

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra analytické chemie

**Vývoj MEPS metody pro UHPLC-MS/MS  
stanovení entekaviru v ultrafiltrátu  
ledvin**

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

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

Hradec Králové 2013

Jaroslav Janák

## **Abstrakt**

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**

**Kandidát:** Jaroslav Janák

**Školitel:** RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Vývoj MEPS metody pro UHPLC-MS/MS stanovení entekaviru v ultrafiltrátu ledvin

Diplomová práce se zabývala vývojem a validací metody úpravy vzorků pro stanovení entekaviru v ultrafiltrátu ledvin, pomocí techniky MEPS, tj. mikroextrakce tuhým sorbentem. K analýze byla využita již dříve vyvinutá UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení entekaviru v potkaní moči.

Pro jeho stanovení byla využita hydrofilní interakční chromatografie na koloně Acquity BEH Amide za použití izokratické eluce. Složení mobilní fáze acetonitril - 5 mM octan amonný pH 4,0 bylo v poměru 75:25 (v:v). Jako vnitřní standard byl použit entekavir  $C_2^{13}N^{15}$ . Ionizace analytu byla provedena elektrosprejem v pozitivním módu a jako detektor byl zvolen trojitý kvadrupól. Ke kvantifikaci analytu bylo využito SRM přechodů entekaviru a vnitřního standardu.

Na základě optimalizace MEPS metody byl jako nejvhodnější tuhá fáze zvolen porézní grafítický uhlík vhodný pro analýzu polárních látek. Jako eluční činidlo byl zvolen roztok acetonitril a vody v poměru 75:25 (v:v) a jako promývací činidlo čistá voda.

Metoda byla validována. Ověřena byla zejména linearita, přesnost, správnost, selektivita a matricové efekty vyvinuté metody. Metoda byla lineární v rozsahu 0,5 – 500 ng/ml a limit kvantifikace byl stanoven 0,5 ng/ml v biologické matrici. Hodnoty přesnosti byly nižší než 4,5 % a správnosti menší než 106 %. Kvantitativní hodnocení matricových efektů bylo provedeno pomocí post-extrakčního přídatku a hodnoty nepřesáhly 4 %. Po validaci MEPS-UHPLC-MS/MS metody pro stanovení entekaviru v ultrafiltrátu ledvin byla metoda aplikována na sérii reálných vzorků.

**Klíčová slova:** Entekavir, mikroextrakce tuhým sorbentem, UHPLC-MS/MS, validace metody

## **Abstract**

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of analytical chemistry**

**Candidate:** Jaroslav Janák

**Supervisor:** RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

**Title of Thesis:** Development of MEPS-UHPLC-MS/MS methods for the determination of entecavir in kidney ultrafiltrate.

The thesis deals with the development and validation of sample preparation method for determination of entecavir in kidney ultrafiltrate, using techniques MEPS (microextraction by packed sorbent). The previously developed UHPLC-MS/MS method for the determination of entecavir in rat urine has been used for the analysis. Hydrophilic interaction chromatography by column Acquity BEH Amide and isocratic elution were employed. The composition of the mobile phase was acetonitrile and 5 mM ammonium acetate pH 4.0 in the ratio 75:25 (v:v). Entecavir C<sub>2</sub><sup>13</sup>N<sup>15</sup> was used as the internal standard. Ionization of the analyte was carried out by electrospray in the positive ion mode and triple quadrupole was employed as the detector. Quantification of the analyte was realized by two SRM transitions of entecavir and internal standard method.

Based on the MEPS optimization method, porous graphitic carbon suitable for the analysis of polar compounds was selected as the most suitable sorbent. The mixture of acetonitrile and water in a ratio of 75:25 (v: v) as the optimal elution solvent and pure water as the washing solvent was chosen.

The method was validated. Linearity, precision, accuracy, selectivity and matrix effects were verified. The method was linear in the range 0.5 - 500 ng/ml and the limit of quantification was estimated at concentration of entecavir 0.5 ng/ml in a biological matrix. The precision was less than 4.5 % and the accuracy less than 106 %. Quantitative evaluation of matrix effects was carried out using post-extraction and values did not exceed 4 %. After validation of MEPS-UHPLC-MS/MS methods for the determination of entecavir in kidney ultrafiltrate, the method was applied to the series of real samples.

**Keywords:** Entecavir, microextraction by packed sorbent, UHPLC-MS/MS, method validation

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí mé diplomové práce RNDr. Haně Vlčkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a pomoc při vypracování diplomové práce. Poděkování dále patří všem pracovníkům katedry analytické chemie a v neposlední řadě také své rodině za podporu během mého studia.

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

V Hradci Králové dne 13.září 2013

.....

Jaroslav Janák

# Obsah

---

1.	ÚVOD .....	10
2.	CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE .....	11
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1	ULTRA VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (UHPLC) .....	12
3.2	HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ CHROMATOGRAFIE (HILIC).....	14
3.3	DETEKCE S VYUŽITÍM HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	14
3.3.1	Spojení UHPLC- MS/MS .....	15
3.3.2	Ionizační techniky .....	15
3.3.2.1	Ionizace elektrosprejem (ESI) .....	16
3.3.2.2	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI).....	17
3.3.3	Hmotnostní analyzátory.....	18
3.3.4	Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS).....	19
3.3.5	Skeny v hmotnostní spektrometrii.....	19
3.4	METODY PŘÍPRAVY VZORKŮ .....	20
3.4.1	Konvenční techniky.....	21
3.4.2	Moderní techniky.....	23
3.4.2.1	Mikroextrakční metody založené na LLE .....	23
3.4.2.2	Mikroextrakční techniky založené na SPE.....	27
3.4.3	Materiály s omezeným přístupem (RAM).....	30
3.4.4	Molekulárně vtištěné polymery (MIPs).....	30
3.5	ENTEKAVIR .....	31
3.6	VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD .....	34
3.7	MATRICOVÉ EFEKTY .....	34
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
4.1	CHEMIKÁLIE .....	36
4.1.1	Standardní látky.....	36
4.1.2	Rozpouštědla .....	36
4.2	PŘÍSTROJE .....	36
4.3	TESTOVANÉ MEPS SORBENTY .....	37
4.4	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ .....	37

4.4.1	Příprava zásobních roztoků .....	37
4.4.2	Příprava pracovních roztoků.....	37
4.4.3	Příprava mobilní fáze .....	38
4.5	UHPLC-MS/MS PODMÍNKY .....	38
4.5.1	Chromatografické podmínky.....	38
4.6	MEPS METODA .....	39
4.7	VALIDACE ANALYTICKÉ METODY .....	40
4.7.1	Test vhodnosti systému, SST .....	40
4.7.2	Linearita, přesnost, správnost a matricové efekty .....	40
4.7.3	Selektivita .....	40
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	42
5.1	OPTIMALIZACE PODMÍNEK MEPS EXTRAKCE.....	42
5.1.1	Výběr vhodného sorbentu a elučního činidla .....	42
5.1.2	Optimalizace promývacího činidla.....	44
5.1.3	Optimalizace objemu vzorku.....	45
5.1.4	Shrnutí poznatků.....	46
5.2	VALIDACE METODY PRO STANOVENÍ ENTEKAVIRU .....	46
5.2.1	Opakovatelnost metody .....	46
5.2.2	Linearita a citlivost metody .....	47
5.2.3	Správnost a přesnost metody .....	49
5.2.4	Matricové efekty.....	49
5.2.5	Selektivita .....	50
5.3	APLIKACE NA REÁLNÉ VZORKY .....	51
6.	ZÁVĚR.....	53
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	54

## Seznam zkratek

---

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric-pressure chemical ionization)
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization)
BEH	Hybridní stacionární fáze (bridge ethylen hybride)
CX	polystyren-divinylbenzen částečně modifikovaný sulfonovými kyselinami
DI-SDME	Mikroextrakce jedinou kapkou pomocí přímého ponoření (direct immersion single-drop microextraction)
DLLME	Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (dispersive liquid–liquid microextraction)
EI	Elektronová ionizace (electron ionization)
ESI	Ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
EV	Entekavir
EV IS	Entekavir vnitřní standard
GC	Plynová chromatografie (gas chromatography)
GLE	Extrakce plyn – kapalina (gas-liquid extraction)
HF-LPME	Mikroextrakce do kapalné fáze s využitím dutého vlákna (hollow fibre liquid phase microextraction)
HILIC	Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (hydrophilic interaction chromatography)
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (high-resolution mass spectrometry)
HS-SDME	Mikroextrakce jedinou kapkou nad hladinou kapaliny (head-space single-drop microextraction)
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid–liquid extraction)
LLME	Mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (liquid–liquid microextraction)



LLLME	Mikroextrakce z kapaliny do kapaliny a zpět (liquid–liquid–liquid microextraction)
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice (matrix assisted laser desorption ionization)
MEPS	Mikroextrakce tuhým sorbentem (microextraction by packed sorbent)
MIPs	Molekulárně vtištěné polymery (molecularly imprinted polymer)
MS	Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)
m/z	Poměr hmotnosti a náboje
PeP	polystyren-divinylbenzen modifikovaný močovinou
PGC	Porézní grafický uhlík (porous graphitic carbon)
PS-DVB	Kopolymer polystyren-divinylbenzen (polystyrene-divinilbenzene copolymers)
QqQ	Trojité kvadrupól (triple quadrupole)
RAM	Materiály s omezeným přístupem (restricted access materials)
RP	Obrácené fáze (reversed-phase)
SBSE	Sorpční extrakce míchátkem (stir bar sorptive extraction)
SDME	Mikroextrakce jednou kapkou (single-drop microextraction)
SPE	Extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction)
SPME	Mikroextrakce na tuhou fázi (solid phase microextraction)
SST	Test způsobilosti systému (system suitability testing)
TOF	Průletový analyzátor (time of flight)
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)
UF	Ultrafiltrát

# 1. Úvod

---

Nepostradatelnou součástí každé bio-analytické metody je úprava vzorků, která slouží k odstranění proteinů, solí a ostatních interferujících látek z komplexní biologické matrice, jako je například plasma a moč. Biologické vzorky proto nelze použít k přímé analýze pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Nejčastěji užívanou metodou přípravy vzorku v klinické praxi je extrakce na tuhou fázi (SPE). Nicméně se zvyšujícím se počtem analyzovaných vzorků je v současnosti kladen důraz hlavně na miniaturizaci, automatizaci, vysokou účinnost, společně se získáním dostatečně přesných a správných výsledků. Byla vyvinuta široká škála nových extrakčních technik, ale dosud nebyla nalezena vhodná metoda splňující požadavky klinické praxe. Jednu z novějších technik vzniklou miniaturizací SPE představuje mikroextrakce tuhým sorbentem (MEPS). Tato technika pracuje s velmi malými objemy vzorků a rozpouštědel, umožňuje on-line spojení s LC systémem a celkově snižuje časovou náročnost analýzy biologických vzorků. Oblast přípravy vzorku je neustále ve fázi vývoje.

Nukleosidový analog entekavir je řazen mezi šest používaných antivirotik k léčbě hepatitidy B. Entekavir inhibuje všechny tři kroky virové replikace. Kompeticí s přirozeným substrátem deoxyguanosinem trifosfátem a působením proti DNA polymeráze snižuje množství viru hepatitidy B v těle.

## 2. Cíl a zadání práce

---

Tato diplomová práce se zabývala vývojem a validací metody úpravy vzorků pro analýzu entekaviru v ultrafiltrátu plasmy za využití dříve vyvinuté UHPLC-MS/MS metody. Požadavkem na vybranou extrakční techniku bylo využití malého objemu vzorku za dostatečné přesnosti a správnosti metody. Z důvodu těchto podmínek byla jako vhodná metoda vybrána mikroextrakce tuhým sorbentem.

Hlavním úkolem experimentální práce bylo optimalizovat MEPS metodu úpravy vzorků. Na základě sorpce analytu byl nejprve zvolen vhodný MEPS sorbent. Následně bylo optimalizováno složení a objem elučního a promývacího činidla. Vyvinutá MEPS-UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení entekaviru v ultrafiltrátu ledvin byla validována a následně aplikována na reálné vzorky.

## 3. Teoretická část

---

### 3.1 Ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

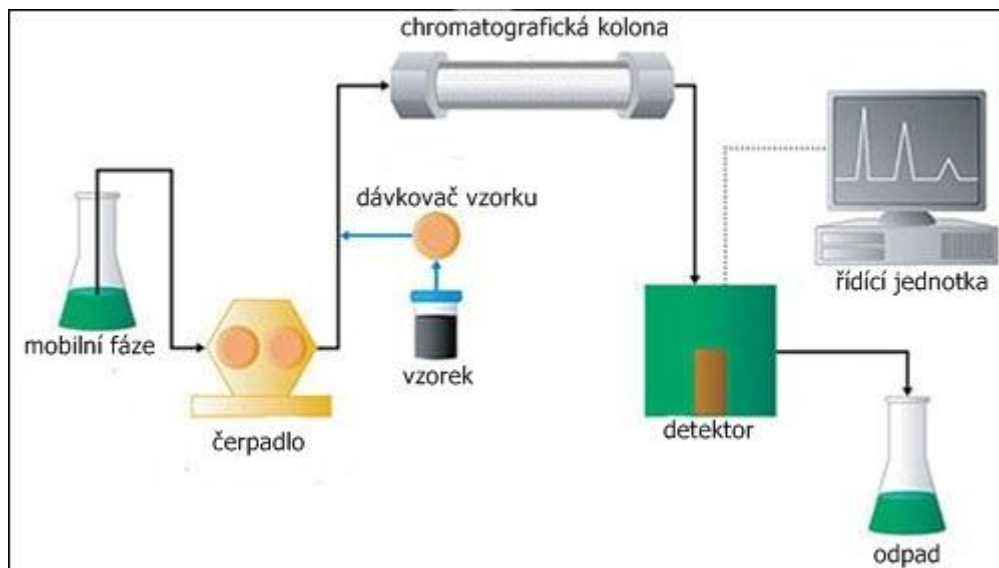
UHPLC je v současné době jedním z trendů kapalinové chromatografie. Principiálně využívá stejné mechanismy separace látek jako HPLC, tedy opakované ustalování rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází, kdy jednotlivé analyty jsou separovány na základě odlišné interakce mezi těmito dvěma fázemi.

UHPLC využívá kolony s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ , tzv. sub-2-mikronové částice, což na základě zvětšení celkového povrchu sorbentu poskytně zvýšení separační účinnosti, zvýšení rozlišení a snížení meze detekce. Nicméně sekundárním efektem použití těchto částic je vzrůstající zpětný tlak na koloně.

První typy UHPLC stacionárních fází byly tvořeny speciálním hybridním sorbentem od firmy Waters, tzv. „Ethylene-Bridged Hybrids (BEH)“. Sorbent syntetizovaný z polymeru a silikagelu spojuje výhody obou těchto materiálů. V současnosti se výrobou UHPLC stacionárních fází zabývá mnoho dalších firem a jsou využívány dva typy sorbentů: hybridní a na bázi silikagelu. Mechanická odolnost silikagelu umožňuje jeho využití za vysokých tlaků a v přítomnosti organických rozpouštědel se nesráží ani nebobtná. Nicméně jeho hlavní nevýhodou je omezená pH stabilita. Hybridní stacionární fáze vykazují vyšší mechanickou, chemickou i teplotní stabilitu v porovnání se silikagelem. Se vznikem druhé generace hybridních fází byla ještě více zvýšena chemická a mechanická odolnost a také účinnost separace [1][2][8].

Jednotlivé součásti UHPLC systému jsou shodné jako u klasického kapalinového chromatogramu, nicméně musí být odolné vůči vysokému zpětnému tlaku (až do 100MPa) generovanému malými částicemi sorbentu. Běžný kapalinový chromatograf umožňuje práci pouze do 40 MPa. Jsou kladeny požadavky nejen na kvalitní a pevné ventily, dávkovací zařízení a čerpadla, ale i na minimalizaci objemů při použití nízkoobjemové detekční cely a rychlejší sběr dat. Užití sorbentů s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  umožňuje zvýšení separační účinnosti a rozlišení, zkrácení doby analýzy a díky tomu zvýšení produktivity přístroje. S tím souvisí nižší spotřeba

organických rozpouštědel a snížení provozních nákladů. Díky spojení s vhodným detektorem je možno získat více kvalitativních informací o analyzovaném vzorku. Schéma UHPLC systému je znázorněno na Obr. 1 [1][2][6].



Obr. 1: Schéma uspořádání UHPLC chromatografu [4].

Míra účinnosti chromatografického systému je posuzována pomocí výškového ekvivalentu teoretického patra (H). Vztah mezi výškovým ekvivalentem teoretického patra a lineární rychlostí mobilní fáze popisuje van Deemterova rovnice:

$$H = A + B/u + C * u$$

kde,

A - faktor vlivu turbulentní difúze

B - faktor vlivu molekulární difúze

C - faktor vlivu odporu vůči převodu hmoty

u - lineární průtoková rychlost mobilní fáze [9].

## 3.2 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

HILIC je separační mód kapalinové chromatografie vhodný pro analýzu hydrofilních látek. Používá polární stacionární fáze, typické zejména pro systémy s normálními fázemi, a zároveň mobilní fázi s obsahem více než 60 % organické složky, což má blíže naopak k chromatografii na reverzní fázi (RP). Mechanismus HILIC separací stále není objasněn, nicméně jedná se o velmi komplexní proces. Hlavním principem je rozdělování mezi hydrofobní částí mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvou vody, která je imobilizována na povrchu stacionární fáze. Separace látek je ovlivněna složením mobilní fáze a typem sorbentu. Retence analytu se zvyšuje s polaritou analytu a klesá s rostoucím podílem vodné složky v mobilních fázích. V současné době existují sorbenty s navázanými aminopropylovými, amidovými, nitrilovými, polyethylenglykolovými a dalšími polárními funkčními skupinami, ale existuje i čistý HILIC silica sorbent.

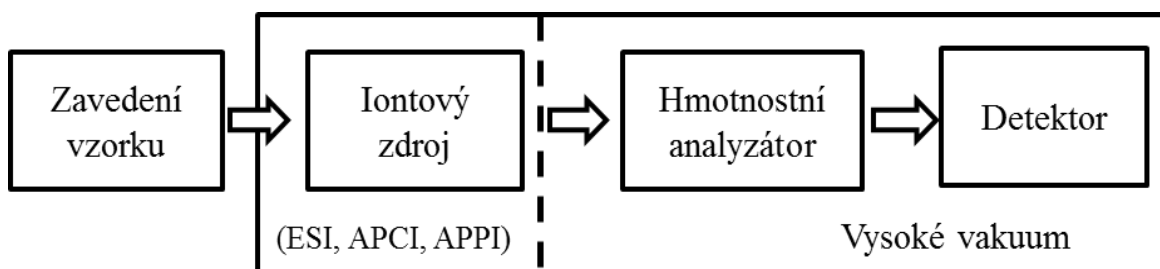
Tato technika našla nejprve uplatnění při separacích sacharidů, aminokyselin a peptidů, ale nyní s rostoucím počtem vzniklých HILIC kolon roste i počet aplikací v oblasti analýz, biologického materiálu, životního prostředí, potravin, přírodních látek i syntetických léčiv, iontových i neiontových tenzidů [2][9].

## 3.3 Detekce s využitím hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr (MS) může být použit jednak jako samostatná analytická technika pro identifikaci neznámých analytů nebo jako detektor. Podstatou MS je separace iontů na základě poměru jejich hmotnosti a elektrického náboje ( $m/z$ ) v magnetickém nebo elektrickém poli a jejich následná detekce.

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Mezi další součásti hmotnostního spektrometru patří zařízení pro dávkování vzorků, vakuová pumpa, iontová optika, sloužící k urychlení a fokusaci iontů, počítač na ovládání, sběr, ukládání a zpracování dat. V iontovém zdroji dochází k ionizaci analytů, tedy k převedení neutrální molekul na ionty. Takto vzniklé ionty dále pokračují do hmotnostního analyzátoru. Separace iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) probíhá v hmotnostním analyzátoru za

vysokého vakua. Rozdělené ionty přecházejí do detektoru, který slouží k vyhodnocení signálu [1][3][13].



Obr. 2: Schematické znázornění hmotnostního spektrometru.

### 3.3.1 Spojení UHPLC- MS/MS

Spojení UHPLC-MS/MS je upřednostňováno pro své široké užití a řadu výhod, mezi které patří: citlivost, selektivita, rozlišení, rychlost analýzy, poskytování údajů o identitě látek, molekulové hmotnosti, množství jednotlivých analytů a možnosti automatického vyhodnocení naměřených dat. Spojení LC/MS/MS lze použít pro bioanalytické aplikace, potravinovou analýzu, metabolomiku, proteomiku a využívá se také při výzkumu a vývoji nových lékových struktur.

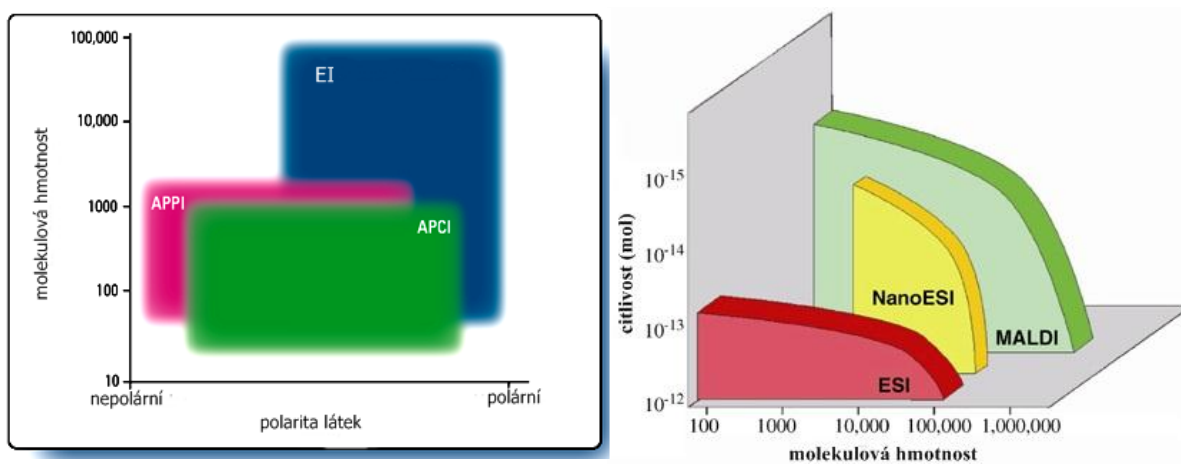
Nevýhodou tohoto zařízení je jeho vysoká pořizovací cena a značné provozní náklady, které jsou však kompenzovány hodnotou získaných informací [14].

### 3.3.2 Ionizační techniky

V hmotnostním spektrometru se látky pohybují pomocí elektrického nebo magnetického pole, a proto je nutné z neutrálních molekul vytvořit ionty. Ionizační techniky se podle množství dodané energie dělí na měkké a tvrdé. Při tvrdé ionizaci získá ionizovaná molekula nadbytek vnitřní energie, což se projeví fragmentací dané molekuly. Jako tvrdá ionizační technika je nejčastěji používána elektronová ionizace (EI). Při měkké ionizaci je energetický přebytek ionizované molekuly malý a vznikají zejména protonované  $[M+H]^+$  nebo deprotonované  $[M-H]^-$  molekuly, fragmentace není tak výrazná. V současnosti se pro spojení s LC-MS/MS nejčastěji používají měkké

ionizační techniky: ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Pro analýzu biomolekul je vhodná ESI nebo ionizace laserem za účasti matrice (MALDI).

Vhodnou ionizační techniku volíme na základě druhu matrice a fyzikálně-chemických vlastností analytu jako je těkavost, molekulová hmotnost a tepelná stabilita stanovované látky nebo prostorové uspořádání molekul. Vliv polaritě a molekulové hmotnosti analytu na výběr vhodné ionizační techniky je znázorněn na Obr. 3 [19].



Obr. 3: Závislost výběru vhodné ionizační techniky na molární hmotnosti a polaritě analytu a vliv na citlivost daného stanovení [5][6].

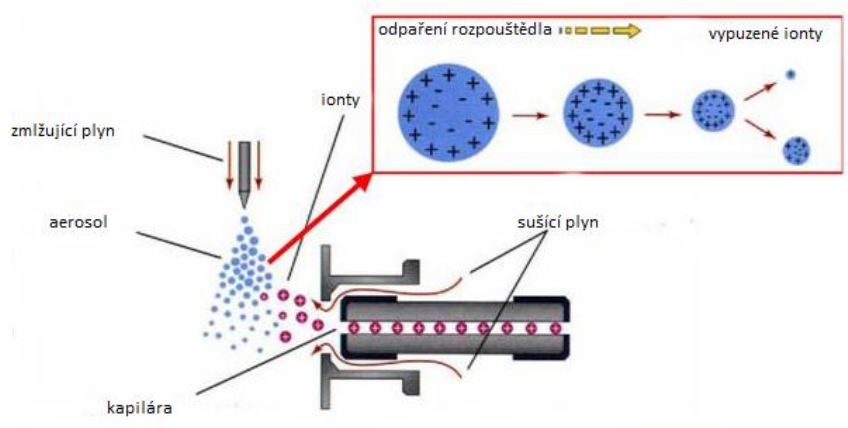
### 3.3.2.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)

ESI je nejpoužívanější ionizační technika pro spojení LC-MS/MS. Ionizace molekul probíhá za atmosférického tlaku. Analyt rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle je přiváděn do iontového zdroje kovovou kapilárou, okolo které proudí inertní plyn. Na kapiláru je vloženo vysoké napětí a vytváří se silné elektrostatické pole. Vznikající kapičky v proudu sušícího plynu nesou velké množství ionizovaných molekul. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšování kapiček a tím ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty se kapičky rozpadají na ještě menší



kapičky, které nesou náboj. Tento děj se označuje jako tzv. Coulombická exploze. Opakováním tohoto mechanismu se uvolní protonované či deprotonované molekuly, které jsou dále unášeny k analyzátoru a detektoru.

ESI je vhodná pro sloučeniny středně polární až iontové s molekulovou hmotností v případě biopolymerů do  $M_h = 150000$  Da a umožňuje studium prostorového uspořádání proteinů, viz. obr 4 [16][18][19].



Obr. 4: Princip ionizace elektrosprejem [17].

### 3.3.2.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Chemická ionizace za atmosférického tlaku je vhodná pro látky středně polární až nepolární. Má obdobný princip jako u konvenční chemické ionizace, ale ionizace probíhá za atmosférického tlaku.

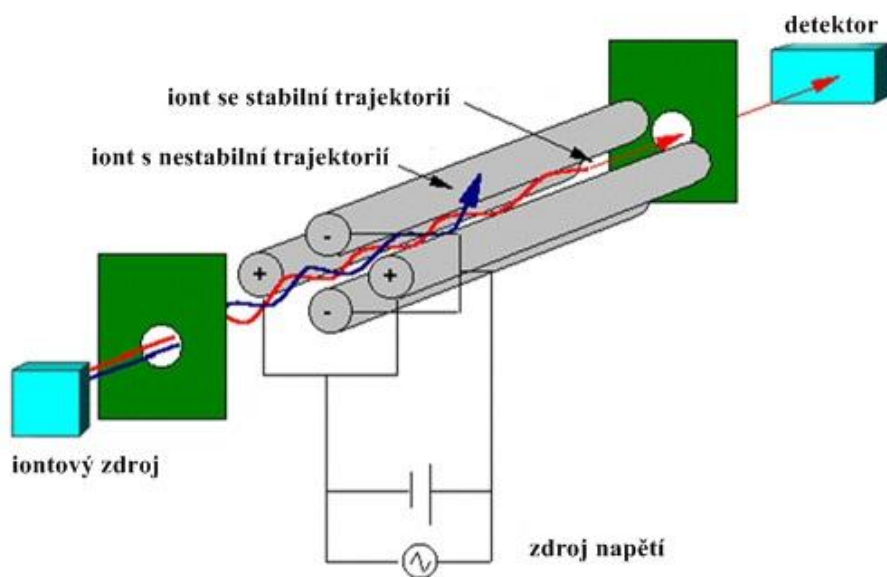
Eluát z LC systému je kapilárou přiváděn do vyhřívací zóny a na jejím konci dochází k rozprášení pomocí zmlžovače. Vložím vysokého napětí (3-4 kV) na výbojovou elektrodu (jehlu) vzniká koronový výboj. Výbojem jsou ionizovány nejprve molekuly mobilní fáze, které jsou ve velkém nadbytku vůči molekulám analytu. Ionizace vzorku probíhá ion-molekulárními interakcemi. Vzniklé ionty jsou elektrodami přitahovány do analyzátoru. K vysušení a rozbití případných nekovalentních klastrů slouží protiproud sušícího plynu (dusík) [19].

### 3.3.3 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor dělí ionty v plynné fázi podle poměru jejich hmotnosti a náboje. Dělení iontů probíhá za vysokého vakua na základě různých fyzikálních principů:

- 1) zakřivení dráhy pohybu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli – magnetický analyzátor
- 2) různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a střídavého napětí – kvadrupól, iontová past
- 3) různá doba rychlosti letu iontů – analyzátor doby letu
- 4) různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli – iontová cyklotronová resonance [13].

Kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi kovovými tyčemi, které jsou paralelně rozmístěny na kružnici. Na protilehlé tyče se vkládá kladné nebo záporné stejnosměrné napětí, přičemž na všechny je vloženo střídavé vysokofrekvenční napětí. Při vhodně vloženém napětí na obou párech tyčí jsou stabilní pouze ionty s určitou hodnotou  $m/z$  a ty mohou proletět k detektoru. Zbylé ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou hodnot napětí jsou postupně propouštěny všechny ionty ve zvoleném rozsahu  $m/z$  [9].

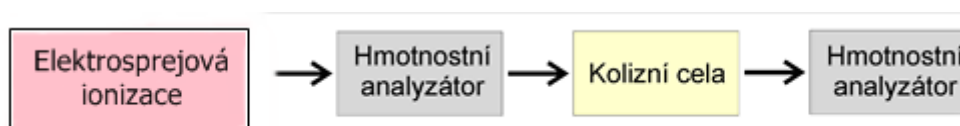


Obr. 5: Schéma kvadrupólového analyzátoru [15].

V současné době je trendem v oblasti hmotnostních analyzátorů tandemová hmotnostní spektrometrie, hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) a tzv. hybridní analyzátoři. Největší zastoupení v LC-MS/MS má iontová past, trojitý kvadrupól a kvadrupól spojený s analyzátořem doby letu [13][9].

### 3.3.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Tandemový hmotnostní spektrometr se skládá z několika hmotnostních analyzátorů. První funguje k výběru jednotlivých iontů, které budou propouštěny do druhého analyzátoři, který slouží jako kolizní cela. V kolizní cele dochází ke srážkám iontů a vzniku fragmentů, které jsou propouštěny dále do třetího analyzátoři.



Obr. 6: Schéma hmotnostního analyzátoři - trojitý kvadrupól [12].

Tandemová hmotnostní spektrometrie může probíhat v čase nebo v prostoru. Při tandemové hmotnostní spektrometrii v čase se izolace, fragmentace a skenování produktového iontu odehrává postupně v různých časových intervalech, ale na stejném místě. Při tandemové hmotnostní spektrometrii v prostoru výběr prekurzorového iontu, fragmentace a separace probíhá v různých částech spektrometru. Při použití tohoto spojení hmotnostních analyzátoři se zvyšuje citlivost metody pro kvantifikaci, selektivita, specifičnost a vznik fragmentů pro identifikaci látek [13].

### 3.3.5 Skeny v hmotnostní spektrometrii

- **Základní sken** - změření hmotnostního spektra v celém rozsahu m/z.
- **Sken produktových iontů** - změření MS/MS spektra z vybraného prekurzoru.

- **Sken iontů prekurzoru** - pro vybraný fragmentový ion určíme původní ion prekurzoru, ze kterého vznikl fragmentací.
- **Sken neutrálních ztrát** - zjistíme charakteristické dvojice iontů prekurzorů a produktů, u kterých dochází k odštěpení vybrané hmotnostní ztráty, např.  $m/z = 18$  pro ztrátu vody.
- **Selektivní záznam jednoho nebo více iontů** (Selected Ion Monitoring, SIM) - měříme pouze závislost intenzity signálu vybraného iontu na čase (nebo více iontů).
- **Selektivní záznam jedné nebo více iontových reakcí** (Selected Reaction Monitoring, SRM) - prvním analyzátozem vybereme ion prekurzoru, který potom v kolizní cele podrobíme fragmentaci a sledujeme pouze vybraný fragmentový ion. Lze sledovat i více reakcí najednou [13].

### 3.4 Metody přípravy vzorků

Úprava vzorku je nepostradatelnou součástí každé bio-analytické metody a zároveň se jedná o časově i finančně nejnáročnější krok, na který je vynaloženo okolo 60 % času celé analýzy. Konvenční přístupy úpravy vzorků v současné době používané v klinické praxi jsou pracné, časově náročné a často mnoha krokové. Z těchto důvodů v posledním desetiletí vzniklo velké množství nových extrakčních metod, nicméně žádná z nich nesplňuje veškeré požadavky klinické praxe, které jsou zejména snížení času, nákladů, objemů vzorku a spotřeby rozpouštědel a zároveň miniaturizace a automatizace pomocí on-line spojení analytických metod.

Cílem úpravy biologického vzorku je odstranění balastních látek a zároveň zakontrolování analytu. Úprava biologického vzorku navíc umožňuje zvýšit selektivitu stanovení a citlivost metody. Odstranění nežádoucích složek, jako například bílkovin, soli a interferujících látek můžeme ochránit kolonu před mechanickým a chemickým poškozením a tím prodloužit životnost kolony.

Nejčastěji používané metody v klinické praxi jsou: deproteinace, extrakce z kapaliny do kapaliny a extrakce na tuhou fázi. Tyto metody se řadí mezi konvenční a na jejich základě vznikla řada nových moderních technik [20][21][22].

### 3.4.1 Konvenční techniky

Konvenční metody úpravy vzorků jsou využívány zejména pro svou jednoduchost a malou finanční nákladnost. Z důvodu časové náročnosti, relativně vysoké spotřeby rozpouštědel a vzorků jsou v poslední době nahrazovány moderními technikami.

**Deproteinace** je jednoduchá a rychlá metoda, sloužící k odstranění proteinů z biologického materiálu. Nejčastěji se pro srážení používají organická rozpouštědla, silné kyseliny a soli vícemocných iontů. Deproteinační činidlo nesmí ovlivňovat stanovovanou látku nebo interferovat při detekci. Hlavní nevýhodou této metody je nízká efektivita v odstranění balastních látek.

**Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)** je jednou z nejdéle používaných extrakčních technik a stále nachází široké uplatnění. Principem extrakce je opakované ustalování rovnováhy v soustavě dvou vzájemně nemísitelných kapalin na základě rozdělovacího koeficientu. Analyt obvykle přechází z vodné fáze do organického rozpouštědla, kdy extrahovanou látku je nutné zachovat v neionizované formě.

Účinnost extrakce je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech extrakčního činidla, pH vodné fáze, vzájemném poměru fází, provedení, času extrakce a způsobu předchozího zpracování vzorku.

LLE je stále ještě využívána v praxi z důvodu jednoduchosti provedení, dobré výtěžnosti, zakoncentrování a to i přes řadu nevýhod, jako jsou velká spotřeba organických rozpouštědel, tvorba emulzí, pracnost, časová náročnost a obtížná automatizace. V současné době se začínají užívat modernější techniky, které jsou na LLE založeny [21][23][24].

**Extrakce na tuhou fázi (SPE)** je v klinické praxi nejrozšířenější metoda pro přípravu vzorků. Do kontaktu se dostává kapalná analyzovaná směs s SPE sorbentem, na jehož povrchu dochází záchytu analytu. Mezi oběma fázemi probíhají mezimolekulární interakce, které mohou být polární, nepolární nebo iontové. Konečnou fází je vymytí analytu ze sorbentu pomocí vhodného činidla.

Před výběrem vhodného sorbentu je třeba zjistit co nejvíce informací o vzorku a na základě toho zvolit typ fáze a velikost kolonky. Pro SPE kolonky se používají různé druhy sorbentů s rozdílnou velikostí částic, kterých je na trhu velké množství. Používají se klasické nepolární fáze C8 a C18, polární jako je silikagel, oxid hlinitý i různé polymerní materiály, tím je zajištěna sorpce analytů s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi

SPE se v porovnání s ostatními konvenčními technikami vyznačuje vyšší extrakční účinností, jednoduchostí, spolehlivostí, snadnější automatizací a on-line spojením s chromatografickými systémy. Metoda je rychlá, přesná, reprodukovatelná a lze ji využít v mnoha oblastech, například v monitorování životního prostředí, v toxikologii, farmacii a dalších oborech. V posledních letech vzniklo několik metod na stejném principu, které z SPE vychází [21][23][31][32].

### **Postup SPE**

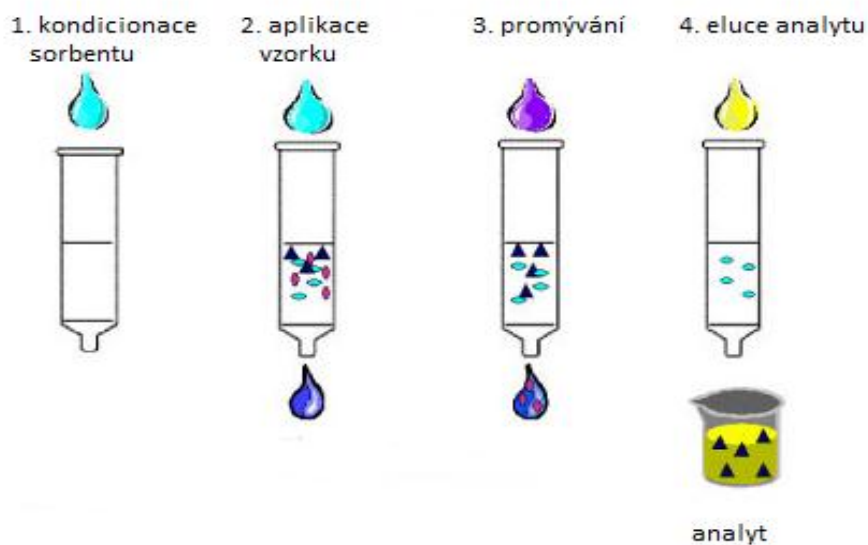
**I.** Aktivace sorbentu - dochází k otevření vazebných míst sorbentu. Nejčastěji se používají organická rozpouštědla, např.: acetonitril nebo metanol.

**II.** Kondicionace kolonky - provádí se rozpouštědlem podobných vlastností jako vzorek, nejčastěji je to voda nebo pufr.

**III.** Aplikace reálného vzorku - dochází k zachycení analytu na sorpčním materiálu kolonky.

**IV.** Promytí kolonky vhodným rozpouštědlem - slouží k vymytí adsorbovaných nečistot ze sorbentu, nicméně bez ztrát analytu. Ve většině případů se používají vodné roztoky s nízkým obsahem organických rozpouštědel, kde hraje roli také jejich hodnota pH.

**V.** Eluce stanovovaného analytu – pomocí vhodného rozpouštědla jsou analyty vymyty ze sorbentu. Eluát je použit pro analýzu [24][33].



Obr. 7: Schéma postupu SPE [34].

### 3.4.2 Moderní techniky

Hlavním účelem moderních metod přípravy vzorků je odstranění nevýhod konvenčních technik. Požadavky na tyto techniky jsou: snížení spotřeby rozpouštědel a množství vzorku, zkrácení doby úpravy, automatizace, zvýšení extrakční účinnosti a on-line spojení s chromatografickými metodami.

Ve většině případů tyto moderní metody vychází z principu extrakce na tuhou fázi a extrakce z kapaliny do kapaliny.

#### 3.4.2.1 Mikroextrakční metody založené na LLE

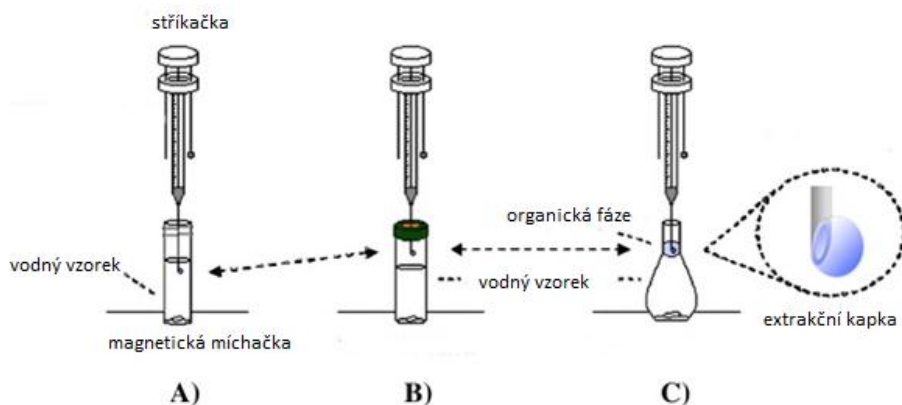
Mikroextrakční metody založené na LLE jsou nejpočetnější skupinou moderních technik úpravy vzorku. Tyto techniky zahrnují **mikroextrakci do jedné kapky** (single-drop microextraction, SDME), **mikroextrakci do kapalné fáze pomocí dutého vlákna** (hollow fibre liquid phase microextraction, HF-LPME) a **disperzní mikroextrakci z kapaliny do kapaliny** (dispersive liquid–liquid microextraction, DLLME).

## Mikroextrakce do jedné kapky (SDME)

SDME využívá k extrakci mikrokapku (1-10 $\mu$ l) extrakčního roztoku nemísitelného s vodou. Mikrokapka je vytvořena na konci jehly, po extrakci je vtažena zpět do jehly a následně je přímo nastříknuta do chromatografického systému. Hlavní nevýhodou této metody je horší reprodukovatelnost. Metoda existuje ve třech provedeních a to jako **mikroextrakce do jedné kapky pomocí přímého ponoření** (direct immersion SDME, DI-SDME), **mikroextrakce do jedné kapky pomocí head space** (head-space SDME ,HS-SDME) a **mikroextrakce z kapaliny do kapaliny a zpět** (liquid–liquid–liquid microextraction, LLLME).

- Principem **DI-SDME** je přímý kontakt kapky organického rozpouštědla na špičce jehly s polárním rozpouštědlem, čímž dochází k přechodu analytu z vodné fáze do organického rozpouštědla. Přechod analytu probíhá do doby než je dosažena termodynamická rovnováha nebo se extrakce nezastaví. Po extrakci je organické rozpouštědlo vtaženo zpět do stříkačky a nastříknuto do LC systému. Rozpouštědlo se nesmí mísit s vodou.
- Použití **HS-SDME** umožňuje extrakci a zakoncentrování těkavých nebo částečně těkavých vzorků. Kapka rozpouštědla je v prostoru nad těkavým vzorkem. Analyty v plynné fázi jsou extrahovány do rozpouštědla a rychlost přestupu lze ovlivnit mícháním roztoku. Lze použít vodné i organické extrakční rozpouštědlo.
- **LLLME** je způsob mikroextrakce vhodný pro ionizovatelné analyty. Analyt z vodného roztoku přechází do organického rozpouštědla s nižší hustotou než voda a současně probíhá další extrakce do vodné kapky. Při vhodné úpravě pH vodného roztoku vzorku se získá nejprve analyt v neutrální formě. Ten se extrahuje do organické fáze a ionizuje se, aby následně snadno přecházel do vodné kapky [21][25][26].

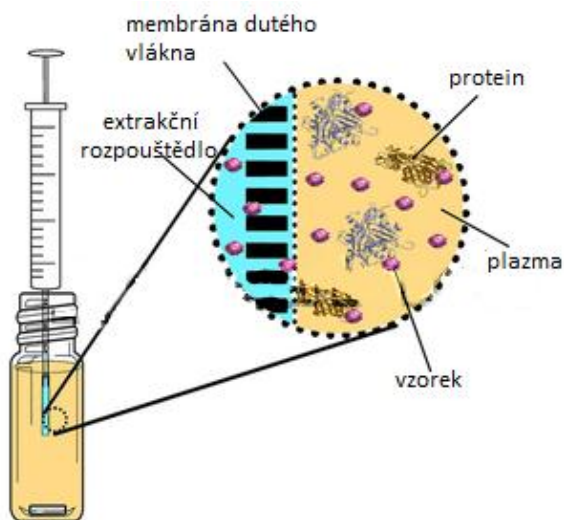




Obr. 8: Schéma uspořádání DI-SDME (A), HS-SDME (B) a LLLME (C) [25].

### Mikroextrakce do kapalné fáze s využitím dutého vlákna (HF-LPME)

Při HF-LPME technice je použito duté vlákno, jehož stěna je impregnována rozpouštědlem. Analyt je extrahován z vodných roztoků přes tenkou vrstvu organického rozpouštědla navázaného v pórech dutého vlákna. Poté analyt přechází do lumen dutého vlákna, které je naplněno akceptorovou tekutinou. Malá velikosti pórů zabraňuje přechodu větších molekul, což umožňuje získání čistšího eluátu. Je to rychlá, selektivní, citlivá a jednoduchý metoda, použitelná pro širokou skupinu analytů k extrakci a zakoncentrování vzorku. Hlavní nevýhodou této metody je možná kontaminace vlákna a jeho křehkost [21][25][28].

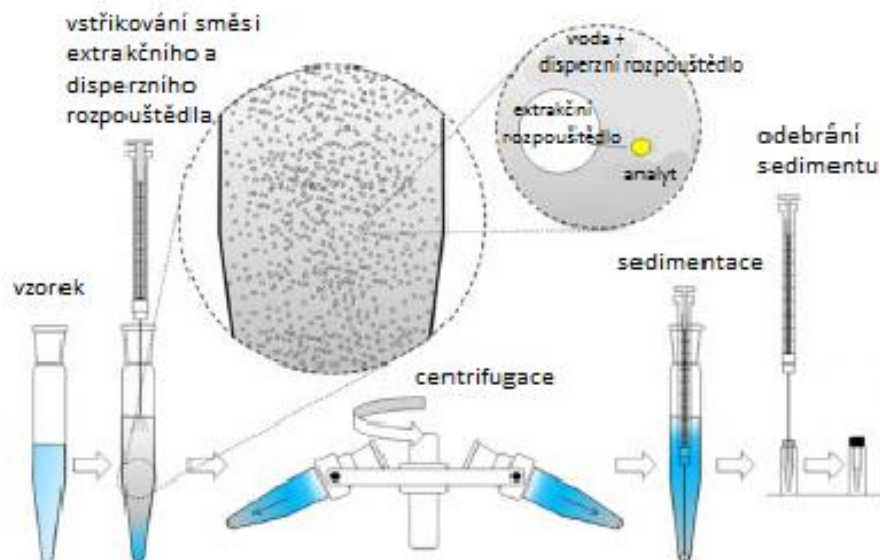


Obr. 9: Schéma HF-LPME metody [27].

## Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME)

DLLME využívá tříložkový systém. Disperzní činidlo musí být mísitelné s oběma fázemi a extrakční činidlo nemísitelné s vodnou fází. Směs extrakčního a disperzního rozpouštědla je rychle vstříknuta do vzorku, kde se za pravidelného míchání rozptýlí a vzniká nehomogenní směs. Vznikají emulgované kapičky s velkým mezifázovým povrchem, do nichž je analyt extrahován. Po odstředění a usazení emulgovaných kapek je výsledný sediment odebrán pomocí mikro-injekční stříkačky a nastříknut do chromatografického systému.

Disperzní činidla mají také za úkol snižovat povrchové napětí mezi vodnou a organickou fází a tím dochází k tvorbě menších kapének. Velké mezifázové rozhraní usnadňuje přenos analytu a tím je rychlost extrakce podstatně vyšší. Ve většině případů se využívá extrakční činidlo o vyšší hustotě než voda. V současnosti vznikají i nové varianty této techniky. Například využívající ultrazvuku místo disperzního činidla pro rozptýlení rozpouštědla ve vzorku. Výhodou DLLME proti LLE je tedy větší rychlost extrakce, vyšší výtěžnost a malá spotřeba činidel [21][25][30].



Obr. 10: Provedení DLLME metody [29].

### 3.4.2.2 Mikroextrakční techniky založené na SPE

Mikroextrakční metody založené na extrakci na tuhou fázi jsou další početnou skupinou. Vyznačují se použitím malých objemů rozpouštědel a minimalizací počtu extrakčních kroků. Řadí se sem **mikroextrakce na tuhou fázi (SPME)**, **sorpční extrakce míchátkem (SBSE)**, **mikroextrakce tuhým sorbentem (MEPS)** a **extrakce pomocí naplněných špiček pipet (DPX)**.

#### Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME)

Mikroextrakce na tuhou fázi je jednoduchá a efektivní sorpčně - desorpční technika úpravy vzorku. Analyty jsou extrahovány ze vzorku adsorpcí na tenkou polymerovou vrstvu umístěnou na pevném povrchu vlákna uvnitř injekční jehly nebo kapiláry.

Postup při vzorkování a desorpci analytu je rozdělen do dvou fází, adsorpční a desorpční. V první fázi je vlákno uvnitř jehly, které slouží k propíchnutí septa. Následně se vlákno vysune do kapalného vzorku a analyt se adsorbuje na tenkou polymerovou vrstvu. Adsorpce probíhá do dosažení rovnováhy. Poté dojde k zasunutí vlákna dovnitř jehly a vytažení ze zkumavky. V druhé fázi dochází k desorpci analytu z vlákna. Desorpce může být tepelná nebo pomocí rozpouštědla a analyt je nastříknut do chromatografického systému.

Podle toho, zda jsou analyty adsorbovány z kapalně fáze (jehla je ponořena přímo do kapalného vzorku) nebo z plynné fáze (jehla je nad hladinou vzorku) rozlišujeme: **direct immersion SPME (DI-SPME)** - přímá extrakce analytu ze vzorku a **head space SPME (HS-SPME)** - provedení vhodné pro extrakci těkavých látek.

Vývoj nových sorbentů umožňuje zkrácení času, potřebného pro náročnou analýzu a stanovení netěkavých látek se složitou maticí. Snadná automatizace a zrychlení metody je dosaženo spojením operace vzorkování, extrakce, zkoncentrování a dávkování do jednoho kroku.

Jednou z modernějších metod je tzv. In-tube SPME, kdy je sorbent nanesen na vnitřní stěnu kapiláry. Analyt ve vodném vzorku je extrahován a koncentrován ve stacionární fázi během opakovaných cyklů nasávání a vypouštění roztoku vzorku z

kapiláry. Tato metoda je jedna z nejlepších pro bio-analytické aplikace. Velkou výhodou její rychlost, jednoduchost, eliminace rozpouštědel, citlivost, potřeba malého množství vzorku, nízká cena, snadná automatizace a on-line spojení s chromatografickým systémem [20][21][35][36].

### **Sorpční extrakce míchátkem (SBSE)**

SBSE je metoda založena na stejných principech jako mikroextrakce na tuhou fázi, kde je sorbent umístěn na magnetickém míchátku. Extrakce analytu je řízena pomocí rozdělovacího koeficientu mezi vodnou a extrakční (nejčastěji polydimethylsioxan) fází. U této metody je použito podstatně větší množství sorbentu, tím vzrůstá citlivost ale také nutnost užití větších objemů vzorku.

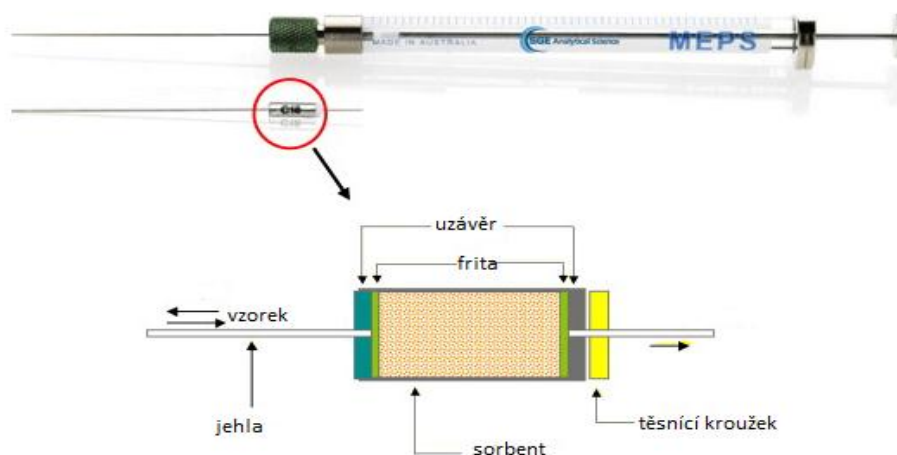
SBSE nachází využití v oblasti životního prostředí a bio-medicínské analýze. Hlavní nevýhodou tohoto způsobu je doba extrakce, která je v rozmezí 30 – 150 minut [21][37][38][39].

### **Mikroextrakce tuhým sorbentem (MEPS)**

MEPS představuje jednu z novějších technik pro přípravu vzorků a byla vyvinuta v laboratoři Astra Zeneca v roce 2004. Mikroextrakce tuhým sorbentem je v podstatě miniaturizace SPE metody, která je prováděná pomocí stříkačky s využitím menších objemů vzorku a rozpouštědel. Podobnou metodou založenou na stejném principu je DPX, kdy je sorbent naplněn do špiček pipet. MEPS sorbent (1-2 mg) je umístěn do stříkačky nebo do speciálního barelu mezi jehlu a tělo stříkačky, po obou stranách je ohraničený polypropylenovými filtry. Mezi běžně používané sorbenty patří modifikovaný silikagel C2, C8 a C18, iontoměniče, polystyren-divinylbenzen kopolymer (PS-DVB), materiály s omezeným přístupem (RAM), molekulárně vtištěné polymery (MIP) a nově komerčně dostupný porézní grafitický uhlík (PGC). PGC vzniká grafitizací při 2000-2800 °C a jeho povrch ve formě plochých krystalů je vysoce homogenní. Používá se pro extrakci polárních látek a jeho výhody jsou: vysoká výtěžnost analytu, chemická stabilita a dobrá reprodukovatelnost metody. MEPS lze on-line spojit s LC nebo GC systémem, bez větších zásahů do instrumentace.

Postup extrakce je shodný s technikou SPE, obecně lze popsat následujícími kroky: Sorbent se nejprve aktivuje nejčastěji organickým rozpouštědlem a kondicionuje

vhodným roztokem podobného složení jako analyzovaný vzorek, nejčastěji tedy vodou či pufrem. Vzorek (50-250  $\mu\text{l}$ ) je ručně nebo pomocí autosampleru nasáván přes sorbent do stříkačky, kde se adsorbuje na sorbent. Po promytí sorbentu je analyt eluován vhodným elučním činidlem. Eluát může být přímo nastříknut do chromatografického systému. Pro zakoncentrování se může proces nasávání a vypouštění vzorku několikrát opakovat [21][40][41].



Obr. 11: Schéma MEPS [41].

Hlavní výhodou v porovnání s SPE je možnost několikanásobného použití MEPS sorbentu. Jeho typická životnost činí 40 až 100 vzorků. Důvodem vyšší životnosti jehly, je malé množství extrakční fáze, které lze snadno a účinně promýt. Tím se snižuje riziko vzájemné kontaminace mezi vzorky. MEPS je jednoduchá a efektivní metoda využívající malé množství vzorku i sorbentu, používaná zejména v bio-analýze. Zpracování vzorku "on-line" pomocí jednoho zařízení zkracuje dobu úpravy vzorku a eliminuje nutnost častého zásahu analytika [40][41].

### 3.4.3 Materiály s omezeným přístupem (RAM)

Materiály s omezeným přístupem se používají pro analýzu látek s nízkou molekulovou hmotností ve složitých matricích, které obsahují vysokomolekulární látky. RAM umožňují přímé vstříkávání biologického vzorku do chromatografických systémů bez předchozího zpracování vzorku, což značně zjednodušuje a urychluje přípravu vzorku a usnadňuje automatizaci. RAM sorbenty jsou porézní materiály umožňující odstranění makromolekul na základě omezení přístupu do sorbentu. Makromolekuly nepronikají do pórů a jsou snadno eluovány promývacím činidlem. Separace menších molekul je založeno na interakci se stacionární fází, která molekuly zadržuje.

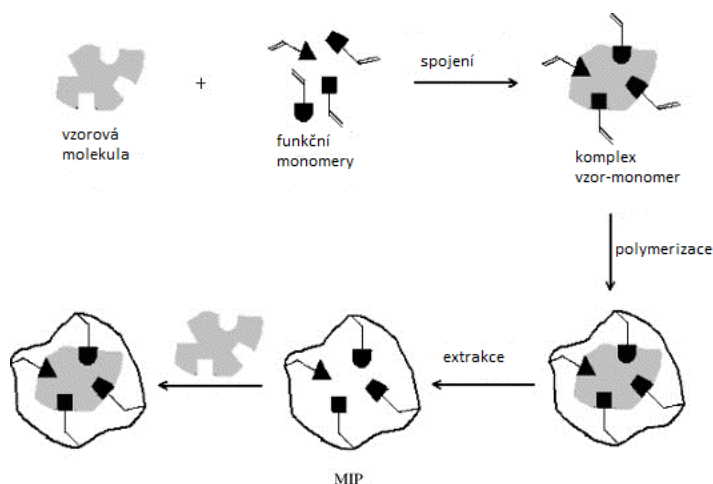
Separáční účinnost závisí hlavně na použitém typu RAM sorbetu. Dlouhá životnost, rychlé analýzy, snadná automatizace a zjednodušení analytického postupu jsou hlavní výhody využití RAM v HPLC systémech [42].

### 3.4.4 Molekulárně vtištěné polymery (MIPs)

Molekulárně vtištěné polymery jsou materiály s vysokou selektivitou pro cílové molekuly. Postupem přípravy se vytváří specifická rozpoznávací místa pro daný analyt na sorbentu. MIPs se používají stejným způsobem jako sorbenty pro SPE, ale i MEPS. Slouží tedy nejen k přečištění a zakoncentrování analytu, ale také k selektivní extrakci konkrétního analytu, která je důležitá zejména u složitých matric.

Příprava MIP sorbentu probíhá v několika krocích. Nejprve se vzorová molekula spojí s funkčními monomery do komplexu a následně se komplex vzorová molekula-monomery polymerizuje. Konečnou fází přípravy MIPs je vyjmutí vzorové molekuly z polymeru.

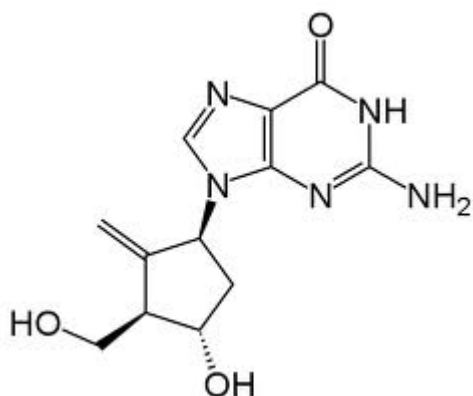
Hlavní výhody této metody spočívají ve vysoké selektivitě. Nevýhodou těchto polymerů je jejich nízká kapacita a prozatím i relativně úzké spektrum dostupných MIP sorbentů [43][44].



Obr. 12: Schéma přípravy selektivního MIPs polymeru.

### 3.5 Entekavir

Entekavir (EV) nukleosidový analog guanosinu s chemickou strukturou 2-amino-9-[(1-S,3R,4S)-4-hydroxy-3(hydroxymethyl)-2-methylindenecyclopentyl]-3H-purin-6-on je novým antivirokem používaným k léčbě chronické hepatitidy B. Jedná se o malou polární molekulu s MW = 277,12. V těle je fosforylován na aktivní trifosfátovou formu, která inhibuje všechny tři kroky virové replikace. Působí proti HBV polymeráze a kompeticí s přirozeným substrátem deoxyguanosinem trifosfátem soutěží o inkorporaci do nově vznikajícího řetězce DNA, čímž zastavuje jeho syntézu. Dále zabraňuje primování při reverzní transkripci a blokuje DNA dependentní DNA syntézu.



Obr. 13 Struktura entekaviru [49].

Po perorálním podání se vstřebává z gastrointestinálního traktu. Maximální koncentrace v plazmě je dosažena za 0,6 až 1,5 hodiny. Není výrazně vázaný na plasmatické bílkoviny, jen asi z 13 %. Distribuční objem je větší než objem celkové tělesné tekutiny. V malé míře je metabolizován na glukuronid a síranové formy. Není substrátem, inhibítorem ani induktorem cytochromu P450. Entekavir je vylučován převážně ledvinami a to glomerulární filtrací a tubulární sekrecí. Průměrný biologický poločas se pohybuje v rozmezí 77 a 149 hodin [48][49][50][52].

V současné době existuje pouze několik LC metod používaných pro stanovení entekaviru v biologickém materiálu. V Tab. 1 jsou shrnuty jednotlivé LC-MS/MS metody. Nejčastěji používanou metodou úpravy vzorků je SPE s objemem vzorku 0,5 – 1 ml a jako vnitřní standard byly použity strukturní analogy entekaviru.



Metoda	Režim UHPLC	Vnitřní standard	Technika úpravy vzorku	Sorbent	Objem vzorku	Matrice	Nástřík	Doba analýzy	LOQ	Odkaz
ESI-LC- MS/MS	RP, pH 10,5	Lamivudin	SPE	Oasis HLB	500 µl	Lidská plasma	20 µl	5 min	50 pg / ml	[51]
ESI-LC- MS/MS	RP, pH 10,5	Lobucavir	96 jamková destička SPE	Oasis HLB	1 ml (2 kroky)	Lidská plasma	20 µl	4 min	5 pg / ml	[49]
ESI-LC- MS/MS	RP, pH kyselé	Acyclovir	SALLE	Síran hořečnatý	500 µl	Lidská plasma	5 µl	10 min	50 pg / ml	[50]
ESI-LC- MS/MS	HILIC, pH 4,0	Entekavir- C <sub>2</sub> <sup>13</sup> N <sup>15</sup>	SPE	Oasis HLB	500 µl	Potkaní moč	2 µl	2 min	100 pg/ ml	[48]
ESI-LC- MS/MS	HILIC, pH 4,0	Entekavir- C <sub>2</sub> <sup>13</sup> N <sup>15</sup>	MEPS	PGC	50 µl	Ultrafiltrát ledvin	2 µl	2 min	100 pg/ml	Prezentovaná metoda

Tab. 1: Přehled LC-MS/MS metod pro stanovení entekaviru v biologickém materiálu.

### 3.6 Validace analytických metod

Validace je prokázání vhodnosti postupu pro zamýšlené použití a zajištění stejné spolehlivosti při opakovaném použití ve stejné nebo různých laboratořích. Úplná validace by měla být provedena pro všechny nově zaváděné analytické metody. Validace bio-analytických metod se řídí platnými předpisy, kterými jsou směrnice „ICH Q2R1: Validace analytických procesů“ a směrnice společnosti EMA (European Medicines Agency).

Mezi hlavní validační charakteristiky bio-analytické metody patří: správnost, přesnost, selektivita, limit kvantifikace (LOQ), limit detekce (LOD), přenos vzorku, linearita, rozsah, robustnost a matricové efekty. Tyto parametry jsou shrnuty v Tab. 2. EMA na rozdíl od ICH směrnice přesně definovala limitní hodnoty jednotlivých parametrů. Dalším rozdílem mezi nimi je v počtu stanovení potřebných pro hodnocení jednotlivých parametrů.

Parametr	ICH - Q2R1	EMEA	
	počet vzorků	počet vzorků	limitní hodnota
Selektivita	+	6	< 20% LOQ
Přenos vzorku	+	+	
LOQ	+	+	
Lineární rozsah	5x1	6x3	± 15%, pro LOQ 20%
Správnost	3x3	4x5	± 15%, pro LOQ 20%
Přesnost	3x3	4x5	± 15%, pro LOQ 20%
Vliv ředění vzorku	-	5	správnost i přesnost 15%
matricové efekty	-	6	< 15%

+ směrnice stanovení provádí, - směrnice stanovení neprovádí

Tab. 2: Srovnání parametrů u ICH a EMEA směrnice [53][54].

### 3.7 Matricové efekty

Matricové efekty lze definovat jako změny účinnosti ionizace způsobené přítomností látky vycházející z kolony spolu s analyzovanou látkou. [45] Setkáváme se s nimi u analýzy reálných matric, kde je vyšší obsah látek, které způsobují pozitivní

nebo negativní efekt. Vliv matricových efektů může být ovlivněn typem ionizace (elektrosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku), způsobem úpravy vzorku, složením mobilní fáze a jejích aditiv, zvolením vhodného vnitřního standardu. Pečlivé zhodnocení matricových efektů a používání příslušné přípravy vzorku ve spojení s odpovídající chromatografií a vnitřními standardy, jsou důležité pro úspěšnou validaci.

Velké rozdíly jsou pozorovány u jednotlivých technik přípravy vzorku. Precipitace proteinů vykazuje největší matricový efekt s mohutným potlačením, zejména na začátku a na konci chromatogramu. Precipitace proteinů je neselektivní, a proto se tímto způsobem nedostatečně odstraní lipidy, fosfolipidy a mastné kyseliny, které mohou ovlivnit ionizaci u látek s malým retenčním časem. SPE umožňuje mnohem intenzivnější přečištění biologického vzorku, ale na druhé straně dochází ke zakoncentrování nejen cílového analytu, ale také interferujících látek a tedy ke zvýšení mí matricových efektů.

K hodnocení matricových efektů se používají tři metody:

- **post-kolonová infuze** – do toku mobilní fáze, který je za kolonou obohacován kontinuálním přísunem analytu, je vstříknut extrakt blankové matrice a mobilní fáze. Porovnáním těchto dvou záznamů je kvalitativně hodnocen vliv matricových efektů.
  
- **standardní post-extrakční přídavek** - porovnání koncentrací analytů ve dvou roztocích – vzorek blankové matrice obohacená sledovaným analytem po extrakci a standardní roztok sledovaného analytu v mobilní fázi.
  
- **porovnání směrnice kalibračních křivek** - směrnice se získají změřením standardní a matricové kalibrační křivky. Jestliže je koeficient „k“ v rovnici lineární závislosti shodný s oběma kalibračními křivkami, nevyskytují se žádné matricové efekty [45][46][47].

## 4. Experimentální část

---

### 4.1 Chemikálie

#### 4.1.1 Standardní látky

- Entekavir, Santa Cruz Biotechnology, USA,  $\geq 99\%$
- Entekavir C<sub>2</sub><sup>13</sup> N<sup>15</sup>, vnitřní standard, Toronto Chemicals Research, Kanada,  $\geq 99\%$

#### 4.1.2 Rozpouštědla

- Acetonitril, Acetonitrile, LC-MS chromasolv®  $\geq 99\%$ , FLUKA Analytical, ČR
- Kyselina octová, Acetic acid,  $\geq 99\%$ , FLUKA Analytical, ČR
- Hydroxid amonný, Ammonium hydroxide, LC-MS,  $> 25\%$ , Fluka Analytical, ČR
- Kyselina mravenčí, Formic acid,  $\geq 99\%$ , MERCK, ČR
- Ultračistá voda, vyrobena na Farmaceutické fakultě v HK pomocí zařízení MILLI-Q, Millipore

### 4.2 Přístroje

- Acquity UPLC Systém, Waters, ČR
- Analytická kolona - Acquity BEH Amide (1,7  $\mu\text{m}$  2,1 x 50 mm), Waters, ČR
- Hmotnostní spektrometr - trojitý kvadrupól Quattro Micro, Waters, ČR
- Analytické váhy Sartorius 2004 MP, SARTORIUS, Německo
- Vakuová pumpa a filtrační zařízení, Chromservis, ČR
- Automatické pipety, BIOHIT, Fisher Scientific, ČR
- Magnetická míchačka IKA MS 3 basic, Chromservis, ČR
- Laboratorní pH metr HANNA instruments pH 212, Fisher Scientific, ČR
- Ruční automatická pipeta eVol s příslušenstvím, SGE Analytical Science, USA
- Sušení dusíkem: Supleco Visiprep 24<sup>TM</sup> DL
- PTFE Filtry: 4 x 0,2  $\mu\text{m}$  ISO-DISC<sup>TM</sup> Filters, Supleco Analytical Science, USA

## 4.3 Testované MEPS sorbenty

- Retain CX - Thermo Scientific
- Retain PeP - Thermo Scientific
- C8 - SGE Analytical Science, Australia
- C18 - SGE Analytical Science, Australia
- Silica - SGE Analytical Science, Australia
- PGC- Thermo Scientific

## 4.4 Příprava roztoků

### 4.4.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny navážením 1 mg standardu entekaviru a vnitřního standardu entekaviru  $C_2^{13}N^{15}$  a rozpuštěním v 1 ml vody. Koncentrace zásobních roztoků byla 1 mg/ml a byly skladovány v lednici.

### 4.4.2 Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky byly připraveny postupným ředěním zásobních roztoků mobilní fáze v rozsahu 100  $\mu\text{g/ml}$  – 0,1 ng/ml. Ze zásobního roztoku bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$ , napipetováno do vialky a doplněno 900  $\mu\text{l}$  mobilní fáze. Takto vznikl pracovní roztok o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Stejným způsobem byla pomocí postupného ředění připravena koncentrační řada až do hodnoty koncentrace 0,1 ng/ml. Roztok entekaviru o koncentraci 500 ng/ml byl připraven smísením 50  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  a 950  $\mu\text{l}$  mobilní fáze. A následně roztok o koncentraci 50 ng/ml byl připraven napipetováním 100  $\mu\text{l}$  roztoku o koncentraci 500 ng/ml a 900  $\mu\text{l}$  mobilní fáze. Stejným způsobem byly připraveny roztoky o koncentraci 5 ng/ml a 0,5 ng/ml.

Obdobným způsobem byl připraven roztok vnitřního standardu entekaviru, který byl používán jako roztok o koncentraci 10 ng/ml.

### 4.4.3 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze pro přípravu pracovních roztoků byla připravena smísením acetonitrilu a 5 mM octanu amonného o pH 4,0 v poměru 75:25 (v:v).

Octan amonný o pH 4,0 byl připraven napipetováním 71,3  $\mu$ l kyseliny octové do kádinky s 200 ml vody a pH bylo upraveno přidávkem hydroxidu amonného na hodnotu 4,00. Následně byl roztok převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml a doplněn vodou po rysku. Tento roztok byl připravován čerstvý každý den.

## 4.5 UHPLC-MS/MS podmínky

Optimalizace chromatografické separace a hmotnostní detekce byla provedena v rámci dříve vyvinuté metody pro stanovení entekaviru v potkaní moči. Chromatografické podmínky a nastavení hmotnostního spektrometru bylo převzato z diplomové práce Tomáše Gottvalda, která se zabývala vývojem a validací HILIC-UHPLC-MS/MS metody pro stanovení entekaviru v potkaní moči.

### 4.5.1 Chromatografické podmínky

Stanovení entekaviru bylo provedeno v HILIC módu s využitím kolony Acquity BEH Amide (1,7  $\mu$ m, 2,1 x 50 mm). Jako mobilní fáze byla zvolena směs acetonitrilu a 5 mM octanu amonného pH 4,0 v poměru 75:25 (v:v) při průtoku 0,3 ml/min. Objem vzorku nastříknutého na kolonu byl 2  $\mu$ l.

Jako vhodná ionizační technika byla zvolena ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Nastavení ESI iontového zdroje bylo: napětí vkládané na kapiláru 3,5 kV, napětí na extraktoru 3 V, RF Lens 0,3 V, desolvační teplota 450 °C, teplota v iontovém zdroji 130 °C, průtok sušícího plynu (dusíku) 600 l/h, průtok plynu (dusíku) na vstupním kuželu 150 l/h.

Pro analýzu entekaviru byly použity 2 SRM přechody, kvantitativní a kvalitativní SRM přechod a metoda vnitřního standardu. Kolizní energie a napětí na vstupním kuželu byly zvoleny individuálně pro každý přechod, viz Tab. 3.

Analyt typ SRM přechodu	prekurzor	produktový iont	Napětí na vstupním kuželu (eV)	Kolizní energie (V)	Retenční čas (min.)
EV - kvantifikace	277,9	152,2	25	15	1,4
EV - konfirmace	277,9	135,2	25	35	1,4
EV - IS	280,2	155,2	25	15	1,4

Tab. 3: Chromatografické podmínky a SRM přechody entekaviru.

## 4.6 MEPS metoda

MEPS extrakce byla prováděna ruční automatickou pipetou eVol s jehlou obsahující sorbentem PGC. Sorbent byl nejprve kondicionován 100 % ACN a vodou, posléze byl aplikován vzorek. Následovalo promytí promývacím činidlem a eluce roztokem 75 % ACN ve vodě. Na závěr byla kolonka promyta znovu elučním činidlem, 100 % ACN a vodou. Přesný postup je uveden v Tab. 4.

Postup MEPS		
Krok	Objem	činidlo
1. kondicionace	3x100 µl	100% ACN
2. kondicionace	3x100 µl	voda
aplikace vzorku	50 µl	vzorek
promytí	2x100 µl	voda
eluce	100 µl	75% ACN
promytí	100 µl	75% ACN
promytí	100 µl	100% ACN
promytí	100 µl	voda

Tab. 4: Postup MEPS extrakce.

## **4.7 Validace analytické metody**

### **4.7.1 Test vhodnosti systému, SST**

Opakovatelnost retenčního času a ploch píků byla ověřena v sérii deseti měření na třech koncentračních hladinách (100, 10, 1 ng/ml) analytu a byla vyjádřena relativní směrodatnou odchylkou ploch píků analytu a retenčních časů (RSD) v procentech.

### **4.7.2 Linearita, přesnost, správnost a matricové efekty**

Linearita byla ověřena na základě dvou kalibračních křivek, standardní a matricové. Linearita standardní kalibrační křivky byla měřena v koncentračním rozmezí 0,1 ng/ml až 100 ng/ml a matricové kalibrační křivky byla v rozsahu 0,5 ng/ml až 100 ng/ml. Linearita byla hodnocena na základě korelačního koeficientu  $r^2$ .

Přesnost, správnost a matricové efekty byly ověřeny na třech koncentračních bodech + LLOQ: 100, 10, 1 a 0,5 ng/ml ve třech následujících dnech ve třech opakováních. Pro vyhodnocení správnosti, přesnosti a matricových efektů bylo využito třech roztoků entekaviru, viz Tab. 5.

### **4.7.3 Selektivita**

Selektivita byla hodnocena porovnáním chromatogramu čistého ultrafiltrátu plasmy upraveného metodou MEPS a chromatogramu standardního vzorku. Bylo ověřeno, zda nedochází k interferenci matrice se signálem analytu.



Matricové kalibrační vzorky	Post-extrakční přídavek	Standardní kalibrační body
<b>Postup přípravy</b>		
<b>0,5 ng/ml</b>		
227,5µl ultrafiltrátu + 12,5µl EV 10 ng/ml +10µl EV IS 250 ng/ml	90µl ultrafiltrátu po MEPS +10 µl směsi (EV 5 ng/ml + EV IS 100 ng/ml )	90 µl 75% ACN +10 µl směsi (EV 5 ng/ml + EV IS 100 ng/ml)
<b>1 ng/ml</b>		
230µl ultrafiltrátu +10µl EV 25 ng/ml +10 µl EV IS 25 ng/ml	90µl ultrafiltrátu po MEPS +10 µl směsi (EV 10 ng/ml + EV IS 100 ng/ml )	90 µl 75% ACN +10 µl směsi (EV 10 ng/ml + EV IS 100 ng/ml)
<b>10 ng/ml</b>		
230µl ultrafiltrátu +10µl EV 250 ng/ml +10µl EV IS 250 ng/ml	90µl ultrafiltrátu po MEPS +10 µl směsi (EV 100 ng/ml + EV IS 100 ng/ml )	90 µl 75% ACN +10 µl směsi (EV 100 ng/ml + EV IS 100 ng/ml)
<b>100 ng/ml</b>		
230µl ultrafiltrátu +10µl EV 2,5 µg/ml +10 µl EV IS 250 ng/ml	90µl ultrafiltrátu po MEPS +10 µl směsi (EV 1 µg/ml + EV IS 100 ng/ml )	90 µl 75% ACN +10 µl směsi (EV 1 µg/ml + EV IS 100 ng/ml)

Tab. 5: Příprava vzorků pro kontrolu kvality.

## 5. Výsledky a diskuze

---

### 5.1 Optimalizace podmínek MEPS extrakce

Pro nalezení vhodného extrakčního postupu bylo nutné optimalizovat výběr sorbentu, elučního a promývacího činidla a jejich objemy. Optimalizace jednotlivých kroků byla nejprve provedena na roztok směsi standardů a poté byl daný postup ověřen na obohacené reálné matrici. Při práci s biologickým vzorkem bylo nutné extrakt s analytem přefiltrovat, aby nebyla zanesena chromatografická kolona. Testovaným biologickým materiálem byl ultrafiltrát ledvin. Mikroextrakce tuhým sorbentem byla použita z důvodu omezeného množství biologického vzorku, úprava pomocí konvenční SPE by vyžadovala větší objem vzorku.

#### 5.1.1 Výběr vhodného sorbentu a elučního činidla

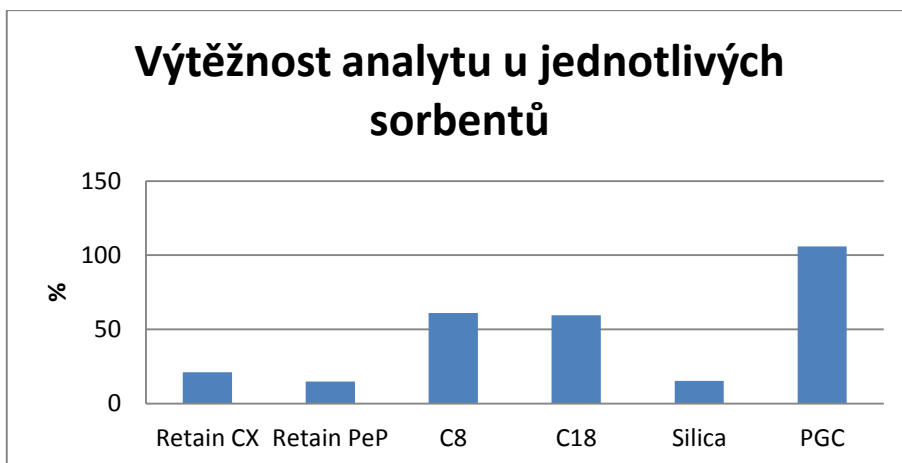
Pro zachycení analytu bylo nutné zvolit vhodný MEPS sorbent. Celkem bylo testováno šest druhů sorbentů: Retain CX, Retain PeP, Silica, C8, C18 a PGC. Vhodnost sorbentu byla hodnocena na základě výtěžnosti analytu. Testování sorbentu bylo provedeno na vodném roztoku entekaviru o koncentraci 50 ng/ml. Aplikováno bylo vždy 50 µl vzorku a eluce provedena 100 µl elučního činidla. Krok promytí sorbentu byl vynechán. Jako eluční činidlo byly testovány roztoky obsahující různý poměr acetonitrilu a vody v rozmezí 50 – 100 % acetonitrilu. Také byl testován vliv přídavku amoniaku do elučního činidla.

Nejprve byla zkoušena jehla Retain CX a jako eluční činidlo byl použit roztok 100 % ACN, 75 % ACN a (H<sub>2</sub>O/5 % NH<sub>4</sub>OH v ACN) v poměru 5:95 (v:v). V případě elučního činidla s podílem hydroxidu amoného bylo nutné provést odpaření eluátu do sucha a následné rozpuštění ve 100 µl mobilní fáze. Tento sorbent nebyl dále testován, protože výtěžnost analytu, ani pro jediné eluční činidlo nepřesáhla 21%. Příčinou byl nízký záchyt analytu na sorbentu. U jehly Retain PeP s polymerním sorbentem, který je vhodný pro polární a středně polární látky byl použit roztok 75 %, 85 % a 100 % ACN

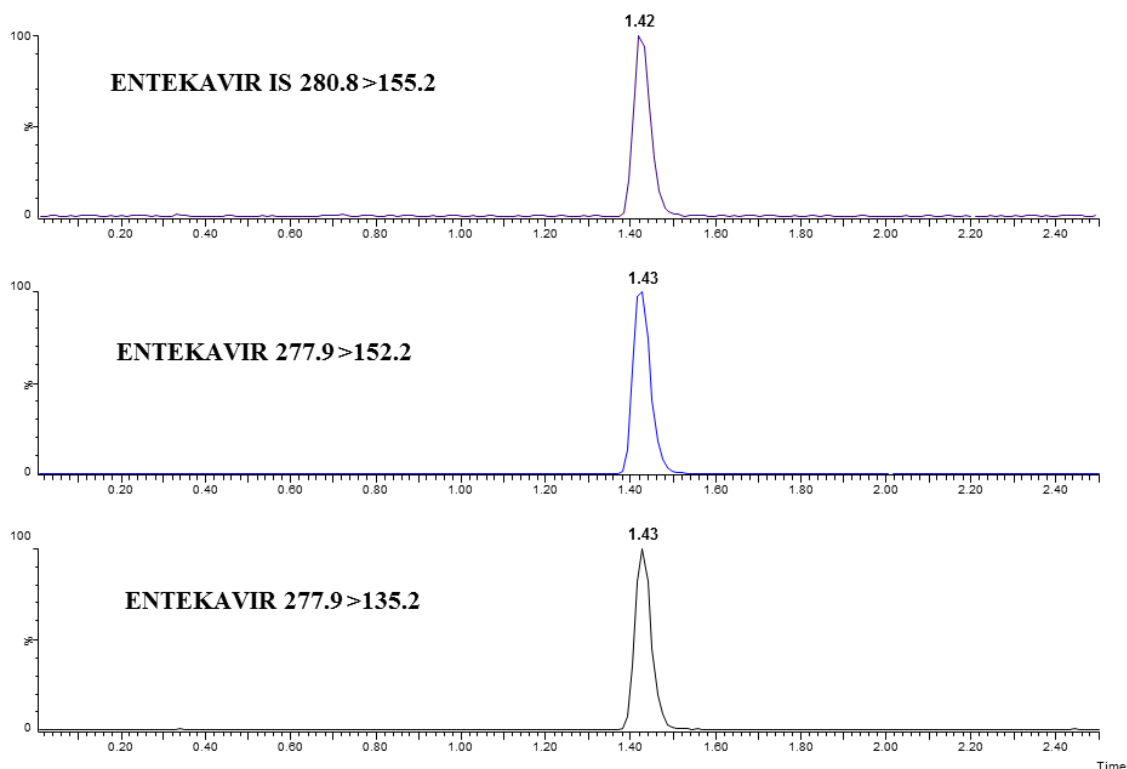
ve vodě jako eluční činidlo. Ale ani tento sorbent nebyl vhodný pro další měření, protože nedocházelo k záchytu analytu a výtěžnost nebyla větší než 15 %. U dalších zkoušených sorbentů tvořených modifikovaným silikagelem s C8 a C18 byla eluce provedena roztoky 75 % a 100% ACN ve vodě. Výtěžnost u obou sorbentů byla srovnatelná, ale o něco vyšší hodnoty výtěžnosti poskytl sorbent C8. Výtěžnost entekaviru pomocí 75 % ACN se pohybovala okolo 60%, což bylo více jak u předešlých sorbentů, ale stále to nebylo optimální. Pro sorbent Silica byla zkoušena eluční řada činidel acetonitrilu ve vodě od 50 % do 100 %. Ale ani u tohoto sorbentu nedocházelo k vyššímu záchytu analytu. Výtěžnost činila přibližně 13 %. Jako poslední byla testována jehla se sorbentem tvořeným porézním grafitickým uhlíkem. Eluční řadu vytvářel opět ACN ve vodě s obsahem ACN od 50 % do 100 %. Zkoušený analyt byl velmi dobře zadržován v sorbentu a při eluci 80 % ACN byla výtěžnost okolo 100 %, viz Tab. 6. Proto se tato jehla se sorbentem PGC použila pro další experimenty a vybrána jako optimální MEPS sorbent. Jako nejvhodnější eluční činidlo byl zvolen roztok 75 % ACN ve vodě.

Eluční činidlo	Výtěžnost analytu u jednotlivých sorbentů (%)					
	Retain CX	Retain PeP	C8	C18	Silica	PGC
NH <sub>4</sub> v AcN	18,33	-	-	-	-	-
ACN 100%	9,36	10,16	41,05	28,63	9,50	45,60
ACN 95%	-	-	49,25	44,28	-	-
ACN 90%	-	-	54,56	47,48	12,34	92,39
ACN 85%	-	13,88	58,70	52,91	-	-
ACN 80%	-	-	56,15	55,63	12,86	106,45
ACN 75%	21,12	13,35	61,14	59,67	-	-
ACN 70%	-	-	-	-	13,79	102,38
ACN 60%	-	-	-	-	15,43	97,30
ACN 50%	-	-	-	-	14,68	95,87

Tab. 6: Výtěžnost analytu pro jednotlivé sorbenty.



Obr. 14: Graf výtěžnosti sorbentů při užití nejvhodnějšího elučního činidla pro daný sorbent.



Obr. 15 Chromatogram standardu entekaviru o koncentraci 100 ng/ml.

### 5.1.2 Optimalizace promývacího činidla

Optimalizace promývacího činidla, sloužícího k odstranění balastních látek, byla prováděna na kolonce se sorbentem PGC. Vzorek o objemu 100  $\mu$ l byl eluován 100  $\mu$ l

75 % ACN ve vodě. Testovány byly tyto promývací činidla: voda, 5 % ACN a 10% ACN ve vodě. Základním předpokladem bylo ověřit, zdali nedochází k vymytí analytu ze sorbentu. Již při nízké koncentraci ACN (5 %) docházelo k nežádoucímu vymytí analytu, proto byla zvolena voda jako nejvhodnější promývací činidlo. Promytí bylo provedeno 2 x 100 µl vody, byl testován i jiný objem promývacího činidla, ale to nemělo na hodnotu výtěžnosti a matricových efektů vliv.

Promývací roztok (100 µl)	Výtěžnost analytu (%)
voda	100,12
5 % ACN	94,71
10 % ACN	62,9

Tab. 7: Vliv typu promývacího činidla na výtěžnost analytu.

### 5.1.3 Optimalizace objemu vzorku

Optimalizace objemu vzorku byla provedena dle optimálního postupu, tedy sorbent PGC, eluční činidlo roztok 75 % acetonitrilu ve vodě o objemu 100 µl, promytí 2x 100 µl vody. Optimalizace objemu vzorku byla nejprve provedena na standartním roztoku EV a následně na reálné matici. Testovaný objem vzorku byl 50 µl nebo 100 µl.

	Objem vzorku	Výtěžnost (%)
Standartní roztok	100 µl	103,46
	50 µl	106,23
Ultrafiltrát	100 µl	56,39
	50 µl	80,93

Tab. 8: Výtěžnost analytu u různých objemů vzorku.

Jak je patrné z Tab. 8 bylo vhodnější užití menšího objemu vzorku. Přestože výtěžnost analytu ze standartního roztoku se nelišila pro 50  $\mu$ l a 100  $\mu$ l, u reálné matrice byl vliv objemu vzorku velmi výrazný. Snížená výtěžnost při použití ultrafiltrátu byla pravděpodobně způsobena interferencí matrice a sorbentu, což způsobilo nižší záchyt analytu.

### 5.1.4 Shrnutí poznatků

Úkolem bylo vyvinout rychlou a efektivní metodu přípravy vzorku využívající malé objemy vzorků i rozpouštědel. Jako optimální byl zvolen následující MEPS postup:

Sorbent MEPS - PGC		
Postup MEPS		
Krok	Objem	čínidlo
1. kondicionace	3x100 $\mu$ l	100% ACN
2. kondicionace	3x100 $\mu$ l	voda
vzorek	50 $\mu$ l	vzorek
promytí	2x100 $\mu$ l	voda
eluce	100 $\mu$ l	75% ACN
promytí	100 $\mu$ l	75% ACN
promytí	100 $\mu$ l	100% ACN
promytí	100 $\mu$ l	voda

Tab. 9: Optimální postup MEPS extrakce.

## 5.2 Validace metody pro stanovení entekaviru

### 5.2.1 Opakovatelnost metody

Opakovatelnost metody byla ověřena na třech koncentračních hladinách: 100, 10 a 1 ng/ml v sérii deseti po sobě jdoucích měření, které probíhaly za stejných podmínek.

Vhodnost systému byla hodnocena jako RSD (%) retenčních časů a ploch píku. Opakovatelnost retenčních časů byla 0,0 % a opakovatelnost ploch píků byla < 5,2 %. V Tab. 10 jsou uvedeny výsledky měření.

Koncentrace (ng/ml)	Průměr plochy píku	SD	RSD (%)	Průměr ret. času	SD	RSD (%)
100	17881	296,4	1,7	1,4	0,0	0,0
10	1746	40,8	2,3	1,4	0,0	0,0
1	176	9,2	5,2	1,4	0,0	0,0

Tab. 10: Opakovatelnost retenčních časů a ploch píku.

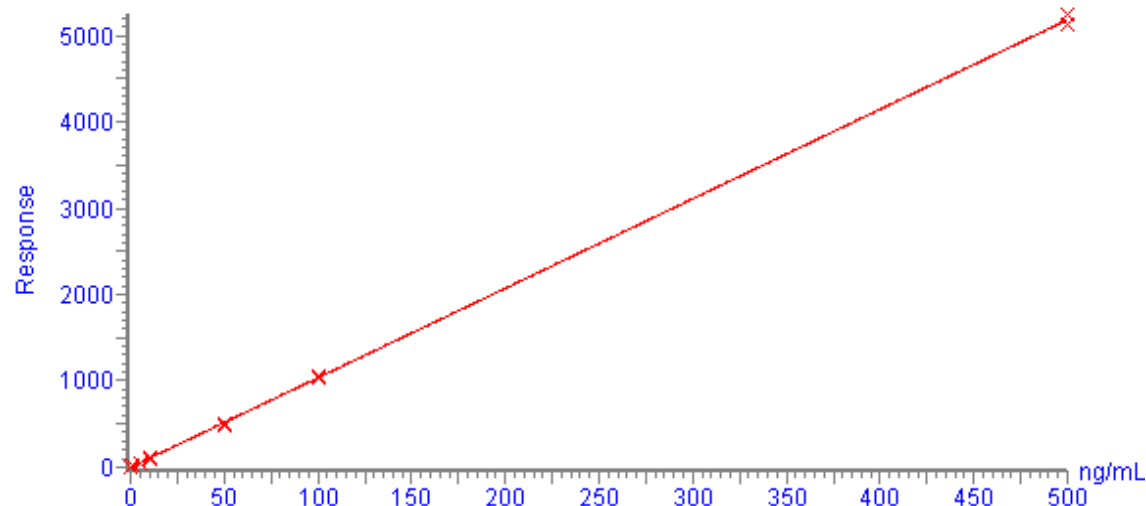
### 5.2.2 Linearita a citlivost metody

Linearita byla ověřena jak u standardní, tak matricové kalibrační křivky. Korelační koeficient byl použit k jejímu hodnocení. Standardní kalibrační křivka měřená v rozsahu koncentrací 0,1 – 500 ng/ml nabývala hodnoty korelačního koeficientu 0,9998. U matricové kalibrační křivky byla měřená koncentrace v rozsahu 0,5 – 500 ng/ml s korelačním koeficientem 0,9997. Citlivost metody vyjádřená LOD a LOQ byla vyhodnocena pomocí poměru S/N, kdy limit detekce je trojnásobkem a limit kvantifikace desetinásobkem poměru signálu k šumu.

	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	$r^2$	Rovnice kalibrační křivky
standardní kal. křivka	1,5	0,5	0,9998	$y=10,372x-3,05396$
matricová kal. křivka	0,3	1	0,9997	$y=9,685x-8,13294$

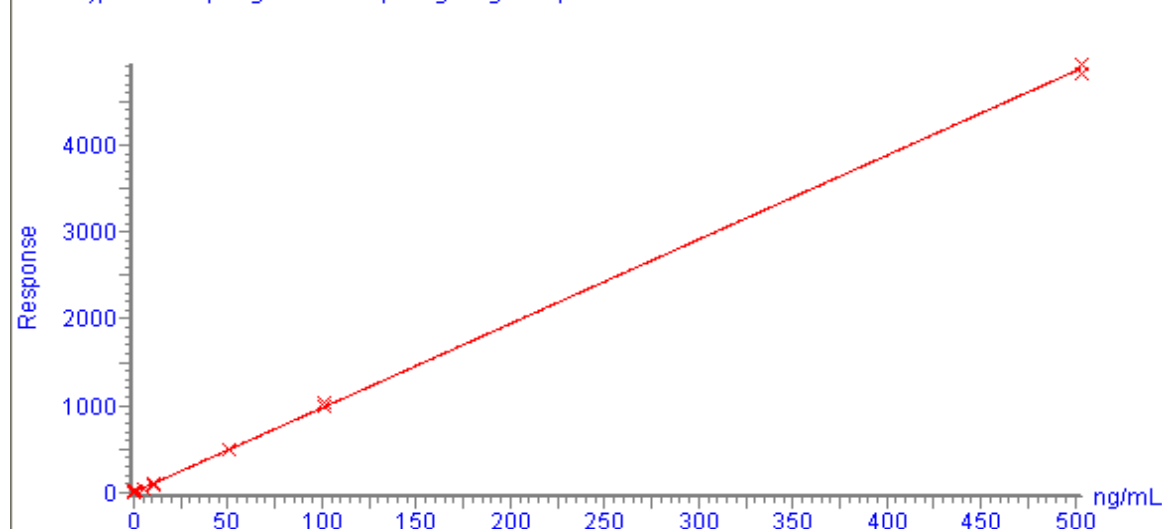
Tab. 11: Vyhodnocení kalibračních křivek.

Compound name: ENTECAVIR  
Correlation coefficient:  $r = 0.999905$ ,  $r^2 = 0.999810$   
Calibration curve:  $10.3726 * x + -3.05396$   
Response type: Internal Std (Ref 2), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Obr. 16: Standardní kalibrační křivka

Compound name: ENTECAVIR  
Correlation coefficient:  $r = 0.999887$ ,  $r^2 = 0.999773$   
Calibration curve:  $9.68579 * x + 8.13294$   
Response type: Internal Std (Ref 2), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Obr. 17: Matricová kalibrační křivka



### 5.2.3 Správnost a přesnost metody

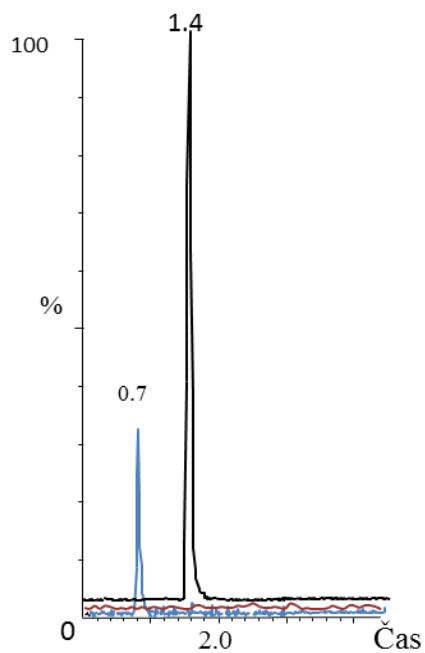
Správnost a přesnost byla hodnocena ve třech koncentračních hladinách + LLOQ a ve třech opakováních. Správnost by se dle směrnice neměla přesahovat hodnotu  $\pm 15\%$  a u LLOQ  $\pm 20\%$ . Pro koncentraci entekaviru 5 ng/ml byla nejvyšší hodnota a to 106,33 %. Přesnost byla stanovena pomocí relativní směrodatné odchylky a dosahovala hodnot nižších než 4,5 %, což vyhovuje ICH směrnici. V Tab. 12 jsou uvedeny jednotlivé hodnoty.

Koncentrace (ng/ml)	Výtěžnost (%)	Přesnost (RSD %)	Matricové efekty (%)
100	97,27	1,25	102,16
10	100,26	3,77	99,79
1	107,73	4,49	96,88
0,5	106,33	1,86	101,12

Tab. 12: Výsledky jednotlivých validačních parametrů pro jednotlivé koncentrace.

### 5.2.4 Matricové efekty

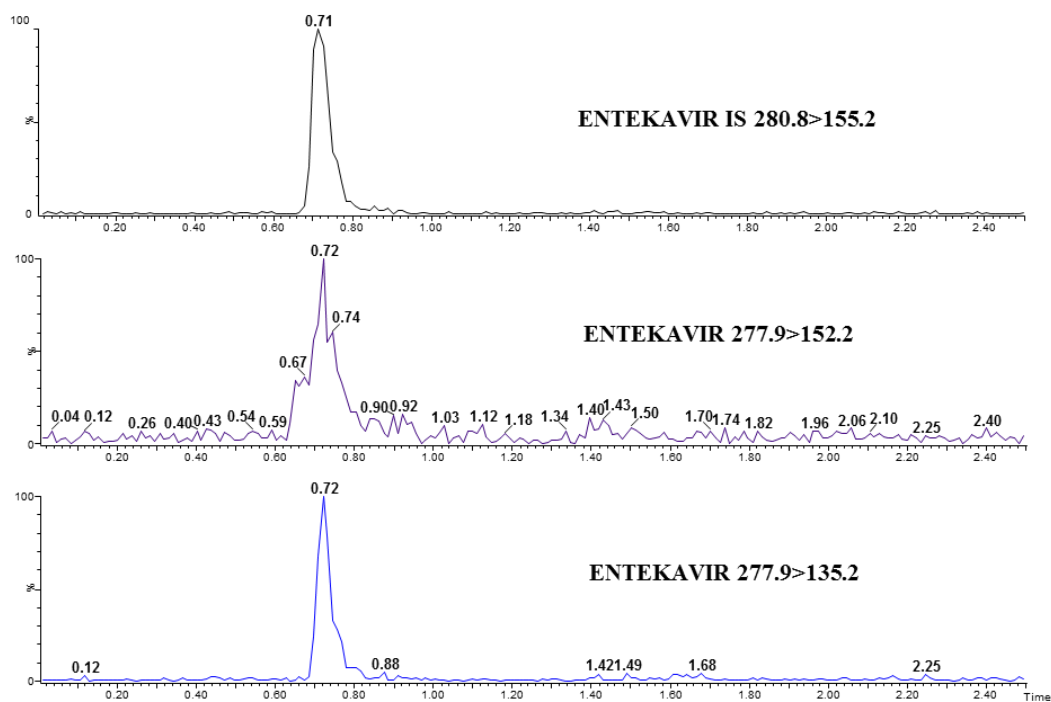
Matricové efekty byly určeny pomocí post-extrakčního přidavku a post-kolonové infuze. U post-kolonové infuze byly porovnány chromatogramy standardu, vzorku plasmy po MEPS a mobilní fáze. Při této metodě nebylo pozorováno ovlivnění analýzy matricovými efekty, protože byl patrný pouze pík v čase 0,7 min, který neinterferuje s píkem entekaviru v retenčním čase 1,4 min. Kvantifikace matricových efektů byla provedena pomocí metody post-extrakčního přidavku a dosahovaly hodnot  $\pm 4\%$ . Z výsledků je patrné, že analýza nebyla ovlivněna složkami matrice. Hodnoty matricových efektů jsou uvedeny v Tab. 12.



Obr. 18: Chromatogram post-kolonové infuze. Modrá – vzorek ultrafiltrátu plasmy po MEPS extrakci, černá – standard EV, červená – mobilní fáze.

### 5.2.5 Selektivita

Selektivita metody je definována jako schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti matrice. Byla stanovena vizuálně, pomocí chromatogramu blanku ultrafiltrátu plasmy, který je znázorněn na Obr. 19. Bylo ověřeno, že v retenčním čase entekaviru (1,4 min) se neeluuje žádný jiný analyt.



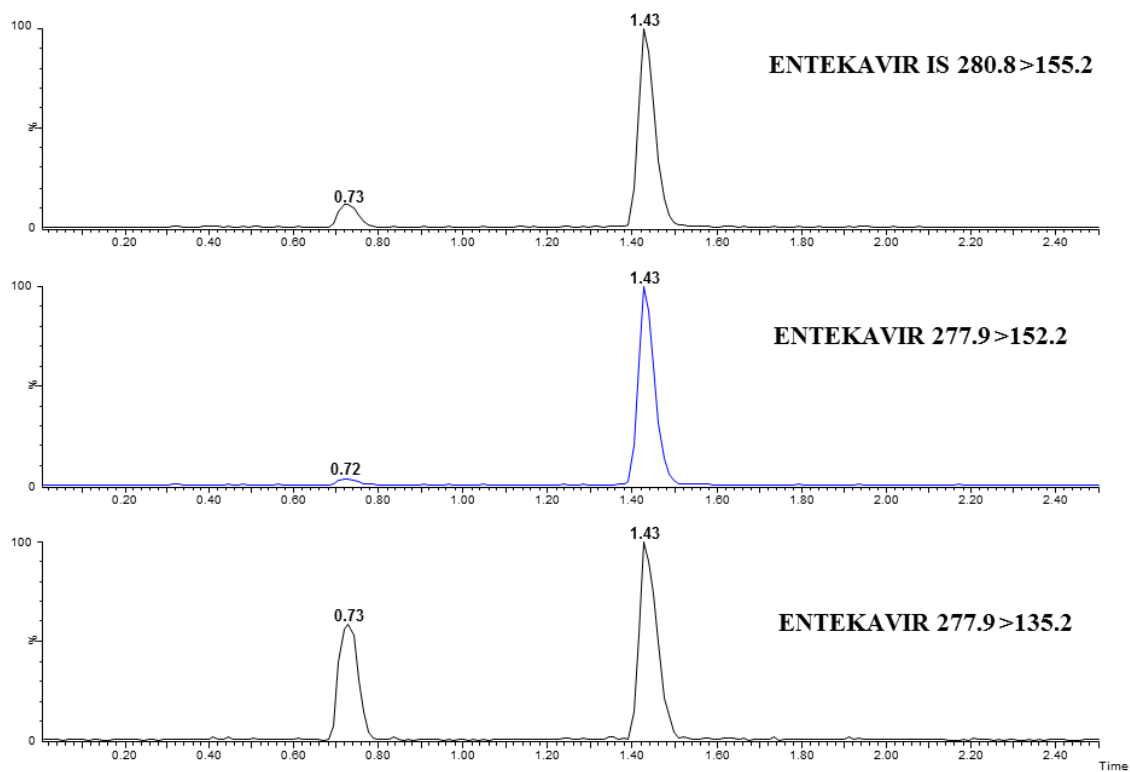
Obr. 19: Chromatogram blank ultrafiltrátu. V retenčním čase entekaviru se neeluje žádný jiný analyt

### 5.3 Aplikace na reálné vzorky

Validovaná MEPS-UHPLC-MS/MS metoda byla využita pro analýzu ultrafiltrátu plasmy. Naměřené výsledky sloužily jako doplňující informace k dříve změřeným vzorkům koncentrace entekaviru v plasmě a moči potkana a umožnily popsat farmakokinetiku a exkreci entekaviru. V Tab. 13 jsou uvedeny hodnoty koncentrací entekaviru v jednotlivých vzorcích ultrafiltrátu plasmy.

Vzorek	koncetrace (ng/ml)	Vzorek	koncetrace (ng/ml)	Vzorek	koncetrace (ng/ml)
33	5	41	5,9	49	32,65
35	5,25	43	3,15	50	38,95
37	6,4	45	6,8	51	30,55
39	4,65	47	5,65	52	21,35

Tab. 13: Koncentrace jednotlivých biologických vzorků.



Obr. 20: Chromatogram reálného vzorku s číslom 50.

## 6. Závěr

---

Byla vyvinuta a optimalizována MEPS metoda pro stanovení entekaviru z ultrafiltrátu plasmy s využitím izotopicky značeného vnitřního standardu entekaviru. Nastavení LC-MS bylo převzato z diplomové práce Tomáše Gottvalda. Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat postup úpravy ultrafiltrátu plasmy pomocí mikroextrakce tuhým sorbentem. Nejvhodnějším sorbentem pro extrakci se stal porézní grafitický uhlík. Postup MEPS se skládá z kondicionace sorbentu pomocí acetonitrilu a vody, následuje extrakce 50  $\mu$ l vzorku a promytí vodou. Na závěr probíhá eluce entekaviru 100  $\mu$ l roztoku acetonitrilu a vody v poměru 75:25 (v:v). Nově vyvinutá extrakční metoda umožnila použití nižších objemů rozpouštědel a vzorku, při zachování správnosti a přesnosti.

Metoda byla validována. Ověřena byla zejména linearita, přesnost, správnost, selektivita a matricové efekty vyvinuté metody. Metoda byla lineární v rozsahu 0,5 – 500 ng/ml a limit kvantifikace byl stanoven 0,5 ng/ml v biologické matrici. Hodnoty přesnosti byly nižší než 4,5 % a správnosti menší než 106 %. Kvantitativní hodnocení matricových efektů bylo provedeno pomocí post-extrakčního přídatku a hodnoty nepřesáhly 4 %. Po validaci MEPS-UHPLC-MS/MS metody pro stanovení entekaviru v ultrafiltrátu ledvin byla metoda aplikována na sérii reálných vzorků.

## 7. Seznam použitých zdrojů

---

- [1] <http://www.waters.com> (28.12.2012)
- [2] <http://hplc.cz/> (28.12.2012)
- [3] Klimeš J. a kol.: *Kontrola léčiv I.*, Karolinum, Praha (2002)
- [4] <http://kinardf.people.cofc.edu/221LabCHEM/CHEM221L%20HPLC%20Determination%20of%20Aspirin%20and%20Salicylic%20Acid.htm> (29.8.2013)
- [5] Megan S. Lim, Kojo Elenitoba-Johnson, *Laboratory Investigation* 84, 1227–1244, (2004)
- [6] Muthu Vadivel, R.Suresh Kumar, A.Tamil Selvan, R.Suthakaran, *Pharmatutor-art*, 1581
- [7] <http://chromservis.cz/group/uhplc?lang=CZ> (9.1.2013)
- [8] Karolína Beešová, Helena Pluháčková, Sylvie Běláková, Kateřina Vaculová, Renata Mikulková, Jaroslava Ehrenbergerová, Natálie Březinová, *Chem. Listy* 106, 672 – 676, (2012)
- [9] Lucie Nováková, Michal Douša a kolektiv: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I a II*, Praha (2013)
- [10] Jandera P., *Chemagazin* 2, 8-9, (2011)
- [11] Vacek J., Onofrejová L., Klejdus B., Kubáň V.: *Chem. Listy* 103, 381-385, (2009)
- [12] <http://www.orgchem.cz/roithova/cz/veda-a-vyzkum/> (26.3.2013)
- [13] <http://holcapek.upce.cz> (19.1.2013)
- [14] Holčapek M., Jandera P.: *Chem. listy* 92, 278-286, (1998)
- [15] <http://chromservis.cz/item/gc-ms-tof-description?lang=CZ> (28.8.2013)
- [16] Ch. Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Wiley, USA, (2007)
- [17] <http://www.okbpavlin.cz/prirucka/JVAXG.htm> (27.3.2013)
- [18] C. Dass, Recent developments and applications of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Curr. Org. Chem.* 3, 193 – 209, (1999)
- [19] [http://holcapek.upce.cz/teaching/MS\\_2012/MS02\\_03\\_Ionizacni\\_techniky.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS02_03_Ionizacni_techniky.pdf) (27.3.2013)

- [20] Chunfeng Duan, Zheng Shen, Dapeng Wu, Yafeng Guan, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30, 1568-1574, (2011)
- [21] Lucie Nováková, Hana Vlčková, *Analytica Chimica Acta* 656, 8-35, (2009)
- [22] Chromý V.: *Bioanalytika: Analytická chemie v laboratorní medicíně*. Brno: Masarykova Univerzita (2002), 267
- [23] Karlíček R. a kolektiv, *Analytická chemie pro farmaceuty*, nakladatelství Karolinum, Praha (2005), 265-281
- [24] Klouda P.: *Moderní analytické metody*, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava, 43-49, (2003)
- [25] F. Pena-Pereira et al. / *Spectrochimica Acta Part B* 64, 1-15, (2009)
- [26] Ali Sarafraz-Yazdi, Amirhassan Amiri, *Trends in Analytical Chemistry* 29, 1-14, (2010)
- [27] [http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007\\_s00604-011-0612-5-0](http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007_s00604-011-0612-5-0) (31.1.2013)
- [28] María Ramos Payan, Miguel Ángel López Bello, Rut Fernández-Torres, Mercedes Villar Navarro, Manuel Callejón Mochón, *Talanta* 79, 911-915, (2009)
- [29] Sergiane Souza Caldas; Fábio Ferreira Gonçalves; Ednei Gilberto Primel; Osmar Damian Prestes; Manoel Leonardo Martins; Renato Zanella, *Química Nova* 34, (2011)
- [30] M.S. El-Shahawi, *Trends in Analytical Chemistry* 44, 12-24, (2013)
- [31] H. Kataoka, *Trends Anal. Chem.* 22, 232, (2003)
- [32] K.C. Saunders, A. Ghanem, H.W. Boon, F. Hilder, P.R. Haddad, *Anal. Chim. Acta* 652, 22, (2009)
- [33] *Guide to Solid Phase Extraction*. Bulletin 910, Sigma-Aldrich Co., 12, (1998)
- [34] [http://www.crawfordscientific.com/Silicycle\\_SPE.htm](http://www.crawfordscientific.com/Silicycle_SPE.htm) (20.2.2013)
- [35] Kataoka H., Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application. *Anal. Bioanal. Chem.* 373, 31-45, (2002)
- [36] Vas G., Vékey K.: Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass. Spectrom.* 39, 233-254, (2004)
- [37] Kirchner M., Matisová E.: *Chem. Listy* 98, 396, (2004)
- [38] Popp P., Bauer C., Wennrich L.: *Anal. Chim. Acta* 1, 436, (2001)

- [39] Migaku Kawaguchi, Rie Ito, Koichi Saito, Hiroyuki Nakazawa, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40, 500-508, (2006)
- [40] Mohamed Abdel-Rehim, *J. of Chromatography B* 801, 317-320, (2004)
- [41] Mohamed Abdel-Rehim, *Journal of Chromatography A* 1217, 2569-2580, (2010)
- [42] Petr Sadílek, Dalibor Satinský, Petr Solich, *Trends in Analytical Chemistry* 26, 375-384, (2007)
- [43] E. Caro, RM Marce, F. Borrull, *Trends in Analytical Chemistry* 25, 143-154, (2006)
- [44] Chiyang On, Yuanyuan Dlouhá, Junlan Pan, Kean Li, Feng Liu, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70, 133-150, (2007)
- [45] Klapková E, Uřinová R, Průša R, *Klinická biochemie a metabolismus* 19, 5-8, (2011)
- [46] Paul J. Taylor, *Clinical Biochemistry* 38, 328-334, (2005)
- [47] Renáta Húková, Michale Kirchner, Eva Matisová, *Chem. Listy* 101, 1020–1027, (2007)
- [48] Lucie Nováková, Tomáš Gottvald, Hana Vlčková, František Trejtnar, Jana Mandíková, Petr Solich, *Journal of Chromatography A* 1259, 237-243, (2012)
- [49] Duxi Zhang, Yunlin Fu, Jane P. Gale, Anne F. Aubry, Mark E. Arnold, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 49, 1027-1033, (2009)
- [50] FengJuan, Zhao, Hong Tang, QingHua, Zhang, Jin Yang, Andrew K. Davey, Jiping Wang, *Journal of Chromatography B* 881– 882, 119– 125, (2012)
- [51] BR Challa, BZ Awen, BR Chandu, S. Rihanaparveen, *Journal of Chromatography B* 879, 769, (2011)
- [52] S. James Matthews, *Clinical Therapeutics* 28, 185-205, 2006
- [53] Committee for medicinal products for human use (CHMP), *Guideline on validation of bioanalytical methods*. EMEA, (2010)
- [54] International Conference on Harmonization (ICH), Q2R1: Text on Validation of Analytical Procedures. US FDA Federal Register, (2003)