

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANKA PEGANC

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANKA PEGANC

**ANALIZA BISOPROLOLA V PLAZMI S TEKOČINSKO
KROMATOGRAFIJO: RAZVOJ IN VALIDACIJA METODE**

DETERMINATION OF BISOPROLOL IN HUMAN PLASMA BY
LIQUID CHROMATOGRAPHY: ANALYTICAL METHOD
DEVELOPMENT AND VALIDATION

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka.

HVALA

- ★ *Tomažu, Mojci, Robiju in Greti*
- ★ *Posebna zahvala: Juriju za meritve na masnem spektrometru*

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Tomaža Vovka.

Ljubljana, februar 2013

Predsednica diplomske komisije: izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič

Članica diplomske komisije: asist. dr. Irena Prodan Žitnik

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Lastnosti analita	1
1.1.1	Fizikalno-kemijske lastnosti	1
1.1.2	Klinični podatki	2
1.1.3	Farmakodinamične lastnosti	2
1.1.4	Farmakokinetične lastnosti	3
1.2	Analiza učinkovin v bioloških vzorcih	4
1.2.1	Biološki vzorci.....	4
1.2.2	Priprava vzorca	5
1.2.3	Separacija in detekcija	11
1.2.4	Masna spektrometrija	13
1.3	Pregled raziskav na področju analitike bisoprolola	15
2	NAMEN DELA.....	17
3	EKSPERIMENTALNI DEL	18
3.1	Materiali	18
3.1.1	Plazma	18
3.1.2	Standard in interni standardi.....	18
3.1.3	Reagenti in topila.....	19
3.2	Priprava standardnih raztopin	20
3.3	Priprava kalibracijskih standardov in QC vzorcev	21
3.4	Izbira internega standarda	21
3.5	Priprava vzorca	21
3.4.1	Ekstrakcija tekoče-tekoče	22
3.4.2	Ekstrakcija na trdnem nosilcu	22
3.5	Pogoji kromatografije s fluorescentnim detektorjem (HPLC-FLD).....	26

3.6	Pogoji kromatografije, sklopljene s tandemskim masnim spektrometrom (LC-MS/MS).....	27
3.7	Validacija metode	29
3.7.1	Selektivnost, linearnost in meja določljivosti.....	29
3.7.2	Točnost in ponovljivost	31
3.7.3	Učinek matrice in izkoristek ekstrakcije	32
3.7.4	Stabilnost	35
3.8	Analiza vzorcev bolnikov	36
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	37
4.1	Izbor ekstrakcijske metode	37
4.1.1	Optimizacija postopka SPE	39
4.2	Izbira internega standarda	40
4.3	Optimizacija kromatografije s fluorescentnim detektorjem HPLC-FLD).....	40
4.4	Pogoji kromatografije, sklopljene s tandemskim masnim spektrometrom (LC-MS/MS).....	41
4.5	Validacija metode	45
4.5.1	Selektivnost, linearnost in meja določljivosti.....	45
4.5.2	Točnost in ponovljivost	48
4.5.3	Učinek matrice in izkoristek ekstrakcije	49
4.5.4	Stabilnost	53
4.6	Aplikacija metode na realne vzorce	55
5	SKLEPI	58
6	VIRI.....	60

POVZETEK

V okviru diplomskega dela smo razvili občutljivo, točno in natančno metodo za določevanje bisoprolola v človeški plazmi. Eksperimentalni del je obsegal razvoj in optimizacijo ekstrakcijskega postopka ter optimizacijo kromatografskih pogojev. Končni postopek temelji na tekočinski kromatografiji, sklopljeni s tandemsko masno spektrometrijo, saj z uporabo fluorescentnega detektorja nismo dosegli želene selektivnosti. Izmed preizkušenih načinov ekstrakcije (tekoče-tekoče, na trdnih nosilcih in obarjanje proteinov) je najboljše rezultate dal postopek z ekstrakcijo na trdnih nosilcih Strata X-C in uporabo metoprolola kot internega standarda. Kromatografsko separacijo smo izvedli na reverzno fazni koloni Kinetex C18 ($50 \times 2,1$ mm; $2,6 \mu\text{m}$). Mobilna faza je bila sestavljena iz 0,1 % mravljične kisline v vodi in acetonitrila, pri čemer smo začetni del organske faze (10 %) postopoma povečevali in tako dosegli najmanjši možni čas analize, ki je znašal 2,7 min. Bisoprolol in interni standard smo ionizirali z elektrorazprševalnim ionizatorjem, nastavljenim na pozitivni način. Izvedli smo multirezidualno analizo in za kvantitativno določanje bisoprolola določili masni prehod m/z 326,2 \rightarrow 56,1, masni prehod m/z 326,2 \rightarrow 116,1 pa nam je služil za potrjevanje identitete analita. Interni standard smo določali pri masnem prehodu m/z 268,2 \rightarrow 116. Pomembnejši del naloge je obsegala validacija metode s standardnimi raztopinami bisoprolola in ekstrahiranimi plazemskimi standardi. Pri vrednotenju pridobljenih rezultatov smo se ravnali po smernicah za validacijo bioanalitske metode Ameriške agencije za hrano in zdravila. Metoda je bila v območju linearnosti 1–150 ng/mL točna (94,5–105,5 %) in ponovljiva s koeficientom variacije 3,4–10,6 %. Izkoristek ekstrakcije iz plazme je bil konstanten in je znašal od 88,1 do 99,1 %. Bisoprolol je bil v plazemskih vzorcih in metanolu stabilen, prav tako ni bilo zaznati pomembnejšega učinka matrice. Z optimiziranim in validiranim postopkom smo uspešno določili plazemske koncentracije bisoprolola pri 14 bolnikih v štirih različnih časovnih točkah po per os aplikaciji zdravila z bisoprololijevim fumaratom.

Ključne besede: bisoprolol, tekočinska kromatografija, masna spektrometrija, ekstrakcija na trdnih nosilcih, plazemski vzorci.

ABSTRACT

A sensitive, accurate and precise method was developed and validated for quantification of bisoprolol in human plasma. In experimental part, the optimization of sample preparation techniques and chromatographic conditions is described. The final method employed a state-of-the-art liquid chromatography-tandem mass spectrometry, since the selectivity of optimized method using fluorescence detector was not satisfactory. Several strategies for preparation of plasma samples were evaluated including liquid-liquid extraction, solid phase extraction and protein precipitation. Best sample clean-up was achieved by solid phase extraction with a mixed-mode column Strata X-C and metoprolol was used as the internal standard. Chromatographic separation was performed on a Kinetex C18 column (50 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) using a gradient mixture of acetonitrile and water (containing 0.1 % formic acid) as a mobile phase at flow rate of 0.65 mL/min. Protonated analytes were detected in multiple reaction monitoring mode. The mass transition ion-pair was as follows: m/z 326.2 → 56.1 for quantification of bisoprolol, m/z 326.2 → 116.1 for bisoprolol qualifier ion and m/z 268.2 → 116 for metoprolol. One of the most important aspects of our work was method validation, which was achieved by analyzing spiked plasma samples (standards for the calibration curve and quality control samples). Moreover, selectivity towards endogenous species was demonstrated by analyzing blank plasma and monitoring bisoprolol quantifier ion. The method validation procedure was based on the recommendations by the United States Food and Drug Administration. Calibration curve was linear over wide range from sub- to over-therapeutic concentration in plasma (1–150 ng/mL). Intra- and inter-day coefficient of variation was less than 10.6 % and accuracy ranged from 94.5 % to 105.5 %. Recovery was reproducible and ranged from 88.1 % to 99.1 % and an absence of significant matrix effect was confirmed. The validated method was successfully applied to plasma samples obtained from 14 cardiovascular patients under treatment with 1.25 mg to 10 mg of bisoprolol fumarate per day.

Keywords: Bisoprolol; Liquid chromatography; Mass spectrometry; Solid phase extraction; Plasma samples

OKRAJŠAVE

β -bloikator	zaviralec adrenergičnih receptorjev beta
ACN	acetonitril
ALS	avtomatski vzorčevalnik (<i>automatic liquid sampler</i>)
APCI	kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku (<i>atmospheric-pressure chemical ionization</i>)
ATC	anatomsko-terapevtsko-kemična klasifikacija zdravil
Biso	bisoprolol
C	koncentracija
CI	kemijska ionizacija (<i>chemical ionization</i>)
C_{\max}	maksimalna koncentracija v plazmi
CV	koeficient variacije
DAD	detektor z nizom diod (<i>diode array detector</i>)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EI	elektronska ionizacija (<i>electron ionization</i>)
ESI	elektrozaprševalna ionizacija (<i>electrospray ionization</i>)
FAB	obstreljevanje s hitrimi elektroni (<i>fast atom bombardment</i>)
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (<i>Food and Drug Administration</i>)
FLD	fluorescentni detektor
FTMS	masna spektrometrija s Fourierjevo transformacijo (<i>Fourier transform mass spectrometry</i>)
GC	plinska kromatografija (<i>gas chromatography</i>)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
IS	interni standard
LC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo
LLOQ	spodnja meja določljivosti (<i>lower limit of quantification</i>)
LOD	meja zaznavnosti (<i>limit of detection</i>)
m/m	utežni odstotek
v/v	volumski odstotek
m/z	razmerje med maso in nabojem

MALDI	ionizacija v matrici z lasersko desorpcijo (<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
ME	učinek matrice (<i>matrix effect</i>)
MF	mobilna faza
MRM	multirezidualna analiza (<i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	masni spektrometer
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PMT	fotopomnoževalka (<i>photomultiplier</i>)
PS	primarna osnovna raztopina
Q	kvadrupol ali masni filter
QC	kontrolni vzorec (<i>quality control</i>)
QC _H	kontrolni vzorec pri visoki koncentraciji
QC _L	kontrolni vzorec pri nizki koncentraciji
QC _M	kontrolni vzorec pri srednji koncentraciji
r ²	determinacijski koeficient
Re	izkoristek ekstrakcije (<i>recovery</i>)
rpm	obrati na minuto (<i>revolutions per minute</i>)
sd	standardni odklon
SPE	ekstrakcija na trdnem nosilcu (<i>solid phase extraction</i>)
SPME	mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (<i>solid phase microextraction</i>)
SS1	sekundarna osnovna raztopina 1
SS2	sekundarna osnovna raztopina 2
T	temperatura
TFA	trifluoroocetna kislina (<i>trifluoroacetic acid</i>)
t _{max}	čas, pri katerem je dosežena maksimalna koncentracija v plazmi
TOF	masni analizator na čas preleta ionov (<i>time-of-flight</i>)
UHPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (<i>ultra high performance liquid chromatography</i>)
w _i	regresijska utež
WS	delovna raztopina

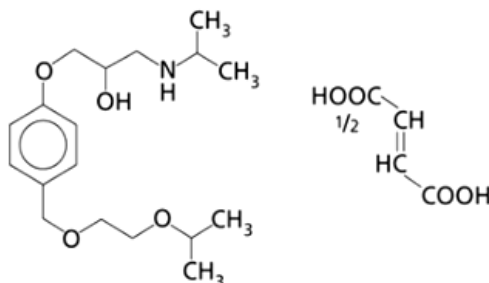
1 UVOD

Bisoprolol spada med pogosteje predpisane učinkovine za zdravljenje kardiovaskularnih obolenj. Za namene, kot so določevanje farmakokinetičnih parametrov ali terapevtsko spremljanje koncentracij, potrebujemo zanesljivo metodo za določevanje učinkovine v plazmi. Pri izbiri analizne metode in načrtovanju postopka je bistvenega pomena narava analizirane spojine, zato bomo v začetku teoretičnega dela naloge najprej predstavili nekatere pomembnejše lastnosti in značilnosti našega analita bisoprolola.

1.1 LASTNOSTI ANALITA

1.1.1 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI

Bisoprolol je mednarodno nelastniško ime za spojino (\pm)-1-{4-[(2-izopropoksietoksi)metil]fenoksi}-3-(izopropilamino)propan-2-ol, v farmaciji pa uporabljamo predvsem sol s fumarno kislino (slika 1). Na področju lipofilnosti se nahaja na sredini med predvsem lipofilnimi in predvsem hidrofilnimi β -blokatorji z logP 1,87 (eksperimentalno določena vrednost v sistemu oktanol-voda) (1, 2). Pomembnejše fizikalno-kemijske lastnosti so prikazane v preglednici 1.



Slika 1. Struktura bisoprololijevega hemifumarata (1).

Preglednica 1

Fizikalno-kemijske lastnosti bisoprololijevega hemifumarata (2, 3)

Kemijska formula	$C_{18}H_{31}NO_4 \cdot \frac{1}{2}(C_4H_4O_4)$
Molekulska masa	383,48 g/mol
pKa (bisoprolol)	9,5
Topnost	Zelo lahko topen v vodi in metanolu, lahko topen v kloroformu, ledoctu in etanolu, težko topen v acetonu in etil acetatu
Temperatura tališča	101 °C
Izgled	Bela kristalinična snov

1.1.2 KLINIČNI PODATKI

Bisoprolol uvrščamo med *selektivne zaviralce adrenergičnih receptorjev β_1* (ATC oznaka C07AB07). Pri nas je registriran za zdravljenje stabilnega kroničnega srčnega popuščanja, arterijske hipertenzije in koronarne srčne bolezni (angine pectoris) (4). Učinkovina je na voljo v filmsko obloženih tabletah za peroralno uporabo, ki vsebujejo, odvisno od zdravila, od 1,25 do 10 mg bisoprololijevega fumarata (Borez[®], Byol[®], Cardiol[®], Concor[®], Concor COR[®]), registrirane pa so tudi kombinacije bisoprolola z acetilsalicilno kislino (Concorasa[®]) in hidrokloriazidom (Lodoz[®]) (5). Običajni odmerek za zdravljenje hipertenzije in koronarne srčne bolezni je 5 mg bisoprololijevega fumarata enkrat na dan, ki ga lahko povečamo na 10 mg na dan, maksimalni priporočen odmerek pa znaša 20 mg na dan (6). Zdravljenje kroničnega srčnega popuščanja zahteva fazo titracije. Predlagani začetni odmerek je 1,25 mg enkrat na dan, ki se poveča na do 10 mg enkrat na dan v intervalu dveh ali več tednov (7).

1.1.3 FARMAKODINAMIČNE LASTNOSTI

β -adrenergični receptorji so po definiciji *"s proteinom G sklopljeni receptorji, na katere se fiziološko vežejo kateholamini, zlasti noradrenalin in adrenalin, stimulacija receptorja pa je bolj izražena pri uporabi sinteznega izoproterenola kot adrenalina"* (8). Bisoprolol deluje selektivno zaviralno na β_1 tip receptorjev, ki se nahajajo pretežno v srcu in ledvicah. To povzroči upočasnitev srčnega utripa in zmanjšanje krčljivosti ter posledično zmanjšanje porabe kisika v srčni mišici. Kot možni mehanizem antihipertenzivnega učinka navajajo tudi zmanjšanje plazemske aktivnosti renina zaradi zaviranja adrenergičnih receptorjev β_1 v ledvicah (6, 9).

Paradoksalno se β -blokatorji uporabljajo tudi za zdravljenje srčnega popuščanja, čeprav obstaja na začetku zdravljenja nevarnost poslabšanja (zato je potrebno začeti z nizkimi odmerki). β -blokatorji zmanjšajo brazgotinjenje tkiva v srčni mišici, ki se lahko pojavi pri dolgotrajni bolezni srca in upočasnjujejo srčno frekvenco ter tako izboljšajo polnjenje prekatov in s tem funkcijo srca. Rezultati več kliničnih študij (10–12) so pokazali izboljšanje simptomov, ventrikularne funkcije in funkcijskega statusa po klasifikaciji NYHA (*New York Heart Association*) ter na splošno višje preživetje bolnikov na terapiji z bisoprololom.

1.1.4 FARMAKOKINETIČNE LASTNOSTI

Bisoprolol ima približno enako izražene hidrofilne kot lipofilne lastnosti, kar mu daje ugoden farmakokinetični profil – se dobro absorbira in ima hkrati dovolj dolg razpolovni čas, da se lahko jemlje enkrat na dan. Glavni farmakokinetični parametri so povzeti v preglednici 2.

Preglednica 2

Farmakokinetika bisoprolola (1)

Stopnja absorpcije	> 90 %
Predsistemski metabolizem	< 10 %
Biološka uporabnost	90 %
C_{\max}	~ 50 ng/mL ^a
t_{\max}	2–3 h
Razpolovna doba v plazmi	10–12 h
Metabolizem	50 % v jetrih do neaktivnih presnovkov 50 % v nespremenjeni obliki
Izločanje	95 % preko ledvic 2 % z blatom
Ledvični očistek	140 mL/min
Volumen porazdelitve	3,21 L/kg
Vezava na plazemske proteine	~ 30 %
Prehod čez placento	da
Prehod v mleko	da

^a 10 mg/dan, stacionarno stanje.

Kinetika bisoprolola je linearna in ni odvisna od starosti bolnika. Pričakovane plazemske koncentracije znašajo od 6 ng/mL (pri začetnem odmerku 1,25 mg na dan) do 101 ng/mL (pri maksimalnem odmerku 20 mg na dan). Terapevtske koncentracije pri dozi 10 mg na dan znašajo od 10 do 50 ng/mL (1). Pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem (III. funkcijski razred po NYHA) so v primerjavi z zdravimi prostovoljci ravni bisoprolola v plazmi višje in razpolovni časi daljši. Največja plazemska koncentracija v stanju dinamičnega ravnovesja znaša pri teh bolnikih pri odmerku 10 mg na dan 64 ± 21 ng/mL, razpolovni čas pa 17 ± 5 ur (7).

1.2 ANALIZA UČINKOVIN V BIOLOŠKIH VZORCIH

V nadaljevanju se bomo osredotočili na metode, s katerimi kvalitativno in kvantitativno določujemo učinkovine in njihove metabolite v bioloških vzorcih. Veljavna in zanesljiva bioanalizna metoda je pomemben del določevanja farmakokinetičnih parametrov pri razvoju novih zdravil, čedalje večji pomen pa pridobiva tudi terapevtsko spremljanje koncentracij učinkovin. Z analizo spojin v bioloških vzorcih se srečujemo tudi na področjih kot sta forenzika in toksikologija ter pri kontroli dopinga v športu (13).

Beta-blokatorji so s strani Mednarodnega olimpijskega komiteja prepovedani pri nekaterih športih, pri katerih se zahtevata natančnost in mirna roka (na primer lokostrelstvo in streljanje s puško), zlorabljajo pa se tudi za zmanjševanje treme pred nastopom (9).

Vzorci človeškega ali živalskega izvora so izredno kompleksne narave, tarčni analit pa je v njih pogosto prisoten v zelo nizkih koncentracijah. Večina analiznih naprav ne prenese neposrednega nanosa odvzete tekočine ali tkiva, zato je pred samo analizo nujna ustrezna priprava oziroma obdelava vzorca, med katero izoliramo in koncentriramo analit. Analitski proces na splošno vključuje pet korakov: vzorčenje, pripravo vzorca, separacijo, detekcijo in analizo podatkov (14).

1.2.1 BIOLOŠKI VZORCI

Biološko matrico lahko predstavljajo različne telesne tekočine in tkiva, najpogosteje pa so to plazma (kri brez krvnih celic), serum (kri brez krvnih celic, fibrinogena in nekaterih drugih faktorjev strjevanja krvi) in urin. Koncentracija učinkovin in njihovih metabolitov je običajno višja v urinu, zato ga pogosteje odvezemamo pri odkrivanju snovi, ki normalno niso prisotne v telesu, na primer nedovoljene droge ali razni strupi. Problematika urinskih vzorcev se kaže v veliki vsebnosti motečih snovi in visoki variabilnost v sestavi matrice (različne vrednosti pH in ionske moči, različna vsebnost aminokislin, proteinov, bakterij, glukoze, soli ...). Količina in koncentriranost urina sta odvisni od vrste dejavnikov, kot so hidracija preiskovanca, sočasne bolezni (predvsem ledvic) in jemanje določenih zdravil, zaradi česar je kvantifikacija spojin v urinu problematična. Plazma ima v primerjavi z urinom bolj konstantno sestavo in se med drugim uporablja za analizo v farmakokinetičnih študijah ter pri terapevtskem spremljanju koncentracij učinkovin. Določevanje učinkovin v plazmi in serumu lahko motijo predvsem proteini, fosfolipidi in razne soli (13, 15).

Bisoprolol se v plazmi nahaja v dveh oblikah: v *prosti obliki*, ki je odgovorna za farmakološki učinek in se tudi metabolizira, ter *vezan na plazemske proteine*. V vezani obliki ga je približno 30 % in se kot rahlo bazična spojina veže predvsem na kisli α -1 glikoprotein (1). Med pripravo vzorca običajno porušimo vezi med učinkovino in plazemskimi proteini. Rezultati bioanalitskih metod se tako nanašajo na celokupno koncentracijo spojine v plazmi ali serumu in so neodvisni od stopnje vezave učinkovine na proteine (13).

1.2.2 PRIPRAVA VZORCA

Ustrezna priprava vzorca je bistvenega pomena za uspešno izvedbo metode. Po nekaterih ocenah (13, 15, 16) zahteva do 80 % časa, ki ga porabimo v analitskem laboratoriju in predstavlja 60–70 % stroškov laboratorija. Glavni cilji priprave vzorca so (13):

- odstranitev motečih komponent matrice (proteinov, soli, kislin, baz in drugih organskih snovi, predvsem tistih, ki imajo podobne lastnosti kot analit);
- koncentriranje analita z namenom izboljšanja meje zaznavnosti in določljivosti;
- prenos analita iz matrice v topilo, ki je primernejše za injiciranje v analitski sistem.

1.2.2.1 Obarjanje proteinov

Obarjanje je eden pogostejših načinov odstranjevanja proteinov iz biološke matrice in se ga poslužujemo predvsem takrat, kadar naš vzorec predstavljata plazma ali serum. Ta vsebujeta okrog 8 % (*m/m*) proteinov, ki bi se lahko adsorbirali na kromatografske kolone, jih mašili in motili njihovo delovanje. Postopek je relativno enostaven in hiter: plazmi ali serumu dodamo obarjalni reagent, centrifugiramo in za nadaljnjo analizo uporabimo supernatant, ki je brez proteinov. Kot obarjalni reagent najpogosteje uporabljamo organska topila, ki se mešajo z vodo, predvsem acetonitril in metanol, ki imata poleg dobrega mešanja s plazmo in serumom tudi ustrezno kompatibilnost z običajnimi HPLC mobilnimi fazami. Prekomerno redčenje vzorca je nezaželeno, saj zvišuje mejo zaznavnosti in določljivosti. Iz preglednice 3 lahko razberemo, da z razmerjem topilo:plazma = 2:1 običajno odstranimo čez 98 % proteinov. Eden močnejših obarjalnih reagentov je trikloroocetna kislina (CCl_3COOH) (0,1 g/mL), ki pa lahko povzroči nevšečnosti (zmanjšanje izkoristka) pri spojinah, ki so slabše topne v kislem. Nizek izkoristek se lahko pojavi tudi zaradi soobarjanja učinkovine s plazemskimi proteini (13).

Preglednica 3

Učinkovitost nekaterih obarjalnih reagentov glede na razmerje topilo:plazma (13)

Obarjalni reagent	Volumen dodanega obarjalnega reagenta na volumen plazme		
	0,2	1,0	2,0
	Učinkovitost obarjanja [%]		
Acetonitril	13,4	97,2	99,7
Aceton	1,5	96,2	99,4
Metanol	17,6	73,4	98,7
CCl ₃ COOH (0,1g/mL)	99,7	99,5	99,8
ZnSO ₄ -NaOH	41,1	94,2	99,3

1.2.2.2 Ekstrakcija tekoče-tekoče

Ekstrakcija tekoče-tekoče je "postopek priprave vzorca pred analizo, ki temelji na ločevanju njegovih komponent glede na porazdelitev med dve tekočini, navadno vodno raztopino in organsko topilo, ki se ne mešata" (8). Zmes (običajno) vodnega vzorca in organskega topila najprej intenzivno stresamo, pri čemer analit prehaja v organsko fazo. Fazi ponovno ločimo s centrifugiranjem, izoliramo organsko fazo, odparimo topilo in preostanek raztopimo v topilu, ki je kompatibilno s kromatografskim sistemom.

Pri nevtralnih spojinah je izkoristek ekstrakcije odvisen predvsem od porazdelitvenega koeficienta spojine med organsko in vodno fazo. Učinkovine z bazičnimi in kislimi funkcionalnimi skupinami pa v vodnem mediju disociirajo, zato moramo za uspešno ekstrakcijo upoštevati tudi pKa analita. pH vodne faze uravnamo na vrednost, ki se od pKa vrednosti analita razlikuje za vsaj dve enoti – pri kisljih spojinah mora biti ta za dve enoti nižja od pKa analita, pri bazičnih pa za dve enoti višja. Na tak način dosežemo, da je > 99 % spojine v neionizirani obliki in tako brez večjih izgub preide v organsko fazo. Če je potrebno, nečistote iz organske faze odstranimo še s povratno ekstrakcijo. Bazične učinkovine pri tem iz organske faze ekstrahiramo nazaj v kislno vodno raztopino, kisle učinkovine pa v bazično. Nevtralne hidrofobne nečistote ostanejo v organski fazi (13).

Slabo stran ekstrakcije tekoče-tekoče predstavljajo poraba velike količine organskih topil, ki so pogosto zdravju in okolju škodljiva ter veliki volumni vzorcev. Sam postopek je tudi relativno zamuden in ga je težje avtomatizirati, zato se v zadnjem času pogosteje izvajata ekstrakcija na trdnem nosilcu in obarjanje proteinov (14).

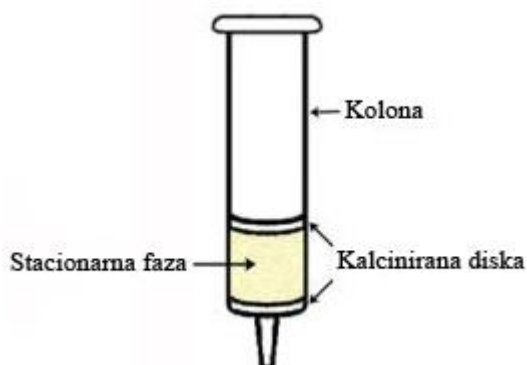
1.2.2.3 Ekstrakcija na trdnem nosilcu

Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE) je "postopek čiščenja ali koncentriranja vzorca pred analizo, pri čemer se v raztopljenem vzorcu želeni analit loči od drugih komponent glede na različno afiniteto do trdne stacionarne faze" (8). V primerjavi s klasično ekstrakcijo tekoče-tekoče ima več prednosti (14, 17):

- višji izkoristki in bolj učinkovito koncentriranje;
- manjša poraba organskih topil;
- potrebujemo manj vzorca (od 10 μL pri uporabi μ -elucijske ploščice);
- nimamo težav s penjenjem ali tvorbo emulzij;
- krajši čas priprave vzorca;
- enostavnejše rokovanje in večja robustnost;
- manj težav z labilnimi vzorci;
- lažja avtomatizacija.

Stacionarno fazo predstavljajo porozni delci na silikatni ali polimerni osnovi, ki imajo na površini veliko število funkcionalnih skupin, odgovornih za zadrževanje spojin v koloni. Nahaja se v obliki raznovrstnih produktov za izvajanje SPE, kot so polipropilenske ali steklene kartuše v obliki injekcijske brizge (slika 2), ploščice s 96 vdolbinicami in ekstrakcijski diski (14).

Običajno pri ekstrakciji na trdno stacionarno fazo adsorbiramo analit, medtem ko moteče komponente matrice stečejo iz kolone skupaj s topilom. Druga možnost je, da na trdno stacionarno fazo adsorbiramo moteče komponente matrice. Tako postopamo predvsem takrat, ko imamo v vzorcu prisoten analit v visokih koncentracijah, kar pa je v bioanalitiki redko (18).



Slika 2. Primer SPE kartuše.

V splošnem sestoji postopek ekstrakcije v koloni iz naslednjih korakov:

1. Predpriprava vzorca
2. Priprava kolone
3. Nanos vzorca
4. Spiranje kolone
5. Sušenje kolone
6. Elucija analita

V koraku **predpriprave vzorca** poskrbimo, da se bo analit ustrezno vezal na stacionarno fazo. Če imamo, na primer, ob uporabi reverzno-fazne SPE vzorec raztopljen v organskem topilu, lahko z dodatkom ustrezne količine vode povečamo vezavo analita na adsorbent. Podobno z uravnavanjem pH vrednosti vzorca kontroliramo vezavo ionizirajočih analitov. **Priprava kolone (kondicioniranje)** je običajno sestavljena iz omočenja adsorbenta in ekvibracije. Za omočenje kolone najpogosteje uporabljamo metanol in je še posebej pomembno pri silikatnih trdnih fazah. Z omočenjem aktiviramo funkcionalne skupine adsorbenta in povečamo možnost interakcij z analitom, kar je pomembno za dober izkoristek ekstrakcije. Ostanek topila v stopnji ekvibracije odstranimo s topilom, ki ima podobno polarnost in pH kot matrica vzorca – najpogosteje sta to voda ali pufer. **Nanos vzorca** mora slediti nemudoma, da se kolona ne izsuši. Sledi **spiranje** preostalih motečih komponent matrice (običajno z metanolom in/ali pufrom) in **sušenje**. Zadnji korak je **elucija** analita, pri čemer z ustreznim eluentom razbijemo interakcije analita s stacionarno fazo in ga tako sprostimo iz kolone. Končna raztopina (eluat), ki jo zbiramo ločeno, vsebuje topilo, analit in neodstranjene nečistote. Postopku običajno sledi odparevanje topila in rekonstitucija analita v ustrezni mešanici topil, v nekaterih primerih pa lahko eluat prenesemo neposredno na analizno napravo (13, 16).

SPE lahko glede na vrsto polnila v grobem razdelimo na tri tipe: *reverzno fazno z nepolarno stacionarno fazo*; *normalno fazno s polarno stacionarno fazo* in *ionsko izmenjevalno s pozitivno ali negativno nabitimi verigami stacionarne faze*. Kratka primerjava omenjenih načinov izvedbe SPE je prikazana v preglednici 4.

Preglednica 4

Načini izvedbe SPE glede na tip adsorbenta (13, 16)

SPE:	Reverzno fazna	Normalno fazna	Ionsko izmenjevalna
Analiti	Nepolarni ali srednje polarni	Polarni	Negativno nabiti ali kisline (anionski izmenjevalec), pozitivno nabiti ali baze (kationski izmenjevalec)
Tip interakcij	Hidrofobne (nepolarne-nepolarne, van der Waalove), π - π	Hidrofilne (polarno polarno, H-vezi, (induciran) dipol-dipol)	Ionske
Funkcionalne skupine adsorbenta	C18, C8, C2, cikloheksil, fenil, polimeri iz divinilbenzena in N-vinilpirolidona	Silikagel, cianopropil, aminopropil, magnezijev silikat	– NR ₃ ⁺ (močni anionski), – NH ₃ ⁺ (šibki anionski), – SO ₃ ⁻ (močni kationski), – COO ⁻ (šibki kationski)
Medij vzorca	Vodni, pufer z nizko ionsko močjo	Nepolarne organske topila (npr. heksan)	Voda, pufer z nizko ionsko močjo; pH v katerem je analit v ionizirani obliki
Elucija	MeOH/voda, MeCN/voda	MeOH, etil acetat, aceton, MeCN	Nevtralizacija naboja analita, raztopine soli z visoko ionsko močjo, deaktivacija šibkega izmenjevalca

Mešana ionsko izmenjevalna SPE ("mixed-mode" SPE) v eni koloni združuje reverzno fazni in ionsko izmenjevalni način ekstrakcije. S tem načinom lahko ločimo nevtralne, kisle in bazične spojine, idealno pa je, da ima analit tako hidrofobna področja kot tudi nabite funkcionalne skupine. Prednost metode je v tem, da lahko kolono spiramo s pufrom, ki bo odstranil polarne nečistote in z metanolom, saj je naš analit vezan tudi z ionskimi interakcijami, na katere metanol ne deluje. Tako se znebimo tudi nepolarnih nevtralnih nečistot, s čimer dobimo po tem postopku zelo čist ekstrakt (18).

1.2.2.4 Novejši pristopi k pripravi vzorcev

Trendi priprave vzorcev v bioanalitiki se nagibajo k razvoju metod, ki zahtevajo čedalje manjše količine vzorca in topil, omogočajo avtomatizacijo in "on-line" izvedbo z analitičnimi instrumenti, so visoko zmogljive in zahtevajo čim manj časa, nižajo pa se tudi zahtevane meje zaznavnosti in določljivosti (14). V nadaljevanju navajamo nekaj primerov pogostejših in že uveljavljenih metod in tehnik.

Priprava vzorcev na ploščicah s 96 vdolbinicami ("96-well plates")

Uvedba μ -elucijskih ploščic s 96 vdolbinicami je močno skrajšala čas priprave vzorcev in minimalizirala potrebne volumne vzorca ter porabo topil. Ploščice omogočajo visoko zmogljivostno analizo vzorcev in se uporabljajo predvsem za SPE in obarjanje proteinov, razvili pa so tudi že ploščice s 96 vdolbinicami za ekstrakcijo tekoče-tekoče (14, 19). Novejše μ -elucijske ploščice s SPE adsorbenti omogočajo nanos od 10–750 μ L vzorca, medtem ko lahko analit eluiramo z zelo nizkimi volumni topila – tudi do 25 μ L in tako do 15-krat povečamo koncentracijo analita v vzorcu. Prednost omenjenih ploščic je tudi v tem, da lahko zaradi visoke koncentracijske sposobnosti izpustimo korak sušenja in rekonstituiranja ter eluat prenesemo neposredno na analizni instrument (20).

Mikroekstrakcija na trdnem nosilcu ("solid phase microextraction" – SPME)

SPME se najpogosteje uporablja za ekstrakcijo hlapnih spojin predvsem iz vodnih vzorcev. Trdno fazo predstavljajo silikatna mikrovlakna, prevlečena z različnimi tipi polimerov. Vlakno je v posebni injekcijski brizgi pritrjeno v igli in ga lahko pomikamo gor in dol (pomočimo v vzorec), kar omogoča izvedbo priprave vzorca v enem samem koraku. Prednost metode je tudi v tem, da se pri sklopitvi s plinskim kromatografom izognemo porabi topil, saj lahko analit z vlakna desorbiramo tudi termično neposredno v GC injektorju (21).

"On-line" SPE

Pri t. i. "on-line" izvedbi je kolona s SPE adsorbentom vgrajena v kromatografski analizni sistem med avtomatski injektor in separacijsko kolono. Prednosti tehnike so hitrost in možnost popolne avtomatizacije, visoka občutljivost zaradi koncentriranja vzorca pred separacijsko kolono ter nizka cena ekstrakcije na posamezen vzorec. Slaba stran postopka pa je, da zahteva sistem za te namene precej zahtevno konfiguracijo ventilov, črpalk in kolon, pozorni pa moramo biti tudi na kompatibilnost uporabljenih topil (19, 20).

1.2.3 SEPARACIJA IN DETEKCIJA

Za ločevanje manjših molekul v biološki matrici se najpogosteje poslužujemo kromatografskih tehnik. Glavni princip kromatografije je porazdeljevanje analita med dve fazi – mobilno in stacionarno – na podlagi razlik v fizikalno-kemijskih lastnostih (15). Glede na mobilno fazo ločimo plinsko (GC) in tekočinsko (LC) kromatografijo, v nadaljevanju pa se bomo osredotočili predvsem na priljubljeno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti oziroma krajše HPLC ("*high-performance liquid chromatography*").

1.2.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

HPLC je "*tekočinska kromatografija, ki črpa mobilno fazo pod visokim tlakom*" (8). Srce sistema predstavlja jeklena separacijska kolona dolžine 5–25 cm in premera 4,6 mm, ki je običajno napolnjena s stacionarno fazo iz silikatnih delcev premera 5 μm . Črpalka zagotavlja konstanten pretok mobilne faze skozi kolono, na koncu katere analiti ločeno prihajajo na detektor. Tipični pretok skozi kolono znaša 0,5–2 mL/min, povratni tlak pa zaradi majhnosti delcev stacionarne faze doseže visoke vrednosti, običajno 30–300 barov (3–30 MPa). Današnji sistemi so opremljeni z avtomatskimi vzorčevalniki, ki injicirajo raztopino vzorca pod visokim tlakom v tok mobilne faze tik pred vstopom v kolono, pri čemer so običajni volumni injiciranja 5–100 μL . Odziv detektorja ob koncu kolone se s pomočjo računalniškega programa pretvori v kromatogram (13).

Več kot 90 % vseh HPLC analiz predstavlja **reverzno fazna HPLC**, ki je najprimernejša za zmerno polarne in nepolarne analite. Stacionarna faza je običajno sestavljena iz silikatnih delcev, ki imajo na površini hidrofobne funkcionalne skupine, kot so oktadecilna (C18, najbolj hidrofobna), oktilna (C8), fenilna, butilna (C4) in cianopropilna (najmanj hidrofobna) (13, 15). Silikatne stacionarne faze lahko uporabljamo v pH območju 2–8, saj pride pri višjih oziroma nižjih pH vrednostih mobilne faze do raztapljanja trdne osnove zaradi razcepa siloksanskih vezi. Omejitvi se lahko izognemo z uporabo stacionarne faze, ki temelji na organskih polimerih, kot je na primer kopolimer polistirena in divinilbenzena, ki je stabilen v pH območju 1–13 (13). Mobilno fazo reverzno fazne HPLC običajno predstavlja vodna faza (pufer) z organskim modifikatorjem (ACN, MeOH, tetrahidrofur, izopropil alkohol). S povečanjem odstotka organskega modifikatorja povzročimo hitrejšo elucijo hidrofobnih analitov. Slednji se sicer eluirajo iz kolone kasneje kot hidrofilni, saj tvorijo močnejše hidrofobne interakcije s stacionarno fazo (15).

1.2.3.2 Tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti

UHPLC ("*ultra high performance LC*") je novejša kromatografska tehnika, pri kateri so separacijske kolone napolnjene z delci, manjšimi od 2 μm (običajno 1,7 μm), povratni tlak v sistemu pa je še višji kot pri HPLC – običajno od 400 do 1000 barov. Manjši delci pomenijo večjo učinkovitost kolone in posledično tudi višjo resolucijo v primerjavi s tradicionalno HPLC, pri kateri so delci običajno veliki 5 μm . Zaradi manjšega premera delcev lahko skrajšamo dolžino kolone brez izgube v učinkovitosti, ker je optimalni pretok obratno sorazmeren z velikostjo delcev, pa lahko analizo izvajamo tudi pri hitrejših pretokih. Oboje ima za posledico višjo hitrost in zmogljivost analize brez izgube v resoluciji. Vrhovi so pri UHPLC običajno višji in ožji, kar pomeni izboljšanje občutljivosti metode (22).

Primerjavo tehnik HPLC-MS in UHPLC-MS so izvajali tudi na skupini β -blokatorjev, pri čemer so uporabljali mobilno fazo, sestavljeno iz acetonitrila, TFA in H_2O ali D_2O . Ob uporabi UHPLC je bil čas analize krajši, kapacitivnost kolone višja, pri mobilni fazi z D_2O pa so rezultati pokazali tudi višje razmerje signala proti šumu (23).

1.2.3.3 Detektorji

LC detektorji nam dajejo odziv na analit, ki se pretvori v električni signal. Odziv je sorazmeren koncentraciji ali masi spojine v mobilni fazi, kvantifikacija pa poteka na podlagi površine vrha ali njegove višine. Nekateri izmed pomembnejših detektorjev v farmacevtski analizi so navedeni v preglednici 5.

Preglednica 5

Pogostejši LC detektorji s prikazano mejo zaznavnosti (LOD) in selektivnostjo (13)

Detektor	LOD [ng]	Selektivnost za spojine
UV	0,1–1,0	Selektiven (kromofor)
Fluorescentni	0,001–0,01	Zelo selektiven (fluorofor)
Elektrokemični	0,01–1,0	Zelo selektiven (redoks)
Masni spektrometer	0,001–0,01	Selektiven (ionizacija)
Detektor spremembe lomnega količnika	100–1000	Univerzalen
Detektor na sipanje svetlobe	0,1–1,0	Nizko selektiven (nehlapljive spojine)

UV detektor (na primer tipa DAD) temelji na absorpciji preiskovane spojine v UV (190–400 nm) in VIS (400–790 nm) območju, za kar mora analit v svoji strukturi vsebovati kromofor oziroma vsaj eno dvojno vez. Zaradi svoje enostavnosti, selektivnosti in zanesljivosti je med najbolj uporabljenimi detektorji predvsem v kontrolni analizi gotovih farmacevtskih oblik, za analizo nizkih koncentracij učinkovin v bioloških vzorcih pa pogosto ni dovolj občutljiv (13). S **fluorescentnim detektorjem** dosežemo nižje meje zaznavnosti, je pa dotični detektor zelo selektiven, saj so naravno fluorescentne spojine manj številne. Bisoprolol in strukturno sorodni β -blokatorji rahlo fluorescirajo že brez derivatizacije in so za analizo na podlagi fluorescence kar primerni. Detekcija poteka tako, da z žarkom svetlobe določene valovne dolžine molekulo najprej privedemo v višje energijsko stanje (*ekscitacija*) in nato merimo svetlobo druge, višje valovne dolžine, ki jo molekula oddaja med vračanjem v osnovno energijsko stanje (*emisija oziroma fluorescenca*). Oddana fluorescentna svetloba se sipa v vse smeri, vendar jo običajno merimo pod kotom 90° glede na ekscitacijsko obsevanje. Fluorescenco tako merimo na temnem ozadju in s tem zmanjšamo šum, kar je tudi razlog, zaradi katerega lahko s fluorescentnim detektorjem dosežemo precej nizke meje zaznavnosti in določljivosti (13, 24).

1.2.4 MASNA SPEKTROMetriJA

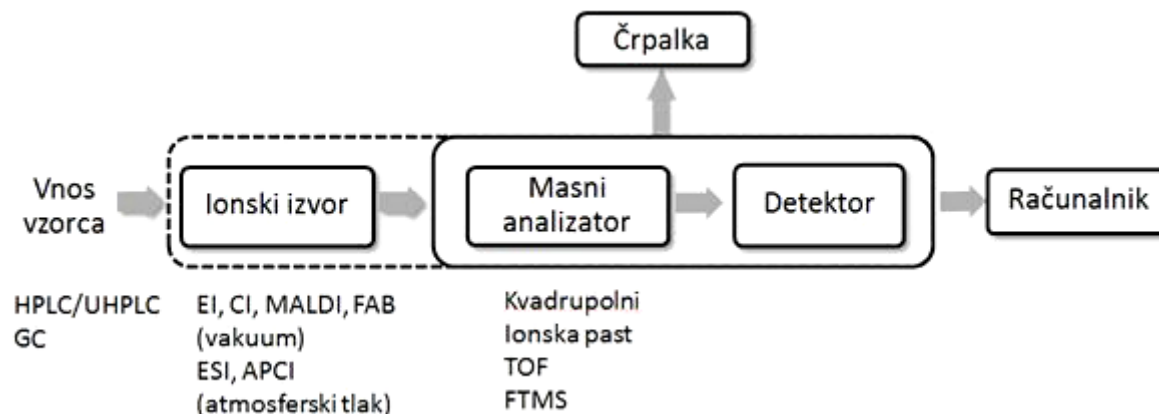
Zaradi izjemne selektivnosti, občutljivosti in hitrosti analize je masna spektrometrija, sklopljena s tekočinsko kromatografijo, v bioanalitiki zelo uporabna tehnika in pogosto tudi najboljša izbira za izvedbo visoko zmogljivostnih analiz. Z masno spektrometrijo dosežemo zelo nizke meje zaznavnosti, kar je zaradi čedalje večje jakosti novejših učinkovin in posledično nižjih koncentracij v plazmi (srečujemo se tudi s subnanogramskimi vrednostmi) še posebej pomembno (20).

Da bi si bralec lažje predstavljal, s kako nizkimi koncentracijami imamo opravka v farmacevtskih analizah, bomo na primeru kocke sladkorja (2,3 g) izračunali, koliko vode potrebujemo, da dobimo koncentracijo 1 ng/mL:

$$1,0 \text{ ng/mL} = 1,0 \times 10^{-6} \text{ g/L}; V (\text{voda}) = m (\text{sladkor}) / \text{konc.} = 2,3 \text{ g} / 1,0 \times 10^{-6} \text{ g/L} = \underline{\underline{2,3 \times 10^6 \text{ L}}}$$

$2,3 \times 10^6$ L vode vsebuje bazen, ki je globok približno 2,5 m, dolg 50 m in širok 20 m. Z analitskimi tehnikami torej zaznamo in merimo koncentracije, ki so tako nizke, kot če bi kocko sladkorja raztopili v malo ožjem olimpijskem plavalnem bazenu.

Masna spektrometrija je po definiciji "analizna metoda, ki z merjenjem razmerja med maso in nabojem molekul ali njihovih fragmentov omogoča določanje molekulske mase in elementne sestave" (8). Analiza poteka na dragem in sofisticiranem instrumentu, katerega osnovna shema je predstavljena na sliki 3.

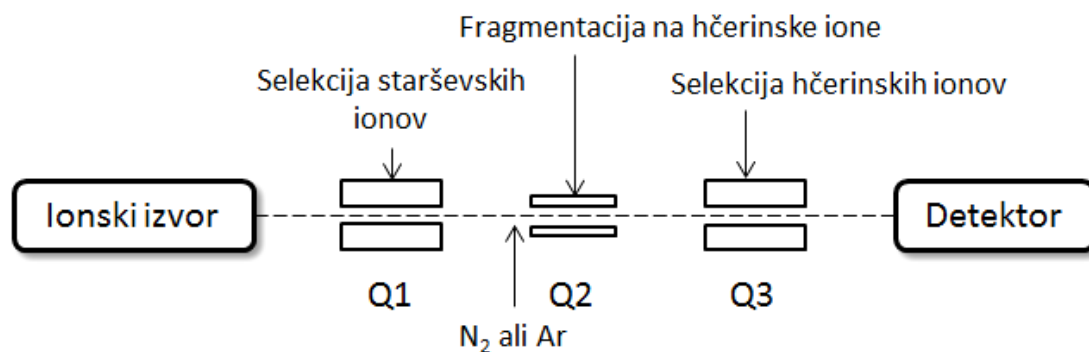


Slika 3. Shema masnega spektrometra (13, 15).

Po kromatografski ločbi na GC ali LC koloni vzorec v masnem spektrometru najprej ioniziramo. **Elektrozprševalna ionizacija** (ESI; "electrospray ionization") je primerna za polarne analite s kislimi ali bazičnimi lastnostmi in se lahko uporablja za termolabilne spojine. Poteka pod atmosferskim tlakom in zahteva uporabo lahko hlapne mobilne faze, saj kapljice topila tekom ionizacije odparimo. Fragmentacija ionov je pri ESI nizka. V našem primeru smo izvedli pozitivno ESI, kjer nastanejo kationi (pri proton akceptorjih), za razliko od negativne ESI, kjer nastanejo anioni (pri proton donorjih). Po ionizaciji nastali molekularni ioni (molekule, ki so izgubile ali pridobile elektron) in fragmentirani ioni (razpadli molekularni ioni, ki so ohranili naboj) potujejo v masni analizator, kjer se ločujejo na podlagi razmerja med maso in nabojem (m/z). Kot detektorji se uporabljajo pomnoževalne diode, podobne fotopomnoževalki, rezultat pa je masni spekter – graf intenzitete ionov v odvisnosti od m/z (13, 15).

Za ponovljivo in selektivno kvantitativno analizo spojin v nizkih koncentracijah se široko koristi **tandemska masna spektrometrija (MS/MS)**, ki uporablja trojni kvadrupolni masni analizator (QQQ, slika 4). V eksperimentalnem delu naloge bomo lahko videli rezultate, pridobljene z MRM načinom meritve ("multiple reaction monitoring"). Pri tej tehniki imamo dva masna filtra – Q1 in Q3. Prvi kvadrupol prehajajo le ioni z izbranim razmerjem m/z (molekularni ioni analita), ki se nato v kolizijski celici (Q2) ob stiku z inertnim plinom fragmentirajo na hčerinske ione. Na drugem masnem filtru (Q3) pa ne

analiziramo vseh možnih ampak le določeno vrsto fragmentiranih ionov. Specifični pari m/z vrednosti starševskega (prekurzorskega) in fragmentiranega hčerinskega (produktnega) iona se imenujejo *masni prehodi* in pomembno pripomorejo k selektivnosti metode. Izboljšana je tudi občutljivost, saj z opisano metodo učinkovito odstranimo ionsko ozadje motečih nečistot (25).



Slika 4. Trojni kvadрупolni masni analizator (13, 25).

1.3 PREGLED RAZISKAV NA PODROČJU ANALITIKE BISOPROLOLA

Bisoprolol so v do sedaj objavljenih raziskavah izolirali in analizirali iz vrste različnih bioloških vzorcev, najpogosteje iz plazme (26–37), z namenom kontrole dopinga v športu pa tudi iz urina (38–40). Redkeje srečamo metode, razvite za aplikacijo na vzorcih iz polne krvi (41, 42), nekaj raziskovalcev pa se je iz okoljevarstvenih razlogov ukvarjalo tudi z odkrivanjem bisoprolola v odpadnih in pitnih vodah (43–45). Bisoprolol so v plazmi določevali kot edini analit (26, 29, 31, 33, 35, 36) ali pa skupaj z drugimi β -blokatorji (27, 34) in učinkovinami za zdravljenje kardiovaskularnih bolezni (28, 30, 32, 37).

Za določevanja bisoprolola v človeški plazmi so avtorji pri razvoju metod najpogosteje uporabljali tehnike, kot so HPLC-FLD (27, 36) in HPLC-DAD (28), novejša raziskava pa se zaradi naraščajočih zahtev po občutljivosti in zmogljivosti metod poslužuje predvsem LC-MS (29, 31, 34) in LC-MS/MS (26, 30, 32, 33, 35, 37). GC-MS je zaradi polarne amino in hidroksilne skupine β -blokatorjev zahtevnejša in časovno bolj potratna tehnika, saj moramo bisoprolol predhodno ustrezno derivatizirati, da mu zmanjšamo polarnost. GC-MS sicer pogosteje zasledimo v forenziki, kjer se uporablja za zaznavnaje oziroma "screening" nedovoljenih substanc v urinu (39, 40).

Izmed načinov priprave plazemskih vzorcev za analizo smo pri pregledu strokovnih člankov pogosto našli na ekstrakcijo tekoče-tekoče (27, 29, 31, 35, 36), ki pa vključuje zamudne postopke sušenja topila in zahteva velike volumne vzorcev. Časovno učinkovitejši postopek priprave vzorcev je obarjanje plazemskih proteinov, ki je bila najpogostejša tehnika v kombinaciji z masno spektrometrijo (30, 32, 33, 37). Vendar pa se samo z obarjanjem proteinov ne znebimo nečistot, kot so lipidi, fosfolipidi in maščobne kisline, kar ima lahko kot posledico nezaželen učinek matrice na ionizacijo v MS aparatu. Bolj čiste ekstrakte daje ekstrakcija na trdni fazi, ki pa smo jo zasledili le pri treh raziskavah (26, 28, 34). V nekaj bioanalitskih metodah določevanja β -blokatorjev v plazmi in serumu so se raziskovalci posluževali modernejših tehnik, kot so SPME ("*solid-phase microextraction*") (46–48), SPE na μ -elucijskih ploščicah (20) in separacija z UHPLC kolono (23), vendar med obravnavanimi β -blokatorji ni bilo tudi bisoprolola.

Pričakovane terapevtske koncentracije bisoprolola v plazmi znašajo 6–101 ng/mL, pri bolnikih s kroničnim srčnim popuščanjem (III. funkcijski razred po NYHA) pa so ravni bisoprolola v plazmi lahko nekoliko višje (1, 7). Spodnje meje določljivosti (LLOQ) metod preteklih raziskav so bile ustrezno nizke in so znašale z uporabo tehnik HPLC-FLD 5 ng/mL (36) oziroma 6,25 ng/mL (27), HPLC-DAD 5 ng/mL (28), najnižje meje določljivosti (LLOQ 0,05 ng/mL (29), 0,1–2 ng/mL (26, 30–33, 35, 37) oziroma 5 ng/mL (34)) pa so dosegli z uporabo masne spektrometrije. Zgornja meja linearnosti je pri večini metod znašala 100–150 ng/mL (29, 30, 33–35), redkeje pod 70 ng/mL (26, 37), pri nekaterih pa je segala tudi čez 200 ng/mL (27, 28, 31, 32, 34). Pri uporabi MS najboljše rezultate kvantifikacije dosegamo z uporabo stabilnega izotopno označenega internega standarda, kar smo zasledili pri eni izmed raziskav (33).

2 NAMEN DELA

Kardiovaskularna obolenja spadajo pri nas med epidemiološko najbolj aktivne bolezni in so zaradi načina življenja ljudi še v porastu. Bisoprolol se kot selektivni zaviralec adrenergičnih receptorjev β_1 uporablja pri indikacijah, kot so arterijska hipertenzija, angina pectoris in kronično srčno popuščanje ter spada med pogosteje predpisane učinkovine v Sloveniji. Za namene, kot je na primer določevanje farmakokinetičnih parametrov, je potrebno izmeriti koncentracije bisoprolola v bioloških vzorcih. V okviru diplomske naloge bomo razvili in validirali metodo za določanje bisoprolola v človeški plazmi.

Metoda bo temeljila na tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti z uporabo UV, fluorescentnega ali masnega detektorja. Ključ za uspešno analizo je ustrezna priprava vzorca in odstranitev motečih komponent matrice, pri čemer hkrati želimo, da je metoda hitra in zmožljiva. S tem ciljem v mislih bomo preizkusili različne načine ekstrakcije: obarjanje plazemskih proteinov, ekstrakcijo tekoče-tekoče in ekstrakcijo na trdnem nosilcu.

Z validacijo bomo poskušali dokazati zanesljivost metode oziroma njeno ustreznost za določanje bisoprolola v plazmi, podali pa bomo tudi omejitve uporabe. Pri našem delu se bomo ravnali po smernicah za validacijo bioanalitske metode Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA). Z uporabo standardnih raztopin bomo preverjali osnovne parametre, kot so točnost, ponovljivost, selektivnost, območje linearnosti, izkoristek ekstrakcije in različne vrste stabilnosti. Validirano metodo bomo nazadnje preizkusili tudi na plazemskih vzorcih bolnikov s kardiovaskularnim obolenjem.

V pričujočem delu se bomo srečali z občutljivimi in učinkovitimi postopki in tehnikami, kot sta masna spektrometrija in ekstrakcija na trdnem nosilcu. Pričakujemo, da bomo razvili selektivno in občutljivo metodo, ki se bo kosala z območji določljivosti v preteklih raziskavah in jih v katerih parametrih morda tudi preseгла.

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

3.1.1 PLAZMA

Kot biološka matrica nam je služila človeška plazma šestih različnih darovalcev (antikoagulant EDTA), ki nam jo je priskrbel Zavod za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Datumi odvzema so bili sledeči:

Plazma A 23. 9. 2011, alikvot 4. 10. 2011

Plazma B 20. 9. 2011, alikvot 4. 10. 2011

Plazma C 14. 6. 2011, alikvot 21. 6. 2011

Plazma D 10. 6. 2011 alikvot 21. 6. 2011

Plazma E 7. 2. 2011, alikvot 22. 4. 2011

Plazma F 16. 7. 2012, alikvot 19. 9. 2012

Plazmo smo shranjevali v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred uporabo smo plazmo počasi odtajali na vodni kopeli sobne temperature in na zmerni hitrosti vorteksirali 20 sekund z mešalnikom Vibromix 114EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija). Ker smo pri večini plazem opazili manjše količine oborin, smo jih po odtajanju tudi centrifugirali (4300 rpm, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$) na napravi Centric 322 A (Tehtnica, Železniki, Slovenija) ter naprej uporabljali supernatant.

Plazemske vzorce bolnikov, na katerih smo preizkusili našo analizno metodo, smo pridobili z Univerzitetne klinike za pljučne bolezni in alergijo Golnik. Sodelovalo je 14 bolnikov s kardiovaskularnim obolenjem, ki so prejeli 1,25 mg, 2,5 mg, 5 mg ali 10 mg bisoprololijevega fumarata enkrat na dan. Vzorci krvi so bili odvzeti v epruvete z antikoagulantom z litijevim heparinom, in sicer v štirih časovnih točkah: 0 h, 2 h, 3 h in 4 h po aplikaciji zdravila z bisoprololijevim fumaratom. Vzorce bolnikov smo shranjevali pri enakih pogojih kot plazme, ki smo jih uporabili za razvoj in validacijo metode.

3.1.2 STANDARD IN INTERNI STANDARDI

Kot standard za pripravo plazemskih vzorcev smo uporabili *bisoprololijev fumarat*, $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_4 \cdot \frac{1}{2}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4)$, $M = 383,48\text{ g/mol}$, proizvajalca Sequoia Research Products

(Pangbourne, Velika Britanija). Interne standarde so predstavljali *moksifloksacin HCl*, $C_{21}H_{24}FN_3O_4 \cdot HCl$, $M = 437,89 \text{ g/mol}$, proizvajalca Bayer AG (Leverkusen, Nemčija) ter *atenolol*, $C_{14}H_{22}N_2O_3$, $M = 266,34 \text{ g/mol}$ in *metoprololijev tartrat*, $(C_{15}H_{25}NO_3)_2 \cdot C_4H_6O_6$, $M = 684,81 \text{ g/mol}$, ki smo ju naročili pri podjetju Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija).

3.1.3 REAGENTI IN TOPILA

Pri delu smo uporabljali naslednje reagente in topila: *bidestilirana voda*, pridobljena z aparatom Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore Corporation, Bedford, MA, ZDA); *metanol* LC-MS čistoče: Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija); *puferske raztopine s pH 2, 3, 4, 5, 6 in 7*: Merck (Darmstadt, Nemčija); *dietil eter*: Riedel de Haën (Seelze bei Hannover, Nemčija); *Titrisol*[®] za pripravo raztopine NaOH s koncentracijo 1 mol/L, *kalijev dihidrogenfosfat*, *mravljična kislina 98-100% Suprapur*[®], *25 % amoniak v vodi* in *85 % ortofosforna kislina*: Merck (Darmstadt, Nemčija); *acetonitril* ultra gradient HPLC čistoče, *metanol* HPLC čistoče in *100 % očetna kislina*: J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, ZDA).

Iz zgoraj navedenih reagentov in topil smo pripravili še naslednje zmesi:

- *Fosfatni puffer* (25 mM, pH 2,5 in pH 3 – mobilna faza pri HPLC analizi ter 50 mM, pH 3, pH 4 in pH 6 – za izvedbo SPE): 0,5 L 25 (50) mM fosfatnega pufra smo pripravili tako, da smo na precizni tehtnici Exacta 300 EB (Tehtnica, Železniki, Slovenija) natehtali 1,701 (3,402) g KH_2PO_4 , sol prenesli v 500 mL bučko in z bidestilirano vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo nato prelili v čašo in na kalibriranem pH metru MA5750 (Iskra, Kranj, Slovenija) umerili na želeno pH vrednost z ortofosforno kislino oziroma z 1 M NaOH. Puffer smo s pomočjo vodne črpalke filtrirali skozi celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,45 μm in pred uporabo na HPLC aparatu razplinili v ultrazvočni kadički.
- *20 % metanol v vodi* (topilo za standardne raztopine): V 100 mL bučko smo odpipetirali 20 mL 100 % metanola iz z vodo dopolnili do oznake.
- *0,1 % mravljična kislina v vodi* (pH ~ 3) (mobilna faza): v stekleno posodo smo natočili 0,5 L vode in vanjo odpipetirali 500 μL mravljične kisline.
- *5 % amoniak v metanolu* (elucijsko topilo): v 10 mL bučko smo odpipetirali 2 mL 25 % amoniaka v vodi in dopolnili do oznake z metanolom.

3.2 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN

Primarni osnovni raztopini (PS) bisoprolola in IS (obe 1 mg/mL) smo pripravili tako, da smo na analitski tehtnici XP105 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Švica) v 1,5 mL mikrocentrifugirki točno natehtali približno 1 mg bisoprololijevega fumarata oziroma 1 mg IS in dodali volumen metanola, ki je dal ustrezno koncentracijo bisoprolola oziroma IS.

Sekundarni osnovni raztopini 1 (SS1) bisoprolola in IS (obe 10 µg/mL) smo pripravili tako, da smo v 10 mL bučko odpipetirali 100 µL PS in dopolnili do oznake z 20 % metanolom v vodi. *Sekundarno osnovno raztopino 2 (SS2)* s koncentracijo bisoprolola 1 µg/mL smo pripravili tako, da smo v 25 mL bučko odpipetirali 25 µL PS in dopolnili do oznake z 20 % metanolom v vodi.

Delovne standardne raztopine (WS) bisoprolola, ki smo jih uporabili za pripravo kalibracijskih standardov in QC vzorcev, smo pripravili iz SS1 oziroma SS2 v 1,5 mL mikrocentrifugirkah z redčenjem v 20 % metanolu. Zavoljo večje natančnosti smo se izogibali pipetiranju volumnov, manjših od 20 µL. Koncentracije WS bisoprolola in postopek priprave prikazuje preglednica 6. Delovno standardno raztopino internega standarda s koncentracijo 1000 ng/mL smo pripravili tako, da smo 100 µL SS1 internega standarda dodali 900 µL topila (20 % metanol v vodi).

Preglednica 6

Priprava delovnih standardnih raztopin (WS) bisoprolola

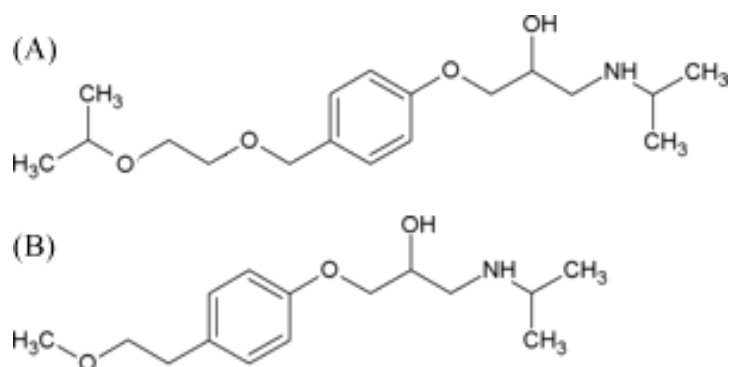
Volumen SS1 [µL]	Volumen SS2 [µL]	Volumen topila [µL]	Koncentracija WS [ng/mL]	Koncentracija Bisoprolola v plazmi [ng/mL]
0	0	1000	0	0
/	20	980	20	1
/	100	900	100	5
/	200	800	200	10
100	/	900	1000	50
150	/	850	1500	75
300	/	700	3000	150
/	60	940	60	3 (QC _L)
50	/	950	500	25 (QC _M)
200	/	800	2000	100 (QC _H)

3.3 PRIPRAVA KALIBRACIJSKIH STANDARDOV IN QC VZORCEV

Da bi simulirali čim bolj realne vzorce, smo pri pripravi plazemskih vzorcev za validacijo pazili, da volumen dodane standardne raztopine ni presegal 5 % volumna matrice. Vsakega izmed šestih *kalibracijskih standardov* s koncentracijami od 1 do 150 ng/mL (preglednica 6) smo pripravili tako, da smo v 3,5 mL plastične epruvete z zamaškom odpipetirali 1045 μ L človeške plazme in 55 μ L ustrezne delovne raztopine bisoprolola ter na zmerni moči vorteksirali 30 s. *Kontrolne vzorce* smo na enak način pripravili pri nizki (QC_L; 3 ng/mL), srednji (QC_M; 25 ng/mL) in visoki koncentraciji (QC_H; 100 ng/mL). Kalibracijske standarde in kontrolne vzorce smo pripravili iz iste plazme sveže za vsak dan validacije posebej. Analizirali smo tudi slepe vzorce, s katerimi smo preverjali, da ni prišlo do prenosa med vzorci ali onečiščenja ter potrdili odsotnost motečih interferenc iz ozadja.

3.4 IZBIRA INTERNEGA STANDARDA

Uporaba internega standarda kompenzira analitske napake, kot so izgube vzorca in variabilnost v volumnih pipetiranja ter injiciranja. Na tak način izboljšamo točnost in ponovljivost rezultatov. Kako se obnesejo v vlogi internega standarda, smo preverili za tri spojine: atenolol, metoprolol (slika 5B) in moksifloksacin. Analizirali smo raztopine standardov v mobilni fazi (50 ng/mL) in v kromatogramu opazovali obliko vrha in njegov položaj glede na vrh bisoprolola ter nečistote v plazmi.



Slika 5. Kemijski strukturi bisoprolola (A) in metoprolola (B) (49).

3.5 PRIPRAVA VZORCA

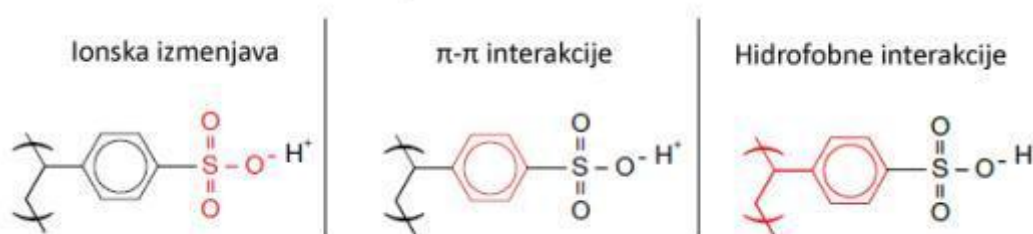
Preizkusili smo tri načine izolacije in čiščenja vzorca: ekstrakcijo tekoče-tekoče, ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) in obarjanje proteinov v kombinaciji s SPE.

3.4.1 EKSTRAKCIJA TEKOČE-TEKOČE

Pri izvedbi ekstrakcije tekoče-tekoče smo se opirali na postopek, opisan v članku avtorjev Braza *et al.* (27). Mililiter plazme smo naalkalili s 100 μL 1M NaOH, vorteksirali 30 s in dodali 6 mL organske faze (dietil etra). Epruvete smo zamašili, stresali 10 min pri hitrosti 150 rpm in na napravi Centric 322 A (Tehtnica, Železniki, Slovenija) centrifugirali 5 min pri hitrosti 2000 rpm. Epruvete smo nato za 30 min postavili v zamrzovalnik na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vodna faza je zamrznila, organsko pa smo odlili v steklene epruvete. V nadaljevanju smo organski fazi dodali 250 μL 1 M očetne kisline, epruvete zamašili s parafinskim filmom in stresali na 200 rpm 30 min. Po ponovnem ločenju obeh faz smo kisloto odvezli s pomočjo pipete in 130 μL prenesli v HPLC vialo z insertom.

3.4.2 EKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU

Ekstrakcijo na trdnem nosilcu smo izvajali na mešanem reverzno faznem ionsko-izmenjevalnem SPE adsorbentu **Strata X-C[®]** (Phenomenex, Torrance, CA, ZDA). Kolona vsebuje polimerno osnovo z močnimi kationsko-izmenjevalnimi funkcionalnimi skupinami (*Strong Cation Mixed Mode*), kar omogoča več mehanizmov retencije analita (slika 6). Uporabili smo 3 mL SPE kartuše s 60 mg polimera. Nekatere fizikalne in kemijske značilnosti trdne faze so predstavljene v preglednici 7.



Slika 6. Retencijski mehanizmi na Strata X-C adsorbentu (50).

Preglednica 7

Značilnosti delcev stacionarne faze Strata X-C (51)

Tip trdne faze	Površinsko obdelan kopolimer stirena in divinilbenzena
Povprečni premer delcev	33 μm
Velikost por	85 Å
Ionska izmenjevalna kapaciteta	1 mEq/g
pH stabilnost	1–14

Razredčen vzorec za nanos na nosilec Strata X-C smo pripravili tako, da smo v plastični epruveti združili in vorteksirali (20 sekund):

- 1100 μL plazemskega vzorca (1045 μL človeške plazme + 55 μL delovne raztopine bisoprolola z ustrežno koncentracijo);
- 50 μL raztopine IS s koncentracijo 1000 ng/mL;
- 2150 μL pufra (50 mM fosfatni pufer, pH 6).

Pufer smo dodali zaradi narave stacionarne faze, ki zahteva ionizirano obliko analita. Pri tem smo zagotovili, da je bila pH vrednost medija za vsaj dve enoti nižja od pKa vrednosti bisoprolola in je bilo tako pozitivno nabitega > 99 % našega analita. pH vrednost vzorca za nanos po dodatku pufra smo preverili tudi s pH lističi, ki so pokazali vrednost pH 6.

OPTIMIZIRAN POSTOPEK EKSTRAKCIJE NA TRDNEM NOSILCU STRATA X-C:

Kondicioniranje: omočenje kolone z 2 mL MeOH

ekvilibracija z 2 mL fosfatnega pufra (50 mM, pH 6)

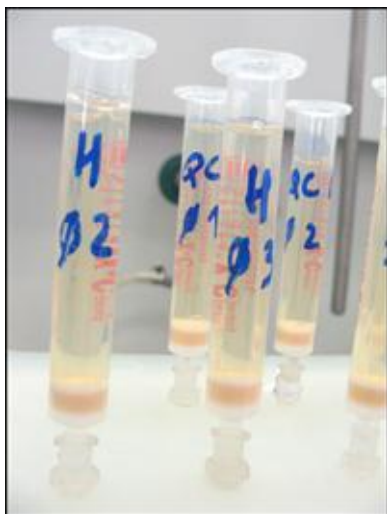
Nanos: 3 mL razredčenega vzorca (slika 7)

Spiranje 1: 2 mL fosfatnega pufra (50 mM, pH 6)

Spiranje 2: 1 mL MeOH

Sušenje: 1 min pri podtlaku 5 mm Hg

Elucija: 2 mL 5 % (v/v) NH_4OH v MeOH



Slika 7. SPE kolona Strata X-C z nanosenimi vzorci.

Ekstrakcijo smo izvajali na vakuumski kadički s pokrovom in dvanajstimi mesti za SPE kolone proizvajalca Macherey-Nagel (Düren, Nemčija) (slika 8). Zaradi lažjega rokovanja in za večjo ponovljivost smo analizirali do osem vzorcev naenkrat. Tlak in pretok smo uravnavali s pomočjo oljne vakuumske črpalke DOA-P504-BN (Gast, Benton Harbor, MI, ZDA). Pred začetkom smo kartuše za 1 min izpostavili podtlaku 5 mm Hg, da smo odstranili morebitno nesnago, ki je morda zašla v kolono. Ekstrakcija je potekala pri podtlaku 5 mm Hg, ki smo ga pri sušenju in eluciji povišali na 10 mm Hg. Predvsem med nanosom in elucijo vzorca smo skrbeli za počasen in konstanten pretok (1 do 2 kaplji na sekundo), kar je pomembno za dober izkoristek in ponovljivost ekstrakcije. Eluat smo zbirali v 2 mL mikrocentrifugirke in topilo odparili v sušilniku Turbovap LV (Caliper, Hopkinton, MA, ZDA) pri 40 °C. Suh preostanek smo rekonstituirali v 200 µL mobilne faze in prenesli v steklene vialne z insertom za analizo na HPLC-FLD aparatu oziroma na mikrotitrsko ploščico za analizo na masnem spektrometru.



Slika 8. Vakuumski sistem z nastavki za SPE kartuše.

Ker je adsorbent mešanega tipa, smo lahko kolono spirali s 100 % organskim topilom brez bojazni, da bi izgubili analit. Sušenje pred spiranjem z organskim topilom, za razliko od konvencionalnih adsorbentov s silikatno osnovo, pri uporabi kartuš Strata X-C ni potrebno. Izsušitev kolone med ekstrakcijo je kritična le med kondicioniranjem, zato smo bili še posebej pozorni, da sta po omočenju kolone takoj sledili ekvilibracija s pufrom in nanos vzorca. Elucijo smo po priporočilu proizvajalca (50) izvedli s 5 % amoniakom v metanolu,

s čimer smo dosegli deionizacijo bisoprolola in prekinitvev interakcije s stacionarno fazo. Uporaba metanola kot elucijskega topila je ugodna za sušenje eluata, saj zaradi svojega nižjega vrelišča hitreje odpari.

Optimizacija pH medija vzorca/ekvilibracijskega pufra

Preverili smo učinkovitost ekstrakcije pri pH vrednostih SPE pufra pH 3,0, pH 4,0 in pH 6,0. Ekvilibracijski pufer je bil pri vseh poskusih enak puftru, s katerim smo pripravljali vzorec za nanos na SPE kolono.

Optimizacija volumna spiranja

Poleg volumnov spiranja v osnovnem postopku (2 mL pufra, 1 mL MeOH) smo preizkusili še dve varianti:

- | | |
|------------------|------------------|
| A) 1. 3 mL pufer | B) 1. 2 mL pufer |
| 2. 1 mL MeOH | 2. 2 mL MeOH |

SPE v kombinaciji z obarjanjem proteinov

Preverili smo tudi, ali je ekstrakt znatno bolj čist, če pred SPE izvedemo obarjanje plazemskih proteinov. Kot obarjalni reagent smo izbrali acetonitril in preizkusili dve varianti dodanega volumna:

- A) plazma:ACN = 1:0,5 (v/v)
- B) plazma:ACN = 1:1 (v/v)

V 2 mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali 495 μL (A) oziroma 990 μL (B) ACN, ki smo ga predhodno za 1 uro postavili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dodali smo 1100 μL plazemskega vzorca, ki je vseboval 990 μL plazme in 110 μL standardne raztopine bisoprolola in IS. Vsebinsko smo vorteksirali 30 sekund in nato v centrifugirni napravi Microcentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) centrifugirali 5 min pri 13000 rpm in $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant smo previdno odpipetirali v plastično epruveto, mu dodali dvakratni volumen fosfatnega pufra (50 mM, pH 6) in pripravljen vzorec ekstrahirali po optimiziranem SPE postopku.

3.5 POGOJI KROMATOGRAFIJE S FLUORESCENTNIM DETEKTORJEM (HPLC-FLD)

Začetni del razvoja metode (optimizacija postopka ekstrakcije) je potekal na HPLC sistemu serije 1100 proizvajalca Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). Aparat vključuje vakuumski razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor tipa DAD in fluorescentni detektor (G1231A). Optimizirana kromatografska separacija je potekala na koloni Gemini 110 Å C18 (150 × 4,6 mm, velikost delcev 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, ZDA), sklopljeni s predkolono Gemini C18 (4,0 × 3,0 mm, velikost delcev 5 µm) (Phenomenex). Mobilna faza je bila sestavljena iz A: 98 % (v/v) ACN v vodi in B: 25 mM fosfatnega pufra s pH = 3,0. Puffer smo filtrirali skozi 0,45 µm filter, obe komponenti mobilne faze pa smo pred uporabo tudi razplinili v ultrazvočni kadički. Elucija je bila izokratska z razmerjem A:B = 20:80 (v/v) in s pretokom 1 mL/min. Volumen injiciranja je znašal 50 µL in po vsakem vzorčenju je aparat obod igle spral z mešanico vode in ACN (1:1; v/v). Temperatura v avtomatskem vzorčevalniku je znašala 4 °C, kolona pa je bila termostatirana na 55 °C. Fluorescentni detektor smo nastavili na valovni dolžini 225 nm (ekscitacijska) in 310 nm (emisijska). Za ojačitev fotopomnoževalke ("*PMT gain*") smo izbrali vrednost 12. Celoten HPLC sistem je bil pod nadzorom programa ChemStation for LC 3D Systems, Rev. B.02.01-SR2(260) 2001–2006 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Spreminjanje sestave mobilne faze

Mobilno fazo običajno sestavljata vodna faza (puffer) in organski modifikator. Za organsko topilo smo izbrali acetonitril, ki ima poleg osnovnega pogoja, da ne daje odziva na detektorju, tudi to prednost, da ne povečuje viskoznosti mobilne faze in s tem povratnega tlaka v koloni. Preverjali smo različne odstotke acetonitrila v mobilni fazi: 30, 25, 24, 23, 22 in 20 %. Preizkusili smo tri vrednosti pH fosfatnega pufra: 2,5, 3,0 in 4,0.

Spreminjanje temperature kolone

Opazovali smo tudi vpliv temperature kolone na retencijo in ločevanje kromatografskega vrha analita od nečistot. Preizkusili smo temperature kolone 30 °C, 50 °C in 55 °C, pri čemer višanje temperature pomeni nižanje retencijskega časa. S povišanjem temperature dosežemo tudi rahlo znižanje viskoznosti mobilne faze, kar povzroči padec tlaka v koloni. Posledično lahko po želji povečamo pretok in tako še dodatno skrajšamo čas analize.

3.6 POGOJI KROMATOGRAFIJE, SKLOPLJENE S TANDEMSKIM MASNIM SPEKTROMETROM (LC-MS/MS)

Za dokončni razvoj in validacijo metode ter analizo vzorcev bolnikov smo uporabili LC-MS/MS analitski sistem z Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole Jetstream[®] LC-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA). 1290 Infinity LC vključuje vakuumski razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono in UV-VIS detektor tipa DAD. Kromatografsko separacijo smo izvedli na reverzno fazni koloni Kinetex C18, 50 × 2,1 mm in z 2,6 µm delci (Phenomenex, Torrance, CA, ZDA) pri temperaturi 50 °C in tlaku omejenemu na 600 barov. Mobilna faza je bila sestavljena iz A: 0,1 % mravljične kisline v vodi in B: 98 % ACN v vodi. Elucija je bila gradientna z odstotki topila B in s pretoki, kot so navedeni v preglednici 8. Pred analizo so vzorci stali v avtomatskem vzorčevalniku na 4 °C, vsak vzorec pa smo analizirali po trikrat z volumnom injiciranja 0,1 µL. Čas analize posameznega vzorca je znašal 2,7 min. Tok mobilne faze je bil z namenom zaščite masnega spektrometra v analitski del usmerjen le med časom 0,7 min do 1,6 min, pred in po tem času pa ga je program usmerjal v odpad.

Preglednica 8

Program gradientne elucije za kromatografsko separacijo bisoprolola

Čas [min]	Pretok [mL/min]	% topila B
0	0,65	10
0,25	0,65	10
0,5	0,65	20
1	0,65	30
1,25	0,65	50
1,7	0,65	50
1,75	0,65	10
2,7	0,65	10

S postopnim povečanjem začetnega deleža organske faze smo skrajšali čas analize, hkrati pa smo z ostrejšim gradientnim programom zmanjšali problem "*carry-over*" učinka (prenosa med vzorci). Učinek smo znižali tudi s tem, da smo analizirali vzorce od najnižje proti najvišji koncentraciji in vmes spirali obod igle. Prenos med vzorci smo kontrolirali tako, da smo po analizi vzorca z najvišjo koncentracijo trikrat injicirali slepo raztopino in opazovali morebiten odziv analita.

Kromatografski sistem je bil sklopljen z Agilentovim 6460 QQQ masnim analizatorjem in Jet Stream[®] elektrorazprševalnim ionizatorjem, nastavljenim na pozitivni način. Nekateri pomembnejši parametri tandemskega masnega spektrometra so podani v preglednici 9.

Preglednica 9

Nastavitve masnega spektrometra

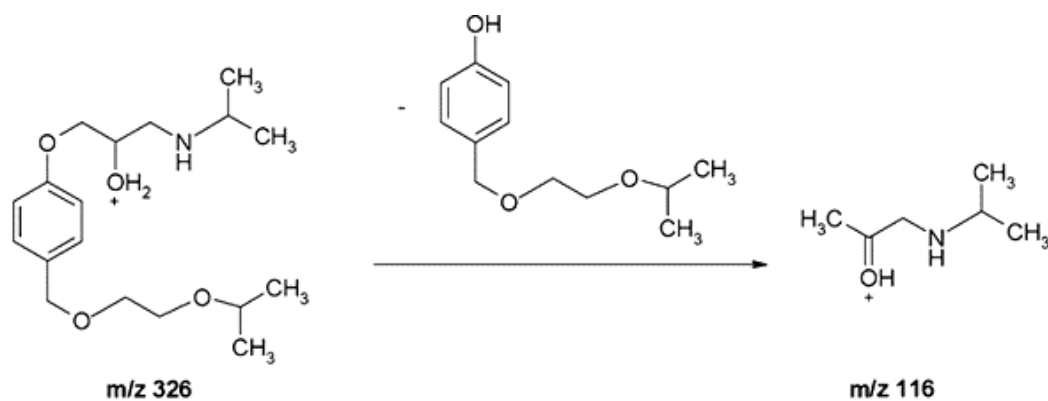
Temperatura in pretok sušilnega plina	275 °C, 5 L/min
Tlak nebulizacijskega plina	45 psi
Temperatura in pretok JetStream [®] plina (" <i>Sheath gas</i> ")	329 °C, 11 L/min
Napetost na kapilari	4000 V
Napetost na šobi (" <i>Nozzle voltage</i> [®] ")	1000 V
Širina masne ločljivosti na prvem kvadrupolu	"wide"
Širina masne ločljivosti na tretjem kvadrupolu	"wide"
Razdelilni čas (" <i>dwel time</i> ")	50 ms
Polarnost analize	pozitivna

Kvantifikacijo smo izvedli s pomočjo programske opreme MassHunter Workstation B.04.01 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA). Uporabili smo multirezidualno analizo (MRM), pri kateri spremljamo več produktnih ionov, nastalih iz prekursorskega iona. Za kvantitativno določanje običajno uporabimo produktne ione, ki jih nastane največ ("*quantifiers*"), ostali produktni ioni pa lahko potrjujejo identiteto analita ("*qualifiers*"). Masne prehode in napetost fragmentorja (144 V za bisoprolol in 96 V za IS) smo določili s programom Optimizer (Agilent). MRM nastavitve so prikazane v preglednici 10, na sliki 9 pa lahko vidimo enega izmed glavnih fragmentacijskih procesov ioniziranega bisoprolola.

Preglednica 10

Optimalni MRM prehodi in kolizijska energija za bisoprolol in metoprolol

	MRM m/z prehodi	Kolizijska energija [eV]
Bisoprolol	326,2 → 56,1	37
Bisoprolol " <i>qualifier</i> "	326,2 → 116,1	9
Metoprolol (IS)	268,2 → 116	12



Slika 9. Predvidena fragmentacija ionizirane molekule bisoprolola, ki daje produktni ion z m/z 116 (37).

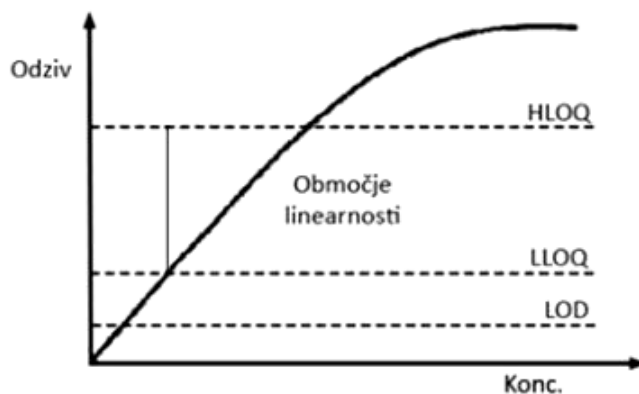
3.7 VALIDACIJA METODE

V okviru validacije smo preverili naslednje osnovne parametre: specifičnost, linearnost, mejo določljivosti, točnost, ponovljivost, izkoristek ekstrakcije, učinek matrice in stabilnost. Pri delu smo se ravnali po FDA smernicah za validacijo bioanalitske metode (52), pri ocenjevanju učinka matrice in izkoristka ekstrakcije pa smo upoštevali tudi postopke in napotke Matuszewskega (53, 54). Plazemske vzorce smo kvantificirali na podlagi razmerja površine vrha bisoprolola z internim standardom (Biso/IS).

3.7.1 SELEKTIVNOST, LINEARNOST IN MEJA DOLOČLJIVOSTI

Selektivnost je sposobnost analizne metode, da loči analit od ostalih komponent v vzorcu in tako omogoča njegovo določanje (15). Da bi potrdili selektivnost, smo analizirali slepo plazmo in v kromatogramu opazovali pojavnost morebitnih interferenc endogenih komponent vzorca pri retencijskem času analita. Selektivnost smo določili tudi kvantitativno, in sicer z razmerjem odzivov produktnega iona za kvantifikacijo ("*quantifier*") in produktnega iona za potrjevanje identitete analita ("*qualifier*") – razmerje je moralo biti konstantno z največ 5 % CV.

Za določanje učinkovine v neznanih vzorcih potrebujemo umeritveno oziroma kalibracijsko krivuljo, ki jo sestavimo za vsak analit posebej. Kalibracijsko območje zajema vse pričakovane koncentracije analita v vzorcih, pri čemer želimo, da je odziv detektorja neposredno sorazmeren koncentraciji analita v vzorcu (**območje linearosti**, slika 10).



Slika 10. Hipotetični graf odziva v odvisnosti od koncentracije; HLOQ: zgornja meja določljivosti; LLOQ: spodnja meja določljivosti; LOD: meja zaznavnosti. Naklon premice predstavlja občutljivost – sposobnost metode oziroma detektorja, da razlikuje med majhnimi razlikami v koncentraciji analita (55).

Umeritveno krivuljo smo tekom tridnevne validacije določili za vsak dan posebej. V ta namen smo merili odzive šestih kalibratorjev koncentracij 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL in 150 ng/mL. Analizirali smo po eno ponovitev vsakega izmed kalibratorjev. Umeritveno krivuljo je predstavljal graf odvisnosti površine vrha analita (relativno glede na IS) od koncentracije analita. Podatke smo analizirali s pomočjo linearne regresije in po metodi najmanjših kvadratov določili enačbo umeritvene premice (enačba 1).

$$\text{Odziv} = b \times \text{konc.} + a \quad (1)$$

Pri določevanju umeritvene premice se zna zgoditi, da standardna napaka napovedi (razpršitev dejanskih vrednosti okoli napovedanih) ni enaka na celotnem koncentracijskem razponu (t. i. heteroscedastičnost). Do pojava lahko pride, če imamo visok razpon med najvišjim in najnižjim kalibracijskim standardom. Večje deviacije pri višjih koncentracijah imajo večji vpliv na enačbo premice, kar pomeni, da se točke pri kalibratorjih višje koncentracije bolje prilegajo umeritveni premici kot točke pri nizkih koncentracijah. V tem primeru lahko z uporabo **utežene linearne regresije** povečamo vpliv meritev pri nižjih koncentracijah in s tem izboljšamo točnost metode na spodnjem delu kalibracijske krivulje (56, 57).

Pri našem delu smo preverili morebitno izboljšanje točnosti meritev z uporabo uteži $1/C$ in $1/C^2$. Naklon in odsek utežene umeritvene premice smo optimizirali s pomočjo dodatka v

programu Microsoft Excel, imenovanega *Reševalec* ("Solver"). Reševalec je regresijska parametra b in a izbral tako, da je bila vsota (SS) produkta uteži pri določeni koncentraciji (w_i) in kvadratov odstopanj dejanskega odziva (Y_i) od odziva, izračunanega iz umeritvene premice (Y'_i), najmanjša (enačba 2).

$$SS = \sum w_i \times (Y_i - Y'_i)^2 \quad (2)$$

Kot najboljši model smo izbrali tistega, pri katerem so bile točnosti povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev najbližje 100 %. Točnost smo izračunali tako, da smo koncentracije posameznih kalibracijskih standardov, ki smo jih določili iz umeritvene krivulje, primerjali z nominalnimi vrednostmi (enačba 3) (15).

$$\text{Točnost [\%]} = \frac{\bar{C}_{\text{izmerjena}}}{C_{\text{nominalna}}} \times 100 \quad (3)$$

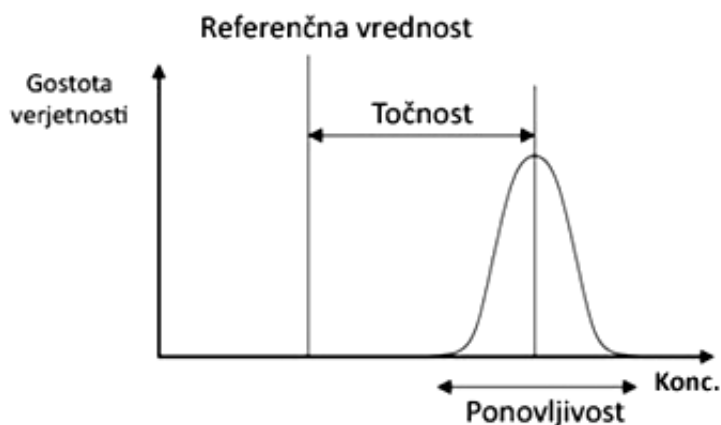
Najvišje dovoljeno odstopanje od 100 % točnosti je znašalo ± 20 % pri LLOQ in ± 15 % pri ostalih koncentracijah. Naveden kriterij so morali dosegati vsaj štirje od šestih kalibracijskih standardov s koncentracijo ≥ 1 ng/mL, standard pri LLOQ in standard pri najvišji koncentraciji. Kot dodatni kriterij za sprejemljivost enačbe umeritvene krivulje smo upoštevali vrednost determinacijskega koeficienta (r^2), ki je morala biti višja od 0,990 (52, 58).

Spodnja meja določljivosti (LLOQ) predstavlja najmanjša koncentracija kalibratorja v umeritveni krivulji z ustrežno točnostjo in ponovljivostjo. Zahteve so sledeče (52):

- odziv standarda pri LLOQ vsaj 5-krat višji od odziva slepega vzorca;
- koeficient variacije (CV) največ 20 %;
- točnost 80–120 %.

3.7.2 TOČNOST IN PONOVLJIVOST

Točnost ("accuracy") opisuje ujemanje med srednjo vrednostjo rezultatov koncentracije analita, pridobljene z analizo metodo, in vrednostjo koncentracije analita, ki je sprejeta kot prava vrednost. **Ponovljivost** ("precision") odraža natančnost našega dela in opisuje ujemanje večkratnih meritev posameznih koncentracij analita, pripravljenih in izmerjenih na identičen način (15). Grafični prikaz obeh parametrov predstavlja slika 11.



Slika 11. Prikaz točnosti in ponovljivosti na hipotetičnem grafu (55).

Točnost in ponovljivost smo določili s pomočjo umeritvenih krivulj in odzivov kontrolnih vzorcev treh različnih koncentracij (QC_L , QC_M in QC_H), pri čemer smo za vsak QC izvedli pet ponovitev. Meritve smo izvedli na tri različne dneve v časovnem obdobju petih dni. Točnost smo izrazili po enačbi 3, ponovljivost pa s koeficientom variacije (CV) (enačba 4).

$$CV [\%] = \frac{sd}{\bar{C}} \times 100 \quad (4)$$

Določili smo znotraj-dnevno in med-dnevno ponovljivost. Znotraj-dnevno ponovljivost smo izračunali kot koeficient variacije analize petih ponovitev kontrolnih vzorcev nizke, srednje in visoke koncentracije. Med-dnevno ponovljivost smo izračunali kot koeficient variacije rezultatov treh različnih dni, v katerih smo na enak način analizirali pet ponovitev vsakega izmed kontrolnih vzorcev. Po FDA smernicah (52) se za veljavne meritve smatrajo tiste, pri katerih je točnost vseh QC vzorcev v okviru $100 \pm 15 \%$, CV izračunanih koncentracij QC vzorcev pa ne sme biti višji od 15% .

3.7.3 UČINEK MATRICE IN IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

Pri uporabi LC-MS/MS tehnike se srečujemo s problemom učinka matrice, ki ima lahko velik vpliv na točnost, ponovljivost in občutljivost metode. Pri učinku matrice govorimo o motečih vplivih molekul iz matrice vzorca, ki se eluirajo skupaj s tarčnim analitom in motijo njegovo ionizacijo v masnem spektrometru. Pride lahko do zmanjšanja učinkovitosti ionizacije analita ("*ion suppression*") ali do njenega povečanja ("*ion enhancement*"). Učinek matrice je lahko prisoten tudi v primeru, ko v kromatogramu slepega vzorca ni prisotnih vidnih vrhov (53, 59).

Učinek matrice lahko s skrbnim načrtovanjem analiznega postopka zmanjšamo na več načinov (53, 59–61):

- manjšanje volumnov in redčenje vzorca (če občutljivost metode to dopušča);
- izbira učinkovitega (selektivnega) postopka ekstrakcije: kot najbolj dovezetno za učinek matrice velja obarjanje proteinov, najbolj čist ekstrakt in najnižji učinek matrice pa običajno dobimo pri mešani ionsko izmenjevalni SPE;
- izvedba APCI (kemijska ionizacija pri atmosferskem tlaku), ki je manj dovezetna za učinek matrice kot ESI (če polarnost analita in drugi parametri to dopuščajo);
- uporaba nižjih pretokov mobilne faze;
- uporaba UHPLC zniža učinek matrice zaradi višje resolucije;
- uporaba primerne internega standarda, najboljše izotopno označenega.

FDA smernice za validacijo bioanalitske metode omenjajo nujnost dokazovanja odsotnosti učinka matrice, vendar pa konkretnjših napotkov za izvedbo ne navajajo (52). Pri našem delu smo se zato ravnali po priporočilih Matuszewskega (53, 54) in v okviru validacije določili absolutni ter relativni učinke matrice.

Absolutni učinek matrice smo ocenili tako, da smo primerjali odzive v ekstrahirani slepi plazmi, ki smo jo rekonstituirali v 200 μ L raztopine bisoprolola in IS v mobilni fazi (*set B*) z odzivom čiste raztopine bisoprolola in IS v mobilni fazi (*set A*) (enačba 5).

$$ME [\%] = \frac{B}{A} \times 100 \quad (5)$$

Absolutni ME smo izračunali za pet različnih slepih plazem. Raztopino bisoprolola in IS v rekonstitucijskem topilu smo pripravili tako, da smo ustreznim delovnim standardnim raztopinam Basis in IS dodali količino topila (mobilne faze), ki je dala koncentracijo bisoprolola 150 ng/mL (ekvivalent 30 ng/mL v plazmi) in koncentracijo IS 250 ng/mL. Izvedli smo pet ponovitev za vsako plazmo in pet ponovitev za raztopino standarda v čistem topilu. Kriterij sprejemljivosti absolutnega ME je predstavljala vrednost $100 \pm 5 \%$.

Relativni učinek matrice se nanaša na primerjavo različnih plazem in ima po navedbah Matuszewskega (53, 54) še večji pomen kot določevanje absolutnega ME. Metoda je namreč namenjena določevanju bisoprolola pri različnih bolnikih, ki se lahko razlikujejo v sestavi plazemske matrice. S tem, ko eliminiramo učinek matrice pri vsaj petih različnih plazmah, znatno povečamo verjetnost, da nam metoda daje točne bioanalitske podatke.

Relativni učinek matrice smo določili na dva načina:

- I. na podlagi variabilnosti naklonov umeritvenih premic, sestavljenih iz različnih plazem;
- II. na podlagi variabilnosti vzorcev seta B (post-ekstrakcijsko dodajanje standarda) pri različnih plazmah.

Pri načinu I smo za vsako izmed petih različnih plazem ekstrahirali in analizirali šest standardnih raztopin bisoprolola v plazmi (koncentracij od 1 do 150 ng/mL). Iz odzivov Bis/IS smo sestavili umeritveno krivuljo in primerjali naklon premice pri plazmah iz različnih virov. Odsotnost relativnega učinka matrice dokažemo, če je koeficient variacije naklonov premic nižji od 3–4 % (54).

Pri načinu II smo uporabili odzive vzorcev seta A in B, ki smo jih pripravili za določevanje absolutnega ME. Relativni ME smo izrazili s CV odzivov seta B (post-ekstrakcijsko dodan standard) pri petih različnih plazmah in vrednost primerjali s CV odzivov seta A (standard v čistem topilu). Za potrditev odsotnosti relativnega ME koeficient variacije seta B ne sme biti višji od CV seta A oziroma mora biti primerljive vrednosti (52).

Izkoristek ekstrakcije ("Recovery") smo določili tako, da smo primerjali odzive detektorja pri vzorcih, katerim smo standard bisoprolola in IS plazmi dodali *pred* ekstrakcijo (set C) z odzivi vzorcev, pri katerih smo raztopino bisoprolola in IS v mobilni fazi dodali suhemu preostanku plazme *po* ekstrakciji (set B). Z načinom, pri katerem za vzorec B uporabimo rekonstituirano slepo plazmo in ne preprosto raztopine analita v mobilni fazi, dobimo pravilnejše vrednosti, saj tako pridobljene vrednosti izkoristkov ne vključujejo prispevka učinka matrice (53). Izkoristek ekstrakcije (Re) smo izračunali po enačbi 6.

$$Re [\%] = \frac{C}{B} \times 100 \quad (6)$$

Izkoristek ekstrakcije smo določili s petimi ponovitvami kontrolnih vzorcev QC_L, QC_M in QC_H. Set C so predstavljali QC vzorci, pripravljeni na običajen način (poglavje 3.3). Vzorce seta B smo pripravili na enak način kot pri določanju absolutnega ME, le da smo jih pripravili pri koncentracijah bisoprolola 15 ng/mL, 125 ng/mL in 500 ng/mL ter IS 250 ng/mL. Ker vzorec po SPE 5-krat koncentriramo, so bile koncentracije seta B petkrat višje kot pri kontrolnih vzorcih seta C pred ekstrakcijo. Zahteve za ekstrakcijo niso 100 % izkoristki, vendar pa morajo biti izkoristki ponovljivi in konstantni pri vseh koncentracijah.

3.7.4 STABILNOST

Raziskali smo tri tipe stabilnosti bisoprolola v plazmi (stabilnost med zamrzovanjem in odtajanjem, kratkoročno in dolgoročno stabilnost), stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku ter stabilnost bisoprolola v metanolu. Za oceno prvih štirih smo analizirali po tri paralele QC_L in QC_H vzorcev, za oceno zadnje pa primarno osnovno raztopino bisoprolola s koncentracijo 1 mg/mL. Stabilnost smo določili kot spremembo v odzivu po določenem času (t_x) glede na začetni čas (t_0) (enačba 7). Interni standard smo pri analizi stabilnosti bisoprolola v plazmi dodajali tik pred nanosom na SPE kolono.

$$\text{Relativna sprememba} = \frac{\text{odziv } t_x - \text{odziv } t_0}{\text{odziv } t_0} \times 100 \quad (7)$$

Stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku

Pet ponovitev kontrolnih vzorcev nizke in visoke koncentracije smo ekstrahirali, posušili, rekonstituirali in postavili v termostatisiran avtomatski vzorčevalnik na 4 °C. Prvo injiciranje in analizo smo izvedli takoj, drugo (pet paralel QC_L in QC_H) čez 24 ur, tretjo (po eno paralelo QC_L in QC_H) pa čez 3 dni.

Kratkoročna ("bench-top") stabilnost

Z določevanjem kratkoročne stabilnosti dokazujemo, da se koncentracija bisoprolola v plazmi v času priprave in analize vzorca pri sobni temperaturi ne spreminja (52). V ta namen smo pripravili in alikvotirali kontrolne vzorce nizke in visoke koncentracije. En set vzorcev (tri paralele QC_L in QC_H) smo obdelali takoj in jih v mikrotitrski ploščici pustili v avtomatskem vzorčevalniku na 4 °C, kjer so počakali na sočasno analizo s testnimi vzorci. Drugi set vzorcev smo pustili 6 ur na sobni temperaturi, nato pa ekstrahirali in analizirali skupaj s primerjalnimi vzorci ter opazovali morebitno spremembo v koncentraciji analita.

Stabilnost med zamrzovanjem in odtajanjem

Plazemske standardne vzorce nizke in visoke koncentracije smo alikvotirali in zamrznili na –20 °C. Polovico alikvotov (tri paralele) smo nato podvrgli trem ciklom zamrzovanja in odtajanja, polovica alikvotov pa nam je služila za primerjavo in je ostala ves čas zamrznjena. En cikel je bil sestavljen iz odtajanja pri sobni temperaturi in zamrzovanja, ki je trajalo 12 ur. Po zadnjem ciklu zamrzovanja/odtajanja smo odtalili tudi primerjalne vzorce, jih analizirali skupaj s testnimi in določili spremembo v koncentraciji.

Dolgoročna stabilnost

Test dolgoročne stabilnosti se po FDA smernicah (52) izvaja pod pogoji, ki so enaki tistim, v katerih hranimo realne vzorce bolnikov in presega čas od odvzema prvega vzorca do analize zadnjega. Pripravili smo količino QC_L in QC_H vzorcev, ki je zadostovala za tri ponovitve vsake izmed koncentracij in jih postavili v zamrzovalnik na –20 °C. Vzorce smo ponovno analizirali po petih tednih in rezultate primerjali z nominalnimi vrednostmi.

Stabilnost v raztopini topila

Testirali smo stabilnost primarne osnovne raztopine bisoprolola (1 mg/mL v metanolu), ki smo jo hranili v hladilniku na 4 °C. Analizo smo izvedli na HPLC aparatu z UV detektorjem in primerjali odzive sveže pripravljene raztopine in raztopine, analizirane po enem tednu. Raztopine smo pred nanosom na HPLC ustrezno redčili na tri različne koncentracije (60, 500 in 2000 ng/mL).

3.8 ANALIZA VZORCEV BOLNIKOV

Metodo smo uporabili za določevanje plazemskih koncentracij bisoprolola pri 14 bolnikih s terapijo 1,25 mg, 2,5 mg, 5 mg ali 10 mg bisoprololijevega fumarata na dan. Koncentracije bisoprolola v plazmi so bile v času odvzema v stacionarnem stanju. Vzorce krvi smo pridobili v štirih časovnih točkah: 0 h, 2 h, 3 h in 4 h po aplikaciji tablete z bisoprololijevim fumaratom. Pridobljene vzorce smo do pričetka analize hranili v polipropilenskih epruvtkah na –20 °C in nato pripravili po enakem postopku, kot smo pripravljali plazemske vzorce za razvoj metode (brez dodajanja standardne raztopine bisoprolola). Za kontrolo točnosti meritev smo skupaj z vzorci bolnikov analizirali tudi QC vzorce treh različnih koncentracij, katerih število je znašalo najmanj 5 % števila vzorcev bolnikov. Serijo po smernicah (52) sprejmemo kot veljavno, če vsaj dve tretjini QC-jev, analiziranih med sekvenco realnih vzorcev, odstopa za manj kot 15 % od navedene kontrolne vrednosti. Ena tretjina kontrolnih vzorcev lahko odstopa za več kot 15 %, vendar ti ne smejo biti enake koncentracije.

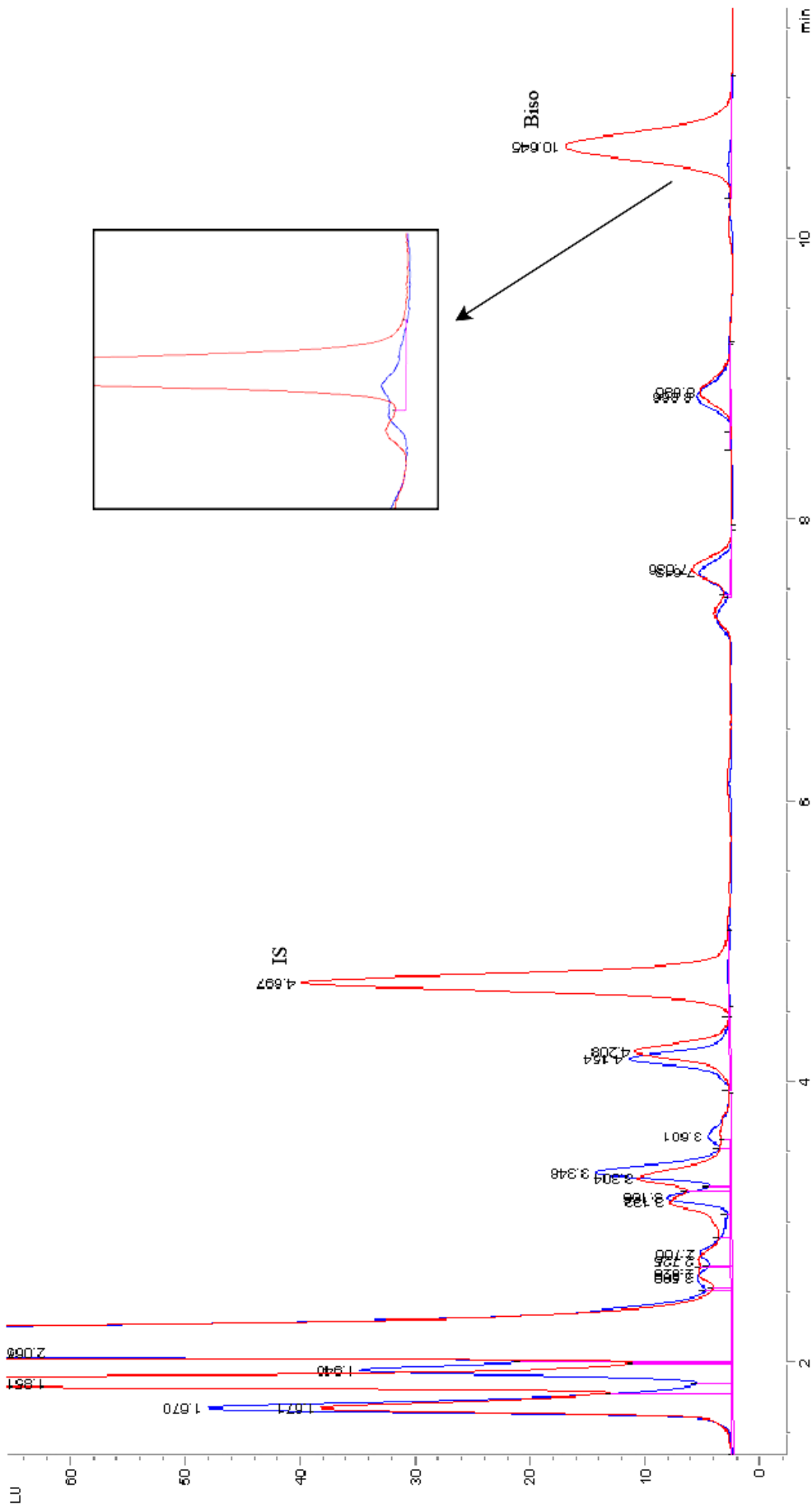
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Z namenom razvoja hitre, občutljive in enostavne metode za določevanje bisoprolola v plazmi smo s postopnim spreminjanjem optimizirali različne parametre ekstrakcijskega postopka in parametre sistema za separacijo ter detekcijo. Zaradi večje dostopnosti instrumenta smo prvotno načrtovali izvedbo celotne metode na HPLC aparatu s fluorescentnim detektorjem, vendar nam s tem načinom ni uspelo doseči dovolj visoke selektivnosti. *V začetni fazi eksperimentalnega dela diplomske naloge (izbira in optimizacija ekstrakcijskega postopka) smo tako uporabljali HPLC-FLD aparat, dokončno optimizacijo in validacijo metode ter analizo vzorcev bolnikov pa smo izvedli na masnem spektrometru (LC-MS/MS).*

Iz HPLC-FLD kromatograma na sliki 12 lahko razberemo, da se pri retencijskem času bisoprolola (10,646 min) eluira tudi neznana nečistota, ki zmanjšuje točnost določanja. Interference, ki se je pojavljala v vseh različnih slepih plazmah, nam ni uspelo odpraviti niti s spreminjanjem parametrov ekstrakcije niti s spreminjanjem kromatografskih pogojev. Pri tem smo preizkusili različne pH vrednosti vzorca za nanos na SPE kolono (3, 4 in 6), povečanje volumna spiranja SPE kolone in predhodno obarjanje proteinov ter spreminjali odstotek ACN v mobilni fazi (20–30 %), pH mobilne faze (2,5, 3 in 4) in temperaturo kolone (30 °C, 50 °C in 55 °C). Želene rezultate smo dosegli šele z uporabo tandemске masne spektrometrije (MS/MS), pri kateri poteka analiza na podlagi zelo specifičnih parov m/z vrednosti starševskega in hčerinskega iona, kar močno izboljša selektivnost metode.

4.1 IZBOR EKSTRAKCIJSKE METODE

Namen optimizacije ekstrakcije je bil v čim krajšem času analize doseči zadovoljiv izkoristek in visoko ponovljivost ekstrakcije bisoprolola iz plazme. Na podlagi razpoložljive opreme smo preizkusili ekstrakcijo tekoče-tekoče, SPE in obarjanje proteinov v kombinaciji s SPE. Za vrednotenje ekstrakcijskega postopka smo na HPLC-FLD instrumentu najprej s pomočjo standardov bisoprolola v topilu s koncentracijo 50 ng/mL določili začetne osnovne parametre. Mobilna faza je bila sestavljena iz 25 % ACN in 75 % 25 mM fosfatnega pufrs s pH 3; ojačitev fotopomnoževalke smo nastavili na vrednost 12, λ_{eks} na 225 nm in λ_{emis} na 310 nm; pretok je znašal 1 mL/min, T kolone pa 30 °C. Začetne parametre smo nato tekom dela optimizirali in spreminjali. Retencijski čas bisoprolola je pri začetnih pogojih znašal 6,6 min.



Slika 12. HPLC-FLD kromatogram ekstrahirane slepe plazme (modra) in ekstrahirane plazme s koncentracijo bisoprolola 25 ng/mL (rdeča) pri optimiziranih kromatografskih pogojih, navedenih v poglavju 4.3.

Prvotno smo kot metodo ekstrakcije izbrali ekstrakcijo tekoče-tekoče, za katero ne potrebujemo zahtevne opreme in običajno daje dovolj visoke izkoristke ter čistost ekstrakta. Kot organsko fazo smo uporabili dietil eter. Postopek smo priredili na podlagi članka avtorjev Braza *et al.* (27), kjer je izkoristek ekstrakcije bisoprolola iz plazme znašal 89 %. V nasprotju s temi podatki pa naše delo ni dalo spodbudnih rezultatov, saj so bili izkoristki nizki in slabo ponovljivi (rezultati niso prikazani). Pri delu smo se soočali s težavami, kot so odhlapevanje etra, izgube pri prelivanju in nepraktičnost postopka, kar vse bi zahtevalo večjo izkušnost izvajalca. Zaradi naštetega in več v uvodu omenjenih prednosti postopka SPE smo se odločili, da bomo ekstrakcijo izvedli na trdnih nosilcih.

4.1.1 OPTIMIZACIJA POSTOPKA SPE

Osnovno shemo ekstrakcijskega postopka smo oblikovali glede na priporočila proizvajalca kolon, v nadaljevanju pa smo spreminjali pH medija vzorca (ekvilibracijskega pufra) in volumen spiranja. Analizirali smo vzorce s koncentracijo bisoprolola 5 ng/mL, 10 ng/mL in 25 ng/mL ter slepo plazmo. Parametre optimizacije smo vrednotili tako, da smo opazovali površino vrha bisoprolola in prisotnost nečistot na področju retencijskega časa bisoprolola. Izkazalo se je, da **med preizkušenimi pH vrednostmi SPE pufra (3, 4 in 6) ni bilo bistvenih razlik v odzivu analita in prisotnosti nečistot** (rezultati niso prikazani). Za nadaljnje delo smo izbrali SPE pufer z vrednostjo pH 6, ki je še dovolj nižja od pKa spojine, kar pomeni, da je naš analit v celoti v ionizirani obliki.

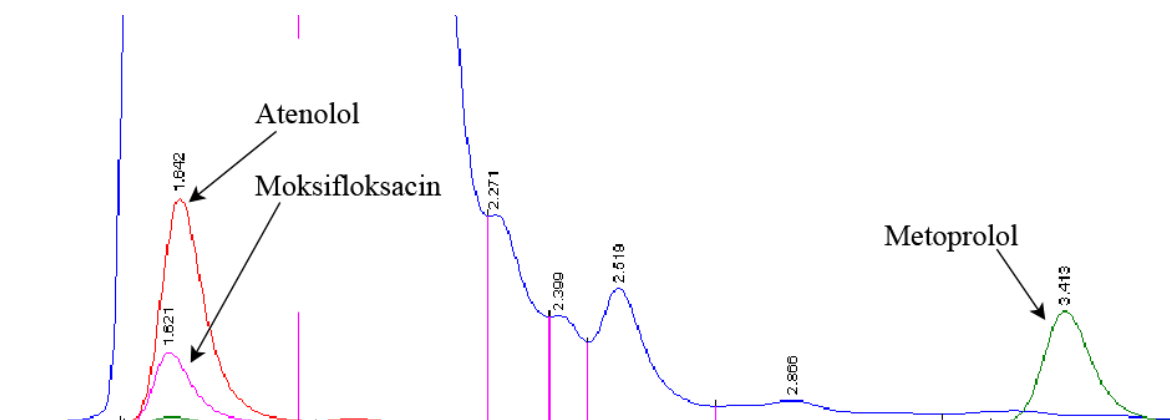
Prisotne nečistote v koloni smo po nanosu vzorca spirali s fosfatnim pufrom in metanolom. Začetna volumna, predlagana s strani proizvajalca kolon (2 mL pufra, 1 mL MeOH), smo spreminjali tako, da smo v prvem primeru povečali volumen pufra (na 3 mL; varianta A), v drugem pa volumen MeOH (na 2 mL; varianta B). S tem smo se želeli znebiti nečistote, ki se je nahajala pri retencijskem času bisoprolola, vendar pa **s povečanjem volumna spiranja ni prišlo do zmanjšanja količine moteče nečistote**.

Tekom razvoja ekstrakcije smo preverili tudi, ali lahko kromatografsko sliko izboljšamo, če pred SPE izvedemo obarjanje z acetonitrilom. Preizkusili smo dve varianti dodanega volumna obarjalnega reagenta: A) plazma:ACN = 1:0,5 (v/v) in B) plazma:ACN = 1:1 (v/v). Primerjava kromatogramov ekstrahiranih slepih plazem je pokazala, da **na področju retencijskega časa analita z obarjanjem ni prišlo do izboljšave v čistosti vzorca**. Moteča nečistota morda ni bila protein in se je z obarjanjem nismo mogli znebiti.

4.2 IZBIRA INTERNEGA STANDARDA

Analizirali smo raztopine treh kandidatov za IS: atenolola, metoprolola in moksifloksacina (50 ng/mL, topilo MeOH) ter kromatograme primerjali s slepo plazmo in vzorcem bisoprolola (slika 13). Kot interni standard smo izbrali **metoprolol**, ki je imel retencijski čas 3,413 min in je zadostil naslednjim kriterijem:

- zadostna kromatografska ločba od vrha bisoprolola;
- podobna višina oziroma površina vrha kot pri srednjih koncentracijah analita;
- podobne fizikalno-kemijske lastnosti in posledično retencijski čas, ki je bil nižji od retencijskega časa bisoprolola, tako da z uporabo IS nismo podaljševali časa analize.



Slika 13. Izsek kromatograma standardnih raztopin atenolola, metoprolola in moksifloksacina ter ekstrahirane slepe plazme (modra barva). Retencijski čas bisoprolola je pri izbranih analiznih pogojih (MF: 25 % ACN, 75 % 25 mM fosfatni pufer pH 3; pretok 1 mL/min; T kolone 30 °C; "PMT gain" 12; λ_{eks} 225 nm in λ_{emis} 310 nm) znašal 6,291 min.

4.3 OPTIMIZACIJA KROMATOGRAFIJE S FLUORESCENTNIM DETEKTORJEM (HPLC-FLD)

Za izboljšanje kromatografske ločbe smo, po principu spreminjanja enega parametra naenkrat, optimizirali odstotek ACN v mobilni fazi (30, 25, 24, 23, 22 in 20), temperaturo kolone (30 °C, 50 °C in 55 °C) in pH mobilne faze (2,5, 3,0 in 4,0). Ugotovili smo, da najboljšo ločbo ob najkrajšem času analize dosežemo s sestavo mobilne faze iz A: 98 % (v/v) ACN v vodi in B: 25 mM fosfatnega pufra s pH 3,0; A:B = 20:80 (v/v) ter temperaturo kolone 55 °C. Retencijski čas bisoprolola je pri teh pogojih znašal 10,3 min in internega standarda 4,5 min, čas analize enega vzorca pa je znašal 13 min.

Kljub spreminjanju sestave mobilne faze in temperature nam ob optimiziranem postopku ekstrakcije še vedno ni uspelo ločiti vrha nečistote, ki se je pri analizi ekstrahirane slepe plazme vztrajno nahajala pri retencijskem času bisoprolola. Poskusili smo še z menjavo kolone Gemini 110 Å C18 s kolono Luna C18(2) 100 Å, dimenzij 250 × 4,6 mm in velikostjo delcev 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA, ZDA), vendar tudi v tej koloni ni prišlo do ločitve vrha nečistote od vrha bisoprolola. Preostala nam je še menjava detektorja – metodo smo prenesli na masni spektrometer, s katerim smo dobili želene rezultate.

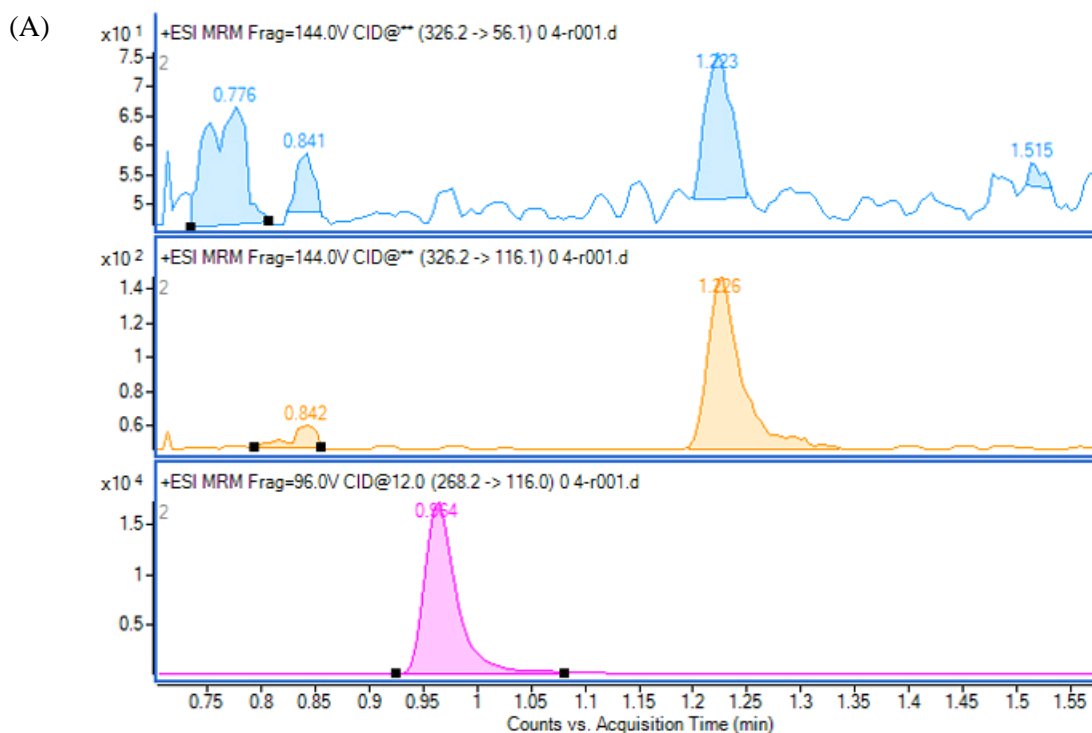
4.4 POGOJI KROMATOGRAFIJE, SKLOPLJENE S TANDEMskim MASNIM SPEKTROMETROM (LC-MS/MS)

Metodo LC-MS/MS smo razvili na Agilentovem sistemu 1290 Infinity LC, sklopljenim s 6460 Triple Quadrupole Jetstream[®] masnim spektrometrom in parametre nastavili tako, da smo pridobili maksimalno občutljivost in selektivnost. Različni parametri masnega spektrometra so bili že predhodno optimizirani in so predstavljeni v poglavju 3.6. Ker je bisoprolol šibko bazična in srednje polarna spojina, smo za analizo izvedli ESI v pozitivnem načinu. Detekcijo in kvantifikacijo smo izvedli s pomočjo MRM ter določili masne prehode. Bisoprolol v kisli mobilni fazi sprejme proton in tvori protoniran prekursorski ion ($[M + H]^+$) z m/z 326,2. Za kvantitativno vrednotenje bisoprolola smo določili produktni ion, ki nastane iz prekursorskega z m/z 56,1 ("*quantifier ion*"), produktni ion, ki nastane pri m/z 116,1 pa smo uporabili za potrjevanje identitete analita ("*qualifier ion*"). Določili smo tudi optimalni masni prehod za metoprolol (IS) (268,2 → 116). Vrednost napetosti fragmentorja in kolizijske energije smo pridobili z avtomatsko optimizacijo. Vrednost za fragmentor predstavlja razliko v napetosti med začetkom masnega spektrometra, kjer ioni nastanejo, in kolizijsko celico. Nastavili smo jo tako, da je v kolizijsko celico prispelo čim več osnovnega iona. Vrednosti kolizijske energije so skupaj z MRM prehodi bisoprolola in IS predstavljene v preglednici 10. Z analizo navedenih masnih prehodov smo v kombinaciji z LC separacijo dosegli odlično selektivnost in občutljivost s spodnjo mejo določljivosti bisoprolola 1 ng/mL.

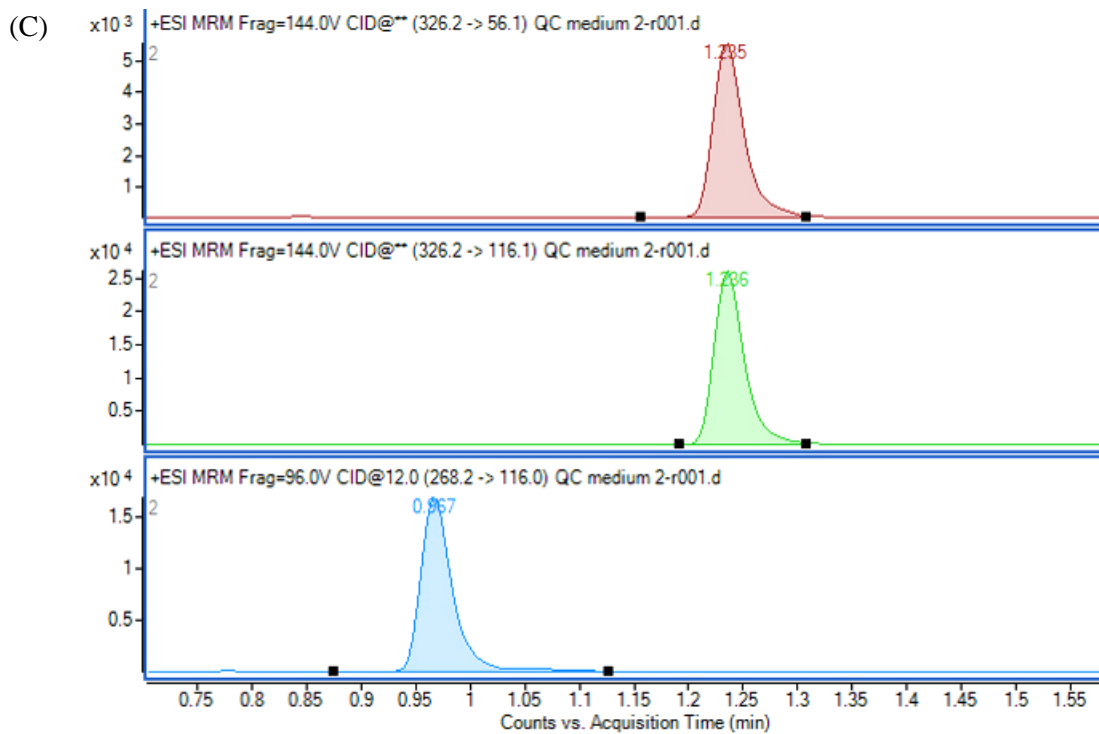
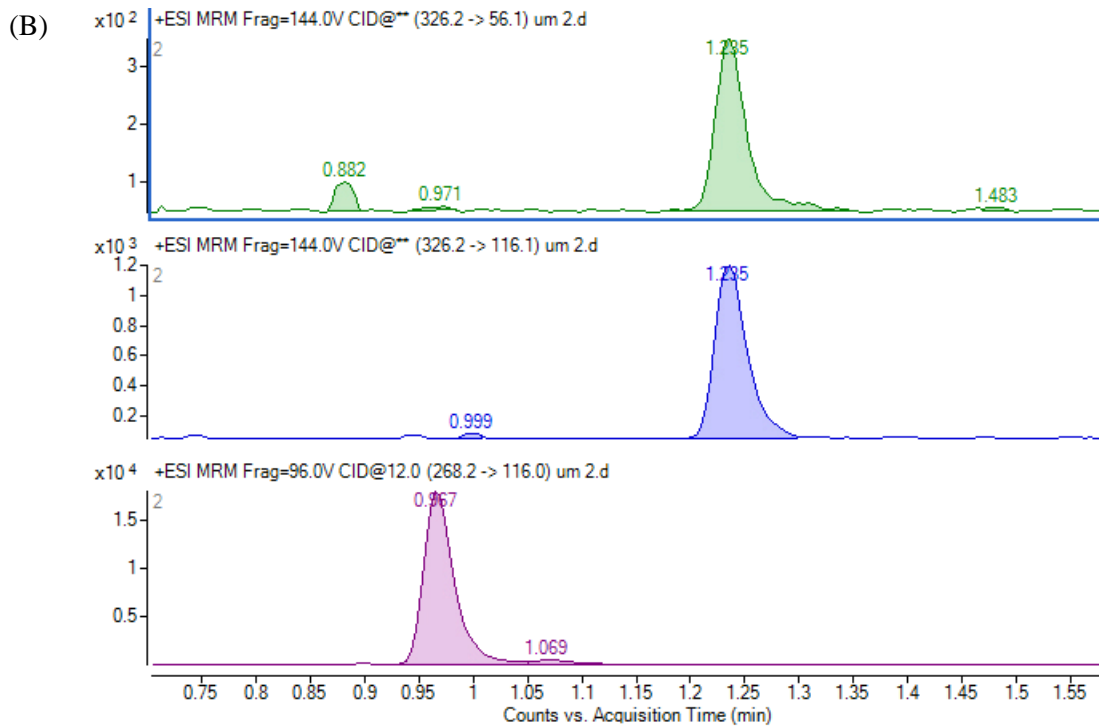
Kromatografsko separacijo smo izvedli na UHPLC koloni, ki ima v primerjavi s tradicionalnimi HPLC kolonami manjši premer delcev (2,6 µm), kar omogoča večjo resolucijo in občutljivost ter krajši čas analize (22, 23). V našem primeru so za analizo zadoščali že nižji tlaki, zato UHPLC način ni bil potreben. Za mobilno fazo so v preteklih

LC-MS in LC-MS/MS analizah (26, 29–35, 37) uporabljali predvsem acetonitril ali metanol kot organski modifikator v kombinaciji z vodo ali pufersko raztopino amonijevega acetata/formata. Pri tem vodna faza rada vsebuje dodatke, s katerimi povečamo ionizacijo in posledično občutljivost analize. V pozitivnem ESI načinu je za ta namen običajno najboljša izbira mravljična kislina (15).

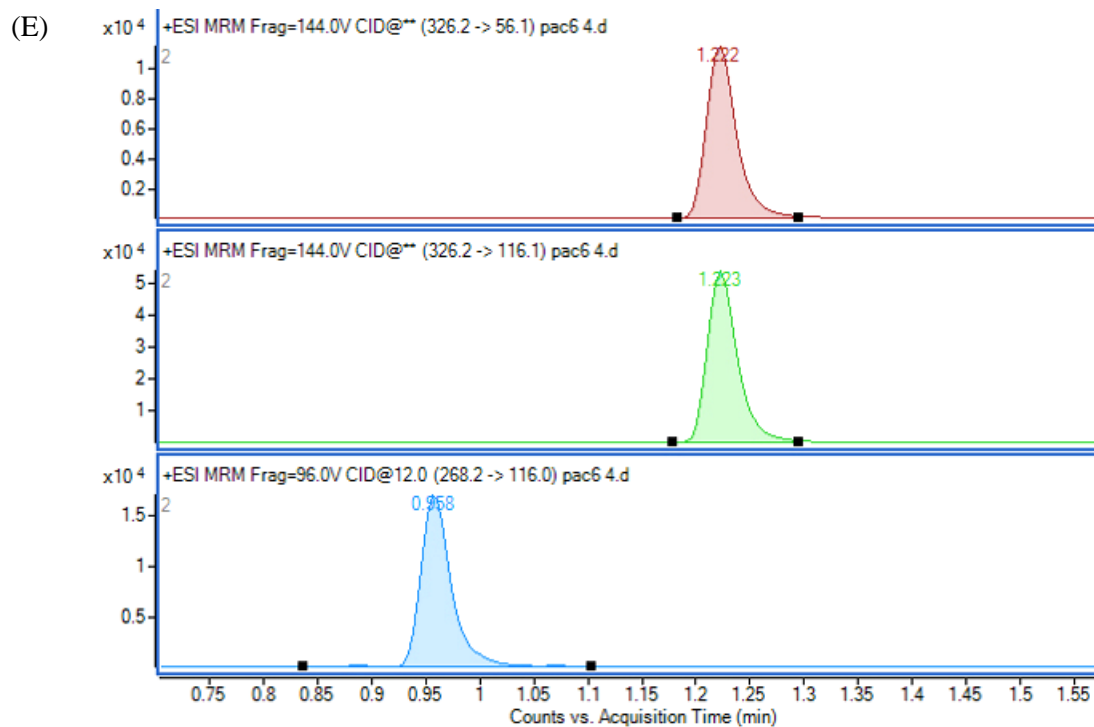
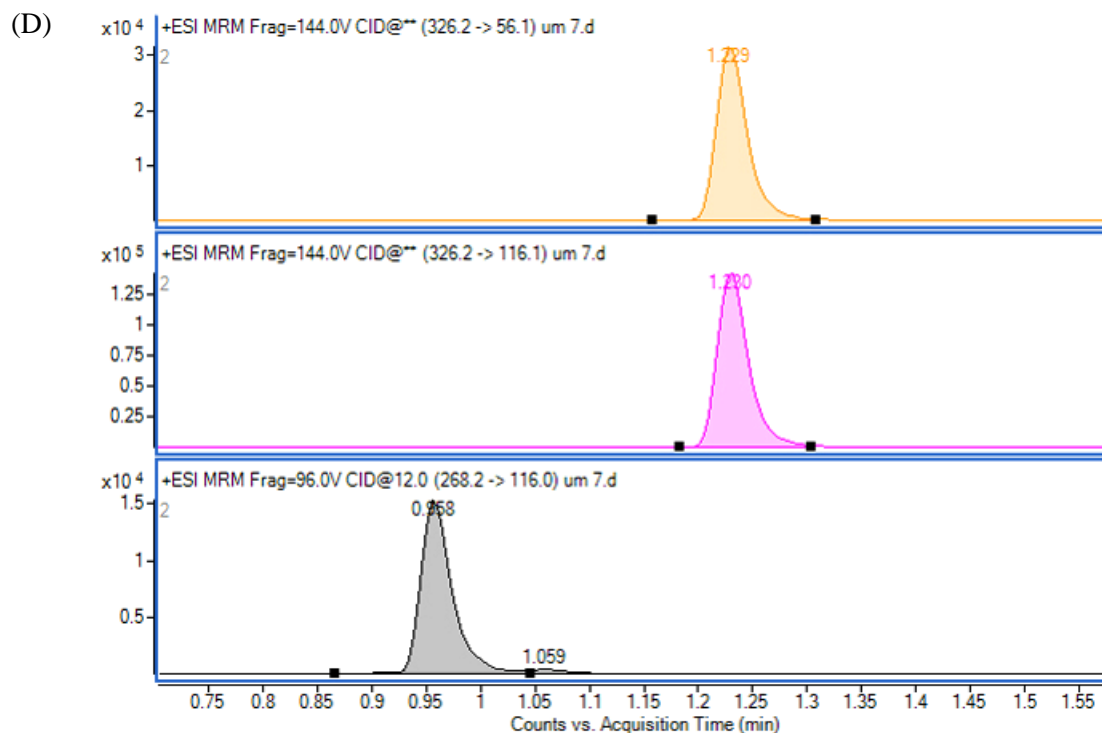
Mobilno fazo je v našem primeru predstavljala zmes 0,1 % mravljične kisline v vodi (pH ~ 3) in acetonitrila (80:20, v/v). Pretok smo nastavili na 0,65 mL/min. Z navedenimi pogoji smo dosegli visoko resolucijo, simetrične kromatografske vrhove in kratke retencijske čase tako za analit kot za interni standard. Bisoprolol se je iz kolone eluiral pri 1,233 min in metoprolol (IS) pri 0,969 min. Čas analize enega vzorca je znašal 2,7 min, kar je krajši čas kot pri večini preteklih raziskav, pri katerih je analizni čas znašal od 3 do 20 min na vzorec (25, 28–34, 36). Reprezentativni kromatogrami slepe plazme, plazemskih standardov in realnega vzorca bolnika so prikazani na sliki 14.



Slika 14. LC-MS/MS kromatogrami (po vrsti): bisoprolol, bisoprolol "qualifier", IS. (A) slepa plazma z IS; (B) LLOQ plazemski standard s konc. Bisoprolol 1 ng/mL; (C) plazemski standard s konc. Bisoprolol 150 ng/mL; (D) QC vzorec s konc. Bisoprolol 25 ng/mL; (E) vzorec bolnika, odvzet 4 ure po per os aplikaciji 10 mg bisoprololijevega fumarata.



Slika 14. (Nadaljevanje)



Slika 14. (Nadaljevanje)

4.5 VALIDACIJA METODE

Uspešno smo izvedli validacijo LC-MS/MS metode, ki je vključevala ekstrakcijo v SPE kartušah Strata X-C in uporabo metoprolola kot internega standarda. Metoda je dala ustrezno točnost in ponovljivost, široko območje linearnosti ter ponovljiv izkoristek ekstrakcije iz plazme. Pomembnejšega učinka matrice ni bilo zaznati, ustrezna pa je bila tudi stabilnost bisoprolola v plazmi, avtomatskem vzorčevalniku in primarni osnovni raztopini.

4.5.1 SELEKTIVNOST, LINEARNOST IN MEJA DOLOČLJIVOSTI

Z uporabo multirezidualne analize (MRM), pri kateri poleg m/z vrednosti prekursorskega iona določamo tudi za analit zelo specifično m/z vrednost fragmentiranega iona, smo dosegli izvrstno selektivnost masnega spektrometra. Kromatografsko selektivnost metode smo sproti preverjali z analizo ekstraktov slepih plazem, pri čemer na področju retencijskega časa analita nismo opazili motečih vrhov endogenih nečistot. Reprezentativni kromatogram ekstrahirane slepe plazme se nahaja na sliki 14A. Selektivnost smo spremljali tudi z razmerjem med produktnim ionom za kvantifikacijo (m/z 56,1) in produktnim ionom za kvalifikacijo (m/z 116,1). Razmerje odzivov je bilo konstantno pri različnih koncentracijskih nivojih, kar prikazuje preglednica 11.

Preglednica 11

Variabilnost razmerja odziva produktnega iona za kvantifikacijo ("*quantifier*") in produktnega iona za kvalifikacijo ("*qualifier*") bisoprolola

	Povpr. razmerje " <i>quantifier</i> "/" <i>qualifier</i> " ($n = 15$)	CV [%]
QC _L (3 ng/mL)	0,22994	2,39
QC _M (25 ng/mL)	0,21871	1,59
QC _H (100 ng/mL)	0,21818	0,87

Odziv kalibracijskih standardov (Biso/IS) je bil sorazmeren koncentraciji bisoprolola v koncentracijskem območju **1–150 ng/mL**. Linearnost kalibracijskih krivulj smo dokazali z metodo najmanjših kvadratov. Regresijske parametre smo določili z uporabo uteži $1/C^2$, saj je bila tako točnost povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev najvišja (preglednica 12). Z uporabo utežene linearne regresije smo občutno povečali predvsem točnost določevanja nižjih koncentracij, kar lahko razberemo iz preglednice 13.

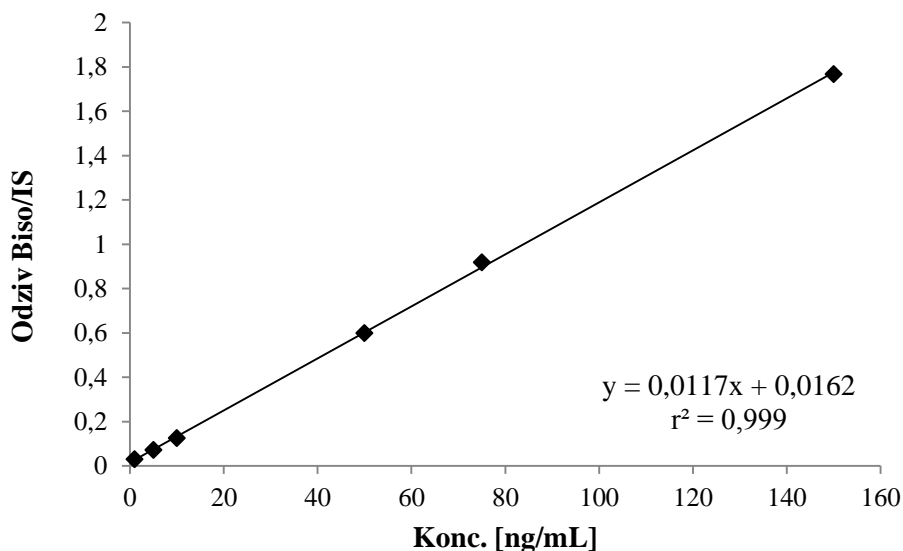
Primeri umeritvenih krivulj (brez in z uporabo utežene linearne regresije) si lahko ogledamo na slikah 15 in 16, točnosti povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev pa so navedene v preglednici 13. Nobena izmed vrednosti ni odstopala za več kot 15 % (20 % pri LLOQ), kar ustreza kriterijem smernic FDA (52). Determinacijski koeficient je bil visok za vse umeritvene premice in je znašal $\geq 0,999$. Parametri regresijske premice za tri dni validacije so predstavljeni v preglednici 14. Primer enačbe umeritvene krivulje lahko zapišemo kot: $odziv (Biso/IS) = 0,01441 \times konc. + 0,00488$.

Preglednica 12

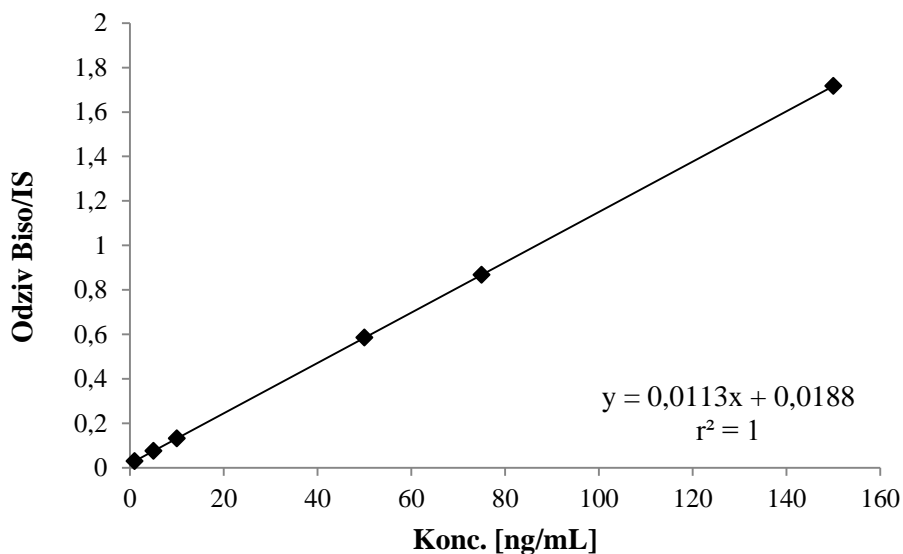
Regresijski parametri reprezentativne kalibracijske krivulje in vsote relativne napake povratno izračunanih koncentracij kalibratorjev ($\Sigma |\%RE|$) za vsako izmed uteži (w_i); $n = 6$

w_i	b	a	r^2	$\Sigma \%RE $
1	0,011731	0,016151	0,999692	37,9
1/C	0,011713	0,017038	1	32,5
1/C ²	0,011318	0,018807	1	26,7

$$\%RE = (\bar{C}_{izmerjena} - C_{nominalna})/C_{nominalna} \times 100$$



Slika 15. Reprezentativna umeritvena krivulja za določanje bisoprolola v plazmi – neutežena linearne regresija.



Slika 16. Reprezentativna umeritvena krivulja za določanje bisoprolola v plazmi – utežena linearna regresija ($w_i = 1/C^2$).

Preglednica 13

Točnost kalibracijskih standardov bisoprolola za serije treh različnih dni ob uporabi uteži $1/C^2$. Pri umeritveni krivulji iz prvega dneva smo za primerjavo navedli še, kolikšna bi bila točnost, če ne bi uporabili utežene linearne regresije ($w_i = 1$)

C_{nominal} [ng/mL]	1. dan		2. dan		3. dan		
	$C_{\text{izračun.}}$ [ng/mL]	točnost [%]		$C_{\text{izračun.}}$ [ng/mL]	točnost [%]	$C_{\text{izračun.}}$ [ng/mL]	točnost [%]
		$w_i = 1$	$w_i = 1/C^2$				
1	1,019	121,0	101,9	0,9985	99,8	1,003	100,3
5	4,626	93,8	92,5	5,169	103,4	4,897	97,9
10	9,412	93,1	94,1	9,449	94,5	10,09	100,9
50	51,24	99,3	102,5	50,53	101,1	49,87	99,7
75	79,51	102,6	106,0	*	*	76,12	101,5
150	154,4	99,5	102,9	151,8	101,2	149,5	99,6

* – izločena meritev

Preglednica 14

Parametri utežene umeritvene premice tekom treh različnih dni

	1. dan	2. dan	3. dan
<i>b</i>	0,011318	0,013572	0,014408
<i>a</i>	0,018807	0,004639	0,004880
<i>r</i> ²	1	1	1

Spodnjo mejo določljivosti (LLOQ) je predstavljala najmanjša koncentracija kalibratorja v umeritveni krivulji z ustrezno točnostjo ($\pm 20\%$) ter vsaj 5-krat višjim odzivom od odziva slepe plazme. **LLOQ bisoprolola je znašala 1 ng/mL** s točnostjo 99,8–102 % (preglednica 13). Z metodo smo tako dosegli nižjo mejo določljivosti kot v preteklih raziskavah z uporabo HPLC-FLD in HPLC-DAD aparatov, kjer je LLOQ znašala 5 ng/mL do 6 ng/mL (27, 28, 36). Dosegli smo tudi primerljivo nizko vrednost LLOQ v primerjavi z ostalimi LC-MS(/MS) metodami določevanja bisoprolola v plazmi, pri katerih je LLOQ znašala 0,05 ng/mL (29), 0,1–2 ng/mL (26, 30–33, 35, 37) oziroma 5 ng/mL (34). Doseženo območje linearnosti metode (1–150 ng/mL) pokriva terapevtsko območje bisoprolola v plazmi, ki znaša 6–101 ng/mL.

4.5.2 TOČNOST IN PONOVLJIVOST

Točnost in ponovljivost smo določili v treh različnih dneh s pomočjo kontrolnih vzorcev treh različnih koncentracij in petimi ponovitvami. Iz preglednice 15 je razvidno, da je CV znašal znotraj dneva največ 5,8 %, med dnevi pa največ 10,6 %. Znotraj-dnevna točnost je bila v območju 101–105 % in med-dnevna v območju 94,5–102 %. LC-MS/MS metoda ustreza zahtevam za točnost in ponovljivost tako znotraj ene analize kot tudi med celotnimi tremi dnevi validacije. Preglednica 16 v nadaljevanju prikazuje, kakšna bi bila točnost in ponovljivost metode, če ne bi upoštevali internega standarda. Ob primerjavi s preglednico 15 lahko razberemo, da je imel IS kompenzacijski efekt na natančnost in točnost določanja bisoprolola, saj je brez upoštevanja IS med-dnevna variabilnost višja in točnost nižja.

Preglednica 15

Znotraj-dnevna in med-dnevna ponovljivost in točnost določevanja bisoprolola v plazmi

	Vzorec	$C_{\text{nominal.}}$ [ng/mL]	$\bar{C}_{\text{izračun.}}$ [ng/mL]	CV [%]	Točnost [%]
Znotraj	QC _L	3,000	3,162	3,8	105,5
dneva	QC _M	25,00	25,15	3,4	100,6
($n = 5$)	QC _H	100,0	102,8	5,8	102,8
Med	QC _L	3,000	2,836	10,6	94,5
dnevi	QC _M	25,00	24,93	4,7	99,7
($n = 15$)	QC _H	100,0	102,1	7,5	102,1

Preglednica 16Znotraj-dnevna in med-dnevna ponovljivost in točnost določevanja bisoprolola v plazmi *brez upoštevanja internega standarda*

	Vzorec	$C_{\text{nominal.}}$ [ng/mL]	$\bar{C}_{\text{izračun.}}$ [ng/mL]	CV [%]	Točnost [%]
Znotraj	QC _L	3,000	2,874	2,1	95,8
dneva	QC _M	25,00	23,51	2,9	94,0
($n = 5$)	QC _H	100,0	91,94	2,8	91,9
Med	QC _L	3,000	2,541	18,1	84,7
dnevi	QC _M	25,00	24,63	4,4	98,5
($n = 15$)	QC _H	100,0	98,69	6,2	98,7

4.5.3 UČINEK MATRICE IN IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

Ocena učinka matrice je pri LC-MS/MS metodah zelo pomemben aspekt validacije, saj imajo lahko interference iz vzorca zaradi načina ionizacije in občutljivosti detektorja velik vpliv na točnost določanja, selektivnost in občutljivost (52). Učinek matrice smo zmanjšali že z učinkovitim postopkom ekstrakcije in injiciranjem majhnega volumna vzorca (0,1 μ L). Odsotnost učinka matrice smo dokazali s t. i. post-ekstrakcijskim dodajanjem standarda, ki ga je predlagal Matuszewski. Najprej smo določili **absolutni učinek matrice** za pet različnih plazem, ki je znašal 100,6–104,4 % (preglednica 17). Za sam IS je absolutni učinek matrice znašal 105,7 % ($n = 25$) in je bil ponovljiv s CV 1,3 %.

Preglednica 17

Absolutni učinek matrice za bisoprolol v plazmi

Plazma ($n = 5$)	Povprečni odziv Biso/IS		ME [%]
	A	B	
a	0,40998		100,6
b	0,41939		102,9
c	0,41740	0,40763	102,4
d	0,42140		103,4
e	0,42562		104,4
		CV	1,4 %

a in d: plazmi z oborinami; e: hemolizirana plazma; (A) post-ekstrakcijsko dodan standard; (B) standard v mobilni fazi; koncentracija (plazemski ekvivalent) = 30 ng/mL.

Vrednosti, izrazito nižje od 100 %, bi nakazovale na zmanjšanje učinkovitosti ionizacije analita ("*ion suppression*"), vrednosti, višje od 100 %, pa na povečanje ionizacije ("*ion enhancement*") (53). V našem primeru dobljene vrednosti znašajo blizu 100 % in hkrati z nizko variabilnostjo kažejo na to, da je absolutni ME nizek in ponovljiv ter tako nima pomembnega vpliva na rezultate analize.

Ocena **relativnega učinka matrice** ima po navedbah Matuszewskega (53, 54) še večji pomen kot ocena absolutnega ME. Relativni ME smo izrazili s koeficientom variacije naklonov umeritvenih krivulj, sestavljenih iz plazem petih različnih virov (*način I*). Z analizo nismo opazili pomembnega učinka matrice, saj je CV naklonov premic znašal 3,9 %, kar ne presega predlagane meje 3–4 % (preglednica 18).

Relativni ME smo izrazili tudi s CV odzivov seta B (post-ekstrakcijsko dodan standard) pri petih različnih plazmah in vrednost primerjali s CV odzivov seta A (standard v čistem topilu) (*način II*). CV odzivov seta B je znašal 1,4 % in je bil le malenkost višji od CV odzivov seta A, ki je znašal 0,7 %. Tudi na ta način torej nismo dokazali prisotnosti relativnega učinka matrice.

Preglednica 18

Relativni učinek matrice za bisoprolol v plazmi

Plazma (<i>n</i> =5)	Parametri regresijske premice		
	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>r</i> ²
a	0,01345	-0,00313	0,99957
b	0,01460	-0,01706	0,99958
c	0,01409	-0,00133	0,99989
d	0,01481	-0,01666	0,99847
e	0,01414	0,00069	0,99908
povprečje	0,01424		
sd	0,00055		
CV [%]	3,9		

a in d: plazmi z oborinami; e: hemolizirana plazma.

Izračunali smo tudi, kolikšen bi bil učinek matrice, če pri analizi ne bi upoštevali internega standarda. Rezultati za absolutni in relativni učinek matrice so prikazani v preglednicah 19 in 20. Opazimo lahko, da smo z uporabo internega standarda zmanjšali absolutni učinek matrice na določevanje bisoprolola v plazmi, ki je brez uporabe IS znašal od 106,0 % do 112,7 %. Prisotnost učinka matrice torej ne pomeni nujno, da metoda ni veljavna, saj ga lahko zmanjšamo z uporabo ustreznega IS. Če se pri različnih plazmah pojavi enak vzorec učinka matrice na analit in na interni standard, ostane razmerje analit/IS nespremenjeno, zaradi česar učinek matrice nima vpliva na kvantifikacijo v plazmi (53).

Pri določanju relativnega učinka matrice pa smo brez upoštevanja IS določili nižji CV naklonov premic (2,4 % v primerjavi s 3,9 % pri upoštevanju IS), kar je bilo v nasprotju s pričakovanji. Vrednosti se sicer le malo razlikujeta, zato menimo, da je razlika posledica drugih dejavnikov, ki vplivajo na variabilnost meritev in manj neustreznosti IS.

Preglednica 19Absolutni učinek matrice za bisoprolol v plazmi *brez upoštevanja internega standarda*

Plazma (<i>n</i> = 5)	Povprečni odziv		ME [%]
	A	B	
a	18637		106,0
b	19031		108,3
c	18936	17579	107,7
d	18992		108,0
e	19813		112,7
		CV	2,3 %

a in d: plazmi z oborinami; e: hemolizirana plazma; (A) post-ekstrakcijsko dodan standard; (B) standard v mobilni fazi; koncentracija (plazemski ekvivalent) = 30 ng/mL.

Preglednica 20Relativni učinek matrice za bisoprolol v plazmi *brez upoštevanja internega standarda*

Plazma (<i>n</i> =5)	Parametri regresijske premice (Biso/IS)		
	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>r</i> ²
a	541	129	0,99932
b	577	-450	0,99985
c	566	-516	0,99964
d	560	-386	0,99947
e	554	-31	0,99974
povpr.	560		
sd	13		
CV [%]	2,4		

a in d: plazmi z oborinami; e: hemolizirana plazma.

Učinek matrice bi lahko še dodatno znižali z uporabo stabilnega izotopno označenega internega standarda, ki pa ga zaradi cene in trenutne nedostopnosti nismo uporabili. Nekatere študije (59, 62) tudi navajajo, da uporaba izotopno označenega IS sama po sebi ne zagotavlja nujno konstantnega razmerja analit/IS. Zamenjava ¹H z devterijem rahlo spremeni lipofilnost molekule in s tem retencijski čas na reverzno fazni koloni. V primeru, da se okoli retencijskega časa analita in IS eluira nečistota z vplivom na ionizacijo, ima lahko ta majhna razlika v retenciji za posledico različni učinek matrice na analit oziroma interni standard.

Izkoristek ekstrakcije smo določili tako, da smo primerjali odzive ekstrahiranih plazemskih standardov z odzivi vzorcev, pri katerih smo standarde dodali plazmi po ekstrakciji. Povprečni izkoristek ekstrakcije bisoprolola iz plazme je znašal 94,2 % s koeficientom variacije glede na različne koncentracijske nivoje 6,0 % (preglednica 21). Opazimo lahko, da je pri najvišji koncentraciji izkoristek nekoliko nižji, kar bi lahko bila posledica nezadostne interakcije analita s stacionarno fazo in izgubljanjem s spiranjem ali pa nezadostne elucije iz kolone. Povprečni izkoristek ekstrakcije IS iz plazme je znašal 87,8 %. Ekstrakcija na trdnem nosilcu z uporabo Strata X-C kartuš je dala zadovoljivo visoke in ponovljive izkoristke.

Preglednica 21

Izkoristki ekstrakcije (Re) bisoprolola (QC_L , QC_M in QC_H ; $n = 5$) in IS ($n = 15$) iz plazme ter njihova variabilnost (CV)

	A		B		Re [%]	Povprečje [%]	CV [%]
	Povpr. odziv	CV [%]	Povpr. odziv	CV [%]			
QC_L (3 ng/mL)	1758	4,1	1773	3,2	99,1		
QC_M (25 ng/mL)	12332	3,7	12929	4,6	95,4	94,2	6,0
QC_H (100 ng/mL)	46398	3,9	52666	0,9	88,1		
IS (50 ng/mL)	31545	5,0	35937	2,7	87,8		

(A) ekstrahiran plazemski standard; (B) post-ekstrakcijsko dodan standard.

4.5.4 STABILNOST

Stabilnost učinkovine v plazmi ali topilu je odvisna od pogojev shranjevanja in kemijskih značilnosti spojine ter vrste in značilnosti matrice in vsebnika. Stabilnost analita v določeni matrici in sistemu vsebnikov je tako specifična samo za to matrico in vsebnik ter je ne moremo ekstrapolirati na druge matrice in vsebnike (52). Pri našem delu smo raziskali stabilnost bisoprolola v plazmi pri shranjevanju v plastičnih epruveh z zamaškom, stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku na zamašeni mikrotitrski ploščici ter stabilnost primarne osnovne raztopine bisoprolola v stekleni bučki, zaščiteni s parafinskim filmom. Rezultati testov stabilnosti so prikazani v preglednici 22.

Preglednica 22

Rezultati stabilnostnih testov bisoprolola

	Povprečna sprememba odziva glede na t_0 [%]	
	QC _L (3 ng/mL)	QC _H (100 ng/mL)
ALS 24 h ($n = 5$) ^a	-0,9	0,4
ALS 3 dni ($n = 1$) ^b	3,0	1,3
Kratkoročna ($n = 3$) ^c	-1,0	-2,6
Zamrzovanje/odtajanje ($n = 3$) ^d	6,7	5,4
Dolgoročna ($n = 3$) ^e	1,2	3,6
Primarna osnovna raztopina ($n = 3$) ^f	-0,1-0,7	

^a Po 24 h v avtomatskem vzorčevalniku na 4 °C.^b Po 3 dneh v avtomatskem vzorčevalniku na 4 °C.^c Po 6 h na sobni temperaturi.^d Po treh ciklih zamrzovanja/odtajanja na -20 °C.^e Po petih tednih na -20 °C; primerjava glede na nominalno vrednost.^f Po 1 tednu na 4 °C; navedena je sprememba v odzivu UV detektorja pri treh redčitvah.

Ugotovili smo, da je analit pod raziskanimi pogoji stabilen, tako v plazmi kot tudi v raztopini mobilne faze (v ALS) in v primarni osnovni raztopini. Rezultati so bili pričakovani in se skladajo z ugotovitvami preteklih raziskav, v katerih prav tako niso dokazali nestabilnosti bisoprolola pri podobnih pogojih (26–37). Sprememba v koncentraciji v avtomatskem vzorčevalniku je znašala od -0,9 do 0,4 %, kar pomeni, da lahko vzorce pred analizo pustimo v avtomatskem vzorčevalniku na 4 °C vsaj tri dni. Prav tako je bisoprolol stabilen v plazmi pri sobni temperaturi vsaj 6 ur (rezultati testa kratkoročne stabilnosti), saj je prišlo do največ 2,6 % upada v koncentraciji v primerjavi s takoj obdelanimi QC vzorci. Med tremi cikli zamrzovanja in odtajanja ni prišlo do zmanjšanja vsebnosti bisoprolola v plazmi, pozitivna sprememba v odzivu (6,7–5,4 %) pa je verjetno posledica variabilnosti meritev. Test dolgoročne stabilnosti je pokazal, da lahko plazmo z bisoprololom pred analizo brez upada v koncentraciji shranjujemo na -20 °C vsaj pet tednov, prav tako je vsaj en teden pri hranjenju na 4 °C stabilna tudi primarna osnovna raztopina bisoprolola (1mg/mL v MeOH).

4.6 APLIKACIJA METODE NA REALNE VZORCE

Z uporabo validirane metode smo uspešno določili plazemsko koncentracijo bisoprolola pri 14 bolnikih, ki so prejeli od 1,25 mg do 10 mg bisoprololijevega fumarata enkrat na dan. Posamezne plazemske koncentracije za vsakega izmed bolnikov so prikazane v preglednici 23. Določili smo tudi plazemski koncentracijski profil srednjih vrednosti po aplikaciji tablet z 10 mg (slika 17) oziroma tablet s 5 mg (slika 18) bisoprololijevega fumarata.

Preglednica 23

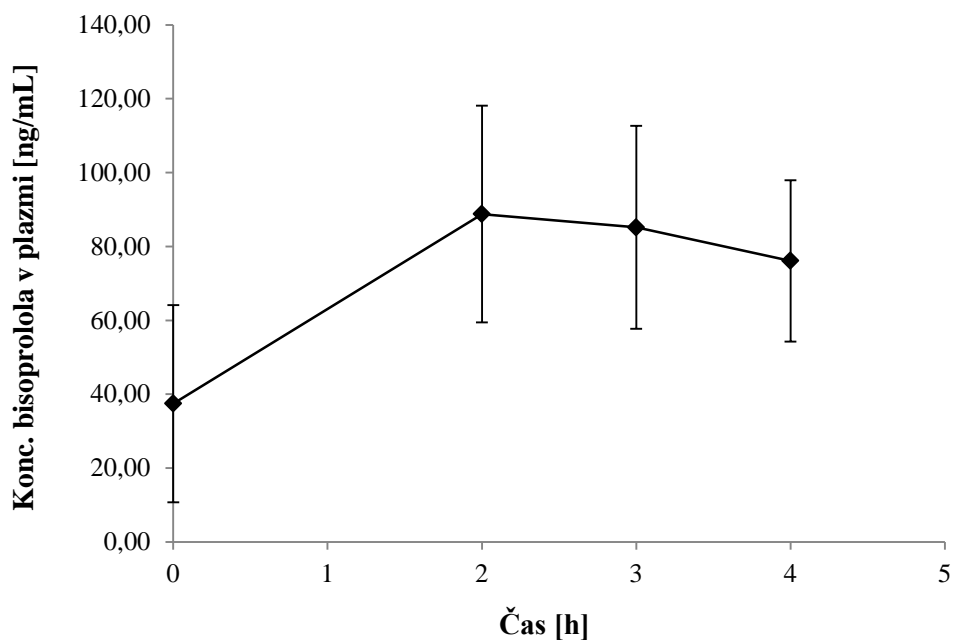
Izmerjene plazemske koncentracije bisoprolola [ng/mL] pri 0 h, 2 h, 3 h in 4 h po per os aplikaciji zdravila z bisoprololijevim fumaratom

Šifra bolnika	Odmerek [mg]	Koncentracija bisoprolola v plazmi [ng/mL] ^a			
		0 h	2 h	3 h	4 h
K01	10	17,33	74,83	70,00	64,96
K02	10	13,75	70,87	67,77	61,76
K03	10	28,22	64,55	63,33	62,68
K04	5	18,15	37,10	28,46	32,84
K05	5	17,78	55,94	46,49	45,98
K06	10	9,746	47,48	46,64	49,47
K07	10	57,40	102,3	95,69	78,53
K08 ^b	10	45,15	99,85	101,2	90,56
K09	2,5	19,30	31,25	27,35	27,54
K10	5	15,54	35,37	37,79	37,16
K11	1,25	1,839	6,484	5,649	6,187
K12	10	38,29	113,1	107,6	81,48
K13	2,5		9,072	8,313	7,858
K14	10	89,53	136,9	129,0	119,3

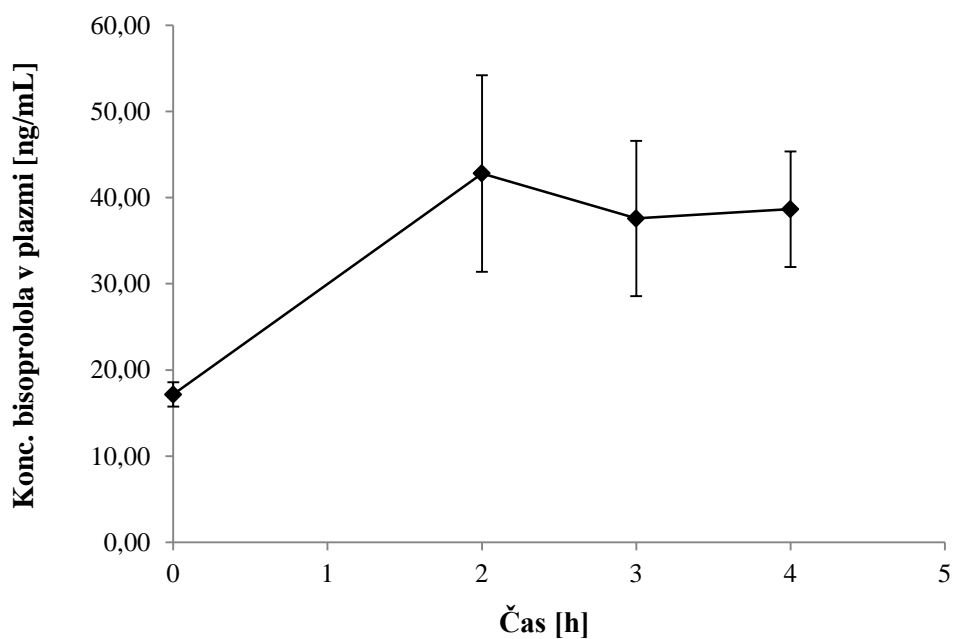
^a Plazemske koncentracije so bile izračunane na podlagi umeritvene krivulje z enačbo:

$$\text{odziv (Biso/IS)} = 0,011318 \times \text{konc.} + 0,018807; r^2 = 1.$$

^b Bolnik je dodatno prejel tudi odmerek 5 mg zvečer.



Slika 17. Povprečni plazemski koncentracijski profil bisoprolola po aplikaciji tablet z 10 mg bisoprololijevega fumarata ($n = 8$, povpr. \pm sd).



Slika 18. Povprečni plazemski koncentracijski profil bisoprolola po aplikaciji tablet s 5 mg bisoprololijevega fumarata ($n = 3$, povpr. \pm sd).

Za kontrolo točnosti smo skupaj z vzorci bolnikov izvedli tudi 27 meritev QC vzorcev treh različnih koncentracij. Kriterij veljavnosti meritve je bil, da vsaj dve tretjini QC vzorcev, analiziranih med sekvenco realnih vzorcev, odstopa za manj kot 15 % od kontrolne vrednosti. Ena tretjina kontrolnih vzorcev lahko odstopa za več kot 15 %, vendar ti ne smejo biti enake koncentracije (52). Odstopanje QC vzorcev je znašalo največ –19,6 % s povprečjem absolutne vrednosti odstopanja 5,4 %. Odstopanje je bilo višje od 15 % pri treh QC vzorcih, kar še ustreza postavljenim zahtevam za veljavnost meritev.

Naš prvotni namen je bil, da bi na podlagi ugotovljenih koncentracij bisoprolola v plazmi izračunali tudi nekatere pomembnejše farmakokinetične parametre, kot so C_{max} , t_{max} in razpolovna doba v plazmi ter parametre primerjali s podatki iz literature, kar bi bilo še posebej zanimivo. Vendar pa za zanesljivo določitev parametrov nismo imeli na voljo dovolj vzorcev, pri čemer so nam manjkali predvsem vzorci, odvzeti po maksimalni koncentraciji v plazmi (v eliminacijski fazi). Za izračun farmakokinetičnih parametrov bi morali vzorce analizirati v več časovnih točkah – glede na podatke o razpolovni dobi bisoprolola v plazmi (10–12 ur) bi za določitev konstante eliminacije potrebovali vzorce, odvzete vsaj do 60 ur po aplikaciji učinkovine ali več. Težave z okrnjenimi podatki oziroma redkim vzorčenjem lahko sicer rešimo z uporabo populacijskega farmakokinetičnega modeliranja, ki pa zahteva napredno znanje in specifično programsko opremo. Razvijanje ustreznega modela bi preseglo okvir diplomske naloge, zato se za to pot nazadnje nismo odločili, so pa rezultati na voljo za morebitno kasnejšo obdelavo.

5 SKLEPI

Razvili smo selektivno in zanesljivo LC-MS/MS metodo, ki je primerna za določevanje plazemskih koncentracij bisoprolola. Prednosti metode sta relativna enostavnost izvedbe in visoka občutljivost, ki nam omogoča merjenje koncentracij bisoprolola od 1–150 ng/mL.

Priprava vzorcev je vključevala ekstrakcijo na trdnih nosilcih Strata X-C s petkratnim koncentriranjem. Mešani ionsko izmenjevalni SPE adsorbenti omogočajo visoko selektivno retencijo analita, zaradi česar smo lahko kolono spirali z agresivnejšimi topili in tako pridobili zelo čist ekstrakt. Izkoristki ekstrakcije bisoprolola iz plazme so bili visoki (88,1–99,1 %) in ponovljivi. Bisoprolol in interni standard metoprolol smo od endogenih nečistot uspešno ločili na reverzno fazni koloni Kinetex C18 ($50 \times 2,1$ mm; $2,6 \mu\text{m}$) z uporabo mobilne faze iz 0,1 % mravljične kisline v vodi in acetonitrila. Elucija je bila gradientna s postopnim povečevanjem odstotka ACN od 10 do 50 %, s čimer smo dosegli najmanjši možni čas analize, ki je znašal 2,7 min in je bil nižji kot pri večini do sedaj objavljenih raziskav.

Metoda je točna, ponovljiva, linearna in selektivna v območju 1–150 ng/mL ter pokriva terapevtsko koncentracijsko območje bisoprolola v plazmi. Izračun absolutnega in relativnega učinka matrice je pokazal, da neodstranjene komponente plazme niso motile obsega ionizacije bisoprolola na masnem analizatorju, kar ima velik pomen za točnost pridobljenih rezultatov. S testi stabilnosti smo dokazali, da lahko vzorce pred analizo hranimo v zamrzovalniku vsaj pet tednov in jih pri tem trikrat zamrznemo in odtajamo, bisoprolol pa je stabilen tudi tekom obdelave vzorca pri sobni temperaturi, v avtomatskem vzorčevalniku (vsaj 3 dni) in v osnovni standardni raztopini pri hranjenju na 4°C (1 teden).

Metoda se je izkazala kot primerna za določevanje bisoprolola v človeški plazmi, kar smo potrdili z uspešno analizo vzorcev 14 bolnikov v štirih časovnih točkah po per os aplikaciji zdravila z bisoprololijevim fumaratom.

Kljub omenjenim prednostim metode pa imamo še prostor za izboljšave. Priprava vzorcev v laboratorijih pogosto predstavlja ozko grlo celotnega postopka analize, kar smo opazili tudi pri našem delu. Zmogljivost metode bi lahko povečali z izvedbo SPE na μ -elucijskih ploščicah, kar bi tudi zmanjšalo potrebne volumne vzorca ter porabo topil. Za dodatno

izboljšanje točnosti meritev bi lahko kot IS namesto metoprolola uporabili devteriran bisoprolol, ki daje zaradi enakih fizikalno-kemijskih lastnosti podoben izkoristek ekstrakcije in podoben retencijski čas kot bisoprolol ter še bolj učinkovito zmanjša učinek matrice. Izotopno označenega internega standarda pa ne bi mogli izbrati pri uporabi HPLC-FLD aparata, saj se kromatografsko bisoprolol in njegov devteriran analog s fluorescentnim detektorjem ne bi ločila.

Metoda je primerna za uporabo v farmakokinetičnih študijah in pri dokazovanju bioekvivalence pripravkov z bisoprololom. Postopek lahko služi tudi za terapevtsko spremljanje koncentracij pri kardiovaskularnih bolnikih, kar ima glede na porast tovrstnih obolenj nedvomno veliko uporabno vrednost.

6 VIRI

1. Merck: Bisoprolol, Cardioselective Beta-Blocker. <http://www.bisoprolol-slides.info/homesite/teaser.pdf>, december 2011.
2. SRC Inc.: Interactive PhysProp Database Demo. <http://www.srcinc.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>, december 2011.
3. *The United States pharmacopeia, 35th ed.* United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2012: 1104.
4. Inštitut za varovanje zdravja RS: Register zdravil RS. <http://www.ivz.si/register/>, marec 2012.
5. Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke: Baza podatkov o zdravilih. www.zdravila.net, december 2011.
6. Merck: Povzetek glavnih značilnosti zdravila Concor. http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/011444_smpc.pdf, december 2011.
7. Merck: Povzetek glavnih značilnosti zdravila Concor COR. http://skrito.draagle.com/media/d/smpc/024236a_smpc.pdf, december 2011.
8. Obreza A, et al.: *Farmaceutski terminološki slovar*. Založba ZRC, Ljubljana, 2011: 20, 67, 239, 145.
9. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: *Pharmacology*, 5th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003: 173–176.
10. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999; 353(9146): 9–13.
11. Van de Ven LL, et al.: The effect of treatment with bisoprolol versus enalapril on cardiac structure and function in heart failure. *Int J Cardiol* 2010; 144(1): 59–63.
12. Stankovic I, et al.: Sinus rhythm versus atrial fibrillation in elderly patients with chronic heart failure – Insight from the Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study in Elderly. *Int J Cardiol* 2012; 161(3): 160–165.
13. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K: *Introduction to pharmaceutical chemical analysis*. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, 2012: 127–160, 173–190, 231–259, 273–298, 453–465.
14. Kataoka H: New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 2003; 22(4): 232–244.
15. Vovk T, Trontelj J: *Analizne metode v farmakokinetiki (interno gradivo)*, 2011.

16. Waters Corporation: A Sample Preparation Primer and Guide to Solid Phase Extraction Methods Development. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/wa20300.pdf>, marec 2012.
17. Waters Corporation: Waters Quality Parts, Chromatography Columns and Supplies Catalog 2012/2013. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004075en.pdf>, oktober 2012.
18. Waters Corporation: SPE Method Development. <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10083845>, februar 2012.
19. Xu RN, Fan L, Rieser MJ, El-Shourbagy TA: Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44(2): 342–355.
20. Mallet CR, Lu Z, Fisk R, Mazzeo JR, Neue UD: Performance of an ultra-low elution volume 96-well plate: drug discovery and development applications. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003; 17(2): 163–170.
21. Kole PL, Venkatesh G, Kotecha J, Sheshala R: Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed Chromatogr* 2011; 25(1–2): 199–217.
22. Waters Corporation: Acquity Ultraperformance by Design. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000880en.pdf>, marec 2012.
23. Wren SA, Tchelitcheff P: UPLC/MS for the identification of beta-blockers. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 40(3): 571–580.
24. Agilent Technologies, Inc.: Agilent 1100 Series Fluorescence Detector. http://www.thm.de/ibva/images/stories/doku/agilent1100/g1321-90003_ebook.pdf, oktober 2012.
25. Broad Institute: MRM (Multiple Reaction Monitoring). <http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/platforms/proteomics/mrm-multiple-reaction-monitoring>, marec 2012.
26. Bhatt J, et al.: A high throughput and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the estimation of bisoprolol in human plasma using multiplexing technique. *J Chromatogr B* 2007; 852(1–2): 374–381.

27. Braza AJ, Modamio P, Lastra CF, Marino EL: Development, validation and analytical error function of two chromatographic methods with fluorimetric detection for the determination of bisoprolol and metoprolol in human plasma. *Biomed Chromatogr* 2002; 16(8): 517–522.
28. Caudron E, Laurent S, Billaud EM, Prognon P: Simultaneous determination of the acid/base antihypertensive drugs celiprolol, bisoprolol and irbesartan in human plasma by liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2004; 801(2): 339–345.
29. Ding L, et al.: LC-ESI-MS method for the determination of bisoprolol in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 44(2): 520–525.
30. Gonzalez O, et al.: LC-MS/MS method for the determination of several drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma. *Journal of Chromatography B* 2010; 878: 2685–2692.
31. Jovanovic D, Cusic S, Rancic D, Srnic D, Perkovic-Vukcevic N: A pharmacokinetic comparison of generic tablets containing bisoprolol with the innovator formulation in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2006; 46(10): 1217–1222.
32. Li S, et al.: Simultaneous determination of ten antiarrhythmic drugs and a metabolite in human plasma by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 847(2): 174–181.
33. Liu GY, et al.: Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of bisoprolol in human plasma using d5-bisoprolol as the internal standard. *Biomed Chromatogr* 2010; 24(6): 574–580.
34. Maurer HH, Tenberken O, Kratzsch C, Weber AA, Peters FT: Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in blood plasma by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Chromatogr A* 2004; 1058(1–2): 169–181.
35. Peste G, Bibire N, Apostu M, Vlase A, Oniscu C: A new liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of bisoprolol in human plasma samples. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 736327.
36. Taguchi M, et al.: Pharmacokinetic variability of routinely administered bisoprolol in middle-aged and elderly Japanese patients. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(5): 876–881.

37. Tutunji MF, Ibrahim HM, Khabbas MH, Tutunji LF: Simultaneous determination of bisoprolol and hydrochlorothiazide in human plasma by HPLC coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(16–17): 1689–1697.
38. Zhang L, et al.: Extraction and preconcentration of beta-blockers in human urine for analysis with high performance liquid chromatography by means of carrier-mediated liquid phase microextraction. *Talanta* 2010; 82(3): 984–992.
39. Pujos E, Cren-Olive C, Paisse O, Flament-Waton MM, Grenier-Loustalot MF: Comparison of the analysis of beta-blockers by different techniques. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(31): 4007–4014.
40. Branum GD, Sweeney S, Palmeri A, Haines L, Huber C: The feasibility of the detection and quantitation of beta-adrenergic blockers by solid-phase extraction and subsequent derivatization with methanaboronic acid. *J Anal Toxicol* 1998; 22(2): 135–141.
41. Kristoffersen L, et al.: Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 850(1–2): 147–160.
42. Josefsson M, Sabanovic A: Sample preparation on polymeric solid phase extraction sorbents for liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of human whole blood--a study on a number of beta-agonists and beta-antagonists. *J Chromatogr A* 2006; 1120(1–2): 1–12.
43. Stolker AA, et al.: Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. *Anal Bioanal Chem* 2004; 378(4): 955–963.
44. Van Nuijs AL, et al.: Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398(5): 2211–2222.

45. Pitarch E, et al.: Potential of capillary-column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitative trace analysis of small molecules. Application to the on-line screening of drugs in water. *J Chromatogr A* 2004; 1031(1–2): 1–9.
46. Katayama M, et al.: Determination of β -blockers by high performance liquid chromatography coupled with solid phase microextraction from urine and plasma samples. *Analytical Letters* 2001; 34(1): 91–101.
47. Wu J, Pawliszyn J: Polypyrrole-coated capillary coupled to HPLC for in-tube solid-phase microextraction and analysis of aromatic compounds in aqueous samples. *Anal Chem* 2001; 73(1): 55–63.
48. Hu X, Pan J, Hu Y, Li G: Preparation and evaluation of propranolol molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for trace analysis of beta-blockers in urine and plasma samples. *J Chromatogr A* 2009; 1216(2): 190–197.
49. Jiang S, et al.: Three-Phase Solvent Bar Microextraction Combined with HPLC for Extraction and Determination of Plasma Protein Binding of Bisoprolol. *Chromatographia* 2011; 73(9–10): 897–903.
50. Phenomenex, Inc.: Simplified Solid Phase Extraction Solutions. <http://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/b50e7828-7b9b-431f-9490-fd9e4498a660.pdf>.
51. Phenomenex, Inc.: Efficient extraction of basic drugs from biological matrices using a polymeric cationic mixed-mode sorbent Strata™ X-C. <http://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/4179f1e5-36f8-4e52-824b-b3fa9d2cb5d6.pdf>, februar 2012.
52. U.S. Food and Drug Administration: Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>, december 2011.
53. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 2003; 75(13): 3019–3030.
54. Matuszewski BK: Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC–MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B* 2006; 830(2): 293–300.

55. Ederveen J.: A Practical Approach to Biological Assay Validation. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20IG/Rapport%20Validatie%20Testmethoden.pdf>, februar 2012.
56. Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcao AC: Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B* 2002; 774(2): 215–222.
57. Arizona Department of Health Services: Weighted Least Square Regression <http://www.azdhs.gov/lab/license/tech/calibration-training/calibration/documents/11-Weighted-Least-Squares-Regression-Calib.pdf>, februar 2012.
58. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M: A strategy for validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14(4): 375–388.
59. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y: Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009; 877(23): 2198–2207.
60. Taylor PJ: Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005; 38(4): 328–334.
61. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR: Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B* 2007; 852(1-2): 22–34.
62. Stokvis E, Rosing H, Beijnen JH: Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005; 19(3): 401–407.