

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra analytické chemie

**Vývoj vhodné metody přípravy vzorku a chromatografické separace
pro stanovení vybraných perorálních antidiabetik metodou HPLC/MS**

Diplomová práce

Autor: Mgr. Veronika Černínová
Studijní program: N 1407 Analytická chemie
Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Olomouc 2017

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo vyvinout vhodný postup úpravy vzorků krevního séra, tak aby v nich bylo možné metodou HPLC/MS stanovit antidiabetika různých skupin.

Teoretická část popisuje všeobecné postupy úprav biologických vzorků od jednodušších precipitačních metod, přes již už méně používanou extrakci kapalinou, až po dnes velmi oblíbenou extrakci tuhou fází. Extrakci tuhou fází a jejím obměnám je věnována značná část této kapitoly. Dále je zde krátce popsána problematika onemocnění Diabetes mellitus a perorálních antidiabetik, jakožto léčiv využívaných k léčbě II. typu této choroby. V této kapitole je také zmíněno několik příkladů úprav biologických vzorků s následným stanovením biologicky aktivních látek či přímo antidiabetik.

Experimentální část je věnována instrumentaci, nastavení parametrů chromatografické separace i parametrů pro hmotnostní spektrometrii. Také jsou zde uvedeny postupy příprav roztoků standardů a vzorků.

Kapitola Výsledky a diskuze obsahuje detailnější postupy hledání vhodných podmínek chromatografické separace včetně ukázek chromatogramů. Také jsou zde zmiňovány podmínky ionizace a fragmentace molekul, včetně fragmentačních spekter jednotlivých stanovovaných antidiabetik. V této části je popsána validace metody a vyhodnocení modelových vzorků, včetně zhodnocení dvou různých postupů úpravy vzorků.

Summary

The aim of this diploma thesis was development of a suitable procedure for determination of antidiabetic drugs by HPLC/MS method in blood serum sample.

Theoretical part of this thesis describes common procedures for the pretreatment of biological samples by simple protein precipitation, liquid-liquid extraction and very popular solid phase extraction method. A substantial part of this chapter deals with the solid phase extraction and its modifications. Diabetes and its complications is described in this chapter, too. Type 2 diabetes is treated by peroral antidiabetic drugs which are also mentioned here as well as a few examples describing biological sample preparation for subsequent determination of these drugs.

Experimental chapter is devoted to the instrument and experimental settings, chromatographic separation parameters and mass spectrometry parameters. Sample procedures are described there.

The Results and discussion chapter contains more detailed description of the development of suitable chromatographic separation conditions and also contains chromatogram samples. Ionization and fragmentation conditions are listed here, including fragmentation spectra of all used antidiabetics. Results of two methods of sample pretreatment, methods validation and model sample analysis results are presented here.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 21. 4. 2017

.....

Podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Petru Fryčákovi, Ph.D. za odborné vedení, obětavou pomoc a cenné připomínky při řešení a zpracování daného úkolu. Také bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu.

Tato práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2016_016, IGA_PrF_2017_020).

Obsah:

1.	ÚVOD	8
2.	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1.	Použití HPLC/MS ke stanovení léčiv v biologických vzorcích	9
2.2.	Metody přípravy biologických vzorků	10
2.2.1.	Precipitace proteinů (PPT)	10
2.2.2.	Extrakce kapalina - kapalina (LLE)	13
2.2.3.	Extrakce tuhou fází (SPE)	15
2.2.3.1.	SPE extrakční módy	16
2.2.3.1.1.	Nepolární sorbent	16
2.2.3.1.2.	Polární sorbent	17
2.2.3.1.3.	Sorbenty pro iontovou výměnu	18
2.2.3.1.4.	Sorbenty pro smíšený mód	18
2.2.3.2.	Automatizovaná SPE extrakce	19
2.2.3.3.	On-line SPE	19
2.3.	Stanovení léčiv v biologických vzorcích pomocí HPLC/MS	21
2.4.	Diabetes mellitus	30
2.5.	Perorální antidiabetika	32
2.5.1.	Deriváty sulfonylmočoviny	33
2.5.1.1.	Gliclazid	33
2.5.1.2.	Glipizid	34
2.5.1.3.	Glibenklamid	34
2.5.1.4.	Glimepirid	35
2.5.2.	Nesulfonylmočovinová sekretagoga	35
2.5.3.	Léky zvyšující citlivost k inzulínu	36
2.5.3.1.	Biguanidy	36
2.5.3.1.1.	Metformin	36
2.5.3.2.	Tiazolidindiony	37
2.5.3.3.	Inhibitory α -glukosidáz	38
2.5.3.4.	Inhibitory dipeptidyl peptidázy 4	38
2.5.3.4.1.	Sitagliptin	38
2.6.	Případy stanovení perorálních antidiabetik pomocí HPLC/MS	39
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44

3.1.	Přístroje a chemikálie	44
3.2.	Pracovní postup pro HPLC/MS a chromatografickou separaci	45
3.3.	Postup úpravy vzorků	46
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
4.1.	Chromatografická separace a hmotnostně spektrofotometrická data	48
4.2.	Vývoj metody úpravy vzorků krevního séra	54
4.3.	Validace metody	58
4.4.	Vyhodnocení analýz vzorků	65
5.	ZÁVĚR	70
6.	ZDROJE.....	72
7.	SEZNAM ZKRATEK	76

1. ÚVOD

V dnešní době, kdy farmaceutický průmysl produkuje celosvětově léky za více než jeden bilión amerických dolarů ročně (2014) ¹ a stále se snaží objevovat nové potencionální kandidáty k další výrobě, musí být současně hledány i analytické metody k jejich stanovení.

Současně s vývojem léčiv se tedy vyvíjí i analytické metody, na které jsou ze strany kontrolních úřadů kladeny vysoké požadavky. Schopnost detekce a její citlivosti nejen k samostatné léčivé látce, ale i možných nečistot obsažených v léčivu je zásadní. Nicméně od návrhu struktury léčivé látky k jeho schválení k prodeji je nutné, aby tato látka splnila mnoho kritérií, které vyžadují použití analytických metod a to nejen pro stanovení samostatné látky v rozpouštědle, ale i ve více složitých biologických systémech. V těchto systémech je nutné detekovat a určit koncentraci nejen látky samotné, ale i jejich metabolitů, což nebývá snadné díky komplexnímu složení biologických vzorků.

Antidiabetika jsou léky k léčbě onemocnění zvaném *Diabetes mellitus* II. typu, kterým v současnosti trpí stále více lidí (v ČR až 800 000)². Základním projevem cukrovky je hyperglykemie, kdy se tímto pojmem označuje zvýšená hladina glukózy v krvi, která je za normálního stavu organismem přísně kontrolována. Hyperglykemie je důsledkem nedostatečné produkce hormonu inzulínu nebo jeho nedostatečným účinkem (tzv. inzulínová rezistence), případně kombinací obou zmíněných důvodů ². Inzulínová rezistence se tedy léčí pomocí perorálních antidiabetik, které různými mechanismy snižují hladinu glukózy v krvi ³.

Cílem této práce bylo vyvinout metodu pro úpravu vzorku krevního séra a následnou HPLC/MS metodu pro stanovení obsahu pěti zástupců z řad antidiabetik (Metformin, Glibenklamid, Glimepirid, Sitagliptin, Gliclazid).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Použití HPLC/MS ke stanovení léčiv v biologických vzorcích

Stále rychlejší vývoj léčiv vyžaduje neustálé zdokonalování analytických metod a zkracování doby analýzy. Současně se dbá na to, aby postupy byly co nejekologičtější a co nejméně nákladné. Bioanalytické metody jsou používány ke kvantifikaci léčiv a jejich metabolitů ve fyziologických matricích. Tyto metody bývají uplatňovány jak v oblasti lidské klinické farmakologie, tak nehumánní farmakologie a toxikologie, kde slouží k evaluaci a interpretaci bioekvivalenčních, farmakokinetických a toxikologických studií⁴.

Donedávna byla jednou z neaplikovanějších metod k analýzám léčiv používána kapalinová chromatografie spojená s UV/VIS detekcí, nicméně v současné době je tento detektor stále častěji nahrazován detektorem hmotnostním. Biologické vzorky, ať už tkáň či tekutiny, jsou velmi komplexní, a proto je spojení separační techniky a specifického detektoru velmi výhodné. Hlavní výhodou hmotnostního detektoru je, že lze současně identifikovat analyt na základě jeho molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů a současně lze analyt kvantifikovat⁵.

Aby mohlo být dané léčivo, nebo léčiva stanoveny v určitém biologickém vzorku, musí se nejprve vyvinout analytická metoda. Vývoj analytického postupu obnáší vypracování postupu, který umožní identifikovat a kvantifikovat naše cílové molekuly v biologické matrici. V procesu vývoje analytické metody je zahrnuto vzorkování, příprava samotného vzorku, separace, detekce a konečně evaluace výsledků⁶. Posouzení, zda je metoda schopná poskytovat objektivní důkazy a je specifická k zamýšlenému použití, slouží *validace*. Vhodnost postupu je posuzována podle několika parametrů: selektivita a specifita, správnost a přesnost, limit detekce a kvantifikace, linearita a rozsah, citlivost a robustnost^{3,7}.

Dalším důležitým parametrem, který se vyhodnocuje je tzv. *recovery* neboli *návratnost*, jenž vyjadřuje efektivitu extrakce analytu. Zde se porovnává odezva detektoru na analyt v čistém rozpouštědle a odezva analytu extrahovaného z biologické matrice. Výsledky by se měly porovnávat na třech koncentračních úrovních (nízké, střední a vysoké) oproti neextrahovým standardům, které reprezentují 100 % návratnost⁶.

Při kvantifikaci analytu ve vzorku se dále bere v potaz tzv. *matricový efekt*, který vzniká vlivem dalších složek přítomných v biologickém vzorku. Krev, plazma,

moč, atd. jsou mnohem komplexnější než jiné matrice, zvláště díky přítomnosti proteinů, solí a organických látek, čímž může docházet k ovlivňování ionizace analytu. Matricový efekt je tedy definován jako změna účinnosti ionizace, která je způsobená koelucí analytu a jiné látky. Matrice může způsobit jak snížení ionizace, tak její zvýšení, což ovlivňuje výsledek analýzy a může vést k chybnému výsledku kvantifikace⁸⁻¹⁰. Klíčem k co nejvýraznějšímu potlačení matricového efektu a také k dosažení co nejnižších kvantifikačních limitů je samotná příprava vzorku. Nejběžnější metody pro přípravy vzorků jsou precipitace proteinů, extrakce kapalina - kapalina či kapalina - pevná fáze¹¹.

2.2. Metody přípravy biologických vzorků

Příprava vzorku předchází veškerým chromatografickým analýzám a optimalizace jejího postupu zůstává hlavní výzvou ke stanovení léčiv a jejich metabolitů v komplexních maticích. Smyslem úpravy vzorku je odstranit interferující složky (např. proteiny, lipidy a soli), zakonzentrovat analyt a převést jej do nejvhodnější formy pro nástřik, separaci a detekci. Jak už bylo řečeno, nejčastěji používané metody jsou extrakce kapalina - pevná fáze (SPE), extrakce kapalina - kapalina (LLE) a proteinová precipitace (PPT), kdy za nejdůležitější postupy pro následné použití LC/MS jsou považovány LLE a SPE^{10,11}.

2.2.1. Precipitace proteinů (PPT)

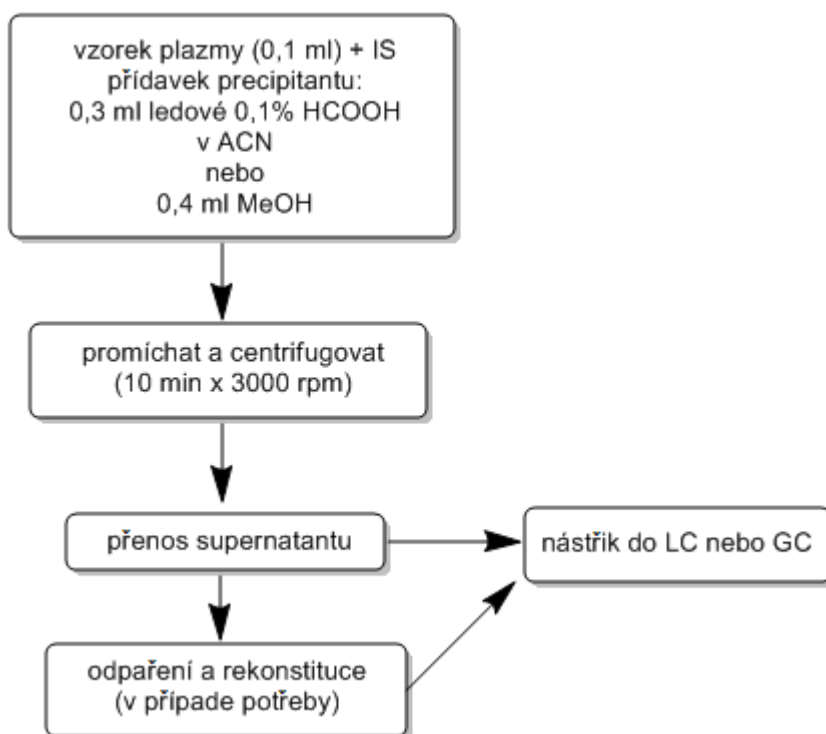
Tato metoda je vhodná pro úpravu vzorků plazmy či krve, které obsahují analyt v relativně vysoké koncentraci. Nejčastěji se pro tuto metodu používají organická rozpouštědla jako methanol, acetonitril či aceton, dále ionty kovů (síran zinečnatý, wolframan sodný) nebo koncentrované roztoky kyselin např. trifluoroctové, trichloroctové, chloristé, atd. Podle použitého precipitačního činidla se liší výsledné pH roztoku vzorku. Při použití vícemnočných solí se výsledné pH roztoku pohybuje kolem hodnoty 7, použijeme-li organické rozpouštědlo pH se bude pohybovat v rozmezí 5,8-10 a naopak při precipitaci kyselinou se pH roztoku vzorku pohybuje kolem 1,4-2,7. Proto se musí brát v potaz stabilita analytu jak při vysokém, tak při nízkém pH.

Při použití jakékoli z výše uvedených precipitačních činidel musí být brána v úvahu možnost nechtěné koprecipitace analytu ^{10, 12}.

Doporučený poměr kyseliny a plazmy je (0,2-0,5):1,0 (v/v) pro dosažení více jak 98 % odstranění proteinů. Při použití organického rozpouštědla je poměr rozpouštědlo/plazma (1,0-4,0):1,0 (v/v) ¹⁰.

Po promíchání a odstředění je supernatant buď přímo použit k analýze nebo zakoncentrován odpařením. Odparek může být následně rozpuštěn v mobilní fázi či její součásti ¹³.

Schéma 1.: obecný postup precipitace při použití organických rozpouštědel ¹⁰



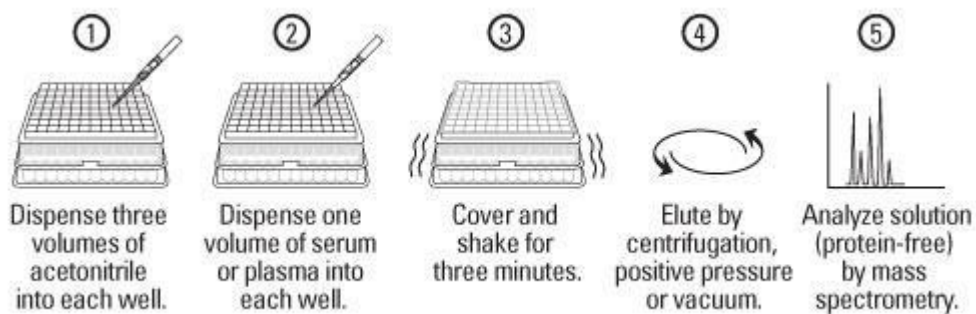
Tato technika úpravy vzorku je jednoduchá, rychlá a podává uspokojivé výsledky. Používá se především tam, kde je zapotřebí nenáročné přípravy vzorků a rychlé interpretace výsledků. Pokud je nutná manipulace s větším množstvím vzorků, jako např. při bionanalýzách ve výzkumných či klinických laboratořích, je manuální příprava velmi časově náročná. Ve snaze učinit tento proces více účinným, rychlejším a automatizovatelným byly vyvinuty 96 - jamkové filtrační desky.



Obrázek 1: 96 - jamková precipitační deska ¹⁴

Tyto desky obsahují tubusy s membránou a jsou připojitelné na vakuovou vývěvu. Znamená to, že po precipitaci proteinů následuje filtrace, která je provedena ve stejné jamce bez centrifugace a přenášení supernatantu. Tyto destičky umožňují precipitaci jak roboticky automatizovanou, tak manuální.

Schéma 2.: Postup práce na 96 - jamkové precipitační desce ¹⁵



Proběhly i studie porovnávající 96 - jamkové destičky s manuální přípravou vzorku a následnou LC-MS analýzou, kdy výsledky vzorků zpracovaných pomocí precipitačních destiček poskytly lepší opakovatelnost (správnost a přesnost). Současně došlo ke zkrácení času přípravy vzorků až 4x, oproti manuální přípravě vzorků ¹⁵.

2.2.2. Extrakce kapalina - kapalina (LLE)

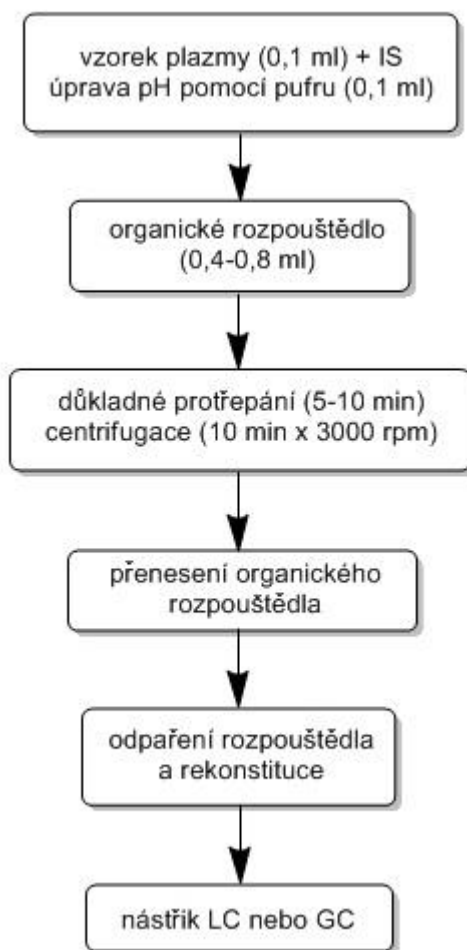
Tato technika byla používána pro přípravu vodných vzorků po mnoho desítek let. LLE spočívá v extrakci analytu z vodného prostředí vzorku (plazma, moč či sérum) do s vodou nemísitelného organického rozpouštědla, a to na základě rozdělovacího poměru D_c . Rozdělovací poměr je dle *Nernstova zákona* vyjádřen poměrem koncentrací v organické fázi (c_1) ke koncentraci analytu ve vodné fázi (c_2).

$$D_c = \frac{c_1}{c_2}$$

Touto metodou lze extrahovat látky ve vysokých i nízkých koncentracích. Pokud je analyt ve vzorku přítomen v nízké koncentraci s dalším množstvím interferujících látek, je jednoduchá extrakce nedostatečná. Tento problém lze řešit zpětnou extrakcí do vodného rozpouštědla pomocí úpravy pH. Analyty jsou extrahovány v nenabitě formě, proto je pro extrakci slabých kyselin a bází, důležitá znalost pH vodného roztoku, pK_a a rozdělovací poměr. Aby byla látka v extrahovatelné formě, tedy jako volná báze či kyselina, je nutné upravit pH tak, aby bylo o 2 jednotky nižší než pK_a pro látky kyselé a o 2 jednotky vyšší než pK_a pro látky bazické. Pro extrakci iontových látek je lepší využít iont-párovou extrakci, kdy se využívá vzniku asociovaných komplexů iontů vzorku s protiiontem opačného náboje^{10, 12, 17}.

Analyt může být následně analyzován či zakoncentrován odpařením organické složky a poté rekonstituován v menším množství rozpouštědla.

Schéma 3.: postup LLE pro vzorky plazmy¹⁰



Hlavní výhodou této techniky je vynikající odstranění solí a makromolekul, ale problémem může být přecházení nežádoucích sloučenin do organické fáze. Dále může při extrakci docházet ke vzniku emulzí a tím ke špatnému oddělení fází. Nevýhodné bylo rovněž používání většího objemu rozpouštědla (1-4 ml), což je dnes řešeno redukcí objemů organického rozpouštědla pod 1 ml^{10, 12}.

Extrakce z kapaliny do kapaliny byla popsána i v 96 - jamkovém, automatizovaném uspořádání. Objem vzorků i rozpouštědel je redukován, stejně jako čas potřebný k přípravě velkého množství vzorků. Vodná a organická fáze jsou v tomto uspořádání odděleny centrifugací^{10, 18}.

2.2.3. Extrakce tuhou fází (SPE)

V dnešní době je SPE nejoblíbenější technikou pro přípravu vzorků, což také dosvědčuje množství jejích modifikací. Obecně je cílem extrakce tuhou fází retence analytu, jeho eluce z kapalného biologického vzorku, odstranění interferujících látek a zakoncentrování analytu¹⁶. Extrakce analytu je založena na principu rozdělování nebo jiné interakce mezi pevnou fází a kapalným vzorkem obsahujícím analyt. Nejdůležitější chemické vlastnosti extrahované látky jsou polarita a hydrofobicita, neboť intermolekulární síly (vodíkové vazby, dipól-dipólový moment, Van der Waalsova síla) se podílejí na retenci. Pro úspěšnou extrakci je důležité, aby byla afinita analytu vyšší k tuhé fázi než k matici vzorku. Nežádoucí interferující sloučeniny lze selektivně odstranit různými rozpouštědly s odlišnou eluční silou.

Dále je podstatných několik parametrů jako je druh stacionární fáze a její množství, stanovení objemu vzorku, který lze nanést, složení a objem promývacích roztoků a samotného elučního rozpouštědla. K retenci vzorku jsou používány kolonky se sorbentem o obsahu 50-200 mg. Sorbentů v dnešní době existuje celá řada, a to od nepolárních C₁₈ a C₈, přes polární (silikagel, kyano, aminopropyl, diol) a iontově výměnné fáze, až po různé polymerní materiály (např. polystyren-divinylbenzen). Výběr stacionární fáze záleží především na chemických vlastnostech analytu a vlastnostech rozpouštědla.

Obecný postup pro SPE se dá popsat ve 4. krocích:

1) Kondicionace sorbentu

- dochází k solvataci funkčních skupin sorbentu, což následně umožňuje jejich interakci se vzorkem

2) Nanesení vzorku

- tomuto kroku předchází vhodná úprava vzorku (výběr vhodného rozpouštědla, úprava pH, či iontové síly), poté dochází k adsorpci analytu na stacionární fázi

3) Odstranění interferujících látek

- používají se rozpouštědla, v nichž je analyt minimálně rozpustný, často je používána voda
- na reverzních sorbentech se používají pufrы s malým podílem organického rozpouštědla
- v iontově výměnném módu je zásadní hodnota pH a iontová síla

4) Eluce analytu

- volba rozpouštědla závisí na druhu sorbentu a metodou následující analýzy (např. pro nepolární sorbent C₁₈ je možné použít MeOH s příměsí octanu sodného)

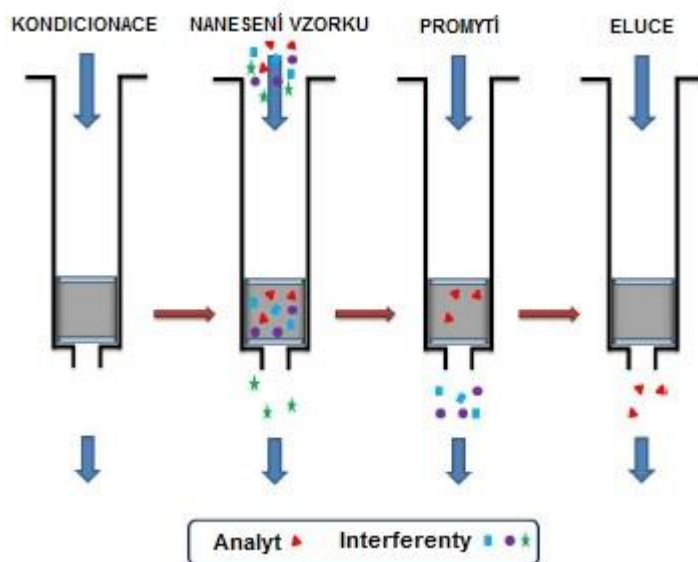


Schéma 4.: Schéma postupu SPE procedury ¹⁹

Mezi hlavní výhody extrakce tuhou fází můžeme zařadit vysokou výtěžnost, nižší spotřebu rozpouštědel ve srovnání s PPT i LLE, možnost zakoncentrování analytu, relativně snadnou automatizaci a možnost přímého tzv. *online* spojení s chromatografickým systémem. Nevýhodou manuálního SPE postupu je relativně velká spotřeba vzorku i rozpouštědel, dále jednorázové použití kolonek, což zvyšuje finanční náklady ^{10, 13, 17}.

2.2.3.1. SPE extrakční módy

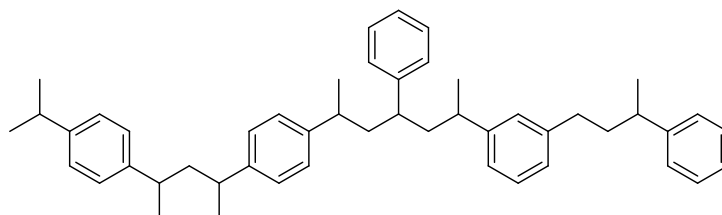
Selektivita sorbentu závisí na přitažlivých silách mezi analytem a funkčními skupinami na povrchu sorbentu. Každý z těchto sorbentů nabízí jedinečnou směsici vazebných interakcí ¹⁹.

2.2.3.1.1. Nepolární sorbent

Nepolární sorbenty jsou používány k zadržování hydrofobních nebo polárních organických sloučenin z vodných maticí. Na zadržování analytu se primárně podílejí

hydrofobní interakce C-H vazeb analytu s C-H vazbami funkčních skupin sorbentu. Mezi nejběžnější patří oktadecylová skupina vázaná na silikagelu. Některé silanolové skupiny silikagelu však nejsou alkylovány a mohou se tak podílet na nežádoucích interakcích s analytem, které nelze předpovídat. Eluce je obecně prováděna použitím nepolárních rozpouštědel. Všechny sorbenty na bázi nepolárně modifikovaného silikagelu jsou použitelné pouze v úzkém rozmezí pH (vzhledem k jejich stabilitě), což může být limitující při používání silných bází či kyselin.

Odpovědí nejen na úzké pH rozmezí, ale i lepší zadržování analytu bez nechtěných interakcí silanolových skupin, jsou polymerní alkylsilany. Tyto polymery mají větší kapacitu, jsou stabilní v širším rozmezí pH (0-14) a mají jinou selektivitu než Si-C₁₈ sorbent. Nejběžnější je polystyren zesíťovaný s 1-2 % divinylbenzenem, označovaný jako PS-DVB. Díky přítomnosti aromatických kruhů a vinylových skupin je PS-DVB schopný adsorbovat širší spektrum látek a to jak polárních, tak nepolárních. Adsorpce je umožněna π - π interakcemi mezi aromatickými cykly divinylbenzenů s nenasycenými analyty^{10, 19}.



Obrázek 2.: struktura PS-DVB

2.2.3.1.2. Polární sorbent

Retence analytu je na polárních sorbentech zprostředkována především interakcemi mezi polárními funkčními skupinami analytu a polárními skupinami na povrchu sorbentu. V čemž jsou zahrnuty vodíkové vazby, interakce dipól-dipól, π - π interakce a další. Eluce se provádí rozpouštědlem více polárním, než byla matrice vzorku a to na základě rozrušení vazebných interakcí.

Jako polární sorbent jsou používány silikagel, florisil (MgO·SiO₂) a oxid hlinitý. Silikagel může být modifikován funkčními skupinami (kyano, aminopropylová, diol). Tyto výše jmenované fáze zadržují velmi polární látky méně než samotný silikagel, proto jimi lze extrahovat ty analyty, u kterých by použití silikagelu nebylo možné. Také

lze na těchto sorbentech adsorbovat a selektivně eluovat molekuly velmi podobných struktur (např. isomery), léčiva či lipidy. Silikagel modifikovaný kyano skupinou se dá použít i jako nepolární sorbent pro vodné vzorky k retenci mírně polárních látek. Další aplikaci má i aminopropylem modifikovaný silikagel, který se dá využít k separaci nabitých molekul za podmínek iontové výměny při nízkém pH^{17, 19}.

2.2.3.1.3. Sorbenty pro iontovou výměnu

Iontově výměnné sorbenty jsou použitelné pro extrakci polárních analytů nesoucích náboj, nejčastěji z vodných roztoků a výjimečně i z organických rozpouštědel. Zadržování analytu na sorbentu je zprostředkováno elektrostatickými silami interagujících opačných nábojů funkčních skupin. Tato iontová interakce je nejsilnější možná nevazebná interakce.

Retence je dosaženo podnícením ionizace, čehož je dosaženo úpravou pH roztoku, ze kterého má být analyt extrahován. Ideální pH se odvíjí od pK_a analytu. Optimální pH pro maximální ionizaci analytu je 2 jednotky pod či nad hodnotou pK_a analytu. Pro dosažení retence je však nutné, aby byl nabit analyt i sorbent. Jako sorbent je používán silikagel modifikovaný funkčními skupinami schopnými výměny iontů. Pro výměnu aniontů jsou nejpoužívanější kvartérní aminy (SAX), jako slabý aniontoměnič je používán aminopropyl (WAX). Typické sorbenty pro výměnu kationtů jsou sulfonové (SCX) a karboxylové kyseliny (WCX). Všechny sorbenty na bázi silikagelu obsahují volné silanolové skupiny, které mohou poskytovat sekundární vazebné interakce pro polární analyty, což je vhodné pro retenci velmi polárních analytů. Současně však musí být brána v potaz i možná ireverzibilní vazba mezi analytem a sorbentem.

K eluci analytů dochází neutralizací nabitých funkčních skupin analytu, nebo sorbentu, čehož bývá dosaženo roztokem s vhodně voleným pH^{10, 17}. Eluce může být dosaženo i použitím roztoku s velkou iontovou silou, kdy dochází k nahrazení nabitého analytu iontem přítomným v roztoku¹⁹.

2.2.3.1.4. Sorbenty pro smíšený mód

Smíšený mód kombinuje nepolární polymerní sorbent s funkčními skupinami schopnými iontové výměny. Takový sorbent umožňuje extrakci jak neutrálních, tak ionizovatelných molekul z biologické matrice v rámci jedné extrakční techniky¹⁹.

Díky dvojitému mechanismu interakce analytu se sorbentem, může být eluováno více intereferujících látek, aniž by docházelo ke koeluci analytu ¹⁰. Z tohoto důvodu je touto metodou dosahováno větší účinnosti přečištění vzorku než u metod s jedním retenčním mechanismem a současně má tento postup větší reprodukovatelnost ²⁰.

2.2.3.2. Automatizovaná SPE extrakce

Pro rychlou analýzu a kvantifikaci analytů v biologických vzorcích je nezbytná i rychlá a účinná příprava vzorků. Tato úprava je umožněna nejen výše zmíněnou 96 - jamkovou precipitační destičkou, ale i 96 - jamkovou technikou pro SPE, která dosahuje vyšší čistoty extraktu než při použití PPT.

Při tomto postupu extrakce je používána destička s 96 jamkami obsahujícími sorbent a automatický robotický systém, který zajišťuje manipulaci s rozpouštědly. V prvním kroku systém kondicionuje sorbent organickým rozpouštědlem a dále vodným pufrům. Následně je roboticky do jamek nanesen biologický vzorek, interní standard, pufr a poté je na destičku aplikováno vakuum. Dalším krokem je promytí sorbentu organickým rozpouštědlem či pufrům. Následně je manuálně vyměněn podnos s oplachovanými rozpouštědly za sběrný tácek. Eluce analytu je již provedena automaticky organickým rozpouštědlem. Plát se vzorky buď může být dále přesunut k vysušení a rekonstituován, kdy rekonstituce je opět automatizována, či pokud bylo eluce dosaženo kompatibilním rozpouštědlem s analytickým systémem, může být eluát přímo do něj injektován ¹⁸.

2.2.3.3. On-line SPE

On-line metody jsou výhodné zejména pro analýzy, kde je dostupné pouze omezené množství vzorku nebo je-li zapotřebí dosažení co největší citlivosti. Tuto techniku lze spojovat jak s HPLC systémem, což je běžnější, tak i s GC. V tomto systému jsou používány 2 kolony, kdy jedna je extrakční a druhá analytická. Nejběžnějším přístupem je vložení malé SPE kolonky do dávkovací smyčky v šesticestném dávkovacím ventilu. Nejprve proběhne kondicionace kolonky, injekce vzorku a promytí prostřednictvím vysokotlaké pumpy. Pro eluci je nutné přepnout ventil do tzv. inject position, kdy dochází ke vpuštění mobilních fází do dávkovací smyčky s SPE kolonkou, čímž dochází k vymývání analytu na analytickou kolonu.

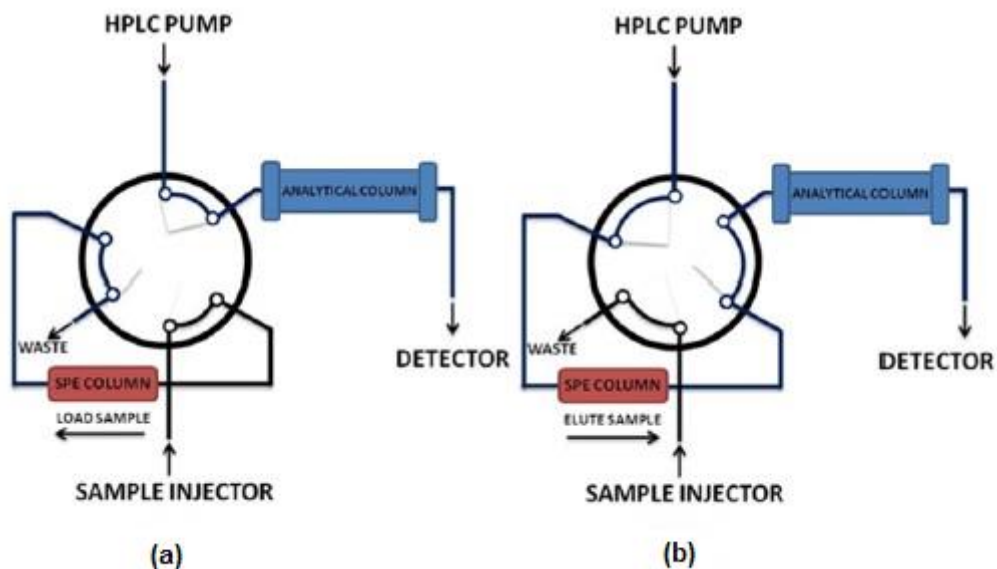


Schéma 5.: pozice 6 - cestného ventilu pro využití online SPE ve spojení s LC; (a) pozice ventilu pro nanesení vzorku na SPE kolonku; (b) pozice ventilu pro nástřik na analytickou kolonu (inject position) ¹⁹

SPE kolonku lze v tomto případě opakovaně používat, nicméně postupem času dochází k postupné degradaci sorbentu, což vede ke změně selektivity a kapacity kolonky. Hlavní rozdíl mezi SPE kolonkou pro tzv. off-line zacházení a on-line je použitý materiál a velikost částic. Velikost částic pro běžnou SPE kolonku se pohybuje mezi 40 - 60 μm , kdežto při použití SPE jako předkolonky je velikost až 5x menší, tj. 5-10 μm . Použitý materiál pro SPE předkolonky může být jak na silikagelovém základě, tak je možné použití více selektivních sorbentů, jako jsou MIP (molecular imprinted polymers) či RAM (restricted access material). Výhodou on-line SPE nebo též „column switching“ metody je snadná automatizace, menší pravděpodobnost ztráty vzorku a vyšší výkonnost. Nevýhodami jsou možnost carryoveru z předchozích analýz a dražší prepínací ventily ^{10, 19}.

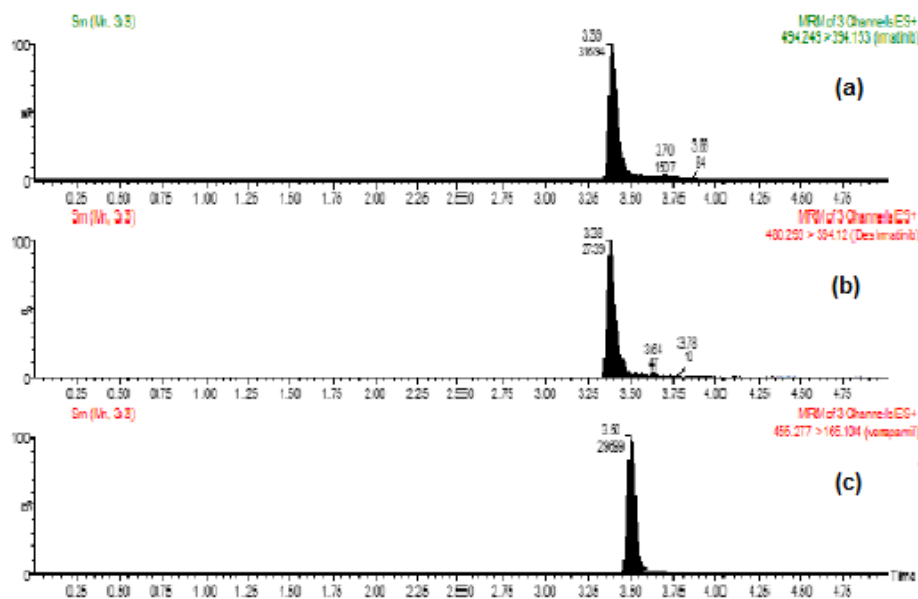
MIP jsou syntetické, cross-linkované polymery s uměle vytvořenou 3D strukturovanou sítí tak, aby byly schopny specificky vázat cílový analyt či jeho strukturální analoga ¹⁹.

RAM jsou biokompatibilní materiály, které umožňují separaci makromolekul z biologických vzorků od molekul analytů na základě jejich molekulové hmotnosti ¹².

2.3. Stanovení léčiv v biologických vzorcích pomocí HPLC/MS

Léčiva v biologických matricích se stanovují zejména v rámci preklinických a klinických studií a při monitorování terapeutické dávky léčiva pro určitého pacienta. Imatinib mesylát, což je inhibitor tyrosin-kinázy používaný při léčbě akutní myeloidní leukémie byl stanovován z lidské krevní plazmy současně s desmethyl imatinibem pomocí HPLC/MS/MS metody.

Příprava vzorku byla provedena jednokrokovou precipitační metodou za použití acetonitrilu. K 500 μl plazmy bylo přidáno 50 μl interního standardu o koncentraci 100 ng/ml, směs byla promíchána a následně byl ke vzorku přidán 1 ml acetonitrilu. Celý roztok byl 30 s vortexován a poté centrifugován při 13 500 rpm po dobu 5 minut. Ze supernatantu bylo odebráno 100 μl pro LC analýzu, z nichž bylo 20 μl injektováno do systému. Jako interní standard byl použit Verapamil díky jeho podobným fyzikálně chemickým vlastnostem k imatinibu a jeho metabolitu a současně kvůli nižší ceně oproti deuterovanému imatinibu. Separace byla provedena na XTerra MS C₁₈ koloně (3,9 mm x 150 mm; 5 μm), mobilní fáze byla složena z 0,1 % HCOOH ve vodě jako složka (A) a čistého methanolu (B). Průtok byl 0,6 ml/min s gradientem začínajícím v čase 0,1 min na 25% složky (A), kdy (A) složka narůstala do 2,5 min až na 75 %. Kolona byla vyhřívána na 40 °C. Jako hmotnostní analyzátor byl použit trojitý kvadrupól s ionizací elektrosprejem v kladném módu měření. K detekci a kvantifikaci byla použita funkce MRM (multiple reaction monitoring). Kalibrace byla provedena spikováním čisté lidské plazmy v rozmezí 5 ng/ml až 8 $\mu\text{g/ml}$ pro imatinib a 5 ng/ml až 1 $\mu\text{g/ml}$ pro desmethyl imatinib. Limit kvantifikace byl stanoven na 5 ng/ml. Metoda byla validována a použita ve farmakokinetické studii sledující imatinib mesylát²¹.

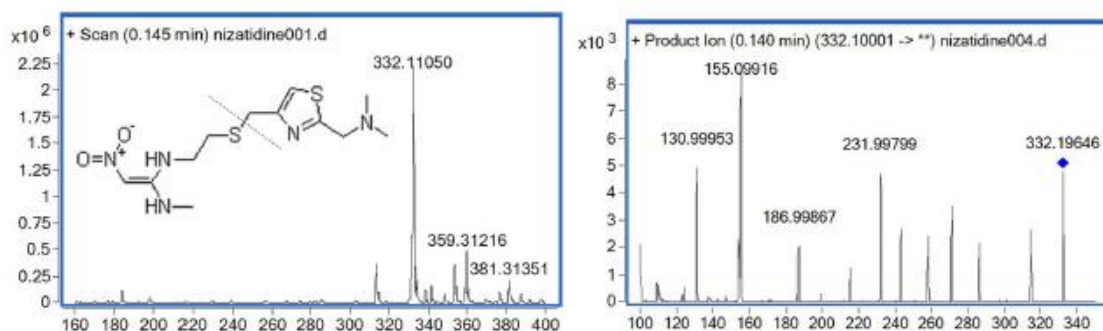


Obrázek 3.: chromatogram 3 látek po extrakci z patientského vzorku (a) imatinib mesylát; (b) desmethyl imatinib; (c) verapamil ²¹

De-Wei Shang a kolektiv vyvinuli a validovali metodu pro kvantifikaci nizatidinu v lidské plazmě a moči k využití ve farmakokinetických studiích. Nizatidin se používá k léčbě gastroezofageálního refluxu a duodenálních vředů. Analyty extrahovali z lidské plazmy i moči. Pro extrakci z plazmy použili proteinovou precipitaci, kdy ke vzorku o objemu 100 μ l bylo přidáno 20 μ l interního standardu ze zásobního roztoku (2000 ng/ml) a směs byla zamíchána zvortexována. Precipitace byla provedena 880 μ l 95 % methanolu a vzorek byl míchán po dobu jedné minuty. Směs byla poté centrifugována při 20238x g po dobu 5 min. Ze supernatantu byl odebrán 1 μ l, který byl injektován do HPLC-MS/MS systému k analýze.

Vzorek moči o objemu 10 μ l byl napipetován do 2 ml vialky a zředěn 90 μ l čisté moči zdravého dobrovolníka. Do vzorku byl poté přidán interní standard o objemu 40 μ l (100 μ g/ml), což byl deuteriem značený nizatidin a 860 μ l methanolu. Směs byla poté 15 s míchána na vortexu a centrifugována při 20238x g po dobu 5 min. Jeden μ l supernatantu byl opět injektován do systému. Chromatografická separace probíhala na Agilent Eclipse Plus C₁₈ (100 mm x 4,6 mm; 5 μ m) při 35 °C. Mobilní fáze byla složena z 95 % methanolu a zbylých 5 % bylo tvořeno vodným roztokem 5mM mravenčanu amonného, průtok byl nastaven na hodnotu 0,5 ml/min. Analyty byly detekovány v pozitivním módu elektrospreje a kvantifikovány pomocí MRM techniky.

Kalibrace byla provedena v rozsahu 5-2000 ng/ml v plazmě a 0,5-80 µg/ml v moči, nejnižší limit kvantifikace v plazmě byl stanoven na 5 ng/ml, v moči na 0,5 µg/ml.

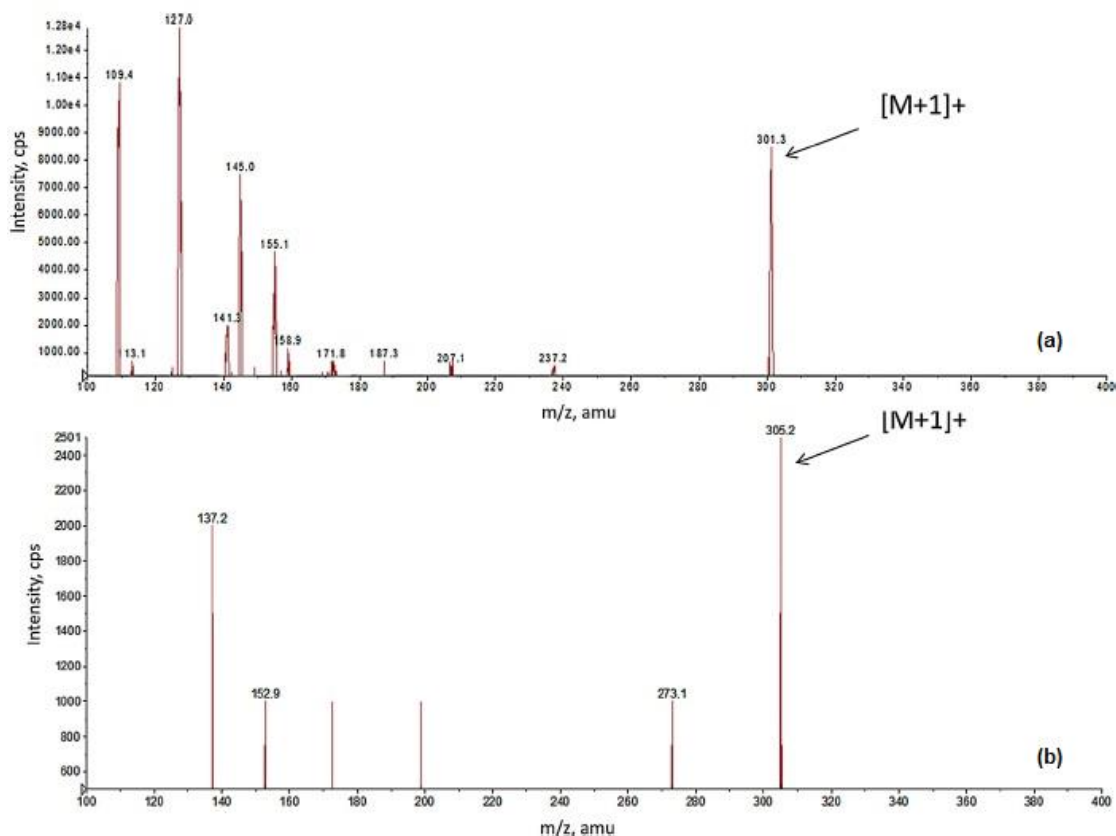


Obrázek 4.: Full scan nizatidinu ($M+H^+$) a jeho iontové produktu ²²

Tato metoda byla použita ve farmakokinetické studii pro orální podání 150 mg nizatidinu v kapslích, které se zúčastnilo 16 zdravých dobrovolníků čínské národnosti ²².

Mahmoud Hasan a kol. se zabývali stanovením klodronátu v lidské krevní plazmě. Klodronát patří do třídy bisfosfonátů, které jsou používány k léčbě onemocnění kostí, jako je např. osteoporóza. Analýza bisfosfonátů je kvůli jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem (vysoká polarita, nepřítomnost chromoforu, snadná polarizovatelnost) značně komplikovaná. Kolektiv Hasana použil pro úpravu vzorků plazmy proteinovou precipitaci, kdy 0,5 ml rozmrazené plazmy bylo smícháno s 50 µl interního standardu etidronátu (100 µg/ml). Poté bylo přidáno 100 µl 10 % kyseliny chloroctové, celá směs byla po dobu 10 s míchána a následně centrifugována při 21 000 g 10 min při pokojové teplotě. Supernatant byl odebrán a odpařen při 70 °C pomocí proudu vzduchu. Vysušený analyt byl poté rozpuštěn ve 150 µl koncentrované kyseliny octové a smíchán s 500 µl trimethyl orthoacetátu, jakožto derivatizačního činidla. Tato směs se ponechala 30 min inkubovat při teplotě 100 °C. Po zchlazení, bylo do reakční směsi přidáno 300 µl HCOOH (90 %) a 500 µl vody a analyty byly extrahovány do 4 ml do *tert*-butyl etheru po dobu 15 min. Následovala centrifugace při 3200x g po dobu 5 min. Organická fáze byla izolována a odpařena pod proudem vzduchu při teplotě 70 °C. Nakonec byl analyt rekonstituován ve 150 µl směsi voda/methanol (1:1), z něhož pak bylo injektováno 10 µl do chromatografického systému. Separace probíhala na koloně Supelco Ascentis MS (C_{18} ; 2,1 mm x 100 mm; 3 µm), která byla vyhřívána na 50 °C. Jako mobilní fáze byl použit 5mM octan amonný a acetonitril

v poměru 85:15, eluce probíhala izokraticky a průtok byl 0,3 ml/min. Spektrometrická detekce byla zajištěna trojitým kvadrupólem a byl sledován poměr hmotnosti k náboji (m/z). Přejchod 301,0/145 pro klodronát a 305,2/137,1 pro interní standard etidronát.



Obrázek 5.: MS/MS spektrum (a) klodronátu 301,0/145; (b) etidronátu 305,2/137,1 ²³

Kalibrační rozpětí bylo 5 - 800 ng/ml a vykazovalo kvadratickou korelaci mezi koncentrací analytu a signálem. Metoda byla validována dle platných norem FDA/EMA a použita pro farmakokinetickou studii ²³.

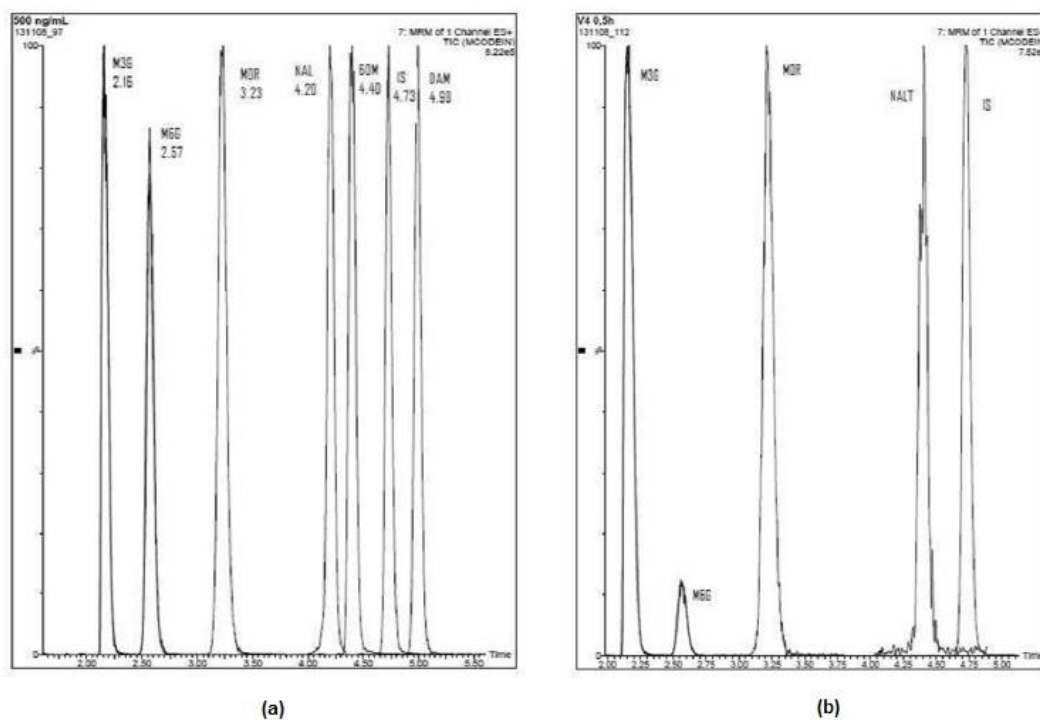
Bifosfonáty se nepoužívají k léčbě kostních onemocnění jen v lidské medicíně, ale i veterinární. Nicméně jejich používání je u závodních koní zakázáno, proto A. Wong a kol. vyvinuli postup pro úpravu vzorků koňské moči a plazmy i HPLC/MS metodu pro stanovení pěti látek z této řady léčivých přípravků. Na rozdíl od Hasana a kol. ²⁶ použili k přípravě vzorků extrakci tuhou fází.

Vzorek moči a plazmy byl centrifugován při 3000 rpm po dobu 10 min. Část vzorku (0,5 ml) byla naředěna do objemu 3 ml deionizovanou vodou a pH vzorku byl upraveno na hodnotu 4 pomocí kyseliny chlorovodíkové. Okyselený vzorek byl filtrován přes

prekondiciovanou (3 ml methanol, 3 ml vody) Oasis HLB kolonku. Filtrátu bylo znovu upraveno pH na hodnotu 4 a byl dále nanesen na Oasis WAX kolonku, prekondiciovanou 2 ml methanolu a 2 ml HCOOH (pH 4). Po nanesení vzorku byla cartridge promyta 2 ml mravenčí kyseliny (pH 4) a 2 ml methanolu. Eluce byla provedena 10 % roztokem amoniaku ve vodě. Eluát byl odpařen do sucha při 60 °C pomocí proudu dusíku, poté rekonstituován v 50 µl deionizované vody a metylován. K methylaci byl použit trimethylsilildiazomethan (100 µl) a methanol (100 µl). Roztok se ponechal 1 hodinu reagovat při laboratorní teplotě a následně byl přenesen do vialky k analýze. K separaci byla použita kolona Waters XBridge s reverzní fází (150 mm x 2,1 mm; 3,5 µm), nastříkovaný objem vzorku byl 5 µl. Mobilní fáze (A) byla 0,1 % kyselina mravenčí ve vodě, rovněž mobilní fáze (B) obsahovala 0,1 % kyselinu mravenčí, ale v acetonitrilu. Průtok byl nastaven na 200 µl/min, kdy od času $t = 0$ do $t = 1$ min. bylo složení mobilní fáze 98 % (A) a 2 % (B), poté do doby $t = 10$ min, lineárně klesal obsah složky (A) až na 0 %, který byl následně 4 minuty udržován. Ionizace byla prováděna elektrosprejem v kladném módu a měření v SRM (selective reaction monitoring) módu. Kalibrace byla udělána zvlášť pro moč i plazmu spikováním negativních biologických matric vybranými léčivy (alendronová kyselina, klodronová kyselina, ibandronová kyselina, tiludronová kyselina, risedronová kyselina). Metoda byla použita k administrační studii tiludronové kyseliny použité k léčbě artritidy, kdy jako IS byla použita kyselina risedronová. Kalibrace byla lineární v rozsahu 0-2500 ng/ml v moči i plazmě. Sledován byl přechod m/z 375/157 pro tiludronovou kyselinu a 340/182 pro IS ²⁴.

Dalším příkladem úpravy vzorků plazmy a stanovení analytů v ní pomocí HPLC/MS/MS je práce španělského týmu pod vedením R. Moreno-Vicente, který stanovoval heroin (diacetylmorfin DAM) v krevní plazmě současně s jeho hlavními metabolity, naloxonem (NAL) a naltrexonem (NALT). Plazma byla během zpracování vzorků udržována při nízké teplotě v ledové lázni, čímž se předcházelo degradaci DAM a 6-monoacetylmorfinu. Interní standard (O-methylcodein) o koncentraci 100 ng/ml v methanolu, sloužil současně i jako precipitační činidlo. V prvním kroku úpravy vzorku bylo 200 µl IS přidáno ke 100 µl vzorku plazmy, směs byla promíchána a centrifugována na 14000 rpm při 4 °C po dobu 5 min. Supernatant byl poté přefiltrován a bylo z něj odebráno 50 µl, které byly smíchány s 50 µl 0,1 % mravenčí kyseliny. Ze vzorku zpracovaným tímto postupem se stanovoval samotný heroin, 6-monoacetylmorfin, morfin, naloxon a naltrexon. Pro stanovení

morfin-3-glukuronidu a morfin-6-glukuronidu bylo nutné nejprve supernatant vysušit, čímž bylo dosaženo lepší odezvy analytů. Alikvot supernatantu o objemu 150 μ l byl odebrán a vysušen pod proudem dusíku a poté byl rekonstituován v 50 μ l 0,1 % HCOOH. Všechny výše zmíněné látky byl stanovovány v jedné analýze, tudíž byly oba díly supernatantu převedeny do 1 vialky. Chromatografická separace byla provedena na X-Bridge fenylové koloně (150 x 4,6 mm; 5 μ m) vyhřívané na 35 °C. Mobilní fáze byla složena z 5mM mravenčanu amonného (A) a 0,1 % HCOOH v acetonitrilu (B). Počátek gradientu byl nastaven na 5 % B do 1. minuty, poté do 3. minuty stoupala složka B až na 90 % a takto byla další 2 minuty udržována než se vrátila na počáteční hodnotu 5 %. Celková doba analýzy činila 8 min, průtok byl nastaven na 1,0 ml/min, nastříkováno bylo 30 μ l vzorku. Jako ionizační zdroj byl použit elektrosprej v kladném módu a měření bylo provedeno v MRM módu.

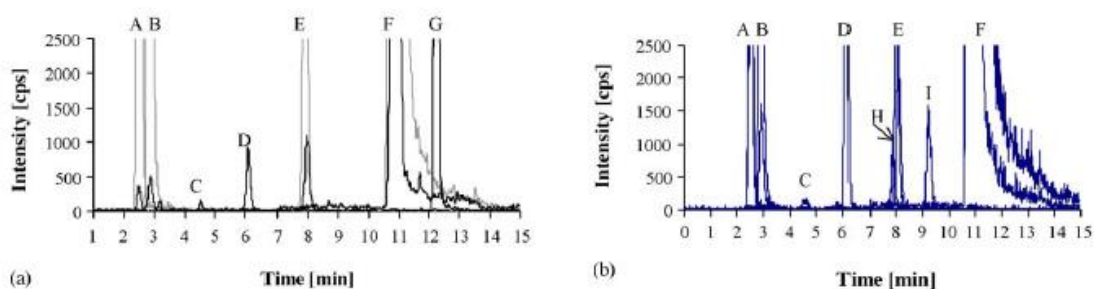


Obrázek 6.: MRM chromatogramy **(a)** vzorek lidské plazmy naspikovaný všemi stanovovanými látkami včetně IS (500 ng/ml); **(b)** vzorek plazmy dobrovolníka odebraný po 30 minutách od podání DAM/NAL (50/2 mg)²⁵

Linearita kalibrace byla stanovena v rozsahu 10-2000 ng/ml pro morfin-3-glukuronid a 10-1000 ng/ml pro ostatní analyty. Validace vyhovovala správné

laboratorní praxi a EMA normám. Tato metoda byla aplikována v klinických zkouškách k vyhodnocování vzorků plazmy od zdravých dobrovolníků po orálním podání diacetylmorfinu a naloxonu²⁵.

E. Rook a kolektiv stanovovali rovněž heroin, jeho metabolity a jiné opioidy v krevní plazmě, nicméně si pro úpravu vzorku vybrali metodu extrakce tuhou fází. Vzorky plazmy pocházely od drogově závislých pacientů, jenž byli těmito látkami léčeni. Vzorek byl ponechán rozmrznout v ledové vodní lázni, poté z něj bylo odebráno 250 μ l plazmy, ke kterému bylo přidáno 50 μ l roztoku interních standardů (1,25 μ g/ml). Vzorek byl následně naředěn 300 μ l 0,15M vodným roztokem kyseliny chlorovodíkové, promíchán a dočasně umístěn v ledové vodní lázni. SPE kolonka se sorbentem pro extrakci ve smíšeném módu (Oasis MCX) byla kondicionována 2 ml methanolu, 1 ml vody a 2 ml 10mM citrátového pufru (pH 3) v daném pořadí. Vzorek byl na kolonku nanesen tak, aby nedošlo k vysušení sorbentu. V dalším kroku byla kolonka promyta 0,5 ml vody okyselené na pH 3 pomocí octové kyseliny a následně byl sorbent vysušen aplikací vakua po dobu 1 min. Vzorek byl eluován 500 μ l roztoku 0,5 % octanu sodného v methanolu, který byl uchováván při -20 °C kvůli stabilitě heroinu s nízkým poločasem rozkladu. Eluát z kolonky byl jímán do vialky obsahující 250 μ l 50mM octanu amonného (pH 3) a obsah byl okamžitě promíchán, protože heroin není stálý v bazickém prostředí. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno pomocí proudu dusíku zhruba na objem 250 μ l z nichž bylo dále 6 μ l injektováno do systému. Návratnost byla vypočítána z poměru výsledků kontrolních vzorků a výsledků zpracovaných prázdných vzorků rekonstituovaných se standardy. K separaci byla použita kolona obsahující reverzní fázi Zorbax Bonus column (150 x 4,5 mm; 5 μ m) a rovněž byla použita ochranná předkolonka s reverzní fází. Gradientová eluce využívala směs 5mM mravenčanu amonného ve vodě (pH 4) a acetonitrilu. Průtok byl nastaven na 1 ml za minutu a doba analýzy činila 15 min. Ionizace probíhala v elektrospreji v pozitivním módu a ke kvantifikaci analytů byl použit MRM mód²⁶.

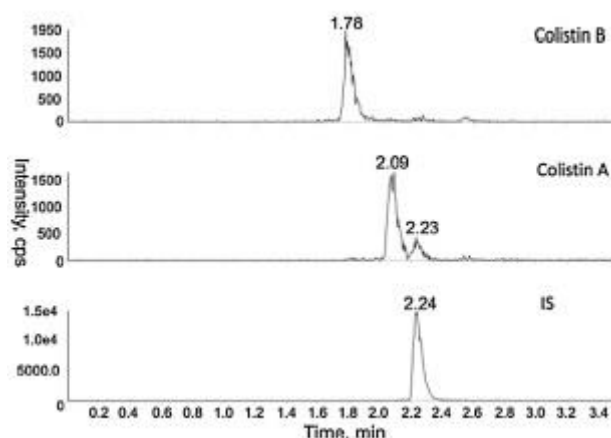


Obrázek 7.: (a) chromatogram spikované plazmy všech kvantifikovatelných analytů (5 ng/ml), intenzita deuterovaných standardů přesahovala 2500 [cps]; (b) náhodně vybraný chromatogram vzorku pacienta; (A) morfin-3-glukuronid a d_3 -morfin-3-glukuronid, (B) morfin a d_3 -morfin, (C) morfin-6-glukuronid, (D) 6-monoacetylmorfin, (E) heroin a d_6 -heroin, (F) methadon a d_9 -methadon, (G) ethyl-5-methyl-3,3-difenyl-1-pyrrolidon, (H) kokain, (I) ecgonin benzoát ²⁶

Miao Zhao s kolegy vyvinuli postup úpravy vzorku plazmy ke stanovování kolistinu, přímo aplikovatelný i na úpravu vzorků moči, pomocí extrakce tuhou fází v 96 - jamkovém uspořádání ²⁷. Jejich snahou bylo zlepšit již publikované postupy, ve kterých byla problémem dlouhá příprava vzorků k analýze ²⁸ a nedostatečná čistota extraktů po precipitaci ²⁹.

Nejprve byl vyvinut postup pro úpravu vzorků plazmy, kdy ke 200 μ l plazmy s kolistinem bylo přidáno 20 μ l roztoku IS (polymyxin B1) a 200 μ l 5 % amoniaku. Směs byla vortexována a poté nanesena na Oasis WCX 96 - jamkovou destičku, kde byl sorbent kondiciován 1 ml methanolu a 1 ml vody. Po nanesení vzorku byly jamky promyty 1 ml vody, 1 ml methanolu, 1 ml acetonitril/voda (30/70 s 2 % amoniaku) a následně 1 ml 0,5 % mravenčí kyseliny. Analyt byl eluován 2 díly acetonitril/voda (30/70 s 6 % HCOOH) o objemu 300 μ l. Eluát byl poté přímo nastříknut do systému. Metoda byla následně aplikována na úpravu vzorků moči, kde se prokázala adsorpce kolistinu na povrch vzorkovnic, čímž byla ovlivněna reprodukovatelnost. Nicméně tento problém byl vyřešen přidáním 1 % bovinálního sérového albuminu do vzorku moči. Chromatografická separace proběhla na Phenomenex Kinetec XB-C₁₈ koloně (100 x 2,1 mm; 2,6 μ m) vyhřívané na 30 ± 3 °C. Složka (A) mobilní fáze obsahovala acetonitril/methanol (1:1, v/v) a složka (B) 0,1 % mravenčí kyselinu ve vodě. Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min. Gradientová eluce začínala na 10 % složky (A), která dále narůstala na 35 % do času 2,5 min. Následně vzrůstal obsah (A) až na 70 % do 2,9 min

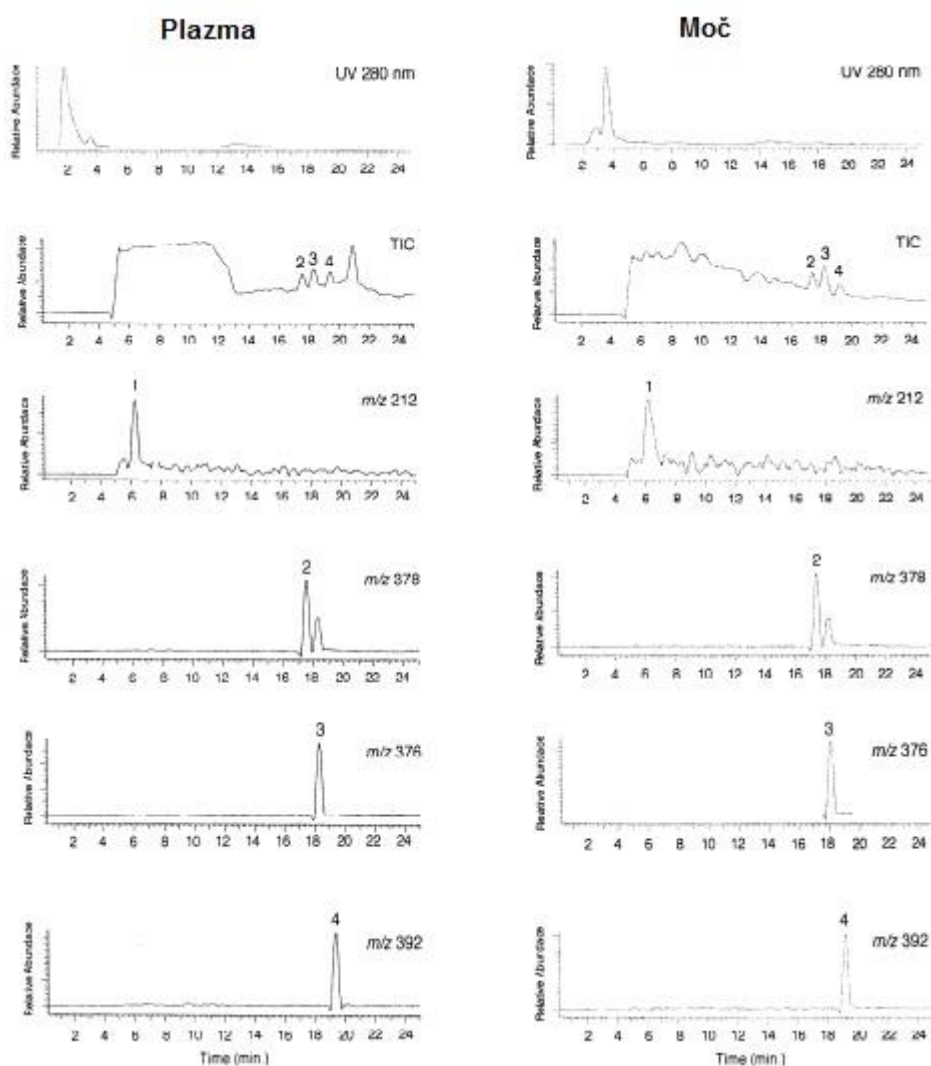
a poté rychle klesal zpět na 10 % do času 3,0 min. Na 10 % byla složka (A) udržována do konce analýzy v čase 3,5 min. Do systému se nastříkoval vzorek o objemu 5 μ l a autosampler byl chlazen na teplotu 4 ± 2 °C. Hmotností spektrometr s ESI⁺ byl použit v módu SRM, kde se sledoval přechod m/z 390,7/101,3 pro kolistin A, 386,0/101,2 pro kolistin B a 402,3/101,2 pro IS polymyxin B1. Limit kvantifikace byl stanoven na 13 ng/ml pro kolistin A a 25,1 ng/ml pro kolistin B, jak v plazmě, tak v moči²⁸.



Obrázek 8.: vzorek plazmy dobrovolníka po 24 hod po administraci jedné dávky kolistinu 2,5 mg/kg²⁷

Nejideálnější případ pro stanovování biologicky aktivních látek ve vzorcích moči, plazmy či séra by bylo vyvinout postup analýzy bez zdlouhavé a náročné předúpravy vzorků. Tento přístup pro HPLC/MS stanovení haloperidolu a jeho metabolitů v moči a plazmě zvolil tým Tetsuya Arinoby³⁰. Ti využili kolonu MSpak GF-3104B (4,6 mm x 50 mm) k separaci přímo injektovaných vzorků plazmy a moči, aniž by byla současně použita metoda column switching. Jeden mililitr vzorku plazmy či moči s IS (300 ng/ml) byl naředěn 3 ml mobilní fáze (A). Složka (A) mobilní fáze obsahovala vodu s 0,09 % kyselinou mravenčí a 20 mM octanem amonným, složka (B) byl čistý acetonitril. Průtok byl nastaven na 0,3 ml/min. Prvních 5 minut analýzy probíhala eluce pouze složkou A, následně narůstal obsah složky (B) na 20 % po dobu 20 min. Detekce byla provedena na UV/VIS i hmotnostním spektrometru (iontová past) s ionizací ultrazvukovým sprejem (SSI). Recovery haloperidolu a redukovaného haloperidolu v plazmě bylo 64,4-76,1 % a 46,8-50,2 %. V moči bylo recovery stanoveno na 87,3-99,4% a 94,2-98,5 %. Detekční limity byly 5 ng/ml pro haloperidol, 10 ng/ml pro redukovaný haloperidol a 300 ng/ml pro IS (chlorovaný analog haloperidolu).

Metoda byla shledána jako vhodná k identifikaci a determinaci haloperidolu a jeho metabolitů po vysokých a toxických dávkách³⁰.



Obrázek 9.: Ukázka HPLC/UV chromatogramu (při 280 nm, TIC a chromatogramy $[M+H]^+$: m/z 212 CPHP; m/z 378 redukovaný haloperidol; m/z 376 haloperidol; m/z 392 IS v lidské plazmě a moči³⁰.

2.4. Diabetes mellitus

Toto onemocnění je narůstajícím problémem v celosvětovém měřítku, ať už v zemích vyspělých či rozvojových. Vzhledem k rychlosti vzrůstu prevalence v celosvětovém měřítku je možné označit výskyt diabetes mellitus jako epidemii. V České republice je diagnostikován DM asi 8 % populace, což dle údajů z roku 2011

odpovídá 850 000 pacientů, nicméně je odhadováno, že další 2 % zůstávají nediodnostikována.

Onemocnění diabetes mellitus je definováno jako: *chronické heterogenní onemocnění provázené hyperglykemií v důsledku absolutního či relativního nedostatku inzulínu* ³¹.

DM je diagnostikován na základě měření *glykémie ve venózní plazmě*. Sledují se hodnoty:

- Glykémie na lačno (min po 8 hodinách po příjmu potravy).
- Náhodná glykémie (kdykoli v průběhu dne, nebere se ohled na příjem potravy).
- Glykémie ve 120 minutě orálního glukózového tolerančního testu, při kterém se podává 75 g glukózy.

Diabetes je diagnostikován, jestliže jsou u pacienta přítomny klasické příznaky cukrovky (žízeň, časté a vydatné močení, kolísání zrakové ostrosti, hubnutí při normální chuti k jídlu) a naměřená náhodná glykémie přesahuje nebo je rovna hodnotě 11,1 mmol/l nebo je-li hodnota glykémie na lačno větší nebo rovna 7,0 mmol/l nebo je-li glykémie ve 120. minutě po glukózovém testu větší nebo rovna 11,1 mmol/l ³¹.

DM 1. typu neboli „inzulin dependentní“ vzniká běžněji v mládí a má autoimunitní podklad. Je zde nezbytné podávání inzulínu, neboť je ho v těle naprostý nedostatek. Jeho vznik je spojen s postupným zánikem β -buněk, což je způsobováno autoimunitními procesy, čímž dochází k poklesu sekrece inzulínu ³². Léčba zahrnuje podávání inzulínu, individuální dietní režim a vhodný životní styl (vyloučení kouření, každodenní pohybová aktivita) ³¹.

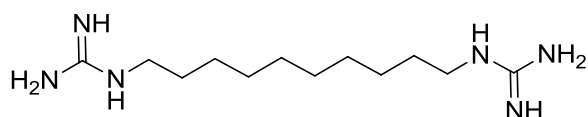
DM 2. typu není závislý na inzulínu a vyskytuje se spíše u starších osob, často s nadváhou ³². Jedná se o onemocnění chronického charakteru inklinující ke zhoršování stavu pacienta. Vzniká při porušení sekrece inzulínu v kombinaci se snížením jeho působení v cílových tkáních ³³. Vnější projevy tohoto onemocnění na počátku chybějí, protože se projevuje pouze hyperglykemií. Často je nemoc u pacienta odhalena až následkem projevujících se diabetických komplikací (např. noční bolesti dolních končetin, poruchy vyprazdňování žaludku, průjmy, zácpa, erektilní disfunkce, ischemické choroby srdce či dolních končetin, ateroskleróza), jako důsledek neléčené hyperglykémie. Při kumulaci rizikových faktorů jako je ateroskleróza či metabolický syndrom (obezita, hypertenze, dyslipidémie, atd.) se zvyšuje riziko makrovaskulárních

komplikací ³¹. Po stanovení diagnózy se léčba zahajuje metforminem (pokud není kontraindikován) a současně dochází i ke změně režimu pacienta. Hyperglykémie je u nemocného DM 2. typu léčena jako součást komplexních opatření, ve kterých je zařazena i léčba hypertenze, obezity a dalších projevů metabolického syndromu ³³.

Cílem léčby je dlouhodobá normalizace hodnot glykémie, na základě jak léčby pomocí farmaceutik, tak režimových opatření a oddálení či zabránění rozvoje komplikací této nemoci ³¹.

2.5. Perorální antidiabetika

Tyto léčivé přípravky jsou indikovány pro léčbu diabetu 2. typu. Prvním léčivem z této skupiny byl diguaninový preparát Synthalin A představený v roce 1926. Od té doby prošla perorální antidiabetika (PAD) dlouhým vývojem, který se týkal především snížením terapeutické dávky a vývojem nových látek s menším rizikem nežádoucích účinků ³⁴. Cílem PAD je snížit či stabilizovat hladinu glukózy v krvi, k čemuž dochází různými mechanismy v závislosti na použité skupině antidiabetik. PAD mohou působit skrze stimulaci uvolňování inzulínu ze slinivky a stimulaci glykolýzy. Dále mohou potlačovat glukoneogenezi (proces, při kterém v játrech dochází k syntéze glukózy z necukerných prekurzorů), zpomalovat absorpci glukózy v gastrointestinálním traktu, či podporovat vazbu inzulínu na receptory a další ³.



Obrázek 10.: Struktura Synthalinu A

V současné době by již žádný pacient s diagnostikovaným diabetem 2. typu neměl být léčen pouze dietou, ale ihned by měl být začít léčen antidiabetiky. Při léčbě by se mělo přihlížet k faktu, že PAD v terapii pouze jedním léčivým přípravkem postupně ztrácí účinnost a je tedy nutné začít včas kombinovat různé typy antidiabetik v menších dávkách. Existuje již řada různých preparátů, které v jedné tabletě kombinují PAD s různými mechanismy účinků, tak aby byl zesílen požadovaný efekt. Nicméně základní podmínkou pro úspěšnou léčbu diabetu 2. typu zůstává úprava režimu a životního stylu ³⁵.

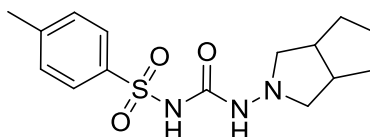
2.5.1. Deriváty sulfonylmočoviny

Sulfonylmočovinné preparáty byly rozsáhle používány k léčbě diabetes 2. typu v 50. letech minulého století. Jejich primárním mechanismem účinku je zvýšení sekrece inzulínu na základě vazby na specifické receptory na β -buňkách pankreatu. Uvolněný inzulín vstupuje do portální žíly, čímž v ní způsobí hyperinzulinemii, která potlačí zvýšenou bazální produkci glukózy v játrech³⁶.

Tzv. první generace těchto léčiv, do níž patřili např. tolbutamid a chlorpropamid, měla tu nevýhodu, že k dosažení terapeutického efektu byly potřebné vysoké dávky a to až 2000 mg denně³. V 70. a 80. letech byla na trh uváděna další léčiva tzv. druhá generace, která měla vyšší účinnost a patří mezi ně glibenklamid, gliclazid a glipizid. Všechna PAD jsou dobře absorbována a dosahují nejvyšších koncentrací v plazmě během 2-4 hodin. Doba působení se liší od méně než 12 hod, až po více jak 24 hod³⁷. Déle působící léčiva jako glibenklamid a glimepirid zvyšují u pacientů riziko hypoglykémie, což musí být bráno v potaz³⁸. U léčiv této skupiny neplatí předpoklad, že se zvýšením dávky současně bude růst i hypoglykemizující účinek. Léčba těmito antidiabetiky je preferována pro neobězní pacienty, neboť jejich užívání obvykle způsobuje nárůst váhy a současně je předepisována pacientům s normální či mírně vyšší hladinou vlastního inzulínu^{34 37}. Frekvence výskytu vedlejších účinků je nízká (2-5 %), bývají středně závažné a vymizí s přerušáním léčby. Generická antidiabetika patří mezi nejlevnější preparáty k léčbě diabetes mellitus typu 2. na trhu³⁶.

2.5.1.1. Gliclazid

Je to bílý nebo téměř bílý prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, jehož systematický název je 1-(hexahydrocyklopenta[*c*]pyrrol-2(1*H*)-yl)-3-[(4-methylfenyl)sulfonyl]močovina³⁹.

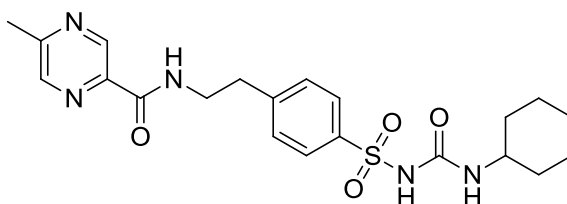


Obrázek 11.: Struktura gliclazidu

Tato látka má středně dlouhý efekt působení a také malé riziko vzniku hypoglykémie a zároveň má i antiagregační vlastnosti. Doporučená denní dávka přípravků obsahujících gliclazid je 80 až 240 mg³⁴.

2.5.1.2. Glipizid

Je definován jako 1-cyklohexyl-3-{4-[2-(5-methylpyrazin-2-karboxamido)-ethyl]-benzen-1-sulfonyl}močovina. Vzhledem je to bílý nebo skoro bílý prášek, téměř nerozpustný ve vodě³⁹.

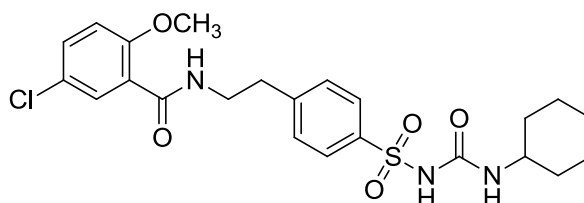


Obrázek 12.: Struktura glipizidu

Přednostní vlastností této látky je rychlý nástup účinků, kdy po 2-3 hodinách dosahuje maximálních účinků a má výraznější hypoglykemizující efekt. Působí středně dlouhodobě a proto se 5-10 mg denní dávky dělí do dvou dávek³⁴.

2.5.1.3. Glibenklamid

Systematický název je 1-[(4-{2-[(5-chlor-2-methoxybenzoyl)amino]ethyl}-fenyl)-sulfonyl]-3-cyklohexylmočovina. Je to bílý či téměř bílý krystalický prášek, prakticky ve vodě nerozpustný³⁹.

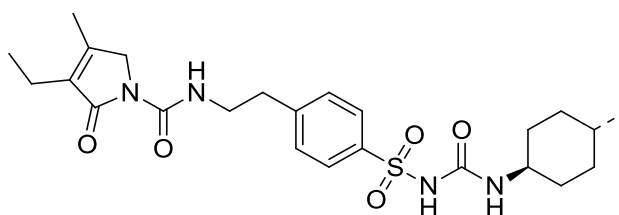


Obrázek 13.: Struktura glibenklamidu

Ze skupiny sulfonylmočovinyových derivátů 2. generace je nejstarším zástupcem, zároveň s nejsilnějším hypoglykemizujícím účinkem. Doporučená denní dávka se pohybuje v intervalu 5-10 mg³⁴.

2.5.1.4. Glimepirid

Je to skoro bílá látka v práškové formě, téměř nerozpustná ve vodě se systematickým názvem 1-{4[2-(3-ethyl-4-methyl-2-oxo-2,5-dihydropyrrol-1-karbox-amido)ethyl]benzen-1-sulfonyl}-3-(*trans*-4-methylcyklohexyl)močovina³⁹.



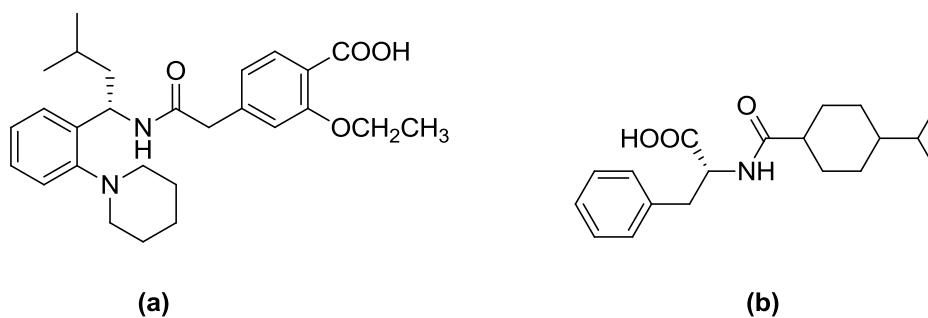
Obrázek 14.: Struktura glimepiridu

Výhodou glimepiridu jsou antiagregační vlastnosti a v porovnání s glibenklamidem má toto léčivo nižší vznik rizika hypoglykémie a zvýšení hmotnosti pacienta. Denní doporučená dávka je 1-6 mg v jedné dávce³⁴.

2.5.2. Nesulfonylmočovinyová sekretagoga

Tyto perorální antidiabetika též označovaná jako glinidy, působí stejně jako deriváty sulfonylmočoviny, a to uvolňováním inzulínu z β -buněk Langerhansových ostrůvků. Nicméně tyto látky působí na jiná vazebná místa než sulfonylmočovinyové přípravky³⁴. Během dne je β -buněkami vylučován inzulín průběžně, což je označováno jako „bázální sekrece“, nicméně sekrece se zvyšuje při jídle, což je označováno za bonusovou či „prandiální sekreci“⁴⁰. Glinidy tedy zajišťují rychlé uvolnění prandiálního inzulínu, který působí krátkodobě, čímž nezhoršuje glykémii na lačno⁴¹. Proto je tento typ léků vhodný pro pacienty, kteří mají během dne normalizovanou glykémii, které narůstá po jídle. Z toho vyplývá, že léky se berou vždy před hlavním jídlem a v případě, že je nějaké hlavní jídlo vynecháno, vynechává se i dávka léku³⁴.

Mezi zástupce této skupiny patří repaglinid a nateglinid.



Obrázek 15.: (a) struktura repaglinidu; (b) struktura nateglinidu

2.5.3. Léky zvyšující citlivost k inzulinu

Inzulinová resistance je metabolická porucha, kterou trpí většina pacientů s diabetem 2. typu. Při tomto onemocnění dochází k poruchám účinku inzulinu, kdy normální hladiny inzulinu v krevní plazmě vyvolávají nižší účinek než je běžné. Nejvýznamnější skupinu osob s inzulinovou rezistencí tvoří osoby s metabolickým syndromem⁴². Tkáně mající takto sníženou citlivost k inzulinu, jsou tedy vhodným cílem pro léčbu tohoto typu diabetu. Skupiny léků mající tento mechanismus účinku jsou biguanidy a tiazolindindiony³⁴.

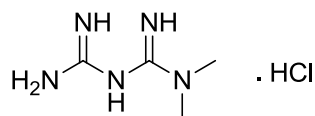
2.5.3.1. Biguanidy

Na počátku minulého století byla v Evropě k léčbě diabetu tradiční medicínou používána jeřábina lékařská, která byla bohatá na guanidin. Toto zjištění vedlo ve 20. letech k zavedení několika glukózu snižujících guanidinových derivátů. Poté co se stal inzulin běžně dostupným, bylo na tyto látky zapomenuto a znovu nabyly na popularitě až v 50. letech. V těchto letech byly schváleny 3 biguanidinová léčiva: metformin, phenformin a buformin, ale pouze metformin přetrval a je používán³⁷.

2.5.3.1.1. Metformin

Systematický název této bílé či téměř bílé krystalické látky rozpustné ve vodě, je 1,1-dimethylbiguanid-hydrochlorid³⁹. Účinky metforminu na organismus jsou značné, neboť ovlivňuje metabolismus buněk nejen svalových, ale i tukových, v jaterních buňkách negativně ovlivňuje glukoneogenezi a zvyšuje citlivost vůči inzulinu. Dále snižuje rychlost vyprazdňování žaludku a vstřebávání glukózy

z gastrointestinálního traktu. Metformin je po podání rychle absorbován a eliminován močí v nezměněném stavu, protože není metabolizován.

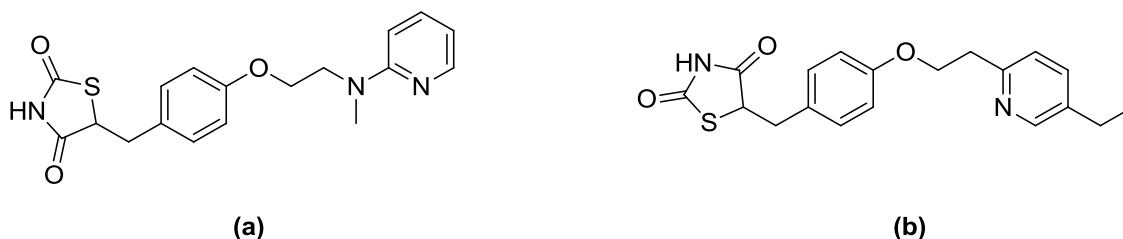


Obrázek 16.: Struktura metforminu hydrochloridu

Tento lék je předepisován pacientům s nadváhou či obezitou, ale je stejně efektivní i pro pacienty s normální váhou. Může být používán jako monoterapie, ale často se využívá v kombinaci s dalšími antidiabetiky či inzulinem. Na začátku léčby se dává po 500-850 mg 1x denně či 2x denně 500 mg s tím, že dávka může být zvyšována. Nicméně maximální denní dávka je asi 2000 mg^{34, 37}.

2.5.3.2. Tiazolidindiony

Tyto látky díky svému působení na genovou regulaci zvyšují citlivost na inzulin v celém těle. Jsou nejmladší skupinou perorálních antidiabetik představených v 80. letech minulého století. Zástupci této skupiny jsou rosiglitazon a pioglitazon³⁷.



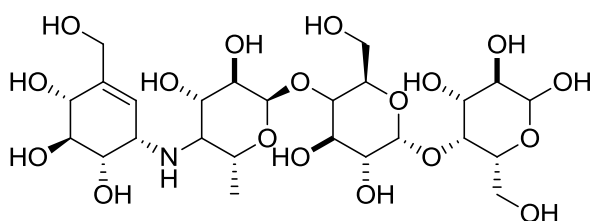
Obrázek 17.: (a) struktura rosiglitazonu; (b) struktura pioglitazonu

Skrze své působení blokují glukoneogenezi v játrech a zvyšují využití glukózy ve tkáních. Zástupci této skupiny se neužívají v monoterapii, nýbrž se kombinují s dalšími PAD jako je metformin či sulfonylmočovinné deriváty. Díky jejich působení

na genovou expresi je nástup účinku delší a pohybuje se v rozmezí 4 až 6 týdnů³⁴. Mezi vedlejší účinky patří přibírání na váze a zadržování tekutin³⁸.

2.5.3.3. Inhibitory α -glukosidáz

Do této skupiny patří akarbóza, která kompetitivně inhibuje schopnosti enzymů (maltázy, isomaltázy, glukoamylázy, atd.) ve střevech odbourávat oligosacharidy a disacharidy na monosacharidy a současně blokuje vstřebávání těchto jednoduchých cukrů do krve. Toto léčivo se podává v dávkách 50-100 mg před hlavními jídly. Vedlejší účinky jsou spojené s gastrointestinálním traktem. Používá se v monoterapii i v kombinaci s jinými PAD či inzulinem. Důležité je vědět, že rovněž zvyšuje účinek warfarinu^{34,36}.



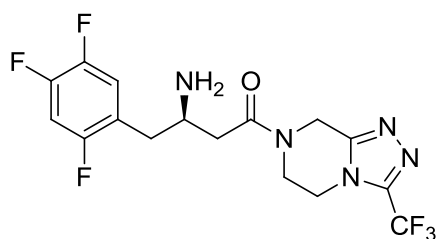
Obrázek 18.: struktura akarbóza

2.5.3.4. Inhibitory dipeptidyl peptidázy 4

Inhibitory dipeptidyl peptidáz 4 (DPP-4), též zvaných gliptiny působí díky inhibici aktivního místa na enzymu dipeptidyl peptidáze 4, jak už název naznačuje. Tímto je inhibována degradace glukagon-podobnému peptidu 1 (GLP-1), což zvyšuje jeho účinky, kterými jsou sekrece inzulínu v β -buňce a snižování sekrece glukagonu. Tímto způsobem je snižována glykémie a současně je zpomaleno zhoršování sekreční funkce β -buněk, neboť snižování počtu β -buněk apoptózou je důvodem progresu DM.

2.5.3.4.1. Sitagliptin

Je prvním preparátem této skupiny, který byl do klinické praxe zaveden v roce 2008. V případě, že je u pacienta kontraindikován či špatně snášen metformin, je v monoterapii použit sitagliptin. Dále je možné jej kombinovat s ostatními ATD v případech, kdy terapie nevede ke kompenzaci DM. Denní dávka je 100 mg⁴³.



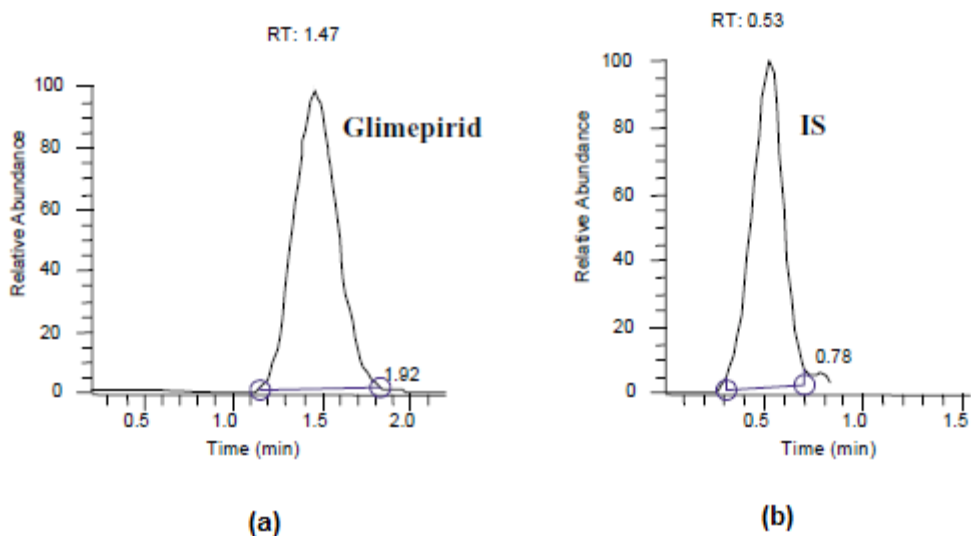
Obrázek 19.: sktruktura sitagliptinu

2.6. Případy stanovení perorálních antidiabetik pomocí HPLC/MS

Existuje již mnoho metod přípravy vzorků a mnoho metod stanovení antidiabetik v těchto vzorcích. Jedná se o metody, které popisují stanovení jedné či více látek v průběhu analýzy. Tyto metody jsou neustále vylepšovány a to jak v limitech detekce a kvantifikace, tak ve zkracování celkového času analýzy, či počtu látek, které se danou metodou dají stanovovat.

Jedním z případů je práce Isama Salema a jeho týmu, který stanovoval glimepirid v lidské plazmě za pomoci HPLC/MS. Navrhnutá metoda byla určená ke kvantifikaci a identifikaci glimepiridu ve farmakokinetických, biodostupnostních a bioekvivalenčních studiích. K extrakci analytu ze vzorku plazmy byla použita extrakce kapalinou. Jeden ml 0,05M roztoku KCl (s upraveným pH na hodnotu 1 pomocí HCl) byl přidán do každé jamky obsahující 1 ml plazmy. Poté bylo přidáno 7 ml diethyletheru a proběhla extrakce, kdy byl vzorek po dobu 20 min vytřepáván a stočen na centrifuze při 2000x g po dobu 5 min. Vzorek v tomto stavu byl zmrazen a horní vrstva diethyletheru byla dekantována a následně odpařena do sucha pod proudem dusíku při 30 °C. Vysušené vzorky byly rekonstituovány v 60 µl rozpouštědla složeného z methanolu a vody (50:50, v/v), vortexovány po dobu 30 s a poté přímo nastříknuty do HPLC systému. K separaci byla použita kolona C₁₈ XTerra (50 mm x 2,1 mm; 5 µm), kterou chránila C₁₈ předkolonka značky Phenomenex (4 mm x 2,0 mm). Složkami mobilní fáze byly 0,02M octan amonný (pH = 2), acetonitril a methanol v poměru 40:35:25 (v/v). Průtok byl nastaven na 0,28 ml/min. Jako interní standard byl použit glibenklamid. Iontový zdroj byl elektrosprej v kladném módu. V analyzátoru byly nejprve identifikovány prekurzorové molekulové ionty [M+H⁺], které byly dále fragmentovány a detekovány v SRM módu. Pro fragment glimepiridu byl přiřazen poměr *m/z* 352, pro interní standard glibenklamid 369. Výsledky této metody

prokázaly, že metoda je specifická a dostatečně citlivá pro stanovení glimepiridu ve vzorcích lidské plazmy pro farmakokinetické a další studie ⁴⁴.

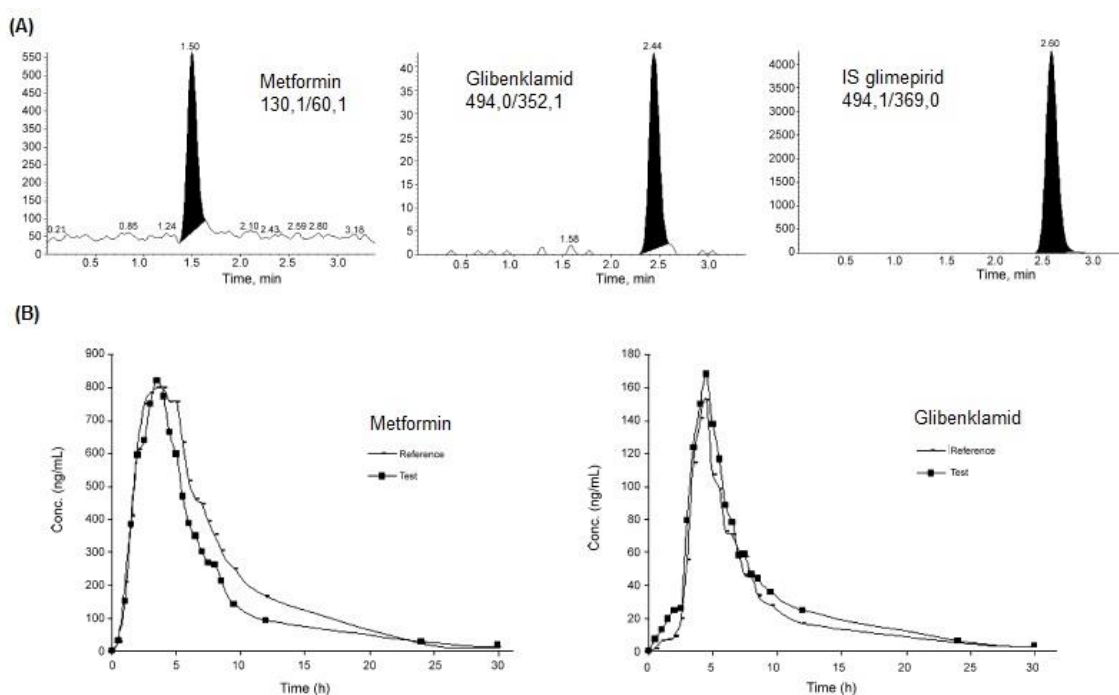


Obrázek 20.: (a) chromatogram ukazující vzorek plazmy dobrovolníka po administraci dávky 3 mg glimepiridu v tabletě; (b) plazma s interním standardem o koncentraci 200 ng/ml ⁴⁴

Dalším příkladem stanovení antidiabetik v plazmě je práce kolektivu S. Polaganiho, který stanovoval současně atorvastatin, metformin a glimepirid metodou HPLC/MS. Po rozmražení vzorků a jejich ekvilibraci na pokojovou teplotu byly vzorky vortexovány po dobu 10 s. Byl odebrán alikvot 200 μ l plazmy, ke kterému byl přidán interní standard (karbamazepin, 5 μ g/ml) o objemu 20 μ l. Dále bylo do směsi přidáno 50 μ l 25 % roztok amoniaku a vše bylo promícháno na vortexu a centrifugováno při 4000 rpm po dobu 10 min. Supernatant byl poté odebrán do čisté vialky a odpařen do sucha při 45 °C pomocí proudu dusíku. Odpařený vzorek byl následně rekonstituován v 500 μ l mobilní fáze, z čehož bylo dále 25 μ l injektováno do LC/MS/MS systému. Separace byla provedena na koloně Alltima HP C₁₈ (50 mm x 4,6 mm; 3 μ m) při laboratorní teplotě. Eluce probíhala izokraticky pomocí mobilní fáze složené z acetonitrilu a 10mM octanu amonného (pH 3,00 \pm 0,05) v poměru 60:40 (v/v) při průtoku 1,1 ml/min. Ionizace byla provedena pomocí elektrospreje v kladném módu. Ionty byly detekovány v módu MRM, kde atorvastatinu patřily m/z 559,5 a 440,4;

metforminu 130,1 a 60,1 a glimepiridu 237,2 a 194,1. Vzhledem ke snadné přípravě vzorku a krátké době analýzy (tj. 2,5 min) se tato metoda jeví jako vhodná k „high-throughput“ bioanalýzám ke stanovení atorvastatinu, metforminu a glimepiridu ⁴⁵.

V jiné bioekvivalenční studii byly vzorky zdravých dobrovolníků testovány na přítomnost a obsah metforminu a glibenklamidu v krvi po užití tablet, které tyto látky obsahují. Vzorky byly po rozmražení promíchány a stočeny na centrifuze při 3200 rpm při teplotě 10 °C po dobu 5 min, aby došlo k usazení případných sraženin. K 0,5 ml plazmy bylo přidáno 50 µl interního standardu glimepiridu (10 µg/ml) a vše bylo řádně promícháno. Následně byly ze vzorku precipitovány proteiny pomocí 1 ml 0,1% mravenčí kyseliny v acetonitrilu a centrifugovány při 10 000 rpm po dobu 10 min. Supernatant byl přenesen do vialek, zavíčkovan a vložen do autosemplaru pro nástřik. Separace byla provedena na Hypersil C₁₈ koloně (50 mm x 4,6 mm; 5 µm), mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 5 mM octanu amonného (70:30) upraveného na pH 3 pomocí ledové kyseliny octové. Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min a analýza probíhala za izokratických podmínek. Nastříknutý objem byl 5 µl a doba analýzy činila 3,5 min. Detekce analytů byla provedena na hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem, ionizace proběhla v elektrospreji v kladném módu a kvantifikace byla zpracována na základě MRM přechodů. Tato metoda byla validována a použita k analýzám vzorků 28 dobrovolníků mužského pohlaví ⁴⁶.



Obrázek 21.: (A) chromatogramy metforminu, glibenklamidu a IS; (B) koncentrace metforminu a glibenklamidu v plazmě po orálním podání dávky 500 mg metforminu a 5 mg glibenklamidu ve formě tablety na lačno ⁴⁶

P. Shah a kol. validovali metodu přípravy vzorků plazmy pro souběžné stanovení metforminu a sitagliptinu pomocí HPLC/MS/MS. Pro úpravu vzorků vyzkoušeli několik metod od precipitace proteinů pomocí methanolu či acetonitrilu, extrakce kapaliny-kapalinou s použitím různých rozpouštědel či kolonky pro SPE se sorbentem na bázi reverzních fází. Nicméně žádnou z těchto metod nedosáhli u obou látek současně relevantních hodnot recovery. U sitagliptinu bylo dosaženo návratnosti 85-90 % při extrakci na nepolární sorbent, což byl základní poznatek pro další postup. Retence metforminu na reverzním sorbentu bylo dosaženo použitím ion-párovacího činidla. Příprava vzorku zahrnovala odběr 50 μ l plazmy, její smíchání s 25 μ l IS, promíchání a centrifugaci při 3200x g, po dobu 5 min při 10 °C. SPE kolonka Strata-X byla nejprve kondicionována pomocí 1 ml methanolu a 1 ml laurethsulfátu sodného (SLS), což je anionický tenzid, který byl na sorbentu SPE zadržen pomocí hydrofobních interakcí. Poté byl nanesen vzorek obsahující oba analyty, následoval oplach 1 ml 5% roztoku amoniaku ve vodě a 1 ml methanolu. Analyty byly kvantitativně eluovány pomocí 5% (v/v) kyseliny mravenčí v methanolu a acetonitrilu (50:50). Dalším krokem bylo odpaření rozpouštědla proudem dusíku při 40 °C. Vysušený vzorek byl znovu rozpuštěn ve 100 μ l mobilní fáze, zamíchán a 5 μ l bylo použito k injektování

do chromatografického systému. Tímto postupem bylo dosaženo 82,5 % recovery pro metformin a 90,4 % pro sitagliptin. Separace proběhla na XSelect HSS CN koloně (150 mm x 4,6 mm; 5 µm), použitá mobilní fáze za izokratických podmínek byla složena z methanolu a 8,0 mM mravenčanu amonného ve vodě (80:20, v/v; pH 4,5). Délka analýzy činila 4,5 minuty. Jako hmotností analyzátor byl použit trojitý kvadrupól, ionizace byla zajištěna elektrosprejem v kladném módu. Kvantifikace proběhla na základě MRM přechodů. Metoda byla validována a úspěšně použita ke klinické farmakokinetické studii ⁴⁷.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístroje a chemikálie

K měření vzorků antidiabetik byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Acquity UPLC-I-Class (Waters, UK) a hmotnostní spektrometr Xevo TDQ s ionizací elektrosprejem a trojitým kvadrupólem.

Chromatografická separace byla provedena na koloně Acclaim RSLC 120 C₁₈ (100 mm x 2,1 mm; 2,2 μm; 120 Å) Dionex Bounded silica Products s tlakovým limitem 800 bar, rozmezí pH 2-8.

K navažování chemikálií byly použity váhy značky Mettler Toledo, k úpravě pH pufrů pH-metr inoLab WTW. K odstředění byla použita centrifuga Hettick Micro 120.

Tabulka I.: seznam chemikálií

Název	Výrobce
Kyselina chlorovodíková 35 %	Penta s.r.o.
Acetonitril	HiPerSolv CHROMANORM
Methanol	HiPerSolv CHROMANORM
Deionizovaná voda	Direct - Q VV Millipore
Kyselina chloroctová	Sigma Aldrich s.r.o.
Hydroxid sodný	Lach-Ner, s.r.o.
Kyselina mravenčí	Penta s.r.o.
Amoniak 25-29 %	Penta s.r.o.
Kyselina trichloroctová	Schering-KahlBaum A.G. Berlin
Octan sodný	Penta s.r.o.
Octan amonný	Lachema s.r.o.
Kyselina octová	Sigma Aldrich s.r.o.
Kyselina m-hydroxybenzoová	Sigma
Standard glibenklamid	Sigma
Standard d11-glibenklamid	Santa Cruz biotechnology
Standard glimepirid	Sigma
Standard d5-glimepirid	Santa Cruz biotechnology
Standard metformin	Sigma

Standard d6-metformin	Santa Cruz biotechnology
Standard Sitagliptin	Santa Cruz Biotechnology
Standard gliclazid	Sigma
Standard d4-gliclazid	Santa Cruz biotechnology

Vzorky krevního séra byly poskytnuty Ústavem soudního lékařství fakultní nemocnice v Olomouci.

3.2. Pracovní postup pro HPLC/MS a chromatografickou separaci

Zásobní roztoky nedeuterovaných i deuterovaných standardů antidiabetik byly připraveny rozpuštěním 1 mg daného antidiabetika v 5 ml methanolu, čímž byl získána koncentrace 200 µg/ml. Pro přímý nástřik byl použit směsný standard nedeuterovaných ATD o koncentraci 1 µg/ml, ředícím rozpouštědlem byl 10% acetonitril ve vodě.

Jako ideální parametry ionizace elektrosprejem v kladném módu pro nejvyšší odezvy antidiabetik byly nalezeny tyto parametry:

Tabulka II.: Optimální hodnoty nastavení ESI⁺

Parametr	Nejlepší hodnota
Teplota desolvatace	500 °C
Teplota na zdroji	150 °C
Napětí na sprejovací kapiláře	2,3 kV
Průtok desolvatačního plynu	1200 l/h
Napětí na vstupním kuželu	20-40 V (v závislosti na dané látce*)
Kolizní energie	15-25 V (v závislosti na dané látce**)

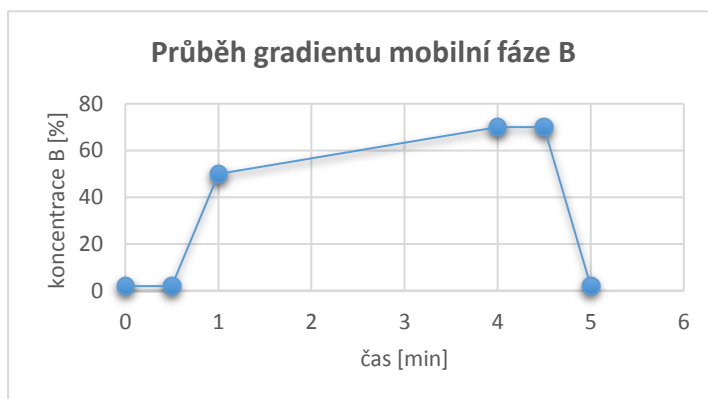
* metformin 20 V; sitagliptin 40 V; gliclazid 40 V; glimepirid 40 V; glibenklamid 20 V;

** metformin 20 V; sitagliptin 20 V; gliclazid 20 V; glimepirid 25 V; glibenklamid 15 V

Pro separaci antidiabetik byla použita kolona Acclaim RSLC 120 C₁₈ s gradientovou elucí. Mobilní fáze (A) obsahovala 0,1 % kyseliny chloroctové ve vodě a mobilní fáze (B) byla složena z 0,5% kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,4 ml/min a průběh gradientu je uveden v následující **tabulce III.** Objem nástřikovaného vzorku na kolonu byl 5 µl.

Tabulka III.: Průběh gradientu mobilní fáze pro separaci antidiabetik

Čas [min]	A [%]	B [%]
0	98	2
0,5	98	2
1,0	50	50
4,0	30	70
4,5	30	70
5,0	98	2



Graf 1.: Profil gradientu MF B

Kvantifikace byla provedena na základě dat získaných v MRM módu hmotnostního analyzátoru metodou kalibrační křivky, kdy jako IS sloužily jednotlivé deuterované standardy daných látek, kromě sitagliptinu, jehož deuterovaný standard nebyl k dispozici. V MRM módu byl sledován přechod jednotlivých molekulových iontů na nejintenzivnější iont dceřiný. Koncentrace deuterovaných standardů činila 100 ng/ml, kalibrace byla prováděna v rozsahu 1-1000 ng/ml nedeuterovaných standardů.

Správnost a přesnost metody byla vyhodnocena z šesti ihned po sobě následujících měření roztoků standardů o koncentracích 5, 50 a 100 ng/ml, kdy se měření opakovala ve 3 různých dnech. Mez detekce a limit kvantifikace byly vypočítány ze směrnice a standardních odchylek úseků kalibračních přímek.

3.3. Postup úpravy vzorků

Pro úpravu vzorků krevního séra byla použita metoda proteinové precipitace i extrakce pevnou fází. K přípravě vzorků bylo použito lidské sérum zdravých dobrovolníků, do kterého byly přidávány standardy dle potřeby.

Nejprve se sérum ponechalo rozmraznout a přizpůsobit se okolní teplotě, poté bylo řádně promícháno. Pro SPE bylo odebráno 0,4 ml séra, ke kterému byl přidán 1M octan sodný o objemu 0,8 ml. Následující postup vyžadoval úpravu pH zředěného séra na hodnoty 8-9 pomocí 20% roztoku NaOH. Z takto upraveného séra bylo odebráno takové množství, aby po přidání deuterovaného standardu a libovolných

nedeuterovaných standardů s přihlédnutím na požadované výsledné koncentrace, byl celkový objem vzorku 1 ml. Připravený vzorek byl nanesen na prekondicionovanou WCX (Waters Oasis) kolonku. Kondicionace proběhla 1 ml methanolu, 1 ml pufru octanu sodného o pH cca 8. Po nanesení vzorku byla kolonka promyta 1 ml 5% roztoku amoniaku ve vodě a poté již následovala dvou kroková eluce 1 ml methanolu a 1 ml 1M kyseliny chloroctové v ACN. Pro eluci všech antidiabetik byla nutná dvou kroková eluce, která vyžadovala rozrušení dvou typů vazebných interakcí. Methanolem byly rozrušeny hydrofobní interakce a kyselé pH způsobilo rozrušení interakcí iontově-výměnných. Methanolvá frakce byla poté vysušena při laboratorní teplotě pod proudem dusíku do sucha. Frakce s kyselinou chloroctovou obsahující metformin, byla následně převedena do vzorkovnice k vysušené methanolvé frakci, kde došlo pomocí ultrazvuku k rozpuštění odparku. K nástřiku do HPLC systému se odebralo 0,5 ml spojených frakcí, které byly zředěny 0,5 ml deionizované vody.

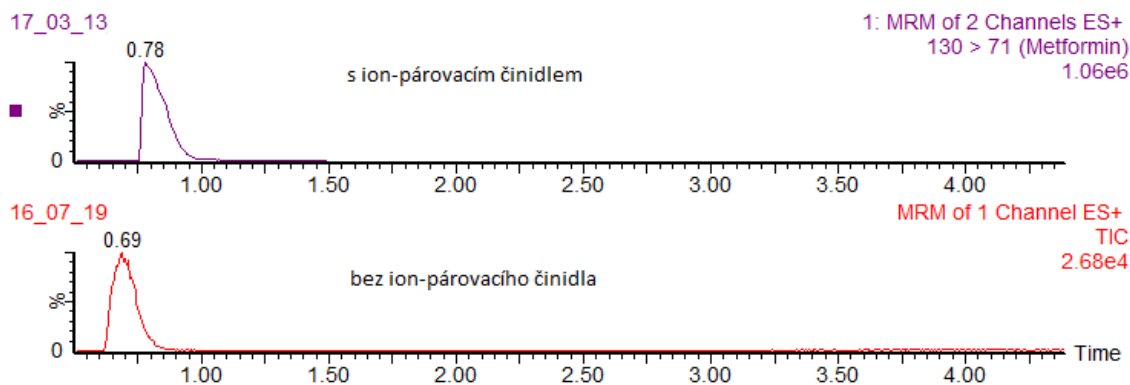
Pro čištění vzorku proteinovou precipitací bylo z rozmraženého krevního séra odebráno 0,5 ml, ke kterému byly přidány standardy (deuter. i nedeuter, viz výše) a takové množství precipitačního činidla, které odpovídá dvojnásobku objemu séra bez objemu přidávaných standardů. Jako precipitační činidlo byl použit acetonitril. Vzorek byl následně řádně protřepán a centrifugován při 14 200 rpm po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Odebraný supernatant byl přefiltrován přes mikrofiltr s velikostní částic 22 μm . Z filtrátu byl odebrán podíl 300 μl , ke kterému bylo přidáno 100 μl deionizované vody. Z takto upraveného vzorku bylo následně 5 μl nastříknuto na chromatografickou kolonu.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Náplní této práce bylo vypracovat vhodnou metodu pro úpravu biologických vzorků krevního séra a pomocí HPLC/MS v daném vzorku stanovit přítomnost a množství jednoho či více antidiabetik. Stanovení více antidiabetik najednou proto, že léčba diabetu velmi často vyžaduje kombinaci různých skupin antidiabetik. Metformin byl vybrán na základě informací z literatury, kde je uváděn jako první volba při stanovení diagnózy diabetu. Další byly sitagliptin, jakožto nejdéle používané ATD ze skupiny gliptinů, glibenklamid, gliclazid a glimepirid jako zástupci nejrozsáhlejší skupiny sulfonylmočovinných preparátů. Hlavním kritériem chromatografické separace bylo zadržení metforminu na chromatografické koloně, což vzhledem k jeho fyzikálně-chemickým vlastnostem (polární molekula, vyjma silně zásaditého prostředí nabitá) může být poměrně komplikované a současně s ním zadržet a dostatečně oddělit další v praxi používaná antidiabetika.

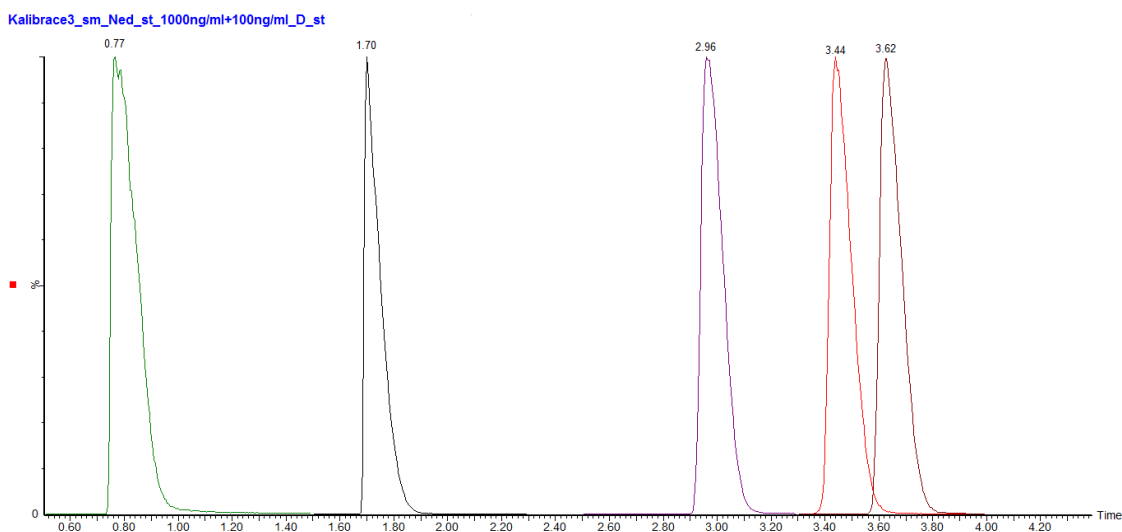
4.1. Chromatografická separace a hmotnostně spektrofotometrická data

Nejprve bylo nutné optimalizovat složení a gradient mobilní fáze, aby byl zadržován jak velmi polární metformin, tak aby od sebe byly dostatečně odděleny další analyty. Počáteční složení mobilní fáze bylo 0,5 % kyseliny mravenčí ve vodě (A) a 0,5% kyselina mravenčí v acetonitrilu (B), gradient začínal na 95 % složky (A) při průtoku 0,4 ml/min. Průtok a délka analýzy (5 min) byly v průběhu hledání ideálních podmínek zachovány, měnilo se převážně množství organické fáze. Nicméně metformin se stále nedařilo na koloně dostatečně dlouho zadržet, proto bylo přistoupeno k přidání ion-párovacího činidla do vodné složky MF. Jako první činidlo byla vyzkoušena 0,05% kyselina m-hydroxybenzoová, nicméně u té nebylo zjištěno žádné zlepšení. Další pak byla kyselina chloroctová, která byla zkoušena ve dvou koncentracích, 0,05 % a 0,1 %, kdy u 0,1% došlo k prodloužení retenčního času (viz **obr. 22**). I přes zlepšení retence metforminu byly hledány vhodnější podmínky jak pro něj, tak pro ostatní látky. Došlo ke změnám v MF (B), kde namísto acetonitrilu byl použit 50% methanol s acetonitrilem za současného zachování 0,5 % HCOOH. Touto obměnou mělo být docíleno lepší separace glibenklamidu od glimepiridu a lepší symetrie píků. Bohužel změna složení MF (B) nepřinesla kýžené výsledky.



Obrázek 22.: Porovnání retenčních časů metforminu před a po přidání kys. chloroctové do MF (A)

A proto bylo dále pracováno s vodou okyselenou CH_2ClCOOH a acetonitrilem s 0,5 % HCOOH , kdy byl hledán nejvhodnější profil gradientu pro dostatečnou separaci vybraných antidiabetik, hlavně glibenklamidu a glimepiridu. Nakonec bylo dosaženo uspokojivých výsledků, které jsou prezentovány v **tabulce III** (viz výše) a chromatografický záznam je zobrazen na **obrázku 23**.



Obrázek 23.: chromatogram separace pěti standardů antidiabetik, koncentrace 1000 ng/ml; R_t 0,77 min metformin, R_t 1,70 min sitagliptin; R_t 2,96 min gliclazid; R_t 3,44 min glibenklamid; R_t 3,62 min glimepirid

V **tabulce IV.** jsou shrnuty retenční časy standardů jak nedeuterovaných, tak deuterovaných, které odpovídají gradientové eluci, jejíž profil je uveden v **tabulce III.**

Tabulka IV.: přehled retenčních časů standardů antidiabetik

Název standardu	Retenční čas (min)
metformin / <i>d6</i>-metformin	0,78 / 0,78
sitagliptin	1,71
gliclazid/ <i>d4</i>-gliclazid	2,99 / 2,98
glibenklamid/ <i>d11</i>-glibenklamid	3,47/ 3,44
glimepirid/ <i>d5</i>-glimepirid	3,66/ 3,65

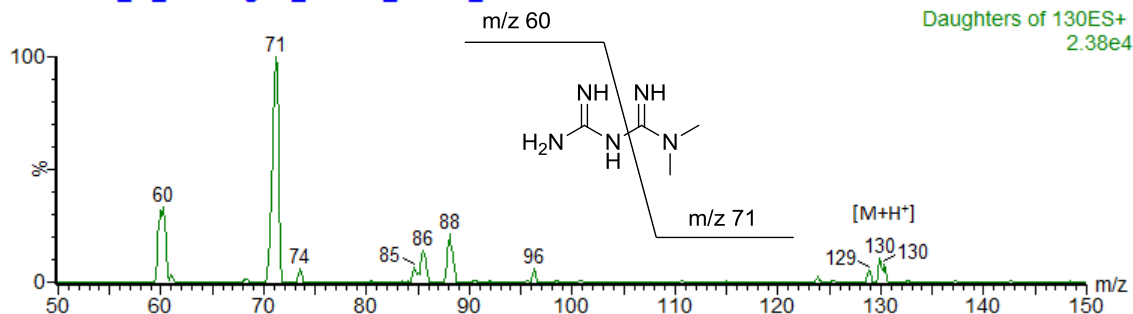
Hmotnostní analyzátor byl nejprve využit pro sběr fragmentačních spekter všech jednotlivých látek včetně jejich deuterovaných standardů. Nejprve bylo nutné vhodně nastavit parametry metody hmotnostního analyzátoru. Jako nejvhodnější se ukázala ionizace elektrosprejem v kladném módu při napětí na sprejovací kapiláře 2,3 kV, teplotou zdroje 150 °C, průtokem desolvatačního plynu 1200 l/h a desolvatační teplotě 500 °C. Také byly optimalizovány hodnoty kolizních energií a napětí na konusu pro jednotlivé standardy, aby byly látky co nejlépe fragmentovány.

Tabulka V.: Přehled MRM přechodů, CE a CV jednotlivých standardů látek

Název standardu	Molekulový iont [M+H ⁺]	Dceřinné ionty <i>m/z</i>	Kolizní energie (V)	Napětí na konusu (V)
metformin	130	71	20	20
<i>d6</i>-metformin	136	60		
sitagliptin	408	235	20	40
gliclazid	324	110	20	40
<i>d4</i>-gliclazid	328	110		
glimepirid	491	126	25	40
<i>d5</i>-glimepirid	496	131		
glibenklamid	494	369	15	20
<i>d11</i>-glibenklamid	505	369		

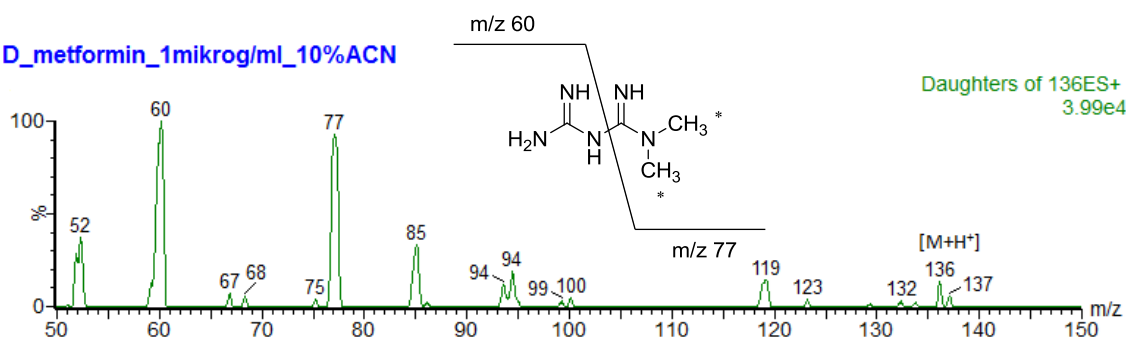
Fragmentační spektra jednotlivých antidiabetik a jejich deuterovaných standardů:

metformin_st_1mikrog/ml_kolona_MSMS_KE20V



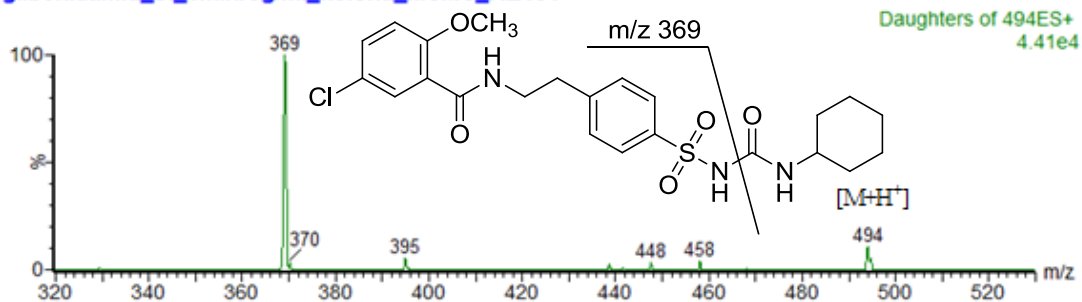
Obrázek 24.: Fragmační spektrum metforminu; molekulový pík m/z 130, nejintenzivnější dceřiný pík m/z 71⁴⁸

D_metformin_1mikrog/ml_10%ACN



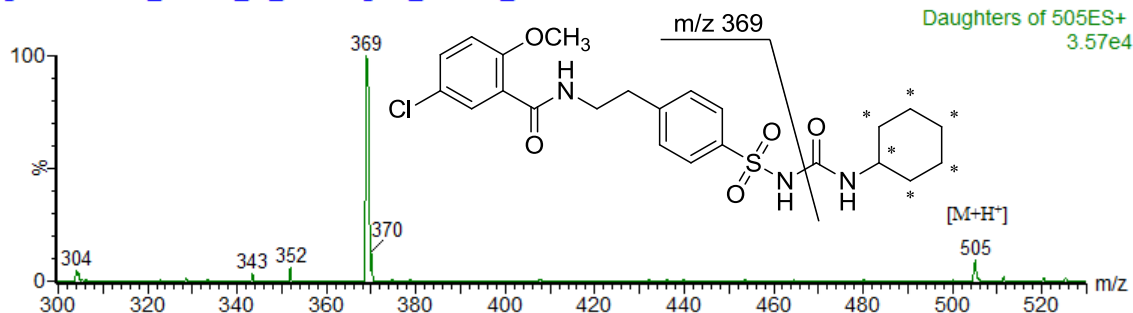
Obrázek 25.: Fragmační spektrum deuterovaného metforminu, hvězdičky u atomů ve struktuře indikují izotopové značení deuteriem; molekulový pík m/z 136, nejintenzivnější dceřiný pík m/z 60

glibenklamid_st_1mikrog/ml_kolona_MSMS_KE15V



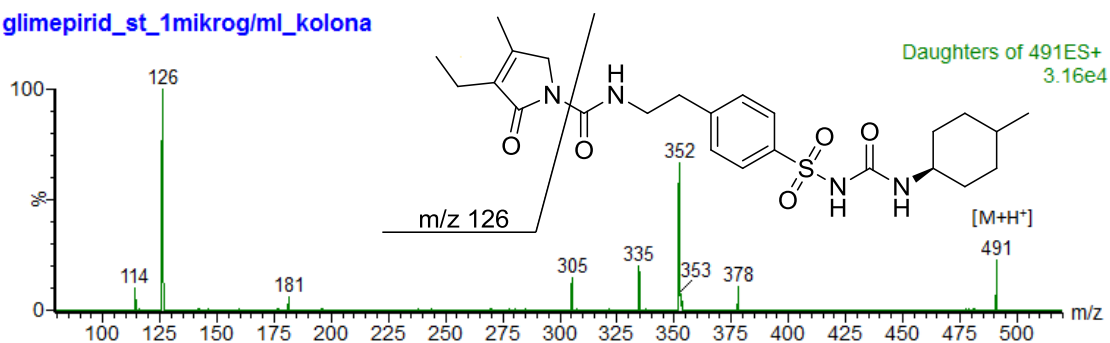
Obrázek 26.: Fragmační spektrum glibenklamidu; molekulový pík m/z 494, nejintenzivnější dceřiný pík m/z 369⁴⁹

glibenklamid_deuter_st_1mikrog/ml_kolona_MSMS



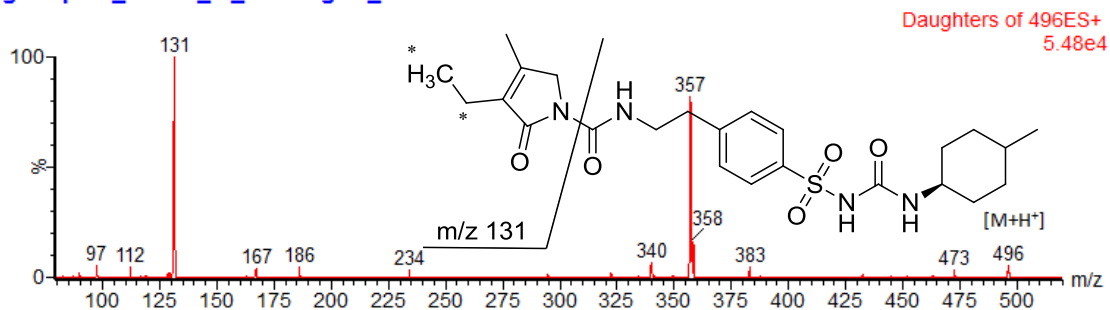
Obrázek 27.: Fragmentační spektrum deuterovaného glibenklamidu, hvězdičky u atomů ve struktuře indikují izotopové značení deuteriem; molekulový pík m/z 505, nejintenzivnější dceřiný pík m/z 369

glimepirid_st_1mikrog/ml_kolona



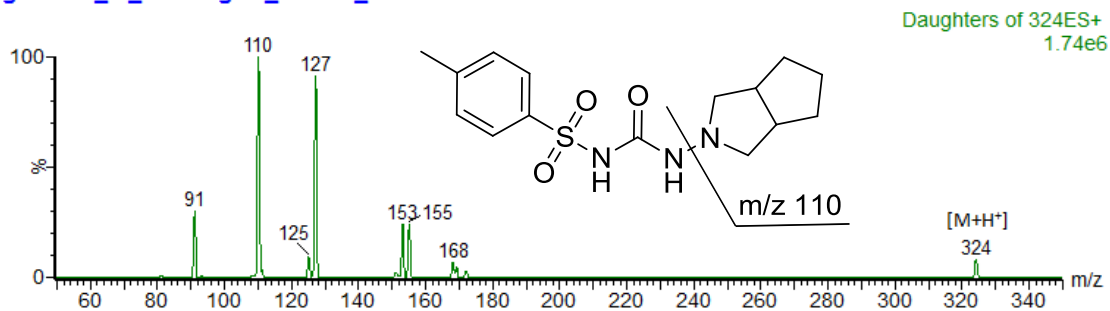
Obrázek 28.: Fragmentační spektrum glimepiridu; molekulový pík m/z 491, nejintenzivnější dceřiný pík m/z 126^{50,51}

glimepirid_deuter_st_1mikrog/ml_MSMS



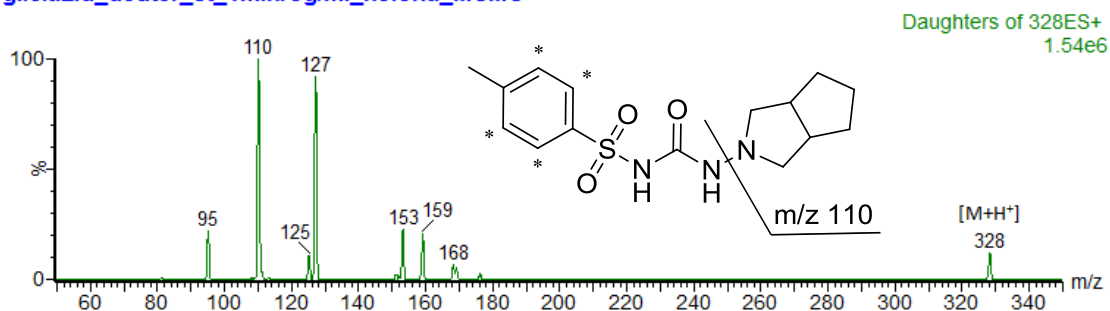
Obrázek 29.: Fragmentační spektrum deuterovaného glimepiridu, hvězdičky u atomů ve struktuře indikují izotopové značení deuteriem; molekulový pík m/z 496, nejintenzivnější dceřiný pík m/z 131

gliclazid_st_1mikrog/ml_kolona_MSMS



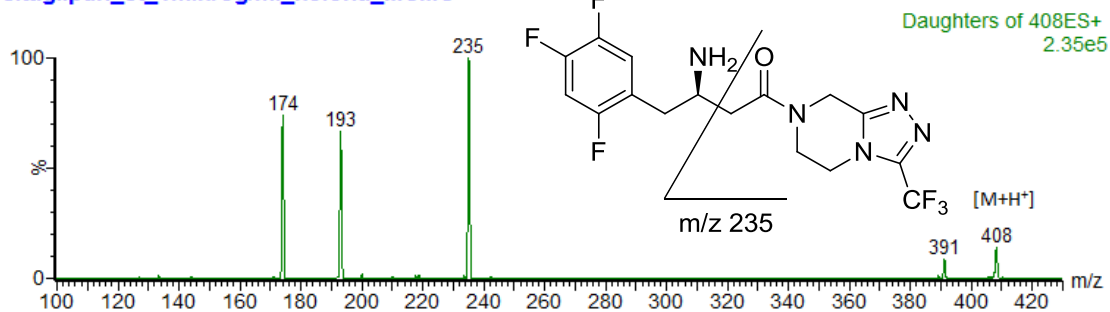
Obrázek 30.: Fragmentační spektrum gliclazidu; molekulový pík m/z 324, nejintenzivnější dceřiný pík m/z 110⁵²

gliclazid_deuter_st_1mikrog/ml_kolona_MSMS



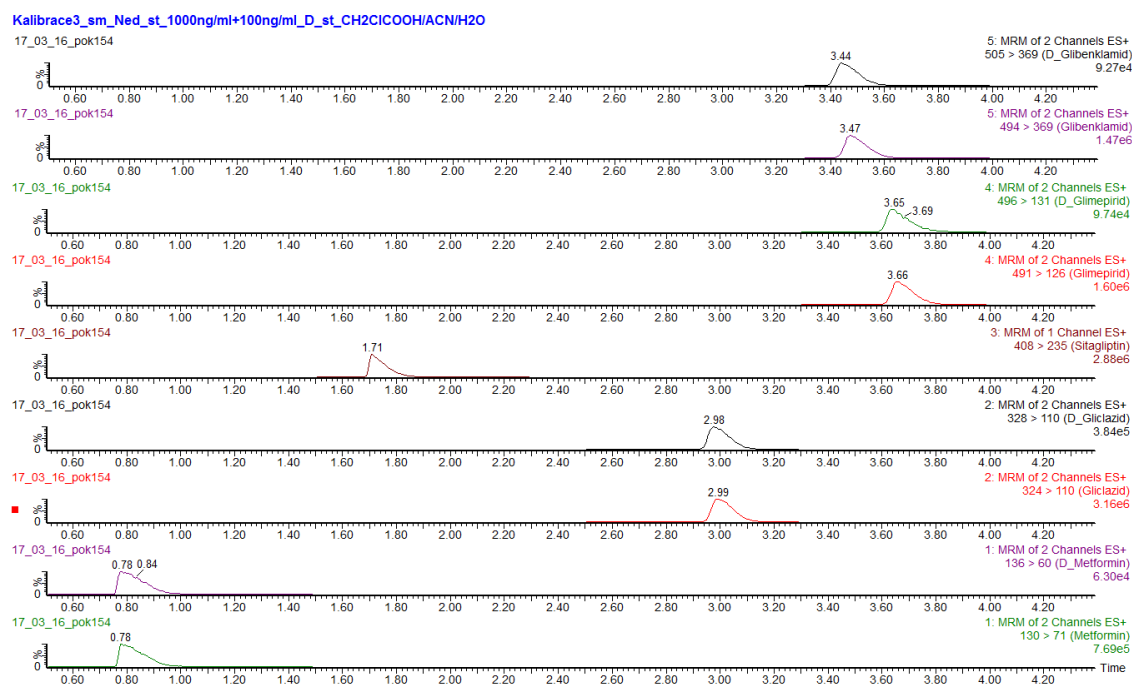
Obrázek 31.: Fragmentační spektrum deuterovaného gliclazidu, hvězdičky u atomů ve struktuře indikují izotopové značení deuteriem; molekulový pík m/z 328, nejintenzivnější dceřiný pík m/z 110

sitagliptin_st_1mikrog/ml_kolona_MSMS



Obrázek 32.: Fragmentační spektrum sitagliptinu; molekulový pík m/z 408, nejintenzivnější dceřiný pík m/z 235⁵³

Na základě těchto informací následně probíhal sběr dat v MRM módu, která byla využita ke kvantifikaci látek ve vzorcích.



Obrázek 33.: ukázka MRM chromatogramu nedeuterovaných antidiabetik o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ a deuterovaných antidiabetik o koncentraci 100 ng/ml

4.2. Vývoj metody úpravy vzorků krevního séra

Pro vývoj metody byly nejprve použity standardy v rozpouštědle a až následně bylo použito krevní sérum, těmito standardy spikované. Jako způsob extrakce antidiabetik byla vybrána extrakce tuhou fází, kdy byly zpočátku testovány 2 typy kolonek, a to Oasis MCX (Mixed-mode Cation eXchange) a Oasis WCX (Weak Cation eXchange). Obecný postup pro SPE je kondicionace a ekvibrace sorbentu, nanášení vzorku, promytí a eluce analytů. Pro zachycení metforminu na SPE kolonce bylo nutné aktivovat iontově výměnné skupiny na pevné fázi, čehož bylo docíleno oplachem pufrům s vhodným pH. Pro WCX kolonku, která obsahuje jako iontoměnič karboxylovou skupinu s pK_a 4,8 je k disociaci potřeba pH alespoň o 2 jednotky vyšší, tj. 6,8. Pro MCX kolonku, kde jsou za výměnu iontů zodpovědné sulfonylové skupiny je třeba aby pH bylo o 2 jednotky nižší než je pK_a analytu. Analyt, který chceme zadržet na základě iontově-výměnných interakcí je metformin, jehož pK_a je rovno 12,4, tj. 10,4. Proto byl pro obě kolonky použit stejný pufr, 1M octan sodný ve vodě s pH cca 8, který

splňuje požadavky obou. Pro promytí byl v obou případech použit daný pufr a dle SPE sorbentu byla použita vhodná eluční činidla, pro WCX kyselá, pro MCX bazická. Nicméně MCX se zdá být od počátku jako nepříliš vhodná varianta, neboť v manuálu se již při nanášení vzorku doporučuje okyselení, aby došlo k protonizaci analytu a pro eluci 5 % roztok amoniaku v methanolu, aby došlo k deprotonizaci analytu, čímž by došlo k uvolnění ze sorbentu. Vzhledem k vlastnostem metforminu, který je kladně nabitý i v bazickém pH není použití MCX vhodnou volbou. Pro další optimalizaci byla tudíž používána kolonka WCX, kde došlo k mnoha obměnám hlavně ve fázi promývání a eluce vzorku.

WCX kolonka byla kondiciována pomocí 1 ml methanolu, ekvilibrována 1 ml pufru pH cca 8 a vzorek byl nanášen rovněž rozpuštěný v pufru o objemu 1 ml. Všechny tyto frakce byly sbírány a analyzovány ke zjištění, zda hlavně ve frakci po nanesení vzorku, nedochází k nedostatečné retenci. Nanášený vzorek obsahoval směs nedeuterovaných standardů o koncentraci 100 ng/ml, k frakcím po průchodu SPE kolonkou byl před analýzou přidán deuterovaný směsný standard o koncentraci 100 ng/ml. Stejně tak bylo jednáno s frakcemi po proplachu a eluci. K jednotlivým frakcím byly deuterované standardy o koncentraci 100 ng/ml přidávány z důvodu vyhodnocování návratnosti, na základě kterého byla hodnocena úspěšnost daného postupu (viz **tabulka VI**). K proplachování byl zpočátku používán pufr, nicméně nakonec byl použit roztok 5 % NH_4OH ve vodě dle postupu výrobce. K eluci bylo zapotřebí kyselého pH a to až o 2 jednotky nižšího než bylo pK_a karboxylových skupin, tj. < 3 . Pro eluci bylo vyzkoušeno mnoho kyselin o různých koncentracích v různých rozpouštědlech, které se potýkaly s mnoha problémy, přes potlačování ionizace, nedostatečnou eluci, či v průběhu dalších úprav eluentu k pravděpodobnému rozkladu analytů. Nakonec byl však vhodný postup pro SPE extrakci a analýzu objeven a aplikován na vzorky krevního séra.

Nalezený obecný postup pro SPE extrakci antidiabetik:

1. Kondicionace 1 ml methanolu
2. Ekvilibrace 1 ml pufru 1M octanu sodného, pH 8
3. Nanesení 1 ml vzorku v pufru, pH cca 8 → frakce 1
4. Promytí kolonky 1 ml 5 % NH_4OH ve vodě → frakce 2
5. Eluce 1 ml methanolu → frakce 3
6. Eluce 1 ml 1M CH_2ClCOOH v ACN → frakce 4

V poslední fázi vývoje metody už byly jímány pouze frakce 3 a 4, které byly následně analyzovány. Postup pro analýzu byl rovněž optimalizován, tak aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků a současně, aby bylo možné analyzovat obě frakce současně, čímž dojde nejen k úspoře času, ale i rozpouštědel. Frakce 3 byla tudíž odfoukána do sucha pod proudem dusíku, při laboratorní teplotě. Po odfoukání bylo do eppendorfky k odparku frakce 3 napipetována frakce 4, ve které byl odparek pomocí ultrazvuku rozpuštěn. Následně bylo ze spojených frakcí odebráno 0,5 ml, který byl přenesen do HPLC vialky k 0,5 ml deionizované vody. Takto připravený vzorek byl následně analyzován.

Tabulka VI.: příklad vyhodnocování návratnosti z eluovaných frakcí 3 a 4

Správná hodnota 10 ng/ml	AUC (Ned)	AUC (Deut)	AUC (Ned)/(D)	X (ng/ml)	návratnost (%)
Metformin	1071	13188	0,0812	10,9	109
Glibenklamid	1554	12857	0,1209	11	110
Glimepirid	1115	5372	0,2076	12	120
Sitagliptin	2966	12857	0,2307	6,4	64
Gliclazid	7582	92090	0,0823	8,1	81

Nalezený postup byl poté aplikován na čisté krevní sérum, které bylo nejprve nutné naspikovat pomocí antidiabetik. Vzhledem k tomu, že sérum má vlastní pufrací kapacitu bylo před nanesením séra na SPE kolonku nutné upravit jeho pH. 1 díl séra se ředil 2 díly pufru, kdy poté bylo pomocí pH papírku změřeno aktuální pH, které se obvykle pohybovalo v hodnotách nižších než požadovaných 8. Z tohoto důvodu bylo nutné pH upravit k čemuž byl používán 20 % roztok NaOH ve vodě. Takto upravený vzorek séra s antidiabetiky, poté mohl být nanesen na WCX kolonku, kde se již dále postupovalo dle výše uvedeného postupu.

Přesto, že původním záměrem bylo pro úpravu vzorků použití SPE kolonek, dodatečně byla vyzkoušena i proteinová precipitace, která si rovněž vyžádala optimalizaci. Pro vysrážení proteinů byla vyzkoušena trifluoroctová kyselina, která vyžadovala vysušení a acetonitril, který byl posléze používán. K séru obsahujícímu

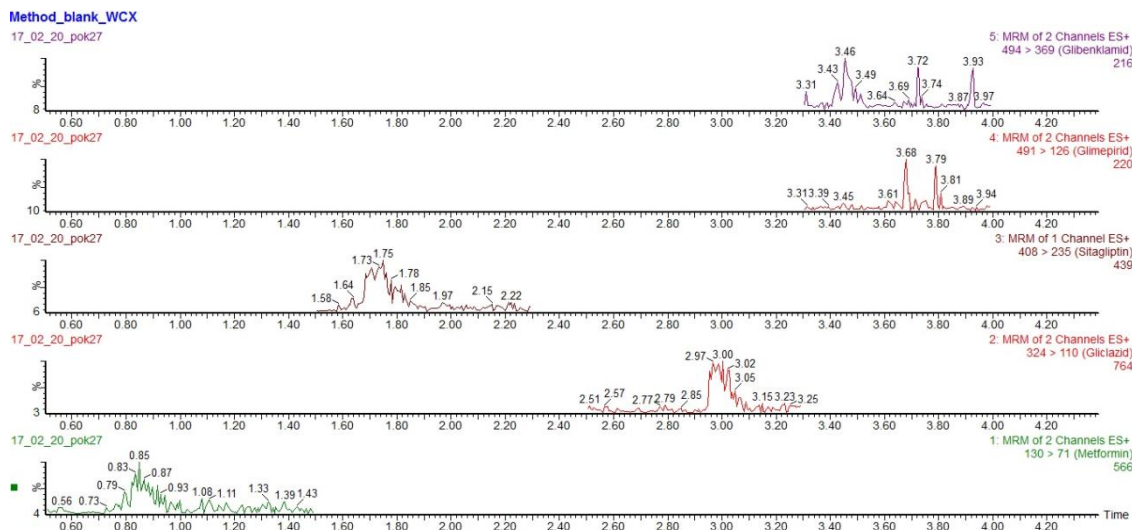
standardy byl přidán acetonitril o dvojnásobném objemu, vzorek byl poté centrifugován při 14 200 rpm, při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Supernatant byl odebrán a přefiltrován přes diskový mikrofiltr. Z filtrátu poté bylo odebráno 0,3 ml, ke kterému bylo přidáno 100 μ l deionizované vody a takto byl nastříknut do systému k analýze. Rovněž u této metody probíhalo vyhodnocování návratnosti (**tabulka VII**).

Tabulka VII.: příklad vyhodnocování návratnosti pro metodu PPT

Správná hodnota 10 ng/ml	AUC (Ned)	AUC (Deut)	AUC (Ned)/(D)	X (ng/ml)	návratnost (%)
Metformin	882	6343	0,1391	17,6	71
Glibenklamid	3270	14954	0,2187	19,9	80
Glimepirid	2483	5960	0,4166	23,6	94
Sitagliptin	8096	14954	0,5414	16,1	64
Gliclazid	18963	93811	0,2021	21,0	84

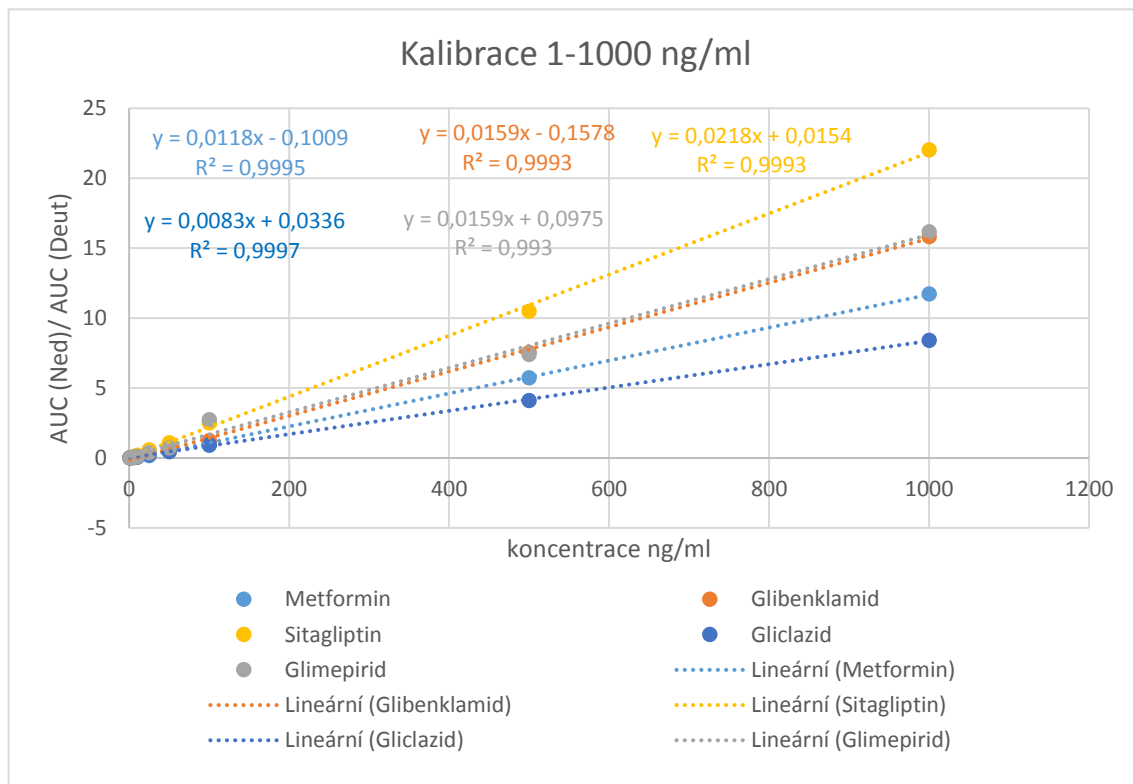
4.3. Validace metody

Metoda byla validována v parametrech specificity, linearity, rozsahu, správnosti, detekčního a kvantifikačního limitu⁵⁴. Pro důkaz *specificity* je přiložen MRM chromatogram krevního séra bez přidaných antidiabetik (obrázek 31), kde v každém chromatogramu je signál pro danou látku zanedbatelný.



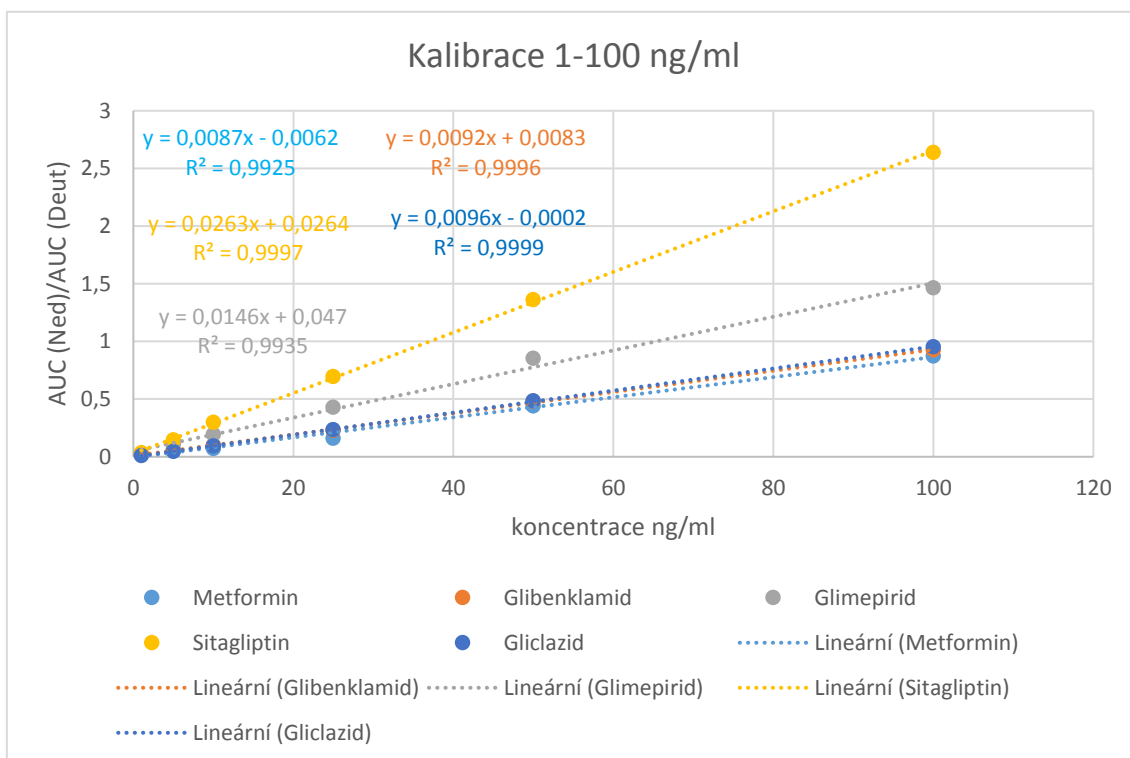
Obrázek 34.: MRM chromatogram blanku krevního séra

Linearita byla vyhodnocena na základě kalibrace v rozsahu koncentrací 1-1000 ng/ml všech nedeuterovaných standardů. Deuterované standardy byly použity jako vnitřní standardy a byly k nim vztaženy plochy píků odpovídajících standardů, kromě sitagliptinu, k němuž nebyl deuterovaný standard k dispozici. Plocha píků sitagliptinu byla tudíž vztahována vždy k ploše píků deuterovaného standardu glibenklamidu. Každá z koncentrací byla měřena 3x. Zásobní roztoky standardů byly ředěny 0,5 M kyselinou chloroctovou v 50% acetonitrilu ve vodě, aby se co nejvíce blížily matrici eluentů po SPE. V případě nutnosti byly vyloučeny odlehlé body. Rovnice přímek a korelační koeficienty jsou uvedeny v grafu a přiřazeny dle barev podle legendy.

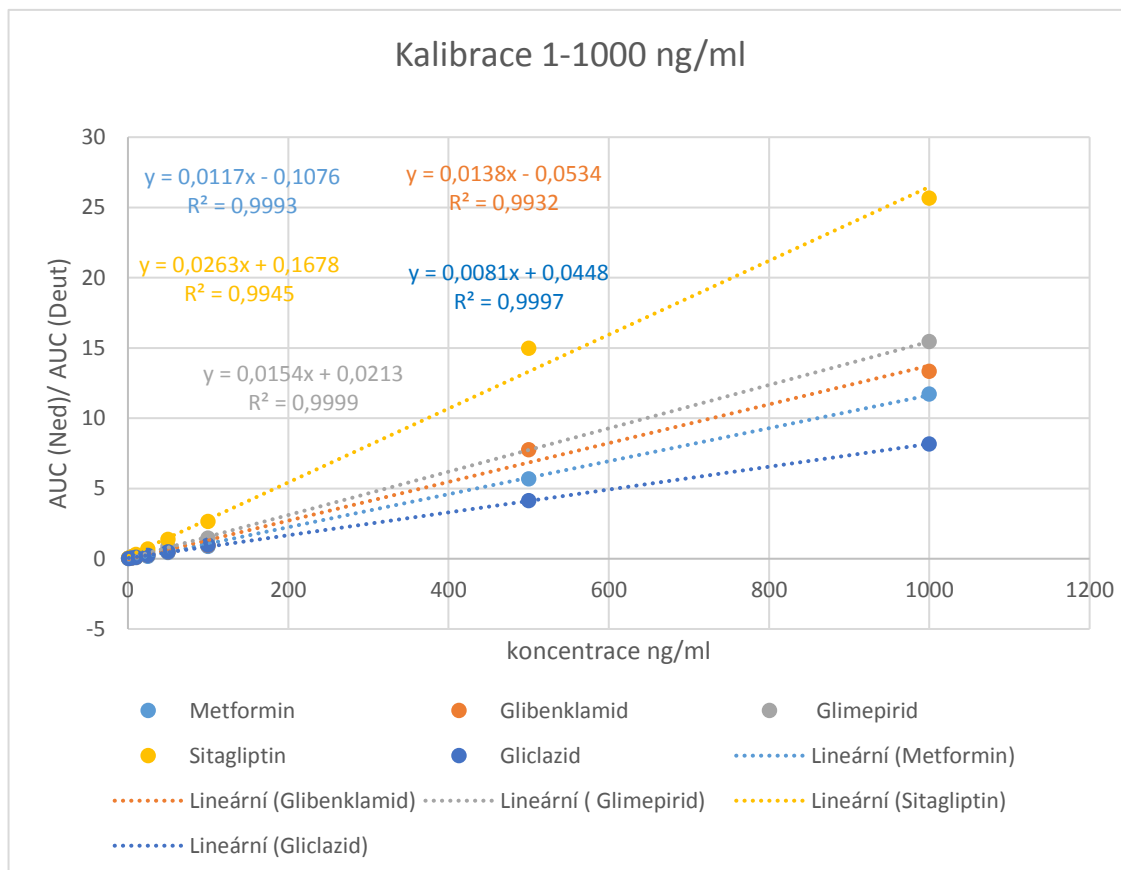


Graf 2.: Kalibrační přímky pěti antidiabetik v rozmezí koncentrací 1-1000 ng/ml

Rozsah metody byl hodnocen na základě měření 3 různých koncentrací v šesti opakováních. Nejnižší koncentrace byla 5 ng/ml, která je nad limitem detekce, jako střední hodnota byla zvolena koncentrace 50 ng/ml a jako nejvyšší hodnota byla vybrána koncentrace 1000 ng/ml. Tyto hodnoty platí pro nastříkované vzorky, tj. po ředění pufrům nebo precipitačním činidlem. Vzhledem k vývoji dvou postupů přípravy vzorků byl rozsah testován pro obě dvě tyto metody. Při vyhodnocování výsledků s nižšími koncentracemi tj. 5 a 50 ng/ml, po dosažení do rovnic přímek v rozsahu 1-1000 ng/ml docházelo k velkým odchylkám, proto vzorky byly vyhodnocovány dle zkráceného rozsahu kalibrace 1-100 ng/ml. Vzorek s koncentrací 1000 ng/ml byl vyhodnocen dle rovnic přímek z kalibrace v celém rozsahu. Deuterované standardy byly do vzorku přidány před jeho jakoukoli úpravou o takové koncentraci, aby v nastříkovaném vzorku byla koncentrace 100 ng/ml.



Graf 3.: kalibrace v rozsahu koncentrací 1-100 ng/ml pro vyhodnocení rozsahu metody



Graf 4.: Kalibrace v rozsahu koncentrací 1-1000 ng/ml pro vyhodnocení rozsahu metody

Tabulka VIII.: Vyhodnocení výsledků pro postup extrakce pomocí SPE

Koncentrace	5 ng/ml		50 ng/ml		1000 ng/ml	
	x	správnost %	x	správnost %	x	správnost %
Metformin	9,52	190	55,6	111	972	97
Glibenklamid	9,81	196	59,4	119	1084	108
Glimepirid	7,65	153	55,2	110	1011	101
Sitagliptin	4,41	88	34,1	68	650	65
gliclazid	7,01	140	50,0	100	850	85

Při koncentraci 5 ng/ml dochází v měření k velké chybě, a to u všech vyhodnocovaných antidiabetik. U koncentrace 50 ng/ml je naměřená hodnota nejdále od správné v případě sitagliptinu, což může být ovlivněno vztahováním ploch píků k jinému deuterovanému standardu, než sitagliptinu, který není k dispozici. Totéž se dá říct při koncentraci vzorku 1000 ng/ml, kde je naměřená hodnota sitagliptinu nejnižší, kdežto ostatní se pohybují v rozmezí 85-108 %.

Tabulka IX.: Vyhodnocení výsledků pro postup proteinové precipitace

Koncentrace	5 ng/ml		50 ng/ml		1000 ng/ml	
	x	správnost %	x	správnost %	x	správnost %
Metformin	8,14	163	58,4	117	1003	100
Glibenklamid	5,15	103	51,5	103	919	92
Glimepirid	2,72	54	52,6	105	740	74
Sitagliptin	3,62	72	39,5	79	690	69
gliclazid	5,32	106	51,1	102	993	99

Opět je při vyhodnocování koncentrace vzorku obsahujícího teoretickou koncentraci 5 ng/ml velká chyba. Při koncentraci 50 ng/ml je největší odchylka od teoretické koncentrace zaznamenána opět u sitagliptinu. U vzorku obsahujícího antidiabetika v koncentraci 1000 ng/ml, je nejnižší vypočítaná hodnota rovněž u sitagliptinu, nicméně i glimepirid má v tomto případě poněkud nižší hodnotu.

V rámci *opakovatelnosti* byly měřeny 3 různé koncentrace vzorků v 6 opakováních pro oba způsoby přípravy vzorků. Koncentrace byly znovu 5 ng/ml, 50 ng/ml a 1000 ng/ml.

Tabulka X.: vyhodnocení opakovatelnosti pro 6 měření pro 3 různé koncentrace antidiabetik ve vzorcích zpracovaných pomocí SPE

SPE	5 ng/ml	50 ng/ml	1000 ng/ml
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
Metformin	2,4	2,7	2,6
Glibenklamid	1,9	1,8	0,8
Glimepirid	2,6	2,8	3,6
Sitagliptin	1,7	2,5	1,5
Gliclazid	1,7	0,8	0,8

Tabulka XI.: vyhodnocení opakovatelnosti pro 6 měření pro 3 různé koncentrace antidiabetik ve vzorcích zpracovaných pomocí PPT

PPT	5 ng/ml	50 ng/ml	1000 ng/ml
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
Metformin	6,6	4,3	3,2
Glibenklamid	4,7	1,4	1,5
Glimepirid	3,6	1,6	2,7
Sitagliptin	3,3	1,6	1,6
Gliclazid	2,1	0,8	0,4

Vzorky o 3 koncentracích, při 6 opakováních byly měřeny ve 3 různých dnech. Z výsledků těchto analýz byla stanovena *mezilehlá preciznost* pro každou koncentraci a každé antidiabetikum.

Tabulka XII.: vyhodnocení mezilehlé preciznosti jednotlivých antidiabetik ve třech různých koncentracích, k úpravě vzorku byla použita SPE metoda

SPE	5 ng/ml	50 ng/ml	1000 ng/ml
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
Metformin	12	3,7	1,5
Glibenklamid	10	5,4	3,0
Glimepirid	21	7,7	11
Sitagliptin	18	8,6	11
Gliclazid	7,6	0,8	8,6

Tabulka XIII.: vyhodnocení mezilehlé preciznosti jednotlivých antidiabetik ve třech různých koncentracích, k úpravě vzorku byla použita metoda PPT

PPT	5 ng/ml	50 ng/ml	1000 ng/ml
	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
Metformin	14	2,2	1,6
Glibenklamid	13	7,0	12
Glimepirid	33	5,3	25
Sitagliptin	26	9,5	16
Gliclazid	14	0,9	2,0

Dalším vyhodnocovaným parametrem metody byly *limity detekce (DL)* a *kvantifikace (QL)* jednotlivých antidiabetik. Tyto hodnoty byly vypočítány na základě regrese 9 naměřených hodnot při 3 nejnižších koncentracích (1, 5 a 10 ng/ml) standardů dané kalibrace. Získané hodnoty směrodatných odchylek úseků (σ) a směrníc přímek (S), pak byly dosazeny do vzorců pro výpočty:

$$DL = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

$$QL = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

Tabulka XIV.: Limity detekce a kvantifikace jednotlivých stanovovaných antidiabetik

	DL (ng/ml)	QL (ng/ml)
Metformin	1,22	3,70
Glibenklamid	0,90	2,72
Glimepirid	0,99	3,01
Sitagliptin	0,90	2,72
Gliclazid	0,79	2,39

4.4. Vyhodnocení analýz vzorků

Na základě literatury ^{34, 35}, ve které se uvádí vhodné kombinace perorálních antidiabetik, byly připraveny modelové vzorky séra obsahující různá antidiabetika o různých koncentracích.

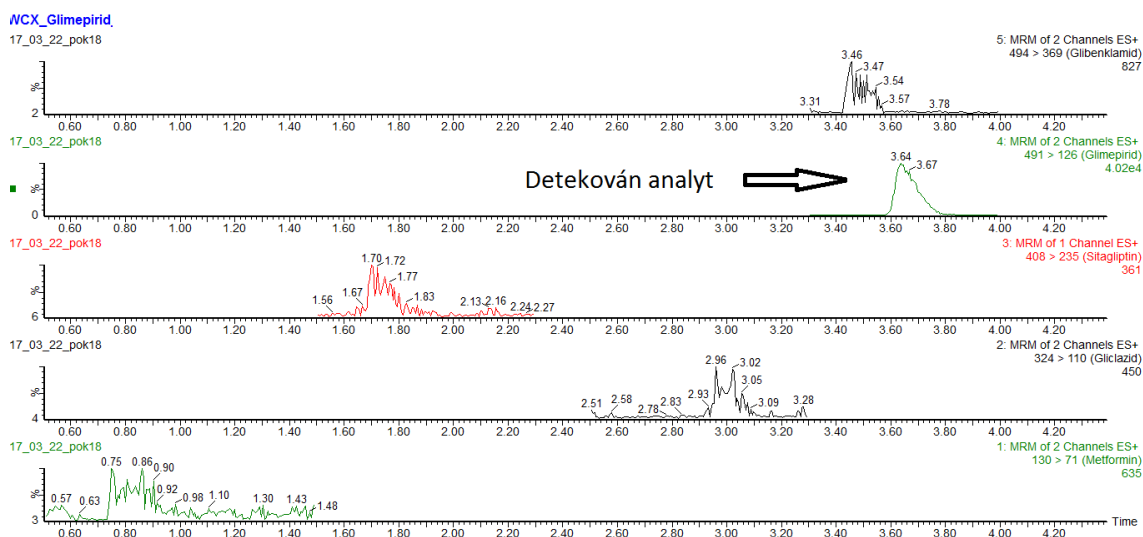
Vzorek 1.:

Úprava vzorku proběhla jak metodou SPE, tak PPT. Ke vzorku byl přidán vnitřní deuterovaný standard o koncentraci 100 ng/ml. Jako analyt byl detekován pouze glimepirid, jehož obsah byl stanoven na základě dosažení hodnot poměru ploch analytu a jeho vnitřního standardu do příslušné rovnice přímky:

$$y = 0,0174x - 0,0175$$

Tabulka XV.: vyhodnocení výsledků vzorku 1

glimepirid	y	RSD (%)	x (ng/ml)	RSD	zohlednění
	(Ned/D)	(Ned/D)		(ng/ml)	ředění (ng/ml)
SPE	0,268	1,7	16	0,3	104
PPT	0,611	4,6	36	1,7	144



Obrázek 35.: chromatogram vzorku 1, metoda SPE, detekován Glimepirid

Vzorek 2.:

Vzorek opět podstoupil 2 metody zpracování. V tomto případě byla ve vzorku detekována 2 antidiabetika, a to metformin a sitagliptin. Na základě příslušných rovnic přímek byly stanoveny jejich koncentrace ve vzorku:

$$\text{metformin:} \quad y = 0,079x + 0,02$$

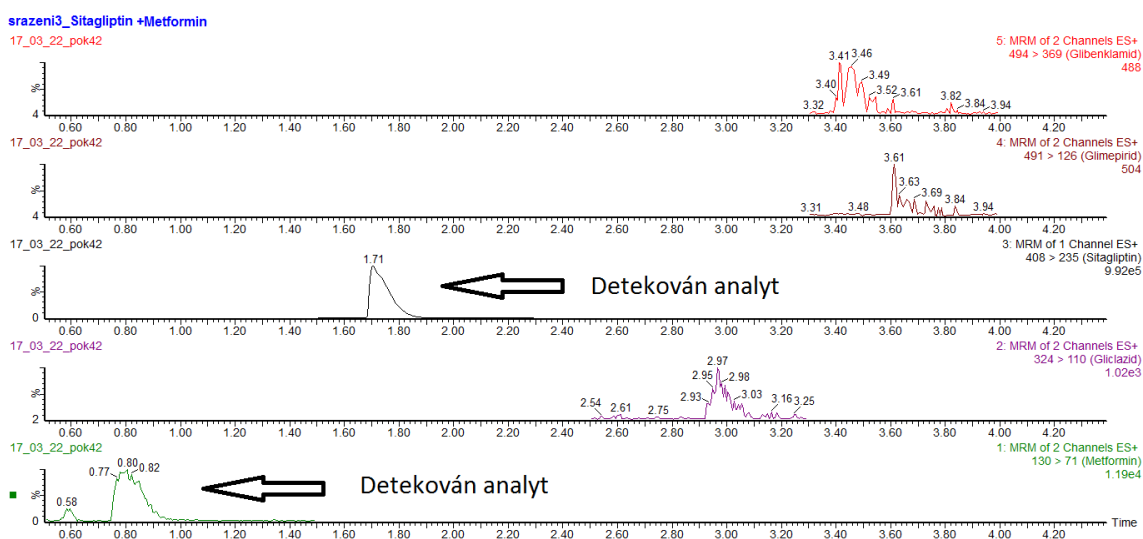
Tabulka XVI.: vyhodnocení výsledků vzorku 2 pro metformin

metformin	y (Ned/D)	RSD (%)	x (ng/ml)	RSD (ng/ml)	zohlednění ředění (ng/ml)
SPE	0,403	0,01	51	1,2	314
PPT	0,359	0,01	45	1,0	361

$$\text{sitagliptin:} \quad y = 0,0232x + 0,2026$$

Tabulka XVII.: vyhodnocení výsledků vzorku 2 pro sitagliptin

sitagliptin	y (Ned/D)	RSD (%)	x (ng/ml)	RSD (ng/ml)	zohlednění ředění (ng/ml)
SPE	9,0084	2,7	380	1,7	2310
PPT	11,822	2,2	501	0,89	4008



Obrázek 36.: chromatogram vzorku 2, metoda PPT, detekovány metformin a sitagliptin

Vzorek3.:

V analýzách obou vzorků, připravených 2 metodami, byly shodně nalezeny metformin a glibenklamid.

metformin: $y = 0,074x - 0,0588$

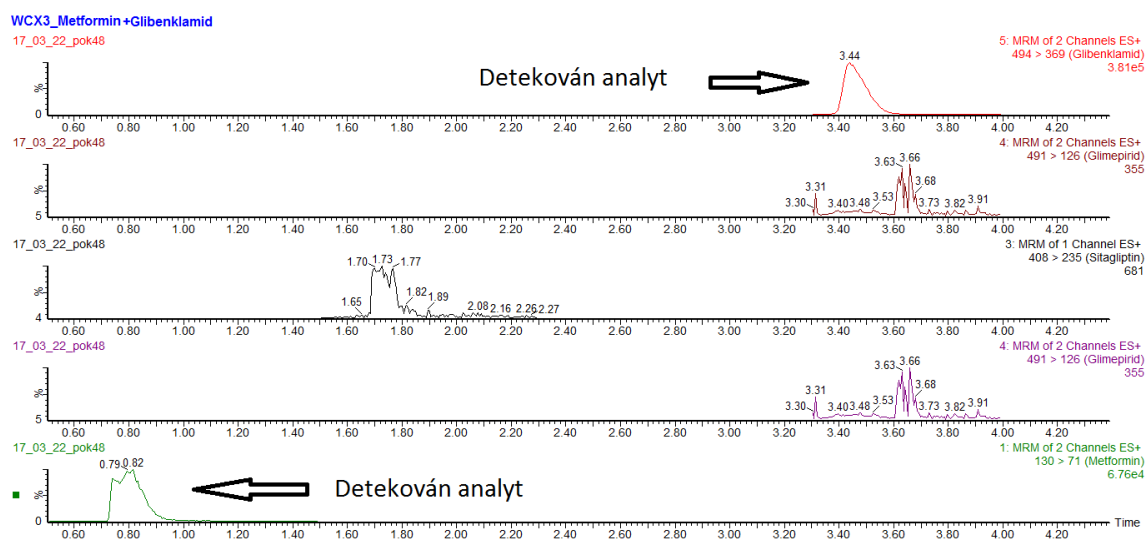
Tabulka XVIII.: vyhodnocení výsledků vzorku 3 pro metformin

metformin	y (Ned/D)	RSD (%)	x (ng/ml)	RSD (ng/ml)	zohlednění ředění (ng/ml)
SPE	1,4839	3,5	189	6,6	1155
PPT	1,2414	4,0	158	6,3	1265

glibenklamid: $y = 0,014x + 0,059$

Tabulka XIX.: vyhodnocení výsledků vzorku 3 pro glibenklamid

glibenklamid	y (Ned/D)	RSD (%)	x (ng/ml)	RSD (ng/ml)	zohlednění ředění (ng/ml)
SPE	4,4600	2,0	314	6,2	1920
PPT	4,8776	0,2	344	0,8	2760



Obrázek 37.: chromatogram vzorku 3, metoda SPE, detekovány metformin a glibenklamid

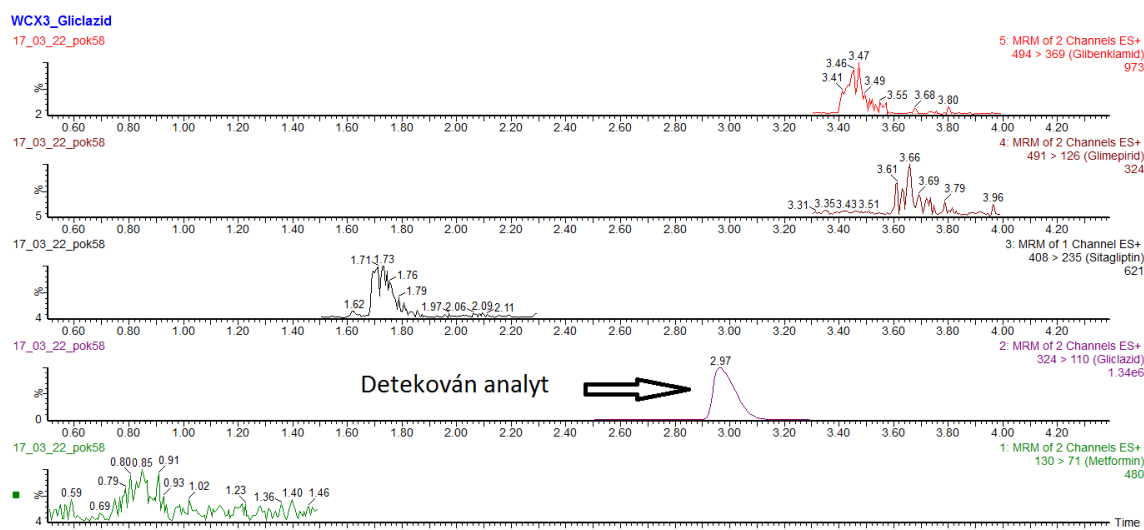
Vzorek 4.:

V posledním vzorku byl identifikován pouze Gliclazid. Vzorky byly upraveny jak pomocí SPE, tak pomocí PPT.

$$\text{gliclazid:} \quad y = 0,0094x + 0,0339$$

Tabulka XX.: vyhodnocení výsledků vzorku 3 pro glibenklamid

gliclazid	y (Ned/D)	RSD (%)	x (ng/ml)	RSD (ng/ml)	zohlednění ředění (ng/ml)
SPE	3,0192	0,2	318	0,7	1944
PPT	2,9218	0,6	307	1,8	2448



Obrázek 38.: chromatogram vzorku 4, metoda SPE, detekován gliclazid

Vzhledem k tomu, že vzorky byly modelové, je pro každý vzorek známá skutečná hodnota koncentrace jednotlivých antidiabetik v séru, před samotnými úpravami vzorku. V **tabulce XXI.** jsou tedy uvedeny skutečné hodnoty pro každý vzorek a správnost vyhodnocení vyjádřená jako relativní chyba stanovení.

Tabulka XXI.: Skutečné hodnoty koncentrace standardů a správnost metod

	Skutečná hodnota (ng/ml)	Správnost Metoda SPE	Správnost Metoda PPT
Vzorek 1 (glimepirid)	140	75 %	103 %
Vzorek 2 (metformin; sitagliptin)	320; 3000	97 %; 77 %	113 %; 134 %
Vzorek 3 (metformin; glimepirid)	1100; 2000	105 %; 96 %	115 %; 138 %
Vzorek 4 (gliclazid)	2400	81 %	102 %

5. ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na vývoj pracovního postupu pro úpravu vzorků krevního séra ke stanovení pěti zástupců perorálních antidiabetik. Nedílnou součástí této práce byl vývoj analytické metody pro stanovení těchto léčivých látek.

Před zahájením vývoje zpracování vzorku bylo nejprve nutné vyvinout vhodnou separační a analytickou metodu. Antidiabetika byla separována metodou ultraúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Analyty byly ionizovány elektrosprejem v kladném módu a jejich kvantifikace byla umožněna na základě sběru dat v „multiple reaction monitoring“ módu. Separace antidiabetik byla komplikována fyzikálně-chemickými vlastnostmi metforminu, který je velmi polární, a proto bylo obtížné dosáhnout retence na chromatografické koloně. Nesnadné bylo také dostatečně rozdělit glimepirid od glibenklamidu. K separaci byla využita kolona Acclaim RSLC 120 s nepolárním sorbentem. Retence metforminu bylo dosaženo na základě přidavku ion-párovacího činidla do mobilní fáze, oddělení dvou výše zmíněných látek bylo dosaženo vhodnou gradientovou elucí.

Prvotním záměrem bylo vyvinout postup úpravy vzorků pomocí extrakce tuhou fází, nicméně byla nakonec vyvinuta i metoda precipitace proteinů. Postup pro SPE odpovídá obecnému schématu - kondicionace, ekvilibrace, nanesení vzorku, promytí a eluce. Ke kondicionaci byl využíván methanol, k ekvilibraci 1M octan sodný ve vodě (pH 8), k promytí 5% NH_4OH , k eluci methanol s 1M CH_2ClCOOH v acetonitrilu. Všechna rozpouštědla včetně vzorku byla nanášena v objemu 1 ml. Pro účely extrakce tuhou fází byl využit nepolární sorbent derivatizovaný karboxylovými skupinami, které umožňují iontovou výměnu. Pod podmínkou vhodného pH, jehož hodnota činila 8, byl tudíž zadržen i kladně nabitý metformin. Vzhledem k tomu, že elucí byly získány dvě frakce obsahující analyty, bylo nutné najít vhodný způsob jejich spojení za účelem jedné analýzy. Tohoto požadavku bylo docíleno odpařením methanolu pomocí proudu dusíku za laboratorní teploty a následného převedení celého objemu frakce s chloroctovou kyselinou do vysušené vzorkovnice. Ze spojených frakcí byla odebrána alikvotní část, která byla v poměru 1:1 (v/v) naředěna deionizovanou vodou a nastříknuta do chromatografického systému. Účinnost postupu byla vyhodnocována na základě stanovení návratnosti.

Druhou metodou pro úpravu vzorků séra byla proteinová precipitace. Jako precipitační činidlo byl použit acetonitril v dvojnásobném objemu proti séru. Po řádném

promíchání a centrifugaci byl supernatant přefiltrován přes diskový mikrofiltr a v poměru 3:1 naředěn vodou a injektován. I zde byla vyhodnocována návratnost.

Metoda byla validována s ohledem na specifitu, linearitu, rozsah, opakovatelnost, limit detekce a kvantifikace a aplikována na analýzu modelových vzorků. Limity detekce byly stanoveny v rozsahu 0,79-1,22 ng/ml. Limity kvantifikace se pohybovaly v rozmezí 2,39-3,70 ng/ml. Linearita byla prokázána v koncentračním rozsahu 1-1000 ng/ml. Opakovatelnost byla vyhodnocována na základě 6 měření na třech koncentračních úrovních (5, 50 a 1000 ng/ml), směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 0,2-2,8 % pro metodu SPE a 0,4-6,6 % pro metodu PPT. Mezilehlá preciznost byla rovněž vyhodnocena pro obě metody, kdy směrodatná odchylka pro SPE se pohybovala v hodnotách 1,5-21 % a PPT 1,3-33 %. Vyšší hodnoty směrodatné odchylky u mezilehlé preciznosti i opakovatelnosti byly v obou metodách zaznamenány především u nejnižší koncentrace 5 ng/ml.

Modelové vzorky byly zpracovávány oběma metodami za účelem vyhodnocení obsahu jednotlivých antidiabetik. Vzhledem k tomu, že vzorky byly připraveny v laboratoři a byla tedy známá skutečná koncentrace analytů ve vzorcích, mohla být rovněž vyhodnocena správnost obou metod. Precipitační metoda je jednoznačně časově i materiálně méně náročná. Nicméně i přes to, že se supernatant filtruje je zde velká pravděpodobnost, že se větší částice mohou dostat do systému a zanést tak chromatografickou kolonu či ochrannou předkolonku. Z tabulky XXI. rovněž vyplývá, že metoda proteinové precipitace pravděpodobně výsledky nadhodnocuje. Postup extrakce tuhou fází je oproti precipitační metodě nákladnější a zpracování vzorku je zdlouhavější a to hlavně díky potřebě odpařovat methanol. Výhodou naopak je účinnější odstranění interferujících látek. Pokud bychom porovnávali výsledky obou metod dle tabulky XXI., která reprezentuje většinu získaných dat, lze říci, že výsledky získané ze vzorků upravených metodou SPE se více blíží skutečným hodnotám.

6. ZDROJE

- 1) Global Pharmaceutical Industry - Statistics & Facts. • *Statista - The Statistics Portal for Market Data, Market Research and Market Studies* [online]. [cit. 20.11.2016]. Dostupné z: <https://www.statista.com/topics/1764/global-pharmaceutical-industry/>
- 2) Diabetes mellitus – WikiSkripta. [online]. [cit. 20.11.2016]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Diabetes_mellitus
- 3) HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 2., rozš. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-639-5.
- 4) Prasanna A. Datar; *Journal of Pharmaceutical Analysis* (2015), 5, 213-222.
- 5) NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Klatovy: Michal Douša, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- 6) Naudiyal, Rahul; Kumar, Praveen; Kothiyal, Preeti; *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences* (2014), 3(4), 321-330.
- 7) Murugan, S.; Pravallika, N.; Sirisha, P.; *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* (2013), 6(1), 41-45.
- 8) Klapková E.; *Klinická Biochemie Metabolismu* (2011), 19(40), 5-8.
- 9) Fang, Nianbai; Yu, Shangong; Ronis, Martin J. J.; *Experimental Biology and Medicine* (2015), 240(4), 488-497.
- 10) Ashri Nadia Y; Abdel-Rehim Mohamed; *Bioanalysis* (2011), 3(17), 2003-18.
- 11) Bourgogne Emmanuel; Grivet Chanta; *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* (2015), 102, 290-8.
- 12) NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- 13) Guglya, E. B.; *Pharmaceutical Chemistry Journal* (2014), 48(8), 489-498.
- 14) 2mL Protein Precipitation Plate wth Grated Screen (60223) - Analytical Sales and Services, Inc.. *Analytical Sales and Services, Inc.* [online]. Copyright © 2017 Analytical Sales and Services, Inc. [cit. 20.03.2017]. Dostupné z: <http://www.analytical-sales.biz/60223/>

- 15) Pierce Protein Precipitation Plates - Thermo Fisher Scientific. [online].
[cit. 20. 03. 2017]. Dostupné z:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/90036>
- 16) Jemal, Mohammed; *Biomedical Chromatography* (2000), 14(6), 422-429.
- 17) Li, Kong M.; Rivory, Laurent P.; *Current Pharmaceutical Analysis* (2006), 2(2), 95-102.
- 18) Jemal, Mohammed; *Biomedical Chromatography* (2000), 14(6), 422-429.
- 19) GIOVANETTI, M. H., et al. Chromatography—the most versatile method of chemical analysis. *InTech*; ISBN 978-953-51-0813-9, 438.
- 20) Yawney J; Treacy S; Hindmarsh K W; Burczynski F J; *Journal of analytical toxicology* (2002), 26(6), 325-32.
- 21) Francis, Jose; Dubashi, Biswajit; Sundaram, Rajan; *World Journal of Pharmaceutical Research* (2014), 3(5), 1067-1075.
- 22) Shang De-Wei; Wang Zhan-Zhang; Ni Xiao-Jia; *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* (2015), 80(7), 998-999.
- 23) Hasan Mahmoud; Schumacher Gitta; Seekamp Anne; *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* (2014), 100, 341-7.
- 24) Wong, April S. Y.; Ho, Emmie N. M.; Wan, Terence S. M.; *From Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2015), 998-999, 1-7.
- 25) Moreno-Vicente, Raquel; Fernandez-Nieva, Zurine; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2015), 114, 105-112.
- 26) Rook, Elisabeth J.; Hillebrand, Michel J. X.; *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2005), 824(1-2), 213-221.
- 27) Zhao, Miao; Wu, Xiao-Jie; Fan, Ya-Xin; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2016), 124, 303-308.
- 28) Gobin, Patrice; Lemaitre, Florian; Marchand, Sandrine; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2010), 54(5), 1941-1948.
- 29) Jansson B., Karvanen M., Cars, O.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2009), 49(3), 760-767.

- 30) Arinobu, Tetsuya; Hattori, Hideki; Iwai, Masae; *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2002), 776(1), 107-113.
- 31) KAREN, Igor, Štěpán SVAČINA a Jan ŠKRHA. *Diabetes mellitus: doporučený postup péče o pacienty s diabetes mellitus : [novelizace 2013]*. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, c2013. Doporučené postupy pro všeobecné praktické lékaře. ISBN 978-80-86998-61-9.
- 32) Diabetes mellitus (zkr. DM) | Velký lékařský slovník On-Line. *Výrazy od a /Velký lékařský slovník On-Line* [online]. Copyright © Maxdorf 1998 [cit. 11.04.2017]. Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/diabetes-mellitus-zkr-dm-11>
- 33) Milan Flekač; *Medicína Pro Praxi* (2009), 6(3), 140-143.
- 34) Jana Bělobrádková; *Klinická Farmakologie a Farmacie* (2006), 20(1), 16-18.
- 35) Alena Šmahelová; *Interní Medicína* (2009), 11(4), 155-158.
- 36) DeFronzo, Ralph A.; *Annals of Internal Medicine* (1999), 131(4), 281-303.
- 37) Krentz, Andrew J.; Bailey, Clifford J.; *Drugs* (2005), 65(3), 385-411.
- 38) Stumvoll, Michael; Goldstein, Barry J.; van Haefen, Timon W.; *Lancet* (2005), 365(9467), 1333-1346.
- 39) Český lékopis 2009, 2. díl; ISBN 978-80-247-2994-7; Grada Publishing, a.s.; U průhonu 22, Praha 7.
- 40) Inzulin – Wikipedie. [online]. [cit. 04.04.2017]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Inzulin>
- 41) Scott, Lesley J.; *Drugs* (2012), 72(2), 249-272.
- 42) Terezie Pelikánová; *Interní medicína pro praxi* (2005); 5(10), 491-495.
- 43) Marcela Szabó; *Interní Medicína pro praxi* (2013), 15(2): 49-50.
- 44) Salem, Isam Ismail; Idrees, Jafer; Al Tamimi, Jaafar I.; *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2004), 799(1), 103-109.
- 45) Polagani, Srinivasa Rao; Pilli, Nageswara Rao; Gajula, Ramakrishna; *Journal of Pharmaceutical Analysis* (2013), 3(1), 9-19.
- 46) Mistri, Hiren N.; Jangid, Arvind G.; Shrivastav, Pranav S.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2007), 45(1), 97-106.
- 47) Shah, Priyanka A.; Shah, Jaivik V.; Sanyal, Mallika; Shrivastav, Pranav S.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2016), 131, 64-70.

- 48) Collin, F., Khoury, H., Bonnefont-Rousselot; (2004) *Journal of mass spectrometry*, 39(8), 890-902.
- 49) Radjenović, J., Pérez, S., Petrović, M.; (2008) *Journal of Chromatography A*, 1210(2), 142-153.
- 50) Thevis, M., Geyer, H., & Schänzer, W; (2005) *Rapid communications in mass spectrometry*, 19(7), 928-936.
- 51) Shigemi, K. A. I., ISHIKAWA, K., Hajime, I. T. O.; (2015) *Chromatography*, 36(1), 19-24.
- 52) Zayed, M. A., El-Dien, F. N., Hawash, M. F.; (2010) *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 102(1), 305-312.
- 53) Nirogi, R., Kandikere, V., Mudigonda, K.; (2008) *Biomedical Chromatography*, 22(2), 214.
- 54) *U S Food and Drug Administration Home Page* [online]. Copyright © [cit. 19.04.2017]. Dostupné z:
<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073384.pdf>

7. SEZNAM ZKRATEK

ATD - antidiabetikum

ATP - adenosin trifosfát

C₁₈ - sorbent na bázi silikagelu s vázanými oktadecylovými skupinami

C₈ - sorbent na bázi silikagelu s vázanými oktanovými skupinami

CPHP - 4-(4-chlorfenyl)-4-hydroxypiperidin

Čr - Česká republika

DAM - diacetylmorfin

DL - limit detekce

DM - Diabetes mellitus

DPP - dipeptidyl peptidáza 4

ESI⁺ - ionizace elektrosprejem v kladném módu

FDA/EMA - Food and drug administration (americký kontrolní úřad)/ European medicines agency (evropský kontrolní úřad)

GC - plynová chromatografie

HLB - označení kolonky na extrakci tuhou fází

HPLC/MS - vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií

IS - interní standard

kV - jednotka

LC/MS - kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

LLE - extrakce na rozhraní kapalina-kapalina

MeOH - methanol

MF - mobilní fáze

MIP - „molecular imprinted polymers“

MRM - „multiple reaction monitoring“

NAL - naloxon

NALT - naltrexon

PAD - perorální antidiabetika

PPT - proteinová precipitace

PS-DVB - polystyren zesíťovaný 1-2% divinylbenzenem

QL - limit kvantifikace

RAM - restricted acces materiál
RPM - počet otáček za minutu
SAX - silný anionto měnič
SCX - silný kationto měnič
Si-C₁₈ - oktadecylová skupina vázána na silikagel
SPE - extrakce tuhou fází
SSI - ionizace ultrazvukovým sprejem
TIC - „total ion current“
UV/VIS - oblast ultrafialového a viditelné spektra světla
WAX - slabý aniontoměnič
WCX - slabý kationtoměnič