

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



**VÝVOJ A OPTIMALIZACE KROKU ÚPRAVY VZORKU
PRO RYCHLÉ CHROMATOGRAFICKÉ ANALÝZY**

Dizertační práce

Hradec Králové 2017

Mgr. Veronika Pilařová

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

.....

V Hradci Králové dne 2. 1. 2017

Veronika Pilařová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za možnost být její postgraduální studentkou a stát se tak členem jejího vědeckého týmu. Děkuji za odborné vedení po celé postgraduální studium, všechny cenné rady, zkušenosti a připomínky při laboratorní práci i psaní odborných publikací. Také děkuji panu profesoru Solichovi, vedoucímu katedry, za možnost absolvovat zahraniční stáž na několika prestižních pracovištích a za možnost vycestovat na mezinárodní i tuzemské konference, na kterých jsem mohla prezentovat výsledky své vědecké práce. Všechny získané zkušenosti velmi přispěly k rozšíření mých odborných znalostí a také obohatily můj osobní život.

Děkuji všem kolegům z Katedry analytické chemie, především RNDr. Haně Vlčkové, Ph.D. a Marii Albertovně Khalikové, Ph.D. za spolupráci při vývoji metod, jež jsou obsahem mé dizertační práce, za cenné rady v oblasti přípravy vzorku a analýzy a za přátelský přístup.

Také děkuji kolegům z Katedry farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty (skupina doc. Mladěnký), kolegům z Ústavu klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové (skupina doc. Buchty) a kolegyním z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského v Brně (jmenovitě dr. Benešové a dr. Bělákové) za možnost podílet se na zajímavých výzkumných projektech.

Dále bych chtěla poděkovat profesoru Miroslavu Strnadovi, dr. Karlu Doležalovi a především Mgr. Ondřeji Novákovi, Ph.D. a celému kolektivu Laboratoře růstových regulátorů, Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky za to, že mi umožnili pracovat v jejich laboratoři s moderním přístrojovým vybavením, a za příjemné chvíle strávené nejen na jejich pracovišti.

Také bych na tomto místě ráda poděkovala kolegům ze zahraničí, jmenovitě dr. Karin Ljung a její výzkumné skupině z Umeå Plant Science Centre ve Švédsku a prof. Stigu Pederson-Bjergaardovi a doc. Astrid Gjelstad z Farmaceutické fakulty Univerzity v Oslu za možnost absolvovat na jejich pracovišti odbornou stáž, za možnost rozšířit si znalosti a také za příjemný čas v zahraničí.

Řešení témat této dizertační práce bylo finančně podpořeno grantovými projekty: AZV-ČR 15-29225A, GAUK 253115/2015, GAUK 1948214/2014, GAČR 15-10781S, Norway Grants and EEA NF-CZ07-INS-4-046-2014, TEAB CZ.1.07/2.3.00/20.0235, PRVOUK P37/12 a SVV 260 292 (2016).

Na závěr děkuji své rodině, blízkým a přátelům za jejich podporu, trpělivost a pochopení nejen v průběhu mého doktorského studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Veronika Pilařová

Školitel: doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název dizertační práce: Vývoj a optimalizace kroku úpravy vzorku pro rychlé chromatografické analýzy.

Hlavním cílem dizertační práce je vývoj moderních extrakčních metod pro přečištění vzorků a pro izolování a zakoncentrování analytů z různého biologického materiálu, včetně biologických tekutin (plazma, sérum, poševní výplachy) a rostlinného materiálu. Moderní techniky pro přípravu vzorku přinášejí celou řadu výhod jako je snížení objemu vzorku a rozpouštědel, urychlení extrakce, či lepší přečištění vzorků, odstranění molekul matrice a snížení vlivu matricových efektů. Extrakty získané moderními mikroextrakčními přístupy lze obvykle analyzovat separačními metodami jako jsou ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie a superkritická fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Tyto separační metody umožňují rychlou analýzu s citlivou a selektivní detekcí a zvyšují také prostupnost vzorků laboratoří.

Jednotlivé projekty ukazují možnost využití moderních trendů v oblasti úpravy vzorku, kde pro extrakci analytů byly využity metody mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS), mikroextrakce na tuhou fázi pomocí plněných špiček pipet (μ -SPE-PT), nebo paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán (PALME). Tyto extrakční techniky byly v některých pracech porovnávány s tradičními postupy jako je srážení proteinů a extrakce na tuhou fázi (analýza kvercetinu a jeho metabolitů), či vzájemně mezi sebou (analýza farnesolu a tyrosolu v poševních výplacích, extrakce statinů pomocí μ -SPE-PT). Optimalizována byla také první metoda PALME pro extrakci polárních bazických látek z lidské plazmy. Nová v μ -SPE-PT byla vyvinuta pro selektivní izolaci auxinů z rostlinného materiálu. V rámci vypracování dizertační práce byla také vyvinuta extrakce z kapaliny do kapaliny pro následnou SFC analýzu izomerních forem vitamínu E.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Mgr. Veronika Pilařová

Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Dissertation Thesis: Development and optimization of sample preparation step for fast chromatographic analysis.

The aim of the dissertation thesis is the development of modern extraction methods for the sample purification and for the analytes isolation and preconcentration from various biological materials, including biological fluids (plasma, serum, vaginal lavages) and plant material. Modern approaches have a lots of advantages such as a lower consumption of sample and organic solvents, extraction speed-up, better sample purification, matrix removal and lower influence of matrix effects. Extracts from modern microextraction methods can be analyzed by separation methods including ultra-high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography coupled with mass spectrometry. The separation methods enable fast high-throughput analysis with sensitive and selective detection.

Individual projects show the possibility of use of the modern approaches in the sample preparation field, where the microextraction by packed sorbent (MEPS), microextraction by solid phase extraction in pipette tips (μ -SPE-PT), or parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) can be used for the extraction of analytes. These extraction methods were compared with traditional sample preparation procedures such as protein precipitation and solid phase extraction (analysis of quercetin and its metabolites), modern approaches compared with each other (analysis of farnesol and tyrosol in vaginal lavage, statins extraction using μ -SPE-PT). The first PALME method for extraction of polar basic drugs from human plasma was optimized. New μ -SPE-PT for the selective isolation of auxins from plant material was developed. Liquid-liquid extraction for SFC analysis to determine vitamin E isomeric forms was developed as the other part of the work.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>2-EP</i>	2-ethylpyridin
<i>4-MC</i>	4-methylcatechol
<i>ACN</i>	acetonitril
<i>APCI</i>	chemická ionizace za atmosférického tlaku
<i>API</i>	ionizace za atmosférického tlaku
<i>AT</i>	atorvastatin
<i>ATL</i>	atorvastatin lakton
<i>CE</i>	kolizní energie
<i>CI</i>	chemická ionizace
<i>CSF</i>	cerebrospinální tekutina
<i>cSFC</i>	kapilární superkritická fluidní chromatografie
<i>DBS</i>	suché krevní kapky
<i>DEHP</i>	2-diethylhexylfosfát
<i>DI-MS</i>	přímý nástřik do hmotnostního spektrometru
<i>DLLME</i>	disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
<i>DMS</i>	suché skvrny matrice
<i>DPS</i>	suché skvrny plazmy
<i>DPX</i>	disposable pipette tip extraction
<i>d-SPE</i>	disperzní extrakce na tuhou fázi
<i>DSS</i>	suché skvrny slin
<i>DUS</i>	suché skvrny moči
<i>EI</i>	elektronová ionizace
<i>EMA</i>	European Medicines Agency
<i>EME</i>	extrakce pomocí elektromembrány
<i>ESI</i>	ionizace elektrosprejem
<i>EtOH</i>	ethanol
<i>GC</i>	plynová chromatografie
<i>HFA</i>	3-hydroxyfenyloctová kyselina
<i>HF-LPME</i>	mikroextrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna

<i>HFP</i>	3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina
<i>HILIC</i>	chromatografie hydrofilních interakcí
<i>HPLC</i>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>HVA</i>	homovanilinová kyselina
<i>IAA</i>	indolyl-3-octová kyselina
<i>IpOH</i>	isopropanol
<i>IRN</i>	isorhamnetin
<i>IS</i>	vnitřní standard
<i>LC</i>	kapalinová chromatografie
<i>LLE</i>	extrakce z kapaliny do kapaliny
<i>LLOQ</i>	dolní limit kvantifikace
<i>LOD</i>	limit detekce
<i>LOQ</i>	limit kvantifikace
<i>LSER</i>	metodologie pro klasifikaci kolon a mobilních fází na základě lineární solvatační energie (linear solvent energy relationship)
<i>MeOH</i>	methanol
<i>MEPS</i>	mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu
<i>MIP</i>	molekulárně vtištěné polymery
<i>MW</i>	molekulová hmotnost
<i>NP-HPLC</i>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normálních fázích
<i>PAA</i>	3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina
<i>Pα-EME</i>	paralelní extrakce pomocí elektromembrány
<i>PALME</i>	paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán
<i>PEP</i>	polymerní sorbent vhodný pro zadržení polárních i méně polárních látek (polar enhanced polymer)
<i>PFP</i>	fluorofenyl
<i>PG</i>	floroglucinol
<i>PGC</i>	porézní grafitický uhlík
<i>PP</i>	srážení proteinů
<i>PTFE</i>	polytetrafluoroethylen
<i>PTV</i>	pitavastatin

<i>PTVL</i>	pitavastatin lakton
<i>PV</i>	pravastatin
<i>PVL</i>	pravastatin lakton
<i>Q-3-Gl</i>	kvercetin-3-o-glukuronid
<i>QCE</i>	kvercetin
<i>QuEChERS</i>	typ disperzní extrakce na tuhou fázi (<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Save Extraction</i>)
<i>RAM</i>	materiály s omezeným přístupem
<i>RAX</i>	aniontově výměnný sorbent (retain anion exchange)
<i>RP-HPLC</i>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
<i>RSD</i>	relativní směrodatná odchylka
R_t	retenční čas
<i>RUT</i>	rutin
<i>RV</i>	rosuvastatin
<i>RVL</i>	rosuvastatin lakton
<i>S/N</i>	poměr signálu k šumu
<i>SBSE</i>	sorpční extrakce míchadlem
<i>SDB</i>	styren divinylbenzen
<i>SDME</i>	mikroextrakce do jedné kapky rozpouštědla
<i>SFC-MS</i>	superkritická fluidní chromatografie s hmotnostní detekcí
<i>SFE</i>	superkritická fluidní extrakce
<i>SIM</i>	monitorování jednoho iontu
<i>SLE</i>	Extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená tuhou fází
<i>SPE</i>	extrakce na tuhou fázi
<i>SPME</i>	mikroextrakce na tuhou fázi
<i>SRM</i>	sledování vybrané reakce
<i>SV</i>	simvastatin
<i>SVA</i>	kyselina simvastatinu
<i>TFC</i>	chromatografie s turbulentním průtokem
<i>THF</i>	tetrahydrofuran
<i>TMX</i>	tamarixetin

<i>UHPLC-MS/MS</i>	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
<i>UHPSFC-MS</i>	ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí
<i>ULOQ</i>	horní limit kvantifikace
<i>μ-dSPE-PT</i>	disperzní mikroextrakce na tuhou fázi pomocí plněných špiček pipet
<i>μ-SPE-PT</i>	mikroextrakce na tuhou fázi pomocí plněných špiček pipet

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	5
ABSTRAKT	7
ABSTRACT.....	9
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	11
1 ÚVOD.....	19
2 CÍL PRÁCE	21
3 TEORETICKÁ ČÁST	23
3.1 Úprava biologických vzorků před analýzou.....	23
3.1.1 Konvenční metody pro úpravu biologických vzorků	23
3.1.2 Moderní metody a trendy v úpravě vzorků	26
3.2 Rychlé chromatografické metody	42
3.2.1 Účinnost chromatografického systému	42
3.2.2 Moderní trendy v kapalinové chromatografii	43
3.2.3 Spojení rychlé chromatografie s hmotnostní detekcí	63
3.3 Validace analytických metod	65
3.3.1 Validační parametry.....	66
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	70
4.1 Vývoj a optimalizace UHPSFC-MS metody pro stanovení tokoferolů a tokotrienolů v lidském séru	70
4.1.1 Úvod do problematiky a cíl práce	70
4.1.2 Chemikálie.....	71
4.1.3 Příprava zásobních a pracovních roztoků	71
4.1.4 Extrakční metoda	71
4.1.5 UHPSFC-MS analýza	72
4.1.6 Vývoj SFC chromatografické metody	73
4.1.7 Optimalizace kroku přípravy vzorku.....	76
4.1.8 Validace metody.....	77
4.1.9 Závěr.....	80
4.2 Vývoj jedнокrokové extrakce polárních látek z plazmy s využitím paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán.....	81
4.2.1 Úvod do problematiky a cíl práce	81
4.2.2 Chemikálie.....	82
4.2.3 Příprava zásobních a pracovních roztoků	82

4.2.4	PALME extrakce.....	82
4.2.5	UHPLC-MS/MS analýza	83
4.2.6	Vývoj extrakční metody.....	84
4.2.7	Validace metody.....	87
4.2.8	Závěr.....	87
4.3	Optimalizace μ -SPE-PT metody pro analýzu statinů v lidském séru za využití komerčně dostupných a laboratorně připravených špiček pipet	89
4.3.1	Úvod do problematiky a cíl práce	89
4.3.2	Chemikálie	89
4.3.3	Příprava zásobních a pracovních roztoků	90
4.3.4	Extrakční metoda	90
4.3.5	UHPLC-MS/MS analýza	91
4.3.6	Optimalizace extrakční metody	91
4.3.7	Validace metody.....	93
4.3.8	Závěr.....	94
4.4	Vývoj a optimalizace extrakčních metod PP, SPE, MEPS a μ -SPE-PT pro stanovení kvercetinu a jeho metabolitů v potkaní plazmě s využitím ve farmakokinetických studiích..	96
4.4.1	Úvod do problematiky a cíl práce	96
4.4.2	Chemikálie.....	98
4.4.3	Příprava zásobních a standardních roztoků	98
4.4.4	Extrakční metody	99
4.4.5	UHPLC-MS/MS analýza	100
4.4.6	Optimalizace UHPLC-MS/MS analýzy.....	102
4.4.7	Optimalizace extrakčních metod	105
4.4.8	Validace metody.....	110
4.4.9	Závěr.....	110
4.5	Vývoj a optimalizace mikroextrakčních metod MEPS a μ -SPE-PT pro stanovení farnesolu a tyrosolu jako quorum-sensing molekul ve vzorcích poševních výplachů	112
4.5.1	Úvod do problematiky a cíl práce	112
4.5.2	Chemikálie.....	113
4.5.3	Příprava zásobních a pracovních roztoků	113
4.5.4	Extrakční metoda	113
4.5.5	UHPLC-MS/MS analýza	114
4.5.6	Optimalizace UHPLC-MS/MS metody	115
4.5.7	Stabilitní studie.....	117

4.5.8	Optimalizace extrakčních metod	119
4.5.9	Validace metody.....	123
4.5.10	Závěr.....	126
4.6	Vývoj a optimalizace metody pro rychlý screening metabolitů auxinu v mutantech rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i>	127
4.6.1	Úvod do problematiky a cíl práce	127
4.6.2	Chemikálie.....	128
4.6.3	Rostlinný materiál	128
4.6.4	Extrakce IAA a jeho metabolitů.....	128
4.6.5	UHPLC-MS/MS analýza	129
4.6.6	Validace metody.....	131
4.6.7	Screening mutantů rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i>	131
4.6.8	Závěr.....	132
5	ZÁVĚR	134
6	LITERATURA.....	137
7	PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ A KONFERENČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ.....	147
7.1	Seznam publikovaných vědeckých prací souvisejících s dizertací.....	147
7.2	Seznam plakátových sdělení a přednášek.....	148
7.2.1	Plakátová sdělení	148
7.2.2	Přednášky.....	149
7.3	Řešené granty a projekty (hlavní řešitel)	150
8	Přílohy	151
8.1	Příloha 1	151
8.2	Příloha 2	166
8.3	Příloha 3	175
8.4	Příloha 4	189
8.5	Příloha 5	201
8.6	Příloha 6	215
8.7	Příloha 7	251

1 ÚVOD

Úprava biologických vzorků tvoří až 80 % celkového času analýzy, do kterého je kromě samotné úpravy vzorku včetně jeho odběru zařazena vlastní analýza a také zpracování a vyhodnocení naměřených dat a interpretace získaných výsledků.

Trendem posledních let je rozvoj nových extrakčních technik, které umožňují selektivně izolovat vybrané analyty, zakonzentrovat je a odstranit případné interferující látky. Nové extrakční metody jsou založeny na principech konvenčně používaných metod úpravy vzorku, jako jsou extrakce na tuhou fázi a extrakce z kapaliny do kapaliny. Nespornou výhodou mikroextrakčních technik je oproti výše zmíněným metodám především nízká spotřeba rozpouštědel, tak i spotřeba malého množství samotného vzorku. Tyto techniky by navíc měly zkrátit čas analýzy a umožnit lepší prostupnost vzorků laboratoří. Mezi mikroextrakční techniky s takovým potenciálem jsou řazeny mikroextrakce na tuhou fázi pomocí plněných špiček pipet (μ -SPE-PT), paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán (PALME), extrakce kapalinou podpořená tuhou fází (SLE) či analýza suchých skvrn matrice (DMS).

Kromě rozvoje nových rychlých extrakčních metod došlo také k významnému rozvoji moderních instrumentálních systémů umožňujících rychlé a citlivé analýzy v řádech minut, které jsou stále častěji využívány v klinických a farmaceutických laboratořích. V současné době se kromě vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzních fázích začínají běžně používat i další směry chromatografie. Mezi tyto směry jsou řazeny ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC) s UV či s citlivější hmotnostní detekcí, chromatografie hydrofilních interakcí, vícemodální chromatografie, ultra-vysokoúčinná superkritická fluidní chromatografie, využití monolitických kolon, či využití povrchově porézních částic. Mezi hlavní výhody patří kromě vysoké separační účinnosti a zrychlení analýzy především možnost separace polárních látek, která byla při použití kapalinové chromatografie v reverzním módu značně obtížná.

Současné použití moderních trendů v úpravě vzorků a nových chromatografických směrů zvyšuje prostupnost vzorků laboratoří a umožňuje citlivou a selektivní analýzu látek izolovaných z komplexních vzorků.

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem dizertační práce je vývoj moderních mikroextrakčních metod pro přečištění komplexních vzorků a izolaci analytů různých fyzikálně-chemických vlastností. Takto upravené vzorky byly separovány rychlými separačními chromatografickými metodami spojenými s hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS, UHPSFC-MS). Nedílnou součástí práce byla následná validace vyvinutých extrakčních metod pro úpravu vzorku před vlastní analýzou. Pro izolaci analytů byly využívány nejen tradiční extrakční metody jako je srážení proteinů (PP), extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakce na tuhou fázi (SPE), ale především moderní mikroextrakční techniky odvozené od metod konvenčních, a to mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS), mikroextrakce na tuhou fázi pomocí plněných špiček pipet (μ -SPE-PT), nebo paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán (PALME).

Konkrétně byla tato práce zaměřena na:

1. Vývoj LLE a UHPSFC metody s hmotnostní detekcí pro extrakci a separaci 8 izomerních forem vitamínu E v lidském séru
 - Projekt vznikl ve spolupráci s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským v Brně a Laboratoří růstových regulátorů v Olomouci (skupina dr. Ondřeje Nováka) a výsledky byly publikovány v časopise *Analytica Chimica Acta*.
2. Vývoj PALME metody pro analýzu polárních bazických léčiv
 - Projekt vznikl ve spolupráci s Univerzitou v Oslu a výsledky byly publikovány v časopise *Journal of Chromatography B*.
3. Vývoj metody μ -SPE-PT pro analýzu statinů za použití komerčně dostupných a laboratorně připravovaných plněných špiček pipet
 - Práce vznikla ve spolupráci s Laboratoří růstových regulátorů v Olomouci (skupina dr. Ondřeje Nováka). Publikace je sepsána a odeslána do časopisu *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
4. Vývoj a optimalizace konvenčních extrakčních a vybraných mikroextrakčních metod pro analýzu kvercetinu a jeho metabolitů (polyfenolické kyseliny a konjugované deriváty) v potkaní plazmě

- Projekt vznikl ve spolupráci s Katedrou farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy (doc. Mladěnka) a Laboratoří růstových regulátorů v Olomouci (skupina dr. Ondřeje Nováka). Aplikace analytických metod pro farmakologické studie vybraných látek byly publikovány v časopisech *Molecular Nutrition and Food Research*, *Redox Report* a *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. Publikace zaměřená na vlastní analytickou metodu je ve fázi sepisování.
- 5. Vývoj mikroextrakčních technik pro analýzu farnesolu a tyrosolu z poševních výplachů pomocí UHPLC-MS/MS
 - Práce vznikla ve spolupráci s Ústavem klinické mikrobiologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové, publikace je sepisována.
- 6. Vývoj rychlé analytické metody pro metabolický screening růstových hormonů na bázi auxinů mutantů *Arabidopsis thaliana*
 - Práce vznikla ve spolupráci spolupráci s Umeå Plant Science Centre (skupina dr. Karin Ljung) a Laboratoří růstových regulátorů v Olomouci (skupina dr. Ondřeje Nováka). Publikace je sepsána a odeslána do recenzního řízení v časopisu *Journal of Experimental Botany*.

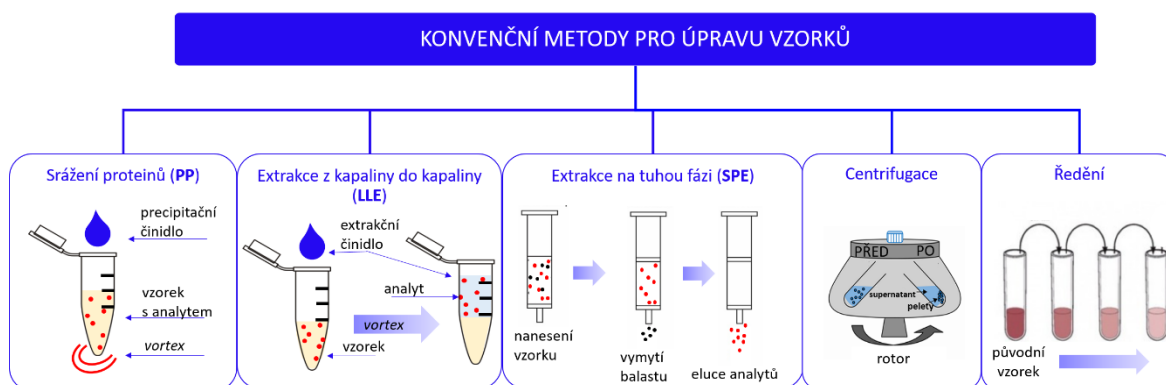
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Úprava biologických vzorků před analýzou

Biologický materiál v širším slova smyslu zahrnuje biologické tekutiny, rostlinný materiál, živočišné tkáně a patří mezi nejčastěji analyzované matrice. Pro farmaceutickou analýzu jsou klíčové především vzorky biologických tekutin a tkání (krev, plazma, sérum, moč, sliny, vlasy, atd.). Jsou to velmi komplexní matrice, které kromě vybraných analytů obsahují mnoho dalších látek, jako jsou proteiny, soli, fosfolipidy a další organické látky kyselého či bazického charakteru, které mohou být svými vlastnostmi podobné analyzovaným sloučeninám. Jelikož tyto balastní složky matrice mohou interferovat s analyty, a tak ovlivnit výsledky stanovení, je nutné je před vlastním nadávkováním do analytického systému odstranit. K tomu jsou používány metody pro úpravu vzorku, jejichž cílem je nejen vzorek zbavit interferujících látek, které jsou mnohdy nekompatibilní s analytickým systémem (způsobují jeho ucpávání, atd.), ale také zakoncentrovat a izolovat vybraný analyt, který je ve vzorku často přítomen ve velmi nízkých koncentracích. Metody pro úpravu vzorků lze na základě četnosti používání a doby používání v praxi rozdělit do dvou skupin, na metody konvenční a metody moderní, které jsou od nich odvozené [1] - [4].

3.1.1 Konvenční metody pro úpravu biologických vzorků

Konvenční či tradiční metody jsou široce využívány ve většině laboratoří pro rutinní úpravu vzorků. Mezi jejich výhody patří snadná optimalizace metody, reprodukovatelnost výsledků, dobrá validovatelnost metody či možnost automatizace pracovního postupu. Pro jejich provedení není nutné žádné speciální vybavení, veškerý materiál, který je k jejich realizaci třeba, je snadno komerčně dostupný. Mezi konvenční techniky (Obr. 1) řadíme srážení proteinů (PP), extrakci z kapaliny do kapaliny (LLE), extrakci na tuhou fázi (SPE), centrifugaci a ředění vzorku [4][5].



Obr. 1: Rozdělení konvenčních metod na pět základních technik – srážení proteinů, extrakci z kapaliny do kapaliny, extrakci na tuhou fázi, centrifugaci a ředění [6]. Obrázky převzaty ze zdrojů [6]-[8] a upraveny.

Metody centrifugace, ředění a srážení proteinů jsou velmi rychlé a jednoduché na provedení. Centrifugace je metoda založená na působení odstředivé síly aplikované na vzorek. Vlivem působení odstředivé síly dochází k usazení pevných látek na dno nádoby, ve které je vzorek umístěn, a jejich oddělení od kapalných složek vzorku. Centrifugace může také sloužit k homogenizaci vzorku, pokud jsou do biologického materiálu přidány kuličky. Ty rozmělní materiál vzorku, který je poté odstředivou silou oddělen. Další možností provedení centrifugace je vložení filtru, skrz který vzorek musí během centrifugace projít. Dojde tak nejen k odstředění, ale i selektivnímu odstranění vybraných nečistot [10]-[12]. Metoda ředění vzorku spočívá v přidání rozpouštědla mísitelného se vzorkem a případně vnitřních standardů do vzorku. Ředění neodstraňuje žádné interference, přidáním většího objemu rozpouštědla dojde pouze ke snížení koncentrace molekul matrice i analytů ve vzorku. Mezi výhody techniky patří především rychlé provedení, nenáročnost, nízká cena a možnost snížení matricových efektů. Ředění lze kromě sledování známých analytů použít i k necílenému hledání molekul ve vzorku, pokud to dovoluje povaha matrice [13][14]. Srážení proteinů obvykle následované centrifugací, případně jiným krokem odstraňujícím precipitát, je vhodná pro extrakci hydrofobních i hydrofilních molekul, čímž se řadí mezi nejpoužívanější metody v bioanalýze. Princip PP spočívá v přidání organického rozpouštědla (acetonitril - ACN, methanol - MeOH), či roztoku organických nebo anorganických kyselin, které jsou mísitelné se vzorkem, k malému objemu biologického vzorku. Přidané srážecí činidlo rozruší vazby proteinů, vzniká precipitát a supernatant, který je po oddělení sráženiny dále analyzován. Získaný extrakt po této úpravě může nadále obsahovat další

interferující složky z matrice. Proto metody využívající PP často nedosahují takové citlivosti jako selektivnější techniky pro přípravu vzorků [2][15][16].

Extrakce z kapaliny do kapaliny je jednoduchá metoda založená na přechodu analytu z vodného vzorku do extrakčního rozpouštědla, které je s vodou nemísitelné, na základě rozdělovacího koeficientu oktanol-voda. LLE je možné provádět ve skleněných zkumavkách ve větších objemech, nebo ve vialkách či eppendorfkách v menších objemech. Extrakční metoda je výhodnější pro látky snáze rozpustné v nepolárních rozpouštědlech. Účinnost extrakce lze ovlivnit použitým rozpouštědlem, jeho množstvím, dobou extrakce či změnou pH roztoku vzorku. Výhodou techniky LLE je omezený přechod balastních látek z matrice do extrakčního činidla, čímž mohou být sníženy matricové efekty při LC-MS analýzách a zvýšena citlivost analýzy. LLE extrakce je pro svoji jednoduchost a snadnou proveditelnost stále často používána ve farmaceutických a dalších analýzách, ač je poměrně časově náročná a pro účinnou extrakci v konvenčním LLE je potřeba velké množství organických rozpouštědel. Pro další analýzu pomocí LC-MS je obvykle nutné odpaření extrakčního činidla a rozpuštění vzorku v rozpouštědle kompatibilním s mobilní fází. Tento krok odpadá při použití chromatografie na normálních fázích nebo při nástřiku vzorku do SFC systému, kdy je vzorek plně mísitelný s mobilní fází [2][15]-[17].

Poslední konvenční metodou pro úpravu vzorků je extrakce na tuhou fázi. SPE je založena na afinitě analytu k tuhé fázi ve formě sorbentu a následně k extrakčnímu činidlu, kterým je ze sorbentu vymyt. Sorbent je obvykle uložen v plastových kolonkách, nebo je používán ve formě SPE disků. Mezi běžně používané SPE sorbenty patří silikagel modifikovaný dlouhými uhlíkatými řetězci (C8, C18), iontově výměnné materiály, polymery, imunosorbenty, molekulárně vtištěné polymery (MIP) či materiály s omezeným přístupem (RAM). Volba SPE sorbentu je klíčovým krokem v optimalizaci procedury a vychází z fyzikálně-chemických vlastností analytu, jako je polarita, molekulová hmotnost a acidobazické vlastnosti. Postup SPE extrakce spočívá v několika krocích. Nejprve je třeba sorbent kondicionovat a ekvilibrovat vhodným rozpouštědlem, které je svými vlastnostmi podobné nanášenému vzorku a umožní tak dostatečné zachycení analytu. Po nanesení vzorku je sorbent promyt promývacím činidlem, jehož úkolem je odstranit co nejvíce balastních a interferujících látek a zároveň nevymýt analyt. Posledním krokem SPE procedury je vymytí vhodným elučním činidlem.

Jako eluční činidla jsou často používána organická rozpouštědla, ke kterým má analyt vysokou afinitu a je v nich dobře rozpustný. Složení vhodného elučního činidla vychází opět z fyzikálně-chemických vlastností analyzovaných látek a použitého sorbentu. Obvykle se jedná o roztoky ACN a MeOH s vodou, s přídavkem kyselin nebo zásad. Mezi výhody SPE patří nižší spotřeba rozpouštědel v porovnání s LLE, vyšší selektivita extrakce, reprodukovatelnost výsledků, vyšší výtěžnosti extrakce a možnost automatizace procedury. Nevýhodou může být potřeba speciálního zařízení pro provedení (SPE manifoldu a vakuové pumpy), v porovnání s předchozími metodami (Tab. 1) náročnost provedení a především použití kolonky se sorbentem pouze na jednu analýzu, které činí SPE extrakci finančně méně výhodnou. I přes výše zmíněné nevýhody je však SPE pravděpodobně nejpoužívanější metodou v mnoha laboratořích díky jejím nesporným výhodám [2][9]-[15][18].

	centrifugace	ředění	PP	LLE	SPE
způsob provedení	zkumavky, eppendorfky	zkumavky, eppendorfky	zkumavky, eppendorfky	zkumavky, eppendorfky	kolonky a disky s SPE sorbentem
obvyklý objem vzorku	50 – 500 µl	10 – 1000 µl	50 – 500 µl	50 – 1000 µl	500 – 1000 µl
obvyklý objem extrakčního činidla	0 µl	10 – 10000 µl	100 – 500 µl	600 – 2000 µl	500 – 2000 µl
typy činidel	-	rozpouštědla a mísitelná se vzorkem	organická rozpouštědla, kyseliny	rozpouštědla nemísitelná se vzorkem	rozpouštědla s vysokou eluční silou dle typu analytu
časová náročnost	✗	✗	✗	✓	✓
jednoduchost provedení	✓	✓	✓	✓	✗
selektivita metody	✗	✗	✗	✓	✓
nutnost speciálního vybavení	✗	✗	✗	✗	✓

Tab. 1: Souhrnné informace o konvenčních metodách, jejich výhody a nevýhody. ✓- ano, ✗-ne.

3.1.2 Moderní metody a trendy v úpravě vzorků

V posledních dvou až třech dekádách dochází k rychlému rozvoji nových metod, které jsou využívány pro úpravu biologických vzorků. Tyto rozvíjející se metody jsou často odvozeny od metod tradičních, a to především od SPE a LLE. Cílem vývoje nových

metod (Obr. 2) je především zvýšit prostupnost vzorků v laboratoři a umožnit tak rychlejší analýzu a vyhodnocení dat [2][4][16][19]-[21].



Obr. 2: Souhrn požadavků na moderní extrakční metody.

Moderní extrakční metody lze rozdělit do několika skupin (Obr. 3), a to na on-line metody, vysoce selektivní extrakční metody a na metody mikroextrakční, které lze dále rozdělit na metody založené na principu SPE a LLE [4][20].

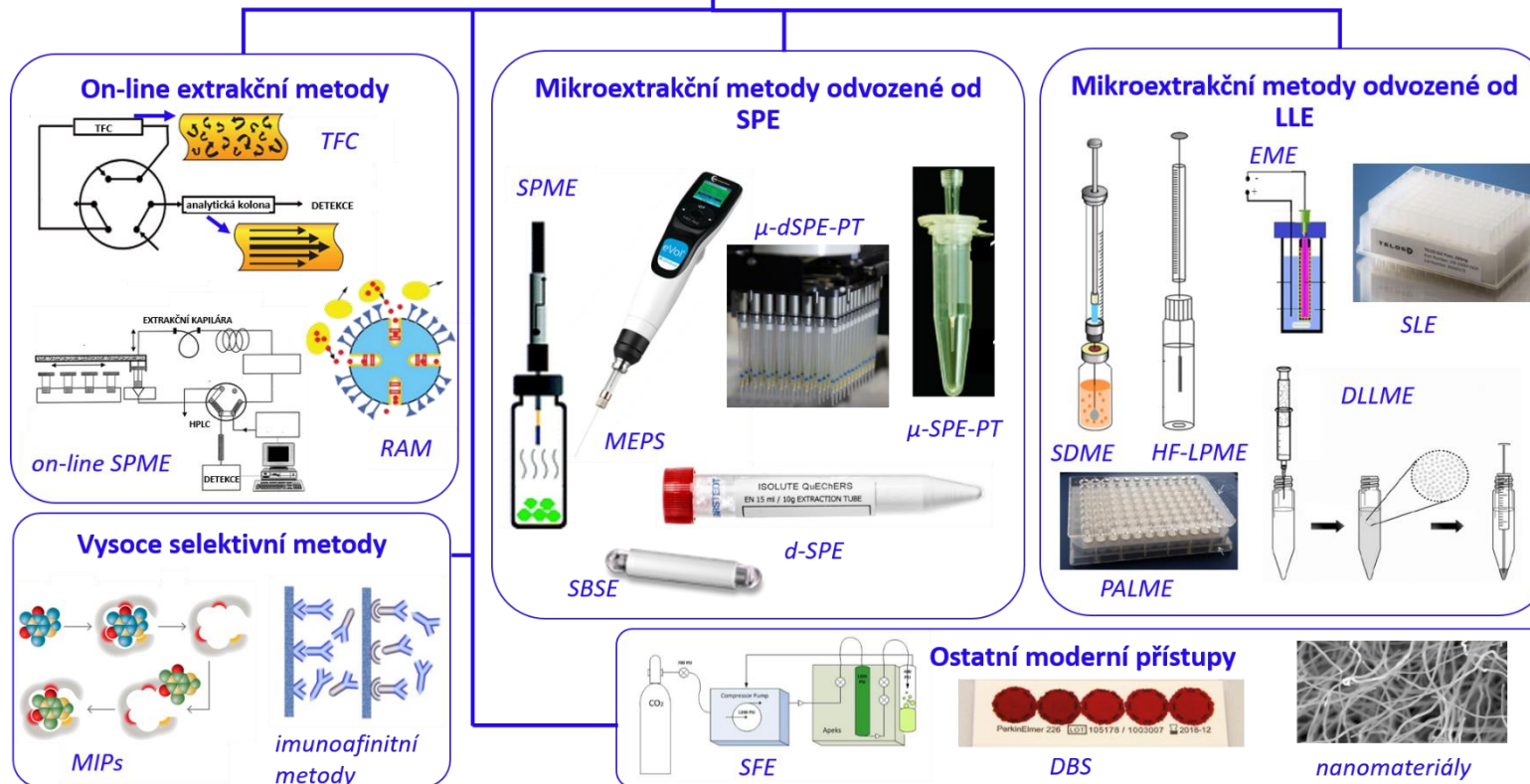
Mezi on-line mikroextrakční metody jsou řazeny chromatografie s turbulentním průtokem (TFC), on-line mikroextrakce na tuhou fázi (in-tube SPME) a materiály s omezeným přístupem (RAM). On-line extrakční metody umožňují přímý nástřik vzorků do analytického systému, kde dochází k oddělení molekul matrice, v případě TFC a RAM k oddělení velkých molekul, od analytů na základě fyzikálně-chemických vlastností molekul a následnou separací vlastních analytů [2].

Vysoce selektivní metody pro extrakci spočívají v selektivním záchytu vybraných analytů a jejich následném vymytí a analýze. Do této skupiny jsou řazeny metody využívající imunosorbenty a MIPs. Imunoafinitní metody jsou založeny na interakci antigen – protilátka, kdy dochází k selektivnímu vyvázání analytu. Výhodou je potlačení matricových efektů a možnost zachycení a analýzy i velmi nízkých koncentrací analytů [22]-[24]. MIPs jsou syntetické materiály, kde jsou při syntéze na základě vloženého templátu molekuly vytvořeny kavity. Analyty jsou pak do těchto dutin zachytávány na základě interakce zámek-klíč. Látky obdobné nebo stejné struktury se stejnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako jsou templáty, jsou v kavitě zadrženy. Molekula, která strukturně do kavity nezapadá, nemůže být zadržena [25].

Poslední velkou skupinou moderních extrakčních metod jsou metody mikroextrakční. Využívají malých objemů vzorků a činidel. Často ale vyžadují určitou zručnost a praktické zkušenosti analytika. Mikroextrakční metody zažívají velký rozkvět a jsou děleny do dvou podskupin podle principu extrakce. První skupinou jsou extrakce odvozené od SPE. Mezi ně jsou řazeny mikroextrakce na tuhou fázi (SPME), mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS), mikroextrakce na tuhou fázi pomocí plněných špiček pipet (μ -SPE-PT), disperzní extrakce na tuhou fázi (d-SPE, např. QuEChERS), disperzní mikroextrakce pomocí plněných špiček pipet (μ -dSPE-PT) a sorpční extrakce míchadlem (SBSE). Druhou skupinu tvoří mikroextrakce založené na principu LLE. Příkladem jsou mikroextrakce do jedné kapky rozpouštědla (SDME), mikroextrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna (HF-LPME), disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME), paralelní mikroextrakce pomocí umělých kapalných membrán (PALME), extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená tuhou fází (SLE) či extrakce využívající elektromembrány (EME) [16][18][20][26].

V posledních letech lze pozorovat i další trendy, mezi něž patří využití nanomateriálů jako sorbentů pro extrakce, zavedení superkritické fluidní extrakce (SFE), nebo analýza DMS [16]. Vybrané moderní přístupy umožňující rychlou prostupnost vzorků laboratoří budou podrobně diskutovány v následující části práce.

MODERNÍ METODY PRO ÚPRAVU VZORKŮ



Obr. 3: Rozdělení moderních přístupů v úpravě biologických vzorků. TFC - chromatografie s turbulentním průtokem, SPME – mikroextrakce na tuhou fázi, RAM - materiály s omezeným přístupem, MIPs – molekulárně vtištěné polymery, MEPS – mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu, μ -dSPE-PT – disperzní mikroextrakce pomocí plněných špiček pipet, SBSE - sorpční extrakce míchadlem, d-SPE – disperzní extrakce na tuhou fázi (např. QuEChERS), μ -SPE-PT - mikroextrakce pomocí plněných špiček pipet, SDME – mikroextrakce pomocí jedné kapky rozpouštědla, HF-LPME – extrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna, DLLME – disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny, EME - extrakce využívající elektromembrány, PALME - paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán, SLE - extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená tuhou fází, SFE – superkritická fluidní extrakce, DBS – suché krevní kapky. Obrázky převzaty ze zdrojů [27]-[47] a následně upraveny.

3.1.2.1 Mikroextrakce pomocí plněného sorbentu – MEPS

MEPS je miniaturizovanou verzí SPE metody s několika odlišnostmi. Na rozdíl od SPE, kde je sorbent pro zachycení analytu uložen v plastové kolonce, je tuhá fáze integrována přímo v kartridži v jehle, kterou je nasáván vzorek a všechna činidla. Sorbenty používané při MEPS extrakci jsou shodné se sorbenty pro SPE. Běžně dostupné jsou fáze s řetězcí C2, C8, C18, iontově-výměnné sorbenty, polymerní fáze, MIP, RAM, fáze na bázi grafitického uhlíku. Množství sorbentu uloženého v patroně je oproti obvyklým desítkám miligramů pro SPE nižší, a to 1 – 2 mg. Jehla se sorbentem je připevněna na stříkačku o objemu 100 – 500 μl , která umožňuje nasávání jednotlivých roztoků ručně (Obr. 4), automaticky pomocí speciální pipety, či on-line ve spojení se separační technikou, kde je k provedení extrakce zapotřebí automatické stanice [2][3][48]-[50].



Obr. 4: Typy technik MEPS od ruční stříkačky po plně automatizovanou techniku. Obrázek převzat ze zdroje [49] a upraven.

Kroky MEPS procedury jsou obdobné jako postup SPE extrakce. Nejprve je nutné sorbent kondicionovat a ekvilibrovat. Po ekvilibraci kolonky je nanesen vzorek, obvykle objem 10 – 1000 μl . Sorbent se zachycenými analyty je promyt vhodnými činidly pro

odstranění balastních látek z matrice. Posledním krokem je aplikace elučního činidla (obvykle o objemu 100 μ l). Vzorek je nakonec analyzován vybraným systémem – LC, plynovou chromatografií (GC), nebo kapilární elektroforézou s vhodnou detekcí. Po eluci analytu je nutné sorbent opakovaně promýt čistým MeOH nebo ACN, aby došlo k odstranění zbytku balastních látek z důvodu opakovaného použití sorbentu. Jednu patronu s tuhou fází lze použít na desítky až stovky extrakcí podle typu matrice, která je metodou upravována. Při extrakci komplexních matric, jako jsou plazma a krev, může dojít k ucpání sorbentu, kterému lze předejít dostatečným naředěním vzorku či srážením proteinů [1][2][19][48]-[50].

Mezi výhody MEPS extrakce patří kromě opakovaného použití sorbentu nízká spotřeba organických rozpouštědel a vzorku. MEPS umožňuje rychlé, selektivní a reprodukovatelné zakoncentrování analytů, které je možné plně automatizovat [48]-[50].

3.1.2.2 Mikroextrakce pomocí plněných špiček pipet – μ -SPE-PT a μ -dSPE-PT

Mikroextrakce pomocí plněných špiček pipet je další modifikací tradiční SPE extrakce. Od SPE se liší v uložení sorbentu. Ten je umístěn v polypropylenové špičce



Obr. 5: (A) Špičky a možnost paralelního stanovení pomocí μ -dSPE-PT. (B) Špičky a možnost paralelní úpravy vzorku metodou μ -SPE-PT. Obrázky převzaty ze zdrojů [37][51][52] a upraveny.

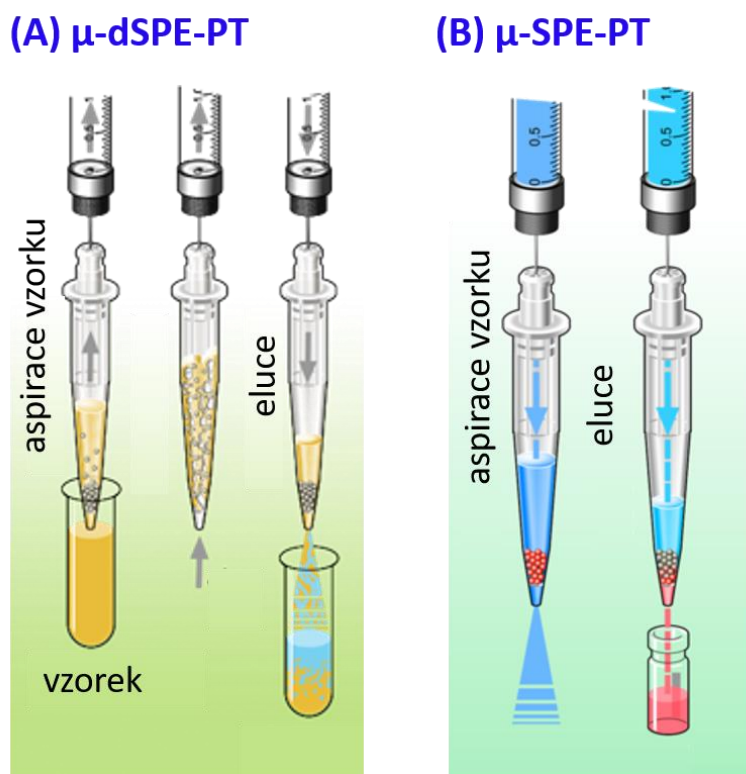
pipety o objemu 200 μ l. Může být buď volně uložený ve formě částic mezi dvěma fritami (disperzní mikroextrakce pomocí plněných špiček pipet- μ -dSPE-PT, či komerčním názvem DPX – disposable pipette tip extraction), nebo je tvořen vrstvou/vrstvami sorbentu bez frit (mikroextrakce pomocí plněných špiček pipet – μ -SPE-PT, komerčním názvem StageTip - STop And Go Extraction Tip).

V obou případech jsou dostupné typy sorbentů obdobné jako pro SPE – monolitické sorbenty, C8 a C18, polymerní

či iontově-výměnné fáze. Provedení extrakce spočívá v několika krocích. Nejprve je

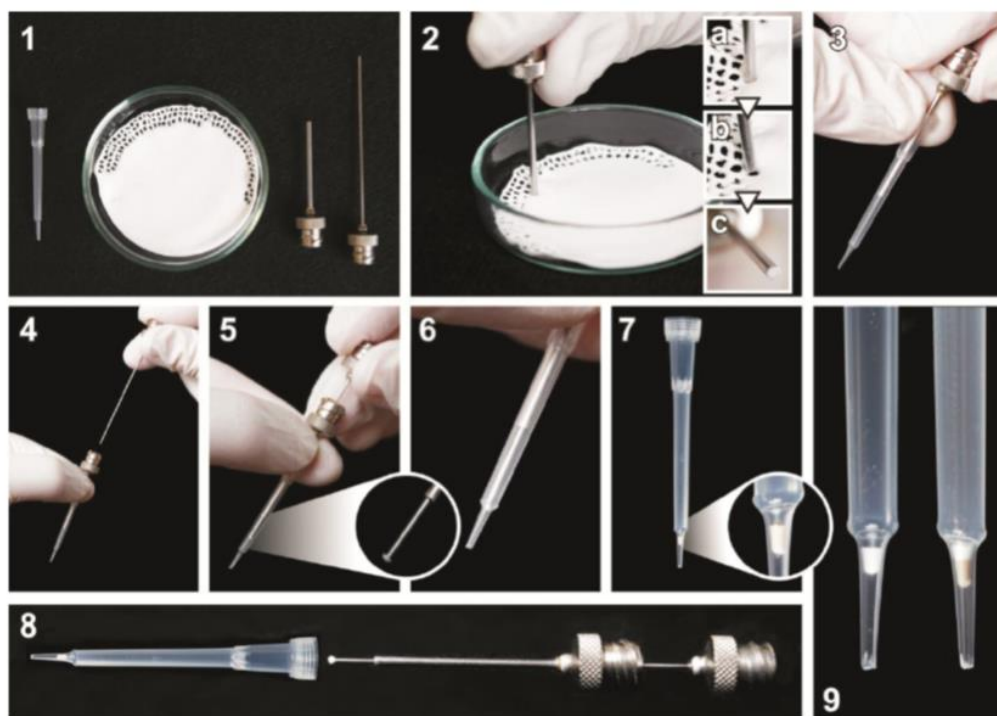
nutné sorbent dostatečně aktivovat, následně je nanášen vzorek. Další krok extrakce spočívá ve vymytí balastních látek matrice a nakonec je analyt eluován vhodně zvoleným elučním činidlem. Špička je na rozdíl od MEPS sorbentu použitelná pouze na jednu extrakci. Obě uspořádání (μ -SPE-PT, μ -dSPE-PT) ale umožňují paralelní úpravu vzorků (Obr. 5), čímž zvyšují prostupnost vzorků laboratoří [16] [37] [53]-[61].

μ -dSPE-PT a μ -SPE-PT se liší ve způsobu nanášení roztoků a vzorků (Obr. 6). Pro μ -dSPE-PT je typické, že veškeré kroky jsou prováděny pomocí pipety aspirováním a vypouštěním kapaliny přes sorbent. Analyt má tedy díky volně uloženým částicím sorbentu větší kontaktní plochu s tuhou fází. Naopak u μ -SPE-PT jsou všechny kapaliny nanášeny stejně jako u SPE, pipetou jsou aplikovány vrchním koncem špičky. Přes sorbent prochází díky aplikovanému tlaku či aplikované odstředivé síly (centrifuga) a veškerý eluát je sbírán do odpadních zkumavek, ve kterých jsou špičky umístěny [37] [53]-[61].



Obr. 6: Způsob nanášení vzorku a dalších roztoků u jednotlivých přístupů využívajících sorbenty uložené v pipetovací špičce. (A) Při μ -dSPE-PT proceduře jsou kapaliny aspirovány pomocí pipety, při μ -SPE-PT (B) postupu jsou nanášeny shora a přes sorbent prochází díky aplikovanému tlaku nebo odstředivé síle. Obrázky převzaty ze zdrojů [62][63] a upraveny.

Špičky se sorbentem pro μ -SPE-PT lze velmi snadno připravit v laboratoři (Obr. 7). Výroba spočívá ve vyříznutí sorbentu z SPE disku pomocí Hamiltonovy stříkačky a přemístění výřezu do špičky. Hlavními výhodami je možnost optimalizace množství a typu sorbentu a získání špiček s fází, která není komerčně dostupná, nebo špiček, ve kterých jsou nakombinované různé typy sorbentů, což je výhodné pro analýzu směsí látek o různých fyzikálně-chemických vlastnostech [37].

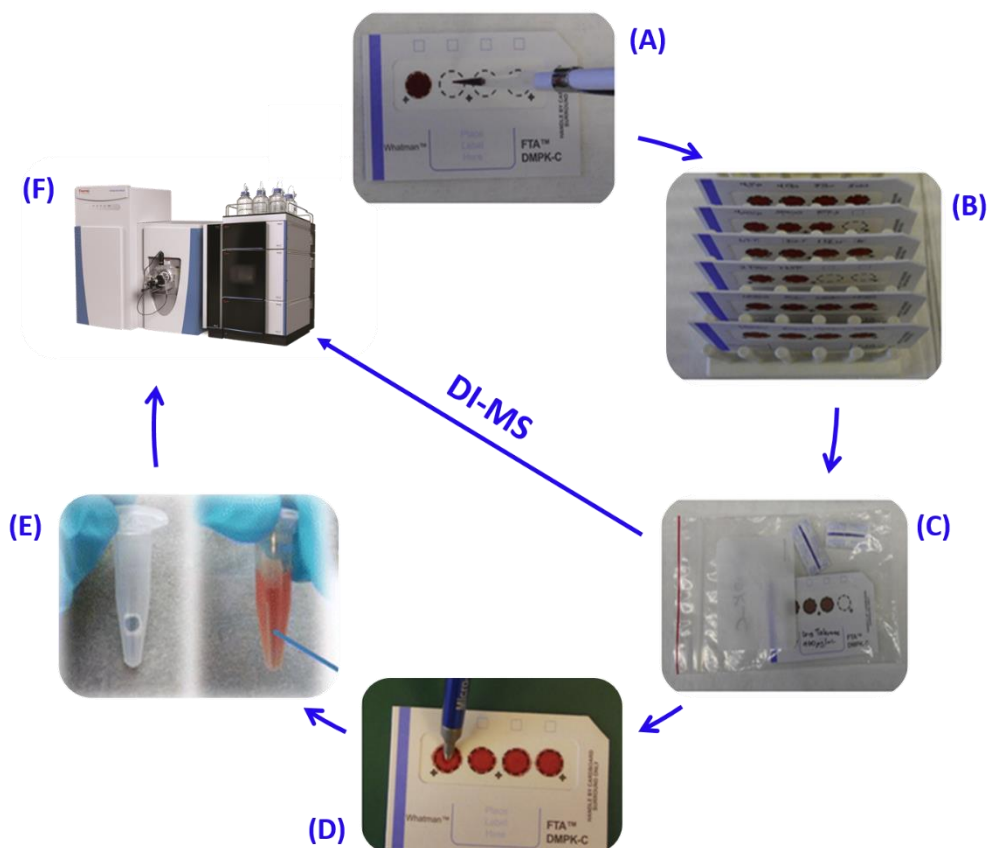


Obr. 7: Příprava špiček pro μ -SPE-PT extrakci v laboratoři. Pro přípravu je třeba SPE disk daného sorbentu a jehly z Hamiltonovy stříkačky o různém průměru (1). Pomocí jehly o větším průměru je vyříznut malý disk (2). Pomocí jehly o menším průměru je vtlačěn do špičky pipety (3 – 8). Celý proces je opakován, dokud není ve špičce dostatečné množství sorbentu. Obrázek převzt ze zdroje [37].

Mezi přednosti obou metod patří jednoduché, nenáročné a rychlé provedení extrakce. Vzhledem k objemu používaných špiček je nutné nanášet malá množství vzorků i ostatních kapalin. Metody jsou tedy šetrné k životnímu prostředí a nejsou ekonomicky náročné. Ekonomickou náročnost snižuje i příprava vlastních plněných špiček v laboratoři. μ -dSPE-PT i μ -SPE-PT jsou robustní techniky s vysokou výtěžností a reprodukovatelností. μ -dSPE-PT lze navíc plně automatizovat [37] [53]-[61].

3.1.2.3 Analýza suchých skvrn matrice – DMS

Analýza suchých skvrn matrice je řazena mezi metody, které jsou stále častěji využívány v rutinních analýzách v klinických a bioanalytických laboratořích. Kromě nejvíce rozšířené analýzy suchých krevních kapek (DBS), je možné stejným způsobem analyzovat i další matrice jako jsou sliny (DSS), plazma (DPS), moč (DUS), či cerebrospinální tekutina (CSF). Provedení analýzy je velmi jednoduché (Obr. 8). Analyzovaná biologická tekutina (15 – 50 μ l) je odebrána na filtrační papír. Po jejím zaschnutí je z filtračního papíru vyříznut disk o průměru 3 – 5 mm, odkud jsou analyty extrahovány vhodným extrakčním činidlem. Extrakt je dále analyzován konvenčními technikami LC-MS nebo GC-MS. Druhou možností je přímá infúze ze skvrny do hmotnostního spektrometru (DI-MS) a následné vyhodnocení naměřených hmotnostních spekter [16][64]-[69].



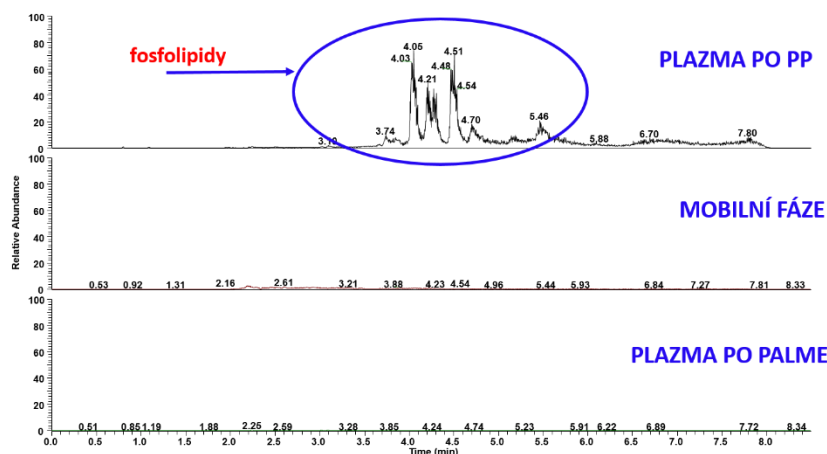
Obr. 8: Průběh analýzy ze suchých krevních kapek (DBS): A – nanesení kapky krve na filtrační papír, B – zaschnutí krevní kapky, C – jednoduché uchování papírku za laboratorních podmínek, D – vyříznutí disku o přesném průměru, E – extrakce látek z disku, F – analýza extraktu pomocí LC-MS, případně přímý nástřik

do hmotnostního spektrometru (DI-MS) a interpretace naměřených spekter. Obrázky převzaty ze zdrojů [70][71] a následně upraveny.

Analýza ze suchých kapek matrice přináší mnoho výhod, mezi které patří především snadný odběr vzorků, který může provést pacient po zaškolení i sám v domácím prostředí. Není tedy nutné navštěvovat speciální pracoviště. Požadované množství tělní tekutiny je minimální, a je tak snížena invazivnost odběru. Proto je metoda DBS používána při neonatálním screeningu genetických poruch. Je také vhodná pro pacienty se zánětem žil, při monitorování lékových hladin, či pro odběry při farmakologických studiích prováděných na zvířatech. Odebrané tekutiny lze po zaschnutí na médiu uchovávat při laboratorní teplotě. Metabolity či látky, které jsou v tělních tekutinách nestabilní, nepodléhají degradaci z důvodu rozložení a denaturace enzymů, jež nestabilitu způsobují. Ze stejného důvodu je zde sníženo i riziko přenosu infekce (např. hepatitida, HIV, atd.) na personál pracující se zaschlými kapkami. Další z výhod DMS je cenová nenáročnost a jednoduchost provedení. Kromě zmíněných výhod je třeba také zmínit nevýhody metody. Vzhledem k malému odebíranému množství vzorku je třeba citlivých analytických přístrojů. [16][64]-[69].

3.1.2.4 Paralelní mikroextrakce pomocí umělých kapalných membrán – PALME

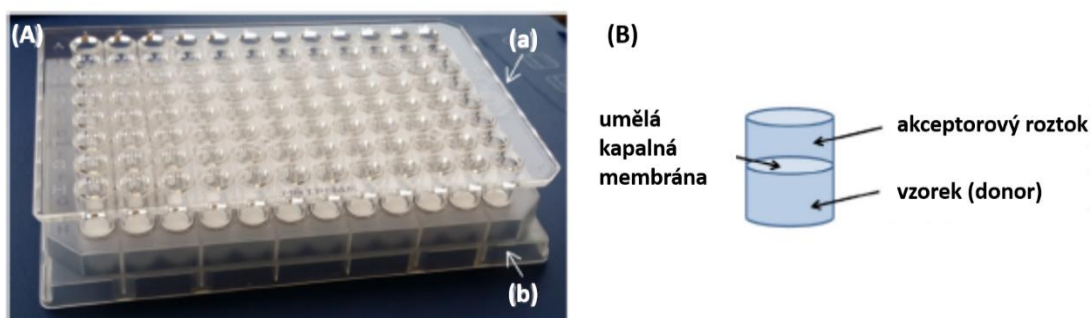
Paralelní mikroextrakce pomocí umělých kapalných membrán, neboli PALME, je jedna z nejnovějších mikroextrakčních technik odvozených od LLE přesněji od HF-LPME. Je založená na umělých kapalných membránách, které jsou tvořeny porézním materiálem (nejčastěji polypropylenem) impregnovaným organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou. Tento film vytváří bariéru mezi vzorkem (donor) a akceptorovým roztokem, které jsou velmi často na bázi vodných roztoků. Vzhledem k fyzikálně-chemickým vlastnostem tak zabrání přechodu balastních látek, jako jsou fosfolipidy, soli, proteiny, z matrice a snižuje tak matricové efekty (Obr. 9). Analyty přechází na základě pasivní difúze [72][73].



Obr. 9: PALME jako funkční metoda pro odstranění fosfolipidů z lidské plazmy. Pomocí UHPLC-MS metody byly analyzovány vzorky plazmy po srážení proteinů (PP) a PALME. Pro porovnání je také přiložen záznam slepého pokusu (samotná mobilní fáze).

Na rozdíl od již zmiňované HF-LPME je PALME uzpůsobena pro paralelní extrakci až 96 vzorků najednou. Je prováděna v destičkách s 96 jamkami. V prvním kroku jsou do jamek donorové destičky nanášeny vzorky o maximálním možném objemu 300 μ l. Vzorkem je obvykle biologická tekutina, u které je třeba upravit pH tak, aby analyty nebyly v ionizované formě. V dalším kroku jsou připraveny umělé kapalně membrány, které tvoří dno každé jamky akceptorové destičky. Na polypropylenovou membránu je napipetováno organické rozpouštědlo (2 – 3 μ l) nemísitelné s vodou. Dovnitř jamky akceptorové destičky je následně napipetován akceptorový roztok o takovém pH, aby sledované analyty přecházely v nabitěm stavu. Pro bazické analyty jsou proto používány kyselé roztoky, pro kyseliny potom roztoky zásaditého pH. Následně je akceptorová destička vložena do destičky donorové, sestava je přikryta víčkem (sendvičový formát, Obr. 10) a vložena na třepačku, kde probíhá vlastní extrakce. Dobu a intenzitu třepání je

třeba optimalizovat stejně jako složení vzorku a akceptorového roztoku [72][73].



Obr. 10: (A) Sendvičový formát sestavy pro PALME extrakci, kde (a) je akceptorová destička, na jejímž dně se nachází membrána, a (b) je jamková destička se vzorky, tzv. donorová destička. (B) představuje jednu jamku pro extrakci jednotlivého vzorku. Obrázek převzat ze zdroje [43] a upraven.

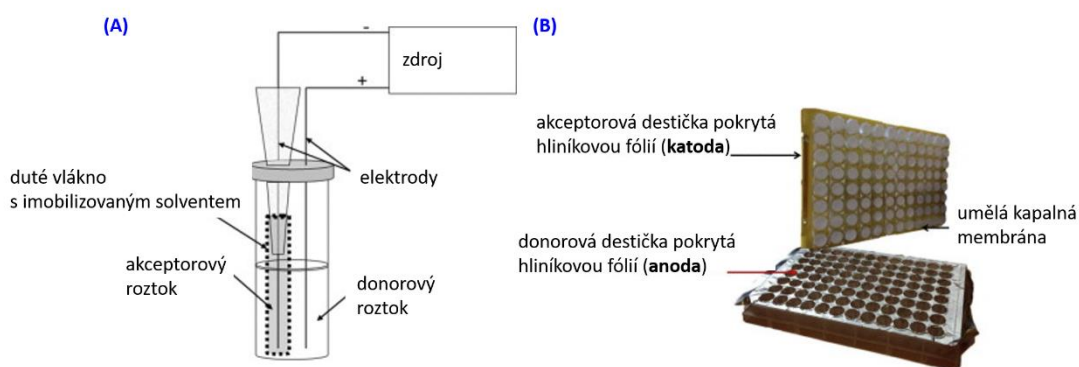
Mezi hlavní výhody PALME patří krátký čas analýzy, kdy je možné během 15 – 60 minut extrahovat až 96 vzorků. Metoda je velmi šetrná k životnímu prostředí, je velmi jednoduchá na provedení a nevyžaduje žádné speciální zaškolení operátora. Finální extrakt nevyžaduje žádné další úpravy a je možné jej po přenesení do insertu ihned dávkovat do konvenčních analytických systémů. Výhodou je také již zmiňované odstranění fosfolipidů, které jsou zodpovědné za vznik matricových efektů při MS detekci [1][43][72][73].

3.1.2.5 Extrakce pomocí elektromembrány – EME, a paralelní extrakce pomocí elektromembrán – Pa-EME

Extrakce pomocí elektromembrány (EME) je dalším typem extrakce odvozené od LPME. Analyty jsou extrahovány z vodného vzorku pomocí organického rozpouštědla ukotveného v pórech stěny dutého vlákna, které tak tvoří podpurnou kapalnou membránu, do vodné akceptorové fáze umístěné uvnitř dutého vlákna. Hnací silou extrakce je aplikovaný stejnosměrný elektrický potenciál (1 – 300 V) vedený přes membránu, kde jedna elektroda je vložena ve vzorku a druhá elektroda je umístěna v extrakčním činidle. Pro úspěšnou migraci analytů je třeba, aby elektroda v akceptorovém roztoku byla opačného náboje, než je náboj analyzovaných látek. Pro analýzu bazických látek (kationty) je třeba udržovat pH vzorku i pH akceptorového roztoku neutrální až kyselé, aby analyty vykazovaly kladný náboj. V akceptorovém roztoku je umístěna katoda. Pro analýzu kyselin (anionty v disociované formě) je nutné udržovat pH obou roztoků neutrální až bazické, elektrodou vloženou do akceptorového

roztoku je kladně nabitá anoda. Mezi výhody EME patří nízká spotřeba organických rozpouštědel, díky aplikaci elektrického potenciálu je velmi urychlen čas extrakce (obvykle 5 a méně minut). Membrána je navíc dobrou bariérou pro extrakci balastních složek matrice. Metoda EME umožňuje velmi efektivní přečištění a zakoncentrování vzorku. EME je také možné použít pro extrakci bazických i kyselých látek z roztoku zároveň tak, že jsou do vzorku ponořena dvě dutá vlákna a v každém vlákně je vložena elektroda s jiným nábojem. EME také umožňuje současnou extrakci polárních i nepolárních analytů z jednoho vzorku. V tomto případě jsou v extrahovaném roztoku ponořeny také dvě vlákna. Každé vlákno je ale impregnováno jiným organickým rozpouštědlem podle toho, k jaké dílčí extrakci je použito. Oba extrakty se následně smísí a je možné je nastříknout do zvoleného analytického systému. Další výhodou EME je možnost současné extrakce až 96 vzorků pomocí takzvané paralelní EME (Pa-EME) [26][74] - [76].

Pa-EME je metoda, která byla poprvé použita v roce 2010, kdy byly tři jednotky pro EME paralelně spojeny s jednou 9 V baterií. Toto uspořádání umožnilo extrakci látek ze 3 různých vzorků plazmy. Složitá manipulace se systémem Pa-EME využívající dutá vlákna vedla k vývoji 96 jamkového formátu (Obr. 11), který stejně jako PALME využívá 96 jamkové destičky pro extrakci analytů. Od PALME se uspořádání liší přidáním hliníkové fólie na akceptorovou i donorovou destičku, které slouží jako elektrody. Hnací silou extrakce je elektrické napětí vložené na fólii [77].

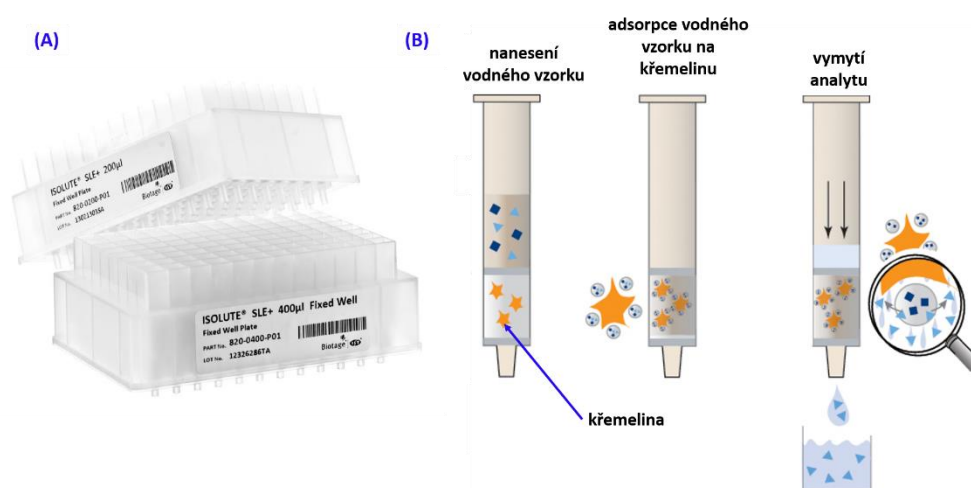


Obr. 11: (A) EME extrakce v jedné jamce pomocí dutého vlákna, (B) paralelní uspořádání Pa-EME pro souběžnou extrakci 96 vzorků. Obrázky převzaty ze zdrojů [76][77] a upraveny.

3.1.2.6 Extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená tuhou fází – SLE

Extrakce z kapaliny do kapaliny podpořená tuhou fází (SLE – supported liquid extraction) je dalším typem extrakce, která umožňuje paralelní úpravu až 96 vzorků. Byla odvozena od LLE pro zvýšení prostupnosti vzorků laboratoří a pro odstranění nevýhod LLE, mezi které patří kromě časové náročnosti také složitá manipulace se vzorky, potřeba většího objemu vzorku, tvorba emulzí, které způsobují složité oddělení fází, a nízká výtěžnost. Formát SLE je obdobný jako u PALME. Pro extrakci se používá destička až s 96 kartridžemi (Obr. 12), ve kterých je uložena křemelina. Křemelina s velkým množstvím pórů slouží jako inertní nosič pro adsorpci vodných vzorků s obsahem analytů. Ve srovnání s SPE, kde dochází k záchytu analytů na sorbent, v SLE proceduře není třeba křemelinu kondicionovat a lze na ni přímo nanést vzorek. Analyty jsou extrahovány činidlem, kterým je stejně jako v LLE organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou [15][78]-[81].

Mezi výhody SLE techniky patří snadná manipulace, časová nenáročnost provedení, nízká cena a možnost automatizace kroku úpravy vzorku. Shodně s PALME je i SLE účinnou metodou pro odstranění fosfolipidů způsobujících matricové efekty [78]-[81].

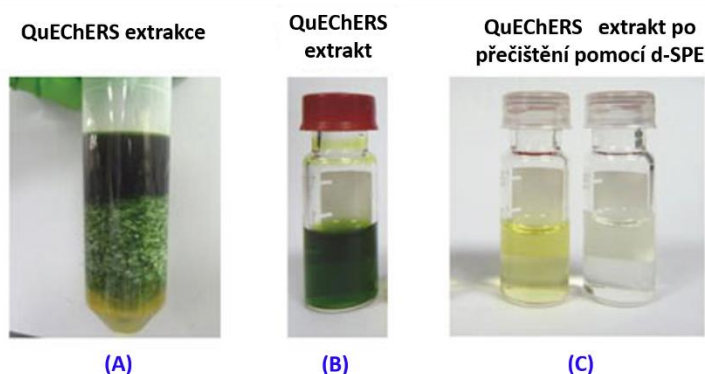


Obr. 12: (A) destička s křemelinou pro SLE. (B) postup SLE extrakce: nejprve je nanesen vodný vzorek, dojde k naadsorbování vodného vzorku na křemelinu, následně je analyt vymyt vhodným extrakčním činidlem nemísitelným s vodou. Obrázky převzaty z [82][81][83] a dále upraveny.

3.1.2.7 Disperzní extrakce na tuhý sorbent - d-SPE

Disperzní SPE (d-SPE) je alternativou ke konvenční SPE metodě. Je založena na SPE principu s tím rozdílem, že ke vzorku je přidán sorbent. Sorbent není kondicionován a po přidání je dispergován v objemu vzorku obvykle protřepáním, či centrifugací. Volné částice sorbentu zvyšují plochu, se kterou přijdou analyty do kontaktu, čímž se zvyšuje výtěžnost extrakce. d-SPE lze provést dvěma způsoby. Pomocí sorbentu lze vyvázat analyzované látky a ty pak vymýt stejně jako v SPE. Druhou možností je navázání balastních látek na sorbent a analýza zbylé přečištěné kapaliny [84].

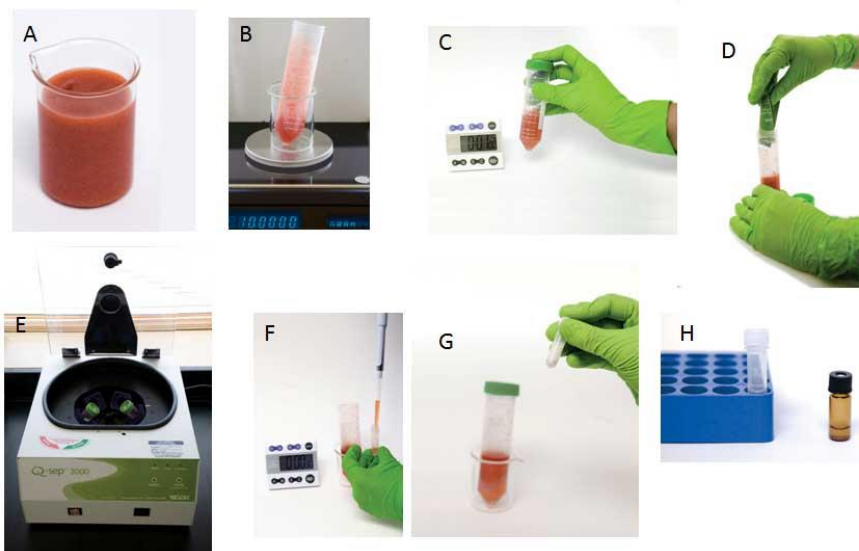
Příkladem d-SPE je metoda QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Save Extraction). Rychlá, jednoduchá, levná, účinná, robustní a bezpečná extrakce patří mezi populární metody pro úpravu vzorků především v analýze potravin. Původně byla vyvinuta pro analýzu pesticidů v ovoci a zelenině s vysokým obsahem vody, v současné době je používána i pro forenzní analýzu či při analýze vzorků životního prostředí. Metoda QuEChERS je založena na dvou hlavních krocích (Obr. 13), na extrakci do kapaliny a d-SPE [85][88].



Obr. 13: (A) Extrakce QuEChERS, extrakt (B) před přidavkem a (C) po přidavku sorbentu, kdy dojde k navázání nečistot a odstranění balastních látek. Obrázek převzat ze zdroje [89] a upraven.

V prvním kroku (Obr. 14) je ke vzorku přidáno organické rozpouštědlo (nejčastěji ACN) pro extrakci vodného vzorku. Ke směsi je dále přidávána sůl, konkrétně NaCl a $MgSO_4$, případně další soli. Přídavek soli zlepšuje přechod analytu do organického rozpouštědla a zvyšuje tak výtěžnost a selektivitu extrakce. Ve druhém kroku je k organickému extraktu přidán sorbent pro disperzní extrakci d-SPE. Úkolem sorbentu je odstranit balastní látky a nechtěné sloučeniny tak, aby byl vzorek pro analýzu co nejčistší. Jako sorbenty lze použít klasické SPE sorbenty, na příklad C18, C8, grafitický

uhlík, či amin s primární nebo sekundární skupinou. Mimo zmíněných sorbentů je součástí tuhé fáze také $MgSO_4$, který odstraní přebytek vody z extraktu. Parametry stejně jako u předchozích metod závisí na analyzovaných látkách a typu matrice, a je třeba je vhodně zoptimalizovat. Výsledný extrakt je možné analyzovat pomocí LC, GC systémů či kapilární elektroforézy [85][88].



Obr. 14: Znárodnění extrakce QuEChERS: A – homogenizace vzorku, B – navážení vzorku do centrifugační zkumavky, C – přidání organického rozpouštědla a protřepání, D – přidání solí, E – centrifugace, F – odebrání organického extraktu a jeho přenesení do zkumavky se sorbentem pro disperzi extrakci, G – protřepání a centrifugace, H – přenesení přečištěného extraktu do vialky, ze které je vzorek dávkován do analytického systému. Obrázek převzat z [90].

Mezi nesporné výhody QuEChERS patří snížení spotřeby organických rozpouštědel a množství vzorku ve srovnání s konvenční LLE a SPE. Vzhledem k rychlému provedení je možné připravit až 20 vzorků během několika desítek minut (30 – 40 min), čímž metoda zvyšuje prostupnost jednotlivých vzorků laboratoří. Navzdory rychlosti a jednoduchému provedení není metoda stále automatizovaná z důvodu používání centrifugy a třepaček [87][88].

3.2 Rychlé chromatografické metody

Kapalinová chromatografie (LC) je účinná separační metoda, která našla široké uplatnění v mnoha odvětvích, jako je například analýza potravin, environmentální analýza, farmaceutická analýza, forenzní analýza, či bioanalýza. Cílem vývoje bioanalytických metod je optimalizovat rychlé, spolehlivé a účinné procedury pro kvalitativní i kvantitativní analýzy. Chromatografické metody jsou v laboratořích často metodou volby pro analýzu poměrně složitých směsí látek různé polarity, acidobazických vlastností v různých matricích [2][4].

3.2.1 Účinnost chromatografického systému

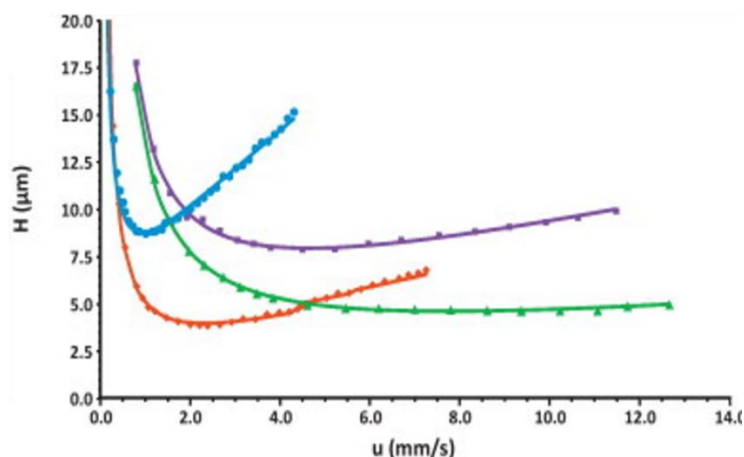
Účinnost separace v chromatografickém systému je dána bezrozměrnou veličinou N , která značí počet teoretických pater. Čím vyšší je počet teoretických pater, tím vyšší je účinnost kolony. N není konstantní veličinou, je ovlivněna historií kolony a také retenčním faktorem látky použité pro výpočet. Účinnost kolony udává míru rozmývání elučních zón. Vlivy ovlivňující rozmývání elučních zón popisuje van Deemterova rovnice [91].

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + \frac{f(k)d_p^2 u}{D_M}$$

Ta popisuje příspěvek jednotlivých členů A , B , a C k výškovému ekvivalentu teoretického patra kolony H , udávající účinnost kolony. A odpovídá vířivé difúzi, člen B podélné difúzi, C odporu proti převodu hmoty mezi mobilní a stacionární fází a jako u je značena lineární průtoková rychlost mobilní fáze. d_p je průměr částice kolonové náplně, D_M značí difúzní koeficient analytu, λ je koeficient nerovnoměrného plnění chromatografické kolony, γ je korekční faktor charakterizující tvar kanálku v náplni kolony a k retenční faktor analytu.

Z teorie vyplývá několik závěrů. Snížení velikosti částic ve stacionární fázi vede ke zvýšení rychlosti separace a zvýšení účinnosti kolony. Zvýšení průtoků vede ke snížení podélné difúze, a tím ke zvýšení separační účinnosti. U SFC díky nízké viskozitě a vysokým hodnotám difúzních koeficientů látek v CO_2 dochází ke zvýšení účinnosti separace. S rostoucí průtokovou rychlostí se snižuje odpor proti převodu hmoty, a tím je sníženo rozmytí elučních zón [92][93].

Studie [94] měla za cíl porovnat vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC), superkritickou fluidní chromatografii (SFC) a ultra-vysokoúčinnou superkritickou fluidní chromatografii (UHPSFC) pomocí van Deemterových křivek. Bylo prokázáno, že zmenšení velikosti částic v chromatografickém systému vede ke zvýšení účinnosti. Závěry studie také prokázaly, že lineární průtoková rychlost mohla být v UHPLC a UHPSFC systému zvýšena, aniž by došlo k výraznému poklesu účinnosti. Následkem snížení velikosti částic byl také pokles odporu proti převodu hmoty, jehož snížení vedlo ke zvýšení účinnosti kolon s menšími částicemi. Rozdíly jsou výraznější pro SFC díky nižší viskozitě mobilní fáze a vyšším hodnotám difúzních koeficientů analyzovaných látek. U UHPSFC systémů je účinnost zachována i při vysoké lineární průtokové rychlosti i díky vlastnostem použité mobilní fáze a lze tak používat několikanásobně vyšší průtok v porovnání s UHPLC, což vede ke zrychlení analýzy [93]-[94][95].



Obr. 15: van Deemterovy křivky naměřené za podmínek uvedených v [94] pro separaci v LC systému s kolonou o velikosti částic 3,5 μm (modrá křivka), s částicemi o průměru 1,7 μm (červená křivka) a v SFC systému s kolonou o velikosti částic 3,5 μm (fialová křivka), s částicemi o průměru 1,7 μm (zelená křivka). Zdroj [94].

3.2.2 Moderní trendy v kapalinové chromatografii

V posledních letech bývá klasická HPLC často nahrazována modernějšími směry, které umožňují zrychlit analýzu při zachování či zvýšení účinnosti separace. Mezi tyto

směry patří UHPLC, použití povrchově porézních částic a použití monolitických kolon. Kromě uvedených směrů se do pořadí dostávají také chromatografické metody, s rozdílnou selektivitou oproti klasické chromatografii na reverzní fázi (RP-HPLC). Mezi ně jsou řazeny chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) a superkritická fluidní chromatografie (SFC), která je řazena i mezi metody, které zvyšují účinnost separace [2][4].

3.2.2.1 Zvýšení účinnosti separace

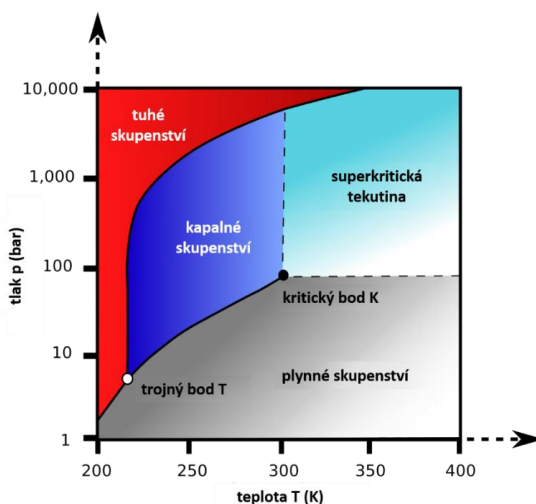
3.2.2.1.1 Superkritická fluidní chromatografie

Superkritická fluidní chromatografie (SFC) je separační metoda, která byla v minulých desetiletích zastíněna rychle se rozvíjející HPLC a GC. V současné době se však začíná dostávat do popředí zájmu v mnoha odvětvích analytické chemie. SFC využívá instrumentaci podobnou HPLC. Od HPLC se liší zejména používanou mobilní fází, kterou je v tomto případě nadkritická tekutina, nejčastěji stlačený CO₂ s přídavkem nebo bez přídavku organických rozpouštědel. Tento přídavek však ovlivňuje fyzikální skupenství CO₂, kdy může kontinuálně docházet k přechodu mezi subkritickým a nadkritickým stavem. I když mobilní fáze není vždy striktně v nadkritickém stavu, je odbornou veřejností akceptován široce užívaný název SFC [92]-[105].

3.2.2.1.1.1 Superkritická tekutina

Nadkritický stav tekutiny je takové skupenství, kdy tlak a teplota látky dosáhnou vyšších hodnot než je kritická teplota a kritický tlak. Nejčastější definice Nadkritického stavu pro čisté sloučeniny vychází ze zachování rovnováhy plynného a kapalného skupenství, které je znázorňováno P-T fázovými diagramy. Na obrázku (Obr. 16) je znázorněn diagram pro CO₂, který ukazuje vztah mezi tlakem a teplotou kapaliny a její páry, kde body na fázovém diagramu $P = f(T)$ zobrazují rovnováhu mezi kapalným a plynným skupenstvím. Rovnovážná křivka nasycených par existuje pouze mezi trojným bodem T, kde látka existuje ve 3 skupenstvích současně (plyn, pevná látka a kapalina), a mezi bodem kritickým K, který křivku nasycených par zakončuje. Při teplotách, které jsou nižší, než je T, existuje látka pouze v plynném a pevném stavu, termodynamicky stálá

kapalina neexistuje. Pokud je hodnota teploty nebo tlaku vyšší než bod T, klesne hustota kapaliny. Naopak, ze zvyšující se teplotou hustota plynu vzrůstá a zvyšuje se tlak par. V bodě K si hustota plynu a kapaliny jsou rovny a rozdíl mezi těmito dvěma skupenstvími se stírá. Vzniká tak tekutina, která je nazývána nadkritickou a existuje pouze za teplot a tlaků vyšších, než je hodnota kritického bodu K. Pokud jsou hodnoty tlaku a teploty nižší než bod K, jedná se o subkritické podmínky [106][107].



Obr. 16: Fázový diagram pro CO₂ zobrazující křivku nasycených par a stav nadkritické tekutiny. Obrázek převzat ze zdroje [108] a upraven.

Poprvé byla nadkritická tekutina pro separaci použita Klesperem a kol. v roce 1962 ještě před příchodem HPLC technologie. Jako mobilní fáze byly použity dichlordifluormethan a monochlordifluormethan. V průběhu dalších studií byly testovány další látky, které se jeví jako vhodné mobilní fáze pro SFC. V následující tabulce (Tab. 2) jsou uvedeny zkoušené látky včetně hodnot kritické teploty a tlaku [92] [93][106][107].

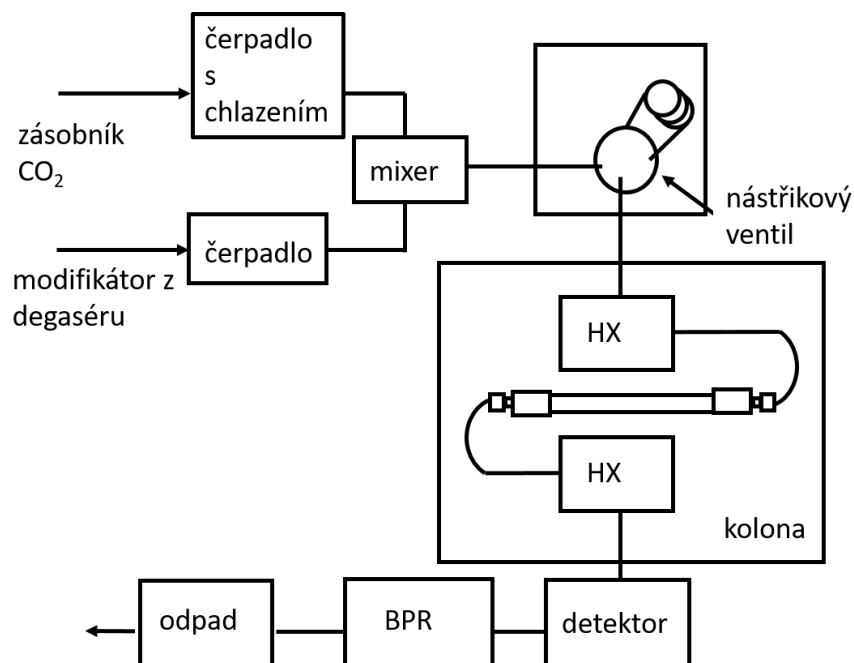
	MW	T _k (°C)	P _k (bar)
oxid uhličitý	44,01	31,3	73,7
voda	18,02	373,9	220,6
oxid dusný	44,01	36,5	72,5
amoniak	17,03	132,2	113,3
dichlordifluormethan	120,91	111,9	41,4
chlordifluormethan	86,47	96,2	49,9
methan	16,04	-82,4	46,0
ethan	30,07	32,2	48,7
propan	44,09	96,7	42,5
methanol	32,04	240,5	78,9
ethanol	46,07	241,8	61,5

Tab. 2: Vybrané látky, které byly zkoušeny jako potenciálně vhodné mobilní fáze pro SFC a jejich molekulové hmotnosti (MW), kritické teploty (T_k) a tlaku (P_k). Převzato z [107].

U všech testovaných látek bylo také kromě schopnosti snadno přejít do superkritického stavu nutné zvážit i jejich bezpečné použití, nízkou toxicitu, či nehořlavost. Proto byl a je jako mobilní fáze v SFC pro svoji bezpečnost, inertnost, dostupnou vysokou čistotu a nízkou cenu nejčastěji používán CO_2 , jehož kritické hodnoty teploty a tlaku jsou snadno dosažitelné v laboratorních podmínkách. Další výhodou použití CO_2 je jeho velmi dobrá mísitelnost s organickými rozpouštědly, jako jsou MeOH, ACN, či ethanol, které zvyšují eluční sílu, mění polaritu samotného CO_2 a umožňují tak úspěšné použití SFC nejen pro separaci nepolárních, ale také polárních látek. Přídavek organického modifikátoru mění polaritu mobilní fáze, která je klíčová pro eluci látek z kolony. Jeho přidavkem ale dochází také ke změně kritické teploty a tlaku. Při zvyšujícím se množství modifikátoru v mobilní fázi dochází ke zvýšení kritických hodnot, které jsou hůře dosažitelné, mobilní fáze je tedy v subkritickém stavu. Díky kontinuálnímu přechodu mezi subkritickým a superkritickým stavem jsou však zachovány veškeré výhody chromatografie a technika může být úspěšně používána [92][93][106][109].

3.2.2.1.1.2 SFC instrumentace

Přístroj je obvykle složen z binárního čerpadla – jedno je chlazené a čerpá CO_2 , druhé čerpá modifikátor. Po čerpadlech je do systému zapojen mixér, kde dochází ke směšování mobilní fáze. Vzorky jsou do systému dávkovány pomocí automatického dávkovače a vícecestného ventilu, který přepíná mezi tokem mobilní fáze a vzorkem. Vzorek je veden na kolonu vyhřívanou v termostatu a je detekován na detektoru. Mezi nejčastěji používané detektory v SFC patří UV/VIS, PDA, MS detektor, používány jsou také odpařovací detektor rozptylu světla (ELSD) a aerosolový detektor nabitých částic (CAD). Z detektoru je mobilní fáze vedena do regulátoru zpětného tlaku (BPR) a následně do odpadu [109]-[111].



Obr. 17: Schéma SFC přístroje: čerpadla, automatický dávkovač vzorků, termostat (HX) s kolonou, detektor, regulátor zpětného tlaku (BPR), odpad. Zdroj [111].

ČERPADLO a SMĚŠOVAČ MOBILNÍ FÁZE

V SFC instrumentaci jsou obvykle využívána binární čerpadla, kde jedno čerpadlo je zodpovědné za čerpání a chlazení CO_2 a druhé potom za čerpání modifikátoru. V závislosti na fyzikálním stavu CO_2 (kapalina, nebo plyn) čerpaného do systému existuje několik typů čerpadel, která mají za úkol CO_2 pouze čerpat, nebo i kondenzovat do kapalného stavu. Velmi často je používán CO_2 stlačený v tlakové lahvi, který existuje při laboratorní teplotě jako kapalina s vysokou hustotou, jenž je v rovnováze s plynnou fází o nižší hustotě. Jakékoliv zvýšení teploty nebo snížení tlaku po opuštění tlakové láhve vede k odpaření části kapaliny, která může poškodit čerpadlo a zastavit průtok mobilní fáze. Proto je velmi důležité udržovat čerpadlo pro CO_2 na určité teplotě tak, aby jeho hustota odpovídala podmínkám SFC. Optimální hustotu CO_2 obvykle dosahuje při teplotě 4 – 5 °C, na kterou musí být pístová hlavice pro jeho čerpání chlazena. Chlazení tekutiny je zároveň nutné pro snížení kompresního poměru potřebného k čerpání CO_2 . Komprese CO_2 je také nutná k udržení konstantního průtoku. Používaná čerpadla pracují na principu recipročního pohybu, kdy jedna je hlavice plněna a druhá vytlačuje mobilní

fázi dále do systému. Výsledná mobilní fáze je smíšena ve směšovači. Směšovač je krátká kolona o malém vnitřním objemu naplněná ocelovými kuličkami [109]-[111].

DÁVKOVAČ VZORKŮ

Pro dávkování vzorků jsou využívány automatické dávkovače s karusely, kam jsou umísťovány vzorky ve vialkách stejně jako v LC systémech. Pro nasátí vzorku je používána stříkačka a šesticečný nástřikový ventil, který zároveň vede mobilní fázi na kolonu. V průběhu nástřiku je vzorek aspirován z vialky pomocí jehly a je veden do nástřikové smyčky přes jehlový port. Jakmile ventil přepne do nástřikové polohy, smyčka je pod vysokým tlakem. Po přepnutí ventilu do polohy, kdy proudí mobilní fáze, kapalina ve smyčce expanduje až 500krát. Proto je důležité, aby jehla a stříkačka zůstala v jehlovém portu při změně pozice ventilu, protože jinak by došlo ke kontaminaci celého autosampleru vzorkem i mobilní fází. Expandující kapalina je odváděna odpadní kapilárou do odpadní lahve. Po provedení nástřiku jsou jehla a kapiláry propláchnuty promývacím rozpouštědlem pomocí nízkotlakého čerpadla [109]-[111].

KOLONOVÝ TERMOSTAT

Stabilní teplota na koloně je v SFC velmi důležitá z hlediska zachování hustoty CO₂, která je závislá na teplotě a tlaku. Pro zachování vlastností mobilní fáze a účinnosti separace je tedy nutné kontrolovat a udržovat stálou teplotu na koloně. Pro udržení dané teploty jsou v kolonovém termostatu u každé kolony instalovány tzv. preheatery, které mobilní fázi chladí nebo ohřívají na danou teplotu a pak ji po celou dobu měření udržují na konstantní hodnotě. Teplota při SFC separacích se obvykle pohybuje v rozmezí 20 – 90 °C [109]-[111].

REGULÁTOR ZPĚTNÉHO TLAKU

Pro kontrolu tlaku systému je v SFC instrumentaci za kolonovým termostatem zařazen regulátor zpětného tlaku. Jeho funkcí je udržovat požadovaný tlak na výstupu z kolony. Pokud je jako mobilní fáze použit čistý CO₂, je monitorování tlaku důležité, protože při změně tlaku dojde ke změně hustoty CO₂, a tím i změně jeho eluční síly, retence a selektivity. Jakmile je použit modifikátor, změna tlaku nemá příliš velký vliv na

změnu selektivity a retence. Regulace zpětného tlaku je nutná pro stabilní retenční časy a pro nízký šum základní linie. V minulosti byly používány mechanické regulátory. V současnosti jsou v systémech používány elektronické regulátory [109]-[111].

DETEKTORY

Nejpoužívanější detektory v SFC instrumentaci jsou UV/PDA, ELSD, CAD a MS detektor (viz 3.2.3.2).

UV a PDA DETEKTOR

UV a PDA detektory patří k nejpoužívanějším detektorům pro SFC analýzy vzhledem k jejich relativní univerzálnosti a dostačující citlivosti v mnoha aplikacích. V systému jsou řazeny před regulátor zpětného tlaku. Optická cela, ve které je vzorek detekován, musí být odolná vůči vysokým tlakům. Citlivost analýzy je ovlivněna poměrem signálu k šumu. Základní linie má v SFC vyšší šum než v HPLC. Hladina šumu je ovlivněna hustotou tekutiny. Čím vyšší je hustota mobilní fáze, tím vyšší je i šum základní linie chromatogramu. Kolísání základní linie může být způsobeno kolísáním tlaku, které vzniká při čerpání mobilní fáze, či v regulátoru zpětného tlaku. Snížit šum základní linie je možné snížením hustoty, ke které dojde při zvýšení teploty mobilní fáze [109].

ELSD a CAD DETEKTORY

ELSD a CAD detektory jsou vhodné pro detekci látek, které ve své molekule neobsahují chromofory a pro analýzu převážně netěkavých látek. Jsou označovány jako univerzální detektory, protože jejich odezva je zcela závislá na hmotnostní koncentraci analytů bez ohledu na jejich molekulární strukturu. Jejich výhodou je kromě vysoké citlivosti a univerzálnosti, také relativně široké dynamické rozmezí a jednoduché použití. Nevýhodou může být závislost odezvy na koncentraci organické složky v mobilní fázi při použití gradientové eluce [109][112][113].

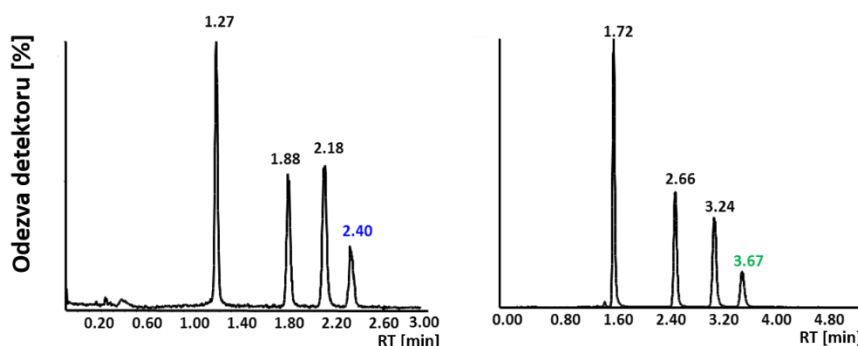
3.2.2.1.1.3 Základní parametry pro optimalizaci SFC metody

Mezi parametry, které je třeba při vývoji metody využívající SFC optimalizovat, patří volba mobilní fáze a jejího průtoku, volba stacionární fáze, teploty na koloně, zpětného tlaku a složení směsi, ve které je vzorek do systému dávkován.

MOBILNÍ FÁZE

Nejvýraznější změnou během vývoje SFC prošla mobilní fáze. V počátcích metody se jednalo o tekutiny v nadkritickém stavu. Později, s rozvojem náplňových kolon, došlo ke změně složení mobilní fáze, kdy se k mobilní fázi začala přidávat organická rozpouštědla a další složky. Mezi výhody mobilní fáze v SFC patří vysoký difúzní koeficient a nízká viskozita. Proto je optimální průtoková rychlost u SFC systémů vyšší než u LC a je tak možné urychlit separace [93][114].

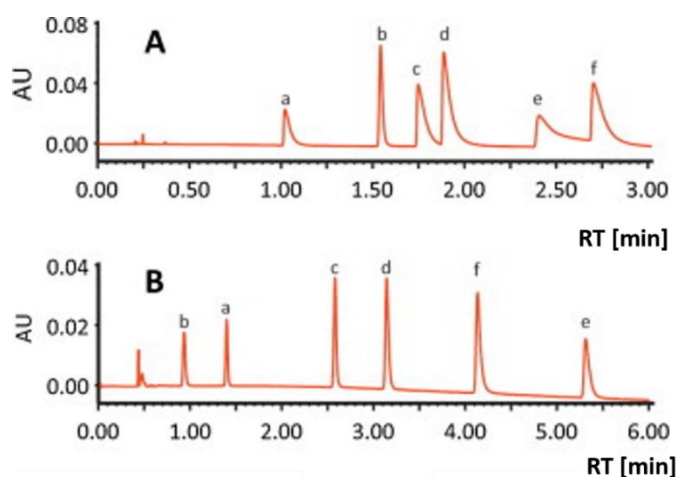
Hlavní složkou mobilní fáze v moderní superkritické fluidní chromatografii je CO₂. Samotný CO₂ je nepolární látka, která není vhodná pro eluci polárních analytů, které mohou interagovat pomocí vodíkových donor/akceptorových vazeb s volnými polárními skupinami stacionární fáze. Tato silná interakce způsobuje jednak horší eluci těchto látek a také jejich chvostování. Pro zvýšení eluční síly samotného CO₂ a zabránění interakcím mezi analyty a volnými aktivními silanolovými skupinami stacionární fáze jsou do mobilní fáze přidávány polární organická rozpouštědla, zvaná organické modifikátory. Modifikátorem první volby je pro většinu aplikací díky své nejvyšší eluční síle MeOH. Mezi další modifikátory patří EtOH, IpOH a ACN, případně jejich kombinace v koncentraci 5 – 50 % celkového objemu mobilní fáze. Kromě změny eluční síly (Obr. 18) a polarity CO₂ přidané modifikátory ovlivňují také hustotu mobilní fáze za daných podmínek. Tyto změny pak mohou ovlivnit selektivitu a retenci. [92][104][109][114][115].



Obr. 18: Ovlivnění retence tokoferolu změnou použitého modifikátoru. (A) - MeOH, (B) - EtOH. Obrázek převzat ze zdroje [116] a upraven.

Efekt modifikátoru spočívá především v pokrytí silanolových skupin na stacionární fázi na základě vodíkových interakcí a ve změně polarity mobilní fáze. Při

analýze kyselých či bazických látek dochází k ovlivnění retence a tvaru píků především u silných kyselin a zásad. Z tohoto důvodu jsou do mobilní fáze přidávána tzv. aditiva, která umožňují jejich analýzu pomocí SFC. Aditiva mění kyselost mobilní fáze a tím i disociaci analytů a funkčních skupin na stacionární fázi, čímž ovlivňují retenci. Mohou modifikovat povrch stacionární fáze a změnit tak interakci analytu a funkčních skupin mobilní fáze, či vytvářet iontové páry s nabitými analyzovanými látkami. Mezi nejčastěji používaná aditiva patří kyseliny (mravenčí, octová, trifluorooctová), báze (hydroxid amonný, diethylamin, triethylamin), či soli (octan amonný, mravenčan amonný) a voda. Nízké koncentrace těchto látek zlepšují tvar píku (Obr. 19) díky ovlivnění ionizace analytů a funkčních skupin na stacionární fázi a mohou také ovlivnit selektivitu. Výhodou těkavých solí jako přidaných aditiv je jejich kompatibilita ve spojení s hmotnostní detekcí [92][93][104][93][109][114][115].



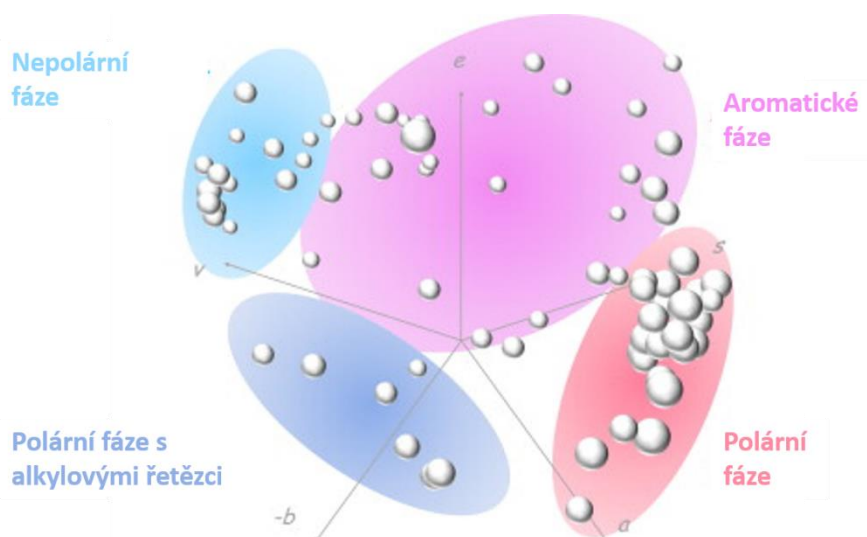
Obr. 19: Vliv aditiva na selektivitu a tvar píku. (A) Mobilní fáze bez aditiva, (B) mobilní fáze s 20 mM NH₄OH jako aditivem. Analyzované látky: pethidin (a), buprenorfin (b), dextrometorfan (c), kodein (d), folkodin (e), morfin (f). Obrázek převzat ze zdroje [104] a upraven.

STACIONÁRNÍ FÁZE

Stacionární fáze pro SFC lze rozdělit na chirální a achirální fáze [93].

Pro achirální látky je SFC univerzální separační metodou, jelikož umožňuje analýzu látek na koloně s polární i nepolární stacionární fází s totožnou mobilní fází. SFC tak může nahradit chromatografii na RP-HPLC, chromatografii na normálních fázích (NP-HPLC), HILIC či bezvodou LC. Z toho vyplývá, že jako stacionární fáze v SFC mohou být použity jak čisté silikagelové sorbenty vysoké polaritě, tak stacionární fáze modifikované

dlouhými nepolárními řetězci, či jinými funkčními skupinami. První achirální kolony byly představeny již v 80. letech. Jednalo se o 2-ethylpyridinovou (2-EP) skupinu navázanou na čistém silikagelu. Tuto kolonu představila firma Princeton Chromatography [92][93][109][114]. V současné době lze stacionární fáze charakterizovat na základě LSER (linear solvent energy relationship). Pomocí této metodiky bylo proměřeno retenční chování analytů za totožných chromatografických podmínek využívajících různé stacionární fáze. Na základě vyhodnocení několika parametrů byly komerčně dostupné kolony s různými sorbenty rozděleny podle polaritě do 4 základních skupin – nepolární, aromatické, polární alkylové a polární fáze (Obr. 20), které lze využít při hledání optimální stacionární fáze při vývoji SFC metody.



Obr. 20: Rozdělení kolon pro SFC podle polaritě od nejméně polárních fází v levé části obrázku až po polární fáze v pravém dolním rohu. Obrázek převzat ze zdroje [109] a upraven.

Mezi polární stacionární fáze v SFC patří silikagelové fáze, či fáze s navázanými diolovými, aminopropylenovými, kyanopropylovými a polyethylenglykolovými skupinami, či hojně využívaná fáze 2-EP. Mezi aromatické fáze jsou řazeny na příklad fáze s polystyren-divinylbenzenovými nebo fenylpropylenovými skupinami. Typickou nepolární fází je fáze s fenyl-hexylovými řetězci. [92][93][109][114].

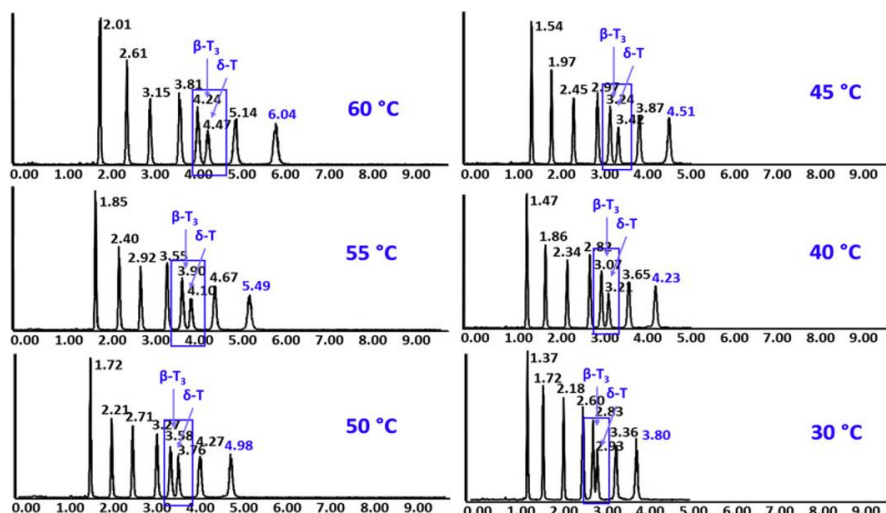
Chirální separace patří mezi nejčastější aplikace SFC. Chirální separace je obvykle dosaženo díky speciální stacionární fázi. Na rozdíl od LC nejsou v SFC využívány přísady chirálních aditiv do mobilní fáze. V současné době nejsou dostupné žádné specifické SFC kolony pro chirální separace. Jsou využívány kolony se sorbenty pro chirální separace primárně vyrobené pro LC. Mezi nejčastěji používané sorbenty patří polysacharidové a

cyklodextrinové fáze. Dalšími chirálními fázemi používanými v SFC jsou fáze na bázi cyklofruktanů, makrocyclických polypeptidů či syntetických polymerů [105][93][114].

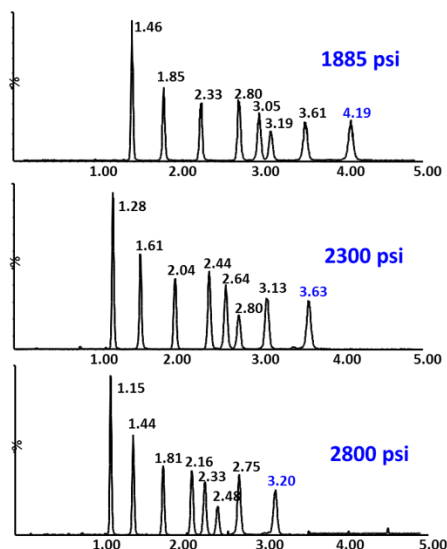
TEPLOTA NA KOLONĚ, ZPĚTNÝ TLAK SYSTÉMU a PRŮTOK mobilní fáze

Retence analytu je kromě použité stacionární a mobilní fáze ovlivňována také hustotou mobilní fáze. Ta je dána jejím složením, teplotou a tlakem. Příklad modifikátoru značně ovlivňuje retenci analytů díky změně polaritativnosti mobilní fáze a také ovlivněním rozpustnosti analytů v mobilní fázi. Složení mobilní fáze je tedy jedním z klíčových parametrů, které je třeba optimalizovat při vývoji nové metody. Následně je možné jako druhotné parametry optimalizovat tlak a teplotu systému, jejichž optimální podmínky závisí na složení mobilní fáze [92] [93][104].

Teplota v systému ovlivňuje tlak par a hustotu superkritické tekutiny a mísitelnost analytů a tekutiny. Může také ovlivňovat afinitu látky ke stacionární fázi (Obr. 21). Pokud je teplota v SFC systému zvyšována, dochází nejprve ke zvyšování retence vlivem snížené hustoty tekutiny. Po dosažení maxima, nad teplotami vyššími než kritický bod, je při dalším zvyšování teploty dosaženo snížení retence. Pokud dojde v SFC systému ke zvýšení tlaku je vlivem zvýšené hustoty mobilní fáze pozorováno snížení retence analytů (Obr. 22). Pokud je jako mobilní fáze použit čistý CO₂, je toto snížení mnohem výraznější než u směsi s modifikátorem. Průtok mobilní fáze má také vliv na retenci analytů. Při zvýšení průtoku dojde ke zrychlení eluce. Zároveň dojde ke zvýšení tlaku v systému. Tím je opět ovlivněna hustota mobilní fáze a dochází k dalšímu snížení retence látek [92][104].



Obr. 21: Vliv teploty při konstantním BPR tlaku v systému, složení mobilní fáze (MeOH:CO₂ – 2:98) a průtoku 2 ml/min na retenci analytů a selektivitu metody. Obrázek převzat ze zdroje [116] a upraven.



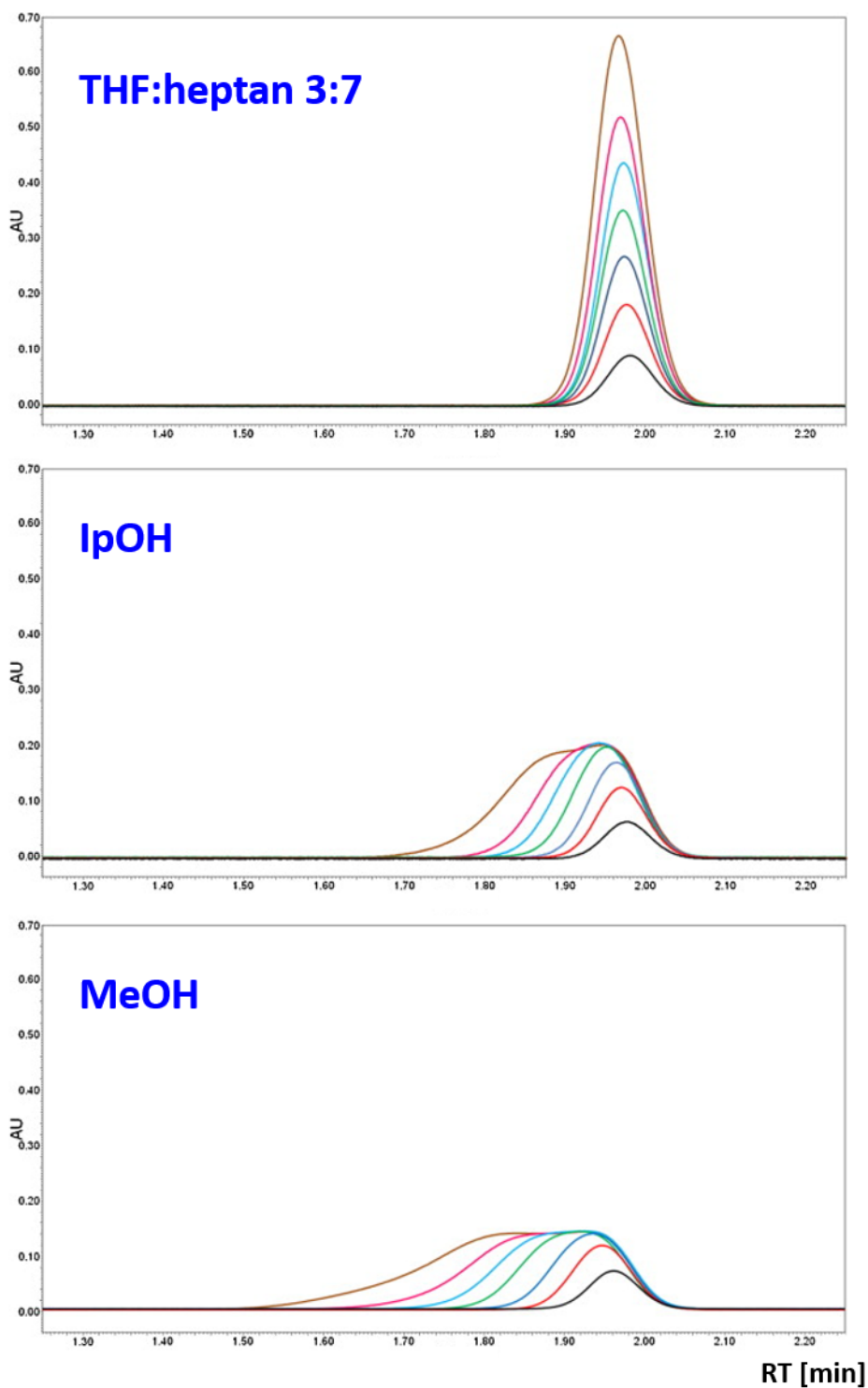
Obr. 22: Vliv tlaku systému na retenci analytů při konstantní teplotě 50 °C na koloně. Obrázek převzat ze zdroje [116] a upraven.

SLŐŽENÍ NASTŘIKOVANÉHO ROZPOUŠTĚDLA A NASTŘIKOVANÝ OBJEM VZORKU

Volba nastřikovaného rozpouštědla a objemu vzorku je v SFC velmi důležitým parametrem hned z několika důvodů. Zvolené rozpouštědlo ovlivňuje tvar píku a také průběh chromatografie. Rozpouštědlo interaguje pomocí slabých vazebných interakcí s analytem a stacionární fází, a tím minimalizuje navázání analytů na případné volné silanolové skupiny. Ideálně, stejně jako v LC, by měl být analyt rozpuštěn v rozpouštědle,

které odpovídá složení mobilní fáze v době nástřiku. U SFC je toto vzhledem k použití plynného CO₂ nemožné. Existuje proto několik doporučení pro volbu vhodného nastřikovaného rozpouštědla. Vzorek by měl být rozpuštěn v co nejméně polárním rozpouštědle, ve kterém je možnost jej rozpustit, a které je kompatibilní s mobilní fází. Ideální rozpouštědla pro nástřik vzorku v SFC jsou nepolární kapaliny typu hexanu a heptanu. Velmi polární rozpouštědla jako čistý MeOH totiž způsobují rozmývání píků (Obr. 23). Pokud je tedy možné analyt rozpustit jen ve velmi polárním rozpouštědle, je žádoucí toto rozpouštědlo smísit s méně polárním (např. IpOH, THF, hexan, heptan).

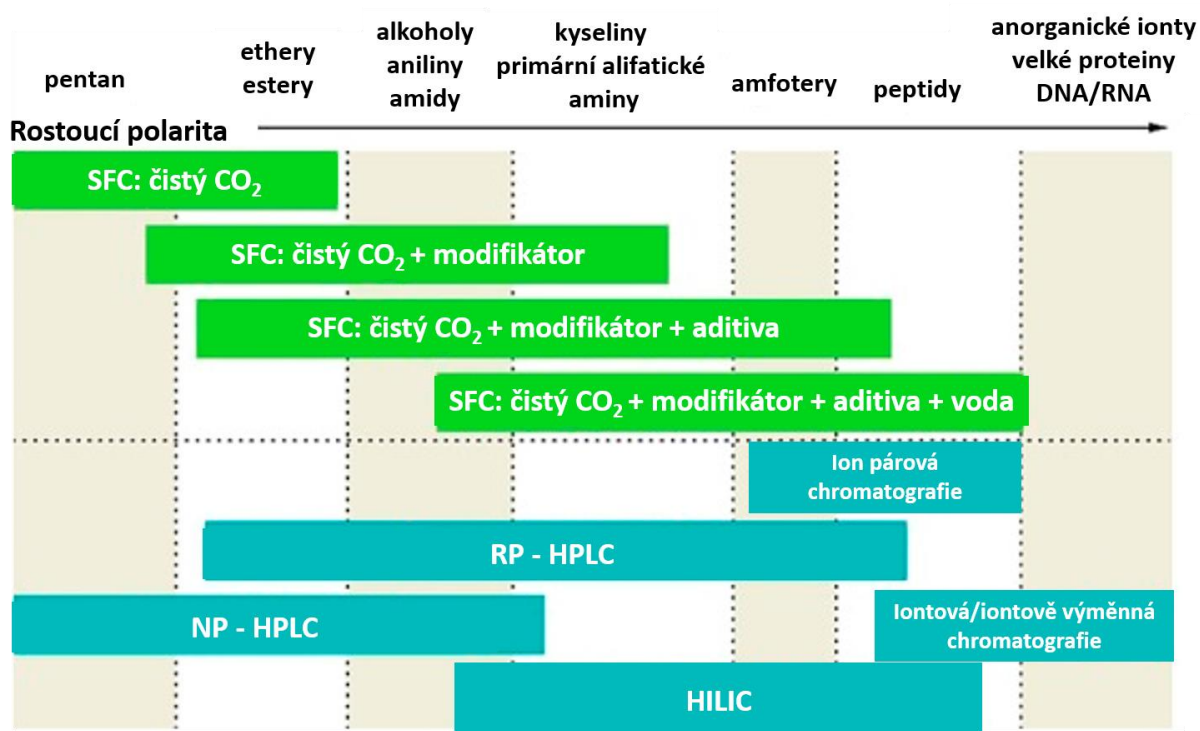
Kromě složení nastřikovaného roztoku je také důležitý jeho nastřikovaný objem. Objem dávkovaný na kolonu ovlivňuje v závislosti na složení nastřikovaného roztoku tvar píku. Pokud by byly vzorky dávkovány v nepolárním rozpouštědle, i při vyšším objemu nástřiku bude díky kompatibilitě s mobilní fází zachován tvar píku (Obr. 23). Čím polárnější rozpouštědlo bude pro nástřik použito, tím výraznější rozmytí píku při vyšším objemu nástřiku bude pozorováno. Proto je pro nastřikované polárnější směsi doporučováno snížit objem nástřiku co nejvíce, pokud je nástřik opakovatelný a signál detektoru je akceptovatelný. V SFC se velmi často používají dávkovací objemy 1 -2 μl, či menší než 1 μl [92][117][118].



Obr. 23: Vliv nastříkovaného rozpouštědla a objemu vzorku na tvar píku butylparabenu. Jako rozpouštědla byla zvolena nepolární směs tetrahydrofuranu (THF) s heptanem, isopropanol (IpOH) a methanol (MeOH). Zkoušen byl nastříkovaný objem 0,5 µl (černý záznam), 1 µl (červený záznam), 1,5 µl (tmavě modrý záznam), 2 µl (zelený záznam), 2,5 µl (světle modrý záznam) 3 µl (růžový záznam) a 4 µl (hnědý záznam). Obrázek převzat ze zdroje [92] a upraven.

3.2.2.1.1.4 Aplikace SFC

Využití SFC úzce souviselo a souvisí s používanou mobilní fází. SFC využívající pouze samotný CO₂ je možné používat pro analýzu nepolárních látek. S přidavkem polárních modifikátorů a aditiv pro analýzu kyselých a zásaditých látek se spektrum využití SFC výrazně rozšířilo a je možné jej použít pro analýzu látek polárních, včetně molekul jako jsou peptidy. V porovnání s LC lze pouze vhodnou změnou mobilní fáze (Obr. 24) obsáhnout NP-HPLC, RP-HPLC, iontově výměnnou, ion párovou chromatografií a také HILIC [93].

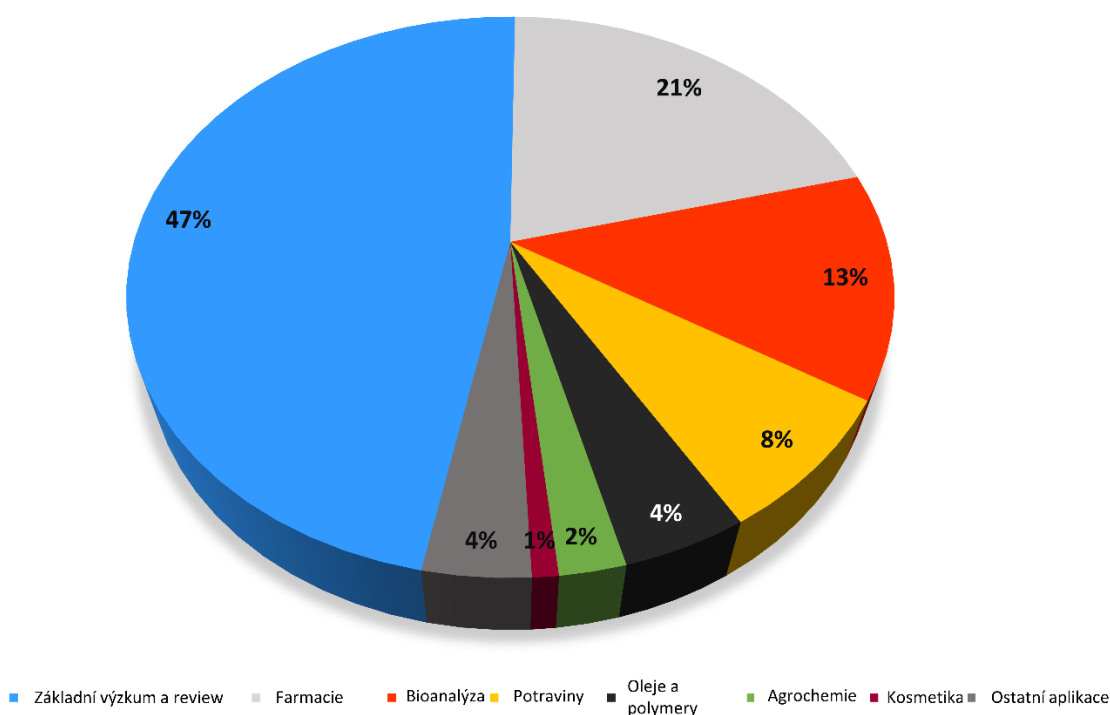


Obr. 24: Možnosti využití SFC v analýze látek širokého spektra polarit ve srovnání s kapalinovou chromatografií. RP-HPLC - HPLC na reverzních fázích, NP-HPLC - systémy s normálními fázemi, HILIC - hydrofilní interakční chromatografie. Obrázek převzat ze zdroje [93] a upraven.

SFC je v současné době hojně využívána v mnoha odvětvích. Mezi nejčastější aplikace patří chirální separace. Díky vysoké separační účinnosti a vysokým průtokům je možné separovat chirální látky ve velmi krátkém čase včetně enantiomerních párů, které není možné pomocí NP-HPLC či RP-HPLC kompletně separovat. Separace chirálních látek

je hojně využívána především ve farmaceutickém průmyslu pro kontrolu a zajištění kvality a čistoty účinných látek [104][110].

Mimo farmaceutický průmysl je SFC využívána také ve forenzní analýze pro identifikaci a stanovení výbušnin, opiátů, kanabionoidů, amfetaminů či sedativních látek, kde většinou analýz předchází SFE, či jiná forma extrakce látek z biologické matrice [119][120]. Byla použita také pro analýzu látek zneužívaných při dopingu [121][122]. SFC je také využívána pro kontrolu a analýzu kosmetických produktů, na příklad pro analýzu složení krémů, mastí či dalších kosmetických produktů [123][124]. SFC je velmi vhodná pro analýzu lipidů, olejů, mastných kyselin, či vitaminů rozpustných v tucích. Je tedy často využívána pro analýzu doplňků stravy, přírodních produktů, olejů či potravin s obsahem těchto látek [125][126]. Hlavní oblasti využívající SFC jsou shrnuty v následujícím obrázku (Obr. 25).



Obr. 25: Využití SFC v různých aplikacích a výzkumu. Obrázek byl vyhotoven na základě vyhledávání v databázi SciFinder, kde jako klíčové slovo bylo zadáno SFC s filtrací duplicitních výsledků. Rešerše byla provedena v listopadu 2016 [134].

3.2.2.1.2 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

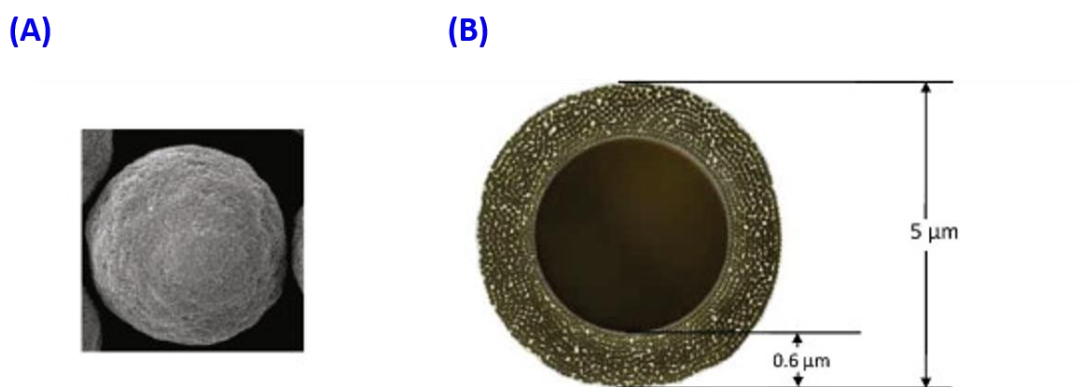
Nejvýznamnějším trendem v HPLC je zavedení kolon s částicemi menšími než 2 μm . Chromatografie využívající částice o těchto rozměrech je nazývána ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), známá také pod pojmem ultra-vysokotlaká kapalinová chromatografie. V roce 1997 byla skupinou Jorgensona popsána chromatografie za použití kolon se silikagelovými částicemi o průměru 1 – 1,5 μm . Použití těchto částic nebylo v konvenčních HPLC systémech možné kvůli vysokému tlaku, který v systému vlivem použití malých částic vznikal. Až v roce 2004 byl firmou Waters uveden první komerčně dostupný systém, který byl odolný vůči těmto tlakům a mohl tak využívat kolony s částicemi o průměru menší než 2 μm , které jsou taktéž vůči vysokým tlakům odolné. Kromě mechanické odolnosti musely být zmenšeny mimokolonové objemy, vyvinut dávkovací systém s přesným a rychlým dávkováním a systémy s rychlým sběrem dat [100]-[103].

Použití částic menších než 2 μm v UHPLC systémech vedlo také ke změně rozměrů kolon, a to k jejich zkrácení a zmenšení vnitřního průměru. Malé částice vedly také ke zvýšení účinnosti separace, která je zachována i za vyšších průtoků mobilní fáze. Zvýšením průtoku mobilní fáze dojde ke zkrácení doby analýzy, což vede ke zvýšení prostupnosti vzorků laboratoří. Další výhodou vyplývající především ze změny vnitřního průměru kolon v je snížené množství použitých rozpouštědel. Vzhledem k uvedeným nesporným přínosům metody došlo k rychlému rozvoji UHPLC, která je v současné době standardem ve většině výzkumných analytických laboratoří, ať už ve spojení s UV a PDA detekcí, nebo hmotnostním spektrometrem. UHPLC systémy jsou využívány především pro separace na reverzních i normálních fázích. Mohou být také využity pro chirální separace, HILIC separace či pro separace iontově výměnné [100]-[103].

3.2.2.1.3 Povrchově porézní částice (Core-shell particles)

Další možností, jak zvýšit účinnost separace, je použití povrchově porézních částic. Na rozdíl od klasických plně porézních částic (Obr. 26A), které jsou v celém svém objemu tvořeny stejnou strukturou, se povrchově porézní částice skládají z pevného neporézního jádra, jenž je obalené porézním sorbentem (Obr. 26B). Jádro je obvykle

tvořeno silikagelem nebo anorganickými (hliník, zlato, uhlík) či organickými materiály (polymery) a jeho průměr se pohybuje v rozmezí 0,9 – 3,7 μm . Jádro je obaleno několika vrstvami chemicky modifikovaného silikagelu o přesně dané porozitě a tvoří tak sférické částice o konečném průměru 1,3 – 5 μm . Použití povrchově porézních částic přináší řadu výhod. Částice zvyšují permeabilitu kolony a umožňují použití vyšších průtoků za nižšího tlaku systému. Vysoká homogenita velikosti částic zlepšuje účinnost separace a zabraňuje rozmývání elučních zón. Pevné jádro částice snižuje podélnou difúzi a menší množství porézního materiálu snižuje odpor proti převodu hmoty, což opět vede ke zvýšení účinnosti separace a lepšímu rozlišení. Core-shell částice jsou využívány především v RP-HPLC. Kolony vyrobené touto technologií je ale možno využít i pro separace v módu HILIC, pro chirální separace či kapilární HPLC [97][98].

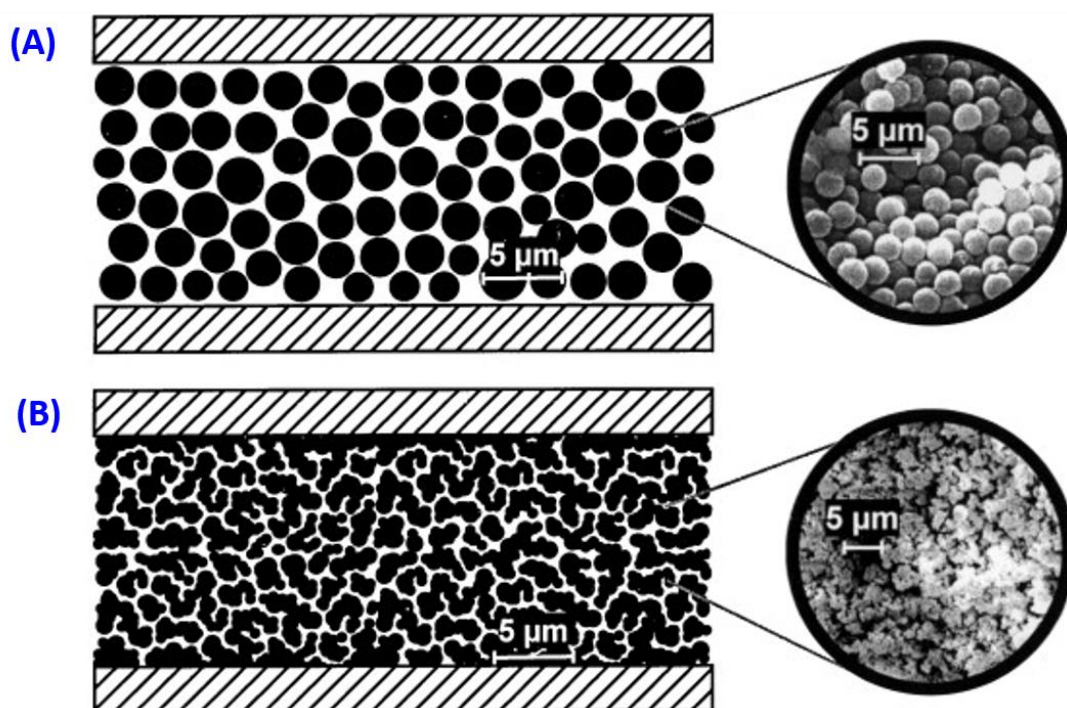


Obr. 26: Povrchově porézní částice na záznamu z elektronového mikroskopu (A) a její grafické znázornění (B). Obrázek převzat ze zdroje [99].

3.2.2.1.4 Monolitické kolony

V HPLC jsou nejčastěji využívány kolony částicové (Obr. 27A), které jsou naplněny plně porézními, nebo povrchově porézními částicemi o daném průměru (obvykle 3, 5 a 10 μm). Monolitické kolony jsou oproti tomu kolony, jejichž náplň je tvořena z jednoho kusu porézního materiálu (Obr. 27B). Porézní materiál obsahuje dva typy pórů – velké póry, tzv. makropóry (obvykle o velikosti 2 μm); a malé póry, tzv. mesopóry, jejichž velikost dosahuje řádově nanometrů. Makropóry umožňují průtok mobilní fáze kolonou a díky nízkému odporu proti převodu hmoty umožňují aplikaci vyšších průtoků ve

srovnání s částicovými kolonami. Mesopóry umožňují zachycení a separaci analytů [2][128][129].



Obr. 27: (A) Náplňové kolony s plně porézními částicemi o velikosti 5 µm. (B) Monolitické kolony naplněné jedním kusem porézního sorbentu. Obrázek převzat ze zdroje [130].

Hlavní výhodou použití monolitických kolon je značné zvýšení průtokových rychlostí, které vede k urychlení separací bez zvýšení zpětného tlaku a bez ztráty separační účinnosti. Mezi další výhody patří krátká doba ekvilibrace systému či možnost zapojení několika kolon pro zvýšení účinnosti separace. Nevýhodou je nevhodnost použití monolitických kolon v LC-MS/MS systémech, kde je vysoký průtok mobilní fáze nekompatibilní s ionizací elektrosprejem (ESI) [2].

3.2.2.2 Změna selektivity

3.2.2.2.1 Vícemodální chromatografie (mixed-mode chromatography)

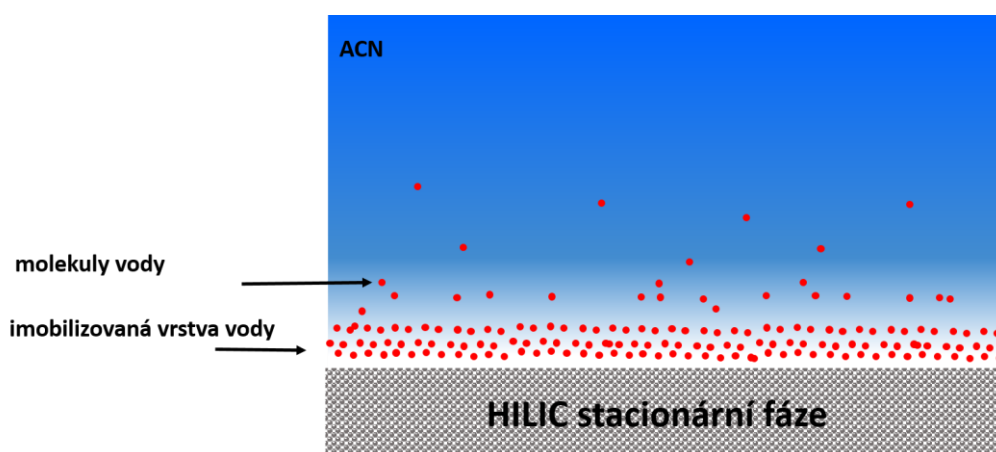
Vícemodální chromatografie je metoda, kdy látky interagují se stacionární fází více než jedním interakčním mechanismem. Jsou uplatňovány hydrofilní, hydrofobní a iontově výměnné interakce zároveň. Je to alternativní a komplementární technika k tradičním RP-HPLC, NP-HPLC a iontově výměnné chromatografii. Stacionární fáze pro

vícemodální chromatografii může obsahovat jednu funkční skupinu, která je buď kladně, nebo záporně nabitá, nebo obě funkční skupiny, které jsou dále v kombinaci s RP nebo HILIC stacionární fází. Tyto kombinace stacionárních fází tak umožňují separaci malých polárních látek, kyselin a zásad. Vícemodální chromatografii je také možné použít pro analýzu anorganických a organických molekul zároveň. Použitá mobilní fáze ovlivňuje disociaci nabitých analytů a tím jejich retenci na koloně (pH). Retence neutrálních analytů je ovlivněna především množstvím organického rozpouštědla [131]-[133].

3.2.2.2 Chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC)

HILIC je možné charakterizovat jako chromatografickou metodu využívající normálních stacionárních fází v kombinaci s mobilními fázemi typu RP-HPLC, které více než z 50% obsahují organické rozpouštědlo ve vodné složce [135].

HILIC je vhodnou separační metodou pro analýzu malých polárních molekul, které jsou špatně zadržovány na reverzních fázích a obvykle eluují s mrtvým objemem. Retence analytu je pravděpodobně způsobena rozdělováním analytu mezi hydrofobní částí mobilní fáze a hydrofilní vrstvou vody, která je imobilizována na povrchu polární stacionární fáze (Obr. 28). Mobilní fáze je obvykle složena z ACN a 5 – 40% vodné složky (vody, kyselin, bazí, či pufrů). Vodná složka je nejsilnější eluční činidlo. Zvýšení jejího množství v mobilní fázi vede ke snížení retence analytů. Mezi stacionární fáze typicky využívané v HILIC chromatografii patří silikagel, případně silikagel modifikovaný polárními skupinami jako jsou diolové, hydroxy-ethylové či amino- skupiny [4][135].



Obr. 28: HILIC chromatografie - vznik imobilizované vrstvy vody na povrchu polární stacionární fáze způsobuje retenci polárních analytů v systému.

Díky nižší viskozitě mobilní fáze může HILIC vykazovat vyšší separační účinnost pro polární analyty než RP-HPLC. Mezi další výhody HILIC chromatografie patří snadné spojení s MS detekcí s ESI díky vysoké koncentraci těkavých organických rozpouštědel. Nízký tlak v systému umožňuje separaci látek při vyšších průtokových rychlostech a v kratším čase analýzy. Díky nižšímu tlaku v systému lze využít i delší kolony a menší částice. Nespornou výhodou je také kompatibilita systému s obvyklými elučními činidly v SPE a mikroextrakcí od něj odvozených, čímž odpadá krok odpaření eluátu a jeho rozpuštění ve směsi kompatibilní s mobilní fází [4][135].

3.2.3 Spojení rychlé chromatografie s hmotnostní detekcí

Hlavním požadavkem na detektory používané v bioanalytických metodách je vysoká citlivost, selektivita a široké lineární rozmezí. Tyto požadavky splňuje hmotnostní spektrometr (MS). MS ve spojení s LC či SFC lze použít pro detekci širokého spektra látek.

Spojení chromatografických metod s MS lze použít ke kvantitativní i kvalitativní analýze. Kvantitativní (targeted, cílená) analýza obvykle sleduje m/z vybraných iontů (SIM) či vybraný přechod m/z prekurzorového a produktového iontu (SRM). Použití SRM zvyšuje citlivost a selektivitu analýzy z důvodu nastavení jedinečného přechodu pro sledovanou molekulu. Ke zvýšení selektivity je možné nastavit dva SRM přechody pro jednu látku a počítat sekundární poměr iontů. Přechod pro každou molekulu musí být důkladně optimalizován tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti. Je nutné zvolit prekurzorový ion, kolizní energii (CE), při které je prekurzor štěpen na produktové ionty, a produktový ion s nejvyšší odezvou. Pro kvantitativní analýzu je nejčastěji používán MS typu trojitého kvadrupólu především z důvodu vysoké rychlosti skenování, širokého lineárního rozmezí, vysoké citlivosti [102][137][138].

Necílená (non-targeted) analýzu umožňuje použití módu skenování všech m/z (full-scan), které jsou ionizovány. Tento způsob detekce tak umožňuje sledovat široké spektrum molekul zároveň. Je často využíván pro identifikaci neznámých látek ve vzorku, kdy je naměřená m/z porovnávána se známými hodnotami m/z . Necílenou analýzu je možné použít i pro kvantifikaci látek. Pro necílenou analýzu jsou nejčastěji využívány MS typu Q-TOF (kvadrupól s analyzátozem doby letu). Tyto analyzátory mají sice nižší

citlivost než QqQ, ale je pro ně typický rychlejší sběr dat a vyšší správnost měření m/z [102][137][138].

3.2.3.1 UHPLC-MS/MS

Spojení LC s hmotnostní detekcí je v současné době konvenčně využíváno k rutinním analýzám. Většina LC-MS analýz je prováděna za využití ionizačních technik ESI a atmosférické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Volba ionizační techniky závisí na molekulové hmotnosti, polaritě a těkavosti analytu. Odezvu detektoru je také možné ovlivnit přidavkem těkavých organických kyselin, pufrů, či změnou organického rozpouštědla. Tyto parametry mohou ovlivnit ionizaci molekul, a tím změnit citlivost analýzy. Použití hmotnostní detekce v bioanalýze umožňuje analýzy s vyšší citlivostí než s UV detekcí. Chromatografie pak slouží k vzájemnému odseparování analytů a jejich oddělení od interferencí pocházejících z matrice [102][137][138].

3.2.3.2 UHPSFC-MS/MS

Na první pohled je spojení SFC s hmotnostní detekcí snazší než u HPLC-MS. Je to dáno fyzikálně-chemickými vlastnostmi mobilní fáze, která je z větší části tvořena těkavým CO_2 . Přítomností CO_2 odpadá náročné odpařování velkého objemu mobilní fáze ve srovnání s LC-MS. Další fyzikálně-chemické vlastnosti a chování mobilní fáze v SFC ale ukazují, že spojení SFC-MS je na provedení náročnější. Náročnost vyplývá ze stlačitelnosti mobilní fáze. Vlivem snížení hustoty mobilní může dojít k vysrážení analytů v systému. To potom vede ke ztrátě chromatografické účinnosti, zhoršení tvaru píků a snížení odezvy a stability detektoru. Spojení SFC-MS bylo poprvé popsáno v 80. letech 20. století, a to pro cSFC (kapilární SFC), kde byla využívána chemická ionizace (CI) či ionizace elektronová (EI), řazená mezi tvrdé ionizační techniky, kde spojení a provedení bylo podobné GC-MS. S rozvojem SFC systémů využívajících pro separaci náplňové kolony a přídavky organických rozpouštědel jako modifikátorů bylo postupně zavedeno spojení SFC s hmotnostními detektory s iontovými zdroji pracujícími za atmosférického tlaku (API). Na počátku devadesátých let byly úspěšně použity MS s ESI a APCI. Jsou stále považovány za iontové zdroje první volby při spojení SFC-MS [109][114][139][140].

Mobilní fáze může být do iontového zdroje přiváděna všechna, nebo dochází k jejímu dělení, kdy do MS vchází pouze část mobilní fáze, která prošla kolonou. K rozdělení mobilní fáze může dojít hned po výstupu z kolony, kdy část odchází do MS a zbylá mobilní fáze je odváděna do UV detektoru a regulátoru zpětného tlaku. Jednou z dalších možností je rozdělení objemu mobilní fáze za UV detektorem, kdy je k eluátu čerpána pomocná kapalina, část mobilní fáze proudí do MS a část do regulátoru zpětného tlaku. Přídavek pomocné kapaliny umožňuje ovlivnit ionizaci analytů a snížit tak limit detekce. Její složení a průtok je nutné optimalizovat během vývoje metody tak, aby odezva detektoru byla co nejvyšší. Jako pomocné kapaliny jsou používána různá organická rozpouštědla (nejčastěji MeOH, ethanol - EtOH, isopropanol - IpOH) s přídavkem vody, kyselin, pufrů, či bazických látek. Kromě zlepšení ionizace může pomocná kapalina zabránit vzniku přenosů analytů mezi analýzami, které mohou vzniknout jako důsledek zachycení analytů v kapilárách [109][114][139][140].

3.3 Validace analytických metod

Validace analytické metody je proces, který má ověřit, zda je vyvinutá metoda vhodná pro zamýšlené použití, tedy např. pro kvantifikaci látek v dané matrici. Podle European Medicine Agency (EMA) existují tři typy validace: plná validace, částečná validace a cross-validace [144]. Pokud je metoda validována poprvé, nebo pro novou látku či metabolit, je nutné provést plnou validaci. Na základě zvolené autority je tak nutné stanovit správnost, přesnost, selektivitu, citlivost metody, reprodukovatelnost, stabilitu látek a proměřit kalibrační závislost. Mimo těchto parametrů je požadováno stanovení matricových efektů. Plnou validaci je třeba provést pro každou matici a každý druh matrice za stejných podmínek, za jakých budou zpracovávány vzorky ve studiích či v následných rutinních analýzách. Před každou validací je vhodné provést pre-validaci, kdy je určena výtěžnost a stanoveno kvantifikační rozmezí, tzn. horní a dolní limit kvantifikace (LLOQ, ULOQ) a limit detekce (LOD), na jejichž základě je sestavena kalibrační křivka. Pokud dojde k přenosu metody mezi laboratořemi, ke změně v kalibrační závislosti, skladování, či dalším menším změnám, je autoritami vyžadováno ověřit metodu pomocí částečné validace jako určení správnosti a přesnosti metody.

Poslední typ validace, cross-validace, spočívá v porovnání validačních parametrů dvou a více metod, které jsou používány v rámci jedné studie, nebo v porovnání validačních parametrů totožné metody využívané dvěma laboratořemi [141]-[141] [144].

3.3.1 Validační parametry

3.3.1.1 Selektivita (Selectivity)

Selektivita metody je schopnost metody rozlišit mezi analytem, vnitřním standardem (IS) a ostatními složkami matrice a nečistotami, které mohou být ve vzorku přítomny. Selektivita je stanovena proměřením šesti různých zdrojů matrice bez přídavku analytů, které byly upraveny zvoleným procesem. Selektivita metody je prokázána, pokud je odezva čisté matrice menší než je 20% LLOQ pro analyt v dané matrici a méně než 5% pro IS v dané matrici [141]-[144].

3.3.1.2 Přenosy analytů (Carry-Over)

Přenosy jsou problémem při ověřování správnosti a přesnosti metody u LC metod ve spojení s MS či UV detekcí. Jsou způsobeny elucí zbytkového množství analytu v následujících nástřících. Přenosy závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech analytů, především na lipofilitě/hydrofilitě, a také na koncentraci látky ve vzorku. Tento problém je velmi často způsobený adsorpcí analytů na nástřikovém systému či spoje v LC systému. Přenosy jsou nejvíce patrné u nízkých koncentracích analytu. Při validaci metody jsou přenosy ověřovány nadávkováním blankového vzorku po vzorku o koncentraci rovnající se ULOQ. Přenos by neměl být pro analyt větší než 20% hodnoty LLOQ a 5% pro IS [141]-[144].

3.3.1.3 Kalibrační rozmezí a limity kvantifikace (Calibration range, LOQ)

Kalibrační křivka je matematické vyjádření pro závislost intenzity signálu přístroje na měnící se koncentraci analytu. Obvykle se jedná o přímkovou závislost. V bioanalytické chemii jsou velmi často využívány i nelineární modely. Linearita metody je vyjádřena korelačním koeficientem, který vyjadřuje těsnost proložení bodů křivkou. Čím více se hodnota korelačního koeficientu blíží 1,0, tím více je závislost lineární. Kalibrační křivka

je definována kalibračním rozmezím, které udává LLOQ a ULOQ. Při validaci metody jsou vzorky jednotlivých kalibračních hladin připravovány vždy z totožné matrice (matricová kalibrační křivka), pro kterou je metoda validována, přidáním analytu o známé koncentraci. Kalibrační křivka by měla být sestavena minimálně z 6 kalibračních bodů, z čisté matrice bez analytů a IS a z nulového bodu, který obsahuje pouze IS. Každý kalibrační bod by měl být proměřen dvakrát [141]-[144].

3.3.1.4 Citlivost metody (Method Sensitivity)

Citlivost metody je schopnost analytické metody rozlišit malá množství analytu. Pro bioanalytické metody je to nejnižší hodnota koncentrace, kterou je možno určit s požadovanou správností a přesností, tedy LLOQ [141]-[144].

3.3.1.5 Správnost metody (Method Accuracy)

Správnost analytické metody označuje těsnost shody výsledků měření s nominální hodnotou koncentrace analytu. Validace správnosti metody je provedena proměřením minimálně 5 vzorků na 4 různých hladinách pokrývajících koncentrační rozmezí (LLOQ, trojnásobek LLOQ, 30 – 50% kalibračního rozmezí, 75% kalibračního rozmezí). Vzorky jsou připraveny z matrice, která je obohacena analytem o zvolené koncentraci, a následně jsou vyhodnoceny proti matricové kalibrační křivce. Výsledné hodnoty by se neměly od referenčních lišit o více než 20% pro LLOQ a 15% pro ostatní koncentrační hladiny [141]-[144].

3.3.1.6 Přesnost metody (Method Precision)

Přesnost metody udává míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky měření. Je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD). Stejně jako správnost metody je stanovena pro 4 koncentrační hladiny pokrývající kalibrační rozmezí (LLOQ, trojnásobek LLOQ, 30 – 50% kalibračního rozmezí, 75% kalibračního rozmezí). RSD pro LLOQ nesmí být větší než 20%, pro ostatní hladiny pak nesmí přesáhnout 15% [141]-[144].

3.3.1.7 Stabilita (Stability)

Stabilita analytu v dané matrici je v rámci validace bioanalytických metod důležitým parametrem. Stabilita by měla být ověřena pro úpravu vzorku, jeho analýzu a také pro skladovací podmínky. Žádný z výše zmíněných částí bioanalytického procesu by neměl ovlivnit koncentraci analytu ve vzorku. Krátkodobá a dlouhodobá stabilita analytu v matrici by měla být ověřena pro nízké a vysoké koncentrace (maximálně trojnásobek LLOQ a koncentrace blízká ULOQ) při různých teplotách od mrazícího boxu až po laboratorní teplotu. Kromě stability analytu v matrici by měla být ověřena stabilita analytu a IS v zásobním roztoku [141]-[144].

3.3.1.8 Matricové efekty (Matrix effects)

Matricové efekty jsou parametrem, který je spojený zejména s hmotnostní spektrometrií. Jsou definovány jako vliv matrice na odezvu analytu. Jsou způsobené látkami, které jsou součástí analyzované matrice. Nejčastěji se jedná o látky typu fosfolipidů, solí a proteinů. Tyto látky mohou zesílit či zeslabit signál analytu, mohou ovlivnit extrakci, nebo také retenční čas analytu [144]-[146].

Matricové efekty lze monitorovat několika způsoby. Prvním způsobem hodnocení matricových efektů je porovnání směrnice kalibračních křivek standardů a matricové kalibrační křivky [147]. Pokud jsou si směrnice rovny, matricové efekty nejsou přítomny. Další možností je provedení tzv. post-kolonového přídavku. Tato metoda spočívá v přídavku extraktu matrice do mobilní fáze protékající kolonou, která je za kolonou kontinuálně s využitím T-kusu obohacována analyty [148]. Tento postup slouží ke kvalitativnímu určení matricových efektů. Poslední možností, jak stanovit matricové efekty, je hodnocení dle Matuszewskeho [145]. V tomto případě jsou porovnávány plochy pík analytů, které byly do matrice přidány po provedení extrakce (A), a plochy pík analytů v roztoku rozpouštědla shodného složení jako u roztoku A (B). Z tohoto vyhodnocení lze kvantitativně určit míru potlačení, či zesílení signálu [144]-[146]:

$$ME (\%) = \frac{A}{B} * 100$$

Dle EMA[144] by měly být matricové efekty stanoveny minimálně pro 6 různých vzorků matrice pocházejících z jiných zdrojů. Matricové efekty jsou určeny pomocí výše uvedeného vzorce. Stanovením efektů by mělo být provedeno pro nízkou koncentrační hladinu (maximálně trojnásobek LLOQ) a vysokou koncentrační hladinu (hladina blízká ULOQ).

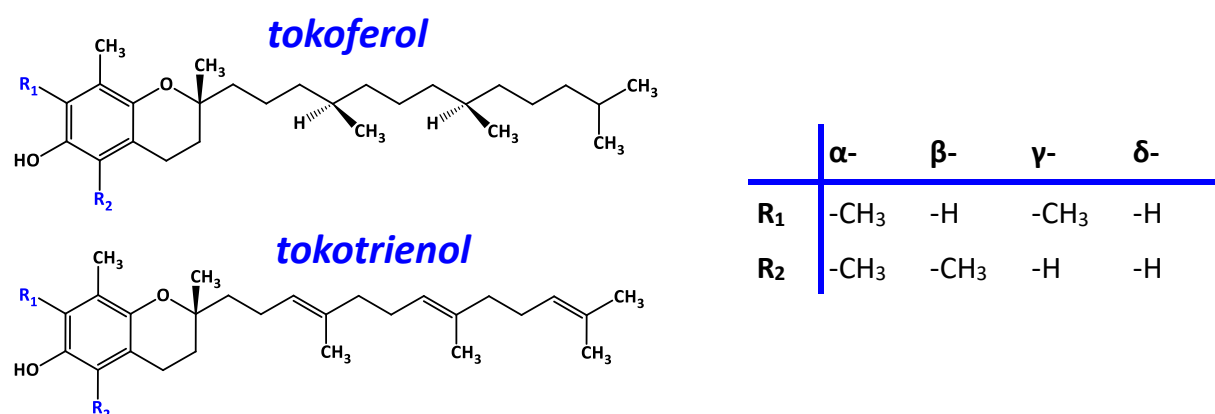
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vývoj a optimalizace UHPSFC-MS metody pro stanovení tokoferolů a tokotrienolů v lidském séru

4.1.1 Úvod do problematiky a cíl práce

Vitamin E je v tucích rozpustný vitamin, který vykazuje širokou biologickou aktivitu esenciální pro lidské zdraví. Je jedním z neúčinnějších antioxidantů, který má schopnost inaktivovat volné radikály podílející se na vzniku mnoha civilizačních onemocnění. Mezi jeho další diskutované účinky patří účinek kardioprotektivní, imunostimulační a neuroprotektivní. Separace izomerních forem vitaminu E pomocí LC systémů je obtížná z důvodu jejich vysoké lipofility, velmi blízké struktury a fyzikálně-chemických vlastností. Nejkritičtější je oddělení β - a γ - izomerních párů tokoferolů i tokotrienolů o shodném m/z , které se odlišují pouze polohou methylové skupiny na aromatickém jádru.

Cílem práce bylo vyvinout rychlou, selektivní a citlivou metodu pro analýzu 8 izomerních forem vitaminu E (α -, β -, γ -, δ - tokoferolu a tokotrienolu, Obr. 29) za využití UHPSFC ve spojení s jednoduchým kvadrupólem a efektivní mikroextrakční technikou založenou na LLE pro izolaci uvedených izomerů z lidského séra.



Obr. 29: Struktury izomerních forem tokoferolů a tokotrienolů.

4.1.2 Chemikálie

Referenční standardy α -tokoferolu (100 mg/ml, 99,9%), β -tokoferolu (50 mg/ml, 99,0%), γ -tokoferolu (1 mg/ml, 97,3%), δ -tokoferolu (100 mg/ml, 95,5%) v hexanu byly získány od Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo). Referenční standardy α -tokotrienolu (25 mg/ml, 98%), β -tokotrienolu (25 mg/ml, 98%), γ -tokotreinolu (25 mg/ml, 98%), δ -tokotrienolu (25 mg/ml, 98%) v EtOH byly poskytnuty Larodan Fine Chemicals (Malmö, Švédsko). Stlačený kapalný CO₂ o čistotě 99,995% byl získán od společnosti Messer (Praha, ČR). MeOH, IpOH, EtOH, kyselina mravenčí, kyselina octová a hydroxid amonný (25% roztok) o LC/MS čistotě, hexan a dichloromethan HPLC čistoty byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (Praha, ČR) stejně jako octan amonný (99,8%) a mravenčan amonný (99%) pro LC/MS analýzy.

Lyofilizované kontrolní sérum LYO HUM N bylo zakoupeno u firmy Erba Lachema (Brno, ČR).

4.1.3 Příprava zásobních a pracovních roztoků

Zásobní roztoky všech tokochromanolů byly připraveny zředěním každé látky hexanem na finální koncentraci 1 mg/ml, s výjimkou γ -tokoferolu, který byl v této koncentraci dodáván. Roztoky byly skladovány při -20 °C po dobu maximálně 2 týdnů. Pro další ředění roztoků byla používána směs hexanu a isopropanolu v poměru 90:10 (v/v).

4.1.4 Extrakční metoda

Pro extrakci tokochromanolů z lidského séra byla vyvinuta extrakční metoda kombinující PP a LLE. 200 μ l EtOH jako srážecího činidla bylo přidáno ke 100 μ l lidského séra pro uvolnění analytů z vazby na proteiny. Směs byla promíchána na vortexu po dobu 10 s. Následně bylo k roztoku přidáno 400 μ l směsi hexanu s dichloromethanem (80:20, v/v), směs byla promíchána na třepačce. Vzorek byl centrifugován po dobu 10 minut (12000 rpm, 4 °C). 300 μ l výsledného supernatantu bylo přeneseno do vialky, odstředěno a použito k analýze.

4.1.5 UHPSFC-MS analýza

Veškeré experimenty byly provedeny na SFC systému Acquity UPC² (Waters, Milford, MA, USA) složeného z binárního čerpadla, autosampleru, kolonového termostatu, regulátoru zpětného tlaku a PDA detektoru. Systém byl spojen s hmotnostním detektorem typu jednoduchého kvadrupólu využívajícím ESI Acquity QDa Detector (Waters, Milford, MA, USA) pomocí komerčně dostupného splitteru (Waters). Přídavná kapalina tvořená 5% vody v MeOH (v/v) byla čerpána pomocí izokratického čerpadla Isocratic Solvent Manager (Waters, Milford, MA, USA).

V průběhu optimalizace byly testovány 4 různé stacionární fáze – Waters Acquity UPC² BEH, Acquity UPC² BEH 2-EP, Acquity UPC² HSS C18 SB a Acquity UPC² CSH fluorophenyl (PFP) o rozměrech 100 x 3,0 mm a velikosti částic 1,7 µm, vyjma Acquity UPC² HSS C18 SB s průměrem částic 1,8 µm. Mobilní fáze byla složena z CO₂ a MeOH nebo EtOH jako modifikátorů a byla čerpána v izokratickém módu. V rámci vývoje metody byl testován vliv aditiv o různých koncentracích (octan amonný, mravenčan amonný, voda).

Výsledkem optimalizace byly dvě metody využívající stejnou kolonu, konkrétně Acquity UPC² BEH 2-EP a mobilní fázi složenou z CO₂ a MeOH s obsahem 10 mM mravenčanu amonného.

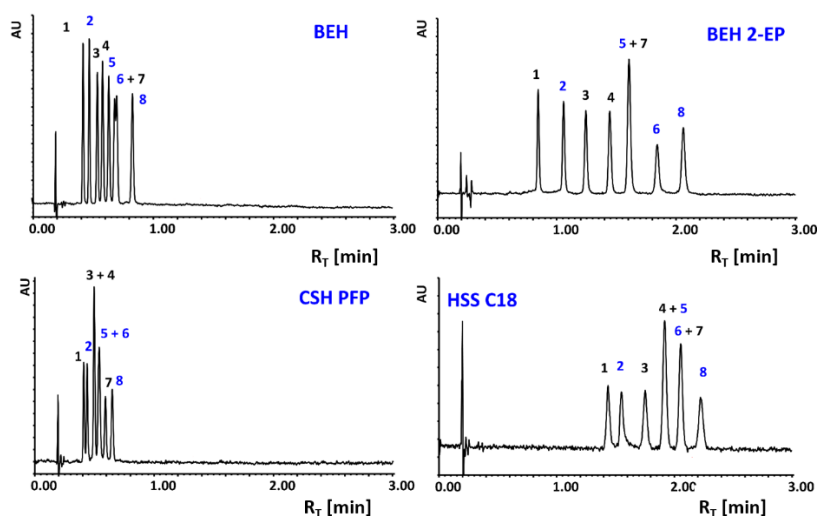
Izokratická eluce pro metodu s vysokým rozlišením („high resolution method“) využívala jako mobilní fázi CO₂ a modifikátor v poměru 98:2 o průtoku 1,5 ml/min. Teplota na koloně dosahovala 40 °C a zpětný tlak byl nastaven na 23,4 MPa. Pro metodu s důrazem na vysokou rychlost („high speed method“) byla vybrána mobilní fáze s 5% modifikátoru o průtoku 1,5 ml/min. Teplota na koloně byla nastavena na 50 °C a zpětný tlak systému dosahoval 13,0 MPa. Do systému byl nastříkovan 1 µl vzorku a analyty byly detekovány při 290 nm.

Pro hmotnostní detekci v pozitivním módu elektrospreje byly optimalizovány pro každý analyt jednotlivě hodnoty napětí na vstupním kuželu (α-tokochochromanoly – 10 V, ostatní analyty – 5 V). Analýzy byly prováděny pomocí SIM (single ion monitoring), kde byla pro každý analyt sledována hmota prekurzorového iontu [M+H]⁺: α-tokoferol = 431,0, β-tokoferol, γ-tokoferol = 417,0, δ-tokoferol = 403,0; α-tokotrienol = 425,3, β-

tokotrienol, γ -tokotrienol = 411,3, δ - tokotrienol = 397,3. K ovládání přístroje a vyhodnocování dat byly využity software MassLynx v4.1 a QuanLynx pro integraci píků a zpracování dat.

4.1.6 Vývoj SFC chromatografické metody

Separace izomerních forem vitamínu E je z důvodu jejich lipofility a strukturní podobnosti pomocí HPLC metod obtížná. Prvním krokem vývoje separační metody byla volba stacionární fáze. Byly testovány 4 stacionární fáze (BEH, BEH 2-EP, CSH PFP a HSS C18). CSH PFP fáze poskytovala velmi nízkou retenci analytů a zároveň na ní docházelo ke koeluci kritických izomerních párů β - a γ -. Ke koelucím docházelo také na fázi HSS C18. BEH stacionární fáze poskytovala lepší rozlišení, ale z důvodu nízké retence a koeluce analytů nebyla vhodná pro analýzu komplexních vzorků. Nejlepší selektivitu a rozlišení poskytovala za daných podmínek fáze BEH 2-EP (Obr. 30), která byla vybrána pro další optimalizaci metody.

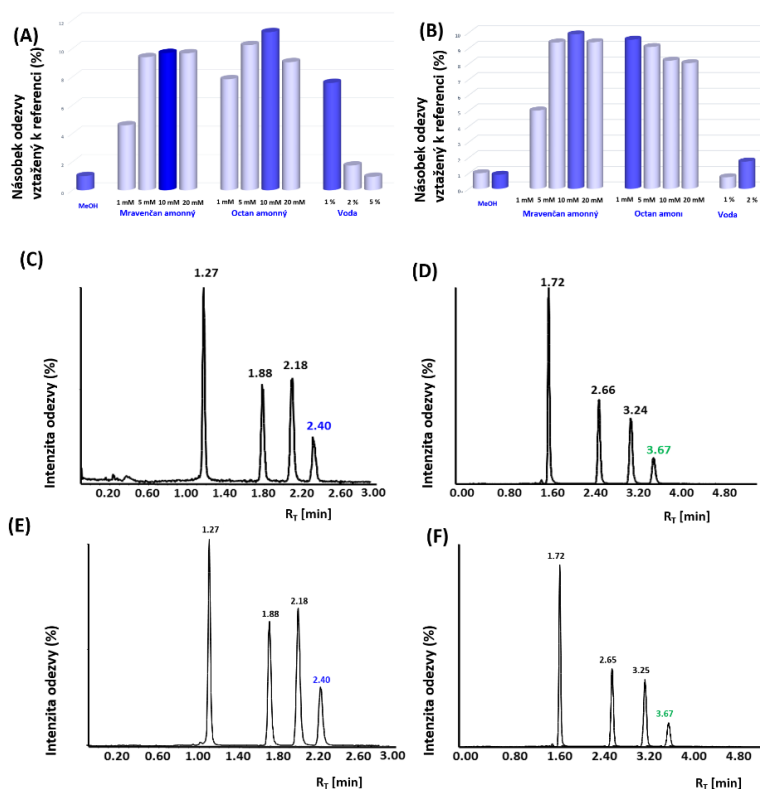


Obr. 30: Testování kolon při výběru optimální stacionární fáze pro analýzu vitamínu E. Podmínky separace: CO₂:modifikátor (97:3), teplota na koloně 50 °C, BPR 13 MPa, průtok 2,5 ml/min. (1) α -tokoferol, (2) α -tokotrienol, (3) β -tokoferol, (4) γ -tokoferol, (5) β -tokotrienol, (6) γ -tokotrienol, (7) δ -tokoferol, (8) δ -tokotrienol. [117].

Následujícím krokem byla optimalizace složení mobilní fáze, která je v SFC jedním z klíčových parametrů ovlivňující retenční čas, tvar píku, selektivitu a odezvu hmotnostního detektoru. Jako modifikátory byly testovány MeOH a EtOH. Změna MeOH jako modifikátoru první volby za EtOH vedla ke zvýšení času analýzy (Obr. 31). Odezva

MS touto změnou výrazně ovlivněna nebyla. Přidání aditiv octanu amonného a mravenčanu amonného k oběma modifikátorům vedlo ke zvýšení odezvy analytů. S rostoucí koncentrací vody jako aditiva v modifikátoru docházelo ve srovnání s ostatními aditivy k výraznému snížení odezvy. Jako modifikátor byl díky své ceně a kratšímu času analýzy vybrán MeOH. Jako aditivum byl vybrán 10 mM mravenčan amonný díky vysoké MS odezvě a dobré selektivitě (Obr. 31).

Spojení SFC-MS bylo provedeno pomocí splitování mobilní fáze, ke které byla před vstupem do iontového zdroje čerpána pomocná kapalina. Jako pomocné kapaliny byly testovány MeOH, EtOH a IpOH, přičemž nejvyšší odezvu detektoru poskytoval čistý MeOH. V následujícím kroku byla k MeOH přidávána aditiva mravenčan amonný, kyselina mravenčí, hydroxid amonný či voda. Těkává organická aditiva v tomto případě způsobila výrazný pokles intenzity ve srovnání s čistým MeOH. Pouze přidavek vody vedl ke zvýšení odezvy detektoru. Při přidavku 5% vody došlo ke zvýšení odezvy o 80%. Směs MeOH s 5% vody byla nakonec vybrána jako nejlepší pomocná kapalina.

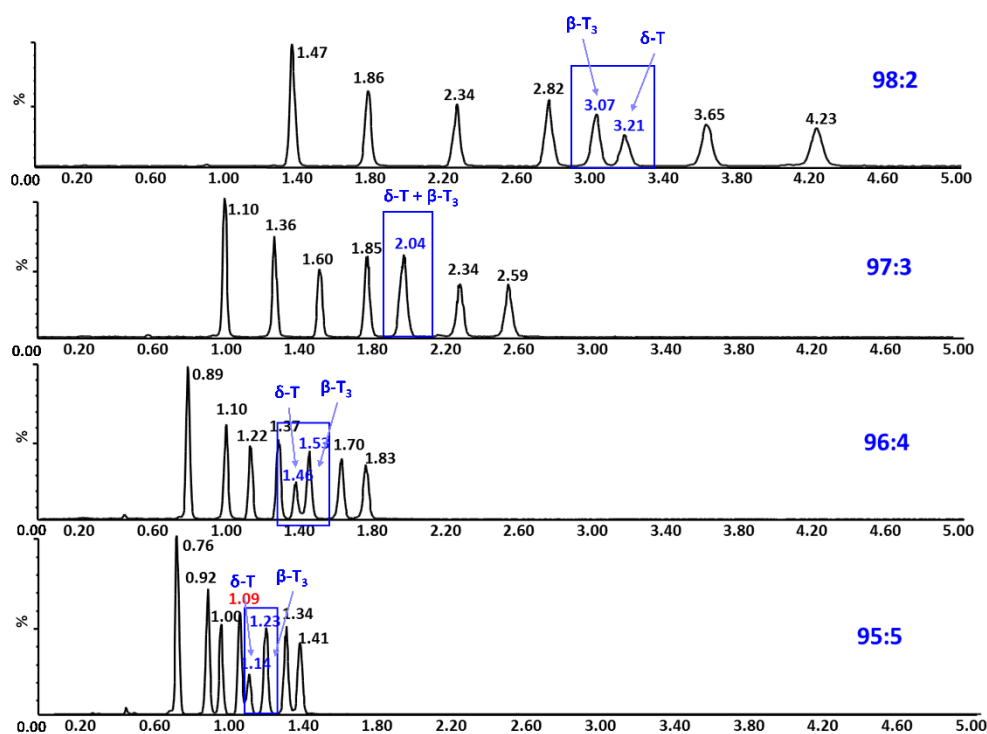


Obr. 31: Optimalizace složení mobilní fáze. Vliv testovaných aditiv v (A) MeOH a (B) EtOH na odezvu detektoru pro γ -tokoferol. TIC chromatogramy tokoferolů s (C) MeOH a (E) MeOH s přidavkem 10 mM mravenčanu amonného, (D) EtOH a (F) EtOH s přidavkem 10 mM mravenčanu amonného. Podmínky

separace byly následující: CO₂:modifikátor 97:3, teplota na koloně 40 °C, BPR 13,0 MPa, průtok 2,0 ml/min, přídavná kapalina MeOH o průtoku 0,3 ml/min.

Po optimalizaci složení mobilní fáze a přídavné kapaliny bylo třeba optimalizovat poměr modifikátoru a čistého CO₂. Množství modifikátoru může značně ovlivnit retenci analytů a selektivitu metody díky změně polariry mobilní fáze a tím i rozpustnosti analytů. Zvýšené množství modifikátoru vedlo ke snížení retence analytů. Byla pozorována také změna v selektivitě separace, která byla patrná u páru β -tokotrienolu a δ -tokoferolu (Obr. 32).

Při optimalizaci teploty na koloně docházelo při snížení teploty ke snížené retenci analytů. Vliv teploty byl testován v rozmezí 30 – 60 °C. Kritický pár β -tokotrienolu a δ -tokoferolu byl úspěšně separován při 98% CO₂ v mobilní fázi a všech teplotách kromě 30 °C. Obdobně u mobilní fáze s 95% CO₂ byla koeluce pozorována pouze při 40 °C.



Obr. 32: SIM chromatogramy ukazující vliv množství modifikátoru na rychlost a selektivitu separace. Podmínky separace byly následující: CO₂:MeOH + 10 mM mravenčan amonný, teplota na koloně 40 °C, BPR 13 MPa, průtok 2,0 ml/min. Jako pomocná kapalina byl použit MeOH s 5% vody o průtoku 0,3 ml/min. [117].

Po této optimalizaci byly vybrány dvoje podmínky, 98% CO₂ při 40 °C a 95% CO₂ v mobilní fázi a teplotě na koloně 50 °C. Zde byl testován vliv průtoku a zpětného tlaku,

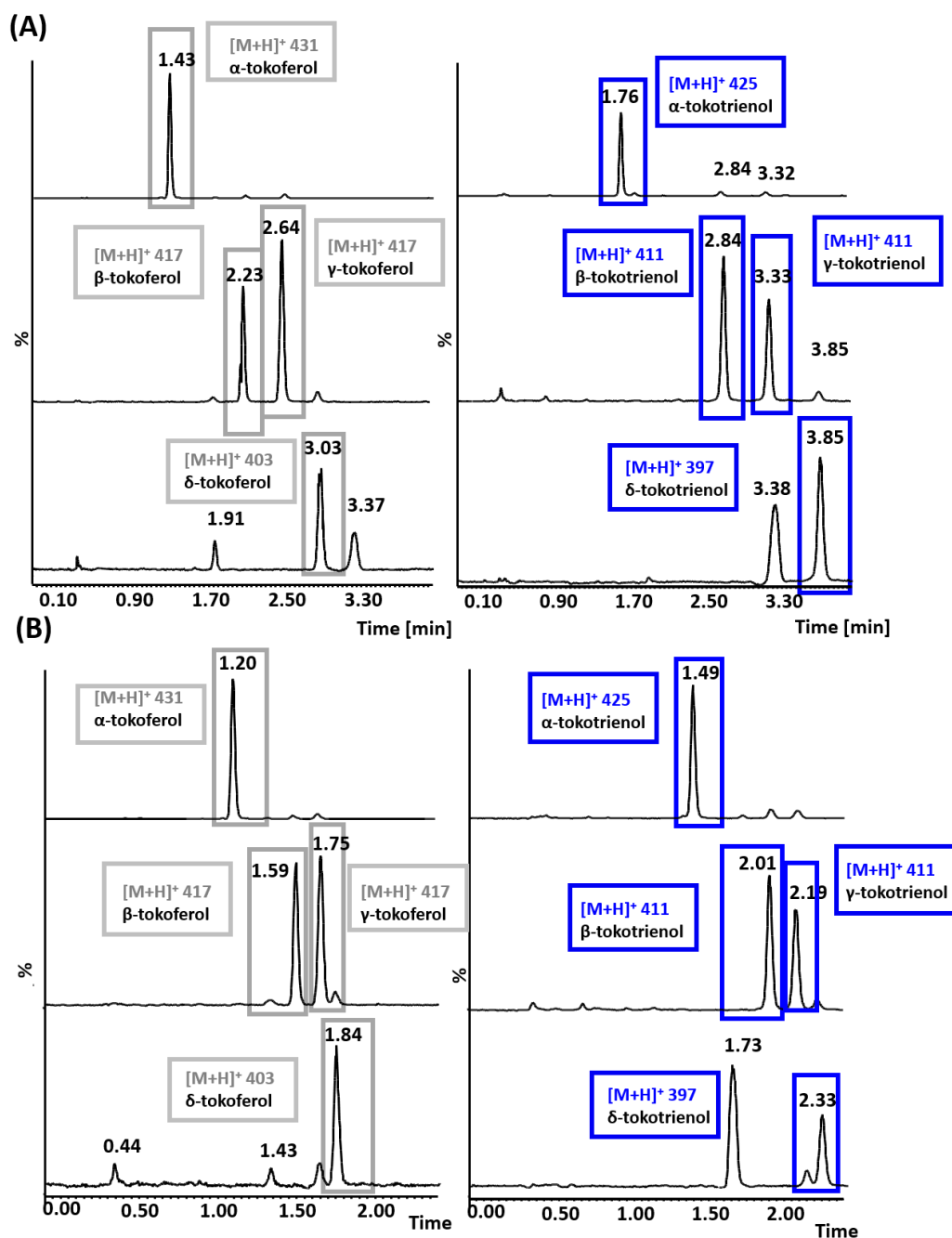
kteře mohou stejně jako předchozí parametry ovlivnit retenci analytů a selektivitu metody. Průtoky pro obě metody byly testovány v rozmezí 1,5 – 2,0 ml/min, přičemž snížení průtoku ze 2 ml/min na 1,5 ml/min vedlo ke zvýšení retence o 50% a zároveň ke zvýšení citlivosti o 60%. Kvůli různému množství CO₂ a modifikátoru v mobilní fázi byla testována různá rozmezí BPR tlaků. Pro 98% CO₂ byl zpětný tlak testován v rozmezí 13,0 – 23,4 MPa, pro 95 % v rozpětí 11,4 – 13,0 MPa. V obou případech vedla zvýšená hodnota tlaku na BPR ke zvýšení odezvy hmotnostního detektoru a ke zkrácení času analýzy až o 40%. Na základě této optimalizace byly nakonec vybrány dvě finální metody, metoda s vysokým rozlišením a lepší citlivostí „high resolution“ a metoda rychlejší se stále dostačující citlivostí „high speed“.

4.1.7 Optimalizace kroku přípravy vzorku

Díky dobré rozpustnosti vitamínu E v nepolárních rozpouštědlech byla pro jeho extrakci z lidského séra vybrána jako nejvhodnější technika LLE. Protože vitamín E je silně vázaný na proteiny, bylo třeba jej nejprve z této vazby uvolnit pomocí PP. Různé objemy lidského séra (100 a 200 µl), 4 organická rozpouštědla jako srážecí činidla (ACN, MeOH, EtOH, IpOH) o objemech 100 a 200 µl, různá rozpouštědla pro LLE (hexan, hexan:dichloromethan v poměru 90:10 nebo 80:20) o objemech 200 a 400 µl a extrakční čas (5 a 10 minut) byly testovány v průběhu optimalizace extrakčního kroku.

ACN a MeOH jako silná srážecí činidla neposkytovaly v tomto případě dostatečnou výtěžnost (10 – 35%), jako vhodnější se v tomto případě jevil EtOH či IpOH. 100 µl srážecího činidla nebylo pro uvolnění analytů z vazby dostačující, při použití vyššího objemu (200 µl) došlo k výraznému zvýšení výtěžnosti. Při testování extrakčního činidla pro LLE poskytovala nejvyšší výtěžnosti směs hexanu a dichloromethanu v poměru 80:20 (v/v) o objemu 400 µl, a to v rozmezí 80 – 120%.

Výhodou extrakční metody na bázi LLE ve spojení s UHPSFC-MS analýzou (Obr. 33) je možnost přímého nástřiku do systému bez nutnosti kroku odpaření extrakčního činidla, které je plně kompatibilní s používanou SFC mobilní fází.



Obr. 33: SIM chromatogramy pro vzorky lidského séra obohacené o 8 izomerních forem vitamínu E pro (A) "high resolution" a (B) "high speed" metodu [117].

4.1.8 Validace metody

Před vlastní validací metody byla ověřena opakovatelnost retenčních časů a plochy píků vyjádřena jako RSD (%). Opakovatelnost byla ověřena 10 nástřiky ze 4 vzorků o různé koncentraci pokrývající kalibrační rozmezí u obou optimalizovaných chromatografických metod. RSD pro opakovatelnost retenčních časů byla pro metodu

„high resolution“ menší než 0,1%, pro „high speed“ metodu <0,3%. RSD pro plochu píků byla pro „high resolution“ metodu menší než 8,5%, pro „high speed“ <10%, což je pro UHPSFC-MS metodu adekvátní. Následně byla ověřena linearita, správnost (odchylka od reference menší než 15%, pro LLOQ < 20%) a přesnost (RSD menší než 15%, pro LLOQ < 20%) metody a byly stanoveny LOD a LOQ, kdy LOD odpovídalo poměru signálu k šumu (S/N) rovnajícímu se 3, LOD potom S/N ≈ 10.

Obě metody byly validovány podle požadavků EMA [144]. Správnost a přesnost metody byly ověřeny na 4 koncentračních hladinách a matricové efekty na nízké a vysoké koncentrační hladině pro obě metody. Validační výsledky jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tab. 3 - Tab. 5).

		α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T ₃	β -T ₃	γ -T ₃	δ -T ₃	
Metoda „HIGH RESOLUTION“	STANDARD CALIBRATION	LINEARITA [r ²]	0,9999	0,9995	0,9996	0,9996	0,9987	0,9990	0,9996	0,9997
		LOD [μg/ml]	0,003	0,003	0,003	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017
		LLOQ [μg/ml]	0,01	0,01	0,01	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
		ULOQ [μg/ml]	5,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
	MATRICE	LINEARITA [r ²]	0,9930	0,9952	0,9954	0,9931	0,9940	0,9955	0,9927	0,9942
		LOD [μg/ml]	0,083	0,017	0,017	0,083	0,025	0,025	0,083	0,083
		LLOQ [μg/ml]	0,25	0,05	0,05	0,25	0,075	0,075	0,25	0,25
		ULOQ [μg/ml]	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Metoda „HIGH SPEED“	STANDARD CALIBRATION	LINEARITA [r ²]	0,9992	0,9995	0,9998	0,9996	0,9996	0,9996	0,9969	0,9996
		LOD [μg/ml]	0,017	0,033	0,17	0,17	0,017	0,033	0,017	0,017
		LLOQ [μg/ml]	0,05	0,10	0,50	0,50	0,05	0,10	0,05	0,05
		ULOQ [μg/ml]	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
	MATRICE CALIBRATION	LINEARITA [r ²]	0,9877	0,9942	0,9912	0,9914	0,9915	0,9941	0,9935	0,9922
		LOD [μg/ml]	0,167	0,167	0,25	0,167	0,083	0,083	0,25	0,083
		LLOQ [μg/ml]	0,5	0,5	0,75	0,5	0,25	0,25	0,75	0,25
		ULOQ [μg/ml]	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

Tab. 3: Linearita metody, LOD, LLOQ a ULOQ pro tokoferoly (T) a tokotrienoly (T₃) ve standardních roztocích a ve vzorcích s obsahem lidského séra pro metodu „high resolution“ a metodu „high speed“.

			α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T ₃	β -T ₃	γ -T ₃	δ -T ₃
Metoda „HIGH RESOLUTION“	Koncentrační hladiny [$\mu\text{g/ml}$] (n=5)	L1	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50
		L2	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
		L3	1,00	0,25	0,25	1,00	0,25	0,25	1,00	1,00
		L4	0,25	0,05	0,05	0,25	0,08	0,08	0,25	0,25
	SPRÁVNOST [%]	L1	108,0	102,8	106,5	106,6	96,1	93,2	96,9	95,4
		L2	114,0	109,7	113,9	111,8	97,6	99,4	95,9	97,2
		L3	115,4	88,1	102,5	99,2	92,6	101,4	88,3	93,6
		L4	87,9	107,9	78,8	95,0	92,4	105,8	96,7	97,6
	PŘESNOST [RSD %]	L1	10,7	4,3	5,7	4,9	4,6	4,0	5,0	4,2
		L2	7,3	6,1	7,8	5,5	5,3	5,1	3,2	4,0
		L3	15,9	5,2	11,2	5,3	9,3	4,2	13,6	8,3
		L4	12,0	9,0	7,0	3,7	5,9	13,4	11,6	7,4
Metoda „HIGH SPEED“	Koncentrační hladiny [$\mu\text{g/ml}$] (n=5)	L1	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50
		L2	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
		L3	1,00	1,00	2,50	1,00	0,75	0,75	2,50	0,75
		L4	0,50	0,50	0,75	0,50	0,25	0,25	0,75	0,25
	SPRÁVNOST [%]	L1	109,3	107,8	107,2	103,8	98,9	103,0	97,0	97,5
		L2	101,7	100,8	104,4	104,6	86,2	95,5	89,8	96,9
		L3	89,3	84,9	105,7	87,7	85,9	87,3	96,4	94,1
		L4	114,7	103,0	119,0	102,4	112,3	128,4	86,9	119,8
	PŘESNOST [RSD %]	L1	5,3	3,2	3,2	2,2	2,5	2,8	3,0	3,7
		L2	7,5	3,9	9,7	1,9	3,7	3,5	5,7	2,9
		L3	15,2	6,2	4,4	6,8	2,6	5,5	21,7	3,3
		L4	18,5	13,8	20,9	12,4	3,2	1,8	21,0	17,2

Tab. 4: Validační parametry správnost a přesnost stanovené na 4 koncentračních hladinách dle požadavků EMA pro obě optimalizované UHPSFC-MS metody.

		α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T ₃	β -T ₃	γ -T ₃	δ -T ₃
Metoda „HIGH RESOLUTION“	L1	137,0	83,7	129,0	121,6	129,9	125,6	89,8	142,9
	L2	104,4	106,4	109,0	119,1	112,0	93,3	104,9	119,8
Metoda „HIGH SPEED“	L1	132,2	107,7	103,4	120,4	106,0	110,0	107,7	113,7
	L2	106,2	104,5	106,0	104,9	104,2	108,8	106,4	108,0

Tab. 5: Kvantitativní hodnocení maticových efektů pro rychlou metodu a metodu s vysokým rozlišením stanovené na 2 koncentračních hladinách 1 $\mu\text{g/ml}$ (L1) a 7,5 $\mu\text{g/ml}$ (L2).

4.1.9 Závěr

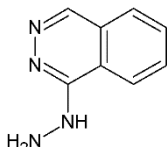
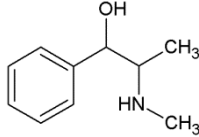
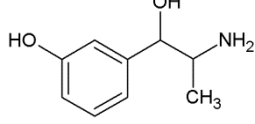
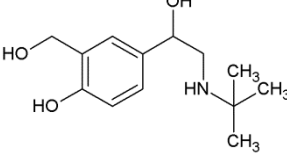
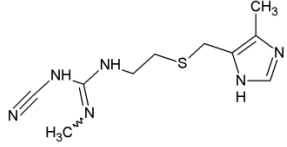
Dvě rychlé, citlivé a selektivní metody UHPSFC-MS pro analýzu 8 izomerních forem vitamínu E v lidském séru využívající kombinaci LLE a PP jako kroku pro přípravu vzorků byly vyvinuty a validovány. Mezi výhody metody využívající jednoduchý kvadrupól pro detekci analytů patří především cenová dostupnost a jednoduché ovládání MS detektoru ve srovnání s obvykle používanými detektory typu trojitých kvadrupólů. Rychlá „high speed“ metoda poskytuje separaci analytů během 2,5 minut, metoda s vyšší citlivostí („high resolution“) v čase 4,5 minut. Metoda „high resolution“ poskytuje citlivější výsledky a je vhodnější pro analýzu komplexních maticí díky lepšímu rozlišení a delšímu času analýzy. Metoda je na příklad vhodnější pro analýzu vzorků z rostlinného materiálu, který kromě analytů obsahuje i mnoho jiných interferujících látek a při delším čase analýzy je lze lépe odseparovat. Rychlejší „high speed“ metoda je naopak vhodnější pro rychlý screening vzorků a pro matrice, které nemají komplexní složení, jako je sérum a moč. K výhodám obou metod patří snížená spotřeba rozpouštědel, spotřeba malého objemu vzorku a vysoká prostupnost vzorků laboratoří.

4.2 Vývoj jednokrokové extrakce polárních látek z plazmy s využitím paralelní extrakce pomocí umělých kapalných membrán

4.2.1 Úvod do problematiky a cíl práce

PALME je moderní mikroextrakční metoda odvozená od LLE, která je založena na přechodu analytů ze vzorku do vodného extrakčního činidla přes umělou membránu s obsahem organického rozpouštědla nemísitelného s vodou (3.1.2.4). Tato metoda byla prozatím použita pouze pro extrakci polárních a nepolárních kyselin a nepolárních zásad z lidské plazmy.

Cílem této práce bylo vyvinout novou mikroextrakční metodu PALME pro modelové bazické polární látky hydralazin, cimetidin, efedrin, metaraminol a salbutamol (Tab. 6), které ve své molekule obsahují aminoskupiny a další polární substituenty a proto je jejich extrakce pomocí LLE značně obtížná.

Látka	MW	Log P	pKa	Strukturní vzorec
hydralazin	160,07	0,75	6,40	
efedrin	165,11	1,32	9,52	
metaraminol	167,09	- 0,05	9,68	
salbutamol	239,15	0,34	9,40	
cimetidin	252,11	- 0,29	6,72	

Tab. 6: Fyzikálně-chemické vlastnosti (molekulová hmotnost MW, Log P a pKa) a strukturní vzorce modelových analytů zvolených pro vývoj PALME extrakce. Data získána z [150].

4.2.2 Chemikálie

Standardy analytů hydralazinu hydrochloridu, cimetidinu, salbutamolu, metaraminolu bistartarátu a efedrinu hydrochloridu byly získány od Sigmaly Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dodecylacetát, 2-nonanon, hexadekan, 1-oktanol, dihexylether, 2-oktanon a isopentyl benzen pro optimalizaci PALME extrakce byly zakoupeny u Sigmaly Aldrich (St. Louis, MO, USA). MeOH, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, kyselina chlorovodíková, kyselina trifluoroctová a kyselina mravenčí byly zakoupeny u Merck (Darmstadt, Německo). Lidská plazma byla získána od Univerzitní nemocnice v Oslu (Norsko) a skladována při -32 °C.

4.2.3 Příprava zásobních a pracovních roztoků

Zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny navážením hydralazinu, cimetidinu, salbutamolu, efedrinu a metaraminolu a jejich následným rozpuštěním v EtOH. Zásobní roztoky byly uchovávány při -20 °C. Pracovní roztok byl připraven naředěním zásobního roztoku 25 mM fosfátovým pufrem o pH 7 na finální koncentraci 10 µg/ml pro každý analyt. Pracovní roztok byl připravován každý týden čerstvý a byl uchováván při teplotě 2 – 8 °C.

4.2.4 PALME extrakce

Pro PALME extrakci byly použity 96 jamkové spodní donorové destičky o objemu jamky 0,5 ml (Agilent, Santa Clara, CA, USA), sada osmi mikrozkupek pro PCR typu eppendorf o objemu 0,2 ml (eight-tube strips, Thermo Scientific, San Diego, CA, USA), polypropylenová membrána o porozitě 0,1 µm a tloušťce 100 µm (Accurel PP 1ER/P, Membrana, Wuppertal, Německo) pro přípravu akceptorového kompartmentu a víčko pro přikrytí sestavy.

Finální PALME extrakční procedura byla provedena následujícím způsobem. 250 µl vzorku plazmy a 50 mM fosfátového pufru o pH 7 (1:2, v/v) bylo napipetováno do jamky donorové destičky. 2,5 µl 15% 2-diethylhexylfosfátu (DEHP) v 2-nonanonu bylo naneseno na polypropylenovou membránu. Do akceptorové destičky nad vytvořenou umělou kapalnou membránu bylo napipetováno 50 µl 150 mM kyseliny trifluoroctové. Akceptorová destička byla vložena do donorové a sestava byla zavřena víčkem. Extrakce

byla prováděna na třepačce Vibramax 1000 (Heidolph Instruments, Schwabach, Německo) při rychlosti 900 rpm po dobu 45 minut. Výsledný extrakt byl odebrán do insertu a nastříknut do chromatografického systému.

4.2.5 UHPLC-MS/MS analýza

Pro analýzu vzorků byl použit chromatografický systém Dionex UltiMate 3000 spojený s hmotnostním detektorem LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Separace byla provedena na koloně Acquity UPLC HSS T3 o rozměrech 100 x 2,1 mm a velikosti částic 1,8 μm (Waters, Wexford, Irsko). Mobilní fáze A byla složena z 20 mM kyseliny mravenčí a MeOH (95:5, v/v) a mobilní fáze B z MeOH a 20 mM kyseliny mravenčí (5:95, v/v). Pro analýzu byla využita gradientová eluce o konstantním průtoku 0,3 ml/min, teplotě 40 °C a následujícím průběhu (Tab. 7):

Čas [min]	A [%]	B [%]
0,0	100	0
4,0	100	0
4,1	97	3
8,0	92	8
8,8	92	8
8,9	0	100
9,9	0	100
10,0	100	0
11,0	100	0

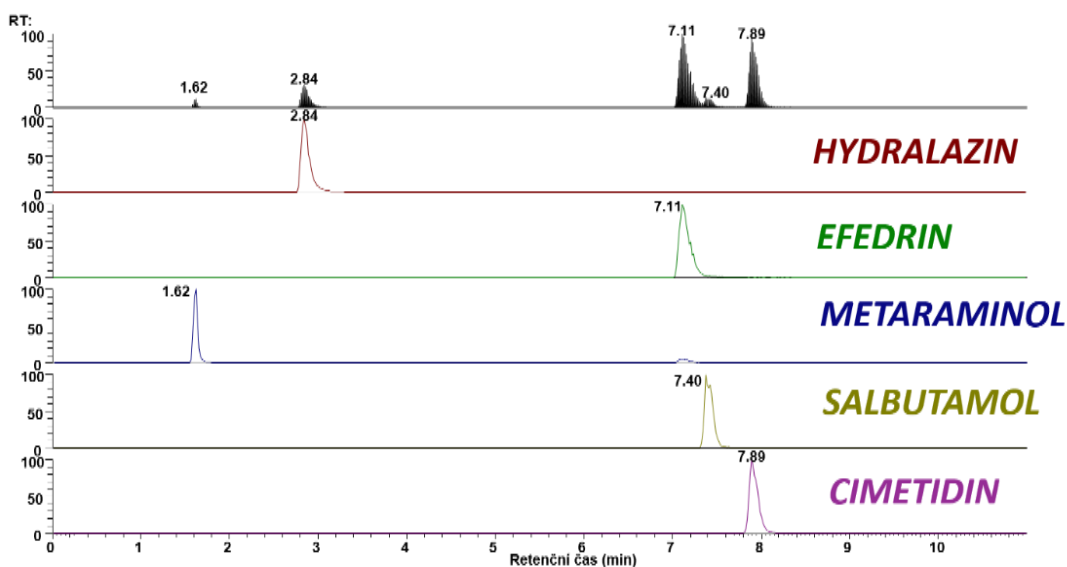
Tab. 7: Průběh gradientové eluce pro analýzu polárních bazických látek.

Při detekci hmotnostním spektrometrem byly látky ionizovány pomocí ESI v pozitivním módu. Teplota zdroje byla nastavena na 350 °C. Látky byly kvantifikovány na základě SRM (Obr. 34). Prekurzorové a produktové ionty byly zvoleny pro každou látku. Kolizní energie (CE) byly pro každou molekulu optimalizovány následujícím způsobem (Tab. 8):

MRM	[M+H] ⁺	Produktový ion	CE
hydralazin	161,0	115,7 (88,7)	31 (34)
efedrin	166,0	148,0	25
cimetidin	253,0	158,9 (116,8)	30
salbutamol	240,0	222,1	32
metaraminol	168,0	149,9	35

Tab. 8: Prekurzorové a produktové ionty a optimální kolizní energie (CE) pro každý analyt. U hydralazinu a cimetidinu byly sledovány dva produktové ionty, druhý produktový ion je uveden v závorkách.

Data byla zpracována pomocí Xcalibur software (verze 2.2.SPI.48) od firmy Thermo Scientific.



Obr. 34: SRM chromatogramy analyzovaných látek měřený za finálních podmínek pro UHPLC-MS/MS analýzu.

4.2.6 Vývoj extrakční metody

Dřívější studie extrakce PALME ukázaly, že polarita analytů hraje důležitou roli pro výtěžnost extrakce. Analyty hydrofobního charakteru snadno přecházely přes membránu díky pasivní difúzi mezi donorovým a akceptorovým roztokem.

Prvním krokem vývoje PALME metody pro extrakci polárních bazických látek bylo testování standardního protokolu PALME, kdy z alkalického roztoku vzorku byly látky extrahovány přes membránu impregnovanou 1-oktanolem. Nenabitě látky přes membránu nebyly schopné přejít do kyselého akceptorového roztoku ani po přidání přenašeče DEHP k 1-oktanolu. Tyto výsledky dokázaly, že polární bazické látky nelze extrahovat v nenabitě formě.

Aby mohlo dojít k párování iontově párového přenašeče a analytu, muselo být upraveno pH vzorku tak, aby se v něm analyty vyskytovaly v nabitě formě. Proto bylo pH vzorku upraveno 25mM fosfátovým pufrům o pH 7. Jakmile byly analyty nabitě, mohly tvořit iontové páry s DEHP a byly extrahovány s výtěžností 18 – 93%. Snížení pH vzorku při dalších experimentech nevedlo ke zlepšení výtěžnosti extrakce. Proto optimalizace pokračovala volbou typu organického rozpouštědla ve směsi s DEHP používaného

k impregnaci polypropylenové membrány. Mezi testovaná rozpouštědla patřil dodecylacetát, dihexylether, 2-hexyldekanol, 2-nonanon, hexadekan a 1-oktanol. Extrakce s nejvyšší návratností poskytoval 2-nonanon, kde se výtěžnosti analytů kromě hydralazinu pohybovaly v rozmezí 69 – 96%. Výtěžnost pro hydralazin byla nižší (18%), protože část hydralazinu zůstávala ve vzorku a zbylá část zachycená na membráně, pravděpodobně z důvodu reakce látky s ketoskupinou membránové kapaliny 2-nonanonu.

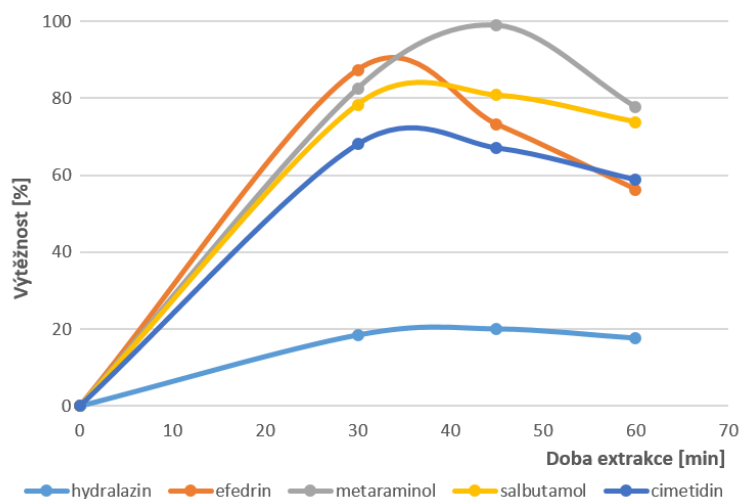
V následujícím kroku bylo optimalizováno složení akceptorového roztoku. Požadavkem na extrakční činidlo byla kompatibilita s UHPLC-MS systémem a jeho pH umožňující extrakci nabitých bazí zachycených na membráně. Z uvedených důvodů byla jako extrakční činidla testována kyselina mravenčí a trifluoroctová o různých koncentracích. Výsledky optimalizace jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 9). Nejlepší výsledky poskytovala kyselina trifluoroctová o koncentraci 150 mM, kde výtěžnosti pro analyty byly v rozmezí 81 – 112% a pro hydralazin byla výtěžnost 20%.

Akceptorový roztok [mM]		Výtěžnost [%]				
		hydralazin	efedrin	metaraminol	salbutamol	cimetidin
Trifluoroctová kyselina	10	0,00	32,28	49,97	44,98	45,59
	50	13,27	99,93	118,70	103,79	88,15
	100	17,06	99,87	135,56	107,67	88,68
	150	19,28	90,03	112,20	84,07	81,10
	200	17,11	72,73	83,63	47,29	38,97
Mravenčí kyselina	10	0,00	35,97	40,72	48,16	45,22
	100	1,23	38,58	55,49	69,85	75,62
	200	2,58	53,10	58,02	72,47	76,40
	500	5,77	60,19	69,61	68,92	72,65
	1000	8,04	61,90	68,72	52,92	57,51

Tab. 9: Efekt akceptorového činidla. Extrakce byla provedena s 250 μ l vzorku o pH 7, organická membrána obsahovala 2,5 μ l 2-nonanonu s 15% DEHP.

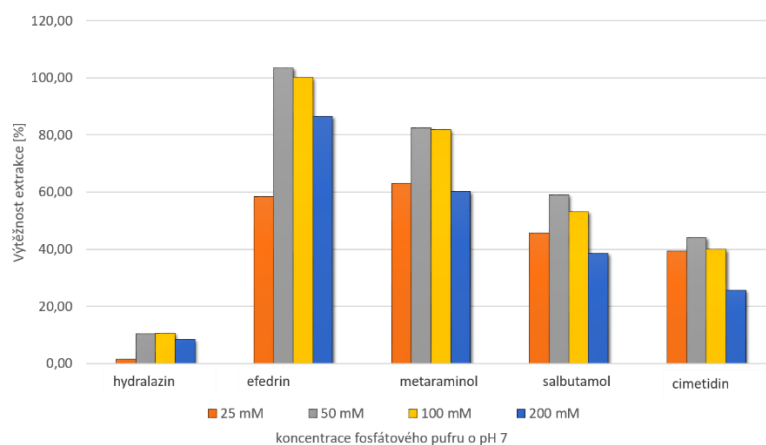
Po optimalizaci akceptorového činidla a složení membrány byla metoda aplikována na vzorky lidské plazmy s obsahem zvolených analytů. Pro ověření výtěžností byla plazma naředěna 25 mM fosfátovým pufrům v poměru 1:1. Výtěžnosti při takto použitým ředění byly v rozmezí 10 – 79% a jejich snížení oproti extrakcím prováděným na roztocích standardů bylo způsobeno pravděpodobně vazbou analytů na proteiny, či vyšší viskozitou vzorku. Prvním krokem optimalizace extrakce na vzorcích plazmy byla tedy z důvodu pomalejší extrakční kinetiky optimalizace extrakčního času. Při zvýšení

extrakčního času z 30 minut na 45 došlo ke zvýšení výtěžnosti u všech analytů. Další zvýšení doby extrakce na 60 minut nevedlo k dalšímu zvýšení účinnosti extrakce, proto byla pro finální protokol zvolena délka extrakce 45 minut (Obr. 35).



Obr. 35: Vliv doby extrakce na výtěžnost extrakční procedury.

Pro další zvýšení výtěžnosti extrakce byl testován vliv ředění vzorku plazmy a koncentrace fosfátového pufru o pH 7, který byl k ředění používán. Byla testována koncentrace 25, 50, 100 a 200 mM, kde pro všechny analyty byl pozorován nárůst výtěžnosti extrakce při zvýšení koncentrace z 25 mM na 50 mM. Další zvyšování koncentrace pufru nevedlo ke zlepšení výsledků (Obr. 36). Ředění vzorku 50 mM fosfátovým pufrům v poměru 1:2 poskytovalo vyšší výtěžnosti než ředění 1:1, a to v rozmezí 14 – 129%, pravděpodobně z důvodu snížení viskozity roztoku vzorku a snížení vazby látek na proteiny.



Obr. 36: Vliv molární koncentrace fosfátového pufru na výtěžnost extrakce.

4.2.7 Validace metody

Po optimalizaci extrakčního kroku pomocí PALME byla metoda validována dle požadavků EMA [144]. Byla ověřena linearita, správnost a přesnost metody. Byly stanoveny LOD a LOQ pro všechny analyty. Pro zvolené hladiny byly také ověřeny matricové efekty. Výsledky validace jsou shrnuty v tabulce (Tab. 10).

		hydralazin	efedrin	metaraminol	salbutamol	cimetidin
Standardní kalibrační křivka [r²]		0,9994	0,9984	0,9938	0,9919	0,9900
Matricová kalibrační křivka [r²]		0,931	0,9989	0,9956	0,9927	0,9933
Koncentrační hladiny [ng/ml] (n)	L1	50 (8)	10 (5)	25 (6)	25 (6)	25 (6)
	L2	100 (6)	25 (5)	75 (8)	75 (6)	75 (6)
	L3	500 (6)	100 (8)	250 (6)	250 (6)	250 (7)
	L4	750 (6)	250(7)	750 (6)	750 (6)	750 (6)
Správnost [%]	L1	120,5	85,5	106,2	120,7	129,3
	L2	109,6	109,6	86,7	94,9	110,7
	L3	83,9	93,1	128,1	118,9	115,1
	L4	103,8	109,1	111,5	115,9	113,1
Přesnost [RSD %]	L1	8,9	15,3	11,0	13,9	7,6
	L2	13,1	17,3	9,2	5,2	14,4
	L3	14,0	13,3	6,6	8,2	13,0
	L4	14,8	12,8	13,9	14,8	9,9
Matricové efekty [%]	L1	80,0	128,5	102,6	107,5	109,4
	L2	80,3	107,0	118,6	109,5	104,3
	L3	85,1	103,6	97,5	102,7	99,4
	L4	89,8	120,8	120,6	114,5	102,3

Tab. 10: Výsledky validace pro PALME polárních bazických látek. Hodnocena byla linearita standardní a matricové kalibrační křivky, pro L1-L4 správnost, přesnost metody a matricové efekty podle požadavků EMA [144], n – počet opakování.

4.2.8 Závěr

První metoda PALME pro extrakci polárních bazických látek s využitím ion-párového činidla jako přenašeče látek přes membránu byla vyvinuta a validována. Byly optimalizovány různé parametry extrakce včetně složení donorového a akceptorového roztoku a složení organického mediátoru pro impregnaci polypropylenové membrány. Byl ukázán potenciál této extrakce pro paralelní izolaci a zakoncentrování analytů až z

96 biologických vzorků ve velmi krátkém čase 45 minut, což umožňuje zvýšit prostupnost vzorků laboratoří.

4.3 Optimalizace μ -SPE-PT metody pro analýzu statinů v lidském séru za využití komerčně dostupných a laboratorně připravených špiček pipet

4.3.1 Úvod do problematiky a cíl práce

Statiny jsou významnou skupinou léčiv, která jsou používána pro snižování hladiny cholesterolu v krvi. Jejich účinek spočívá v blokaci enzymu 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reductázy. Statiny byly objeveny v 70. letech minulého století jako produkty houby *Penicillium citrinum*. Další deriváty izolovaného mevastatinu byly získávány syntetickou cestou. Statiny existují ve dvou formách, ve formě laktonové (proléčivo) a ve formě kyseliny (vlastní účinná látka). Mezi nejvíce užívané statiny patří atorvastatin, simvastatin, rosuvastatin a pravastatin [151]-[153]. Monitorování hladiny statinů je důležitou součástí správného stanovení dávky a také kontroly pravidelného užívání léčiv. Z důvodu častého odebírání vzorků při monitorování je vhodné pro izolaci analytů používat mikroextrakční techniku. Jednou z moderních metod, která se dostává do popředí je metoda μ -SPE-PT. Metoda umožňuje paralelní stanovení několika desítek vzorků o malém objemu (desítky μ l) ve velmi krátkém čase. Špičky naplněné sorbentem jsou dostupné komerčně, nebo je možné si je připravit v laboratoři, podle postupu popsaném v kapitole 3.1.2.2. Původně byly tyto extrakční špičky vyvinuty pro analýzu v proteomice, postupně ale byly používány i pro analýzy dalších maticí.

Cílem této práce bylo vyvinout mikroextrakční metodu pro analýzu statinů v jejich kyselé i laktonové formě za použití komerčně dostupných a laboratorně připravených špiček plněných sorbentem a zjistit, zda oba typy špiček poskytují shodné výsledky a je možné je zaměnit, případně zda laboratorní, nebo komerční mají oproti druhé skupině významné přednosti, či nedostatky.

4.3.2 Chemikálie

Následující statiny – atorvastatin ve formě vápenaté soli (AT), atorvastatin lakton (ATL), rosuvastatin ve formě vápenaté soli (RV), rosuvastatin lakton (RVL), pravastatin ve formě sodné soli (PV), pravastatin lakton (PVL), pitavastatin ve formě vápenaté soli (PTV), pitavastatin lakton (PTVL), simvastatin (SV) a amonná sůl kyseliny simvastatinu

(SVA) byly získány od firmy Toronto Research Chemicals (Ontario, Kanada). Pro každou látku byl zajištěn izotopicky značený IS - AT-d₅, ATL-d₅, RV-d₆, RVI-d₆, PV-d₃, PVL-d₃, PTV-d₅, PTVL-d₅, SV-d₆ a SVA-d₆ také od firmy Toronto Research Chemicals (Ontario, Kanada). ACN, kyselina octová, hydroxid amonný o LC-MS čistotě byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (Praha, ČR).

Lyofilizované kontrolní sérum LYO HUM N bylo zakoupeno u firmy Erba Lachema (Brno, ČR).

4.3.3 Příprava zásobních a pracovních roztoků

Zásobní roztoky standardů byly připraveny rozpuštěním 1,0 mg analytu v 1,0 ml rozpouštědla v závislosti na rozpustnosti jednotlivých analytů. PVL, RVL, ATL, AT, PTVL, SV a jejich IS byly rozpuštěny v ACN, ostatní analyty ve směsi ACN: 0,5mM octan amonný o pH 4 v poměru 30:70 (v/v). Tato směs rozpouštědel byla používána pro další ředění pracovních roztoků. Zásobní roztoky byly připravovány každý týden čerstvé a byly uchovávány při teplotě 8 °C.

4.3.4 Extrakční metoda

Byly vyvinuty 3 mikroextrakční metody využívající sorbenty uložené v pipetovacích špičkách. Všechny procedury využívaly k průchodu roztoků přes sorbent centrifugu, kdy po každém nanesení činidla či vzorku byla kolonka centrifugována při 8000 rpm po dobu 10 minut. Pro všechny metody byl sorbent kondicionován stejným způsobem, a to 300 µl ACN a 300 µl 0,1 M octanu amonného o pH 4,5. Po nanesení vzorku byl sorbent promyt 100 µl 0,01 M octanu amonného o pH 4,5 a 100 µl směsi 0,01 M octanu amonného o pH 4,5 a ACN v poměru 95:5 (v/v) pro odstranění balastních látek. K eluci analytů bylo použito 100 µl ACN. Následně byly vzorky odpařeny dosucha pod proudem dusíku a znovu rozpuštěny ve směsi ACN:0,5 mM octan amonný o pH 4 v poměru 30:70 (v/v). Roztok byl přefiltrován přes polytetrafluorethylenový (PTFE) stříkačkový filtr (0,22 µm, Membrane Solutions) a 5 µl vzorku bylo nastříknuto do analytického systému.

Tato metoda byla aplikována na vzorky lidského séra s obsahem statinů. Před nanesením vzorku na sorbent bylo nutné sérum precipitovat. Ke 100 µl séra bylo přidáno 200 µl ACN, směs byla promíchána, po 10 minut inkubována za laboratorní teploty a

následně zcentrifugována při 4200 rpm po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Vysrážené vzorky byly naředěny 0,01 M octanem amonným o pH 4,5 na objem 2ml, aby byl zředěn ACN, který by při nanášení vzorku zabránil retenci analytů na sorbentu.

4.3.5 UHPLC-MS/MS analýza

Pro analýzu byl použit systém Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) ve spojení s hmotnostním detektorem typu trojitého kvadrupólu Quattro Micro API (Waters, Manchester, UK). Separace statinů probíhala na koloně Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) o teplotě 35 °C. Mobilní fáze byla složená z ACN (složka A) a 0,5 mM octanu amonného o pH 4,0 (složka B) s počátečním poměrem gradientové eluce 30:70. Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min a separace trvala 10,5 minut včetně ekvibrace systému před dalším nástřikem, jak bylo podrobně popsáno v předchozí práci [154].

4.3.6 Optimalizace extrakční metody

V průběhu vývoje metody pro mikroextrakci byla nejprve vyvinuta výchozí metoda pro další porovnání komerčně dostupných a laboratorně připravených špiček plněných sorbentem. Složení elučního a promývacích činidel vycházelo z předchozích studií [151][155].

Byly testovány 3 typy sorbentů – C8, C18 a kombinace styren divinylbenzenu (SDB) a C18. Jako eluční a promývací činidla byly testovány směsi ACN a 0,01 M octanu amonného o pH 4,5 o koncentracích ACN 90%, 95% a 100% pro eluční činidlo a 0%, 5% a 10% pro promývací činidlo. Metody byly optimalizovány na základě výtěžnosti metody. Při použití 90% byly výtěžnosti velmi nízké (méně než 20%), rozdíly pro eluční činidlo s 95% a 100% ACN byly pozorovány pro sorbent C18 a kombinovaný sorbent. Nakonec byla jako eluční činidla vybrána 100% ACN pro sorbenty C8 a C18 a 95% ACN pro kombinovaný sorbent.

Jako promývací činidla byly vybrány octan amonný o pH 4,5 k odstranění solí ze vzorku a směs tohoto octanu s 5% ACN k odstranění dalších matricových komponent. Více než 5% ACN vedlo ke ztrátám analytů při promývacím kroku, a tím ke snížení výtěžnosti.

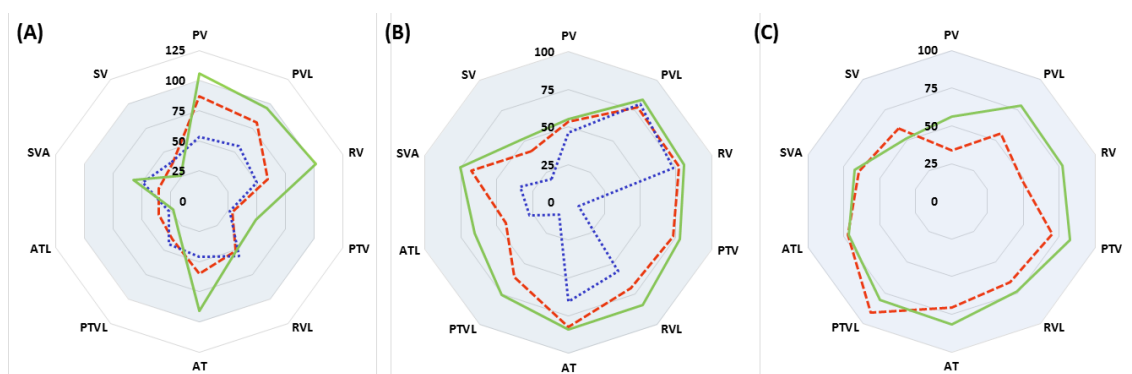
Po aplikaci metody na lidské sérum docházelo k ucpávání komerčně dostupných sorbentů, z tohoto důvodu bylo přistoupeno k zavedení srážecího kroku před vlastní µ-

SPE-PT metodu. PP byla prováděna pomocí přídavku 200 μ l ACN ke 100 μ l séra. Získaný supernatant byl naředěn 0,01 M octanem amonným o pH 4,5 do celkového objemu a poté nanesen na mikroextrakční kolonku. Vyvinuté metody pro všechny sorbenty byly aplikovány na vzorky lidského séra. Pro porovnání byly hodnoceny 3 metody – metoda 1 využívající laboratorně připravené špičky, metoda 2 využívající PP a laboratorně připravené špičky, metoda 3 využívající PP a komerčně dostupné špičky (Tab. 11).

	Metoda 1	Metoda 2	Metoda 3
použitá technika	μ -SPE-PT	PP + μ -SPE-PT	PP + μ -SPE-PT
typ špiček	laboratorní	laboratorní	komerční
použité sorbenty	C8, C18, C18+SDB	C8, C18, C18+SDB	C8, C18
množství sorbentu	1,2 mg, 2x1,2 mg*	1,2 mg, 2x1,2 mg*	0,4 mg
cena jedné extrakční špičky	3 Kč	3 Kč	60 Kč

Tab. 11: Základní charakteristiky uvedených metod pro laboratorně připravované a komerčně dostupné špičky pro μ -SPE-PT. * - platí pro kombinovaný sorbent.

Pro všechny 3 metody byl vybrán nejvhodnější sorbent. Z důvodu nízkých výtěžností nebyl použit sorbent C18. Kombinovaný sorbent nebyl vhodný z důvodu nižších výtěžností pro PT a PTVL. Nejlepší výtěžnosti poskytoval sorbent C8, a to komerčně dostupný i laboratorně připravený (Obr. 37). Pro oba typy sorbentů byl ověřen vliv nanášeného množství vzorku (50 a 100 μ l).



Obr. 37: Výtěžnosti jednotlivých analytů po nanesení na sorbent pro jednotlivé metody (A) metoda 1, (B) metoda 2, (C) metoda 3. Testované sorbenty jsou odlišeny barevně - C8 - zelená barva, C18 - červená barva, kombinovaný sorbent - modrá barva.

Jak bylo zmíněno výše, komerčně dostupné sorbenty byly náchylnější k ucpávání, proto na ně bylo aplikováno pouze 50 μ l vzorku séra, které muselo být precipitováno. Oproti tomu laboratorně připravené sorbenty PP nevyžadovaly a bylo možné na ně nanést i 100 μ l séra. Důležité bylo také zvolit rychlost centrifugace. U komerčně

dostupných sorbentů často docházelo k uvolnění samotného sorbentu ze špičky a tak bylo nutné používat nižší centrifugační sílu než u špiček připravovaných v laboratoři. Tyto faktory ovlivnily samotný čas extrakce, který byl pro komerčně dostupné sorbenty značně vyšší.

4.3.7 Validace metody

Všechny 3 uvedené metody byly validovány. Validacioní výsledky jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tab. 12-Tab. 14).

		[ng/ml] PV	PVL	RV	PTV	RVL	AT	PTVL	ATL	SVA	SV
Linearita		0,9996	0,9998	0,9999	0,9999	0,9997	0,9997	0,9999	0,9996	0,9994	0,9996
LLOQ [ng/ml]		5	10	5	1	1	1	5	5	1	5
	1	117,9			138,0	117,1	118,6			111,1	
Správnost [%]	10	98,4	111,5	113,2	112,6	117,0	106,8	112,6	121,8	110,4	99,7
	100	92,4	94,2	94,1	102,4	101,5	96,2	105,9	103,5	97,4	104,4
	1000	99,0	94,3	101,4	118,2	108,4	106,2	123,2	115,7	107,6	103,1
	1				14,6	8,8	14,5				
Přesnost [%]	10	3,7	5,2	1,2	2,6	4,4	5,1	3,2	13,6	15,9	8,3
	100	5,2	1,6	3,7	1,8	1,0	1,0	6,0	1,7	5,0	2,7
	1000	2,0	2,8	2,4	3,6	4,0	1,2	2,0	3,3	4,8	1,9
	1	95,7			94,7	118,1	113,8			138,7	
Matricové efekty s IS [%]	10	93,9	78,0	89,7	81,6	90,2	93,5	85,8	90,5	92,2	80,1
	100	93,7	91,0	98,0	93,0	92,7	91,0	100,5	102,6	96,2	95,2
	1000	98,2	94,6	96,6	91,2	96,3	93,2	98,5	102,7	99,9	105,6
	1										

Tab. 12: Validacioní data pro μ -SPE-PT metodu 1.

		[ng/ml] PV	PVL	RV	PTV	RVL	AT	PTVL	ATL	SVA	SV
Linearita		0,9992	0,9997	0,9996	0,9999	0,9997	0,9997	0,9999	0,9995	0,9998	0,9996
LLOQ [ng/ml]		5	5	1	1	1	1	1	1	1	5
	1				104,1	86,7	94,7	120,2	114,6	112,1	
Správnost [%]	10	95,4	96,5	97,3	92,7	107,4	100,6	104,3	109,7	106,0	108,6
	100	100,9	87,0	90,4	87,0	92,7	85,9	87,9	96,4	94,4	98,4
	1000	97,6	87,9	96,1	87,5	87,6	84,1	96,3	90,3	96,7	95,0
	1				8,8	9,5	11,9	8,9	8,1	28,9	
Přesnost [%]	10	2,0	6,7	10,3	4,6	6,8	5,1	1,6	2,5	8,5	3,5
	100	3,0	8,3	3,5	3,1	4,1	3,4	3,7	3,2	4,3	1,8
	1000	3,6	2,2	3,8	8,6	11,3	3,1	11,0	2,2	2,4	2,0
	1				78,1	85,1	68,1	97,2	92,7	98,0	
Matricové efekty s IS [%]	10	105,3	83,9	95,6	89,1	84,1	90,7	93,5	83,8	91,2	95,9
	100	93,3	87,9	96,7	90,6	86,3	93,2	97,2	93,3	97,6	96,0
	1000	94,3	92,0	96,0	92,1	94,7	84,4	97,4	91,6	100,2	93,2
	1										

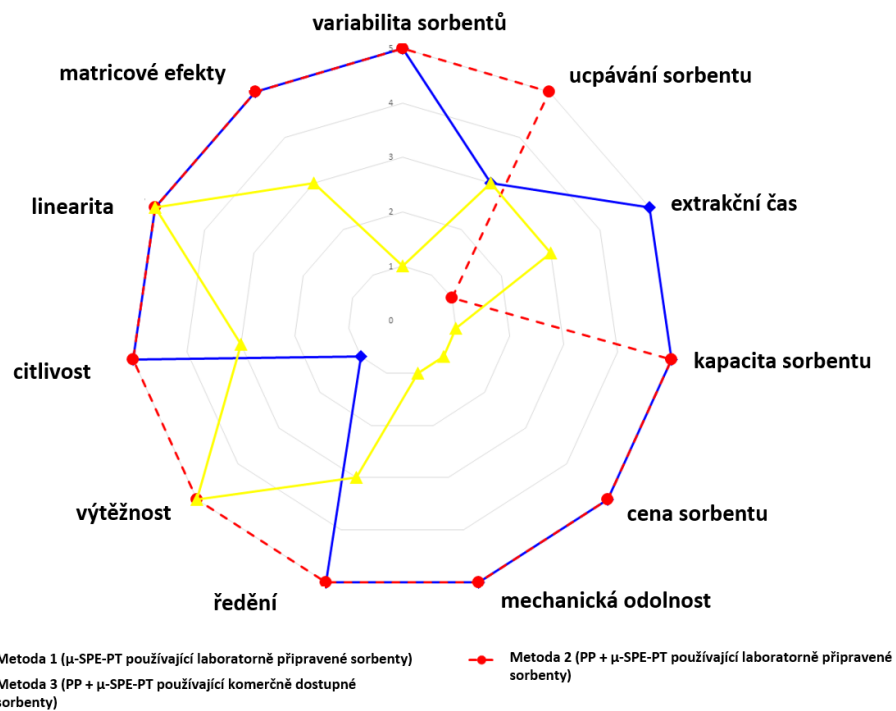
Tab. 13: Validační data pro μ -SPE-PT metodu 2.

	[ng/ml]	PV	PVL	RV	PTV	RVL	AT	PTVL	ATL	SVA	SV
Linearita			0,9999	0,9998	0,9998	0,9997	0,9999	0,9999	0,9997	0,9997	0,9987
LLOQ [ng/ml]			5	5	1	5	1	1	1	5	10
správnost [%]	1				159,6		106,2	90,9	65,6	127,5	
	10	110,8	114,5	98,3	120,4	118,4	107,5	107,2	103,3	121,5	104,3
	100	98,3	99,4	101,9	107,9	98,7	106,7	108,0	107,4	102,7	101,9
	1000	99,4	101,7	106,9	85,4	94,5	97,1	107,9	133,1	95,7	107,3
Přesnost [%]	1				13,4		9,1	6,0	27,2	7,1	
	10	9,0	10,7	6,7	3,9	7,8	2,3	1,7	7,5	14,3	10,5
	100	4,8	0,7	3,7	0,6	5,4	0,4	1,6	2,1	1,1	3,4
	1000	2,5	4,0	2,9	3,2	3,2	1,7	3,0	0,8	4,6	2,0
Matricové efekty s IS [%]	1				64,0		98,7	119,6	230,6	89,6	
	10	103,1	106,4	113,1	87,9	90,7	95,6	107,0	94,1	89,7	117,0
	100	98,2	99,0	105,5	92,9	96,0	96,8	101,6	102,0	101,7	108,4
	1000	96,9	99,6	102,0	96,7	96,7	97,2	103,4	105,9	101,8	96,5

Tab. 14: Validační data pro μ -SPE-PT metodu 3.

4.3.8 Závěr

Byly vyvinuty a validovány 3 mikroextrakční techniky využívající metodu μ -SPE-PT pro komerčně dostupné a laboratorně připravené sorbenty, které byly porovnány z hlediska validačních parametrů, ale také z hlediska ceny i časové náročnosti. Porovnání všech těchto parametrů ukázalo, že testované komerčně dostupné sorbenty nejsou vhodné pro uvedenou aplikaci hned z několika důvodů. Prvním důvodem je až 20x vyšší cena a 3x delší čas analýzy z důvodu nutnosti kroku srážení proteinů a delší centrifugace. Další nevýhodou jsou podstatně vyšší matricové efekty, které tato metoda vykazovala bez korekce na IS (Obr. 38). Naopak, metoda 1 se jeví jako vhodná pro další použití v klinických analýzách a ukazuje potenciál ve využití μ -SPE-PT v rutinních extrakcích biologického materiálu.



Obr. 38: Porovnání jednotlivých mikroextrakčních metod, jejich výhody a nevýhody.

4.4 Vývoj a optimalizace extrakčních metod PP, SPE, MEPS a μ -SPE-PT pro stanovení kvercetinu a jeho metabolitů v potkaní plazmě s využitím ve farmakokinetických studiích

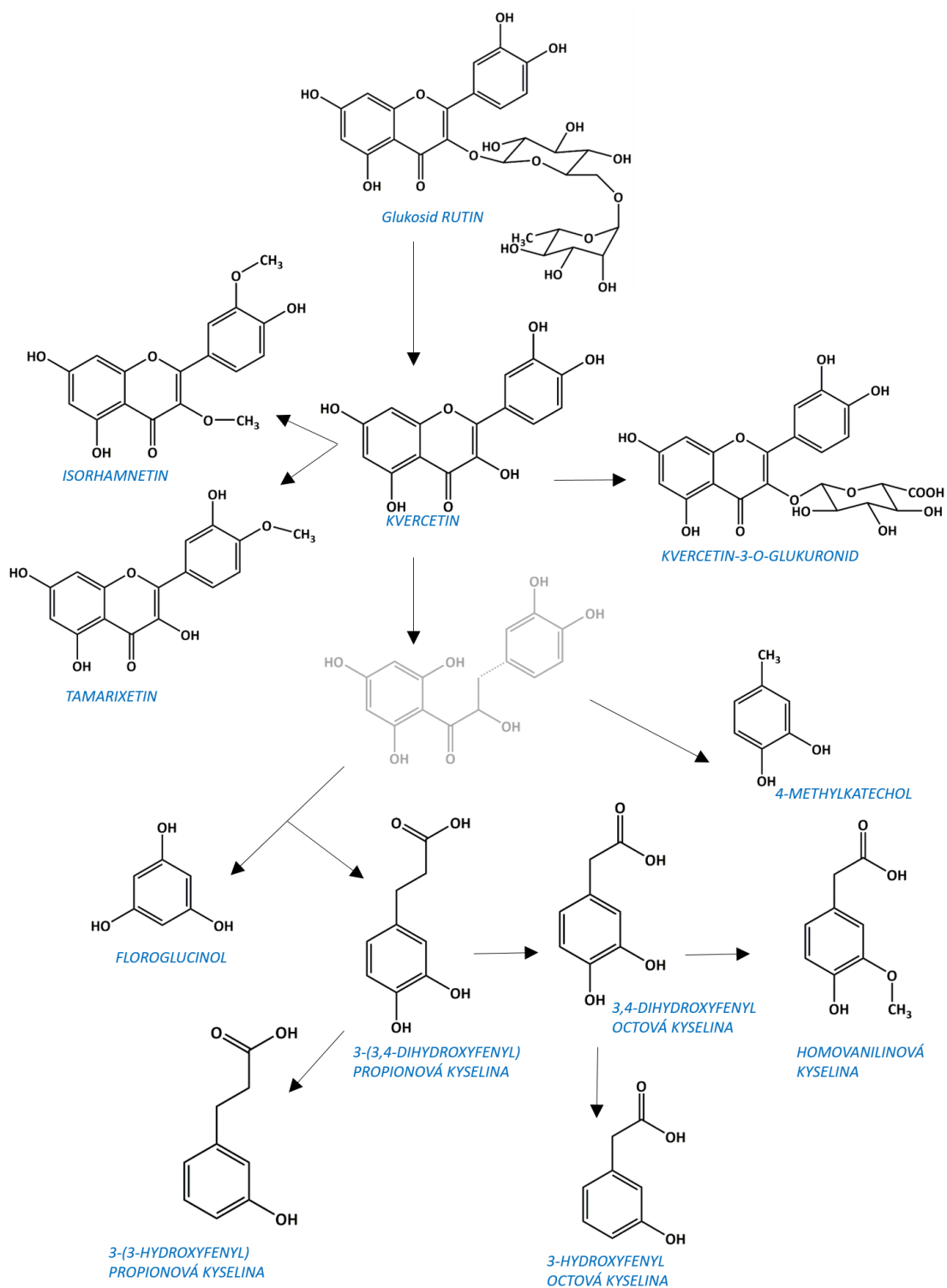
4.4.1 Úvod do problematiky a cíl práce

Flavonoidy jsou širokou skupinou přírodních polyfenolických látek zastoupených v rostlinách a jejich produktech. Jsou běžnou součástí stravy člověka i živočichů. Z hlediska chemické struktury jsou to látky, které se skládají ze 2 aromatických kruhů spojených tříuhlíkatým řetězcem. Na základě jejich substituce jsou flavonoidy děleny na flavony, flavonoly, flavanoly, isoflavony, flavanony a antocyanidiny. Mezi nejdiskutovanější flavonoidy patří kvercetin, flavonol s mnoha zajímavými účinky na lidské zdraví. Mezi jeho nejvýznamnější efekty patří antioxidační účinek, schopnost inhibovat lipidovou peroxidázu, a tím předcházet kardiovaskulárním chorobám. Kvercetin a jeho metabolity hrají také roli v prevenci neurodegenerativních onemocnění [156]-[166].

Kvercetin (Obr. 39) je nejčastěji přijímán ve formě glykosidů (rutin, kvercetrin), které jsou hydrolýzou štěpeny na aglykon a cukernou složku. Uvolněný kvercetin je absorbován pasivní difúzí a následně metabolizován za vzniku metabolitů (tamarixetin, isrohmanetin, kvercetin-3-O-glukuronid). Polyfenoly, které jsou odolné střevním hydrolázám, jsou ve střevě štěpeny mikroflórou na fenolické kyseliny (homovanilinová, fenypropionová, 3-hydroxyfenyloctová a další). Tyto kyseliny mohou být dále absorbovány a metabolizovány v játrech a posléze vyloučeny močí [166]-[172].

Kvercetin a jeho metabolity je možné rozdělit do dvou skupin podle jejich struktury a fyzikálně-chemických vlastností. První skupinou jsou hydrofilní slabé fenolické kyseliny, druhou skupinu tvoří méně polární deriváty kvercetinu s větší molekulovou hmotností (Tab. 15) [172].

Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat extrakční metody pro izolaci kvercetinu a jeho metabolitů, které by umožňovaly stanovení těchto látek během jedné analýzy s důrazem na dostupnost pouze malého objemu biologického vzorku (potkaní plazma).



Obr. 39: Schéma shrnující metabolismus kvercetinu přijatého ve formě rutinu a následně metabolizovaného na konjugované deriváty a štěpeného na fenolické kyseliny.

Analyt	Zkratka	MW	log P	pKa
floroglucinol	PG	126,03	0,01	9,06
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	PAA	168,04	0,31	4,42
homovanilinová kyselina	HVA	182,06	0,61	4,39
3-hydroxyfenyloctová kyselina	HFA	152,05	1,02	4,21
3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina	HFP	166,06	0,43	4,68
rutin	RUT	610,15	-0,9	6,17
kvercetin	QCE	302,04	1,99	6,31
kvercetin-3-O-glukuronid	Q-3-Gl	478,07	1,94	2,76
tamarixetin	TMX	316,06	2,67	6,31
isorhamnetin	IRN	316,06	2,68	6,31
4-methylkatechol	4-MC	124,05	1,33	9,91

Tab. 15: Souhrn základních fyzikálně-chemických vlastností analytů pro optimalizaci extrakčních metod.

4.4.2 Chemikálie

K práci byly použity standardy látek od Sigma-Aldrich (Praha, ČR): PG (99%), HVA (97%), RUT (95%), QCE (95%) a 4-MC (95%). Referenční standardy PAA, Q-3-Gl (95%), TMX (99%) a IRN (99%) byly zakoupeny u Extrasynthese (Francie), standardy HFA (95%) a HFP byly získány od Toronto Research Chemicals (Ontario, Kanada). Pro kvantifikaci byly využity izotopicky značené IS HVA-d₃, QCE-d₃, RUT-d₃ a PAA-d₅, které byly poskytnuty také Toronto Research Chemicals (Ontario, Kanada).

MeOH, ACN, kyselina mravenčí, kyselina octová, kyselina trifluoroctová, hydroxid amonný (25%) vše o čistotě LC-MS grade a kyselina chlorovodíková (36%) byly získány od firmy Sigma-Aldrich. Kyselina trihydrogenfosforečná (85%) byla obdržena od Penty (Praha, ČR).

Čistá potkaní plazma pro vývoj extrakčních metod byla získána z laboratoře Katedry farmakologie a toxikologie (skupina doc. P. Mladěnký).

4.4.3 Příprava zásobních a standardních roztoků

Zásobní roztoky byly připraveny navážením 1 mg látky, v případě IRN 0,1 mg látky a rozpuštěny v MeOH na koncentraci 1 mg/ml, respektive 0,1 mg/ml v případě IRN. Roztoky byly uchovávány při 8 °C a každé dva týdny připravovány čerstvé. Ředící směs

pro přípravu dalších koncentrací standardních roztoků byla složena z MeOH a 0,1% kyseliny mravenčí v poměru 60:40 (v/v).

4.4.4 Extrakční metody

Pro extrakci kvercetinu a jeho metabolitů z potkaní plazmy byly vyvinuty 4 metody.

První extrakční metodou byla PP. Protokol spočíval v přidání 100 μ l ACN k 50 μ l plazmy. Následně byla směs kvůli stabilitě analytů okyselena 2 μ l 10% kyseliny mravenčí. Takto upravený vzorek byl 10 minut inkubován při laboratorní teplotě a poté zcentrifugován při 4 °C a 14000 rpm. Supernatant byl odebrán a přefiltrován přes PTFE stříkačkový filtr (0,22 μ m, Membrane Solutions) a eluát byl pod proudem dusíku odpařen dosucha.

Jako konvenční technika pro izolaci QCE a metabolitů byla vybrána SPE. Před vlastní SPE bylo nutné vzorek plazmy precipitovat z důvodu vazby analytů na proteiny. K vysrážení proteinů bylo použito 500 μ l potkaní plazmy a 500 μ l 0,1% kyseliny chlorovodíkové jako srážecího činidla. Po 10 minutové inkubaci a centrifugaci (4 °C, 14000 rpm) byl odebraný supernatant nanesen na kolonku se sorbentem kombinujícím kopolymerní fázi a iontově výměnnou fázi pro zachycení slabých kyselin (Oasis MAX, 1 ml, 30 mg, Waters). Kolonka byla ekvilibrována 3 ml MeOH a 3 ml 10 mM mravenčanu amonného o pH 5,0. Po nanesení vzorku byla kolonka promyta 500 μ l 10 mM mravenčanu amonného o pH 5,0 a 500 μ l 1% MeOH. Analyty byly eluovány 1 ml směsí MeOH a 100% kyseliny mravenčí (90:10, v/v). Roztok byl přefiltrován přes PTFE stříkačkový filtr (0,22 μ m, Membrane Solutions) a eluát byl pod proudem dusíku odpařen dosucha.

Jako vhodné mikroextrakční techniky pro tuto aplikaci byly optimalizovány MEPS a μ -SPE-PT.

Metoda MEPS po optimalizaci odpovídala konvenční SPE, pouze používala desetkrát menší objemy. K 50 μ l vzorku bylo pro srážení proteinů přidáno 50 μ l 0,1% kyseliny chlorovodíkové, po inkubaci (10 minut) a centrifugaci (10 minut, 4 °C, 14000 rpm) byl supernatant nanesen na kolonku se sorbentem RAX (retain anion exchange), která byla ekvilibrována 300 μ l MeOH a 300 μ l 10 mM mravenčanu amonného o pH 5,0.

Vzorek byl promyt 50 μ l roztoku mravenčanu amonného o pH 5,0 a 50 μ l 1% MeOH a následně eluován 100 μ l směsi MeOH a kyseliny mravenčí (90:10, v/v). Roztok byl přefiltrován přes PTFE stříkačkový filtr (0,22 μ m, Membrane Solutions) a eluát byl pod proudem dusíku odpařen dosucha.

Extrakce byly prováděny pomocí MEPS stříkačky o kapacitě 100 μ l a ruční automatické eVOL[®] pipety (SGE Analytical Science, Austrálie).

Pro μ -SPE-PT byl vzorek o objemu 50 μ l precipitován 50 μ l 0,1% kyseliny chlorovodíkové za stejných podmínek, které jsou uvedeny v předchozích metodách. Supernatant byl nanesen na kolonku s obsahem sorbentu RAX (Empore[™] Anion-SR, 47 mm Extraction Disks), která byla ekvilibrována 300 μ l MeOH (centrifugace 4500 rpm, 4 °C, 10 min) a 300 μ l 10 mM mravenčanu amonného o pH 5,0 (centrifugace 4500 rpm, 4 °C, 25 min). Po nanesení vzorku (centrifugace 8000 rpm, 4 °C, 25 min) byla kolonka promyta 10 mM mravenčanem amonným o pH 5 a objemu 50 μ l (centrifugace 8000 rpm, 4 °C, 15 min) a 50 μ l 1% MeOH (centrifugace 8000 rpm, 4 °C, 15 min). Analyty byly eluovány 100 μ l směsi MeOH a kyseliny mravenčí v poměru 90:10 (v/v) (centrifugace 8000 rpm, 4 °C, 15 min). Roztok byl přefiltrován přes PTFE stříkačkový filtr (0,22 μ m, Membrane Solutions) a eluát byl pod proudem dusíku odpařen dosucha.

Před nástřikem do UHPLC-MS/MS systému byl odparek rekonstituován ve směsi MeOH a 0,1% kyseliny mravenčí v poměru 60:40 (v/v).

4.4.5 UHPLC-MS/MS analýza

Separace QCE a jeho metabolitů byla optimalizována na Acquity Ultra Performance LC systému (Waters, Milford, MA, USA) spojeného s Micromass Quattro Micro hmotnostním detektorem typu trojitého kvadrupólu s API ionizačními technikami (Waters, Manchester, UK). Pro finální validaci byl použit Acquity UPLC[®] I-Class System (Waters, Milford, MA, USA) s hmotnostním detektorem typu trojitého kvadrupólu XEVO[™] TQ-S MS (Waters, Milford, MA, USA).

5 μ l vzorku bylo nastřikováno na kolonu Acquity UPLC[®] BEH Shield RP18 o rozměrech 100 x 2,1 mm s částicemi o velikosti 1,7 μ m. Teplota na koloně byla udržována na 40 °C. Analyty byly separovány pomocí gradientové eluce začínající na 95% složky A mobilní fáze (0,1% kyselina mravenčí) a 5% složky B mobilní fáze (MeOH), jejíž

množství stoupalo až na 95% do 5. minuty gradientu. Následně bylo složení mobilní fáze vráceno na počáteční hodnoty a systém ekvilibrován po dobu 2 minut. Průtok mobilní fáze byl po celou dobu analýzy udržován na hodnotě 0,35 ml/min.

Podmínky pro MS detekci pomocí MS Micromass Quattro Micro byly následující. Všechny látky byly kvantifikovány pomocí SRM. Nastavení iontového zdroje pro ionizaci elektrosprejem bylo optimalizováno pro pozitivní i negativní mód. Ionizační podmínky byly nastaveny následujícím způsobem: napětí na kapiláře: 3,2 kV/-2 kV, napětí na extraktor: 3,0 V, napětí na hexapólu: 0,5 V, teplota zdroje: 130 °C. Dusík o průtoku 800 l/hod o teplotě 450 °C byl použit jako desolvatační plyn. Průtok kolizního plynu (argon) byl nastaven na 100 l/hod. CE, napětí na kuželu a čas prodlevy (dwell-time) byly optimalizovány pro každý analyt zvlášť a jsou shrnuty v Tab. 16.

analyt	ionizační mód	SRM přechod	napětí na kuželu CV[V]	CE [eV]	dwell time [s]	R _T [min]
PG	ESI ⁺	127,1 > 80,9	35	20	0,100	1,39
PAA	ESI ⁻	181,1 > 137,3	25	10	0,200	2,01
HVA	ESI ⁻	166,9 > 123,1	15	10	0,100	2,55
HFA	ESI ⁻	150,8 > 106,8	15	10	0,050	2,57
HFP	ESI ⁻	164,7 > 120,8	30	10	0,050	3,05
RUT	ESI ⁺	610,9 > 303,3	20	25	0,200	3,67
QCE	ESI ⁺	303,0 > 153,0	40	30	0,050	4,65
Q-3-GL	ESI ⁺	479,2 > 303,1	25	15	0,050	3,88
TMX	ESI ⁺	317,2 > 302,0	40	25	0,050	4,92
IRN	ESI ⁺	317,2 > 302,1	40	25	0,050	5,00
4-MC	ESI ⁻	123,0 > 122,1	35	20	0,200	2,93

Tab. 16: Souhrn SRM přechodů a SIM pro jednotlivé analyty včetně nastavení napětí na vstupním kuželu, CE, dwell time a doby eluce pro každou látku pro detekci pomocí hmotnostního spektrometru XEVO™ TQ-S MS.

Podmínky pro MS detekci pomocí MS XEVO™ TQ-S MS byly následující. PAA, HFA a HVA byly kvantifikovány pomocí SIM, ostatní látky pomocí SRM (Tab. 17). SIM mód u uvedených látek sledoval produktový ion po rozkladu látky v iontové optice. Nastavení iontového zdroje bylo optimalizováno pro ionizaci elektrosprejem v pozitivním a negativním módu. Ionizační podmínky byly nastaveny následujícím způsobem: napětí na kapiláře: 2,5 kV/1,25 kV, teplota zdroje: 125 °C, napětí na zdroji: 30 V. Dusík o průtoku 600 l/hod o teplotě 450 °C byl použit jako desolvatační plyn. Průtok kolizního plynu

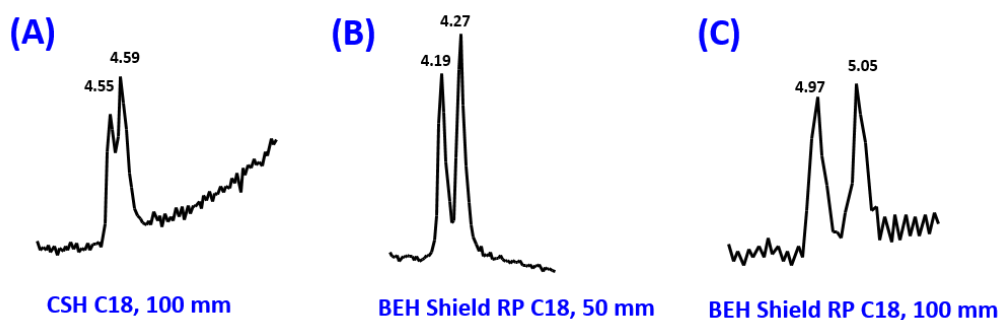
(argon) byl nastaven na 0,2 ml/min /0,1 ml/min. CE, napětí na kuželu a čas prodlevy (dwell-time) byly optimalizovány pro každý analyt zvlášť (Tab. 17). Data byla naměřena pomocí software MassLynx verze 4.1 a zpracována pomocí programu TargetLynx (Waters, Milford, MA, USA).

analyt	ionizační mód	SRM přechod	SIM	napětí na kuželu [C]	CE [eV]	dwell time [s]	R _T [min]
PG	ESI ⁺	126,7 > 80,7	-	25,0	15,0	0,500	1,39
PAA	ESI ⁻	-	136,7	40,0	-	0,100	2,01
HVA	ESI ⁻	-	122,7	35,0	-	0,075	2,55
HFA	ESI ⁻	-	106,8	30,0	-	0,075	2,57
HFP	ESI ⁻	164,7 > 120,8	-	35,0	10,0	0,250	3,05
RUT	ESI ⁺	611,0 > 302,8	-	15,0	20,0	0,250	3,67
QCE	ESI ⁺	302,8 > 152,7	-	30,0	25,0	0,250	4,65
Q-3-GL	ESI ⁺	479,0 > 302,8	-	25,0	15,0	0,500	3,88
TMX	ESI ⁺	317,1 > 301,8	-	25,0	20,0	0,250	4,92
IRN	ESI ⁺	317,1 > 301,8	-	25,0	20,0	0,250	5,00
4-MC	ESI ⁻	122,7 > 107,6	-	35,0	15,0	0,250	2,93

Tab. 17: Souhrn SRM přechodů a SIM pro jednotlivé analyty včetně nastavení napětí na vstupním kuželu, CE, dwell time a doby eluce pro každou látku pro detekci pomocí hmotnostního spektrometru XEVO™ TQ-S MS.

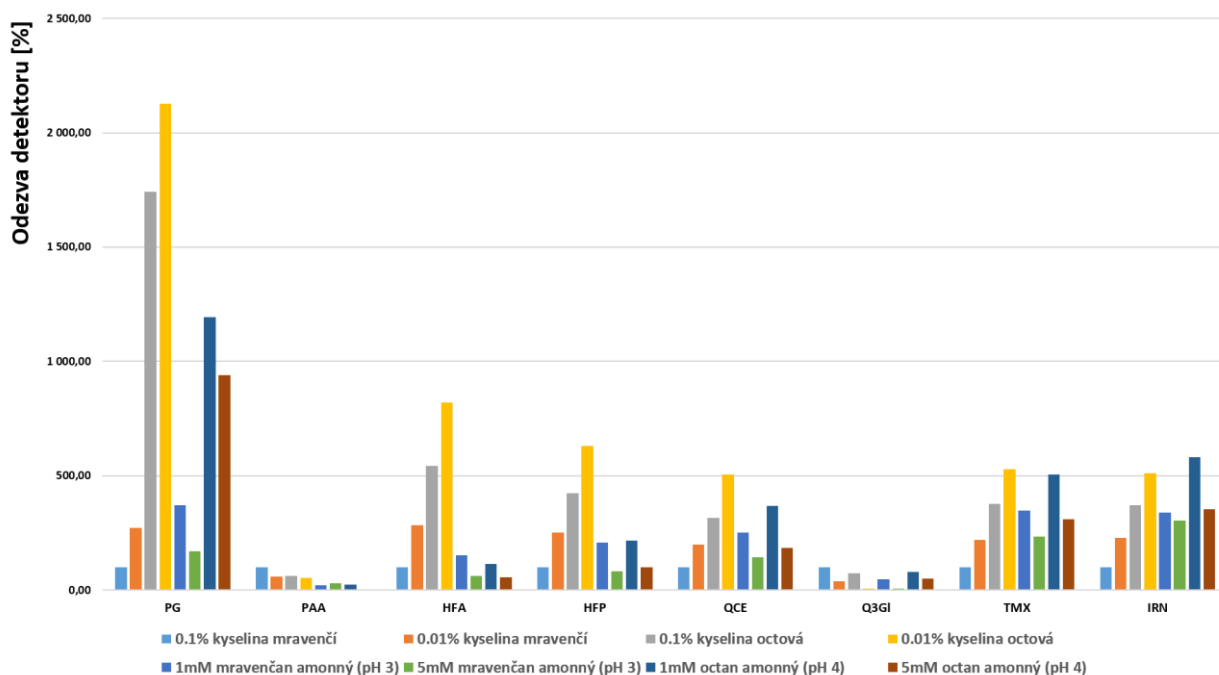
4.4.6 Optimalizace UHPLC-MS/MS analýzy

Prvním krokem vývoje UHPLC-MS/MS metody byla volba vhodné stacionární a mobilní fáze. Bylo testováno několik kolon s různým sorbentem o velikosti částic 1,7 μm a o délkách 5 a 10 cm, konkrétně se jednalo o BEH C18, BEH Shield RP18, BEH Phenyl, všechny o rozměrech 50 a 100 mm x 2,1 mm (Waters). Dále byly testovány kolony BEH CSH phenyl-hexyl a BEH CSH fluoro-phenyl o rozměrech 100 x 2,1 mm. Analyty byly zadržovány na všech typech sorbentů, problémem ale byla separace 2 izomerů – isorhamnetinu a tamarexitenu (Obr. 40), které byly odděleny pouze na koloně BEH Shield RP18 o délce 10 cm.



Obr. 40: Separace izomerů TMX a IRN byla nejproblematičtější částí volby kolony pro separaci QCE a jeho metabolitů. Nejlepší oddělení až na základní linii poskytovala kolona (C) BEH RP18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μ m).

Následovala volba vhodné mobilní fáze, a to složky vodné. Jako organická složka byl na základě předchozích zkušeností s chromatografickými metodami pro analýzu flavonoidů vybrán MeOH. Jako vodná část mobilní fáze byly testovány kyseliny octová a mravenčí 0,1% a 0,01%, octan amonný (pH 4) a mravenčan amonný (pH 3) o koncentraci 1 a 5 mmol/l.

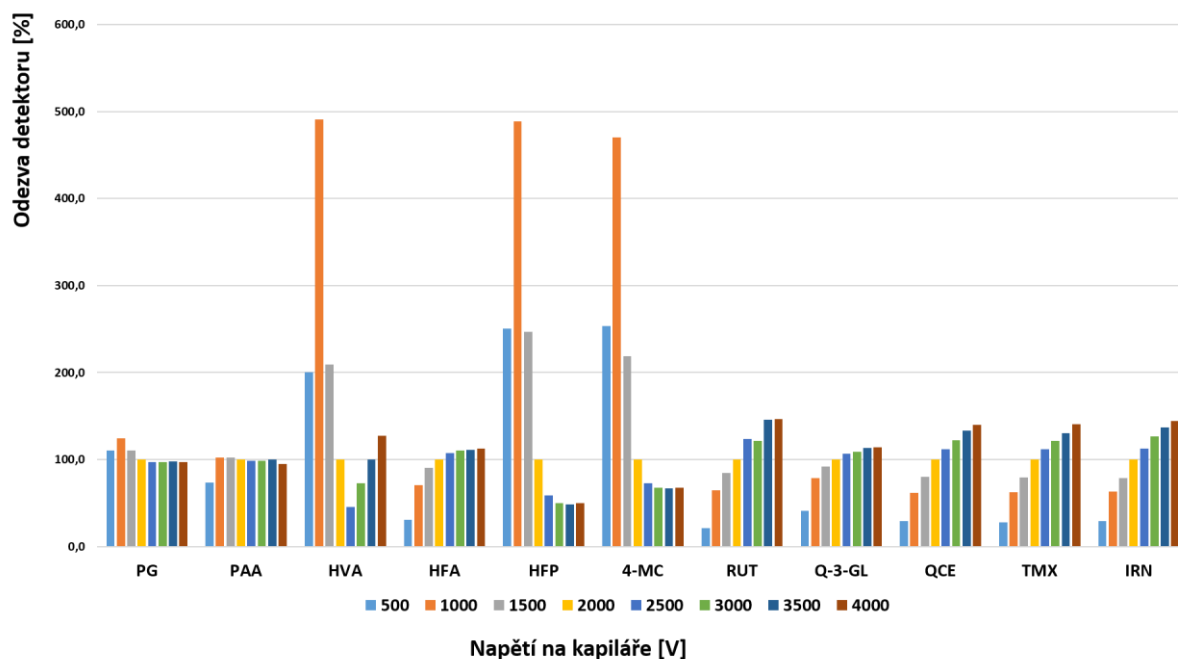


Obr. 41: Vliv vodné složky mobilní fáze na odezvu detektoru u vybraných analytů.

Nejlepší výsledky pro většinu analytů vykazovala 0,01% kyselina octová (Obr. 41). Oproti kyselině mravenčí zesilovala signál analytů obvykle 5 – 10x, u PG dokonce 25x. Bohužel u PAA a především u Q-3-GI došlo k zeslabení signálu oproti kyselině mravenčí 0,1%, která měla v těchto případech nejvyšší odezvu (100%) až na pouhých 5%. Z tohoto

důvodu kyselina octová nebyla vybrána jako složka mobilní fáze, ale byla zvolena 0,1% kyselina mravenčí, která u těchto kritických látek potencovala nejvyšší odezvu detektoru. Byl také sledován vliv složení nastříkované směsi na odezvu detektoru a tvar píku. Po proměření směsi MeOH a 0,1% kyseliny mravenčí o zvyšující se koncentraci MeOH z 0% na 100% byla nakonec jako nejlepší vybrána směs MeOH:0,1% kyselina mravenčí v poměru 60:40 (v/v).

Pro MS detekci bylo nutné zoptimalizovat napětí na kapiláře, extraktoru, iontové optice, dále napětí na vstupním kuželu, desolvatační teplota, teplota iontového zdroje a průtoky plynů. Všechny parametry byly optimalizovány pro oba hmotnostní spektrometry. Pro MS Micromass Quattro Micro byly vybrány hodnoty, při kterých měly analyty nejvyšší odezvu, hodnoty pro MS Xevo TQ-S byly vybrány jako kompromis pro dvě protichůdně se chovající skupiny látek, malé polární fenolické kyseliny a větší méně polární molekuly kvercetinu a jeho konjugovaných derivátů. Pro ukázkou jsou ukázány výsledky optimalizace napětí na kapiláře (Obr. 42). Z výsledků je zřetelný rozdílný vliv zvyšující se hodnoty napětí na zmíněné skupiny analytů. Výsledky optimalizace jsou shrnuty v tabulkách (Tab. 16, Tab. 17).



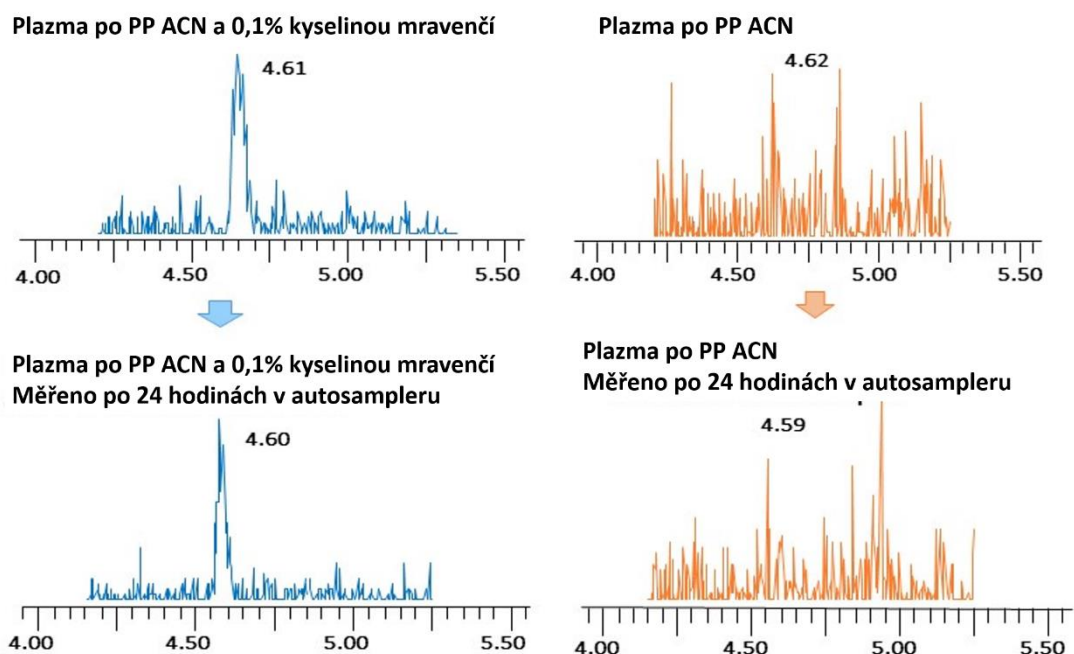
Obr. 42: Optimalizace napětí na kapiláře pro MS Xevo TQ-S.

4.4.7 Optimalizace extrakčních metod

V rámci vývoje metody pro extrakci byly optimalizovány 4 extrakční metody. Srážení proteinů, které je možné použít i pro necílenou analýzu metabolitů, a dále extrakční metody SPE, MEPS a μ -SPE-PT, které selektivně zachytávají na sorbentu vybrané analyty a jsou tak vhodnější pro kvantifikaci sledovaných předem známých molekul.

4.4.7.1 Srážení proteinů

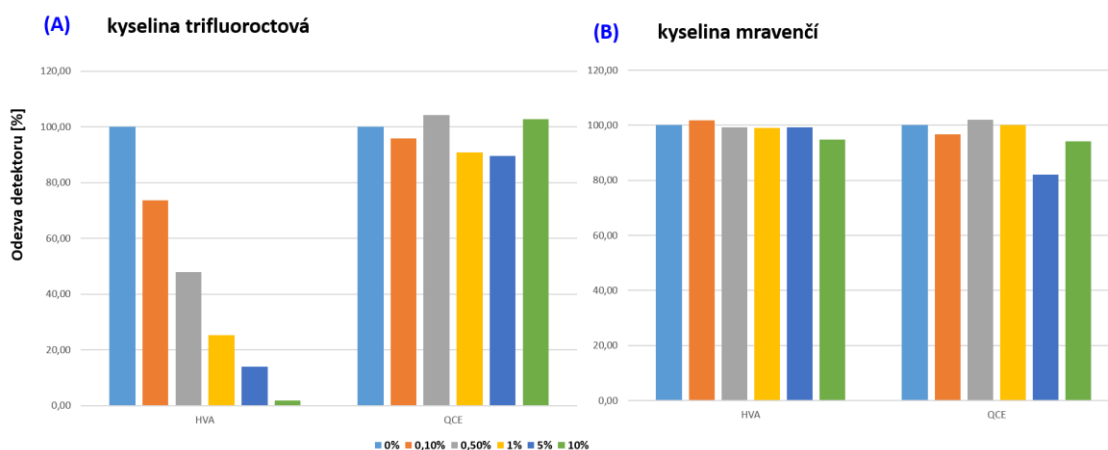
V průběhu vývoje metody PP byla testována dvě srážecí činidla – ACN a MeOH. Činidla byla přidána k 50 μ l potkaní plazmy v různých poměrech – 1:2, 1:3, 1:5 a 1:10. Po přidání a promísení kapalin se vzorek nechal 10 minut inkubovat za laboratorní teploty a poté se centrifugoval po dobu 10 minut (14000 rpm, 4 °C). Se zvyšujícím se množstvím organiky se snižovala výtěžnost metody. Nakonec byl jako srážecí činidlo zvolen ACN o objemu 100 μ l. Z důvodu nízké stability QCE, PAA a IRN byla k vzorku před srážením proteinů přidávána kyselina mravenčí. Její přídavek vedl ke zvýšení výtěžnosti u problematických analytů (Obr. 43).



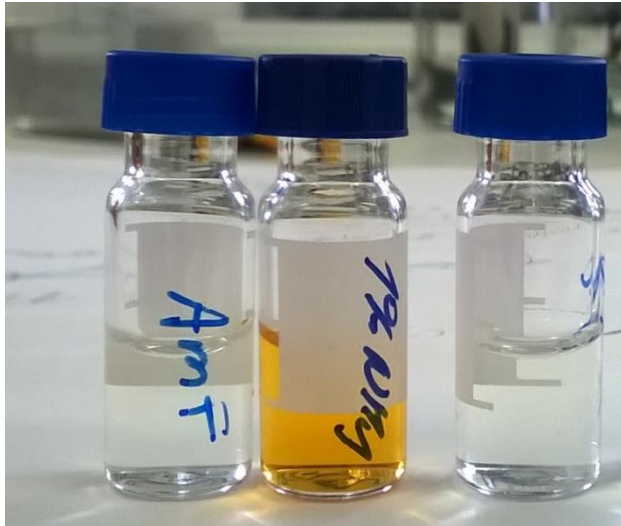
Obr. 43: Vliv přídavku malého množství kyseliny mravenčí na výtěžnost a stabilitu QCE ve vzorku plazmy.

4.4.7.2 SPE

Prvním krokem optimalizace SPE metody byla volba stacionární fáze. Byly testovány 3 typy kolonek - Discovery DSC-C8, Discovery DSC-C18 a Oasis MAX. C8 a C18 jsou reverzní silikagelové sorbenty modifikované uhlíkatým řetězcem o příslušném počtu uhlíků, MAX sorbent je polymerní fáze s kvarterní amoniovou skupinou, která je vhodná pro zadržení slabě kyselých látek. Právě zachycení těchto kyselých látek bylo problematické na reverzně fázových sorbentech. Z toho důvodu byla jako nejvhodnější stacionární fáze vybrána fáze iontově výměnná, na které byly zadrženy všechny analyty. Po výběru stacionární fáze bylo optimalizováno složení elučního činidla. Nejprve bylo nutné zvolit optimální množství organické složky. Byly testovány různé koncentrace MeOH v kombinaci s 2% kyselinou mravenčí. Nejlepší výtěžnost poskytovalo použití 90% MeOH. Následně bylo nutné vybrat vhodnou kyselinu o takové koncentraci, aby extrakce byla co nejvíce účinná. Jako kyselá složky elučního činidla byly testovány kyselina mravenčí (0,5%, 1%, 2%, 5%, 10% v celkovém objemu roztoku) a kyselina trifluoroctová (0,1%, 0,5% a 1% v celkovém objemu roztoku). Nejlepší výtěžnosti poskytovala směs MeOH a kyselinytrifluoroctové 0,5%. Bohužel použití kyseliny trifluoroctové vedlo k významnému snížení odezvy analytů ze skupiny fenolických kyselin (Obr. 44). Z tohoto důvodu byla v eluční směsi použita 100% kyselina mravenčí s MeOH v poměru (90:10, v/v).



Obr. 44: Vliv kyselá složky elučního činidla o složení 90% MeOH + kyselina trifluoroctová (A), nebo mravenčí (B) o dané koncentraci. Pro analyty ze skupiny fenolických kyselin (HVA) byl značný vliv kyseliny trifluoroctové na odezvu detektoru, docházelo k výraznému snížení odezvy při zvyšující se koncentraci kyseliny. Při použití kyseliny mravenčí tento jev nebyl pozorován.



(A)

(B)

(C)

Obr. 45: Vliv přídavku (A) roztoku mravenčanu amonného, (B) 1% amoniaku k roztoku standardů (C) QCE a jeho metabolitů.

Následovala optimalizace promývacího činidla, kdy byly testovány roztoky hydroxidu amonného o koncentracích 0,1%, 0,5%, 1%, 2% a 5%, 10 mM mravenčanu amonného o pH 5, roztoky MeOH (1%, 2%, 5% a 10%) a použití čisté vody. Roztoky amoniaku se jevily jako vhodné z hlediska chemie sorbentu, bohužel však jejich použití snížilo výtěžnost některých analytů (PAA, PG, QCE, IRN) až na 0%.

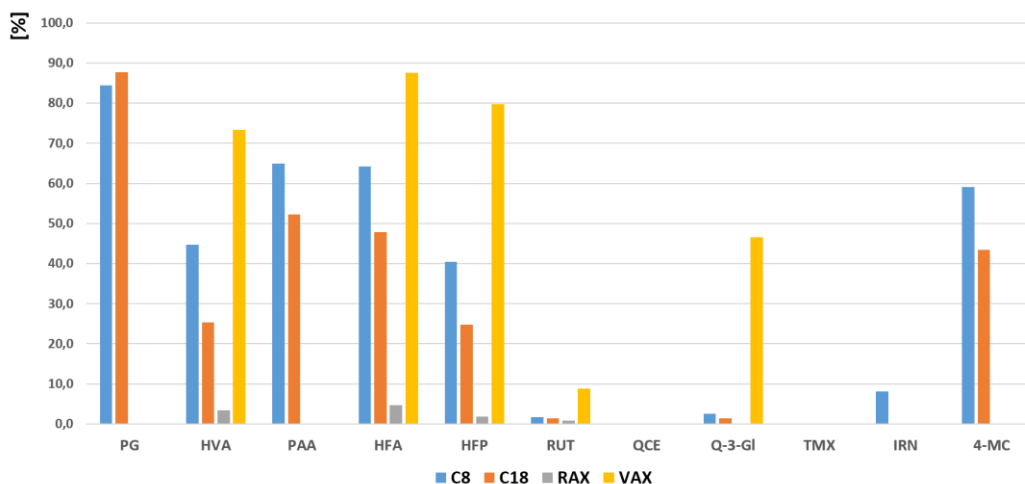
Důvodem byla reakce těchto látek za

vzniku pravděpodobně Schiffových bází (Obr. 45). U promývacího činidla s obsahem MeOH platilo, že zvyšující se koncentrace organické složky byla důvodem vyšších ztrát analytů a nižší výtěžnosti extrakce. Jako nevhodnější činidla byla nakonec vybrána 1% MeOH a 10 mM mravenčan amonný o pH 5.

Po optimalizaci složení všech činidel byla metoda aplikována na vzorky potkaní plazmy. Z důvodu vazby analytů na proteiny došlo ke snížení výtěžnosti extrakce pro všechny analyty až o 50%. Bylo nutné zařadit krok pro uvolnění látek z vazby na protein. V tomto kroku byla zkoušena různá srážecí činidla, včetně ACN a MeOH s obsahem kyselin, vodné roztoky kyseliny fosforečné, mravenčí, chlorovodíkové, trifluoroctové a octové. Byl také testován vliv vymrazování vzorku. Nejlepší výsledky poskytovalo přidání kyseliny chlorovodíkové 0,1% v poměru 1:1. Výhodou kyseliny byla i možnost nanesení supernatantu přímo na extrakční kolonku, aniž by vzorek musel být ředěn, jako by tomu bylo u použití ACN či MeOH jako srážecích činidel, která by snížila retenci analytů při nanesení vzorku na kolonku a vzorek by bylo nutné ředit tak, aby koncentrace organického rozpouštědla byla menší než 10% celkového objemu vzorku.

4.4.7.3 MEPS

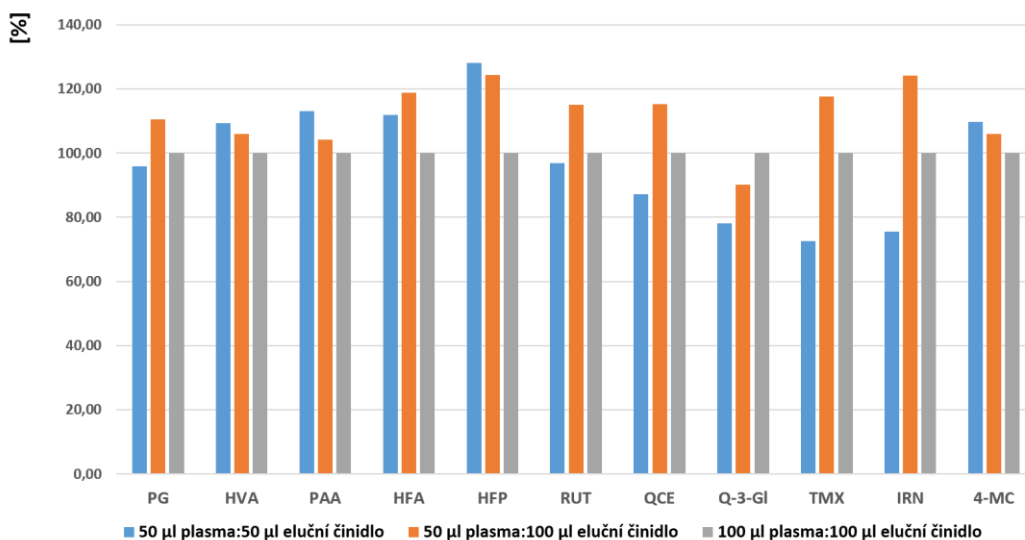
Obdobným způsobem byla vyvíjena i mikroextrakční technika MEPS. Nejprve bylo třeba zvolit sorbent, na kterém budou zachyceny všechny analyty. Byly testovány komerčně dostupné sorbenty C8, C18, RAX (vhodný pro slabé kyseliny) a VAX (vhodný pro silné kyseliny). Stejně jako u SPE nebyly všechny analyty zachyceny na reverzních fázích. Z iontově výměnných fází RAX a VAX byla vhodnější fáze RAX, na které byly zachyceny všechny analyty (Obr. 50).



Obr. 46: Ztráty jednotlivých analytů po nanesení vzorku na MEPS sorbent.

V průběhu optimalizace elučního a promývacího činidla byly pozorovány stejné trendy jako u optimalizace SPE metody, proto byla vybrána shodná činidla jako u předchozí metody, a to směs MeOH a kyseliny mravenčí v poměru 90:10 jako eluční činidlo a mravenčan amonný o pH 5,0 a 1% MeOH jako činidla promývací. U promývacích činidel byl testován vliv zvyšujícího se objemu činidla na výtěžnost extrakce. Při použití obou činidel byly pozorovány vyšší ztráty s rostoucím objemem činidla (50 – 300 μ l), proto byly pro finální protokol použity objemy 50 μ l pro obě činidla.

Nakonec byl optimalizován poměr objemu vzorku a elučního činidla, kde lepší výsledky vykazoval poměr vzorku a činidla 1:2, než poměr 1:1, ať už byly objemy 50 μ l, nebo 100 μ l (Obr. 47).

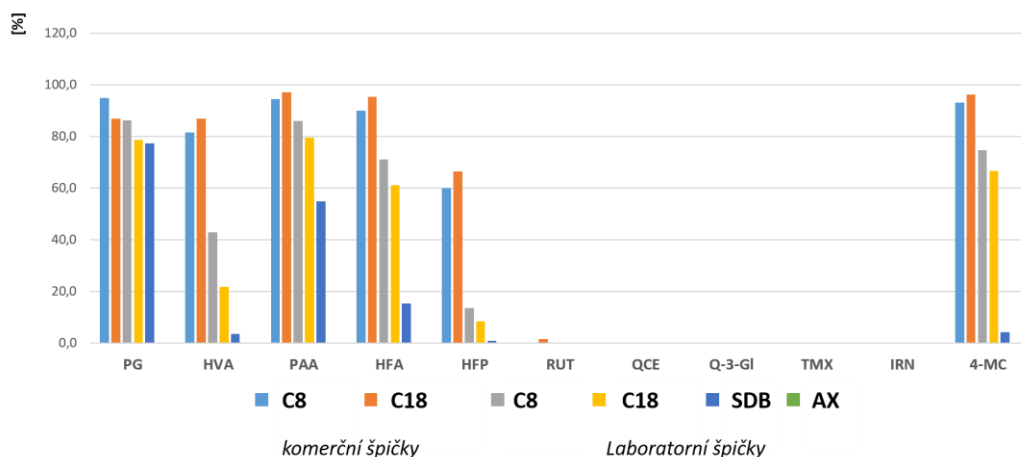


Obr. 47: Vliv poměru objemů vzorku a elučního činidla na výtěžnost extrakce.

Po aplikaci metody na plazmu musel být opět zaveden krok srážení proteinů. Podle předchozí optimalizace pro SPE metodu byla použita kyselina chlorovodíková 0,1% ve dvojnásobném objemu, než byl objem plazmy.

4.4.7.4 μ -SPE-PT

Prvním krokem optimalizace této mikroextrakční metody byla opět volba sorbentu. Byly testovány komerčně dostupné špičky pro mikroextrakci se sorbenty C8 a C18, a dále laboratorně připravené špičky se sorbenty C8, C18, SDB a RAX, kde je případně při nezadržení analytů na jednom sorbentu zkombinovat sorbenty různého typu tak, aby byl záchyt analytu 100%. Z uvedených výsledků je patrné, že analyty byly beze zbytku zachyceny na iontově-výměnném sorbentu (Obr. 48) stejně jako v předchozích případech.



Obr. 48: Ztráty analytů po nanesení na různé sorbenty pro mikroextrakci.

Po otestování různých elučních činidel (směsi MeOH a ACN s kyselinami mravenčí a trifluorooctovou) byl opět jako nejvhodnější činidlo vybrán roztok MeOH a kyseliny mravenčí 90:10 (v/v). U promývacího kroku se při použití standardů jako nejlepší činidlo jevil roztok 0,1% kyseliny mravenčí a octové. Po aplikaci na plazmu ale z důvodu jejich srážecího účinku na vzorek nanesený na kolonku docházelo k úplnému ucpání kolonek. Z tohoto důvodu byly jako promývací činidla opět použity roztoky mravenčanu amonného o pH 5 a 1% MeOH.

Vzorky plazmy musely být před nanesením na sorbent precipitovány. K vysrážení proteinů byla použita kyselina chlorovodíková o koncentraci 0,1% o objemu 50 μ l. Tato kyselina měla nejlepší srážecí účinek a její použití zlepšovalo reprodukovatelnost metody.

4.4.8 Validace metody

Všechny optimalizované metody budou zvalidovány podle požadavků EMA [144]. V současné době je validována metoda MEPS a PP. Metody SPE a μ -SPE-PT budou validovány v brzké době. Výsledky validace budou pro jednotlivé metody porovnány.

4.4.9 Závěr

Byla vyvinuta UHPLC-MS/MS metoda pro citlivou a selektivní analýzu QCE a jeho metabolitů o různých fyzikálně-chemických vlastnostech. Pro jejich izolaci z potkaní plazmy byly vyvinuty 4 extrakční techniky. Tyto techniky budou dále využity pro

farmakokinetické studie k objasnění metabolismu QCE a jeho metabolitů v potkaním organismu a k objasnění jejich účinků na cévní svaly.

Technika PP je vhodná pro malé objemy vzorků. Slouží především k odstranění proteinů ze vzorku, tudíž může být použita i pro úpravy vzorků, kde bude nutné sledovat i další metabolity, které ve vzorku mohou být přítomny. Ostatní techniky umožňují cílené sledování vybraných analytů a slouží především ke kvantitativnímu hodnocení.

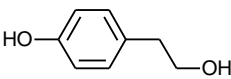
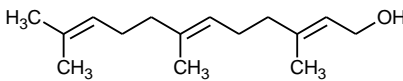
Metody budou validovány a porovnány včetně vlivu matricových efektů. Metoda PP již byla použita pro analýzu farmakologických vzorků.

4.5 Vývoj a optimalizace mikroextrakčních metod MEPS a μ -SPE-PT pro stanovení farnesolu a tyrosolu jako quorum-sensing molekul ve vzorcích poševních výplachů

4.5.1 Úvod do problematiky a cíl práce

Candida albicans je jedním z nejdůležitějších a nejzajímavějších plísňových organismů v medicíně. Je součástí lidské mikrobiální flory v trávicím systému, orofaryngu či ženských pohlavních orgánů. Zároveň je však významným patogenem, který může způsobovat život ohrožující infekce, především u pacientů s oslabenou imunitou. *Candida albicans* může růst ve formě hyfy, pseudohyfy, nebo jako rašící kvasinka. Její morfologická konverze z kvasinkové na hyfovou formu charakterizuje přechod ze stavu koloniálního (nepatogenního) na stav invazivní. Přechod těchto forem může být ovlivněn fyzikálně-chemickými faktory a také vlivem signálních, tzv. quorum sensing molekul, mezi které jsou řazeny právě dvě látky farnesol a tyrosol. Farnesol je těkavá molekula terpenoidní stuktury, která při akumulaci nad určitou mez blokuje přeměnu kvasinkové formy na formu hyfovou. Z vnějšku přidaný farnesol navíc inhibuje zárodečnou formu kvasinek. Tyrosol je fenolická kyselina, která podporuje přeměnu kvasinky na vláknitou zárodečnou formu. Vývoj *Candidy albicans* je tedy ovlivňován a kontrolován farnesolem a tyrosolem [173]-[176].

Cílem práce bylo vyvinout citlivé a selektivní mikroextrakční techniky pro UHPLC-MS/MS analýzu farnesolu a tyrosolu v poševních výplacích.

Látka	MW	Log P	pKa	Strukturní vzorec
tyrosol	138,16	1,19	10,2	
farnesol	222,36	4,84	16,3	

Tab. 18: Fyzikálně-chemické vlastnosti (molekulová hmotnost MW, Log P a pKa) a strukturní vzorce farnesolu a tyrosolu. Data získána z [130].

4.5.2 Chemikálie

K práci byly použity standardy farnesolu (96%) a tyrosolu (98%) získané od Sigma Aldrich (Praha, ČR). Kvantifikace byla provedena pomocí přídavku izotopicky značených vnitřních standardů: tyrosol- d_4 (99%) a farnesol- d_6 (96%) syntetizovaných firmou TLC Pharmaceutical Standards (Ontario, Kanada). MeOH, ACN, kyselina mravenčí, hydroxid amonný (25% roztok) o LC-MS čistotě a kyselina trifluoroctová (99%) byly získány od Sigma-Aldrich (Praha, ČR).

Fosfátem pufovaný fyziologický roztok (PBS 10x) pro přípravu biologických vzorků byl poskytnut firmou BioSystems (Barcelona, Španělsko).

4.5.3 Příprava zásobních a pracovních roztoků

Zásobní roztoky farnesolu, tyrosolu a jejich IS byly připraveny navážením odpovídajícího množství látek a jejich rozpuštěním v ACN na finální koncentraci 0,1 mg/ml. Tyto roztoky byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a každý měsíc připravovány čerstvé. Pro další ředění roztoků byl používán 40% ACN.

4.5.4 Extrakční metoda

Pro extrakci dvou quorum-sensing molekul z poševních výplachů byly vyvinuty dvě mikroextrakční metody odvozené od SPE, a to MEPS a μ -SPE-PT.

Pro zachycení analytů byl v metodě MEPS v rámci optimalizace vybrán sorbent PEP (polar enhanced polymer), který je vhodný pro retenci polárních i nepolárních látek. 100 μl vzorku v PBS s přídavkem 1% MeOH bylo nanášeno na kolonku kondicionovanou 300 μl MeOH a 300 μl 1% MeOH. Vzorek byl poté promyt 100 μl vody a 100 μl 1% MeOH. Analyty byly eluovány 1000 μl ACN. Z důvodu opakovaného použití sorbentu pro MEPS bylo nutné jej propláchnout 3x 100 μl ACN. Extrakce byly prováděny pomocí MEPS stříkačky o kapacitě 100 μl a ruční automatické eVOL[®] pipety (SGE Analytical Science, Austrálie).

Sorbent pro μ -SPE-PT obsahoval dvě fáze – C8 (Empore[™] Octyl C8, 47 mm Extraction Disks) v kombinaci s polymerním SDB (Empore[™] Styrene Divinyl Benzene – SDB-RPS, 47 mm Extraction Disks). Kolonka byla před nanesením vzorku kondicionována

300 µl ACN (centrifugace, 4500 rpm, 5 min, 4 °C) a 300 µl 1% ACN (centrifugace, 4500 rpm, 5 min, 4 °C). Následně byl nanesen vzorek v PBS s přídavkem 1% ACN o objemu 100 µl (centrifugace, 4500 rpm, 15 min, 4 °C). Kolonka byla promyta 100 µl vody (centrifugace, 4500 rpm, 10 min, 4 °C) a 100 µl 1% MeOH (centrifugace, 4500 rpm, 15 min, 4 °C). Analyty byly eluovány 2x 300 µl ACN (centrifugace, 4500 rpm, 5 min, 4 °C).

Eluáty z obou extrakčních metod byly ve vialce odpařeny do sucha pomocí dusíkové odparky a následně rozpuštěny ve 40% ACN.

4.5.5 UHPLC-MS/MS analýza

Pro analýzu vzorků byl použit systém Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) ve spojení s hmotnostním detektorem Quattro Micro API (Waters, Manchester, UK) s ESI v pozitivním módu. Separace byla provedena na koloně Acquity BEH C18 o rozměrech 100 x 2,1 mm a velikosti částic 1,7 µm (Waters, Milford, MA, USA). Mobilní fáze využívala gradientovou eluci, kde složku A tvořila 0,075% kyselina mravenčí ve vodě a složku B 0,075% kyselina mravenčí v ACN. Průběh gradientu je uveden v následující tabulce (Tab. 19). Průtok byl po celou dobu analýzy udržován na 0,2 ml/min a teplota na koloně na 35 °C. Do systému bylo dávkováno 5 µl vzorku ve 40% ACN.

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Gradientová křivka
0,0	90	10	3
1,1	10	90	3
2,1	9	91	3
2,2	2	98	3
2,8	90	10	3
4,5	90	10	3

Tab. 19: Průběh gradientu pro eluci farnesolu a tyrosolu.

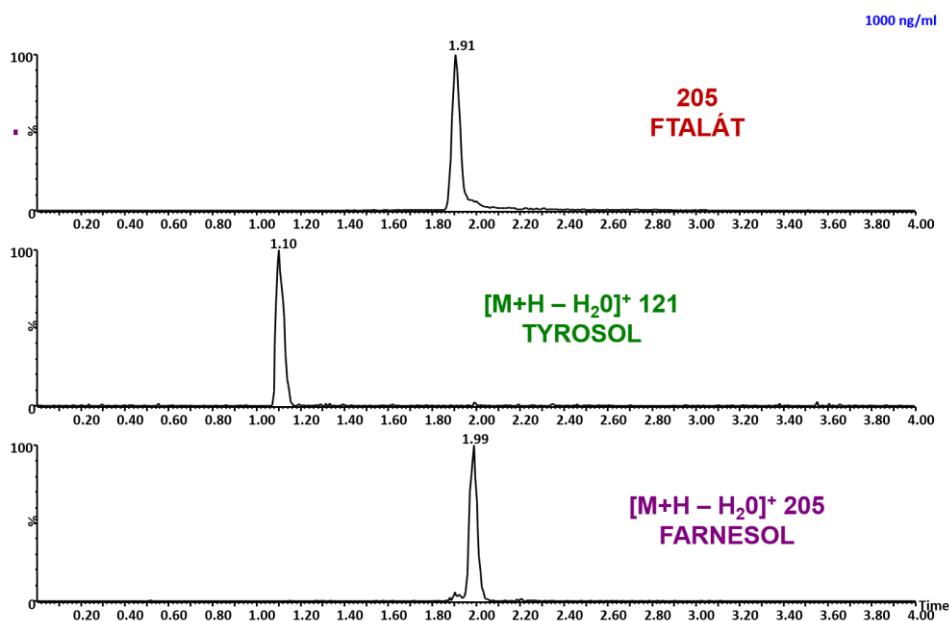
Hmotnostní detektor byl nastaven následujícím způsobem: napětí na kapiláře 2,5 kV, napětí na extraktoru 2,0 V, RF čočky 0,1 V. Jako desolvatační plyn byl použit dusík o teplotě 450 °C a průtoku 800l/hod. Pro kolizní plyn (argon) byl průtok nastaven na 120 l/hod. Teplota iontového zdroje byla nastavena na 130 °C. Látky byly stanovovány na základě dvou SRM přechodů. Pro každý analyt a každý přechod byla optimalizována CE a napětí na vstupním kuželu (Tab. 20). Pro každý analyt byl počítán sekundární iontový poměr.

	Tyrosol	Farnesol
R _t [min]	1,10	1,99
prekurzor	121,1	205,3
typ prekurzoru	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
fragment 1 (CV, CE)	103,2 (15; 15)	121,0 (25; 15)
fragment 2 (CV, CE)	77,03 (15; 20)	108,9 (25; 15)
sekundární iontový poměr	1,7	2,6

Tab. 20: Podmínky hmotnostní detekce pro oba analyty.

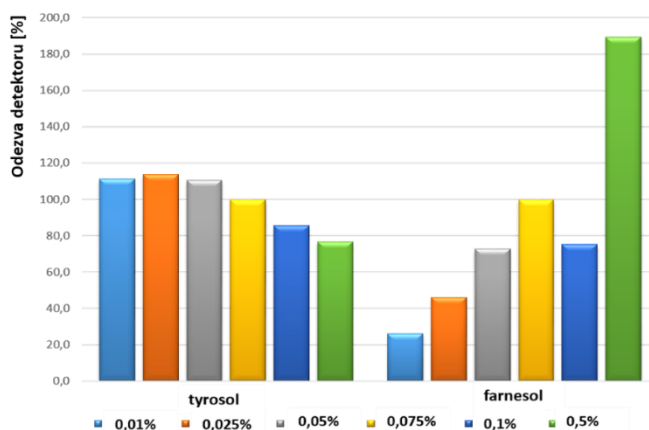
4.5.6 Optimalizace UHPLC-MS/MS metody

Základem optimalizace UHPLC-MS/MS metody byly již opublikované výsledky práce [177]. Cílem bylo změnit izokratickou eluci na eluci gradientovou, která umožňuje lepší eluci interferencí díky zvyšující se koncentraci organické složky o vysoké eluční síle. Velmi problematické bylo oddělit v systému se vyskytující ftalát, jehož m/z prekurzorového iontu byla 279 [M+H]⁺ a jedním z jeho produktových iontů byla molekula o m/z 205, odpovídající prekurzorovému iontu farnesolu. Separace byla prováděna na koloně Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm). Nejprve byl testován vliv organické složky mobilní fáze, ACN a MeOH. Použití ACN umožňovalo rychlejší eluci i při velmi nízkých průtocích (0,2 ml/min). Po prvotním screeningu při použití generického gradientu, kdy složení mobilní fáze předcházelo z 95% složky A na 95% složky B během 3 a 5 minut při průtocích 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 ml/min, byly pro další optimalizaci gradientových křivek zvoleny podmínky využívající uvedený 5 minutový generický gradient o průtoku 0,2 ml/min. Se změnou gradientových křivek docházelo postupně ke zvyšování retence analytů na koloně. Jako nejvhodnější se jevílo použití gradientové křivky č. 3, při které byla při 5 minutovém gradientu retence obou analytů menší než dvě minuty a bylo možné oddělit farnesol a ftalát (Obr. 49). Změna teploty na koloně neměla na separaci vliv. Jako finální byla zvolena běžně užívaná teplota 35 °C. Jemným laděním gradientu bylo dosaženo finálních podmínek uvedených v tabulce (Tab. 19).



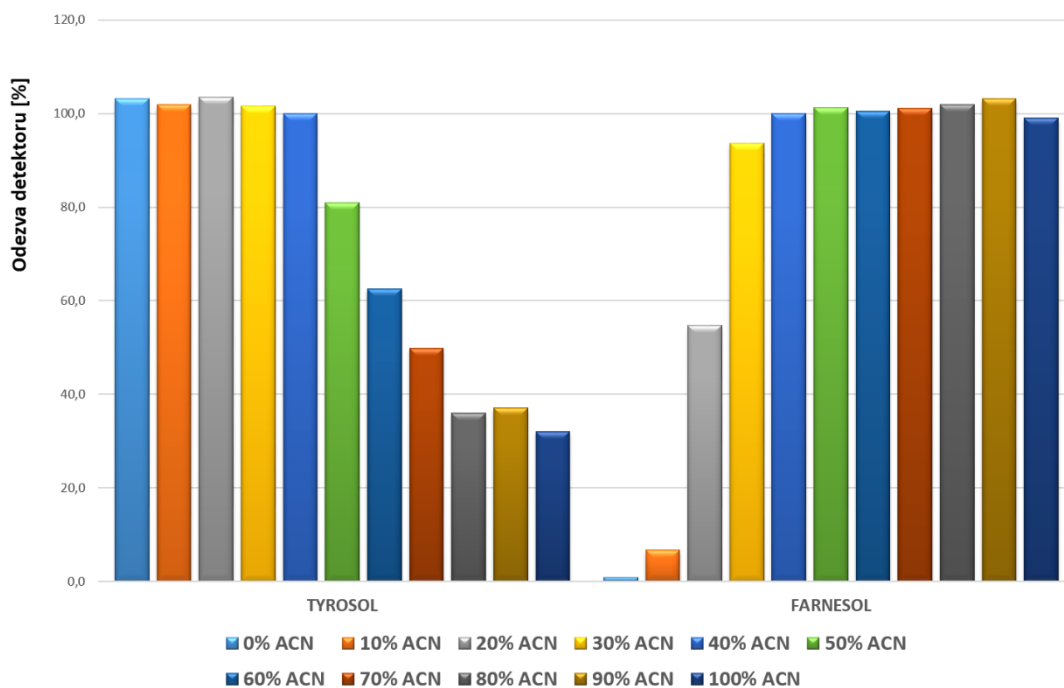
Obr. 49: SRM chromatogram pro analýzu farnesolu a tyrosolu naměřený za optimalizovaných podmínek MS detekce a gradientové eluce. Jako mobilní fáze byla použita 0,075% kyselina mravenčí ve vodě a 0,075% kyselina mravenčí v ACN o průtoku 0,2 ml/min. Teplota na koloně byla nastavena na 35 °C. Vzorek o koncentraci 1 µg/ml byl dávkován ve 40% ACN.

Dalším krokem byla optimalizace složení vodné složky mobilní fáze. Byl testován vliv změny koncentrace kyseliny mravenčí, octové a mravenčanu amonného na odezvu analytů. Se zvyšující se koncentrací kyseliny v mobilní fázi došlo ke zvýšení odezvy farnesolu, ale zároveň ke snížení odezvy tyrosolu. Nejlepší výsledky vykazovala 0,075% kyselina mravenčí a 0,5 a 0,1% kyselina octová. Záměna kyseliny za pufr vedla k výraznému snížení odezvy z důvodu potlačení ionizace látek. Výběr vodné složky mobilní fáze tedy musel být kompromisem výhodným pro oba analyty (Obr. 50). Po výběru vodné složky (0,075% kyselina mravenčí) byla okyselena i organická složka mobilní fáze, což vedlo k dalšímu zvýšení odezvy vlivem podpoření ionizace analytů.



Obr. 50: Vliv zvyšující se koncentrace kyseliny mravenčí ve vodné složce mobilní fáze na odezvu analytů.

Poslední fází optimalizace bylo ověření vlivu složení nastříkovaného rozpouštědla na odezvu analytů a tvar píků. Byly testovány různé koncentrace roztoků ACN v rozmezí 0 – 100% s přidavkem kyseliny mravenčí či bez něho (Obr. 51). Okyselení vzorku nevedlo ke zvýšení odezvy. Jako finální složení nastříkovaného roztoku byl zvolen 40% ACN jako kompromis pro oba analyty.

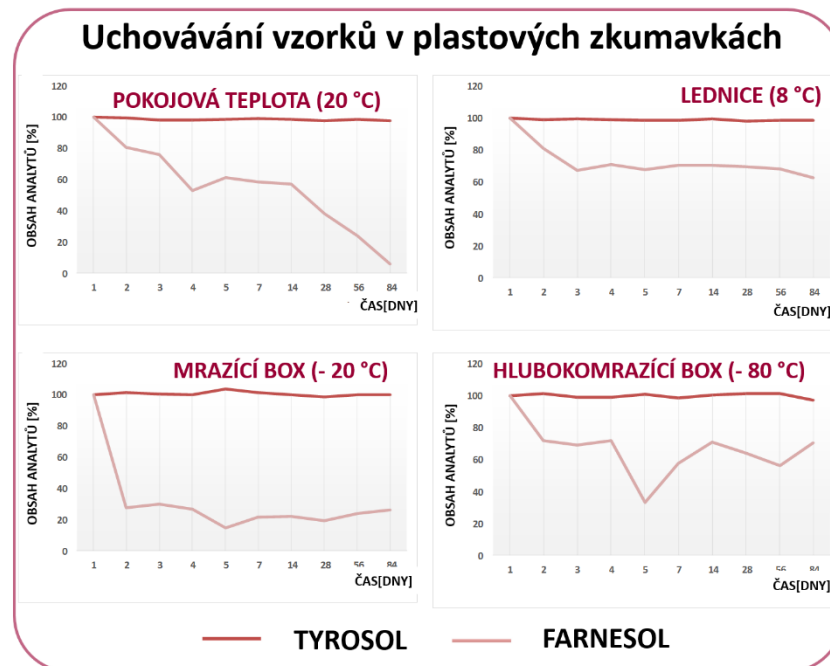
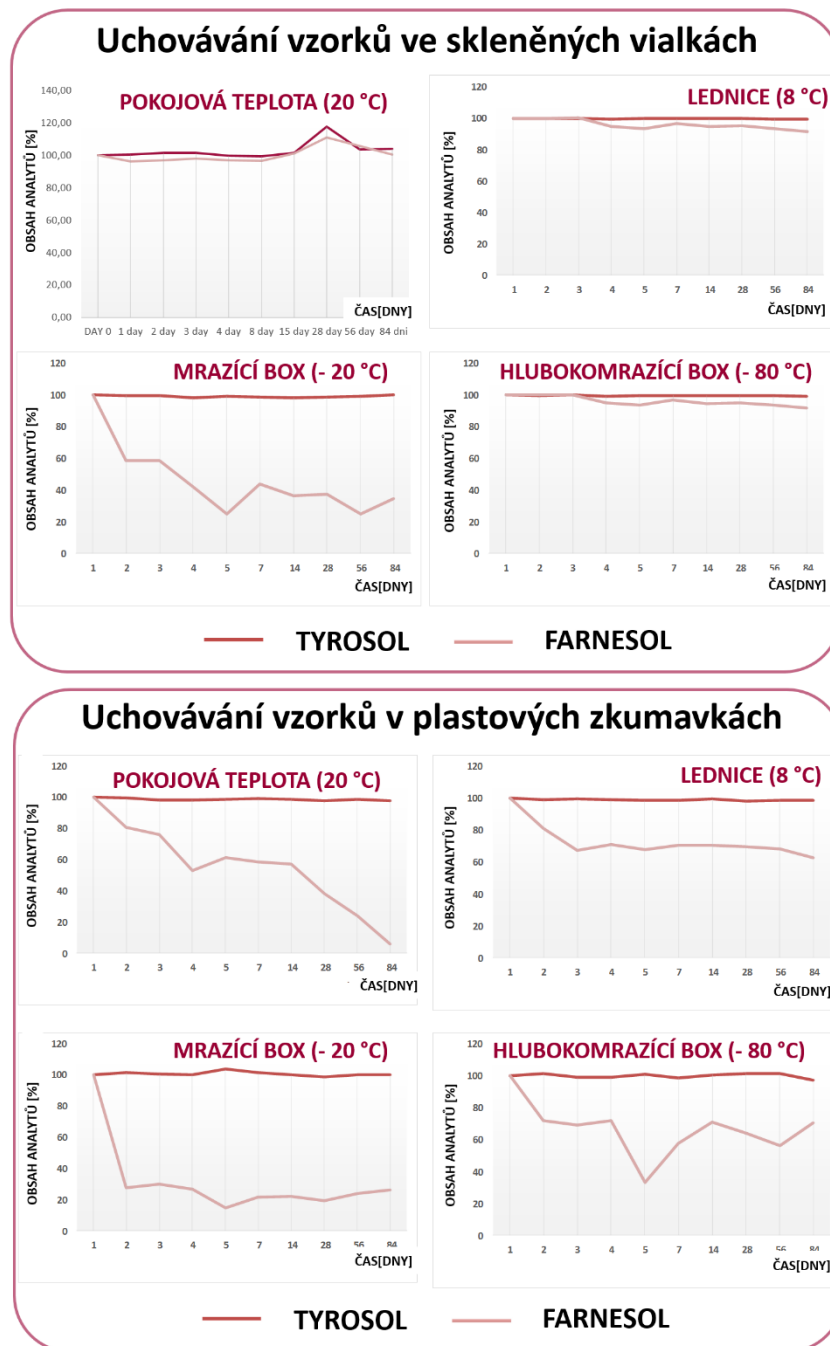


Obr. 51: Vliv složení vzorku na odezvu analytů.

4.5.7 Stabilitní studie

Před vlastním vývojem extračních postupů bylo třeba ověřit stabilitu látek v biologickém médiu (PBS) a ve zvolené směsi, ve které byly vzorky dávkovány do analytického systému. Z důvodu obsahu solí v PBS byly tyto analýzy prováděny na UHPLC systému s PDA detekcí (farnesol při 212 nm, tyrosol při 276,6 nm).

Stabilita v obou typech vzorků byla testována na vzorcích uchovávaných v tmavých skleněných vialkách a plastových zkumavkách typu Eppendorf. Vzorky byly uchovávány při laboratorní teplotě (20 °C), při teplotě 8 °C (lednice), při -20 °C (mrazící box) a při -80 °C (hlubokomrazící box). Vzorky byly odebírány v přesných časových intervalech po dobu 12 týdnů (84 dní).



Obr. 52: Stabilita farnesolu a tyrosolu v médiu PBS při uvedených podmínkách zkoušená po dobu 12 týdnů.

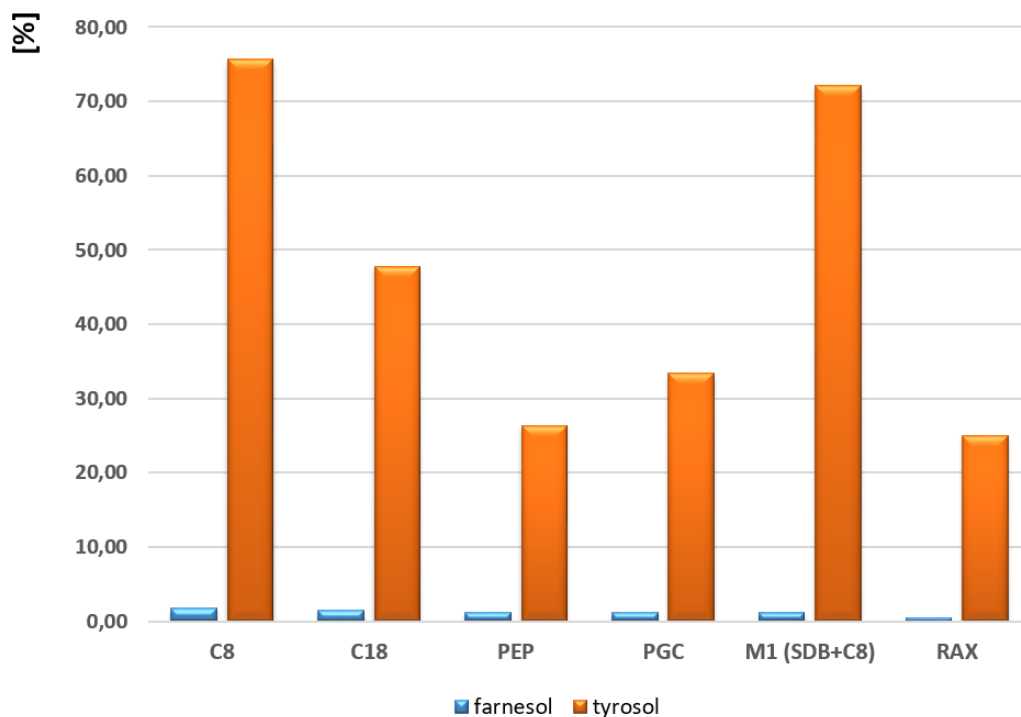
Z výsledků stabilitních studií bylo patrné (Obr. 52), že pro uchovávání vzorků v PBS bude klíčová stabilita farnesolu, tyrosol byl stabilní za všech zkoušených podmínek. Z uvedených grafů vyplývá, že uchovávání vzorků v plastových zkumavkách není vhodné, protože již v průběhu prvního dne došlo ke ztrátě farnesolu při všech teplotách uchovávání. Ztráta byla pravděpodobně způsobena navázáním látky na plast. Nejvhodnějším se jeví uchovávání ve skleněných vialkách při teplotě 8 °C nebo -80 °C,

což je vhodné z hlediska dlouhodobého uchování vzorků. V těchto případech bylo ztraceno maximálně 10% farnesolu. Při uchování látek ve 40% ACN byly oba analyty v případě skladování ve skleněných vialkách stabilní po celou dobu studie.

4.5.8 Optimalizace extrakčních metod

4.5.8.1 MEPS

Klíčovým krokem při vývoji MEPS extrakce byla volba vhodné stacionární fáze. Byly testovány komerčně dostupné fáze C8, C18, PEP, PGC (porézní grafitický uhlík), M1 (fáze obsahující kombinaci SDB a C8 sorbentu) a RAX (fáze na bázi aniontově výměnného sorbentu). Při nanášení vzorku bylo na kolonci zachyceno veškeré množství farnesolu, tyrosol byl ve všech případech zadržován pouze z velmi malé části (Obr. 53).

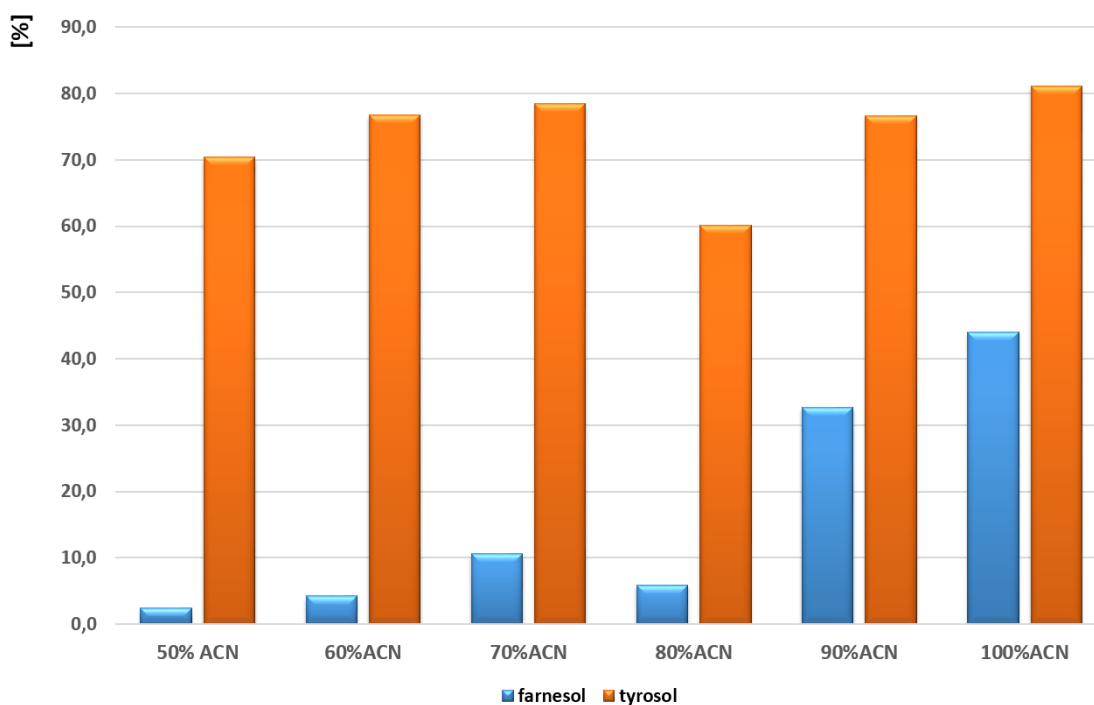


Obr. 53: Množství látek, které při nanesení vzorku na kolonku nebylo na daném sorbentu zadrženo.

Z tohoto důvodu byl dále testován vliv pH na zachycení analytů na sorbenty a přidavek malého množství organické složky, který může zachycení analytu na sorbentu ovlivnit přechodem analytu do ionizované formy. Tato optimalizace byla prováděna pouze se sorbenty PEP, M1, PGC a RAX. Sorbenty C8 a C18 nebyly testovány z důvodu

špatné retence analytů. Vzorek byl na kolonku nanášen v roztocích s obsahem MeOH (1% a 3%), ACN (1% a 3%), dále v 0,1% kyselině mravenčí, 0,5% kyselině trifluoroctové, mravenčanu amonném o pH 7; 8,5; 9 a 10 a v 1% NH₄OH. Nejlepší výsledky byly získány při použití mravenčanu amonného o pH 8,5 a 7, které odpovídá hodnotě pH používaného média a 1% MeOH na sorbentu PEP.

Dalším krokem byla optimalizace elučního činidla. Pro svoji největší eluční sílu a rychlé odpaření byl jako eluční činidlo první volby vybrán ACN zkoušený ve směsi s vodou o nanášeném objemu 100 μ l. Vymytí tyrosolu oproti jeho zachycení na sorbentu nebylo problematické, k jeho eluci plně postačoval 50% roztok ACN. Farnesol byl vzhledem ke svojí terpenoidní struktuře velmi dobře zadržován na kolonce, se zvyšujícím se množstvím ACN došlo ke zvýšení jeho eluce, ale ani 100 μ l 100% ACN nedostačovalo pro úplné vymytí látky z kolonky (Obr. 54). Bylo tedy nutné dále optimalizovat objem elučního činidla. Analyty byly postupně vymývány až 1 ml ACN (2 x 500 μ l), který vykazoval nejlepší výsledky výtěžnosti a byl tak zvolen finálním elučním činidlem.



Obr. 54: Vliv zvyšující se koncentrace ACN na výtěžnost extrakce farnesolu a tyrosolu.

Pro odstranění balastních látek z média bylo nutné optimalizovat složení a objemy promývacího činidla. Jako možná promývací činidla byly zkoušeny následující roztoky: voda, mravenčan amonný pH 8,5, MeOH (1%; 2% a 5%), ACN (1%; 2% a 5%) a

kyselina mravenčí (0,1%; 0,5% a 1%). Nejnižší ztráty byly pozorovány při použití čisté vody, 1% MeOH a mravenčanu amonného. Pro tyto roztoky byl dále testován vliv jejich objemu (100, 200 a 300 μ l) na výtěžnost extrakce. Obecně lze říci, že se zvyšujícím se objemem promývacího činidla byla snižována výtěžnost extrakce z důvodu vyšších ztrát analytů v průběhu promývacího kroku. Nejlepší promývací činidla (voda a 1% MeOH) o objemu 100 μ l byla použita pro finální protokol.

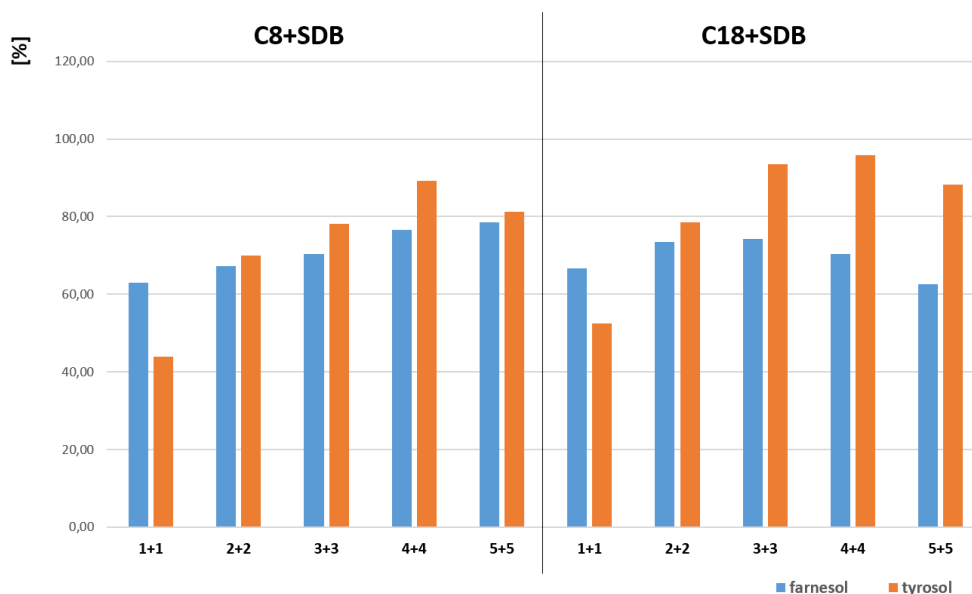
Po optimalizaci těchto kroků byla vyvinutá metoda aplikována na vzorek média s přídavkem 1% MeOH. Po ověření účinnosti extrakce bylo optimalizováno složení ekvilibračního činidla, kterým je kolonka promývána před nanesením vzorku. Z důvodu podobnosti se vzorkem byl pro kondicionaci a ekvilibraci použit čistý MeOH a 1% MeOH.

4.5.8.2 μ -SPE-PT

μ -SPE-PT metoda byla optimalizována obdobným způsobem jako MEPS. Veškerá optimalizace po znalostech chování látek probíhala na biologickém médiu PBS.

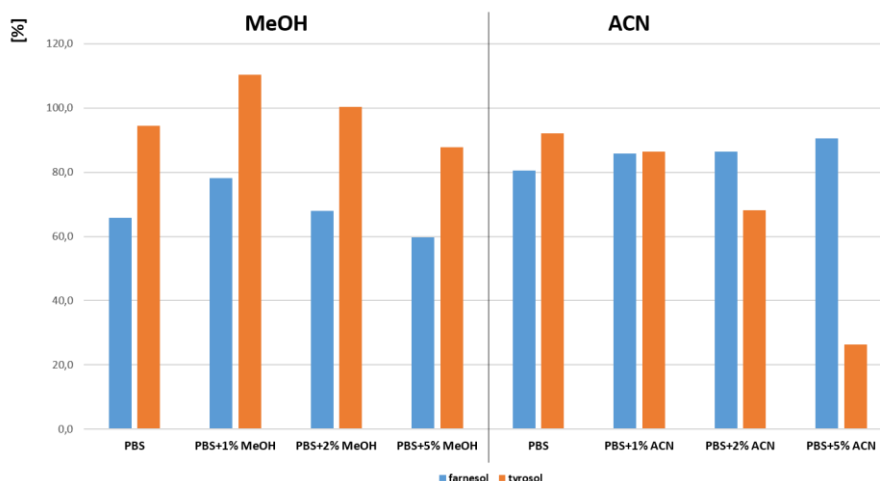
Prvním krokem optimalizace této mikroextrakční metody byla volba sorbentu. Jelikož jsou kolonky pro μ -SPE-PT techniku připravovány v laboratoři, bylo zde možné zkoušet kombinace sorbentů, které nejsou komerčně dostupné, či vyhodnotit vliv množství sorbentu na výtěžnost extrakce.

Jako sorbenty byly testovány komerčně dostupné C8 a C18, laboratorní C8, C18, SDB a kombinace C8+SDB a C18+SDB. Z důvodu nízké retence analytů na komerčně dostupných sorbentech a na sorbentech připravených v laboratoři s jedním typem fáze byla pro zachycení analytu vybrána kolonka s kombinovaným sorbentem. U obou typů kombinovaných fází byl zkoušen vliv množství sorbentu na výtěžnost extrakce. Sorbenty jsou totiž do špičky vyřezávány z SPE disků a podle potřeby je tak možné množství sorbentu optimalizovat. Z výsledků (Obr. 55) je patrné, že zvyšování množství sorbentu vedlo také ke zvýšení výtěžnosti extrakční procedury vlivem větší kapacity sorbentu. U obou kombinací je ale vidět, že při určitém počtu vrstev již k významnému zvýšení výtěžnosti nedochází a není nutné dále množství sorbentu zvyšovat. Jako nejlepší kombinace byla vybrána kombinace 3 vrstev sorbentu C8 se 3 vrstvami SDB.



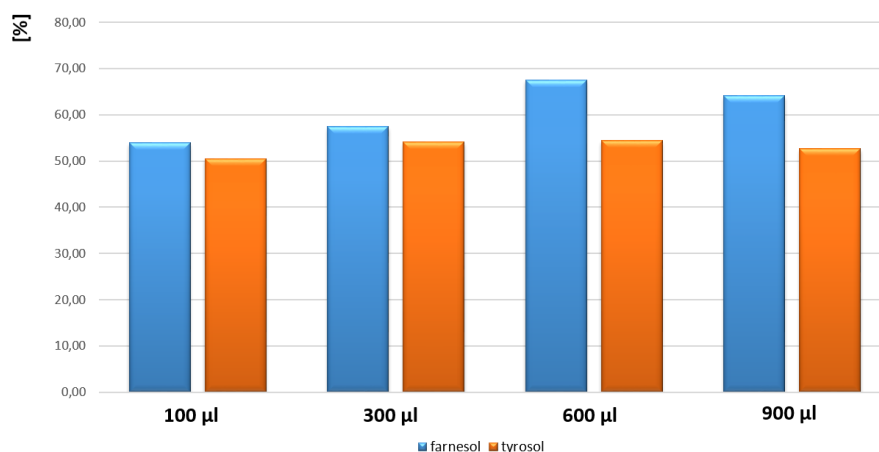
Obr. 55: Vliv zvyšujícího se počtu vrstev sorbentů na výtěžnost extrakce farnesolu a tyrosolu.

V případě vývoje této metody bylo také ověřeno, zda bude retence, a tím i výtěžnost analytů, ovlivněna přidáním malého množství organické složky k médiu. Z důvodu zachytávání farnesolu na plasty by tento přídavek mohl zvýšit jeho výtěžnost tím, že by pokryl stěnu plastové špičky a znemožnil by jeho navázání na kolonku. Z uvedených výsledků je patrné, že přidání 1% organické složky vedlo ke zvýšení výtěžnosti farnesolu i tyrosolu. Další zvyšování koncentrace organických rozpouštědel ACN a MeOH ve vzorku mělo opačný efekt (Obr. 56). Přídavek 1% ACN k médiu PBS byl vybrán jako konečné složení matrice vzorku.



Obr. 56: Vliv přídavku malého množství organických rozpouštědel ACN a MeOH k médiu na výtěžnost mikroextrakce.

Následně bylo optimalizováno složení elučního činidla. Stejně jako u MEPS metody byl testován ACN. Nejvyšší výtěžnost opět poskytoval čistý ACN, pro který byl dále optimalizován nejvhodnější objem pro eluci obou analytů. Zvýšení objemu z původních 100 μ l na 300 μ l nevedlo ke zvýšení výtěžnosti. Pokud byly analyty vymyty 600 μ l ACN, zvýšila se eluce farnesolu přibližně o 15%. Další zvyšování objemu nevedlo k lepším výsledkům.



Obr. 57: Vliv objemu 100% ACN jako elučního činidla na výtěžnost extrakce analytů (%).

Další částí optimalizace byla volba promývacího kroku k odstranění solí a dalších nežádoucích látek z média. Byla testována stejná rozpouštědla jako u metody MEPS: voda, mravenčan amonný pH 8,5, MeOH (1%; 2% a 5%), ACN (1%; 2% a 5%) a kyselina mravenčí (0,1%; 0,5% a 1%). Vyhodnocené výsledky byly taktéž obdobné. Nejlepší výtěžnost, a tedy nejnižší ztráty analytů, způsobilo použití čisté vody a 1% MeOH, u kterých byl následně optimalizován nanášený objem. Zvyšující se objem promývacího činidla vedl k vyšším ztrátám analytu. Z tohoto důvodu byla proto použita promývací činidla o objemu 100 μ l, a to v kombinaci voda a následně 1% MeOH.

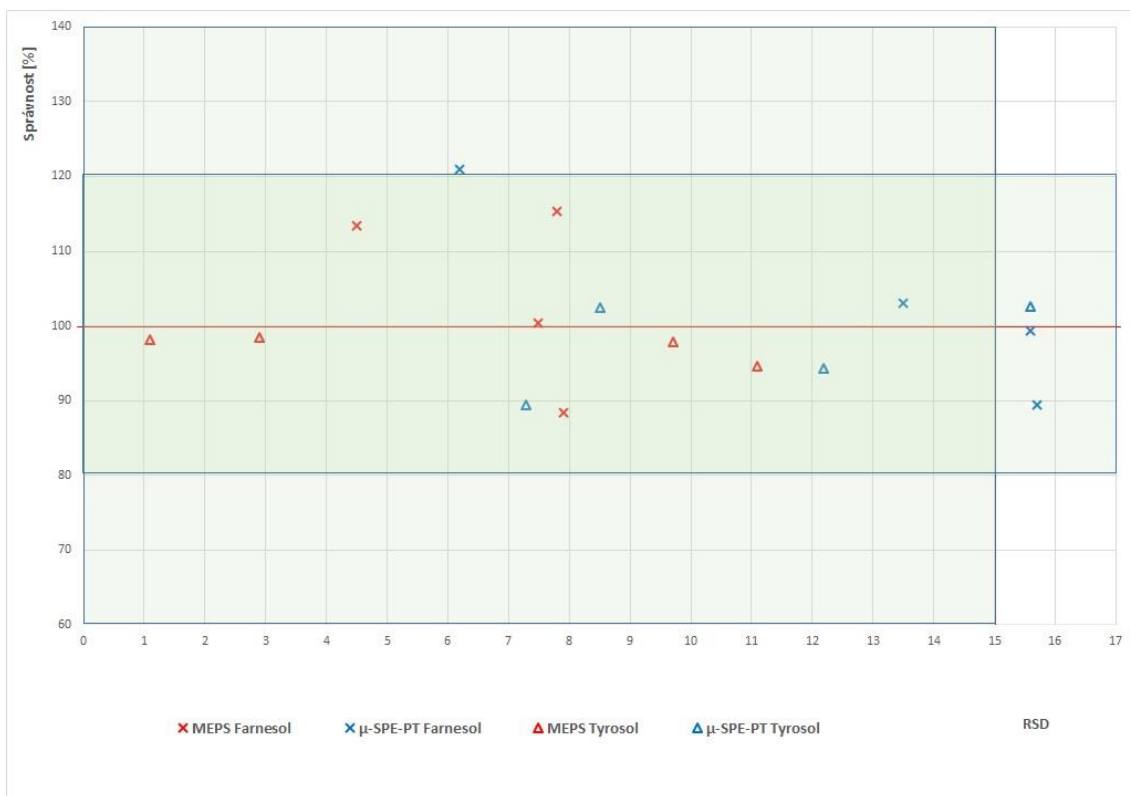
4.5.9 Validace metody

Pro oba analyty byla před validací metody ověřena opakovatelnost retenčních časů a ploch pík vyjádřena jako RSD (%) na 3 koncentračních hladinách (50; 100 a 1000 ng/ml). Opakovatelnost retenčních časů vyjádřena jako RSD (%) byla pro oba analyty menší než 0,56%, pro plochy píků menší než 9,84%.

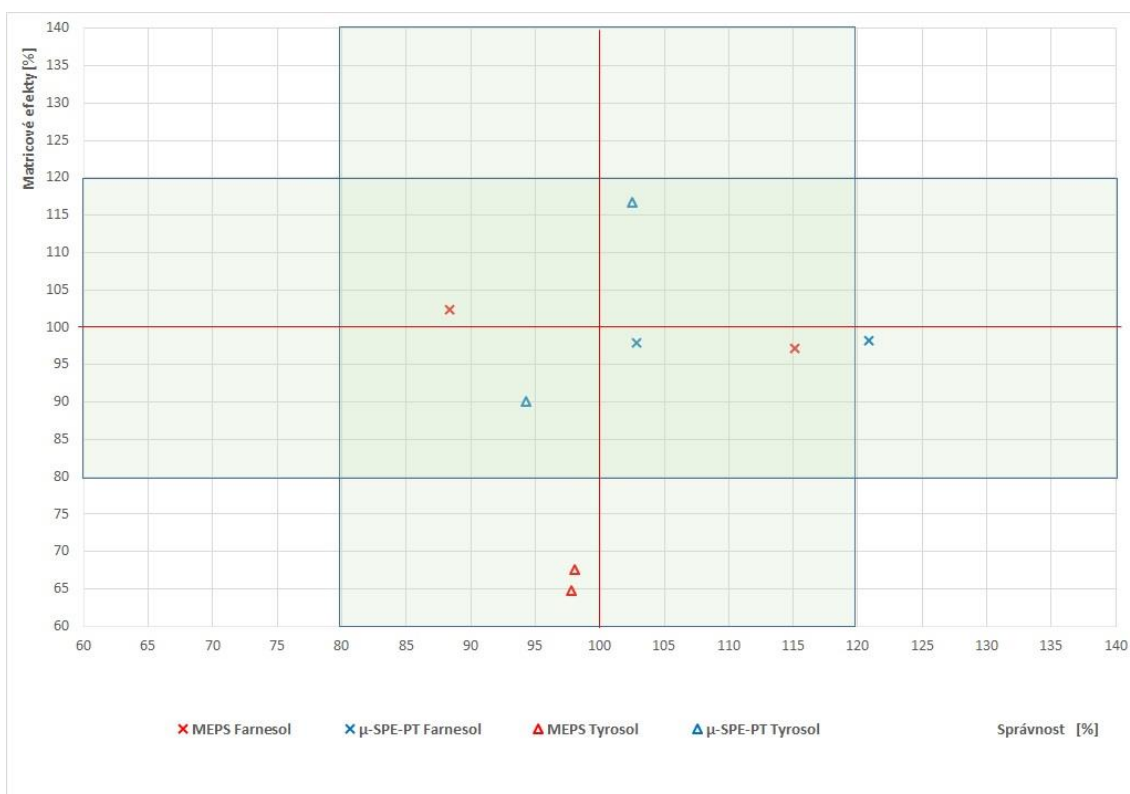
Pro obě metody byla v rámci validace vyhodnocena správnost a přesnost na čtyřech koncentračních hladinách, byla ověřena linearita standardní i matricové kalibrační křivky, LOD a LOQ a vyhodnoceny matricové efekty podle požadavků EMA [144]. Výsledky validačních parametrů jsou shrnuty v Tab. 21. Obě metody splnily požadavky správnosti a přesnosti. Metoda MEPS poskytovala oproti metodě μ -SPE-PT přesnější výsledky pro farnesol. Naopak metoda μ -SPE-PT nevykazuje tak významný vliv matricových efektů jako metoda MEPS (Tab. 21, Obr. 58, Obr. 59).

		MEPS		μ -SPE-PT	
		farnesol	tyrosol	farnesol	tyrosol
Standardní kalibrační křivka [r²]		0,9990	0,9979	0,9990	0,9979
Matricová kalibrační křivka [r²]		0,9983	0,9985	0,9956	0,9984
Koncentrační hladiny [ng/ml]	L1	10	5	10	5
	L2	25	10	25	10
	L3	2500	2500	2500	2500
	L4	5000	5000	5000	5000
Správnost [%]	L1	88,4	97,8	120,9	102,5
	L2	100,3	94,6	89,3	102,6
	L3	115,2	98,1	102,9	94,3
	L4	113,4	98,4	99,2	89,4
Přesnost [RSD %]	L1	7,9	9,7	6,2	8,5
	L2	7,5	11,1	15,7	15,6
	L3	7,8	1,1	13,5	12,2
	L4	4,5	2,9	15,6	7,3
Matricové efekty [%]	L1	102,3	64,8	98,2	116,7
	L3	97,1	67,5	97,8	90,1

Tab. 21: Souhrn validačních parametrů pro metodu MEPS a metodu μ -SPE-PT na 4 koncentračních hladinách - L1 odpovídá LLOQ, L2 maximálně trojnásobku LLOQ, L3 - 50-30% rozsahu kalibračního rozmezí, L4 odpovídá ULOQ.



Obr. 58: Grafické znázornění správnosti a přesnosti pro obě validované mikroextrakční metody.



Obr. 59: Maticové efekty pro MEPS a μ -SPE-PT.

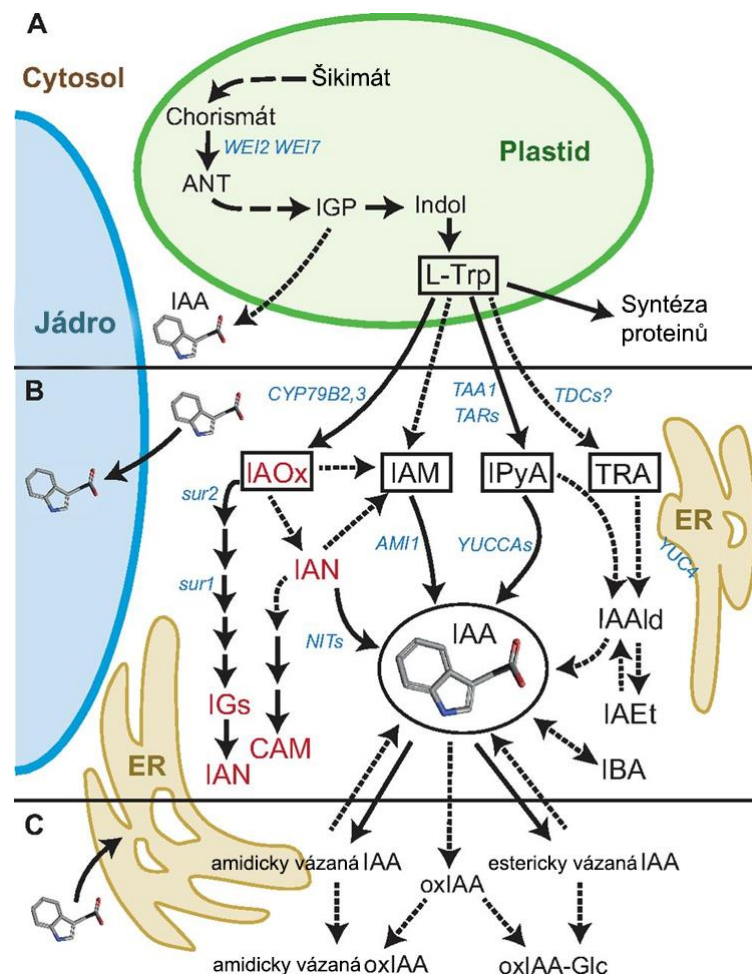
4.5.10 Závěr

Byly vyvinuty dvě mikroextrakční techniky pro stanovení farnesolu a tyrosolu ve vzorcích poševních výplachů. Metody umožňují rychlou úpravu vzorků, která ve spojení s UHPLC-MS/MS umožní rychlejší zpracování vzorků a zvýší jejich prostupnost laboratoří. Obě mikroextrakční metody vykazují obdobnou správnost a přesnost, metoda μ -SPE-PT není tolik ovlivněna matricovými efekty jako metoda MEPS. Navíc umožňuje paralelní přípravu až 48 vzorků zároveň během 90 minut, na rozdíl od metody MEPS, kde úprava jednoho vzorku zabere přibližně 7 minut. Vyvinuté a zvalidované metody budou použity pro analýzu reálných vzorků s obsahem farnesolu a tyrosolu. Na základě tohoto měření budou sledovány vlivy těchto látek na rozvoj či potlačení kandidóz u žen.

4.6 Vývoj a optimalizace metody pro rychlý screening metabolitů auxinu v mutantech rostliny *Arabidopsis thaliana*

4.6.1 Úvod do problematiky a cíl práce

Auxin (indolyl-3-octová kyselina, IAA) hraje významnou roli jako signální molekula v růstu a vývoji rostlin. Aminokyselina L-tryptofan je hlavním prekurzorem auxinových biosyntetických drah: indolyl-3-acetamidové, indolyl-3-acetalodximové, tryptaminové a indolyl-3-pyrohroznové kyseliny (Obr. 60). Tyto metabolické cesty jsou nejdůležitějším zdrojem IAA v rostlinném organizmu.



Obr. 60: Metabolické dráhy biosyntézy auxinu v rostlinném organizmu. Obrázek převzat ze zdroje [178].

Po přenesení na místo působení mohou být auxiny inaktivovány oxidací nebo konjugací s aminokyselinami či cukry. Některé z těchto forem pak mohou být zpětně hydrolýzou aktivovány na vlastní IAA.

Cílem této práce bylo vyvinout mikroextrakční metodu pro analýzu IAA, jeho prekurzorů a metabolitů v rostlinném materiálu, která umožní lepší pochopení metabolismu tohoto hormonu.

4.6.2 Chemikálie

Komerčně dostupné standardy pro IAA a jeho metabolity byly získány od firem Sigma-Aldrich, Olchemim a Cambridge Isotope Laboratories (Velká Británie). Ostatní standardy včetně izotopicky značených IS byly syntetizovány podle již publikovaných reakčních postupů.

Kyselina octová byla zakoupena u firmy Merck (Švédsko). Sodná sůl diethyldithiokarbamové kyseliny a cysteamin hydrochlorid u Sigma-Aldrich. Rozpouštědla o čistotě HPLC grade byla pořízena u firmy J. T. Baker (Švédsko). Ostatní chemikálie pocházely od Lach-Ner či Sigma-Aldrich (Švédsko).

4.6.3 Rostlinný materiál

Pro vývoj a validaci metody pro rychlý screening byly použity mladé sedmidenní rostliny *Arabidopsis*. Ve studii bylo testováno 64 listových mutantních linií *Arabidopsis thaliana*. Mutační linie *sur2-1* byla použita jako pozitivní kontrola, která má zvýšenou produkci auxinů. *Arabidopsis Columbia (Col-0)* a *Landsberg erecta* byly ke studii připojeny jako linie bez mutačních změn a projevů. Rostliny byly pěstovány ze semen na agarových plátech za přesně kontrolovaných podmínek (viz manuskript 8.7). Všechny rostliny byly sklizeny v pěti replikátech, zváženy, zmrazeny tekutým dusíkem a uchovávány při -80 °C.

4.6.4 Extrakce IAA a jeho metabolitů

Pro kvantifikaci IAA a jeho metabolitů bylo naváženo 10 mg rostlinného materiálu, který byl extrahován do 1 ml vychlazeného 50 mM fosfátového pufru o pH 7,0 obsahujícího 0,1% diethyldithiokarbamátu sodného. Ke vzorku byly přidány izotopicky značené IS. Vzorky byly následně homogenizovány pomocí kuličkového mlýnku MixeMill MM 301 (Retsch GmbH) při frekvenci 29 Hz po dobu 6 minut. Rostlinný

extrakt byl inkubován při 4 °C po dobu 10 minut za stálého třepání a následně centrifugován (15 minut, 14 000 rpm, 4 °C). Výsledný extrakt byl přečištěn pomocí μ -SPE-PT metody. Jako sorbent pro mikroextrakci byla zvolena kombinace reverzní C₁₈ a polymerní SDB-XC fáze (Empore™, 3M™).

Ke 200 μ l rostlinného extraktu bylo přidáno 100 μ l 0,1M kyseliny chlorovodíkové. Takto okyselený vzorek (pH 2,7) byl nanesen na mikroextrakční kolonku, která byla aktivována 50 μ l acetonu (centrifugace - 2200 rpm, 10 min, 4 °C), 50 μ l MeOH (centrifugace - 2200 rpm, 10 min, 4 °C) a 50 μ l vody (centrifugace - 2200 rpm, 15 min, 4 °C). Po nanesení vzorku (centrifugace - 3400 rpm, 25 min, 4 °C) byla kolonka promyta 50 μ l 0,1 % kyseliny octové (centrifugace - 3400 rpm, 15 min, 4 °C) a analyty byly poté eluovány 50 μ l 80 % MeOH (centrifugace - 3400 rpm, 15 min, 4 °C).

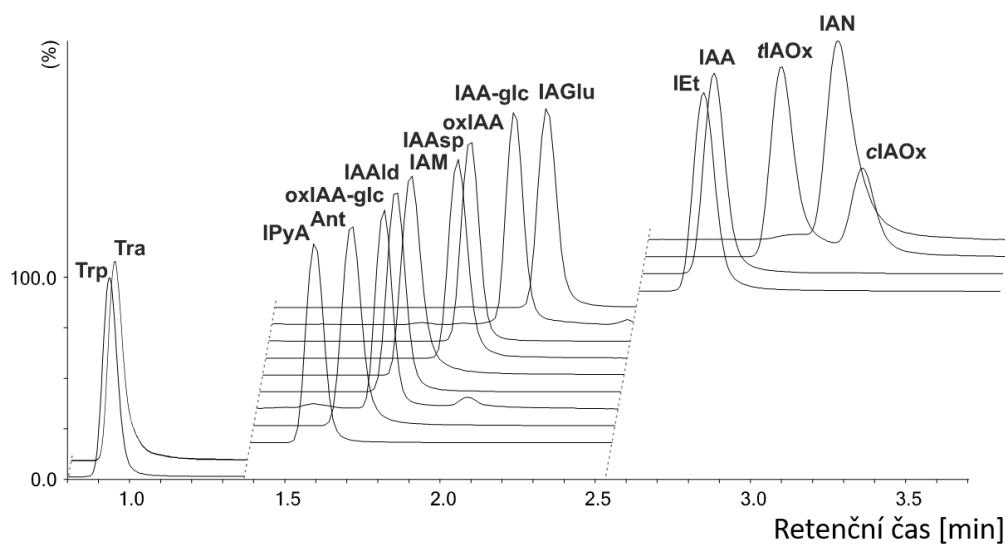
K dalším 200 μ l rostlinného extraktu bylo přidáno 100 μ l 0,75 M cysteaminu o pH 8,2. Tímto přídatkem došlo k derivatizaci dvou metabolitů IAA, indolyl-3-acetaldehydu a indolyl-3-pyrohroznové kyseliny, za vzniku thiazolidinových derivátů. Po 15 minutách inkubace bylo pH vzorku upraveno na pH 2,7 a přečištěno výše zmíněným způsobem. Oba eluáty byly smíseny ve vialce, odpařeny ve vakuové odparce do sucha a před vlastní UHPLC-MS/MS analýzou uchovávány při -20 °C.

4.6.5 UHPLC-MS/MS analýza

Před analýzou byly odpařené vzorky rozpuštěny ve 40 μ l mobilní fáze. Pro analýzu byl využit LC systém 1290 infinity ve spojení s hmotnostním detektorem 6490 Triple Quadrupole (Agilent Technologies). 20 μ l vzorku bylo nastříknuto do systému a separováno na koloně Kinetex C18 100A o rozměrech 100 x 2,1 mm naplněné povrchově porézními částicemi o průměru 1,7 μ m. Analyty byly eluovány v průběhu tříminutového gradientu (Obr. 61) od 5% do 35% složky A, kde složka A byla 1% kyselina octová v MeOH a složka B 0,1% kyselina octová ve vodě. Následně byla kolona promyta 100% MeOH a ekvilibrována po dobu 1 minuty do počátečního stavu gradientu. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min a teplota na koloně byla udržována na 40 °C. Analyty byly kvantifikovány pomocí SRM přechodů za použití optimálních CE (Tab. 22). Výsledné chromatogramy byly vyhodnocovány pomocí software MassHunter (verze B.05.02, Agilent Technologies).

Analyt	SRM přechod	IS	SRM přechod pro IS	CE (V)	Retenční čas (min)	LOD (fmol)	Linerární rozmezí (pmol)	R ²
Trp	205,2 > 146,1	[² H ₅]-Trp	210,2 > 151,1	14	0,931	10,0	0,050-500	0,9987
TRA	161,1 > 144,1	[² H ₂]-TRA	163,1 > 146,1	6	0,932	10,0	0,050-50	0,9998
IPyA-TAZ	263,1 > 88,0	[² H ₄]-IPyA-TAZ	267,1 > 88,0	10	1,617	5,0	0,010-100	0,9981
ANT	138,1 > 120,1	[¹³ C ₆]-ANT	144,1 > 126,1	6	1,728	10,0	0,050-500	0,9999
oxIAA-glc	192,1 > 146,1	[¹³ C ₆]-oxIAA-glc	198,1 > 152,1	12	1,759	50,0	0,100-100	0,9991
IAM	175,1 > 130,1	[² H ₅]-IAM	180,1 > 135,1	12	1,842	2,5	0,005-500	0,9999
IAAsp	291,2 > 130,1	[¹³ C ₆]-IAAsp	297,2 > 136,1	20	2,027	25,0	0,050-500	0,9999
oxIAA	192,1 > 146,1	[¹³ C ₆]-oxIAA	198,1 > 152,1	12	2,064	5,0	0,050-500	0,9996
IAA-glc	176,1 > 130,1	[¹³ C ₆]-IAA-glc	182,1 > 136,1	12	2,165	50,0	0,100-100	0,9976
IAGlu	305,2 > 130,1	[¹³ C ₆]-IAGlu	311,2 > 136,1	20	2,294	5,0	0,050-500	0,9997
IAA	176,1 > 130,1	[¹³ C ₆]-IAA	182,1 > 136,1	12	2,822	5,0	0,005-500	0,9999
<i>trans</i> -IAOx	175,1 > 158,1	[² H ₅]- <i>trans</i> -IAOx	180,1 > 163,1	10	3,011	5,0	0,005-500	0,9978
IAN	157,1 > 130,1	[¹³ C ₆]-IAN	163,1 > 136,1	10	3,185	10,0	0,050-500	0,9991
<i>cis</i> -IAOx	175,1 > 158,1	[² H ₅]- <i>cis</i> -IAOx	180,1 > 163,1	10	3,258	5,0	0,005-500	0,9982

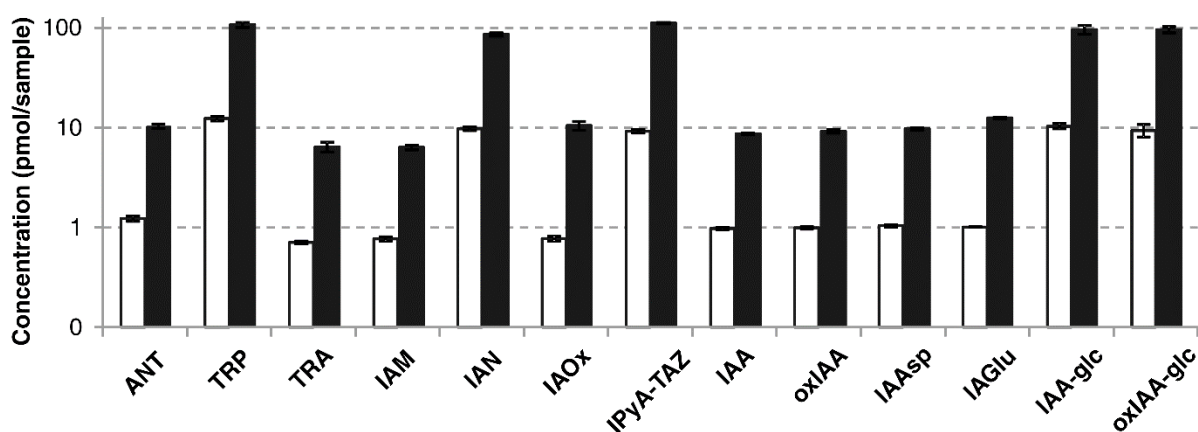
Tab. 22: SRM přechody, CE, retenční časy, LOD, dynamické lineární rozmezí a linearita vyjádřena jako korelační koeficient pro jednotlivé analyty pro finální UHPLC-MS/MS metodu.



Obr. 61: SRM chromatogram pro IAA a jeho metabolity změřený za finálních podmínek separace.

4.6.6 Validace metody

Účinnost metody byla ověřena pomocí metody standardního přídavku. 2 mg rostliny, ke kterým bylo přidáno 1, 10 a 100 pmol standardu a směs IS, byly upraveny μ -SPE-PT metodou a analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS. V jednotlivých vzorcích byla vypočtena množství přidaných látek. Výsledky (Obr. 62) vykazují vysokou správnost a přesnost metody, která byla ověřena na 4 replikátech pro každou koncentrační hladinu.

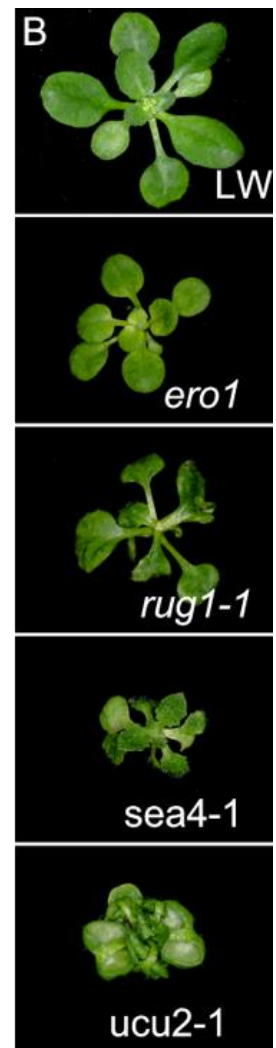
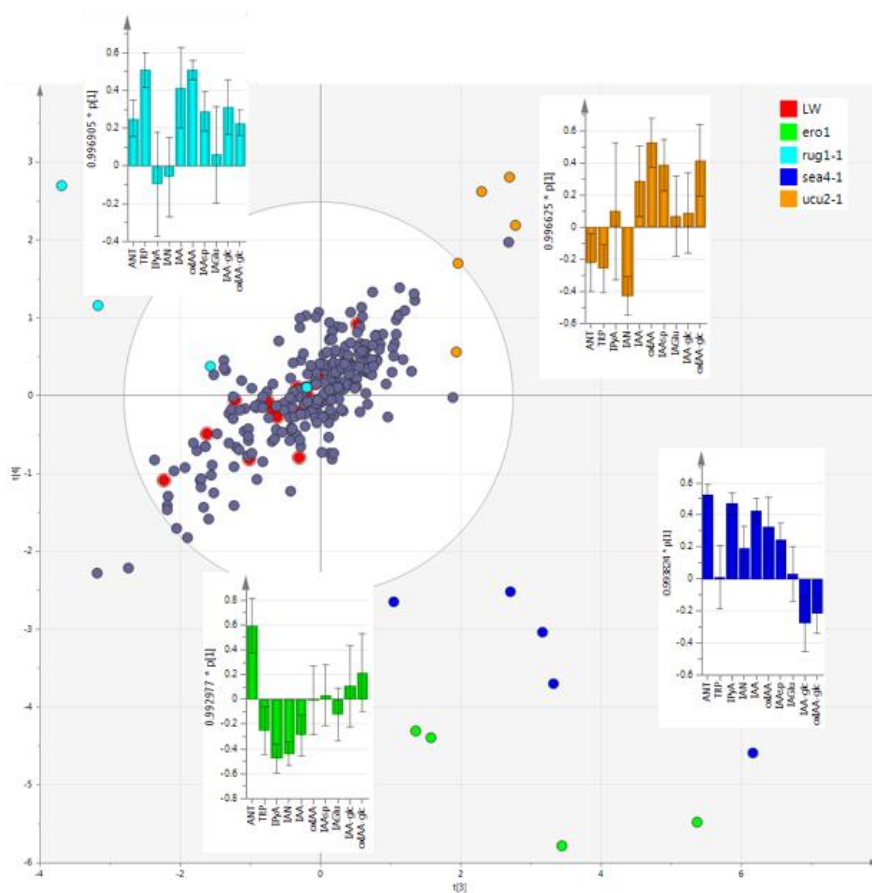


Obr. 62: Získaná množství metabolitů IAA přidaná do extraktů 2 mg *Arabidopsis thaliana*. Bílá barva - 1 nebo 10 pmol, Černá 10 nebo 100 pmol. Vzorky byly analyzovány ve 4 replikátech. Chybové úsečky vykazují standardní odchylku hodnot.

4.6.7 Screening mutantů rostliny *Arabidopsis thaliana*

Optimalizovaná metoda byla použita pro testování známé knihovny mutantu rostliny *Arabidopsis thaliana* pro identifikaci různých genotypů. Na základě odchylek v listové morfologii, které mohou indikovat odchylky v auxinovém metabolismu, bylo vybráno 64 linií. Ekotyp *Landsberg erecta* byl použit jako nezmutovaná kontrola, mutant *sur2-1* jako pozitivní kontrola.

Díky vyvinuté metodě, která umožňovala analýzu IAA, jeho prekurzorů a degradačních produktů, bylo v průběhu několika týdnů zpracováno celkem 365 vzorků *Arabidopsis thaliana*. Na získané výsledky koncentrací jednotlivých látek byly aplikovány vícerozměrné statistické metody. Bylo zjištěno, že 4 mutační linie jsou signifikantně odlišné od divokého nezmutovaného typu *Landsberg erecta*. Vícerozměrné statistické metody také vydělily mutační linie, které se značně odlišují od ostatních v hladinách jednotlivých auxinů (Obr. 63).



Obr. 63: Oddělené 4 mutační linie - *ero1* (zelená), *rug1-1* (světle modrá), *sea4-1* (tmavě modrá) a *ucu1-1* (oranžová) od nezmutované *Landsberg erecta* (červená) a zbylých mutačních linií (fialová). Na obrázku (B) jsou vyobrazeny fenotypy oddělených mutačních linií. Zdroj [179].

4.6.8 Závěr

Výsledky analýzy ukazují, že metoda má velký potenciál pro využití v rychlém metabolickém screeningu *Arabidopsis thaliana* pro charakterizaci auxinů, jeho metabolitů a biosyntetických drah. Metoda byla testována na setu již dříve izolovaných mutačních linií. Zpracování a analýza více než 100 vzorků za den umožňuje rychlou dostupnost vzorků laboratořím, je méně časově náročná a efektivnější než dříve publikované metody. Umožňuje analyzovat auxinové metabolity ve velkých setech vzorků, které jsou dostupné pouze v miligramových množstvích, s vyhovující přesností a správností měření. V kombinaci s vícerozměrným statistickým zpracováním dat je tak

nástrojem, který může být užitečným při hledání nových genů ovlivňujících metabolismus auxinů. Navíc může být tento přístup využit pro analýzu dalších tříd rostlinných hormonů a metabolitů a pomoci tak objasnit genetické pozadí u různých fenotypů rostlin.

5 ZÁVĚR

Dizertační práce se zabývá vývojem extrakčních metod založených na principech LLE, SPE i PP pro extrakci biologicky aktivních látek, biologických markerů či rostlinných hormonů pro následnou vysokoúčinnou chromatografickou analýzu ve spojení s hmotnostní detekcí. V průběhu optimalizace metod byl kladen důraz především na to, aby vyvíjené metody umožnily selektivně izolovat dané analyty z co nejmenšího objemu vzorků za co nejkratší dobu. Optimalizovány byly proto především metody založené na technikách, které umožňují rychlou prostupnost vzorků laboratoří a jejichž extrakty je možné analyzovat pomocí UHPLC-MS/MS či UHPSFC-MS/MS.

V rámci vypracování dizertační práce byly vyvinuty a validovány následující metody:

1. Dvě UHPSFC-MS metody pro separaci 8 izomerních forem vitamínu E v lidském séru, kde pro extrakci byla vyvinuta kombinace metod PP a LLE. Vyvinuté metody umožňují rychlé a selektivní stanovení vitamínu E v rámci několika desítek minut včetně provedení extrakce a jsou tak vhodné pro klinické monitorování hladiny vitamínu E v lidském séru.
2. PALME metoda pro analýzu polárních bazických léčiv. V rámci této práce byly optimalizovány různé parametry extrakce, které mohou ovlivnit výtěžnost metody (akceptorové činidlo, složení membrány, extrakční čas). Vyvinutá a validovaná metoda potvrdila, že PALME je možné používat nejen pro extrakci hydrofobních a kyselých látek, ale i pro analýzu látek polárních, jejichž LLE bývá velmi obtížná.
3. Metoda μ -SPE-PT pro analýzu statinů s využitím komerčně dostupných a laboratorně připravovaných plněných špiček pipet. Tato práce se zabývala porovnáním komerčně dostupných sorbentů ve špičkách pipet a špiček plněných v laboratoři. Ukazuje potenciál techniky v klinických laboratořích, kde je žádoucí vysoká prostupnost vzorků. Technika využívající plněné špičky pipet jako extrakční kolony umožňuje úpravu až několika desítek vzorků zároveň (v závislosti na počtu pozic v centrifuze) a při použití laboratorních

špiček není nutné v případě méně komplexní matrice zavádět krok srážení proteinů, který opět úpravu vzorků prodlužuje.

4. Extrakční metody PP, SPE, MEPS a μ -SPE-PT pro analýzu kvercetinu a jeho metabolitů (polyfenolické kyseliny a konjugované deriváty) v potkaní plazmě. Vyvinuté metody umožňují stanovení uvedených látek v nízkých koncentračních hladinách. Jsou a budou používány pro objasnění metabolismu kvercetinu a jeho metabolitů v potkaní plazmě.
5. Mikroextrakční techniky MEPS a μ -SPE-PT pro analýzu farnesolu a tyrosolu z poševních výplachů pomocí UHPLC-MS/MS. Validované metody budou použity pro stanovení hladiny farnesolu a tyrosolu v reálných vzorcích z klinické studie pro objasnění role těchto látek v rozvoji kandidóz u žen.
6. Rychlá analytická metoda pro metabolický screening růstových hormonů auxinů v rostlině *Arabidopsis thaliana*. Metoda ověřená na již známých a izolovaných mutantních liniích *A. thaliana* umožňuje rychlé zpracování vzorků, které jsou dostupné ve velmi malých množstvích. V kombinaci se statistickým zpracováním dat může být vhodnou metodou užitečnou při hledání nových genů ovlivňujících metabolismus auxinů, či dalších rostlinných hormonů.

Vyvíjené mikroextrakční metody mají několik společných všeobecných výhod, mezi které patří snižování použitých objemů vzorků, snížení množství rozpouštědel a možnost selektivně izolovat a zakoncentrovat malá množství analyzovaných látek. Při porovnání optimalizovaných metod vykazují více výhod především technika PALME a μ -PT-SPE, které oproti MEPS umožňují paralelní extrakci několika desítek vzorků najednou (96 – PALME, až 48 μ -PT-SPE, v závislosti na typu centrifugy) v rámci jedné až dvou hodin, a to v případě, že k úpravě vzorku je nutné přidat krok srážení, či ředění matrice. Obě metody lze použít pro izolaci analytů o různých fyzikálně-chemických vlastnostech v jedнокrokové úpravě vzorků. Metoda μ -SPE-PT není omezena pouze komerčně dostupnými sorbenty, ale je možné špičky připravit v laboratoři přesně pro zamýšlené použití. Nespornou výhodou PALME je odstranění fosfolipidů, které mohou být zodpovědné za vznik matricových efektů při použití hmotnostní detekce. Její největší

nevýhodou je prozatímní nedostupnost komerčně dodávaných akceptorových jamkových destiček, které musí být připraveny v laboratoři. Obě metody umožňují dosáhnout správných a přesných výsledků v rámci validačních požadavků EMA. μ -SPE-PT a PALME se jeví jako velmi slibné techniky, které by se mohly stát rutinními v analytických laboratořích a jejich používání by vedlo ke zvýšení prostupnosti vzorků laboratoroří.

6 LITERATURA

- [1] J. A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. Á. Bello-López, M. Ramos-Payán; *Anal. Chim. Acta* 905 (2016) 8 – 23.
- [2] L. Nováková, H. Vlčková; *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8 – 35.
- [3] H. Kataoka; *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 339 – 364.
- [4] L. Nováková; *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 25 – 37.
- [5] L. Ramos; *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84 – 98.
- [6] <https://socratic.org/questions/how-does-solid-phase-extraction-differ-from-solvent-extraction-online> 25. 12. 2016.
- [7] <https://adarshsmani02.files.wordpress.com/2015/02/centrifugation4.png> online 11. 1. 2017
- [8] <http://virusabc.weebly.com/uploads/3/4/6/6/3466109/6245135.jpg?599> online 11. 1. 2017
- [9] J. Oh, Y. Lee; *Phytochem. Anal.* 25 (2014) 314 – 330.
- [10] A. Saracevic, N. Nikolac, A.-M. Simundic; *Clin. Biochem.* 47 (2014) 309 – 314.
- [11] K. Jurowski, K. Kochan, J. Walczak, M. Barańska, W. Piekoszewski, B. Buszewski; *TrAc Trends Anal. Chem.* 86 (2017) 276 – 289.
- [12] R. Mihaila, S. Chang, A. T. Wei, Z. Y. Hu, D. Ruhela, T. R. Shadel, S. Duenwald, E. Payson, J. J. Cunnigham, N. Kuklin, D. J. Mathre; *Int. J. Pharm.* 420 (2011) 118 – 121.
- [13] H. Stahnke, S. Kittlasu, G. Kempe, L. Alder; *Anal. Chem.* 84 (2012) 1474 – 1482.
- [14] S. Esposito, E. Bracacel, M. Nibbio, R. Speziale, L. Orsatti, M. Veneziano, E. Monteagudo, F. Bonelli; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118 (2016) 70 – 80.
- [15] C. Bylda, R. Thiele, U. Kobold, D. A. Volmer; *Analyst* 139 (2014) 2265 – 2276.
- [16] L. Nováková; *LCGC Europe* 29 (2016) 9 – 15.
- [17] S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen; *TrAc Trends Anal. Chem.* 27 (2010) 934 – 941.
- [18] D. M. Pavlović, S. Babić, A. J. M. Horvat, M. Kaštelan-Macan; *TrAc Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 1062 – 1075.
- [19] M. Szultka, P. Pomastowski, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski; *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3094 – 3105.
- [20] J. Moreda-Piñeiro, A. Moreda-Piñeiro; *TrAc Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 265 – 274.

- [21] J. Plotska-Wasyłka, K. Owczarek, J. Namieśnik; *TrAc Trend Anal. Chem.* 85 (2016) 46 – 64.
- [22] N. Delaunay-Bertocini, M.-C. Hennion; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 717 – 736.
- [23] D. Stevenson; *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 39 – 4.
- [24] N. Delaunay, V. Pichon, M.-C. Hennion; *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 15 – 37.
- [25] A. Sarafraz-Yazdi, N. Razavi; *TrAc Trends Anal. Chem.* 73 (2015) 81 – 90.
- [26] E. Carasek, J. Merib; *Anal. Chim. Acta* 880 (2015) 8 – 25.
- [27] <http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2000/AN/b006211l/b006211l-f2.gif>, online 27. 12. 2016.
- [28] http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/21/d44bd917-0178-4a05-a467-2a64843a6ad9/i18.jpg, online 27. 12. 2016.
- [29] https://www.pall.com/images/Industrial-Manufacturing/PCCFR_graphic1.jpg, online 27. 12. 2016.
- [30] <http://www.chrom-china.com/fileup/HTML/PIC/sp1211021-1.jpg>, online 27. 12. 2016.
- [31] <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/analytical-chromatography/solid-phase-extraction/MIP-synthesis-interaction.gif>, online 27. 12. 2016.
- [32] <http://www.chrom-china.com/fileup/PIC/20131009172100.jpg>, online 27. 12. 2016.
- [33] <http://www.gerstel.com/images/PDMS-Twister.png>, online 27. 12. 2016.
- [34] <http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2013/AN/c2an36231g/c2an36231g-f1.gif>, online 27. 12. 2016.
- [35] <http://www.sisweb.com/art/sge/evolsyringe.jpg>, online 27. 12. 2016.
- [36] http://www.biotage.com/uploads/thumbnails/q0020-15v_800x800.jpg, online 27. 12. 2016.
- [37] J. Svačinová, O. Novák, L. Plačková, R. Lenobel, J. Holík, M. Strnad, K. Doležal; *Plant Methods* 8 (2012) 7 – 20.
- [38] http://dpxtechnologies.com/wp-content/uploads/2016/04/Hamilton_96tips-web.jpg, online 27. 12. 2016.

- [39] <http://www.chromacademy.com/lms/sco61/images/P2-figure-2.jpg>, online 27. 12. 2016.
- [40] <http://pubs.rsc.org/services/images/RSCpubs.ePlatform.Service.FreeContent.ImageService.svc/ImageService/Articleimage/2013/AY/c3ay40597d/c3ay40597d-f4.gif>, online 27. 12. 2016.
- [41] M. Saraji, M. K. Boroujeni; Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 2027 – 2066.
- [42] <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1386142514012943-fx1.jpg>, online 27. 12. 2016.
- [43] K. S. Ask, T. Bardakci, M. P. Parmer, A. Gjelstad; J. Pharm. Biomed. Anal. 10 (2016) 229 – 236.
- [44] http://kinesis-usa.com/media/catalog/product/cache/4/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/1/9/198-200M-096P_0.jpg, online 27. 12. 2016.
- [45] <https://cs.lbl.gov/assets/Images/News/2014/Edison-Stories/NASA-nanotubes.jpg>, online 27. 12. 2016.
- [46] https://www.extractz.com/Content/Images/uploaded/extractz_CO2_machine_diagram3.png, online 27. 12. 2016..
- [47] <http://www.cegat.de/web/wp-content/uploads/2016/04/dried-blood-spot-card-valid.png>, online 27. 12. 2016.
- [48] M. M. Moein, R. Said, F. Bassyouni, M. Abdel-Rehim; J. Anal. Methods Chem. 2014, Article ID 921350, 24 pages.
- [49] M. M. Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim; TrAc Trends Anal. Chem. 67 (2015) 34 – 44.
- [50] L. Yang, R. Said, M. Abdel-Rehim; J. Chromatogr. B. 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.044>, v tisku.
- [51] http://www.richrom.com/application/v2/public/upload/0/images_in_sidebar/103.jpg, online 28. 12. 2016.
- [52] http://dpxtechnologies.com/wp-content/uploads/2016/04/Hamilton_96tipsdye-web.jpg, online 28. 12. 2016.
- [53] D. C. Mozaner Bordin, M. N. R. Alves, E. G. De Campos, B. S. De Martinis; J. Sep. Sci. 39 (2016) 1168 – 1172.

- [54] S. J. Lehotay, K. Mastovska, A. R. Lightfield, A. Nuñez, T. Dutko, Ch. Ng, L. Bluhm; *J. Chromatog. A* 1313 (2013) 103 – 112.
- [55] A. R. Chaves, B. H. F. Moura, J. A. Caris, D. Rabelo, M. E. C. Queiroz; *J. Chromatogr. A* 1399 (2015) 1 – 7.
- [56] V. C. Fernandes, V. E. Domingues, N. Mateus, C. Delerue-Matos; *J. Chromatog. Sci.* 52 (2014) 1339 – 1345.
- [57] D. Vuckovic; *TrAc Trend Anal. Chem.* 45 (2013) 136 – 153.
- [58] L. Wang, M. Wang, H. Yan, Y. Yuan, J. Tian; *J. Chromatog. A* 1368 (2014) 37 – 43.
- [59] Ch. Hasegawa, T. Kumazawa, S. Uchigasaki, X. Lee, K. Sato, M. Terada, K. Kurosaki; *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2215 – 2223.
- [60] Ch. Hasegawa, T. Kumazawa, X. Lee, A. Marumo, N. Shinmen, H. Seno, K. Sato; *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 563 – 570.
- [61] M. Pena-Abaurrea, V. S. García de la Torre, L. Ramos; *J. Chromatogr. A* 1317 (2013) 223 – 229.
- [62] http://www.gerstel.com/images/GSW12_DPX_2Phases.png, online 28. 12. 2016.
- [63] <http://www.richrom.com/application/v2/public/upload/0/default/188.png>, online 28. 12. 2016.
- [64] L. Rello, A. C. Lapeña, M. Aramendía, M. A. Belarra, M. Resano; *Spectrochim. Acta Part B* 81 (2013) 11-19.
- [65] B. Rago, J. Liu, B. Tan, Ch. Holliman; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 1201 – 1207.
- [66] L. Mercolini, M. Protti, M. C. Catapano, J. Rudge, A. E. Sberna; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 123 (2016) 186 – 194.
- [67] N. Kostić, Y. Dotsikas, N. Jović, G. Stevanović, A. Malenović, M. Medenica; *J. Chromatogr. B.* 962 (2014) 102 – 108.
- [68] T. Uchikata, A. Matsubara, E. Fukusaki, T. Bamba; *J. Chromatogr. A.* 1250 (2012) 69 – 75.
- [69] Y. Enderle, K. Foerster, J. Burgenne; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 231 – 243.
- [70] Y. Xiang, M. Welch, L. Amaravadi, Ch. Stebbins; *J. Immunol. Methods* 393 (2013) 53 – 60.
- [71] C. Rosting, A. Gjelstad, T. G. Halvorsen; *Anal. Chem.* 87 (2015) 7918 – 7924.
- [72] V. Pilařová, M. Sultani, K. S. Ask, L. Nováková, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad; *J. Chromatogr. B* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ichromb.2016.09.019>, v tisku.

- [73] A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard; Lab. Journal 2015 - <http://www.laboratory-journal.com/printpdf/12972>, online 28. 12. 2016.
- [74] Ch. Huang, K. F. Seip, A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard; J. Pharm. Biomed. Anal. 113 (2015) 97 – 107.
- [75] A. Gjelstad, S. Pedersen-Bjergaard; Anal. Methods 5 (2013) 4549 – 4557.
- [76] L. E. E. Eibak, K. E. Rasmussen, E. L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad; Anal. Chim. Acta 828 (2014) 46 -52.
- [77] I. J. Ø. Kjelsen, A. Gjelstad, K. E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard; J. Chromatogr. A 1180 (2008) 1 - 9.
- [78] C. Meunier, D. Blondelle, P. Faure, J.-P. Baguet, C. Le Goff, O. Chabre, V. Ducros; Clin. Chim. Acta 447 (2015) 8 – 15.
- [79] J. Rositano, P. Harpas, Ch. Kostakis, T. Scott; Forensic Sci. Int. 265 (2016) 125 – 130.
- [80] R. E. Majors; LCGC Europe 25 (2012) 430 – 435.
- [81] A. L. Edel, M. Aliani, G. N. Pierce; J. Chromatogr. B 912 (2013) 24 – 32.
- [82] http://www.biotage.com/uploads/thumbnails/isolute-sle-400-plate_800x800.jpg, online 28. 12. 2016.
- [83] <http://www.sopachem.com/diagnostics/portfolio/isolute-sle-supported-liquid-extraction/>, online 28. 12. 2016.
- [84] Z. Aladaghlo, A. Fakhari, M. Behbahani; J. Chromatogr. A 1462 (2016) 27 – 34.
- [85] M. L. Schmidt, N. H. Snow; TrAc Trends Anal. Chem. 75 (2016) 49 – 56.
- [86] P. Mu, N. Xu, T. Chai, Q. Jia, Z. Yin, S. Yang, Y. Quian, J. Qiu; J. Chromatogr. B 1023-1024 (2016) 17 – 23.
- [87] M. Á. González-Curbelo, B. Socas-Rodríguez, A. V. Herrera-Herrera, J. González-Sálamo, J. Hernández-Borges, M. Á. Rodríguez-Delgado; TrAc Trend Anal. Chem. 71 (2015) 169 – 185.
- [88] T. Rejczak, T. Tuzimski; Open Chem. 13 (2015) 980 – 1010.
- [89] J. Kowalski, S. Lupo, J. Cochran; Food Safety Applications – <http://www.restek.com/pdfs/FFAN1796A-UNV.pdf>, online 28. 12. 2016.
- [90] J. Kowalski, J. Cochran; Sep. Science 4 (2012).
- [91] L. Nováková, M. Douša. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. Europrint a.s., 1. vydání, 2013, str. 19 - 25. ISBN 978-80-260-4244-0

- [92] L. Nováková, A. Grand-Guillaume Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Lesellier, D. Guillaume; *Anal. Chim. Acta.* 824 (2014) 18 – 35.
- [93] http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/Theory/th_vandm.html, online 29. 12. 2016.
- [94] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillaume; *J. Chromatogr. A* 1266 (2012) 158 – 167.
- [95] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillaume; *TrAc Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 44 – 54.
- [96] A. Tarafder; *TrAc Trends Anal. Chem.* 81 (2016) 3 – 10.
- [97] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang; *J. Chromatogr. A* 1357 (2014) 36 – 52.
- [98] V. González-Ruiz, A. I. Olives, M. A. Martín; *TrAc Trends Anal. Chem.* 64 (2015) 17 – 28.
- [99] J. J. DeStefano, S. A. Schuster, J. M. Lawhorn, J. J. Kirkland; *J. Chromatogr. A* 1258 (2012) 76 – 83.
- [100] T. H. Walter, R. W. Andrews; *TrAc Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 14 – 20.
- [101] M. W. Dong, K. Zhang; *TrAc Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 21 – 30.
- [102] S. Fekete, J. Schappler, J.-L. Veuthey, D. Guillaume; *TrAc Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 2 – 13.
- [103] K. Broeckhoven, G. Desmet; *TrAc Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 65 – 75.
- [104] V. Desfontaine, D. Guillaume, E. Francotte, L. Nováková; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 56 – 71.
- [105] K. Kalíková, T. Šlechtová, J. Vozka, E. Tesařová; *Anal. Chim. Acta.* 821 (2014) 1 – 33.
- [106] M. Saito; *J. Biosci. Bioeng.* 115 (2013) 590 – 599.
- [107] G. Guiochon, A. Tarafder; *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1037 – 1114.
- [108] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/13/Carbon_dioxide_pressure-temperature_phase_diagram.svg/2000px-Carbon_dioxide_pressure-temperature_phase_diagram.svg.png, online 29. 12. 2016.
- [109] E. Lesellier, C. West; *J. Chromatogr. A* 1382 (2015) 2 – 46.
- [110] L. T. Taylor; *J. Supercrit. Fluids* 47 (2009) 566 – 573.
- [111] T. A. Berger; *J. Chromatogr. A* 1421 (2015) 171 – 183.
- [112] K. Takahashi, S. Kinugasa, M. Senda, K. Kimizuka, K. Fukushima, T. Matsumoto, Y. Shibata, J. Christensen; *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 151 – 155.

- [113] X. Bu, E. L. Regalado, J. Cuff, W. Schafer, X. Gong; *J. Supercrit. Fluids* 116 (2016) 20 – 25.
- [114] L. Kott; *Am. Pharm. Review* 16 (2013) 26.
- [115] C. G. A. da Silva, C. H. Collins; *Quim. Nova* 37 (2014) 1047 – 1057.
- [116] C. West, E. Lesellier; *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 152 – 162.
- [117] V. Pilařová, T. Gottvald, P. Svoboda, O. Novák, K. Benešová, S. Běláková, L. Nováková; *Anal. Chim. Acta* 934 (2016) 252 – 265.
- [118] V. Abrahamsson, M. Sandhal; *J. Chromatogr. A* 1306 (2013) 80 – 88.
- [119] J. N. Fairchild, P. C. Iraneta, J. F. Hill; *LCGC North America* 31 (2013) 326 – 333.
- [120] J. M. Płotka, M. Biziuk, C. Morrison, J. Namieśnik; *TrAc Trends Anal. Chem.* 56 (2014) 74 – 89.
- [121] Ch. Radcliffe, K. Maguire, B. Lockwood; *J. Biochem. Biophys. Methods* 43 (2000) 261 – 272.
- [122] M. K. Parr, B. Wuest, E. Naegele, J. F. Joseph, M. Wenzel, A. H. Schmidt, M. Stanic, X. de la Torre, F. Botré; *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 6789 – 6797.
- [123] L. Nováková, V. Desfontaine, F. Ponzetto, R. Nicoli, M. Saugy, J.-L. Veuthey, D. Guillarme; *Anal. Chim. Acta* 915 (2016) 102 – 110.
- [124] E. Lesellier, D. mith, I. Dubrulle; *J. Chromatogr. A* 1423 (2015) 158 – 168.
- [125] A. Salvador. A: Chisvert; *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 1 – 14.
- [126] J. L. Bernal, M. T. Martín, L. Toribio; *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 24 – 36.
- [127] Ch. Turner, J. W. King, L. Mathiasson; *J. Chromatogr. A* 963 (2001) 215 – 237.
- [128] P. Jandera; *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 37 -53.
- [129] G. Guiochon; *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 101 – 168.
- [130] H. Oberacher, Ch. G. Huber; *TrAc Trend Anal. Chem.* 21 (2002) 166 – 174.
- [131] K. Zhang, X. Liu; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128 (2016) 73 – 88.
- [132] L. Zhang, Q. Dai, X. Qao, Ch. Yu, X. Qin, H. Yan; *TrAc Trends Anal. Chem.* 82 (2016) 143 – 163.
- [133] L. Nováková, M. Douša. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Europrint a.s., 1. vydání, 2013, str. 165 – 169. ISBN 978-80-260-4244-0
- [134] *Handbook of Advanced Chromatography /Mass Spectrometry Techniques*; editoři: M. Holčapek, B. W. Craig; Elsevier, datum publikace 04/2017. Kapitola: Ultra-high

- performace supercritical fluid chromatography-mass spektrometry (L. Nováková, K. Plachká, P. Jakubec).
- [135] P. Jandera; *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 1 -25.
- [136] *Handbook of Advanced Chromatography /Mass Spectrometry Techniques*; editoři: M. Holčápek, B. W. Craig; Elsevier, datum publikace 04/2017. Kapitola: Ultra-high performace supercritical fluid chromatography-mass spektrometry (L. Nováková, K. Plachká, P. Jakubec).
- [137] *UHPLC in Life Sciences*, editoři: D. Guillarme, J.-L. Veuthey. RSC Publishing, ISBN – 978-1-84973-388-5. Kap. 9 (237 – 277).
- [138] *Handbook of Advanced Chromatography /Mass Spectrometry Techniques*; editoři: M. Holčápek, B. W. Craig; Elsevier, datum publikace 04/2017. Kapitola: Ultra-high performace supercritical fluid chromatography-mass spektrometry (L. Nováková, K. Plachká, P. Jakubec).
- [139] A. Grand-Guillarme Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillarme; *J. Chromatogr. A* 1339 (2014) 174 – 184.
- [140] L. Nováková, A. Grand-Guillarme Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J.-L. Veuthey, D. Guillarme; *Anal. Chim. Acta* 853 (2015) 637 – 646.
- [141] O. González, M. E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolomé, M. I. Maguregui, R. M. Alonso; *J. Chromatogr. A* 1353 (204) 10 – 27.
- [142] M. M. Moein, A. E. Beqqali, M. Abdel-Rehim; *J. Chromatog. B.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ichromb.2016.09.028>, v tisku.
- [143] L. Nováková, M. Douša. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Europrint a.s., 1. vydání, 2013, str. 141 – 161. ISBN 978-80-260-4244-0
- [144] European Medicines Agency, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, Guideline on bioanalytical method validation, 2011.
- [145] B. K. Matuszewski, M.K. Constanzer, C.M. Chavez-Eng; *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019 – 3030.
- [146] D. E. Mulvana; *Bioanalysis* 2 (2010) 1051 – 1072.
- [147] B.K. Matuszewski; *J. Chromatogr. B* 830 (2006) 293 – 300
- [148] A. Van Eekhaut, K. Lanckmans, S. Sarre, I. Smolders, Y. Michotte; *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2198 – 2207.

- [149] P. Panuwet, R. E. Hunter jr., P. E. D'Souza, X. Chen, S. A. Radford, J. R. Cohen, M. E. Marder, K. Kartavenka, P. B. Ryan, D. B. Barr; *Crit. Rev. Anal. Chem.* 45 (2016) 93 – 105.
- [150] www.chemicalize.org; online 23. 05. 2016.
- [151] L. Nováková, D. Šatínský, P. Solich, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 352.
- [152] Hing-Biu Lee, T. E. Peart, M. Lewina Svoboda, S. Backus, *Chemosphere* 77 (2009) 1285.
- [153] H. Lüllman, K. Mohr, L. Hein, *Barevný atlas farmakologie*, 3. české vydání, Grada, 2007.
- [154] H. Vlčková, P. Svoboda, O. Novák, P. Solich, L. Nováková; *Bioanalysis* 8 (2016) 333 – 349.
- [155] H. Vlčková, M. Rabatinová, A. Mikšová, G. Kolouchová, S. Mičuda; *Talanta* 90 (2012) 22–29.
- [156] L. Cialdella-Kam, D. C. Nieman, W. Sha, M. P. Meaney, A. M. Knab, R. A. Shanely; *Br. J. Nutr.* 109 (2011) 1 – 9.
- [157] E.U. Graefe, H. Derendorf, M. Veit; *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 37 (1999) 219 - 233.
- [158] J. K. Prasain, Ch. Wang, S. Barnes; *J. Free Rad. Biomed.* 37 (2004) 1324 – 1350.
- [159] P. Ader, A. Wessmann, S. Wolffram; *Free Radical Bio. Med.* 28 (2000) 1056 – 1067.
- [160] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P.E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, A. Crozier; *Antioxid. Redox. Signal.* 18 (2013) 1818 – 1892.
- [161] G. D'Andrea; *Fitoterapia* 106 (2015) 256 – 271.
- [162] I. Najmanová, J. Pourová, M. Vopršálová, V. Pilařová, V. Semecký, L. Nováková, P. Mladěnka; *Mol. Nutr. Food Res.* 60 (2016) 981 – 991.
- [163] A. Gupta, K. Bihman, I. Raheja, S. K. Sharma, H. K. Kar. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 6 (2016) 248 – 252.
- [164] W. Wang, C. Sun, L. Mao, P. Ma, F. Liu, J. Yang, Y. Gao; *Trends Food. Sci. Tech.* 56 (2016) 21 – 38.
- [165] F. Dajas; *J. Ethnopharmacol.* 143 (2012) 383 – 396.
- [166] S. F. Nabavi, G. L. Russo, M. Daglia, S. M. Nabavi; *Food. Chem.* 179 (2015) 305 – 310.
- [167] J.V. Formica, W. Regelson; *Fd Chem. Toxic* 33 (1995) 1061-1080.
- [168] M. Russo, C. Spagnuolo, I. Tedesco, S. Bilotto, G.L. Russo; *Biochem. Pharmacol.* 83 (2012) 6 – 15.
- [169] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P.E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, A. Crozier; *Redox Signal.* 18 (2013) 1818 – 1892

- [170] C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Rémésy; *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 230 – 242.
- [171] A. Serra, A. Macià, M. Romero, J. Reguant, N. Ortega, M. Motilva; *Food Chem.* 130 (2012) 383 – 393.
- [172] W. Mullen, J. Rouanet, C. Auger, P. Teissèdre, S. T. Caldwell, R. C. Hartley, M. E. J. Lean, C. A. Edwards, A. Crozier; *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 12127 – 12137.
- [173] Nickerson K.W. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 3805-3813.
- [174] Chen H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101 (2004) 5048-5052.
- [175] Hornby J.M. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 2982–2992.
- [176] Rappsilber J. et al. *Nature Protocols* 2 (2007) 1896 – 1906.
- [177] P. Greguš, H. Vlčková, V. Buchta, J. Kestřanek, L. Křivčíková, L. Nováková; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 674 – 681.
- [178] K. Ljung; *Development* 140 (2013) 943 – 950.
- [179] G. Berná, P. RObles, J. L. Micol; *Genetics* 152 (1999) 729 – 742.

7 PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ A KONFERENČNÍCH PŘÍSPĚVKŮ

7.1 Seznam publikovaných vědeckých prací souvisejících s dizertací

One-step extraction of polar drugs from plasma by Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction.

V. Pilařová, M. Sultani, K. S. Ask, L. Nováková, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad.

Journal of Chromatography B (2016),

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ichromb.2016.09.019>, v tisku (citováno: 0x; IF₂₀₁₅ – 2,687)

Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum.

V. Pilařová, T. Gottvald, P. Svoboda, O. Novák, K. Benešová, S. Běláková, L. Nováková.

Analytica Chimica Acta 934 (2016) 252 – 265 (citováno: 0x; IF₂₀₁₅ – 4,712)

Intravenous rutin in rat exacerbates isoprenaline-induced cardiotoxicity likely due to intracellular oxidative stress.

T. Filipický, M. Říha, P. Hašková, V. Pilařová, L. Nováková, V. Semecký, J. Vávrová, M.

Holečková, V. Palicka, T. Šimůnek, R. Hrdina, P. Mladěnka.

Redox Report 21 (2016) 1 - 13 (citováno: 0x; IF₂₀₁₅ – 2,606)

Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats.

I. Najmanová, J. Pourová, M. Vopršalová, V. Pilařová, V. Semecký, L. Nováková, P. Mladěnka.

Molecular Nutrition and Food Research, 60 (2016) 981 – 991 (citováno: 2x; IF₂₀₁₅ – 4,551)

Oral administration of quercetin is unable to protect against isoproterenol cardiotoxicity.

M. Říha, M. Vopršalová, V. Pilařová, V. Semecký, M. Holečková, J. Vávrová, V. Palička, T.

Filipický, R. Hrdina, L. Nováková, P. Mladěnka.

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 387 (2014) 823 (citováno: 1x; IF₂₀₁₄ – 2,471)

7.2 Seznam plakátových sdělení a přednášek

7.2.1 Plakátová sdělení

Development and optimization of UHPSFC-MS for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum.

V. Pilařová, T. Gottvald, P. Svoboda, O. Novák, L. Nováková.

SFC 2016 10th International Conference on Packed Column SFC, Vídeň, Rakousko, 5. – 7. 10. 2016. *Plakát oceněn cenou za nejlepší plakátové sdělení.*

Development of μ PT-SPE sample preparation step for UHPLC-MS/MS analysis of *Candida albicans* quorum-sensing molecules.

V. Pilařová, M. Protti, V. Buchta, P. Solich, L. Nováková.

44th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2016), San Francisco, CA, USA, 19. – 24. 6. 2016.

Development and optimization of UHPSFC-MS method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum.

V. Pilařová, T. Gottvald, P. Svoboda, O. Novák, L. Nováková.

Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2016, Olomouc, ČR, 6. – 9. 6. 2016. *Plakát oceněn cenou za nejlepší plakátové sdělení.*

Development of UHPSFC-PDA and UHPSFC-MS methods for the determination of tocopherols and tocotrienols isomeric forms.

V. Pilařová, T. Gottvald, P. Jakubec, O. Novák, P. Solich, L. Nováková.

42nd International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2015), Ženeva, Švýcarsko, 21. – 25. 6. 2015.

Development of UHPSFC-PDA method for the determination of tocopherols and tocotrienols.

V Pilařová, T. Gottvald, P. Jakubec, K. Benešová, S. Běláková, L. Nováková.

Food Analysis Congress, Barcelona, Španělsko, 29. – 30. 10. 2014.

Ultrarapid auxin metabolite profiling for high-throughput Arabidopsis mutant screening.

O. Novák, A. Pěnčík, V. Pilařová, R. Casanova Saez, K. Ljung.

20th International Mass Spectrometry Conference 2014, Ženeva, Švýcarsko, 24. – 29. 8. 2014.

Determination of Quercetin and its metabolites in rat plasma by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

V. Pilařová, J. Mišík, I. Najmanová, P. Solich, P. Mladěnka, L. Nováková.

20th International Mass Spectrometry Conference 2014, Ženeva, Švýcarsko, 24. – 29. 8. 2014.

7.2.2 Přednášky

Parallel artificial liquid membrane extraction – a new approach for selective sample preparation.

V. Pilařová, K.S. Ask, A. Gjelstad, L. Nováková, S. Pedersen-Bjergaard.

6th postgradual and 4th postdoc science conference, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, ČR, 9. 2. 2016.

Determination of tocopherols and tocotrienols by means of UHPSFC-PDA and UHPSFC-MS.

L. Nováková, V. Pilařová, T. Gottvald, P. Jakubec, O. Novák, P. Solich

Waters UPC² Users Meeting 2015, Philadelphia, PA, USA, 22. -24. 6. 2015.

Rapid auxin metabolite profiling for high-throughput Arabidopsis screening.

V. Pilařová, O. Novák, A. Pěňčík, R. Casanova-Saez, K. Ljung, L. Nováková, P. Solich.
5th postgradual and 3rd postdoc science conference, Charles University in Prague, Faculty
of Pharmacy in Hradec Králové, 4. 2. 2015

**Development of UHPSFC-PDA method for determination of tocopherols and
tocotrienols.**

T. Gottvald, V. Pilařová, P. Jakubec, K. Benešová, K. Běláková, L. Nováková, P. Solich.
5th postgradual and 3rd postdoc science conference, Charles University in Prague, Faculty
of Pharmacy in Hradec Králové, 4. 2. 2015

7.3 Řešené granty a projekty (hlavní řešitel)

Nové mikroextrakční techniky pro rychlou úpravu vzorků.

**New important microextraction techniques for rapid sampling and sample
preparation.** Norské fondy a granty EEA, projekt No. NF-CZ07-INS-4-046-2014

Využití SFC-MS pro analýzu biologického materiálu s důrazem na matricové efekty.

SFC-MS technique for analysis of biological material with emphasis on matrix effects.

Grantová agentura Univerzity Karlovy, projekt GA UK No.1948214

8 Přílohy

8.1 Příloha 1

Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum.

V. Pilařová, T. Gottvald, P. Svoboda, O. Novák, K. Benešová, S. Běláková, L. Nováková.

Analytica Chimica Acta 934 (2016) 252 – 265 (citováno: 0x; IF₂₀₁₅ – 4,712)



Development and optimization of ultra-high performance supercritical fluid chromatography mass spectrometry method for high-throughput determination of tocopherols and tocotrienols in human serum



Veronika Pilařová^a, Tomáš Gottvald^a, Pavel Svoboda^a, Ondřej Novák^b, Karolína Benešová^c, Sylvie Běláková^c, Lucie Nováková^{a,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 120B, 500 05, Hradec Králové, Czech Republic

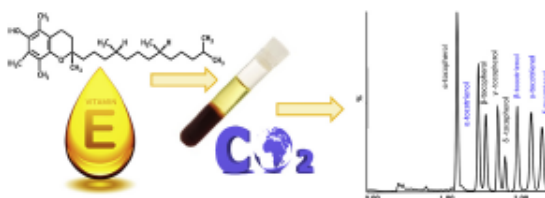
^b Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Hradec for Biotechnological and Agricultural Research, Institute of Experimental Botany CAS 4 Faculty of Science of Palacký University, Štefánikův 27, 783 71, Olomouc, Czech Republic

^c Research Institute of Brewing and Malting, Mlátkářský ústav Brno, Mlýnská 7, 614 00, Brno, Czech Republic

HIGHLIGHTS

- Two fast, selective and sensitive UHPLC-MS methods were developed and validated.
- Eight isomeric forms of vitamin E were fully separated in less than 4.5 min.
- The influence of individual SFC parameters was evaluated in detail.
- High-throughput LLE was used for sample preparation with sufficient selectivity and sensitivity.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2016

Received in revised form

2 June 2016

Accepted 4 June 2016

Available online 9 June 2016

Keywords:

Ultra-high performance supercritical fluid chromatography

Mass spectrometry

Liquid-liquid extraction

Tocopherols

Tocotrienols

Human serum

ABSTRACT

The goal of this study was to develop an effective supercritical fluid chromatography method using single quadrupole MS for analysis of all isomeric forms of vitamin E. Finally, two fast and effective methods, the high resolution one and the high speed one, for the determination of 8 vitamin E isomers in human serum were developed.

Rapid high-throughput liquid-liquid extraction was selected as a sample preparation step. Sample pretreatment of 100 μ l human serum was consisted of protein precipitation with 200 μ l ethanol and liquid-liquid extraction by 400 μ l hexane/dichloromethane (80/20, v/v). The separation was performed on BEH 2-EP (3.0 \times 100 mm, 1.7 μ m) stationary phase, using isocratic elution with carbon dioxide and 10 mM ammonium formate in methanol in the ratio 98:2 for high resolution method with run time 4.5 min and in the ratio 95:5 for high speed method, where the run time was 2.5 min. The method development included optimization of key parameters: the choice of the suitable stationary phase and the composition of mobile phase, where an influence of various modifiers, their ratio and additives were tested, and optimization of fine tuning parameters including BPR pressure, flow-rate and column temperature. Quantification of all isomeric forms was performed using SIM (single ion monitoring) experiments in ESI positive ion mode. Both high speed and high resolution chromatographic methods were validated in terms of precision, accuracy, range, linearity, LOD, LOQ and matrix effects using the same LLE procedure. The high resolution method provided more sensitive results (LOD: 0.017

* Corresponding author.

E-mail address: nl@emil.cz (L. Nováková).

$-0.083 \mu\text{g mL}^{-1}$) and better linearity ($r^2 > 0.9930$) than the high speed one (LOD: $0.083-0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$, $r^2 > 0.9877$) at the cost of double time of analysis.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Vitamin E belongs among fat-soluble vitamins associated with important biological activity that is essential for human health. Vitamin E exists in eight different stereoisomeric forms: α -; β -; γ - and δ -tocopherols and α -; β -; γ - and δ -tocotrienols. All tocopherols are amphiphilic molecules characterized by the same chemical structure based on a 2-methyl-6-chromanol ring and a lipophilic saturated isoprenoid C_{16} side chain (tocopherols) or a farnesyl side chain (tocotrienols). Derivatives of both tocotrienols and tocopherols differ in the methylation of the chromanol ring (Fig. 1) [1–3]. Vitamin E is considered as one of the most powerful antioxidants. The most biologically active homologue is α -tocopherol with phenolic group on chromanol ring donating a hydrogen atom to reduce free radicals activity. Lipophilic side chain allows penetration of vitamin E into biological membranes and protects them from oxidation caused by free radicals [4]. Tocopherols are hypothesized to induce apoptosis of various tumour cells (skin, lung, prostate, pancreas, breast). They also exhibit cardioprotective, immunomodulatory, neuroprotective activity and blood cholesterol lowering effect [5–8]. Vegetable oils, nuts, whole grains and green leafy vegetables represent the important plant sources of vitamin E. The vitamin E level in animal tissues and products is not so significant in comparison with plant tissues containing tocopherols [9–12]. After the oral administration vitamin E is absorbed in the gastrointestinal tract and transported by plasma lipoproteins to other tissues. Distribution and concentration of vitamin E in body compartments are influenced by lipids in various tissues. Plasma level of vitamin E is regulated by specific proteins binding tocopherols and tocotrienols in cell membranes. In general, the major amount (up to 90%) of vitamin E is redistributed in adipose tissues in normal subjects [13,14]. A physiological range of vitamin E in human plasma belongs typically to confidence interval $4-12 \mu\text{g mL}^{-1}$. Lower levels of tocopherols are commonly associated with malabsorption syndromes, including biliary atresia, cystic fibrosis, abetalipoproteinemia; and with preterm born neonates [15]. The human deficiency syndrome of vitamin E is manifested as a peripheral neuropathy caused by dying back of sensory

axons, which signalizes the sensitivity of the central nervous system to oxidative stress. The vitamin E intake is an essential dietary factor for reproductive health [16,17]. Unlike other fat-soluble vitamins, vitamin E is not accumulated in the liver or extrahepatic tissues with a high intake. Only the increase of bleeding tendency was observed as its toxic effect. In fact, this effect was found to be advantageous as a prevention of venous thrombosis [17,18].

Tocopherols and tocotrienols were mostly analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) in various matrices as shown in Table 1.

These separations were performed on both reversed (C18, PFP) and normal (silica) stationary phases using isocratic elution and UV or fluorescent detection. Because of very similar structures and physico-chemical properties, the separation of eight vitamin E forms is very challenging, especially the separation of critical pairs of β - and γ -isomeric forms. Therefore, the most of the previously developed methods for vitamin E analysis enable the determination of only a few isomers of tocopherols and tocotrienols, most commonly α -tocotrienol, α - and γ -tocopherol [19]. As it is shown in Table 1, only few methods (NP-HPLC, RP-HPLC, and also supercritical fluid chromatography - SFC) have been developed for the simultaneous determination of all isomeric forms of tocopherol and tocotrienol [23,25–28,32]. Despite this fact, the determination often took typically tens of minutes (20–60). Even the fastest developed LC method using PFP column took 15 min, so the analysis time was quite long for routine high throughput applications. Modern SFC methods with packed column took less than 10 min, but only one of these methods allowed to determine all isomeric forms of vitamin E [23] without application on any real matrix, such as biological or food samples to show the potential when the real samples are analysed. Sample pretreatment step of complex samples (oils, food, serum, blood or tissues) typically involves liquid-liquid extraction (LLE), LLE based techniques, protein precipitation (PP), solid phase extraction (SPE) followed by evaporation to dryness and reconstitution in solvents compatible with the mobile phase, which is the main disadvantage of the approaches combined with RP-HPLC. Only one method developed in 1999 where supercritical fluid extraction (SFE) coupled with capillary SFC were used

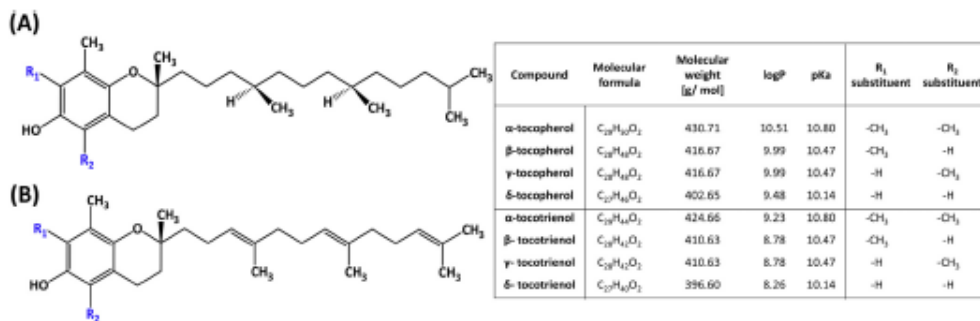


Fig. 1. Chemical structures of tocopherols (A) and tocotrienols (B) and physico-chemical properties of their isomeric forms [45].

Table 1
Methods for determination of tocopherols and tocotrienols in various matrices.

Analyte	Sample	Sample pretreatment	Separation technique	Analytical column	Mobile phase flow rate [mL min ⁻¹]	Analysis time [min]	Detection	Sensitivity [LOQ]	Year of publication ref.
α -T, β -T, γ -T, δ -T	Standard solution	SFE	Capillary SFC	Packed capillary with silica particles coated by polyethylene glycol (250 × 5 mm)	CO ₂ NA	30	RD	NA	1999 [20]
α -T, β -T, γ -T, δ -T, D ₈ , triacylglycerols	Pulp oil, cibus-beary oil	—	Capillary SFC	SB-Octyl-50 (10 m × 0.5 mm) SB-Cyanopropyl-25 (10 m × 0.5 mm)	CO ₂ 0.37	55	RD, MS	NA	1995 [21]
α -T, γ -T, δ -T, sterols	Soybean oil	Extraction by heating	Capillary SFC	SP-Octyl-50 (10 m × 0.5 mm)	CO ₂ NA	35	RD	NA	1997 [22]
α -T acetate, α -T, β -T, γ -T, δ -T, α -T ₈ , β -T ₈ , γ -T ₈ , δ -T ₈	Soybean oil	dilution	SFC	Amine Luna NH ₂ (150 × 2.0 mm, 3 μ m)	CO ₂ :EtOH + 0.1% FA 1.5	5	MSMS	50 pmol	2016 [23]
α -T, β -T, γ -T, δ -T, α -T ₈ , β -T ₈ , γ -T ₈ , δ -T ₈	Standard solution	—	SFC	Acquity UPLC ² BEH (100 × 3.0 mm, 1.7 μ m)	CO ₂ :MeOH (99.5:0.5) 2.5	5.5	MS-APCI	10.6 mg L ⁻¹	2015 [24]
Retinol, retinyl acetate, α -T acetate, α -T, γ -T, δ -T	Olive, sunflower, soybean oil	LIE evaporation	RP-HPLC	Lichrosorb RP-18 (150 × 4.0 mm, 10 μ m)	Hexadecyltrimethylammonium bromide:n-propanol NA	15	UV (290–330 nm)	0.12–0.28 mg L ⁻¹	2011 [25]
α -T, β -T, γ -T, δ -T, α -T ₈ , β -T ₈ , γ -T ₈ , δ -T ₈	Vegetable oils, seeds, eggs, flours	Saponification LIE evaporation	NP-HPLC	Lichrosorb Si60 (250 × 4.0 mm, 5 μ m)	Hexane:isopropanol:acetic acid (98.9:0.6:0.5) 1	25	FLD	105–335 ngm L ⁻¹	2011 [26]
α -T, β -T, γ -T, δ -T, α -T ₈ , β -T ₈ , γ -T ₈ , δ -T ₈	Human plasma, liver tissue	Saponification LIE evaporation	RP-HPLC	Phenomex Kinetex PPP (150 × 4.6 mm, 2.6 μ m)	MeOH:H ₂ O (85:15) 0.8	15	FLD	92–519 pg	2012 [27]
α -T, β -T, γ -T, δ -T, α -T ₈ , β -T ₈ , γ -T ₈ , δ -T ₈	Vegetable sample	Saponification LIE evaporation	RP-HPLC	Kinetex PPP (150 × 3 mm, 2.6 μ m); Develsil RP Aqueous 30 (150 × 3 mm, 3 μ m)	MeOH:H ₂ O: Methylbutylether 0.3; 0.5	45; 63	FLD	NA	2015 [28]
α -T, β -T, γ -T, δ -T, α -T ₈ , β -T ₈ , γ -T ₈ , δ -T ₈	Fruit, vegetable	PLE DILME evaporation	RP-HPLC	Ascentis Express F5 (150 × 4.6 mm, 5 μ m)	MeOH:H ₂ O (85:15) 1	17	FLC MS-APCI [M – H]	1.5 ng mL ⁻¹	2014 [29]
α -T, β -T, γ -T, δ -T, α -T ₈ , β -T ₈ , γ -T ₈ , δ -T ₈	Cereals	Saponification DILME	RP-HPLC	Cosmosil n-NAP (250 × 4.6 mm, 5 μ m)	H ₂ O: MeOH:ACN (13.80:7) 1	30	FLD	0.05–0.30 μ g mL ⁻¹	2013 [30]
α -T, γ -T, δ -T, retinol acetate	Infant milk-based formulae	LIE	NP-HPLC	Pinnacle II silica (50 × 21 mm, 3 μ m)	0.5% ethyl acetate:hexane 0.4	25	DAD	1.8–73.7 μ g mL ⁻¹	2006 [31]
α -T, β -T, γ -T, δ -T, α -T ₈ , β -T ₈ , γ -T ₈ , δ -T ₈ , γ -oryzanol	Rice	LIE	NP-HPLC	Inertsil CN-3, SIL-100A (250 × 4.6 mm, 5 μ m)	Hexane:isopropanol: ethyl acetate: acetic acid (97.6:0.8:0.8:0.8) 0.7–1.5	25	FLD	0.05–0.5 μ g mL ⁻¹	2011 [32]

254

V. Riković et al. / Analytica Chimica Acta 934 (2016) 253–265

α -T, γ -T, retinol	Human plasma	LLE evaporation	RP-HPLC	Waters Symmetry C18 (75 × 4.6 mm, 3.5 μ m)	MeOH 1:8	4	UV, RID	0.03–0.32 mg L ⁻¹	2014 [31]
α -T, α -T ₆	Human plasma	PP LLE evaporation	NP-HPLC	EC Nucleosil (250 × 4.6 mm, 5 μ m)	Hexane-isopropanol 1	45	UV	83 pmol mL ⁻¹	2003 [34]
α -T, α -T acetate, β -T, retinol, cholecalciferol, phytylquinone, menaquinone, menadiolone, xanthophyll	Human blood serum	SPE evaporation	RP-HPLC	Phenomenex Luna C18 (150 × 4.6 mm, 3 μ m)	ACN:MeOH 1:3	20	UV	0.1–1 ng mL ⁻¹	2004 [35]

for the vitamin E analysis did not need the reconstitution of the sample in different solvent [20].

SFC has been known for more than 50 years. However, it was over shadowed by gas chromatography (GC) and rapidly evolving LC. Recently, SFC made a remarkable comeback. The supercritical fluids exhibit similar properties as the mobile phase used in LC (density and solvating power) and GC (high diffusivity and low viscosity) [36–38]. In modern SFC, mobile phase contains not only CO₂, but also small amount (2–40%) of organic polar modifier (methanol, ethanol, isopropanol, or rarely acetonitrile (ACN)) and additives (volatile organic acids and buffers, possibly water) which affect the polarity, solvating power and eluting power of nonpolar CO₂. Through this modification, SFC can be successfully used for the analysis of molecules with broad spectrum of polarity [39]. Technological advances allow use of the latest trends in the field of stationary-phase technologies such as fully porous sub-2- μ m and sub-3- μ m core-shell particles and high linear velocity in modern analytical SFC systems [40,41]. This approach, similarly to ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC), is known as ultra-high performance supercritical fluid chromatography (UHPSFC). Because of higher sensitivity and selectivity of mass spectrometry (MS), the hyphenation of UHPSFC with MS becomes more popular method. Nowadays, even the cheap single quadrupole instruments become more user-friendly and sensitive which allows to use them as powerful detectors in routine analysis in clinical laboratories. UHPSFC coupled to MS promises not only higher sensitivity in comparison with UV detection but also alternative selectivity to LC-UV and reliability of analysis in complex biological matrices.

The hyphenation of SFC-MS can be made via the pre-BPR flow-splitting with addition of make-up solvent to improve the forming of ions, peak shape and detector response. Proton-donating organic modifiers such as methanol, ethanol, isopropanol and volatile additives (formic acid, acetic acid, ammonium formate, ammonium acetate, water, ammonium hydroxide, etc.) were used as a make-up solvent [42–44].

Due to the low polarity of pure CO₂, similar to hexane or heptane used in NP-HPLC, SFC is suitable for the analysis of non-polar compounds with physico-chemical properties close to pure CO₂. Thus, the high log P of vitamin E is a prerequisite for the use of SFC technique for the analysis of vitamin E isomeric forms. Considering other numerous advantages, such as high separation efficiency, sensitivity, low consumption of organic solvents and good selectivity for separation of the isomers SFC seems to be an appropriate technique for the separation and determination of tocopherols and tocotrienols and application of the method in clinical practice.

The aim of this study was to develop fast, selective and sensitive UHPSFC-MS method for high-throughput analysis of all 8 vitamin E isomeric forms and effective sample preparation step based on LLE for the isolation of vitamin E from human serum.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Pressurized liquid CO₂ 4.5 grade (99.995%) was purchased from Messer (Prague, Czech Republic). Methanol (MeOH), isopropanol (IpOH), ethanol (EtOH), formic acid, acetic acid and ammonium hydroxide (25%) all of them LC/MS grade and hexane and dichloromethane for HPLC were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ammonium formate (99%) and ammonium acetate (99.83%) for LC/MS were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ultrapure water was prepared by Milli-Q reverse osmosis system (Millipore, Bedford, MA, USA) immediately prior to use.

Reference standards of α -tocopherol (α T; 100 mg mL⁻¹, purity 99.9%), β -tocopherol (β T; 50 mg mL⁻¹, purity 99.0%), γ -tocopherol (γ T; 1 mg mL⁻¹, purity 97.3%) and δ -tocopherol (δ T; 100 mg mL⁻¹, purity 95.5%) in hexane were provided by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Reference standards of α -tocotrienol (α T₃; 25 mg mL⁻¹, purity 98%), β -tocotrienol (β T₃; 25 mg mL⁻¹, purity 98%), γ -tocotrienol (γ T₃; 25 mg mL⁻¹, purity 98%), and δ -tocotrienol (δ T₃; 25 mg mL⁻¹, purity 98%) in EtOH were provided by Larodan Fine Chemicals (Malmö, Sweden).

A lyophilized control serum based on human matrix LYO HUM N was provided by Erba Lachema (Brno, Czech Republic).

2.2. Standard solutions

The stock standard solutions of tocopherols were prepared by dilution of each compound in hexane to give a solution at a concentration of 1 mg mL⁻¹. These solutions were stored at -20 °C and they were prepared fresh every two weeks. The diluent mixture consisting of hexane and IpOH (90:10, v:v) was used for the subsequent dilutions.

2.3. UHPSFC-MS instrumentation and analysis

All the experiments were performed on a supercritical fluid chromatography system Acquity UPC² (Waters, Milford, MA, USA), which consisted of a binary pump, an autosampler, a column thermostat, a back pressure regulator (BPR) and PDA detector. The system was coupled to a single quadrupole mass spectrometer with an electrospray ionization (ESI) Acquity QDa Detector (Waters, Milford, MA, USA) via commercial SFC-MS dedicated splitter device (Waters). Additional make-up solvent was brought by an Isocratic Solvent Manager (Waters, Milford, MA, USA). Mixture of 95% MeOH and 5% water was selected as a make-up solvent at flow-rate 0.3 mL min⁻¹.

Four different stationary phases were tested for the method development, namely Waters Acquity UPC² BEH, Acquity UPC² BEH 2-Ethylpyridine (2-EP), Acquity UPC² HSS C18 SB and Acquity UPC² CSH Fluoro-Phenyl (PPF). All columns had dimensions of 3.0 × 100 mm and particle sizes of 1.7 μ m except for Acquity UPC² HSS C18 SB (1.8 μ m). The isocratic elution was performed with CO₂ and MeOH or EtOH as modifiers. Various additives in organic modifier were tested, including ammonium acetate (1, 5, 10 and 20 mM), ammonium formate (1, 5, 10 and 20 mM), and water (1, 2, 5%).

Finally, the Acquity UPC² BEH 2-EP was selected as the optimum column using CO₂ and MeOH with 10 mM ammonium formate.

Isocratic elution for high resolution method was provided by CO₂ and an organic modifier in ratio 98:2 at a flow-rate 1.5 mL min⁻¹. A column temperature and BPR were set at 40 °C and 23.4 MPa, respectively. High speed method was obtained using isocratic elution with CO₂ and 5% of modifier at a flow-rate 1.5 mL min⁻¹. A column temperature and BPR were set at 50 °C and 13.0 MPa, respectively. The partial loop with needle overfill mode was used to inject of 1 μ L of sample. Methanol was selected as a strong and weak wash solvent. The analytes were detected at 290 nm.

The MS conditions were tuned in ESI⁺ mode as follows: capillary voltage 0.80 kV, ion source temperature 120 °C and probe temperature 600 °C. Sample cone voltage was optimized for each analyte individually (α T, α T₃ – 10 V; β T, γ T, δ T, β T₃, γ T₃, δ T₃ – 5 V). Analyses were performed in SIM (single ion monitoring) experiment using precursor ions [M+H]⁺: α T – 431.0; β T, γ T – 417.0; δ T – 403.0; α T₃ – 425.3; β T₃, γ T₃ – 411.3; δ T₃ – 397.3. Masslynx v4.1 software was employed for MS control and data acquisition

and QuanLynx for peak integration and data processing.

2.4. Sample preparation

The combination of PP and LLE was used for sample preparation. 200 μ L of EtOH as a precipitating agent was added to 100 μ L of human serum for release of analytes from protein binding. The mixture was vortexed for 10 s. 400 μ L of hexane: dichloromethane solution (80:20, v:v) was subsequently added. The sample was centrifuged at 12 000 rpm, 4 °C for 10 min. 300 μ L of resulting supernatant were transferred into an insert of a vial. The sample was spun again and injected onto the BEH 2-EP column.

2.5. Method validation

At first, the repeatability of peak areas and retention times were evaluated at three concentration levels for both high resolution and high speed methods to perform system suitability test (SST) ($n = 10$). Standard solutions and spiked human serum samples were used for validation of the UHPSFC-MS methods. Both methods were fully validated in terms of linearity, range, limit of detection (LOD), lower limit of quantification (LLOQ), upper limit of quantification (ULOQ), precision, accuracy and matrix effects. For the determination of linearity, two calibration curves of all analytes were prepared. Standard calibration curve was prepared from stock standard solutions in the concentration range 0.001–10 μ g mL⁻¹ for high resolution method and 0.01–10 μ g mL⁻¹ for high speed method using diluting mixture. Matrix calibration curve was constructed using human reference serum spiked with all analytes and treated with PP and LLE procedure in the concentration range 0.01–10 μ g mL⁻¹ for high resolution method and 0.05–10 μ g mL⁻¹ for high speed method. LOQ was determined as the lowest concentration level with S/N = 10 and LOD as S/N = 3.

For the method precision and accuracy, spiked human serum samples treated by LLE were measured in five replicates at four different concentration levels covering the calibration range: the LLOQ, within five times the LLOQ (low QC), around 30–50% of the calibration curve (medium QC) and 75% of the upper calibration curve range (high QC) according to EMA Guideline on bioanalytical method validation [46]. Matrix effects were evaluated as the comparison of standard solutions and human serum samples, which were first treated with PP and LLE and subsequently spiked with standard solutions at two concentration levels for all isomers of vitamin E [47]. Matrix effects were determined at a low (close to LLOQ) and high (close to ULOQ) concentration level covering the calibration range according to EMA Guideline on bioanalytical method validation [46].

3. Results and discussion

3.1. UHPSFC-PDA method development

All 8 isomers of vitamin E are structurally similar compounds which differ in the number of methyl groups and their position on the chromanol ring. Due to the equal number of methyl substituents in a different position and therefore the same m/z ratio of β - and γ -tocopherols and tocotrienols, the separation of these isomeric forms is the critical point of the method development. This problem was often observed during LC method development. Therefore, it was expected also in SFC. To optimize the SFC separation, PDA detector was set at a selected wavelength of 290 nm. Due to the high log P value of vitamin E, the isocratic elution with 97% CO₂ and 3% MeOH at flow-rate 2.5 mL min⁻¹ and column temperature 50 °C was chosen as primary conditions for the column screening. Four different stationary phases were tested (BEH,

BEH 2-EP, CSH PFP and HSS C18). The results are shown in Fig. 2. CSH PFP stationary phase was not suitable for the separation under selected conditions due to coelution of two critical pairs β -; γ -T and β -; γ -T₃ and very low retention (analysis time < 0.8 min) which confirmed our expectations. Two different coelutions (γ -T and β -T₃; γ -T₃ and δ -T) were observed also on HSS C18 stationary phase. BEH stationary phase provided better selectivity, but a coelution of two analytes (δ -T and γ -T₃) and also very low retention of all analytes (analysis time < 1.0 min) were observed which is not desirable for analysis of complex biological matrices. Finally, BEH 2-EP provided the best selectivity and resolution in 2 min analysis time. Only the coelution of δ -T and β -T₃ which was less expected was observed instead of predicted coelution of β - and γ -isomers. This column was selected for further optimization. The sensitivity and repeatability of this method were verified at this point. However, determined LOQ ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) for vitamin E analysis using PDA detector was insufficient for analysis of vitamin E in biological samples. Therefore, the transfer from UHPSFC-PDA to UHPSFC-MS was unavoidable and further optimization steps were performed on UHPSFC-MS system.

3.2. UHPSFC-MS method development

3.2.1. Selection of mobile phase modifier, additive and make-up solvent

Mobile phase composition in SFC-MS is one of the key factor affecting the peak shape, retention time, selectivity and mass spectrometry response similarly to LC-MS. Because of tocotrienol high costs, this large set of experiments was performed only with tocopherol standards. Due to similar physicochemical properties, the behaviour of all 8 compounds in terms of MS response was

expected to be analogous. Both, tocopherols and tocotrienols, are non-polar molecules with log P in the range 8–10, pKa typical for neutral compounds (Fig. 1), and few functional groups possessing hydrogen bond donor or acceptor properties (1 H-donor group/2-H acceptor groups). For this reason, the change in retention and selectivity, respectively, was expected in a lesser extent when various additives were used. Despite this fact, several additives, including ammonium acetate (1, 5, 10 and 20 mM), ammonium formate (1, 5, 10 and 20 mM), and water (1, 2, 5%), were tested to verify the influence of individual additives on MS ionization and method sensitivity. To show the results, γ -T was selected as a representative for all tocopherols, as the results for other isomers were identical.

First, MeOH, which is considered to be a modifier of the first choice not only due to its strong elution power, but also due to its cost and availability, was investigated as a co-solvent. The MS response corresponding to pure MeOH was taken as a reference (100%) for the scaling of all other mobile phases (Fig. 3A and B). Subsequently, MeOH and EtOH with different additives were investigated (Fig. 3A and B). When using pure EtOH as an organic modifier, the increase in analysis time from 3 min to 5 min (Fig. 3C, E) was observed. The MS response was similar compared to pure MeOH as shown in Fig. 3B. Therefore, there was no benefit in using EtOH as a co-solvent. When using additives in CO₂/MeOH mobile phase no influence on retention time was observed (Fig. 3D, F) even after significantly long equilibration times (more than 3 h). On the other hand, the influence to signal intensity (evaluated as both peak area and S/N) was significant. As shown in Fig. 3A, an addition of ammonium formate and ammonium acetate led to increase in the MS response in comparison with pure MeOH. When increasing concentration of an additive from 1 mM to 10 mM, the response

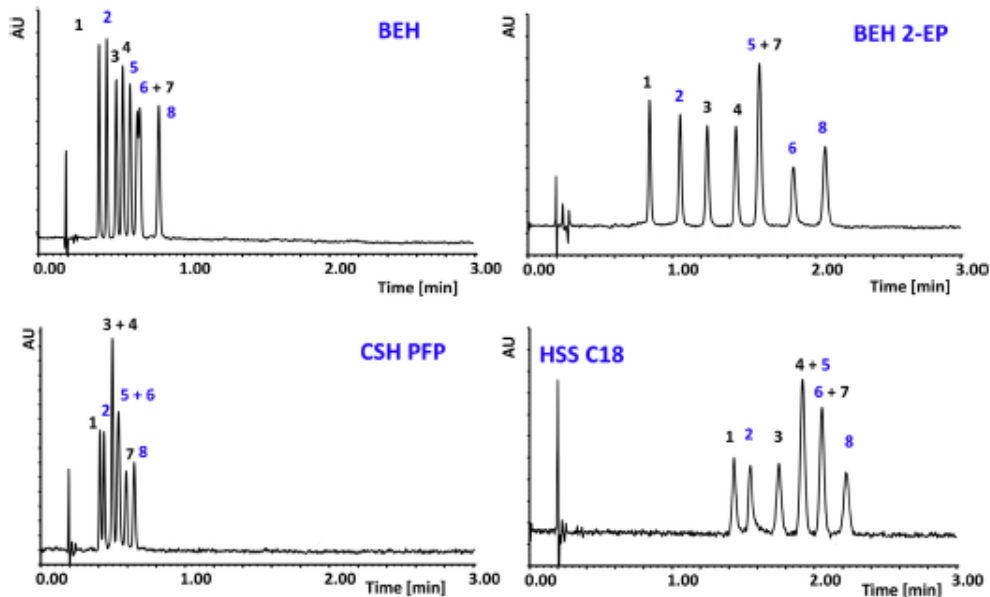


Fig. 2. Columns screening to investigate optimal stationary phase for vitamin E analysis. UHPSFC conditions: CO₂; modifier (97:3), column temperature 50 °C, BPR 13.0 MPa, flow-rate 2.5 mL min⁻¹. (1) α -tocopherol (2) α -tocotrienol (3) β -tocopherol, (4) γ -tocopherol, (5) β -tocotrienol (6) γ -tocotrienol (7) δ -tocopherol, (8) δ -tocotrienol.

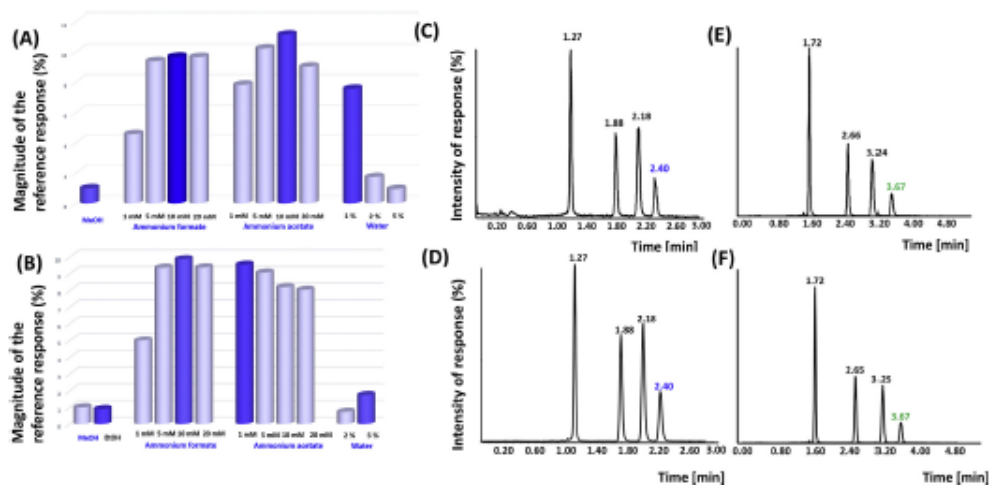


Fig. 3. Optimization of mobile phase composition: Influence of all investigated additives on MS response using (A) MeOH with additives and (B) EtOH with various additives reported for γ -T. TIC chromatograms of tocopherols with (C) MeOH and (D) MeOH + 10 mM ammonium formate, (E) EtOH used as organic modifier and (F) EtOH + 10 mM ammonium formate. UHPSFC conditions: CO₂ modifier (97:3), column temperature 40 °C, BPR 13.0 MPa, flow-rate 2.0 mL·min⁻¹, make-up solvent: MeOH, flow-rate 0.3 mL·min⁻¹.

was further increased 4 fold and 10–12 fold, respectively. If 20 mM ammonium acetate or formate was used, the signal of tocopherols was slightly decreased in comparison with 10 mM buffers. Finally, the influence of water addition to MeOH modifier was studied. A significant positive effect (8–10 fold increase of response compared to pure MeOH) on the signal of the analytes was observed when 1% of water was added into MeOH. When the concentration of water increased, the decrease of MS response was observed as is shown in Fig. 3A. When the additives with the highest response (10 mM ammonium formate, 10 mM ammonium acetate and 1% water added to both buffers) were compared, no great difference in MS responses between chosen additives was found. The same set of experiments was repeated using EtOH and the same additives (Fig. 3B). However, no significant difference was observed compared to MeOH based mobile phases.

Finally, due to the shorter analysis time, the highest MS response and still good selectivity, MeOH with 10 mM ammonium formate (Fig. 3D) was chosen as an organic modifier and additive of the CO₂-based mobile phase.

The hyphenation of UHPSFC and MS was implemented via the pre-BPR flow-splitting with addition of make-up solvent. Various organic solvents, including MeOH, EtOH and IpOH, addition of water (2 and 5%) and volatile additives (10 mM ammonium formate, 0.1% formic acid, 0.1% ammonium hydroxide) on MS sensitivity were studied. Pure MeOH was taken as a reference (100%) to compare intensity of response for all tested make-up solvents.

When MeOH was replaced with EtOH or IpOH, the MS signal was reduced for all analytes, typically to 30% of the reference intensity for EtOH, and 10% for IpOH respectively. Consequently, MeOH with various additives was subjected to further testing. Surprisingly, the addition of volatile ammonium formate, formic acid and ammonium hydroxide lead to the decrease of MS response compared to pure MeOH. Only addition of water provided some enhancement of MS signal. The addition of 5% water increased the signal to 180% of reference signal. Therefore, it was chosen as the

most suitable make-up solvent (Fig. 4).

3.2.2. The influence of mobile phase composition, column temperature, flow-rate and BPR pressure

In SFC, the analyte retention is not only influenced by the choice of stationary phase and mobile phase composition, but also by column temperature and pressure on which mobile phase density depends. Critical point of CO₂ is changing when it is mixed with polar modifier. Therefore, when using organic modifiers, the mobile phase is not properly in supercritical state but rather in a state which can be called subcritical [36]. Comparing these states, no significant difference in the physical and chemical properties has been described. The organic modifier influences the solvating power of the mobile phase. The temperature and pressure change can also influence the solubility of non-polar analytes and thereby the selectivity and retention time of analytes [36,41,48,49].

At first, a concentration of the organic modifier (95–98% of CO₂) was finely tuned as the most influencing factor in subcritical state. The dependence of the retention and co-solvent concentration is non-linear, with decrease in retention from 0 to 10% of modifier increase, whatever the polarity of the stationary phase. For lipophilic compounds, it was observed that the retention time decreased with modifier amount increase and after the retention reached a minimum value, the retention factor increased again [48,49].

Indeed, in this study, increasing amount of the modifier led to the analysis time decrease, as only low concentrations of the modifier were employed. Due to the various polarities of tocopherols and tocotrienols, the change in selectivity was also observed. Different selectivity was noticed at very low amount of carbon dioxide in mobile phase, namely this effect was observed for critical pair β -T₃ and δ -T (Fig. 5). The baseline separation of all 8 isomeric forms was obtained only when 98% or 96% of CO₂ was used in the mobile phase and temperature was kept at 40 °C. In other cases the peaks were not baseline-separated and δ -T α -eluted with neighboring peaks. Subsequently, column temperature was investigated

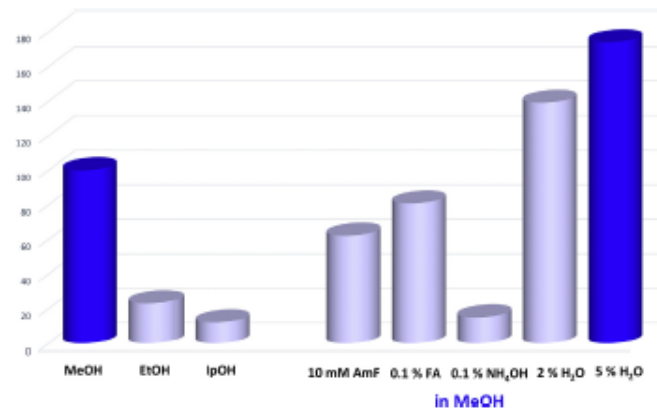


Fig. 4. Optimization of make-up solvent: influence of organic solvents and additives on MS intensity.

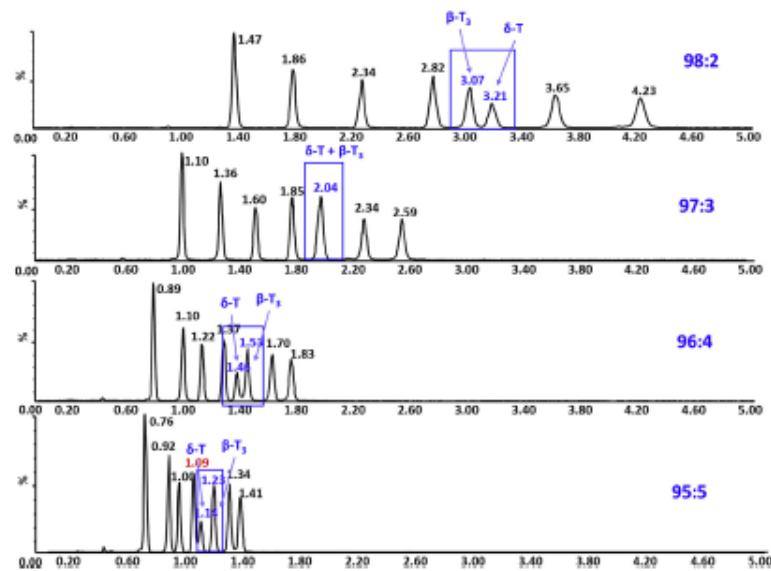


Fig. 5. SIM chromatograms reporting an influence of mobile phase composition on speed of analysis and selectivity. UHPSFC conditions: CO₂/MeOH + 10 mM ammonium formate, column temperature 40 °C, BPR 13.0 MPa, flow-rate 2.0 mL min⁻¹, make-up solvent: MeOH + 5% H₂O, flow-rate 0.3 mL min⁻¹.

in detail. The analysis time was decreased with decreasing temperature (Fig. 6). The critical pair β -T₃ and δ -T was separated on baseline at 98% of CO₂ in all cases except when the temperature was decreased to 30 °C when partial co-elution was observed. Similarly, at 95% of CO₂, this coelution was observed already at 40 °C. Generally, combination of lower temperature and higher concentration of organic modifier were not favourable for the separation of critical pair β -T₃ and δ -T.

After this optimization, two promising conditions, 98% of CO₂ at

40 °C and 95% of CO₂ at 50 °C, allowing separation of all eight isomers were subjected to further method optimization, where the influence of BPR and flow-rate were further tested. The flow-rate for both methods was investigated in the range 1.5–2.0 mL min⁻¹. When the flow-rate value was decreased from 2.0 mL min⁻¹ to 1.5 mL min⁻¹, the sensitivity was increased typically by 60% and run time of separation was prolonged by 50%.

Due to different amount of CO₂ and column temperature setting, the density of mobile phase allowed to test different BPR ranges for

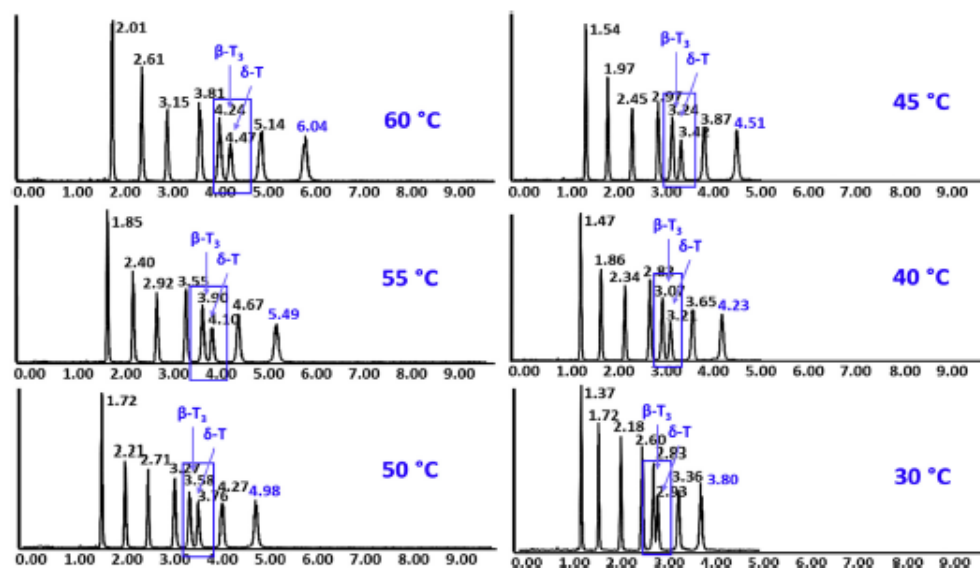


Fig. 6. Effect of temperature on separation of 8 tocochromanols. Critical pair of co-eluting β -T₃ and δ -T is highlighted. UHPSEC conditions: CO₂/MeOH + 10 mM ammonium formate (98:2), 13.0 MPa, flow-rate 2.0 mL min⁻¹, make-up solvent: MeOH + 5% H₂O, flow-rate 0.3 mL min⁻¹.

the two promising conditions. Tested BPR range was 13.0–23.4 MPa and 11.4–13.0 MPa for 98% and 95% CO₂, respectively. Generally, when the BPR pressure was increased, the sensitivity of MS response was higher and the analysis time was shorter by 40% and

20%, respectively, as shown in Fig. 7. No influence on separation selectivity was observed probably due to the very little change of analyte solubility in the mobile phase under these conditions [49]. Finally, two high-throughput UHPSEC-MS methods were

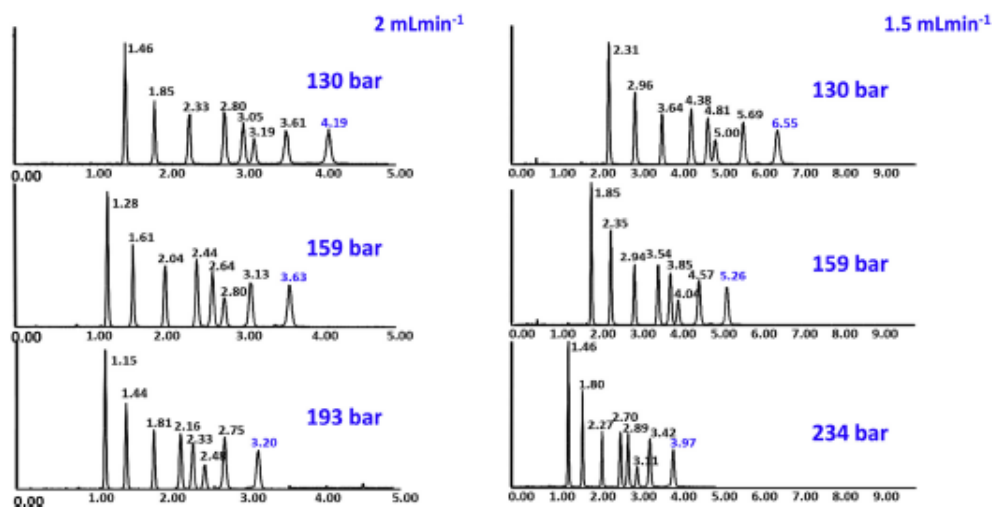


Fig. 7. Effect of flow-rate and BPR pressure on separation of 8 tocochromanols. UHPSEC conditions: CO₂/MeOH + 10 mM ammonium formate (98:2), column temperature 40 °C, flow-rate 2.0 mL min⁻¹ and 1.5 mL min⁻¹ respectively, make-up solvent: MeOH + 5% H₂O, flow-rate 0.3 mL min⁻¹.

obtained – the high resolution method and the high speed method, both with analysis time shorter than 5 min. The high resolution method provided more sensitive analysis and higher resolution which is more suitable for samples originated from complex matrices, while the high speed one is suitable for rapid laboratory screening with still sufficient sensitivity for less complex matrices or for samples after thorough sample preparation. The high resolution method utilized mobile phase composed from 98% CO₂ and 2% of MeOH with 10 mM ammonium formate at flow-rate 1.5 mL min⁻¹, column temperature 40 °C, and BPR pressure 23.4 MPa as the best compromise between sensitivity and separation efficiency. The high speed method was performed at CO₂: MeOH with 10 mM ammonium formate (95:5), column temperature 50 °C, flow-rate 1.5 mL min⁻¹ and BPR pressure 13.0 MPa for the maintaining of separation efficiency and short time of analysis (Fig. 8).

3.3. Optimization of sample preparation step

Due to the solubility of vitamin E in non-polar solvents, LLE was chosen for the sample pretreatment as the most suitable approach

for the isolation of vitamin E from human serum. As discussed, tocopherols are strongly bound on plasma proteins which are responsible for their transportation and regulation of their level in plasma [13,14]. Therefore, it was important to release them from protein binding before the LLE using effective protein precipitating (PP) agent.

Different volumes of human serum (100 and 200 µL) as a complex matrix, four organic solvents (ACN, MeOH, EtOH and iPrOH) used as a precipitating agent in volumes of 100 and 200 µL, various solvents for LLE (hexane, hexane: dichloromethane (80:20, v:v), hexane: dichloromethane (90:10, v:v) in volumes of 200 and 400 µL and extraction times (5 and 10 min) were investigated in detail.

ACN and MeOH as the most efficient precipitating agents provided very low recoveries (10–35%). When EtOH or iPrOH were used as precipitating agents, the recoveries were substantially improved. 100 µL of precipitating agent was not sufficient to break the protein binding of vitamin E. When sample: precipitating ratio was 1:2 instead of 1:1, the recoveries rapidly increased. When using the hexane and mixture hexane: dichloromethane (90:10, v:v) the extraction recoveries were lower (45–65%). Only using 400 µL

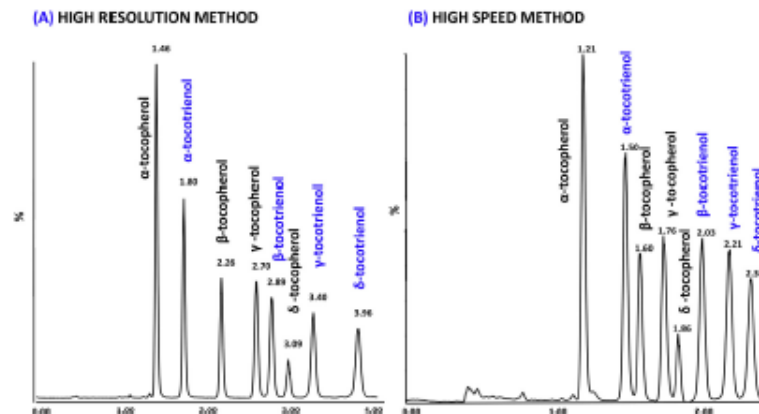


Fig. 8. Final TIC chromatograms for (A) high resolution and (B) high speed UHPSEC-MS method.

Table 2

Peak area and retention time repeatability shown as relative standard deviation (RSD %) for high resolution and high speed method.

		α-T	β-T	γ-T	δ-T	α-T ₃	β-T ₃	γ-T ₃	δ-T ₃
High resolution method	RSD (A) [%]	0.01 [µg mL ⁻¹]	10.66	14.95	12.96	–	–	–	–
		0.05 [µg mL ⁻¹]	2.41	3.77	3.04	8.58	6.12	4.51	5.43
		0.5 [µg mL ⁻¹]	1.66	3.29	4.98	5.37	1.75	1.12	1.04
		5.0 [µg mL ⁻¹]	1.20	2.27	2.82	6.13	2.95	1.14	1.00
		0.01 [µg mL ⁻¹]	0.00	0.00	0.00	–	–	–	–
High speed method	RSD (A) [%]	0.05 [µg mL ⁻¹]	3.22	–	–	–	–	–	–
		0.1 [µg mL ⁻¹]	2.09	9.09	–	–	4.79	4.90	3.49
		0.5 [µg mL ⁻¹]	2.90	4.77	4.23	3.93	2.88	2.49	3.22
		1.0 [µg mL ⁻¹]	1.60	1.35	1.99	3.31	3.15	1.48	2.16
		5.0 [µg mL ⁻¹]	1.31	2.08	2.07	2.01	1.48	1.98	1.59
RSD (B) [%]	0.05 [µg mL ⁻¹]	0.24	–	–	–	–	–	–	
	0.1 [µg mL ⁻¹]	0.00	0.00	–	–	0.00	0.26	0.18	
	0.5 [µg mL ⁻¹]	0.24	0.18	0.95	0.21	0.00	0.14	0.13	
	1.0 [µg mL ⁻¹]	0.00	0.00	0.95	0.95	0.00	0.00	0.00	
	5.0 [µg mL ⁻¹]	0.24	0.18	0.00	0.24	0.00	0.00	0.13	

Table 3
Method linearity, LOD, LOQ and ULQ for tocopherols and tocotrienols in standard solution and human serum for high resolution and high speed method.

			α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T ₃	β -T ₃	γ -T ₃	δ -T ₃
High resolution method	Standard calibration curve	Method linearity (r^2)	0.9999	0.9995	0.9996	0.9996	0.9987	0.9990	0.9996	0.9997
		LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.003	0.008	0.003	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017
		ULQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
	Matrix calibration curve	Method linearity (r^2)	0.9930	0.9952	0.9954	0.9931	0.9940	0.9955	0.9927	0.9942
		LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.083	0.017	0.017	0.083	0.025	0.025	0.083	0.083
		ULQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.25	0.05	0.05	0.25	0.075	0.075	0.25	0.25
High speed method	Standard calibration curve	Method linearity (r^2)	0.9992	0.9995	0.9998	0.9996	0.9996	0.9996	0.9969	0.9996
		LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.017	0.033	0.17	0.17	0.033	0.033	0.017	0.017
		ULQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.05	0.10	0.50	0.50	0.10	0.10	0.05	0.05
	Matrix calibration curve	Method linearity (r^2)	0.9877	0.9942	0.9912	0.9914	0.9915	0.9941	0.9935	0.9922
		LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.167	0.167	0.25	0.167	0.083	0.083	0.25	0.083
		ULQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.5	0.5	0.75	0.5	0.25	0.25	0.75	0.25

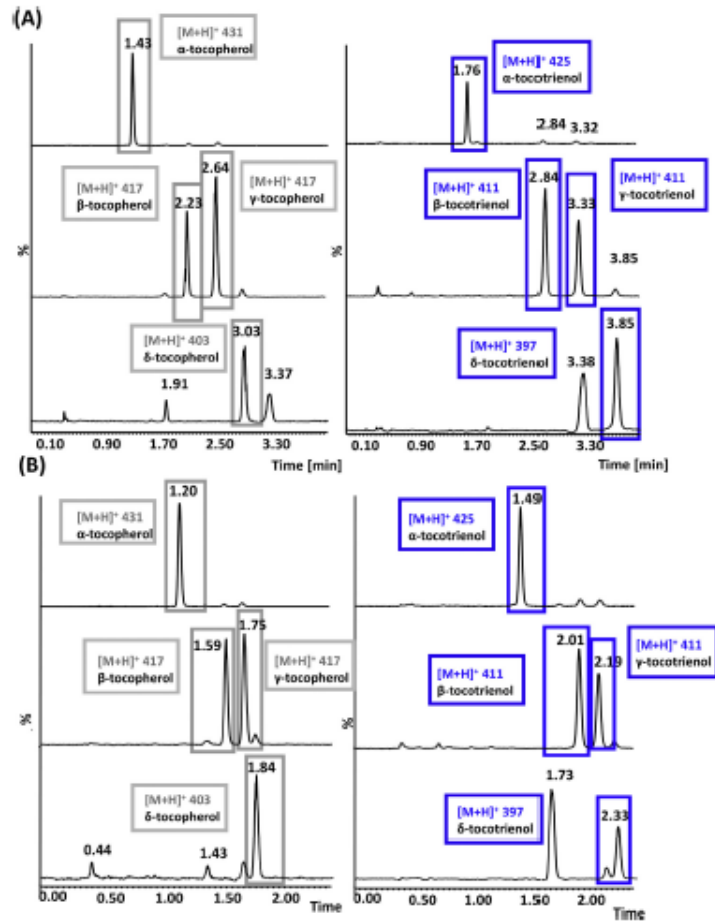


Fig. 9. SIM chromatograms for human serum spiked with all 8 vitamin E isomeric forms for (A) high resolution and (B) high speed method.

hexane: dichloromethane (80:20, v:v) mixture provided results with the recoveries in the range 80–120%.

Finally the method with 10 min extraction time using 100 μL of human serum, 200 μL of EtOH as a precipitating agent and 400 μL of hexane: dichloromethane (80:20, v:v) mixture as an extraction solvent provided results with the highest recovery in the range 80–120%. Due to compatibility of final sample solvent with SFC mobile phase, evaporation and reconstitution of sample before injection could be omitted and sample could be injected in to SFC system directly. While previously described extraction methods for HPLC usually used tens of milliliters of organic solvents (MeOH, hexane, acetone) for vitamin E extraction [25,26,28,31,32], our method uses only 400 μL of hexane: dichloromethane mixture for the tocopherols and tocotrienols extraction from human serum. Thus, advantages of this new method allow not only shortening of analysis time and increasing the throughput of samples in a laboratory, but also lead to reduction of organic solvent consumption. Although hexane: dichloromethane are not green solvents, their consumption in our LLE procedure remains negligible.

3.4. Method validation

Initially, the repeatability of retention times and peak areas expressed as RSD% ($n = 10$) was evaluated at 4 concentration levels (Table 2) for both high resolution and high speed methods. RSD for retention times was <0.1% for high resolution method and <0.3% for high speed method. RSD for peak areas was <8.5% for high resolution method and <10.0% for high speed method, which is adequate for UHPSFC-MS method. Subsequently, the linearity, LOD and LOQ for standard solutions were determined. The linearity of both methods was assessed for concentration ranges reported at Table 3 with coefficient of determination r^2 better than 0.9969. LOD and LOQ were determined for $S/N = 3$ and 10, respectively, the results are summarized in Table 3.

PP combined to LLE approach for human serum provided good selectivity and clean-up (Fig. 9). Despite the SIM mode and single quadrupole was used for the detection, the chromatograms were interference free and the method provided very good sensitivity.

Both UHPSFC-MS methods using PP and LLE as a sample pretreatment approach which enabled to obtain pure extracts of vitamin E were validated in terms of precision, accuracy, linearity, range, LOD, LOQ and matrix effects using human serum according to EMA Guideline on bioanalytical method validation [46]. Methods showed good linearity expressed as correlation coefficient $r^2 = 0.9930$ – 0.9955 for all 8 tocopherols in the different ranges shown in Table 3. LOQ and LOD (determined for $S/N = 3$ and 10 and providing accuracy in the range 80–120% and precision with RSD < 20%) for all analytes measured by both methods are also summarized in Table 3. High resolution method provided more sensitive results in comparison with high speed method. LOQ of high resolution method was 2–15 times lower than LOQ of the high speed one. When standard and matrix calibration curves were compared, the sensitivity of matrix samples was approximately 4 times lower than the sensitivity of standard calibration curve which corresponded to the sample dilution during the extraction procedure. Thus, no more loss of sensitivity was observed when analysing complex matrices such as human serum. In comparison with previously developed methods for the vitamin E determination, only few methods provided lower limit of quantification which was due to very sensitive fluorescent detection [26,27,29], and quadrupole time-of-flight mass spectrometry detector [23]. The developed high resolution method provided more sensitive results than the methods using MS and UV detection mentioned in Table 1. The developed high speed method provided comparable results with LC-UV and LC-MS methods reported in Table 1.

Both methods provided very good accuracy and precision (Table 4) within the limits of acceptance required by EMA [46]. The results were in the range 80–120% for LLOQ (L4) and 85–115% for three other validation concentration levels (L1, L2, L3) except for one result from L4 (LLOQ) measured by high speed method (128.4% $\beta\text{-T}_3$). The method precision was found to be similar to methods reported in Table 1 where the precision was typically better than 15%. Accuracy of newly developed method was usually in range 86–115% which is also comparable or better than previously published methods.

Matrix effects were also evaluated for both methods (Table 5).

Table 4
Method accuracy and precision evaluated at 4 concentration levels in the linear range for tocopherols and tocotrienols in human serum for high resolution and high speed method according to EMA Guideline on bioanalytical method validation.

			$\alpha\text{-T}$	$\beta\text{-T}$	$\gamma\text{-T}$	$\delta\text{-T}$	$\alpha\text{-T}_3$	$\beta\text{-T}_3$	$\gamma\text{-T}_3$	$\delta\text{-T}_3$	
High resolution method	Concentration levels [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ($n = 5$)	L1	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	
		L2	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	
		L3	1.00	0.25	0.25	1.00	0.25	0.25	1.00	1.00	1.00
		L4	0.25	0.05	0.05	0.25	0.08	0.08	0.25	0.25	0.25
	Accuracy [%]	L1	108.0	102.8	106.5	106.6	96.1	93.2	96.9	95.4	95.4
		L2	114.0	109.7	113.9	111.8	97.6	99.4	95.9	97.2	97.2
		L3	115.4	88.1	102.5	99.2	92.6	101.4	88.3	93.6	93.6
		L4	87.9	107.9	78.8	95.0	92.4	105.8	96.7	97.6	97.6
	Precision [RSD %]	L1	10.7	4.3	5.7	4.9	4.6	4.0	5.0	4.2	4.2
		L2	7.3	6.1	7.8	5.5	5.3	5.1	3.2	4.0	4.0
		L3	15.9	5.2	11.2	5.3	9.3	4.2	13.6	8.3	8.3
		L4	12.0	9.0	7.0	3.7	5.9	13.4	11.6	7.4	7.4
High speed method	Concentration levels [$\mu\text{g mL}^{-1}$] ($n = 5$)	L1	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	
		L2	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	
		L3	1.00	1.00	2.50	1.00	0.75	0.75	2.50	0.75	0.75
		L4	0.50	0.50	0.75	0.50	0.25	0.25	0.75	0.25	0.25
	Accuracy [%]	L1	109.3	107.8	107.2	103.8	98.9	103.0	97.0	97.5	97.5
		L2	101.7	100.8	104.4	104.6	86.2	95.5	89.8	96.9	96.9
		L3	89.3	84.9	105.7	87.7	85.9	87.3	96.4	94.1	94.1
		L4	114.7	103.0	119.0	102.4	112.3	128.4	86.9	119.8	119.8
	Precision [RSD %]	L1	5.3	3.2	3.2	2.2	2.5	2.8	3.0	3.7	3.7
		L2	7.5	3.9	9.7	1.9	3.7	3.5	5.7	2.9	2.9
		L3	15.2	6.2	4.4	6.8	2.6	5.5	21.7	3.3	3.3
		L4	18.5	13.8	20.9	12.4	3.2	1.8	21.0	17.2	17.2

Table 5

Evaluated matrix effects for a low (1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and high (12.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$) levels of concentration for tocopherols and tocotrienols in human serum for high resolution and high speed method according to IMA Guideline on bioanalytical method validation.

		α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T ₃	β -T ₃	γ -T ₃	δ -T ₃
High resolution method	L1	137.0	83.7	129.0	121.6	129.9	125.6	89.8	142.9
	L2	104.4	106.4	109.0	119.1	112.0	93.3	104.9	119.8
High speed method	L1	132.2	107.7	103.4	120.4	106.0	110.0	107.7	113.7
	L2	106.2	104.5	106.0	104.9	104.2	108.8	106.4	108.0

The range of observed matrix effects was 90–138% for a low concentration level (1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 93–119% for a high concentration level (12.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$) which was fully acceptable. Pairwise comparison showed (at the 95% probability level) that the differences between matrix effects determined for high speed and high resolution method were not significant. It is an important fact because various compounds could be eluted in different time during both analytical methods and influence the signal of analytes of the interest. The results of ME evaluation and their comparison between two methods show that the LLE provided appropriate sample clean-up and prevented matrix effects to compromise the results.

4. Conclusions

The aim of this study was to develop fast, simple and selective UHPSFC-MS method for the determination of all 8 isomeric forms of vitamin E. Finally, two selective and sensitive methods involving high-throughput sample preparation step based on PP and LLE and fast UHPSFC-MS were optimized and fully validated for quantitative determination of all tocopherols and tocotrienols in human serum for the first time. Methods used single quadrupole MS which undoubtedly advantages are price affordability, small size and easy operation in comparison with most frequently used triple quadrupoles. Using additive in mobile phase was beneficial despite neutral character of compounds and few functional groups possessing hydrogen-binding donor/acceptor properties.

The high speed method provided the separation with analysis time of 2.5 min. The high resolution method took 4.5 min and provided more sensitive analysis than the high speed method. The high resolution method is more suitable for analysis of complex matrices due to the longer analysis time and better resolution, while the high speed method is convenient for rapid screening of samples containing higher concentrations of vitamin E in samples. These optimized methods benefit from the combination of LLE and SFC which are based on using of nonpolar extraction agents in LLE and CO_2 as a mobile phase. Consequently, there is no need for evaporation and reconstitution of sample in solvent compatible with used mobile phase which is often needed in HPLC. Moreover, the developed methods are suitable for fast screening due to a significant saving of instrument time, a low consumption of organic solvents, a need of small sample amount and a high throughput of samples in laboratory, which is important for routine bioanalytical laboratories.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Charles University Grant Agency for Grant GAUK no. 1948214 and the Project of Specific research, SVV 260 292 (2016). This work was also supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic – grant from the National Program for Sustainability I (LO1204). The authors also wish to gratefully acknowledge Waters, particularly Marek Exner and Petr Butzke for

the kind opportunity to use the Waters Acquity UPC² coupled to QDa and for the technical support.

References

- [1] M.L. Colombo, An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol – perspectives, *Molecules* 15 (2010) 2103–2113.
- [2] H.A. Clemente, H.M.M. Ramalho, M.S.R. Lima, E.C. Grillo, R. Dimenstein, Maternal supplementation with natural or synthetic vitamin E and its levels in human colostrum, *JPGN* 60 (2015) 535–537.
- [3] T. Pozza, V. Craige Trenerly, D. Caridi, The simultaneous determination of vitamins A, E and β -carotene in bovine milk by high performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry (HPLC-MSⁿ), *Food Chem.* 134 (2012) 559–563.
- [4] M. Paz San Andrés, J. Otero, S. Vera, High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of α -, γ - and δ -tocopherol in vegetable oils in presence of hexadecyltrimethylammonium bromide/n-propanol in mobile phase, *Food Chem.* 126 (2011) 1470–1474.
- [5] A.M. Drosoff, C. Bahnsack, J. Schneider, A. Hahn, W. Terres, Human oral bioavailability and pharmacokinetics of tocotrienols from tocotrienol-rich (tocotrienol-low) barely oil and palm oil formulations, *J. Funct. Foods* 7 (2014) 150–160.
- [6] H.-Y. Huang, L.J. Appel, Supplementation of diets with α -tocopherol reduces serum concentration of γ - and δ -tocopherol in humans, *J. Nutr.* 133 (2003) 3137–3140.
- [7] C.K. Sen, S. Khanna, S. Roy, Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family, *Mol. Asp. Med.* 28 (2007) 692–728.
- [8] B.B. Aggarwal, C. Sundaram, S. Prasad, R. Kannappan, Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 1613–1631.
- [9] H.M. Pinheiro-Sant'Ana, M. Guinazi, D. da Silva Oliveira, C.M. Della Lucia, B. de Lazzari Reik, S.C. Cardoso Brandão, Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8496–8502.
- [10] N.I. Kifitsky, Human requirements for fat-soluble vitamins, and other things concerning these nutrients, *Mol. Asp. Med.* 24 (2003) 317–324.
- [11] A. Podsedek, Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: a review, *IWT* 40 (2007) 1–11.
- [12] R. Emswiler, J. Lee, *VITAMIN E: Food Chemistry, Composition and Analysis*, Marcel Dekker Inc., New York, 2004, pp. 488–493.
- [13] D.H. Blatt, S.W. Leonard, M.C. Traber, Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins, *Nutrition* 17 (2001) 799–805.
- [14] A.K. Dutta-Roy, Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of α -tocopherol: role of tocopherol-binding proteins, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 967–971.
- [15] L. Paclet, J. Fuchs, *VITAMINE In Health and Disease: Biochemistry and Clinical Applications*, Marcel Dekker Inc., New York, 1993, pp. 861–862.
- [16] M.C. Traber, D. Manor, Vitamin E, *Adv. Nutr.* 3 (2012) 330–331.
- [17] M.C. Traber, J. Atkinson, Vitamin E, antioxidant and nothing more, *J. Free Rad. Biol. Med.* 48 (2007) 4–15.
- [18] M.C. Traber, Mechanisms for the prevention of vitamin E excess, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 2295–2306.
- [19] F.J. Rupérez, D. Martín, E. Hemesa, C. Barbas, Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices, *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 45–69.
- [20] E. Ibáñez, J. Palacios, C. Reglero, Analysis of tocopherols by on-line coupling supercritical fluid extraction – supercritical fluid chromatography, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 605–611.
- [21] P. Manninen, P. Laakso, H. Kallio, Method for characterization of triacylglycerols and fat-soluble vitamins in edible oils and fats by supercritical fluid chromatography, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72 (1995) 1001–1008.
- [22] G. Galuba, M. Gogolewski, Separation of tocopherols and sterols in soybean oil condensate utilizing supercritical fluid chromatography, *Chem. Anal. Wars.* 42 (1997) 245–248.
- [23] M. Méjean, A. Brunelle, D. Touboul, Quantification of tocopherols and tocotrienols in soybean oil by supercritical-fluid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 5133–5142.
- [24] P.T. Gee, C.Y. Uiew, M.C. Thong, M.C.L. Gaym, Vitamin E analysis by ultra-performance convergence chromatography and structural elucidation of novel α -tocotrienol by high-resolution mass spectrometry, *Food Chem.* 196 (2016) 367–373.
- [25] M.P.S. Andrés, J. Otero, S. Vera, High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of α -, γ - and δ -tocopherol in vegetable oils in presence of hexadecyltrimethylammonium bromide/n-propanol in mobile phase, *Food Chem.* 126 (2011) 1470–1474.
- [26] H.M. Pinheiro-Sant'Ana, M. Guinazi, D. da Silva Oliveira, C.M.D. Lucia, B. de Lazzari Reik, S.C. Brandão, Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8496–8502.
- [27] N. Greenstein, J. Frank, Rapid baseline-separation of all eight tocopherols and tocotrienols by reversed-phase liquid chromatography with a solid-core pentafluorophenyl column and their sensitive quantification in plasma and liver, *J. Chromatogr. A* 1243 (2012) 39–46.

- [28] K. Knecht, K. Sandfuchs, S.E. Kulling, D. Bunesel, Tocopherol and tocotrienol analysis in raw and cooked vegetables: a validated method with emphasis on sample preparation, *Food Chem.* 160 (2015) 20–27.
- [29] P. Vinas, M. Bravo-Biavo, I. Lopez-García, M. Pazos-Belda, M. Hernández-Córdoba, Pressurized liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for determination of tocopherols and tocotrienols in plant foods by liquid chromatography with fluorescence and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection, *Talanta* 119 (2014) 98–114.
- [30] B. Shammugasamy, Y. Ramakrishnan, H.M. Ghazali, K. Muhammad, Combination of saponification and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 31–37.
- [31] J.I. Chávez-Servín, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater, Simultaneous analysis of Vitamins A and E in infant milk-based formulae by normal-phase high performance liquid chromatography-diode array detection using a short narrow-bore column, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 138–143.
- [32] S.-H. Huang, L.-T. Ng, An improved high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol in rice, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4709–4713.
- [33] C. Yuan, M. Burgjian, D.R. Bunch, E. Reineks, R. Jackson, R. Steink, S. Wang, Fast, simple, and sensitive high-performance liquid chromatography method for measuring vitamins A and E in human blood plasma, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2293–2299.
- [34] M. Richelle, I. Tavazzi, L.B. Fay, Simultaneous determination of deuterated and non-deuterated α -tocopherol in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 794 (2006) 1–8.
- [35] P.F. Charzimitchalis, V.F. Samanidou, I.N. Papadogiannis, Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B* 805 (2004) 289–296.
- [36] V. Desfontaine, D. Guillaume, E. Francotte, I. Nováková, Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 113 (2015) 56–71.
- [37] L.T. Taylor, Supercritical fluid chromatography for the 21st century, *J. Supercrit. Fluids* 47 (2009) 566–573.
- [38] K. Kálková, T. Stechtová, J. Vozka, E. Tesalová, Supercritical fluid chromatography as a tool for enantioselective separation; A review, *Anal. Chim. Acta* 821 (2014) 1–33.
- [39] D. Spaggiari, F. Mehl, V. Desfontaine, A. Grand-Guillaume Perrenoud, S. Felletti, S. Rudaz, D. Guillaume, Comparison of liquid chromatography and supercritical fluid chromatography coupled to compact single quadrupole mass spectrometer for targeted in vitro metabolism assay, *J. Chromatogr. A* 1371 (2014) 244–256.
- [40] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillaume, The use of columns packed with sub-2 μ m particles in supercritical fluid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 44–54.
- [41] I. Nováková, A. Grand-Guillaume Perrenoud, I. Francois, C. West, E. Isellier, D. Guillaume, Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2 μ m particles: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 824 (2014) 18–35.
- [42] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillaume, Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compound, *J. Chromatogr. A* 1266 (2012) 158–167.
- [43] I. Nováková, A. Grand-Guillaume Perrenoud, R. Nicoli, M. Saugy, J.-L. Veuthey, D. Guillaume, Ultra-high performance supercritical fluid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for screening of doping agents. I: investigation of mobile phase and MS conditions, *Anal. Chim. Acta* 853 (2015) 637–646.
- [44] A. Grand-Guillaume Perrenoud, J.-L. Veuthey, D. Guillaume, Coupling state-of-the-art supercritical fluid chromatography and mass spectrometry: from hyphenation interface optimization to high-sensitivity analysis of pharmaceutical compounds, *J. Chromatogr. A* 1339 (2014) 174–184.
- [45] <http://www.chemicalize.org> 10th March 2016.
- [46] [BMA Guideline on bioanalytical method validation online available 10th March 2016.](http://www.bma-guideline.org)
- [47] B.K. Maruszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Berg, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [48] E. Isellier, C. West, The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – a review, *J. Chromatogr. A* 1382 (2015) 2–46.
- [49] A. Tarafder, G. Guiochon, Unexpected retention behaviour of supercritical fluid chromatography at the low density near critical region of carbon dioxide, *J. Chromatogr. A* 1229 (2012) 249–259.

8.2 Příloha 2

One-step extraction of polar drugs from plasma by Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction.

V. Pilařová, M. Sultani, K. S. Ask, L. Nováková, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad.

Journal of Chromatography B (2016),

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.019>, v tisku (citováno: 0x; IF₂₀₁₅ – 2,687)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

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



One-step extraction of polar drugs from plasma by Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction

Veronika Pilařová^a, Mumtaz Sultan^b, Kristine Skoglund Ask^b, Lucie Nováková^a, Stig Pedersen-Bjergaard^{b,c}, Astrid Gjelstad^{b,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b School of Pharmacy, University of Oslo, Norway

^c Department of Pharmacy, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, DK-2100 Copenhagen, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2016

Received in revised form 6 September 2016

Accepted 13 September 2016

Available online xxx

Keywords:

Parallel artificial liquid membrane

extraction

PALME

Microextraction

Supported liquid membrane

Carrier-mediated transport

ABSTRACT

The new microextraction technique named parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) was introduced as an alternative approach to liquid–liquid extraction of charged analytes from aqueous samples. The concept is based on extraction of analytes across a supported liquid membrane sustained in the pores of a thin polymeric membrane, a well-known extraction principle also used in hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME). However, the new PALME technique offers a more user-friendly setup in which the supported liquid membrane is incorporated in a 96 well plate system. Thus, high-throughput is achievable, in addition to the green chemistry offered by using PALME. The consumption of organic solvent is minimized to 3–5 μL per sample. With a sample volume of 250 μL and acceptor solution volume of 50 μL , a maximal enrichment factor of five is achievable. Based on these parameters, a new method for extraction of polar basic drugs was developed in the present work. The basic drugs hydralazine, ephedrine, metaraminol, salbutamol, and cimetidine were used as model analytes, and were extracted from alkalinized human plasma into an aqueous solution via the supported liquid membrane. The extraction was promoted by a carrier dissolved in the membrane, creating a temporary ion-pair complex between the hydrophilic drug and the carrier. As the model analytes were extracted directly into an aqueous solution, there was no need for evaporation of the extract before injection into LC–MS. Hence, the sample preparation is performed in one step. With optimized conditions, the extraction recoveries were in the range 50–89% from human plasma after 45 min extraction. The data from the method evaluation were satisfactory and in line with current guidelines, and revealed an extraction method with substantial potential for high throughput bioanalysis of polar basic drugs.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The field of analysis of pharmaceuticals and other chemicals in biological matrices has undergone a major renewal during the last decades. There has been massive focus on improvement of analytical instrumentation for separation and detection of the analytes of interest, for example shorter run time, better sensitivity, smaller injection volumes, and improved selectivity [1]. To a lesser degree, attention has been drawn to the sample preparation methods required prior to the injection in the analysis instruments. Traditional and well-known sample preparation methods like liquid–liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE), and

protein precipitation are still preferred as the gold standards [2]. However, in order to match the sample preparation techniques to the new era of analytical instrumentation, efforts have been made to reduce the sample preparation time, to decrease the use of hazardous organic solvents, and to automate the sample preparation methods [3,4]. For example, SPE has been miniaturized into the format of solid-phase microextraction (SPME) which is an important example of reduced organic solvent usage combined with automation possibilities [5]. SPME has been established as a real alternative to SPE and is commercially available. However, there are still some challenges to deal with when using SPME in quantitative bioanalysis such as fiber stability, fragility and robustness in contact with biological samples. Other miniaturized formats of SPE comprise stir-bar sorptive extraction (SBSE) [6,7] and microextraction by packed sorbent (MEPS) [8,9]. Sample preparation of whole blood and plasma samples often also involves protein precipitation, and

* Corresponding author.

E-mail address: astrid.gjelstad@farmasi.uio.no (A. Gjelstad).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.019>

1570-0232/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article in press as: V. Pilařová, et al., One-step extraction of polar drugs from plasma by Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction, J. Chromatogr. B (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.019>

equipment for an effective and automated precipitation procedure is available. However, the clean-up efficiency with protein precipitation is limited, and direct analysis by LC-MS may be prone to ion-suppression and instrumental contamination. LLE could then be a better alternative as this sample preparation technique provides a higher degree of clean-up. The attempts to miniaturize LLE have involved amongst other single drop microextraction (SDME), dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), and hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) [10,11]. With these techniques, the use of organic solvents has been reduced dramatically, using only a single drop (~10 µL) of solvent per sample. However, there is still no elegant and user friendly equipment commercially available to execute automation of miniaturized LLE. In 2013, the first attempt to make simple equipment for miniaturized LLE was proposed, and this was named parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) [12]. The technique is based on supported liquid membranes (SLMs) where small amounts of organic solvent is impregnated into a porous-structured supporting material, thus creating a thin film of organic solvent. This film makes a physical barrier between the sample (donor solution) and the receiver solution (acceptor solution), and is shown to exclude large endogenous compounds like phospholipids, which may cause matrix effects in LC-MS analysis [13]. The extraction principle is the same as described for HF-LPME [14], but the new PALME set up has some advantages compared to HF-LPME. Firstly, the equipment is more user-friendly. Thus, the experimental work-flow is simplified, the training time is reduced and the reproducibility is improved. Secondly, the equipment is based on multi well plates, and the method is therefore expected to be easily automated. Ninety six samples can be extracted simultaneously within 45–60 min. Thirdly, the thickness of the membrane in PALME is thinner compared to the membranes normally used in HF-LPME. Thus, the consumption of organic solvent is reduced to only 3–5 µL per sample.

PALME has been described for quantification of hydrophobic basic drugs ($\log P > 1 - 2$) [12] and for acidic drugs [15]. Another relevant class of substances is the more polar basic drugs ($\log P < 1 - 2$). They have been challenging to extract in HF-LPME due to their hydrophilic character and poor partition into the SLM. Therefore, an ion-pairing reagent has been included in the organic solvent in HF-LPME in order to facilitate carrier-mediated extraction of the polar drugs across the SLM [16]. Although carrier-mediated extraction has been reported for HF-LPME, no similar data have been reported for PALME yet. Due to the geometrical differences between HF-LPME and PALME, initial experiences with carrier-mediated extraction in PALME are mandatory for future implementation and method development. Thus, this paper describes for the first time extraction of polar drugs from human plasma based on carrier-mediated transport in a PALME system. Optimization from both pure aqueous samples and human plasma samples is described with special focus on key operational parameters. The phospholipid removal property of PALME with the presence of ion-pair reagents in the SLM is also highlighted. The resulting knowledge could be highly beneficial for future development and optimization of PALME applications for polar basic drugs.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Hydralazine hydrochloride, ephedrine hydrochloride, cimetidine, salbutamol, metaraminol bitartrate, dodecyl acetate, 2-nonanone, hexadecane, 1-octanol, dihexylether, 2-octanone, and isopentyl benzene were all from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , hydrochloric acid, trifluoroacetic

acid, and formic acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Standard solutions

A stock solution of 1 mg/mL was prepared by weighing hydralazine hydrochloride, ephedrine hydrochloride, cimetidine, salbutamol, and metaraminol bitartrate followed by dissolution in ethanol. The stock solution was stored at -20°C . A working standard solution was prepared weekly by dilution of the stock solution in 25 mM phosphate buffer (pH 7) to a final concentration of 10 µg/mL of each drug analyte. The standard solution was stored at $2-8^\circ\text{C}$.

2.3. Biological matrices

Drug-free human plasma was obtained from Oslo University Hospital (Oslo, Norway). The samples were stored at -32°C . The plasma samples were spiked with the standard solutions containing the target analytes.

2.4. PALME

The equipment used for PALME comprised four elements; a 96 well bottom plate with 0.5 mL wells (Agilent, Santa Clara, CA, USA), eight-tube strips with 0.2 mL volumes from Thermo Scientific (San Diego, CA, USA) for preparation of the acceptor compartment, a flat and 100 µm thick porous polypropylene membrane with pore size 0.1 µm (Accurel PP 1E R/P, Membrana, Wuppertal, Germany), and a lid to avoid potential evaporation of the acceptor solution. The procedure for making the acceptor compartment is described elsewhere [15]. Pictures of the setup and an illustration of one well is shown in Fig. 1a) and b).

The PALME procedure was performed in the following way; 250 µL alkalized sample was filled in the bottom plate (donor plate). Subsequently, 3 µL organic solvent (SLM solvent) was pipetted into the polypropylene membrane in the bottom of the acceptor compartment and spread by diffusion in the membrane within 5 s. Thereafter, 50 µL acidified acceptor solution was filled in the acceptor compartment above the impregnated SLM. Then, the acceptor compartment was coupled together with the donor plate in a sandwich-like configuration (Fig. 1). The whole equipment was placed on a shaker board (Vibramax 100, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) and agitated with 900 rpm for 30 min. Afterwards, the extracts were transferred to vials for LC-MS analysis by a multi-channel pipette.

2.5. LC-MS

The chromatographic system comprised a Dionex UltiMate 3000 RS Pump, Column Compartment, and Autosampler, and a Thermo Scientific LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer (all from Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Data acquisition and processing were carried out using Xcalibur software (version 2.2.SP1.48) from Thermo Scientific. The chromatographic separation was performed using a 100 mm \times 2.1 mm inner diameter Acquity UPLC[®] HSS T3 column with a particle size of 1.8 µm and a pore size of 100 Å, from Waters (Wexford, Ireland).

Mobile phase A consisted of 20 mM formic acid and methanol (95:5 v/v), and mobile phase B consisted of methanol and 20 mM formic acid (95:5 v/v). The multistep gradient was run with a flow rate of 0.3 mL/min as follows: 100% A from 0.0–4.0 min, thereafter from 0% to 2% B within 0.1 min followed by a slightly increase in the elution strength to 8% B from 4.1–8.0 min. This condition was kept constant for 0.8 min, followed by an increase to 100% B in 0.1 min which was kept constant until 9.9 min. The column was reset to

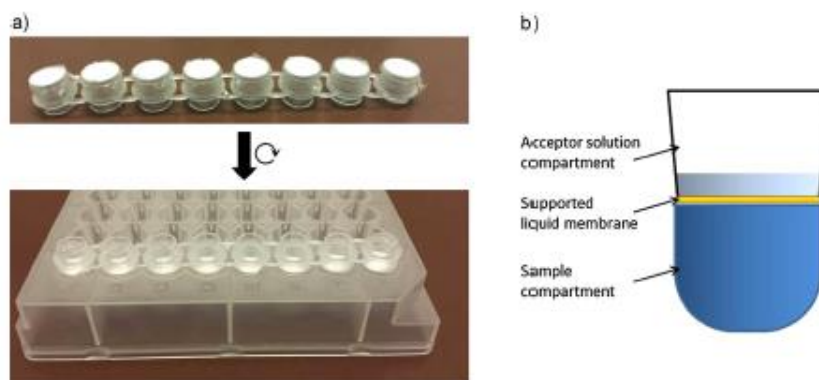


Fig. 1. a) Pictures of the acceptor solution compartment (upper picture; seen from the bottom) and the acceptor solution compartment clamped to the sample compartment (lower picture), and b) Schematic illustration of one well in PALME.

Table 1
 LC-MS/MS parameters.

	[M+H] ⁺	Fragment Ion	Collision energy
Hydralazine	161.0	115.7 (88.7)	31 (34)
Ephedrine	166.0	148.0	25
Cimetidine	253.0	158.9 (116.8)	30
Salbutamol	240.0	222.1	32
Metaraminol	168.0	149.9	35

initial conditions (100% A) between 10.0 and 11.0 min. The temperature of the column oven was set to 40 °C and the injection volume was 2 µL.

Detection was carried out using an LTQ XL™ Linear Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo) with electrospray ionization operated in positive ion mode. Spray voltage of 5000 V, sheath gas (nitrogen) flow rate of 26 arbitrary units, and auxiliary gas flow rate of 5 arbitrary units were used. The capillary temperature was set to 350 °C. Selected reaction monitoring (SRM) was performed and the scan time (maximum injection time) was set to 50 ms. The *m/z* values for the precursors, fragment ions, and collision energies for all drugs are shown in Table 1.

The LC method used for the phospholipids measurements is described in detail in [13]. The mass spectrometer was operated using in-source fragmentation and selected reaction monitoring of the phospholipid specific transition *m/z* 184 → 184 as described in [17]. The ESI was operated in positive mode, with a source fragmentation energy of 65 V and a collision energy of 10%.

2.6. Method validation

The method validation experiments were as far as possible performed according to the European Medicine Agency (EMA) guidelines [18]. The calibration curves were made of minimum seven levels covering the therapeutic ranges of the drugs, and with minimum five replicates at each level. The accuracy and precision were calculated from four concentration levels with minimum five replicates at each level. The recoveries were determined according to the following equation:

$$RE = \frac{A}{B} \times 100\% \quad (1)$$

where A is the peak area obtained from an extract of a pre-extraction spiked sample and B is the peak area obtained from a

standard spiked after extraction into plasma extracts. The lower limit of detection (LOD) and lower limit of quantification (LLOQ) were calculated by extrapolation of the calibration curves. The matrix effects were calculated as follows:

$$ME = \frac{B}{C} \times 100\% \quad (2)$$

where C is the peak area obtained from neat standard solution.

3. Results and discussion

The drug analytes included in this study were chosen as model analytes based on their physicochemical properties (Table 2). The drug analytes were all basic compounds with pKa values in the range 6.4–9.7, and log P values below 1.3.




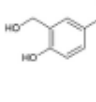

3.1. Method optimization from aqueous samples

Earlier studies with PALME of basic drug analytes have shown that the polarity of the drug analytes plays an important role regards to the extraction efficiency [12]. Uncharged drug analytes with log P > 2 are easily extracted from the aqueous sample, through the SLM and into the acceptor solution. This is a process driven by passive diffusion and facilitated mainly by a pH difference between the sample and the acceptor solution. The composition of the SLM in extraction of hydrophobic drugs is usually a pure solvent without any additives [12]. The aim of the present study was to examine the extraction of more polar drug analytes in the PALME system.

Initially, the drug analytes were extracted in a standard PALME setup from an alkalinized aqueous sample in order to keep the drug analytes uncharged (pH ~ 12). With 100% 1-octanol as the organic solvent, the recoveries were almost zero for all the drug analytes. Addition of a carrier molecule, 2-di(ethylhexyl) phosphate (DEHP), to the SLM did not improve the extraction recoveries, and it was concluded that the drug analytes were unable to penetrate the SLM in their uncharged form. This was due to their polar character. In order to facilitate ion pairing of analyte molecules and DEHP at the interface between the sample and the SLM, pH in the sample was adjusted to pH ~ 7 using a 25 mM phosphate buffer. As the drug analytes were charged, they were now capable of forming ion pairs with the DEHP molecules. In this case, all the drug analytes were detected in the acceptor solution, with extraction recoveries in the range 18–93%. Hence, it was proven that the extraction was

Please cite this article in press as: V. Pilařová, et al., One-step extraction of polar drugs from plasma by Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction, J. Chromatogr. B (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.019>

Table 2
Physicochemical properties and structures of the drug analytes included in the study.

Drug	Molecular formula	MW	Log P ^a	pK _a ^b	Structure formula	Degree of protein binding ^c
Hydralazine	C ₉ H ₈ N ₄	160.07	0.75	6.40		87%
Ephedrine	C ₁₀ H ₁₅ NO	165.11	1.32	9.52		NA
Metaraminol	C ₉ H ₁₃ NO ₂	167.09	-0.05	9.68		45%
Salbutamol	C ₁₃ H ₂₁ NO ₂	239.15	0.34	9.40		10%
Cimetidine	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ S	252.11	-0.29	6.72		20%

NA: Not available.

^a Data obtained from www.chemicalize.org (23/05/16).^b Data obtained from www.drugbank.ca. (23/05/16).**Table 3**
Different organic solvents combined with 15% DEHP. (Sample volume 250 μL; pH in sample ~7; organic solvent volume 2.5 μL; acceptor solution 50 μL 50 mM HCl; extraction time 30 min; 900 rpm).

Organic solvent	Recovery% (RSD%) ^a				
	Hydralazine	Ephedrine	Metaraminol	Salbutamol	Cimetidine
Dodecyl acetate	16 (5)	94 (1)	20 (4)	9 (7)	7 (8)
Dihexyl ether	16 (8)	86 (9)	12 (27)	9 (46)	9 (36)
2-Hexyl decanol	12 (8)	80 (8)	40 (3)	12 (9)	16 (17)
2-Nonanone	18 (7)	96 (2)	88 (3)	89 (2)	69 (6)
Hexadecane	6 (6)	18 (2)	ND	ND	ND
1-Octanol	76 (7)	42 (9)	79 (13)	28 (25)	89 (5)

ND: Not detected.

^a n=4.**Table 4**
The effect of acceptor solution (Sample volume 250 μL; pH in sample ~7; organic solvent 2.5 μL 15% DEHP in 2-nonanone; extraction time 30 min; 900 rpm).

Acceptor concentration (mM)	Recovery% (RSD%) ^a				
	Hydralazine	Ephedrine	Metaraminol	Salbutamol	Cimetidine
TFA					
10	0	32 (14)	50 (19)	45 (12)	46 (7)
50	13 (27)	100 (14)	119 (6)	104 (4)	88 (7)
100	17 (8)	100 (1)	136 (11)	108 (5)	89 (6)
150	19 (4)	90 (4)	112 (13)	84 (10)	81 (9)
200	17 (3)	73 (3)	84 (8)	47 (11)	39 (7)
FA					
10	0	36 (23)	41 (24)	48 (17)	45 (7)
100	1 (23)	39 (6)	55 (5)	70 (4)	76 (5)
200	3 (23)	53 (14)	58 (9)	72 (6)	76 (9)
500	6 (22)	60 (1)	70 (4)	69 (7)	73 (4)
1000	8 (12)	62 (3)	69 (7)	53 (3)	58 (4)

^a n=3.Please cite this article in press as: V. Pilařová, et al., One-step extraction of polar drugs from plasma by Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction, J. Chromatogr. B (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.019>

promoted by ion pair formation between drug analyte and ion pair reagent. Lowering the pH value from seven did not result in further improvement of recoveries. Thus, pH ~ 7 was chosen in the rest of the experiments.

In a next experiment, some common organic solvents used as SLM were tested in combination with DEHP (Table 3) as alternatives to 1-octanol. The different organic solvents revealed large variations in the recoveries. Amongst the organic solvents tested, 15% DEHP in 2-nonanone were found to be the most efficient SLM based on overall high recoveries and low RSD values, and this combination was used in the rest of the experiments.

Despite of the relatively similar physicochemical properties between hydralazine and the other analytes included in the study, the extraction efficiency for hydralazine with 15% DEHP in 2-nonanone was low. In order to examine this observation, the sample solution was analyzed after extraction in order to establish a mass balance calculation. The results showed that 18% of the original amount of hydralazine was found in the acceptor solution, and 35% were still left in the sample. Thus, approximately 47% was probably trapped in the SLM. An exact explanation for this was not found, but the experiment point out that analyte trapping in the SLM may be an issue for certain analytes.

In following experiments, the pH value and the chemical composition of the acceptor solution was investigated. In order to get an optimal release of the analyte from the ion pair complex at the SLM/acceptor solution surface, the proton concentration in the acceptor solution should be relatively high. In addition, the

acceptor solution should be LC–MS compatible. Based on these criteria, formic acid (FA) and trifluoro acetic acid (TFA) were tested in different concentrations and the results are shown in Table 4. The results were all over better for TFA compared to FA. One possible explanation for this could be a possible ion pairing effect between TFA and the basic analyte at the SLM/acceptor surface, and thus more effective release of the analyte from the ion pair complex in the SLM. In other words, TFA was probably more efficient as a result of ion exchange. Finally, 150 mM TFA was used as the acceptor solution in the further work to maximize the recoveries.

3.2. Method optimization from human plasma

The optimized PALME conditions from aqueous samples were applied to human plasma samples. The optimal conditions from aqueous samples were as follows; drug analytes spiked in 25 mM phosphate buffer pH 7.0, 2.5 μ L 15% DEHP in 2-nonanone as the SLM, 50 μ L 150 mM TFA as the acceptor solution, 30 min extraction time, and convection of 900 rpm. With those conditions applied to a plasma sample diluted 1:1 with 25 mM phosphate buffer, the recoveries were in the range 10–79%. The lower recoveries compared to aqueous samples were probably caused by protein binding of the drug analytes or the higher viscosity of the sample solution. In both cases, slower extraction kinetics can cause lower recoveries at the given extraction time (30 min). Therefore, the first attempt to increase the recoveries was to increase the extraction time. An increase of the extraction time to 45 min yielded a general increase

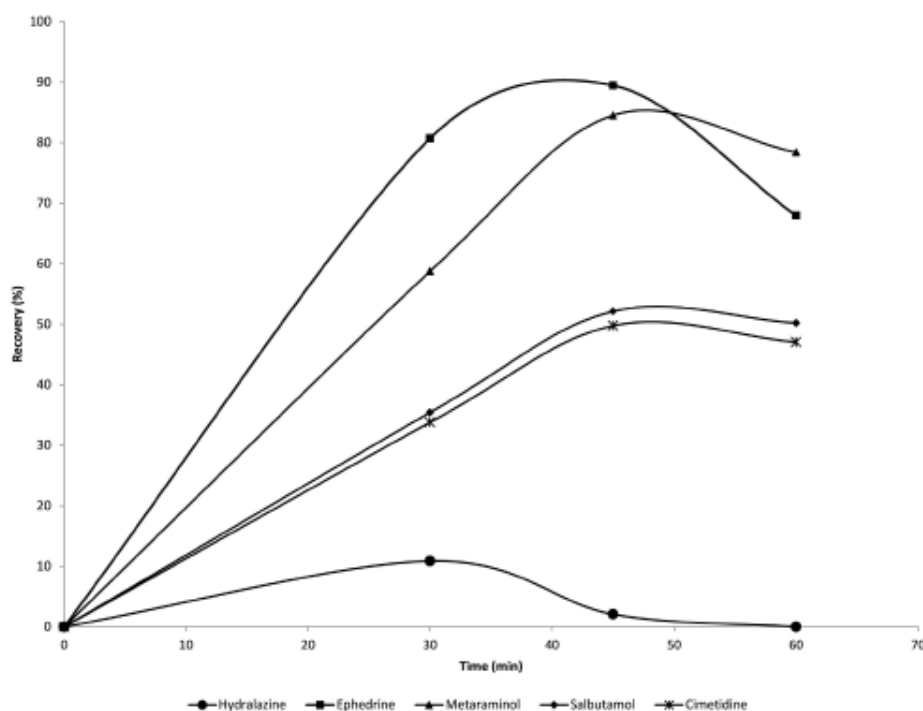


Fig. 2. Optimization of extraction time from human plasma (sample volume: 250 μ L (plasma:phosphate buffer 1:1); acceptor volume: 50 μ L 150 mM TFA; SLM: 2.5 μ L 15% (v/v) DEHP in 2-nonanone; convection: 900 rpm; n=4).

Please cite this article in press as: V. Pilařová, et al., One-step extraction of polar drugs from plasma by Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction, J. Chromatogr. B (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.019>

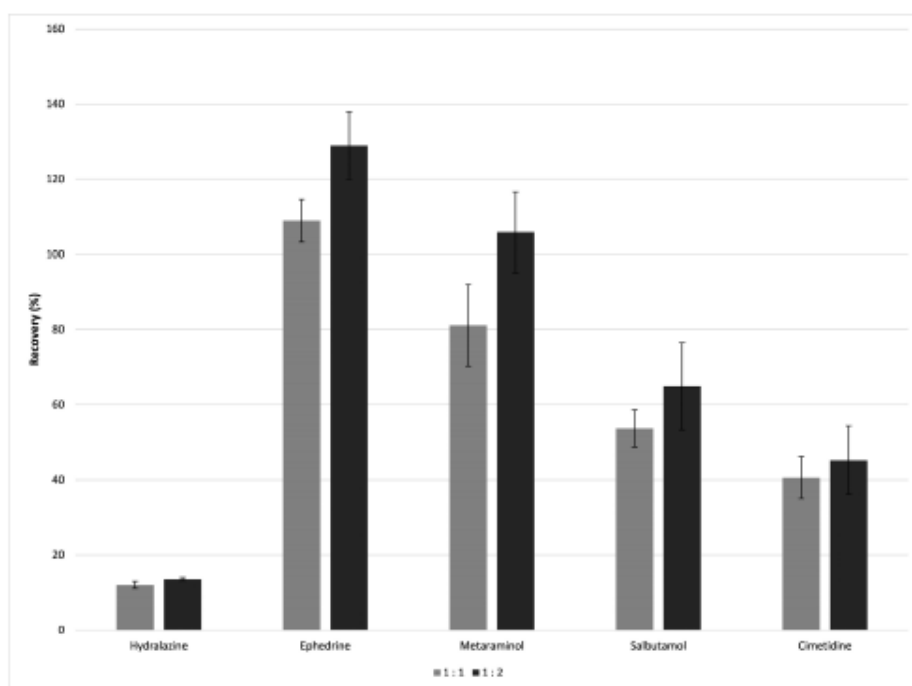


Fig. 3. The effect of plasma dilution (diluted with 50 mM phosphate buffer pH 7.0, drug concentration in plasma 500 ng/mL; SLM: 15% (v/v) DEHP in 2-nonanone, acceptor: 50 μ L 150 mM TFA; extraction time 45 min; n = 3).

of the recoveries except for hydralazine (Fig. 2). A further increase up to 60 min did not gain any further increase of the recoveries, and 45 min was therefore used as the final extraction time. The recoveries in this system were 2% (hydralazine); 89% (ephedrine); 85% (metaraminol); 52% (salbutamol); and 50% (cimetidine), respectively. Further attempts to increase the recoveries from plasma included testing of different sample dilution ratios and different molarities of the phosphate buffer used for dilution. Optimal conditions were found to be a phosphate buffer concentration of 50 mM (data not shown) and with a dilution of plasma:buffer 1:2 (v/v) (Fig. 3). Increased dilution of the plasma samples decreased viscosity and suppressed protein binding of the drug analytes. To sum up, the optimal conditions for extraction of plasma samples were: a total sample volume of 250 μ L comprising plasma mixed with 50 mM phosphate buffer pH 7 (1:2, v/v); 2.5 μ L 15% DEHP in 2-nonanone as the organic solvent; 50 μ L 150 mM TFA as acceptor solution; and agitation of 900 rpm during 45 min extraction time.

3.3. Phospholipid removal

As phospholipids in plasma are well-known for causing possible matrix effects in LC-MS/MS, an optimal sample preparation method should include removal or exclusion of phospholipids from the final extract injected into the LC-MS/MS system. In order to check whether the PALME system optimized for polar drugs was capable of phospholipid removal from the plasma samples or not, an extract from PALME from a blank plasma sample was

analyzed on LC-MS/MS using the phospholipid specific transition m/z 184 \rightarrow 184 [17]. The chromatogram obtained from the PALME extract was compared with a chromatogram from analysis of a supernatant obtained from a protein precipitation procedure, and from analysis of blank mobile phase, respectively (Fig. 4). The chromatograms clearly show that in PALME of polar basic drugs with a carrier in the membrane, phospholipids are not extracted into the final extract. The physical and chemical barrier made up by the SLM is an effective tool for a selective cleanup procedure from human plasma. This finding is also in accordance with earlier experiments with phospholipid removal by PALME, which showed that phospholipids are effectively excluded from the extracts both in extraction of hydrophobic basic and acidic drugs, respectively [13].

3.4. Method validation

The optimized and final PALME system as reported in Section 3.2, was finally subjected to a method validation in combination with LC-MS and according to the Guideline on bioanalytical method validation from European Medicine Agency (EMA) [18]. Linearity, accuracy, and precision were included in the validation protocol. In addition, the linearity curves were extrapolated to calculate limit of detection (LOD) and lower limit of quantification (LLOQ). The results from the method validation are summarized in Table 5. According to the EMA guidelines, level 1 (L1) refers to the lower limit of quantification (LLOQ); L2 is a concentration of 2–3 times LLOQ; L3 is a concentration of 30–50% of the linear range and

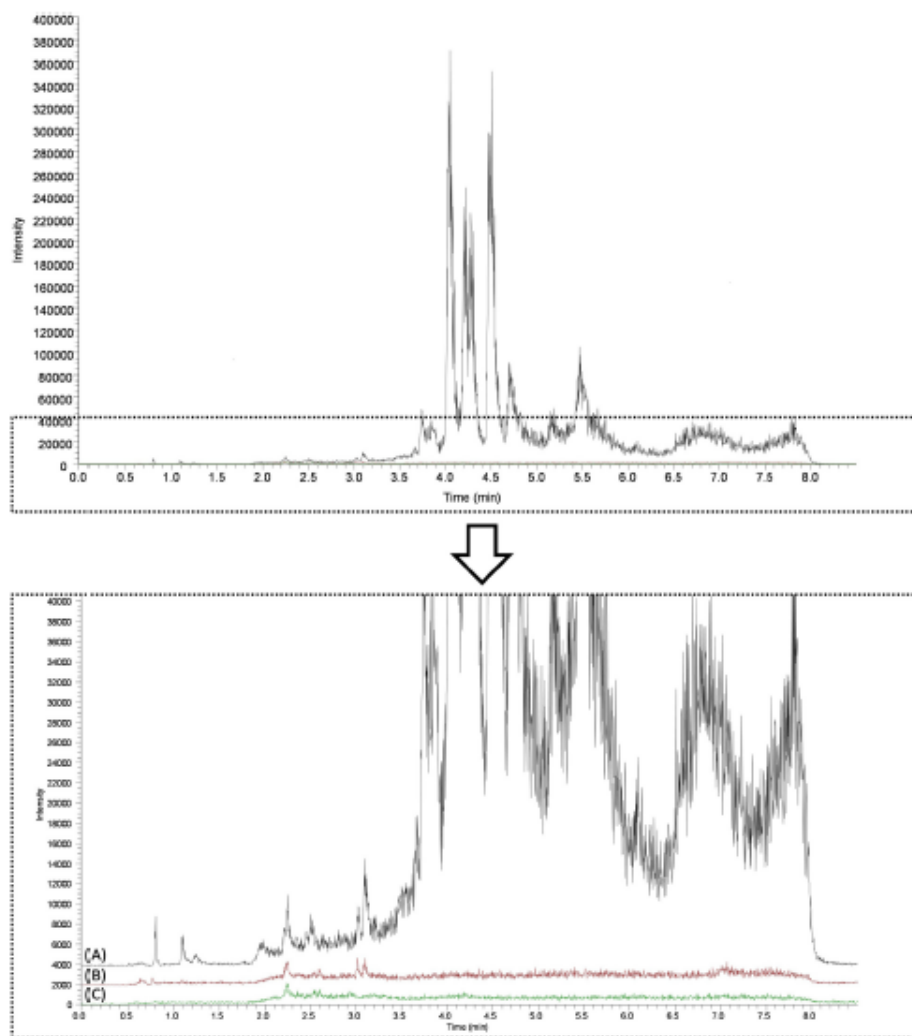


Fig. 4. Phospholipid removal of PALME. Chromatogram (A) is obtained from a supernatant after protein precipitation; chromatogram (B) is obtained from a PALME extract from human plasma and chromatogram (C) is obtained from an injection of blank mobile phase.

L4 is about 70–75% of the linear range. The r^2 values given in Table 5 are obtained by usage of quadratic curve adaption, weighted with $1/x$. The accuracy is a comparison of the obtained concentration of a quality control sample (QC) with the nominal concentrations from the calibration curve (calibrators), and is reported as percent of the nominal value. In the present study, the accuracy was tested as a within-run accuracy. According to the EMA guidelines the mean concentration should be within 15% of the nominal values, except for the LLOQ which should be within 20% [18]. Except

for L1 for salbutamol, all the values are within the EMA criteria, and the within-run accuracy is found to be satisfactory.

The absolute matrix effects, calculated from Eq. (2), are given in Table 5. In general, the results are satisfactory, except for hydralazine. The reason for that is unknown, but it could be a stability problem of hydralazine. However, that is outside the scope of this evaluation.

The precision (within-run), or the closeness of repeated individual measurements of the analyte, was calculated as the relative

Please cite this article in press as: V. Pilařová, et al., One-step extraction of polar drugs from plasma by Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction, J. Chromatogr. B (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.09.019>

Table 5

Validation data (Sample: 250 µL (plasma:phosphate buffer 1:1); pH in sample -7; organic solvent volume 2.5 µL; acceptor solution 50 µL 150 mM TFA; extraction time 45 min; 900 rpm).

	Hydralazine	Ephedrine	Metaraminol	Salbutamol	Cimetidine	
Calibration curve range (ng/mL)	50–1000	10–500	10–500	25–1000	25–1000	10–1000
Calibration equation	$y = -0,0122x^2 + 23,938x - 1093,2$	$y = -0,1169x^2 + 699,5x + 914,62$	$y = -0,0055x^2 + 26,476x - 227,48$	$y = 0,033x^2 - 1,4279x + 1615$	$y = -0,0652x^2 + 295,96x - 3295,2$	$y = -0,0652x^2 + 295,96x - 3295,2$
Calibration curve (r^2)	0,9959	0,9995	0,9995	0,9995	0,9910	0,9978
Concentration levels (ng/mL) (n)	L1 L2 L3 L4	50 (8) 100 (6) 500 (6) 750 (6)	10 (5) 25 (5) 100 (8) 250 (7)	25 (6) 75 (8) 250 (6) 750 (6)	25 (6) 75 (6) 250 (6) 750 (6)	25 (6) 75 (6) 250 (7) 750 (6)
Accuracy (%)	L1 L2 L3 L4	114,2 105,1 84,3 92,0	113,9 102,1 99,9 107,2	102,6 89,8 110,8 109,0	120,8 94,9 116,6 107,9	81,2 108,6 112,8 113,0
Precision (RSD%)	L1 L2 L3 L4	17,5 15,7 14,3 11,0	10,6 13,9 5,4 13,4	5,0 8,1 6,8 11,2	13,5 5,2 7,0 7,8	6,1 11,4 13,2 9,8
Matrix effects (%)	L1 L2 L3 L4	80,0 80,3 85,1 89,8	128,5 107,0 103,6 120,8	102,6 118,6 97,5 120,6	107,5 109,5 102,7 114,5	109,4 104,3 99,4 102,3

standard deviation (RSD, %) from the different concentration values in the range of matrix calibration curve. According to the EMA requirements, the RSD value should not exceed 15% for the QC samples, except from the LLOQ which should not exceed 20%. As seen from Table 5, the results are acceptable and within the EMA requirements.

4. Conclusion

In the present work, carrier-mediated parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) was demonstrated from human plasma samples for the first time. In spite of the geometrical differences between HF-LPME and PALME, the latter provided close to exhaustive extraction ($\geq 90\%$) for most of the model analytes studied. Different important extraction parameters were optimized, and when combined with LC-MS, the evaluation data were in accordance with EMA guideline requirements. In addition, the great potential PALME offers considering phospholipid removal was demonstrated. The resulting knowledge could be highly beneficial for future development and optimization of different PALME applications for polar basic drugs.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Bilateral Scholarship Programme EEA and Norway grants, project No. NF-CZ07-INS-4-046-2014 and the Project of Specific research, SVV 260 292 (2016). The authors also want to thank the Research

Council of Norway for the support of parts of this project (NFR 234396).

References

- [1] S. Ramagiri, Column 11 (2015) 31.
- [2] D. Raynie, LCGC North-Am. 34 (2016) 174.
- [3] C. Ribeiro, A.R. Ribeiro, A.S. Maia, V.M.F. Gonçalves, M.E. Tiritan, Crit. Rev. Anal. Chem. 44 (2014) 142.
- [4] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, TrAC-Trend Anal. Chem. 29 (2010) 617.
- [5] E.A. Souza-Silva, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Rijos, E. Boyaci, B. Bojko, J. Pawliszyn, TrAC-Trend Anal. Chem. 71 (2015) 240.
- [6] C. Nazyropoulou, V. Samanidou, Bioanalysis 7 (2015) 2241.
- [7] J.M.F. Nogueira, TrAC-Trend Anal. Chem. 71 (2015) 214.
- [8] M.M. Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, TrAC-Trend Anal. Chem. 67 (2015) 34.
- [9] G. Alves, M. Rodrigues, A. Fortuna, A. Falcao, J. Queiruz, Bioanalysis 5 (2013) 1409.
- [10] A. Spletelun, Ł. Marcinkowski, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Talanta 119 (2014) 34.
- [11] J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M.Á. Bello-López, M. Ramos-Payán, Anal. Chim. Acta 905 (2016) 8.
- [12] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, M.P. Farmer, S. Pedersen-Bjergaard, Bioanalysis 5 (2013) 1377.
- [13] K.S. Ask, T. Bardakci, M.P. Farmer, T.G. Halvorsen, E.L. Ønstad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, J. Pharm. Biomed. 129 (2016) 229.
- [14] B. Hu, M. He, B. Chen, L. Xia, Spectrochim. Acta B 86 (2013) 14.
- [15] M. Roldán-Pijuán, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 2811.
- [16] T.S. Ho, T.G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, J. Chromatogr. A 998 (2003) 61.
- [17] J. Little, M. Wempe, C. Buchanan, J. Chromatogr. B 833 (2006) 219.
- [18] Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, (2011).

8.3 Příloha 3

Intravenous rutin in rat exacerbates isoprenaline-induced cardiotoxicity likely due to intracellular oxidative stress.

T. Filipský, M. Říha, P. Hašková, V. Pilařová, L. Nováková, V. Semecký, J. Vávrová, M.

Holečková, V. Palicka, T. Šimůnek, R. Hrdina, P. Mladěnka.

Redox Report 21 (2016) 1 - 13 (citováno: Ox; IF₂₀₁₅ – 2,606) – „proofs“

Intravenous rutin in rat exacerbates isoprenaline-induced cardiotoxicity likely due to intracellular oxidative stress

Tomáš Filipický¹, Michal Říha¹, Pavlína Hašková², Veronika Pilařová³, Lucie Nováková³, Vladimír Semecký⁴, Jaroslava Vávrová^{5,6}, Magdaléna Holečková^{5,6}, Vladimír Palicka^{5,6}, Tomáš Šimůnek², Radomír Hrdina¹, Přemysl Mladěnka¹

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Czech Republic, ²Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Czech Republic, ³Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Czech Republic, ⁴Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Czech Republic, ⁵Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Šimkova 870, 500 38 Czech Republic, ⁶University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Czech Republic

Objectives: Rutin, quercetin-3-O-rutinoside, a natural flavonol glycoside, has shown various *in vitro* benefits with potential use treating human diseases, especially cardiovascular system disorders. Antioxidant properties are assumed to underlie the majority of these benefits. Yet rutin pro-oxidant properties have been reported as well. Our research group has recently shown aggravating effects on isoprenaline (ISO)-induced cardiotoxicity in Wistar:Han rats after 24 hours.

Methods: This study was designed to examine in more detail the reasons for the negative effects of rutin (11.5 and 46 mg/kg, i.v.) after administration of ISO (100 mg/kg, s.c.) in rats within 2 hours of continuous experiment and in the H9c2 cardiomyoblast-derived cell line.

Results: Like our previous findings, rutin did not (11.5 or 46 mg/kg, i.v.) reduce the ISO-induced mortality within 2 hours although the lower dose significantly reduced cardiac troponin T (cTnT) and partly improved the histological findings. In contrast, the higher dose increased the mortality in comparison with solvent (1.26% w/v sodium bicarbonate). This was not caused by any specific haemodynamic disturbances. It appears to be associated with oxidative stress as rutin enhanced intracellular reactive oxygen species formation *in vitro* and had the tendency to increase it *in vivo*.

Conclusions: Rutin, likely due to its pro-oxidative effects, can exacerbate catecholamine cardiotoxicity depending on the dose used.

Keywords: Catecholamine, Isoprenaline, Flavonoid, Rutin, Wistar rat, H9c2 cell line, Reactive oxygen species

Introduction

Flavonoids, which are ubiquitous plant polyphenolic secondary metabolites, are an integral part of the human diet.^{1,2} Recent epidemiological studies have evaluated the relationship between flavonoid intake and benefits in case of various pathologies including those of the cardiovascular system.²⁻⁴ The proposed benefits are probably caused by combination of reactive oxygen species (ROS) scavenging activity, iron/copper chelation, inhibition of free radical-forming enzymes, decrease in expression of inflammatory

signalling molecules, and other factors like direct vasodilatory and antiplatelet potential.⁵⁻¹¹ However, flavonoids can have pro-oxidative effects as well. These could be based on their transient metal-reducing potential and consequent increase in formation of the hydroxyl radical *via* Fenton reaction.¹²⁻¹⁴

The endogenous catecholamines are hormones and neurotransmitters in the sympathetic and central nervous systems. However, excessive concentrations can trigger acute myocardial infarction (AMI).^{15,16} Interestingly, a cardiotoxic dose of the synthetic non-selective β -agonist isoprenaline (isoproterenol, ISO) induces a pathological state which resembles the acute phase of AMI as shown by marked release in

Correspondence to: Přemysl Mladěnka, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Czech Republic. Email: mladenkap@faf.cuni.cz

cardiac troponin T (cTnT), calcium overload, ST segment (J-point) elevation, R amplitude decrease, and histopathological disturbances.^{17–23} Although the pathogenesis of ISO-induced cardiotoxicity is multifactorial, overstimulation of β -adrenoceptors, auto-oxidation of catecholamines followed by formation of ROS, energy metabolism dysfunction, microthrombi formation, and membrane permeability alterations play substantial roles.^{16–18,21,24,25}

Stanley Mainzen Prince and coworkers^{26–29} reported that oral pre-treatment with rutin (40 or 80 mg/kg/day, 42 days, p.o.) had broad preventive effects on various aspects of ISO-induced cardiotoxicity (150 mg/kg/day, 2 days, s.c.) in rats. Similarly, administration of quercetin (10 mg/kg/day, 7 days, p.o.) appeared to be protective against cardiotoxic doses of ISO as well (100 mg/kg/day, respectively 85 mg/kg/day, s.c., 2 days).³⁰ The beneficial effects of the flavonols were particularly associated with their antioxidant, lipid-lowering, mitochondrial structure and function improving, and membrane stabilizing properties. However, Stanley Mainzen Prince and coworkers did not show data on rat survival, haemodynamics, arrhythmias after administration of cardiotoxic doses of ISO, and pharmacokinetics of the flavonoids.

On the other hand, our research group found that a single i.v. dose of rutin in rats either had no effect (11.5 mg/kg) or aggravated (46 mg/kg) ISO-induced cardiotoxicity (100 mg/kg, s.c.) after 24 hours.³¹ Since such effects are in clear contrast to the foregoing studies, we reanalysed the effects of quercetin on ISO-induced cardiotoxicity. We used the same experimental design as Prince and Sathya³⁰ and we evaluated survival, haemodynamic, and ECG variables as well. Surprisingly, we found that oral administration of quercetin did not ameliorate ISO-induced cardiotoxicity.³²

We decided to return to the issue of the i.v. administered rutin and to analyse the reason for higher mortality rate in rats receiving rutin as a premedication. This study was aimed at detailed comparison of the early pathophysiological effects of administered rutin (11.5 and 46 mg/kg, i.v.) on ISO-induced cardiotoxicity (100 mg/kg, s.c.) to explain the mechanisms of its direct negative effects.

Material and methods

Chemicals

Rutin hydrate, sodium bicarbonate, ISO hydrochloride, and urethane were purchased from Sigma-Aldrich Inc. (USA). Water for injection was purchased from Braun (Germany). Ultrapure water was produced by Milli-Q RG (Merck Millipore, USA).

In vivo studies using Wistar:Han rats

Wistar:Han male rats (MediTox, Czech Republic) were kept in an air-conditioned room at constant temperature and humidity. They had free access to a standard pellet diet for rodents (Velaz, Czech Republic) and tap water. After 2 weeks of acclimatization, the rats were deprived of food for 12 hours before the experiments.

The study was approved by the Ethics Committee of Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové (Study No. MŠMT 2437/2012-30), and it conformed to the guide for the care and use of laboratory animals published by The US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Haemodynamic study

Rats weighing on average 392 g were randomly divided into nine groups:

- control groups received i.v. either sodium bicarbonate dissolved in water for injection (1.26% w/v, the solvent) or rutin dissolved in a solution of sodium bicarbonate as a slow bolus: (a) sodium bicarbonate – 2.3 ml/kg (SB2.3, six rats), (b) sodium bicarbonate – 4.6 ml/kg (SB4.6, six rats), (c) rutin – 11.5 mg/kg (2.3 ml/kg, Ru11.5, six rats), and (d) rutin – 46 mg/kg (4.6 ml/kg, Ru46, six rats). The higher dose of rutin was an equimolar dose to the clinical dose of the standard iron chelator – deferoxamine (50 mg/kg) and was chosen to enable comparison with other compounds.
- ISO groups received i.v. either a solution of sodium bicarbonate, a solution of rutin, as described above, or saline (S, 4.6 ml/kg), and a freshly prepared solution of ISO dissolved in water for injection 5 minutes later (100 mg/kg, s.c.): (a) SB2.3+ISO (nine rats), (b) SB4.6+ISO (seven rats), (c) Ru11.5+ISO (seven rats), and (d) Ru46+ISO (seven rats), and (e) S4.6+ISO (nine rats).

All rats were anaesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.) before surgery and recording procedures were as described in our previous studies.^{33,34} Briefly, a pressure transducer MLT0380/D (AdInstruments, Australia) was connected via a polyethylene catheter 0.5/1.0 mm (filled with heparinized saline 10 IU/ml) to the left common iliac artery. A high-fidelity pressure-volume micromanometer catheter (Millar PV-catheter SPR-838 2F, 4E, 9 mm; Millar Instruments Inc., USA) was inserted into the left ventricle via the right common carotid artery. The pressure transducer and Millar PV-catheter, together with s.c. electrodes for the ECG standard limb lead II (MLA1215, AdInstruments), were connected to the PowerLab apparatus equipped with software LabChart 7 (AdInstruments). After 15 minutes of equilibration, the drug formulation/solvent was administered as a slow i.v. bolus via the saphenous vein (400 μ l/

225 minute; 'Genie' Kent syringe pump, Kent Scientific Corporation, USA). ISO was administered s.c. 5 minutes later if indicated. Haemodynamic and ECG variables were then recorded continuously for 2 hours. The results were calculated as the percent change vs. baseline level (at time 0 minute, before ISO administration). The temperature was maintained at $36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (TCAT-2LV Controller, Physitem Instruments Inc., USA). All calibrations were performed as described.³³

235 At the end of the experiment, blood samples were collected from the abdominal aorta into a heparinized tube (BD Vacutainer, BD, USA) and surviving rats were sacrificed using 1 M aqueous solution of potassium chloride (i.v., Sigma-Aldrich Inc., USA). 240 Afterwards, the heart was excised and weighed. The wet ventricles weight was expressed as an index, i.e. weight of ventricles in grams divided by body weight in grams, and expressed in per thousand (‰). The apical part of the heart was separated for further histological analysis and the base part was frozen at -20°C 245 for further biochemical analysis as follows.

Biochemical analysis

250 cTnT, vitamin E, and vitamin C were measured in serum. cTnT was determined using electrochemiluminescence immunoassay which uses two monoclonal antibodies specifically targeted against cTnT (Elecys 2010, Roche, Czech Republic). After deproteinization, vitamin E was analysed fluorimetrically using the HPLC system LC-10A (Shimadzu, Japan). Vitamin C was determined using capillary electrophoresis followed by UV detection (System P/ACE 5100, Beckman Coulter Inc.).

260 Frozen samples of the base part of the heart were dried, weighed, and digested by microwave digestion using nitric acid and hydrogen peroxide (Milestone MLS 1200 MEGA, Milestone Corporation, Italy). Calcium was determined photometrically using flame photometry (Efox 5053, Eppendorf, Germany). Copper was analysed using graphite furnace atomic absorption spectrometry (Unicam, Solaar 959, UK) and zinc was determined using flame atomic absorption spectrometry (Solaar 959, Unicam, UK).

Histological analysis

275 The excised heart ventricles were rapidly fixed in cold 10% buffered neutral formalin solution for at least 24 hours. After fixation, a heart tissue block was processed using the conventional paraffin-embedding technique. Paraffin sections $5-7\ \mu\text{m}$ were stained with haematoxylin-eosin and Goldner's green trichrome.

280 The heart tissue was fixed by immersion in 3% glutaraldehyde, postfixed in 1% OsO_4 (both in phosphate buffer at pH 7.2-7.4), dehydrated in acetone and

propylene oxide, and embedded in the resin mixture Durcupan ACM and Epon 812. Semi-thin sections about $1\ \mu\text{m}$ were cut on the ultramicrotome LKB and stained with toluidine blue.

285 Evaluation of pathological changes included focal cardiomyocyte damage or small multifocal degeneration with mild degree of inflammatory process, extensive myofibrillar degeneration and/or diffuse inflammatory process, and necrosis with diffuse inflammatory process. For the topographic localization of the heart tissue we used a semi-quantitative scale as follows: (-) absence of pathological changes, (+) mild, (++) moderate, and (+++) marked changes. Photo documentation and image digitizing were performed using the light microscope, 295 OLYMPUS AX-70 (Olympus Ltd, Japan), using a digital camera, Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., Canada) and an image analysis software, NIS - ELEMENTS AR 3.2 (Laboratory Imaging, Czech Republic). 300

Glutathione in whole blood

305 Rats weighing on average 380 g were randomly divided into eight groups of four rats each and the same experimental design as described above, i.e. control groups: (a) SB2.3, (b) SB4.6, (c) Ru11.5, and (d) Ru46; and ISO groups: (a) SB2.3+ISO, (b) SB4.6+ISO, (c) Ru11.5+ISO, and (d) Ru46+ISO.

310 The rats were anaesthetized using urethane and the left common iliac artery was cannulated for blood withdrawal. After 15 minutes of equilibration, the drug formulation/solvent was administered as a slow i.v. bolus via the saphenous vein using the same infusion rate as described above. ISO was administered 315 s.c. 5 minutes later if indicated. Whole blood ($150\ \mu\text{l}$) was collected into a heparinized tube (BD Vacutainer, BD, USA) at the predefined time intervals following the administration of ISO (0, 1, 5, 15, 30, 60, and 120 minutes). Immediately after the sampling, 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethanesulphonate (Oxis Research, USA) was added to the blood samples for analysis of oxidized glutathione (GSSG) to prevent spontaneous glutathione oxidation. 320 Afterwards, the samples of oxidized and total glutathione (GSH_t) were stored at -80°C until analysis. 325

GSSG, ratio of reduced and oxidized glutathione (GSH/GSSG ratio), and GSH_t were determined colorimetrically using the BIOXYTECH GSH/GSSG-412 kit according to the instructions of the manufacturer (Item No. 21040, Oxis Research, USA) and a spectrophotometer Helios Gamma equipped with VisionLite Software 2.2 (ThermoFisher Scientific Inc., USA). The results were calculated as percent of change vs. baseline level (at time 0 minute, before ISO administration). 335

8-Isoprostane in rat plasma

Rats weighing on average 350 g were randomly divided into four groups of four rats involving only the higher dose regimes and the same order as above: SB4.6, Ru46, SB4.6+ISO, and Ru46+ISO.

The administration of the drug formulation/solvent and whole blood withdrawal followed the protocol described above. Whole blood (150 µl) was collected at the predefined time intervals following the administration of ISO (0, 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, and 240 minutes). Immediately after the sampling, blood was centrifuged (1733 × g, 10 minutes, a centrifuge MPW-52, MPW Med. Instruments, Poland) in the presence of 0.005% *tert*-butylhydroxytoluene and plasma was stored at -80°C until analysis.

The free fraction of 8-isoprostane was determined in plasma using the 8-isoprostane EIA kit according to the instructions of the manufacturer (Item No. 516351, Cayman Chemical Company, USA) and a spectrophotometer Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments Inc., USA). The results were calculated as percent of change vs. baseline level (at time 0 minute, before ISO administration).

Pharmacokinetic study

A rat weighing 525 g was anaesthetized with urethane and cannulated for blood withdrawals in the same way as described above. Afterwards, rutin dissolved under the same conditions as above was administered at a dose of 46 mg/kg as a slow i.v. bolus via the saphenous vein using the same infusion rate as in the pharmacodynamic study. Whole blood (150 µl) was sampled at predefined time intervals following the administration of the drug formulation (0, 1, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180, and 240 minutes). Immediately after the sampling, whole blood was centrifuged (2500 × g, 10 minutes; a centrifuge MPW-52, MPW Med. Instruments, Poland) and plasma was stored at -80°C until analysis.

Rutin concentrations in plasma were assessed using the UHPLC-MS/MS method. This was a system consisting of Acquity UPLC (Waters Corporation, Czech Republic) and Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corporation, Czech Republic). The separation was performed on a BEH Shield RP C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 µm) using gradient elution with methanol and 0.1% formic acid. All injected solutions were stored in the autosampler at 4°C. The partial loop with needle overflow mode was set up to inject 5 µl. The analytical column was kept at 40°C by a column oven.

The MS conditions were finely tuned in positive ESI polarity mode as follows: capillary voltage: +3200 V, ion source temperature: 130°C, extractor: 3.0 V, RF lens: 0.5 V. The desolvation gas was nitrogen at a

flow 800 l/hour and at 450°C. Nitrogen was also used as a cone gas (100 l/hour) and argon as a collision gas. Analyses were performed in selected reaction monitoring mode using the precursor ions [M + H]⁺ and the corresponding product ion (610.9 > 303.3). The cone voltage was 20 V, collision energy 25 eV, and the dwell time was 0.2 seconds. MassLynx MS Software 4.1 (Waters Corporation, Czech Republic) was used for MS control and data acquisition. QuanLynx Software (Waters Corporation, Czech Republic) was used for data processing and peak integration. The sample pre-treatment of plasma samples consisted in fast and simple protein precipitation. Plasma (50 µl) was precipitated with 100 µl of acetonitrile. After 10 minutes the samples were centrifuged for 10 minutes. The supernatant was then diluted 200× with a mixture of acetonitrile/water (2:1), filtered through a PTFE membrane with 0.22 µm pores and injected into a UHPLC system.

Pharmacokinetic parameters were calculated by Kinetica 5.1 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) and PKSolver both using the non-compartmental analysis of plasma after the i.v. bolus input and the linear trapezoidal method.³⁵

In vitro studies using H9c2 cell line

The H9c2 cell line derived from embryonic BD1X rat heart tissue was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, USA).³⁶ Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Lonza, Switzerland) supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Lonza, Switzerland), 1% penicillin/streptomycin solution (Lonza, Switzerland), and 10 mM HEPES buffer (pH 7.4; Sigma-Aldrich, USA). Cell cultivation was held in 75 cm² tissue culture flasks from Techno Plastic Products AG (TPP, Switzerland) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. Cells were subcultured twice a week when they reached approximately 90% confluence.

For particular experiments, cells were seeded into appropriate microplates or Petri dishes (TPP, Switzerland) at given cellular density. Twenty-four hours prior to all cellular experiments, the medium was changed for serum-free cell-culture medium (pyruvate-free DMEM, Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 1% penicillin/streptomycin solution (Lonza, Switzerland) and 10 mM HEPES buffer (pH 7.4; Sigma-Aldrich, USA). Serum deprivation was used to stop cellular proliferation to mimic the situation in post-mitotic cardiomyocytes.³⁷ Pyruvate was omitted because it is an antioxidant and could interfere with ROS-related toxicity.

Glutathione in H9c2 cell line

H9c2 cells seeded in Petri dishes (Ø150 mm) at a density of 3 000 000 cells/dish were pre-incubated with rutin (1–1000 µM) and ISO (0.1–1000 µM) was added 5 minutes later. After 2-hour co-incubation, cells were washed twice with ice-cold PBS, harvested by scraper, and centrifuged. Supernatants were discarded, pellets of cells were resuspended in 175 µl of PBS, and aliquots were sampled into microtubes, i.e. (a) 100 µl was mixed with 10 µl of 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethanesulphonate (Oxis Research, USA) preventing the spontaneous oxidation of glutathione for GSSG assessment; (b) 50 µl was used for GSH_i assessment; and (c) 25 µl for protein assessment. Each step was kept on ice. The samples were stored at –80°C until analysis. GSSG, GSH/GSSG ratio, and GSH_i were determined in the same way as in whole blood.

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate assay

To assess intracellular ROS formation, measurement of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA; Molecular Probes, USA) fluorescence intensity was used. This originally non-fluorescent reagent diffuses passively through the cellular membranes, its acetate groups are metabolized by intracellular esterases and then oxidized by ROS formed inside the cell (particularly by hydroxyl radicals) to green-fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF; $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$). The fluorescence intensity is proportional to the intracellular concentration of hydroxyl radical leading to its quantitative measurement.

H9c2 cells seeded in a 96-well plate at a density of 10 000 cells/well were washed twice with ADS buffer (116 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.13 mM NaH₂PO₄, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 20 mM HEPES; pH 7.4) and loaded with 10 µM H₂DCF-DA in ADS buffer. After 60-minute incubation, the buffer was discarded, the cells were washed twice with ADS buffer, and pre-incubated with rutin for 5 minutes. ISO was then added (both in ADS buffer). All solutions were pre-warmed to 37°C. Fluorescence intensity was measured at time 0 and 2 hours of co-incubation at 37°C using a microplate spectrophotometer Tecan Infinite 200 M (Tecan Austria, Austria). Hydrogen peroxide and *tert*-butyl hydroperoxide (*t*BHP) (10–250 µM) were used as positive controls. Intracellular ROS formation after 2 hours was expressed as the percentage of the untreated control (100%).

Statistical analysis

Data are expressed as means ± SEM. Significant outliers were excluded using Grubb's test. Differences were considered significant at $P < 0.05$, unless

indicated otherwise. Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, USA).

Survival was analysed using Kaplan–Meier survival curves and the log-rank test. cTnT, vitamin E and vitamin C, elements in myocardium, wet ventricle weight index, and glutathione and intracellular ROS formation in the H9c2 cell line were evaluated using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. The normality of the data was tested by D'Agostino–Pearson test. Time-dependent variables (haemodynamics, glutathione in whole blood, and 8-isoprostane in rat plasma) were analysed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Results

In an earlier publication we found that a single dose of rutin (46 mg/kg, i.v.) aggravated ISO-induced cardiotoxicity and reduced survival within 24 hours of administration.³¹ In the present study, we firstly analysed the effects of rutin and sodium bicarbonate (the solvent) on ISO-induced mortality. No control rats receiving either the solvent or rutin died in the haemodynamic study. The mortality rate for the ISO groups receiving either sodium bicarbonate at the lower dose or the lower dose of rutin was similar while the higher dose of rutin resulted in a higher mortality rate than the corresponding solvent group. Moreover, there was a clear tendency of the higher dose of the solvent to prevent mortality, but this was not significant in comparison with the lower dose of the solvent (Supplementary material Fig. A.1). Moreover, we did a *post hoc* analysis of the mortality rates (Fig. 1). Even though the *in vivo* studies (haemodynamic study, glutathione in whole blood, and 8-isoprostane in plasma) followed different protocols and the frequent blood withdrawals clearly affected the outcome, the results for 2-hour mortality rate were similar, i.e. the *post hoc* analysis (Fig. 1) and Kaplan–Meier survival curves of the individual *in vivo* studies (Supplementary material Figs. A.1–A.4). Only one rat receiving rutin (without ISO) at a dose of 46 mg/kg died during the 8-isoprostane study after 115 minutes. In general, the frequent blood withdrawals during this 4-hour study were associated with the higher mortality rates (Supplementary material Fig. A.4).

As the solvent, 1.26% sodium bicarbonate, could have affected the results due to its slight alkalinity, we did an additional experiment, in which saline was given in the same volume as the solvent (4.6 ml/kg). There were no significant differences between groups (Supplementary material Fig. A.2).

Based on our previous 24-hour study, in which rutin increased cardiac output dose-dependently after

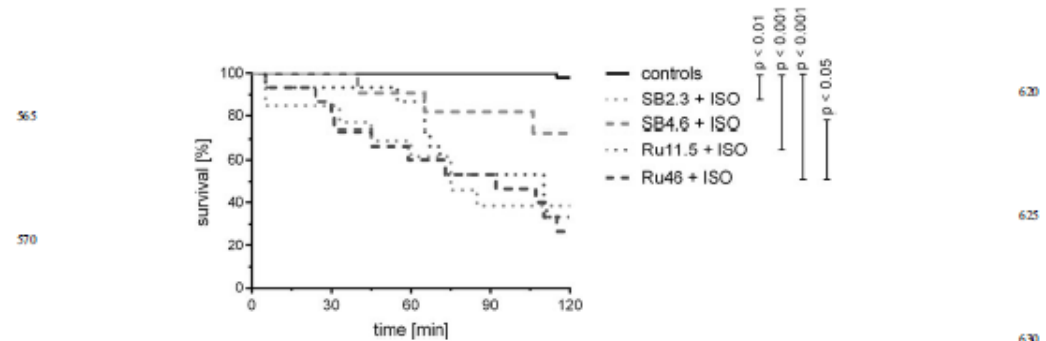


Figure 1 Kaplan-Meier survival curve of all *in vivo* studies involving the administration of the solvent (sodium bicarbonate, SB, 2.3 or 4.6 ml/kg, i.v.) or rutin (Ru, 11.5 or 46 mg/kg, i.v.), i.e. controls, and their combination with ISO (100 mg/kg, s.c.). The statistical analysis was performed using the log-rank test.

24 hours,³¹ and published papers which suggest that flavonoids can decrease blood pressure,³⁸ we assessed haemodynamic variables as these effects could have a negative influence on the early stages of ISO-induced cardiotoxicity. Neither the solvent or rutin themselves nor their combination with ISO significantly modified the haemodynamic variables, in comparison with the corresponding group, during or at the end of the 2-hour continuous recording (Supplementary material Figs. A.5 and A.6). Even if short-term differences were observed for several haemodynamic variables, such fluctuations were apparently caused by increase in intravascular volume rather than a pharmacological action of

rutin itself. Analysing ECG variables, ISO-induced mortality was caused by different types of ventricular dysrhythmias including *torsades de pointes* and AV blocks. There were no specific dysrhythmias in individual groups suggesting rather their coincidence. Moreover, no positive or negative effect of rutin on their frequencies was observed.

In agreement with previously published data, the administration of ISO (100 mg/kg, s.c.) induced a marked release of cTnT into blood. The lower dose of rutin reduced it significantly in comparison with the corresponding ISO group, while there was a dose-dependent tendency of higher dose of rutin to increase cTnT release. However, it was not feasible to assess the hypothesis statistically because of the low survival in the Ru46+ISO group. Interestingly, in agreement with the mortality rate, the higher dose of sodium bicarbonate had a preventive effect, in comparison with the lower dose. Like the mortality, the administration of saline instead of sodium bicarbonate was associated with the same cTnT release. Rats that received the solvent or rutin without ISO had only a negligible cTnT release (Fig. 2). No significant differences were found between serum concentrations of vitamin E and vitamin C (Supplementary material Fig. A.7). Similarly, there were no disturbances in myocardial levels of calcium, copper, or zinc (data not shown).

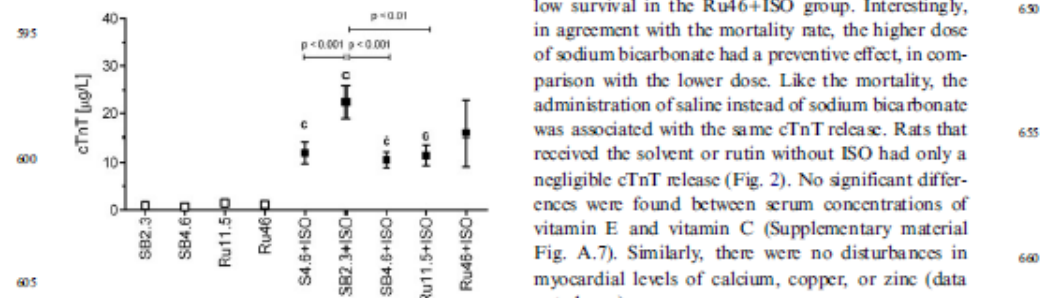


Figure 2 Serum concentration of cTnT after 2-hour haemodynamic study involving the administration of the solvent (sodium bicarbonate, SB, 2.3 or 4.6 ml/kg, i.v.) or rutin (Ru, 11.5 or 46 mg/kg, i.v.), i.e. controls, and their combination with ISO (100 mg/kg, s.c.) including the comparison with saline (S, 4.6 ml/kg, i.v.). Data are expressed as means \pm SEM. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Statistical significance: c vs. the corresponding control group at $P < 0.001$. Because of high mortality in the group Ru46+ISO, its data were not included in the statistical analysis.

The co-administration of sodium bicarbonate and ISO showed massive diffuse inflammatory infiltrations in all parts of the ventricle using haematoxylin-eosin and Goldner's trichrome green stainings after 2-hour haemodynamic study. Indeed, the presence of large quantities of phagocytes, mast cells together with significant interstitial oedema and foci of necrotic cardiomyocytes were observed, confirming significant alterations of the heart tissue (Fig. 3C). Although rutin partly ameliorated some of ISO-induced

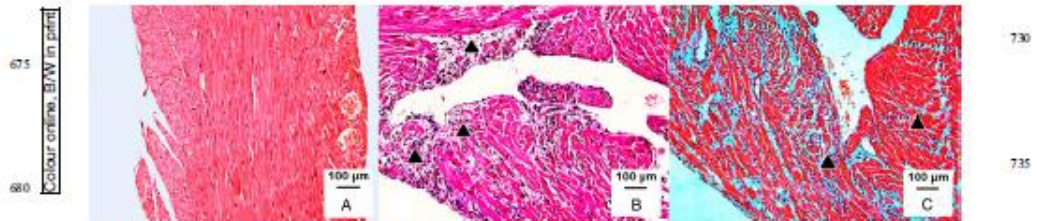


Figure 3 Overview of histological findings in endocardium and myocardium after 2-hour haemodynamic study. Staining: haematoxylin-eosin and Goldner's trichrome green. Representatives of control groups (A; rutin 11.5 mg/kg, i.v.) and ISO groups (100 mg/kg, s.c.) involving a premedication with rutin (B; 11.5 mg/kg, i.v.) or sodium bicarbonate (C; the solvent, 2.3 ml/kg, i.v.). In contrast to normal structural architecture in the control groups (A), marked alterations were found after the administration of ISO (B). Although rutin partly ameliorated histopathological changes, local capillary hyperaemia, mild interstitial oedema with dilation or swelling of cardiomyocytes, and slight inflammatory cell infiltration of phagocytes (▲) were still observed (C). There were no marked differences between the lower dose and the higher dose of rutin, resp. the solvent (not shown).

histopathological changes, local capillary hyperaemia, mild interstitial oedema with dilation or swelling of cardiomyocytes, and slight inflammatory cell infiltration were still found in the endocardium and partially in the pericardium (Fig. 3B, Table 1). The structural architecture of all parts of the ventricle was normal in the control groups with the exception of those for rutin in which a slight local capillary hyperaemia was found (Fig. 3A). It is worth mentioning that no marked differences were observed between the lower dose and the higher dose of rutin and the solvent groups, at all. Moreover, these findings were confirmed at the cellular level using toluidine blue staining

(Supplementary material Fig. A.8). The analysis of wet ventricle weight index showed no significant changes (Supplementary material Fig. A.9).

As haemodynamic study and ECG were unable to explain the reason for the higher mortality, we focused on evaluating oxidative stress. Again, there were no significant changes in GSSG, GSH/GSSG ratio, and GSH_i levels in whole blood after 2 hours. Interestingly, the higher dose of rutin itself increased the level of GSSG, however, there were no significant differences between the control and ISO groups during the experiment (Supplementary material Fig. A.10). For this reason, we used a simpler model –

Table 1 Semi-quantitative analysis of histopathological changes in epicardium, myocardium, and endocardium of left ventricle after 2-hour haemodynamic study

Pathological changes/experimental groups		SB2.3	SB4.6	Ru1.5	Ru46	SB2.3+ISO	SB4.6+ISO	Ru1.5+ISO	Ru46+ISO	
710	Local capillary hyperaemia	Endocardium	-	-	+	+	+++	+++	++	++
	Myocardium	-	-	+	+	+++	+++	+	+	+
715	Interstitial oedema with dilation	Endocardium	-	-	-	+++	+++	++	++	++
		Myocardium	-	-	-	+++	+++	+	+	+
720	Swelling of the binder fibres	Endocardium	-	-	-	+++	+++	++	++	++
		Myocardium	-	-	-	+++	+++	+	+	+
725	Necrotic changes of cardiomyocytes	Endocardium	-	-	-	++	++	+	+	+
		Myocardium	-	-	-	++	++	+/-	+/-	+/-
730	Myofibrils fragmentation	Endocardium	-	-	-	++	++	+	+	+
		Myocardium	-	-	-	++	++	+	+	+
735	Fragmentation of muscle trabeculae	Endocardium	-	-	-	+	+	-	-	-
		Myocardium	-	-	-	+	+	-	-	-
740	Presence of macrophages/mast cells	Endocardium	-	-	-	+++	+++	++	++	++
		Myocardium	-	-	-	+++	+++	++	++	++
745		Endocardium	-	-	-	+++	+++	++	++	++

Evaluation of pathological changes was expressed with a semi-quantitative scale as follows: (-) absence of pathological changes and (+) mild, (++) moderate, and (+++) marked changes. The study involved administration of the solvent (sodium bicarbonate, SB, 2.3 or 4.6 ml/kg, i.v.) or rutin (Ru, 11.5 or 46 mg/kg, i.v.), i.e. controls, and their combination with ISO (100 mg/kg, s.c.).

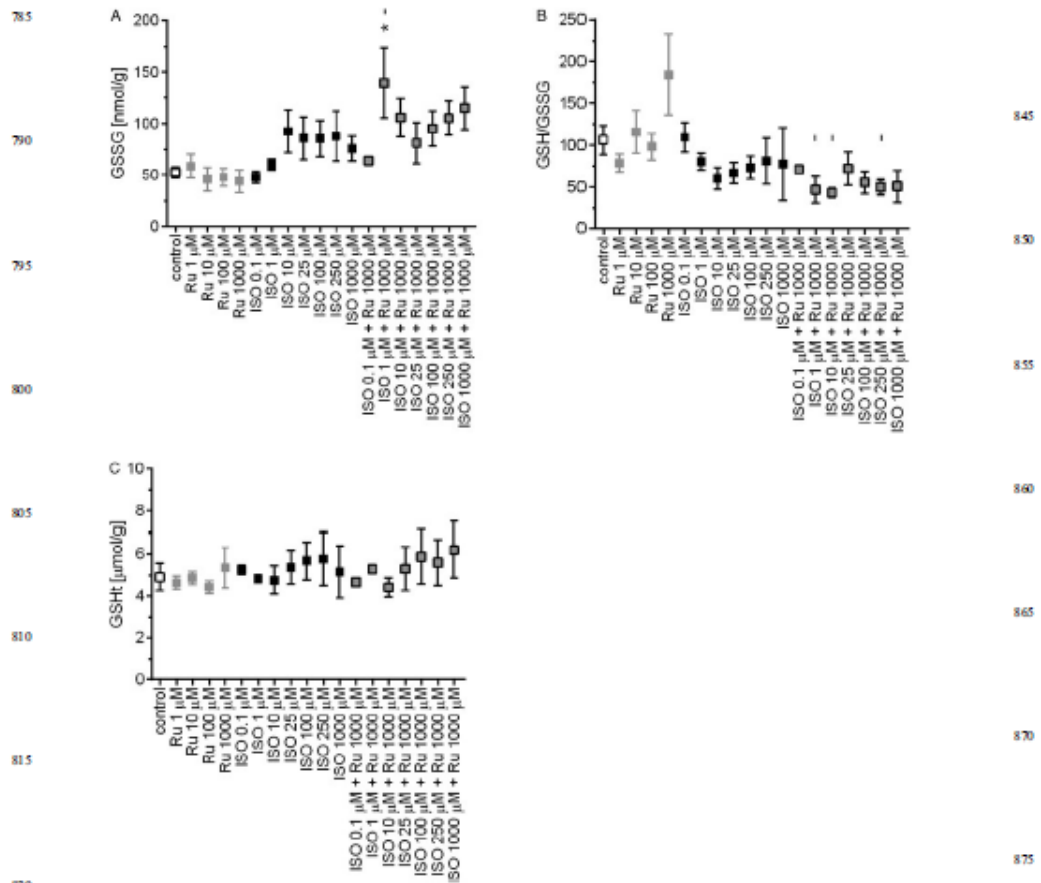


Figure 4 GSSG (A), the GSH/GSSG ratio (B), and GSH_t (C) in the H9c2 cell line exposed to rutin (Ru, 1–1000 μM), ISO (0.1–1000 μM), or their combination, i.e. ISO (0.1–1000 μM) and Ru (1000 μM). Data are expressed as means ± SEM of at least two independent experiments, which were performed in duplicates. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Statistical significance: **P* < 0.05 vs. control; – *P* < 0.05 vs. Ru 1000 μM.

the rat cardiomyoblast-derived cell line, H9c2, in order to further examine the influence of both rutin and ISO on glutathione levels. Here, as expected, ISO tested over the broad concentration range of 0.1–1000 μM led to slight increase in GSSG levels (Fig. 4A). Rutin not only failed to prevent the ISO-induced increase in GSSG, it increased it. However, this was significant only at the lowest concentration of ISO (Fig. 4A). Similarly, a slight increase in glutathione oxidation was revealed through decrease in the GSH/GSSG ratio (Fig. 4B). Although rutin at the highest concentration tended to increase GSH_t levels, there were no significant changes (Fig. 4C). This may also be the reason for the lower GSH/GSSG ratio (Fig. 4B).

Owing to the low/even negligible changes in plasma glutathione and the H9c2 cell line, we used a more selective biomarker of free radical-initiated peroxidation, 8-isoprostane. In this case, the free fraction level in plasma increased significantly in the SB4.6+ISO group compared with solvent (*P* < 0.001). The two-way ANOVA showed an overall significant difference between groups sets (*P* < 0.001) but the *post hoc* Tukey's multiple comparison showed no significant differences at various time intervals between groups, likely due to the high variability in the Ru46+ISO group (Fig. 5). Due to the minor changes in oxidative stress found in plasma, intracellular ROS formation was determined using the H₂DCF-DA assay. As seen in

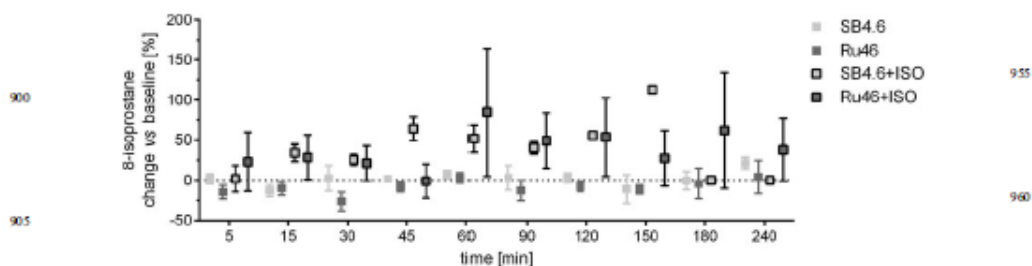


Figure 5 Changes of the free fraction of 8-isoprostane in plasma following the administration of the solvent (sodium bicarbonate, SB, 4.6 ml/kg, i.v.) or rutin (Ru, 46 mg/kg, i.v.), i.e. controls, and their combination with ISO (100 mg/kg, s.c.). The changes were calculated vs. baseline level (at time 0 minute, before ISO administration). Data are expressed as means \pm SEM. Each sample was tested at least in duplicate. Two-way ANOVA showed significant differences between means of data sets ($P < 0.001$).

Fig. 6, none of the concentrations of ISO induced ROS production inside H9c2 cells after 2-hour incubation in comparison with the control group. Interestingly, a dose-dependent decrease was observed. However, co-incubation with rutin had the opposite effect. The most significant induction was seen with the combination of 1000 μ M rutin and 10 μ M ISO. As predicted the positive controls, tBHP, and hydrogen peroxide dose-dependently resulted in intracellular ROS formation (Supplementary material Fig. A.11).

To confirm the presence of rutin in rat plasma, whole blood was withdrawn from one rat for analysis of the pharmacokinetic profile after the slow i.v. bolus

(Supplementary material Fig. A.12 and Supplementary material Tab. A.1). Calculations were carried out using two independent programmes (Kinetic 5.1 and PKSolver). The minor difference between the area under the curve at the last analysed time-point (AUC_{0-t}) and that extrapolated to infinity ($AUC_{0-\infty}$) confirmed sufficient duration of the study and thus accuracy of analysed pharmacokinetic parameters.³⁹

Discussion

Rutin, quercetin-3-O-rutinoside, a natural flavonol glycoside, has shown various beneficial pharmacological properties which could be useful in the treatment of

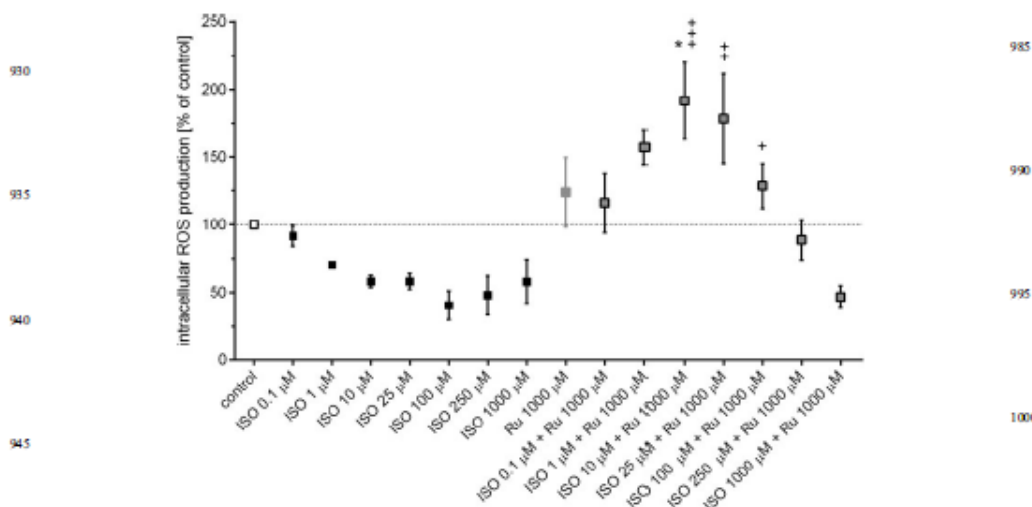


Figure 6 Intracellular ROS formation in H9c2 cardiomyoblasts determined using the H₂DCF-DA assay after 2-hour treatment with ISO (0.1–1000 μ M), rutin (Ru, 0.1–1000 μ M), or their combination, i.e. ISO (0.1–1000 μ M) and Ru (1000 μ M). Data are expressed as means \pm SEM; $n = 3$. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Statistical significance: * $P < 0.05$ vs. control; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, and +++ $P < 0.001$ vs. the corresponding ISO group without rutin.

many human diseases, particularly those of the cardiovascular system.⁴⁰ These benefits have been mostly attributed to its antioxidant effects involving the combination of scavenging activities towards various ROS (e.g. superoxide, hypochlorite, and peroxynitrate), iron/copper chelation properties, and inhibition of free radical-forming enzymes (e.g. xanthine oxidase) and anti-inflammatory effects.^{6,8,11,41-44} It may improve endothelial function by augmenting NO production and inhibiting human platelet aggregation, as well.^{45,46} However, rutin can also have pro-oxidative effects, which could be based on its metal-reducing potential and increased formation of the hydroxyl radical via Fenton chemistry.¹² This may also depend on other factors such as concentrations used, presence of other reductants, and/or the atmospheric oxygen access.⁴⁷

Stanley Mainzen Prince and coworkers reported a broad spectrum of prophylactic effects of rutin (40 or 80 mg/kg/day, p.o., 42 days) in the case of various aspects of ISO-induced cardiotoxicity (150 mg/kg/day, s.c., 2 days), in the same rat strain as used in this study. The above authors suggested the beneficial effects of rutin were associated with free radical scavenging activity, lipid-lowering effects, both mitochondrial structure and function improvement, and membrane stabilizing properties in particular.²⁶⁻²⁹ It is not easy to reconcile such results with the findings concerning the current study and our published study over 24 hours.

Firstly, Stanley Mainzen Prince and coworkers administered rutin orally for 42 days. We used a single i.v. dose. This is an important factor as rutin is not absorbed in the intestine. A number of clinical and experimental studies have reported that rutin is cleaved in the caecum via bacterial microflora and further metabolized by both bacterial and human enzymes to form various metabolites such as quercetin and its glucuronide and sulphate, tamarixetin, isorhamnetin, and various phenolic acids, resulting to no absorption of the parent rutin itself.^{31,48-52} Moreover, the relatively short elimination half-life of i.v. rutin (Supplementary material Fig. A.10 and Supplementary material Tab. A.1) suggests that the positive effects of oral rutin on the ISO-induced oxidative stress were caused by its metabolites, including quercetin conjugates and small phenolic acids, and/or some adaptation mechanism(s).⁵³⁻⁵⁵ Therefore, if rutin had positive effects, these benefits probably were not caused by rutin *per se*.

Secondly, no mortality data were provided by Stanley Mainzen Prince and coworkers, surprisingly, only positive results. Moreover, the results were linearly related to dose. It is very uncommon that 42-day oral treatment results in a high linear dose/effect relationship. To test this, we performed a similar analysis to the one we reported recently.⁵⁶ In

short, mean control values were considered 100% (untreated rats), the mean ISO values were considered 0% (the pathological state), and mean effects of rutin were expressed as percent inhibition due to ISO effect. Surprisingly, a linear relationship describing inhibition of ISO-induced cardiotoxicity was found in most of the cases. Indeed, the linear regression coefficients in 5/34 cases were equal to 1.000 (15%), in 15/34 (44%) cases higher than 0.990, and in 25/34 (74%) cases higher than 0.975, respectively. Such high linearity for so many measured variables in the studies of Stanley Mainzen Prince and coworkers is unlikely. It is also well known that the bioavailability and pharmacokinetics of oral rutin are non-linear.^{49,50,57}

In contrast, we found that a single i.v. dose of rutin either did not influence (11.5 mg/kg) or aggravate (46 mg/kg) ISO-induced cardiotoxicity (100 mg/kg, s.c.) in Wistar rats after 24 hours.³¹ In agreement, the higher dose of rutin resulted in increased mortality rate from 30 to 52%, while the lower dose had no effect on mortality. Moreover, such outcomes are in agreement with cTnT concentrations; myocardial calcium levels, and *in vitro* experiments, in which co-incubation with higher concentrations of rutin was found to significantly increase ISO-induced toxicity in the H9c2 cell line.³¹

Similar findings were confirmed in this study. Indeed, rutin was not able to protect myocardium against ISO-induced cardiotoxicity within 2 hours of continuous experiment. Although the mortality rate was higher in general, likely due to invasive approach and/or frequent blood withdrawals, the outcome was similar (Fig. 1). Here, we discovered three interesting facts: (1) the lower dose of rutin did not affect the mortality rate but it decreased cTnT release after 2 hours, (2) the greater volume of administered solution itself was protective regardless whether it was saline or 1.26% sodium bicarbonate, (Fig. 1), and (3) both doses of rutin had some positive effect on histological myocardial changes after 2 hours due to ISO regardless of the high mortality rate and different effect on cTnT release. The results extended our previous findings demonstrating that i.v. rutin was unable to provide sufficient protection against ISO-induced cardiotoxicity. pH is markedly reduced during ischaemia⁵⁸ and we speculated that slightly alkaline solvent might afford some degree of protection but this was not the case as saline was similarly protective. One reason could be that ISO results in massive vasodilation due to β_2 -adrenergic hyperstimulation together with myocardial hyperstimulation through β_1 -receptors causing an acute state of shock²¹ and increase in circulating blood by administration of a higher dose of fluid can partly reverse it.

The reason why both doses of rutin had partial protective effects from the histological findings after 2 hours without any effect on histology after 24 hours³¹ or mortality is not clear. Since there was a marked difference between subacute (2 hours) changes in myocardial histology which were mainly of an inflammatory character and acute (24 hours) changes which included myocardial necrosis, we suggest the subacute positive effects may be based on the anti-inflammatory effects of flavonoids.^{5,59}

Apropos oxidative stress variables in blood, rutin itself dose-dependently increased the level of GSH_t after 24 hours, however, ISO abolished this. The effect appears to correspond with our outcomes, in which both GSH_t and the GSH/GSSG ratio tended to increase at the higher concentration of rutin in the H9c2 cardiomyoblast-derived cell line (Fig. 4B and C). No significant differences in thiobarbituric acid reactive substances or vitamin E have been found after 24 hours.³¹ The latter corresponds to this study, in which no significant changes in blood variables were observed 2 hours after the ISO treatment. This was valid for the continuous analysis of GSSG in blood as well. Even though there were only minor differences in oxidative stress-related parameters between groups, the mortality rates were markedly different. These data clearly suggest that antioxidant markers and markers of oxidative stress in blood might not be the valid markers of ISO-induced cardiotoxicity described.^{60,61}

Interestingly, the inability of ISO to induce detectable formation of ROS was in accordance with our previous studies.^{62,63} This phenomenon has also been described by Costa *et al.*,⁶⁴ where no changes were shown in lipid peroxidation, protein carbonylation, or activity of various antioxidant enzymes after up to 3 hours of incubation of isolated adult rat cardiomyocytes with 500 μ M adrenaline. Moreover, direct antioxidant activity of catecholamines under pro-oxidant conditions has been described. Adrenaline elicited intracellular survival pathways in isolated rat cardiomyocytes resembling those described for the phenomenon of ischaemic preconditioning.⁶⁵ This may explain the above mentioned changes in glutathione in our 2- and 24-hour *in vivo* studies as well.

Although we found no convincing data in whole blood, our results clearly showed that rutin aggravated intracellular oxidative stress under *in vitro* conditions (Fig. 6) and was not able to reverse oxidative stress caused by ISO (Fig. 4). However, the clinical impact of these effects is unknown because the mortality rates for SB2.3/4.6+ISO and Ru11.5+ISO were not different, and there was a decrease in cTnT levels in Ru11.5+ISO (Figs. 1 and 2). Similarly, in contrast to the cell experiments, analysis of the free fraction of 8-isoprostane in rat plasma, a specific marker of free

radical-initiated peroxidation of arachidonic acid,⁶⁶ revealed only differences between ISO and sodium bicarbonate (Fig. 5). Conclusively, although Stanely Mainzen Prince and coworkers reported positive effects of oral rutin on various oxidative stress markers, this does not mean that rutin is able to revert negative haemodynamic effects and clinical outcome (mortality) of ISO administration. In line with our previous findings that refute any positive effect of oral quercetin on ISO-induced cardiotoxicity,³² claiming rutin is an oral protective substance against ISO-induced cardiac injury will need detailed study showing haemodynamic, ECG, and mortality rates as well. However, from our quercetin findings, we suspect such outcomes are unlikely, mainly due to the complex mechanisms of ISO-induced cardiotoxicity.

Conclusion

In contrast to studies reporting a wide spectrum of preventive effects of continuous oral administration of rutin against ISO-induced cardiotoxicity, the results described here of the direct effects of a single i.v. dose of rutin within 2 hours confirmed our previous findings of no direct protection of rutin. Rutin did not reduce the mortality rate and it increased intracellular ROS formation *in vitro* and had the tendency to increase it *in vivo*. The higher dose of sodium bicarbonate (4.6 ml/kg, 1.26% w/v solution) was found to protect rat myocardium possibly due to assuaging the state of shock accompanying ISO-induced cardiotoxicity. This is supported by significant decrease in cTnT level and greater survival rate.

Acknowledgements

This study was supported by The Czech Science Foundation (grant No. P303/12/G163), Charles University in Prague (grants No. GAUK/605712C and No. SVV 260 064). The publication is co-financed by the European Social Fund and the State Budget of the Czech Republic (Operational Program CZ.1.07/2.3.00/30.0061). The authors wish to thank Mrs Pavlína Lukešová, Mrs Anežka Kunová, and Miss Renata Exnarová for their excellent technical assistance.

Disclaimer statements

Contributors None.

Funding None.

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval The study was approved by the Ethics Committee of Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové (Study No. MŠMT 2437/2012-30), and it conformed to the guide for the

care and use of laboratory animals published by The US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

References

1 Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-33.

2 Toh JY, Tan VM, Lim PC, Lim ST, Chong MF. Flavonoids from fruit and vegetables: a focus on cardiovascular risk factors. *Curr Atheroscler Rep* 2013;15(12):368.

3 Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong CP, Nettleton JA, et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2007;85(3):895-909.

4 Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2008;88(1):38-50.

5 Mladénka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2010;49(6):963-75.

6 Mladénka P, Macáková K, Filipický T, Zatloukalová L, Jahodar L, Bovičelli P, et al. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem* 2011;105(5):693-701.

7 Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* 2006;67(18):2058-70.

8 Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63(10):1787-90.

9 Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res* 2002;36(11):1199-208.

10 El Housari M, Rosado JA. Modulation of platelet function and signaling by flavonoids. *Mini Rev Med Chem* 2011;11(2):131-42.

11 Riha M, Karlickova J, Filipický T, Macáková K, Rocha L, Bovičelli P, et al. In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Adv* 2014;4(62):32628-38.

12 Macáková K, Mladénka P, Filipický T, Riha M, Jahodar L, Trejtnar F, et al. Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols. *Food Chem* 2012;135(4):2584-92.

13 Procházková D, Bousova I, Wilhelmova N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 2011;82(4):513-23.

14 Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997;22(5):749-60.

15 Kloner RA. Natural and unnatural triggers of myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* 2006;48(4):285-300.

16 Schömig A. Catecholamines in myocardial ischemia. Systemic and cardiac release. *Circulation* 1990;82(3 Suppl):III3-22.

17 Chagoya de Sánchez V, Hernández-Muñoz R, López-Barraera F, Yañez L, Vidrio S, Suárez J, et al. Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75(12):1300-11.

18 Díaz-Muñoz M, Álvarez-Pérez MA, Yañez L, Vidrio S, Martínez L, Rosas G, et al. Correlation between oxidative stress and alteration of intracellular calcium handling in isoproterenol-induced myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2006;289(1-2):125-36.

19 Mladénka P, Hrdina R, Bobrovová Z, Semečký V, Vávrová J, Holečková M, et al. Cardiac biomarkers in a model of acute catecholamine cardiotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 2009;28(10):631-40.

20 Berenshtein E, Vaisman B, Goldberg-Langerman C, Kitrossky N, Konijn AM, Chevion M. Roles of ferritin and iron in ischemic preconditioning of the heart. *Mol Cell Biochem* 2002;234-235(1-2):283-92.

21 Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17(4):291-306.

22 Chappel CI, Rona G, Balazs T, Gaudry R. Severe myocardial necrosis produced by isoproterenol in the rat. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1959;122:123-8.

23 Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol* 1959;67(4):443-55.

24 Bindoli A, Rigobello MP, Deebie DJ. Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med* 1992;13(4):391-405.

25 Todd GL, Cullan GE, Cullan GM. Isoproterenol-induced myocardial necrosis and membrane permeability alterations in the isolated perfused rabbit heart. *Exp Mol Pathol* 1980;33(1):43-54.

26 Karthick M, Stanely Mainzen Prince P. Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Pharm Pharmacol* 2006;58(5):701-7.

27 Stanely Mainzen Prince P, Karthick M. Preventive effect of rutin on lipids, lipoproteins, and ATPases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2007;21(1):1-6.

28 Stanely Mainzen Prince P, Priya S. Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardio toxic rats: biochemical, histological and in vitro evidences. *Eur J Pharmacol* 2010;649(1-3):229-35.

29 Punithavathi VR, Shanmugapriya K, Prince PS. Protective effects of rutin on mitochondrial damage in isoproterenol-induced cardiotoxic rats: an in vivo and in vitro study. *Cardiovasc Toxicol* 2010;10(3):181-9.

30 Prince PS, Sathya B. Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of lipid metabolism in isoproterenol treated cardiotoxic male Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 2010;635(1-3):142-8.

31 Mladénka P, Zatloukalová L, Šimůnek T, Bobrovová Z, Semečký V, Nachžgal P, et al. Direct administration of rutin does not protect against catecholamine cardiotoxicity. *Toxicology* 2009;255(1-2):25-32.

32 Riha M, Vopravala M, Pilarova V, Semečký V, Holečková M, Vávrová J, et al. Oral administration of quercetin is unable to protect against isoproterenol cardiotoxicity. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2014;387(9):823-35.

33 Filipický T, Zatloukalová L, Mladénka P, Hrdina R. Acute initial haemodynamic changes in a rat isoprenaline model of cardiotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 2012;31(8):830-43.

34 Zatloukalová L, Filipický T, Mladénka P, Semečký V, Macáková K, Holečková M, et al. Dextrazoxane provided moderate protection in a catecholamine model of severe cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;90(4):473-84.

35 Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: an add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* 2010;99(3):306-14.

36 Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* 1976;98(2):367-81.

37 Šimůnek T, Štěřba M, Popelová O, Kaizerová H, Adamcová M, Hroch M, et al. Anthracycline toxicity to cardiomyocytes or cancer cells is differently affected by iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone. *Br J Pharmacol* 2008;155(1):138-48.

38 Chan EC, Pannangpetch P, Woodman OL. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35(2):326-33.

39 Jambhekar SS, Breen PJ. Basic pharmacokinetics. London: Pharmaceutical Press; 2009.

40 Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Investig Drugs* 2013;22(8):1063-79.

41 Haenen GRMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236(3):591-3.

42 Moridani MY, Pourahmad J, Bui H, Siraki A, O'Brien PJ. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic Biol Med* 2003;34(2):243-53.

43 Firuzi O, Mladénka P, Petrucci R, Marrou G, Saso L. Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. *J Pharm Pharmacol* 2004;56(6):801-7.

44 Guardia T, Rotelli AE, Juárez AO, Peber LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacol* 2001;56(9):683-7.

45 Ugusman A, Zakaria Z, Chua KH, Megat Mohd Nordin NA, Abdullah Mahdy Z. Role of rutin on nitric oxide synthesis in

- 1345 human umbilical vein endothelial cells. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:169370.
- 46 Sheu J-R, Hsiao G, Chou P-H, Shen M-Y, Chou D-S. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of rutin, a glycoside of the flavonol quercetin, in human platelets. *J Agric Food Chem* 2004;52(14):4414-8.
- 1350 47 Labuda J, Bučková M, Heilerová L, Šilhár S, Štěpánek I. Evaluation of the redox properties and anti/pro-oxidant effects of selected flavonoids by means of a DNA-based electrochemical biosensor. *Anal Bioanal Chem* 2003;376(2):168-73.
- 48 Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Demigne C, et al. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 1995;125(7):1911-22.
- 49 Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Pertunen K, Kennalli J, et al. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2000;56(8):545-53.
- 1355 50 Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GR, Debnam ES, Srini SK, et al. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic Biol Med* 2004;36(2):212-25.
- 1360 51 Serra A, Macià A, Romem M-P, Reguant J, Ortega N, Motilva M-J. Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chem* 2012;130(2):383-93.
- 52 Choudhury R, Srini SK, Debnam E, Rice-Evans CA. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radic Biol Med* 1999;27(3-4):278-86.
- 1365 53 Tang D, Yin Y, Zhang Z, Gao Y, Wei Y, Chen Y, et al. Simultaneous HPLC-DAD analysis of five flavonoids in diabetic rat plasma and its application in the study of pharmacokinetics. *Acta Chromatographica* 2009;21(3):483-97.
- 54 Wang SY, Chai JY, Zhang WJ, Liu X, Du Y, Cheng ZZ, et al. HPLC determination of five polyphenols in rat plasma after intravenous administration of hawthorn leaves extract and its application to pharmacokinetic study. *Yakugaku Zasshi* 2010;130(1):1603-13.
- 1370 55 Yang CY, Hsui SL, Wen KC, Lin SP, Tsai SY, Hou YC, et al. Bioavailability and metabolic pharmacokinetics of rutin and quercetin in rats. *J Food Drug Anal* 2004;13(3):244-50.
- 56 Mladenka P, Hrdina R, Filipický T, Riha M, Palická V. Is a highly linear relationship between the dose of quercetin and the pharmacological effect possible? – a comment on Liu, et al. Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules* 2012;17:4281-4291. *Molecules* 2014;19(7):9606-9.
- 1405 57 Manach C, Morand C, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett* 1997;409(1):12-6.
- 58 Ambrosio G, Zsveier JL, Jacobus WE, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation* 1987;76(4):906-15.
- 1410 59 Garcia-Lafuente A, Guillamon E, Villares A, Rostagno MA, Martinez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res* 2009;58(9):537-52.
- 60 Stöbel NA, Fasset RG, Marsh SA, Coombes JS. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 2011;147(2):191-201.
- 1415 61 Mladenka P, Zatloukalova L, Filipický T, Vavrova J, Holeckova M, Palická V, et al. Common biomarkers of oxidative stress do not reflect cardiovascular dysfunction in rats. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2013;157(2):146-52.
- 62 Haskova P, Kovarikova P, Kouřkova I, Vavrova A, Mackova E, Simunek T. Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2011;50(4):537-49.
- 1420 63 Mladenka P, Kalinowski DS, Haskova P, Bobrova Z, Hrdina R, Simunek T, et al. The novel iron chelator, 2-pyridylcarboxaldehyde 2-thiophenecarboxyl hydrazone, reduces catecholamine-mediated myocardial toxicity. *Chem Res Toxicol* 2009;22(1):208-17.
- 64 Costa VM, Silva R, Ferreira LM, Branco PS, Carvalho F, Bastos ML, et al. Oxidation process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: formation of adrenochrome, quinoproteins, and GSH adduct. *Chem Res Toxicol* 2007;20(8):1183-91.
- 1425 65 Costa VM, Silva R, Ferreira R, Amado F, Carvalho F, de Lourdes Bastos M, et al. Adrenaline in pro-oxidant conditions elicits intracellular survival pathways in isolated rat cardiomyocytes. *Toxicology* 2009;257(1-2):70-9.
- 66 Milne GL, Musiek ES, Morrow JD. P2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers* 2005;10(Suppl 1):S10-23.
- 1430
- 1435
- 1440
- 1445
- 1450
- 1455

8.4 Příloha 4

Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats.

I. Najmanová, J. Pourová, M. Vopršalová, V. Pilařová, V. Semecký, L. Nováková, P. Mladěnka.

Molecular Nutrition and Food Research, 60 (2016) 981 – 991 (citováno: 2x; IF₂₀₁₅ – 4,551)

RESEARCH ARTICLE

Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats

Iveta Najmanová¹, Jana Pourová¹, Marie Vopršalová¹, Veronika Pilařová², Vladimír Semecký³, Lucie Nováková² and Přemysl Mladěnka¹

¹ Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic

³ Department of Biological and Medical Science, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic

Scope: A number of studies have suggested that higher flavonoid intake is associated with lower cardiovascular mortality. The direct vasodilatory potential of flavonoids is one proposed mechanism for this link. However, the bioavailability of flavonoid aglycones is low. The metabolites of flavonoids could therefore explain/contribute to the effect.

Methods and results: We tested a series of quercetin metabolites formed by both human enzymes and colon microflora. *In vitro*, a number of these metabolites resulted in vasodilation of isolated rat aortic rings, precontracted with norepinephrine. However, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid (3HPPA) was clearly the most potent with an effect of about one order better than quercetin or its close methyl derivatives isorhamnetin and tamarixetin. In contrast, quercetin-3-O-glucuronide was void of any effect. The vasodilatory activity of 3HPPA was confirmed by *in vivo* experiments on both normotensive and spontaneously hypertensive rats. Subsequent experiments showed that the arterial blood pressure decrease found after 3HPPA was associated with the peripheral action of the compound on vascular beds and was NO-based.

Conclusion: This is the first study showing that a metabolite of flavonoids formed by human microflora has haemodynamic effects.

Keywords:

Blood pressure / Flavonoid / Metabolite / Phenolic / Quercetin / Rat / Vascular



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Received: September 29, 2015

Revised: January 6, 2016

Accepted: January 11, 2016

1 Introduction

Flavonoids are polyphenolic compounds that are regularly consumed in the human diet as fruits, vegetables, nuts, and derived products like chocolate and wine. Significant effects of flavonoids on vascular smooth muscles have been reported

in vitro and *in vivo* [1, 2]. Clinical studies of their effects on the cardiovascular system usually focus on flavonoid-rich food, e.g. recent reports on blood pressure lowering effects of blueberry and cranberry juice [3, 4] and more extensively documented effects of cocoa products rich in the flavanol epicatechin [5]. Surprisingly, clinical data on the effects of pure flavonoids on arterial blood pressure are generally sparse and positive effects have not always been found [6–8]. There are likely three major reasons for this: (1) lack of interest by pharmaceutical companies due to the impossibility of patenting known flavonoids, (2) small effect or (3) still undefined mechanism of action and the complex pharmacokinetics of flavonoids with consequent difficulties in results

Correspondence: Dr. Přemysl Mladěnka

E-mail: mladenkap@faf.cuni.cz

Abbreviations: 3HPPA, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid; L-NAME, L-N^ω-nitroarginine methyl ester; NE, norepinephrine; SHR, spontaneously hypertensive rats

interpretation and clinical application [9]. In particular, neglecting the pharmacokinetics might be a key factor. This can be illustrated by the fact that a number of studies have reported positive effects of different flavonoid aglycones on vascular smooth muscle *in vitro*. However, testing the pure aglycones does not take into account two important facts: (1) in plasma, the conjugated forms of flavonoids (glucuronides, sulphates etc.) dominate, while the pure aglycones are absent or present only in very low concentrations, and (2) flavonoids are only partially absorbed in the upper gastrointestinal tract. They are largely metabolised in the colon by human microflora into small phenolic acids [10] that are easily absorbed and may thus have some pharmacological effects.

In this study, we chose quercetin as one of the most abundant flavonoids in food. This is the flavonoid mostly analyzed by researchers from a number of viewpoints including vasoactive properties [11]. Quercetin has demonstrated antihypertensive effects in the most common rodent models of hypertension. In addition, it attenuates cardiac hypertrophy, restores impaired endothelial vasodilator function, reduces oxidative stress in hypertensive animals, and protects against pulmonary arterial hypertension [12]. It has been reported that oral quercetin results in improved NO-based vasodilation caused by acetylcholine, a decrease in aorta-reaction to vasoconstrictors, an increase in eNOS activity and a decrease in expression of NADPH oxidase subunits in aortic rings from both spontaneously hypertensive (SHR) and healthy control rats [1, 39, 40]. Interestingly, the NADPH-activity and protein expression of its subunits were decreased in the aortic rings after oral but not after *i.p.* administered quercetin drawing attention to the impact of metabolites formed in the gastrointestinal tract [1]. The same study also showed that *i.p.* administration led to lower antihypertensive effects than oral administration even though higher concentrations of quercetin metabolites with preserved flavonoid structure were measured in plasma after *i.p.* injection [1]. These, at first sight contradictory results are explainable in terms of the metabolites mentioned above which are formed by bacteria in the gastrointestinal tract, and their pharmacodynamic effects. Most orally given quercetin is not absorbed in the upper gastrointestinal tract and reaches the colon, where it yields a number of metabolites. The metabolism of quercetin and its glycosides from human faeces samples or from specific bacteria present in faeces has been investigated in some *in vitro* studies [13–17]. We assumed that these or similar metabolic pathways are also functional *in vivo* (Fig. 1). It is known for example that a half of the oral dose of rutin, quercetin-3-O-rutinoside, is metabolized into phenolic acids [18, 19]. For this reason, these metabolites may participate significantly in quercetin effects and certainly deserve attention. Unfortunately, we still do not know the full spectrum of these compounds and even less about their effects. There are few studies on the small phenolic acids formed in the colon *in vivo* and with their concentrations in human/rat urine, also in plasma [18–20].

The aim of this study was to investigate the paradoxically greater effects of orally provided quercetin compared to intraperitoneal administration by examination of metabolite(s) formed in the gastrointestinal tract that may participate in/be responsible for the antihypertensive effect of quercetin. We hypothesized that small phenolic acids formed in the colon could be crucial. We approached this by first carrying out a series of *in vitro* tests to identify the most effective vasodilatory substance(s), and then verifying its effect *in vivo* on normotensive and spontaneously hypertensive rats. Another goal was to elucidate its mechanism of action. As far as we know, this is the first study to analyse the effect of small phenolic acids (flavonoids metabolites) on vascular smooth muscle and arterial blood pressure. Part of this study has been published as an abstract [21].

2 Materials and methods

2.1 Animals

The experiments were carried out on male normotensive Wistar rats obtained from MediTox (Czech Republic) and on SHR from Charles River (USA). The animals were housed in the Faculty of Pharmacy animal house, maintained at a constant temperature 23–25°C with 12-h dark/light cycle. They were provided a standard diet and tap water *ad libitum*. The study (reg. No. MSMT-7041/2014-10) was approved by the Experimental Animal Welfare Committee of Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové and conformed to The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

2.2 Chemicals

Norepinephrine (NE), sodium nitroprusside, ascorbic acid, acetylcholine, L-N ω -nitroarginine methyl ester (L-NAME), atropine and DMSO were purchased from Sigma-Aldrich. Flavonoid and its metabolites: quercetin, 3-phenylpropionic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid/3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid/, 2-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, 3-hydroxybenzoic acid, phloroglucinol, and 4-methylcatechol were purchased from Sigma-Aldrich (Germany), quercetin-3-O-glucuronide, isorhamnetin, tamarixetin, and 3-coumaric acid from Extrasynthese (France) and 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid (3HPPA) and 3-hydroxyphenylacetic acid from Toronto Research Chemicals (Canada).

2.3 *In vitro*

These experiments were performed on isolated thoracic rat aortas. The rats were anesthetized by urethane 1.2 g/kg and

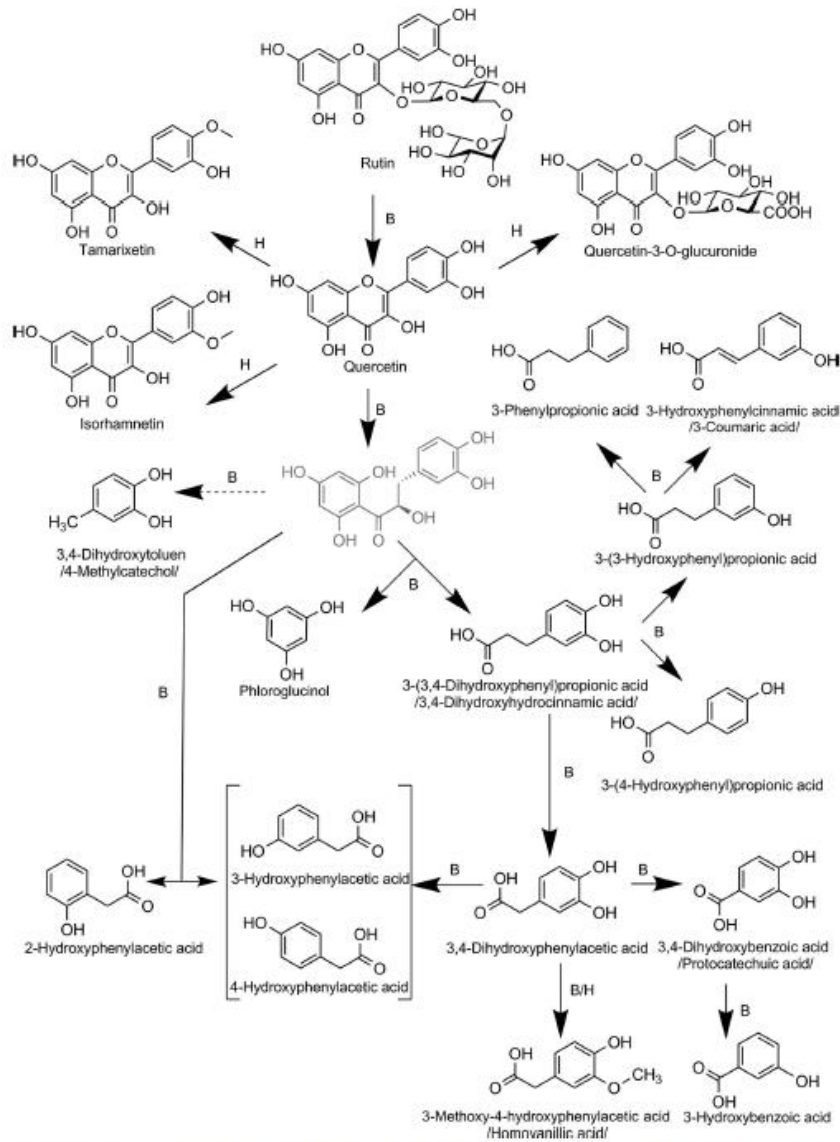


Figure 1. Metabolism of quercetin. This figure shows confirmed and suggested metabolites of quercetin that were tested in this study. Rutin is shown as an example of a quercetin glycoside. The data on phenolic acid metabolites were summarized from the following articles: [13–20]. The structure in gray is a hypothetical intermediate, which has not been detected up to now. B refers to bacterial enzymes (microflora) and H human enzymes.

killed by exsanguination. The thoracic aorta was excised and cleaned of connective tissue and blood and then cut into rings of 3 mm long. In some aortic rings, the endothelial layer (see Supporting Information Fig. 1) was mechanically disrupted by gently rubbing the luminal surface with dental floss. The rings were maintained in tissue baths with Krebs–Henseleit solution (in mM): NaCl 135, KCl 5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.3, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 20, glucose 10, oxygenated by 95% O₂/5% CO₂ and kept at 37°C. Contractions were measured by hung up rings between two stainless-steel wire hooks, one of them attached to the end of a fixed support rod and the second was connected with a transducer and computer equipped S.P.E.L. Advanced kymograph Software (Experimetria Ltd, Hungary). The rings were equilibrated at a tension of 2 g for one hour and washed every 20 min. After the stabilization period, the tissue baths were filled with 5 mL of Krebs solution.

To assess the vasorelaxant potency, the aorta rings were contracted by NE (final concentration was 10 µM). After the stabilization of contractions (45 min) acetylcholine (10 µM) was added to confirm intact or denuded endothelium. The tissue baths were then washed, filled with Krebs solution and the NE addition was repeated. Ascorbic acid (10 µM) was added to the tissue baths to avoid degradation of the NE. After the contraction had restabilized, a tested metabolite was added to the bath cumulatively to a final concentrations ranging from 10 nM to 1 mM. The solutions of tested metabolites were prepared in DMSO and the final concentration of DMSO in the bath was generally no higher than 0.1% in the case of efficient metabolites. In experiments with low active metabolites, additional experiments for assessment of EC₅₀ were performed with a concentration of DMSO up to 1–2% due to the low solubility of flavonoids in higher concentrations. The maximal relaxation was provoked by sodium nitroprusside (10 µM).

The mechanisms of action of quercetin and the most active metabolite on vascular smooth muscle were studied on endothelial denuded aortic rings or by the muscarinic receptor blocker - atropine (50 µM) and a NO synthase inhibitor - L-NAME (100 µM) added 30 min before NE addition.

In a separate set of experiments, the left renal artery of the rat was isolated, cleaned, cut into the 2 mm length rings and mounted onto the Small Vessel Wire myograph system (Experimetria Ltd, Hungary). The tissue bath was filled with 5 mL of Krebs solution and maintained under the same conditions as described above. The vessel was under a tension of 1 g and allowed to stabilize. During the 45 min stabilization period, the Krebs solution was changed three times. Following restabilization, the ascorbic acid and NE were added to a final concentration 10 µM in the tissue bath. The stabilization of contraction took around 30 min followed by the addition of cumulative doses of 3HPPA (from 1 nM to 1 mM). The changes in tension were measured and recorded by S.P.E.L. Advanced kymograph Software. The experiment was terminated by inducing maximal relaxation using sodium nitroprusside under the same condition as described above.

2.4 In vivo

2.4.1 Blood pressure experiments

Thirteen Wistar rats (average weight 375 g, blood pressure values under anesthesia: 124 ± 26/78 ± 16 mmHg) and six SHR (310 g, 15 weeks old, 184 ± 26/123 ± 21 mmHg) were anesthetized i.p. by urethane 1.2 g/kg (Wistar) or pentobarbital 50 mg/kg (SHR) and the arterial blood pressure and heart rate were recorded using PowerLab equipped with software LabChart 7 (ADInstruments, Australia) via a pressure transducer MLT0380/D linked to the left common iliac artery. The vena saphena sinistra was cannulated and after an acclimatization period of 15 min, saline or 3HPPA dissolved in saline were administered as a bolus or 5-min infusion. The doses were as follows: single bolus ranging from 0.2 to 25 mg/kg and 5-min infusion rates from 0.25 mg of 3HPPA per kg in 50 µL of saline per min to 5 mg/kg/50 µL/min using of the "Genie" Kent syringe pump (Kent Scientific Corporation, USA). In a separate set of experiments, each saline or 3HPPA solution was followed 5 min later by injections of 100 ng/kg and 500 ng/kg of NE in saline into the vena jugularis dexter. The experiment was terminated by 1 mL of 1 M KCl. The body temperature was maintained during the whole experiment at 36.5 ± 0.5°C.

2.4.2 Heart hemodynamic experiments

The experiments were similar to the foregoing but extended by introduction of a pressure-volume catheter inserted in the left ventricle. Shortly, additional five male Wistar rats (weighing around 300 g) were anesthetized with urethane and connected with a pressure transducer via left common iliac artery. The Millar pressure-volume-catheter SPR-838 2F (4E, 9 mm; Millar Instruments Inc., USA) was inserted into the left ventricle via the right common carotid artery. After the acclimatization period, saline or 3HPPA was injected in increasing doses ranging from 0.2 to 25 mg/kg via vena saphena sinistra. Specific contractility and relaxation parameters were calculated using PVAN software version 3.6 (Millar Instruments).

2.4.3 Pharmacokinetics

In six Wistar rats (average weight 410 g) the plasma levels of 3HPPA were measured. The procedure was analogous. The animals received 10 or 25 mg/kg of 3HPPA under urethane anesthesia via vena saphena sinistra and blood samples were taken from arteria carotis communis sinistra in approximate volumes of 350 µL at the following time intervals 0; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 90; 120 min. The blood samples were immediately centrifuged (2500 g, 10 min, MPW-52, MPW Med. Instruments, Poland) and the plasma samples were frozen at -80°C for subsequent analysis.

2.4.4 Analytical procedure

The determination of 3HPPA in rat plasma was performed using UHPLC–MS/MS. Separation of 3HPPA from other plasma components was achieved with UHPLC system Acquity UPLC (Waters, Prague, Czech Republic) and MS/MS detection with Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters). Analytical column BEH Shield RP C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) was used as a stationary phase. 3HPPA was eluted using gradient elution with methanol and 0.1% formic acid at 40°C. Five microliters of the extract were injected into the UHPLC–MS/MS system using the partial loop with needle overfill mode. All injected solutions were stored in the autosampler at 4°C.

The mass spectrometer was operated in negative ESI polarity mode as follows: capillary voltage: -2000 V, ion source temperature: 130°C, extractor: 3.0 V, RF lens: 0.5 V. The desolvation gas was nitrogen at a flow rate 800 L/h and temperature 450°C. Nitrogen was used also as a cone gas (100 L/h). Argon was used as a collision gas. Highly selective SRM mode (selected reaction monitoring) was used for quantification using the precursor ion [M-H]⁻ and the corresponding product ion in SRM transition 164.9 → 120.8 (cone voltage 30 V and collision energy 10 eV). MassLynx 4.1 software was used for MS control and data acquisition. QuanLynx software was used for data processing and peak integration.

The sample pretreatment of plasma samples consisted in fast and simple protein precipitation. Fifty microliters of rat plasma was precipitated with 100 μL of acetonitrile. After 10 min, the sample was centrifuged for 10 min. The supernatant was then filtrated through a PTFE membrane with 0.22 μm pores and injected into the UHPLC system.

The obtained pharmacokinetic data were analyzed by PKSolvet, an add-in program for Microsoft Excel.

2.4.5 Statistical analysis

The *in vitro* vasodilatory effect was compared using the 95% confidence intervals of relaxation curves and EC₅₀. The dose-dependent relationship was assessed by Person correlation followed by linear regression. Differences between saline and 3HPPA were compared using a one- or two-way ANOVA followed by Sidac post hoc test (GraphPad Prism version 6.0, GraphPad Software, USA).

3 Results

3.1 Comparison of *in vitro* vasodilatory potencies of quercetin and its metabolites

Norepinephrine induced a sustained vasoconstriction in the isolated endothelium-intact aortic rings from healthy rats. Cumulative concentrations (ranging from 10 nM to 100 μM) of quercetin or its metabolites provoked dose-dependent

vasodilatation of contracted aortas to a varying extent. Quercetin, its methylated metabolites tamarixetin and isorhamnetin, 4-methylcatechol, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid /3HPPA/, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 3-coumaric acid, and 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid in the final tested concentration range (up to 100 μM) achieved 100% relaxation of aorta rings (Supporting Information Fig. 2). However, their effects were very diverse. The most active structure was 3HPPA (Supporting Information Fig. 3) that resulted in vasodilation in a concentration of 100 nM while quercetin required a dose of 500 nM. Methyl derivatives of quercetin, isorhamnetin, and tamarixetin, as well as 4-methylcatechol behaved almost identically to quercetin. On the other hand, 3-coumaric acid and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid caused vasodilation at higher concentrations (more than 10 μM). 3-hydroxyphenylacetic acid, 3-hydroxybenzoic acid, and phloroglucinol were able to cause relaxation in a lesser extent and in higher concentrations. Other tested compounds/(homovanillic acid, quercetin-3-O-glucuronide, 3-phenylpropionic acid, 2-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid)/had the same vasodilatory potential as the solvent, and hence were considered to be ineffective.

The order of vasodilatory activity at the 95% confidence interval of vasodilatory curves was as follows: 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid > tamarixetin = isorhamnetin = quercetin = 3,4-dihydroxyphenylacetic acid = 4-methylcatechol = 3-coumaric acid = 3-hydroxyphenylacetic acid > 3-hydroxybenzoic acid = phloroglucinol > 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid > solvent. When all compounds were analyzed by EC₅₀ (Fig. 2), the concentration at which each reached 50% vasodilatory effect, the order was similar but not identical. 3HPPA was clearly the most efficient compound with about an order better activity than the other metabolites and quercetin.

3HPPA vasodilatory potential was confirmed in experiments on isolated renal artery (Supporting Information Fig. 4).

3.2 *In vivo* effect of the most effective compound, 3HPPA, in rats

The *in vitro* results showed that 3HPPA was the most active compound, and was thus tested on the animals. In normotensive rats, the compound decreased both systolic and diastolic blood pressure dose-dependently from the dose of 2.5 mg/kg (Fig. 3). There was no significant difference between the magnitude of decrease in systolic and diastolic blood pressures. In both, the recovery of blood pressure to basal values was rapid. The heart rate was not significantly influenced at any of the tested doses (Supporting Information Fig. 5). Analysis of heart hemodynamics suggested that the drop in arterial blood pressure was caused by peripheral action. This

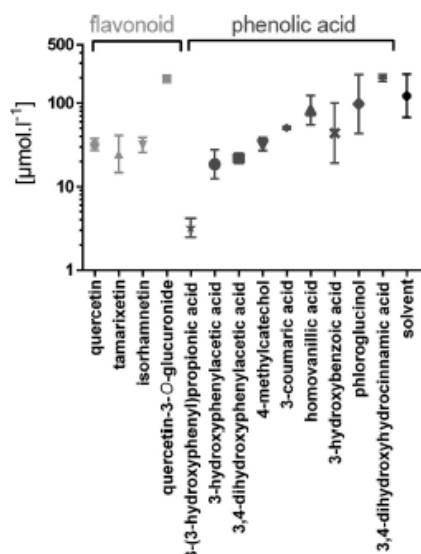


Figure 2. EC_{50} vasodilatory activity of tested compounds on isolated aortic rings. Graphs show EC_{50} with 95% confidence intervals for easier comparison. The other tested metabolites (3-phenylpropionic acid, 2-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid) are not shown as they were inactive.

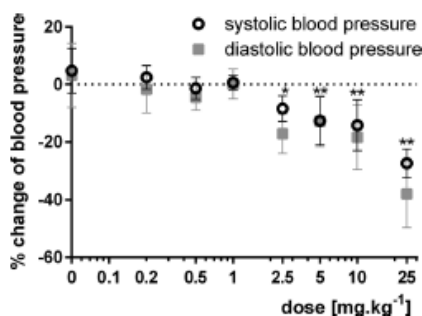


Figure 3. Change of systolic and diastolic blood pressure after bolus i.v. administration of 3HPPA in normotensive rats ($n = 5$). Data are shown as means \pm SD.

conclusion was suggested firstly by the fact that the stroke volume was not significantly changed (Supporting Information Fig. 6A). Further analysis confirmed this to be true. Although on first sight, the contractility parameter dp/dt_{max} dropped significantly from a concentration of 2.5 mg/kg (Supporting

Information Fig. 7A), it is well known that this parameter can be influenced by the volume/pressure changes in the left ventricle [22]. This was indeed found in our experiments, where a decrease in arterial blood pressure was reflected as a significant drop from 2.5 mg/kg in maximal systolic pressure in left ventricle (Supporting Information Fig. 6B). Firstly, we divided dp/dt_{max} by end-diastolic volume in order to eliminate the influence of volume. Contractility expressed using this parameter was unchanged (Supporting Information Fig. 7B), but because an insignificant tendency to decrease in contractility was seen at highest concentration, we used as well, another modification that is known to decrease the volume/pressure interference— dp/dt_{max} divided by left ventricular pressure at this maximum [22]. Again no significant changes in any tested concentration (Supporting Information Fig. 7C) suggested no effect on cardiac contractility. Similarly, negative peak of dp/dt initially dropped (Supporting Information Fig. 7D), but when relaxation was expressed by the more specific parameter tau (the time constant of left ventricular isovolumic pressure decay, Supporting Information Fig. 7E) [23], no significant changes were found. In agreement with this, minimal pressure in the left ventricles increased slightly (about 1 mmHg) at the highest dose, 25 mg/kg (Supporting Information Fig. 6C).

To confirm the results in hypertensive rats, infusions at three different rates were given as well to SHR to mimic the slow absorption of the compound from the colon. At the highest rate (5 mg/kg/50 μ L/min) the arterial blood pressure significantly decreased after 1 min, reached a maximum after 90 s, then started to normalize slowly and reached basal levels within 5 min (Fig. 4A, B). Smaller rates followed the same course but with lower effects (Supporting Information Fig. 8). When we summarized the data, both systolic and diastolic blood pressure decreased in a dose-dependent linear manner (Fig. 4C), however only the infusion at the highest rate (5 mg/kg/50 μ L/min) significantly decreased arterial blood pressure compared to saline.

3.3 Assessment of 3HPPA mechanism of action

Firstly, we tested if the effect of 3HPPA was based on the endothelium (Fig. 5A, Supporting Information Fig. 9). In contrast to quercetin (Fig. 5B), which retained its effect in endothelium-denuded rings, in the case of 3HPPA, a very marked drop in effect was observed. We therefore tested if NO might be responsible for this. In the presence of the NO-synthase blocker, L-NAME, the vasodilatory effect of 3HPPA was absolutely abolished. In contrast, NO release did not play a role in quercetin vasoactive properties as preincubation with L-NAME did not shift the quercetin relaxation curve. Finally, we tested if NO release might be based on stimulation of muscarinergic receptors, but this was not very likely, since the M-blocker atropine only slightly shifted the vasodilatory curve of 3HPPA to the right. Similar results were found for quercetin.

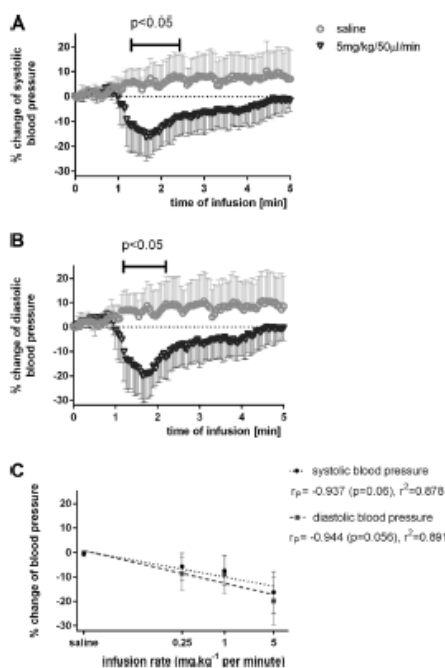


Figure 4. Effect of 3HPPA in infusion on arterial blood pressure in SHR rats ($n = 6$). (A, B) Effect of the highest rate infusion of 3HPPA on systolic and diastolic pressure, respectively. (C) The linear dose-dependent relationship between the rate of infusion per minute and maximal per cent change in arterial blood pressure. Data are shown as means \pm SD.

In order to test if 3HPPA would modify the vasoconstrictor response of NE, we tested the effect on animals repeatedly challenged with the same doses of NE after administration of 3HPPA. However, this compound did not affect the rise in blood pressure after NE administration in any of the tested doses (Supporting Information Fig. 10AB). The heart rate too was not affected either with the exception of the dose of 0.2 mg/kg, when the compound caused a slight decrease in the NE augmented heart rate (Supporting Information Fig. 10C).

3.4 Pharmacokinetics of 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid

Finally, we analyzed the basic pharmacokinetics parameters of 3HPPA in the two highest doses (Table 1). As expected, the higher dose resulted in a proportional increase in the maximal plasma concentration achieved, but interestingly, the

highest dose had longer elimination half-life (41 ± 8 versus 20 ± 3 min) and correspondingly lower total clearance. The volume of distribution was comparable for both doses.

4 Discussion

Flavonoids are known to be health-beneficial components of human diets due to their various presumed protective effects including those on the cardiovascular system. However, the purported cardiovascular effects are based mainly on *in vitro* and epidemiological studies and hence not confirmed in humans with few exceptions [2, 6, 7, 24]. Further, little is known about the underlying mechanism(s) of flavonoid action. First-while theories that explained flavonoid effects as solely due to direct antioxidant activity are being slowly replaced by more complex understanding of the direct effects of flavonoids on enzymes, aggregation cascade, and vascular smooth muscles [1, 2, 6, 7, 25]. The latter is relevant to this study.

The activity of flavonoids on vascular smooth muscles has been studied largely only with aglycones (even though they are generally not found in plasma or in very low concentrations) [9, 10], and unfortunately, studies that analyzed the effect of in-plasma-present flavonoid metabolites are rare. The same is true for quercetin and its metabolites. Quercetin given orally as the parent compound or in the form of naturally occurring glycosides (rutin, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-4'-O-glucoside) is likely partly absorbed as the aglycone but immediately metabolized especially by conjugation or methylation even in gastrointestinal mucosa and later in the liver. Hence no parent quercetin-glycosides and very low levels of pure quercetin are detected in plasma [12–15]. Some glycosides may have better absorption than the pure quercetin. Nevertheless, they are also rapidly metabolized and no parent glycosides have been detected in plasma [16]. Quercetin yields various metabolites with retained flavonoid structure, among others, glucuronides, sulphates, diglucuronide, glucuronide-sulphate of quercetin or its methylated metabolites isorhamnetin and tamarixetin [17, 18]. In the latter two cases, only low concentrations of nonconjugated isorhamnetin and tamarixetin are found in plasma [14, 15].

Pure quercetin has *in vitro* vasodilatory effects on vascular smooth muscle cells [26]. This was seen as well in this study (Supporting Information Fig. 2). Apparently, the ring B substitution by a small substituent is not the most important factor for the vasodilatory potential since kaempferol and quercetin were similarly efficient in another study [29] and quercetin, isorhamnetin, and tamarixetin in the current one (Supporting Information Fig. 2A and Fig. 2). However, in contrast to pure quercetin or its methylated metabolites, quercetin-3-O-glucuronide, and quercetin-3'-sulphate had no direct vasodilatory effects *in vitro* [27], and similarly quercetin-3'-sulphate did not affect arterial blood pressure *in vivo* [28]. Interestingly, the blood pressure significantly decreased one hour after the *i.v.* administration of quercetin-3-O-glucuronide in SHR [28]. The authors

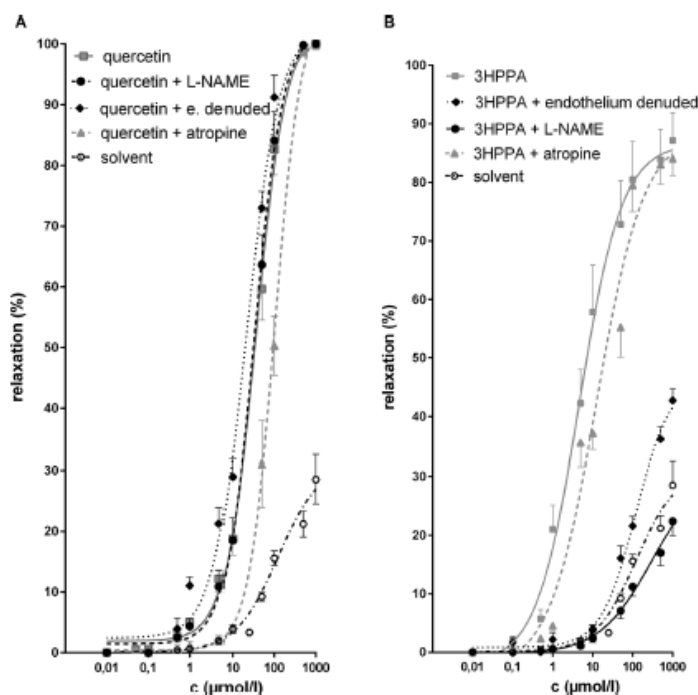


Figure 5. Effect of quercetin (A) and 3HPPA (B) on aortic rings precontracted with NE. All experiments are means from experiments with at least six aortic rings.

Table 1. Basic pharmacokinetic parameters after a single bolus dose of 3HPPA

	10 mg/kg		25 mg/kg	
	Mean	± SD	Mean	± SD
c_{max} (μg/mL)	19	± 7	80	± 2
$t_{1/2}$ (min)	20	± 3	41	± 8
Cl (μg/kg)/(μg/mL)/min	23.8	± 1.4	6.1	± 0.5
Vd (μg/kg)/(μg/mL)	490	± 188	349	± 14

suggested that this was based on deconjugation of quercetin-3-O-glucuronide into quercetin [29]. A study on human volunteers provided similar conclusions [30].

However, the hypothesis of quercetin-3-O-glucuronide as a quercetin carrier cannot explain why the i.p. administration of quercetin was less efficient than the oral, in particular, if the i.p. route resulted in higher plasma levels of metabolites with retained flavonoid core [1]. After i.p. administration, the substances pass directly via the portal circulation to the liver where they can be metabolized before reaching the systemic circulation. In the case of oral intake of quercetin or its glycosides, only a small part is absorbed in the upper gastroin-

testinal tract and a large portion reaches the colon. The small phenolic acids are important flavonoid metabolites formed by intestinal microflora. Being quite small molecules, they are absorbed and can have pharmacological effects that are largely unknown. Their anti-platelet and anti-inflammatory effects [31–33] have been reported, but as far as we know, no published study has addressed their effects on vascular smooth muscles and hemodynamics. For these reasons, we suggest that the smaller activity of i.p. given quercetin could then be related to the lack of specific metabolite(s) formed by colonic metabolism. Small phenolic acids formed from quercetin in the colon by human microflora relaxed vascular smooth muscles *in vitro* with 3HPPA being the most potent. Our subsequent experiments therefore focused on this compound. Complementary analysis *in vivo* has shown that the 3HPPA effect is based on its peripheral activity in vascular beds and is NO dependent. The minimal dose required for a significant effect was 2.5 mg/kg. This represents an approximate dose of 1 mg in a rat. It is not easy to transform these data to a dose effective in humans but the dose appears to be quite low. Unfortunately, there are almost no data on 3HPPA-plasma/urine concentrations in humans. Only one study measured concentration of this metabolite in

plasma, but this was done only after eating a meal containing flavonoids once daily for 5 days [34]. This is very different to pharmacological administration of quercetin. Nevertheless, that study reveals two interesting facts: (1) 3HPPA was not conjugated in plasma and (2) its basal plasma level was about 30 nM. The latter is quite important given that the volunteers consumed a diet low in flavonoids for the rest of the day and the half-life of 3HPPA is short (Table 1). The long-term presence of 3HPPA in plasma despite its short half-life can be explained by available studies which document that 3HPPA is a metabolite not only of quercetin but also of some other phenolic compounds in human diets (e.g. flavanols including oligomeric proanthocyanidins, diosmin, caffeic acid, chlorogenic acid) [14, 35–38] and these may ensure a continuous supply from colon metabolism through a normal human diet. This fact supports its possible pharmacological importance.

Our *in vivo* results indicate that the immediate drop in blood pressure after 3HPPA administration was caused by its direct vasorelaxant properties. The substance did not affect either the contractility or heart rate (changes in both can participate in blood pressure regulation). This study cannot fully answer the question whether 3HPPA is the metabolite mainly responsible for the blood pressure-decreasing effect of quercetin after oral consumption or if it participates in the greater response found after oral intake of quercetin compared to the *i.p.* route. However, it is the first study showing that a phenolic acid formed by human microflora is able to reduce arterial blood pressure. We reiterate, this compound can be formed from a number of phenolic compounds present in common diets. For example, it has been detected in urine after intake of chocolate [39]. Indeed, the strongest evidence of the blood pressure lowering effect of flavonoids came from cocoa intake, where epicatechin is the major bioactive component. However, studies with epicatechin have demonstrated only a modest blood pressure decrease [5]. Taking into account that the effect of 3HPPA was significant only in higher infusion rates though a clear dose-effect relationship existed, one might expect a small but a significant blood pressure lowering at smaller doses as well, with larger animal samples.

Another new fact from the present study is that the 3HPPA-effect was of short duration. A similar finding was reported in a recent study with a plant extract that rapidly reduced arterial blood pressure by 15–60% in healthy rats after *i.v.* administration but normalization followed within 10–30 min. When the same extract was given as gastric gavage to SHR rats, the effect was much smaller and persistent [40]. In the present study, we used a slow infusion to mimic the continuous 3HPPA absorption from the colon and the antihypertensive effect was again normalized quite rapidly. It is possible that (1) 3HPPA has a short-term effect and other metabolite(s) could be responsible for the persisting fall in blood pressure or (2) when administered separately, 3HPPA is unable to cause a long-lasting decrease in blood pressure because some other flavonoid metabolite(s) are needed to first

potentiate its effect. For example, oral quercetin decreased not only the systolic blood pressure but the heart rate in SHR as well [1, 28]. In the present study, no direct effect on heart rate was observed after 3HPPA (Supporting Information Fig. 5). This discrepancy may be likely explained by the presence and effects of other metabolite(s) formed after quercetin administration. Additionally, despite the short duration of the effect, 3HPPA may potentiate the effects of known antihypertensive drugs. For example in a recent study, oral quercetin potentiated the positive effect of losartan on anthracycline cardiotoxicity [41]. This might be true as well for high blood pressure. Quercetin and similar compounds could be useful adjuvant therapeutic means for hypertension treatment in humans. Further studies are necessary to confirm this hypothesis and some are currently ongoing in our laboratory.

In conclusion, we found that some quercetin metabolites formed by human microflora have vasodilatory effects *in vitro* on the aortic vascular smooth muscle. The most effective compound, 3HPPA, was about one order more potent than quercetin. Its direct arterial blood pressure lowering effects were confirmed *in vivo* in both healthy and spontaneously hypertensive rats. Regarding the mechanism of action, the endothelium and NO were found to play a role in 3HPPA-induced vascular relaxation.

This study was supported by the grant of The Czech Science Foundation (project No. P303/12/G163) and Charles University in Prague (No. 253115 C and SVV 260 064). We would like to thank Dr. Alexander Oulton for critical reading of the manuscript.

I.N., J.P., M.V., and V.S. participated in vitro experiments, I.N., J.P., and P.M. performed in vivo experiments, V.P. and L.N. were responsible for the analytical part. I.N. analyzed the data and P.M. wrote the article. All authors participated in the revision.

The authors declare no conflict of interest.

5 References

- [1] Galindo, P., Gonzalez-Manzano, S., Zarzuelo, M. J., Gomez-Guzman, M. et al., Different cardiovascular protective effects of quercetin administered orally or intraperitoneally in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* 2012, 3, 643–650.
- [2] Mladenka, P., Zatloukalova, L., Filipovsky, T., Hrdina, R., Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 49, 963–975.
- [3] Johnson, S. A., Figueroa, A., Navaei, N., Wong, A. et al., Daily blueberry consumption improves blood pressure and arterial stiffness in postmenopausal women with pre- and stage 1-hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Acad. Nutr. Diet.* 2015, 115, 369–377.
- [4] Novotny, J. A., Baer, D. J., Khoo, C., Gebauer, S. K., Charon, C. S., Cranberry juice consumption lowers markers of

- cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults. *J. Nutr.* 2015, *145*, 1185–1193.
- [5] Ellinger, S., Reusch, A., Stehle, P., Helfrich, H. P., Epicatechin ingested via cocoa products reduces blood pressure in humans: a nonlinear regression model with a Bayesian approach. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012, *95*, 1365–1377.
- [6] Edwards, R. L., Lyon, T., Litwin, S. E., Rabovsky, A. et al., Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J. Nutr.* 2007, *137*, 2406–2411.
- [7] Egert, S., Bosy-Westphal, A., Seiberl, J., Kurbitz, C. et al., Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidized low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br. J. Nutr.* 2009, *102*, 1065–1074.
- [8] Dower, J. I., Geleijnse, J. M., Gijsbers, L., Zock, P. L. et al., Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2015, *101*, 914–921.
- [9] Williamson, G., The use of flavonoid aglycones in in vitro systems to test biological activities: based on bioavailability data, is this a valid approach? *Phytochem. Rev.* 2002, *1*, 215–222.
- [10] Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M. et al., Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox. Signal.* 2013, *18*, 1818–1892.
- [11] Chirimbolo, S., Role of quercetin in vascular physiology. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2012, *90*, 1652–1657.
- [12] Gormaz, J. G., Quintremil, S., Rodrigo, R., Cardiovascular disease: a target for the pharmacological effects of quercetin. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015, *15*, 1735–1742.
- [13] Schneider, H., Schwierz, A., Collins, M. D., Blaut, M., Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch. Microbiol.* 1999, *171*, 81–91.
- [14] Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R. et al., Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, *36*, 212–225.
- [15] Braune, A., Gutschow, M., Engst, W., Blaut, M., Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, *67*, 5558–5567.
- [16] Serra, A., Macià, A., Romero, M.-P., Reguant, J. et al., Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chem.* 2012, *130*, 383–393.
- [17] Graefe, E. U., Derendorf, H., Veit, M., Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1999, *37*, 219–233.
- [18] Olthof, M. R., Hollman, P. C., Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M., Katan, M. B., Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.* 2003, *133*, 1806–1814.
- [19] Sawai, Y., Kohsaka, K., Nishiyama, Y., Ando, K., Serum concentrations of rutoside metabolites after oral administration of a rutoside formulation to humans. *Arzneimittelforschung* 1987, *37*, 729–732.
- [20] Loke, W. M., Hodgson, J. M., Proudfoot, J. M., McKinley, A. J. et al., Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, *88*, 1018–1025.
- [21] Najmanova, I., Voprsalova, M., Mladenka, P., Vasodilatory activity of human quercetin metabolites. *Free Radic. Biol. Med.* 2014, *76*(Suppl 1), S43 (abstract).
- [22] Kass, D. A., Maughan, W. L., Guo, Z. M., Kono, A. et al., Comparative influence of load versus inotropic states on indexes of ventricular contractility: experimental and theoretical analysis based on pressure-volume relationships. *Circulation* 1987, *76*, 1422–1436.
- [23] Weiss, J. L., Frederiksen, J. W., Weisfeldt, M. L., Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J. Clin. Invest.* 1976, *58*, 751–760.
- [24] Huxley, R. R., Neil, H. A., The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2003, *57*, 904–908.
- [25] Jimenez, R., Lopez-Sepulveda, R., Romero, M., Toral, M. et al., Quercetin and its metabolites inhibit the membrane NADPH oxidase activity in vascular smooth muscle cells from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* 2015, *6*, 409–414.
- [26] Duarte, J., Perez Vizcaino, F., Utrilla, P., Jimenez, J. et al., Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.* 1993, *24*, 857–862.
- [27] Lodi, F., Jimenez, R., Moreno, L., Kroon, P. A. et al., Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis* 2009, *204*, 34–39.
- [28] Galindo, P., Rodriguez-Gomez, I., Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M. et al., Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *PLoS One* 2012, *7*, e32673.
- [29] Terao, J., Murota, K., Kawai, Y., Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct.* 2011, *2*, 11–17.
- [30] Perez, A., Gonzalez-Manzano, S., Jimenez, R., Perez-Abud, R. et al., The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity. *Pharmacol. Res.* 2014, *89*, 11–18.
- [31] Kim, D. H., Jung, E. A., Sohng, I. S., Han, J. A. et al., Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* 1998, *21*, 17–23.
- [32] Larrosa, M., Luceri, C., Vivoli, E., Pagliuca, C. et al., Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, *53*, 1044–1054.

- [33] Semaming, Y., Pannengetch, P., Chattipakorn, S. C., Chattipakorn, N., Pharmacological properties of protocatechuic acid and its potential roles as complementary medicine. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015, 2015, 593902.
- [34] Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P. et al., The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 33, 220–236.
- [35] Cova, D., Deangelis, L., Giavarini, F., Palladini, G., Perego, R., Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy-volunteers. *Int. J. Clin. Pharm. Th.* 1992, 30, 29–33.
- [36] Gao, K., Xu, A., Krul, C., Venema, K. et al., Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J. Nutr.* 2006, 136, 52–57.
- [37] Bazzocco, S., Mattila, I., Guyot, S., Renard, C. M., Aura, A. M., Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. *Eur. J. Nutr.* 2008, 47, 442–452.
- [38] Aura, A. M., Mattila, I., Seppanen-Laakso, T., Miettinen, J. et al., Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method. *Phytochem. Lett.* 2008, 1, 18–22.
- [39] Rios, L. Y., Conthier, M. P., Remesy, C., Mila, I. et al., Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 77, 912–918.
- [40] Luo, L. F., Wu, W. H., Zhou, Y. J., Yan, J. et al., Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in spontaneously hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.* 2010, 129, 238–243.
- [41] Matouk, A. I., Taye, A., Heeba, G. H., El-Moselhy, M. A., Quercetin augments the protective effect of losartan against chronic doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013, 36, 443–450.

8.5 Příloha 5

Oral administration of quercetin is unable to protect against isoproterenol cardiotoxicity.

M. Říha, M. Vopršalová, V. Pilařová, V. Semecký, M. Holečková, J. Vávrová, V. Palicka, T. Filipický, R. Hrdina, L. Nováková, P. Mladěnka.

Paper in Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 387 (2014) 823 (citováno: 1x; IF₂₀₁₄ – 2,471)

Oral administration of quercetin is unable to protect against isoproterenol cardiotoxicity

Michal Říha · Marie Vopršalová · Veronika Pilařová · Vladimír Semecký ·
Magdalena Holečková · Jaroslava Vávrová · Vladimír Paříčka · Tomáš Filipický ·
Radomír Hrdina · Lucie Nováková · Přemysl Mladěnka

Received: 16 May 2013 / Accepted: 20 May 2014 / Published online: 5 June 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Catecholamines are endogenous amines that participate in the maintenance of cardiovascular system homeostasis. However, excessive release or exogenous administration of catecholamines is cardiotoxic. The synthetic catecholamine, isoprenaline (isoproterenol, ISO), with non-selective β -agonistic activity has been used as a viable model of acute myocardial toxicity for many years. Since the pathophysiology of ISO-cardiotoxicity is complex, the aim of this study was to elucidate the effect of oral quercetin pretreatment on myocardial ISO toxicity. Wistar-Han rats were randomly divided into four groups: solvent or quercetin administered orally by gavage in a dose of 10 mg kg^{-1} daily for 7 days were followed by s.c. water for injection or ISO in a dose of 100 mg kg^{-1} . Haemodynamic, ECG and biochemical parameters were measured; effects on blood vessels and myocardial histology were

assessed, and accompanying pharmacokinetic analysis was performed. Quercetin was unable to protect the cardiovascular system against acute ISO cardiotoxicity (stroke volume decrease, cardiac troponin T release, QRS-T junction elevation and histological impairment). The sole positive effect of quercetin on catecholamine-induced cardiotoxicity was the normalization of increased left ventricular end-diastolic pressure caused by ISO. Quercetin did not reverse the increased responsiveness of rat aorta to vasoconstriction in ISO-treated animals, but it decreased the same parameter in the control animals. Accompanying pharmacokinetic analysis showed absorption of quercetin and its metabolite 3-hydroxyphenylacetic acid formed by bacterial microflora. In conclusion, a daily oral dose of 10 mg kg^{-1} of quercetin for 7 days did not ameliorate acute ISO-cardiovascular toxicity in rats despite minor positive cardiovascular effects.

M. Říha · M. Vopršalová · T. Filipický · R. Hrdina · P. Mladěnka (✉)
Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty
of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague,
Heyrovského 1 203, Hradec Králové 500 05, Czech Republic
e-mail: mladenkap@faf.cuni.cz

V. Pilařová · L. Nováková
Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy
in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1
203, Hradec Králové 500 05, Czech Republic

V. Semecký
Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of
Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague,
Heyrovského 1 203, Hradec Králové 500 05, Czech Republic

M. Holečková · J. Vávrová · V. Paříčka
Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in
Prague, Šimkova 870, Hradec Králové 500 38, Czech Republic

M. Holečková · J. Vávrová · V. Paříčka
University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581,
Hradec Králové 500 05, Czech Republic

Keywords Cardiotoxicity · Catecholamine · Isoproterenol · Quercetin

Introduction

Endogenous catecholamines are essential signal molecules in very low concentrations. However, they are well-known to be cardiotoxic in higher concentrations (Rona 1985; Costa et al. 2011). In harmony with this finding, the synthetic non-selective β -agonist isoprenaline (isoproterenol, ISO) has been used for more than 50 years for inducing a pathological state that mimics acute myocardial infarction in many respects (Rona et al. 1959). Administration of ISO in necrogenic doses is an adequate model for this purpose. A dose of 100 mg kg^{-1} s.c. evokes considerable histopathological changes in the myocardium which are associated with haemodynamic disturbances, marked release of cardiac troponin T, calcium overload, ST segment (J-point) elevations, R

amplitude decrease and with a mortality of around 30 % (Ramesh et al. 1998; Mladenka et al. 2009a; Zatloukalova et al. 2012). This level of mortality corresponds to the mortality rate of acute myocardial infarction before the introduction of current non-pharmacological treatment approaches (Widimský and Špaček 2004). Despite the plethora of research in this area, no single drug appears to be able to protect against all the consequences of catecholamine administration. Additionally, nor was a combination of α - and β -blockers able to completely protect against catecholamine injury notwithstanding the observed and expected effect on heart rate (Neri et al. 2007). This is very likely due to the fact that catecholamine cardiotoxicity is a complex mechanism involving both hyperstimulation of adrenoceptors and catecholamine auto-oxidation leading to production of reactive compounds (Costa et al. 2011; Rona 1985; Dhalla et al. 2010). Moreover, the mentioned hyperstimulation of β -receptors leads to myocardial hypoxia which can exacerbate the myocardial impairment by additional generation of reactive oxygen species (ROS) (Blasig et al. 1985).

However, one group reported that a series of flavonoids appeared to be unexpectedly protective against each tested aspect of isoprenaline toxicity (Prince 2011; Prince and Sathya 2010; Karthick and Prince 2006). A few years ago, our group tested the direct intravenous administration of the flavonoid rutin in two doses. The findings were contradictory to the oral administration. A dose of 11.5 mg kg^{-1} i.v. was not protective while a dose of 46 mg kg^{-1} apparently aggravated the ISO injury (Mladenka et al. 2009b). Our previous idea was that metabolism had been responsible for this paradoxical effect since oral administration of rutin would not lead to absorption of the parent compound (Manach et al. 1995).

Due to serious discrepancies in this research, we decided to return to this issue. The main aim of this study was to confirm the suggested protection of oral quercetin in the form of chronic premedication and to elucidate its effect on major cardiovascular aspects of isoprenaline toxicity.

Materials and methods

Animals

Thirty-one Wistar-Han male rats were obtained from Meditox (Czech Republic), 23 rats were used in the basic study with isoprenaline and 8 rats in the pharmacokinetic study. The rats were housed in cages located in a special air-conditioned room with a periodic light-dark (12–12 h) cycle for 2 weeks. During this period, they were provided with free access to tap water and standard pellet diet for rodents. After the acclimatization period, the healthy rats weighing approximately 375 g (haemodynamic study)/456 g (pharmacokinetic study) were used for the experiments.

The study had the approval of the Ethics Committee of Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové and conformed to The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Experimental design

Haemodynamic study

The rats were randomly divided into two groups. The first group received solvent (2 ml kg^{-1}) and the second one received quercetin (Sigma-Aldrich, Germany) in a dose of 10 mg kg^{-1} by gastric gavage in seven succeeding days. On the last day, animals from both groups were again randomly divided for s.c. administration of water for injection (2 ml kg^{-1}) or aqueous solution of ISO (100 mg kg^{-1}) 1 h after gavage. The experiment started 24 h following ISO/water administration. The experimental groups designated control and Q (oral pretreatment by solvent or quercetin, respectively) were followed by s.c. administration of water for injection, while the groups of ISO and Q+ISO (pretreated by solvent or quercetin, respectively) were exposed to s.c. injection of ISO.

Pharmacokinetic study

Similar to the foregoing, the rats were randomly divided into two groups and received either solvent or quercetin by gastric gavage in seven succeeding days in the same doses/concentrations. Pentobarbital (Sigma-Aldrich) in a dose of 45 mg kg^{-1} i.p. was used as anaesthetic in this study. On the last day, three animals from the quercetin group were anaesthetized, their right common carotid artery was cannulated and the cannula ran out through the skin on the back of the neck. After recovery, approximately 400 μl of blood was collected (time 0), and the last dose of quercetin was administered via gastric gavage. Additional blood samples were collected each hour up to 8 h. Three other quercetin and two control animals were treated in a slightly different way. They were anaesthetized 105 min after the last dose of quercetin/solvent. The right common carotid artery was cannulated, and blood samples were collected from 2 up to 8 h again at a 1-h interval. In these animals, the anaesthesia was maintained throughout.

Quercetin was firstly dissolved in a mixture of ethanol:DMSO (19:1), and the suspension finally containing 0.5 % DMSO was then prepared with water for injection. Control animals received solvent which was composed of DMSO (0.5 %), ethanol (9.5 %) and water (90 %). Neither control nor quercetin animals received more than 5 μL of DMSO in each gavage.

Anaesthesia and surgery in the haemodynamic study

After 12 h fasting, the rats were anaesthetized with i.p. injection containing aqueous solution of urethane (Sigma-Aldrich) in a dose of 1.2 g kg^{-1} . Surgical and measuring procedures were identical to our previous studies (Zatoukalova et al. 2012; Filipsky et al. 2012) with minor modifications, briefly:

The left common iliac artery was connected to a pressure transducer MLT0380/D (AdInstruments, Australia) via a polyethylene catheter (0.5/1.0 mm filled with heparinized saline 50 IU/ml). A high-fidelity pressure-volume micromanometer catheter (Millar pressure-volume catheter SPR-838 2 F, 4E, 9 mm, Millar Instruments Inc., USA) was inserted into the left heart ventricle through the right common carotid artery. Both pressure transducer and Millar pressure-volume catheter together with subcutaneous electrodes for the ECG standard limb lead II MLA1215 (AdInstruments) were connected to PowerLab with LabChart 7 software (AdInstruments). Data were analyzed for 30 min, and necessary calibrations with hypertonic saline ($2 \times 20 \mu\text{l}$ of 25 % w/w sodium chloride solution) were performed at the end. A blood sample was collected from the abdominal aorta into a heparinized test tube (170 IU/10 ml). Following the experiment, all surviving animals were killed painlessly in anaesthesia by intravenous administration of 1 ml of 1 M aqueous solution of potassium chloride (Sigma-Aldrich).

Biochemical analysis

Cardiac troponin T (cTnT), vitamin C and vitamin E were measured in serum and total glutathione in the whole blood. cTnT was determined by high sensitive electrochemoluminescence immunoassay (Elecsys 2010, Roche), which employs two monoclonal antibodies specifically directed against cTnT. Capillary electrophoresis was used for separation of glutathione, which was measured by UV detection (PrinCE 750, Prince Technologies B.V., The Netherlands) at 200 nm. After deproteinization, analysis of vitamin E with fluorimetric detection was performed in an HPLC system LC-10A (Shimadzu, Japan). The analysis of vitamin C was performed after deproteinization by electrophoresis using UV detection (System P/ACE 5100, Beckman).

Malondialdehyde (MDA) was assessed in the hearts of the tested animals. The tissue was homogenized in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) using a Potter-Elvehjem homogenizer (B. Braun, Germany). The homogenate was centrifuged for 10 min at 2,600 g (centrifuge VWR Compact Star CS4, VWR International, LLC, USA). MDA was assessed in the samples adjusted to a final concentration of 0.05 or 0.01 mg/ μl of the tissue in the buffer by the known spectrophotometric thiobarbituric acid method (Hendriks and Assmann 1990).

Quercetin metabolite analysis

The concentrations of flavonoids and phenolic acids in rat plasma were assessed using the UHPLC–MS/MS method in system consisting of Acquity UPLC (Waters, Czech Republic) and a Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters). The separation was performed on BEH Shield RP C18 ($2.1 \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$) using gradient elution with methanol and 0.1 % formic acid. All injected solutions were stored in the auto-sampler at 4°C . The partial loop with needle overfill mode was set up to inject $5 \mu\text{l}$. The analytical column was kept at 40°C by column oven.

The MS conditions were finely tuned in positive/negative ESI polarity mode as follows: capillary voltage, $+3,200 \text{ V}$ / $-2,000 \text{ V}$; ion source temperature, 130°C ; extractor, 3.0 V ; RF lens, 0.5 V . The desolvation gas was nitrogen at a flow of 800 l h^{-1} and at a temperature of 450°C . Nitrogen was also used as a cone gas (100 l h^{-1}). Argon was used as a collision gas. Analyses were performed in selected reaction monitoring (SRM) mode using the precursor ions $[\text{M}+\text{H}]^+$ or $[\text{M}-\text{H}]^-$ and the corresponding product ions. The cone voltage, collision energy and dwell time were carefully optimized for each compound and its transition individually. The most intensive product ion was selected for the SRM transition. MassLynx 4.1 software was used for MS control and data gathering. QuanLynx software was employed for data processing and peak integration. The sample pretreatment of plasma consisted in fast and simple protein precipitation. Fifty microliters of rat plasma was precipitated with $100 \mu\text{l}$ of acetonitrile. After 10 min, the sample was centrifuged for 10 min. The supernatant was then filtered through a PTFE membrane with $0.22\text{-}\mu\text{m}$ pores and injected into UHPLC system.

Standards, quercetin-3-glucuronide and 3-hydroxyphenylacetic acid, were purchased from Sigma-Aldrich and Toronto Research Chemicals (Canada), respectively.

Histological examination

The heart was excised immediately after the animal's death and rapidly fixed in cold 10 % neutral buffered formaldehyde solution for at least 24 h. The cardiac muscle was then sliced transversally into four parts from the basis to the apex, and the fixed specimens were processed using the conventional paraffin-embedding technique. From the prepared paraffin blocks, $5\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections were obtained and stained with haematoxylin and eosin for light microscopic examination. Photo documentation and image digitizing were performed with the Olympus AX 70 light microscope, with a digital firewire camera Pixelink PL-A642 (Vitana Corp. Ottawa, Canada) and image analysis software NIS (Laboratory Imaging, Czech Republic).

Isolated aorta

The thoracic aorta was gently excised and placed in Krebs solution. After removal of fat and connective tissue, the aorta was cut into rings (approximately 3-mm width). Aorta rings with endothelium were mounted between two stainless steel wire hooks. Then, they were transferred into the tissue bath chamber. The aortic rings were allowed to equilibrate at 37 °C in oxygenated (95 % O₂, 5 % CO₂) Krebs solution of the following composition: 135 mmol l⁻¹ NaCl, 5.0 mmol l⁻¹ KCl, 2.5 mmol l⁻¹ CaCl₂, 1.3 mmol l⁻¹ MgSO₄, 1.2 mmol l⁻¹ KH₂PO₄, 20 mmol l⁻¹ NaHCO₃ and 10 mmol l⁻¹ glucose. The rings were equilibrated for 45 min at an initial resting tension of 2.0 g; the bathing solution was changed at 10 min intervals. After the equilibration period, the contractility of each arterial segment was assessed with 10 μmol l⁻¹ norepinephrine (NE, Sigma-Aldrich). Changes in isometric tension were recorded using computer equipped with SPEL Advanced Kymograph Software (Experimetria Ltd., Hungary). The presence of functional endothelium was confirmed by the response to acetylcholine (10 μmol l⁻¹) as an induction of more than 50 % relaxation of aortic rings precontracted with 10 μmol l⁻¹ NE. Preparations were then washed three times with Krebs solution and cumulative concentration–response curves to NE (1 pmol l⁻¹–500 μmol l⁻¹) were obtained. At the end of the experiment, KCl (75 mmol l⁻¹) was added to the bath to induce maximal contraction. Responses to NE were expressed as a percentage of the maximal contraction evoked by KCl.

Data analysis

Calculations were performed as previously described (Filipsky et al. 2012). Total peripheral resistance index (TPR) was calculated as mean arterial blood pressure divided by the cardiac output and adjusted to the weight of the animal. The double product was calculated as systolic blood pressure multiplied by heart rate. Tau (the time constant of left ventricular isovolumic pressure decay) was calculated by Weiss and Glantz methods (Weiss et al. 1976; Raff and Glantz 1981). Other parameters have common meaning.

Data are expressed as means±SD. Outliers were excluded by Grubb's test. Differences were compared by one-way ANOVA test followed by Fisher's LSD test, based on a set of individual *t* tests, or by 95 % confidence intervals (isolated aorta). Statistical software GraphPad Prism 5 for Windows (GraphPad Software, USA) was used for statistical analysis. Differences between groups were considered significant at *p* ≤ 0.05 unless indicated otherwise.

Results

Mortality

No death occurred in any tested group, including ISO groups.

Haemodynamic parameters

ISO did not significantly modify mean blood pressure but significantly accelerated heart rate, increased the double product—the marker of myocardial oxygen consumption—and decreased the stroke volume 24 h after its administration (Fig. 1). Quercetin premedication had apparently no influence on the stroke volume, and it did not significantly affect double product or heart rate. Similar to the stroke volume, ISO significantly decreased the ejection fraction (39±15 %) when compared with both of the controls (solvent 67±18 %, quercetin 67±13 %). Quercetin premedication had no positive effect on this parameter (40±8 %). Such a drop in ejection fraction indicates heart failure. Therefore, additional parameters of heart function were analyzed.

ISO increased the left ventricular end-diastolic pressure and peripheral resistance and caused impairment of the diastolic isovolumic relaxation (Fig. 2), but did not modify the contractility (data not shown). Although there are some differences according to the calculation of the time constant of left ventricular isovolumic pressure decay (tau, Fig. 2c, d), it is apparent that quercetin premedication again failed to positively influence myocardial relaxation impairment. Quercetin did not influence the peripheral resistance either, but had some protective impact on the left ventricular end-diastolic pressure; there was no significant rise in this pressure in contrast to the ISO group (Fig. 2a).

To elucidate in detail the impact of quercetin on cardiac function, we analyzed maximal volume rise *dV/dt*_{max} (describes the peak filling rate in early diastolic filling) and the negative peak of *dV/dt* (characterizes the ejection phase). Likely, due to the variability of the data, although there were tendencies in quercetin to increase the negative *dV/dt*, the differences between quercetin vs control and quercetin+ISO vs ISO for this parameter were insignificant (Fig. 3a). No influence of quercetin on *dV/dt*_{max} was found either (Fig. 3b).

Morphological parameters and ECG

ISO administration induced a significant rise in cardiac wet ventricles weight index. Quercetin pretreatment did not affect the increase in this parameter (Fig. 4a). There was a marked QRS-T junction elevation/corresponding to

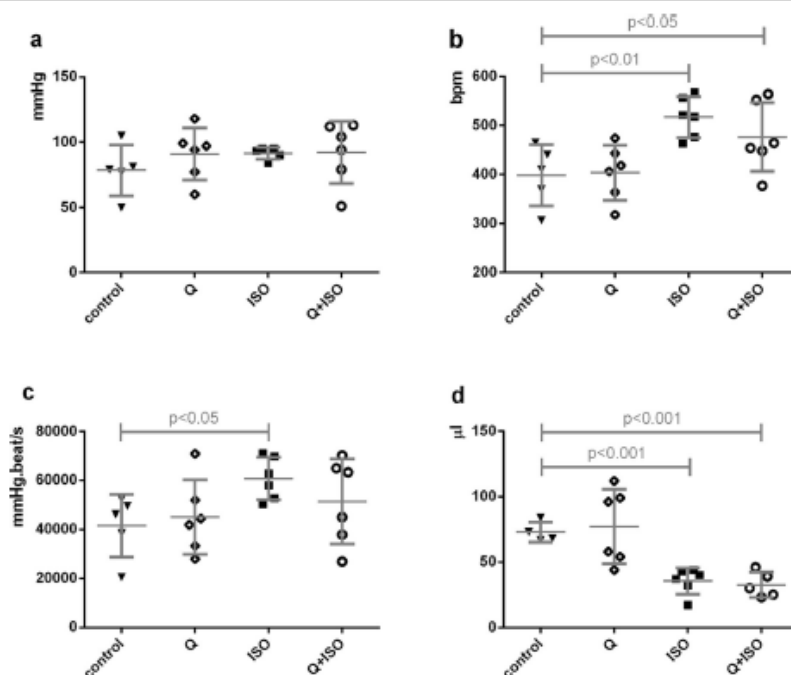


Fig. 1 Basic haemodynamic parameters: mean blood pressure (a), heart rate (b), double product (c) and stroke volume (d)

elevation of ST segment in human ECG (Beinfeld and Lehr 1968) in both of the ISO groups (Fig. 4b), which indicates again no protection of quercetin against myocardial ischaemia caused by ISO. All ECG from animals treated with ISO are shown (Fig. 5). It is clear that there is high variability, but the finding is unambiguous: quercetin cannot reverse ECG changes caused by ISO.

Biochemical markers

In agreement with previous data suggesting marked ISO cardiotoxicity, ISO induced a significant increase in serum levels of cardiac troponin T (Fig. 4c); quercetin pretreatment had no influence. Moreover, quercetin did not affect the significant decrease in serum concentration of vitamin C in ISO groups (Fig. 6a). Another marker of oxidative stress, vitamin E, did not change after ISO administration in comparison with the control group (Fig. 6b). Similarly, levels of malondialdehyde were not significantly elevated after ISO treatment in the heart samples (data not shown).

Histological findings

ISO administration caused frequent inflammatory infiltrates with the presence of oedema in widely expanded interstitial spaces and necrotic changes in cardiomyocytes including increased cytoplasmic eosinophilia, loss of myofibrillar striation and pycnotic damage of nucleus (Fig. 7). The lymphocytic infiltration including activated macrophages was mild to moderate from epicardial to subendocardial sections of the heart. The findings in quercetin+ISO-treated animals were apparently similar to that of ISO group (Fig. 7a vs b, c vs d). Animals treated with quercetin had, like the control animals, apparently healthy heart histology, with the exception of one animal from the quercetin group where mild focal interstitial infiltration of lymphocytes was found in the epicardium.

Effect on vascular smooth muscles

As a part of this study, the aortal reactivity on a vasoconstrictor was analyzed (Fig. 8). ISO-treated animals had markedly

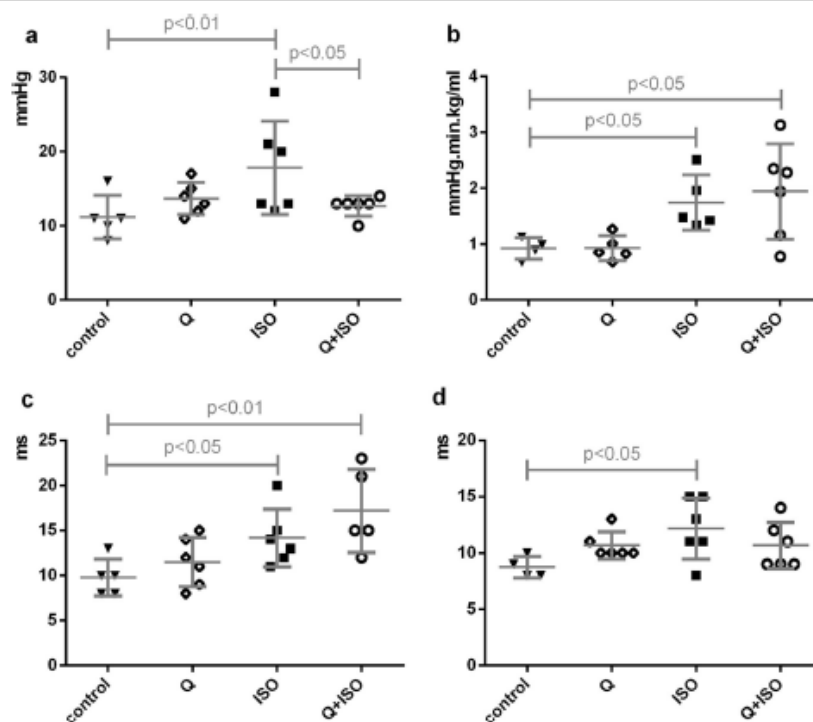


Fig. 2 Additional haemodynamic parameters: left ventricular end-diastolic pressure (a), peripheral resistance index (b) and the time constant of left ventricular isovolumic pressure decay calculated by the method of Weiss (c) and method of Glantz (d)

enhanced responsiveness on NE. There was no effect of quercetin pretreatment. However, control aorta from solvent and quercetin-treated animals reacted differently: quercetin premedication significantly decreased the NE vasoactive effects.

Quercetin pharmacokinetic analysis

Since the results showed, on the one hand, some positive effects on vascular smooth muscle cells, but on the other no

positive influence on the isoprenaline model, we tested known metabolites produced by oral quercetin gavage. Two metabolites were clearly apparent in the MS analysis, quercetin-3-glucuronide and 3-hydroxyphenylacetic acid. In contrast, those metabolites were not present in the control animals at any time interval measured (data not shown).

The plasmatic profile of quercetin-3-glucuronide is shown in Fig. 9. Much higher variability was found in the case of 3-hydroxyphenylacetic acid. Since it has not been possible to

Fig. 3 Changes in the negative peak of dV/dt (a) and positive peak of dV/dt_{max} (peak filling rate, b)

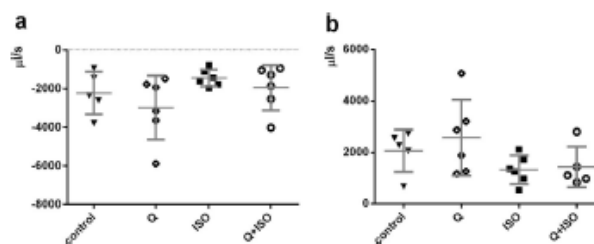


Fig. 4 Changes in cardiac wet ventricles weight index (a), elevation of the QRS-T junction (b) and serum levels of cardiac troponin T (c)

quantify precisely several samples due to low signal to noise ratio, the concentration–time curves were not prepared, but the metabolite was presented at least in low quantity in all samples from animals treated with quercetin. The absorption was clearly slower than in the case of quercetin-3-glucuronide and the rise of plasma concentration started apparently after 4 h from quercetin administration which is in the harmony with the necessity of bacterial cleavage of quercetin in the large intestine. In three rats, the concentration at 8 h from quercetin administration was found in a narrow range (28.8, 29.7 and 34.1 ng/ml).

Discussion

This study has produced two main novel findings. Firstly, chronic gastric gavage alone inhibited the ISO-induced mortality, and secondly, oral quercetin could not protect myocardium against the deleterious effect of ISO. The first finding is unexpected since in acute settings, ISO in a dose of $100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ s.c.}$ causes about 30 % mortality in accordance to other studies with lower or higher ISO doses, e.g. $5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ s.c.}$ caused about 20 % mortality while $1 \text{ g kg}^{-1} \text{ s.c.}$ approximately 50 % (Mladenka et al. 2009a, b; Ellison et al. 2007; Singal et al. 1982; Feng and Li 2010; Wexler and McMurtry 1981). Although, there are important differences among older (heavier) and younger animals (Joseph et al. 1981), this was not apparent in this case since the weight of animals was approximately the same as in our previous experiments (Mladenka et al. 2009a). It is possible that repeated daily gastric gavage represents a significant stress factor with consequent release of catecholamines. Adrenergic receptor desensitization by catecholamines is quite rapid and efficient (Doss et al. 1981; Hertel and Perkins 1984) and cannot be excluded as a reason for the survival of all animals. However, we have no available experimental data, and this needs to be investigated in the future in detail.

The second finding is in accordance with the current knowledge of the complex pathophysiology of catecholamine cardiotoxicity. For this reason, the outcome that one compound with antioxidant activity cannot reverse the complex pathophysiology of catecholamine cardiotoxicity is not very surprising. However, these data are not in agreement with the article of Prince and Sathya (2010). The reason for this is unclear as we used the same experimental setting in major aspects. In particular, the ECG findings published in that article and in another article from the same group are of note (Prince 2011; Prince and Sathya 2010). Although the authors

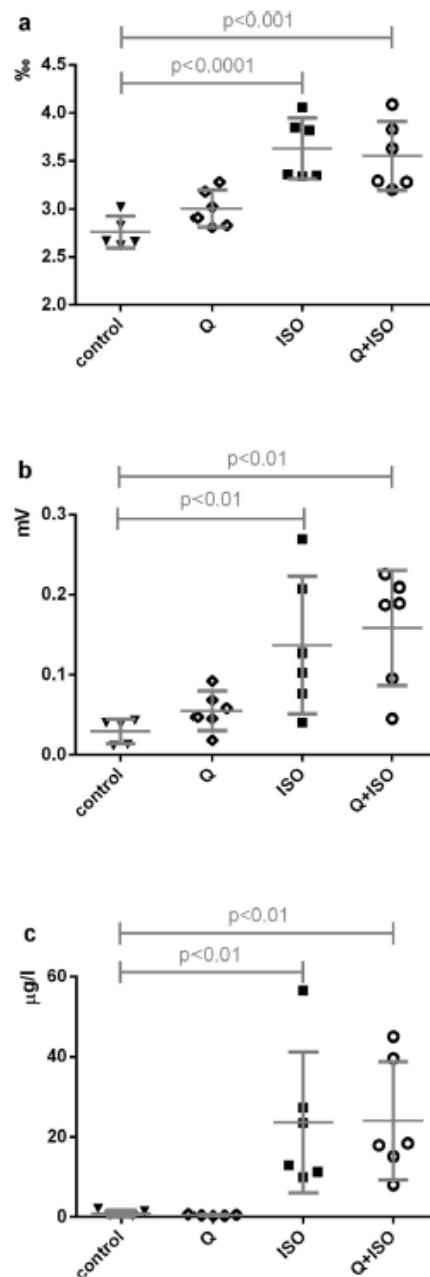
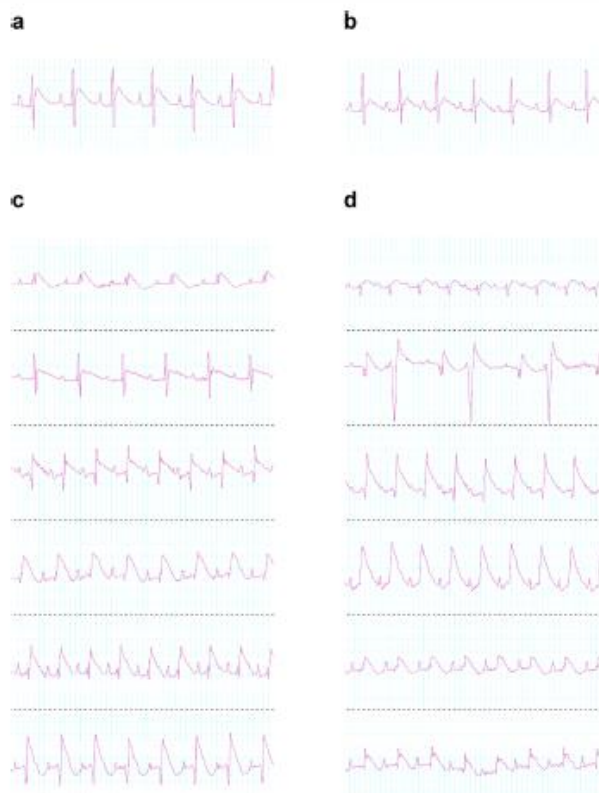


Fig. 5 ECG tracings of lead II. Normal ECG tracings are shown in quercetin- (a) and solvent-treated animals (b). All ECG from ISO groups, quercetin+ISO (c) and solvent+ISO (d), are shown. Prominent QRS-T junction changes are present in majority of ISO-treated animals (both ISO and Q+ISO). Bigeminy can be seen in one ISO-treated rat



did not state which lead was used, some aspects of the ECG findings deserve more detailed comment:

- (1) ISO is associated with a decrease in R wave amplitude (Ramesh et al. 1998; Zatloukalova et al. 2012). It is therefore not clear why in the two mentioned

publications, where the same dose of ISO was used, no change and an improbable increase in R amplitude were observed (Prince and Sathya 2010; Prince 2011). It has to be emphasized that R wave amplitude may be, in fact, higher in ISO-treated rats compared with the controls, but only in cases where the R wave, as a part of the QRS

Fig. 6 Serum concentrations of vitamins C (a) and E (b)

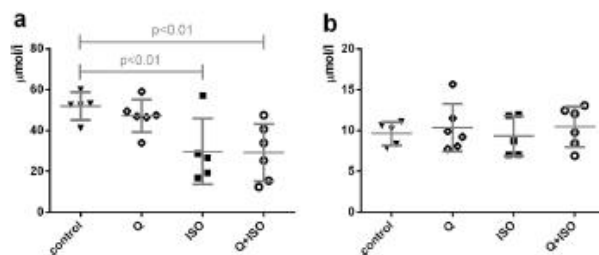


Fig. 7 Histological findings. Apparent ischaemic damage with necrotic myocytes, oedema in widely extended interstitium and presence of inflammatory cell infiltrates were observed in subendocardium (a) and myocardium (c) of ISO-treated animals. Similar findings were observed in combination (quercetin+ISO) group in the subendocardial tissue (b) and in the myocardium (d) or in the epicardium (f), where severe interstitial infiltration of lymphocytes and dilatation of subepicardial blood vessels were observed. The intact myocardium in the control group shows normal cardiac fibres without any changes (e). Staining: haematoxylin–eosin. Direct magnification, $\times 100$

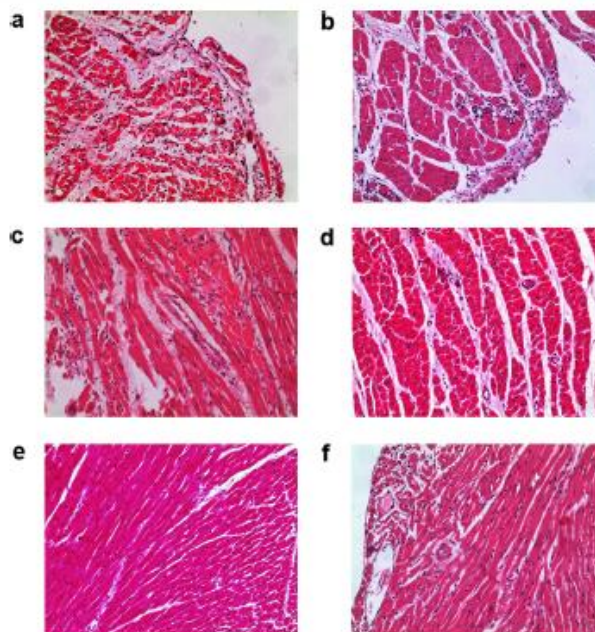
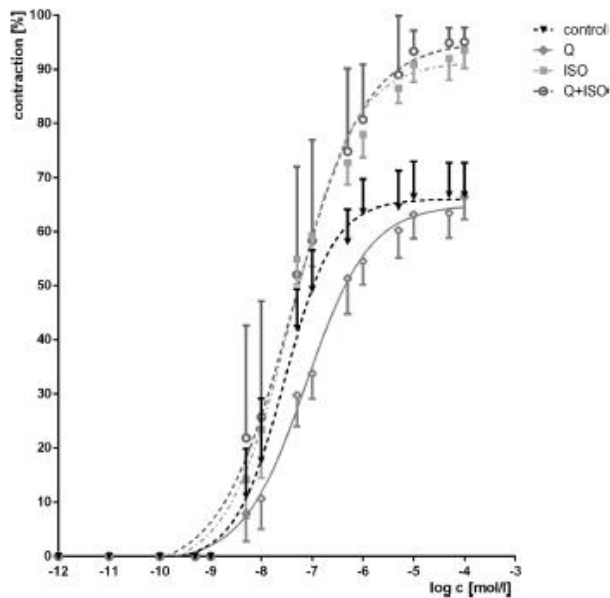


Fig. 8 Concentration–response curves to NE in aortic rings with endothelium. Responses to NE were expressed as a percentage of the maximal contraction evoked by KCl (75 mmol l^{-1})



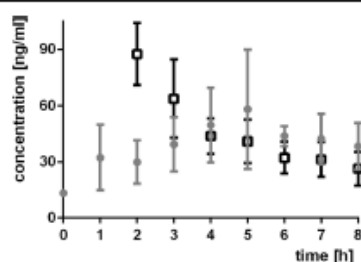


Fig. 9 Pharmacokinetic profile of quercetin-3-glucuronide in plasma of rats supplemented with quercetin or solvent for 7 days. Results shown as circles are from animals anaesthetized before the quercetin gastric gavage, squares depict animals anaesthetized 105 min after quercetin gavage. Controls are not shown since the concentration of this metabolite was zero at all time intervals

complex, is apparently joined with markedly elevated T wave. This can be seen in Fig. 5, but is not true for the publications mentioned, where both R and T waves were separated.

- (2) The above authors referred to ST segment elevation, but this cannot be clearly deduced from their tracings. Moreover, S wave amplitude remained unchanged after ISO administration which is in clear contrast to the QRS-T junction elevation found in our study, where S wave was not usually present (Fig. 5).
- (3) It is worth mentioning that the T wave amplitude apparently increased after ISO in both papers, but QRS-T junction, as mentioned above, was unchanged.
- (4) Elevated heart rate indicates cardiac derangement and, thus, may represent an additional parameter. Indeed, an increase in heart rate was found even 24 h after ISO administration (Mladenka et al. 2009a). Although the heart rate was not reported in the article of Prince and Sathya (2010) and according to Fig. 1 in their article, it appears that quercetin in combination with ISO decreased the heart rate compared with the controls or ISO alone, and similarly, ISO alone had lower heart rate compared with the controls. It can be speculated that the second dose could modify the ISO effect on heart rate possibly due to discussed β -adrenoreceptor desensitization. This was probably not the case since a previous study showed that two doses of ISO caused even more pronounced effect on heart rate within 12 h after the second dose in comparison with the single dose (Ramesh et al. 1998).

There may be some objections concerning the slightly different study design. Firstly, animals used in this study were older, but this cannot explain marked differences in the results, and moreover, older animals are more relevant for research on cardiovascular diseases. Secondly, we used only single dose of ISO since this evokes severe

injury (Mladenka et al. 2009a). If quercetin is not able to block this impairment, it could not likely block the pathophysiological changes caused by the double dose. Since oral quercetin had some obvious effect on blood vessels compared to the control animals (Fig. 7), it is apparent that quercetin or its metabolites reached the systemic circulation, and this was confirmed in this study (Fig. 9). We did not concentrate on detailed pharmacokinetic analysis owing to the complex metabolism of quercetin by human/rat intestinal and liver enzymes and by bacteria in the colon (Cermak et al. 2003; Graefe et al. 1999), but on the evidence for quercetin absorption. We selected two metabolites, quercetin-3-glucuronide and 3-hydroxyphenylacetic acid, as representatives of quercetin metabolites by rat/human and bacterial enzymes, respectively. It is well-known that the concentration of free quercetin is very low in contrast to its major human-conjugated metabolite quercetin-3-glucuronide (Bieger et al. 2008; Cialdella-Kam et al. 2013). Similarly, the majority of phenolic acid was found to be conjugated (Olthof et al. 2003), so the concentration of total 3-hydroxyphenylacetic acid may be higher. However, we have not yet measured it since the glucuronide of this acid is not available.

Considering the character of the pathophysiological changes associated with cardiotoxic doses of ISO, we focused on haemodynamic and biochemical markers. ISO effects on haemodynamics are rapid as can be demonstrated by very fast diastolic dysfunction and release of cardiac troponin T. Contractility derangement follows the diastolic impairment. The histopathological findings of heart damage appeared with some delay. Thus, the 24-h interval, when marked histological derangement and persistent biochemical markers were found, was selected in this study to assess the possible effect of quercetin (Chagoya de Sanchez et al. 1997; Pick et al. 1989; Filipovsky et al. 2012; Mladenka et al. 2009a; Clements et al. 2010).

Although quercetin protective effects on ISO toxicity were clearly minor, its positive effect on left ventricular end-diastolic pressure is of note. The explanation of this is equivocal since ejection fraction was similar in both ISO groups. Furthermore, quercetin had no positive effect on the myocardial contractility and did not reverse depressed myocardial relaxation response. Quercetin has positive inotropic effect on isolated rat atria, but this effect is bell-shaped and the clinical situation can be different since quercetin administration will result mainly in systemic appearance of its conjugated metabolites (Erlund et al. 2000; Kubota et al. 2002). Even if the mechanism is not known, this finding may be of a clinical interest: Although quercetin cannot reverse ISO cardiotoxicity, it may have some positive effect on

progression of heart failure. In fact, quercetin supplementation decreased cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction (Jalili et al. 2006).

Another interesting finding was the influence of quercetin on blood vessel responsiveness to vasoconstrictors. The data presented here seem to be in agreement with studies showing that flavonoids, including quercetin, have vasodilatory potential on isolated vessels and that oral administration of quercetin could affect the NO and endothelin-1 plasma concentrations in humans (Loke et al. 2008a; Ajay et al. 2003). Therefore, even if quercetin cannot revert acute cardiovascular injury caused by ISO, it may, in addition to the previously mentioned effect on heart failure, have some minor positive effects in arterial hypertension. Indeed, a decrease in arterial blood pressure has been documented in human after oral quercetin premedication (Edwards et al. 2007; Egert et al. 2009). It appears that the effect is mediated by phenolic acids produced by intestinal microflora rather than by quercetin itself or its close methylated or conjugated metabolites. In a recent study, oral administration of quercetin was more effective in reducing blood pressure than i.p. administration (Galindo et al. 2012). For this reason, we believe that some of the phenolic acids produced by quercetin cleavage by intestinal microflora may be responsible for the effect. One candidate may be the measured 3-hydroxyphenylacetic acid which has longer elimination half-life than other phenolic acids produced by quercetin cleavage (Sawai et al. 1987). Our next study will test the effect of quercetin bacterial cleavage products in greater detail.

The relationship between antioxidants, oxidative stress parameters and cardiovascular diseases is still equivocal (Strobel et al. 2011). The kinetics of changes of endogenous antioxidants after ISO administration is complicated and is highly dependent on time and likely on other factors too (Diaz-Munoz et al. 2006). Similarly, data on biomarkers of oxidative stress from our laboratory are not identical with our previous study (Mladenka et al. 2009a). In this study, serum vitamin E and myocardial malondialdehyde levels were not significantly changed after ISO administration, and vitamin C level drop caused by ISO was not positively influenced by quercetin, a known antioxidant. The lack of positive influence on oxidative stress biomarkers after quercetin oral administration is not a rare finding. Several previous studies reported that oral quercetin did not influence oxidized LDL, plasma/urinary F_2 -isoprostanes and total plasma antioxidant capacity in humans (Edwards et al. 2007; Shanely et al. 2010; Egert et al. 2008; Loke et al. 2008a). This interesting finding may be due to several possible factors: (1) the dose of quercetin was low, (2) quercetin possesses both pro-oxidant and antioxidant

activity depending on the concentration (Prochazkova et al. 2011) and (3) conjugates of quercetin formed in vivo have lower antioxidant activity (Loke et al. 2008b), and thus, oral quercetin may not be very active. We presume that the dose was not low. It is well-known that quercetin has antioxidant activity in very low doses, and in humans, the maximal concentration of total quercetin of 40 $\mu\text{g/l}$ was found after a similar dose of 8 mg (Afanas'ev et al. 1989; Erlund et al. 2000). Our data are in a good agreement with this finding (Fig. 9). Such concentration could have some effect on vitamin C levels. The pro-oxidant effects of quercetin are not probable at this concentration because no negative effects on vitamin C or E levels were seen in this study. The third possibility appears to be the most probable since the majority of absorbed not cleaved quercetin is circulating in the plasma conjugated and/or bound on plasma proteins (Manach et al. 1995; Bieger et al. 2008). On the other hand, despite the very low concentration of free quercetin in plasma, the majority of quercetin is presented in its free, unconjugated form at least in some tissues (Bieger et al. 2008). The matter of oral quercetin metabolites both in plasma and tissue and their pharmacological activity deserves further study and is currently analyzed in our laboratory.

In conclusion, this study demonstrated that 7-day oral quercetin administration was not able to prevent acute manifestation of catecholamine cardiotoxicity; however, it could have some minor cardiovascular effects including decreased responsiveness of blood vessels to vasoconstrictors and normalization of left ventricular end-diastolic pressure.

Acknowledgments This study was supported by a grant from the Czech Science Foundation project no. P303/12/G163. V.P., M.H. and J.V. thank MH CZ-DRO and the programme PRVOUK P37/11. M.R. would like to thank Charles University (GAUK 605712C and SVV 267 003). The authors wish to thank Mrs. Pavlína Lukešová, Mrs. Anežka Kunová and Miss Renata Exnarová for their excellent technical assistance and to Dr. Alexander Oulton for the language correction.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 38:1763–1769
- Ajay M, Gilani AU, Mustafa MR (2003) Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 74:603–612
- Bainfield WH, Lehr D (1968) QRS-T variations in the rat electrocardiogram. *Am J Physiol* 214:197–204

- Bieger J, Cernak R, Blank R, de Boer VC, Hollman PC, Kamphues J, Wolfrum S (2008) Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J Nutr* 138:1417–1420
- Blasig IE, Zipper J, Muschick P, Modersohn D, Lowe H (1985) Absolute and relative myocardial ischemia by isoproterenol overdose. *Biomed Biochim Acta* 44:1641–1649
- Cernak R, Landgraf S, Wolfrum S (2003) The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *J Nutr* 133:2802–2807
- Chagoya de Sanchez V, Hernandez-Munoz R, Lopez-Barrera F, Yanez L, Vidrio S, Suarez J, Cota-Garza MD, Aranda-Fraustro A, Cruz D (1997) Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1300–1311
- Ciaddella-Kam L, Nieman DC, Sha W, Meaney MP, Knab AM, Shanely RA (2013) Dose-response to 3 months of quercetin-containing supplements on metabolite and quercetin conjugate profile in adults. *Br J Nutr* 109(11):1923–1933
- Clements P, Brady S, York M, Berridge B, Mikaelian I, Nicklaus R, Gandhi M, Roman I, Stamp C, Davies D, McGill P, Williams T, Pettit S, Walker D, Turton J (2010) Time course characterization of serum cardiac troponins, heart fatty acid-binding protein, and morphologic findings with isoproterenol-induced myocardial injury in the rat. *Toxicol Pathol* 38:703–714
- Costa VM, Carvalho F, Bastos ML, Carvalho RA, Carvalho M, Remiao F (2011) Contribution of catecholamine reactive intermediates and oxidative stress to the pathologic features of heart diseases. *Curr Med Chem* 18:2272–2314
- Dhalla NS, Adameova A, Kaur M (2010) Role of catecholamine oxidation in sudden cardiac death. *Fundam Clin Pharmacol* 24: 539–546
- Diaz-Munoz M, Alvarez-Perez MA, Yanez L, Vidrio S, Martinez L, Rosas G, Yanez M, Ramirez S, de Sanchez VC (2006) Correlation between oxidative stress and alteration of intracellular calcium handling in isoproterenol-induced myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 289:125–136
- Doss RC, Perkins JP, Harden TK (1981) Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. *J Biol Chem* 256: 12281–12286
- Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T (2007) Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr* 137:2405–2411
- Egert S, Wolfrum S, Bosy-Westphal A, Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Frank J, Rimbach G, Mueller MJ (2008) Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *J Nutr* 138:1615–1621
- Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, Kurbitz C, Setler U, Plachta-Danielzik S, Wagner AE, Frank J, Schrezenmeier J, Rimbach G, Wolfrum S, Muller MJ (2009) Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidized low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr* 102:1065–1074
- Ellison GM, Torella D, Karakikes I, Purushothaman S, Curcio A, Gaspari C, Indolfi C, Cable NT, Goldspink DF, Nadal-Ginard B (2007) Acute beta-adrenergic overload produces myocyte damage through calcium leakage from the ryanodine receptor 2 but spares cardiac stem cells. *J Biol Chem* 282:11397–11409
- Erlund I, Kosonen T, Alftan G, Maenpaa J, Pertunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A (2000) Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 56:545–553
- Feng W, Li W (2010) The study of ISO induced heart failure rat model. *Exp Mol Pathol* 88:299–304
- Filipsky T, Zatloukalova L, Mladenka P, Hrdina R (2012) Acute initial haemodynamic changes in a rat isoprenaline model of cardiotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 31:830–843
- Galindo P, Gonzalez-Manzano S, Zarzuelo MJ, Gomez-Guzman M, Quintela AM, Gonzalez-Paramas A, Santos-Buelga C, Perez-Vizcaino F, Duarte J, Jimenez R (2012) Different cardiovascular protective effects of quercetin administered orally or intraperitoneally in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct* 3:643–650
- Graefe EU, Derendorf H, Veit M (1999) Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* 37:219–233
- Hendriks T, Assmann RF (1990) Spectrophotometric correction for bile pigments in the thiobarbituric acid test for malondialdehyde-like substances in plasma. *Med Lab Sci* 47:10–16
- Hertel C, Perkins JP (1984) Receptor-specific mechanisms of desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Mol Cell Endocrinol* 37: 245–256
- Jalili T, Carlstrom J, Kim S, Freeman D, Jin H, Wu TC, Litwin SE, David Symons J (2006) Quercetin-supplemented diets lower blood pressure and attenuate cardiac hypertrophy in rats with aortic constriction. *J Cardiovasc Pharmacol* 47:531–541
- Joseph X, Whitehurst VE, Bloom S, Balazs T (1981) Enhancement of cardiotoxic effects of beta-adrenergic bronchodilators by aminophylline in experimental animals. *Fundam Appl Toxicol* 1:443–447
- Karhik M, Prince SM (2006) Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *J Pharm Pharmacol* 58:701–707
- Kubota Y, Umegaki K, Tanaka N, Mizuno H, Nakamura K, Kunitomo M, Shinzuka K (2002) Safety of dietary supplements: chronotropic and inotropic effects on isolated rat atria. *Biol Pharm Bull* 25:197–200
- Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD (2008a) Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am J Clin Nutr* 88:1018–1025
- Loke WM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Neals PW, Kroon PA, Hodgson JM, Croft KD (2008b) Quercetin and its in vivo metabolites inhibit neutrophil-mediated low-density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem* 56:3609–3615
- Manach C, Morand C, Texier O, Favier MA, Agullo G, Demigne C, Regerat F, Remesy C (1995) Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 125:1911–1922
- Mladenka P, Hrdina R, Bobrova Z, Semecky V, Vavrova J, Holeckova M, Palicka V, Mazurova Y, Nachtigal P (2009a) Cardiac biomarkers in a model of acute catecholamine cardiotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 28:631–640
- Mladenka P, Zatloukalova L, Simunek T, Bobrova Z, Semecky V, Nachtigal P, Haskova P, Mackova E, Vavrova J, Holeckova M, Palicka V, Hrdina R (2009b) Direct administration of rutin does not protect against catecholamine cardiotoxicity. *Toxicology* 255: 25–32
- Neri M, Cerretani D, Fiaschi AI, Laghi PF, Lazerri PE, Maffione AB, Micheli L, Bruni G, Nencini C, Giorgi G, D'Errico S, Fiore C, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Fineschi V (2007) Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. *J Cell Mol Med* 11:156–170
- Oltorf MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB (2003) Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J Nutr* 133:1806–1814
- Pick R, Jalil JE, Janicki JS, Weber KT (1989) The fibrillar nature and structure of isoproterenol-induced myocardial fibrosis in the rat. *Am J Pathol* 134:365–371
- Prince PS (2011) A biochemical, electrocardiographic, electrophoretic, histopathological and in vitro study on the protective effects of (-)-epicatechin in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *Eur J Pharmacol* 671:95–101

- Prince PS, Sathya B (2010) Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of lipid metabolism in isoproterenol treated cardiotoxic male Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 635:142–148
- Prochazkova D, Bousova I, Wilhelmova N (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82:513–523
- Raff GL, Glantz SA (1981) Volume loading slows left ventricular isovolumic relaxation rate. Evidence of load-dependent relaxation in the intact dog heart. *Circ Res* 48:813–824
- Ramesh CV, Malarvannan P, Jayakumar R, Jayasundar S, Puvanakrishnan R (1998) Effect of a novel tetrapeptide derivative in a model of isoproterenol induced myocardial necrosis. *Mol Cell Biochem* 187:173–182
- Rona G (1985) Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 17: 291–306
- Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R (1959) An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol* 67:443–455
- Sawai Y, Kohsaka K, Nishiyama Y, Ando K (1987) Serum concentrations of rutoside metabolites after oral administration of a rutoside formulation to humans. *Arzneimittelforschung* 37:729–732
- Shanely RA, Knab AM, Nieman DC, Jin F, McAnulty SR, Landrum MJ (2010) Quercetin supplementation does not alter antioxidant status in humans. *Free Radic Res* 44:224–231
- Singal PK, Kapur N, Dhillon KS, Beamish RE, Dhalla NS (1982) Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol* 60:1390–1397
- Strobel NA, Fassett RG, Marsh SA, Coombes JS (2011) Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *Int J Cardiol* 147:191–201
- Weiss JL, Frederiksen JW, Weisfeldt ML (1976) Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest* 58:751–760
- Wexler BC, McMurtry JP (1981) Allopurinol amelioration of the pathophysiology of acute myocardial infarction in rats. *Atherosclerosis* 39:71–87
- Widimský P, Špaček R (2004) Infarkt myokardu. In: Aschermann M (ed) *Kardiologie*, vol 1. Galén, Praha [book in Czech]
- Zatoukalova L, Filipsky T, Mladenka P, Semecky V, Macakova K, Holecckova M, Vavrova J, Palicka V, Hrdina R (2012) Dexrazoxane provided moderate protection in a catecholamine model of severe cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 90:473–484

8.6 Příloha 6

Micro-SPE in pipette tips as the tool for analysis of drugs in serum samples – comparison of commercial and laboratory-made tips.

H. Vlčková, V. Pilařová, O. Novák, L. Nováková. P. Solich.

Publikace nachystána k odeslání do časopisu Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (IF₂₀₁₅ – 3,169)

Micro-SPE in pipette tips as the tool for analysis of drugs in serum samples – comparison of commercial and laboratory-made tips

Hana Vlčková^a, Veronika Pilařová^a, Ondřej Novák^b, Lucie Nováková^a, Petr Solich^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University & Institute of Experimental Botany AS CR, Czech Republic

Abstract

Micro-scale mode in sample preparation has become an important trend in the field of bioanalysis. Micro-SPE in pipette tips (μ SPE-PT) is fast and high-throughput tool in proteomic analysis. Therefore, the possibility to use this technique for the extraction of relatively low molecular weight compounds from biological material was evaluated especially due to the speed and low cost as two main requirements of clinical practice.

The commercial and laboratory-made μ SPE-PT tips were compared with regard to simplicity and speed of sample preparation procedure, the capacity, mechanical stability, variability of μ SPE-PT tips and finally with regard to matrix effects and other validation parameters. For this purpose, three μ SPE-PT methods (method I (μ SPE-PT with laboratory-made tips), method II (PP + μ SPE-PT with laboratory-made tips) and method III (PP + μ SPE-PT with commercial tips)) were developed and validated. Tested commercial tips with silica based particle sorbent were found unsuitable for the extraction of drugs from serum samples due to the low sorbent capacity resulting in lower recoveries and higher proneness to clogging. These facts hindered direct loading of serum samples into the commercial tips without protein precipitation step, which significantly complicated the whole extraction due to increase in sample preparation time and decrease in sample volume resulting in lower sensitivity. On the other hand, the laboratory-made tips were proven as the suitable tool for tested drug analysis. Besides sorbent capacity, laboratory-made tips provided other benefits such as sorbent variability, higher mechanical resistance and lower price of sorbents. The validation data confirmed that the μ SPE-PT method I provided the most similar results to SPE however, cheaper and faster sample preparation approach used significantly lower sample volume. Generally, the results of study confirmed inconvenience of tested commercial μ SPE-PT tips for extraction of drugs from serum samples while the laboratory-made μ SPE-PT tips provided the high-throughput and attractive extraction approach for clinical analysis of drugs in biological materials.

Keywords: μ SPE-PT, pipette tips, statin, sample preparation, UHPLC-MS/MS

Highlights: (3-5 bodů, max 85 znaku s mezerami/1 bod)

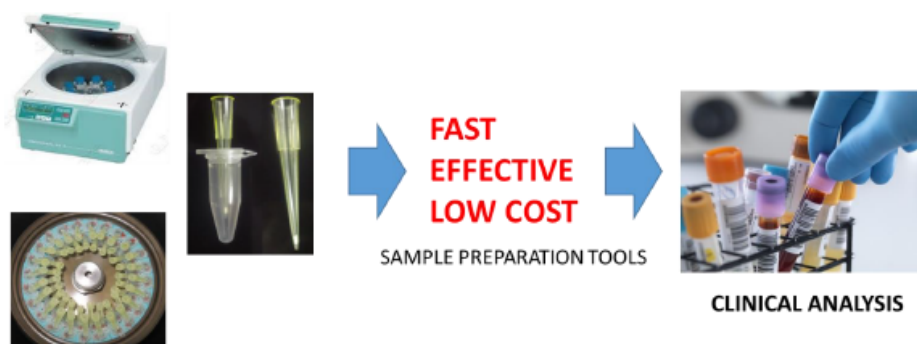
μ SPE-PT as the extraction technique for relatively small molecule analytes

Development of three μ SPE-PT methods for extraction of statins from serum samples

μ SPE-PT in clinical analysis

Comparison of commercial and laboratory-made tips

Graphical abstract:



Introduction

The most challenging part of a bioanalytical method development is the sample preparation where the main goal is to isolate one or more target analytes from biological matrix and to remove the non-targeted endogenous compounds such as phospholipids, proteins, salts, etc. Although protein precipitation (PP), liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) are well-known and widely used sample preparation techniques in clinical practice, many modern methods have been developed and optimized, with the aim of designing cheaper, faster, automated, miniaturized and more high-throughput approaches. The most of these modern methods are performed in the micro-scale with the main goal to decrease in both sample and solvent volumes, which is regardful to the animals, patients and environment. As these benefits are substantial in clinical practice, the microextraction techniques have become an important trend in the field of bioanalysis. A large number of various microextraction approaches were developed and classified into two main groups, microextraction based on LLE (single drop microextraction, dispersive liquid-liquid extraction, membrane supported-LLE) and microextraction based on SPE (solid phase microextraction, microextraction by packed sorbent, micro-SPE in pipette tips) [1] - [4].

Currently, two different approaches of micro-SPE in pipette tips are used, including conventional μ SPE in pipette tips (μ SPE-PT) and dispersive μ SPE in pipette tips (μ -dSPE-PT). The two techniques differ in the sorbent placement and extraction procedure. In the first case, in μ -dSPE-PT also designated as disposable pipette tips extraction (DPX), the sorbent is loosely placed between two frits and the individual extraction steps are performed by the pipette alone. As the sample is dynamically mixed with the sorbent during the sampling step, every sorbent particles faces analytes several times compared to traditional SPE [4][5]. In the second case, μ SPE-PT is a miniaturized version of conventional SPE. However, the sorbent is firmly placed into the pipette tips and the sample preparation takes place on the packed bed. There are two means used as the driving force to perform individual SPE steps: pipetting and centrifugation. Unlike pipetting approach, centrifugation enables the simultaneous extraction of large number of samples, which

is limited only by the number of positions in centrifuge. Due to the above mentioned facts, μ SPE-PT represents cheap and high-throughput method with limited consumption of organic solvents and sample. Another great benefit is the high variability of sorbents. A limited number of commercial pipette tips containing silica and monolith based sorbents with various chemistries (C18, C8, C4, SCX) and two specialized sorbents (Titania and Carbon) is only available. However, the laboratory-made pipette tips enable to prepare tailor-made sorbents combining several different chemistries. Further, the cost of laboratory-made pipette tips is approximately 20 times lower compared to commercial tips and SPE cartridges [5]- [8].

μ SPE-PT was primarily introduced as a „Stop And Go Extraction“ (STAGE Tips) in proteomics in 2003 [9]. This technique has become a simple, attractive and extremely economical approach to microvolume sample preparation, especially for desalting, concentration, purification and pre-fractionation of proteins and peptides prior to LC/MS analysis. Several manufacturers have developed various types of μ SPE-PT tips (ZipTip, NuTip, OMIX and MonoTip) [10][11]. Since the most of these sorbents are primarily developed for the proteomic analysis, the low capacity for the handling drugs extracted from biological samples may be an important limitation. To the very best of our knowledge silica based particle sorbents have never been used for μ SPE-PT extraction of drugs from biological samples. For this purpose only monolith based sorbents (the both silica and polymer) were employed in several studies [11] - [16]. Other studies performed the μ SPE-PT extraction using specialized robotic autosampler, which allows high-throughput drug analysis using 96-well plate with pipette tips. Although this automatic approach permits the extraction of 96 of samples in one run set, its accomplishment requires the expensive equipment [17] - [21]. Another option enabling for high-throughput sample preparation is centrifugation. The pipette tips are fixed into the Eppendorf vials and the centrifugal force is used for the facilitation of extraction, especially to go sample or other solvents through the sorbent. The number of samples is limited only by the number of positions in centrifuge. In most of cases, it is 48 samples, only 2 times lower number than

specialized robotic systems perform in one run set. Although this option represents the effective and relatively cheap tools for μ SPE-PT, it has not been previously used for extraction of drugs from biological samples.

The aim of this study was to evaluate the possibility to use the μ SPE-PT technique for the extraction of relatively small molecule analytes from biological material. The commercial and laboratory-made μ SPE-PT tips were compared in terms simplicity and speed of sample preparation, the capacity, mechanical stability, sorbent variability and finally with regard to matrix effects and other validation parameters. For this purpose, five selected statins and their interconversion products as the representatives of drugs with various physicochemical properties (Figure 1) were analysed using previously developed UHPLC-MS/MS method [22]. In total, three various μ SPE-PT methods for extraction of analytes from human serum were developed and validated. The results of this study will be important to help the bioanalyst to take full advantages of the technique and to avoid the difficulties of μ SPE-PT method in bioanalysis.

2. Experimental

2.1 Chemicals and reagents

Following standards of statins: atorvastatin calcium salt (AT), atorvastatin lactone (ATL), rosuvastatin calcium salt (RV), rosuvastatin lactone (RVL), pravastatin sodium salt (PV), pravastatin lactone (PVL), pitavastatin calcium salt (PTV), pitavastatin lactone (PTVL), simvastatin (SV) and simvastatin acid ammonium salt (SVA) were purchased from Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada). All deuterium labeled internal standards (atorvastatin-d5 sodium salt, atorvastatin lactone-d5, rosuvastatin-d6 sodium salt, rosuvastatin lactone-d6, pravastatin-d3 sodium salt, pravastatin lactone-d3, pitavastatin-d5 sodium salt, pitavastatin lactone-d5, simvastatin-d6 and simvastatin acid-d6 ammonium salt) were purchased from Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada), as well.

Acetonitrile (ACN) and mobile phase additives such as acetic acid and ammonium hydroxide, all of them LC-MS, were purchased from Sigma Aldrich. LC-MS grade water was prepared by Milli-Q reverse osmosis Millipore (Bedford, MA, USA) immediately prior to use.

2.2 Chromatography and Mass Spectrometry

UHPLC system Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) was used for the purpose of this study. It consisted of Acquity binary solvent manager and Acquity sample manager. This UHPLC system was coupled with triple quadrupole system, namely Quattro *micro* API (Waters, Manchester, UK). The separation of statins was performed using our previously published UHPLC-MS/MS method [22]. All analyses were performed on analytical column Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm; 1.7 μ m) which was tempered at 35 °C. Mobile phase was composed of ACN (A) and 0.5 mM ammonium acetate pH 4.0 (B) using gradient elution with initial ratio (30:70, A:B). Mobile phase flow rate was 0.30 ml/min and the chromatographic runtime was 10.5 min including the equilibration of the system. Initial composition of the mobile phase

was changed within 7 minutes to 65 % of ACN and subsequently in 7.5 min the equilibration step was started. The sample solutions were stored in the autosampler at 4°C and injection volume was 5 µl.

MS system was equipped with a Multi-Mode Ionization Source (ESCI, combining ESI and APCI modes of ionization). The ion source was tuned in both positive and negative ESI modes and the individual MS parameters were finally set according to previous published method [22].

The resulting most sensitive SRM transitions with optimized cone voltages and collision energies are shown in SM Table 1. The MassLynx 4.1 Data System was used for MS control and data acquisition. QuanLynx software was used for data processing and quantification.

2.3 Preparation of standard solutions, internal standard solutions and serum samples

The stock standard solutions and stock internal standard solutions were prepared by dissolving of 1.0 mg of each compound in 1.0 ml of dissolution media which were chosen according to the solubility properties. The stock solutions of pravastatin lactone, rosuvastatin lactone, atorvastatin lactone, atorvastatin, pitavastatin lactone, simvastatin and their deuterium labeled internal standards were prepared in pure ACN. The stock solutions of rosuvastatin, pravastatin, pitavastatin, simvastatin acid and their deuterium labeled internal standards were prepared in the mixture corresponding to the initial composition of the mobile phase – ACN: 0.5 mM ammonium acetate pH 4.0, 30: 70, further named as dilution solvent. All the stock standard solutions were furthermore diluted with dilution solvent to obtain the required concentration levels. The working mixture of all internal standards was 500 ng/ml. All stock standard and internal standard solutions were prepared fresh every week.

Serum samples were prepared by enrichment of blank serum samples with the minimum amount of reference standard and internal standard solutions (<5 % of the whole prepared volume) to prevent excessive dilution of the biological material and misinterpretation of results. Serum samples were kept at

-80 °C. After the thaw cycle they were processed immediately by μ SPE-PT with or without PP followed by UHPLC-MS/MS analysis.

2.4 Preparation of laboratory-made μ SPE-PT tips

The preparation of laboratory-made μ SPE-PT tip was performed by placing a very small disk of sorbent in an ordinary pipette tip based on the previously published procedure [8]. Two commercially available sorbents containing reversed-phase octadecyl-bonded (C18), octyl-bonded (C8) silica phase and one poly(styrene-divinylbenzene) copolymer based sorbent (SDB) were used for preparation of three types of μ SPE tips: C18, C8 and a combination of SDB + C18. Each μ SPE tips contained three layers of sorbent with the total sorbent amount 1.2 mg which is 3 times more than in commercial tips. The small disks (approximately 1.0 mm diameter and 0.5 mm thickness) were cut from Empore High Performance Extraction Disk using hollow tool cutter (blunt-ended syringe needle). The cutter was finely pressed into the Empore disk and the sorbent penetrated into the needle. Consecutively, the cutter was placed inside a pipette tips and the small disk was then released using a plunger (rod). After removing the cutter and plunger, the single layer of sorbent into the pipette tip was finished. Additional layers were added the same way to produce three layers μ SPE tip [8].

2.5 Sample preparation – protein precipitation and μ SPE-PT extraction

Three μ SPE-PT sample preparation methods were developed, validated and compared. The whole μ SPE-PT procedure was performed by the centrifugation approach, which means that the centrifugation was used as a moving force to perform individual μ SPE steps. After each step (activation, conditioning, loading, washing and elution) the centrifugation at 8000 RPM for 10 minutes followed. Generally, the sample was loaded on a μ SPE-PT sorbent previously activated with 300 μ l of ACN and conditioned with 300 μ l of 0.01 M ammonium acetate pH 4.5. The sorbent was then washed with 100 μ l of 0.01 M

ammonium acetate pH 4.5 and with 100 μ l of the mixture of ACN and 0.01 M ammonium acetate pH 4.5 in ratio 5/95. The analytes were eluted with 100 μ l of ACN. The eluate was evaporated to dryness and reconstituted in 100 μ l of the dilution solvent. Afterwards it was filtered via PTFE microfilter (0.22 μ m, Membrane Solutions) and the sample (5 μ l) was injected onto UHPLC system.

This general sample preparation procedure was tested on the commercial and laboratory-made μ SPE-PT tips, directly or in combination with protein precipitation. Three μ SPE-PT sample preparation methods were developed: method I (μ SPE-PT with laboratory-made tips), method II (PP + μ SPE-PT with laboratory-made tips) and method III (PP + μ SPE-PT with commercial tips) – Table 1.

Protein precipitation was implemented before μ SPE-PT. Briefly 200 μ l of ACN as deproteinization agent was added to 100 μ l of spiked serum sample. The mixture was vortexed and then incubated for 10 minutes at laboratory temperature. Precipitated samples were centrifuged at 4200 RPM for 10 min. Then supernatants were collected and diluted with the 0.01 M ammonium acetate pH 4.5 into the total volume 2 ml due to the high content of ACN in precipitate, which would prevent from the retention of analytes.

2.6 Method Validation

All three newly developed sample preparation methods were validated in terms of linearity (matrix calibration curve), accuracy, precision, matrix effects, selectivity and sensitivity in serum samples (lower limit of quantification (LLOQ)) according to the requirements of ICH (International Conference on Harmonization) [23] and EMA (European Medicines Agency) guidelines [24]. For determination of linearity, the matrix calibration curves in the concentration range of 1 – 1000 ng/ml were prepared using the blank serum samples which were spiked and then treated with sample preparation procedure described in Section 2.5. LLOQs were determined as the lowest concentration levels with $S/N = 10$ providing adequate results of accuracy and precision. The correlation coefficients and LLOQs in serum samples were compared for all three methods.

For determination of method accuracy, precision and matrix effects three concentration levels (1000, 100, 10 ng/ml) and LLOQ concentration (1 - 10 ng/ml) were evaluated for each method. The method accuracy was evaluated as an average of recovery experiments measured in three replicates. Recovery was calculated as a ratio of the peak areas of analytes in blank serum samples spiked before the sample preparation step and the peak areas of analytes in blank matrix samples that were first treated by μ SPE-PT procedure and then spiked with the mixture of analytes and SIL-ISs. For method precision, spiked blank serum samples treated with μ SPE-PT procedure were measured in three replicates in order to calculate % RSD, which describes the closeness of agreement between the series of measurements. Matrix effects were evaluated using blank serum samples, which were first treated by μ SPE-PT procedure and then spiked with standard solution. The peak areas of analytes in these extracts were compared with the peak areas of analytes in standard solutions. Matrix effects were calculated with and without correction by internal standards.

Statin stability was evaluated in the previous extensive studies [22][27] - [32]. As buffer pH 4 -5 minimizes interconversion of statins and it was not contained in selected elution solvent, the short-term sample stability of statins in ACN used as elution solvent were tested at laboratory temperature (20°C) for the evaluation of stability during the sample preparation procedure.

3. Results and discussion

3.1 Development of μ SPE-PT method

Five clinically relevant statins and their interconversion products were selected as the representative drugs with various physicochemical properties for this study (Figure 1). Individual analytes can be divided into two groups of analytes according to pKa: lactone form (pKa about 13.5) and acid form (pKa about 4.3). However, the analytes are highly variable with respect to log P which was in range of 0.8 – 4.7. The choice of these analytes created the group of miscellaneous drugs used to evaluate the suitability of μ SPE-PT method for extraction of low molecular weight compounds from serum samples.

Although only monolith sorbents in tips have been used for the extraction of drugs from biological materials, the two times lower price and relatively easy manufacture of laboratory-made particulate sorbent tips were the main points of view for the choice of particulate sorbents in this study. The commercial silica based particulate sorbents (C18 and C8) in tips were used for the comparison with laboratory-made tips with particle sorbents (C18, C8 and combination of SDB + C18). As the micropipetting approach was commonly used for extraction of drugs from biological materials by the monolith sorbent tips [11] - [16], one of the main goals was to compare two types of μ SPE-PT arrangements micropipetting and centrifugation approaches. However, the pipetting approach did not allow to aspirate serum sample and certainly not repeated aspiration and dispensing process due to the particulate sorbent clogging and low moving force. With respect to published methods [11] - [16], this fact could be caused by the higher resistance of particle sorbents than monolith sorbents and high viscosity of serum samples. For this reason, only centrifugation approach was further employed for the comparison of commercial and laboratory-made particulate sorbent tips. Comparison was made with regards to practical aspects such as speed and simplicity of procedure, mechanical stability and price of tips, and also the validation parameters such as method accuracy, precision and matrix effects.

Firstly, general μ SPE-PT procedure was developed using standard mixture of statins and this procedure was further optimized using spiked serum samples. The composition of tested elution and washing solvents was based on the results obtained in previous studies [25][26]. Three types of μ SPE-PT tips (C18, C8 and combination of SDB + C18), various elution and washing solvents (mixture of ACN and 0.01 M ammonium acetate pH 4.5) at three concentration ratios (90 %, 95 % and 100 % of ACN) for elution solvent (SM Figure 1) and in three concentration ratios (0 %, 5 % and 10 % of ACN) for washing solvent (SM Figure 2) were compared. The optimization of the whole μ SPE-PT procedure was evaluated based on the method recovery. 90 % of ACN did not enable sufficient elution of analytes from all tested sorbents (C18, C8 and combination of SDB + C18). The recoveries were too low (≤ 20 %), therefore data not shown in SM Figure 1. The differences between elution solvents with 95 % and 100 % of ACN were noticeable for C18 and combined sorbents – difference of recoveries came up to even fifty percent. However, very low differences were obvious for C8 column (SM Figure 1). Finally, 100 % of ACN for C18 and C8 columns, 95 % of ACN for combined sorbent were selected as the most suitable elution solvents. To our knowledge, the pH 4 - 5 is desirable for the elimination of acid-lactone interconversion of statins therefore stability of statins in pure ACN had to be verified. Tested analytes were found to be stable for 12 hours at laboratory temperature. Maximum loss of analytes was 3 – 5 % for SV and PTV (SM Figure 3).

The choice of washing solvent was determined not only by method recovery but also by the amount of the analytes found in the washing fraction. According to the previously developed sample preparation methods two-step washing procedure were selected: ammonium acetate buffer for elimination of salts and 5 % of ACN in buffer for elimination of other matrix components. More than 5 % of ACN used in washing step caused the loss of several analytes (PV, PVL, RV, PTV) >10 %, which is in agreement with decreasing recovery and increasing amount of analytes in washing fraction (SM Figure 2). This phenomenon was explained by their physicochemical properties in Figure 1 showing that PV, RV and PTV are polar analytes with pK_a 4.3 and $\log P$ in the range of 0.8 – 2.5. Although PVL has $pK_a=13.5$ and $\log P =$

2.4, the increasing amount of ACN in washing solvent caused the its significant loss such as for PV, RV and PTV. This fact corresponds to the chromatographic behaviour, when PVL is eluted in the leading part of chromatogram between PV and RV. Final general μ SPE-PT procedure is described in Section 2.5.

The fact that commercial sorbents (C18 and C8) got clogged after the application of spiked serum sample indicated that PP had to be implemented before μ SPE-PT procedure. In accordance with previously published methods [22][25], PP was performed using ACN in ratio 2:1 (ACN: sample). As expected, a high content of ACN in the supernatant influenced the loading step leading to the decrease of analytes retention. Therefore, the supernatant had to be diluted 20 times with 0.01 M ammonium acetate pH 4.5 ($\leq 5\%$ of ACN) corresponding to the content of ACN in washing solvent.

3.2.2 Comparison of commercial and laboratory-made tips

Developed μ SPE-PT procedure was applied on the purification of spiked serum samples using two groups of tips: commercial (C18 and C8) and laboratory-made (C18, C8 and combined C18 + SDB) tips. To compare the benefits and drawbacks of these two groups of tips, three μ SPE-PT methods were evaluated: method I (μ -SPE-PT with laboratory-made tips), method II (PP + μ -SPE-PT with laboratory-made tips) and method III (PP + μ SPE-PT with commercial tips) - Table 1.

The choice of the most suitable sorbent was performed for all three methods (Figure 2). C18 sorbent did not provide sufficient recoveries of analytes for 100 μ l of sample volume, probably due to the inadequate dilution resulting in high % of ACN ($> 5\%$) in the supernatant, which prevented from the retention of some analytes on the C18 sorbent. Combination of C18 and SDB was not suitable especially for the PT and PTVL due to the recoveries lower than 20 %. Regardless the type of μ SPE-PT tips, commercial and laboratory-made tips, C8 sorbent provided the highest recoveries of analytes and was selected for the validation and comparison of all three methods.

As the both groups (commercial and laboratory-made tips) differed by the amount of sorbents (Table 1), the sample volumes (50 μ l and 100 μ l) were tested individually for each type. As expected, commercial tips were more prone to overloading and clogging due to the lower sorbent amount therefore only 50 μ l of sample was possible to use. Due to the manipulation with eluate (especially filtration step after the extraction) the elution volume of 100 μ l had to be maintained. This fact caused the dilution during the sample preparation step and subsequently decrease of method sensitivity in case of commercial tips. On the other hand, the higher amount of sorbent in laboratory-made tips enabled to use 100 μ l of sample, eliminate clogging and obtain the higher method sensitivity, which is a great benefit of these tips (SM Figure 1).

Another challenging step determining the use of commercial tips was the selection of centrifugal force due to their lower mechanical resistance and higher proneness to clogging. As the centrifugal force higher than 8000 RPM caused the movement or displacement of sorbents from commercial tips, the loading sample step could not be facilitated by the increasing centrifugal force unlike laboratory-made tips. These facts hindered direct loading of serum samples into the commercial μ SPE-PT tips without previous protein precipitation. On the other hand, laboratory-made tips enabled the purification of serum samples without PP leading to significant reduction of extraction time (3 times).

Finally, the benefits and drawbacks of individual methods were compared and shown in Figure 3. The methods used laboratory-made tips were more suitable tool for extraction of drugs from serum samples than method used commercial tips especially due to the variability of type and capacity of sorbent. Laboratory-made tips enable to prepare tailor-made sorbents, their chemistry can be selected and combined according to the physicochemical properties of analytes and sorbent amount can be chosen according to concentration of analytes and complexity of matrix. Another benefit of methods with laboratory-made tips is low price of sorbents (20 times lower than that of commercial tips) and simplicity of extraction procedure. In case of tested commercial tips, their higher proneness to clogging significantly

complicated the whole extraction procedure. PP had to be implemented before μ SPE-PT extraction resulting in undesirable increase in sample preparation time. On the other hand, PP enabled to release the protein-binding drugs, which significantly influenced their recovery and method sensitivity. As the statins are drugs particularly binding on protein, implementation of PP into the method II brought positive effects in higher recoveries of selected compounds, shown in Figure 2.

Although the commercial tips with particulate sorbent are currently available from various manufacturers, their main characteristics, such as sorbent capacity, type of sorbent and tip volume, are not significantly differed to each other. Therefore, it could be expected to have similar results for most of commercial tips with particulate sorbent.

3.4 Validation of μ SPE-PT -UHPLC-MS/MS methods

Three μ SPE-PT methods for the determination of 5 statins and their interconversion products were validated. The comparison of the validation results of these methods was performed with the respect to conventional sample preparation method SPE. Method validation procedure was described in Section 2.6. The validation data is shown in SM Table 2 – 5. SRM chromatograms of blank serum sample spiked with all tested analytes are shown in Figure 4.

Method I (μ SPE-PT with laboratory-made tips): The values of method accuracy, precision and matrix effect are shown in SM Table 2. Linearity was higher than 0.9994 for all analytes and LLOQs were in the range 1 – 10 ng/ml in matrix samples. Method accuracy expressed as recovery ranged from 94 – 125 %, except for pitavastatin (138 %) at concentration level 1 ng/ml. Method precision provided RSD < 9 % for all analytes, only for pitavastatin and atorvastatin at concentration level 1 ng/ml and atorvastatin lactone and simvastatin acid at concentration level 10 ng/ml the RSD attained the values about 14 %. Matrix effects with the correction by internal standards ranged from -20 to +18 % for most analytes except for pravastatin lactone (-22 %) and simvastatin acid (+39 %) at the lowest concentration level.

Method II (PP + μ SPE-PT with laboratory-made tips): The results of individual validation parameters are shown in SM Table 3. Linearity was higher than 0.994 except for pravastatin lactone in matrix solution ($r^2 = 0.990$) and LLOQs of individual analytes in serum samples were 5 or 1 ng/ml for all analytes. For pravastatin lactone, pitavastatin lactone and atorvastatin lactone, the sensitivity was 2-5 times higher compared to the sensitivity of the method I. Method accuracy was in the range 86 – 114 % except for pitavastatin lactone (120 %) at the lowest concentration level. Method precision provided RSD < 12 % for all analytes at all concentration levels, except for LLOQ level for simvastatin acid (< 29 %). The matrix effects with the correction by internal standards were in the range from -16 to +6 %. Only for atorvastatin and pitavastatin the higher negative matrix effects (between -21 and -32 %) were observed at the lowest concentration level.

Method III (PP + μ SPE-PT with commercial made tips): The results of method validation are shown in SM Table 4. Linearity was higher than 0.9997 for all measured analytes. LLOQs were in the range 1 – 10 ng/ml. The highest LLOQs (10 ng/ml) were determined for pravastatin and simvastatin. Method accuracy was in the range of 90 – 120 % except for pitavastatin (160 %), simvastatin acid (128 %) and atorvastatin lactone (65 %) at the lowest concentration level. Method precision provided RSD < 15 % for all analytes and concentration levels, except for atorvastatin lactone (27 %) at the lowest concentration. The matrix effects with IS correction were in the range from -13 to +17 % for all analytes at all the concentration levels except for pitavastatin (-36 %) and especially atorvastatin lactone showing very high positive matrix effects (+130 %).

Comparison of validation data for all three methods are shown in Figure 5A. The method III using commercial tips provided the validation data with the most outlier points (ATL, PTV and PTVL especially at LLOQ concentration level) due to the requirement of method accuracy and precision. On the other hand, method I provided the most similar results to SPE. Only method accuracy of two points (ATL and PTV at

the LLOQ concentration level) were higher than 20 %. Although all concentration levels of method II used in validation process fulfilled required accuracy and precision, their dispersion was higher than for SPE and μ SPE-PT method I. Method precision was satisfactory for all validation points and all three methods except for one point, ATL at the LLOQ concentration level for method III (RSD = 27.2 %).

To compare the effectivity of sample clean up, the matrix effects were evaluated also without SIL-ISs correction. Two concentration levels: high (1000 ng/ml) and low (10 ng/ml) were evaluated and the results are shown in SM Table 5. Comparison of matrix effects with and without SIL-ISs correction is shown in Figure 5. In general, the matrix effects of all three μ SPE-PT methods showed more significant signal suppression compared to previously developed SPE-UHPLC-MS/MS method. The method I and II (used laboratory-made tips) provided acceptable negative matrix effects (≤ 20 %), the method III demonstrated most intensive negative matrix effects especially for lactone form of analytes (to -74 %) and high positive matrix effects for rosuvastatin at low concentration level (+39 %), which is probably caused by the lower sorbent amount (Table 1). These results confirmed the inconvenience of commercially available pipette tips with silica based particle sorbent for extraction of measured analytes from human serum. On other hand, laboratory-made pipette tips were emerged as suitable microextraction approach for these purposes although these pipette tips were contained particle sorbent, which is not commonly used in drug analysis in contrast to monolith sorbent. The main benefits of these laboratory-made pipette tips are their flexibility of sorbent preparation and cost, which is 20 times lower than commercial tips.

Conclusions

Three μ SPE-PT sample preparation methods: method I (μ SPE-PT with laboratory-made tips), method II (PP + μ SPE-PT with laboratory-made tips) and method III (PP + μ SPE-PT with commercial tips) were developed and validated to study and compare commercial and laboratory-made μ SPE-PT tips. μ SPE-PT extraction was performed using centrifugation approach because the pipetting approach did not allow to aspirate the serum sample directly and it was more prone to the sorbent clogging.

The μ SPE-PT method I and II using laboratory-made tips provided large variability in the choice of μ SPE-PT tips chemistry, where the type and capacity of sorbents could be optimized with regard to target analytes and tested samples. The combination of various types of sorbents could be tested, which significantly facilitates the extraction of mixtures including compounds with various structures and physicochemical properties. As the capacity of sorbent influences the loading sample volume, the variability of this parameter enables to increase the method sensitivity, which is one of the benefits of laboratory-made tips used in μ SPE-PT method I and II.

Moreover, μ SPE-PT method I using direct serum sample loading into the sorbent represents a simple and high-throughput approach facilitating the preparation of one sample set of 48 samples per 90 minutes. The number of samples in one set depends on the number of positions in centrifuge. On the other hand, although the PP included in μ SPE-PT method II significantly increased the sample preparation time, PP also afforded further benefits, such as facilitation of sample loading step, increase of eluate purity, decrease of matrix effects and release of the protein-bound drugs. Therefore, μ SPE-PT method II provided the highest recoveries of tested analytes at the expense of sample preparation time.

Compared to laboratory-made tips, the main drawbacks of the commercial tips used in μ SPE-PT method III were low sorbent capacity and high proneness to clogging leading to the need for PP before extraction. Unlike laboratory-made tips, the commercial tips provide low mechanical resistance, which significantly

complicated loading steps and adaptation of the centrifugation force. For this reason, PP was an indispensable part of the μ SPE-PT method III.

The most important parameters of sample preparation methods for clinical analysis are especially speed and cost of analysis and consumables. As the cost of commercial tips is 20 times higher than laboratory-made tips and sample preparation time is 3 times longer, the μ SPE-PT method III is not suitable tool for the extraction of small molecule drugs from serum samples. This fact was also confirmed by significant negative matrix effects without SIL-ISs correction for μ SPE-PT method III. On the other hand, the validation data together with above mentioned benefits of μ SPE-PT method I established that laboratory-made tips introduce a high potential in the field of drug analysis in biological fluids, such as serum samples.

References

- [1] L. Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84 – 98.
- [2] C. Bylka, R. Thiele, U. Kobold, D. A. Volmer, Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS, *Analysts* 139 (2014) 2265 – 2276.
- [3] L. Nováková, H. Vlčková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8 – 35.
- [4] D. C. M. Bordin, M. N. R. Alves, E. G. Campos, B. S. Martinis, Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 1168 – 1172.
- [5] P. L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala, Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 199 – 217.
- [6] H. Kataoka, Recent developments applications of microextraction techniques in drug analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 339 – 364.
- [7] Szultka M., Pomastowski P., Railean-Plugaru V., Buszewski B., Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis, *J. Sep. Sci* 37 (2014) 3094 – 3105.
- [8] J. Svačinová, O. Novák, L. Plačková, R. Lenobel, J. Holík, M. Strnad, K. Doležal, A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction, *Plant Methods* 8 (2012) 17 – 30.
- [9] J. Rappsilber, Y. Ishihama, M. Mann, Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics, *Anal Chem* 75 (2003) 663 – 670.

- [10] Namera A., Saito T., Advances in monolithic materials for sample preparation in drug and pharmaceutical analysis, *Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 182 – 196.
- [11] Hasegawa Ch., Kumazawa T., Terada M., Lee X.-P., Sato K., Uchigasaki S., Kurosaki K., A new method for quantitative determination of dimemorfan in human plasma using monolithic silica solid-phase extraction tips, *Legal Med.* 14 (2012) 267 – 271.
- [12] C. Hasegawa, T. Kumazawa, X.-P. Lee, M. Fujishiro, A. Kuriki, A. Marumo, H. Seno, K. Sato, Simultaneous determination of ten antihistamine drugs in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 537 – 543.
- [13] T. Kumazawa, C. Hasegawa, X.-P. Lee, K. Hara K, H. Seno, O. Suzuki, K. Sato, Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 602 – 607.
- [14] C. Hasegawa, T. Kumazawa, X.-P. Lee, A. Marumo, N. Shinmen, H. Seno, K. Sato, 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.
- [15] X.-P. Lee, C. Hasegawa, T. Kumazawa, N. Shinmen, Y. Shoji, H. Seno. K. Sato, Determination of tricyclic antidepressants in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2265 – 2271.
- [16] T. Kumazawa, C. Hasegawa, S. Uchigasaki, X.-P. Lee, O. Suzuki, K. Sato, Quantitative determination of phenothiazine derivatives in human plasma using monolithic silica solid-phase extraction tips and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2521 – 2527.

- [17] Z. Altun, L. G. Blomberg, M. Abdel-Rehim, Increasing Sample Preparation Throughput Using Monolithic Methacrylate Polymer as Packing Material for 96-Tip Robotic Device, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29 (2006) 1477 – 1489.
- [18] Z. Altun, A. Hjelmstrom, M. Abdel-Rehim, L. G. Blomberg, Surface modified polypropylene pipette tips packed with a monolithic plug of adsorbent for high-throughput sample preparation, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1964 – 1972.
- [19] M. Abdel-Rehim, C. Persson, Z. Altun, L. Blomberg, Evaluation of monolithic packed 96-tips and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for extraction and quantification of pindolol and metoprolol in human plasma samples *J. Chromatogr. A* 1196 – 1197 (2008) 23 - 27.
- [20] Z. Altun, A. Hjelstrom, L. G. Blomberg, M. Abdel-Rehim, Evaluation of Monolithic Packed 96-Tips for Solid-Phase Extraction of Local Anesthetics from Human Plasma for Quantitation by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31 (2008) 743 – 751.
- [21] Z. Altun, C. Skoglung, M. Abdel-Rehim, Monolithic methacrylate packed 96-tips for high throughput bioanalysis, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2581 – 2588.
- [22] H. Vlčková, P. Svoboda, O. Novák, P. Solich, L. Nováková, Development of MEPS-UHPLC–MS/MS multistatin methods for clinical analysis, *Bioanalysis* 8 (2016) 333 – 349.
- [23] International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH). Q2 (R1): Text on Validation of Analytical Procedures. US FDA Federal Register (2005).
- [24] Committee for medicinal products for human use. Guideline on Validation of Bioanalytical Methods. EMA, London, UK (2011).

- [25] H. Vlčková, M. Rabatinová, A. Mikšová, G. Kolouchová, S. Mičuda, Determination of pravastatin and pravastatin lactone in rat plasma and urine using UHPLC–MS/MS and microextraction by packed sorbent, *Talanta* 90 (2012) 22–29.
- [26] L. Nováková, H. Vlčková, D. Šatinský et al., Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2093–2103.
- [27] P. Partani, S. M. Verma, S. Gurule, A. Khuroo, T. Monif, Simultaneous quantitation of atorvastatin and its two active metabolites in human plasma by liquid chromatography/(–) electrospray tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Anal.* 4 (2014) 26–36.
- [28] B. Siddartha, I. S. Babu, Estimation and validation for determination of rosuvastatin in human plasma by LC/MS/MS method, *J. Glob. Trends Pharm. Sci.* 5 (2014) 1979–1988.
- [29] B. Ramesh, N. Manjula, S. R. Bijargi, V. U. M. Sarma, P. S. Devi, Comparison of conventional and supported liquid extraction methods for the determination of sitagliptin and simvastatin in rat plasma by LC–ESI–MS/MS, *J. Pharm. Anal.* 5 (2015) 161–168.
- [30] A. Saha, H. Jangala, P. Vats, R. Thakur, A. Khuroo, T. Monif, Stability indicating LC-MS/MS method for estimation of lovastatin in human plasma: application to a bioequivalence study, *J. Anal.Sci Technol.* 6 (2015) 19–30 .
- [31] S. R. Polagani, N. R. Pilli, V. Gandu, High performance liquid chromatography mass spectrometric method for the simultaneous quantification of pravastatin and aspirin in human plasma: Pharmacokinetic application, *J. Pharm. Anal.* 2 (2012) 206–213.
- [32] Nakashima A, Saxer C, Niina M, Masuda N, Iwasaki K, Furukawa K. Determination of fluvastatin and its five metabolites in human plasma using simple gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* 760, 17–25 (2001).

Tables:

Table 1: The main characteristics of developed μ SPE-PT methods I – III and conventional SPE method.

Figures:

Figure 1: The physicochemical properties of analytes (MW, log P, pKa)

Figure 2: The choice of optimal sorbents for individual μ SPE-PT methods: (A) method I: μ SPE-PT with laboratory-made tips, (B) method II: PP + μ SPE-PT with laboratory-made tips and (C) method III: PP + μ SPE-PT with commercial made tips - red (C18), green (C8) and blue color (combined sorbent)

Figure 3: Comparison of individual μ SPE-PT methods, their benefits and drawbacks.

Figure 4: The SRM chromatograms of spiked serum samples.

Figure 5: Comparison of validation data of μ SPE-PT and conventional SPE method (precision, accuracy, matrix effects with and without SIL-ISs correction) – method I (red), method II (yellow), method III (blue), SPE method (green)

Supplementary material (SM):

Tables:

SM Table 1: SRM transitions, ionization mode, optimal cone voltages, collision energies and retention times for individual analytes.

SM Table 2: Validation data for μ SPE-PT method I

SM Table 3: Validation data for μ SPE-PT method II

SM Table 4: Validation data for μ SPE-PT method III

SM Table 5: Comparison of matrix effects with and without SIL-ISs correction for μ SPE-PT method I – III and conventional SPE method

Figures:

SM Figure 1: Influence of ACN concentration in the elution solvent and sample volume on the recovery of individual analytes for individual sorbents: C18 (A), C8 (B) and combined SDB + C18 sorbents (C).

SM Figure 2: Optimization of washing solution (A) recovery of statins in eluate, (B) losses of statins in washing steps

SM Figure 3: Short-term stability of statins in ACN solution at laboratory temperature.

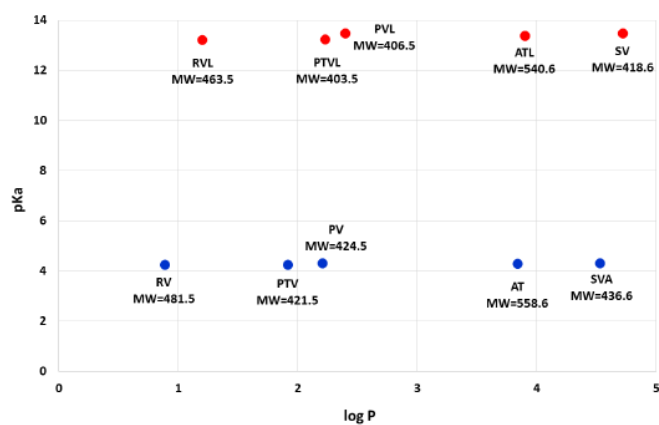
Table 1:

	Method I	Method II	Method III	SPE method
sample preparation technique	μSPE-PT	PP + μSPE-PT	PP + μSPE-PT	SPE
types of tip	laboratory-made	laboratory-made	commercially available	commercially available
types of sorbent	C8, C18, C18+SDB	C8, C18, C18+SDB	C8, C18	C18
amount of sorbent	1.2 mg, 2x1.2 mg*	1.2 mg, 2x1.2 mg*	0.4 mg	100 mg
price of sorbent per one	0.1 €	0.1 €	2 €	2 €

* sorbent C18+SDB

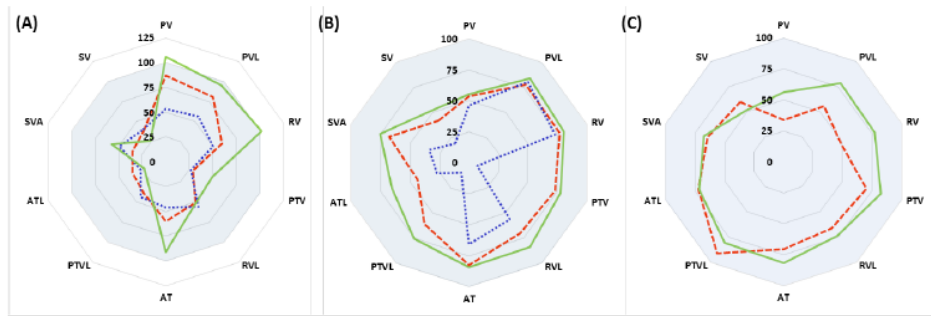
27

Figure 1:



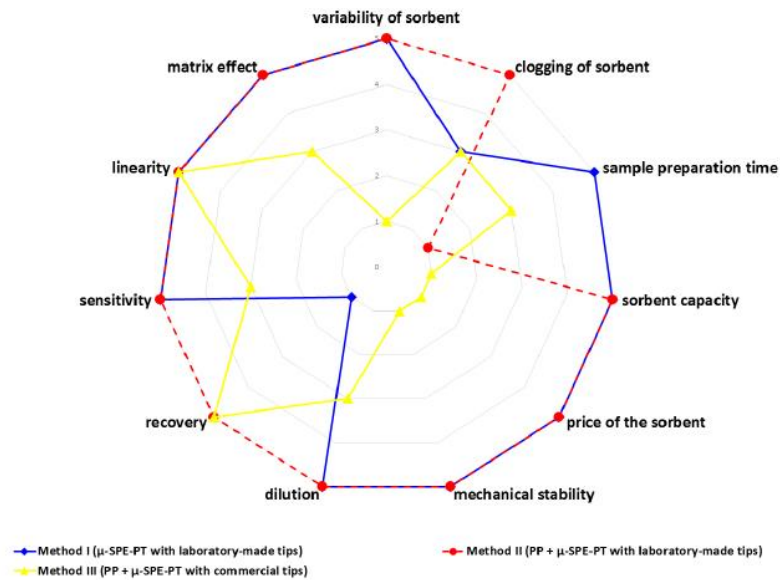
28

Figure 2:



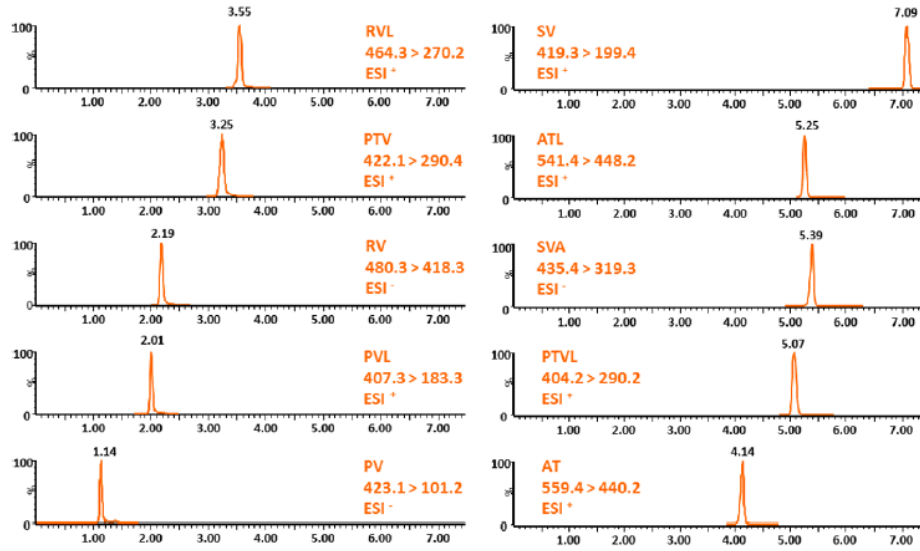
29

Figure 3:



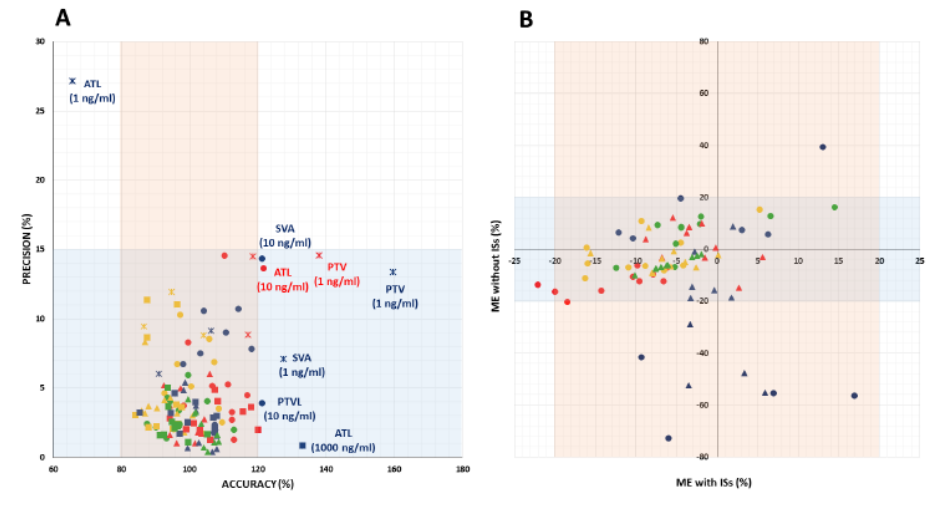
30

Figure 4:



31

Figure 5:



32

SM Table 1:

Compounds	Ionization mode	Precursor ion	Fragment ion	Cone voltage [V]	Collision energy [V]	t _R [min]
PV	ESI ⁻	423	101	35	25	1.14
PVL	ESI ⁺	407	183	20	15	2.01
RV	ESI ⁻	480	418	30	15	2.19
PTV	ESI ⁺	422	290	45	25	3.25
RVL	ESI ⁺	464	270	50	35	3.55
AT	ESI ⁺	559	440	35	20	4.14
PTVL	ESI ⁺	404	290	45	30	5.07
ATL	ESI ⁺	541	448	30	20	5.25
SVA	ESI ⁻	435	319	35	15	5.39
SV	ESI ⁺	419	285	25	10	7.09

33

SM Table 2:

	[ng/ml]	PV	PVL	RV	PTV	RVL	AT	PTVL	ATL	SVA	SV
LINEARITY		0.9996	0.9998	0.9999	0.9999	0.9997	0.9997	0.9999	0.9996	0.9994	0.9996
LLOQ [ng/ml]		5	10	5	1	1	1	5	5	1	5
	1	117.9			138.0	117.1	118.6			111.1	
ACCURACY	10	98.4	111.5	113.2	112.6	117.0	106.8	112.6	121.8	110.4	99.7
[%]	100	92.4	94.2	94.1	102.4	101.5	96.2	105.9	103.5	97.4	104.4
	1000	99.0	94.3	101.4	118.2	108.4	106.2	123.2	115.7	107.6	103.1
	1				14.6	8.8	14.5				
PRECISION	10	3.7	5.2	1.2	2.6	4.4	5.1	3.2	13.6	15.9	8.3
[%]	100	5.2	1.6	3.7	1.8	1.0	1.0	6.0	1.7	5.0	2.7
	1000	2.0	2.8	2.4	3.6	4.0	1.2	2.0	3.3	4.8	1.9
	1	95.7			94.7	118.1	113.8			138.7	
ME with ISs	10	93.9	78.0	89.7	81.6	90.2	93.5	85.8	90.5	92.2	80.1
[%]	100	93.7	91.0	98.0	93.0	92.7	91.0	100.5	102.6	96.2	95.2
	1000	98.2	94.6	96.6	91.2	96.3	93.2	98.5	102.7	99.9	105.6

34

SM Table 3:

	[ng/ml]	PV	PVL	RV	PTV	RVL	AT	PTVL	ATL	SVA	SV
LINEARITY		0.9998	0.9992	0.9997	0.9996	0.9999	0.9997	0.9999	0.9995	0.9998	0.9996
LLOQ [ng/ml]		5	5	5	1	1	1	1	1	1	5
	1				104.1	86.7	94.7	120.2	114.6	112.1	
ACCURACY	10	95.4	96.5	97.3	92.7	107.4	100.6	104.3	109.7	106.0	108.6
[%]	100	100.9	87.0	90.4	87.0	92.7	85.9	87.9	96.4	94.4	98.4
	1000	97.6	87.9	96.1	87.5	87.6	84.1	96.3	90.3	96.7	95.0
	1				8.8	9.5	11.9	8.9	8.1	28.9	
PRECISION	10	2.0	6.7	10.3	4.6	6.8	5.1	1.6	2.5	8.5	3.5
[%]	100	3.0	8.3	3.5	3.1	4.1	3.4	3.7	3.2	4.3	1.8
	1000	3.6	2.2	3.8	8.6	11.3	3.1	11.0	2.2	2.4	2.0
	1				78.1	85.1	68.1	97.2	92.7	98.0	
ME with ISs	10	105.3	83.9	95.6	89.1	84.1	90.7	93.5	83.8	91.2	95.9
[%]	100	93.3	87.9	96.7	90.6	86.3	93.2	97.2	93.3	97.6	96.0
	1000	94.3	92.0	96.0	92.1	94.7	84.4	97.4	91.6	100.2	93.2

35

SM Table 4:

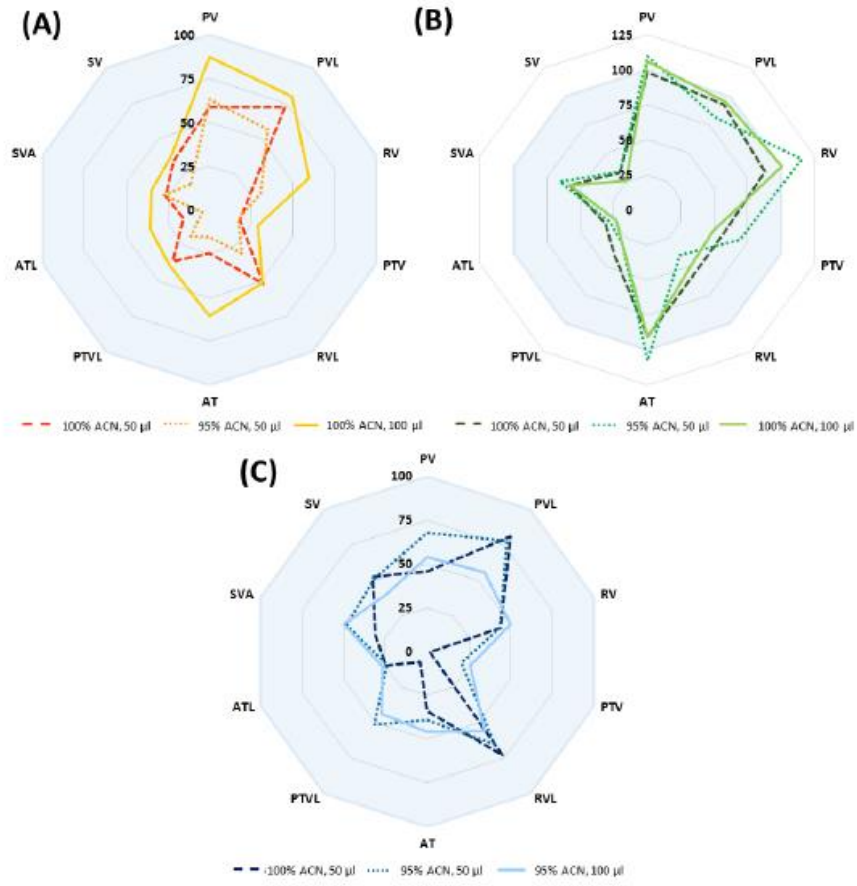
	[ng/ml]	PV	PVL	RV	PTV	RVL	AT	PTVL	ATL	SVA	SV
LINEARITY		0.9989	0.9999	0.9998	0.9998	0.9997	0.9999	0.9999	0.9997	0.9997	0.9987
LLOQ [ng/ml]		10	5	5	1	5	1	1	1	5	10
	1				159.6		106.2	90.9	65.6	127.5	
ACCURACY	10	110.8	114.5	98.3	120.4	118.4	107.5	107.2	103.3	121.5	104.3
[%]	100	98.3	99.4	101.9	107.9	98.7	106.7	108.0	107.4	102.7	101.9
	1000	99.4	101.7	106.9	85.4	94.5	97.1	107.9	133.1	95.7	107.3
	1				13.4		9.1	6.0	27.2	7.1	
PRECISION	10	9.0	10.7	6.7	3.9	7.8	2.3	1.7	7.5	14.3	10.5
[%]	100	4.8	0.7	3.7	0.6	5.4	0.4	1.6	2.1	1.1	3.4
	1000	2.5	4.0	2.9	3.2	3.2	1.7	3.0	0.8	4.6	2.0
	1				64.0		98.7	119.6	230.6	89.6	
ME with ISs	10	103.1	106.4	113.1	87.9	90.7	95.6	107.0	94.1	89.7	117.0
[%]	100	98.2	99.0	105.5	92.9	96.0	96.8	101.6	102.0	101.7	108.4
	1000	96.9	99.6	102.0	96.7	96.7	97.2	103.4	105.9	101.8	96.5

36

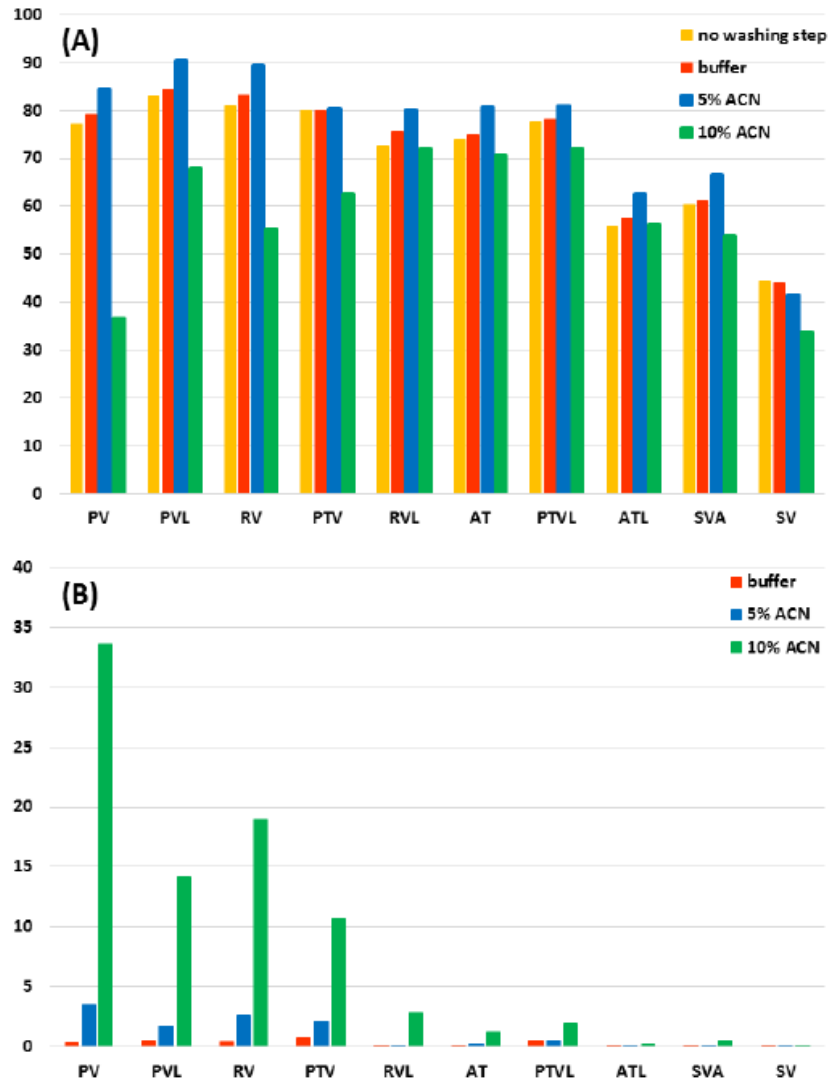
SM Table 5:

		PV	PVL	RV	PTV	RVL	AT	PTVL	ATL	SVA	SV
10 ng/ml	METHOD I	-7.2	-13.9	-10.9	-20.6	-6.4	-12.5	-16.1	-12.5	-9.9	-16.6
	METHOD II	+15.0	+0.4	+2.3	-7.3	-5.7	+10.6	-8.4	-11.5	-6.7	-6.4
	METHOD III	+7.2	+5.5	+39.1	+6.2	-41.8	+19.3	-55.7	-73.0	+3.9	-56.6
	METHOD SPE	+8.1	-7.5	+9.5	+9.1	+8.3	+12.4	+1.9	+12.5	+15.9	-7.1
1000 ng/ml	METHOD I	+9.8	+12.2	+8.5	+3.8	+6.2	-3.3	-3.2	-14.8	+0.5	-3.0
	METHOD II	-6.7	-9.2	-4.9	-9.4	-0.7	-1.5	-7.0	+8.3	-2.3	-3.6
	METHOD III	-14.4	-15.8	+8.8	-18.8	-28.9	-1.0	-47.7	-55.3	-18.6	-52.4
	METHOD SPE	-6.4	-3.7	-3.3	-7.9	-5.4	-1.5	-8.2	-4.4	-4.9	-6.7

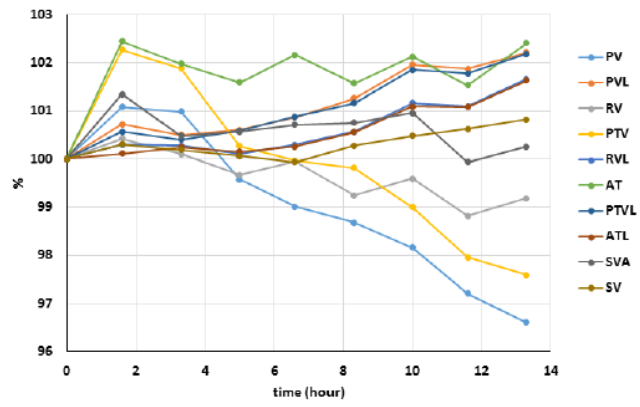
SM Figure 1:



SM Figure 2:



SM Figure 3:



8.7 Příloha 7

Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput Arabidopsis mutant screening.

A. Pěňčík, R. Casanova-Saéz, V. Pilařová, A. Žukauskaite, R. Pinto, J. L. Micol, K. Ljung, O.

Novák

Odesláno do časopisu *Journal of Experimental Botany* (IF₂₀₁₅ – 5,677)

1 **Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput Arabidopsis mutant**
2 **screening**

3
4 **Aleš Pěnčík^{1,2}, Rubén Casanova-Sáez¹, Veronika Pilařová³, Asta Žukauskaitė⁴, Rui**
5 **Pinto^{5,*}, José Luis Micol⁶, Karin Ljung¹ and Ondřej Novák^{4,†}**

6
7 ¹ Umeå Plant Science Centre, Department of Forest Genetics and Plant Physiology,
8 Swedish University of Agricultural Sciences, SE-90183 Umeå, Sweden

9 ² Department of Chemical Biology and Genetics, Centre of the Region Haná for
10 Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University,
11 Šlechtitelů 27, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic

12 ³ Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles
13 University in Prague, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic

14 ⁴ Laboratory of Growth Regulators, Centre of the Region Haná for Biotechnological and
15 Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University & Institute of Experimental
16 Botany AS CR, Šlechtitelů 27, CZ-783 71 Olomouc, Czech Republic

17 ⁵ Computational Life Science Cluster (CLiC), Chemistry department (KBC) – Umeå
18 University, Umeå, Sweden

19 ⁶ Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Campus de Elche, 03202
20 Elche, Alicante, Spain

21
22 ^{*} Present address: Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health,
23 Imperial College, London, UK.

24
25 [†] To whom correspondence should be addressed. E-mail: novako@ueb.cas.cz, tel:
26 +420585634853, fax: +420585634870.

27
28 Aleš Pěnčík, ales.pencik@upol.cz; Rubén Casanova Sáez, ruben.casanova.saez@slu.se;
29 Veronika Pilařová, pilarovaveronika@gmail.com; Asta Žukauskaitė:
30 asta.zukauskaite@upol.cz; Rui Pinto, r.pinto@imperial.ac.uk; José Luis Micol,

31 jlmicol@umh.es; Karin Ljung, karin.ljung@slu.se; Ondřej Novák, novako@ueb.cas.cz

32

33 **Date of submission:**

34 **Number of tables:** 1

35 **Number of figures:** 6

36 **Total words count:** 5152

37 **Supplementary data:**

38 **Number of Supplementary tables:** 2

39 **Number of Supplementary figures:** 5

40

41 **Running title**

42 A high-throughput method for screening auxin mutants

43

44 **Highlight**

45 We have developed a rapid screening method to identify mutants with an altered auxin
46 metabolite profile, and validated the method using a collection of *Arabidopsis* leaf mutants.

47

48 **Abstract**

49 Auxin (indole-3-acetic acid, IAA) plays fundamental roles as a signalling molecule during
50 numerous plant growth and development processes. The formation of local auxin gradients
51 and auxin maxima/minima, which is very important for these processes, is regulated by
52 auxin metabolism (biosynthesis, degradation and conjugation) as well as transport. When
53 studying auxin metabolism pathways it is crucial to combine data obtained from genetic
54 investigations with the identification and quantification of individual metabolites. Thus, to
55 facilitate efforts to elucidate auxin metabolism and its roles in plants we have developed a
56 high-throughput method for simultaneously quantifying IAA and its key metabolites in
57 minute amounts (<10 mg fresh weight) of *Arabidopsis thaliana* tissues. Our method
58 involves isolating IAA metabolites from plant extracts by in-tip micro solid-phase
59 extraction followed by fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry, enabling
60 very rapid analysis of large numbers of samples (approx. 100 samples per day). As a proof
61 of concept, we applied the method to a collection of *Arabidopsis* mutant lines isolated on
62 the basis of leaf phenotypes. Multivariate data analysis was then applied to identify the
63 mutant lines that also had altered IAA metabolite profiles. The developed approach has a
64 great potential for screening of large mutant line collections.

65

66 **Key words:** Auxin, metabolite profiling, *Arabidopsis thaliana*, mutant, screening,
67 multivariate data analysis.

68

69

70 **Introduction**

71

72 Auxin (indole-3-acetic acid, IAA) plays major roles as a signal molecule in numerous plant
73 growth and development processes. A crucial step in many of these processes is the
74 formation of local auxin gradients and maxima/minima within plant tissues (Benková *et al.*,
75 2003), through tightly regulated interplay between biosynthesis, conjugation, degradation
76 and directional transport of auxin (Rosquete *et al.*, 2012).

77 L-Tryptophan (Trp), an amino acid generated by the shikimate pathway, is the key
78 precursor in three major auxin biosynthesis pathways in plants: the indole-3-acetamide
79 (IAM), indole-3-acetaldoxime (IAOx), tryptamine (TRA) and indole-3-pyruvic acid (IPyA)
80 pathways, named according to the major intermediate (Fig. 1). For reviews see Mano and
81 Nemoto (2012), Ljung (2013) and Kasahara (2015). These pathways are believed to be the
82 main sources of *de novo* synthesized auxin, but Trp-independent pathways may also exist
83 (Tivendale *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Following biosynthesis, and often transport,
84 auxin may be degraded by oxidation and subsequent conjugation, yielding the major
85 metabolites 2-oxindole-3-acetic acid (oxIAA) and oxIAA-glucose (oxIAA-Glc) (Östin *et al.*
86 *et al.*, 1998; Kai *et al.*, 2007a; Pěnčík *et al.*, 2013).

87 Another auxin inactivation mechanism is the formation of conjugates with amino acids
88 or sugars (Tam *et al.*, 2000; Kowalczyk and Sandberg, 2001). Some of these conjugates
89 might be hydrolysed, releasing free active auxin, indicating that they may serve as
90 temporary storage forms of the inactive hormone (reviewed by Ludwig-Müller, 2011).
91 However, in *Arabidopsis thaliana* the most abundant amide-linked conjugates, IAA-
92 aspartate (IAA_{Asp}) and IAA-glutamate (IAA_{Glu}), are not reversibly converted to IAA, and
93 likely serve as degradation intermediates (Kowalczyk and Sandberg, 2001; Woodward and
94 Bartel, 2005). Furthermore, the roles and regulation of the different pathways of auxin
95 biosynthesis and degradation/conjugation are not well understood. Thus, there are still
96 many gaps in our knowledge of auxin metabolic processes and functions of the genes
97 involved.

98 To improve understanding of auxin metabolism in given tissues or processes,
99 information on levels of the free hormone, its biosynthetic precursors and major

100 metabolites is highly important. However, analysing plant hormones is challenging due to
101 their very low concentrations and the complexity of plant extracts (Tarkowská *et al.*, 2014).
102 Furthermore, many of these compounds are unstable and can be easily degraded during
103 extraction and purification. Fortunately, some of the problems associated with
104 phytohormone analysis can be overcome by exploiting recent advances in analytical
105 techniques, such as ultra-fast liquid chromatography coupled with high-sensitivity tandem
106 mass spectrometry (LC-MS/MS) (Novák *et al.*, 2014). For samples containing minute
107 amounts of tissue, the sensitivity of the analytical method can also be improved by
108 miniaturization of the extraction and purification steps, which can minimize analyte losses
109 due to adsorption to surfaces and/or increase analyte recovery in the solid phase extraction
110 (SPE) step (Svačinová *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012).

111 Further advances are still required. There is a particular need for a simple, high-
112 throughput analytical approach that provides sufficient robustness, sensitivity and
113 selectivity for analyses of large numbers of samples, e.g. mutant libraries. Thus, in the
114 study presented here an ultra-rapid auxin profiling method, involving micro-scale in-tip
115 solid phase extraction (in-tip μ SPE) and ultra-fast LC-MS/MS analysis was developed and
116 evaluated. The high-throughput approach was successfully validated against the previously
117 published purification protocol using a polymer-based reversed phase sorbent (Novák *et al.*,
118 2012). The method was then used for screening a collection of Arabidopsis mutant lines
119 (Berná *et al.*, 1999; Pérez-Pérez *et al.*, 2009), and several lines with altered IAA metabolite
120 profiles were identified using multivariate data analysis (MVDA). Compared to previously
121 published methods, our novel method is more rapid and less time-consuming (more than
122 100 per day). This makes it an ideal tool for screening of large collections of Arabidopsis
123 mutant lines.

124

125

126 **Materials and methods**

127

128 *Reagents and standards*

129 Standards for the IAA metabolites ANT, IAA, IAAld, IAM, IAN, IPyA, TRA and Trp were
130 purchased from Sigma-Aldrich (<http://www.sigmaaldrich.com>), and standards for IAOx
131 and oxIAA from Olchemim Ltd. (<http://www.olchemim.cz/>). Unlabelled IAAsp and IAGlu,
132 their [indole-¹³C₆]-labelled forms, and 2-oxo-[indole-¹³C₆]-IAA were synthesized as
133 described by Ilić *et al.* (1997) and van de Weert *et al.* (1998), with modifications described
134 by Kowalczyk and Sandberg (2001). Unlabelled and [indole-¹³C₆]-labelled IAA-glucose
135 and oxIAA-glucose were synthesized modifying literature procedures previously described
136 by Kai *et al.* (2007b). [Benzyl-¹³C₆]-ANT and [indole-¹³C₆]-IAA were obtained from
137 Cambridge Isotope Laboratories (<http://www.isotope.com>), and [β, β-²H₂]-TRA and
138 [indole-³H₅]-Trp from C/D/N Isotopes (<https://www.cdnisotopes.com>). Labelled IAAld,
139 IAM and IAN were synthesized from the methyl ester of unlabelled IAA or [¹³C₆]-IAA
140 using the method described by Kowalczyk (2002). [Indole-²H₅]-IAOx and [indole-²H₄]-
141 IPyA were synthesized as described by Novák *et al.* (2012). Acetic acid was purchased
142 from Merck (<http://www.merck.com>); diethyldithiocarbamic acid sodium salt and
143 cysteamine hydrochloride from Sigma-Aldrich; Murashige & Skoog (MS) medium from
144 Duchefa (<http://www.duchefa.com>), and HPLC gradient grade solvents from J.T. Baker
145 (<http://www.jtbaker.nl>). All other chemicals were from Lach-Ner (<http://www.lach-ner.com>) and Sigma-Aldrich.

147

148 *Plant material and growth conditions*

149 Seven-day-old Arabidopsis wild-type seedlings were used as material for development and
150 validation of the ultra-rapid auxin metabolite profiling method. The 64 Arabidopsis leaf
151 mutants used in this study were isolated in the laboratory of José Luis Micol and have been
152 described by Berná *et al.* (1999) and Pérez-Pérez *et al.* (2009). The *sur2-1* mutant line
153 (Barlier *et al.*, 2000) was included as a positive control. Arabidopsis Columbia-0 (Col-0)
154 and Landsberg *erecta* (*Ler*) wild-type accessions were obtained from the Nottingham
155 Arabidopsis Stock Centre (NASC). All seeds were surface-sterilized using a bleach solution
156 containing 0.002% Triton X-100 and then sown on Murashige and Skoog (MS) square agar
157 plates (4.4 g L⁻¹ MS, 0.5 g L⁻¹ MES monohydrate and 8 g L⁻¹ plant agar, pH 5.7). After 3

6

158 days of stratification, the plates were placed vertically in long-day conditions (16 h light/8 h
159 dark) at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ under cool white fluorescent light (maximum irradiance $550 \mu\text{mol m}^{-2}$
160 s^{-1}). Whole seedlings were collected in five replicates and weighed, immediately frozen in
161 liquid nitrogen and stored at -80°C until extraction.

162

163 *Extraction and purification of IAA metabolites*

164 For quantification of IAA and its metabolites, samples containing 10 mg plant material
165 (fresh weight) were extracted in 1 ml cold Na-phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) containing
166 1% diethyldithiocarbamic acid sodium salt. The following stable isotope-labelled internal
167 standards were added to each sample: [$^{13}\text{C}_6$]-IAA_{asp}, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA_{glu}, [$^{13}\text{C}_6$]-ANT, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA,
168 [$^{13}\text{C}_6$]-IAM, [$^2\text{H}_5$]-IAOx, [$^2\text{H}_2$]-TRA, [$^{13}\text{C}_6$]-oxIAA, [$^{13}\text{C}_6$]-IAA-glc and [$^{13}\text{C}_6$]-oxIAA-glc
169 (all at 2.5 pmol per sample); [$^2\text{H}_4$]-IPyA and [$^{13}\text{C}_6$]-IAN (5 pmol per sample); and [$^2\text{H}_5$]-
170 Trp (50 pmol per sample). The samples were homogenized using a MixerMill MM 301
171 bead mill (Retsch GmbH; <http://www.retsch.com>) at a frequency of 29 Hz for 6 min after
172 adding 2 mm ceria-stabilized zirconium oxide beads. The plant extracts were incubated at
173 4°C with continuous shaking (10 min), centrifuged (15 min, 23,000 g at 4°C) and purified
174 by in-tip microSPE using self-packed micro-SPE columns prepared according to Svačinová
175 *et al.* (2012). The columns contained two types of extraction sorbents (three layers of each
176 type): C₁₈ and SDB-XC (EmporeTM, 3MTM; <http://www.3m.com>).

177 200 μl of each plant extract was acidified to pH 2.7 with 1 M hydrochloric acid (ca.
178 100 μl) and loaded on a micro-SPE column that had been activated with 50 μl acetone (by
179 centrifugation at 2200 rpm, 10 min, 4°C), 50 μl methanol (2,200 rpm, 10 min, 4°C) and 50
180 μl water (2,200 rpm, 15 min, 4°C). After sample application (3,400 rpm, 25 min, 4°C), the
181 column was washed with 50 μl 0.1% acetic acid (3400 rpm, 15 min, 4°C) then eluted with
182 50 μl 80% methanol (3,400 rpm, 15 min, 4°C). Another 200 μl of the extract was
183 derivatized by adding 100 μl of 0.75 M cysteamine (pH 8.2) to convert the labile
184 compounds IAA_{ld} and IPyA to their respective thiazolidine derivatives IAA_{ld}-TAZ and
185 IPyA-TAZ (Novak *et al.*, 2012). After 15 min incubation, the sample was adjusted to pH
186 2.7 and purified as described above. Both eluates were pooled into one vial, evaporated to
187 dryness *in vacuo* and stored at -20°C until LC-MS/MS analysis.

7

188 Multi-StageTips with C₁₈/C₈ and C₁₈/SDB-RPS combinations of sorbent types were
189 also prepared for development of the purification method. Briefly, microcolumns of both
190 kinds were activated sequentially with 50 µl each of acetone, methanol and water (by
191 centrifugation at 2,200 rpm, 10-15 min, 4°C) and aliquots of the acidified sample extract
192 was applied (3,400 rpm, 25 min, 4°C). The microcolumns were then washed with 50 µl of
193 0.1% acetic acid (3,400 rpm, 15 min, 4°C), and samples were respectively eluted from the
194 C₁₈/C₈ and C₁₈/SDB-RPS sorbents with 50 µl of 80% methanol and 50 µl of 0.5 M NH₄OH
195 in 80% (v/v) methanol (3,400 rpm, 15 min, 4°C). To validate the final µSPE protocol,
196 extracts were also purified on Oasis HLB columns (30 mg, Waters Corp., Milford, USA),
197 conditioned with 1 ml methanol, 1 ml water, and 0.5 ml Na-phosphate buffer (pH 2.7) as
198 described by Novak *et al.* (2012). After sample application, the columns were washed with
199 2 ml 5% methanol and then eluted with 2 ml 80% methanol. All eluates were evaporated to
200 dryness and stored as described above.

201

202 *Quantification of LAA metabolites*

203 The evaporated samples were dissolved in 40 µl of mobile phase prior to LC-MS/MS
204 analysis, using a 1290 Infinity LC system and a 6490 Triple Quadrupole LC/MS system
205 equipped with Jet Stream and Dual Ion Funnel systems (Agilent Technologies,
206 <http://www.home.agilent.com>). A 20 µl portion of each sample was injected onto a
207 reversed-phase column (Kinetex C18 100A, length 50 mm, diameter 2.1 mm, particle size
208 1.7 µm; Phenomenex, <http://www.phenomenex.com>) and the analytes were eluted by a 3
209 min linear gradient of 5:95 to 35:65 A:B, where A and B are 0.1% acetic acid in methanol
210 and 0.1% acetic acid in water, respectively. The column was then washed with 100%
211 methanol (1.0 min), and re-equilibrated to initial conditions (1.0 min). Throughout the
212 procedure the flow rate was 0.5 ml min⁻¹, and column temperature 40°C. The effluent was
213 introduced into the MS system with the optimised settings listed in Table S2. Analytes were
214 quantified using diagnostic MRM transitions of precursor and appropriate product ions
215 using optimal collision energies and 50 msec dwell time (Table S2). Chromatograms were
216 analysed using MassHunter software (version B.05.02; Agilent Technologies), and the

217 compounds were also quantified by standard isotope dilution analysis (Rittenberg and
218 Foster, 1940).

219

220 *Experimental design and data analysis*

221 Seeds from all Arabidopsis mutant and *Ler* wild-type lines were sown in five rows per
222 plate, with 50-70 seeds per row. Plates containing *Ler* seedlings were randomly placed
223 along the racks, so that any growth variation due to the position of the plate in the growth
224 room shelves would be represented in the reference data. Replicates containing 10 mg
225 (fresh weight) of 7-day-old seedlings were harvested (5 replicates for each mutant line,
226 including the *sur2-1* positive control; and 20 replicates for the *Ler* wild type).

227 PCA models, distance of each sample to the wild-type PCA model (T2 and
228 DMOXP+) and Orthogonal Projections to Latent Structures-Discriminant Analysis
229 (OPLS-DA) loadings were calculated using "Soft Independent Modeling of Class
230 Analogies" (SIMCA) software version 13 (Umetrics AB, Umeå, Sweden). Clustergrams
231 were drawn using R software.

232

233

234 **Results and discussion**

235

236 *Selection of stationary phases for micro-solid-phase extraction of IAA metabolites*

237 One of the most crucial steps in the development and optimization of a purification method
238 for metabolite profiling is selection of suitable SPE sorbents. Ideally, they should afford
239 good retention and high recovery of all target compounds (which may have diverse
240 chemical properties), while excluding others. They must also be compatible with any
241 miniaturized equipment to be used: here, self-made stop-and-go-extraction tips (StageTips)
242 made from ordinary pipette tips containing very small disks made of beads with reversed
243 phase, cation-exchange or anion-exchange surfaces immobilized on a Teflon mesh
244 (Rappsilber *et al.*, 2003). We previously showed that auxin metabolites can be efficiently
245 retained by reversed phase sorbents (Novák *et al.*, 2012). Therefore, two sorbents with long
246 alkyl chains (octyl, C₈ and octadecyl, C₁₈) and two poly(styrene-divinylbenzene) copolymer-

9

247 based sorbents (SDB-RPS and SDB-XC) were selected and used for testing in the study
248 presented here.

249 Accordingly, IAA and its precursors and degradation products were retained and eluted
250 with varying efficiency (Fig. 2A). A combination of C₁₈/C₈ sorbents retained 19 to 75% of
251 all of the IAA metabolites, except the most polar compounds (TRA and Trp). StageTips
252 combining C₁₈ and SDB-based sorbents provided the highest extraction yields. Because
253 SDB-RPS modified with sulfonic acid groups enables reversed phase and cation exchange
254 interactions, amine-containing basic analytes, anthranilate (ANT), TRA, and Trp were
255 enriched by C₁₈/SDB-RPS columns with high recoveries: 63 ± 1%, 70 ± 2%, 82 ± 1%,
256 respectively. However, recoveries of IAA-glucose (IAA-glc) and oxIAA-glucose (oxIAA-
257 glc) were far too low with these columns (1.6 ± 0.1 and 1.0 ± 0.1%, respectively), due to
258 degradation of these conjugates under the alkaline conditions (Table S1) required for
259 elution from the SDB-RPS sorbent. In contrast, use of C₁₈/SDB-XC columns, which does
260 not exploit the cation exchange interactions, enabled maximization of yields from the in-tip
261 μSPE step and minimization of losses due to pH lability (Fig. 2A). Moreover, the C₁₈/SDB-
262 XC combination retained the polar compounds (TRA and Trp) more strongly than the
263 reversed phase sorbents, C₁₈/C₈; this combination allows lower recovery of Trp during the
264 purification step (10 ± 2%), but this is not limiting due to the very high endogenous levels
265 of Trp in plants (Novák *et al.*, 2012). Therefore, we decided to further optimize the one-
266 step purification protocol for multi-μSPE columns using a combination of C₁₈ and SDB-XC
267 sorbents.

268

269 *Development of a micro-SPE purification method for IAA metabolites*

270 IAA metabolites (precursors, catabolites and conjugates) include compounds with widely
271 varying physical-chemical properties, stabilities and abundance in crude plant extracts.
272 Thus, sample processing (extraction and purification) methods and sample sizes strongly
273 affect the retention of IAA and its metabolites on SPE sorbents. In order to minimise
274 contamination with non-polar extractable substances that could interfere with subsequent
275 mass spectrometry-based analyses (e.g., pigments and lipids), we used 50 mM Na-
276 phosphate buffer (pH 7.0) as the extraction solvent (Edlund *et al.*, 1995).

10

277 To maximize recoveries of the analytes when using the μ SPE-based approach we also
278 optimized the loading conditions, by assessing effects of variations in conditions on
279 analytes classified in terms of their stability and acidity or basicity (in three classes: basic,
280 neutral and acidic). The loading capacities were calculated as recoveries of the initial
281 amount of each of the metabolites (1 pmol), as shown in Supplementary Fig. S1. We
282 obtained higher recovery under acidic conditions (pH 2.7) of most metabolites (mean
283 recovery, $75 \pm 25\%$, with overall means of 75%, 65% and 90% for the basic, neutral and
284 acidic compounds, respectively) than under neutral pH. As expected, yields of the neutral
285 IAA precursor indole-3-acetaldoxime (IAOx) were higher in extraction buffer with neutral
286 pH ($96 \pm 3\%$) than under acidic conditions ($31 \pm 1\%$), in accordance with the previously
287 reported lability of IAOx in strongly acidic solutions (Novák *et al.*, 2012).

288 Indole-3-pyruvic acid (IPyA) also has previously demonstrated instability in solution,
289 therefore derivatization is required for its accurate quantification (Tam and Normanly,
290 1998; Mashiguchi *et al.*, 2011). For this purpose, we converted IPyA to the thiazolidine
291 product IPyA-TAZ by derivatization with cysteamine following Novák *et al.* (2012), but
292 miniaturized the derivatization step by using 200 μ l of crude plant extract (from approx. 2
293 mg fresh weight, FW, of plant tissue) with 100 μ l of 0.75 M cysteamine (pH 8.2). This
294 afforded 15-fold greater yields of IPyA-TAZ from minute samples than the original
295 derivatization protocol (Novák *et al.*, 2012).

296 We then tested the influence of a complex multi-component plant matrix on recoveries
297 of diverse IAA metabolites in small amounts of plant tissue. The efficiency of the whole
298 developed method was evaluated by spiking 10-day-old Arabidopsis seedling extracts with
299 a mixture of stable isotope-labelled standards, each at 2.5 pmol, except [$^{13}\text{C}_6$]-indole-3-
300 acetonitrile (IAN) and [$^2\text{H}_4$]-IPyA (5 pmol), and [$^2\text{H}_5$]-Trp (50 pmol). Recoveries were
301 calculated as percentages of the amounts of the respective compounds added to the sample
302 prior to the StageTip purification procedure. We first examined the extraction capability of
303 multi-StageTip columns packed with one, three and five layers of each sorbent type (C₁₈
304 and SDB-XC) using a crude extract from 2.5 mg fresh weight of plant tissue. As shown in
305 Fig. 2B, recoveries increased as the number of sorbent multi-layers increased (mean total
306 extraction yields were approximately 30, 40 and 60% with 1, 3, and 5 bi-layers,

307 respectively). Thus, IAA metabolites could be most effectively enriched by using
308 microcolumns packed with five layers of each sorbent (C₁₈ and SDB-XC). However, these
309 columns were most prone to clogging due to the high number of layers (10 in total), which
310 hindered subsequent washing (0.1% acetic acid) and elution (80% methanol) steps.
311 Consequently, multi-StageTips packed with three layers were used in further analyses, and
312 their capacity to isolate IAA metabolites was tested by using them to purify extracts from
313 four different amounts of fresh *Arabidopsis* tissue (1.0, 2.5, 5.0 and 7.5 mg). As expected,
314 recoveries declined with increasing amounts of fresh plant tissue from overall means of 61
315 ± 22% for extracts from 1.0 mg to 26 ± 11% for extracts from 7.5 mg, due to overloading
316 of the sorbents (Fig. 3). We concluded that 200 µl of a Na-phosphate buffer extract
317 containing 2 mg plant material (fresh weight) was optimal for purifying IAA and its key
318 metabolites using a C₁₈/SDB-XC multi-StageTips microcolumn. Approximately 100
319 samples can be extracted and purified by this approach per working day. The final method
320 for high-throughput extraction and purification of *Arabidopsis* samples is shown in Fig. 4.

321

322 *A rapid LC-MS/MS method for IAA metabolite profiling*

323 The most suitable and widely used analytical techniques for auxin analysis currently
324 available are based on mass spectrometry (Matsuda *et al.*, 2005; Kai *et al.*, 2007a; Pěnčík *et al.*,
325 2009; Sugawara *et al.*, 2009; Mashiguchi *et al.*, 2011; Floková *et al.*, 2014). Recent
326 increases in their sensitivity and selectivity enable tissue- and cell-specific quantification of
327 IAA and diverse IAA metabolites (Novák *et al.*, 2012; Pěnčík *et al.*, 2013). However, in
328 order to process hundreds of samples from *Arabidopsis* mutant screens a high-throughput
329 method for auxin profiling was needed. Thus, we combined the micro-scale purification
330 method with rapid, highly sensitive and selective quantification, using liquid
331 chromatography coupled to electrospray (ESI) tandem mass spectrometry, LC-MS/MS.
332 Using a Kinetex™ column with core-shell technology, IAA and 14 precursors, catabolites
333 and conjugates were separated under optimized conditions (listed in Table S2) in just 3.5
334 min (Fig. 4). Under these conditions retention time stability ranged between 0.07% and
335 0.86% RSD (relative standard deviation), and chromatographic runs were split into three
336 targeted scan windows (0.8-1.4, 1.4-2.5, 2.5-3.7 min).

12

337 Most of the precursor and product ions of IAA metabolites determined under optimized
338 LC-MS/MS conditions corresponded well with previously published data (Novák *et al.*,
339 2012). Moreover, unlabelled and labelled IAA-glc and oxIAA-glc were included in the IAA
340 profiling, and detected in negative-ion as well as positive-ion multi-reaction monitoring
341 (MRM) mode. In accordance with previously published MS/MS patterns (Kai *et al.*,
342 2007a), IAA and oxIAA ions (m/z 174 and 190, respectively) were detected as high-
343 intensity fragments of IAA-glc and oxIAA-glc in negative-ion mode. However, it is well
344 known that negative ion mode (ESI⁻)-MS is generally less sensitive than positive ion mode
345 (ESI⁺) (see Supplementary Fig. S2). In efforts to increase sensitivity, we also examined
346 ionization patterns of IAA-glucose conjugates in (ESI⁺)-MRM mode. The neutral losses of
347 a sugar moiety (162 Da) through in-source fragmentation of precursor ions (m/z 338 of
348 IAA-glc and m/z 354 of oxIAA-glc) produced high-intensity ions, and subsequent
349 fragmentations in the quadrupole collision cell led to quinolinium/quinolonium ions (m/z
350 130 and 146, respectively) (Kowalczyk and Sandberg, 2001). Thus, MRM transitions m/z
351 176>130 and m/z 192>146 were used to detect IAA/IAA-glc and oxIAA/oxIAA-glc,
352 respectively. Moreover, both molecule pairs were fully resolved under our reversed phase
353 LC conditions (Fig. 4 and Supplementary Table S2).

354 To determine the limits of detection (LODs) and linear calibration ranges of the ultra-
355 fast LC-MS/MS method, we constructed calibration curves using data obtained from
356 repeated injections of sets of standards in 12 amounts ranging from 1.0 fmol to 500 pmol.
357 We also applied the stable isotope dilution method, comparing response ratios of each pair
358 of unlabelled and labelled compounds. The responses covered a very broad linear range,
359 spanning at least four orders of magnitude with correlation coefficients (R^2) exceeding
360 0.9975 (Table S2), in accordance with previously published linear ranges of LC-MS/MS
361 methods (Matsuda *et al.*, 2005; Pěnčík *et al.*, 2009; Floková *et al.*, 2014). As expected, the
362 LOD of the IAA metabolites (defined as the amount resulting in a signal-to-noise ratio of 3)
363 differed, reflecting differences in their physicochemical properties, ionization behaviour
364 and separation. In the optimized MRM mode, the LODs ranged from 2.5 to 50 fmol (Table
365 S2). Overall, the method's sensitivity enabled the straightforward analysis and

366 determination of IAA metabolites in extracts of just 2.0 mg FW of Arabidopsis tissue, and
367 more than 250 samples could be quantified per day.

368

369 *Validation of the profiling method*

370 The effectiveness of the method was validated by spiking experiments, in which a
371 homogenous Arabidopsis extract was divided into aliquots, each containing 2 mg of fresh
372 tissue, supplemented with 1, 10 or 100 pmol of authentic standards (depending on the
373 natural content of the respective metabolites) and a mixture of stable labelled internal
374 standards (2.5 pmol of each, except for 5 pmol [¹³C₆]-IAN and [²H₄]-IPyA, and 50 pmol
375 [²H₅]-Trp). Samples were then purified by the one-step multi- μ SPE protocol and
376 subsequently analysed by LC-MS/MS. After subtracting endogenous auxin metabolite
377 contents, contents of individual added metabolites were calculated. The results confirmed
378 the high precision and accuracy of the method (Fig. 3B). Both parameters were determined
379 by analysing four replicate samples spiked with 1 or 10 pmol of each analyte, and another
380 four spiked with 10 or 100 pmol of each analyte. The mean precision obtained in the
381 spiking experiments with *Arabidopsis* extracts was $6 \pm 3\%$ RSD and the mean accuracy for
382 all compounds was $1 \pm 17\%$ BIAS (percent deviation from the accepted reference value),
383 confirming the robustness of our method.

384 We also processed an extract from 7-day-old Arabidopsis seedlings using both our new
385 μ SPE-based method and the previously published one-step purification protocol, involving
386 purification on reversed phase OasisTM HLB columns (Novák *et al.*, 2012).

387 Levels of IAA and its metabolites (precursors, catabolites and conjugates), analysed by
388 ultra-fast LC-MS/MS and quantified by standard isotope dilution, following the two
389 purification methods were similar (Table 1). Furthermore, profiles and levels of most
390 known auxin precursors and conjugates/catabolites were similar to previously published
391 patterns (Kai *et al.*, 2007; Novák *et al.*, 2012). The miniaturized SPE system also provided
392 substantially better method precision (Table 1) than the commercially available polymeric
393 HLB columns, with an overall mean of 3.4% RSD compared to 4.7% RSD. However, it
394 was not possible to calculate IAOx, TRA and IAM levels in extracts purified by StageTips

395 microcolumns, probably due to their very low endogenous levels, low capacity of C₁₈/SDB-
396 XC sorbents (Fig. 2) and/or strong effects of the plant matrix.

397 Taken together, our results in these validation experiments demonstrate the accuracy
398 and robustness of our high-throughput method for routine determination of key auxin
399 precursors and conjugates/catabolites in minute samples of plant material (<10 mg fresh
400 weight).

401

402 *High-throughput mutant screening of Arabidopsis lines*

403 Next we tested the ability of our method to identify genotypes with abnormal IAA
404 metabolite profiles within a collection of Arabidopsis mutant lines. We chose 64 lines that
405 were initially isolated based on perturbations in their leaf morphology (Bemá *et al.*, 1999;
406 Pérez-Pérez *et al.*, 2009), indicative of possible perturbations in auxin metabolism,
407 transport, reception or sensitivity. The Landsberg *erecta* (*Ler*) accession, which is the
408 genetic background of the mutants, was used as a wild-type control for the analysis, and the
409 auxin over-producing mutant line *sur2-1* (Barlier *et al.*, 2000) was included among the
410 mutant lines as a positive control (Supplementary Fig. S3).

411 High-throughput auxin metabolite profiling, combining the one-step in-tip μ SPE
412 purification protocol and ultra-fast LC-MS/MS analysis (Fig. 4), was performed on a total
413 of 365 samples (five biological replicates per mutant line and 20 biological replicates of the
414 *Ler* wild-type; see *Experimental procedures*). This approach allowed multiplex
415 quantification of IAA and its precursors (ANT, Trp, IPyA, IAOx, IAN) and degradation
416 products (oxIAA, IAAsp, IAGlu, IAA-glc and oxIAA-glc), but not (under our method
417 conditions) TRA and IAM, as their signal intensities were consistently below their
418 respective LODs. Multivariate Data Analysis (MVDA) was then applied to the dataset to
419 identify mutant lines with significantly different metabolite profiles from the *Ler* wild type.
420 IAOx values were excluded from our MVDA, since many of the values for this metabolite
421 were lower than the LOD.

422 The MVDA showed that profiles of several lines were far from that of the wild-type
423 PCA model (Fig. S4), based on Hotelling distance (T₂) and distance to the model
424 (DModXP+) values, which indicate how different a line is from the wild type. However, to

425 select lines with the most strongly differing profiles we arbitrarily set thresholds of 60 and
426 10 in T2 and DModXP+ boxplots, respectively (Supplementary Fig. S4). Five mutant lines
427 with above threshold values were identified as lines having markedly different IAA
428 metabolite profiles (Fig. 5 and Supplementary Fig. S4). These lines (*ero1*, *sea4-1*, *ucu2-1*,
429 *ond1* and *rug1-1*; Fig. 5D) also separated from other samples in our principal component
430 analysis (PCA; Fig. 5B-C). As expected, the positive control line (*sur2-1* line) was also
431 found to be strongly different from wild type (Fig. 5A and Supplementary Fig. S4) and
432 markedly separated in the PCA due to differences particularly in IAA, oxIAA, IAAsp,
433 IAA-glc and oxIAA-glc levels (Fig. 5B). This is consistent with previously published data
434 from auxin metabolite profiling of the *sur2-1* mutant line by Novák *et al.* (2012), which
435 corroborates the accuracy of our analytical method.

436 Clustering of the lines' average concentrations of metabolites (Fig. 6A) revealed high
437 diversity in the profiles, as expected for mutants isolated based on a criterion (perturbations
438 of leaf architecture) that might be associated with diverse metabolic phenotypes.
439 Orthogonal Projections to Latent Structures-Discriminant Analysis (OPLS-DA) models
440 were constructed for the most different mutant lines, including *sur2-1*, to visualize patterns
441 of differences among the metabolites (Fig. 6B), which correlated with the differences in
442 metabolite concentrations (Supplementary Fig. S5). As shown in Fig. 6B and
443 Supplementary Fig. S5, metabolic profiles of the selected mutant lines (*ero1*, *sea4-1*, *ucu2-*
444 *1*, *ond1* and *rug1-1*) were very different from that of the *Ler* wild type. However,
445 metabolite profiles of other lines also differed from wild type, although less strongly
446 (Supplementary Fig. S4). The observed differences in IAA metabolite profiles also provide
447 indications of the IAA metabolic pathways affected in these mutant lines (Fig. 1).

448 The mutated genes in the *rug1-1* and *ucu2-1* mutants have been identified (Quesada *et*
449 *al.*, 2013; Pérez-Pérez *et al.*, 2004), but not those in the *ero1*, *sea4-1* and *ond1* mutants. The
450 *RUG1* gene encodes porphobilinogen deaminase, an enzyme of the tetrapyrrole
451 biosynthetic pathway. *rug1-1* mutant plants accumulate porphobilinogen, and both their
452 vegetative and reproductive development is perturbed (Quesada *et al.*, 2013). The
453 accumulation of porphobilinogen in chloroplasts, where tetrapyrrole biosynthesis occurs,
454 might interfere with chloroplast metabolism, thereby affecting TRP biosynthesis and,

455 consequently, IAA and IAA metabolism. In accordance with this hypothesis in the *rug1-1*
456 mutant there were strongly elevated levels of the IAA precursor TRP, IAA and the
457 downstream products oxIAA and IAA-glc (Fig. 1 and Supplementary Fig. S5). The *ucu2-1*
458 mutation, which causes increases in levels of IAA, IAAsp, oxIAA and oxIAA-glc (Fig. 1
459 and Supplementary Fig. S5), perturbs AtFKBP42, a peptidyl-prolyl cis/trans-isomerase of
460 the FK506-binding protein family that participates in auxin and brassinosteroid signalling
461 (Pérez-Pérez *et al.*, 2004). Thus, data acquired regarding both *rug1-1* and *ucu2-1* mutants
462 illustrate that IAA metabolite profiles are affected not only by enzymes and regulators of
463 the IAA metabolic pathways *per se*, but also many other processes that indirectly influence
464 the plant IAA metabolite profile.

465 Overall, the results show that our method has high potential utility for powerful, rapid
466 metabolome-based screening to characterize IAA metabolites, detect the pathways and
467 interactions involved, and identify novel regulators. We have developed a robust ultra-rapid
468 MS-based method for extracting, purifying and quantifying most known IAA metabolites,
469 including IAA and its key precursors and conjugates/catabolites, from minute plant samples
470 for high-throughput mutant screening. Sample extraction and micro-scale purification
471 conditions were optimized using a selection of appropriate sorbent types. The method was
472 tested using a collection of previously isolated mutant lines. Affording analysis of more
473 than 100 samples per day, the procedure is less time-consuming and much more effective
474 than previously published methods. It will allow researchers to quantify auxin metabolites
475 in large numbers of samples containing a few milligrams of fresh plant material highly
476 accurately and reproducibly. In combination with multivariate data analysis, the method
477 provides a powerful tool for mutant screening, and can be used to discover novel genes
478 involved in IAA metabolism. Furthermore, the same approach could be applied to other
479 classes of plant hormones and metabolites, and used for high-throughput metabolic
480 phenotyping of plants with different genetic backgrounds (e.g. knockout and
481 overexpressing mutant and transgenic lines, wild accessions and crop cultivars). Altogether,
482 this shows the importance of close collaboration between plant biologists and chemists, and
483 we believe that the method can greatly facilitate discovery of novel genes involved in

484 regulation of IAA metabolism, thus advancing our understanding of this important plant
485 growth regulator's functions.

486

487

488 **Supplementary data**

489 Supplementary data are available at JXB online.

490 **Figure S1.** Effects of tested loading conditions on the recovery (%) of IAA metabolites
491 after purification by in-tip μ SPE.

492 **Figure S2.** Comparison of signal sensitivities of IAA-glc and oxIAAA-glc in analyses by
493 LC-MS/MS using negative-ion (ESI⁻) and positive-ion (ESI⁺) multi reaction monitoring
494 (MRM) modes.

495 **Figure S3.** IAA metabolite profiles in 7-day-old Arabidopsis seedlings of the wild-type
496 accessions Landsberg *erecta* (*Ler*) and Columbia (Col-0) and the IAA over-producing
497 mutant line *sur2-1*.

498 **Figure S4.** Hotelling distance (T2) and distance to the model (DModXP+) boxplots of each
499 mutant line in the PCA model of the *Ler* wild type (LW).

500 **Figure S5.** IAA metabolite concentrations in the *Ler* wild type and the *ero1*, *rug1-1*, *sea4-*
501 *1*, *ucu2-1* and *ond1* mutant lines.

502 **Table S1.** Stability of IAA-glc and oxIAA-glc in indicated solutions with pH 3 – 12, 0.1 %
503 acetic acid and 80% methanol.

504 **Table S2.** Diagnostic MRM transitions, optimized collision energies, retention time
505 stability, limits of detection (LOD), dynamic linear range and linearity (correlation
506 coefficients, R²) of the LC-MRM-MS method.

507

508

509 **Acknowledgements**

510 We thank Roger Granbom for excellent technical assistance, and the Swedish
511 Metabolomics Centre (<http://www.swedishmetabolomicscentre.se/>) for access to
512 instrumentation. This work was supported by grants from Kempestiftelserna (JCK-1111),
513 Carl Tryggers Stiftelse för Vetenskaplig Forskning (CTS 12:289), the Swedish

18

514 Governmental Agency for Innovation Systems (VINNOVA) and the Swedish Research
515 Council (VR) (2012-01560). The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech
516 Republic also provided support for this project via the National Program for Sustainability I
517 (LO1204) and project Návrat (LK21306), as well as the Czech Foundation Agency via
518 project GA14-34792S, and the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain and the
519 Generalitat Valenciana (grants BIO2014-53063-P and PROMETEOII/2014/006). The
520 authors also gratefully acknowledge the financial support of the Project of Specific
521 research, SVV 260 292 (2016).
522

References

- Barlier I, Kowalczyk M, Marchant A, Ljung K, Bhalerao R, Bennett MJ, Sandberg G, Bellini C.** 2000. The *SUR2* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**, 14819-14824.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G, Friml J.** 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Berná G, Robles P, and Micol JL.** 1999. A mutational analysis of leaf morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **152**, 729-742.
- Edlund A, Eklof S, Sundberg B, Moritz T, Sandberg G.** 1995. A microscale technique for gas chromatography-mass spectrometry measurements of picogram amounts of indole-3-acetic acid in plant tissues. *Plant Physiology* **108**, 1043-1047.
- Floková K, Tarkowská D, Miersch O, Strnad M, Wasternack C, Novák O.** 2014. UHPLC-MS/MS based target profiling of stress-induced phytohormones. *Phytochemistry* **105**, 147-157.
- Ilić N, Magnus V, Östin A, Sandberg G.** 1997. Stable-isotope labeled metabolites of the phytohormone, indole-3-acetic acid. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **39**, 433-440.
- Kai K, Horita J, Wakasa K, Miyagawa H.** 2007. Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **68**, 1651-1663.
- Kai K, Nakamura S, Wakasa K, Miyagawa H.** 2007. Facile preparation of deuterium-labeled standards of indole-3-acetic acid (IAA) and its metabolites to quantitatively analyze the disposition of exogenous IAA in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**, 1946-1954.
- Kasahara H.** 2015. Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **80**, 34-42.
- Kowalczyk M, Sandberg G.** 2001. Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**, 1845-1853.

- Kowalczyk M.** 2002. Metabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. PhD thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå, Sweden.
- Liu X, Hegeman AD, Gardner G, Cohen JD.** 2012. Protocol: High-throughput and quantitative assays of auxin and auxin precursors from minute tissue samples. *Plant Methods* **8**, 31.
- Ljung K.** 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**, 943-950.
- Ludwig-Müller J.** 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1757-1773.
- Mano Y, Nemoto K.** 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2853-2872.
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, et al.** 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**, 18512-18517.
- Matsuda F, Miyazawa H, Wakasa K, Miyagawa H.** 2005. Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**, 778-783.
- Novák O, Hényková E, Sairanen I, Kowalczyk M, Pospíšil T, Ljung K.** 2012. Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant Journal* **72**, 523-536.
- Novák O, Pěňčík A, Ljung K.** 2014. Identification and profiling of auxin and auxin metabolites. In *Auxin and its Role in Plant Development* (Zažímalová, E., Petrášek, J., Benková, E., eds.). Vienna: Springer, pp. 39-60.
- Östin A, Kowalczyk M, Bhalerao RP, Sandberg G.** 1998. Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**, 285-296.
- Pěňčík A, Rolčík J, Novák O, Magnus V, Barták P, Buchčík R, Salopek-Sondi B, Strnad M.** 2009. Isolation of novel indole-3-acetic acid conjugates by immunoaffinity extraction. *Talanta* **80**, 651-655.

- Pěnčík A, Simonovik B, Petersson SV, et al.** 2013. Regulation of auxin homeostasis and gradients in Arabidopsis roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *Plant Cell* **25**, 3858-3870.
- Pérez-Pérez JM, Ponce MR, Micol JL.** 2004. The *ULTRACURVATA2* gene of Arabidopsis encodes an FK506-binding protein involved in auxin and brassinosteroid signaling. *Plant Physiology* **134**, 101-117.
- Pérez-Pérez JM, Candela H, Robles P, Quesada V, Ponce MR, Micol JL.** 2009. Lessons from a search for leaf mutants in *Arabidopsis thaliana*. *The International Journal of Developmental Biology* **53**, 1623-1634.
- Quesada V, Sarmiento-Mañús R, González-Bayón R, Hricová A, Ponce MR, Micol JL.** 2013. PORPHOBILINOGEN DEAMINASE deficiency alters vegetative and reproductive development and causes lesions in Arabidopsis. *PLoS ONE* **8**, e53378.
- Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M.** 2003. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical Chemistry* **75**, 663-670.
- Rittenberg D, Foster L.** 1940. A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **133**, 727-744.
- Rosquete MR, Barbez E, Kleine-Vehn J.** 2012. Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. *Molecular Plant* **5**, 772-786.
- Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiha T, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H.** 2009. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **106**, 5430-5435.
- Svačinová J, Novák O, Plačková L, Lenobel R, Holik J, Strnad M, Doležal K.** 2012. A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: Pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods* **8**, 17.
- Tam YY, Normanly J.** 1998. Determination of indole-3-pyruvic acid levels in *Arabidopsis thaliana* by gas chromatography-selected ion monitoring-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **20**, 101-108.

- Tam YY, Epstein E, Normanly J.** 2000. Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiology* **123**, 589-596.
- Tarkowská D, Novák O, Floková K, Tarkowski P, Turečková V, Grúz J, Rolčík J, Strnad M.** 2014. Quo vadis plant hormone analysis? *Planta* **240**, 55-76.
- Tivendale ND, Ross JJ, Cohen JD.** 2014. The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science* **19**, 44-51.
- Wang B, Chu J, Yu T, Xu Q, Sun X, Yuan J, Xiong G, Wang G, Wang Y, Li J.** 2015. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **112**, 4821-4826.
- van de Weert M, Lagerwerf FM, Haverkamp J, Heerma W.** 1998. Mass spectrometric analysis of oxidized tryptophan. *Journal of Mass Spectrometry* **33**, 884-891.
- Woodward AW, Bartel B.** 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**, 707-735.

TABLES

Table 1. Levels of IAA metabolites in a 7-day-old Arabidopsis Col-0 extract (10 mg fresh weight of tissue extracted in 1 ml of 50 mM Na-phosphate buffer, pH 7.0 and quantified by LC-MRM-MS after purification by in-tip μ SPE or HLB columns). Values are means \pm SD (n = 4); n.d – not detected.

Compound	Content of IAA metabolites (pmol g ⁻¹ FW)	
	in-tip μ SPE	HLB
ANT	297 \pm 27	318 \pm 17
TRP	97,751 \pm 2,833	99,522 \pm 7,618
TRA	n.d.	13 \pm 4
IAM	9 \pm 1	8 \pm 1
IAN	56,792 \pm 1,053	74,042 \pm 1,851
IAOx	n.d.	n.d.
IPyA	158 \pm 11	133 \pm 7
IAA	243 \pm 2	243 \pm 5
oxIAA	1,717 \pm 26	1,611 \pm 37
IAAsp	55 \pm 5	48 \pm 3
IAGlu	52 \pm 1	49 \pm 4
IAA-glc	360 \pm 3	382 \pm 19
oxIAA-glc	6,918 \pm 41	7,039 \pm 43

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Putative pathways of IAA biosynthesis and metabolism in Arabidopsis.

Pathways are based on Ljung (2013), Mano and Nemoto (2012), Kasahara (2015), Ludwig-Müller (2011). Dashed arrows indicate steps in which the enzymes catalysing the reaction are not known. Significantly higher (red) or lower (green) concentrations of individual metabolites in investigated mutant lines showing the most different from wild type IAA metabolomes are indicated.

Fig. 2. Extraction recovery of multi- μ SPE columns.

(a) Recoveries (%) of IAA metabolites applied to multi-StageTips using Empore sorbents in indicated combinations (C18/C8, C18/SDB-RPS and C18/SDB-XC). (b) Recoveries (%) of indicated IAA metabolites with 1, 3 and 5 sorbent multi-layers (C18/SDB-XC) used in the μ SPE purification procedure. Values are means \pm SD (n = 4).

Fig. 3. Method optimization and validation.

(a) Recoveries (%) of internal standards added to indicated amounts of Arabidopsis plant matrix (1 - 10 mg fresh weight) purified by multi-StageTips microcolumns packed with three layers of each sorbent (C18/SDB-XC). (b) Recovered amounts of IAA metabolites spiked in an Arabidopsis extract containing 2 mg fresh tissue (applied amounts: 1 or 10 pmol, white bars; 10 or 100 pmol, black bars). Samples were analysed in four replicates. Error bars indicate standard deviations of the means (SD).

Fig. 4. Ultra-rapid auxin metabolite profiling method.

Plant material (10 mg) was homogenized and extracted in Na-phosphate buffer containing labelled internal standards. One portion (2 mg fresh weight per 200 μ l) of acidified supernatant was directly applied to a pre-conditioned multi-StageTip microcolumn (STop And Go Extraction Tip created by packing C18/SDB-XC sorbents in an ordinary pipette tip and inserting into a 1.5 ml microcentrifuge tube, which was then washed and eluted with methanolic solutions). The other half of the supernatant (200 μ l) was derivatized using

cysteamine and also purified by in-tip μ SPE. The pooled eluate was evaporated to dryness, dissolved in 40 μ l of 5% acidified methanol and finally analysed by the presented LC-MS/MS method affording ultra-fast chromatographic separation of 14 IAA precursors, catabolites and conjugates (1, Trp; 2, TRA; 3, IPyA-TAZ; 4, ANT; 5, oxIAA-glc; 6, IAM; 7, IAAsp; 8, oxIAA; 9, IAA-glc; 10, IAGlu; 11, IAA; 12, trans-IAOx; 13, IAN; 14, cis-IAOx).

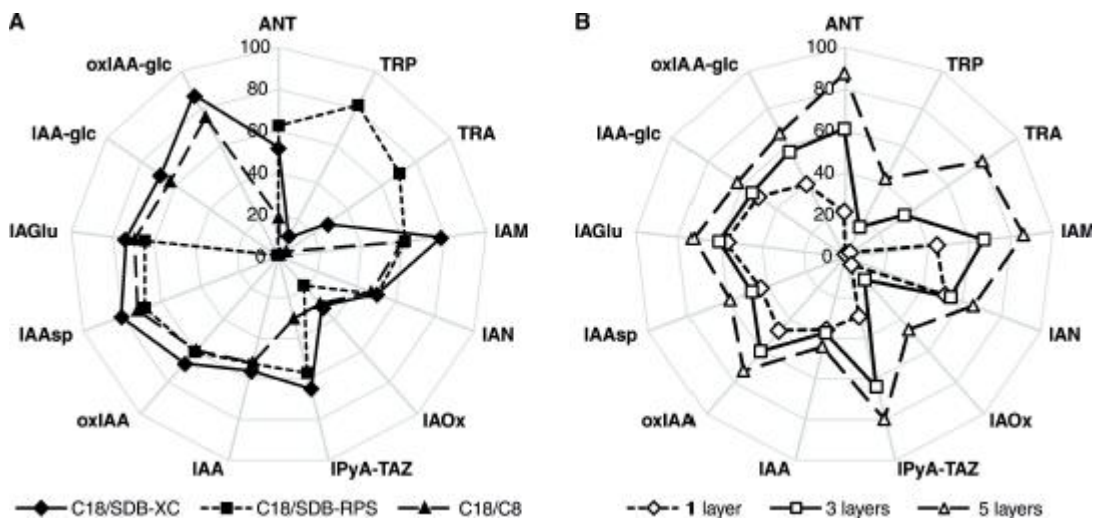
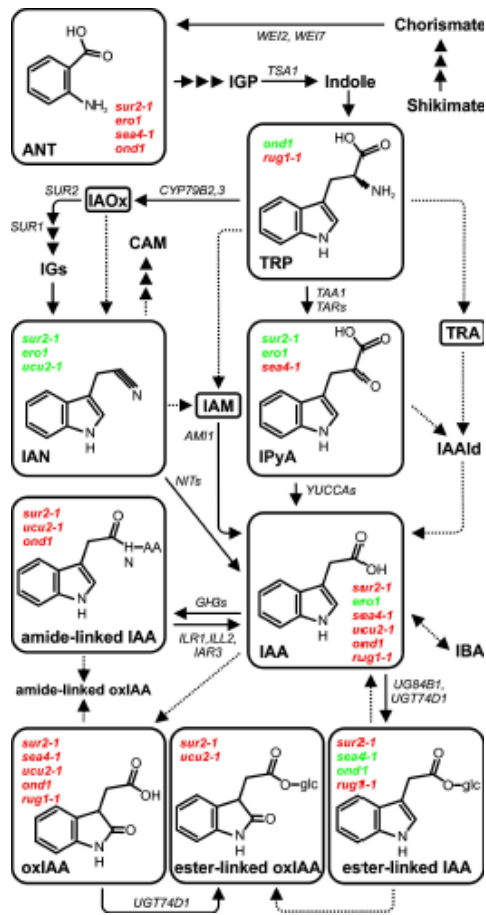
Fig. 5. Identification of five mutant lines with markedly different IAA metabolic profiles.

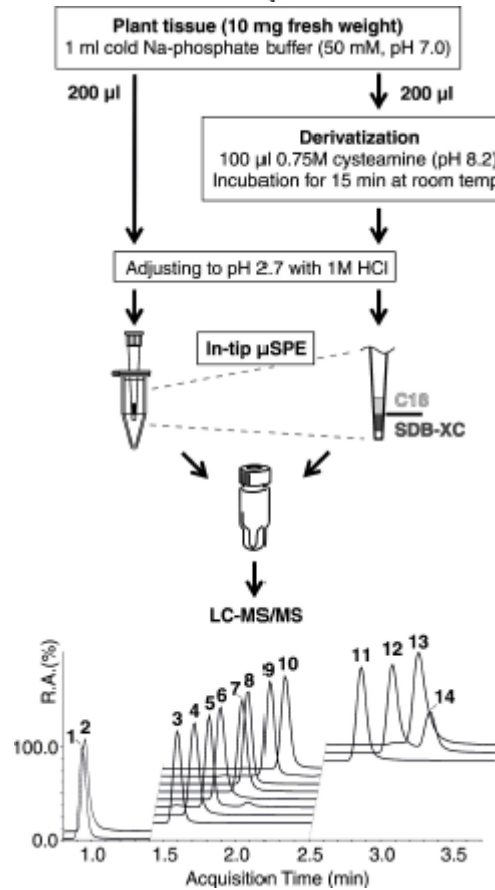
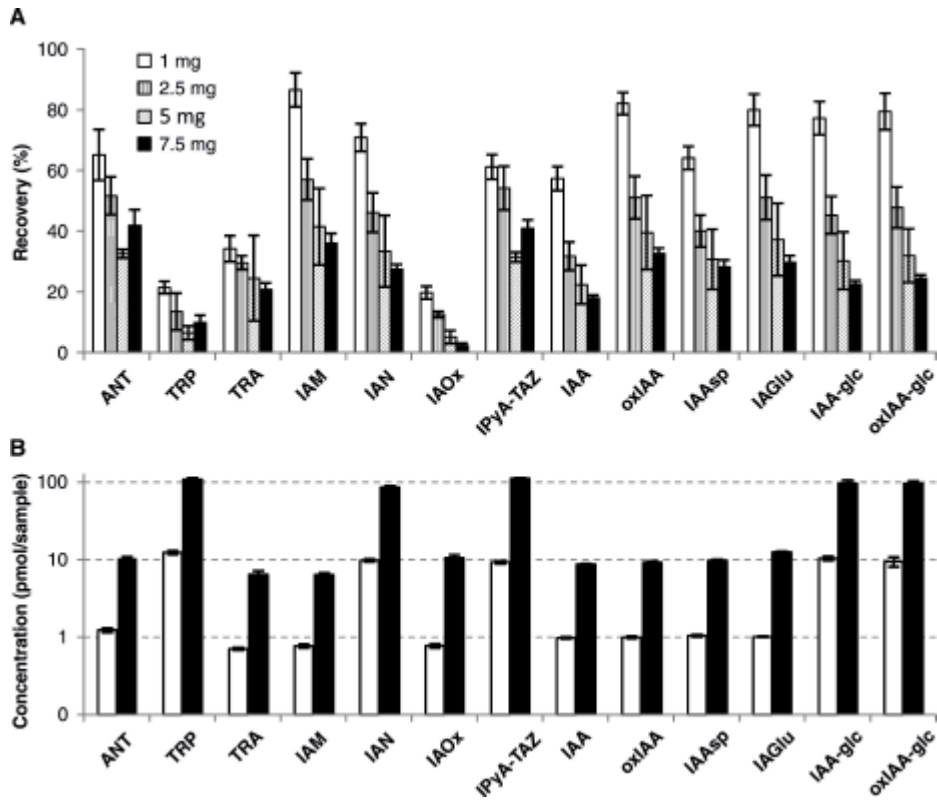
(a) Clustergram of average normalized Hotelling's distance (T2) and Distance to the model (DModXP+) values relative to the PCA model for the *Ler* wild type IAA metabolite profile (for which values for all variables are zero). Euclidean distance was used for lines, linear correlation for variables (metabolites) and average linkage for both. Green and red indicate lines' degrees of similarity and difference to *Ler*, respectively. Values were calculated with SIMCA and the clustergram was constructed in MATLAB. (b, c) PCA biplots showing separation of the samples (mutant lines, represented by hexagons) according to the variables (metabolites, represented by red dots). Points indicating lines that separated the most are coloured in yellow (*ero1*), dark blue (*sea4-1*), light blue (*rug1-1*), violet (*ucu2-1*), green (*ond1*) and black (*sur2-1* control line). Points indicating the other lines, including the *Ler* wild type, are in grey. Biplots were constructed in SIMCA and correspond to (B) PC1 vs. PC2 and (C) PC3 vs. PC4, together explaining 80% of the total variation of the data. (d) Rosette phenotypes of the *Ler* wild type and the five most different lines identified in the analysis, 20 days after sowing. Scale bars indicate 1 mm.

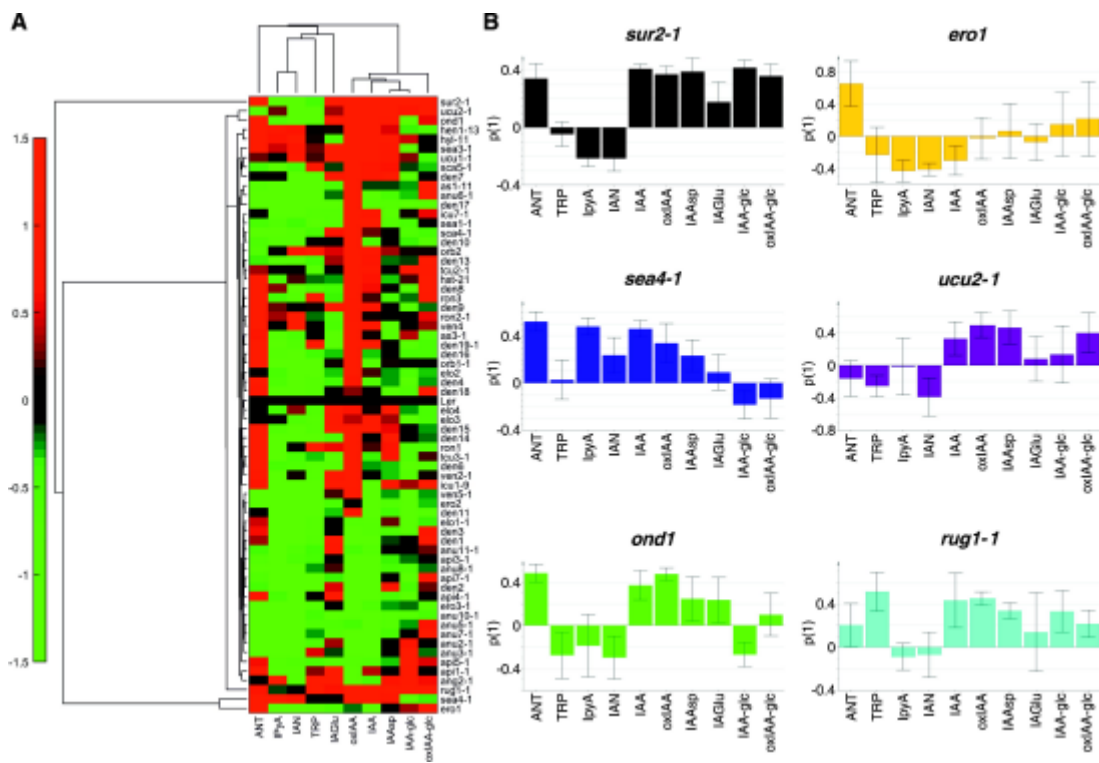
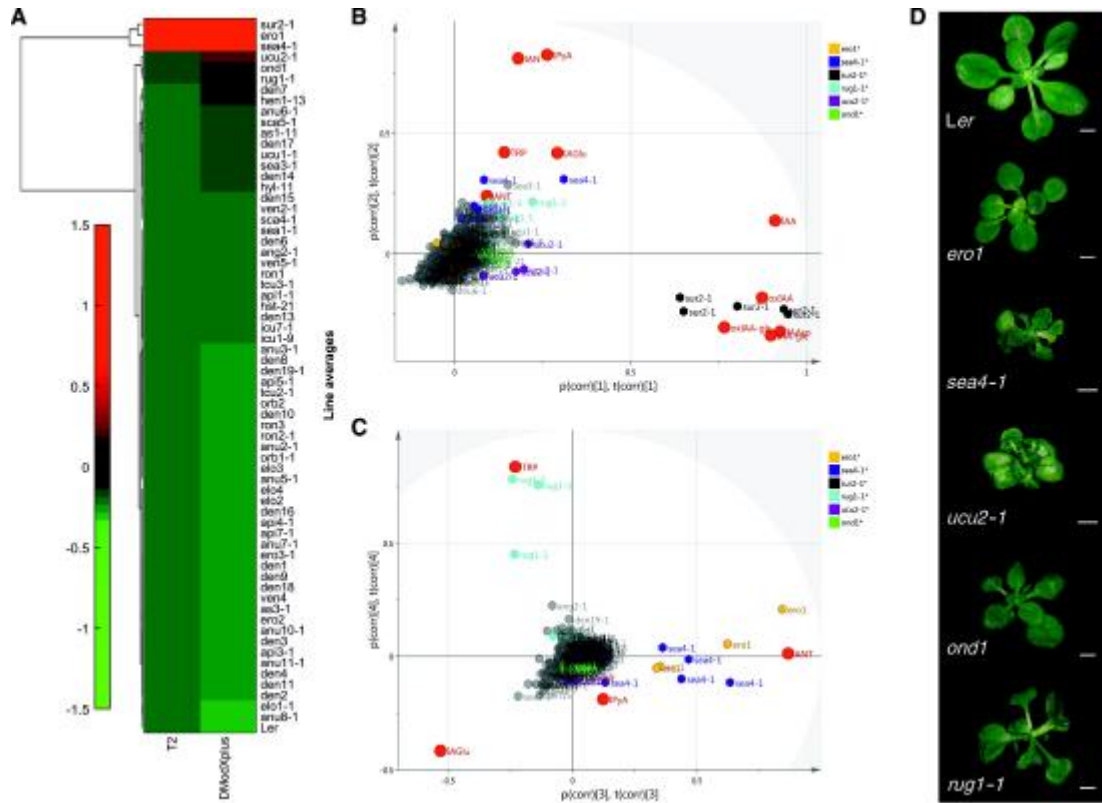
Fig. 6. IAA metabolite profiles of the mutant lines.

(a) Clustergram of average concentrations of the metabolites in the 65 lines analyzed. Values are UV-scaled using the *Ler* samples, so that the value of all variables for *Ler* is zero. Euclidean distance was used to cluster lines, linear correlation for metabolites, and average linkage for both. Green and red colors indicate lower and higher concentrations compared to wild type, respectively. (b) OPLS-DA models between *Ler* and each of the

most different lines, including *sur2-1*. Positive and negative loadings indicate a higher and lower concentration, respectively, of the indicated metabolite compared with *Ler*. The variables with a confidence interval crossing zero are considered not significant. Concentrations of TRA, IAM and IAOx were below LOD.







SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Stability of IAA-glc and oxIAA-glc in indicated solutions with pH 3 – 12, 0.1 % acetic acid and 80% methanol.

Compound	pH < 3.0	pH = 4.0	pH = 8.0	pH > 12.0	0.1 % acetic acid	80% MeOH
IAA-glc	+++	+++	+	-	+++	+++
oxIAA-glc	+++	+++	+	-	+++	+++

Recovery: "-", 0-10%; "+", 10-50%; "++", 50-90%; "+++", 90-100%; Mean \pm SD (n = 4)

Table S2. Diagnostic MRM transitions, optimized collision energies, retention time stability, limits of detection (LOD), dynamic linear range and linearity (correlation coefficients, R^2) of the LC-MRM-MS method.

Optimized MS conditions were as follows: Drying Gas Temperature, 150°C; Drying Gas Flow, 16 l min⁻¹; Nebulizer Pressure, 40 psi; Sheath Gas Temperature, 375°C, Sheath Gas Flow, 12 l min⁻¹; Capillary Voltage, 3400 V; Nozzle Voltage, 0 V; Delta iFunnel High/Low Pressure RF, 110/60 V; and Fragmentor, 380 V.

Compound	MRM transition	IS ^a	MRM transition	CE ^b (V)	Retention time ^c (min)	LOD ^d (fmol)	Linear range (pmol)	R^2
Trp	205.2 > 146.1	[² H ₅]-Trp	210.2 > 151.1	14	0.931 ± 0.004	10.0	0.050-500	0.9987
TRA	161.1 > 144.1	[² H ₂]-TRA	163.1 > 146.1	6	0.932 ± 0.008	10.0	0.050-50	0.9998
IPyA-TAZ	263.1 > 88.0	[² H ₄]-IPyA-TAZ	267.1 > 88.0	10	1.617 ± 0.006	5.0	0.010-100	0.9981
ANT	138.1 > 120.1	[¹³ C ₆]-ANT	144.1 > 126.1	6	1.728 ± 0.004	10.0	0.050-500	0.9999
oxIAA-glc	192.1 > 146.1	[¹³ C ₆]-oxIAA-glc	198.1 > 152.1	12	1.759 ± 0.005	50.0	0.100-100	0.9991
IAM	175.1 > 130.1	[² H ₅]-IAM	180.1 > 135.1	12	1.842 ± 0.003	2.5	0.005-500	0.9999
IAA _{sp}	291.2 > 130.1	[¹³ C ₆]-IAA _{sp}	297.2 > 136.1	20	2.027 ± 0.016	25.0	0.050-500	0.9999
oxIAA	192.1 > 146.1	[¹³ C ₆]-oxIAA	198.1 > 152.1	12	2.064 ± 0.002	5.0	0.050-500	0.9996
IAA-glc	176.1 > 130.1	[¹³ C ₆]-IAA-glc	182.1 > 136.1	12	2.165 ± 0.003	50.0	0.100-100	0.9976
IAGlu	305.2 > 130.1	[¹³ C ₆]-IAGlu	311.2 > 136.1	20	2.294 ± 0.009	5.0	0.050-500	0.9997
IAA	176.1 > 130.1	[¹³ C ₆]-IAA	182.1 > 136.1	12	2.822 ± 0.002	5.0	0.005-500	0.9999
<i>trans</i> -IAOx	175.1 > 158.1	[² H ₅]- <i>trans</i> -IAOx	180.1 > 163.1	10	3.011 ± 0.004	5.0	0.005-500	0.9978
IAN	157.1 > 130.1	[¹³ C ₆]-IAN	163.1 > 136.1	10	3.185 ± 0.005	10.0	0.050-500	0.9991
<i>cis</i> -IAOx	175.1 > 158.1	[² H ₅]- <i>cis</i> -IAOx	180.1 > 163.1	10	3.258 ± 0.004	5.0	0.005-500	0.9982

^a Internal standards used for stable isotope dilution

^b Collision energy

^c Mean ± SD (n=5).

^d Signal-to-noise ratio of 3:1.

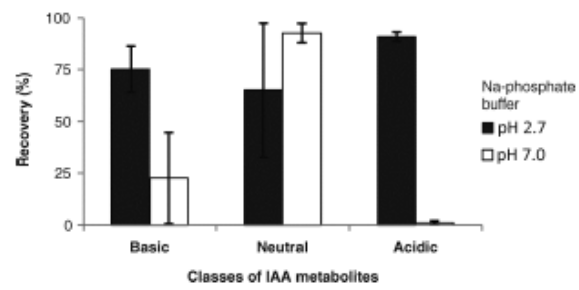


Figure S1. Effects of tested loading conditions on the recovery (%) of IAA metabolites after purification by in-tip μ SPE.

Samples were analysed in four replicates. Error bars indicate standard deviations of the means (SD).

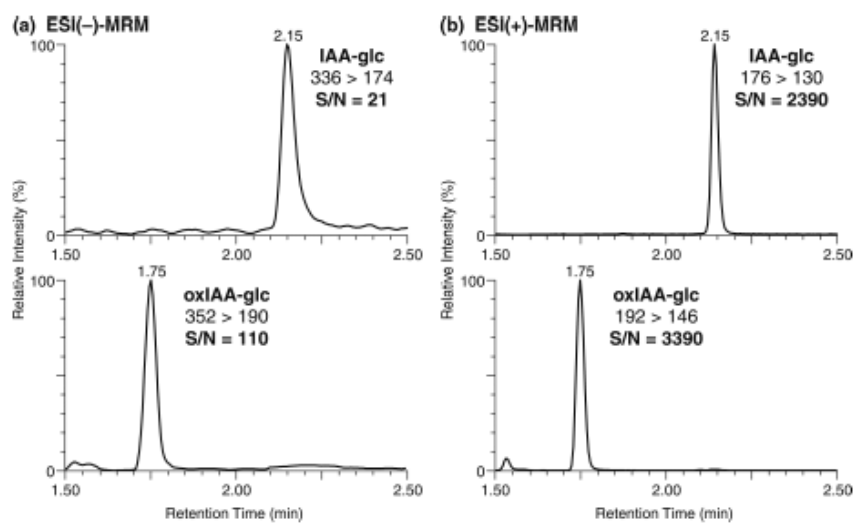


Figure S2. Comparison of signal sensitivities of IAA-glc and oxIAA-glc in analyses by LC-MS/MS using negative-ion (ESI-) and positive-ion (ESI+) multi reaction monitoring (MRM) modes.

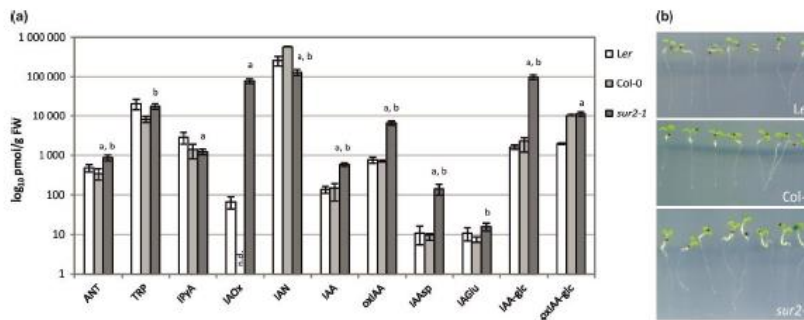


Figure S3. IAA metabolite profiles in 7-day-old Arabidopsis seedlings of the wild-type ecotypes *Landsberg erecta* (Ler) and *Columbia* (Col-0) and the IAA over-producing mutant line *sur2-1*.
 (a) Concentrations of all metabolites are plotted on a logarithmic scale. Error bars indicate SD ($n = 5$). Letters above the bars indicate statistically significant differences between (a) Ler and *sur2-1*, and (b) Col-0 and *sur2-1* (two-tailed Student *t* test, $P < 0.01$).
 (b) Pictures to the right show corresponding 7-day-old seedlings of wild-type ecotypes (Ler and Col-0) and the IAA over-producing mutant line *sur2-1*.

5

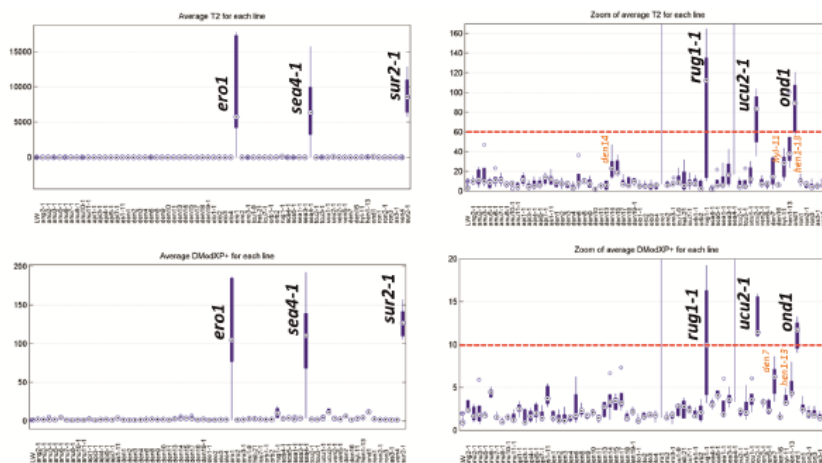


Figure S4. Hotelling distance (T2) and distance to the model (DModXP+) boxplots of each mutant line in the PCA model of the *Ler* wild type (LW).

Each line is represented by a box where the central mark is the median and the edges correspond to the 25th and 75th percentiles. The whiskers extend to the most extreme datapoints that the algorithm considers not to be outliers. The outliers are plotted individually. Zoom views of the T2 (upper) and DModXP+ (lower) plots are shown to the right, where a dashed red line indicates an arbitrary threshold. Five lines with values above this threshold were selected as the most different lines from wild-type (black letters). Lines with values below this threshold, but with remarkably different profiles from wild-type are also indicated (orange letters).

6

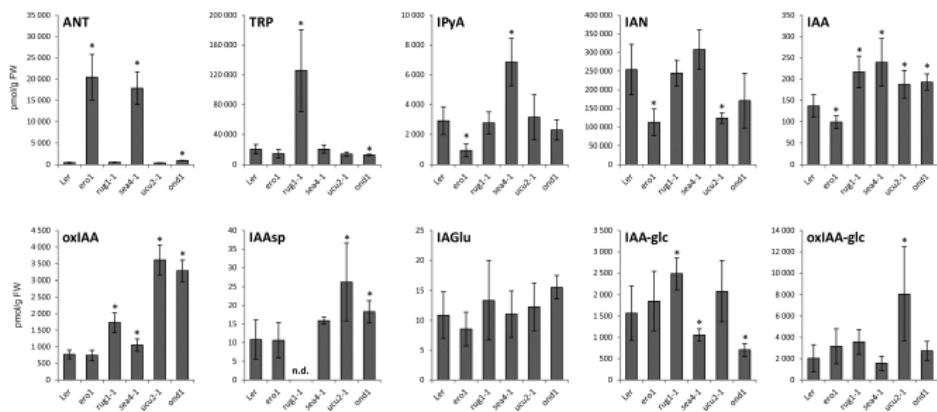


Figure S5. IAA metabolite concentrations in the Ler wild type and the *ero1*, *rug1-1*, *sea4-1*, *ucu2-1* and *ond1* mutant lines.

Five replicates of seedlings of wild-type Arabidopsis Ler and mutant lines were collected and their auxin levels were analyzed by LC-MS/MS. Error bars represent SD (n = 5). Asterisks indicate significant differences (P < 0.01) according to a two-tailed Student t test.