

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**Využití LC/MS metody pro stanovení tiotropia v biologických
vzorcích**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Hana Šťastná
Studijní obor: Analytická chemie
Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D.

Olomouc

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Zuzany Rácové, Ph.D. a že jsem použila zdroje, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé vedoucí, paní Mgr. Zuzaně Rácové, Ph.D. za cenné rady a připomínky, trpělivost a milý přístup při psaní mé diplomové práce. Rovněž bych ráda poděkovala Mgr. Vendule Kubíčkové a PharmDr. Martinu Porubovi, Ph.D. za jejich rady a neocenitelnou pomoc, především při práci na experimentální části mé práce a paní RNDr. Barboře Papouškové, Ph.D. za pomoc a připomínky k mé diplomové práci. Také bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Ústavu farmakologie, LF UPOL za pomoc a vytvoření příjemných pracovních podmínek. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za neutuchající podporu a trpělivost nejen při psaní mé diplomové práce, ale po dobu celého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Hana Šťastná
Název práce:	Využití LC/MS metody pro stanovení tiotropia v biologických vzorcích
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Ústav farmakologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Školitel:	Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D.
Konzultanti:	Mgr. Vendula Kubíčková PharmDr. Martin Poruba, Ph.D. RNDr. Barbora Papoušková, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022
Abstrakt:	<p>Tiotropium bromid je bronchodilatans užívané jako léčivo nemocí spojených s obstrukcí dýchacích cest jako je astma nebo chronická obstrukční plicní nemoc. Je to selektivní, kompetitivní, reverzibilní antagonist muskarinových receptorů s ultra-dlouhodobým účinkem. Při podání tiotropia nedochází k výrazné biotransformaci a velká část tiotropia je vyloučena v nezměněné formě.</p> <p>Cílem práce bylo zavedení LC/MS metody pro stanovení tiotropia v biologických vzorcích, konkrétně v moči. Práce obsahuje literární rešerši na téma tiotropium, HPLC, hmotnostní spektrometrie a validace. Experimentální část popisuje volbu podmínek analýzy, přípravu vzorku, kalibraci a validaci metody. Následně byly změřeny biologické vzorky od jednoho pacienta. Srážení acetonitrilem a následná SPE extrakce pomocí SCX kolonek byla zvolena jako nejlepší úprava vzorku. Pro HPLC analýzu byla použita kolona Luna SCX (150 × 3 mm, s částicemi 5 µm) a separace probíhala isokraticky. Jako mobilní</p>

fáze byl použit 30mM mravenčan amonný s pH 4 ve směsi s acetonitrilem v poměru 20:80.

Zavedená metoda splňuje parametry validace a umožňuje tak spolehlivě stanovit koncentraci tiotropia v moči u pacientů.

Klíčová slova:

Tiotropium, HPLC, hmotnostní spektrometrie, tandemová hmotnostní spektrometrie, moč, validace

Počet stran:

57

Jazyk:

Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Hana Šťastná

Title: The use of LC/MS method for determination of tiotropium in biological samples

Type of thesis: Diploma thesis

Department: Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

Advisor: Mgr. Zuzana Rácová, Ph.D.

Consultants: Mgr. Vendula Kubičková
PharmDr. Martin Poruba, Ph.D.
RNDr. Barbora Papoušková, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Abstract: Tiotropium bromide is a bronchodilator used as a drug to treat of diseases associated with airway obstruction like asthma or chronic obstructive pulmonary disease. It is the selective, competitive, reversible muscarinic receptor antagonist with ultra-long-lasting effect. Administered tiotropium is not significantly biotransformed and a large portion is eliminated in unchanged form.

The aim of the thesis was to develop the LC/MS method for tiotropium determination in biological samples, specifically in urine. The thesis contains a review on topics of tiotropium, HPLC, mass spectrometry, and validation. Experimental part describes the choice of analysis conditions, sample preparation, calibration, and validation of the method. Subsequently, biological samples from one patient were measured.

For sample preparation, acetonitrile precipitation followed by SPE extraction on SCX columns was chosen as the best. For HPLC analysis, the Luna SCX column (150 × 3 mm, with 5 μm particles) was used and the separation was isocratic. The solution of

30mM ammonium formate with pH of 4 mixed with acetonitrile in a ratio 20:80 was used as the mobile phase.

The established method meets the validation parameters and thus enables reliable determination of the concentration of tiotropium in the urine of patients.

Key words:

Tiotropium, HPLC, mass spectrometry, tandem mass spectrometry, urine, validation

Number of pages:

57

Language:

Czech

Obsah

Seznam zkratk	10
Úvod	12
Cíl práce	13
Teoretická část	14
1 Antiastmatika	14
1.1 Tiotropium	15
1.1.1 Vlastnosti	15
1.1.2 Mechanismus účinku	17
1.1.3 Metabolismus tiotropia	18
1.1.4 Nežádoucí účinky	18
1.1.5 Indikace a kontraindikace	18
1.1.6 Výhody tiotropia	19
1.1.7 Metody stanovení tiotropia	19
2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie	20
2.1 Kapalinová chromatografie	20
2.1.1 Základní pojmy chromatografické separace	20
2.1.2 Instrumentace	23
2.1.2.1 Vysokotlaká čerpadla	24
2.1.2.2 Dávkování vzorku	25
2.1.2.3 Kolony	25
2.1.2.3.1 Stacionární fáze pro iontově výměnnou chromatografii	26
2.1.2.4 Detektory	27
2.1.2.4.1 Hmotnostní spektrometr	27
2.2 Příprava vzorku	30
2.2.1 Extrakce tuhou fází	31
2.3 Vyhodnocení výsledků	32
2.3.1 Kvalitativní vyhodnocení	32
2.3.2 Kvantitativní vyhodnocení	32
2.3.2.1 Metoda vnějšího standardu	32
2.3.2.2 Metoda vnitřního standardu	32
2.3.2.3 Metoda přídavku standardu	33

2.3.2.4	Metoda vnitřní normalizace.....	34
3	Validace metod	35
3.1	Přesnost a pravdivost.....	35
3.2	Preciznost	35
3.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti	36
3.4	Linearita a rozsah	37
3.5	Robustnost	37
3.6	Specifičnost	37
	Experimentální část	38
4	Materiál	38
4.1	Biologický materiál	38
4.2	Chemikálie.....	38
4.3	Přístroje a příslušenství.....	38
5	Metody	39
5.1	Příprava chemikálií.....	39
5.2	Instrumentace	40
5.3	Podmínky měření.....	40
	*Tučně zvýrazněné přechody jsou kvantifikační, tedy byly použity k sestrojení kalibrační křivky.	44
5.4	Příprava vzorku	44
6	Výsledky	47
6.1	Kalibrace a validace metody	47
6.2	Vzorky pacienta.....	48
7	Diskuze	50
8	Závěr	53
	Citovaná literatura	54

Seznam zkratek

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
CYP	cytochrom P450
DESI	desorpční elektrosprej
EI	ionizace elektronem
ESI	elektrosprej
FAB	ionizace bombardování rychlými atomy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
LABA	inhalační β_2 -agonista s dlouhodobým účinkem
LAMA	inhalační anticholinergikum s dlouhodobým účinkem
LDI	ionizace desorpcí laserem
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MALDI	ionizace desorpcí laserem za účasti matrice
MRM	selektivní záznam více reakcí
PEEK	polyetheretherketon
SABA	inhalační β_2 -agonista s krátkodobým účinkem
SAMA	inhalační anticholinergikum s krátkodobým účinkem
SAX	silný měnič aniontů
SCX	silný měnič kationtů
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
SRM	selektivní záznam jedné reakce
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie
U-LABA	inhalační β_2 -agonista s ultra-dlouhodobým účinkem

U-LAMA	inhalační anticholinergikum s ultra-dlouhodobým účinkem
WAX	slabý měnič aniontů
WCX	slabý měnič kationtů

Úvod

Tiotropium je léčivo, které je používáno při léčbě onemocnění spojených s obstrukcí dýchacích cest jako je chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) nebo bronchiální astma. Astma je zánětlivé onemocnění dýchacích cest, při kterém dýchací cesty nadměrně reagují na různé rizikové faktory zúžením, čímž dochází k omezení průchodnosti. U CHOPN dochází k zúžení dýchacích cest jako reakce na zánětlivý podnět, např. kouření tabáku nebo jiné škodlivé látky vdechované ze vzduchu.

V dostupné literatuře jsou popsány především metody stanovení tiotropia z krevní plazmy, při monitorování pacientů, které jej užívají. Tiotropium může být také využito jako droga pro zlepšení sportovní výkonnosti, protože jeho užíváním dochází k zvýšení výdechového objemu. Z tohoto důvodu je tiotropium jednou z látek, která je monitorována při drogových testech u koňských sportů.

Tato práce se zaměřuje hlavně na stanovení tiotropia v moči, protože po biotransformaci je velká část podané dávky vyloučena v nezměněné formě močí. Proto by šlo o méně invazivní metodu a pro pacienta komfortnější alternativu.

Cíl práce

- Vypracování rešerše se zaměřením na vlastnosti tiotropia, metodu LC/MS s využitím iontového zdroje ESI a trojitého kvadrupólu a validace metody
- Seznámení se s metodou LC/MS a biologickým materiálem (moč) a následné zavedení a validace LC/MS metody na stanovení tiotropia v biologických vzorcích získaných od pacienta z FN Olomouc
- Stanovení koncentrace tiotropia v dodaných vzorcích

Teoretická část

1 Antiastmatika

Za nemoci spojené s chronickou bronchiální obstrukcí jsou považovány asthma bronchiale (astma) a chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN). Látky používané k léčbě těchto nemocí jsou obecně označovány jako antiastmatika. [1]

Při léčbě astmatu jsou antiastmatika rozlišována na úlevová a preventivní. Mezi úlevová antiastmatika jsou řazena především léčiva používaná k léčbě akutního záchvatu a zmírnění bronchokonstrikce (zúžení průdušek), jako jsou β_2 -agonisté s krátkodobým účinkem (SABA), inhalační anticholinergika s krátkodobým účinkem (SAMA), systémové kortikosteroidy nebo teofyliny s krátkodobým účinkem. [2] Naopak β_2 -agonisté s dlouhodobým, případně ultra-dlouhodobým účinkem (LABA, resp. U-LABA) se užívají preventivně v udržovací léčbě astma a CHOPN. Tato léčiva by v případě astmatu měla být podávána v kombinaci s inhalačními kortikosteroidy. V preventivní farmakoterapii se využívají i další léčiva s dlouhodobým působením, jako jsou antileukotrieny nebo anti-IgE léčba či již zmíněné systémové nebo inhalační kortikosteroidy. Další možností v preventivní léčbě jsou anticholinergika s dlouhodobým (LAMA) a ultra-dlouhodobým (U-LAMA) účinkem, jejichž zástupcem je tiotropium bromid.

Využití jak při farmakoterapii astmatu, tak CHOPN nachází i teofyliny s prodlouženým účinkem. [1] Teofyliny jsou používány hlavně jako podpůrná léčba u středně těžkého až těžkého astmatu. Samotné jsou užívány v případě pacientů s lehkým astmatem. Jejich přidání k léčbě nemá tak výrazný efekt ve srovnání s β_2 -agonisty s dlouhodobým účinkem. Při vysokých dávkách dochází k teofylinové intoxikaci, která se projevuje nežádoucími účinky, jako jsou nauzea, zvracení nebo relaxace dolního jícnového svěrače. To může vést ke gastroezofageálnímu refluxu, který sám může astma zhoršit. Objevit se může také tachykardie, arytmie a příležitostně i stimulace dechového centra. Při intoxikaci může dojít také k záchvatům či dokonce smrti, aniž by tomu předcházely známky centrální nervové stimulace. [2]

Léčba CHOPN je v případě úlevové terapie stejná jako u astmatu, avšak v udržovací léčbě jsou používány kromě již zmíněných látek i inhibitory fosfodiesterázy 4, mukoaktivní látky (např. N-acetylcystein) anebo antibiotika. Tato léčiva jsou používána pouze v rámci fenotypově specifické léčby.

Anticholinergika je možné kombinovat s krátkodobě působícími β_2 -agonisty jako je např. fenoterol. Dostupná je rovněž i fixní kombinace s dlouhodobě působícími β_2 -agonisty, např. s formoterolem. Výhodou fixních kombinací s β_2 -agonisty je zvýšení jejich bronchodilatačních účinků a stejného efektu lze dosáhnout menšími dávkami obou léčiv, což omezuje pravděpodobnost výskytu nežádoucích účinků. [1]

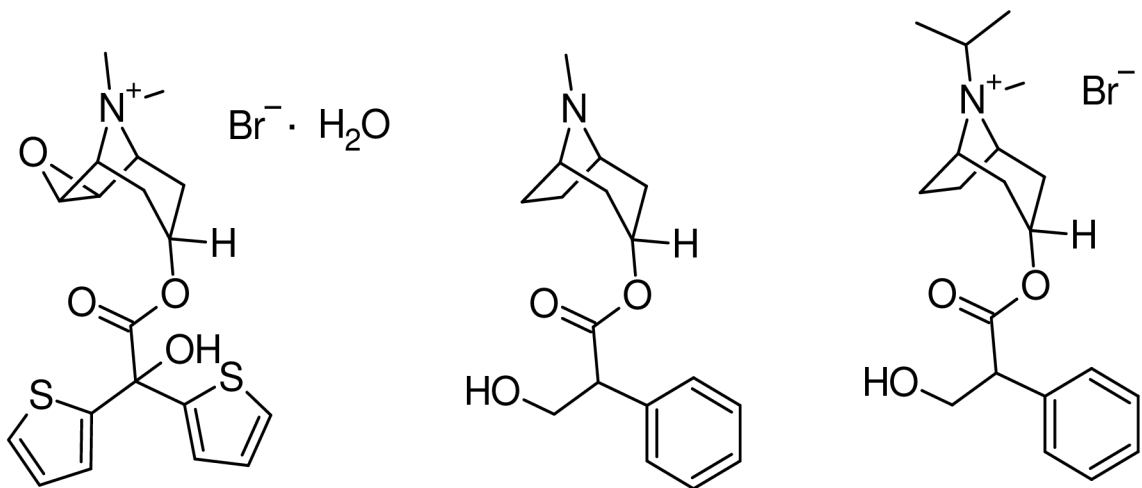
V této práci užíval pacient přípravek Spiolto Respimat, který je kombinací ultra-dlouhodobě působícího β_2 -agonisty olodaterolu a ultra-dlouhodobě působícího anticholinergika tiotropium bromidu.

1.1 Tiotropium

Tiotropium bromid je anticholinergikum navozující bronchodilataci, řadí se do skupiny inhalačních léčiv pro léčbu onemocnění spojených s obstrukcí dýchacích cest. [3] [4] Působí jako selektivní, kompetitivní, reverzibilní antagonist muskarinových receptorů s ultra-dlouhodobým účinkem (U-LAMA). [5] Používá se v udržovací léčbě chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN) [5] a nebo bronchiálního astmatu [6].

1.1.1 Vlastnosti

Molekula tiotropium bromidu je strukturně odvozena od atropinu, podobně jako další inhalační bronchodilatans ipratropium bromid, znázorněné na Obr. 1. Jde o achirální kvartérní amoniovou sůl, která je v léčivých přípravcích podávána ve formě monohydrátu. Má podobu bílého či nažloutlého krystalického prášku bez zápachu, který je mírně rozpustný ve vodě a dobře rozpustný v methanolu. [4] [5] Hodnota pKa byla softwarově vypočtena na hodnotu 13,97. [7]



Obr. 1: Struktura tiotropium bromid monohydrátu (vlevo), atropinu (uprostřed) a ipratropium bromidu (vpravo)

Tiotropium je podáváno inhalačně s použitím inhalátoru. Jeden takový je zobrazen na Obr. 2. Při inhalaci se pouze malá část tiotropia dostává do plic. Větší podíl prochází gastrointestinálním traktem [5], a to z toho důvodu, že část podaného léčiva pacient spolkne. Proto je důležité inhalované léčivo správně aplikovat.



Obr. 2: Inhalátor pro opakované použití přípravku Spiolto Respimat, který byl užíván pacientem, jehož vzorky byly použity pro účely této diplomové práce. Obrázek byl převzat ze Souhrnu údajů o léčivém přípravku, který je součástí přípravku Spiolto Respimat [3]

Z gastrointestinálního traktu je tiotropium velmi obtížně vstřebáváno a jeho biologická dostupnost při p.o. podání roztoku tiotropia činí pouze 2-3 %. Při pravidelné inhalaci tiotropia jednou denně je dosaženo rovnovážného stavu 7. den. Biologická dostupnost při inhalačním podání činí 33 % dávky u zdravých dobrovolníků, při inhalaci tiotropia pacienti s CHOPN je vstřebáváno 18,6 % dávky. Tiotropium se přibližně ze 72 % váže na plazmatické proteiny a studie prováděné na potkanech ukázaly, že neprostupuje přes hematoencefalickou bariéru. [3] [4].

1.1.2 Mechanismus účinku

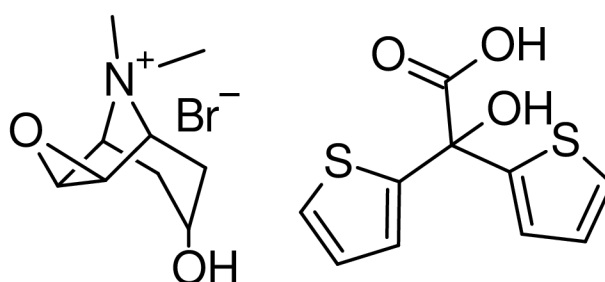
Tiotropium bromid působí jako antagonistu muskarinových receptorů parasympatiku. Na tyto receptory působí neurotransmitter acetylcholin, který tím navozuje bronchokonstrikci dýchacích cest a zvyšuje sekreci hlenových žláz. U člověka bylo identifikováno celkem pět podtříd muskarinových receptorů, z nichž tři byly prokázány v plicích. Jde o podtypy M₁, M₂ a M₃. [5] [6] [8] [9] M₁ receptory umožňují cholinergní neurotransmisi, a tím podporují bronchokonstrikci, zatímco M₃ receptory způsobují bronchokonstrikci hladkých svalů v plicích a sekreci hlenových žláz. M₂ receptory naopak inhibují uvolňování acetylcholinu, a díky tomu se chovají jako receptory inhibující zpětnou vazbu. Pokud dojde k blokádě M₂ receptoru, vede to k vyšší produkci acetylcholinu. [10] [8]

Tiotropium se kompetitivně a reverzibilně váže na M₁ a M₃ receptory, a tím inhibuje účinek acetylcholinu. To vede k bronchodilataci hladkých svalů průdušek. [3] [4] [11] Rovněž vykazuje kinetickou selektivitu vůči M₁ a M₃ oproti M₂ receptorům, což potvrzují výrazné rozdíly mezi poločasů disociace (pro M₁ a M₃ $t_{1/2} = 14,6 - 34,7$ h a pro M₂ $t_{1/2} = 3,6$ h). Právě dlouhý poločas disociace z receptoru M₃ zajišťuje dlouhodobý účinek tiotropia. [11] [12] [13] [14] [15]

Selektivita tiotropia na muskarinových receptorech je jeho hlavní výhodou. Neselektivní antagonisté muskarinových receptorů jako jsou atropin nebo ipratropium bromid působí na všechny tři typy receptorů. Jejich blokáda M₂ receptoru vede naopak k vyšší produkci acetylcholinu, a tím pádem kratší době účinku. [10]

1.1.3 Metabolismus tiotropia

Po intravenózním podání je 74 % tiotropia vyloučeno v nezměněné formě, což naznačuje, že rozsah biotransformace není velký. Tiotropium je ester, který je neenzymatickou cestou štěpen na N-methylskopin a kyselinu dithienylglykolovou. Oba tyto produkty na muskarinové receptory již dále nepůsobí. [3] [4] [11] *In vitro* studie u lidských jaterních mikrosomů a hepatocytů ukázaly, že část léku (menší než 20 %) je při intravenózním podání metabolizována oxidační cestou pomocí CYP2D6 a CYP3A4 a tyto metabolity jsou v II. fázi metabolismu dále konjugovány s glutathionem. [3] [4]



Obr. 3: Struktury metabolitů tiotropia: N-methylskopin (vlevo) a kyselina dithienylglykolová (vpravo)

1.1.4 Nežádoucí účinky

Velké množství nežádoucích účinků může být důsledkem anticholinergních účinků tiotropia. Mezi ty nejčastější se řadí suchost v ústech, která je ale většinou mírná a s průběhem léčby odezní. Dalšími častými nežádoucími účinky mohou být zácpa, kandidóza nebo faryngitida. Vzácně se může objevit tachykardie, fibrilace, zvýšení nitroočního tlaku, retence moči a obtíže při močení, zejména u pacientů s predispozicí (např. hyperplazie prostaty). [3] [4] [5]

1.1.5 Indikace a kontraindikace

Tiotropium je indikováno jako bronchodilatans v rámci udržovací léčby u pacientů s CHOPN [3] [4] [5] nebo bronchiálním astmatem. [6]

Kontraindikováno je v případě, že je pacient přecitlivělý na atropin, případně jeho další deriváty (např. ipratropium) [5], nebo další složky léčivého přípravku. [3] Nutná je opatrnost v případě užívání tiotropia pacienty, kteří jsou léčeni s těžkým postižením ledvinové funkce, s glaukomem s úzkým úhlem, hyperplazií prostaty nebo s obstrukcí

hrdla močového měchýře. Také jej nesmí užívat těhotné nebo kojící ženy, pokud by přínos léčby nepřevážil rizika. [5]

1.1.6 Výhody tiotropia

Výhodou tiotropia oproti β_2 -agonistům spočívá hlavně v nežádoucích účincích β_2 -agonistů, které jsou závislé na dávce. Jde především o třes kosterního svalstva, tachykardii (zvýšenou tepovou frekvenci), hypokalemii (sníženou hladinu draslíku v krvi), zvýšenou sekreci inzulínu nebo glukagonu a vznik hyperglykemie. Dále to můžou být také nervozita, neklid, nauzea, závratě nebo porucha spánku. [1]

Pokud tiotropium srovnáme s jinými používanými anticholinergiky, jako jsou ipratropium bromid nebo aklidinium bromid, rozdíl bude především v době působení. Ipratropium bromid je krátkodobě působící anticholinergikum, které působí jen 4-6 h, takže je nutné ho užívat 2-4krát denně. Má malé nežádoucí účinky, podobné těm, které se vyskytují i u tiotropia a dalších anticholinergik strukturně odvozených od atropinu. [16] Aklidinium bromid je naopak déle působící anticholinergikum a je nutné ho užívat pouze 2krát denně. Tiotropium působí ještě déle a stačí jej podávat jen jednou denně. [1]

1.1.7 Metody stanovení tiotropia

V současné době jsou v literatuře dostupné metody pro stanovení tiotropia v lidské krevní plazmě [17] [18] či v koňské moči v rámci protidrogových opatření při koňských sportech [19]. Tyto metody využívají separaci pomocí kapalinové chromatografie na kolonách s reverzní fází a následnou detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie. Vzorky biologického materiálu je nutné před analýzou extrahovat nebo jinak upravovat. V případě Wang a kol. [18] byl vzorek lidské krevní plazmy zředěn acetonitrilem a následně extrahován dichlormethanem. Naopak Ding a kol. [17] zvolili extrakci lidské krevní plazmy tuhou fází (SPE) za použití sorbentu se stejnou reverzní fází jako v případě chromatografické kolony, na níž byla provedena separace. Rovněž Ho a kol. [19] zvolili extrakci koňské moči pomocí SPE, ale jako sorbent byla zvolena fáze se slabým kationtovým iontoměničem (WCX) a pro následnou separaci byla použita kolona s reverzní fází. Jako mobilní fáze byly použity pufr octanu amonného či mravenčanu amonného v různých poměrech s methanolem nebo acetonitrilem.

2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

2.1 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při které dochází k separaci molekul analytu mezi stacionární a mobilní fází. Složky vzorku jsou separovány průtokem pohyblivé mobilní fáze přes nepohyblivou stacionární fází. Princip této metody je založen na schopnosti stacionární a mobilní fáze různě zadržovat jednotlivé složky vzorku. Složky silněji poutané ke stacionární fázi budou v systému zadržovány déle než složky zadržované v mobilní fázi. Dle separačního mechanismu a použité stacionární fáze můžeme rozlišovat různé druhy chromatografie. Podle použité mobilní fáze dělíme chromatografii na plynovou a kapalinovou. Podle uspořádání rozlišujeme chromatografii kolonovou a planární. Rozdělovat chromatografické techniky můžeme také podle dějů, které se při separaci uplatňují. Těmi mohou být: rozdílná rozpustnost, adsorpce, iontová výměna, molekulový síťový efekt nebo specifické interakce. [20]

V kapalinové chromatografii je jako mobilní fáze použita kapalina. V počátcích byla prováděna ve skleněných kolonách o průměru 1-5 cm a s délkou od 50 cm do 5 m. Naplněny byly pevnými částicemi se stacionární fází adsorbovanou na povrchu a jejich průměr byl větší než 150-200 μm . I přes takto velké částice byl průtok mobilní fáze malý a pokusy o zvýšení průtokové rychlosti pomocí zvýšeného tlaku nebo vakua nebyly vyhovující. Důvodem bylo zvýšení teoretického patra, a tím snížení účinnosti kolony. Avšak zmenšením velikosti částic můžeme dosáhnout nižšího teoretického patra. Taková velikost částic vyžaduje použití vyššího tlaku a s tím i vhodnou instrumentaci, která takové podmínky dokáže vytvořit. Tak byl položen základ vysokoučinné kapalinové chromatografie. [21]

2.1.1 Základní pojmy chromatografické separace

Jak již bylo zmíněno, analyt je separován na chromatografické koloně, následně je detekován vhodným detektorem. Výstupem je závislost sledované veličiny na čase a nazývá se chromatogram. Chromatografické píky mají Gaussovský charakter. Eluce analytu se může provádět buď za konstantního složení (a stejné eluční síle) mobilní fáze,

kdy se jedná o isokratickou eluci, nebo se může použít gradientová eluce, kdy se složení mobilní fáze mění, obvykle ve prospěch složky s vyšší eluční silou.

Základní veličinou pro každou separovanou látku je její retenční čas t_R . Je to doba, která uplyne od nástřiku vzorku po dosažení vrcholu píku analytu. Další charakteristickou veličinou je retenční objem V_R , který udává objem mobilní fáze, která proteče kolonou za čas t_R . Mezi retenčním časem a retenčním objemem platí následující vztah, kde F_m udává objemový průtok mobilní fáze v ml/min:

$$V_R = F_m \cdot t_R \quad (1)$$

Retenční čas zároveň udává kvalitativní informaci o separované látce, zatímco kvantitativní charakteristikou je výška píku h nebo plocha píku A . [22]

Jako měřítko účinnosti chromatografické separace je používán parametr účinnosti kolony. Účinnost kolony je charakterizována pomocí bezrozměrné veličiny N , kterou nazýváme počet teoretických pater, a výškového ekvivalentu teoretického patra H . [21] Výškový ekvivalent teoretického patra je udáván v μm a je definován jako délka kolony, která připadá na jedno patro. Mezi veličinou N a parametrem H existuje následující vztah, kde L je délka kolony: [22]

$$H = \frac{L}{N} \quad (2)$$

Pro popis chromatografické separace je rovněž důležité zmínit van Deemterovu teorii. J. J. van Deemter popsal v roce 1956 pomocí rovnic vztahy mezi jednotlivými procesy, které ovlivňují rozmývání zón separovaných látek, a také popsal závislost účinnosti separace na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze. [23] Na počátku byla tato teorie popsána pouze pro plynovou chromatografii, ale později byly vztahy přesněji popsány pro kapalinovou chromatografii J. C. Giddingsem a J. H. Knoxem. Dle této teorie existují tři nezávislé procesy, které se podílejí na rozmývání eluční zóny: [24] [25] [26]

- Vířivá difúze analytu při průchodu stacionární fází
- Podélná/ molekulární difúze analytu v mobilní fázi
- Odpor proti převodu hmoty ve stacionární a mobilní fázi

Účinnost separace vyjadřujeme jako výškový ekvivalent teoretického patra a je dán součtem jednotlivých příspěvků, kde H_A je příspěvek vířivé difúze, H_B je příspěvek molekulární difúze analytu a H_C je příspěvek odporu proti převodu hmoty (3): [22]

$$H = H_A + H_B + H_C \quad (3)$$

Vířivá difúze je spojena s homogenitou náplně stacionární fáze. Stacionární fáze obsahuje póry a různé velikosti částic, mezi kterými protéká mobilní fáze různou lineární rychlostí. Některé molekuly prochází přímočaře, zatímco jiné molekuly obtékají částice sorbentu, takže se navzájem mohou opožďovat nebo předbíhat. Proto je příspěvek vířivé difúze definován rozměrem částic stacionární fáze d_p a koeficientem nerovnoměrného plnění chromatografické kolony (λ). Jejich vztah se vyjadřuje rovnicí (4): [22]

$$H_A = 2\lambda \cdot d_p = A \quad (4)$$

Molekulární neboli podélná difúze je proces, kdy molekuly z úzké zóny difundují do místa s nižší koncentrací a zároveň se pohybují ve směru nebo proti směru toku mobilní fáze. Je popsána Fickovými zákony a je ovlivněna difúzním koeficientem D_m . Vliv na tento typ difúze má také tvar kanálků náplně a typ stacionární fáze, proto je zaveden korekční faktor γ . Člen u popisuje lineární průtokovou rychlost. [22]

$$H_B = \frac{2\lambda \cdot D_m}{u} = \frac{B}{u} \quad (5)$$

Odpor proti převodu hmoty mezi fázemi je dána především difúzí analytu ve stagnantní mobilní fázi v pórech nosiče, ve stacionární fázi (C_S) a v proudící mobilní fázi (C_M). Dále je také závislý na velikosti částic náplně, jejich tvaru a tloušťce stacionární fáze. Příspěvek odporu proti převodu hmoty lze popsat vztahem (6): [22]

$$H_C = \left(\frac{\omega \cdot d_p^2}{D_m} + \frac{\omega \cdot d_p^2}{D_{part}} \right) \cdot u = (C_M + C_S) \cdot u = C \cdot u \quad (6)$$

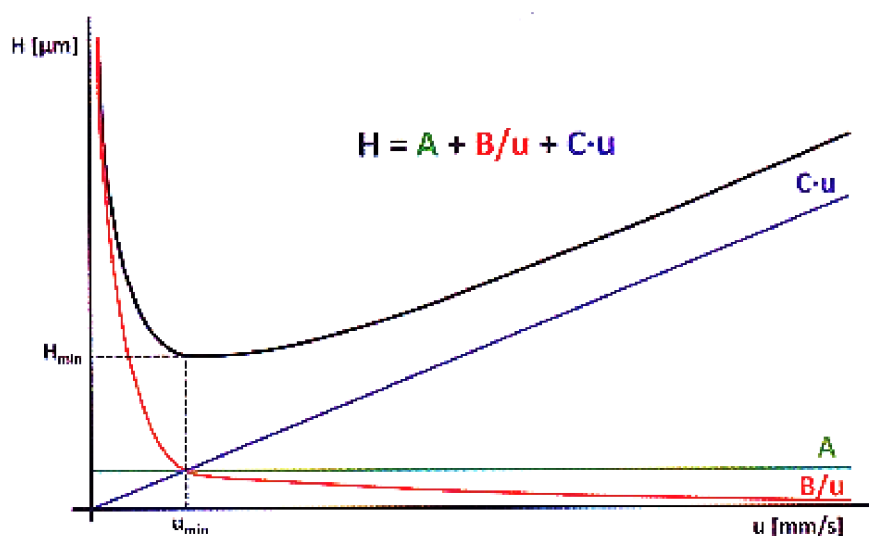
kde C_M a C_S jsou příspěvky mobilní a stacionární fáze, ω je koeficient závislý na distribuci velikosti, tvaru a pórů částic, d_p je průměr velikosti náplně kolony, D_m difúzní koeficient analytu v mobilní fázi a D_{part} je intračásticový difúzní koeficient ve stagnantní mobilní fázi. [22]

Souhrnnou van Deemterovu rovnici můžeme popsat vztahem (7):

$$H = 2\lambda \cdot d_p + \frac{2\lambda \cdot D_m}{u} + \frac{f \cdot (k) \cdot d_p^2 \cdot u}{D_m} = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (7)$$

kde k vyjadřuje retenční faktor analytu [23] a význam dalších členů odpovídá popisu v předchozím textu.

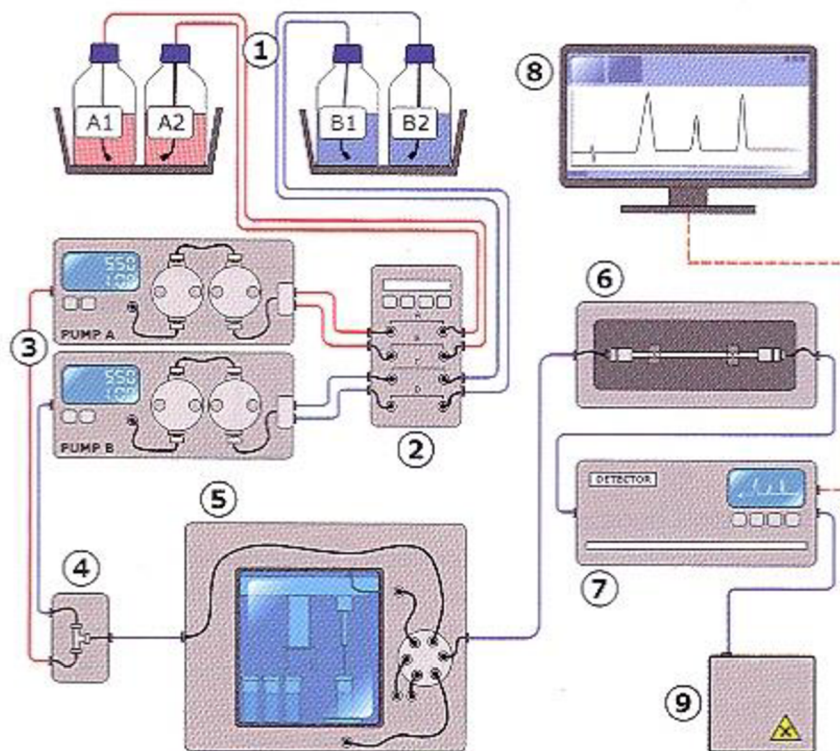
Součtem členů A , B a C získáváme záznam závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra H na lineární rychlosti průtoku u , který nazýváme van Deemterova křivka. Minimum této křivky odpovídá nejnižší hodnotě H , a tedy optimální účinnosti separace při daném průtoku. Nejlepší účinnosti separace je tedy dosaženo při lineární rychlosti průtoku mobilní fáze, která odpovídá minimu van Deemterovy křivky. [22]



Obr. 4: Zobrazení van Deemterovy křivky se zobrazením členů A , B a C , minimální hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra H_{min} a tomu odpovídající optimální lineární rychlosti u_{min} [22]

2.1.2 Instrumentace

Kapalinový chromatograf je složen z několika částí, které zajišťují uchování a transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich následnou detekci, přístroj na záznam dat a jejich vyhodnocení.



Obr. 5: Schéma systému HPLC: 1. zásobníky mobilních fází, 2. odplyňovač, 3. vysokotlaká čerpadla, 4. směšovač, 5. automatický dávkovač vzorku s dávkovacím ventilem, 6. chromatografická kolona umístěná v termostatu, 7. detektor, 8. datová stanice, 9. nádoba na odpad [22]

2.1.2.1 Vysokotlaká čerpadla

Čerpadla zajišťují transport mobilní fáze. U přístrojů HPLC až UHPLC (ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie) se používají čerpadla s výstupními tlaky v rozmezí 1-100 MPa, s průtokem mobilní fáze v širokém rozmezí (od 0,1-10 ml), který musí být přesný a správný. Také musí být bez monotónních změn a pulsů. Materiály používané ke konstrukci čerpadel musí být odolné i v případě použití agresivní mobilní fáze (např. nerezová ocel, titan, keramika). Jejich vnitřní objem by měl být co nejmenší, aby v případě výměny mobilní fáze byla výměna co nejrychlejší.

Čerpadla můžeme rozlišovat do dvou skupin:

1. Pracující za konstantního tlaku
2. Pracující za konstantního objemového průtoku

U čerpadel pracujících za konstantního tlaku je využíváno tlaku plynu nebo hydraulické kapaliny na píst čerpadla, zatímco u čerpadel pracujících za konstantního objemového průtoku je využíváno mechanického pohonu k pohybu pístu. [22]

2.1.2.2 Dávkování vzorku

Proces dávkování vzorku je v určité míře spojen s účinností chromatografické separace. Rizikem je nedokonalé dávkování, kdy může docházet k rozmývání piků. To je způsobeno mimokolonovým příspěvkem dávkovacího zařízení, především při použití krátkých či kapilárních kolon nebo mikrokolon.

V minulosti bylo dávkování prováděno přes vhodné septum nebo při zastaveném průtoku mobilní fáze. V současné době jsou využívány manuální dávkovací smyčky založené na principu přepínacího ventilu nebo automatického dávkovače (tzv. autosamplery). [22]

2.1.2.3 Kolony

Nejčastěji využívané kolony pro HPLC systém mají délku 5–25 cm s vnitřním průměrem 3-5 mm. Velikost částic náplně se pohybuje nejčastěji od 3 do 5 μm . [21] Kolona bývá tvořena ze dvou částí – tělo kolony a koncovka kolony. Koncovka zajišťuje těsnost systému, distribuuje mobilní fázi i analyt rovnoměrně přes celý průřez chromatografického lože a zadržuje náplň kolony. [22]

Před kolonu bývá často zařazena tzv. předkolona, která obsahuje stejnou stacionární fázi jako kolona. Její funkcí je zachytávat nečistoty a částice vzorku, které by jinak zanášely kolonu a tím měnily její účinnost a selektivitu. Další funkcí je zachytávání částic se silnou retencí, které by byly na koloně zachyceny a nebyly eluovány. Předkolona musí být častěji regenerována nebo čištěna a pravidelně měněna za novou. [27]

Materiálem pro výrobu pláště kolon bývá především nerezová ocel. Je antikorozivní, avšak při použití mobilních fází obsahujících chloridy nebo některá organická rozpouštědla jako jsou např. dichlormethan nebo acetonitril mohou z nerez ocelí vyluhovat železo. V případě, že používáme mobilní fázi s aditivou, které mají tendenci tvořit komplexy s ionty železa, musíme volit jiný typ materiálu kolony. Tím může být například polyetheretherketon (PEEK) nebo tvrzené sklo vložené do kovového pouzdra.

Chromatografická kolona je naplněna stacionární fází, tedy pevnou látkou nebo kapalinou zakotvenou na pevném nosiči. Jedná se o nepohyblivou složku separačního systému. Podle skupenství stacionární fáze můžeme chromatografii dělit na rozdělovací,

pokud je stacionární fází kapalina, a adsorpční, pokud se jedná o pevnou fází. Dalším možným typem dělení je dle chromatografického módu separace: [22]

- Normální fáze
- Reverzní fáze
- Iontově výměnná fáze
- Fáze pro hydrofilní interakční chromatografii (HILIC)
- Fáze pro hydrofobní interakční chromatografii (HIC)
- Gely a molekulová síta
- Afinitní fáze
- Chirální fáze

2.1.2.3.1 Stacionární fáze pro iontově výměnnou chromatografii

V této práci je tiotropium separováno od ostatních složek ve vzorku pomocí iontově výměnné stacionární fáze, konkrétně na SCX, proto je tento mód separace v této kapitole vysvětlen blíže.

Stacionární fází pro iontově výměnnou chromatografii nazýváme iontoměniče nebo ionxy. Podle funkční skupiny, která zajišťuje iontovou výměnu je dále rozlišujeme na katexy a anxy. Nosičem těchto funkčních skupin je nejčastěji silikagel, případně organický polymer. V tomto případě je nutné, aby byl materiál nosiče chemicky stabilní a bylo možné pracovat při velkém rozsahu pH. Dalším důležitým faktorem je velikost pórů a výměnná kapacita iontoměniče. [28] Anxy jsou tvořeny bazickou funkční skupinou s kladným nábojem, který zajišťuje výměnu aniontů. Můžeme je rozlišovat na slabé (WAX) anebo silné (SAX) anxy. Katexy naopak tvoří kyselá funkční skupina se záporným nábojem, která zajišťuje výměnu kationtů a podobně jako anxy je můžeme rozdělit na slabé (WCX) a silné (SCX). Silné iontoměniče disociují v celém rozsahu pH, což u katexů znamená $\text{pH} = 1-14$ a pro anxy $\text{pH} = 0-14$. Pokud je nosičem silikagel, tak jsme omezeni na rozsah $\text{pH} = 2-8$. Důvodem je chemická nestabilita silikagelu. V případě $\text{pH} > 8$ dochází k disociaci silanolových skupin. U $\text{pH} < 2$ může docházet k hydrolyze siloxanových skupin a následnému odmývání ligandu, což je nežádoucí především při použití hmotnostní spektrometrie jako detekce, protože zvyšuje šum pozadí. [22]

Nejčastějšími nosiči pro katexy jsou používány organické polymery, jako je kopolymer styren-divinylbenzenu, nebo jsou založeny na bázi aglomerovaných latexových částic. Nosičem může být rovněž silikagel, který je modifikován sulfonovou

skupinou. Pro silné katexy (SCX) je používána sulfonová kyselina jako jediná funkční skupina. U slabých katexů (WCX) jsou nosiče pokryty karboxylovými či fosfonovými skupinami. [29]

2.1.2.4 Detektory

V HPLC systémech je detektor umístěn za chromatografickou kolonu a slouží k zaznamenání změny signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze s obsahem analytu. [22]

Ideální detektor pro HPLC by měl splňovat několik kritérií. Měl by být dostatečně citlivý a měl by poskytovat předvídatelnou odezvu. Také by měl být specifický a univerzální, tzn. poskytovat odezvu pro všechny analyty. Jeho použití by mělo být snadné a spolehlivé, měl by mít široký lineární dynamický rozsah. Příspěvek k mimokolonovému rozmývání zón by měl být nulový a signál by neměl být závislý na složení mobilní fáze či na změně teploty nebo průtoku. Měl by být nedestruktivní a detekované píky by měly poskytovat kvalitativní informace. [30]

Nejpoužívanějšími typy detektorů jsou spektrofotometrické. Na trhu můžeme najít spektrometry, které jsou navrženy speciálně pro HPLC systémy. Dalším typem detektoru, který nachází čím dál větší uplatnění je hmotnostní spektrometrie. Široké uplatnění můžeme najít i pro refraktometrický detektor, avšak tento detektor je méně selektivní a univerzální a jeho nevýhodou je vysoká mez detekce. Dalšími typy HPLC detektorů jsou např. elektrochemický, fluorescenční, vodivostní, infračervený, detektor rozptylu světla odpařováním (ELSD) nebo nukleární magnetická rezonance (NMR). [22]

2.1.2.4.1 Hmotnostní spektrometr

Jedná se o detektor, ve kterém dochází k tvorbě iontů analytu v plynné fázi a jejich následné separaci podle hodnoty poměru hmotnosti a náboje. Výsledný iontový proud je detekován a výstupem je hmotnostní spektrum. [31] Analyt může být ionizován za pomoci tepla, elektrického pole, srážkou s vysokoenergetickým elektronem nebo jinou ionizovanou molekulou. [32] Jednotlivé ionizační techniky můžeme rozlišovat podle vnitřní energie vzniklých iontů na „tvrdé“ a „měkké“. Vlivem vyšší vnitřní energie iontů vzniklých při „tvrdé“ ionizaci dochází k následné fragmentaci nebo vzniku radikálových iontů. Naopak při „měkké“ ionizaci, která je šetrnější, dochází ke vzniku protonovaných

či deprotonovaných iontů. To, jakou techniku ionizace zvolíme, závisí na povaze analytu nebo separační technice, kterou používáme. [33] [34]

Tvrdou ionizační technikou je elektronová ionizace (EI). Jde o ionizaci v plynné fázi, kdy je analyt bombardován elektrony o energii 70 eV, což umožňuje tvorbu knihoven EI spekter. [31]

Mezi měkké ionizační techniky řadíme chemickou ionizaci, která je podobná elektronové ionizaci. Proud elektronů však nejprve ionizuje plyn, který následně zajišťuje ionizaci analytu pomocí ion-molekulových interakcí. Nejpoužívanějšími technikami ve spojení s HPLC jsou ty, které umožňují ionizaci za atmosférického tlaku (API). Takovými technikami jsou chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) a elektrosprej (ESI). Právě tyto techniky jsou nejčastěji používány ve spojení s HPLC. Elektrosprej je používán především při analýze biomakromolekul jako jsou peptidy, proteiny, léčiva a jejich metabolity, nukleotidy, oligonukleotidy, DNA adukty, oligosacharidy, syntetické polymery, organokovy nebo vzorky klinických analýz. APCI je používáno hlavně při analýze neiontových organických sloučenin do 1500 Da, jako jsou pesticidy, steroidy nebo některá léčiva. APPI je oproti tomu lepší pro analýzu látek nepolárního nebo málo polárního charakteru s nižší molekulovou hmotností. [31]

Dalšími ionizačními technikami mohou být např. ionizace desorpcí laserem (LDI), ionizace desorpcí laserem za účasti matrice (MALDI), ionizace termosprejem, desorpčním elektrosprejem (DESI) nebo ionizace bombardováním rychlými atomy (FAB). [31]

Hmotnostní spektrometr se skládá ze vstupního systému, iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru, vakuového systému, elektroniky a systému na zpracování dat. Vstupní systém zajišťuje transport vzorku do iontového zdroje, kde je vzorek převeden z neutrálních molekul na ionty v plynném skupenství. Dále jsou ionty v hmotnostním analyzátoru separovány. Nejčastějšími typy analyzátorů mohou být kvadrupóly, magnetické sektorové analyzátory, analyzátory doby letu (TOF), iontové pasti či orbitrap nebo iontová cyklotronová rezonance. Detektor poté detekuje a zesiluje signál iontového proudu separovaných iontů. [31] Jako detektory jsou používány elektronové násobiče, Faradayovy nebo scintilační detektory. [35] Vakuový systém je důležitý pro udržení velmi nízkého tlaku v iontovém zdroji i hmotnostním analyzátoru. [31]

Spojení více hmotnostních analyzátorů do série nám umožňuje identifikovat strukturu látek, [36] pomáhá objasňovat fragmentační procesy, identifikovat látky a také je kvantifikovat ve složitých maticích. [31] Takové provedení nazýváme tandemová hmotnostní spektrometrie a může být prováděna v prostoru nebo čase. Při provedení v prostoru je třeba zapojit více hmotnostních analyzátorů do série tak, že první z analyzátorů vybírá prekurzorový ion, následuje kolizní cely, která je naplněna kolizním plynem a je zde prováděna fragmentace a druhý analyzátor provádí analýzu produktových iontů. V tomto provedení může být spektrometr např. trojitý kvadrupól, který se skládá ze dvou kvadrupólů a jedné kolizní cely v sérii. [36]

Kvadrupólový analyzátor je tvořen čtyřmi tyčovými elektrodami, hyperbolického nebo cylindrického tvaru. Na ně je vloženo stejnosměrné a vysokofrekvenční napětí tak, že vysokofrekvenční složka je fázově posunuta, aby protilehlé tyče měly stejnou polaritu. [33] Když ion analytu vstupuje do analyzátoru, působí na něj přitažlivá síla elektrody s opačným nábojem, než je jeho vlastní. Periodickou změnou napětí na tyčích kvadrupólu působí na ion střídavě přitažlivé a odpudivé síly, a tím ion začíná oscilovat kolmo k podélné ose. [32] [20] Hmotnostní spektrum získáme správným nastavením stejnosměrného a radiofrekvenčního napětí, zatímco jejich poměr udržujeme konstantní. Vytvoříme tak stabilní trajektorii iontu s určitou hodnotou m/z tak, že prochází kvadrupólem, a může být detekován.

Při využití trojitého kvadrupólu v tandemové hmotnostní spektrometrii jsou první (Q_1) a poslední kvadrupól (Q_3) používány jako běžné hmotnostní filtry, zatímco prostřední kvadrupól (Q_2) využívá pouze radiofrekvenční složku napětí a tím umožňuje projít všem iontům, které byly vybrány. Zároveň také funguje jako kolizní cely. [31] Při provedení jsou zvolené ionty urychleny do kolizní cely, která je naplněna kolizním plynem (Ar , N_2) o tlaku okolo 0,1-0,3 Pa. Účinnost a rozlišení fragmentace lze ovlivnit optimalizací. Pokud nechceme využít provedení trojitého kvadrupólu, můžeme Q_1 nebo Q_3 přepnout do radiofrekvenčního módu, a tak se bude zařízení chovat jako jediný kvadrupól. [32]

Tandemová hmotnostní spektrometrie nám umožňuje různé způsoby záznamů dle potřeby či účelu analýzy: [31]

- a) Sken produktových iontů – výstupem je sken iontů, které vznikly fragmentací jednoho vybraného prekurzorového iontu.
- b) Sken prekurzorových iontů – výstupem je sken prekurzorových iontů, ze kterých mohl fragment vzniknout.

- c) Sken neutrálních ztrát – u tohoto způsobu monitorování iontů jsou sledovány všechny ionty, u kterých dochází ke konkrétní neutrální ztrátě. Např. při ztrátě CO₂ je ztráta 44 Da, což je typické pro karboxylové kyseliny, které je tak možné identifikovat ve směsi strukturně blízkých látek.
- d) Selektivní záznam jedné (SRM) nebo více reakcí (MRM) – tento záznam umožňuje sledování jednoho konkrétního prekurzorového iontu a jeho fragmentů. V této práci byl zvolen MRM mód, protože toto provedení umožňuje kvantitativní analýzu ve směsi, a to s dobrou selektivitou a citlivostí.

Tandemová hmotnostní spektrometrie v čase zahrnuje tyto kroky ve stejném prostoru, ale jiné časové posloupnosti. Analyzátoři vhodné pro provedení v čase jsou např. lineární iontová past nebo iontová cyklotronová rezonance. [31]

2.2 Příprava vzorku

Vzorkem pro HPLC analýzu je často směs mnoha látek v různé matrici a s obsahem dalších balastních složek, které mohou způsobit interferenci se sledovaným analytem, který je často přítomen pouze ve stopovém množství. Proto je nutné vzorek před vlastní analýzou zakoncentrovat, izolovat a odstranit co největší podíl balastních složek. Taková úprava vzorku tak ovlivňuje výslednou přesnost, preciznost a pravdivost stanovení. [37]

Techniky pro úpravu vzorků můžeme rozdělit do dvou skupin, a to jsou konvenční a moderní metody. Konvenční metody jsou dobře optimalizovány a zavedeny do laboratorní praxe. Jedná se především o metody extrakce tuhou fází (SPE), extrakce kapalina-kapalina (LLE) a srážení proteinů. Moderní metody byly vyvinuty pro úpravu složitých vzorků a obecně pro zjednodušení úpravy vzorku. Jde především o zrychlení přípravy, menší spotřeby rozpouštědel i vzorku. Výhodou může být on-line uspořádání, avšak tyto metody jsou stále zdokonalovány a optimalizovány, takže v běžných laboratořích zatím nejsou tak rozšířeny. Tyto metody jsou např. mikroextrakce založená na SPE či LLE, selektivní extrakce nebo on-line techniky (např. kapilární SPME). [38]

2.2.1 Extrakce tuhou fází

Tento způsob extrakce je využíván i v této diplomové práci, proto je více vysvětlen v této kapitole. Je založen na principu interakce kapaliny (vzorku) a tuhé fáze (extrakční kolonka), kde mohou být uplatněny polární, nepolární, iontové nebo afinitní interakce. Pro správné provedení extrakce a dobrou výtěžnost je nutné, aby měl analyt vyšší afinitu k tuhé fázi než k matici vzorku. V současné době na trhu existuje celá řada různých typů sorbentů s různými typy interakcí. Výhodou této techniky úpravy vzorků je vysoká výtěžnost, malá spotřeba rozpouštědel, zakoncentrování vzorku, jednoduchá obsluha, rychlá příprava a snadná automatizace. [39]

Samotná extrakce se skládá z několika kroků: [37]

1. Výběr stacionární fáze – při výběru stacionární fáze je vhodné zvážit chemické vlastnosti analytu, jako je jeho disociační konstanta nebo polarita, a také vlastnosti rozpouštědla, které bude použito. K dispozici je široké spektrum sorbentů, od nepolárních C8 a C18, polárních silikagelů, přes iontově výměnné SCX a SAX až po různé polymerní materiály, které je možné využít v širším rozsahu pH. Dále je možné zvolit např. imunosorbenty nebo vícemodální sorbenty, které obsahují nepolární i iontově výměnnou skupinu.
2. Úprava vzorku – vzorek je třeba převést do kapalné fáze a následně ji modifikovat tak, aby byla kompatibilní se stacionární fází. Jde především o úpravu podílu organické složky, pH nebo iontové síly.
3. Kondicionace sorbentu – kondicionací sorbentu se aktivují jeho funkční skupiny. Používá se vhodné rozpouštědlo (např. methanol), obvykle ve dvojnásobném objemu sorbentu v kolonce.
4. Ekvilibrace sorbentu – tímto krokem se vytváří takové fázové rozhraní, které bude co nejvíce podobné stavu po aplikaci vzorku na kolonku.
5. Aplikace vzorku – při nanesení vzorku na kolonku je důležitá optimalizace průtoku.

6. Odstranění interferujících látek – dochází k odstranění nežádoucích složek vzorku. Obvykle je používáno takové rozpouštědlo, ve kterém je vzorek co nejméně rozpustný.
7. Eluce analytu – posledním krokem extrakce je uvolnění a vymytí analytu ze sorbentu.

2.3 Vyhodnocení výsledků

2.3.1 Kvalitativní vyhodnocení

K identifikaci analytu můžeme využít retenční časy nebo objemy, případně využít specifických detektorů jako jsou NMR nebo již dříve zmíněná hmotnostní spektrometrie. V případě hmotnostní spektrometrie dostáváme údaje o molekulové hmotnosti, izotopickém zastoupení nebo fragmentech. Pro odhalení koeluce látek a identifikaci můžeme využít i DAD detektor. Identifikace je založena na porovnání spekter vzorku a standardních látek za stejných podmínek. [37]

2.3.2 Kvantitativní vyhodnocení

Při kvantitativním hodnocení nacházíme vztah mezi plochou či výškou píku a eluovaným množstvím. Koncentraci analytu stanovíme porovnáním se standardem. [37]

2.3.2.1 Metoda vnějšího standardu

Při této metodě analyzujeme sadu kalibračních roztoků o známé koncentraci, kdy získáváme kalibrační závislost $X = f(c)$. Koncentraci analytu poté určíme jako $c = f(X)$, kde X může být plocha nebo výška píku. Tvar kalibrační funkce nemusí být vždy lineární, ale je lepší pro spolehlivější vyhodnocení výsledné koncentrace. Pro kalibrační přímkou existuje vztah (3), kde x_i je hodnota veličiny X pro koncentraci c_i , a je úsek na ose y a b je směrnice kalibrační přímky. [37]

$$x_i = a + bc_i \quad (8)$$

2.3.2.2 Metoda vnitřního standardu

Tato metoda je založena na principu přidavku látky, která má podobné fyzikální a chemické vlastnosti jako analyt, nenachází se ve vzorku a neinterferuje při odečítání signálu analytu. [35] Je založena na principu přidavku roztoku vnitřního standardu

o známé koncentraci ke vzorku a také k roztoku standardu. Vnitřní standard se přidává na začátku analytického postupu, tím jsou eliminovány chyby vlivem změny podmínek, protože vnitřní standard i analyt jsou vystaveny stejným podmínkám. Koncentraci analytu lze stanovit metodou kalibrační přímky, kdy se ke kalibračním standardům přidává konstantní objem vnitřního standardu o známé koncentraci. Koncentrace neznámého vzorku se stejným přídatkem interního standardu se odečítá z kalibrační závislosti. Také lze použít metodu přímého porovnání. U této metody je změřen vzorek o neznámé koncentraci s přídatkem vnitřního standardu o známém objemu a koncentraci. Pro vyhodnocení koncentrace je nutné změřit také roztok standardu se stejným přídatkem vnitřního standardu a následně je vypočítána hodnota koncentrace podle rovnice (4), kde c_x je neznámá koncentrace analytu, A_i je plocha píku pro analyt, A_s je plocha píku pro standard analytu, $A_{IS,S}$ je plocha píku pro vnitřní standard, $A_{IS,i}$ je plocha píku pro vnitřní standard ve vzorku a c_S je koncentrace standardu. [37]

$$c_x = \frac{A_i}{A_s} \cdot \frac{A_{IS,S}}{A_{IS,i}} \cdot c_S \quad (9)$$

2.3.2.3 Metoda přídatku standardu

Metoda je založena na principu přídatku přesného a známého množství látky, u které má být stanovena koncentrace, k vzorku. Existují metody jednoho či více přídatků standardu.

U metody jednoho přídatku standardu je třeba provést dvě analýzy. První je analyzován známý objem vzorku (V_i) o neznámé koncentraci látky (c_x) a je získána plocha píku (A_i). Ke vzorku je poté přidán známý objem standardu (V_s) o známé koncentraci (c_s). Tomu odpovídá plocha píku (A_{si}), takže pro neznámou koncentraci c_x platí rovnice (10):

$$c_x = \frac{A_i \cdot c_s \cdot V_s}{A_{si} \cdot (V_i + V_s) - A_i \cdot V_s} \cdot c_S \quad (10)$$

A pokud je splněna podmínka, že $V_i \gg V_s$, tzn. že poměr $V_i \gg V_s \geq 1000$, vztah může být zjednodušen následovně (11):

$$c_x = \frac{A_i}{(A_{si} - A_i)} \cdot \frac{V_s}{V_i} \cdot c_S \quad (11)$$

Metodou dvou nebo více přídavků standardu lze stanovit koncentraci tak, že je vytvořena závislost změřené plochy A a změna koncentrace Δc a z ní je extrapolována regresní přímka od záporné oblasti za podmínky, že je lineární. Přídavky jsou voleny tak, aby byly celočíselnými násobky předpokládané koncentrace vzorku. Naměřenými body je proložena přímka a koncentrace neznámého vzorku c_x je vypočtena dle následujícího vzorce (12):

$$c_x = \frac{A_0}{b} \quad (12)$$

2.3.2.4 Metoda vnitřní normalizace

Tato metoda je založena na principu, který vychází z následující rovnice (13), kde CRF je hmotnostní korekční odezvosý faktor:

$$c_x = \frac{A_x \cdot CRF_x}{\sum_{i=1}^n A_i \cdot CRF_i} \quad (13)$$

Hmotnostní korekční odezvosý faktor je vypočítán tak, že se připraví roztok o známé koncentraci analyzované (c_i) a referenční látky (c_s). Tento roztok je následně analyzován a jsou získány plochy A_i a A_s . Odezvosý faktor CRF je pak vypočítán dle vzorce (14):

$$CRF = \frac{A_i \cdot c_s}{A_s \cdot c_i} \quad (14)$$

3 Validace metod

Validace je získání důkazu s vysokou jistotou, že daná metoda, proces či přístroj poskytuje předem určenou specifikaci. Při validaci je důležitý správný výběr validačních parametrů. [37]

3.1 Přesnost a pravdivost

Přesnost (do r. 2008 byl používán termín správnost) [40] metody můžeme definovat jako těsnost shody mezi jednou hodnotou zjištěnou z měření a přijatou referenční hodnotou. Rozdíl mezi těmito hodnotami nazýváme chyba výsledku. Složka chyby, která se v průběhu měření nemění nebo lze její změnu předvídat se nazývá systematická chyba výsledku. Pokud se složka chyby v průběhu řady výsledků zkoušek mění nepředvídatelným způsobem, nazýváme ji náhodnou chybou výsledku. Náhodnou chybu nelze žádným způsobem odstranit.

Pravdivost metody můžeme definovat jako těsnost shody mezi střední hodnotou výsledku měření a přijatou referenční hodnotou. Pravdivý výsledek je zatížen nulovou systematickou chybou. Mírou pravdivosti je odchylka (Bias).

Pro hodnocení výsledků přesnosti a pravdivosti platí tato kritéria: modelové vzorky musí pokrývat celý koncentrační rozsah očekávaných koncentrací analytu, dostatečný počet opakování pro danou koncentrační hladinu pro určení relativní směrodatné odchylky výtěžnosti. Požadavek na hodnotu výtěžnosti nelze definovat, protože závisí na sledované látce, koncentrační hladině, typu vzorku a na analytické metodě. [37]

3.2 Preciznost

Preciznost (do r. 2008 byl používán termín přesnost) [40] definujeme jako hodnotu, která udává těsnost shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem daných podmínek. Nemá vztah k referenční hodnotě a závisí jen na náhodných chybách. Preciznost je počítána ze směrodatných odchylek. S precizností je spojena také opakovatelnost, mezilehlá preciznost a reprodukovatelnost.

Opakovatelnost můžeme definovat jako těsnost shody mezi nezávislými výsledky měření za stejných podmínek (stejný materiál, metoda, přístroj, laboratoř, pracovník) v krátkém časovém úseku.

Mezilehlou preciznost získáme měřením v delším časovém úseku. Zahrnuje měření na jiném místě, přístroji, novou kalibraci nebo pracovníka. [37] Je realizována v rámci laboratoře. [41]

Reprodukovatelnost je definována jako těsnost shody mezi nezávislými výsledky měření stejného analytu ve vzorcích stejného materiálu. Zkoušky jsou provedeny za různých podmínek (jiný přístroj, místo, pracovník, čas), ale se stejnou metodou. Reprodukovatelnost je ověřována pomocí mezilaboratorních porovnání.

Pro hodnocení přesnosti platí následující kritéria: v hodnotě směrodatné odchylky musí být zahrnuty všechny zdroje odchylek a v případě změny v pracovního postupu musí být metoda revalidována, musí být určena z dlouhodobého měření, pro stanovení směrodatné odchylky musí být dostatečný počet měření téhož materiálu a pro danou koncentrační hladinu. [37]

3.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) je minimální hodnota koncentrace, při které je ještě odpovídající analytický signál statisticky významně odlišen od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) je minimální hodnota koncentrace, při které přesnost a preciznost stanovení dovolují kvantitativní vyhodnocení. [42] Nejčastějšími způsoby výpočtu LOD a LOQ jsou výpočet pomocí poměru signálu a šumu, ze směrodatné odchylky odezvy a ze směrnice kalibrační přímky. U tohoto výpočtu LOD (15) a LOQ (16) je nutno použít směrnici (b_1) v jednotkách, ve kterých je uváděn šum.

$$LOD = \frac{3 \cdot \text{šum}}{b_1} \quad (15)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \text{šum}}{b_1} \quad (16)$$

3.4 Linearita a rozsah

Linearita je schopnost metody poskytnout v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku. Jde o přímou závislost jedné veličiny na druhé nezávisle proměnné, kdy hodnota první veličiny je pouze násobkem hodnoty druhé veličiny a případně je k výsledku součinu přičtena konstanta. Příkladem může být závislost signálu na koncentraci. [43] Linearitu můžeme vyjádřit následujícím vztahem:

$$y = a + bx \quad (17)$$

kde a vyjadřuje úsek na ose y , a parametr b je směrnice kalibrační přímky. [37]

Rozsah je uzavřený interval hodnot měřené veličiny ve vzorku, pro který bylo validací potvrzeno, že metoda je v něm aplikovatelná a jehož spodní hranici tvoří mez stanovitelnosti. V oblasti metod kvantitativní analýzy je určován měřením vzorků s různou hodnotou obsahu analytu. [44]

3.5 Robustnost

Robustnost můžeme definovat jako míru kapacity metody poskytovat shodné výsledky, při jejím reprodukování za mírně změněných podmínek (jiný přístroj, pracovník, laboratoř). [45]

Robustnost může být měřena pomocí jednorozměrné analýzy, kdy je měněn pouze jeden faktor v čase, zatímco ostatní jsou nezměněny. Experiment je opakován pro každý faktor a je sledováno ovlivnění výsledku. Nevýhodou je časová náročnost provedení, a také nelze odhalit případné vzájemné interakce faktorů. Druhým možným přístupem je využití vícerozměrné analýzy, kdy je robustnost testována na základě plánovaných pokusů, a to úplných nebo zkrácených. [37]

3.6 Specifičnost

Specifičnost je schopnost analytické metody jednoznačně identifikovat analyt v přítomnosti dalších složek, které lze ve vzorku očekávat. Těmi mohou být nečistoty, matrice, degradanty apod. [46]

Experimentální část

4 Materiál

4.1 Biologický materiál

Pro tuto práci byla využita moč pacienta, který tiotropium teprve začal užívat. Pacient užíval tiotropium v přípravku Spiolto Respimat (Boehringer Ingelheim International GmbH, Německo). Vzorky byly odebírány v rámci odběrů pro jiná klinická vyšetření.

4.2 Chemikálie

Acetonitril pro MS (VWR, Randor, PA, USA)

Benzyltriethylammonium chlorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Hydroxid amonný pro MS (Honeywell, Charlotte, NC, USA)

Kyselina mravenčí pro MS (VWR, Randor, PA, USA)

Methanol pro MS (Avantor, Randor, PA, USA)

Mravenčan amonný pro MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Plynný argon pro MS (Siad Czech, Praha, Česká republika)

Plynný dusík (Siad Czech, Praha, Česká republika)

Tiotropium bromid monohydrát CRS (Merck, Darmstadt, Německo)

Voda pro MS (VWR, Randor, PA, USA)

4.3 Přístroje a příslušenství

Analytické váhy, XP 205 Delta Range (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA)

Centrifuga Jouan BR4i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Generátor dusíku pro MS Genius 1051 (Peak Scientific Instruments, Inchinnan, Skotsko)

Hmotnostní spektrometr LCMS-8045 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

HPLC systém LC-20A Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Kolona Luna SCX 150 × 3 mm, s částicemi 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
Předkolona SCX 4 × 2 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
Magnetické míchadlo MR 1000 (Heidolph, Schwabach, Německo)
Odběrové zkumavky Vacuette 9 ml LH (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Rakousko)
pH metr RS-232 C (Schott AG, Mainz, Německo)
Software LabSolutions, ver. 5.93 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
SPE kolonky Strata SCX (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
Ultrazvuková lázeň K10 (Kraintek, Hradec Králové, Česká republika)
Vakuová pumpa Scanvac VacSafe (LaboGene, Allerød, Dánsko)
Vakuový systém VisiprepTM SPE vacuum Manifold s 12 pozicemi pro SPE kolonky
(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Vortex MS3 basic, (IKA–Werke, Staufen, Německo)

5 Metody

5.1 Příprava chemikálií

Pro zkoušky vodné mobilní fáze (označena jako MF A) byly zvoleny tři druhy pufrů. Těmi byly octan amonný, mravenčan amonný a uhličitan amonný v MS kvalitě. Všechny tři mobilní fáze byly rozpuštěny v destilované vodě v MS kvalitě. Následně bylo jejich pH titrováno na požadované pH příslušnou kyselinou a takto připravená mobilní fáze byla zfiltrována a odplyněna ultrazvukem.

Zásobní roztoky standardů tiotropia a vnitřního standardu benzyltriethylammonium chloridu měly koncentraci 1 mg/ml. Roztok tiotropia byl připraven rozpuštěním 1 mg tiotropia v 1 ml methanolu v MS kvalitě. Roztok vnitřního standardu byl připraven obdobně, rozpuštěním v destilované vodě v MS kvalitě. Oba roztoky byly dále dle potřeby ředěny zvolenou MF A. Pro kalibraci byly zvoleny koncentrace tiotropia od 100 do 1000 pg/ml. Konkrétně koncentrace 100, 200, 300, 500, 750 a 1000 pg/ml. Stejně koncentrace byly použity i pro stanovení validačních parametrů měřených v rámci jednoho dne i mezi dny. Koncentrace vnitřního standardu byla 8,3 pg/ml.

5.2 Instrumentace

Všechny analýzy byly provedeny pomocí kapalinového chromatografu skládajícího se z dvoukanalového vysokotlakého gradientového čerpadla pracujícího za konstantního objemového průtoku, autosampleru s 50 μ l smyčkou a termostatu. Separace látek byly provedeny na koloně se stacionární fází SCX (150 \times 3 mm, s částicemi 5 μ m), která byla spojená s ochranou předkolonou stejné stacionární fáze. Složení mobilní fáze a další chromatografické podmínky byly upravovány v rámci zavádění metody, která byla cílem této diplomové práce, a jsou popsány v dalších kapitolách. Detekce tiotropia a vnitřního standardu byla provedena pomocí hmotnostního detektoru, složeného z elektrospreje, dvou kvadrupólů, kolizní cely a fotonásobiče. V prvním kvadrupólu byl vybrán ion tiotropia (m/z 392,2) a vnitřního standardu (m/z 191,9), v kolizní cele v prostředí plynného argonu byly tyto ionty fragmentovány, následně produkty této fragmentace (viz v následující kapitola Podmínky měření) byly selektovány ve druhém kvadrupólu a detekovány fotonásobičem. Ionizace a proud iontů od elektrospreje až po fotonásobič byl umožněn pomocí čistého plynného dusíku, který byl do hmotnostního spektrometru přinášěn přímo z generátoru.

5.3 Podmínky měření

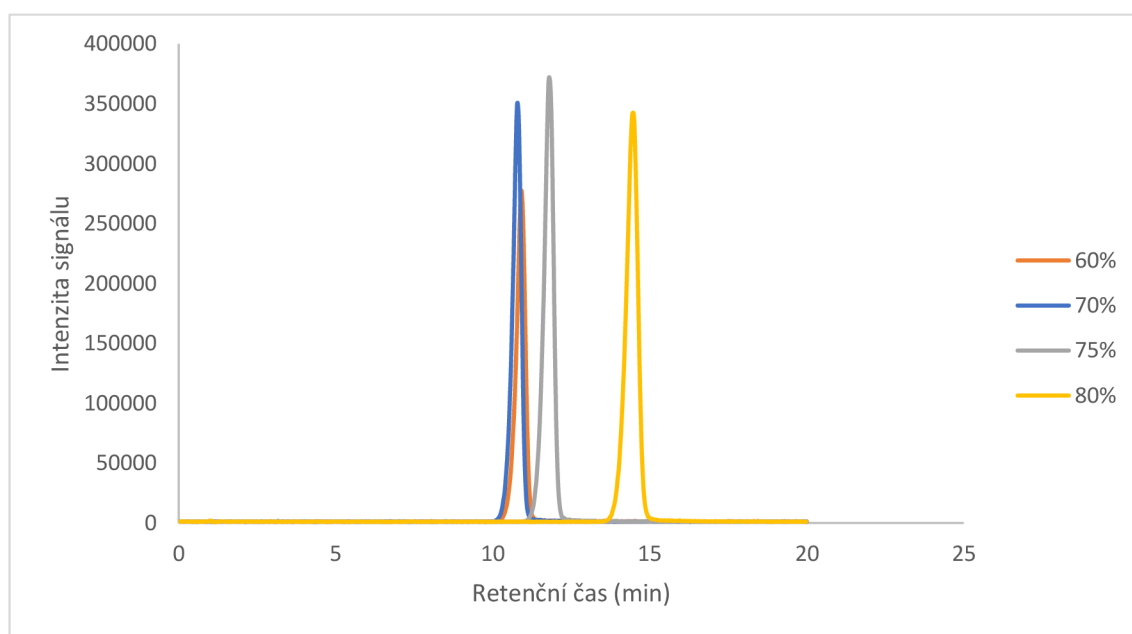
Výběr podmínek pro měření tiotropia byl zvolen na základě dostupné literatury. Nejvhodnější podmínky vhodné pro LC/MS systém byly zvoleny a dále upravovány pro potřeby analýzy.

Nejprve byly nastaveny nejvhodnější podmínky pro stanovení tiotropia v hmotnostním spektrometru. Detekce tiotropia byla nastavena v tzv. MRM módu, kde jako kvantifikační ion byl vybrán s m/z 152,15, a kvalifikační ionty s m/z 170,10 a 81,10. Nejvhodnější podmínky, tedy napětí na iontovém zdroji, obou kvadrupólech a na kolizní cele, dále průtoky plynů, a teplota iontového zdroje, byly nastaveny automaticky pomocí softwaru LabSolutions.

Dále bylo na místě zvolit vhodnou mobilní fází, aby bylo dosaženo co nejlepší separace na koloně se stacionární fází SCX. Byla zvolena isokratická eluce a byly provedeny zkoušky různých složení mobilních fází s různými hodnotami pH a koncentrace. Porovnány byly i poměry mobilních fází. Na základě literatury byla první vodná mobilní fáze (označena jako MF A) vybrána a zkoušena se složením octanu

amonného, mravenčanu amonného nebo uhličitanu amonného. Druhá organická mobilní fáze (označena jako MF B) byla vybrána a zkoušena se složením methanolu nebo acetonitrilu.

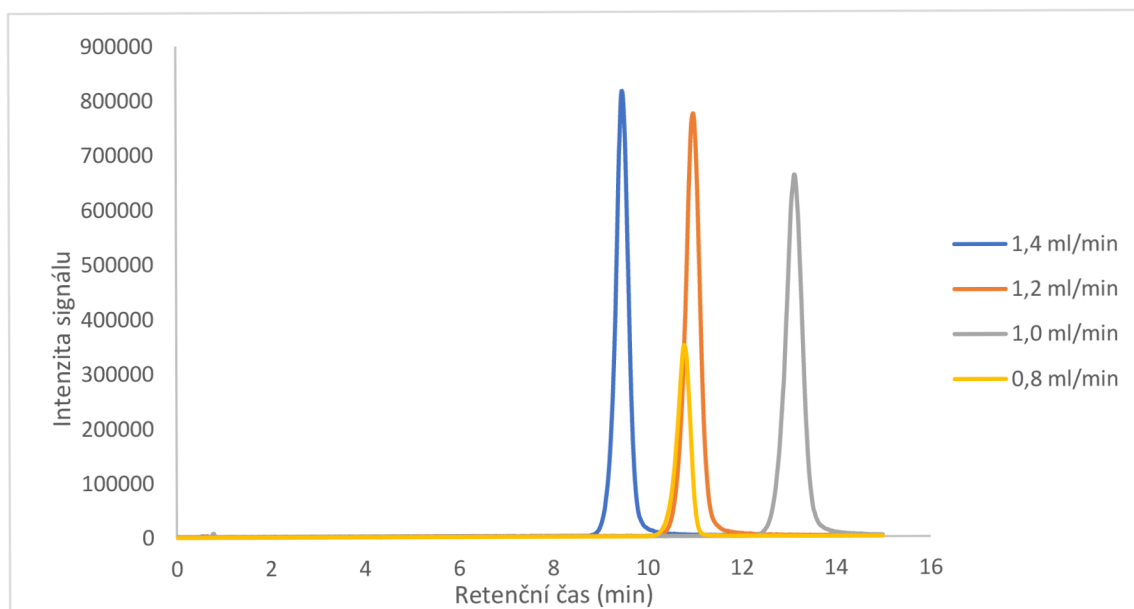
U provedených experimentů byly posuzovány retenční časy, tvar a výška píků. Dle těchto kritérií byl jako nejlepší zvolen mravenčan amonný, který jako jediný poskytoval dostatečně úzký pík s dobrým signálem. Jako MF B byl zvolen acetonitril, protože poskytoval užší píky a lepší intenzitu signálu. Další experimenty byly prováděny s mravenčanem amonným s koncentrací 10 mM a pH 3 jako MF A s průtokem 0,8ml/min. Pro dosažení lepšího signálu analytu byl upraven poměr MF A a MF B. Jako nejlepší bylo zvoleno 70 % MF B, které poskytlo nejkratší retenční čas (11 min) a dobrý signál, jak jde vidět z Obr. 6.



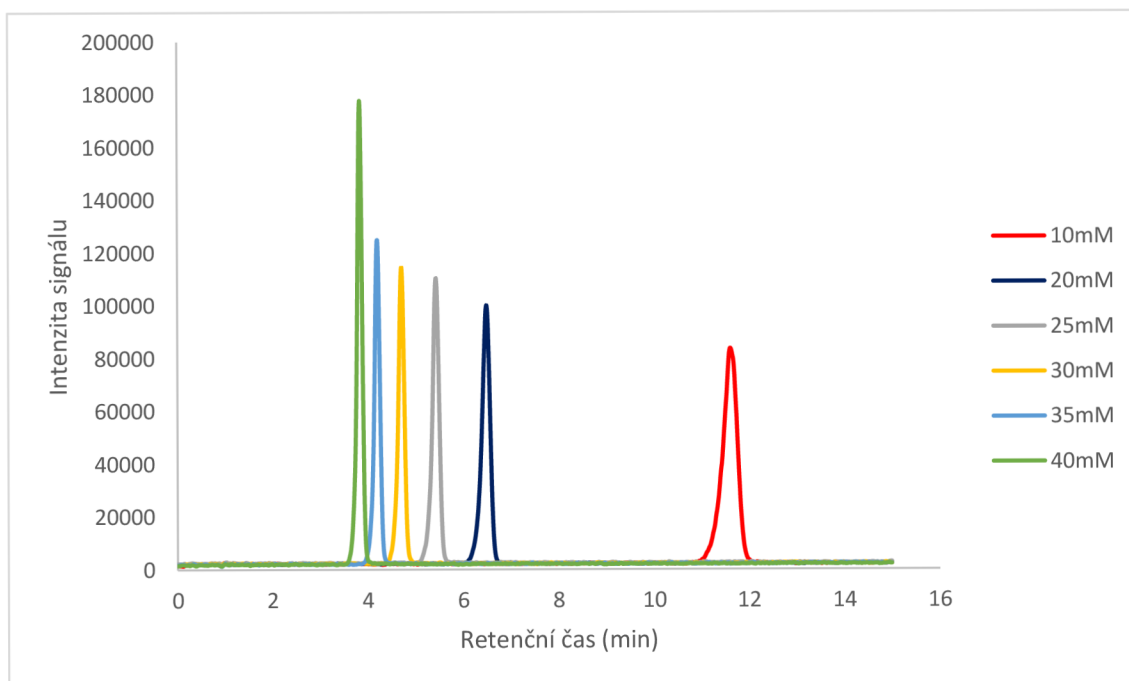
Obr. 6: Porovnání signálu tiotropia při změně obsahu acetonitrilu (MF B) v mobilní fázi obsahující 10 mM mravenčan amonný upravený na pH 3 (MF A)

Retenční čas byl dále upravován zvýšením průtoku mobilní fáze, kde byl jako nejlepší zvolen průtok 1,2 ml/min, kdy se retenční čas sice nezkrátil, ale zlepšila se intenzita signálu a zároveň nebyla větší spotřeba rozpouštědla (Obr.7). Dalším faktorem, který při analýze hraje důležitou roli, byla koncentrace mravenčanu amonného. Byly provedeny zkoušky koncentrací od 10 do 40mM při pH 3 a poměr MF B v mobilní fázi byl 70 %. Na základě výsledků měření (Obr. 8) byla zvolena koncentrace 30mM, která poskytovala

dobrý signál a úzký pík. Retenční čas se zkrátil více než o polovinu, na 4,8 min, a zároveň tato koncentrace není příliš velkou zátěží pro hmotnostní detektor.

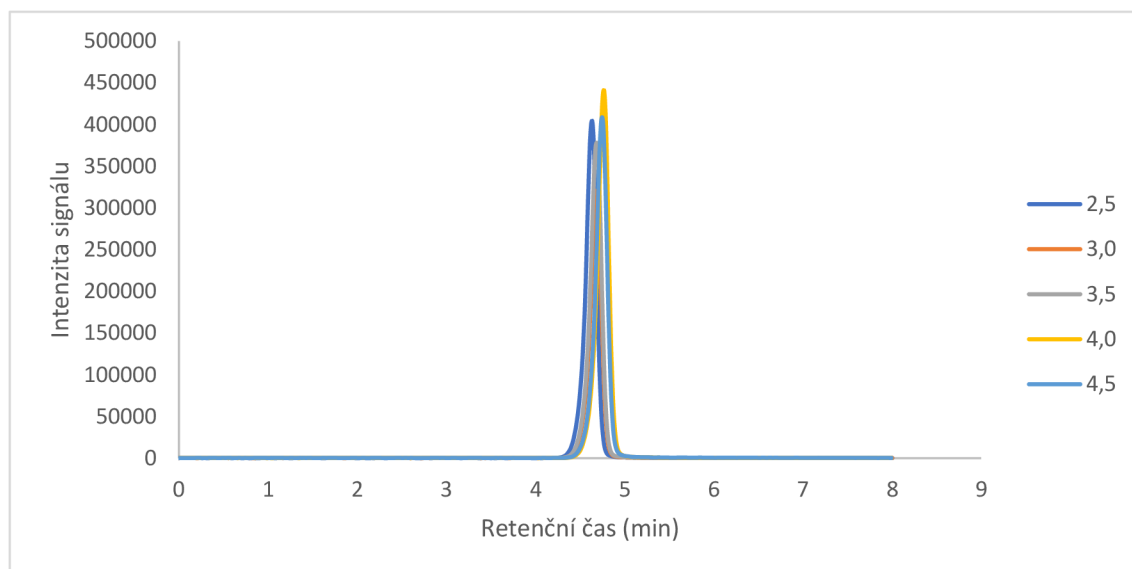


Obr. 7: Porovnání signálu tiotropia při změně průtoku mobilní fáze obsahující 10 mM mravenčan amonný upravený na pH 3 a acetonitril (3:7, v/v)



Obr. 8: Porovnání signálu tiotropia při změně koncentrace mravenčanu amonného s pH 3 (MF A) v mobilní fázi s průtokem 1,2 ml/min. Mobilní fáze obsahovala mravenčan amonný upravený na pH 3 a acetonitril (3:7, v/v).

Pufrovací rozsah pH mravenčanu amonného je 2,8 - 4,8 [47]. Proto byly provedeny také zkoušky pH od 2,5 do 4,5 s koncentrací MF A 30mM. Z chromatogramů (Obr. 9.) jde vidět, že hodnota pH neměla vliv na retenční čas tiotropia, ale při pH 4 měl signál analytu nejvyšší intenzitu, proto byla tato hodnota pH zvolena jako optimální pro analýzu.



Obr. 9: Porovnání eluce tiotropia při použití různých hodnot pH mravenčanu amonného v mobilní fázi s průtokem 1,2 ml/min. Mobilní fáze obsahovala 30 mM mravenčan amonný s acetonitrilem (3:7, v/v).

Jako vnitřní standard měření byl použit benzyltriethylamonium chlorid. Výběr vnitřního standardu byl zvolen dle literatury [17] a výběr podmínek jeho stanovení byl stejný jako v případě analytu. Detekce vnitřního standardu byla nastavena taktéž v MRM módu, kde jako kvantifikační ion byl vybrán m/z 91,10, a kvalifikační ionty byly zvoleny m/z 100,20 a 65,00.

Po změření biologických vzorků (moči) bylo zjištěno, že je třeba provést úpravu podmínek, a to konkrétně úpravu poměru organické a vodné mobilní fáze. Množství acetonitrilu (tedy MF B) bylo upraveno na 80 % z důvodu koeluce nečistot, které měly stejný retenční čas jako vnitřní standard, tedy 4,4 min. Retenční čas tiotropia se poté snížil na 3,9 min a retenční čas vnitřního standardu se posunul na 4,6 min.

Všechny chromatografické podmínky jsou shrnuty v Tab. I.

Tab. I: Chromatografické podmínky pro analýzu tiotropia v moči.

Parametry	Hodnoty
Stacionární fáze	Luna SCX 150 × 3 mm, 5 μm
Mobilní fáze A	30mM mravenčan amonný, pH 4
Mobilní fáze B	acetonitril
Poměr MF A:B	20:80
Teplota kolony	40 °C
Průtok	1,2 ml/min
Nástřík	10μl
Doba analýzy	7 min
Detekce	hmotnostní
	MRM pro i.s
	191,90>91,10*
	191,90>100,20
	191,90>65,00
	MRM pro tiotropium
	392,20>152,10*
	392,20>170,10
	392,20>81,10

*Tučně zvýrazněné přechody jsou kvantifikační, tedy byly použity k sestrojení kalibrační křivky.

5.4 Příprava vzorku

Při práci s biologickými vzorky je nutné před samotnou analýzou vzorek upravit a zbavit proteinů. Takovými procesy může být extrakce nebo srážení proteinů. Oba tyto postupy byly experimentálně ověřeny a vhodný postup byl dále upraven pro potřeby analýzy.

Jako první byla vyzkoušena metoda srážení proteinů pomocí organického rozpouštědla. Vyzkoušenými rozpouštědly byly methanol a acetonitril. Vzorky obsahovaly 1 μg/ml tiotropia v 360 μl moči a proteiny byly vysráženy přidáním 1 ml rozpouštědla. Dále byly vzorky vortexovány a centrifugovány při 12105 × g po dobu 10 min. Následně byl 1 ml organické fáze odebrán, odpařen při 40 °C pod proudem dusíku a odparek byl rozpuštěn ve 100 μl MF A. Výsledky byly zatíženy šumem, a proto byly vyzkoušeny další způsoby přípravy.

Další zkouškou byla SPE extrakce s kolonkami SCX nebo C18. Pro extrakci byl vzorek upraven dle Tab. II. Pro extrakci bylo odebráno a aplikováno na SPE kolonku 900 μl připraveného vzorku.

Tab. II: Složení zkušebního vzorku pro SPE extrakci

Látka	Objem	Koncentrace
Moč	840 μ l	-
Tiotropium	60 μ l	200 pg/ml
Vnitřní standard	60 μ l	-

Při použití SPE kolonek se stacionární fází C18 bylo tiotropium vymyto dříve, pomocí LC/MS nebylo tedy nic detekováno. Proto byla zvolena extrakce s SCX fází, díky které byl získán signál, dokonce vyšší než v případě metody srážení proteinů.

Jednotlivé kroky SPE extrakce byly testovány s různými rozpouštědly, přičemž poslední krok, tedy eluce analytu, měl zásadní vliv na velikost signálu. Pro eluci byla vyzkoušena dvě rozpouštědla: methanol a acetonitril, v kombinaci s amoniakem. Byly vyzkoušeny různé poměry organického rozpouštědla a amoniaku, konkrétně 8:2, 9:1 a 9,5:0,5, z nichž poměr acetonitrilu a amoniaku 9:1 poskytoval nejlepší odezvu, zatímco eluční činidla obsahující methanol a amoniak či jiné poměry acetonitrilu s amoniakem byla zatížena vysokým šumem nebo poskytovaly malé signály. Analyt byl eluován do zkumavek, ve kterých bylo předem připraveno 100 μ l 0,1M kyseliny mravenčí a vzorek byl pod proudem dusíku při 40 °C odpařen. Odparek byl poté rozpuštěn ve 100 μ l MF A.

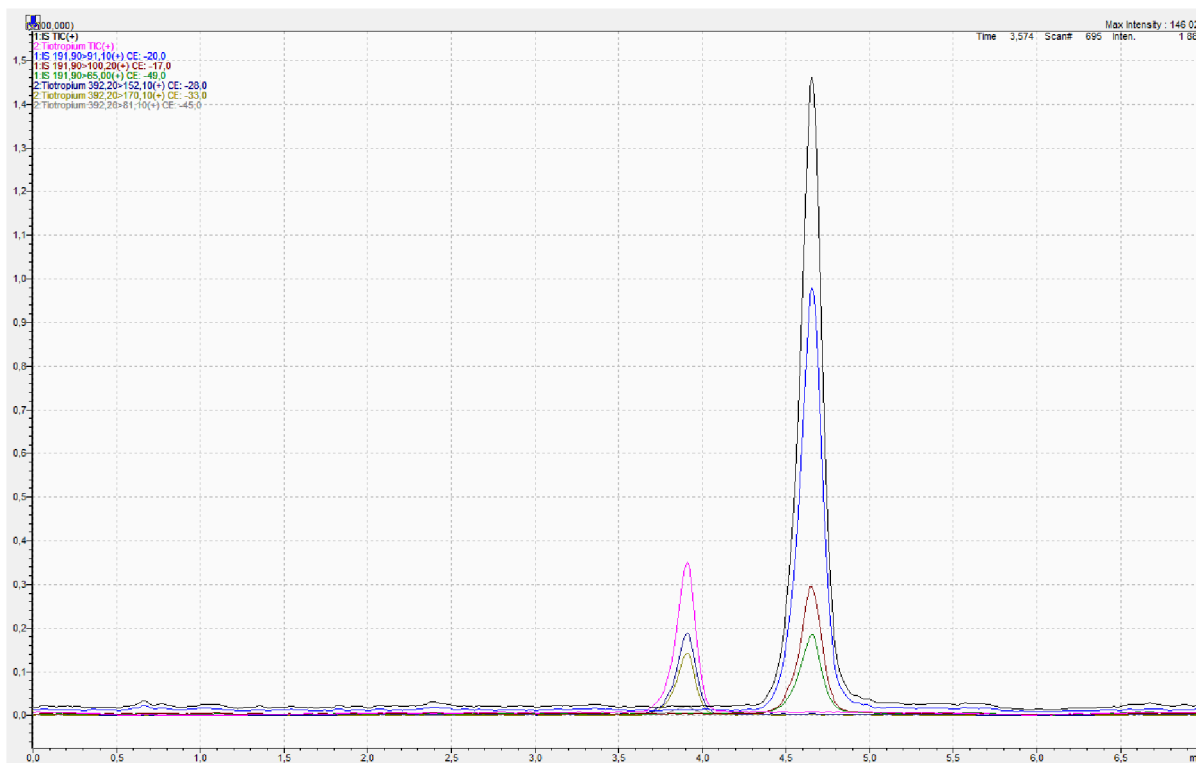
Kvůli přítomnosti nečistot eluujících ve stejném retenčním čase jako má interní standard (4,4min.) byla nakonec zvolena kombinace srážení proteinů a SPE extrakce. Tím bylo dosaženo lepšího přečištění vzorku. Ke vzorku, který byl připraven dle Tab. II, byly přidány 2 ml acetonitrilu a následně byl vzorek 30 s vortexován. Dále byl centrifugován při 4 °C, 2682 \times g po dobu 10 min. Po centrifugaci byl odebrán 1ml supernatantu, který byl aplikován na SPE kolonku. V Tab. III. je znázorněna konečná příprava a složení vzorku pro kalibraci a validaci metody. Schematické znázornění postupu SPE extrakce je zobrazeno na Obr. 10.

Obr. 10: Schéma postupu SPE extrakce.



Tab. III: Složení vzorku pro kalibraci metody stanovení tiotropia v moči

Látka	Objem	Koncentrace
Moč	840 μ l	-
Tiotropium	60 μ l	Dle měření
Vnitřní standard	60 μ l	8,3 pg/ml

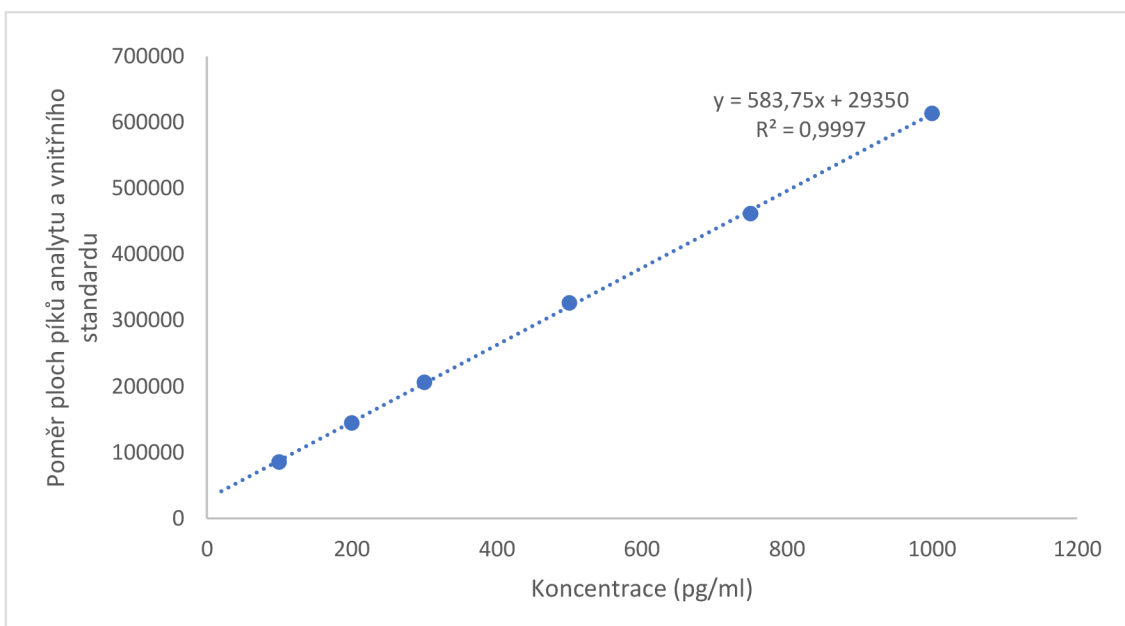


Obr. 11: Chromatogram vzorku tiotropia (růžová křivka) a interního standardu benzyltriethylammonium chloridu (černá křivka).

6 Výsledky

6.1 Kalibrace a validace metody

Před samotnou validací bylo nutno metodu kalibrovat, byla tedy stanovena kalibrační závislost poměru plochy píků analytu a vnitřního standardu na koncentraci analytu. Kalibrace tiotropia byla provedena v moči v rozsahu koncentrací 100 – 1000 pg/ml. Změřená kalibrační závislost je zobrazena na Obr. 11.



Obr. 12: Kalibrační křivka tiotropia měřená za použití LC/MS

Následně byla provedena validace, kdy bylo měřeno šest kalibračních roztoků o různé koncentraci. Tyto roztoky byly připraveny a měřeny šestkrát. Po změření vzorků byla vypočítána preciznost a odchylka (Bias) měření (Tab. IV.). Výtěžek stanovení byl měřen přidáním standardu o dané koncentraci do elučního činidla obsahujícího 100 μ l 0,1M kyseliny mravenčí, následně byl tento vzorek odpařen, a poté rozpuštěn ve 100 μ l MF A. Výtěžek byl stanoven pro každou koncentraci použitou pro kalibraci. Hodnoty výtěžků jsou zobrazeny v Tab. IV.

Tab. IV: Validační parametry LC/MS metody stanovení tiotropia v moči.

Měření v rámci jednoho dne				
Koncentrace (pg/ml)	Průměr změřených koncentrací (pg/ml)	Preciznost (%)	Bias (%)	Výtěžek (%)
100	102±8,6	8,46	1,5	72
200	202±10,1	5,02	0,9	70
300	308±2,0	0,64	2,6	69
500	514±31,2	6,07	2,8	60
750	745±10,0	1,34	0,7	89
1000	1006±77,9	7,75	0,6	60
Měření mezi dny				
100	93±12,9	13,90	7,1	-
200	210±20,4	9,70	5,1	-
300	311±16,6	5,02	4,1	-
500	501±31,8	6,35	0,2	-
750	764±34,0	4,46	1,2	-
1000	1002±146,4	14,62	0,2	-

Tab. V: Další parametry validace LC/MS metody stanovení tiotropia v moči

Parametr	Hodnoty
Rozsah kalibrační křivky (pg/ml)	100 - 1000
Korelační koeficient	0,9997
Limit detekce (pg/ml)	36 ± 6,8
Limit kvantifikace (pg/ml)	100 ± 1,4
Průměrný výtěžek (%)	70

6.2 Vzorky pacienta

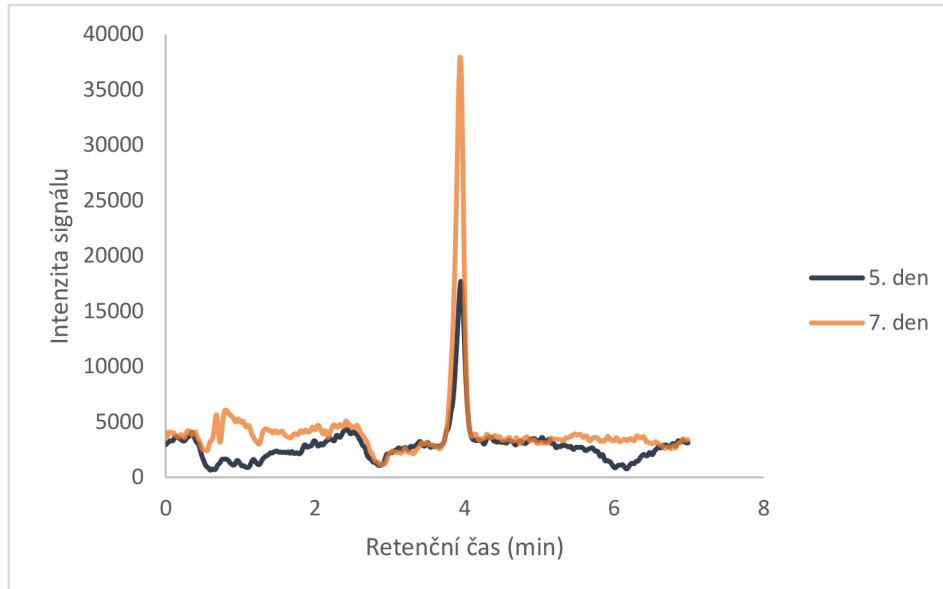
Na základě změřené kalibrační závislosti (viz výše) je možné dopočítat koncentraci sledovaného analytu v neznámých vzorcích. V této práci byly měřeny biologické vzorky získané od jednoho pacienta, který začal užívat tiotropium pravidelně. Vzorky byly odebrány 5. a 7. den od počátku užívání. Vzorky byly zmrazeny a ihned uskladněny v mrazáku při -70°C. Naměřené hodnoty tiotropia u pacienta jsou shrnuty v Tab. VI.

Tab.VI: Naměřené koncentrace tiotropia ve vzorcích pacienta.

Vzorek	Koncentrace (pg/ml)
Den 5.	-*
Den 7.	209,2

* hodnota koncentrace nedosáhla limitu kvantifikace

Na Obr. 13 jsou zobrazeny chromatogramy měřené ve dvou vzorcích získaných od jednoho pacienta. Koncentrace tiotropia byla 5. den od počátku užívání pod mezí kvantifikace (modrá křivka), 7. den od počátku užívání bylo metodou stanoveno 209,2 pg/ml (oranžová křivka).



Obr. 13: Porovnání intenzity signálu tiotropia v patientských vzorcích moči odebraných 5. a 7. den od počátku užívání léčiva (inhalace 1x denně).

7 Diskuze

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu, která by přesně, precizně a pravdivě stanovila koncentraci tiotropia v moči. Z literatury je známo, že tiotropium lze měřit v krevní plazmě, nicméně stanovení tohoto léčiva v moči by pacienta příliš nezatěžovalo a byla by tedy tato metoda přínosnější.

Metoda využívá SPE kolonky i analytickou kolonu s SCX stacionární fází, na které se tiotropium i vnitřní standard selektivně zachytávají, a tudíž se dobře separují od ostatních složek ve vzorku. Použitá kolona má své pH rozmezí v oblasti od 2 do 8, proto při vývoji nové metody bylo zohledněno toto rozmezí pH.

Jako mobilní fáze MF A byl použit mravenčan amonný, stejně jako v případě Wang a kol. [18] nebo Ho a kol. [19], který má hodnotu pK_a 3,8 a jeho pufrovací schopnost je v rozsahu pH 2,8 - 4,8 [47]. Sérií experimentů bylo zvoleno pH 4 jako nejvhodnější. Díky správné volbě pH pufru by tedy nemělo docházet k posunům píků během měření, navzdory tomu, že změna pH mobilní fáze neměla výrazný vliv na analýzu tiotropia (Obr. 9). Další vyzkoušenou možností, kterou literatura nabízela, byl octan amonný [17], který však poskytoval širší píky s nižší intenzitou než v případě mravenčanu. Poslední vyzkoušenou alternativou byl uhličitan amonný, avšak signál tiotropia byl zatížen velkým šumem, takže uhličitan byl označen za nevhodný.

Pro volbu MF B byla navržena dvě organická rozpouštědla: methanol [17] a acetonitril [18] [19]. Po sérii experimentů byl acetonitril zvolen jako lepší volba, díky ostrým a úzkým píkům oproti methanolu. Jako optimální poměr byl nejprve zvolen poměr 30:70 avšak z důvodu eluce nečistot ve stejném čase jako vnitřní standard, byl poměr experimentálně upraven na 20:80. S tímto poměrem protékala mobilní fáze systémem isokraticky s průtokem 1,2 ml/min.

Jako vnitřní standard byl zvolen benzyltriethylamonium chlorid, který použili pro svou metodu také Ding a kol. [17] I když jsou vhodnější značené vnitřní standardy, vyvinutá metoda spolehlivě funguje i s tímto neznačeným vnitřním standardem, který je cenově dostupnější a může se také, na rozdíl od značeného standardu, použít pro HPLC stanovení s UV/Vis detekcí.

Literatura se zmiňuje o různých metodách přípravy vzorku. Wang a kol. [18] zvolili extrakci organickými rozpouštědly, kdy vzorek plazmy smíchali s acetonitrilem a extrakt následně extrahovali dichlormethanem, jak již bylo zmíněno. V této práci byla

moč v prvním kroku rovněž smíchána acetonitrilem, dále však byla využita SPE extrakce. Samotná extrakce acetonitrilem se ukázala jako nedostačující, stejně jako v případě methanolu. SPE extrakce byla zvolena z důvodu lepšího výtěžku extrakce a lepšího signálu tiotropia. Pro SPE extrakci byly vyzkoušeny fáze C18 (jako použili Ding a kol. [17]) a SCX. Fáze SCX se nakonec ukázala jako lepší alternativa, neboť při použití C18 fáze tiotropium nebylo detekováno. Kombinace srážení acetonitrilem a SPE extrakce na SCX fázi bylo dosaženo uspokojivých signálů tiotropia a vnitřního standardu. V moči mohou být proteiny, na které se může tiotropium navázat, a pokud by nebyla provedena předúprava vzorku s acetonitrilem, tiotropium by zůstalo společně s proteiny na SCX fázi, a tím by byla stanovena nižší koncentrace. Takovým způsobem by byly výsledky pak nepravdivé a metoda by nespĺnila parametry validace.

Jak výsledky ukazují, metoda je validní, tedy data získaná touto metodou jsou precizní a pravdivá. Preciznost nám udává směrodatná odchylka vyjadřovaná v procentech a ukazuje nám, jak přesně jsou vzorky připravovány a stanoveny. V analytické praxi by její hodnota neměla přesáhnout 15 %. Pravdivost, tedy odchylka od skutečné hodnoty, nám ukazuje, zda výsledek je správný, tedy pravdivý. Tato odchylka by také neměla překročit 15 %. [48]

Výtěžek tiotropia je sice jen 70 %, nicméně jiná zkoušená metoda vedla k žádné nebo neuspokojivé detekci tiotropia. Nižší výtěžek může být působen nedostatečným vymytím tiotropia z SPE kolonek. Postup stanovení výtěžku, který byl použit v této práci, byl zvolen z toho důvodu, že ionizace tiotropia může být ovlivněna zásaditým pH použitým během SPE extrakce. To znamená, že molekula tiotropia může být jinak ionizovaná v methanolu, v mobilní fázi a jinak v elučním činidle. Pokud by tato ionizace nebyla zohledněna, výtěžek by byl nepravdivý. V ideálním případě by výtěžek měl být 100 %, avšak v praxi dochází během úpravy vzorku ke ztrátám. Je tedy běžné, že výtěžek je nižší. Ovšem vlivem matrice nebo nečistot může naopak dojít ke zvýšení výtěžku.

V této práci byly také změřeny dva vzorky od pacienta, který začal tiotropium užívat jednou denně. Jeden ze vzorků byl odebrán 5. den a druhý ze 7. den od počátku užívání tiotropia. První ze vzorků byl změřen, ale koncentrace analytu nemohla být stanovena, protože hodnota se nacházela pod limitem kvantifikace ($100 \pm 1,4$ pg/ml). Druhý ze vzorků obsahoval koncentraci tiotropia 209,2 pg/ml. Při pravidelném inhalování tiotropia by mělo být dosaženo rovnovážného stavu 7. den od začátku užívání. [3] [16] Jak jde vidět, 5. den užívání nebylo rovnováhy dosaženo. Nicméně, ve druhém vzorku (tedy 7. den užívání) byla stanovena koncentrace tiotropia, která byla v rozsahu

kalibrační křivky. Lze tedy říci, že tato metoda je aplikovatelná na stanovení koncentrace tiotropia v moči u pacientů.

Toto stanovení má však i své úskalí. Pitný režim u pacientů je různý a podle toho se tiotropium může vylučovat rychleji nebo naopak pomalu. To může poněkud lékařům zkomplikovat rozhodování při úpravě dávkování léčiva. Z toho důvodu je v plánu najít vhodný marker, který by byl v moči taktéž ovlivněný pitným režimem. Kombinace nově vyvinuté metody a stanovení zmíněného markeru by pomohla lékařům snadněji upravovat dávkování tiotropia a nastavit tak lépe pacientům léčbu. Současně by si lékaři touto metodou také ověřili, zda pacient dodržuje stanovenou léčbu.

8 Závěr

Cíle, které byly stanoveny před vypracováním této práce, se podařilo splnit. Byla vypracována rešerše o tiotropiu, kapalinové chromatografii a hmotnostní spektrometrii, metodách úpravy vzorků a validaci. Dále byla zavedena metoda na stanovení tiotropia v lidské moči pomocí LC/MS. Metoda splňuje parametry validace a získaná data touto metodou jsou tedy precizní a pravdivá. Byly také změřeny dva patientské vzorky, ve kterých byla koncentrace tiotropia stanovena, nebo alespoň detekována. Závěrem lze říci, že byla zavedena nová LC/MS metoda s využitím SCX fáze, díky které lze spolehlivě stanovit koncentraci tiotropia v lidské moči, jejíž odběr pacienta nezatěžuje. V budoucnu je v plánu tuto metodu rozšířit o stanovení další látky, která by odpovídala pitnému režimu pacienta. Tato rozšířená metoda by lékařům poskytla vhodný nástroj pro ověření, zda pacient dodržuje stanovenou léčbu.

Citovaná literatura

- [1.] J. Švihovec, J. Bultas, P. Anzenbacher, J. Chládek, J. Příborský, J. Slíva a M. Votava, ed. Farmakologie. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018.
- [2.] J. Marek, Farmakoterapie vnitřních nemocí. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2010.
- [3.] <https://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC171384.pdf&type=spc&as=spiolto-respimat-spc>, staženo 3.března 2022.
- [4.] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/206756Orig1s000Lbl.pdf, staženo 20.března 2022.
- [5.] V. Kašák, Tiotropium, *Remedia* 15(3) (2005) 205-211.
- [6.] I. Krčmová, D. Sýkora, Tiotropium bromid v léčbě bronchiálního astmatu, *Remedia* 25(4) (2015) 315-318.
- [7.] <https://drugcentral.org/drugcard/2677>, staženo 19.května 2022
- [8.] P.J. Barnes, Muscarinic receptor subtypes in airways, *Life Sciences* 52(5-6) (1993) 521-527.
- [9.] E. Haddad, H. Patel, J. E. Keeling, M. H. Yacoub, P. J. Barnes, M. G. Belvisi, Pharmacological characterization of the muscarinic receptor antagonist, glycopyrrolate, in human and guinea-pig airways, *British Journal of Pharmacology*, 127(2) (1999) 413-420.
- [10.] P.J. Barnes, The Pharmacological Properties of Tiotropium, *Chest* 117(2) (2000) 63-66.
- [11.] S. Dhillon, Tiotropium/Olodaterol: A Review in COPD, *Drugs* 76(1) (2016) 135-146.
- [12.] P.J. Barnes, M.G. Belvisi, J.C.W. Mak, E. Haddad, B O'Connor, Tiotropium bromide (Ba 679 BR), a novel long-acting muscarinic antagonist for the treatment of obstructive airways disease, *Life Sciences*, 56(11-12) 1995 853-859.

- [13.] G.M. Keating, Tiotropium Bromide Inhalation Powder. *Drugs* 72(2) (2012) 273-300
- [14.] B. Disse, R. Reichl, G. Speck, W. Traunecker, K. L. Rominger, R. Hammer, Ba 679 BR, A novel long-acting anticholinergic bronchodilator, *Life Sciences* 52(5-6) (1993) 537-544.
- [15.] B. Disse, G.A. Speck, K.L. Rominger, T.J. Witek, R. Hammer, Tiotropium (SPIRIVA™): Mechanical considerations and clinical profile in obstructive lung disease. *Life Sciences* 64(6-7) (1999) 457-464.
- [16.] D. Lincová, H. Farghali, *Základní a aplikovaná farmakologie. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007.*
- [17.] L. Ding, W. Tan, Y. Zhang, J. Shen, Z. Zhang, Sensitive HPLC--ESI-MS Method for the Determination of Tiotropium in Human Plasma, *Journal of Chromatographic Science* 46(5) (2008) 445-449.
- [18.] J. Wang, Y. Jiang, Y. Wang, H. Li, J.P. Fawcett, J. Gu, Highly sensitive assay for tiotropium, a quaternary ammonium, in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21(11) (2007) 1755-1758.
- [19.] E.N.M. Ho, W.H. Kwok, A. S.Y. Wong, T. S.M. Wan, Detection of singly- and doubly-charged quaternary ammonium drugs in equine urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 710 (2012) 94-101.
- [20.] P. Klouda, *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava, 2003.*
- [21.] D.A. Skoog, D.M. West, F. J. Holler, S.R. Crouch, *Fundamentals of analytical chemistry, Ninth edition, Australia: Brooks/Cole Cengage Learning, 2014.*
- [22.] L. Nováková, M. Douša, P. Česla, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, 2021.*
- [23.] J.J. Van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chemical Engineering Science* 5(6) (1956) 271-289.
- [24.] J.C. Giddings, The role of lateral diffusion as a rate-controlling mechanism in chromatography, *Journal of Chromatography A*. 5 (1961) 46-60.

- [25.] J.C.Giddings, Comparison of Theoretical Limit of Separating Speed in Gas and Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry* 37(1) (1965) 60-63.
- [26.] J.H. Knox, Practical Aspects of LC Theory*, *Journal of Chromatographic Science* 15(9) (1977) 352-364.
- [27.] G.D. Christian, P. K. Dasgupta, K. Schug, *Analytical chemistry*. 7th ed. Hoboken: Wiley, 2014.
- [28.] J. Weiss, D. Jensen, Modern stationary phases for ion chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375(1) (2003) 81-98.
- [29.] J. Weiss, D. Jensen, Modern stationary phases for ion chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375(1) (2003) 81-98.
- [30.] L.R.Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, *Introduction to modern liquid chromatography*. 3rd ed. Hoboken, N.J.: Wiley, 2010.
- [31.] Ch. Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2007.
- [32.] J.H.Gross, *Mass Spectrometry*. 2nd edition. Heidelberg: Springer, 2011.
- [33.] V. Havlíček, F. Tureček, Kvadrupólový analyzátor a iontová past, *Chem. listy* 114(2) 2020 106-112.
- [34.] M. Holčapek, P. Jandera, Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, *Chem. listy* 92(4)1998 278-286.
- [35.] K. Záruba, *Analytická chemie*, první vyd. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016.
- [36.] R. Ekman, J. Silberring, A. Westman-Brinkmalm a A. Kraj, *Mass Spectrometry, Instrumentation, Interpretation, and Applications*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2009.
- [37.] L. Nováková, M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*, Praha 2013.
- [38.] L. Nováková, H. Vlček, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Analytica Chimica Acta* 656(1-2) (2009) 8-35.
- [39.] H. Kataoka, New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis, *Trends in Analytical Chemistry* 22(4) (2003) 232-244.

- [40.] Z. Plzák, D. MILDE, Terminology in Metrology and Quality Assurance, Chem. listy 106(1) (2012) 41-44.
- [41.] A. Teasdale, D. Elder, R. W. Nims, ed. ICH Quality Guidelines, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2017.
- [42.] L.A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). Pure and Applied Chemistry 67(10) (1995) 1699-1723.
- [43.] J.L. Burrows, K.V. Watson, Development and application of a calibration regression routine in conjunction with linear and non-linear chromatographic detector responses, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 12(4) (1994) 523-531.
- [44.] M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), Pure and Applied Chemistry 74(5) (2002) 835-855.
- [45.] B. Dejaegher, Y. V. Heyden, Ruggedness and robustness testing, Journal of Chromatography A 1158(1-2) (2007) 138-157.
- [46.] ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures. Step 5 version. 2006.
- [47.] <https://www.nestgrp.com/protocols/trng/buffer.shtml>, staženo 27.7.2022
- [48.] Guideline on bioanalytical method validation. (2011).