szabopali_452_26

KVANTITATÍV LC–MS ALAPÚ ANALITIKAI STRATÉGIÁK KOMPLEX RENDSZEREK VIZSGÁLATÁRA

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Szabó Pál

Természettudományi Kutatóközpont

Szerkezetkutató Központ

Budapest

2026

szabopali_452_26

Kétfajta minta létezik.
Az egyik, amit már mértem
A másik, amit majd mérni fogok.

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Jelentés
5FCP	5-fluor-cumyl-pegaclone
5hmC	5-hidroximetil-citozin
5mC	5-metilcitozin
ACN	acetonitril
ADME	felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiürülés
APCI	légköri nyomású kémiai ionizáció
API	aktív hatóanyag (Active Pharmaceutical Ingredient)
CYP	citokróm-P450 enzimcsalád
CSA	ciklosporin A
DOX	doxorubicin
ESI	elektroporlasztásos ionizáció
FAV	favipiravir
GABA	γ-amino-vajsav
HILIC	hidrofil kölcsönhatású kromatográfia
HPLC	nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia
HRMS	nagyfelbontású tömegspektrometria
ISTD	belső standard
LC–MS	folyadékkromatográfia–tömegspektrometria
LOD	kimutatási határ
LOQ	mennyiségi meghatározási határ
MRM	reakciócsatornák figyelése
MS	tömegspektrometria
MS/MS	tandem tömegspektrometria
NN3OHP	N-nitrozo-3-hidroxi-pirrolidin
NNDL	N-nitrozo-duloxetin
NNPE	N-nitrozo-fenilefrin
NSAID	nem-szteroid gyulladáscsökkentő
PE	fenilefrin
P-gp	P-glikoprotein
PK	farmakokinetika
QqQ	hármas kvadrupól tömegspektrométer
QTOF	kvadrupól–repülési idő tömegspektrométer
QTrap	kvadrupól-ioncsapda tömegspektrométer
sMRM	időzített reakciócsatornák figyelése
SPE	szilárdfázisú extrakció
TQ	tariquidar
VPA	valproinsav

Tartalom

1. Bevezetés ... 1
2. A kutatási terület háttere ... 3
2.1. Tömegspektrometria ... 3
2.1.1. Ionizációs technikák ... 4
2.1.2. Analizátorok ... 7
2.1.3. Tandem tömegspektrometria ... 10
2.2. Kromatográfia ... 11
2.2.1. Folyadékkromatográfiás mozgófázis ... 12
2.2.2. Folyadékkromatográfiás állófázis ... 13
2.3. Mennyiségi meghatározás ... 14
2.4. Mátrixok, mátrixhatás ... 15
2.4.1. A víz, mint mátrix ... 16
2.4.2. Biológiai eredetű mátrixok ... 16
2.4.3. Vezikulák ... 18
2.4.4. Gyógyszeripari formulációk ... 19
2.4.5. Extrém ipari mátrixok ... 19
2.5. Az érzékenység növelése ... 20
2.5.1. Extrakció ... 20
2.5.2. Nagy térfogatok injektálása, mintaoldó szerepe ... 20
2.5.3. Származékképzés ... 21
2.5.4. Mikrotechnikák ... 21
2.6. Módszervalidálás ... 22
2.6.1. Szelektivitás/specificitás ... 22
2.6.2. Kalibrációs modell ... 22
2.6.3. Határértékek (LOD,LOQ, ULOQ) ... 22
2.6.4. Pontosság/precizitás ... 23
2.6.5. Mátrixhatás, visszanyerés ... 23
2.6.6. Stabilitás ... 24
2.7. Ipari folyamatok ellenőrzése, minőségbiztosítás ... 24
2.7.1. Covid19 ... 24
2.7.2. Nitrózaminok ... 25
2.7.3. Fermentációs úton történő bioszimiláris gyógyszergyártás ... 26
2.8. Klinikai tömegspektrometria ... 28
2.8.1. Szteroid hormonok mennyiségi meghatározása ... 28

2.8.2. Terápiában használatos gyógyszerszintek mérése (TDM) 29
2.8.3. Epigenetika, DNS metilációs szintjének meghatározása 30
2.8.4. Transzplantáció 32
2.9. Időfüggő analitikai vizsgálatok biológiai rendszerekben 33
2.9.1. Transzportfolyamatok 33
2.9.2. Farmakokinetika 36
3. Célkitűzések 39
4. Alkalmazott analitikai műszerek 41
4.1. Tömegspektrométerek 41
4.2. HPLC rendszerek 42
5. Eredmények és értékelésük 43
5.1. Módszerfejlesztések 43
5.1.1.Tömegspektrometriás módszerfejlesztések, optimálások 43
5.1.2. LC optimálás 56
5.1.3. Mátrixok, mintaelőkészítés, mátrixhatás 65
5.1.4. Érzékenység növelése 73
5.1.5. Kalibrációs modellek 84
5.1.6. Validálás 87
5.2. Gyakorlati alkalmazások, esetismertetések 91
5.2.1. Gyógyszeripari alkalmazások 91
5.2.2. Klinikai, diagnosztikai mérések 113
5.2.3. Transzportfolyamatok 132
5.2.4. Farmakokinetikai vizsgálatok 134
6. Összefoglalás 141
7. Új tudományos eredmények 142
8. Köszönetnyilvánítás 144
9. A dolgozatban felhasznált saját publikációk 146
10. A dolgozat témájához kapcsolódó, de abban fel nem használt egyéb saját publikációk 148
11. Irodalomjegyzék 150
Függelék 163

1. Bevezetés

A tömegspektrometria a természettudományos kutatások egyik legfontosabb analitikai eszközévé vált. Míg kezdetben csupán atom- és molekulatömegek meghatározására alkalmazták, ma már jóval szélesebb körben használják. A vizsgálható vegyületek köre jelentősen kibővült, a műszerek érzékenysége pedig drámai fejlődésen ment keresztül. Ennek köszönhetően a tömegspektrometriás eredmények egyre több területen váltak nélkülözhetetlenné. Ki gondolta volna, hogy a fizikusok által kidolgozott technika mára szinte mindenhol ott van: a szintetikus szerves kémiától és a biokémiától kezdve egészen a klinikai diagnosztikáig. Egyre több kutatási és ipari kérdés merül fel, amelyre a tömegspektrometria adja meg a választ. Nem véletlen, hogy ez az alkalmazott tudományág hatalmas lendületet vett. Saját tapasztalataim alapján is látom, hogy mind gyakrabban érkeznek megkeresések ipari megbízásokkal vagy tudományos együttműködések céljából. Bár léteznek egyszerűbb, rutinmérésre szánt készülékek, a valóban összetett és fontos kérdések megválaszolásához korszerű infrastruktúra és – talán még ennél is fontosabb – nagyfokú szakmai tapasztalat szükséges.

A tömegspektrometria története alig több mint 100 évre tekint vissza. A módszer lehetővé teszi töltéssel rendelkező részecskék vizsgálatát oly módon, hogy a mintát először ionizálja, majd az ionokat elektrosztatikus és/vagy mágneses terek segítségével tömeg/töltés arányuk szerint szétválasztja. Kezdetben csak illékony vegyületek voltak vizsgálhatók, ami jelentősen korlátozta az alkalmazhatóságot. Bár számos kísérlet történt a nem illékony molekulák ionizálhatóságának javítására, mintegy 70 évnek kellett eltelnie, mire rutinszerűen is használható megoldás (gyorsatom-bombázás, FAB) született a poláros, nem illékony vegyületek vizsgálatára. Az igazi áttörést az 1990-es évek hozták el: a légköri nyomáson működő elektroporlasztásos ionizáció (ESI), illetve a mátrixsegített lézerdeszorpció (MALDI) lehetővé tette, hogy polaritástól és molekulatömegtől függetlenül szinte bármely vegyület vizsgálhatóvá váljon. Ez a változás a tömegspektrometriás alkalmazások robbanásszerű bővülését eredményezte.

Hasonló fejlődés figyelhető meg az analizátorok területén is. A kezdeti műszerek mágneses és elektrosztatikus analizátorok kombinációjával választották szét az ionokat. Bár ez nagy felbontást tett lehetővé, a műszerek mérete, kezelhetősége és sebessége számos kihívást jelentett. Az 1950-es évektől azonban megjelentek a kisebb, könnyebben kezelhető analizátorok, például a kvadrupólok, ioncsapdák vagy a repülési idő (TOF) elvén működő

készülékek. Ezeknek köszönhetően a korábban szobányi méretű rendszerek asztali műszerekké zsugorodtak, és mérési sebességük is összehangolhatóvá vált a kromatográfiás elválasztással. Ekkor terjedt el széles körben a tandem tömegspektrometria is, amely mára nélkülözhetetlenné vált a szerkezetazonosításban és a nagy szelektivitást, illetve érzékenységet igénylő mennyiségi meghatározásokban.

Sokan a tömegspektrometriát elsősorban a szerkezetkutatással azonosítják, ahol a cél a molekulatömegek és szerkezetek meghatározása. Meglepő lehet, hogy napjainkban a tömegspektrometriás alkalmazások túlnyomó része mennyiségi meghatározás. A technika a minőségbiztosítás alapvető eszközévé vált: alkalmazzák környezetvédelmi mérésekben, doppinganalitikában, vizsgálólaboratóriumokban és a klinikai diagnosztikában is. Ezekben az esetekben a fő kérdés a célmolekulák koncentrációjának pontos meghatározása az adott környezetben (mátrixban). A tömegspektrometria rendkívüli szelektivitása és érzékenysége teszi lehetővé, hogy ennyire meghatározóvá váljon ezeken a területeken. Szelektivitásának köszönhetően képes megkülönböztetni a nagyon hasonló komponenseket egymástól és a mátrixalkotóktól; egyetlen mérés során már akár ezernyi komponens is detektálható. Érzékenysége pedig olyan mértékűre nőtt, hogy ma már a pg/mL alatti koncentrációk is kimutathatók. Ebben a fejlődésben a kromatográfia szerepe is kulcsfontosságú: jól megválasztott kromatográfiás módszer nélkülözhetetlen a komponensek elválasztásához, dúsításához vagy a mérhető komponensszám növeléséhez. A mennyiségi meghatározások során ezért a tömegspektrometria és a kromatográfia szorosan összekapcsolt technikaként jelenik meg.

Tömegspektrometriás szakemberként – és különösen a HUN-REN TTK Szerkezetkutató Központ vezetőjeként – kiemelten fontosnak tartom, hogy a módszer nyújtotta lehetőségek és eredmények minél szélesebb kutatói körhöz eljussanak. A különböző tudományterületekről érkező megkeresések és ipari megbízások is azt jelzik, hogy valódi igény mutatkozik erre, és a tömegspektrometria sok esetben nélkülözhetetlen hozzájárulást ad az elért eredményekhez. Meggyőződésem, hogy ez a jövőben is így lesz, és a tömegspektrometria mint alkalmazott tudományág egyre fontosabb és elismertebb szerepet fog betölteni a kiemelkedő tudományos teljesítmények elérésében.

2. A kutatási terület háttere

2.1. Tömegspektrometria

A tömegspektrometria felfedezése – más analitikai technikákhoz hasonlóan – a fizikusok munkájához köthető. Az első kísérletek J. J. Thomson nevéhez fűződnek, aki üveggömbbe töltött gázokat ionizált, majd a keletkezett ionokat mágneses térrel térítette el. Az eltérített részecskéket fotografikus lemezen detektálta, így hozva létre az első tömegspektrográfot [1]. Kísérletei meglepő eredményt hoztak: neongázzal dolgozva két jól elkülönülő csúcsot figyelt meg, amelyek a neon izotópjainak feleltek meg. Ez a mérés tekinthető az izotópok felfedezésének. A következő években sikerült az addig ismert valamennyi elem izotópjait meghatározni [1–3].

A technika hamar túlnőtt a fizikusok érdeklődési körén, és egyre szélesebb körben hódított teret a kémikusok között. Kezdetben elsősorban a szerves kémikusok által előállított molekulák molekulatömegét határozták meg vele, később pedig a módszer szerkezeti információval is szolgált. Bár a tömegspektrométerek az elmúlt száz évben hatalmas technológiai fejlődésen mentek keresztül, alapvető felépítésük és működési elvük lényegében változatlan maradt.

A tömegspektrometria jelentőségét jól mutatja, hogy a területhez kapcsolódó kutatásokért eddig négy alkalommal ítéltek oda Nobel-díjat. Elsőként J. J. Thomson részesült ilyen elismerésben 1906-ban a gázokon végzett kísérleteiért [1]. 1922-ben F. W. Aston kapta meg a díjat az első korszerű tömegspektrométer megalkotásáért [2]. 1989-ben W. Paul részesült Nobel-díjban az ioncsapdák fejlesztésében elért eredményeiért [4]. Végül, 2002-ben J. B. Fenn és K. Tanaka kaptak megosztva kémiai Nobel-díjat a lágy ionizációs technikák (ESI, MALDI) kidolgozásáért [5,6].

A tömegspektrometria töltött részecskék vizsgálatát teszi lehetővé. A mintát az ionforrásban először ionizáljuk, majd a keletkező ionokat a tömeganalizátorban fajlagos tömegük (tömeg/töltés arányuk) alapján szétválasztjuk. A detektor által mért jelekből kapjuk meg a tömegspektrumot. A készülék működéséhez elengedhetetlen a csökkentett nyomás biztosítása, amely lehetővé teszi az ionok akadálytalan repülését, valamint a vezérlést, adatgyűjtést és kiértékelést végző számítógép. A következőkben ezeknek a kulcsfontosságú egységeknek a fejlődését tekintem át.

2.1.1. Ionizációs technikák

2.1.1.1. Elektron ionizáció (EI)

Az első tömegspektrometriás kísérleteket gázfázisban végezték: elektromos kisülések során keletkező ionok mágneses térben történő mozgását vizsgálták. Később az ionizációhoz fűtött fémszálból kilépő elektronokat használtak, amely technika az elektronionizáció (EI) nevet kapta [7]. EI körülmények között csak illékony vegyületek vizsgálhatók, ami gyakorlatban nagyjából 600–800 Da körüli felső tömeghatárt jelent. Ugyanakkor egy molekula akkor sem mérhető EI-ben, ha ennél lényegesen kisebb tömegű, amennyiben nem illékony, vagy hő hatására elbomlik. Ilyen esetekben a tömegspektrometriás vizsgálat előtt valamilyen módon illékonnyá kell tenni a vegyületet.

A legelterjedtebb megoldás a származékképzés, amely során a polaritást meghatározó funkciós csoportokat nagy térkitöltésű, kis polaritású csoportokkal – például trimetil-szilil csoporttal – maszkírozzák [8]. A módszer hátránya az idő- és reagensigény, előnye viszont az, hogy jelentősen szélesíti a vizsgálható vegyületek körét. Más, egyszerűbb megoldások is születtek, ám ezek nem hoztak átütő sikert. Egy korábbi munkánk során például ammónium-klorid felhasználásával sikerült poláros, hőre érzékeny vegyületeket is illékonnyá tenni. Deuterált ammónium-klorid alkalmazásakor az aktív hidrogéneket tartalmazó molekulák esetében H/D csere is végbement, ami lehetővé tette az aktív hidrogének azonosítását [9].

Az EI technika másik fontos jellemzője, hogy az ionizáció során a molekulák jelentős energiatöbbletet kapnak. A Franck–Condon-elv értelmében ez az energia rendkívül rövid idő alatt egyenletesen oszlik el a molekula kötései között [10,11]. Ennek következtében bizonyos kötések több energiát kaphatnak, mint amennyit el tudnak viselni, így felszakadnak. A folyamat eredménye a molekula szerkezetére jellemző fragmentionok képződése. Ezek a fragmentumok értékes szerkezeti információt hordoznak, ám bizonyos esetekben a fragmentáció olyan mértékű lehet, hogy a molekula teljesen szétesik, és így elveszhet a molekulatömegre utaló közvetlen információ is.

2.1.1.2. Kémiai ionizáció

A kémiai ionizációt (CI) gyakran együtt emlegetik az elektron ionizációval (EI), mivel ugyanabban az ionforrásban valósítható meg. Az EI-hez képest azonban két lényeges különbség adódik: egyrészt a forrást a kilépő rés szűkítésével zártabbá tesszük, másrészt reagensgázt (például metánt, izobutánt vagy ammóniát) vezetünk be. Bár a reagensgáz

mennyisége a forrásban kicsi, a vizsgálandó anyaghoz képest így is jelentős, akár ezerszeres feleslegben van jelen. Emiatt a fűtőszálból kilépő elektronok sokkal nagyobb valószínűséggel ionizálják a reagensgáz molekuláit. A reagensgázból keletkező ionok lépnek reakcióba a vizsgált molekulákkal, ami elsősorban kis energiaátadású töltéscsere-folyamatokhoz (ionizációhoz) vezet. Ennek eredményeként a CI-spektrumok lényegesen kevesebb fragmentációs iont tartalmaznak [12].

Az EI/CI technika mindmáig széles körben alkalmazott, különösen a GC–MS rendszerekben, ahol az illékony vegyületek vizsgálatának standard ionizációs módját jelenti. Az EI legnagyobb előnye a részletes szerkezeti információt nyújtó, rendkívül jól reprodukálható tömegspektrum. A standard körülmények között mért EI-spektrumok minősége nem függ sem a készüléktől, sem a felhasználótól, ami lehetővé teszi nagy megbízhatóságú spektrumkönyvtárak létrehozását. A jelenleg elérhető EI-adatbázisok több százezer vegyület spektrumát tartalmazzák, és kiválóan alkalmasak ismeretlen komponensek azonosítására [13].

2.1.1.3. Elektroporlasztásos ionizáció

A tömegspektrometriás alkalmazások robbanásszerű elterjedésében meghatározó szerepe volt az ionizációs technikák fejlődésének. A ’90-es évek elején két új módszer jelent meg párhuzamosan: az elektroporlasztásos ionizáció (ESI) [5]. és a mátrixsegített lézerdeszorpciós ionizáció (MALDI) [6]. A MALDI elsősorban a nagy biomolekulák vizsgálatában vált nélkülözhetetlenné, míg az ESI jóval szélesebb vegyületkört tett mérhetővé mind tömeg, mind polaritás tekintetében. Legnagyobb előnye azonban kétségkívül az volt, hogy az ionizáció folyadékfázisból, légköri nyomáson valósul meg – ez pedig megoldást kínált egy régóta fennálló problémára: a folyadékkromatográfia és a tömegspektrometria közvetlen összekapcsolására.

EI körülmények között az ionizáció nagyvákuumban történik, ezért az LC-eluens közvetlen bevezetése a tömegspektrométerbe nem volt lehetséges, mivel a beérkező gőzök lerontották volna a vákuumot. Számos próbálkozás történt a probléma áthidalására: a particle beam interface (PBI) [14] és a moving belt interface [15] EI alapokon próbálták kapcsolni az LC-t az MS-hez, de csak korlátozott hatékonysággal. A folyamatos áramlású FAB megoldás pedig az LC-t a FAB ionizációval kapcsolta össze [16,17].

Az ESI azért jelentett áttörést, mert maga az ionizáció már a légköri nyomáson megy végbe, így a folyadékáramot nem kell bevezetni a nagyvákuum térbe. Az elektroporlasztás során az eluens egy kapillárison áramlik át, amelyre nagyfeszültséget

(1000–5500 V) kapcsolnak, és a porlasztást segítő gáz is bevezetésre kerül. A nagyfeszültség és a porlasztógáz hatására töltött cseppek képződnek, amelyek a forrás elektromos potenciálkülönbsége miatt a tömegspektrométer belépő nyílása (orifice) felé haladnak. A forrás magas hőmérsékletű (akár 700 °C-os) szárítógázának hatására a cseppek oldószertartalma folyamatosan csökken, majd teljesen elpárolog. Ennek eredményeként töltött részecskék, azaz ionok maradnak vissza. Az ESI számos előnnyel rendelkezik. Rendkívül széles áramlási sebesség tartományban alkalmazható (1 nL/perc–3 mL/perc), és a molekula szerkezetétől, méretétől, valamint az eluens pH-jától függően többszörösen töltött ionok is képződhetnek. Több ionizációs technikában megfigyelhető a többszörös töltés kialakulása [18,19], azonban ESI-ben ennek mértéke jóval nagyobb: egy nagy molekulán akár több tucat, sőt több száz töltés is megjelenhet. Ez teszi a módszert különösen alkalmassá nagyméretű biomolekulák vizsgálatára [5,20]. Harmadik nagy előnye, hogy lágy ionizációs technika: a molekulatömeg-információt hordozó ionok dominálnak, a fragmentáció pedig minimális.

2.1.1.4. Légköri nyomású kémiai ionizáció (APCI)

Az elektroporlasztásos technika (ESI) mellett a másik meghatározó légköri nyomású ionizációs módszer az APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), mely elsősorban kis molekulák esetében alkalmazható [21]. Ebben az esetben is oldatfázisból indul az ionképződés, azonban az ionizáció mechanizmusa jelentősen eltér az ESI-től. Az eluens hő és porlasztógáz hatására teljes mértékben elpárolog, így oldószer- és mintagőzök keletkeznek. A forrásban elhelyezett koronakisülési elektródára nagyfeszültséget kapcsolva koronakisülés jön létre, amely ionizálja a forrásban jelen lévő nitrogénmolekulákat. Ennek eredményeként elsődleges $N_2^{+\cdot}$ ionok képződnek. Ezek ion–molekula reakciókban tovább ionizálják az oldószermolekulákat, melyek másodlagos ionokat eredményeznek. A másodlagos ionokat újabb ion–molekula reakciók követik, amelyek során végül a vizsgálni kívánt analitmolekulák gőzfázisú formája ionizálódik. Az APCI legalább ~100 µL/perc áramlási sebességet igényel ahhoz, hogy megfelelő mennyiségű oldószer álljon rendelkezésre az ionizációs folyamatokhoz. Az ESI-hez hasonlóan az APCI is kiválóan alkalmazható atmoszférikus interfészként HPLC–MS rendszerekben. Az APCI elsősorban egyszeresen töltött ionokat hoz létre. Mivel az ionizáció feltétele, hogy a molekulák gőzfázisba jussanak, a módszer felső tömeghatára nagyjából 1000 Da körül van. Polaritás tekintetében a mérsékelten vagy gyengén poláros

vegyületek ionizálhatók a leghatékonyabban. Az APCI különösen jó eredményeket nyújt szteroidok és policiklusos aromás szénhidrogének (PAH-ok) vizsgálatában [22–24].

2.1.2. Analizátorok

A tömegspektrométer analizátorának feladata az ionforrásban keletkező ionok szétválasztása fajlagos tömegük (m/z) alapján. A szétválasztást mágneses és/vagy elektrosztatikus terek biztosítják. Az analizátorokat több paraméterrel jellemezhetjük: felbontóképességgel, pásztázási sebességgel és tömegtartománnyal. A felbontás az egyik legfontosabb jellemző, amely megmutatja, milyen mértékben képes az analizátor két egymáshoz nagyon közeli csúcsot elkülöníteni úgy, hogy az átfedés legfeljebb 10% legyen, illetve hogy az elválasztást követően mennyire keskenyek a csúcsok. A felbontást R-rel (resolution) jelöljük, és az alábbi összefüggéssel adjuk meg:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \tag{1}$$

ahol m az a tömeg, amelynél a felbontást vizsgáljuk, míg Δm a két csúcs tömegkülönbsége (10% völgy definíció szerint), vagy a csúcs félértékszélessége. Egy analizátort nagyfelbontásúnak tekintünk, ha felbontóképessége eléri a 10 000-et. A nagyfelbontású analizátorokkal nagy pontosságú tömegmérés végezhető, ami lehetővé teszi az elemi összetétel meghatározását. Mennyiségi analízis során a magas felbontás továbbá növeli a módszer szelektivitását. Az analizátorok másik fontos jellemzője a pásztázási sebesség, vagyis az az idő, amely alatt egy teljes pásztázási ciklust végrehajtanak. A korai berendezések esetében ez több másodpercet vett igénybe, míg napjainkban másodpercenként akár több száz spektrum is rögzíthető. A tömegtartomány szintén meghatározó paraméter. A kereskedelmi forgalomban kapható analizátorok többségének felső tömeghatára néhány ezer Da egyszeresen töltött ionok esetében, míg a repülési idő mérésén alapuló (TOF) analizátorok akár tíz- vagy százezres tömegtartományt is lefedhetnek. A többszörösen töltött ionoknak köszönhetően még a kisebb tömegtartományú analizátorokkal is vizsgálhatók nagy molekulatömegű biomolekulák; ma már akár millió dalton nagyságrendű fehérjekomplexek mérése is lehetséges [25,26].

Számos analizátortípus ismert. A legrégebbi a mágneses analizátor, amelyet elektrosztatikus analizátorral kombinálva mindmáig alkalmaznak – bár nem elsősorban mennyiségi meghatározásokra. Ennek az analizátornak viszonylag nagy a mérete, szűk a tömegtartománya, és a pásztázási sebessége a legkisebb a mai modern analizátorokhoz képest.

2.1.2.1. Kvadrupól analizátor (Q)

Az analizátorok méretének csökkenésére kiváló példa a kvadrupól analizátor. A kvadrupól felépítése és működése a következőképpen foglalható össze. A rendszer négy párhuzamos rúdból áll, amelyek készülhetnek fémből, illetve fémmel bevont kerámiából. A szemközti rudak azonos potenciálra vannak kapcsolva. A rudakra egyenfeszültséggel kombinált váltófeszültséget vezetnek: az egyik rúdpárra U+VcosΩt, a másikra pedig −U−VcosΩ-t. Ennek eredményeként a rudak között időben periodikusan változó elektromos tér alakul ki. Ez a tér kölcsönhatásba lép a kvadrupólba belépő ionokkal, és azok pályáját oszcillációra készteti. Egy adott egyen- és váltófeszültség-kombináció mellett csak nagyon szűk tömegtartományba eső ionok mozgása válik stabillá. Ezek az ionok átjutnak a rúdrendszeren, míg az instabil pályára kerülő ionok a rudakba csapódnak. A pásztázást az U és V feszültségek arányos, együttes változtatásával valósítják meg. A kvadrupól analizátorok felbontása egységnyi: bár az érték számszerűen nő a tömeggel, a rendszer úgy van hangolva, hogy a csúcsok félértékszélessége a teljes tömegtartományban 0,7 Da körül maradjon. A pásztázási sebességük ma már kifejezetten gyorsnak számít, elérheti akár a 15 000 Da/s értéket is. Pásztázó (scan) módban ugyanakkor az érzékenységük viszonylag korlátozott [27,28].

2.1.2.2. Ioncsapda analizátor

Az ioncsapda analizátor felépítése és működési elve sok tekintetben hasonlít a kvadrupól analizátoréhoz [29]. A legfontosabb különbség azonban abban rejlik, hogy míg a kvadrupól az ionok stabil vagy instabil pályái alapján szeparál, addig az ioncsapda először összegyűjti az ionokat egy térbeli zónában. Az ioncsapda esetében egy gyűrűelektróda és két záróelektróda által határolt térrészbe juttatják be az ionokat. Az elektródákra itt váltófeszültséget kapcsolnak, amely a bekerülő ionok mozgását úgy befolyásolja, hogy a csapda belsejében minden ion számára stabil mozgáspályák alakuljanak ki. A detektálás során a váltófeszültség amplitudójának mértékét növelik egészen addig, ameddig az ion mozgása során kijut a cellából, és bejut a detektorba. Az amplitudó folyamatos változtatásával a csapdából sorban jutnak ki a különböző tömegű ionokat, így valósítva meg a pásztázást. Az ioncsapda mérete a kvadrupólénál is kisebb, így ideális megoldása az asztali készülékeknek. Tömegtartománya hasonló a kvadrupóléhoz, néhány ezer Da nagyságrendű. Működési sebessége kifejezetten nagy, és a kvadrupól analizátorhoz képest jelentős előnyt jelent a lényegesen magasabb érzékenysége pásztázó módban. A cella kis mérete tervezési szempontból előny, azonban egyben komoly korlátozó tényező is lehet: a

csapda könnyen túltölthető ionokkal, ami esetén a túl sok ion kölcsönhatásai torzíthatják az egyedi ionpályákat és ezzel a detektálási eredményeket. Emiatt hosszú ideig csak korlátozottan volt használható mennyiségi meghatározásokra — dinamikus tartománya jelentősen elmaradt a kvadrupól analizátorokétól. Mára azonban a lineáris ioncsapdák elterjedésével ez a hátrány nagyrészt megszűnt, és a kvantitatív alkalmazások jóval reálisabbá váltak.

2.1.2.3. Repülési idő analizátor (TOF)

Az ionok szétválasztásának egyik lehetősége, hogy egy adott, L hosszúságú repülési cső megtételéhez szükséges időt mérjük. Ezen az elven működnek a TOF (time-of-flight) analizátorok. A módszer lényege, hogy a gyorsító feszültséggel azonos kinetikus energiára gyorsított ionok sebessége csak a tömegüktől függ: a könnyebb ionok gyorsabban haladnak, a nehezebbek lassabban, így különböző időben érkeznek a detektorhoz. Az ionforrásban képződő ionokat egy U gyorsító feszültség v sebességre gyorsítja, ekkor az ion kinetikus energiája:

$$E_{kin} = zeU = \frac{1}{2}mv^2 \tag{2}$$

Ebből a sebesség kifejezhető, majd a sebesség–út–idő összefüggésbe (v=L/t) behelyettesítve, az időre rendezve megkapjuk a repülési idő analizátor alapegyenletét:

$$t = \frac{L}{v} = \frac{L}{\sqrt{2eU}}\sqrt{\frac{m}{z}} \tag{3}$$

Mivel az idő rendkívül pontosan mérhető, a TOF analizátorok nagyon nagy felbontással rendelkeznek. A modern műszerek 25 ps időfelbontással dolgoznak, azaz ilyen időközönként érkező ionokat is képesek megkülönböztetni. Ez 40 GHz adatgyűjtési frekvenciának felel meg. A TOF-analizátorok tipikus felbontása meghaladja a 30 000-et, és működésük a leggyorsabbak közé tartozik: másodpercenként akár 100 spektrum rögzítése is lehetséges [30].

2.1.2.4. Extrém nagy felbontású analizátorok: FTICR, Orbitrap

Az analizátorok felbontásának növelése elsősorban a szerkezetkutatás igényei miatt vált kiemelten fontossá. A nagyfelbontás elérésére a speciális ioncsapdák bizonyultak alkalmasnak. Elsőként a Fourier-transzformációs ion ciklotron rezonancia (FTICR) analizátort fejlesztették ki [31]. Ennél a megoldásnál az ioncsapdát egy szupravezető mágnes által létrehozott, rendkívül erős mágneses térbe helyezik, amelyben az ionokat körpályára kényszerítik. A detektálás módja alapvetően különbözik a korábban ismertetett

analizátorokétól: nemdestruktív detektálást alkalmaznak, vagyis az összes csapdázott ion által indukált áramot mérik. Minden ionnak saját, tömegfüggő körfrekvenciája van, és ezek együttesen hozzák létre az eredő időfüggő jelet. A frekvenciakomponenseket Fourier-transzformációval bontják fel, így számítható vissza az egyes ionok m/z értéke. Az FTICR óriási előnye a kivételes, akár milliós nagyságrendű felbontás, ugyanakkor jelentős hátránya a nagyon magas beszerzési és üzemeltetési költség. Fő alkalmazási területe továbbra is a szerkezetkutatás. Az FTICR analizátorok modernebb és jóval költséghatékonyabb alternatívája a Makarov által kifejlesztett orbitrap analizátor [32,33]. Az orbitrap működési elve az FTICR-hez hasonlóan azon alapul, hogy az ionokat csapdázzák, és stabil, tengely körüli mozgásra kényszerítik, miközben az általuk indukált áramot nemdestruktív módon detektálják. A kapott jel Fourier-transzformációjával nyerhetők ki az egyes tömegeknek megfelelő frekvenciák. Bár az orbitrap felbontása elmarad az FTICR extrém magas értékeitől, a több százezres FWHM felbontás így is jelentősen meghaladja a klasszikus nagyfelbontású analizátorok (szektor, TOF) teljesítményét. Ugyanakkor fontos előny, hogy üzemeltetése lényegesen olcsóbb, mivel nem igényel kriogéneket. Emiatt az orbitrap napjaink egyik legelterjedtebb és legpraktikusabb nagyfelbontású analizátortípusa.

2.1.3. Tandem tömegspektrometria

A tandem tömegspektrometriáról (MS/MS) akkor beszélünk, amikor egy rendszeren belül két egymást követő tömeganalizálási lépést valósítunk meg [34]. A folyamat történhet különböző időben (tandem az időben), illetve különböző térben (tandem a térben) [35]. A megvalósítás módjától függetlenül a tandem mérések minden esetben három fő lépésből állnak: kiválasztás, gerjesztés/fragmentálás, majd pásztázás (detektálás). Az ioncsapdás készülékekben mindhárom lépés ugyanazon a helyen, csupán eltérő időpontokban zajlik. Elsőként a csapdázott ionok közül egyetlen tömeget választunk ki: az összes többi ion számára instabillá tesszük a mozgáspályát, így azok elhagyják a csapdát. A bent maradó, azonos m/z értékű ionokat ezt követően rezonanciagerjesztéssel aktiváljuk, ami fragmentálódásukhoz vezet. A kapott fragmensionokat végül tömeg/töltés arányuk alapján detektáljuk. Ez a megközelítés elsősorban szerkezeti információ nyerésére alkalmas. A térben történő tandem mérések esetén a kiválasztás, a fragmentálás és a detektálás a készülék eltérő egységeiben valósul meg. Ilyen felépítés figyelhető meg a QqQ és QTOF rendszerekben. Mindkét esetben a kiindulási lépés az anyaion kiválasztása, amelyet az első

kvadrupól (Q1) végez. A kiválasztott ionok ezt követően az RF-only módban működő második kvadrupólba (q2) jutnak, amely ütközési cellaként funkcionál. Itt ütközőgáz jelenlétében és megfelelő feszültség hatására fragmentálódnak. A keletkező fragmensionokat a hármas kvadrupóloknál a Q3, a QTOF rendszereknél pedig a TOF analizátor detektálja [36].

A hármas kvadrupól rendszerek különös népszerűségüket az egymástól függetlenül működtethető két analizátor összehangolt pásztázásából származó speciális pásztázási üzemmódoknak köszönhetik [37]. Mivel egy kvadrupól vagy kiválasztó-, vagy pásztázó módban működik, két rúdrendszer kombinációjával négy különböző pásztázási mód valósítható meg:

- **Leányion pásztázás (product ion scan):** A Q1 kiválasztja az anyaiont, a Q3 pedig pásztázó módban detektálja az abból képződő fragmensionokat. Ez a szerkezetfelderítés egyik legfontosabb módszere.
- **Anyaion pásztázás (precursor ion scan)**: A Q1 pásztázó módban engedi be az ionokat a q2 cellába, ahol azok fragmentálódnak. A Q3 csak egy adott fragmensiont enged át. Ez különösen hasznos hasonló szerkezetű molekulák (például metabolitok, gyógyszerszennyezők) azonosítására.
- **Semlegesvesztés pásztázás (neutral loss scan)**: Mindkét kvadrupól pásztázó módban működik, de tömegskálájuk egymáshoz képest fix értékkel el van tolva. Az eltolás nagysága éppen a vizsgált semlegesvesztés tömegének felel meg. Ez a mód metabolitok és szennyezők felderítésénél alkalmazható.
- **Reakciócatornák figyelése (MRM, Multiple Reaction Monitoring)**: A Q1 kiválasztja az anyaiont, amely a q2-ben fragmentálódik. A Q3 a vizsgált molekulára jellemző fragmensiont engedi át. Jel kizárólag akkor keletkezik, ha mind az anyaion, mind a fragmension megfelel az előre beállított értékeknek. Ez rendkívül nagy szelektivitást és érzékenységet biztosít, amely a mennyiségi meghatározások alapja.

2.2. Kromatográfia

A többkomponensű rendszerek egyedi vizsgálatára fejlesztették ki a kromatográfiás módszereket. A kromatográfia felfedezése óta jelentős fejlődésen ment keresztül [38]. Az elválasztás során az álló- és mozgófázis közötti megoszlás eredményeként a komponensek elválnak egymástól. A kromatográfiás elválasztásoknak több fajtája ismert. Az egyik

csoportosítás alapja a mozgófázis halmazállapota. Gáz halmazállapotú mozgófázis esetében gázkromatográfiáról (GC-ről) [39], folyadékhalmazállapotú mozgófázis esetén pedig folyadékkromatográfiáról (LC-ről) [40] beszélhetünk. Jelen munkáim során folyadék-kromatográfiás elválasztásokat alkalmaztunk, ezért ebben a részben ezek elvét igyekszem röviden bemutatni.

2.2.1. Folyadékkromatográfiás mozgófázis

Az LC módszerek csoportosításában meghatározó szerepe van az alkalmazott eluensek jellegének. A folyadékkromatográfia korai szakaszában poláros állófázist (például szilika alapú tölteteket) és kevésbé poláros mozgófázist alkalmaztak, amely gyenge eluensként működött. Ez a klasszikus normál fázisú elválasztás (NP-HPLC) [41]. Később elterjedtté váltak az apoláros állófázisok, jellemzően C18-lánccal módosított szilika felületek. Ezeknél a vizes oldat számít gyenge, a szerves oldószer pedig erős eluensnek – ez a fordított fázisú technika (RP-HPLC) [42].

Napjainkban egyre szélesebb körben alkalmazzák a hidrofil kölcsönhatáson alapuló elválasztást (HILIC), amely bizonyos szempontból az NP-HPLC-re emlékeztet, mivel itt is poláros az állófázis [43]. A mozgófázis leggyakrabban acetonitril–víz elegye, de a hatékony elválasztáshoz elengedhetetlen legalább 2–5% víztartalom. Ez biztosítja azt a felületi vízréteget, amelyben a megoszlás lezajlik. A HILIC elsősorban poláros molekulák visszatartására alkalmas.

Az eluens összetétele, az ionerősség és a pH egyaránt befolyásolják a komponensek megoszlását az álló- és mozgófázis között, így az elválasztás minőségét is. LC-MS mérésekben különös figyelmet kell fordítani az eluensmódosítók illékonyságára és tisztaságára. A tömegspektrométerbe kizárólag illékony komponensek juttathatók be, ezért MS detektor esetén kerülendők a klasszikus, nem illékony pufferanyagok, például a foszfátpufferek. Szintén problémát jelenthet a trietilamin használata: bár illékony, erős bázisként pozitív ionizációs módban kifejezett ionelnyomó hatást fejt ki. LC-MS-kompatibilis eluensmódosítóként leggyakrabban gyenge savakat – hangyasavat vagy ecetsavat – alkalmaznak 0,1%-os koncentrációban. Amennyiben az ionerősség vagy a pH szabályozása szükséges, illékony pufferanyagok jöhetnek szóba, mint az ammónium-acetát, ammónium-formiát vagy ammónia.

Poláros vegyületek RP-HPLC elválasztásakor gyakori stratégia az ionpárképzés. Ennek tipikus esete, amikor nagy térkitöltésű aniont tartalmazó szerves savakat (például

trifluórecetsav (TFA), heptafluorobutánsav (HFBA) alkalmaznak. Ezek részben gátolják a savak deprotonálódását, ugyanakkor elősegítik a bázikus csoportok protonálását, majd az így keletkező töltést a nagy méretű ellenion „leárnyékolja”. Ennek eredményeként a molekula kvázi semleges formában jelenik meg, ami már hatékonyan visszatartható a klasszikus fordított fázisú állófázison [44,45].

2.2.2. Folyadékkromatográfiás állófázis

Az elválasztandó vagy visszatartandó komponensek megoszlását döntően az állófázis tulajdonságai határozzák meg. Az állófázis szemcsés vagy polimer jellegű anyag, amelyet a HPLC-oszlop tölteteként alkalmaznak. Az oszlop fizikai paraméterei – így a belső átmérő, az oszlophossz, a szemcsés töltetek szemcseméretе, valamint a részecskék közötti pórusátmérő – alapvetően befolyásolják az elválasztás minőségét. Az állófázis minősége és kémiai jellege biztosítja az elválasztás alapját. A különböző állófázisok elsősorban polaritásukban térnek el, ugyanakkor számos további kölcsönhatás is szerepet játszhat a szeparációban, például aromás, hidrogénkötéses vagy ionos kölcsönhatások.

A modern kromatográfiával szemben egyik kulcsfontosságú elvárás a hatékonyság növelése, amely többféle módon valósítható meg. Az egyik stratégia a szemcseméret csökkentése, amely jelentős mértékben növeli a tányérszámot. A rendkívül kisméretű szemcsék használata azonban nagyon nagy – akár 1000 bar feletti – üzemi nyomást igényel, amelyet az ultranagy nyomású kromatográfia (UHPLC) tesz lehetővé [46,47]. A hatékonyságnövelés másik jelentős megoldása Horváth Csaba nevéhez fűződik, aki felismerte, hogy a hagyományos porózus töltetek esetében a molekulák diffúzió útján jutnak be a pórusok belsejébe, majd ugyancsak diffúzióval kerülnek vissza a mozgófázisba. Mivel a diffúzió lassú folyamat, a két fázis közötti megoszlás kinetikailag gátolt, és ez csúcskiszélesedéshez vezet, amely rontja az elválasztás hatékonyságát [48,49].

A héjszerkezetű (core–shell) tölteteknél ezzel szemben a kölcsönhatások döntően a szemcsék külső felületén mennek végbe, így a lassú diffúziós folyamatok szerepe nagymértékben csökken. Ennek eredményeként gyorsabb és hatékonyabb elválasztás érhető el, élesebb és szimmetrikusabb csúcsokkal, ami egyben az érzékenységet is növeli [50].

Könnyen belátható, hogy az állófázisok és mozgófázisok különböző kombinációi gyakorlatilag korlátlan lehetőséget kínálnak az adott analitikai feladat szempontjából optimális érzékenység és hatékonyság elérésére.

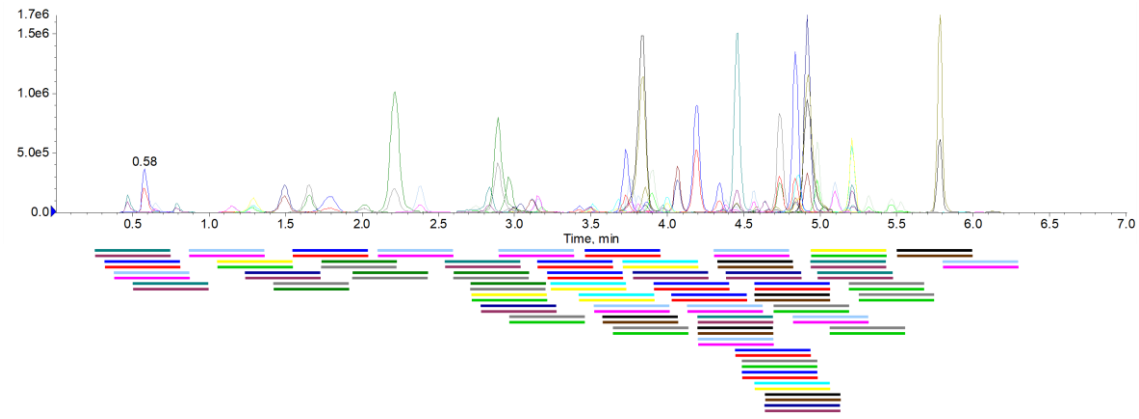
2.3. Mennyiségi meghatározás

Az LC–MS/MS rendszerek ideális megoldást jelentenek mennyiségi meghatározásokhoz, mivel mind a kromatográfiás, mind a tömegspektrometriás oldal kellő szelektivitással és érzékenységgel rendelkezik. E két technika együttes alkalmazása lehetővé teszi, hogy összetett mátrixokból is megbízhatóan, kis koncentrációban jelen lévő komponenseket határozzunk meg.

A szelektivitás tömegspektrometriás oldalról két alapvető megközelítéssel biztosítható. Az egyik a nagyfelbontású pásztázó üzemmód, amikor a teljes tömegtartományt vizsgálva egy szűk, jellemzően 10 mDa széles tömegtartomány alapján kérjük ki a célion extrahált ionkromatogramját. Ennek nagy előnye, hogy a mintában jelen lévő valamennyi komponens mérhető – akár utólag is –, így nincs szükség előzetes MS-módszerfejlesztésre. További jelentős előny, hogy a nagyfelbontású pásztázás is rendkívül érzékeny, és különösen jól alkalmazható többszörös töltésű ionokat adó molekulák esetében, ahol a mennyiségi meghatározás bármelyik töltésállapot alapján elvégezhető.

A szelektivitás másik lehetősége az MS/MS-alapú mennyiségi meghatározás, amely kis- és nagyfelbontású műszereken egyaránt használható. A legelterjedtebb megoldás a hármas kvadrupól (QqQ) által alkalmazott MRM (Multiple Reaction Monitoring) technika. Ebben az esetben a műszert „meg kell tanítani” a célmolekula mérésére, vagyis meg kell határozni a legérzékenyebb mérési körülményeket. Ehhez a megfelelő koncentrációjú standard oldatot fecskendőpumpával, jellemzően 5–10 µL/perc áramlással juttatjuk a rendszerbe. A műszer automatikusan optimálja az anyaion transzmissziójához, a fragmentációhoz és a fragmensionok detektorig történő eljuttatásához szükséges feszültségértékeket. Ezek a paraméterek az ionforrásban és az ionoptika különböző pontjain állítódnak be. Az optimalizálás eredményeként minden molekulára jellemzően legalább két MRM átmenetet tartalmazó módszert kapunk. Egy ajánlás szerint a mennyiségi meghatározáshoz négy azonosítási pont szükséges [51]. Egy anyaion 1 pontot, egy fragmension 1,5 pontot ér; így az előírt négy pont eléréséhez két fragmension kiválasztása szükséges, vagyis komponensenként két MRM csatorna alkalmazása. Egy anyaion–fragmension pár egy MRM csatornát jelent. Az az időintervallum, amíg a műszer egy adott csatornát figyel, a dwell time, míg a csatornaváltások közötti kötelező várakozási idő a pause time. A kettő összege adja az egy csatornára fordított időt. Több komponens együttes meghatározása esetén minden komponensre külön optimálást kell végezni, majd az így kapott paramétereket egy közös

módszerfájlban kell egyesíteni. Az összes MRM csatorna figyelésére fordított idő a ciklusidő, amelyet összhangba kell hozni a kromatográfia teljesítményével. Általános követelmény, hogy egy kromatográfiás csúcs elúciójára legalább tíz mérési pont essen a megfelelő precizitás érdekében. Kevés komponens esetén a csúcsszélesség 1/10-ed része adja a szükséges ciklusidőt; ezt elosztva a mérendő komponensek számának kétszeresével megkapjuk a csatornánként rendelkezésre álló időt (dwell + pause). Könnyen belátható, hogy a komponensszám növekedésével a ciklusidőt egyre többfelé kell elosztani, ami a dwell és pause time jelentős csökkenésével jár. A gyakorlatban a határ nem húzható meg élesen, de például egy 21 s széles csúcs esetén tíz ponttal számolva 2100 ms ciklusidő áll rendelkezésre. Ha a minimális dwell time 5 ms, a minimális pause time pedig 2 ms, akkor egy csatorna 7 ms-ot igényel. Ez alapján a klasszikus HPLC-ben alkalmazható, viszonylag széles csúcsok esetén mintegy 300 MRM csatorna követhető, ami körülbelül 150 komponens vizsgálatának felel meg. Bizonyos alkalmazásokban ez azonban nem elegendő. Például környezetanalitikai vizsgálatok során a peszticidek meghatározásához gyakran szükséges egyetlen injektáláson belül mintegy 500 komponens vizsgálata. Erre fejlesztették ki a sMRM (scheduled MRM) módszert, amelynek lényege, hogy nem kell minden MRM átmenetet folyamatosan figyelni [52]. A komponensek retenciós idejét előzetesen meghatározzák, majd mindegyikhez egy retenciós ablakot rendelnek. A műszer csak ezen ablakokban figyeli az adott átmenetet, így az aktuálisan aktív MRM lista dinamikusan változik minden egyes pásztázási ciklus során. A módszer sematikus működését az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra. A sMRM megvalósítása

2.4. Mátrixok, mátrixhatás

A legtöbb analitikai célmolekula nem tiszta oldószerben, hanem különböző komplexitású mátrixokban van jelen. A megbízható mennyiségi mérésekhez ezért elengedhetetlen a

mátrixok összetételének és mérésre gyakorolt hatásainak ismerete, illetve olyan mintaelőkészítési eljárások kialakítása, amelyek minimálisra csökkentik a zavaró komponensek hatását. A mátrixok tartalmazhatnak ionos, poláros vagy mérsékelten poláros komponenseket, kis és nagy molekulatömegű anyagokat egyaránt. Ezek az anyagok csökkenthetik az érzékenységet, torzíthatják a meghatározást, vagy akár gátolhatják az ionizációt. Ezért minden mennyiségi mérés egyik alapvető feladata a zavaró komponensek hatékony eltávolítása.

2.4.1. A víz, mint mátrix

A víz egyszerre tekinthető könnyen és nehezen mérhető mátrixnak. Zavaró komponensek szempontjából az ivó- és felszíni vizek viszonylag tiszták, míg a szennyvizek már jelentősen komplexebb összetételűek. A mérendő komponensek koncentrációja ugyanakkor gyakran rendkívül alacsony — sok esetben a ng/mL tartomány alatt —, így a vízanalitika követeli meg a legnagyobb érzékenységű műszereket. Amennyiben ez nem áll rendelkezésre, a vizsgálatokhoz komplex és költséges mintaelőkészítésre van szükség. A leggyakrabban alkalmazott eljárások a folyadék–folyadék extrakció [53] és a szilárd fázisú extrakció [54].

2.4.2. Biológiai eredetű mátrixok

A kvantitatív mérések döntő többsége valamilyen biológiai közegben lévő endogén vagy exogén komponens meghatározására irányul. A biológiai eredetű minták közé tartozik többek között a vizelet, a vér (plazma, szérum), a nyál, ízületi folyadék, könny, haj, széklet és a különféle szöveti minták.

2.4.2.1.Vizelet

A vizelet a vese által kiválasztott elektrolitok és anyagcsere-termékek vizes oldata, amely kémiai sokfélesége ellenére egészséges állapotban elsősorban kis molekulatömegű komponenseket tartalmaz. Összetétele számos betegségben megváltozik [55,56], és sok gyógyszer illetve metabolitja is a vizelettel ürül. Emiatt a vizelet ideális célmolekula-forrás. Mintaelőkészítése általában egyszerű: gyakran elegendő a hígítás és a szűrés. A doppingellenőrzésekben jelenleg is ez az elsődleges mátrix [57].

2.4.2.2. Szérum/plazma

A vér rendkívül összetett közeg, mely gázok, tápanyagok, hormonok, anyagcsere-termékek és ásványi anyagok szállítását végzi [58]. Analitikai szempontból ideális lenne, mert szinte minden komponens megtalálható benne, ugyanakkor rendkívül komplex mátrix, ezért közvetlen LC–MS/MS mérésre nem alkalmas. Centrifugálással a sejtes elemek elválaszthatók, így keletkezik a plazma, amely még jelentős mennyiségben tartalmaz fehérjéket — ezekben oldva vannak a célmolekulák is. A vérszérum a véralvadási faktoroktól mentes plazma, és hasonlóan gazdag anyagcsere-termékekben, illetve exogén vegyületekben. Kiemelt fontosságú a terápiás gyógyszerszint-monitorozásban (TDM). A mérés előtt a fehérjék kicsapása szükséges, amelyet leggyakrabban hideg metanollal vagy acetonitrillel végeznek: a háromszoros térfogatú szerves oldószer kicsapja a fehérjéket, a centrifugálást követő felülúszó pedig közvetlenül mérhető.

2.4.2.3. Nyál

A nyál a szájüregben található mirigyek váladéka. Diagnosztikai szempontból nem tartozik az elsődleges mintatípusok közé, de bizonyos hormonok kiválasztódnak a nyálmirigyek által, így kimutathatók nyálból is [59,60]. A mátrix előnye, hogy egyszerűen, non-invazív módon gyűjthető. Bár a hormonok csupán 1–5%-a jelenik meg a nyálban szabad, nem fehérjekötött formában [61], koncentrációjuk jól korrelál a szérumban mért teljes hormonkoncentrációval [62,63]. Lewis és Higashi részletesen bemutatták a nyál klinikai alkalmazásának előnyeit és korlátait [64,65]. A nyálhormon-mérés olcsó és egyszerű alternatívája lehet a plazmaszint-meghatározásnak, ugyanakkor a koncentrációk jellemzően nagyságrendekkel alacsonyabbak. Shibayama és munkatársai LC–MS/MS módszert fejlesztettek 17α-hidroxiprogeszteron meghatározására, melyhez 2-hidrazinopiridin származékképzőt alkalmaztak [66], amely a karbonilcsoporttal reagálva jelentősen javította az ionizálhatóságot.

2.4.2.4. Ízületi folyadék

Az ízületi folyadék az ízületi tokban található viszkózus közeg, amely a porcfelszínek súrlódáscsökkentését biztosítja. A folyadék a vérplazma ultrafiltrátuma, ezért tartalmaz plazmaeredetű fehérjéket, valamint az ízületi szövetek által termelt komponenseket [67]. További jellegzetes összetevői a hialuronsavak, a lubricin és egyéb extracelluláris komponensek. A plazmával fennálló kapcsolat miatt a gyógyszermolekulák is megjelennek benne, ami fontos információkat ad a lokális kezelések hatékonyságáról.

2.4.2.5. Könny

A könny a szaruhártyát és a szemhéjat borító védőréteget alkotja, elektrolitokat, aminosavakat, lipideket és fehérjéket tartalmaz. Bár kis mennyiségben gyűjthető, érzékeny proteomikai és lipidomikai LC–MS/MS módszerekkel a komponensei jól vizsgálhatók [68,69].

2.4.2.6. Haj

A haj a fejünket borító szőrzet, mely 97%-ban a keratin nevű fehérjéből áll. A fejbőrben található hajhagymákból nő, és a növekedési fázisban a haj közvetlen kapcsolatban áll a belső környezettel (vérrel, nyirokfolyadékkal és a sejteken kívüli folyadékokkal). Amikor a haj növekedés közben eléri a fejbőr felszínét, a külső rétegei megszilárdulnak, magukba zárva a kialakulásuk során a környezetükben felhalmozódott anyagokat (ásványi anyagokat, gyógyszermolekulákat, méreganyagokat). Ez teszi különlegessé ezt a mátrixot, hiszen hosszú távon (akár hónapokon keresztül) képes megőrizni a bezárt anyagokat, lehetővé téve azok későbbi vizsgálatát. Igazságügyi-toxikológiai szempontból kiemelkedően fontos mátrix [70–72].

2.4.2.7. Széklet

A széklet az emésztés végterméke, amely a táplálékmaradványok mellett a szervezet által kiválasztott anyagokat és metabolitokat tartalmazza. Bár vizsgálata nehézkes fizikai tulajdonságai miatt, farmakokinetikai vizsgálatokban — különösen ADME tanulmányokban — kiemelkedően fontos, mert hozzájárul a gyógyszerek teljes anyagmérlegének felállításához [73,74].

2.4.2.8. Sejtek, szövetek

A sejtek aktív anyagcserével rendelkeznek, így az endogén és exogén vegyületek folyamatosan áramlanak be és ki. A célzott gyógyszerbevitel hatékonysága például vizsgálható szöveti minták LC–MS/MS analízisével. A méréshez a szövetet foszfátpufferes sóoldatban homogenizálják, majd acetonitrillel feltárják a sejtlipidrétegeket, így a teljes intracelluláris tartalom mérhetővé válik [75,76].

2.4.3. Vezikulák

A vezikulák lipidburokba zárt folyadékterek, amelyek természetes módon is kialakulhatnak a sejtekben, de mesterségesen is előállíthatók. Elsődleges funkciójuk a molekulák szervezett szállítása. A biológiai vezikulák képesek a nehezen transzportálható anyagokat

a sejtből kijuttatni, míg a mesterséges vezikulák (pl. liposzómák) a gyógyszeres terápiában játszanak szerepet: célzott hatóanyag-juttatást biztosítanak, és lehetővé teszik a lassított kioldódást [77,78]. Összetételük és belső tartalmuk meghatározása LC–MS/MS technikával történik, általában acetonitriles feltárást követően.

2.4.4. Gyógyszeripari formulációk

A gyógyszeripari késztermékek analitikai vizsgálata során a hatóanyag (API) meghatározása rendszerint komplex formulációs mátrixban történik. A formuláció célja egyrészt a hatóanyag stabilitásának, biohasznosulásának és adagolhatóságának biztosítása, másrészt a beteg számára elfogadható fizikai és érzékszervi tulajdonságok kialakítása. Ennek érdekében különböző segéd- és adalékanyagokat alkalmaznak, például töltőanyagokat, kötőanyagokat, stabilizátorokat, oldószereket, valamint ízjavító és édesítő komponenseket. Egyes gyakran használt segédanyagok – mint például az aszpartám, szukralóz vagy szorbit – számottevő ionizációs és kromatográfiás interferenciát okozhatnak LC–MS alapú mérések során. A formulációs komponensek jelenléte ezért jelentős mátrixhatást eredményezhet, amely a hatóanyag pontos és megbízható mennyiségi meghatározását csak megfelelő mintaelőkészítési és analitikai stratégiák alkalmazásával teszi lehetővé.

2.4.5. Extrém ipari mátrixok

Az ipari folyamatok analitikai támogatása során gyakran nem biológiai, hanem szélsőséges összetételű és tulajdonságú mátrixokkal kell dolgozni. Ezek a rendszerek sok esetben magas sótartalmúak, erősen savas vagy lúgos kémhatásúak, illetve nagyszámú, kémiailag eltérő komponens egyidejű jelenlétét mutatják. Az ilyen mátrixokban végzett mérések elsődleges kihívása nem csupán a célkomponensek kimutatása, hanem azok szelektív kinyerése és az analitikai rendszer védelme. Különösen extrém példát jelentenek az erősen savas ipari közegek, mint a gyártási folyamatokban alkalmazott és újrahasznosított kénsav, ahol a szerves szennyezők nyomnyi koncentrációban, agresszív mátrixban vannak jelen. Ezzel párhuzamosan a biotechnológiai iparban alkalmazott fermentációs tápoldatok szintén komplex analitikai feladatot jelentenek, mivel nagyszámú szerves és szervetlen komponens, metabolit és tápanyag együttes jelenléte mellett kell megbízható mennyiségi meghatározásokat végezni. Az ilyen ipari mátrixok vizsgálata speciális mintaelőkészítési

és mérési stratégiákat igényel, amelyek túlmutatnak a hagyományos analitikai megközelítéseken.

2.5. Az érzékenység növelése

A kis koncentrációban jelen lévő komponensek mennyiségi meghatározása gyakran kihívást jelent. Még a legérzékenyebb műszerek alkalmazása mellett sem mindig érhető el megfelelő kimutatási határ, így érzékenységnövelő eljárásokra van szükség.

2.5.1. Extrakció

Az extrakció a komponensek dúsításának egyik legelterjedtebb módja, amely a kromatográfiai megoszláson alapul. Két fő típusa a folyadék–folyadék extrakció (LLE) és a szilárd fázisú extrakció (SPE) [53,54].

Az LLE esetében egymással nem vagy csak korlátozottan elegyedő oldószerek között oszlik meg a célkomponens. A szerves fázis bepárlásával és kis térfogatú újrafeloldással jelentős koncentrációnövekedés érhető el [79,80]. Az LLE továbbfejlesztett változata a QuEChERS (**Qu**ick, **E**asy, **Ch**eap, **E**ffective, **R**ugged, and **S**afe), amely elsősorban peszticidek vizsgálatára lett kifejlesztve [81]. Az elve az, hogy megfelelően beállított víztartalmú mintához acetonitrilt adnak, majd sókeverékkel a vizes fázist túltelítik. A túltelítés következtében a vizes- és szerves fázis kettéválik, és a szerves molekulák a nekik kedvezőbb szerves fázisban dúsulnak fel.

Az SPE során a mintát szilárd állófázison vezetjük át, amely a célmolekulákat megköti. Mosást követően erősebb eluenssel eluálhatók. Előnye, hogy nagy térfogat dolgozható fel, így jelentős dúsítás érhető el [82–84]. Hátránya, hogy idő- és költségigényes. Az SPE közvetlen LC–MS/MS rendszerbe integrálható (on-line SPE), amely nagymértékben csökkenti az előkészítési időt [85–87].

2.5.2. Nagy térfogatok injektálása, mintaoldó szerepe

A jelintenzitás arányos az injektált térfogattal, így adódna a nagyobb térfogat alkalmazása. Nagy térfogat injektálásakor azonban széles, torzult csúcsok jelenhetnek meg, illetve ha a mintaoldó erősebb az induló eluensnél, megszűnik a retenció, és a komponensek a fronttal eluálódnak [88,89]. Ez rontja a meghatározás minőségét. Dolan és munkatársai szisztematikusan vizsgálták az oszloptérfogat, a mintaoldó erősségének, illetve az elúciós programoknak az injektálható térfogatra gyakorolt hatását [90]. Az injektálható térfogatot

befolyásolja az oszloptérfogat, a mintaoldó erőssége és az elúciós program is. A héjszerkezetű töltetek jobb hatékonyságot nyújtanak, de érzékenyebbek a túltöltésre [91]. A nagy térfogat csak akkor alkalmazható, ha a mintaoldó gyengébb, mint a kezdeti eluensösszetétel [92,93]. Alternatív megoldásként programozott injektálások vagy víz előinjektálása alkalmazható a komponensek fókuszálására [94,95].

2.5.3. Származékképzés

A származékképzés klasszikusan a GC–MS analitikában jelent meg, a poláros, nem illékony vegyületek illékonyságának növelése céljából. A modern LC–MS/MS analitikában azonban éppen az ellenkezője fontos: a kis polaritású, rosszul ionizálódó, gyakran nagyon kis koncentrációjú vegyületek ionizálhatóságának javítása. A legjobb példa erre a szteroidok mérése. Az elmúlt évtizedben számos publikáció foglalkozott a szteroidok származékképzési reakcióival. Higashi és munkatársai meghatározták az ideális származékképző reagens tulajdonságait [96]: tartalmazzon töltéslokalizáló csoportot, kis molekulatömegű legyen, mérsékelten hidrofób karakterrel rendelkezzen, a keletkező származék jól fragmentálódjon CID körülmények között, a reakció legyen kvantitatív. Származékképzésre minden olyan reagens alkalmazható, amely a szteroidok oxo- vagy hidroxicsoportjával reakcióba lép [97–99]. Tipikus példák: pentafluorobenzil [100], piridil-3-szulfonil [101], danzil [102–104], 2-pikolinoil [105], N-metil-nikotinoil [106], valamint több különféle piperazinoid vagy piridinium jellegű csoport [107–109]. Bár a származékképzés munkafolyamata időigényes, a kimutatási határ jelentős javulása miatt kiemelt jelentőségű, különösen a klinikai-diagnosztikai szteroidanalitikában.

2.5.4. Mikrotechnikák

A mikrotechnikák egyre nagyobb szerepet kapnak az LC–MS/MS vizsgálatokban. Ez a tendencia jól megfigyelhető proteomikai, gyógyszeranalitikai, környezetanalitikai és klinikai alkalmazásokban is [110–116]. A mikrotechnikák alkalmazásakor kisebb kolonnaátmérők és ennek megfelelően alacsonyabb áramlási sebességek használhatók. A kisebb átmérő nagyobb mintakoncentrációt eredményez a kromatográfiás csúcsokban, az alacsony térfogatáram pedig kedvezően hat az ionizáció hatásfokára [117–119]. A kromatográfiás dimenziók csökkentése ugyanakkor a tömegspektrometriás oldalon is léptékcsökkentést igényel, amely így mikro-, kapilláris- és nanotechnikák irányába fejlődött. Mikrotechnika esetén a kolonnaátmérő 0,8–1 mm, az áramlási sebesség 20–100

µL/perc. Kapilláris rendszerekben 180–500 µm-es oszlopátmérőt és 2–10 µL/perc áramlást, míg nanotechnikáknál 50–100 µm-es átmérőt és 80–300 nL/perc térfogatáramot alkalmaznak.

A mikrotechnikai megoldások külön-külön is jelentős érzékenységnövelést biztosítanak, azonban kombinálva még hatékonyabbak. A leggyakrabban használt kombináció az on-line SPE dúsítás nagy térfogatú injektálással összekapcsolva mikro-LC rendszerrel. Ezzel a módszerrel alacsony koncentrációban jelen lévő szteroidok is eredményesen meghatározhatók felszíni vizekben és szérummintákban.

2.6. Módszervalidálás

Az analitikai módszerek alkalmasságát meghatározott feladatok elvégzésére kísérletekkel kell igazolni, a hatóságok által előírt irányelvek szerint. Több validálási protokoll létezik; a választott protokollt jellemzően az alkalmazási terület határozza meg. Gyógyszeripari és klinikai vizsgálatok esetén általában az FDA illetve az EMA útmutatásai az irányadóak [120–122]. A validálás során az alábbi teljesítményjellemzőket kell vizsgálni.

2.6.1. Szelektivitás/specificitás

A módszer szelektivitása megmutatja, hogy a mérendő komponens(ek) a mátrixban jelen lévő zavaró vegyületek ellenére is meghatározhatók-e. Ha a módszer csupán egy vegyületre vagy egy szűk vegyületcsoportra érvényes, specifikusnak tekintjük.

2.6.2. Kalibrációs modell

A kalibrációs modell során ismert koncentrációjú kalibrációs oldatok jelintenzitását vizsgáljuk a koncentráció függvényében. A koncentráció–jel összefüggést grafikus úton értékeljük. Az ideális kapcsolat lineáris, de szükség esetén más (leggyakrabban kvadratikus) modellek is elfogadhatók.

2.6.3. Határértékek (LOD,LOQ, ULOQ)

A kimutatási határ (LOD) a legkisebb mennyiség, amely még egyértelműen elkülönül a zajtól — jellemzően legalább 3:1 jel/zaj viszony mellett. A mennyiségi meghatározási határ (LOQ) a legalább 10:1 jel/zaj viszonyhoz tartozó koncentráció. A validálás során meg kell határozni a felső kalibrációs határt (ULOQ) is; e felett a mért eredmények nem fogadhatók el, és a mintákat hígítani kell.

2.6.4. Pontosság/precizitás

A pontosság azt mutatja, mennyire közel esnek a mért értékek a valódi értékhez, míg a precizitás (megbízhatóság) a mérési szórást jellemzi. Mindkét paramétert három koncentrációszinten kell meghatározni. A pontosságot relatív hibával (RE), a precizitást variációs koefficienssel (CV) adjuk meg.

2.6.5. Mátrixhatás, visszanyerés

A mátrixhatás vizsgálatának célja annak felmérése, hogy a mintamátrix milyen mértékben befolyásolja a mérendő komponens ionizációját és így a jelintenzitást. A vizsgálat során három különböző koncentrációszinten készült addícionált víz- és mátrixminták jelintenzitását hasonlítjuk össze. Ha az eltérés meghaladja a 15%-ot, akkor a módszer érdemi mátrixhatást mutat.

A mátrixhatás jelentősen befolyásolhatja a megfelelő kalibrációs stratégia kiválasztását is. A legegyszerűbb módszert az oldatkalibráció jelenti, amikor a kalibrációs oldatok tiszta oldószerben készülnek (az oldószer összetételének a gradiens kezdeti körülményeihez kell illeszkednie). Ez a megközelítés jó eredményt ad például felszíni és ivóvizek, illetve egyéb tisztább mátrixok esetén. Magasabb koncentrációtartományban a minták hígítása tovább csökkenti a mátrixkomponensek hatását, így az oldatkalibráció pontosabbá válik.

Komplex mátrixok (plazma, szérum, szennyvíz, élelmiszer) esetén azonban a tiszta oldószeres kalibráció gyakran nem tükrözi a valódi jelviszonyokat. Ilyenkor alkalmazandó a blank mátrix alapú kalibráció, amelyben a kalibrációs pontokat a mérendő komponens nélküli, de a vizsgált mintához nagyon hasonló összetételű mátrixban készítjük. Ez jelentősen javítja a pontosságot, ugyanakkor megfelelő üres mátrix beszerzése nem mindig lehetséges. Exogén komponensek mérésénél (pl. gyógyszermaradványok plazmában) a blank mátrix könnyen hozzáférhető, endogén anyagok (pl. szteroidok, metabolitok) esetén viszont gyakorlatilag nem.

Endogén analitok mérésére részben megoldást jelenthet a komponensek mátrixból történő eltávolítása, illetve a valódi mintához hasonló összetételű szintetikus modellmátrix alkalmazása. Bár ez nem tökéletesen egyezik meg a valós mátrixszal, lényegesen közelebb áll hozzá, mint a tiszta oldószer.

A legpontosabb eredményt az addíciós kalibráció adja. Ennél a megközelítésnél a vizsgálandó mintához több koncentrációszinten ismert mennyiségű mérendő komponenst

adunk, majd a kapott jelintenzitásokból határozzuk meg az eredeti minta koncentrációját. Bár ez a módszer nagy pontosságot nyújt, jelentős idő- és munkaráfordítást igényel: egyetlen koncentráció meghatározásához legalább 4–5 mérést kell elvégezni, ezért nagy mintaszám esetén nem alkalmazható rutinszerűen.

2.6.6. Stabilitás

A vizsgált komponensek stabilitását különböző körülmények között, három koncentrációszinten kell értékelni. A vizsgálat magában foglalja:

- Rövid távú stabilitás: a minták szobahőmérsékleten történő tárolása legalább 12 órán át.
- Hosszú távú stabilitás: a minták fagyasztva történő tárolása, majd háromszori fagyasztás–olvasztás ciklust követően 14 napig tartó megőrzés.
- Injektálási stabilitás: az előkészített minták mintatartóban, az analizátor mintavételi körülményei között legalább 24 órán át történő tárolása, majd a koncentrációk visszamérése.

A stabilitási vizsgálatok célja annak igazolása, hogy a minták előkészítése és tárolása során nem történik érdemi lebomlás vagy koncentrációváltozás.

2.7. Ipari folyamatok ellenőrzése, minőségbiztosítás

2.7.1. Covid19

A COVID–19 betegséget a SARS-CoV-2 vírus okozza, amely 2019 decemberében jelent meg, majd 2020 márciusára világjárványt idézett elő. A vírus súlyos légúti megbetegedést okozott, amely számos esetben halálos kimenetelű volt. A járvány kezdetén még nem állt rendelkezésre engedélyezett vakcina, így a megelőzés elsődleges eszközét az izoláció jelentette, azonban ennek ellenére a fertőzés gyorsan terjedt.

Az orvosi beavatkozások ekkor elsősorban a tünetek enyhítésére irányultak. Számos ismert antivirális terápiát próbáltak ki, mivel új hatóanyag kifejlesztésére nem volt elegendő idő. E szerek gyors és nagy mennyiségű előállítása, valamint biztonságos gyógyszerformába történő beépítése kulcskérdés volt.

Az egyik ilyen vegyület a favipiravir, amely széles spektrumú vírusellenes szer, és in vitro, valamint állatkísérletes modellekben egyaránt gátolja a SARS-CoV-2 szaporodását. Tudományos közlemények alapján a korai favipiravir-kezelés csökkentette a vírusterhelést, ezáltal gyorsította a gyógyulást. 2020-ban a magyar kormány konzorciumot

hozott létre a favipiravir hazai gyártástechnológiájának kifejlesztésére. A Természettudományi Kutatóközpont feladata volt a szintézislépések optimalizálása és a laboratóriumi szintű előállítás. A folyamatot jelentősen nehezítette, hogy a világméretű kereslet miatt a kiindulási anyagok hiánycikké váltak, a szállítás pedig akadozott. A TTK végezte a szintézisek analitikai támogatását is, beleértve a reakciókövetést, szennyezésprofil-vizsgálatot, valamint a technológiai és formulázási analitikai módszerek kidolgozását. A validált módszerek ezután átadásra kerültek a konzorciumi partnereknek és az OGYÉI-nek.

A másik fontos antivirális szer a remdesivir, amely rendkívül hatékony, azonban a vízben gyakorlatilag oldhatatlan, így önmagában nem alkalmas injektábilis formuláció készítésére. A Cyclolab munkatársai egy módosított ciklodextrint (szulfobutil-éter-β-ciklodextrin) hoztak létre, amely képes a hatóanyag vízoldhatóságát jelentősen javítani. A formulált hatóanyagot még a Nemzetközi Űrállomáson is vizsgálták, hogy mikrogravitációs környezetben tanulmányozzák a remdesivir–ciklodextrin kölcsönhatást. A cél az volt, hogy csökkentsék a ciklodextrin szükséges mennyiségét a készítményben, mivel a nagy cyklodextrin-terhelés kockázatot jelenthet vesebeteg pácienseknél.

2.7.2. Nitrózaminok

A nitrózaminok mutagén hatású vegyületek. Gyógyszerbiztonsági szempontból 2018-ban kerültek a figyelem középpontjába, amikor a valsartan készítményekben N-nitrozo-dimetilamint (NDMA) mutattak ki [123]. A szennyeződés a hatóanyag szintézise során keletkezett: a tetrazolgyűrű képzéséhez alkalmazott nátrium-azid feleslegét nátrium-nitrittel bontották el, amely azonban reakcióba lépett a dimetil-formamidban jelen lévő dimetil- és dietil-aminnal, így NDMA és NDEA keletkezett.

Ezt követően széleskörű vizsgálatok indultak a gyógyszergyártás során potenciálisan képződő nitrózaminok feltérképezésére. Kezdetben a fő kockázatot az oldószerekben vagy azokkal együtt jelen lévő kis molekulákból képződő nitrózaminok N-nitrozo-dimetilamin, -dietilamin, -dibutilamin, -diizopropilamin (NDMA, NDEA, NDBA, NDIPA) jelentették. Később bebizonyosodott, hogy nitrozálásra képes oldószer hiányában is képződhetnek nitrózaminok, ha a hatóanyag molekulája szekunder amin funkciót tartalmaz. Ennek megfelelően a vizsgálatok kiterjedtek a hatóanyag-jellegű nitrózaminok kimutatására is.

A hatóságok időközben meghatározták a nitrózaminok napi maximális beviteli határértékeit, veszélyességi kategóriák szerint. A legszigorúbb kategóriában a megengedett napi bevitel mindössze 18 ng, ami rendkívül alacsony koncentráció — különösen nagy töltettömegű gyógyszerformák esetében, ahol nagy tömegű mintából kell kimutatni ezt a mennyiséget [124,125].

Példaként említhető egy fenilefrin-tartalmú megfázás elleni italpor, amelynek nitrózamin-származéka (NNPE) a kezdeti 18 ng/nap kategóriából a 100 ng/nap határértékű csoportba került. A legnagyobb kiszerelés 22,5 g/tasak, napi dózisa három tasak, így 67,5 g gyógyszerkészítményben kell kimutatni a 100 ng NNPE-t — ami komoly analitikai kihívást jelent.

A nitrózaminok kimutatásában a tömegspektrometria kulcsszerepet játszik. A kisebb molekulatömegű nitrózaminokat kezdetben GC–MS módszerekkel elemezték, mára azonban az LC–MS/MS vált az elsődleges technikává még ezek esetében is. A gyártók saját validált módszereket dolgoztak ki a kis molekulatömegű nitrózaminokra, míg a hatóanyag-jellegű nitrózaminok minden esetben egyedi módszerfejlesztést igényelnek. A módszerfejlesztés során az ionizáció (ESI, APCI), a polaritás kiválasztása és különösen a kromatográfiás elválasztás optimalizálása meghatározó jelentőségű.

2.7.3. Fermentációs úton történő bioszimiláris gyógyszergyártás

A gyógyszergyártás célmolekulái sokáig főként kismolekulájú vegyületek voltak. Napjainkra azonban ez a szemlélet jelentősen megváltozott: egyre nagyobb teret nyernek a nagy móltömegű biomolekulák, elsősorban a fehérjealapú gyógyszerek. E fejlődésben kulcsszerepe van a rekombináns technológiának [126,127]. A rekombináns fehérjéket biotechnológiai úton állítják elő, a folyamat pedig a kívánt DNS-szakasz és a megfelelő vektor összekapcsolásával, majd a rekombináns DNS gazdasejtbe juttatásával kezdődik. A vektor olyan biológiai hordozó, amely lehetővé teszi egy kiválasztott gén bejuttatását a célsejtbe.

A rekombináns DNS bejuttatására többféle géntranszfer-technika is ismert, amelyek megválasztását elsősorban a gazdaszervezet típusa határozza meg. Egyszerűbb rekombináns fehérjék előállításához gyakran prokarióta sejteket alkalmaznak; így például az inzulin termelése hagyományosan E. coli rendszerekben történik. A bonyolultabb szerkezetű, poszttranszlációs módosításokat igénylő fehérjék előállítása azonban már

eukarióta sejteket kíván. E célból leggyakrabban emlős sejtvonalakat alkalmaznak, például a terápiában széles körben használt monoklonális ellenanyagok előállításához [127,128]. Ma már a terápiás rekombináns fehérjék 60–70%-át emlős sejtek termelik. Az iparban legelterjedtebb sejtvonal a kínai hörcsög petefészek-eredetű (Chinese Hamster Ovary CHO), de gyakran használják az egér mielóma (Non-secreting null, NS0) és a humán embrionális vesesejt-eredetű (Human Embyonic kidney, HEK-293) sejtvonalakat is [129,130].

Az elmúlt évtizedekben a rekombináns fehérjék hozama több mint százszorosára nőtt, ami nagyrészt a sejtkultúrák tápfolyadékainak (médiumainak) jelentős fejlődésének köszönhető. A médiumok biztosítják a sejtek növekedéséhez és a fehérjetermeléshez szükséges tápanyagokat. A tápanyagbevitel módja szerint a tenyésztési technikák több típusra oszthatók. A szakaszos tenyésztés (batch) során minden tápanyagot a folyamat elején juttatnak a médiumba. A rátáplálásos-szakaszos (fed-batch) tenyésztés hasonló módon indul, de a tápanyagokat a folyamat során többször pótolják. Ezt a stratégiát alkalmazzák leggyakrabban a monoklonális ellenanyagok ipari léptékű előállításakor [131].

A sejtek növekedésének és a fehérjetermelés optimalizálásában kiemelten fontos az intracelluláris metabolitok és a médium komponenseinek folyamatos nyomon követése. Erre a célra az egyik leghatékonyabb technika a nagy érzékenységű és szelektivitású folyadékkromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria. Számos LC-MS/MS-alapú módszer ismert a főbb komponensek – például aminosavak és vitaminok – mennyiségi meghatározására [132,133]. Az aminosavak analízise ugyanakkor nem egyszerű feladat: bár kémiai szerkezetük hasonló, polaritásuk és izoelektromos pontjuk jelentős különbségeket mutat, ami a klasszikus kromatográfiás elválasztást megnehezíti. Származékképzés, ionpárképzés vagy HILIC alkalmazása azonban hatékony megoldást kínál, utóbbi különösen alkalmas poláris vegyületek – így aminosavak – elválasztására [134,135].

Az NMR spektroszkópia szintén alkalmas összetett biológiai minták kvantitatív, mintaelőkészítés nélküli vizsgálatára [136,137]. Nagy előnye kiváló reprodukálhatósága, ugyanakkor nagyobb mintammennyiséget igényel, és érzékenysége elmarad a tömegspektrometriáétól. A technikai fejlesztéseknek köszönhetően azonban ma már μM tartományú kimutatási határ is elérhető. Komplex minták esetén az 1H NMR spektrumokban gyakori a jelátfedés, ezért sokszor szükség van multidimenziós spektrumok alkalmazására.

2.8. Klinikai tömegspektrometria

A tömegspektrometria számos területen alkalmazható, de kiemelt jelentősége van a klinikai diagnosztikában. A módszerrel az élő szervezetben előforduló kis- és nagymolekulák egyaránt nagy érzékenységgel és pontossággal mérhetők. A klinikai mérések elsődleges célja a mennyiségi meghatározás, hiszen egy adott molekula – legyen az endogén marker, gyógyszerhatóanyag vagy metabolit – koncentrációja diagnosztikai szempontból döntő fontosságú. A szervezet komponenseinek koncentrációja általában szűk fiziológiás tartományban mozog, ezért az ettől való eltérés kóros állapotot jelezhet.

A gyakorlatban e molekulák mérésére leggyakrabban immunteszteket alkalmaznak [138]. Ezek gyorsak és költséghatékonyak, hátrányuk azonban a korlátozott specifitás: gyakori a keresztreakció, a metabolitokkal vagy hasonló szerkezetű vegyületekkel való összemérés, ami a valós koncentrációnál magasabb eredményt adhat [139]. Emellett minden célmolekulára külön reagenst kell fejleszteni, ami idő- és költségigényes. A tömegspektrometria ezzel szemben kiváló alternatívát kínál [140–142]. Érzékenysége vetekszik az immuntesztekével, ugyanakkor lényegesen nagyobb szelektivitása révén képes megkülönböztetni a célmolekulát, annak metabolitjait és a hasonló szerkezetű komponenseket. Egyetlen műszerrel számos célmolekula mérhető, és a módszerfejlesztés is gyorsabb és kevésbé költséges. Ennek köszönhetően a tömegspektrometria klinikai alkalmazása rohamosan bővül, és egyre több laboratórium rendelkezik saját LC-MS rendszerrel.

2.8.1. Szteroid hormonok mennyiségi meghatározása

A szteroid hormonok a szteránvázas lipidek közé tartoznak [143]. Bioszintézisük a szervezetben koleszterinből indul ki, és olyan endokrin mirigyekben zajlik, mint a mellékvesekéreg vagy az ivarmirigyek [144]. Hatásukat a célsejtekbe jutva, a specifikus intracelluláris receptorokhoz kötődve fejtik ki. A keringésben többnyire hordozófehérjékhez kötődnek: egyes fehérjék (pl. albumin) alacsony affinitással, míg mások – például a nemihormon-kötő globulin (SHBG) – nagy affinitással kötik őket. A kötődés mértéke jelentősen befolyásolja a szteroidok eliminációját és biológiai hozzáférhetőségét. Míg a szabad és gyengén kötődő frakció könnyen hozzáférhető, addig a szorosan kötött hormonok elérhetősége korlátozott. Korábban úgy vélték, hogy a fehérjéhez kötött frakció inaktív, de ma már ismert, hogy az SHBG-hez kötött ösztrogének és androgének is fontos élettani szerepet játszanak [145].

A szteroid hormonok koncentrációjának pontos meghatározása alapvető olyan kórképek diagnosztikájában, mint a veleszületett mellékvese-megnagyobbodás, policisztás ovárium szindróma, mellékvese-elégtelenség vagy a Cushing-szindróma [146–148]. A hormonok már igen alacsony koncentrációban is hatékonyak, így mennyiségük meghatározása nagy érzékenységet igényel. A klinikai gyakorlatban a legelterjedtebb módszerek az immuntesztek, melyek olcsók és nagy áteresztőképességűek, azonban gyakran nem eléggé specifikusak, és keresztreakcióra hajlamosak [149]. Az elmúlt években ezért egyre nagyobb szerepet kapnak az LC-MS/MS-alapú módszerek, amelyek nagy érzékenységük és specifitásuk révén különösen hasznosak az endokrinológiai diagnosztikában [147,150]. Számos vizsgálat foglalkozik a szteroidok különböző biológiai mátrixokból – plazmából, nyálból, vizeletből vagy hajból – történő meghatározásával [148,151–155]. A tandem tömegspektrometriához kapcsolt HPLC rendszerek az alacsony koncentrációk kimutatásában kiemelkedően hatékonyak, ezért mára a szteroidanalitika legfontosabb eszközévé váltak [156]. Noha az LC-MS/MS érzékenysége kiváló, a szteroid hormonok mérése mégsem mindig rutinfeladat. Ennek több oka is van. A legtöbb szteroid hidrofób, ami megnehezíti a HPLC-s elválasztást, és polaritásuk is alacsony, ami gyenge ionizálhatóságot eredményez. Sok esetben a standard elektroporlasztás (ESI) nem biztosít elég jó ionizációs hatásfokot, így az APCI vagy fotoionizációs módok alkalmazása szükséges. Az érzékenység fokozása kiemelt kutatási terület; több megközelítés létezik, például származékképzés, mikroLC-re történő átállás, on-line SPE alkalmazása vagy nagyobb injektált térfogatok használata. A legjobb érzékenység gyakran e technikák kombinációjával érhető el.

2.8.2. Terápiában használatos gyógyszerszintek mérése (TDM)

A szervezetünkbe külső úton bejutó anyagok legnagyobb része valamilyen gyógyszeres terápiás kezelés következtében kerül a véráramba. A gyógyszeres terápia a betegség diagnosztizálásával kezdődik, ezt követően történik meg a megfelelő gyógyszer kiválasztása és a dózis meghatározása. A dózis megállapításakor az orvos figyelembe veszi az alkalmazott hatóanyagot, a páciens korát, testsúlyát, valamint egyéb, a farmakokinetikát befolyásoló tényezőket. A terápiás gyógyszerszintek beállítása azonban összetett feladat, mivel a plazmaszintet nemcsak a bevitt dózis, hanem több, egyénenként eltérő élettani folyamat együttes hatása határozza meg. A cél az, hogy az adott gyógyszer mennyisége a szervezetben elérje és fenntartsa a kívánt terápiás szintet. Mivel a legtöbb hatóanyag

terápiás tartománya viszonylag szűk, a kezelés optimális beállításához gyakran szükség van a tényleges gyógyszerszint mérésére. Ahogy azt az előző részben már említettem, a klinikai gyakorlatban több módszer áll rendelkezésre a gyógyszerszintek meghatározására. Ezek többsége immunteszten alapul, azonban ezen eljárások hátránya, hogy viszonylag alacsony szelektivitásuk miatt keresztreagálhatnak metabolitokkal, ami pontatlan eredményekhez vezethet. A tömegspektrometria ezzel szemben rendkívül pontos és megbízható módszer a gyógyszermolekulák vérbeli koncentrációjának meghatározására [156,157]. Nagy érzékenysége révén alacsony dózisban alkalmazott hatóanyagok esetén is pontos mennyiségi meghatározást tesz lehetővé, továbbá kiváló szelektivitása folytán képes megkülönböztetni az anyavegyületet annak metabolitjaitól. Mindezek miatt a tömegspektrometrián alapuló TDM napjainkban az egyik legmegbízhatóbb analitikai módszer a terápiás gyógyszerszintek monitorozására. A terápiás gyógyszerszint-monitorozás így nemcsak analitikai feladat, hanem a gyógyszeres kezelés biztonságának és hatékonyságának egyre nélkülözhetetlenebb eleme.

2.8.3. Epigenetika, DNS metilációs szintjének meghatározása

A DNS-t az élő szervezetek elsődleges örökítőanyagaként tartjuk számon. A benne található nukleotidsorrend tartalmazza azokat az alapvető genetikai információkat, amelyek generációról generációra átörökítődnek. Ismeretes azonban, hogy a genom szerkezetében olyan kémiai módosulások is létrejöhetnek, amelyek nem változtatják meg a nukleotidsorrendet, mégis örökíthető hatással vannak a gének működésére és az utódok fenotípusára. Ezt a DNS-szekvencián túlmutató, szabályozó folyamatok összességét epigenetikának nevezzük [158]. A mai tudásunk szerint az epigenetikai szabályozás legfontosabb mechanizmusai a kromatin szerkezetét befolyásoló hisztonmódosulások és a DNS-metilációs mintázatok, melyek alapvetően meghatározzák a gének transzkripciós aktivitását.

Az epigenetikai jelenségeket számos élettani és kóros állapottal hozták összefüggésbe. Kutatások igazolták, hogy bizonyos betegségek megjelenésével párhuzamosan megváltozik a genomiális metiláció mintázata [159]. Egyelőre nem minden esetben tisztázott, hogy az epigenetikai változás a betegség oka vagy következménye, azonban kétségtelen, hogy az epigenetikai vizsgálatok a modern biomedicinális kutatások központi területét képezik.

A DNS-metiláció során metilcsoport kerül a citozin bázis 5. szénatomjára, amely gerincesekben és növényekben elsősorban a CpG dinukleotidokban fordul elő [160]. A metilcsoport donorja az S-adenozil-metionin (SAM-CH_3), amelyből a DNS-metiltranszferáz (DNMT) enzimek közreműködésével 5-metilcitozin (5mC) és S-adenozil-homocisztein (SAH) keletkezik [161]. A genomiális metiláció mértéke az egyedfejlődés során jelentősen változik: a korai embriogenezisben csökken, majd ezt követően a genom nagymértékben újrametilálódik. A szomatikus sejtek metilációs mintázata ezzel szemben viszonylag stabil marad [160]. A metilációs állapotra azonban az életmód, a táplálkozás és egyéb környezeti tényezők is hatással lehetnek. A CpG helyek hipo- vagy hipermetilációja potenciális biomarkerként szolgálhat a betegségek diagnosztizálásában, állapotfelmérésében és prognosztizálásában [162,163].

A DNS-hidroximetilációja során az 5-metilcitozin a TET (ten-eleven translocation) fehérjecsalád tagjai által oxidálódik, és 5-hidroximetilcitozin (5hmC) keletkezik [164–166]. A TET fehérjék Fe^{2+}- és α-ketoglutarát-függő oxidázok, amelyek az aktív demetilációs folyamatok első lépéseit irányítják. A 5hmC további oxidációjával 5-formilcitozin (5fC), majd 5-karboxilcitozin (5caC) is képződhet, amelyek a báziskivágó javító mechanizmusokon keresztül visszaalakulhatnak nem metilált citozinná. Az 5hmC eloszlása a különböző sejttípusokban jelentős eltérést mutat: legnagyobb mennyiségben az agyban található, míg más szövetekben koncentrációja 10–100-szor alacsonyabb [167]. Az 5hmC fontos szereplője a génexpresszió szabályozásának, többek között a sejtdifferenciáció, fejlődés és öregedés folyamataiban is részt vesz [168].

A DNS-metiláció és -hidroximetiláció vizsgálatára számos analitikai módszer áll rendelkezésre [169–172]. A kromatográfiás-tömegspektrometriás eljárások esetében a DNS láncának lebontása szükséges a módosított nukleobázisok vagy nukleozidok méréséhez. A hasítás történhet enzimatikus úton, amely regionális információkat szolgáltat a metiláció eloszlásáról, vagy kémiai úton, amely teljes hidrolízist eredményez, és globális metilációs mintázat meghatározására alkalmas. Az enzimatikus hidrolízis termékei a nukleotidok és nukleozidok [161,163]. A kémiai hidrolízis egyik elterjedt módszere tömény hangyasav hozzáadásán és hőkezelésen alapul, amelynek hatására a DNS lánc szabad bázisokra hasad. A keletkezett nukleinsav-bázisok mennyiségi meghatározására savas hidrolízis esetén leggyakrabban folyadékkromatográffal kapcsolt tandem tömegspektrometriát (LC-MS/MS) alkalmaznak [120,173].

2.8.4. Transzplantáció

Számos esetben csak úgy menthető meg egy beteg élete, ha a működésképtelenné vált szervét egy egészséges donor szervére cseréljük, mivel az érintett szerv többé nem képes ellátni létfontosságú feladatait. Ezt a műtéti beavatkozást nevezzük szervátültetésnek, vagy transzplantációnak. A transzplantáció fejlődésének első mérföldkövét Carrel tette le 1901-ben az érvarat-technika leírásával [174]. Emberbe először Jaboulay ültetett át sertés és kosvesét veseelégtelenségben szenvedő betegekbe, ami azonban csak néhány óráig működött. Az áttörést 1954-ben Murray és munkatársai által egypetéjű ikrek között elvégzett veseátültetése jelentette. A sikeres transzplantációhoz hosszú út vezetett. A beültetett szervet ugyanis a szervezet testidegen anyagként kezeli, és az immunrendszer megkezdi a „betolakodó" eltávolítását. Ennek eredményeként a szerv kilökődése figyelhető meg. Ahhoz, hogy a beültetett szerv huzamosabb ideig bent maradjon, a recipiens (fogadó) egyén immunrendszerét le kell gyengíteni. Azokat a kémiai anyagokat, melyek egy adott élőlény immunrendszerét tompítani, csökkenteni képesek, immunszuppresszánsoknak nevezzük.

1959-ben Schwartz és Damashek mutatták ki, hogy egy citotoxikus daganatellenes szer, a 6-merkaptopurin, immungátló hatással is rendelkezik [175]. Azóta az immunszuppresszió több hatóanyagcsoporttal is elérhető, melyeket elsődleges hatásmechanizmusuk szerint különböztetünk meg.

- Kortikoszteroidok: Szervtranszplantációkban és autoimmun betegségek kezelésében széles körben alkalmazzák őket. Immunrendszer-gátló, a citoszolikus glükokortikoid receptorhoz kötődve, génexpressziós változásokat indukálva fejtik ki hatásukat [176].
- Antimetabolit típusú szerek: Az azatioprin és a mikofenolsav-mofetil prodrugok, amelyek a szervezetben alakulnak át aktív formává, és a de novo purinszintézis gátlásán keresztül csökkentik a limfociták proliferációját [176].
- Kalcineurin-inhibitorok: A kalcineurin foszfatáz kulcsszerepet játszik a T-sejtek aktivációjához szükséges citokintermelés szabályozásában. Gátlásuk következtében nem indul el a teljes immunválasz [177]. E csoportba tartozik a ciklosporin A (CSA) és a tacrolimus (FK506), míg a rapamycin (sirolimus) és everolimus az mTOR jelátviteli útvonal gátlásán keresztül fejtik ki immunszuppresszív hatásukat.

Mint minden gyógyszernek, az immunszuppresszív szereknek is vannak mellékhatásaik, melyek többnyire dózisfüggők. Transzplantációt követően nagyobb adagokra van szükség, és a kezelés tartós, így a mellékhatások gyakrabban és súlyosabb formában jelentkezhetnek.

A terápia optimalizálását nehezíti, hogy a hatásos koncentrációtartomány szűk, és mind az alul-, mind a túladagolás komoly következményekkel jár. Terápiás tartomány alatt fokozódik a kilökődés kockázata, míg a tartomány felett toxikus hatások léphetnek fel. Emiatt a gyógyszerszintek folyamatos monitorozása elengedhetetlen.

A CSA koncentrációjának meghatározására több analitikai módszer is ismert [178]. A klinikai gyakorlatban a legelterjedtebbek az EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) és az FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay) módszerek [174,179]. Ezen technikák előnye a könnyű kezelhetőség, a gyors átfutási idő, a nagy mintaszám vizsgálatának lehetősége, valamint az, hogy nem igényelnek kiemelten magas szakképzettséget vagy jelentős beruházást. Ugyanakkor két jelentős korlátjuk is van. Egyrészt korlátozott a szelektivitásuk, mivel a CSA metabolitjai interferálhatnak a méréssel: az antitestek részlegesen keresztreakcióba léphetnek velük, ezáltal pontatlanul magas koncentrációt eredményezve. Másrészt a módszerek nem rendelkeznek megfelelő linearitással a magasabb koncentrációtartományban, így a nagy koncentrációjú minták mérés előtt gyakran hígítást igényelnek [180].

2.9. Időfüggő analitikai vizsgálatok biológiai rendszerekben

A komplex biológiai rendszerekben lejátszódó folyamatok vizsgálata gyakran nem statikus koncentrációértékek meghatározását, hanem a koncentrációk időbeli változásának nyomon követését igényli. Az ilyen jellegű mérések során a cél nem csupán az adott komponens aktuális mennyiségének meghatározása, hanem annak feltárása is, hogy a koncentrációváltozás milyen folyamatok – például transzport, eloszlás, metabolikus átalakulás vagy elimináció – következménye. Analitikai szempontból mind a transzportfolyamatok, mind a farmakokinetikai vizsgálatok közös kihívása a megbízható, reprodukálható és időben felbontott mennyiségi meghatározás különböző biológiai mátrixokban

2.9.1. Transzportfolyamatok

Az élő szervezetek alapvető építőegységei a sejtek, amelyeket sejthártya (plazmamembrán) határol. A membrán választja el a sejt belső környezetét a külvilágtól, és szabályozza az anyagok bejutását, illetve eltávozását. Az anyagok sejtbe vagy sejtből történő áramlását összefoglalóan transzportnak nevezzük. A transzportfolyamatok a sejtműködés

elengedhetetlen elemei [181]. A transzport mechanizmusa alapján két fő típust különítünk el: passzív és aktív transzportot. Passzív transzport az anyagok a koncentrációgrádiensnek megfelelően, energiabefektetés nélkül jutnak át egyik térből a másikba. Elsősorban kis méretű, töltéssel nem rendelkező, hidrofób molekulák képesek így átjutni a membránon. A transzportot minden esetben a membránba beépülő integráns membránfehérjék biztosítják. A passzív transzportban két fő fehérjecsoport vesz részt:

- Csatornafehérjék, amelyek hidrofil pórust képezve engedik át a vizet vagy az ionokat anélkül, hogy azokhoz kovalensen kötődnének. Az áteresztés a fehérje helikális régiói között valósul meg.
- Transzporter fehérjék, amelyekhez a ligandum reverzibilisen kötődik, konformációváltozást indukálva.

A transzporterek egy vagy több komponenst képesek azonos, illetve ellentétes irányba is átszállítani — mindezt továbbra is energiabefektetés nélkül. Ezzel szemben létezik a transzportfehérjéknek egy harmadik fajtája, az ATP-függő pumpafehérjék, amelyek az ATP hidrolíziséből származó energiát felhasználva (aktív transzport) anyagokat juttatnak az alacsonyabb koncentrációjú térből a magasabb koncentráció irányába. Az ATP-függő pumpafehérjék egyik legjelentősebb csoportját az ABC-transzporterek (ATP-binding cassette) alkotják. Ezek a nagyméretű integráns membránfehérjék különféle anyagokat – aminosavakat, kisebb peptideket, toxikus anyagokat – képesek ATP felhasználásával átjuttatni a plazmamembránon [182–184].

Az ABC-transzporterek egyik kiemelt jelentőségű tagja az MDR (multidrug resistance) fehérje, más néven P-glikoprotein (ABCB1). Ez a transzporter a sejtek egyik legfontosabb gyógyszer-efflux mechanizmusáért felelős: széles szubsztrátspecificitással rendelkezik, és számos lipofil, farmakológiailag aktív molekulát képes eltávolítani a sejtből, ezáltal csökkentve azok intracelluláris koncentrációját. Az MDR jelentős szerepet játszik a gyógyszerrezisztencia kialakulásában, különösen daganatos sejtekben, ahol túlzott expressziója a kemoterápiás szerek hatékonyságát is csökkentheti. A fehérje főként a májban, vesében, bélhámsejtekben és a vér–agygátban található meg, így alapvetően meghatározza számos xenobiotikum felszívódását, eloszlását és eliminációját. Mivel az MDR aktivitása vagy gátlása érdemben befolyásolhatja egyes gyógyszerek farmakokinetikáját, vizsgálata a gyógyszerfejlesztés szempontjából kiemelt jelentőségű [185–188].

2.9.1.1. Bajkalin.

A bajkalin – a bajkalein egyik fő metabolitja – jól ismert antioxidáns [189], rákellenes [190], gyulladáscsökkentő [191,192] és vírusölő [193] tulajdonságairól. Ennek köszönhetően farmakokinetikai és potenciális terápiás hatásainak vizsgálata az elmúlt évtizedben jelentős kutatási érdeklődés középpontjába került. A vegyület természetes forrásai közé tartozik a Scutellaria nemzetség több faja – különösen a bajkáli csukóka –, valamint az ezekből előállított gyógyszerek és gyógyhatású készítmények [194].

Számos tanulmány foglalkozott a bajkáli csukóka (Scutellaria baicalensis) szárított gyökerében található bioaktív komponensek együttes meghatározásával. Az alkalmazott analitikai módszerek jellemzően HPLC-, LC-MS-, illetve LC-MS/MS-alapú technikák [195–197]. A bajkalein orális adagolás után hatékonyan felszívódik, és döntően bajkalinná konjugálódva jelenik meg a szisztémás keringésben [198].

Az enterocytákban intracellulárisan képződő bajkalin kiáramlása nagy valószínűséggel ún. carrier-mediated transzporthoz kötött, amely különböző membrántranszporterek közvetítő szerepét feltételezi [199]. Annak meghatározásához, hogy mely transzporterek járulnak hozzá a bajkalin effluxához, az ATP-függő bajkalin-felhalmozódás vizsgálata szükséges. Ez a folyamat közvetlenül is tanulmányozható olyan membránvezikulákban, amelyekben az adott transzporterek túlexpresszált formában vannak jelen [200].

2.9.1.2. Kinidin

A kinidin egy természetes eredetű kinolinvázas alkaloid, amelyet elsősorban a Cinchona nemzetségbe tartozó fafajok kérgéből izoláltak. Farmakológiai szempontból klasszikusan antiaritmiás hatóanyagként ismert, ugyanakkor jelentős szerepet tölt be a gyógyszer-transzport és gyógyszer–gyógyszer kölcsönhatások vizsgálatában is. Ennek oka, hogy a kinidin jól jellemzett szubsztrátja a P-glikoproteinnek (P-gp), amely az ATP-függő efflux transzporterek egyik legfontosabb képviselője [201]. A P-gp széles körben expresszálódik a szervezet különböző barrierrendszereiben, így az intestinalis hámsejtekben, a vér–agy gát endotélsejtjeiben, valamint az orrnyálkahártyában is. Ennek következtében a kinidin farmakokinetikai viselkedése nagymértékben függ a P-gp aktivitásától, ami ideális modellvegyületté teszi a transzporter-függő felszívódási és eloszlási folyamatok tanulmányozására [202]. Számos irodalmi adat igazolja, hogy a P-gp gátlása jelentősen megváltoztatja a kinidin szöveti penetrációját, különösen a központi idegrendszerbe történő bejutását [203,204]. Az utóbbi években egyre nagyobb figyelem irányul az orrüregen

keresztüli, közvetlen agyi gyógyszerbevitel lehetőségére, amely alternatívát kínálhat a vér–agy gát megkerülésére. Ebben a kontextusban különösen fontos annak vizsgálata, hogy a transzporterek – elsősorban a P-gp – milyen szerepet játszanak az intranazálisan alkalmazott hatóanyagok felszívódásában és agyi eloszlásában. A kinidin, mint jól definiált P-gp-szubsztrát, alkalmas modellrendszert biztosít ezen folyamatok kísérletes tanulmányozásához.

A transzportfolyamatok kvantitatív vizsgálata ugyanakkor érzékeny és szelektív analitikai módszereket igényel, mivel a célmolekula koncentrációja gyakran alacsony, és biológiai mátrixokban kell meghatározni. A kinidinnel végzett transzportkísérletek ezért szorosan összekapcsolódnak az LC–MS alapú mennyiségi meghatározásokkal.

2.9.2. Farmakokinetika

A klinikai tömegspektrometria egyik kiemelten fontos alkalmazása a szervezetbe került gyógyszermolekulák sorsának nyomon követése. A farmakokinetikai vizsgálatok célja annak meghatározása, hogyan változik a gyógyszer koncentrációja a szervezet különböző tereiben, és miként jut el a hatás helyére. A folyamatot négy fő lépés írja le: a felszívódás (Absorption), az eloszlás (Distribution), a metabolizáció (Metabolism) és a kiürülés (Excretion). Ezt a modellt az angol kezdőbetűk alapján összefoglalóan ADME-nek nevezzük [205].

A gyógyszeres terápia a megfelelő hatóanyag kiválasztásával és a szükséges dózis meghatározásával kezdődik. A beadott gyógyszernek el kell jutnia a hatás helyére, és ott olyan koncentrációban kell jelen lennie, amely biztosítja a kívánt terápiás hatást. A szervezet ugyanakkor a gyógyszereket is testidegen anyagként kezeli, és megindítja azok átalakítását és eliminációját. A terápiás szint kialakulása és fenntartása így a bevitel és a lebontás/elimináció együttes eredőjeként alakul ki. Az optimális dózis meghatározásához ismernünk kell az adott egyén metabolizációs kapacitását. A gyógyszermolekulák lebontása több szervben is történhet, azonban leggyakrabban a máj enzimrendszerei, elsősorban a citokróm P450 (CYP) enzimek felelősek az átalakításukért [206]. Az enzimek aktivitása egyénenként jelentősen eltérhet. Ennek egyik legfontosabb oka a genetikai variabilitás: az enzimeket kódoló gének különböző alléljai eltérő mennyiségű, illetve eltérő hatékonyságú fehérjét eredményezhetnek. A genetikai variabilitás hátterében gyakran génpolimorfizmusok állnak, amelyek következtében a kódolt enzim expressziója csökkent,

megváltozott működésű lehet, vagy akár teljesen hiányozhat is. Emiatt az egyének gyógyszerlebontó képessége között jelentős különbségek figyelhetők meg.

A gyors metabolizálók esetében a gyógyszer lebomlása és kiürülése rövidebb idő alatt megy végbe, így a beadott dózis koncentrációja hamarabb csökken a terápiás szint alá. Esetükben gyakran magasabb dózisra lehet szükség a hatás fenntartásához. Ezzel szemben a lassú metabolizálók ugyanazon dózis mellett magasabb gyógyszerszinteket halmozhatnak fel, ami akár toxikus hatást is eredményezhet. Mindezek miatt kiemelten fontos a korábban már említett gyógyszerszint mérése, különösen olyan hatóanyagok esetében, amelyek szűk terápiás tartománnyal rendelkeznek.

Az LC–MS alapú klinikai vizsgálatok elterjedését elősegítik az egyre nagyobb érzékenységű, ugyanakkor egyre megfizethetőbb műszerek. Bár a módszer jelenleg még komplexebb, mint a hagyományos immuntesztek, világszerte jelentős erőfeszítések történnek olyan egyszerű, könnyen beállítható és technikus/asszisztensi szinten is elvégezhető LC–MS alapú protokollok kidolgozására [207,208].

2.9.2.1. A doxorubicin farmakokinetikai viselkedésének vizsgálata

A doxorubicin széles körben alkalmazott antraciklin típusú kemoterápiás szer, amely hatékonysága mellett jelentős, dózislimitáló mellékhatásokkal – különösen kardiotoxicitással – rendelkezik [209,210]. A hatóanyag klinikai alkalmazását ezért alapvetően meghatározza annak farmakokinetikai viselkedése és szöveti eloszlása, amelyet számos transzportfolyamat, köztük a P-glikoprotein (P-gp) aktivitása is befolyásol. A P-gp szerepe különösen jelentős a doxorubicin eliminációjában és a kritikus szervekben kialakuló expozíció szabályozásában, így a transzporter gátlása a hatóanyag biohasznosulását és toxicitási profilját egyaránt módosíthatja [211,212]. Ennek megfelelően a doxorubicin és P-gp-gátlók együttes alkalmazásának farmakokinetikai vizsgálata fontos eszközt jelent a gyógyszer szöveti expozíciójának és biztonságosságának jobb megértésében [213]. Az ilyen jellegű vizsgálatok megbízható analitikai hátteret igényelnek, amelyet nagy szelektivitású és érzékenységű LC–MS alapú módszerek képesek biztosítani [207].

2.9.2.2. Új típusú koleszterinszint-csökkentő hatású molekula: LK-935

A széles körben alkalmazott sztatin-típusú koleszterinszint-csökkentők általában biztonságos és hatékony gyógyszerek [214,215]. Alkalmazásuk ugyanakkor ritkán, de súlyos myopathiát, valamint különféle gyógyszerkölcsönhatásokat okozhat [216–219].

Mindez indokolttá teszi olyan új típusú hatóanyagok fejlesztését, amelyek a sztatinok által gátolt HMG-CoA-reduktáztól eltérő enzimeket céloznak meg [217].

A szlovén Lek gyógyszergyár kutatói egy új, nem sztatin típusú molekulát fejlesztettek ki, az LK-935-öt, amely a lanoszterol-14α-demetiláz enzim gátlásával csökkenti a koleszterin bioszintézisét. Ez a támadáspont a sztatinok által blokkolt lépést követi a szteroid-bioszintetikus útvonalon, ami azért jelentős, mert így más, a szervezet számára esszenciális szteroidok előállítása nem gátlódik [220]. Az LK-935 ígéretes farmakokinetikai tulajdonságokat mutatott, és ezekhez a kutatásokhoz csatlakoztunk analitikai oldalról.

2.9.2.3. Blebbistatin-származékok komplex farmakokinetikai vizsgálata

A blebbistatin a myosin-2 család szelektív inhibitora, amelyet széles körben alkalmaznak különböző sejtes folyamatok – például sejtmotilitás, kontraktilitás és sejtosztódás – vizsgálatára [221,222]. A vegyület és származékai klasszikus „tool compound”-ként szolgálnak a myosin-2 funkciók tanulmányozásában [223,224]. Ugyanakkor a blebbistatin farmakológiai alkalmazhatóságát jelentősen befolyásolják kedvezőtlen fizikai-kémiai és farmakokinetikai tulajdonságai, különösen a gyors metabolizmus és az alacsony stabilitás, amelyek módosítása érdekében számos szerkezeti variánst fejlesztettek ki [225,226]. A blebbistatin és származékai esetében a biológiai hatás és a molekuláris sors közötti kapcsolat nem triviális: a gyors elimináció és az intenzív metabolikus átalakulás jelentősen befolyásolja az in vivo megfigyelhető hatásokat. Ennek következtében a farmakológiai válasz értelmezése csak a koncentráció–idő profilok és a keletkező metabolitok részletes ismeretében lehetséges. Ez a rendszer ezért különösen alkalmas modellként szolgál annak bemutatására, hogy a kvantitatív LC–MS alapú farmakokinetikai mérések miként egészíthetők ki nagyfelbontású tömegspektrometriás metabolitazonosítással, lehetővé téve a komplex biológiai és farmakokinetikai folyamatok integrált értelmezését.

3. Célkitűzések

Abban a szerencsés helyzetben volt részem, hogy személyesen követhettem végig a tömegspektrometria elmúlt közel negyven évben bekövetkezett, talán legjelentősebb technológiai fejlődését. Akkor léptem be először a tömegspektrometriás labor ajtaján, amikor a GC-MS és az elektron ionizáció (EI) jelentette a legtöbb analitikai probléma megoldásának alapját. Már ekkor is érzékelhető volt az egyre növekvő igény a tömegspektrometriás vizsgálatok iránt, és a legkülönfélébb feladatokkal találtak meg: voltak köztük első ránézésre egyszerűnek tűnő, valamint kezdettől fogva komplex kihívások is. Gyakran azonban az „egyszerűnek” látszó feladatokról derült ki, hogy jóval bonyolultabbak a vártnál. Ezek jelentették számomra a valódi szakmai inspirációt.

Bár léteznek tömegspektrometriával foglalkozó tankönyvek, egyik sem kínál univerzális megoldást azokra a gyakorlati problémákra, amelyekkel a mindennapok során szembesültem. A feladatok megoldása így többnyire a rendelkezésre álló technológiák határait feszegette, ami új technikai megoldások kidolgozásához, majd ezekre épülő alkalmazások fejlesztéséhez vezetett.

A mennyiségi meghatározások területén szakmai pályám során kitűzött céljaim három fő terület köré rendezhetők: az analitikai módszertani fejlesztések, az ipari alkalmazások analitikai támogatása, valamint a klinikai és diagnosztikai kihívások megoldása.

Technikai fejlesztések megvalósítása

- Egyszerű, megbízható mintaelőkészítési eljárások kidolgozása célmolekulák komplex mátrixokból történő mennyiségi meghatározására.
- A mennyiségi analízis érzékenységét és megbízhatóságát meghatározó tömegspektrometriás paraméterek optimalizálása.
- Az egy injektálással mérhető komponensek számának növelése multikomponenses analitikai stratégiák alkalmazásával.
- Kromatográfiás módszerek fejlesztése a szelektivitás és az érzékenység együttes javítása érdekében.
- Érzékenységnövelő technikák azonosítása és integrálása az analitikai módszerekbe.

- Mikrotechnikák (mikrofolyadékos áramlási rendszerek, miniaturizált elválasztási és detektálási elemek) alkalmazási lehetőségeinek feltárása és beépítése az analitikai eljárásokba.
- Új kalibrációs megközelítések kidolgozása a mérési tartomány bővítésére és a komplex mátrixhatások csökkentésére.

Ipari (elsősorban gyógyszeripari) alkalmazások

- Hatóanyagtartalom mennyiségi meghatározása és minőségellenőrzése különböző formulációkban.
- Formulázási technikák analitikai támogatása a fejlesztési és gyártási folyamatok során.
- Szennyezők kimutatása, azonosítása és mennyiségi meghatározása.
- Nyomnyi mennyiségű, határértékhez kötött szennyezők érzékeny mérése.
- Szermaradványok meghatározása környezeti mintákban.
- Ipari gyártási és technológiai folyamatok analitikai követése és támogatása.

Klinikai és diagnosztikai alkalmazások – az életminőség javítását szolgáló fejlesztések

- Anyagcsere-betegségek szűrésének analitikai megvalósítása.
- Szabad aminosavak diagnosztikai célú mennyiségi meghatározására alkalmas módszerek fejlesztése.
- Epigenetikai folyamatok során keletkező metilált citozinszármazékok érzékeny mérése.
- Terápiás gyógyszerszintek meghatározása vérmintákból.
- Az egyénre szabott gyógyszeres terápia támogatását szolgáló analitikai módszerek kidolgozása.

  Transzportfolyamatok megértését és jellemzését segítő analitikai eljárások kialakítása.
- Daganatterápiák hatékonyságát támogató analitikai módszerek fejlesztése.
- Farmakokinetikai vizsgálatokhoz alkalmazható, megbízható LC–MS alapú módszerek fejlesztése.

4. Alkalmazott analitikai műszerek

A munkám során számos analitikai módszert dolgoztam ki, amelyek kivétel nélkül LC–MS(MS) alapúak voltak. A részletes kísérleti körülmények ismertetése meghaladná jelen dolgozat terjedelmi kereteit; a mérések pontos leírása a kapcsolódó közleményekben található meg. Ebben a fejezetben a vizsgálatok során alkalmazott analitikai műszereket ismertetem.

4.1. Tömegspektrométerek

MS #1: PE Sciex API2000 hármas kvadrupól tandem tömegspektrométer (Sciex, Foster City, CA, USA), TurboIonspray (TIS) ionforrással felszerelve. A készüléket kétféle ionizációs módban (ESI és APCI), valamint mindkét polaritásban alkalmaztam. Tömegtartománya 5–1800 Da volt. Az alkalmazott pásztázási módok közé tartozott a Q1MS, Product Ion Scan, Precursor Ion Scan, Neutral Loss Scan és az MRM. A műszer különlegessége, hogy sorozatszáma *Proto1*, vagyis ez volt a Sciex hármas kvadrupól tömegspektrométereinek prototípusa. A készülék 1998-tól üzemelt a KKKI Tömegspektrometriai Laboratóriumában, majd annak jogutód intézményeiben. A kihasználtság fokozatos csökkenése miatt a rendszert 2021 őszén végleg leállítottam. A műszer tudománytörténeti jelentőségére tekintettel fontosnak tartottam emlékének megőrzését, ezért átalakítást követően egy tematikus műszerkiállítás részeként a TTK első emeleti műszermúzeumában került elhelyezésre [227].

MS #2: Sciex 3200QTrap hibrid kvadrupól-ioncsapdás tandem tömegspektrométer (Sciex, Framingham, MA, USA) TurboV ionforrással felszerelve. A rendszert kétfajta ionizációs módban (ESI/APCI) és mindkét polaritásmódban használtam. A tömegtartománya 5-1700 Da. Alkalmazott pásztázási módok: Q1MS, EPI (enhanced product ion), MRM.

MS #3: Sciex 6500QTrap hibrid kvadrupól-ioncsapdás tandem tömegspektrométer (Sciex, Framingham, MA, USA) TurboV ionforrással felszerelve. A rendszert kétfajta ionizációs módban (ESI/APCI) és mindkét polaritásmódban használtam. A tömegtartománya 5-2000 Da. Alkalmazott pásztázási módok: Q1MS, EPI, MRM.

MS #4: Sciex TripleTOF 5600+ nagyfelbontású hibrid kvadrupól-repülési idő tandem tömegspektrométer (Sciex, Framingham, MA, USA) DuoSpray ionforrással felszerelve. A rendszert kétfajta ionizációs módban (ESI/APCI) és mindkét

polaritásmódban használtam. A tömegtartománya 5-40000 Da. Alkalmazott pásztázási módok: TOF-MS, MS2. A mérések során a felbontása: >25000.

MS #5: Sciex x500B hibrid nagyfelbontású kvadrupól-repülési idő tandem tömegspektrométer (Sciex, Framingham, MA, USA) TurboV ionforrással felszerelve. A rendszert kétfajta ionizációs módban (ESI/APCI) és mindkét polaritásmódban használtam. A tömegtartománya 5-40000 Da. Alkalmazott pásztázási módok: TOF-MS, MS2. A mérések során a felbontása: >25000.

4.2. HPLC rendszerek

HPLC #1: PerkinElmer Series 200 HPLC rendszer, amely gázmentesítő egységből, bináris pumpából, hűthető mintatérrel ellátott automata mintaadagolóból, oszloptermosztátból és UV/VIS optikai detektorból állt.

HPLC #2: Agilent 1100 HPLC rendszer gázmentesítővel, bináris pumpával, hűthető mintatérrel felszerelt automata mintaadagolóval és oszloptermosztáttal.

HPLC #3: Agilent 1200 HPLC rendszer gázmentesítővel, bináris pumpával, hűthető mintatérrel ellátott automata mintaadagolóval és oszloptermosztáttal.

HPLC #4: Shimadzu Prominence LC-20 HPLC rendszer, amely gázmentesítőből, kvaterner pumpából, hűthető mintatérrel felszerelt automata mintaadagolóból, oszloptermosztátból és UV/VIS optikai detektorból állt.

HPLC #5: Sciex Eksigent MicroLC 200 UHPLC rendszer, amely gázmentesítő egységgel, kétdugattyús fecskendőpumpával, hűthető mintatérrel ellátott CTC-PAL automata mintaadagolóval és oszloptermosztáttal volt elláztva.

5. Eredmények és értékelésük

A tömegspektrometria egyik legfontosabb – ha nem a legjelentősebb – alkalmazási területe a mennyiségi meghatározás. Ebben kiemelkedő szerepet játszott a légköri nyomású ionizációs technikák, elsősorban az elektrospray ionizáció (ESI) és az atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI) megjelenése. Ezek az eljárások egyrészt lehetővé tették a folyadékkromatográfia és a tömegspektrometria hatékony, gyakorlatilag kompromisszum-mentes összekapcsolását, másrészt jelentősen kiszélesítették az ionizálható vegyületek körét. Különösen az elektrospray ionizáció jelentett áttörést, mivel nemcsak a kis molekulatömegű, klasszikus szerves vegyületek ionizálását tette lehetővé, hanem nagyméretű biomolekulákét is, így például peptidekét, fehérjékét és oligonukleotidokét. A mennyiségi meghatározások fejlődésében ugyanilyen fontos szerepet játszott a kromatográfiás technikák fejlődése is. A modern elválasztási módszereknek köszönhetően ma már komplex mintamátrixokból is lehetőség van kis koncentrációban jelen lévő komponensek nagy érzékenységű meghatározására. Általánosságban elmondható, hogy a mennyiségi analitikai módszerek fejlesztése során az elsődleges cél a minél nagyobb érzékenység elérése, az egyetlen injektálás során mérhető komponensek számának maximalizálása, illetve a lehető legkisebb mintaelőkészítési igényű módszerek kidolgozása. Ezek az elvárások nem minden esetben teljesíthetők egyidejűleg, ugyanakkor az analitikai módszerfejlesztés során az analitikusok törekvése ezek minél teljesebb megvalósítása. Analitikusi munkámat mindvégig ezek a kihívások motiválták. A folyamatosan jelentkező új feladatok újabb és újabb módszerfejlesztéseket tettek szükségessé. A következő fejezetben ezeket a módszerfejlesztési munkákat, valamint az így kidolgozott módszerekkel elért gyakorlati eredményeimet mutatom be szisztematikus formában.

5.1. Módszerfejlesztések

5.1.1.Tömegspektrometriás módszerfejlesztések, optimálások

Az érzékeny mennyiségi meghatározások megvalósításához elengedhetetlen a mérőrendszer megfelelő szelektivitása és érzékenysége. A tömegspektrométerek önmagukban nagy érzékenységgel rendelkező analitikai eszközök, ugyanakkor az elérhető érzékenység jelentős mértékben függ az alkalmazott analizátor típusától. Nem minden tömeganalizátor rendelkezik azonos érzékenységi jellemzőkkel.

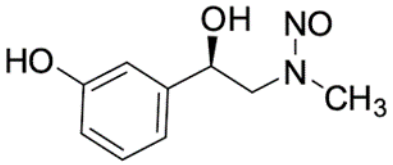
A kvadrupól analizátorok pásztázó üzemmódban általában viszonylag alacsony érzékenységet biztosítanak. Ezzel szemben a hármas kvadrupól alapú tandem tömegspektrométerekben alkalmazott csatolt pásztázási mód, azaz a multiple reaction monitoring (MRM), nagyságrendekkel javítja az elérhető maximális érzékenységet. Az érzékenység ebben az esetben szorosan összefügg a szelektivitással: hármas kvadrupól készüléken MRM módban csak akkor detektálható jel, ha a megfelelő tömegű anyaionból a megfelelő tömegű fragmension képződik. Ez a kiemelkedő szelektivitás és érzékenység az egyik legfontosabb oka a hármas kvadrupól rendszerek széleskörű elterjedésének és népszerűségének a mennyiségi analitikában.

Hasonlóan kedvező tulajdonságokkal rendelkező analizátortípust képvisel a repülési idő (TOF) analizátor. Ebben az esetben a nagy tömegfelbontás biztosítja a szelektivitást, és amennyiben a TOF analizátor kvadrupóllal kombinált rendszerben működik, a klasszikus MRM-hez igen hasonló kromatogramok állíthatók elő. Munkám során elsősorban e két analizátortípusra épülő rendszerekkel dolgoztam, és módszerfejlesztési tevékenységemet is ezek alkalmazásával végeztem.

5.1.1.1. Megfelelő ionizációs technika és a polaritás megválasztása

A tömegspektrometriás módszerfejlesztés és -optimalizálás összetett feladat, amelynek egyik kulcseleme a megfelelő ionizációs technika (ESI vagy APCI), valamint az iondetektálás polaritásának helyes megválasztása. A vizsgálandó vegyület szerkezetének ismeretében az esetek jelentős részében előre megjósolható, hogy mely ionizációs mód és polaritás vezethet eredményre. A gyakorlatban leggyakrabban elektroporlasztásos ionizációt alkalmazunk pozitív ionok detektálása mellett. Ugyanakkor léteznek olyan vegyületcsoportok – például a szteroidok vagy bizonyos nitrózaminok –, amelyek esetében sem az optimális ionizációs technika, sem a megfelelő polaritás nem határozható meg egyértelműen előzetesen. A szteroidok mérsékelten poláros, vagy gyakorlatilag apoláros vegyületek, ezért esetükben az APCI ionizáció gyakran előnyösebb lehet. Ennek ellenére minden esetben indokolt mindkét ionizációs technika kipróbálása. Munkánk során az ösztron, az ösztriol és az ösztradiol esetében az APCI ionizáció pozitív módban bizonyult a legérzékenyebbnek a származékképzés nélküli mennyiségi meghatározás során. Ezzel szemben az N-nitrozo-fenilefrin (NNPE) esetében mind a négy lehetséges ionizációs és polaritáskombináció vizsgálatát követően az elektroporlasztásos ionizáció negatív módban biztosította a legnagyobb érzékenységű detektálást. (2. ábra)

szabopali_452_26



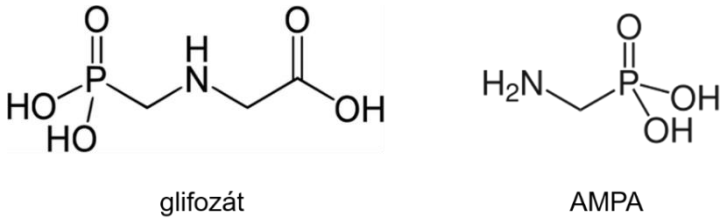
2. ábra. Az N-nitrozo-fenilefrin szerkezete

Ez az eredmény első megközelítésben szokatlannak tűnt, azonban végül kulcsszerepet játszott egy különösen érzékeny módszer kidolgozásában. Ennek oka, hogy az alapmolekula, a fenilefrin (PE) negatív ion módban lényegesen gyengébb ionizációs hatásfokkal rendelkezik, így még nagy felesleg jelenlétében sem okozott számottevő zavaró hatást a meghatározás során [SP1].

5.1.1.2. MRM átmenetek optimálása

A TOF analizátorok esetében általában nincs szükség részletes optimálásra, mivel a rendszer pásztázó módban is nagy érzékenységgel működik, és egy adott tömegtartományon belül valamennyi ion mérésére képes. Természetesen az ionizációs technika és a polaritás megfelelő megválasztása ebben az esetben is elengedhetetlen, ugyanakkor általánosságban kijelenthető, hogy a vegyületek móltömegük alapján nagy szelektivitással kvantálhatók. A hármas kvadrupól rendszerek esetében ezzel szemben lényegesen eltérő a helyzet. Itt a készüléket „meg kell tanítani” az érzékeny és szelektív mennyiségi meghatározásra. Ez azt jelenti, hogy a tömegspektrométer paramétereit úgy kell optimalizálni, hogy az anyaion minél nagyobb intenzitással képződjön, miközben a lehető legnagyobb mennyiségű fragmension keletkezik és jut el a detektorig. Az optimalizáláshoz az adott molekula megfelelő koncentrációjú oldatát fecskendőbe töltjük, majd 5–10 µL/perc áramlási sebességgel folyamatosan juttatjuk be a készülékbe. Ezt követően a rendszer automatikusan beállítja a paramétereket annak érdekében, hogy a legintenzívebb MRM átmenetet kapjuk. Az esetek döntő többségében ez az eljárás sikeres, és néhány percen belül rendelkezésre áll a megfelelően érzékeny MRM átmenet. Mindazonáltal létezik egy szűk esetkör, amely valódi kihívást jelent a módszerfejlesztés során. Egy vizsgálólaboratóriumban végzett munkám során poláros peszticidekre fejlesztettem módszert, ahol a glifozát, mint gyomirtószer, valamint egyik fő bomlásterméke, az aminometil foszforsav (AMPA) képezte a vizsgálat tárgyát (3. ábra). Az optimálást ESI negatív módban kezdtem, ahogy azt a szerkezetek alapján vártam. A glifozát esetében intenzív jelet kaptam, az AMPA esetében azonban semmilyen jelet nem tudtam detektálni. Az első gyanú a standard oldatra irányult, és töményebb törzsoldatok

fecskendőpumpa segítségével történő bejuttatása esetében sem kaptam semmilyen értékelhető jelet. Áttértem kézi optimálásra, és szisztematikusan változtattam az ionforrás paramétereit, és amikor a hőmérsékletet megemeltem, hirtelen intenzív jelet produkált az AMPA. Az automatikus optimálás a 10 µL/perc áramláshoz van tervezve, ahol a rendszer nem használ szárítógázt és a forráshőmérsékletet sem kell emelni. Ennél a molekulánál viszont elengedhetetlen volt az ionizációhoz a hőmérséklet emelése. Apró dolog, de a sikeres optimáláshoz elengedhetetlen volt.



3. ábra. A glifozát és az AMPA szerkezete

Az automatikus optimálás eredményeként megkapjuk a beállított mennyiségű optimált MRM átmenetet. Leggyakrabban egy komponens meghatározásához 2 MRM átmenet szükséges. Az egyiket a mennyiségi meghatározásra (quantifier MRM), a másikat az igazolásra (qualifier MRM) használjuk. A külön-külön optimált MRM átmeneteket tartalmazó módszereket egyesíthetjük, és így több komponens mérésére alkalmas módszerhez jutunk. Az esetek döntő többségénél a legérzékenyebb MRM átmenet megtalálása a cél, hiszen ezzel tudunk nagy érzékenységet elérni. Vannak azonban olyan feladatok, amikor egymás mellett jelentős mértékben eltérő koncentrációban előforduló komponenseket kell egyszerre mérni. Ilyen esetben a nagy mennyiségben jelen lévő komponens esetében kevésbé érzékeny MRM átmenet használata ajánlott. Ennek megvalósítására több megoldás is létezik. A Semmelweis Egyetem Gyermekgyógyászati Osztályán működő anyagcsere laboratóriumban aminosavak meghatározását végzik egy kereskedelmi forgalomból származó módszerrel, ahol a sokkal nagyobb mennyiségben jelen lévő aminosavak esetében anyaionként nem a protonált molekulaiont használják, hanem annak a ^{13}C izotópját, ezzel elérve az intenzitások egymáshoz való közelítését. Az epigenetikai mérésekhez fejlesztett módszerünknél mi egy másik megoldást alkalmaztunk az intenzitás csökkentése érdekében. A vizsgálat tárgyát képező 5mC és az 5hmC mennyiségéhez képest 4 nagyságrenddel nagyobb koncentrációban lévő guanint (G) használtuk belső standardként. Ebben az esetben a guanin MRM átmenetét úgy

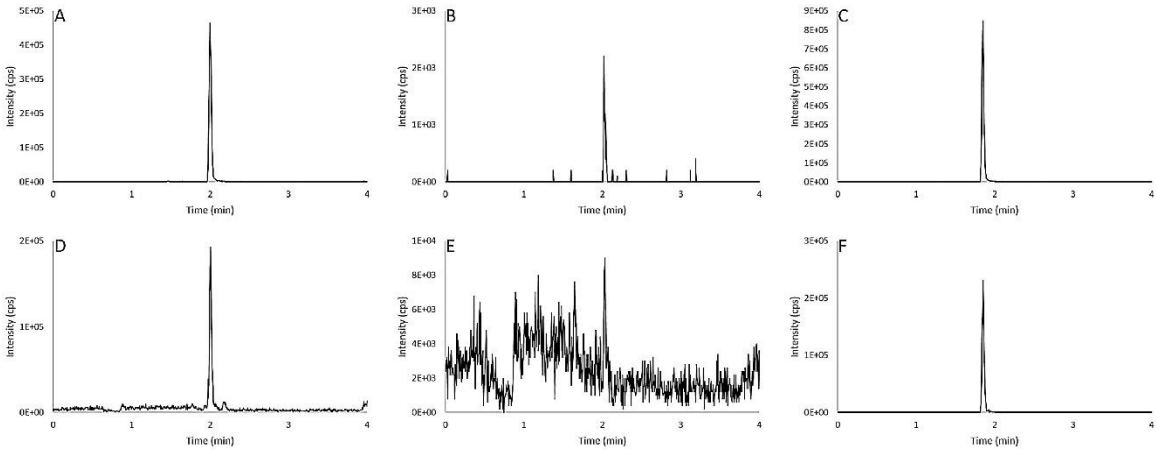
módosítottuk az optimális értékhez képest, hogy az ütközési energiát megnöveltük (40eV), ezáltal a meghatározáshoz használt 152/110 átmenet intenzitása jelentős mértékben lecsökkent. Ezzel lehetővé vált a bázisok egymás melletti meghatározása anélkül, hogy akár a detektor telítődött volna, akár a nagy koncentrációk miatt a koncentráció által kiváltott jel már nem lett volna egyenesen arányos a koncentrációval [SP2].

5.1.1.3. Pszeudo MRM alkalmazása

Az MRM átmenetek optimálása során előfordulhat az a kedvezőtlen eset, amikor az anyavegyülethez nem áll rendelkezésre két jól használható MRM átmenet. Ennek egyik gyakori oka a molekula kis mérete. Ilyen esetekben a fragmentációs lehetőségek erősen korlátozottak, gyakran mindössze egyetlen kötés hasadása figyelhető meg, amelynek eredményeként csupán egy fragmension keletkezik. Sok esetben ennek intenzitása sem elegendő az érzékeny mennyiségi meghatározáshoz. Hasonló problémával találkoztunk a valproinsav (valproát, VP), az N-nitrozo-dimetilamin (NDMA), valamint a glicin és az alanin meghatározása során is. Ilyen helyzetben egy lehetséges megoldást a pszeudo-MRM átmenet alkalmazása jelent. Ennek során mind a Q1, mind a Q3 analizátor tömegét az anyavegyület tömegére állítjuk be, miközben a minimális, jellemzően 5 eV-os ütközési energiát alkalmazzuk. Ebben az esetben a Q1 kiválasztja az anyaiont, amely áthalad az ütközési cellán, azonban az alacsony ütközési energia nem eredményez fragmentációt, így az anyaion változatlan formában jut el a Q3 analizátorba. Ez a mérési mód funkcióját tekintve megegyezik az egyszeres kvadrupól rendszereknél alkalmazott kiválasztott ioncsatornák figyelési módjával (SIM), mivel kizárólag az anyavegyület tömegét detektáljuk. A pszeudo-MRM alkalmazásának előnye ugyanakkor az, hogy a Q1/Q3 átmenet beilleszthető a többi valódi MRM átmenet mellé, így a nehezebben mérhető komponensek is integrálhatók a többkomponensű módszerbe [SP3], [SP4].

Az előző példában nem beszélhetünk valódi MRM átmenetről, mivel a módszer nem tartalmazott valódi fragmensiont. Létezik azonban egy másik típusú pszeudo-MRM megközelítés is, amely során a fragmension valódi, azonban az anyaion nem a molekulából szokásos protonálódással vagy protonvesztéssel keletkező molekulaion, hanem egy semleges rész elvesztésével képződő ion. Ezzel a jelenséggel nem-szteroid gyulladáscsökkentők mennyiségi meghatározására fejlesztett módszerünk során találkoztunk. A negatív ionmódban vizsgált komponensek közül a fenoprofen, a flurbiprofen és a naproxen esetében az $[M–H]^-$ ionok mellett lényegesen intenzívebb csúcsokat adott a CO_2-vesztett forma. E molekulák szerkezetükből adódóan könnyen

veszítenek CO_2-t már az ionforrásban, ennek eredményeként rendre a 197, 199 és 185 m/z tömegű ionok keletkeznek. Az érzékenység növelése érdekében ezekhez a pszeudo-molekulaionokhoz építettük fel az MRM módszert. Az így kialakított átmenetek alkalmazásával 3–5-szörös érzékenységnövekedést sikerült elérni a hagyományos molekulaion-alapú megközelítéshez képest. (4. ábra)



4. ábra. Fenoprofen, flurbiprofen és naproxen disszociált molekulaionjainak (A–C), valamint molekulaionjainak (D–F) kromatogramjai azonos koncentrációszinten.

5.1.1.4. Pásztázási idő beállítása

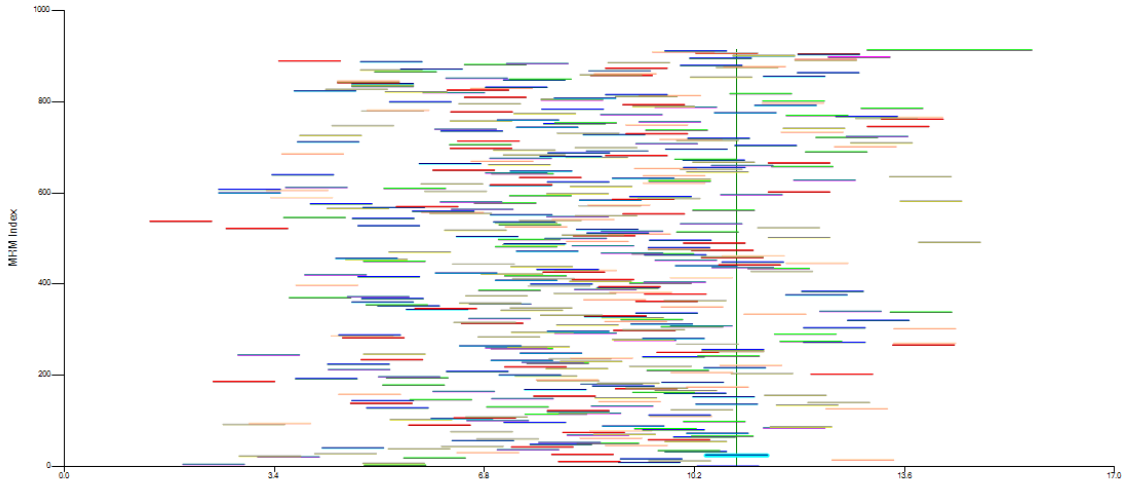
Az MRM átmenetek esetében az egyes csatornák megfigyelésére fordított időt dwell time-nak nevezzük, míg két csatorna közötti váltás ideje a pause time. Egy MRM átmenet teljes megfigyelési ideje a dwell time és a pause time összege. Ezek az idők milliszekundum nagyságrendűek: a dwell time széles tartományban változtatható, míg a pause time értéke jellemzően 2–5 ms. Több MRM átmenet egyidejű mérése esetén ezek az idők a vizsgált átmenetek számával szorzódnak, és így alakul ki az adott módszer ciklusideje. A ciklusidőt a kromatográfiás elválasztáshoz kell illeszteni oly módon, hogy egy kromatográfiás csúcs detektálása során legalább 10 mérési ciklus, azaz mintavételezési pont álljon rendelkezésre. Hagyományos HPLC elválasztások esetén a csúcsok jellemzően 5–20 s szélességűek, ami azt jelenti, hogy a ciklusidőt 0,5–2 s közötti értékre célszerű beállítani. Ezt az időtartamot lehet – és szükséges is – az MRM átmenetekkel „feltölteni”. Viszonylag alacsony számú célkomponens esetén a dwell time értékek akár a 100 ms nagyságrendet is elérhetik, azonban a komponensszám növelésével ezek az értékek gyorsan csökkennek. A minimális dwell time általában 5 ms, míg a minimális pause time 2 ms, ami egyetlen MRM átmenet esetén 7 ms teljes megfigyelési időt jelent. A módszerfejlesztést ezen korlátok figyelembevételével kell elvégezni. Minél rövidebb a dwell time, annál nagyobb a mérési bizonytalanság, míg a túl hosszú dwell time megnöveli a ciklusidőt, ami a kromatográfiás

pontok számának csökkenéséhez vezet, ezáltal rontva a mennyiségi meghatározás pontosságát. Általános szabályként elmondható, hogy alacsony intenzitású MRM átmenetek esetén hosszabb, míg nagyobb intenzitású átmenetek esetén rövidebb dwell time értékeket célszerű alkalmazni. Az érzékeny mérésekhez szükséges MRM átmenetek dwell time értékét ezért magasabbra kell állítani. Ezt a megközelítést alkalmaztuk többek között a DNS-metilációs mérések során is, ahol a legkisebb koncentrációban jelen lévő 5-hidroximetil-citozin (5hmC) esetében a többi komponens 25 ms-os értékéhez képest a mennyiségi, illetve minőségi MRM átmeneteknél 80, illetve 35 ms dwell time került beállításra [SP2].

5.1.1.5. Komponensszám növelése

Az előző fejezetben láthattuk, hogy egyetlen MRM átmenet figyeléséhez szükséges minimális idő (dwell time + pause time) 7 ms, valamint hogy egy komponens egyértelmű azonosításához általában két MRM átmenet szükséges. Multikomponensű módszerek esetén ezért a ciklusidő és a dwell time együttes figyelembevétele elengedhetetlen. Mivel a dwell time egy bizonyos határ alá nem csökkenthető, a ciklusidő pedig egy adott érték fölé nem növelhető, az összes MRM átmenetet folyamatosan figyelő módszerek viszonylag gyorsan elérik a teljesítőképességük határát. Ez jelentősen korlátozná az egyidejűleg mérhető komponensek számát. A komponensszám további növelésére az időablakos MRM (scheduled MRM, sMRM) módszer nyújt megoldást. Ebben az esetben az egyes komponensekhez tartozó MRM átmeneteket a rendszer csak egy előre meghatározott időablakban figyeli. Minden MRM átmenethez meg kell adni a várt retenciós időt, valamint egy ahhoz tartozó időablakot. A módszerben ezen felül definiálni kell a minimális dwell time és a maximális ciklusidő értékét is. Ezek alapján a rendszer dinamikusan állítja össze az adott időpillanatban figyelendő MRM átmenetek listáját. Ezt a technikát alkalmaztuk a Bálint Analitika Kft.-ben fejlesztett módszer során is, ahol a feladat 480 komponens – összesen 960 MRM átmenet – egyetlen injektálásból történő mérése volt. A módszerben a maximális ciklusidőt 800 ms-ra állítottuk be, míg a minimális dwell time és az átmenetek közötti szünet ideje 5, illetve 2 ms volt. A gondosan meghatározott retenciós idők figyelembevételével a rendszer automatikusan állította össze az MRM átmenetek időbeli ütemezését, amelyet az 5. ábra szemléltet. Az ábrán jól látható, hogy az egy időpillanatban aktív MRM átmenetek száma nem egyenletes. Vannak olyan ritkább szakaszok, ahol az ideális ciklusidő kényelmesen megvalósítható anélkül, hogy a dwell time értékeket a minimálishoz közeli tartományba kellene csökkenteni. Ezzel szemben a kromatogram

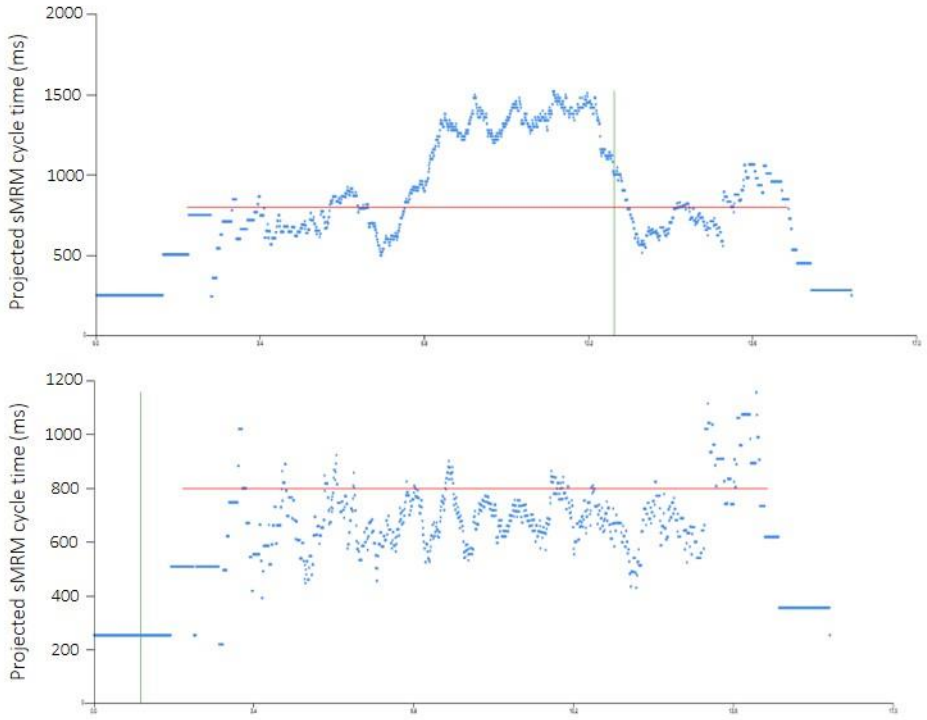
középső tartományában olyan régiók is megjelennek, ahol a rendszernek kompromisszumot kell kötnie, mivel a várt komponensszám még minimális dwell time értékek mellett is meghaladná a beállított maximális ciklusidőt. Ilyen esetekben a dwell time minimum értéke válik meghatározóvá, és a ciklusidő a megadott maximális érték fölé növekszik. Ennek következménye a kromatográfiás csúcsokra jutó mintavételi pontok számának csökkenése, ami a mennyiségi meghatározás pontosságának romlásához vezet.



5. ábra. Az MRM-időablakok eloszlása 480 komponens esetében.

A probléma kezelésére két alapvető megoldás kínálkozik. Az egyik megközelítés kromatográfiás oldalról történik, és vagy az elválasztás idejének megnövelését, vagy a kromatográfiás felbontás csökkentését jelenti. Utóbbi esetben a szélesebb csúcsok lehetővé teszik több mintavételi pont felvételét adott ciklusidő mellett. A másik megoldás tömegspektrometriás oldalról közelít, és az egyes MRM átmenetekhez tartozó figyelési ablakok szűkítését jelenti. Mindkét megoldás előnye a mérési pontosság javulása, ugyanakkor jelentős hátrányokkal is járnak. Az elválasztási idő megnövelése a teljes vizsgálati idő növekedését eredményezi, ami rutinvizsgálatokat végző laboratóriumok esetében számottevő gazdasági hátrányt jelenthet. A figyelési ablakok szűkítése ezzel szemben a módszer robusztusságát veszélyezteti, mivel bármely, akár csekély mértékű hatás – például az eluens összetételének vagy pH-jának változása, illetve az oszlop öregedése – befolyásolhatja a komponensek retenciós idejének reprodukálhatóságát. Ennek következtében egyes komponensek retenciós ideje oly mértékben eltolódhat, hogy kikerülnek a várt időablakból, így a mérés során egyszerűen nem detektálhatók. Ezért kiemelten fontos a rendszer folyamatos ellenőrzése rendszeralkalmassági minta futtatásával, amely néhány, a teljes futási idő mentén egyenletesen elosztott komponenst

tartalmaz. Az éles mérések csak akkor kezdhetők meg, ha minden vizsgált csúcs a számára meghatározott retenciós időablakon belül jelenik meg. A detektálási ablak szélességének ciklusidőre gyakorolt hatását a 6. ábra szemlélteti.



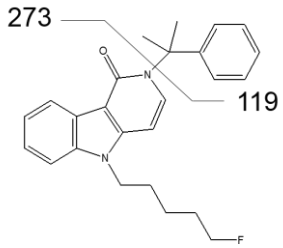
6. ábra. Az időablak szélességének hatása a ciklusidőre 960 MRM esetén. 60 ms-os (felső) és 30 ms-os (alsó) időablakszélesség alkalmazása.

Az ábrákon a piros vonal a megcélzott maximális ciklusidőt jelöli. A felső ábrán jól megfigyelhető, hogy a mérés középső szakaszában – ahol a komponensek többsége eluálódik – a ciklusidő szinte folyamatosan meghaladja a célértéket. Az alsó ábrán, ahol az egyes MRM átmenetekhez tartozó figyelési ablakokat 60 ms-ról 30 ms-ra csökkentettük, a korábban a célérték fölé eső ciklusidők jelentős része a piros vonal alá került, ezáltal biztosítva a megfelelő mintavételezési sűrűséget. Az általam finomhangolt sMRM módszert nemcsak a bemutatott fejlesztések során alkalmaztuk sikeresen, hanem jelenleg is használják az SGS nyíregyházi vizsgálólaboratóriumában illetve a Bálint Analitika kft-ben peszticidek mennyiségi meghatározására, ami jól szemlélteti a módszer gyakorlati alkalmazhatóságát és robusztusságát.

5.1.1.6. Nagyfelbontás szerepe a mennyiségi meghatározásokban

A metabolitvizsgálatok egyik leggyakrabban alkalmazott eszköze a hármas kvadrupól, illetve a QTrap típusú tömegspektrométer. A hármas kvadrupól rendszerek lehetővé teszik mind a szerkezetazonosítást, mind a mennyiségi meghatározásokat. A prediktív MRM

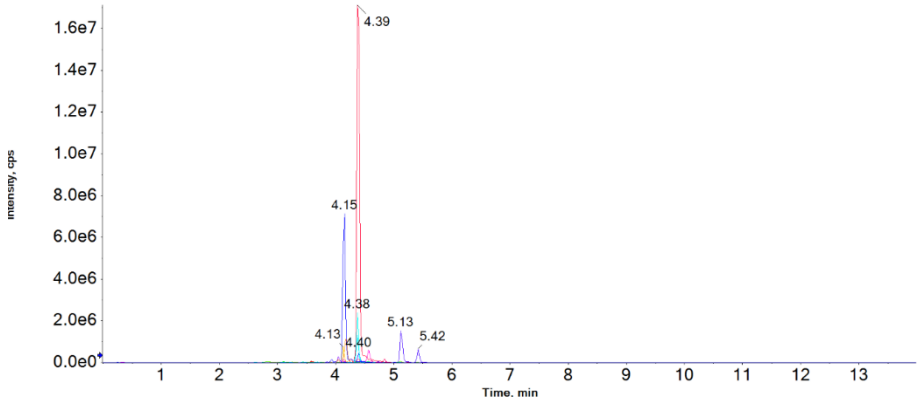
módszer alkalmazásával egy célmolekula lehetséges metabolitjai akkor is feltérképezhetők, ha az egyes metabolitok standardjai nem állnak rendelkezésre. A megközelítés lényege, hogy az anyavegyület fragmentációs viselkedésére építve azonosíthatók a különböző metabolitok, valamint farmakokinetikai vizsgálatok során azok időbeli változásai is nyomon követhetők MRM mérések segítségével. A módszer egyszerű és robusztus, ezért általában minimális annak a kockázata, hogy az azonosítás során hiba lépjen fel. Ennek ellenére egy olyan érdekes esettel találkoztunk, amelyben a hármas kvadrupól rendszeren kapott eredmények nem voltak egyértelműen értelmezhetők. Ebben a vizsgálatban egy dizájner drog, az 5-F-cumyl-pegaclone (5FCP) metabolizmusát tanulmányoztuk hármas kvadrupól készüléken (7. ábra).



7. ábra. 5-F-cumyl-pegaclone szerkezete és az MRM-ben megjelenő ionokat eredményező fragmentációs folyamat.

Az anyavegyületen elvégeztem az előkísérleteket, meghatároztam a molekula pontos tömegét, valamint feltérképeztem annak fragmentációs viselkedését. Az elemi összetétel $C_{25}H_{27}N_2OF$ értékre adódott, és az MS/MS vizsgálatok során a 273 és a 119 m/z tömegű ionok bizonyultak a két legintenzívebb fragmensionnak, amelyeket a mennyiségi meghatározáshoz is kiválasztottam. Ezt követően a prediktív MRM módszer segítségével előállítottam az összes lehetséges metabolithoz tartozó MRM átmenetet, majd az így összeállított módszerrel szűrőmérést végeztem a feltételezett metabolitokra. Az így kapott eredményeket a 8. ábra szemlélteti. Az ábrán a 4,15 percnél megjelenő csúcs az anyavegyülethez rendelt MRM átmenetekkel látható. A metabolizációs folyamatok során a szervezet jellemzően a molekulák polaritásának növelésére törekszik, elősegítve ezzel azok kiürülését. Éppen ezért különösen meglepő volt, hogy az anyavegyület mindkét MRM átmenete megjelent a 4,15 percnél eluálódó csúcsban. A látszólagos ellentmondás tisztázása érdekében ugyanazt a mintát nagyfelbontású QTOF rendszeren is megmértem. A legnagyobb meglepetés akkor ért, amikor a 4,15 percnél eluálódó csúcshoz a várt 391,2186 m/z tömeg helyett 391,1670 m/z értéket mértem, amelyhez a protonált molekulaionként értelmezhető $C_{23}H_{23}N_2O_4$ elemi összetétel tartozott. Ez a várt tömeghez képest mintegy 130 ppm eltérést jelentett, ami egyértelműen kizárta, hogy azonos

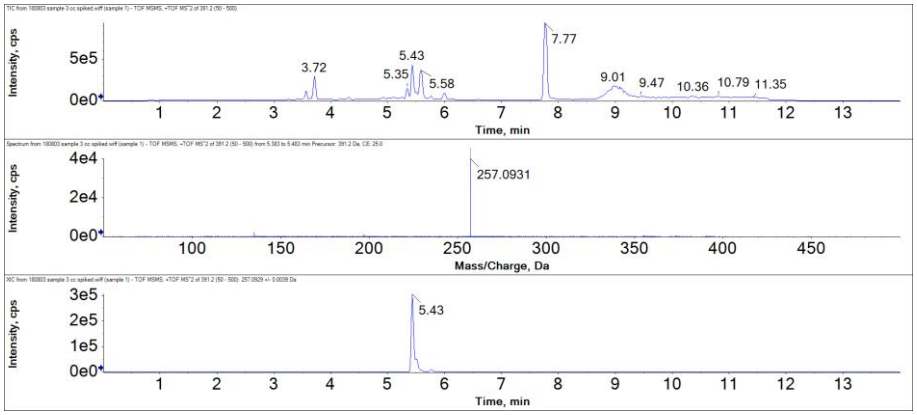
molekuláról lenne szó. Az eredetileg várt tömegre történő célzott keresés során nem jelent meg csúcs, így úgy tűnt, hogy az anyavegyület nem található meg a mintában, és nagy valószínűséggel teljes mértékben metabolizálódott. Ezt követően nagyfelbontású MS/MS mérést végeztem a 391 m/z anyaionon, amely során egy 273 m/z tömegű fragmension jelent meg. Ehhez azonban a $C_{14}H_{13}N_2O_4$ elemi összetétel adódott, ami 118 Da tömegvesztésnek felel meg, és a molekula feltételezett szerkezete alapján jól értelmezhető.



8. ábra. A prediktív MRM módszerrel kapott kromatogram.

Ismert jelenség, hogy két különböző molekula azonos nominális tömeggel rendelkezhet, és alacsony felbontású tömegspektrometriával nem különíthetők el egymástól. Az azonban rendkívül ritka, hogy azonos nominális anyaiontömeg mellett a fő fragmensionok nominális tömege is megegyezzen. Ebben az esetben mégis pontosan ez történt. Mindez azt jelenti, hogy klasszikus hármas kvadrupól rendszeren ez a két molekula pusztán MRM-alapon nem különböztethető meg, és az egyértelmű azonosításhoz elengedhetetlen a retenciós idők figyelembevétele is. A jelenség további megértése érdekében elhatároztam, hogy megkísérlem a vegyület szerkezetének megfejtését. Az eredeti anyavegyülethez képest három oxigénatom beépülését, továbbá egy C_2H_4 egység elvesztését és a fluoratom hiányát figyeltem meg. Az oxigéntartalom növekedése oxidációs, illetve karboxileződési folyamatokra utalhatott, ezért a mintát negatív ion módban is megvizsgáltam. Ebben az üzemmódban intenzív csúcs jelent meg 389,1711 m/z tömegnél, ami alátámasztotta a feltételezést, mivel ilyen jellegű intenzív csúcs jellemzően karbonsav funkciós csoport jelenlétére utal. Ezt követően megvizsgáltam a standard 5-F-cumyl-pegaclone kromatográfiás, MS és MS/MS viselkedését is. A vegyület retenciós ideje 7,76 percnek adódott, ami összhangban volt az elvárásokkal. A nagyfelbontású MS mérés során a várt elemi összetételt kaptam, MS/MS módban pedig a 273,1408 m/z tömegű fragmension jelent meg, amely megfelelt a $C_{16}H_{18}N_2OF$ összetételnek. A standard

vegyületet a kiindulási plazmamintához adagolva nagyfelbontású MS/MS mérést végeztem a 391 m/z ionra. A várakozásoknak megfelelően intenzív csúcs jelent meg 7,77 percnél, amely egyértelműen az eredeti 5FCP vegyülethez volt rendelhető. A 4,15 perces régióban azonban három különálló csúcsot is detektáltam. Ezek részletesebb vizsgálata során két csúcs esetében a 273,1408 m/z ion dominált, míg a legkorábban eluálódó csúcsban a 257,0931 m/z fragmension volt a legintenzívebb, amely pontosan 16 Da-val kisebb tömegű (9. ábra).

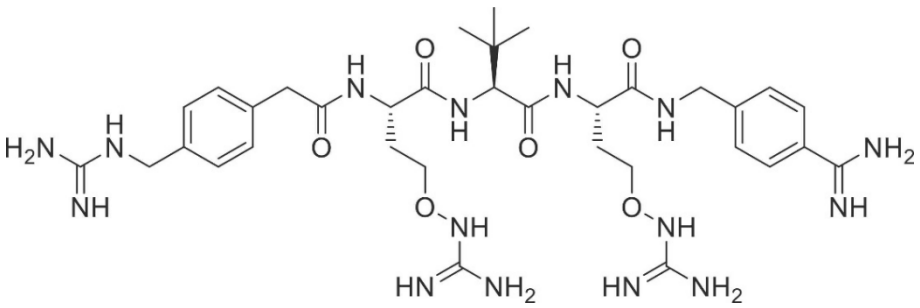


9. ábra. Addícionált plazmaminta MS/MS módban (m/z 391) rögzített összionárama (fent), tömegspektruma (középen) és az m/z 257,0931 fragmension kromatogramja (lent).

Az a tény, hogy több csúcs is megjelent a 4,15 perces régióban, azzal magyarázható, hogy oxidációs metabolitokkal van dolgunk, és az oxidáció a molekula különböző helyein is végbemehetett. Az oxidáció, valamint a korábban azonosított karboxileződés együttesen magyarázatot adhat a plazmamintában megfigyelt 391 m/z tömegű ion három oxigénatomjának jelenlétére. Az MS/MS spektrumban a 273 m/z tömegű fragmension párjaként megjelent a 119 m/z ion. Feltételezésem szerint, amennyiben a 273 m/z tömegű molekularészből egy oxigén hiányzik, annak a 119 m/z fragmentumban 16 Da tömegnövekedésként kellene megjelennie, azaz 135 m/z környékén. Ennek megfelelően valóban azonosítottam egy 135,0803 m/z tömegű iont, amelyhez a $C_9H_{10}O$ elemi összetétel tartozott, és amely a 257 m/z tömegű fragmension párjaként jelent meg. Ezt követően már csak a C_2H_4 molekularész sorsát kellett tisztázni. Ennek érdekében áttekintettem a szakirodalomban a cumyl-pegaclone vegyület metabolizációjára vonatkozó korábbi eredményeket. Az irodalmi adatok egyértelműen igazolják a különböző oxidációs metabolitok jelenlétét, valamint leírnak egy láncrövidülést követő oxidációval képződő, M08 jelű metabolitot is [228]. Ezt a metabolikus útvonalat később az 5-F-cumyl-pegaclone esetében is publikálták [229]. Ezek alapján a kísérleti eredmények és az irodalmi adatok összevetésével egyértelműen meghatározhatóvá vált a $C_{23}H_{23}N_2O_4$ elemi összetételű

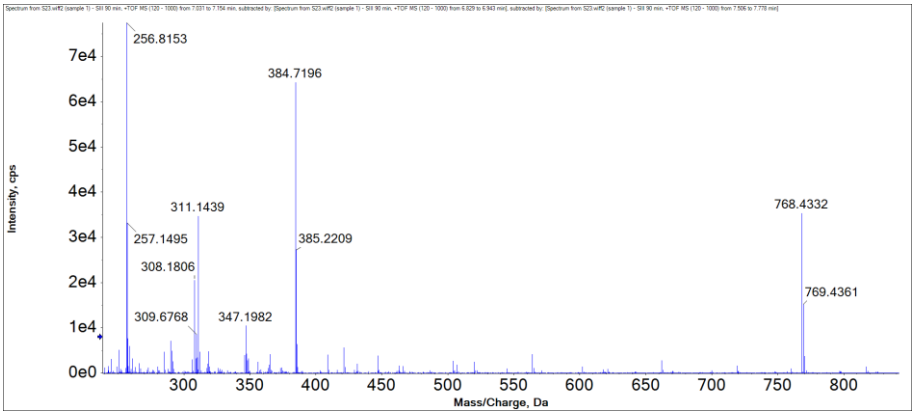
molekula szerkezete. A metabolitok kialakulását az alkillánc rövidülése és oxidációja, valamint a molekula különböző részein végbemenő oxidációs (hidroxileződési) folyamatok együttesen eredményezték. Ezen metabolitok egyértelmű azonosításában a nagyfelbontású tömegspektrometria kulcsszerepet játszott.

A nagyfelbontású tömegspektrométerek azonban nem csupán a szerkezetazonosítás területén bírnak jelentőséggel, hanem egyre nagyobb szerepet kapnak a tényleges mennyiségi meghatározásokban is. Ennek feltétele az volt, hogy a műszerek fejlesztésével a detektált ionok mennyisége és a válaszjel széles koncentrációtartományban arányos kapcsolatba kerüljön. A leggyakrabban alkalmazott megoldás erre a célra a QTOF rendszer, amely funkcionálisan egy pulzáló üzemű analizátornak tekinthető. A folyamatosan keletkező ionokból a készülék meghatározott időközönként jól definiált ioncsomagokat juttat be a TOF analizátorba. A mennyiségi meghatározások megbízhatóságának kulcsa ezen ioncsomagok reprodukálható és kontrollált előállítása volt. A TOF analizátorok nagy felbontása és nagy adatgyűjtési sebessége ideálissá teszi ezeket a rendszereket mennyiségi meghatározások végrehajtására. A szelektivitást elsősorban a készülék felbontóképessége biztosítja: minél szűkebbre állítjuk az extrahált ionkromatogram (XIC) tömegablakát, annál hatékonyabban szűrhetők ki a zavaró ionok. A rendszer további előnye, hogy nem igényel klasszikus értelemben vett tömegspektrometriás módszerfejlesztést, mivel elegendő a tömegek meghatározása pásztázó módban. Ez különösen előnyös olyan esetekben, amikor a vizsgált molekula többszörösen töltött ionokat is képez, például peptidek vagy többfunkciós bázikus molekulák esetében. Erre példaként a furin inhibitor MI-1851 molekula (10. ábra) mennyiségi meghatározását mutatom be, amelyet humán mikroszómából kellett elvégezni. Az ábrán jól látható, hogy erősen bázikus vegyületről van szó, amelynek kromatográfiás és tömegspektrometriás vizsgálata egyaránt kihívást jelentett.



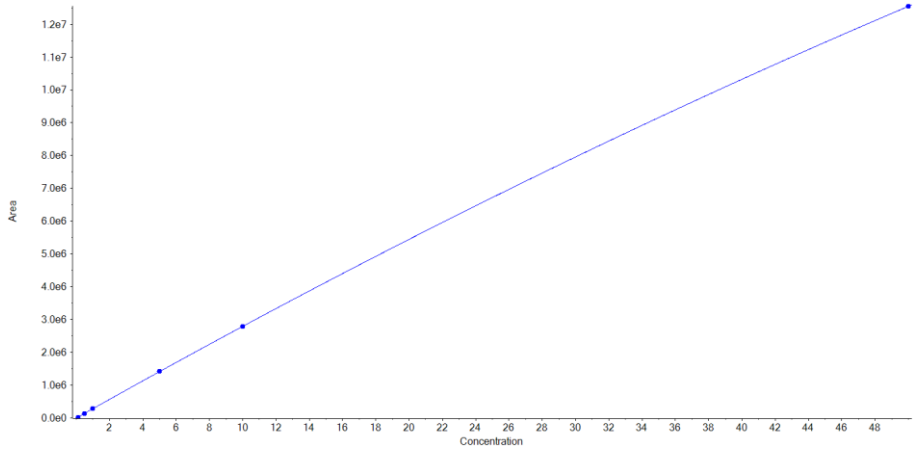
10. ábra. A furin inhibitor MI-1851 szerkezete

Pozitív ion módban többszörösen töltött ionok jelentek meg a spektrumban (11. ábra), és a töltéseloszlás a közeg pH-jára jellemző mintázatot mutatott. Az MI-1851 esetében egyszeres, kétszeres és háromszorosan töltött ionok voltak kimutathatók m/z 768,4332, 384,77196 és 256,8153 tömegeknél.



11. ábra. Az MI-1851 TOF-MS spektruma

A mennyiségi meghatározásokat a kétszeres és a háromszorosan töltött ionokra egyaránt elvégeztem a 0,1–50 µM koncentrációtartományban. Az 50 µM koncentráció kifejezetten magas érték, amelynél már nem minden esetben várható lineáris összefüggés az intenzitás és a koncentráció között. Ezt a mérések is igazolták, mivel a kalibrációs pontok közötti kapcsolatot kvadratikus függvény írta le a legnagyobb pontossággal (r=0,9999). A háromszorosan töltött ion esetében a görbeillesztés minősége kedvezőbbnek bizonyult, ezért a mennyiségi meghatározásokat végül erre az ionra alapoztuk (12. ábra) [SP5].



12. ábra. Az MI-1851 háromszorosan töltött ionjára illesztett kalibrációs görbe a 0,1–50 µM tartományban.

5.1.2. LC optimálás

Az érzékeny és megbízható tömegspektrometriás mennyiségi meghatározásokhoz önmagában egy nagy teljesítményű tömegspektrométer nem elegendő. A vizsgált

komponensek az esetek döntő többségében nem tiszta oldószerben, hanem komplex mátrixban vannak jelen, számos egyéb vegyület társaságában. Ezek a mátrixkomponensek jelentős hatással lehetnek a célmolekula tömegspektrometriás viselkedésére, elsősorban ionelnyomás vagy ionerősítés formájában, ami rontja a mérés érzékenységét és reprodukálhatóságát. Ezen zavaró hatások csökkentésére nyújt hatékony megoldást a folyadékkromatográfia. A kromatográfiás elválasztás során a célkomponens az állófázishoz kötődve visszatartható mindaddig, amíg a kevésbé visszatartott, zavaró mátrixkomponensek el nem hagyják az oszlopot. Ezt követően az eluens erősségének fokozatos növelésével a visszatartott komponensek időben elkülönítve eluálódnak. Ez az időben elnyújtott elúció biztosítja, hogy egy adott időpillanatban a lehető legkevesebb komponens jusson az ionforrásba, ezáltal az egymás ionizációjára gyakorolt zavaró hatás minimálisra csökkenjen. A kromatográfiás elválasztás alapját az állófázis és a mozgófázis közötti megoszlási egyensúly képezi, amely meghatározza a komponensek visszatartását és elúciós sorrendjét. A hatékony elválasztás érdekében mind az állófázist, mind a mozgófázist körültekintően kell megválasztani és optimalizálni. A kromatográfiás hatékonyság alatt jelen esetben nem csupán a felbontást értjük, hanem a módszer pontosságát, precizitását és időigényét is. A maximális módszerteljesítmény eléréséhez ezért az álló- és mozgófázis együttes, egymásra hangolt optimalizálása elengedhetetlen.

5.1.2.1. Mozgófázis optimálása

Polárosabb vagy ionos jellegű molekulák esetében a hagyományos C18-as fordított fázis gyakran csak mérsékelt visszatartást biztosít, sőt bizonyos esetekben a vegyületek egyáltalán nem kötődnek az állófázishoz, hanem gyakorlatilag átesnek az oszlopon. Ilyen esetekben vagy eltérő típusú állófázis alkalmazása válik szükségessé, vagy a vizsgált molekula effektív polaritását kell csökkenteni. A polaritás csökkentésének egyik bevált módja eluensmódosítók alkalmazása. Ezek olyan vegyületek, amelyeket kis koncentrációban adunk a mozgófázishoz, és a teljes kromatográfiás futás során jelen vannak a rendszerben. Munkám során trifluorecetsavat (TFA) peptidek és poláros gyógyszermolekulák elválasztásához, oktánszulfonsavat gyógyszermolekulák meghatározásához, valamint heptafluorobutánsavat (HFBA) biogén aminok mennyiségi meghatározásához alkalmaztam. Ezen eluensmódosítók közös jellemzője, hogy mindhárom szerves sav, valamint nagy térkitöltésű anionnal rendelkeznek. Ennek köszönhetően különösen alkalmasak bázikus és amfoter vegyületek C18-as állófázison történő kromatográfiás meghatározására. Bázikus vegyületek esetében a sav protonálja a

bázikus funkciós csoportot, így a molekula töltötté válik. A rendszerben jelen lévő nagy térkitöltésű anion (trifluor-acetát, oktilszulfonát, heptafluorobutirát) ionpárként leárnyékolja a keletkező pozitív töltést, aminek eredményeként az egész molekula kifelé semleges viselkedést mutat, és C18-as állófázison is megfelelő visszatartással rendelkezik.

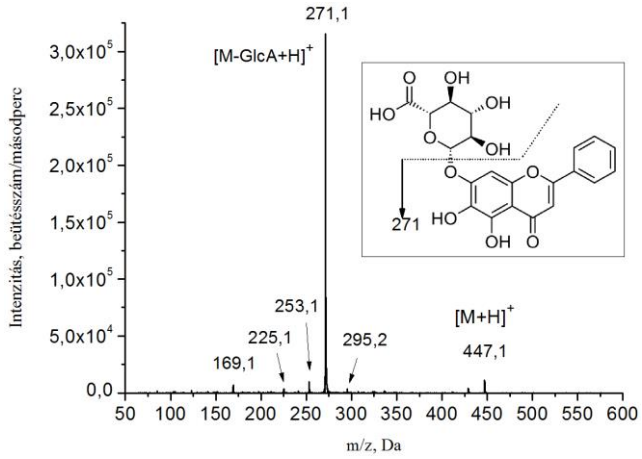
Egy korábbi munkánk során γ-aminovajsav (GABA), putreszcin (Put) és ornitin (Orn) mennyiségi meghatározását végeztük intracelluláris (citoszol) és extracelluláris mintákból [SP6]. A két mintatípusban jelentősen eltérő koncentrációk voltak jelen, ezért eltérő kalibrációs tartományokat kellett alkalmazni. A citoszol minták esetében 5 pontos kalibrációt használtunk az 1–100 µM tartományban, 10 µL injektálási térfogattal, míg az extracelluláris minták esetében 7 pontos kalibrációt alkalmaztunk a 0,05–10 µM tartományban, 30 µL injektálási térfogattal. A mérésekhez az irodalomból átvett, majd általam módosított módszert alkalmaztam [230]. A mozgófázisok 1% hangyasavat és 0,5% HFBA-t tartalmazó vízből, illetve azonos módon módosított acetonitrilből álltak. Az elválasztást egy Phenomenex Synergi Hydro-RP (150 × 3 mm, 4 µm) fordított fázisú oszlopon valósítottuk meg. A módszer gyakorlati hátrányát az eluensmódosító kellemetlen, vajsavszármazékra emlékeztető szaga jelentette, amely a mérések során – a legnagyobb körültekintés ellenére is – érezhető volt.

5.1.2.2. Állófázis optimálása

A megfelelő kromatográfiás állófázis kiválasztásakor több szempontot is figyelembe kell venni. Ezek közül az egyik legfontosabb az állófázis kémiai minősége, amely meghatározza az elválasztandó, illetve visszatartandó komponens és az állófázis közötti kölcsönhatások jellegét és erősségét. Amennyiben a kötődés túl gyenge, a visszatartás nem lesz elegendő, és a célmolekula a zavaró mátrixkomponensekkel együtt eluálódik. Ez ionelnyomást eredményezhet, amely jelentősen torzíthatja a mennyiségi meghatározás pontosságát. Ezzel szemben túl erős kötődés esetén a komponens nehezen eluálható, vagy szélsőséges esetben egyáltalán nem hagyja el az oszlopot. Az állófázisok kötőképességét a felületükön végrehajtott kémiai módosítások biztosítják. A legelterjedtebb esetben egy 18 szénatomos, apoláros alkil-lánc szolgál módosítóként; az így létrejövő oszlopok a klasszikus C18-as töltetek. Ezek univerzális állófázisnak tekinthetők, mivel számos – elsősorban mérsékelten poláros – vegyület esetében biztosítanak megfelelő visszatartást és elválasztást. A rutin módszerfejlesztések során ezek az oszlopok jelentik a leggyakrabban alkalmazott megoldást, és rendkívül széles választékban állnak rendelkezésre különböző fizikai paraméterekkel (oszlopátmérő, hossz, szemcseméret, pórusátmérő). A C18-as állófázishoz

kötött komponensek eluálása a mozgófázis szerves komponensének fokozatos növelésével történik, ami a klasszikus fordított fázisú kromatográfia alapelve. Joggal gondolhatnánk, hogy a fordított fázisú kromatográfiában már minden lényeges összefüggést feltártak. Ezt a feltételezést azonban sikerült megcáfolnunk egy, részben véletlen felfedezés során.

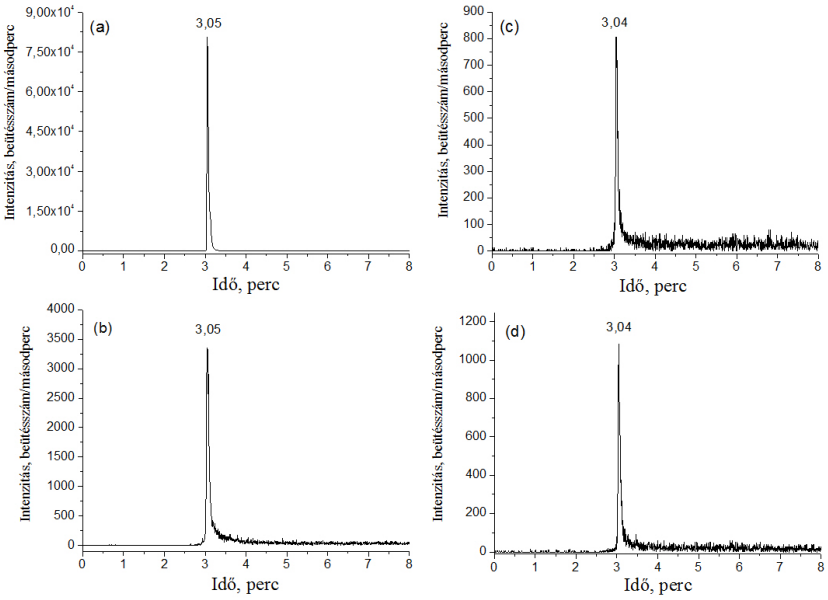
Egy együttműködés keretében bajkalin vezikulákból történő mennyiségi meghatározását vállaltuk. Mivel rendkívül alacsony bajkalinkoncentrációk mérésére volt szükség, egy különösen érzékeny, szelektív és gyors módszer kidolgozása vált szükségessé. Első lépésként a bajkalin tömegspektrometriás paramétereinek optimálását végeztük el. A bajkalin MSMS spektruma a 13. ábrán látható. Ennek alapján a mennyiségi meghatározáshoz az m/z 447,1 → 271,1 és az m/z 447,1 → 253,1 MRM átmeneteket választottuk ki.



13. ábra. A bajkalin szerkezete, MS/MS spektruma és az MRM-ben megjelenő ionokat eredményező fragmentációs folyamat.

A kromatográfiás módszer fejlesztése során egy általánosan alkalmazott HPLC eljárással indultunk: Purospher Star C18 kromatográfiás oszlopot (55 mm × 2 mm, 3 µm) használtunk, ahol az „A" eluens 0,1% hangyasavat tartalmazó víz, míg a „B" eluens 0,1% hangyasavat tartalmazó acetonitril volt. Első ránézésre egy működőképes módszert sikerült beállítani (14. ábra). A standard bajkalinminta injektálását követően azonban tiszta oldószerek (víz, acetonitril, metanol) injektálása során is megjelent egy zavaró csúcs a kromatogramban, éppen a bajkalin retenciós idejénél (14. ábra). Elsőként a molekula kitapadására gyanakodtunk, ezért hosszas oszlopmosási procedúrát alkalmaztunk, azonban ez nem vezetett eredményre. Másik, azonos típusú oszlopon végzett mérések során is ugyanezt a jelenséget tapasztaltuk. A bajkalin szerkezetéből adódóan kiváló vízoldhatósággal rendelkezik, ezért kizárható volt, hogy a molekula olyan mértékben kötődjön az apoláros állófázishoz, hogy még tiszta oldószerek injektálása esetén is

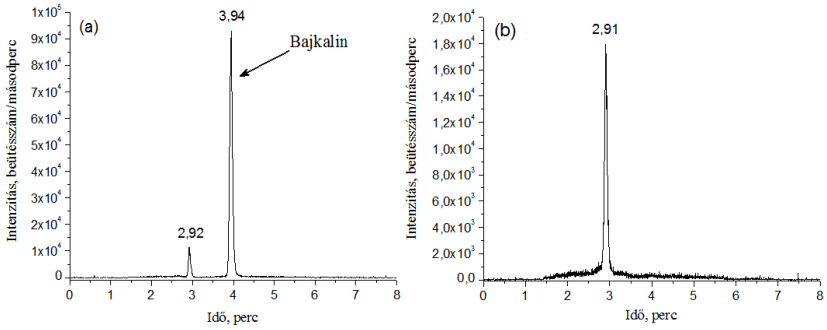
hosszasan megjelenjen. Friss eluensek alkalmazása, az injektortű mosási protokolljának megváltoztatása, sőt az injektálás teljes kiiktatása sem oldotta meg a problémát.



14. ábra. 10 µL térfogatban injektált bajkalin standard (a), víz (b), ACN (c) és MeOH (d) minták MRM kromatogramjai.

Mivel a fenti megoldások egyike sem vezetett eredményre, olyan állófázisokat is teszteltünk, amelyeket első körben nem választottunk volna. Így került sor az Agilent Zorbax SB-C8 állófázisú oszlop kipróbálására. Meglepő eredményt kaptunk: a bajkalin csúcsa mellett – ugyanazon MRM átmenetek alkalmazása mellett – egy másik csúcs is megjelent 2,91 perces retenciós időnél. A standard bajkalin injektálását követően alkalmazott tiszta metanol kromatogramjában a bajkalin retenciós idejénél nem jelent meg csúcs, ugyanakkor a 2,91 perces csúcs tiszta metanol injektálása esetén is megfigyelhető volt (15. ábra). Ez magyarázatot adott arra, hogy a korábbi módszereknél miért jelent meg minden esetben egy kis intenzitású csúcs akkor is, amikor kizárólag tiszta oldószereket injektáltunk. Ahogyan a tudományban oly sokszor, ebben az esetben is jelentős szerepe volt a véletlennek. A HPLC rendszer laboron belüli áthelyezését követően a bináris pumpák kommunikációs kábeleit véletlenül felcseréltük, aminek következtében a gradiensben az eluensek sorrendje megfordult. Ennek eredményeként – akaratunk ellenére – inverz gradienst alkalmaztunk a mérések során. Ezt a megoldást más állófázisok esetében is kipróbáltuk, azonban a jelenséget kizárólag a Zorbax SB-C8 oszlopnál tapasztaltuk. A megfigyelés hátterének tisztázása érdekében különböző összetételű víz–metanol izokratikus eluensrendszereket vizsgáltunk (0–100, 10–90, 20–80, 30–70, 40–60, 50–50).

Meglepő módon még 100% metanol alkalmazása mellett is kimutatható visszatartást tapasztaltunk a bajkalin esetében.



15. ábra. 10 µL bajkalin (a) és blank MeOH (b) MRM kromatogramjai egymás utáni injektálás során.

Közismert tény, hogy a kereskedelmi forgalomban kapható fordított fázisú oszlopok felületi borítottsága – az utókezelt, ún. *endcapped* kolonnákat leszámítva – nem tekinthető teljesnek. A szilikagél felületének szilanizálása során a szilanol csoportok mindössze 50–60%-a lép reakcióba, mivel az előzetesen rögzített metil-, etil-, propil- vagy egyéb ligandumok sztérikus gátlást okoznak, megakadályozva további ligandumok kötődését. Ennek következtében a felületen elreagálatlan, „szabad” szilanol csoportok maradnak vissza.

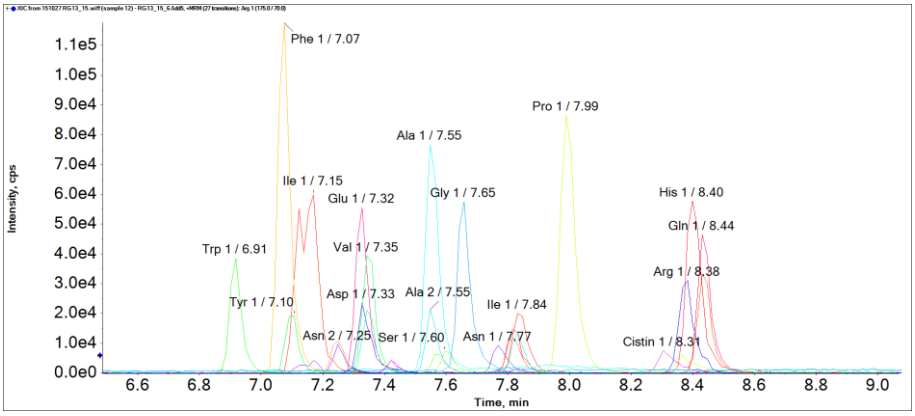
Az elmúlt években egyre több közlemény foglalkozott az új fejlesztésű, kevert retenciós mechanizmussal rendelkező (RPLC/HILIC) állófázisok vizsgálatával [231–233]. Ezekben a munkákban egyértelműen igazolták a kettős retenciós mechanizmus jelenlétét, valamint azt, hogy az ilyen oszlopok az alkalmazott eluensösszetételtől függően fordított fázisú vagy HILIC üzemmódban egyaránt működtethetők [234–236]. Ezen állófázisokra jellemző az ún. „U-görbe” alakú retenciós profil, amely a kevert RPLC/HILIC kromatográfiás viselkedés egyértelmű bizonyítéka [233,237]. Az általunk alkalmazott SB-C8 oszlop – más fordított fázisú kolonnákhoz viszonyítva – arányaiban több szabad szilanol csoportot tartalmaz. Ennek következtében az SB-C8 állófázis a klasszikus hidrofób kölcsönhatások mellett kifejezett poláros szelektivitást is mutat. A kidolgozott módszer során ezt az – irodalomban eddig nem részletezett – tulajdonságot használtuk ki. Természetesen a sikerhez elengedhetetlen volt a vizsgált vegyület, a bajkalin szerkezeti sajátossága is: a molekula egyaránt tartalmaz poláros és kevésbé poláros részegységeket. Az állófázis szabad szilanol csoportjai és a bajkalin poláros molekularésze közötti kölcsönhatás magyarázhatja a vegyület szokatlan retenciós viselkedését, amelynek eredményeként még 100% metanol alkalmazása mellett is megfelelő visszatartás volt

tapasztalható (retenciós idő: 3,34 perc). A kidolgozott módszer további előnye, hogy az elválasztás kezdeti szakaszában (20% víz – 80% MeOH) a mintában jelen lévő egyéb kismolekulák, szervetlen sók és biológiai mátrixkomponensek a magas szerves oldószertartalom következtében hatékonyan eltávolíthatók, így a bajkalin meghatározását ezek a komponensek kevésbé zavarják [SP7].

Az eluensmódosítók alkalmazásának egyik alternatívája poláros molekulák kromatográfiás vizsgálatánál az állófázis polaritásának megváltoztatása. Amennyiben a töltet felületét polárossá tesszük, a poláros komponensek megkötődése válik dominánssá. Ebben az esetben az erősebb eluens a nagyobb polaritású, jelen esetben a vizes fázis. A módszer lényege, hogy magas szerves oldószertartalom mellett történik az injektálás, amely során a poláros komponensek adszorbeálódnak az állófázison, majd a vizes fázis arányának növelésével valósul meg az elúció. Ezt a megközelítést alkalmaztuk szukcinát mennyiségi meghatározása során is, amikor egy Apex Amino oszlopon (100 × 2,1 mm, 3 µm) dolgoztunk, 10 mM ammónium-formiátot (pH = 3) tartalmazó vizes eluenssel és metanollal. A módszerrel megfelelő visszatartást és reprodukálható elválasztást értünk el [SP8].

A poláros molekulák kromatográfiás vizsgálata évtizedek óta jelen van laboratóriumunk módszertani palettáján. A biogén aminok, aminosavak és savas metabolitok mérése mellett felmerült az igény az epigenetikai változások során keletkező DNS-metilációs termékek (5-metil-citozin, 5-hidroxi-metil-citozin), valamint a változatlan nukleinsavbázisok mennyiségi meghatározására is. A korai módszerfejlesztési kísérleteket klasszikus kromatográfiás oszlopokkal kezdtük, azonban ezek nem vezettek sikerre. Hosszas kísérletezés eredményeként egy porózus szilikaalapú oszlopra (Zorbax RX-Sil) esett a választásunk, amelyet a gyártó ajánlása szerint normál- és fordított fázisú környezetben egyaránt lehet alkalmazni. Kezdetben fordított fázisú módban használtam az oszlopot ammónium-formiátos puffer/acetonitril eluensrendszerrel [SP9]. Később felismertem, hogy normál fázisú üzemmódban – ahol a vizes eluens tekinthető erősebbnek – lényegesen hatékonyabb elválasztás érhető el. Az eluensek összetételét is módosítottam: az ammónium-formiátot mindkét eluens esetében hangyasavra cseréltem. Ennek eredményeként különösen az 5-hidroxi-metil-citozin esetében jelentősen javult az érzékenység, ami a módszer gyakorlati alkalmazhatóságát nagymértékben növelte. A kidolgozott eljárást számos epigenetikai témájú együttműködés során alkalmaztuk a DNS-metiláció mértékének kvantitatív jellemzésére [SP10], [SP11], [SP12]. Az RX-Sil oszlop alkalmazása új perspektívát nyitott számunkra a poláros biomolekulák kromatográfiás

vizsgálatában. Egy ipari együttműködés keretében a szabad aminosavak mennyiségi meghatározása volt a feladatom. Kezdetben ionpárképzést alkalmaztam – változó sikerrel –, majd kipróbáltam az RX-Sil oszlopot, amely áttörő eredményt hozott. Valamennyi aminosav megfelelő retencióval rendelkezett, és éles, jól definiált csúcsok formájában eluálódott az oszlopról. A teljes kromatográfiás futási idő 12 perc volt (16. ábra). A kidolgozott módszert éveken keresztül alkalmaztuk aminosavak mennyiségi meghatározására, amelynek során több ezer mintát analizáltunk rutinszerűen. A későbbiekben felmerült az igény arra, hogy a módszert az újszülöttkori szűrővizsgálatok analitikai követelményeihez is igazítsuk. Ennek érdekében a módszer további finomhangolását követően teljes körű validálást végeztünk, majd az eljárást publikáltuk [SP4].

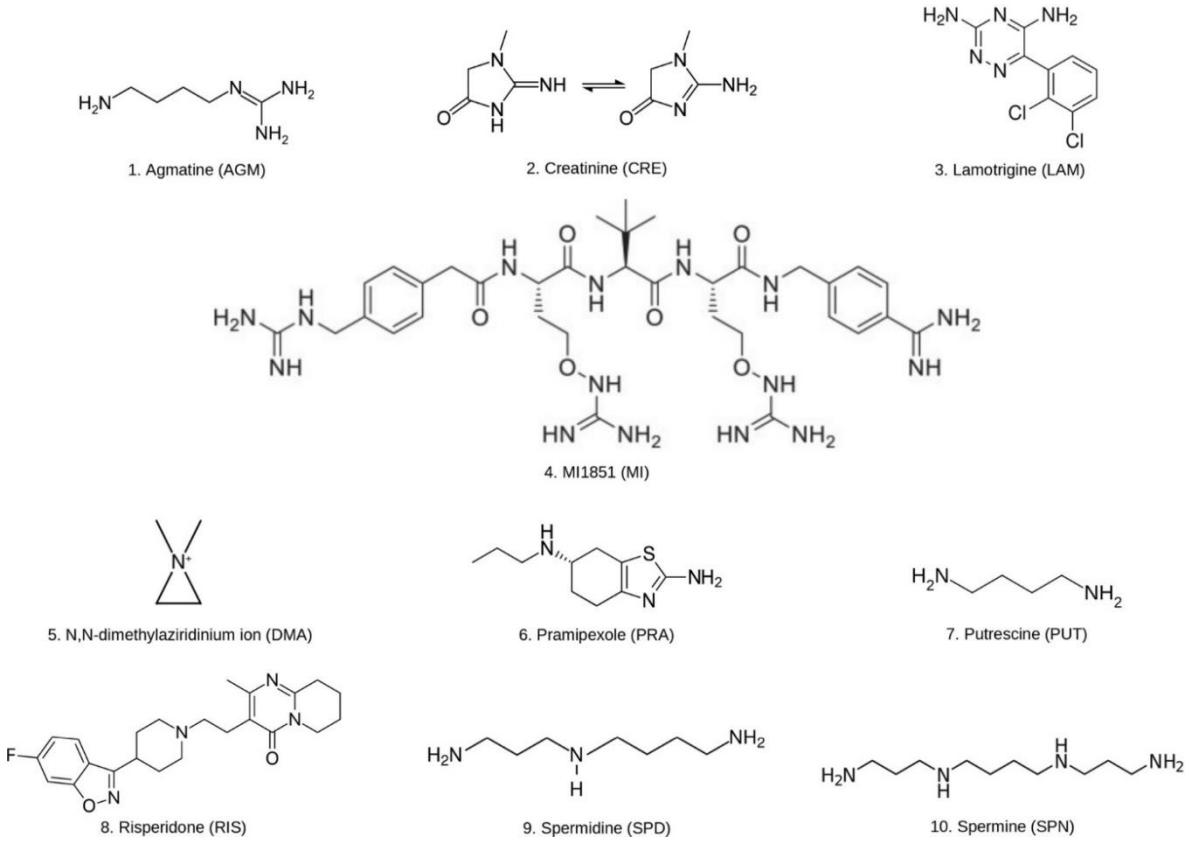


16. ábra. Szabad aminosavak elválasztása RX-Sil oszlopon

Az RX-Sil oszlop egyúttal kielégítő, ionpárképzést nem igénylő („szagtalan”) alternatívát kínált a korábban ionpárképzéssel meghatározott biogén aminok analízisére is. A vizsgálatok során γ-aminovajsavat (GABA), putreszcint (Put), spermidint (Spd) és sperminet (Spn) jelöltük ki célmolekulaként. A négy vegyület megfelelő visszatartással, éles és szimmetrikus csúcsok formájában eluálódott az oszlopról, ami érzékeny és reprodukálható méréseket tett lehetővé. A módszert sikerrel alkalmaztuk a felsorolt biogén aminok mennyiségi meghatározására különböző biológiai mintákban [SP13].

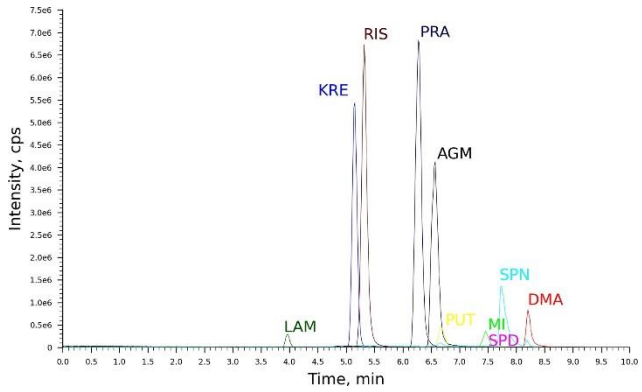
A poláros, bázikus karakterű molekulák kromatográfiás vizsgálata a gyakorlatban gyakran nagyobb kihívást jelent, mint azt szerkezetük alapján várnánk. A rutinszerűen alkalmazott fordított fázisú C18 oszlopok ezeknél a vegyületeknél sok esetben nem biztosítanak megfelelő visszatartást és csúcsalakot, ugyanakkor az alternatív megoldásként kínálkozó hagyományos HILIC módszerek sem univerzálisan alkalmazhatók minden ilyen jellegű analitra. További nehézséget okoz, hogy szerkezetileg és fizikai-kémiai

tulajdonságaikban hasonló poláros bázikus molekulák kromatográfiás viselkedése jelentősen eltérhet egymástól, ami megnehezíti az általános módszertani következtetések levonását. Ezen problémákra reagálva egy összehasonlító vizsgálatot végeztünk, amelynek célja különböző állófázisú oszlopok teljesítményének objektív értékelése volt poláros bázikus molekulák elválasztására. A vizsgálat során kilenc, eltérő kémiai karakterű állófázist hasonlítottunk össze, a klasszikus fordított fázisú oszlopoktól kezdve a hidrofil kölcsönhatáson alapuló (HILIC) fázisokig. (Függelék F1. táblázat) A méréseket gradiens elúcióban, három különböző pH-tartományban (savas, közel semleges és bázikus környezetben) végeztük, figyelembe véve a pH hatását mind a visszatartásra, mind a csúcsalakokra. A módszertani összehasonlítás megkönnyítése érdekében egy egyszerű, de jól reprodukálható rangsorolási rendszert dolgoztunk ki, amely a csúcsalakokat és az elválasztási felbontást vette alapul. Minden egyes mérési körülményt – az alkalmazott oszlop és pH kombinációját – ezen szempontok alapján értékeltük. A tesztkeverék tíz, eltérő szerkezetű poláros bázikus vegyületet tartalmazott (17. ábra, Függelék F2. táblázat), lehetővé téve annak vizsgálatát is, hogy mely analitok mutatnak széles módszertani toleranciát, és melyek igényelnek kifejezetten specifikus kromatográfiás feltételeket.



17. ábra. Az oszloptesztekhez használt tíz vegyület szerkezete és rövidítése.

Ezek a vegyületek korábban analitikai mérési céllal érkeztek a laboratóriumba. Az összehasonlító elemzés eredményeként sikerült azonosítani egy olyan állófázis–eluens–pH kombinációt, amely a vizsgált molekulák túlnyomó többségére nézve hatékony és robusztus elválasztást biztosított. (18. ábra) Valamennyi vizsgált vegyület esetében szimmetrikus csúcsalakot és kellő visszatartást sikerült elérnünk. Az eredmények rávilágítanak arra, hogy a poláros bázikus molekulák esetében az állófázis megválasztása és a pH finomhangolása legalább olyan jelentőséggel bír, mint az eluens összetétele. A kidolgozott rangsorolási szemlélet gyakorlati segítséget nyújthat új analitikai módszerek fejlesztésekor, és jól illeszkedik az állófázis-választás módszertani szempontjait tárgyaló fejezethez [SP14].



18. ábra. A tíz tesztvegyület elválasztása az RX-Sil oszlopon egy általános gradienst használva.

5.1.3. Mátrixok, mintaelőkészítés, mátrixhatás

Munkám során rendkívül változatos mátrixokból kellett célmolekulákat azonosítanom és mennyiségi meghatározásukat elvégeznem. Vizes minták esetében gyakorlatilag valamennyi releváns típus előfordult: ivóvíz, felszíni víz, szennyvíz, valamint szennyvíziszap. Egy kutatási projekt keretében nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentők érzékeny meghatározására dolgoztunk ki analitikai módszert. A vizsgálatok során Budapest több pontjáról származó csapvizet, a Duna mentén különböző helyszínekről gyűjtött felszíni vizeket, továbbá a Nyírségvíz Zrt. szennyvíztisztító telepeiről származó szennyvizet és szennyvíziszapot elemeztünk. Az egyik feladat egy olyan érzékeny analitikai módszer kidolgozása volt, amely alkalmas tíz különböző gyulladáscsökkentő szer mennyiségi meghatározására, elsősorban ivó- és felszíni vizek esetében. Mikro-HPLC és on-line szilárd fázisú dúsítás alkalmazásával az addig elérhető módszerekhez képest lényegesen alacsonyabb kimutatási (LOD) és mennyiségi meghatározási határértékeket

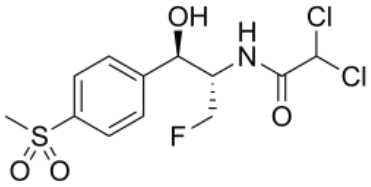
(LOQ) sikerült elérni [SP15]. Egy másik projektben egy új típusú szennyvíztisztítási eljárás analitikai hátterét biztosítottuk. Bizonyos baktériumtörzsek képesek a vizekben jelen lévő szerves mikroszennyezők – többek között gyulladáscsökkentők – lebontására. A kísérletek célja az volt, hogy meghatározzuk az érkező és távozó szennyvízben, valamint a szennyvíziszapban jelen lévő gyulladáscsökkentők koncentrációját, ezáltal képet kapva a baktériumok által lebontott vegyületek mennyiségéről. A mintaelőkészítés minden esetben egyszerű centrifugálással történt, a tiszta felülúszót közvetlenül injektáltuk a HPLC–MS/MS rendszerbe.

A laboratóriumba érkező minták legnagyobb része biológiai eredetű. Ezekből egyaránt meghatározhatók endogén komponensek, valamint exogén anyagok, például gyógyszerek vagy toxinok. A biológiai mátrixok komplexitása jelentősen eltérő lehet. Az egyik legegyszerűbb biológiai mátrixnak a vizelet tekinthető, mivel ideális esetben nem tartalmaz fehérjéket, csupán szervetlen ionokat és kis molekulatömegű szerves vegyületeket. Ennek megfelelően a mintaelőkészítés is viszonylag egyszerű: általában elegendő a centrifugálás és/vagy szűrés, majd a minta közvetlenül mérhető.

Egy vizsgálatunk során gyógyszermolekulák és tudatmódosító szerek mennyiségi meghatározását végeztük vizeletmintákból. Az érzékeny mérések lehetővé tették a vegyületek szervezetből történő kiürülésének nyomon követését is. A módszer tesztelésére egy önkéntes kolléga vizeletmintáját különböző gyógyszermolekulákkal addícionáltuk, annak érdekében, hogy egy mintegy 300 komponens mérésére alkalmas eljárást validáljunk. Valamennyi hozzáadott komponenst sikerült azonosítani, ugyanakkor pozitív találatot kaptunk egy olyan vegyületre is, amely nem szerepelt az addíciós keverékben. Ez a molekula a kinin volt, amelynek forrása a hétvégi rendezvényen elfogyasztott tonik üdítőital egyik komponenseként volt azonosítható.

A biológiai minták jelentős része plazma formájában kerül hozzánk vizsgálatra. A plazma fő alkotója a víz, amely oldott fehérjéket, ásványi anyagokat, glükózt, valamint különféle endogén és exogén szerves molekulákat tartalmaz. Analízis előtt elengedhetetlen a fehérjék eltávolítása, amelyet rendszerint hideg metanol vagy acetonitril 3–4-szeres fölöslegben történő hozzáadásával végeztünk. A fehérjék kicsapódását követően centrifugálással választottuk el a felülúszót, amelyből a célmolekulák közvetlenül meghatározhatók voltak. Meg kell jegyezni, hogy a fehérjekicsapás veszteséggel járhat, amennyiben a vizsgált vegyület erős affinitást mutat a fehérjékhez. Ezt az eljárást alkalmaztam többek között gyógyszerszintek meghatározására és számos farmakokinetikai vizsgálat során a célmolekulák koncentrációjának mérésére.

A plazmánál összetettebb mátrixnak tekinthető az ízületi folyadék. Az Állatorvostudományi Egyetemmel folytatott együttműködés keretében a florfenikol (19. ábra) mennyiségi meghatározását végeztem el plazmából és ízületi folyadékból egyaránt.



19. ábra. A florfenikol szerkezete

A florfenikol széles spektrumú antibakteriális hatással rendelkező, elsősorban az állatorvosi gyógyászatban alkalmazott hatóanyag. A farmakokinetikai vizsgálatok során a florfenikol koncentrációját plazmaminták esetében 72 órás időintervallumban összesen 17 időpontban, míg ízületi folyadék esetében ugyanazon időtartam alatt 10 időpontban határoztuk meg. A mintaelőkészítés mindkét mátrix esetében azonos módon történt: 100 µL plazmához vagy ízületi folyadékhoz 300 µL acetonitrilt adtam. A fehérjék azonnal kicsapódtak, a folyamatot vortex keveréssel tettem teljessé, majd centrifugálást követően a felülúszót közvetlenül analizáltam. Meg kell jegyezni, hogy az ízületi folyadék lényegesen viszkózusabb mátrix a plazmánál, ezért a minták kezelése során szélesebb nyílású pipetta alkalmazása vált szükségessé [SP16], [SP17].

Egy viszonylag kevéssé elterjedt biológiai mátrix, a nyál analitikai vizsgálatával is foglalkoztunk. A Testnevelési Egyetem részéről érkezett megkeresés egy olyan kutatási projekt kapcsán, amely a pillanatnyi stressz molekuláris szintű hatásait vizsgálta. A nyál különösen alkalmas mátrix a szervezetet érő akut hatások gyors jelzésére, így a stresszválasz tanulmányozására is. A vizsgálat célja annak feltárása volt, hogy kimutatható-e összefüggés a nyál kortizon- és kortizolszintje, valamint a szervezetet érő stresszhatás között. A kísérletben egy 20 fős katasztrófavédelmi egység vett részt önkéntesként. Egy riasztást követően – amely kifejezetten a vizsgálat céljából megszervezett vakriasztás volt – mind a 20 résztvevőtől nyálmintát vettek egy speciálisan nyálmintavételre kifejlesztett eszköz segítségével. A minták azonnal a laboratóriumba kerültek, ahol feldolgozásukat követően meghatároztuk a stresszhormonok koncentrációját. A mintaelőkészítés egyszerű volt: a mintavételi csőből centrifugálással nyertük ki a nyálat, amelyet ezt követően hígítottunk, újra centrifugáltunk, majd közvetlenül mértük. Kontrollértékként valamennyi önkéntestől rendelkeztünk nyugalmi állapotban vett mintával is. Az eredmények egyértelműen igazolták, hogy az akut stresszhatás rövid időn belül jelentős emelkedést

okoz a nyál stresszhormon-szintjében. A 20 résztvevő közül 18 esetében volt megfigyelhető egyértelmű koncentrációnövekedés. A két változatlan érték eltérő okokra volt visszavezethető. Az egyik önkéntes tisztában volt a riasztás kísérleti jellegével, így nála nem alakult ki stresszválasz. A másik esetben a kontrollmintavételt megelőzően egy felettesi megbeszélés zajlott, amelynek következtében az alapérték már eleve emelkedett stresszállapotot tükrözött.

Ezzel párhuzamosan egy alternatív, nyálból történő kortizon/kortizol-meghatározási módszert is kidolgoztunk, amely származékképzésen alapuló érzékenységnövelést tett lehetővé. A nyálmintavétel ebben az esetben is speciális gyűjtőcsővel történt, majd a mátrix kinyerését követően folyadék–folyadék extrakcióval és bepárlással készítettük elő a mintát a származékképzéshez [SP18].

Az analitikai kémia egyik alapvető feltételezése, hogy a vizsgált célmolekula a mérés pillanatában hozzáférhető, azaz a mintaoldatban szabad formában van jelen. A modern biológiai és gyógyszertechnológiai alkalmazások azonban egyre gyakrabban kérdőjelezik meg ezt az alapfeltevést. Napjainkban ugyanis mind a természetes biológiai rendszerekben, mind a mesterségesen előállított gyógyszerformulákban egyre nagyobb szerepet kapnak azok a struktúrák, amelyek a célmolekulákat fizikai értelemben elkülönítik környezetüktől. A sejtek által termelt és kibocsátott vezikulák – mint például az exoszómák és mikrovezikulák – a sejtközi kommunikáció alapvető elemei. Ezek a lipid kettősréteggel határolt nanoméretű struktúrák specifikus fehérjéket, nukleinsavakat és kis molekulatömegű metabolitokat képesek szállítani. Tartalmuk nem véletlenszerű: összetételük információt hordoz a sejtek aktuális állapotáról, és egyre több bizonyíték utal arra, hogy betegségek korai stádiumában is jellegzetes molekuláris mintázatot mutatnak. Ennek megfelelően a vezikulákban található molekulák analitikai meghatározása kiemelt jelentőséggel bír biomarker-kutatások és diagnosztikai fejlesztések szempontjából. A „becsomagolt” molekulák problémája azonban nem kizárólag a természetes biológiai rendszerekre korlátozódik. A modern gyógyszerfejlesztésben egyre szélesebb körben alkalmaznak olyan formulázási stratégiákat, amelyek célja a hatóanyagok védelme, célzott szöveti eljuttatása vagy felszabadulásuk időbeni szabályozása. Ennek egyik legelterjedtebb megvalósítása a liposzómák alkalmazása, amelyek lipidburokba zárt formában tartalmazzák a hatóanyagot. A liposzómás gyógyszerformák lehetővé teszik a toxicitás csökkentését, a terápiás hatékonyság növelését, valamint a gyógyszerszintek kontrollált fenntartását a szervezetben. Ezekben a rendszerekben azonban az analitikai mérés nem egyszerűen a célmolekula koncentrációjának meghatározását jelenti. A vizsgált vegyület

ugyanis nem szabadon oldott állapotban van jelen, hanem egy fizikailag elkülönített, zárt térben helyezkedik el. Ennek következtében a mérés egyik kritikus lépése a célmolekula felszabadítása a vezikuláris vagy liposzómás burokból. Amennyiben ez a lépés nem teljes vagy nem reprodukálható módon történik meg, az közvetlenül torzítja a kapott koncentrációértékeket.

A munkánk során mind természetes eredetű vezikulákhoz, mind mesterségesen előállított liposzómás rendszerekhez kapcsolódó analitikai feladatokkal foglalkoztunk. A mérési stratégia központi eleme egy egyszerű, de hatékony acetonitriles feltárási lépés volt, amely biztosította a lipidburok roncsolását és a célmolekulák felszabadítását. Több együttműködés keretében liposzómába zárt doxorubicin mennyiségi meghatározását végeztük el, amely lehetővé tette a kiindulási hatóanyag-koncentráció pontos meghatározását, ami alapvető fontosságú a dózisbeállítás szempontjából. Ezt követően a liposzómákból felszabaduló, a szervezetbe jutó gyógyszerszintek meghatározása is megvalósult.

Végül, de nem utolsósorban meg kell említeni a hajat mint biológiai mátrixot. Míg a nyál elsősorban a rövid távú változások nyomon követésére alkalmas, addig a haj a hosszú távú hatások vizsgálatát teszi lehetővé. A szervezetben jelen lévő molekulák – endogén és exogén vegyületek egyaránt – folyamatosan beépülnek a haj szerkezetébe. A haj szegmentált vizsgálatával időbeli információk nyerhetők, a haj hosszától függően akár több hónapra visszamenőleg is.

Laboratóriumunkban kortizon- és kortizolszintek meghatározását végeztük hajmintákból. A mintaelőkészítés során a hajminták tömegét pontosan meghatároztuk annak érdekében, hogy az eredményeket tömegre vonatkoztatott koncentrációként adhassuk meg. Ezt követően a haj felszínén található zsíros szennyeződéseket gyors izopropanolos öblítéssel távolítottuk el, majd a zsírtalanított hajszálakat zárható mintatartó edénybe helyeztük. Annyi metanolt adagoltunk hozzájuk, hogy a hajszálakat teljes mértékben ellepje, majd a mintákat egy éjszakán át állni hagytuk. Másnap a hajszálakat eltávolítottuk, a metanolos kivonatot inert atmoszféra alatt bepároltuk, majd meghatározott térfogatú mintaoldóban újra feloldottuk a visszamaradó anyagokat, és elvégeztük a kortizon/kortizol mennyiségi meghatározását. Az így kapott értékeket a haj tömegére vonatkoztatva összehasonlítható koncentrációadatokat kaptunk.

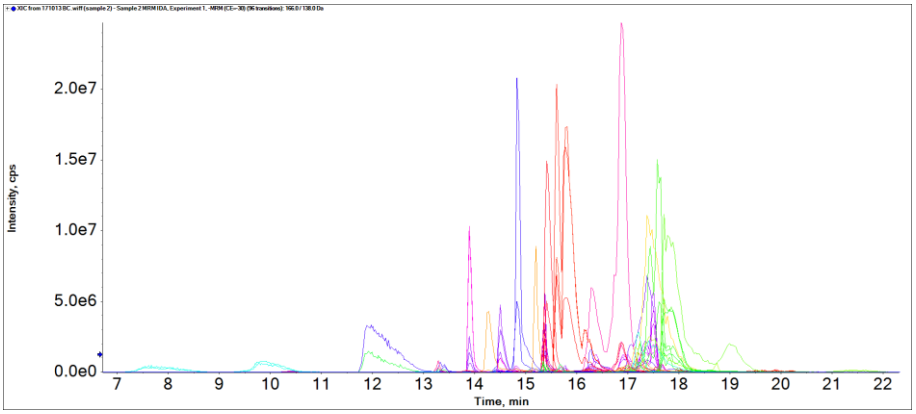
Eddig elsősorban biológiai rendszerekből, illetve különböző vizes mátrixokból származó komponensek analitikai meghatározását mutattam be. Ezek között szerepeltek egyszerűbb mátrixok, mint a víz vagy a vizelet, valamint összetettebb rendszerek is, például

a plazma vagy az ízületi folyadék. Bár ezen mátrixok mindegyike komoly analitikai kihívásokat jelentett, egy ipari megbízás keretében olyan mintával kellett dolgoznom, amely komplexitásában és kezelhetőségében messze túlmutatott a korábban bemutatott rendszereken. A feladat egy nitrálási reakció során keletkező melléktermékek azonosítása és különböző mintákban való eloszlásuk összehasonlítása volt. Már a megbízás kezdetén nyilvánvalóvá vált, hogy a vizsgálat szokatlan megközelítést igényel, mivel a mintamátrix rendkívül agresszív kémiai környezetet jelentett. A korábban ezzel a feladattal megkeresett analitikai laboratóriumok egyike sem vállalta a vizsgálat elvégzését, ami önmagában is jól jelzi a probléma nehézségét. A vizsgálandó mátrix ugyanis nem volt más, mint 92%-os kénsav. Ez nem elírás: a feladat során koncentrált kénsavban jelen lévő szerves komponensek azonosítását kellett elvégezni. A reakció a toluol nitrálása volt, amely során a főtermék mellett különböző nitrálási melléktermékek keletkeztek, ezek analitikai elkülönítése és kimutatása azonban rendkívüli kihívást jelentett a mátrix extrém kémiai tulajdonságai miatt. Az ipari folyamat első lépésében hagyományos nitrálóelegy alkalmazásával dinitro-toluolt állítanak elő. Ezt egy jóval erélyesebb nitrálási lépés követi, amelyben a kénsavat óleum váltja fel a salétromsav mellett, így keletkezik a végtermék, a TNT. A második lépésben visszamaradó savat visszavezetik az első reakciólépésbe, ahol újra felhasználják. Ismert, hogy kémiai reakciók során melléktermékek változó mennyiségben szinte mindig keletkeznek. Amennyiben a reakcióban valamely komponens – legyen az oldószer, katalizátor vagy reaktáns – visszaforgatásra kerül, fennáll annak a veszélye, hogy ezek a melléktermékek a rendszerben feldúsulnak. A nitráláshoz használt, visszaforgatott kénsavban jelen lévő szennyező komponensek szerkezetének ismerete hozzájárulhat a reakciókörülmények optimalizálásához, ezáltal a melléktermék-képződés visszaszorításához. A laboratóriumba összesen három minta érkezett: egy 92%-os kénsavat tartalmazó minta, valamint két kétfázisú minta, amelyek esetében a felső fázis szerves, az alsó fázis pedig szervetlen savakat és fémsókat tartalmazó vizes fázis volt. A mintákat eltérő mintaelőkészítési eljárásokkal dolgoztam fel. Mivel a cél szerves komponensek azonosítása volt, kézenfekvő megoldásként folyadék–folyadék extrakciót alkalmaztam. Extraháló oldószerként toluolt választottam, mivel feltételezhető volt, hogy a keletkező melléktermékek többsége toluol-származék, így toluolban jó oldhatóságot mutat. Az extrakciót igyekeztem a lehető legrövidebb idő alatt elvégezni annak érdekében, hogy az extrakció során alkalmazott toluol savas közegben történő elreagálását minimalizáljam. A kétfázisú minták esetében mindkét fázist külön vizsgáltam. A vizes fázisok toluolos extrakciója problémamentesen kivitelezhető volt. A szerves fázist átpipettáztam egy

mintatartó edénybe, majd nitrogénáram alatt bepároltam, és a visszamaradó anyagokat 1 mL acetonitrilben oldottam fel. Az így kapott oldatot közvetlenül mértem. Mivel az extrakció mindig magában hordozza az egyes komponensek részleges elvesztésének kockázatát, hígításos mintaelőkészítést is alkalmaztam. A szerves fázist tízszeresére hígítottam acetonitrillel, míg a vizes fázist tízszeresére vízzel. A hígításos módszer előnye, hogy komponensvesztéssel nem kell számolni, hátránya viszont a koncentrációcsökkenés, ami megnehezítheti az alacsony mennyiségben jelen lévő komponensek azonosítását. A mintákról Bifenil állófázisú oszlopon, gradiens elúció alkalmazásával LC–MS és MS/MS méréseket végeztem negatív ion módban. A kapott spektrumok értékelése során jellegzetes ionokat és semleges vesztéseket kerestem, amelyek egyes funkciós csoportok vagy molekularészletek jelenlétére utaltak. Ilyen jellegzetes vesztések voltak például:

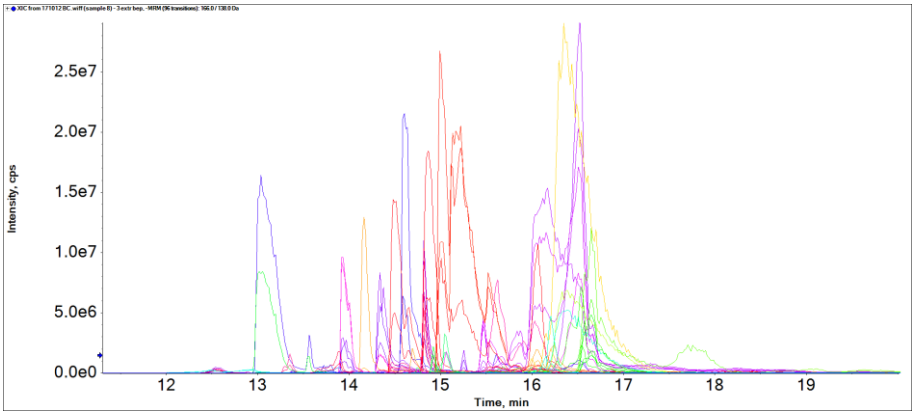
- a karboxilcsoportot tartalmazó molekulák esetében a 44 Da tömegű semleges vesztés (CO_2),
- a szulfonsavcsoportot tartalmazó molekulák esetében a 80 Da tömegű vesztés (SO_3),
- a nitrocsoportokat tartalmazó molekulákra jellemző 30 Da (NO) és 46 Da (NO_2) semleges vesztések,
- számos molekula esetében megfigyelhető volt a 109 m/z értékű fragmension megjelenése.

A kapott MS/MS spektrumok alapján egy MRM-listát állítottam össze, amelybe minden olyan komponenst felvettem, amely bármelyik mintában detektálható volt. Ennek segítségével meghatároztam az egyes komponensek eloszlását a különböző mintákban és fázisokban. A kénsavmintából vizes hígítással előkészített minta MRM kromatogramjában viszonylag kevés komponens volt detektálható, ami részben a jelentős hígulás következménye lehetett. Logikus feltételezés volt, hogy a tömény kénsavas minta toluolos extraktja jelentős mennyiségű szerves melléktermeket tartalmaz majd. Az MRM mérések azonban rámutattak arra, hogy még a rövid extrakciós idő ellenére is az extrakcióhoz használt toluol reakcióba lépett a kénsavval, és számottevő mennyiségű toluol-szulfonsav keletkezett. Ezzel szemben a kétfázisú minta szerves fázisának toluolos extraktjából készült MRM kromatogram (20. ábra) már jóval több komponenst tartalmazott, amelyek a mintában jelentős mennyiségben voltak jelen.



20. ábra. A kétfázisú minta szerves fázisából készült toluolos extrakt MRM kromatogramja

A kétfázisú minta vizes fázisa esetében többféle mintaelőkészítési stratégiát is alkalmaztam. Első lépésben toluolos folyadék–folyadék extrakciót végeztem, majd a keletkezett szerves fázist bepároltam, és acetonitrilben történő visszaoldást követően MRM körülmények között vizsgáltam. Amint az a 21. ábrán látható, ebben az esetben komponensekben gazdag, nagy intenzitású kromatográfiás csúcsokat sikerült detektálni.



21. ábra. Az S3 minta toluolos extraktjának MRM kromatogramja

Ezzel szemben a vizes fázis esetében alkalmazott hígításos mintaelőkészítési technikák nem eredményeztek hasonló intenzitású jeleket. Ennek oka elsősorban az volt, hogy a hígítás hatására a már eleve alacsony koncentrációban jelen lévő komponensek tovább hígultak, ami jelentősen megnehezítette azok detektálását és azonosítását.

A biológiai mintavételezés egyik elterjedt és különösen praktikus módja a szűrőpapírra vett vércsepp módszer (dried blood spot, DBS), amelyet rutinszerűen alkalmaznak az újszülöttkori szűrések során is. A módszer magyarországi bevezetését célzó kísérletekben magam is részt vettem. A laboratóriumba érkezett, speciális szűrőpapíron rögzített vércseppeket a jelölés mentén kivágtuk, majd Eppendorf csövekbe helyeztük. A mérni kívánt komponenseket – elsősorban aminosavakat és acilkarnitineket –

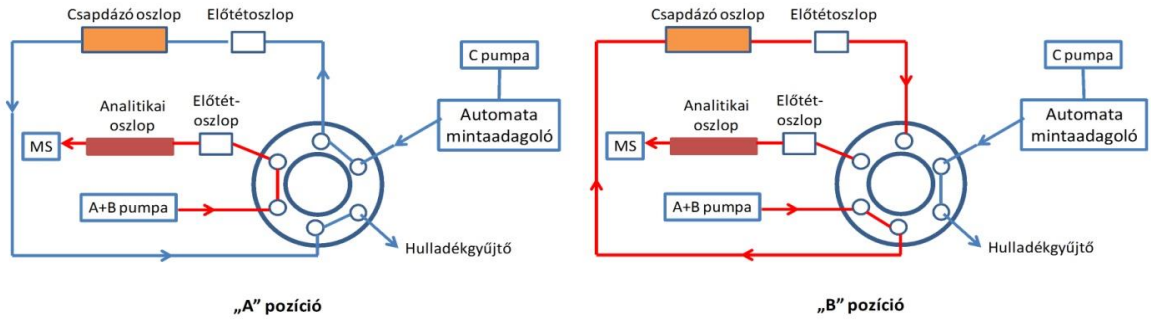
metanollal extraháltuk. Az extrakciót követően a szűrőpapírt eltávolítottuk, a visszamaradó oldatot nitrogénáram alatt szárazra pároltuk, majd izotópjelzett belső standard hozzáadása után mintaoldóban oldottuk fel. Az így előkészített mintákat a folyadékáramba közvetlenül injektálva határoztuk meg az analitok koncentrációját.

5.1.4. Érzékenység növelése

A mennyiségi meghatározások egyik legkritikusabb paramétere az érzékenység. Érzékenység alatt azt a legalacsonyabb koncentrációt értem, amely az adott analitikai módszerrel még megbízhatóan és egyértelműen meghatározható. Az analitikai módszerfejlesztések egyik alapvető célja ezért az érzékenység növelése, azaz minél alacsonyabb koncentrációszintek elérése. Az érzékenység javításának egyik legegyenesebb – ugyanakkor költségigényes – módja egy nagyobb érzékenységű tömegspektrométer alkalmazása. Ennek hiányában azonban a meglévő műszeres és módszertani lehetőségek optimális kihasználásával is hatékony megoldások dolgozhatók ki. Számos olyan megközelítés létezik, amelyek önállóan, illetve egymással kombinálva is jelentős mértékben képesek növelni egy analitikai módszer érzékenységét.

5.1.4.1. On-line SPE

Az érzékenység növelésének egyik hatékony módszere a mintaelőkészítési oldalon alkalmazott on-line szilárd fázisú extrakció (on-line SPE). A módszer sematikus felépítését az 22. ábra szemlélteti.



22. ábra. Az on-line SPE rendszer sematikus felépítése

Az injektálás – amely sok esetben nagy térfogatú is lehet – egy csapdázó (előkoncentráló) oszlopra történik. A csapdázást követően mosási lépés következik, amelyet egy külön pumpa (C pumpa) biztosít, majd a visszatartott komponensek egy analitikai oszlopra kerülnek átvezetésre és ott történik a kromatográfiás elválasztás és detektálás. A rendszerben két előtétoszlop alkalmazása vált szükségessé annak érdekében,

hogy a nagy térfogatú injektálással bekerülő mátrixkomponensek ne szennyezzék sem a csapdázó, sem az analitikai oszlopot [SP7].

Az on-line SPE alkalmazásának előnye nem korlátozódik az érzékenység növelésére. A mintaelőkészítés és az analitikai elválasztás hatékony összekapcsolásával a teljes mérési idő is jelentősen csökkenthető. Amennyiben a mosási fázis időben és áramlásilag is jól elkülöníthető az analitikai elválasztástól, az analitikai oszlopon meredekebb gradiens is alkalmazható zavaró hatások nélkül. Ezt a megközelítést alkalmazva a ciklosporin vérszint-meghatározásának teljes futási idejét 3 percre sikerült csökkenteni.

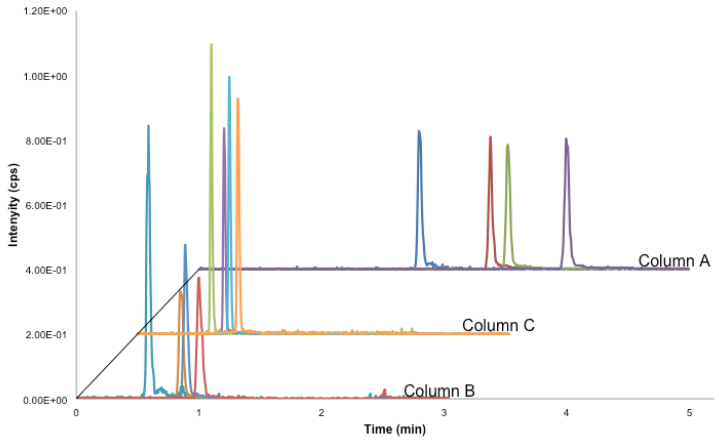
5.1.4.2. Az oldószer erősségének szerepe nagy térfogatok injektálása esetén

Alacsony koncentrációban jelen lévő komponensek meghatározásakor gyakran szükségessé válik nagy térfogatú minták injektálása, különösen olyan esetekben, amikor a mintaelőkészítés során elkerülhetetlen a szerves oldószer arányának növelése. Ilyen helyzettel találkoztunk például vérplazmából történő szteroidmeghatározások során, ahol a fehérjék kicsapása céljából a mintához háromszoros térfogatú szerves oldószert (metanolt vagy acetonitrilt) adtunk. Ennek következtében a mérésre kerülő minta akár 75% szerves oldószert is tartalmazhatott, ami nagy térfogatú injektálás esetén jelentős csúcstorzulást eredményezhet.

Munkánk során négy szteroidmolekula (kortizol, tesztoszteron, androsztendion és progeszteron) érzékeny kimutatására alkalmas LC–MS módszert dolgoztunk ki mikro-UHPLC körülmények között [SP19]. Az első lépés az optimális kromatográfiás oszlop kiválasztása volt, amelyhez három különböző méretű, töltetű és szemcsetípusú oszlopot teszteltünk.

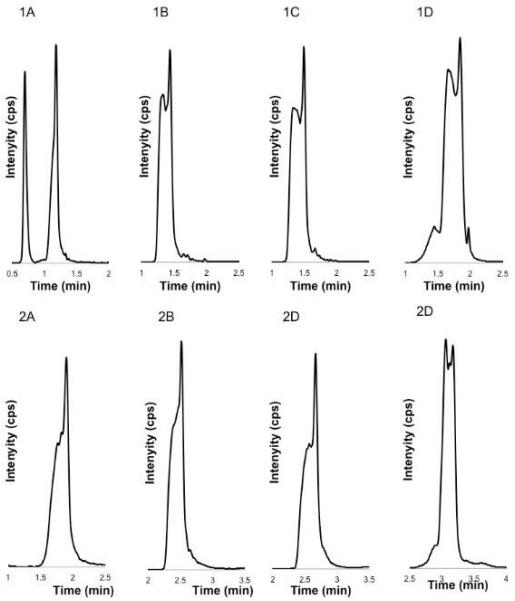
- Oszlop A: Eksigent ChromXP C18CL, 150 x 0,3mm, 3µm, 120Å,
- Oszlop B: Eksigent HALO Fused-core C18, 50 x 0,3mm, 2µm, 90Å,
- Oszlop C: Eksigent HALO Fused-core Phenyl Hexyl, 50 x 0,5mm, 2,7µm, 90Å.

A legjobb érzékenységet a C jelű oszlopon (Eksigent HALO Fused-core Phenyl-Hexyl, 50 × 0,5 mm, 2,7 µm, 90 Å) értük el (23. ábra). Az injektált oldószer erősségének és térfogatának a retenciós faktorokra gyakorolt hatását az A jelű oszlopon vizsgáltuk, két eltérő gradiens alkalmazásával (0,6 perc, illetve 1,8 perc). A mintákat vízből, metanolból, illetve acetonitrilből injektáltuk különböző térfogatban (50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000 és 5000 nL).



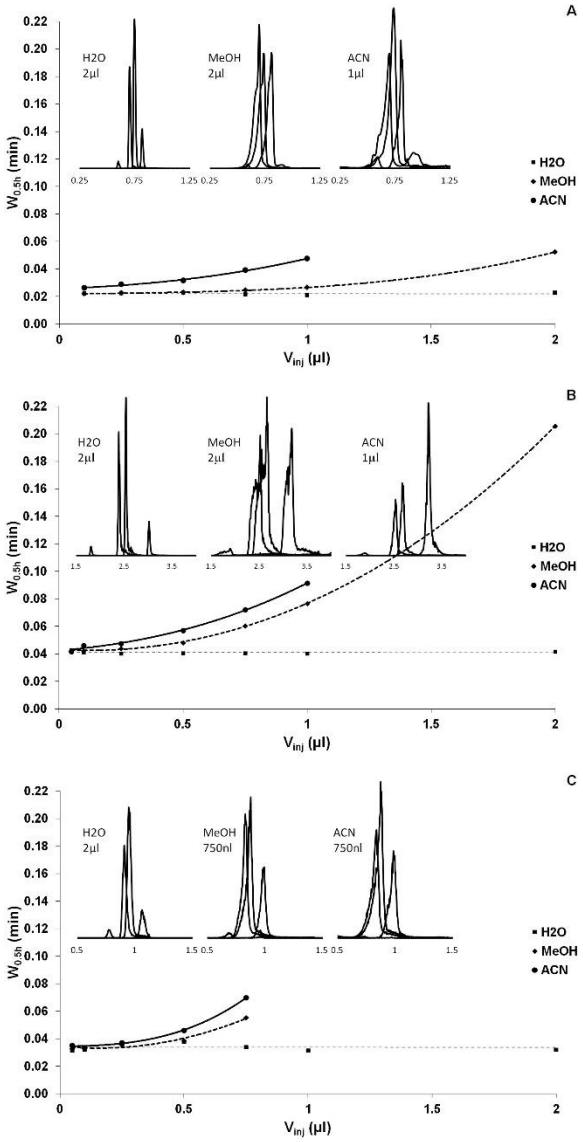
23. ábra. Négy modellvegyület normált csúcsprofiljai különböző kromatográfiás rendszerekben.

A csúcsok félértékszélességének elemzése alapján megállapítható volt, hogy a rövidebb gradienssel kapott, alacsonyabb retenciós faktorok sokkal érzékenyebbek az injektált oldószer erősségére. Vízből történő injektálás esetén mindkét gradiens hasonló csúcsformákat eredményezett, függetlenül az injektált térfogattól. Ezzel szemben szerves oldószerek alkalmazásakor az injektált térfogat növekedésével jelentős különbségek mutatkoztak. 500 nL feletti injektált térfogatoknál a rövidebb gradiens esetén jelentős csúcskiszélesedés volt megfigyelhető, míg a hosszabb gradiens lényegesen stabilabb csúcsformát biztosított. Különösen szemléletes volt a jelenség 2 µL metanolos minta injektálásakor: rövid (0,6 perc) gradiens esetén a csúcsok felhasadtak, míg hosszabb (1,8 perc) gradiensnél csupán kiszélesedés volt tapasztalható (24. ábra).



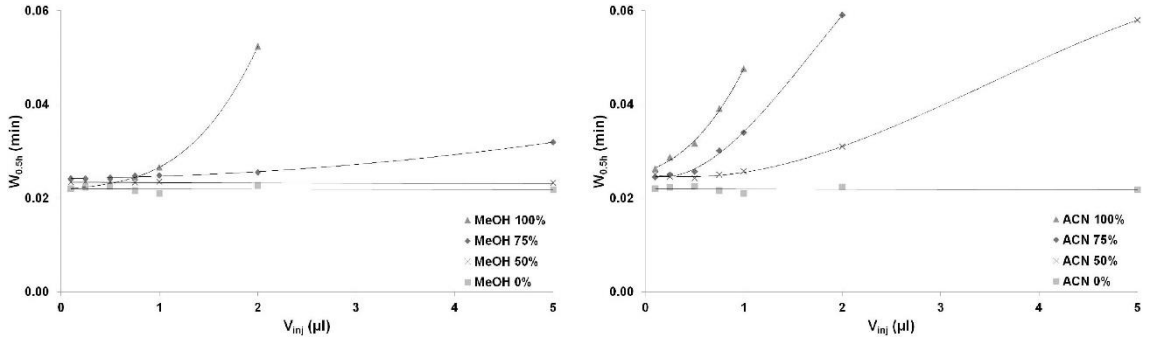
24. ábra. Csúcsalakok 2 µL metanolos minta injektálásakor rövid (1) és hosszú (2) gradiens esetén. A–D: kortizol, tesztoszteron, androsztendion és progeszteron.

Acetonitriles minták esetében ez a hatás már 1 µL injektálási térfogatnál jelentkezett. A retenciós faktor növekedésével az injektált oldószer erősségének hatása fokozatosan csökkent. Ennek alapján megállapítható, hogy azonos oszlop alkalmazása esetén célszerű hosszabb gradienst használni, mivel az így elért nagyobb retenciós faktorok kevésbé érzékenyek az erősebb eluensekből történő nagy térfogatú injektálás által okozott csúcstorzulásokra. Az alkalmazott oszloptöltetek és az oszlopok geometriája szintén jelentős hatással van a maximálisan injektálható térfogatokra, és ezáltal az elérhető LOQ értékekre. Ennek vizsgálatára különböző térfogatú mintákat injektáltunk vízből, metanolból és acetonitrilből mindhárom vizsgált oszlopra, majd elemeztük az injektált térfogat csúcsalakra gyakorolt hatását (25. ábra). A hatást a csúcsok félértékszélességével jellemeztük. Az injektált minta oldószererősségére az egyes rendszerek hasonló módon reagáltak. Vízből történő injektálás esetén az injektált térfogat növelésével nem tapasztaltunk jelentős csúcskiszélesedést. Szerves oldószerből történő injektálásnál azonban minden esetben csúcskiszélesedés volt megfigyelhető, mely a legerősebben az acetonitril alkalmazásakor jelentkezett. A rövidebb oszlopok, illetve a héj-szerkezetű (fused-core) töltetekkel rendelkező oszlopok (B és C oszlop) esetében élesebb, keskenyebb csúcsokat kaptunk. Ugyanakkor ezek a rendszerek sokkal érzékenyebben reagáltak az injektált térfogat növelésére, különösen erős oldószerek alkalmazásakor. Az oszlopok holttérfogata szintén meghatározó szerepet játszott a maximálisan injektálható térfogatok alakulásában. A legkisebb holttérfogattal a B oszlop rendelkezett. Ennél az oszlopnál erős oldószerből történő injektálás esetén a komponensek visszatartása 750 nL injektált térfogat fölött megszűnt, és a komponensek a fronttal együtt áttörtek. A másik két oszlop esetében ez a jelenség metanolos mintáknál 2 µL, míg acetonitriles mintáknál már 1 µL injektált térfogat felett jelentkezett. Az előzőekben bemutatott eredmények alapján megállapítható, hogy az oldószer erőssége jelentősen befolyásolja a maximálisan injektálható térfogatot. Erős oldószerből egy bizonyos térfogat felett történő injektálás esetén már nem érhető el nagyobb csúcsterület vagy jobb LOQ érték, mivel a csúcstorzulás és az áttörés dominánssá válik. Mills és munkatársai indometacin mennyiségi meghatározása során azt tapasztalták, hogy a mintaelőkészítést követően kapott minták vízzel történő hígításával kedvezőbb csúcsalakokat értek el [93].



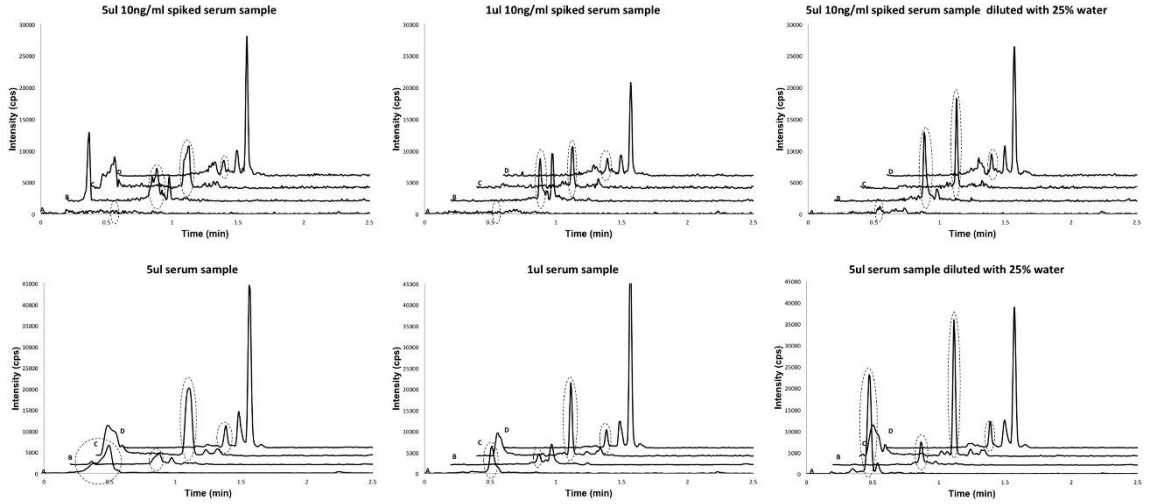
25. ábra. Az injektált térfogat és a mintaoldó hatása a csúcs félértékszélességére különböző oszlopokon. A–C: oszlop A (fent), B (középen) és C (lent).

Ezt a jelenséget a szteroidok esetében mi is megvizsgáltuk. A vizsgálatokhoz a legjobb felbontást biztosító C oszlopot alkalmaztuk, valamint négy különböző szerves oldószer-tartalmú mintaoldatot (100%, 75%, 50% és 0%) használtunk. A hígítás hatására a csúcsalakok jelentősen javultak, ami lehetővé tette nagyobb injektálási térfogatok alkalmazását. A metanolos minták esetében már 25%-os vizes hígítás mellett is lehetőség nyílt 5 µL minta injektálására. Az erősebb eluensnek számító acetonitril esetében legalább 50%-os hígítás volt szükséges ahhoz, hogy a maximális, 5 µL-es huroktérfogat teljes mértékben kihasználható legyen (26. ábra).



26. ábra. Az injektált térfogat és a mintaoldó erősségének hatása a csúcsalakra C oszlopon.

A módszer gyakorlati alkalmazhatóságának tesztelésére szteroidmentes szérumhoz 10 ng/mL végkoncentrációban addícionált szteroidmintát, valamint éles szérummintát vizsgáltunk (27. ábra).



27. ábra. Injektált térfogat és mintaoldó hatása addícionált (fent) és éles (lent) szérumminták kromatogramjaira.

A bal oldali kromatogramokon 5 µL injektálási térfogat alkalmazása mellett, hígítatlan minták esetében, az alacsony retenciós faktorral rendelkező komponenseknél jelentős csúcstorzulás és csúcskiszélesedés volt megfigyelhető. Ugyanezen minták hígítatlan állapotban történő, 1 µL-es injektálása esetén a csúcsalakok javultak, a csúcsok keskenyebbé váltak, és a torzulás mértéke minimálisra csökkent (középső panel). Ez a javulás azonban az injektált mennyiség csökkenésével együtt járt, ami az érzékenység számottevő romlását eredményezte. A jobb oldali kromatogramokon ugyanezen minták 25%-os vizes hígítást követően kerültek mérésre, 5 µL injektálási térfogat alkalmazásával. Jól látható, hogy mind a négy vizsgált szteroid esetében torzulásmentes, éles csúcsokat kaptunk. A hígítás ellenére ezekben az esetekben kaptuk a legnagyobb csúcsterületeket és

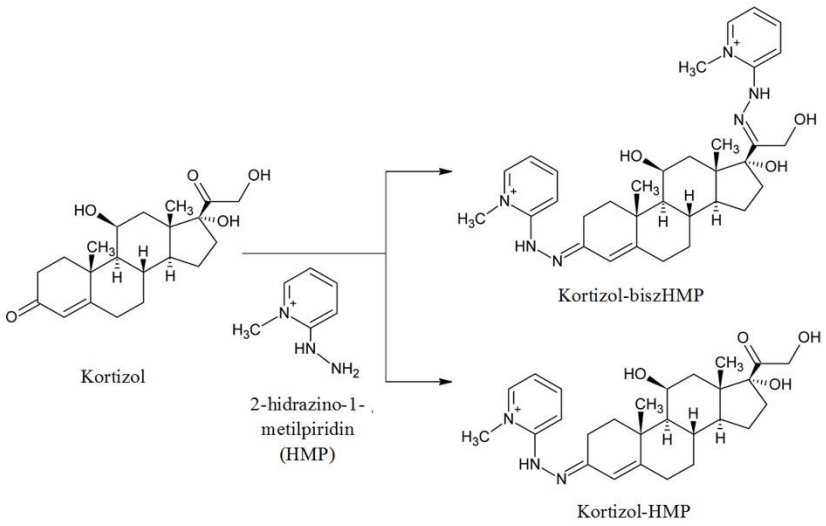
a legintenzívebb jeleket, ami egyértelműen igazolja, hogy az injektált oldószer erősségének csökkentése hatékony módja lehet az érzékenység növelésének nagy térfogatú injektálások esetén.

Az eredmények egyértelműen igazolják, hogy nagy térfogatú injektálások esetén az injektált oldószer erősségének tudatos csökkentése nemcsak a csúcsalak javítását, hanem az érzékenység tényleges növekedését is lehetővé teszi.

5.1.4.3. Érzékenységnövelés származékképzéssel

Az LC–MS technikák széles körű elterjedésében meghatározó szerepet játszott a légköri nyomású ionizációs eljárások megjelenése. Ezek alkalmazásával – a gázkromatográfiával ellentétben – az analitikai vizsgálatok nem igényelték a vegyületek illékonnyá tételét, és az ionizáció többnyire fragmentáció nélkül, kíméletesebb körülmények között valósítható meg. Mindazonáltal léteznek olyan vegyületcsoportok, amelyek esetében az LC–MS technika önmagában is komoly kihívások elé állítja az analitikust. Ilyen csoportot jelentenek a szteroidok, amelyek ionizációs hatékonysága légköri nyomású ionforrásokban kifejezetten alacsony, miközben biológiai mintákban gyakran rendkívül kis koncentrációban vannak jelen. Ezekben az esetekben a detektálási határok további csökkentése kizárólag műszeres optimalizálással sokszor nem érhető el. Bár az LC–MS módszertan fejlődésével a származékképzés háttérbe szorult, bizonyos analitikai problémák esetén továbbra is hatékony megoldást jelenthet. A származékképzés célja ilyenkor nem a kromatográfiás viselkedés javítása, hanem kifejezetten az ionizáció elősegítése, ezáltal a módszer érzékenységének növelése.

Egy korábbi munkánk során olyan érzékeny módszer kidolgozása volt a célunk, amely alkalmas kortizol és kortizon nyálmintákból történő meghatározására. Az irodalomban fellelhető módszerek alapján 2-hidrazinopiridint alkalmaztak hasonló szerkezetű molekulák származékképzésére. A módszer továbbfejlesztése érdekében az érzékenység további növelését tűztük ki célul, mégpedig oly módon, hogy a vizsgált molekulára permanens pozitív töltést helyezünk. Ennek megvalósítására a 2-hidrazino-1-metilpiridint (HMP) választottuk származékképző reagensként, ahol a nitrogénatomon elhelyezkedő metilcsoport következtében a kialakuló származék stabil pozitív töltést hordoz. Ez a módosítás jelentősen növeli az ionizáció hatékonyságát elektrospray ionforrásban. A HMP és a kortizol reakciójának vázlatát az 28. ábra szemlélteti.



28. ábra. A kortizol származékképzési reakciója 2-hidrazino-1-metilpiridinnel.

A 28. ábrán jól látható, hogy a kortizol molekulája két reaktív karbonilcsoportot tartalmaz, amelyek mindegyike alkalmas a hidrazin-származékképző reagenssel történő reakcióra. Ennek megfelelően a gyakorlatban is azt tapasztaltuk, hogy a monohidrazino-1-metilpiridin származék mellett a kétszeresen reagált bisz-hidrazon (biszHMP) képződése is megfigyelhető volt. Noha a kortizon molekulája három karbonilcsoportot tartalmaz, a származékképzési reakció során kizárólag a mono- és bisz-hidrazon származékok megjelenését tapasztaltuk. Ennek feltételezhető oka egyrészt az, hogy a 11-es pozícióban található oxocsoport reakciókészsége alacsonyabb, másrészt az, hogy az ehhez a pozícióhoz kapcsolódó reakció sztérikusan is gátolt. A származékképzési reakciók egyik alapvető követelménye a jól definiált, reprodukálható és lehetőleg egységes termék képződése. Ennek megfelelően a további módszerfejlesztési lépések során a bisz-hidrazon származékot tekintettük fő terméknek, és a reakció körülményeit kifejezetten ennek a képződésére optimalizáltuk. A reakcióparaméterek optimalizálása során tizenkét különböző savat, két hőmérsékleti értéket, három reakcióidőt, valamint öt különböző reagens/szteroid mólarányt vizsgáltunk. Az egyes körülmények hatását a keletkezett származék mennyisége alapján értékeltük. Az optimalizálás eredményeként azt találtuk, hogy éles minták esetében trifluorecetsav alkalmazásával, 60 °C-on, 60 perces reakcióidő mellett, húszszoros reagensfelesleg használata eredményezte a legnagyobb mennyiségben a várt bisz-hidrazon származék képződését.

Az oxoszteroidok HMP-vel történő származékképzése során E- és Z-izomerek keletkezhetnek, amelyek a kromatográfiás elválasztás során külön eluálódhatnak. Ezt a jelenséget az általunk kezdetben alkalmazott kromatográfiás rendszerben (Luna Phenyl-

Hexyl oszlop, 50 mm × 2 mm, 5 μm) egyértelműen megfigyeltük. Az izomerek hasonló MS/MS spektrumot adtak, így a kromatográfiás csúcsok egyértelmű hozzárendelése az egyes izomerekhez nem volt lehetséges. Mivel a mennyiségi meghatározás szempontjából az izomerek elkülönítése nem volt szükséges – hiszen mindegyik izomer azonos kiindulási szteroidból származik –, a kromatográfiás körülményeket úgy módosítottuk, hogy az izomerek ne váljanak szét. Ennek eredményeként egyetlen, összevont csúcsot kaptunk, ami a mérési érzékenység további javulását is eredményezte.

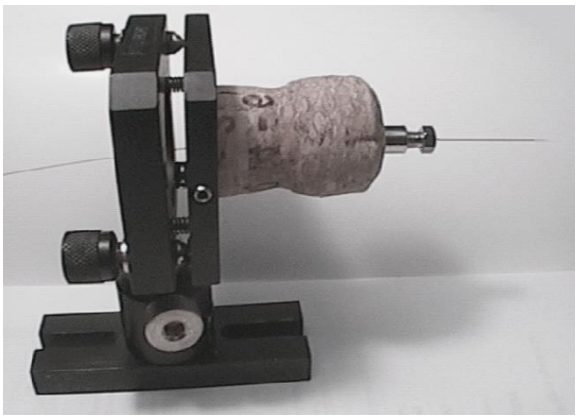
Az érzékenység további növelése érdekében nagy térfogatú injektálást (100 μL), valamint on-line dúsítást is alkalmaztunk. A módszer vázlatát a korábban bemutatott 22. ábra szemlélteti. A fejlesztés eredményeként egy hétperces ciklusidejű módszert sikerült kidolgozni, amely megbízhatóan és nagy érzékenységgel tette lehetővé kortizol és kortizon szintek meghatározását nyálmintákból. A hárompumpás, váltószelepet is tartalmazó mérési elrendezés főbb paramétereit a Függelék F4. táblázat foglalja össze. A kidolgozott módszer alkalmazhatóságát validálás során ellenőriztük. Az LOD értékek rendre 2 és 5 pg/mL volt kortizol és kortizon esetén, 3:1 jel/zaj arány mellett. A kimutatás alsó határa (LOQ) 5 pg/mL (kortizol) és 10 pg/mL (kortizon) volt [SP18].

5.1.4.4. Mikrotechnikák

Az érzékenység növelésének másik hatékony megoldása a kromatográfiás dimenziók csökkentése, ami elsősorban az oszlopok fizikai méreteinek minimalizálását jelenti. Ez a lépés automatikusan az áramlási sebesség csökkentését is maga után vonja. Az oszlopok jellemzéséhez hosszúságukat, belső átmérőjüket és szemcseméretüket használjuk, ezek közül az érzékenységre a belső átmérő és a szemcseméret csökkenése gyakorol a legnagyobb hatást.

Munkám során számos esetben alkalmaztam a méretek csökkentésével elérhető érzékenységnövekedést. Az első lépéseket még Szegeden tettem meg, ahol az országban elsőként valósítottuk meg a mikro-HPLC és a mikroelectrospray/nanospray kombinációját peptidek azonosítására és mennyiségi meghatározására. A kísérletekhez saját ionforrást fejlesztettünk, amely érzékeny porlasztást tett lehetővé nL/perc (nanospray) illetve μL/perc (mikroelektrospray) áramlási tartományban [SP20]. Az ionforrás egyszerű szerkezete egy optikai lencsetartón alapult, amely a tömegspektrométer ionforrásának sínjébe illeszkedett. A lencsetartóba egy parafa pezsgősdugót helyeztünk, amely biztosította a szigetelést a nagyfeszültséggel szemben. A parafadugóba fúrt lyukba került egy acél kromatográfiás illesztő (zero dead volume, ZDV egység), amelynek egyik végébe a HPLC-ről érkező

eluens, másik végébe a porlasztást biztosító kihúzott kvarc kapilláris csatlakozott. A nagyfeszültséget (1000–1200 V) közvetlenül az illesztőre kapcsoltuk. A stabil spray beindításához a klasszikus, kereskedelmi forgalomban kapható források mikrométercsavaros pozícionálásától eltérően egyszerűbb megoldást találtunk: a rendszerbe metanol aeroszolt juttatva a spray automatikusan, további beállítás nélkül elindult. (29. ábra)

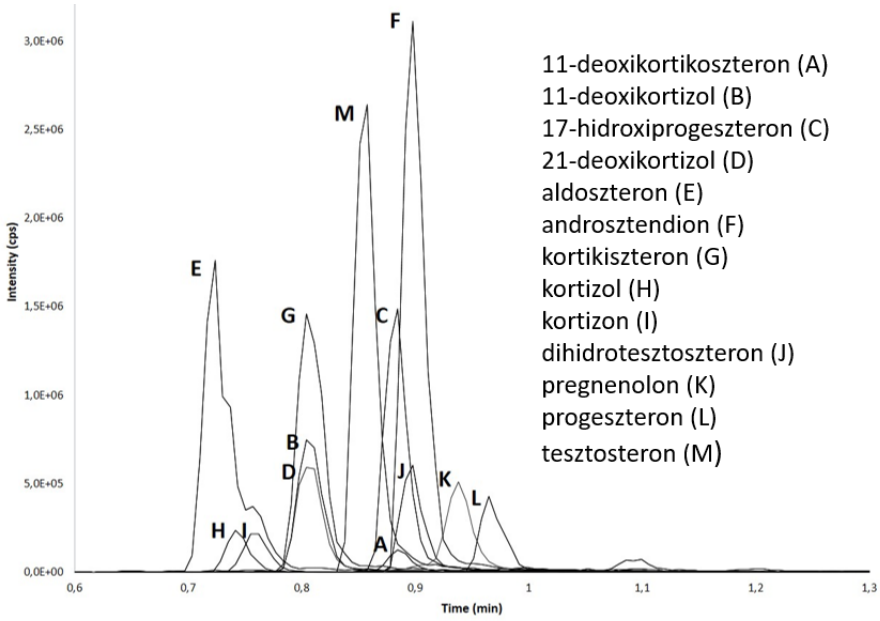


29. ábra. Saját fejlesztésű mikroelektrospray ionforrás

A kromatográfiás oszlopok terén is saját megoldásokat alkalmaztunk. Házi fejlesztésű kapilláris kolonnákat készítettünk (0,32 mm belső átmérőjű kvarc kapilláris), amelyek reprodukálható töltést biztosítottak. Tesztelés után ezeket az oszlopokat proteomikai és egyéb analitikai feladatok során használtuk sikerrel.

A mikro-LC alkalmazása nem csupán az érzékenység növelését teszi lehetővé, hanem az analízis idejének jelentős csökkentését is. Egy korábbi munkánk során 13 szteroid gyors és érzékeny kimutatására alkalmas módszert fejlesztettünk ki, amelynek alapját a mikro-UHPLC rendszeren optimálisnak bizonyult Eksigent HALO Fused-core Phenyl Hexyl oszlop (50×0,5mm, 2,7 μm, 90 Å) adta. Ezen az oszlopon vizsgáltuk a 13 célmolekula elválasztását UHPLC körülmények között. A 30. ábrán jól látható, hogy a komponensek mérését már rövid, 1,8 perces ciklusidővel is el tudtuk végezni. A megfelelő érzékenység eléréséhez a korábban említett nagy térfogatú injektálást választottuk. Nagyszámú sorozatminták mérése esetén azonban a nagy térfogatok fokozottan megterhelik az analitikai oszlopot, ami a csúcsok torzulásához vezethet. Ennek csökkentésére on-line SPE csapdázó oszlop alkalmazását javasoltuk. A mérni kívánt komponensek a csapdázó oszlopon megkötődnek, miközben a mátrix komponensei mosás közben eluálódnak. A komponensek ezután az analitikai oszlopra kerülnek, ahol gradiens elúcióval mérhetők. Csapdázó oszlop használata esetén kiemelt fontosságú a mintaoldó

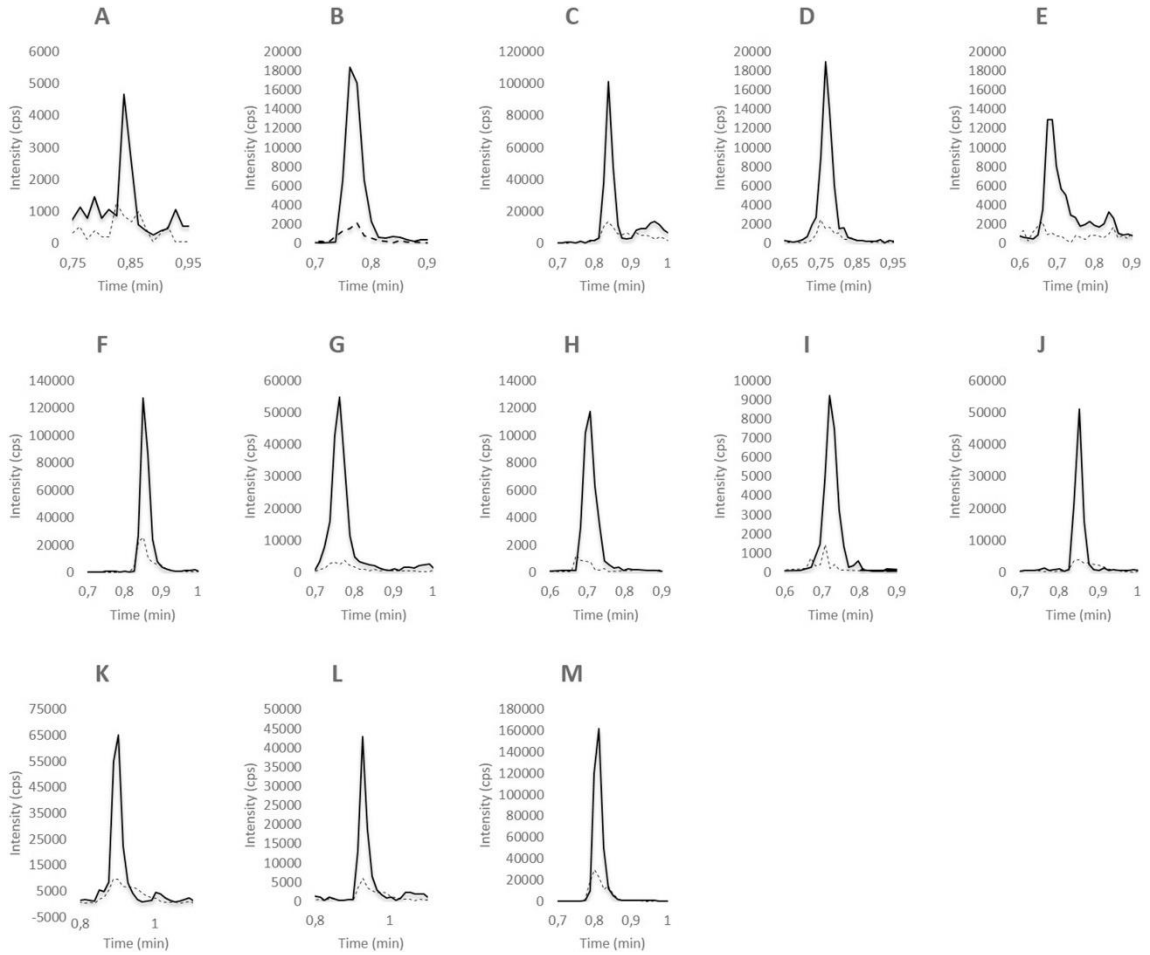
erőssége, hiszen túl erős mintaoldóból történő injektálás esetén a komponensek egy része elveszhet.



30. ábra. Tizenhárom komponenst tartalmazó szteroid standard oldat MRM kromatogramja 50 ng/mL koncentrációszinten.

A plazmaminták esetében bevált mintaelőkészítés a metanolos/acetonitriles fehérjekicsapás. Ilyenkor háromszoros plazmatérfogatnyi metanolt vagy acetonitrilt adunk a mintához, ami a fehérjék kicsapódását eredményezi. A centrifugálást követően a felülúszó közvetlenül mérhető analitikai HPLC rendszereken. UPLC csapdázásnál azonban a 75%-os metanoltartalom lerontja a csapdázás hatékonyságát. Érdekes módon az előző fejezetben bemutatott, vízzel történő 50%-os hígítás esetén a minták abszolút koncentrációja csökken, mégis sokkal intenzívebb csúcsokat kaptunk (31. ábra). A szteroidok koncentrációja a mintában 50 ng/mL volt.

A módszer jól működött, de nem minden komponens esetében érte el a kívánt érzékenységet. Ennek növelésére nagyobb térfogatú plazmamintákból (440 µL) indultunk ki, amelyekből etil-acetáttal (1,5 mL) extraháltuk a szteroidokat. A szerves fázist nitrogénáramban beszárítottuk, majd visszaoldottuk 100 µL víz/acetonitril (9:1) elegyben. Ebből az oldatból 90 µL-t injektáltunk a csapdázó oszlopra, ami jelentős érzékenységnövekedést eredményezett. A módszer alkalmazhatóságát részleges validálással igazoltuk. A kifejlesztett módszerrel kapott kalibrációs egyenesek r értékeit, valamint az egyes vegyületek esetében elért LOD/LOQ értékeket a Függelék F5. táblázatban foglaltam össze [SP21].



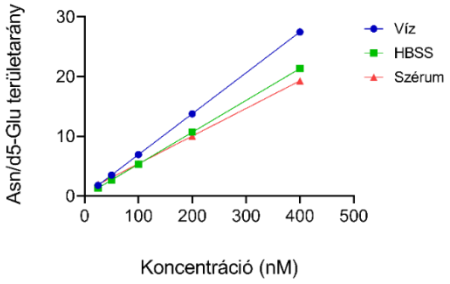
31. ábra. Szteroidok csúcsainak összehasonlítása plazmamintából különböző mintaoldók alkalmazása mellett:
75% metanolt tartalmazó minta (pontozott vonal) és
50%-os vizes hígítást követően mért minta (folytonos vonal).

5.1.5. Kalibrációs modellek

Kalibrációs modell kiválasztásakor mindig a legegyszerűbb megközelítéssel érdemes kezdeni, vagyis tiszta oldatból felvett kalibrációval. Ezt követően ellenőrizzük a mátrixhatást, és amennyiben az elfogadható, a legegyszerűbb modell is elegendő lehet. Ha azonban a mátrix jelentősen befolyásolja az eredményeket, akkor a lehetséges alternatívákat is ki kell próbálni.

Ezt a megközelítést alkalmaztuk például a szabad aminosavak módszerfejlesztése során [SP4]. A feladat során kalibrációs modellt kellett kidolgoznunk szabad aminosavak méréséhez, azonban aminosavmentes szérum nem létezik. A mátrixhatást figyelembe véve ezért tiszta oldatkalibrációt, modellmátrixot (izotóniás sóoldat, **H**anks' **B**alanced **S**alt **S**olution, HBSS) és addíciós kalibrációt is kipróbáltunk, majd az eredményeket összehasonlítottuk. A szérum és HBSS kalibrációk esetében, még jelentős hígítás mellett

is, számottevő intenzitáscsökkenést tapasztaltunk a tiszta oldathoz képest. Ez önmagában nem jelentené a módszer alkalmatlanságát, hiszen a szisztematikus csökkenés belső standard alkalmazásával korrigálható. Az összes aminosav esetében megvizsgáltuk a három különböző közegben felvett kalibrációs egyenesek meredekségét, és jelentős eltéréseket találtunk. A 32. ábra az Asn esetében kapott egyeneseket szemlélteti.



32. ábra. A három kalibrációs modell meredekségei az Asn példáján.

A vízben mért egyenes kilóg a sorból, míg a HBSS és szérum esetében kapott egyenesek sokkal közelebb állnak egymáshoz, de még mindig eltérés mutatkozott a meredekségekben. Ez azt jelentette, hogy a víz után a HBSS-t, mint modellmátrixot is ki kellett zárnunk, és a munka- és időigényesebb addíciós módszert kellett alkalmaznunk a megbízható eredmények biztosításához.

5.1.5.1. Relatív kalibrációs modell

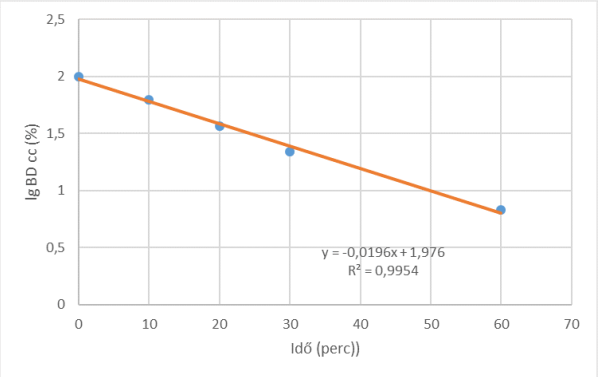
Vannak olyan esetek, amikor az abszolút koncentráció meghatározása nem szükséges, mert elegendő valamilyen viszonyított adat, %-ban kifejezve. Tipikus példák erre a farmakokinetikai mérések, amikor egy molekula metabolikus stabilitását vizsgáljuk, és meghatározzuk az 50%-os fogyáshoz tartozó időt. Ilyenkor a koncentrációk abszolút értékére nincs szükség, kalibrációs oldatsort sem kell készíteni, bár ez lehetséges. A kiindulási koncentrációt tekintjük 100%-nak, és az időbeli változást ehhez viszonyítva fejezzük ki %-ban.

Egy ilyen kísérlet példáját mutatom be: a célmolekula (BD, publikálás alatt) koncentrációját TOF-MS módban mértem, és a kétszeresen töltött ion intenzitását határoztam meg a kiindulási szintre vonatkoztatva. Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat. A BD célmolekula koncentrációjának változása az időben

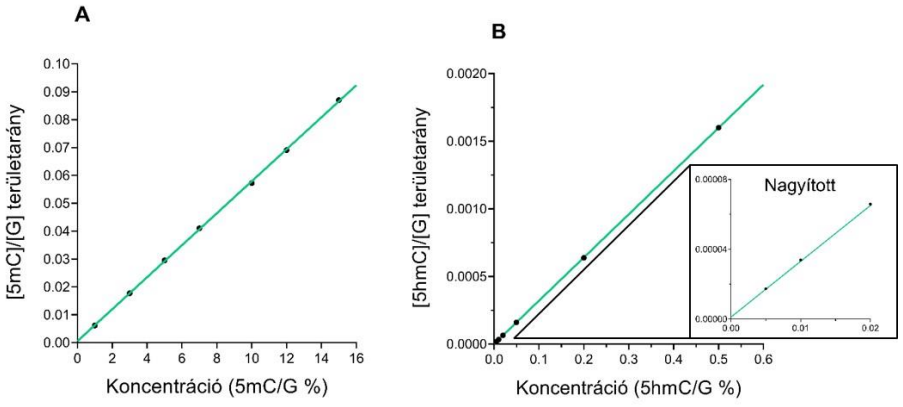
Idő (perc)	0	10	20	30	60	120
konc (%)	100,00	61,94	36,93	22,01	6,71	3,68
lg konc	2,00	1,79	1,57	1,34	0,83	0,57

A koncentrációk logaritmusát ábrázolva az idő függvényében egyenes adódott, amiből az 50%-os fogyáshoz tartozó idő logaritmusa (1,699) meghatározható, így a felezési idő 14,13 perc. (33. ábra)



33. ábra. A BD relatív mennyiségének (%) időfüggő változása.

Hasonlóan elegendő volt a relatív koncentráció alkalmazása epigenetikai mérésekben is, az 5mC és 5hmC esetében. Itt a metiláltságot %-ban fejeztük ki az összes citozinra vonatkoztatva. Az egyszerűség kedvéért a guaninra vonatkoztatott értékeket használtuk, mivel a DNS-ben a guanin és citozin bázispár mólaránya megegyezik. A várt tartomány 5mC esetén 1–15%, míg 5hmC esetén 0,005–0,5% volt. Ebbe a tartományba eső megfelelő számú kalibrációs pontot vettünk fel, majd a dNTP, mdCTP és hmdCTP oldatokból összeállított kalibrációs pontokat a guaninra vonatkoztatott %-ban kifejezett koncentrációk függvényében ábrázoltuk. A 34. ábra jól mutatja, hogy mindkét esetben lineáris összefüggést kaptunk, még az alacsony koncentrációk kinagyított tartományában is.



34. ábra. Kalibrációs egyenesek 5mC (A) és 5hmC (B) esetében, az 5hmC alacsony koncentrációtartományát bemutató nagyított részlettel.

Ez a megoldás több előnnyel jár: a vonatkoztatási anyag (guaninnal) minden mintában jelen van, tehát nem kell külön hozzáadni a rendszerhez. A mintaelőkészítés során a mérendő

mintával együtt kezelődik, így a mennyiségek a mintakezelés során együtt változnak. Az esetleges változások okozta hatások az arányosítás során kioltódnak, így a módszer nem érzékeny a kezdeti DNS-mennyiségre, az injektálási térfogatra és annak pontosságára [SP2].

5.1.6. Validálás

Ahogy korábban említettem, a kidolgozott módszerek esetében mindig szükséges valamilyen szintű validálás elvégzése, hogy meggyőződjünk a kapott eredmények megbízhatóságáról. A döntés a teljes vagy részleges validálás között a felhasználás céljától függ, és részleges validálás esetén azt is el kell dönteni, mely paramétereket vizsgáljuk.

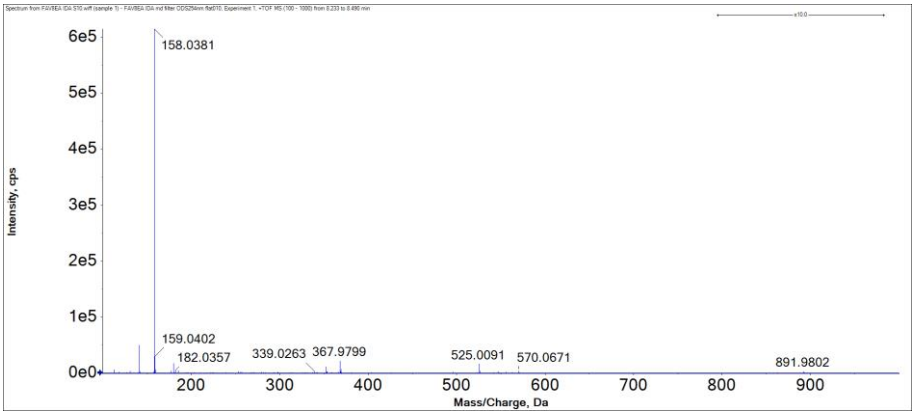
Minden esetben elvégeztük a szelektivitás és specifitás vizsgálatát. Ez a vizsgálandó komponensek mérhetőségét és egymástól való egyértelmű megkülönböztethetőségét jelenti. Ha létezik blank mátrix, több forrásból beszerezve ellenőrizni kell, hogy a mérendő komponensre jellemző retenciós időn, az adott MRM átmeneteken (vagy tömegszámon) nincs-e interferenciát okozó háttérjel. A későbbiekben a blank mintákat addicionálva használjuk a standard és QC oldatok előállításához.

Ezután következik a kalibrációs modell kidolgozása a blank oldatok addícionálásával. A kalibrációs tartománynak célszerű felfelé és lefelé 20–50%-kal túllépni a várt alsó és felső koncentrációs ponton, mert csak a két végpont közötti értékek tekinthetők megbízhatónak. A tartományt legalább hat egyenletesen elosztott ponton kell felvenni, minden pontot legalább öt ismétléssel. Az eredményeket grafikusan és statisztikailag is értékelni kell, meghatározva az illesztett görbe matematikai összefüggését (ideális esetben lineáris), valamint a pontosságot.

A pontok közti összefüggés lehet lineáris, de nagyobb koncentrációk esetén gyakran quadratikus illesztés ad pontosabb eredményt. A nemlineáris válaszjel több okra vezethető vissza:

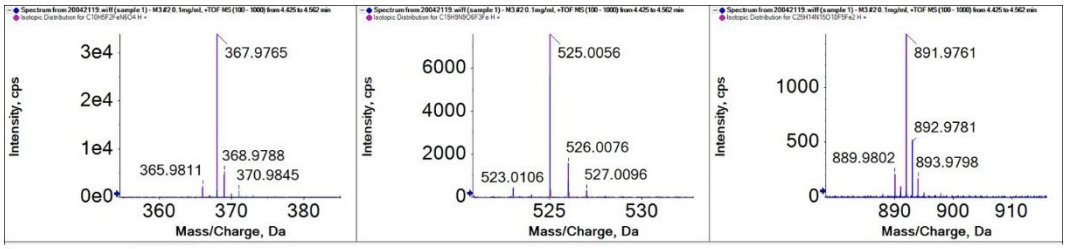
1. Kémiai okok: a komponens koncentrációjának növekedésével dimerek vagy oligomerek keletkezhetnek, amelyek ugyan tartalmazzák a mérendő molekulát, de tömegük eltérő, így sem az MRM, sem a HRMS nem veszi őket figyelembe. Ez csökkenti a jelintenzitást a tényleges koncentrációhoz képest. Például az MI-1851 minta esetén a 50 μM felső tartományt quadratikus illesztéssel lehetett mérni. Minél ellaposodik a görbe, annál pontatlanabb a módszer, ezért ilyen esetekben a mintákat általában meghígítjuk.

2. Ionizációs átalakulás: a mérendő anyag az ionizáció során redox reakcióban is átalakulhat, ami szintén eltérést okoz. Ezzel találkoztam például a favipiravir TOF-mérésénél: az ESI spektrumban megjelentek a favipiravir tömegénél nagyobb csúcsok is. (35. ábra) Ez sok laborban figyelmen kívül marad, mert MRM-módban nem jelennek meg, vagy a háttérhez rendelik őket a viszonylag nagy tömegek miatt.



35. ábra. A favipiravir TOF-MS spektruma

A validálás során tehát mind a módszer pontosságát, mind a komponensek detektálhatóságát és torzulását figyelembe kell venni, hogy a kapott adatok valóban megbízhatóak legyenek. A kalibrációs görbe elhajlását okozhatja az ionforrásból származó fémion is. Vizsgálataink során a csúcsok kinagyításakor jellegzetes izotópeloszlást figyeltünk meg, ami bizonyos átmeneti fémekre, jelen esetben vasra (Fe) volt jellemző. A fő ion mellett mindig megjelent a fő iontól kettővel kisebb tömegű ion is. Alapos vizsgálatok után megállapítottuk, hogy a vas az ionforrásban lévő fém kapillárisból származik, amelyen keresztül a minta porlasztásra kerül. A detektált ionok 2–3 favipiravir molekula és egy Fe-ion által képzett adduktok, valamint ezeknek a többszörösei. Ezek a klaszterek koncentrációtól függően alakulnak ki, és magasabb koncentrációk esetén befolyásolhatják a kalibrációs görbe lefutását. (36. ábra)



$C_{10}H_5N_6O_4F_2Fe$ $C_{15}H_9N_9O_6F_3Fe$ $C_{25}H_{14}N_{15}O_{10}F_5Fe_2$

36. ábra. Különböző összetételű favipiravir–Fe komplexek. Az elméleti (ciklámen) és a mért (kék) csúcsok tökéletes izotópeloszlás-egyezést mutatnak

A kalibrációs görbe elhajlását okozhatja a detektor telítődése is. Magasabb koncentrációknál az elektronikus jelfeldolgozó nem tudja megfelelően mérni az intenzitásokat. Ennek elkerülésére a nagy koncentrációban mérendő komponensekhez nem optimális MRM átmenetet célszerű használni. Ezt a DNS-metilációs vizsgálatoknál alkalmaztuk a guanin esetében.

A pontosság és precizitás vizsgálata során QC mintákat alkalmazunk három különböző koncentrációszinten (alacsony, közepes, magas), legalább öt ismétléssel. Minden szinten kiszámoljuk:

- az eredeti értéktől való eltérést (pontosság, RE),
- az ismétlések szórását (precizitás, RSD).

A pontosság és precizitás elfogadható, ha RE ±15%, és RSD ≤15%.

A következő lépés a limitek meghatározása:

- LOD (Limit of Detection): jel/zaj arány ≥3
- LOQ (Limit of Quantification): jel/zaj arány ≥10
- ULOQ (Upper Limit of Quantification): legmagasabb mérhető koncentráció

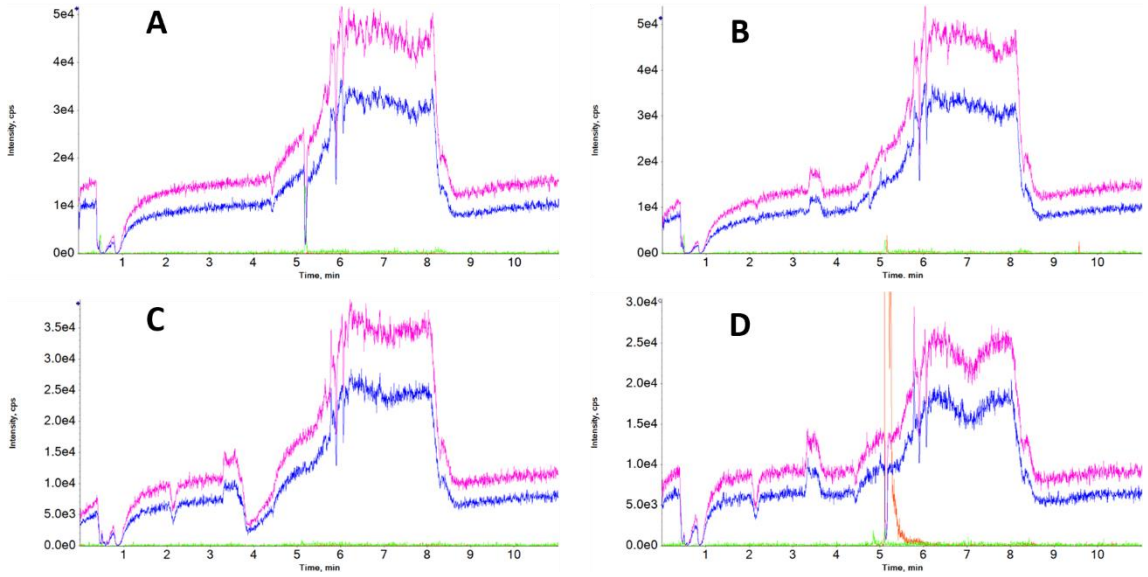
Ha a mért érték LOQ alatt van, dúsítani vagy nagyobb térfogatot injektálni kell. ULOQ felett a mintát hígítani kell, majd újramérni.

A mátrixhatás vizsgálata a mennyiségi LC–MS módszerek egyik kulcsfontosságú lépése. Ennek során a különböző koncentrációszinteken addícionált blank mátrixból és tiszta oldószerből kapott jelintenzitásokat hasonlítjuk össze. Amennyiben az eltérés nem haladja meg a ±15%-ot, a mátrixhatás elhanyagolhatónak tekinthető. Izotópjelzett belső standard alkalmazásával a mátrixhatás jellemzően kompenzálható, azonban ezt minden koncentrációszinten ellenőrizni szükséges.

A mátrixhatás részletesebb vizsgálatára gyakran alkalmazott módszer a post-column infúziós teszt, amelyet az N-nitrozo-fenilefrin (NNPE) példáján keresztül mutatok be. A nitrózaminok rendkívül alacsony megengedett napi beviteli értékei miatt a mátrixhatás elemzése különösen nagy jelentőséggel bír, főként komplex, nagy mennyiségű segédanyagot tartalmazó készítmények esetében. A vizsgálat során az NNPE és izotópjelzett belső standardja (NNPE-d_3) oldatát egy fecskendőpumpa segítségével folyamatosan juttattam a HPLC-áramba egy T-elágazáson keresztül, miközben különböző gyártóktól származó megfázás elleni forró italporok oldatait, illetve tiszta vízmintát injektáltam.

A tiszta víz injektálása során a gradiens elején rövid idejű jelcsökkenés, majd a szerves eluens arányának növekedésével fokozatos jelnövekedés volt megfigyelhető, ami

a gradiensmenet természetes hatásának tekinthető. A célkomponensek retenciós idejénél azonban sem az eluens, sem a gradiens nem okozott mérhető interferenciát. Ezzel szemben a készítménymátrixok injektálásakor kifejezett ionelnyomás jelentkezett a korán eluáló, poláris segédanyagok miatt. Ennek kiküszöbölésére diverter szelepet alkalmaztam, amely a 0,3–1,3 perces időtartamban az eluátumot a hulladékágba irányította. Ez a megoldás hatékonyan megakadályozta az ionforrás elszennyeződését, valamint az időben elkülöníthető mátrixhatás kialakulását. A részletes elemzés gyártóspecifikus különbségeket is feltárt. Egyes termékek esetében acetonitril alapú elúció mellett az NNPE egyik izomerével koelúcióban megjelenő komponens jelentős ionelnyomást okozott. Nagyfelbontású tömegspektrometriás vizsgálatok igazolták, hogy az interferáló anyag szukralóz volt, amelyet a szerves eluens metanolra történő cseréjével sikerült eltérő retenciós tartományba eltolni. Más gyártók esetében kisebb, időben elkülönülő ionelnyomási jelenségek voltak megfigyelhetők, illetve egy esetben az aszpartám jelenlétét sikerült azonosítani, amely azonban megfelelő kromatográfiás felbontás mellett nem befolyásolta a kvantitatív meghatározást. (37. ábra)



37. ábra. Mátrixhatás által kiváltott jelintenzitás-változások az NNPE és NNPE-d$_3$ kromatogramjaiban.

Az a–d panelek az egyes A–D gyártók termékeire vonatkozó méréseket ábrázolják.

Az NNPE, NNPE-d$_3$, aszpartám és szukralóz kvantitatív MRM átmenetei kék, rózsaszín, narancssárga és zöld színnel jelennek meg.

A vizsgálatok összességében igazolták, hogy a megfelelő kromatográfiás körülmények megválasztása, az eluensösszetétel optimalizálása, valamint az izotópjelzett

belső standard alkalmazása együttesen hatékonyan képes kompenzálni a komplex mátrixokból eredő ionizációs hatásokat. A kidolgozott módszer így robusztus és megbízható módon alkalmazható NNPE mennyiségi meghatározására különböző összetételű készítmények esetében is, miközben a mintaelőkészítés egyszerűsége megmaradt.

Végül stabilitási teszteket is ajánlott végezni, különösen hosszabb projektek vagy mérések esetén. Vizsgálni kell a törzs- és munkaoldatok, valamint az előkészített és előkészítetlen mintákban a komponensek koncentrációjának változását időben. Emellett ellenőrizni kell az előkészített minták mintatartóban történő tárolhatóságát. Rövidtávú, egyedi minták esetén a stabilitásvizsgálat elhagyható. Az egyes oldatok abban az időintervallumban használhatóak csak fel, ameddig bizonyított a stabilitásuk.

5.2. Gyakorlati alkalmazások, esetismertetések

Az előző fejezetben a módszerfejlesztéssel kapcsolatos munkáimat foglaltam össze. A jelen fejezetben e módszerek gyakorlati alkalmazásáról, valamint az ezekkel elért eredményekről adok áttekintést. A bemutatott problémák jelentős része külső megkeresésekhez kapcsolódott, amelyek részben ipari partnerektől, részben biológusoktól, illetve klinikai diagnosztikai laboratóriumok orvosaitól érkeztek. Az általam szolgáltatott analitikai eredményeknek a tudományos jelentőségen túl számos esetben közvetlen gyakorlati haszna is volt: hozzájárultak betegségek diagnosztizálásához, terápiás döntések megalapozásához, illetve az életminőség javításához.

5.2.1. Gyógyszeripari alkalmazások

5.2.1.1. Hatóanyagszint-mérés

A gyógyszerkészítmények minőségbiztosításának egyik alapvető eleme a hatóanyagtartalom mennyiségi ellenőrzése. A hatóanyag mennyiségének állandósága elengedhetetlen a terápiás hatás szempontjából, mivel az ingadozó hatóanyagszintek ronthatják a kezelés hatékonyságát, és kedvezőtlenül befolyásolhatják a betegek közérzetét. A készítmények hatóanyagtartalma, valamint a formulázás során alkalmazott segédanyagok minősége és mennyisége széles tartományban változhat, ezért kiemelten fontos, hogy az alkalmazott analitikai módszer a hatóanyagot megbízhatóan, a segédanyagok jelenlétében is pontosan mérje.

A 2020-ban kialakult világjárvány alapjaiban változtatta meg az egészségügyi ellátórendszereket, és rövid idő alatt rendkívül magas halálozási számokhoz vezetett világszerte. A járvány megfékezésére és a fertőzöttek gyógyítására minden rendelkezésre álló eszközt igénybe vettek: új készítmények fejlesztése (vakcinák), valamint már meglévő, potenciálisan hatásos gyógyszerek gyors és nagy volumenű előállítása egyaránt szükségessé vált. Magyarország Kormánya ennek keretében konzorciumot hozott létre egy vírusellenes készítmény, a favipiravir hatékony előállítására alkalmas módszerek kidolgozására, valamint a léptéknövelést követő ipari gyártás megvalósítására. A munkában vezető szerepet töltött be a Természettudományi Kutatóközpont, ahol a laboratóriumi léptékű szintézisutak kidolgozása mellett a teljes analitikai háttér biztosítása is feladat volt. Ennek részeként a szintézistermékek jellemzésén túl a végtermék tisztaságának, valamint a tabletták hatóanyagtartalmának meghatározására alkalmas módszereket kellett kifejleszteni. A két feladat eltérő analitikai megközelítést igényelt: míg a hatóanyagtartalom ellenőrzése során nagy koncentrációban jelen lévő vegyületet kellett mérni, addig a szennyezésprofil vizsgálatakor rendkívül alacsony (≈0,1%) szintű szennyezőkomponensek kimutatása volt a cél.

A favipiravir tabletták kiemelkedően magas hatóanyagtartalommal rendelkeznek: a 250 mg össztömegű tablettában 200 mg hatóanyag található, míg a segédanyagok mennyisége mindössze 20% (50 mg). A vizsgálatokhoz véletlenszerűen kiválasztott tablettákat használtunk. Az egyes tabletták tömegét pontosan megmértük, majd mozsárban finomra őröltük és alaposan homogenizáltuk. A homogenizált mintából körülbelül 100 mg-ot pontosan kimértünk, mintaoldóban oldottuk, és 0,1 mg/mL koncentrációjú oldatokat készítettünk. A méréseket egy kifejezetten a favipiravir és kapcsolódó szennyezőinek azonosítására és mennyiségi meghatározására fejlesztett, 15 perces LC módszerrel végeztem, UV- és MS-detektálást egyaránt alkalmazva. A viszonylag szűk, 40–100 µg/mL koncentrációtartományban négypontos kalibrációt használtam. Először a vizsgált 100 mg mintarész hatóanyagtartalmát határoztam meg, majd ebből számoltam vissza a teljes tabletta hatóanyagmennyiségét. Az eredményeket a 2. táblázat foglalja össze. ami a névleges érték 95,4%-ának felel meg, és viszonylag kis szórással volt mérhető. Fontos kiemelni, hogy ezen a koncentrációszinten mind az UV-, mind az MS-detektálás megbízhatóan alkalmazható volt, és a két detektálási mód egymással jó egyezést mutató eredményeket szolgáltatott.

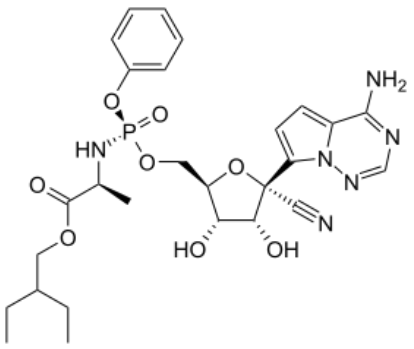
2. táblázat. Favipiravir tabletták hatóanyagtartalmának vizsgálata

Minta kódja	mg/100mg UV	mg/100mg MS	M tabletta	mg/tabl UV	mg/tabl MS
M5 #3	70,0	68,8	264,8	185,4	182,1
M5 #4	74,5	73,5	265,9	198,0	195,4
M5 #5	70,7	69,9	268,8	190,0	187,8
M1 #1	71,7	69,5	267,2	191,7	185,8
M1 #2	70,0	65,4	265,9	186,2	173,9
M1 #3	74,1	68,0	267,6	198,2	182,0
M2 #1	70,8	73,6	272,2	192,8	200,2
M2 #2	67,0	67,8	271,4	181,7	183,9
M2 #3	69,9	71,2	270,1	188,7	192,2
M3 #1	75,8	73,3	266,6	202,2	195,3
M3 #2	71,5	75,4	267,1	191,1	201,3
M3 #3	68,9	71,0	266,2	183,5	189,0
			átlag	190,8	189,1
			szórás	6,3	8,1

5.2.1.2. A becsomagolt hatóanyag

A hatóanyagok különböző hordozórendszerekbe történő becsomagolása egyre elterjedtebb formulázási megoldás a modern gyógyszerfejlesztésben. Ennek egyik fő célja a rossz oldékonyságú hatóanyagok biohasznosulásának javítása, illetve a hatóanyag kiürülésének lassítása, amely elnyújtott terápiás hatást eredményezhet. Emellett bizonyos hordozórendszerek — különösen a ciklodextrin-komplexek és a liposzómák — képesek a hatóanyag fizikai–kémiai stabilitásának növelésére is, ami a készítmények minősége és eltarthatósága szempontjából kiemelt jelentőségű.

A koronavírus-járvány kapcsán a remdesivirrel kapcsolatos kutatások jelentős lendületet kaptak. A remdesivir (38. ábra) egyik fő problémája rendkívül rossz vizes oldékonysága, amely jelentősen korlátozza a formulálhatóságát. Ennek megoldására a Cyclolab olyan formulázási stratégiát dolgozott ki, amelyben a hatóanyagot ciklodextrin-komplexbe zárva annak oldékonysága nagyságrendekkel növelhetővé vált.



38. ábra. A remdesivir szerkezete

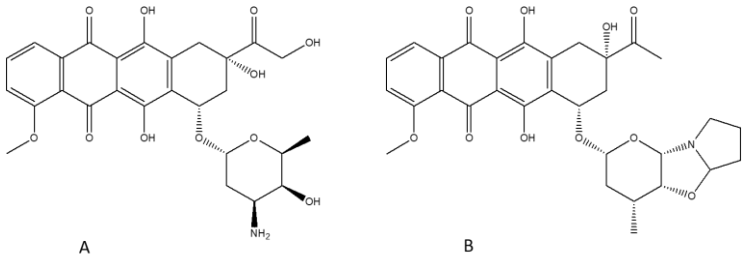
A becsomagolt hatóanyagok vizsgálatát egy több lépcsőből álló kísérletsorozat keretében végeztük. Első lépésként a formulázási eljárás földi körülmények között történő reprodukálhatóságát ellenőriztük. Ennek során ciklodextrinbe komplexált hatóanyagot tartalmazó mintákat készítettünk öt egymást követő napon, naponként két párhuzamos előállítással. A minták hatóanyagtartalmát két független analitikai módszerrel — LC–MS és UV-detektálás alkalmazásával — határoztuk meg. Az eredmények alapján megállapítható volt, hogy a napok közötti variabilitás nagyobb mértékű, mint az egy napon belül készített párhuzamos minták közötti eltérés, míg a mintaelőkészítési eljárások különbsége nem eredményezett szignifikáns hatást. A vizsgált koncentrációtartományban az UV-detektálás kisebb szórást mutatott, míg a tömegspektrometriás mérés nagyobb érzékenységet biztosított. Ezt követően a reprodukálhatónak bizonyult földi minták egy részét extrém környezeti feltételeknek tettük ki: a formulációk a Nemzetközi Űrállomásra (ISS) kerültek, majd a földre történő visszatérést követően ismételt analitikai vizsgálatoknak vetettük alá őket. A visszatért minták hatóanyagtartalmának és bomlástermék-profiljának összehasonlítása a földi kontrollmintákkal sem koncentrációbeli eltérést, sem új vagy megnövekedett mennyiségű bomlástermék megjelenését nem mutatta. Ezek az eredmények egyértelműen igazolták, hogy a ciklodextrines becsomagolás nemcsak az oldhatóság javítására alkalmas, hanem hatékony védelmet nyújt a hatóanyag számára extrém fizikai és környezeti stresszhatásokkal szemben is [SP22].

Pegilált liposzómás antraciklinek analitikai támogatása onkológiai alkalmazásokban

A hatóanyagok liposzómás becsomagolása különösen az onkológiai terápiák területén bír kiemelt jelentőséggel, mivel lehetőséget teremt a hatékony, de súlyos mellékhatásokkal terhelt citosztatikumok biztonságosabb alkalmazására. Az antraciklin típusú kemoterápiás szerek — köztük a doxorubicin — klinikai hatékonysága jól ismert, ugyanakkor alkalmazásukat jelentősen korlátozza kifejezett, dózisfüggő szisztémás toxicitásuk. A pegilált liposzómás doxorubicin formulációk (PLD) célja ezen mellékhatások mérséklése, miközben az antitumor hatás megőrzése vagy javítása valósul meg. Az ilyen hordozórendszerek fejlesztése és biológiai értékelése azonban csak megfelelően validált analitikai módszerek birtokában lehetséges.

Egy több intézményt érintő együttműködés keretében elsőként pegilált liposzómába csomagolt doxorubicin (39. ábra (a)) készítmények analitikai jellemzésében vettem részt. Feladatom a hatóanyagtartalom megbízható meghatározására alkalmas LC–MS alapú

módszer kidolgozása volt, valamint annak vizsgálata, hogy milyen mintaelőkészítési eljárás biztosítja a liposzómákba zárt doxorubicin kvantitatív felszabadítását. A liposzómák felnyitására háromszoros térfogatú metanolos kezelést alkalmaztam, amely egyszerre bizonyult hatékonynak a hatóanyag felszabadítására és kompatibilisnek a későbbi biológiai minták (szérum, sejtes minták) fehérjekicsapási lépéseivel. A kidolgozott módszerrel igazolható volt, hogy az előállított formulációk hatóanyagtartalma megfelel a tervezett dózisoknak, ami alapvető feltétele volt az állatkísérletes farmakokinetikai és hatásvizsgálatok elvégzésének [SP23]. A módszertani tapasztalatokra építve egy későbbi, komplexebb onkológiai fejlesztés során egy újonnan szintetizált piridil-daunorubicin származék (39. ábra (b)) liposzómás formulációjának (LiPydau) analitikai támogatásában is részt vettem. Ebben az esetben a kutatás célja nem csupán a hatóanyag hordozásának biztosítása volt, hanem kifejezetten a szisztémás toxicitás csökkentése a tumorellenes hatás megőrzése mellett. Az analitikai munka során a LiPydau készítmények hatóanyagtartalmának meghatározására és a mérési eljárások reprodukálhatóságának biztosítására szolgáló módszertani alapokat dolgoztam ki. A pontos és megbízható analitikai adatok elengedhetetlenek voltak ahhoz, hogy a különböző formulációk biológiai hatásai összehasonlíthatók legyenek, és hogy a toxicitáscsökkenés valódi formulációs előnyként értelmezhetővé váljon. Ezek az együttműködések jól példázzák, hogy a liposzómás citosztatikumok fejlesztésében az analitikai módszerek nem csupán támogató szerepet töltenek be, hanem közvetlenül meghatározzák a farmakológiai és toxikológiai következtetések megbízhatóságát.



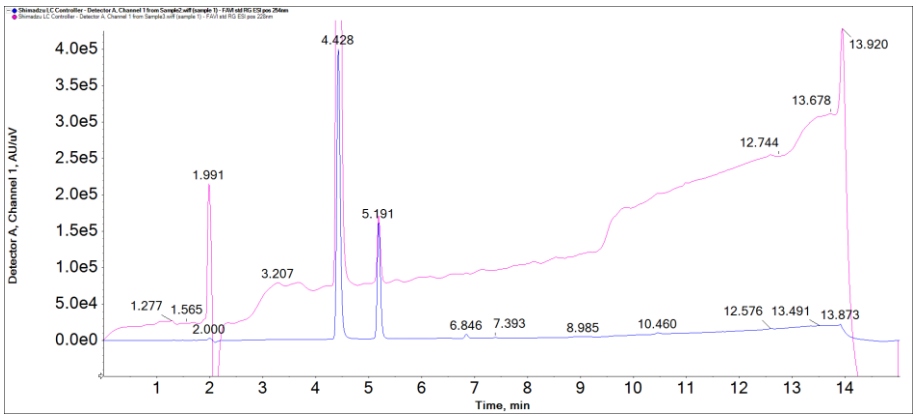
39. ábra. A doxorubicin (A) és a PyDau (B) szerkezete

5.2.1.3. A 0,1%-os azonosítási határ szennyezők esetén

A gyógyszermolekulák szintézise során az API mellett kis mennyiségben szennyezők is megjelenhetnek, amelyek származhatnak mellékreakciókból, segédanyagokból vagy a reaktánsok szennyeződéseiből. A forgalomba hozatal feltétele, hogy a 0,1% feletti

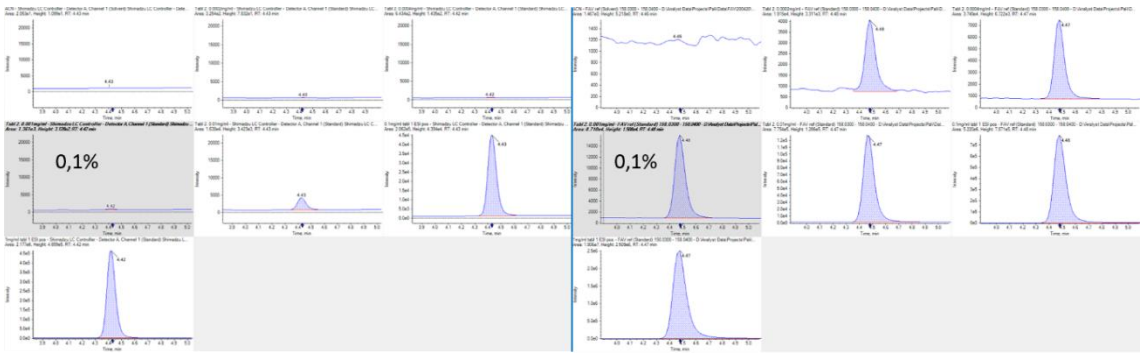
szennyezők szerkezeti azonosítása megtörténjen. Ez a feladat különösen nehéz, ha a szennyezők kémiai szerkezete és polaritása előzetesen nem ismert.

A gyakorlatban gyakran (U)HPLC-UV módszereket alkalmaznak diódasoros detektálással, azonban a hatóanyag és a szennyezők eltérő UV-aktivitása bizonytalanságot okozhat. Nem egyértelmű például, hogy a 0,1%-os határérték mely hullámhosszon értelmezendő. A favipiravir esetében 228 és 254 nm-en felvett kromatogramok összehasonlítása azt mutatta, hogy bár 254 nm-en jobb az érzékenység és simább az alapvonal, a hatóanyag és fő szennyezője eltérő arányban jelenik meg a két hullámhosszon. (40. ábra)



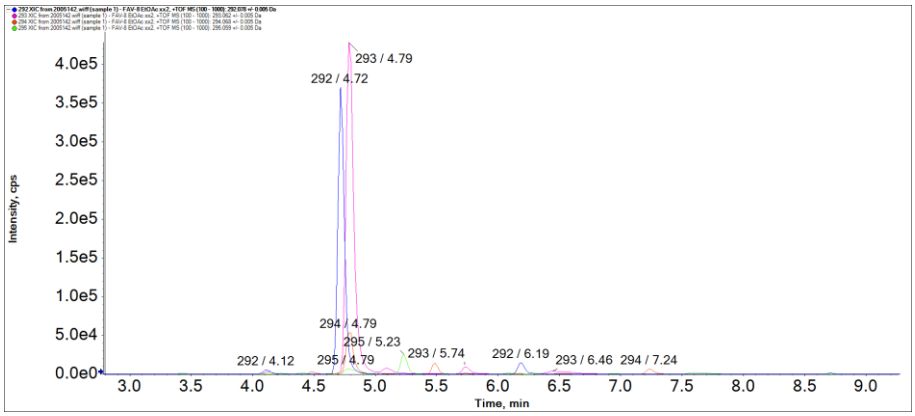
40. ábra. A favipiravir UV-kromatogramjai 254 nm-en (kék) és 228 nm-en (rózsaszín).

A favipiravir hígítási sorában a 0,1% körüli szint (≈1 µg/mL) UV-detektálással már a kimutathatóság határán volt, különösen nem ideális alapvonal esetén. Ezzel szemben a tömegspektrometriás detektálás lényegesen nagyobb érzékenységet és szelektivitást biztosított. (41. ábra) Ugyanakkor MS esetében is bizonytalanságot okozhat a hatóanyag és a szennyezők eltérő ionizálhatósága, mivel már kis szerkezeti változások is nagyságrendi intenzitáskülönbségeket eredményezhetnek.



41. ábra. A favipiravir UV- (bal) és MS - (jobb) kromatogramjai különböző koncentrációszinteken: blank, 0,2; 0,4; 1; 10; 100 és 1000 µg/mL.

A nagyfelbontású MS azonban nemcsak az érzékenységet növeli, hanem az elemi összetétel meghatározásán keresztül a szennyezők szerkezetazonosítását is segíti. A favipiravir esetében egy intenzív, m/z 292-nél megjelenő csúcsról igazolható volt, hogy a hatóanyag dimere. Részletes HRMS vizsgálatokkal dimerek sorozata volt azonosítható: 292 ($C_{10}H_{10}N_7O_4$); 293 ($C_{10}H_9N_6O_5$); 294 ($C_{10}H_9FN_7O_3$) és 295 ($C_{10}H_7FN_6O_4$) tömegekkel. (42. ábra) A teljes anyagmérleg pontos meghatározása azonban csak akkor lehetséges, ha az azonosított szennyezőket izolálják vagy kereskedelmi forrásból beszerzik, és valódi kalibrációs módszerrel határozzák meg azok abszolút koncentrációját.



42. ábra. Favipiravir-dimerek ionkromatogramjai

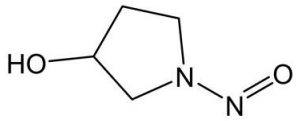
5.2.1.4. Nitrózaminok mennyiségi meghatározása

Napjaink gyógyszeranalitikai vizsgálatainak egyik legnagyobb kihívását a nitrózaminok kimutatása és mennyiségi meghatározása jelenti, különösen a kész gyógyszerformák esetében. A nehézséget egyrészt a késztermékekben nagy mennyiségben jelen lévő mátrixkomponensek, másrészt az egyes nitrózaminokra meghatározott rendkívül alacsony megengedett napi beviteli határértékek okozzák. Egyes vegyületek esetében ez az érték mindössze 18 ng/nap, amely analitikai szempontból extrém érzékenységi követelményeket támaszt.

Az elmúlt években laboratóriumunkat is számos megkeresés érte nitrózaminok vizsgálatával kapcsolatban. A klasszikus, oldószereredetű nitrózaminok (pl. NDMA, NDEA, NDBA, NDIPA) mérésére jól bevált, standardizált módszerek állnak rendelkezésre. Ezeket a módszereket alkalmaztuk a favipiravir esetében is, a lehetséges oldószer-eredetű nitrózaminok kimutatására. Ezzel szemben a hatóanyageredetű nitrózamin-származékok esetében minden egyes vegyülethez és mátrixhoz új, célzott analitikai módszer kidolgozására volt szükség.

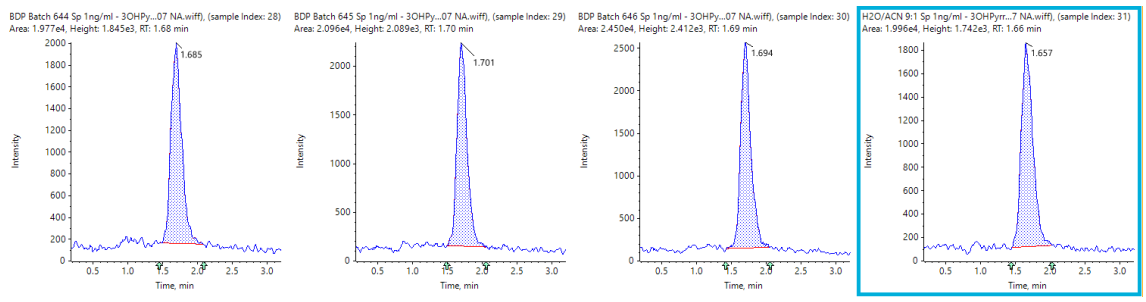
N-nitrozo-3-hidroxi-pirrolidin mérése készítményből.

Az N-nitrozo-3-hidroxi-pirrolidin (NN3OHP) a barnidipin hatóanyagból képződő potenciális nitrózamin-szennyező (43. ábra). A maximálisan megengedett napi bevitel 18 ng, míg a barnidipin terápiás dózisa 20 mg/nap. Ez azt jelenti, hogy 1 mg/mL hatóanyag-koncentráció mellett a megengedett NN3OHP-szint 0,9 ng/mL. A módszerrel szembeni elvárás azonban az volt, hogy ennél legalább egy nagyságrenddel alacsonyabb koncentráció is megbízhatóan kimutatható legyen, ami 90 pg/mL körüli érzékenységet jelentett.



43. ábra. N-nitrozo-3-hidroxi-pirrolidin szerkezete

Egy érzékeny LC–MS/MS módszert dolgoztam ki, amelyben a célmolekula 1,7 percnél eluálódott. A vizsgálatok során az APCI ionizáció pozitív ion módban bizonyult a legérzékenyebbnek. Az 1 ng/mL szintre addícionált három különböző API-termék és a tiszta víz kromatogramjait a 44. ábra mutatja.

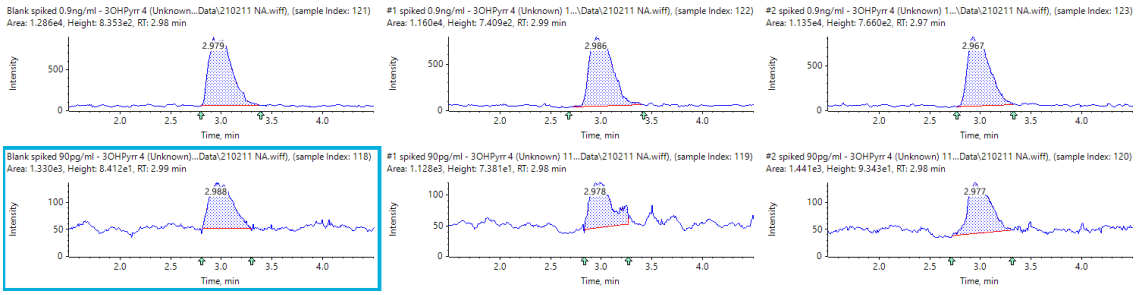


44. ábra. 1 ng/mL szintre addícionált minták kromatogramjai: három API (A–C) és víz (D).

Az eredmények alapján megállapítható volt, hogy a hatóanyag-mátrix és a tiszta oldószer gyakorlatilag azonos intenzitású jelet adott, ami azt jelentette, hogy a kalibráció tiszta oldószerből is elvégezhető volt. A vizsgált minták közül csupán egy API-termékben volt kimutatható NN3OHP, azonban annak mennyisége is jóval a megengedett határérték alatt maradt. Ezzel a vizsgálat első szakasza sikeresen lezárult.

Néhány hónappal később azonban újabb megkeresés érkezett, ezúttal a kész gyógyszertermékből történő NN3OHP-meghatározásra. A korábban kidolgozott módszer alkalmazása során kiderült, hogy a segédanyagok csúcsai a célmolekulához nagyon közel

eluálódnak, ami jelentős ionelnyomást okozott. Ezért új kromatográfiás módszert fejlesztettem. Egy YMC Hydrosphere C18 (150 × 4,6 mm, 3 µm) oszlopon, gradiens elúcióval sikerült a célmolekulát a mátrixcsúcsoktól elkülönítve eluáltatni, 3,04 perces retenciós idővel. Bár a molekula kis molekulatömegű, két jól használható MRM átmenetet is sikerült azonosítani (m/z 117→87 és 117→68,1), amelyek érzékeny és megbízható mennyiségi meghatározást tettek lehetővé. Hétpontos kalibrációt alkalmaztam a 90–50000 pg/mL koncentrációtartományban, kiváló linearitással (r = 0,9997). A módszer reprodukálhatóan biztosította mind a határértékhez közeli koncentráció (900 pg/mL), mind az alacsony LOQ érték (90 pg/mL) mérését (45. ábra).



45. ábra. N-nitrozo-3-hidroxi-pirrolidin három párhuzamos mérése 900 pg/mL (A–C) és 90 pg/mL (D–F) koncentrációszinteken.

A kidolgozott módszer nemcsak tiszta oldószerből, hanem a kész gyógyszertermék komplex mátrixából is alkalmas volt a nitrózamin meghatározására. Éles minták vizsgálata során az NN3OHP csak nyomnyi mennyiségben volt kimutatható, koncentrációja minden esetben messze a megengedett határérték alatt maradt

N-nitrozo-fenilefrin

Az NN3OHP esettanulmánya jól szemléltette, hogy a nitrózaminok vizsgálatában az analitikai kihívás nem kizárólag az extrém alacsony koncentrációk eléréséből adódik, hanem legalább ennyire meghatározó a mátrixváltás is. Míg hatóanyag-mátrixban sok esetben elegendő lehet a relatíve egyszerűbb kalibrációs megközelítés és a célkomponens gyors elúciója, addig kész gyógyszertermékekben a segédanyagok összetétele és mennyisége, illetve a velük együtt eluáló komponensek ionelnyomást és szelektivitási problémákat okozhatnak. A tapasztalatok alapján ezért ugyanazon nitrózamin esetében is eltérő kromatográfiás és detektálási stratégiára lehet szükség attól függően, hogy hatóanyagból vagy késztermékből történik a meghatározás. Ezt a szemléletet tovább erősítette a következő vizsgálat, amelyben az N-nitrozo-fenilefrin (NNPE) mennyiségi

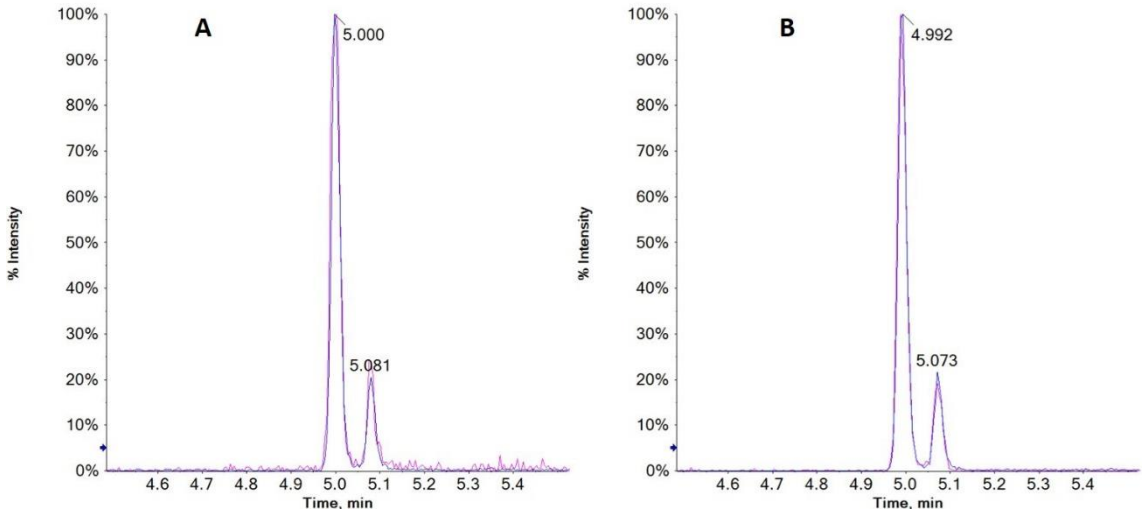
meghatározására dolgoztam ki LC–MS/MS módszert komplex, nagy tömegű segédanyag-mátrixot tartalmazó megfázás elleni forró italporokból. Ebben az esetben a rendkívül alacsony megengedett napi bevitelhez társuló, jelentős és gyártónként is eltérő mátrixterhelés miatt a módszerfejlesztés fókusza már nemcsak az érzékenység maximalizálása volt, hanem a szelektivitás és robusztusság biztosítása is különböző termékösszetételek mellett.

Az N-nitrozo-fenilefrin (NNPE) a fenilefrinhez (PE) köthető, hatóanyageredetű nitrózamin-szennyező, amely a gyógyszerbiztonsági elvárások szigorodásával a készítmények minőségellenőrzésének kiemelt célkomponensévé vált. A vegyület különösen nehéz analitikai feladatot jelent, mivel a megengedett napi bevitel rendkívül alacsony (100 ng/nap), miközben a vizsgált megfázás elleni forró italporok („hot-drink" formulák) igen nagy mennyiségű, kémiailag változatos segédanyag-mátrixot tartalmaznak. A módszerfejlesztés célja ezért olyan LC–MS/MS eljárás kidolgozása volt, amely egyszerre biztosítja az extrém érzékenységet és a különböző gyártók termékei közötti mátrixkülönbségekkel szembeni robusztusságot.

Ahogy azt az 5.1.1.1. fejezetben már említettem, a módszerfejlesztés első lépéseként az NNPE ionizációs viselkedését vizsgáltam, mivel a nitrózaminok esetében sem az ionizációs technika (ESI vagy APCI), sem a polaritás nem jelezhető megbízhatóan pusztán a molekulaszerkezet alapján. A legnagyobb jelintenzitást negatív ESI módban kaptam. Ennek további előnye volt, hogy a kiindulási hatóanyag, a fenilefrin, negatív módban jóval kisebb válaszjelet adott, ami komplex mátrixok esetén csökkentette az ionelnyomás kockázatát. Az MRM átmeneteket automatizált optimalizálással állítottam be az NNPE és izotópjelzett belső standardja (NNPE-d_3) esetében. Negatív módban egy domináns fragmension (m/z 121), valamint két kisebb intenzitású fragmens (m/z 122 és 93) jelent meg az MS/MS spektrumokban. A mérési ciklusidőt és a dwell time-okat úgy választottam meg, hogy a kromatográfiás csúcsokra legalább tíz adatpont jusson, és a módszer érzékenysége maximális legyen. A fejlesztés során a fenilefrin átmeneteit ideiglenesen használtam a kromatográfiás elválasztás ellenőrzésére, majd a végső kvantitatív módszerből eltávolítottam őket a ciklusidő csökkentése és az NNPE detektálási teljesítményének növelése érdekében. A kromatográfiás fejlesztés központi célja az NNPE alapvonali elválasztása volt a fenilefrintől és a poláros, korán eluáló segédanyag-komponensektől, miközben keskeny csúcsalakot kellett elérni az érzékenység érdekében. Több állófázist is teszteltünk; a legkedvezőbb retenciót, csúcsszimmetriát és robusztusságot egy Kinetex C18 oszlop biztosította, ezért ezt választottuk. A fejlesztés

során fontos tapasztalat volt, hogy az eluens szerves komponense döntően befolyásolta a mátrixinterferenciákat. Acetonitril alapú elúció mellett egyes mintákban az NNPE egyik izomerével koelúcióban jövő komponens jelentős elnyomó hatást produkált, amelyet gradiens- és paramétermódosításokkal sem sikerült megbízhatóan kezelni. A fordulópontot az jelentette, amikor metanolra váltva az interferáló csúcs eltolódott az NNPE elúciós tartományából, miközben a retenció és csúcsalak változatlan maradt A végső módszer így metanol/0,1% hangyasav szerves eluenssel bizonyult a legstabilabbnak.

Az NNPE és az NNPE-d_3 a kromatogramokon reprodukálhatóan két csúcs formájábaneluálódott. (46. ábra) Ez a jelenség a N–N=O kötés körüli korlátozott rotációhoz és E/Z izoméria kialakulásához köthető, ami nitrózaminoknál ismert [238]. A kvantitatív szempontból kritikus kérdés az volt, hogy a két izomer ionizációs válasza eltér-e, illetve a csúcsarány stabilan reprodukálható-e. A mérések során a két csúcs aránya stabilnak és állandónak bizonyult az NNPE és az izotópjelzett belső standard esetében egyaránt. Ez lehetővé tette, hogy a mennyiségi meghatározást a nagyobb intenzitású izomer csúcsára alapozzuk, minimalizálva az interferenciák kockázatát. A vizsgált hot-drink készítmények tasakonkénti tömege (5–22,5 g) és a javasolt napi adagolás jelentős eltéréseket mutatott, miközben a célkoncentráció rendkívül alacsony volt. A mintaelőkészítés során ezért olyan, a rutin minőségellenőrzési gyakorlatot tükröző, ugyanakkor robusztus eljárás kialakítására törekedtem, amely nem tartalmaz felesleges tisztítási vagy dúsítási lépéseket, mivel ezek rontanák a visszanyerést és a reprodukálhatóságot.



46. ábra. Az NNPE (A) és az NNPE-d_3 (B) MRM kromatogramjai.
Az egyes MRM átmeneteket kék illetve ciklámen szín jelöli

A kis térfogatban (1–10 mL) történő oldás elfogadható visszanyerést eredményezett, ugyanakkor a reprodukálhatóság gyenge volt, amit az NNPE porokban történő heterogén

eloszlásával magyaráztunk. A reprodukálhatóság jelentősen javult, amikor a mintaelőkészítést a valós felhasználói gyakorlathoz igazítottam: egy teljes tasak tartalmát oldottam fel forró (nem forrásban lévő) csapvízben, a tényleges elkészítési térfogatnak megfelelően. Centrifugálást követően a felülúszót izotópos belső standardot tartalmazó hígítóoldattal tízszeresére hígítottam, majd közvetlenül injektáltam. A nagy mátrixterhelés miatt diverter szelepet alkalmaztam, amellyel a korán eluáló poláris komponenseket 0,3–1,3 perc között a hulladékágba vezettem, védve ezzel az Q2(R2) irányelv szerint történt, beleértve a szelektivitás, linearitás, LOD/LOQ, pontosság, precizitás, mátrixhatás, carryover és stabilitás vizsgálatát. Valódi blank mátrix hiányában a szelektivitást több gyártó termékein értékeltem, és a potenciális interferenciák azonosításához nagyfelbontású QTOF méréseket is alkalmaztam. Ennek során olyan együtteluáló komponenseket is sikerült elkülöníteni, amelyek alacsony felbontású MRM módban álpozitív jelet okozhattak, például izotópcsúcs-átfedések miatt. A kidolgozott módszer kiváló linearitást mutatott a 3,9–500 pg/mL koncentrációtartományban, az LOD értéke 1,95 pg/mL-nek adódott.

A validált módszerrel több gyártótól származó készítményekből tasakonként több mintát elemeztünk, a mérési ismételhetőséget triplikát mérésekkel ellenőrizve. Az eredmények jelentős gyártó- és tárolásfüggő variabilitást mutattak: több esetben az NNPE szintje meghaladta a maximálisan megengedett szintet, és a hosszabb ideig (például egy évig) szobahőmérsékleten tárolt, felbontott tasakoknál egyértelműen magasabb NNPE-koncentrációkat tapasztaltunk, ami időfüggő képződésre utal. (3. táblázat) A módszer így nemcsak minőségbiztosításra, hanem a formulációs és tárolási kockázatok feltérképezésére is alkalmasnak bizonyult [SP1].

3. táblázat. Különböző gyártók anticold italporainak vizsgálata

		#1 (pg/mL)	#2 (pg/mL)	#3 (pg/mL)	Átlag (pg/mL)	szórás (pg/mL)	szórás (%)
Gyártó A	Tasak #1	672,79	623,86	663,49	**653,38**	25,98	3,98
	Tasak #2	489,33	489,76	468,25	**482,45**	12,30	2,55
	Tasak #3	284,48	285,03	277,63	**282,38**	4,12	1,46
	Tasak #4	324,40	316,47	332,00	**324,29**	7,77	2,39
	Tasak #5	286,17	286,12	279,62	**283,97**	3,77	1,33
	Tasak #6	282,73	296,56	298,57	**292,62**	8,62	2,95
Gyártó B	Tasak #1	50,47	53,07	56,88	**53,47**	3,22	6,03
	Tasak #2	10,74	12,54	11,21	11,50	0,93	8,12
	Tasak #3	6,19	6,52	6,70	6,47	0,26	4,00
	Tasak #4	0,93	0,79	1,01	0,91	0,11	12,24
	Tasak #5	41,72	40,29	39,46	**40,49**	1,14	2,82
	Tasak #6	5,79	4,68	4,70	5,06	0,64	12,56
Gyártó C	Tasak #1	294,67	300,59	292,28	**295,85**	4,28	1,45
	Tasak #2	244,67	252,61	243,65	**246,98**	4,91	1,99
	Tasak #3	4426,26	4429,21	4547,09	**4467,52**	68,93	1,54
	Tasak #4	165,76	144,87	157,78	**156,14**	10,54	6,75
	Tasak #5	92,55	98,40	102,64	**97,86**	5,07	5,18
	Tasak #6	96,06	100,47	101,87	**99,47**	3,03	3,05
Gyártó D	Tasak #1	5,09	5,12	5,67	5,29	0,33	6,17
	Tasak #2	20,58	20,17	20,35	20,37	0,21	1,01
	Tasak #3	9,66	9,72	9,95	9,78	0,15	1,57
	Tasak #4	67,20	81,32	74,59	**74,37**	7,06	9,5
	Tasak #5	164,14	154,69	170,38	**163,07**	7,90	4,84
	Tasak #6	16,73	14,60	16,87	16,07	1,27	7,92

Bold: határérték feletti

N-nitrozo-duloxetin esete

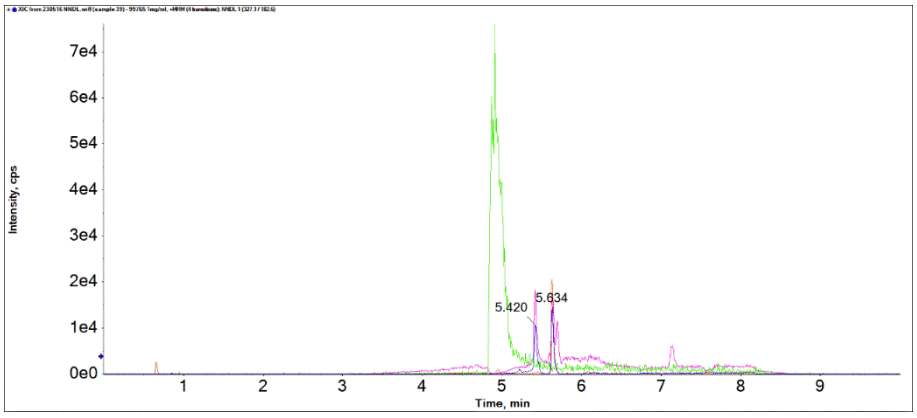
A nitrózaminok mennyiségi meghatározása számos, egymástól eltérő analitikai kihívást rejt magában. A korábban bemutatott problémák – mint az ionizációs technika és polaritás megválasztása, az extrém alacsony mérendő koncentrációk, valamint a nagy mátrixterhelés – mellett bizonyos esetekben további, kevésbé nyilvánvaló jelenségekkel is számolni kell. Az N-nitrozo-duloxetin (NNDL) esete ilyen szempontból különösen tanulságosnak bizonyult.

Az NNDL, mint a duloxetin hatóanyaghoz köthető nitrózamin-szennyező, API-mátrixban történő meghatározására kellett LC–MS/MS módszert fejlesztenem. A szokásos módszerfejlesztési lépések elvégzését követően – beleértve a kromatográfiás és tömegspektrometriás paraméterek optimalizálását – egy látszólag érzékeny és szelektív módszerhez jutottam. A vizsgálatok során azonban váratlan ionkémiai jelenséggel találkoztam. Az NNDL molekula különleges affinitást mutatott az ammóniumionokhoz.

Az optimalizálás során a protonált molekulaion mellett az ammóniumionnal képzett adduktot is vizsgáltam. Az MS/MS mérések egyértelműen igazolták, hogy valóban ammóniumadduktról van szó: a fragmentáció első lépéseként semleges ammónia (NH_3) elvesztése volt megfigyelhető, amelyet az NNDL-re jellemző fragmensionok megjelenése követett. Különösen figyelemre méltó volt, hogy az ammóniumadduktból származó MRM átmenet lényegesen nagyobb érzékenységet mutatott, mint a protonált ionhoz tartozó két MRM átmenet. A mérési biztonság növelése érdekében a végső módszerbe mindhárom, NNDL-hez tartozó átmenetet beépítettem. A 0,15–5 ng/mL koncentrációtartományra hatpontos kalibrációt állítottam fel, amelyet a további mérésekhez alkalmaztam. Az NNDL standard oldatból 5,63 perces retenciós időnél éles, jól reprodukálható csúcsot adott mindhárom MRM átmeneten.

A következő lépés az API-minták vizsgálata volt. A duloxetin hatóanyag a várakozásoknak megfelelően széles jelet adott körülbelül 5 perc környékén. Az NNDL átmenetein azonban 5,42 percnél jelent meg egy jel, miközben az ammóniumaddukt átmenet nem volt kimutatható. Első megközelítésben azt feltételeztem, hogy API-mátrixban a retenciós idő előrébb tolódott, és mivel az eluensek nem tartalmaztak ammónium módosítót, ez a csúcs valóban az NNDL-hez tartozhat.

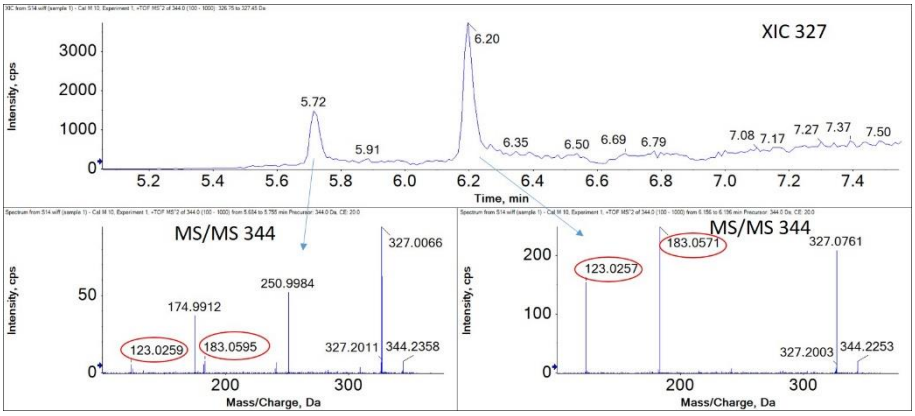
E feltételezés alapján azonban rendkívül magas, és sok esetben nem reprodukálható NNDL-koncentrációkat kaptam. Az ellentmondás tisztázása érdekében az API-mintát NNDL standarddal addícionáltam. Az addíciós kísérlet során az 5,42 perces csúcs továbbra is megmaradt, ugyanakkor az NNDL a várt 5,63 perces retenciós időnél éles csúcsként, egyértelműen megjelent (47. ábra).



47. ábra. NNDL-lel addícionált duloxetin kromatogramja

Ez egyértelműen igazolta, hogy az éles mintákban korábban mért értékek nem voltak valósak, és az 5,42 perces csúcs nem az NNDL-hez tartozott. A következő kérdés

az volt, hogy mi lehet korábban eluálódó komponens. Mivel a két csúcs retenciós ideje viszonylag közel esett egymáshoz, felmerült annak lehetősége, hogy az NNDL valamely izomer formájáról van szó, amely API-környezetben képződik. Ennek igazolására a vizsgálatokat nagyfelbontású tömegspektrometriás (QTOF) rendszerre vittem át. A standard NNDL esetében a 327 és 344 tömegszámú ionokról készült MS/MS spektrumok teljes egyezést mutattak: az anyaion mellett kizárólag a 183 és 123 tömegű, NNDL-re jellemző fragmensionok voltak jelen. Ezzel szemben az API-mintában előrébb eluálódó, szintén 327-es tömegű ion MS/MS spektruma jelentősen eltért: abban a 250,99 és 174,99 tömegű ionok domináltak, eltérő tömegdefektussal, miközben alacsony intenzitással ugyan, de az NNDL-re jellemző 183 és 123 tömegű fragmensionok is megfigyelhetők voltak (48. ábra).



48. ábra. NNDL-lel addícionált duloxetin API QTOF-MS spektruma

Bár a két HPLC rendszer eltérő felépítése miatt a retenciós idők abszolút értékei különböztek, a 327-es ion kromatogramján jól elkülöníthető volt két intenzív csúcs, 5,72 és 6,20 perces retenciós időknél. Ez meggyőző magyarázatot adott arra a jelenségre, amely a duloxetin API-mintákban 5,42 percnél megjelenő csúcsot eredményezte.

Az eset egyértelműen rávilágított arra, hogy a kiértékelés során a retenciós idő pontos értelmezésére és a fragmentációs mintázatok összevetésére kiemelt figyelmet kell fordítani, mivel egy ilyen jellegű véletlen egybeesés súlyosan félrevezető eredményekhez vezethet. A mintákat ezt követően mind a QTOF, mind a hármas kvadrupól (QqQ) rendszeren megmértem, és az egyes mintákra teljes mértékben egyező eredményeket kaptam (4. táblázat). A vizsgálatok megerősítették, hogy bár bizonyos koncentrációszintekig a TOF analizátorok is megbízható kvantitatív adatokat szolgáltathatnak, az extrém alacsony koncentrációk esetében a hármas kvadrupól rendszerek érzékenységével nem képesek versenyezni.

4. táblázat. Éles minták NNDL értékei TOF és QqQ rendszeren

Sample Name	TOF 1	TOF 2	QqQ 1	QqQ 2
1A	1.13	1.28	1.28	1.34
1B	0.04	< 0	0.14	N/A
1C	0.03	< 0	0.17	0.12
2A	0.05	0.21	0.26	N/A
2B	< 0	0.03	< 0	N/A
2C	0.14	0.04	0.08	N/A
3A	0.01	0.05	0.13	N/A
3B	< 0	0.05	0.15	N/A
3C	< 0	< 0	0.09	N/A

5.2.1.5. Szermaradványok mennyiségi meghatározása

A gyógyszerhatóanyagok analitikai nyomonkövetésének utolsó állomását a szervezetből a környezetbe kikerülő komponensek vizsgálata jelenti. Az előző fejezetekben a szervezetbe bekerülő gyógyszermolekulák átalakulását mutattam be: a metabolizáció során az anyavegyület koncentrációja csökken, miközben a keletkező metabolitok mennyisége növekszik. Ezek a komponensek végül vizelet vagy széklet formájában távoznak a szervezetből, majd a szennyvízhálózaton keresztül a szennyvízkezelő rendszerekbe kerülnek. A szennyvíztisztítás egyik fontos feladata ezen szermaradványok eltávolítása vagy ártalmatlanítása annak érdekében, hogy a kezelt szennyvíz minél kisebb terhelést jelentsen a befogadó felszíni vizek számára.

A mátrixok bemutatásánál már említettem a Nyírségvíz Zrt.-vel folytatott együttműködésünket, amelynek keretében a vállalat egy bakteriális bontáson alapuló szennyvíztisztítási technológiát fejlesztett ki. Ez a módszer alkalmasnak bizonyult a vizekben jelen lévő nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentők lebontására. A mi feladatunk olyan analitikai módszer kidolgozása volt, amely képes ezen vegyületek – naproxen, ibuprofen, diclofenac és ketoprofen – mennyiségi meghatározására kezeletlen és kezelt szennyvizekből, szennyvíziszapból, valamint komposztmintákból. A beérkező és távozó szennyvizek mintaelőkészítése egyszerű centrifugálással történt: a mintákat 14 000 rpm fordulatszámon 15 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót közvetlenül mértük. Az iszapminták esetében először centrifugálással különválasztottuk a folyadék- és szilárd fázist. A szilárd fázist ezt követően metanollal extraháltuk, rázattuk, majd újra centrifugáltuk, és az így kapott felülúszót analizáltuk. A komposztminták esetében kizárólag metanolos extrakciót alkalmaztunk.

A vizsgált komponenseket negatív ionizációs módban, MRM üzemmódban határoztuk meg egy Merck Purospher Star C18 (55 × 2 mm, 3 µm) oszlopon. Eluensként

10 mM ammónium-formiát pufferoldatot (pH = 5,5) és acetonitrilt alkalmaztunk. A teljes futási idő 7 perc volt.

Mintegy 200 minta elemzése alapján az alábbi megállapításokat tettük:

- Diclofenac esetében valamennyi mintában jól mérhető koncentrációkat kaptunk; a kezelés hatása egyértelműen nem volt igazolható.
- Ibuprofen esetében az érkező szennyvizekben jelentős koncentrációkat mértünk, amelyek a kezelés hatására számottevően csökkentek.
- Ketoprofen nem minden érkező mintában volt kimutatható, és a kezelés hatása kevésbé volt markáns, bár több esetben mérhető csökkenést tapasztaltunk. Figyelembe véve, hogy a minták különböző telepekről származtak, az érkező minták közötti eltérések értelmezhetőnek tekinthetők.
- Naproxen esetében volt a legszembetűnőbb a kezelés hatása: a kezelt mintákban az esetenként igen magas koncentrációban jelen lévő vegyület gyakorlatilag teljes mértékben eltűnt.

Az iszapminták elemzése során az extrakciót követően a tiszta felülúszóhoz képest 5–10-szer magasabb koncentrációkat mértünk, ami arra utal, hogy a vizsgált komponensek – eltérő mértékben ugyan, de – jelentős mértékben feldúsulnak a leülepedő iszapban. A komposztminták szintén számottevő mennyiségben tartalmazták mind a négy vizsgált hatóanyagot. Ezek az eredmények fontos információt szolgáltattak a szennyvízkezelési technológia további finomhangolásához.

A nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentőket tartalmazó gyógyszerkészítmények kedvező hatásuk miatt a legnagyobb mennyiségben forgalmazott gyógyszerek közé tartoznak. Ennek következtében ezek a vegyületek – változatlan vagy metabolizált formában – egyre nagyobb mennyiségben jelennek meg a szennyvizekben, majd a felszíni vizekben is. Ez jelentősen megnövelte az igényt olyan analitikai módszerek iránt, amelyek gyorsan, nagy érzékenységgel és megbízhatóan képesek ezen komponensek kimutatására különböző vízmátrixokból.

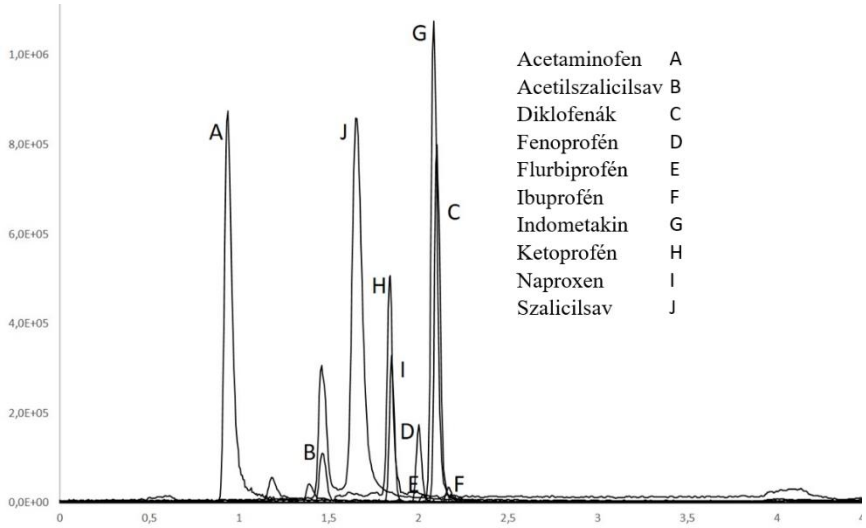
A korábban kidolgozott módszerünk továbbfejlesztése és más hatóanyagokra történő kiterjesztése elkerülhetetlenné vált. Ennek eredményeként egy teljesen új alapokon nyugvó, nagy érzékenységű LC–MS/MS módszert dolgoztunk ki tíz nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentő – acetaminofen, diklofenak, indometacin, acetilszalicilsav, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, ketoprofen, naproxen és szalicilsav – egyidejű meghatározására.

Az érzékenység növelése érdekében a módszerfejlesztés során minden lehetséges eszközt alkalmaztunk. Az MRM átmenetek optimalizálása mellett mikro-LC rendszert, on-line dúsítást és nagy térfogatú injektálást kombináltunk. Az egyes vegyületek ionizációs tulajdonságainak megfelelően az acetaminofent, a diklofenakot és az indometacint pozitív ionizációs módban, míg a további hét vegyületet negatív módban optimalizáltuk. A végső módszerben váltakozó polaritású pásztázást alkalmaztunk, amely lehetővé tette mind a tíz komponens mérését egyetlen injektálásból. A forrásparamétereket a mikro-LC rendszer 20 µL/perc áramlási sebességéhez igazítottuk. Az egyes MRM átmenetek figyelési ideje 5 ms, az átmenetek közötti szünet 2 ms, a polaritásváltás ideje pedig 50 ms volt, így a teljes ciklusidő 170 ms-ra adódott, ami megfelelő adatpont-sűrűséget biztosított a kromatográfiás csúcsokhoz. Az analitikai elválasztást egy Eksigent HALO Fused-Core Phenyl-Hexyl (50 × 0,5 mm, 2,7 µm, 90 Å) kolonnán végeztük, on-line csapdázó oszlopként pedig ProntoSIL C18H (10 × 0,5 mm, 5 µm, 120 Å) kolonnát alkalmaztunk. Pozitív ionizációs módban $[M+H]^+$ ionok képződtek, míg negatív módban – ahogy azt korábban már bemutattam – a fenoprofen, flurbiprofen és naproxen esetében az $[M–H]^-$ ionok mellett a CO_2-vesztett pszeudo-molekulaionok adták a legintenzívebb jelet. Ezek kiválasztásával az MRM módszerben 3–5-szörös érzékenységnövekedést sikerült elérni. Az optimált MS paramétereket a Függelék F6. tábázata tartalmazza.

Az elektroporlasztásos ionizáció hatásfoka nagymértékben függ a molekulák polaritásától, valamint az eluensben jelen lévő módosítók minőségétől és koncentrációjától. A vizsgált tíz vegyület gyenge sav, pKa értékük jellemzően 3 és 5 közé esik, ezért az eluens pH-jának megválasztása döntő hatással van az ionizáció hatékonyságára és így a kimutatási határra. A jelintenzitásokat a pH (2,7–9) és az eluensmódosítók koncentrációjának függvényében vizsgáltuk. A kísérletek alapján a szokásosan alkalmazott 0,1% hangyasavhoz képest tízszer hígabb koncentráció (0,01%) mellett, pH = 3,1 értéken kaptuk a legintenzívebb csúcsokat.

A kromatográfiai érzékenységet tovább növeltük on-line SPE alkalmazásával és nagy térfogatú injektálással (95 µL). Savas közegben, fordított fázisú oszlopon kaptuk a leghatékonyabb elválasztást keskeny, intenzív csúcsokkal (49. ábra). Az MS detektor szelektivitása lehetővé tette, hogy a kromatográfiás elválasztás ne minden esetben legyen alapvonali. Egyetlen jelentős interferenciát figyeltünk meg 1,45 percnél, ahol az acetilszalicilsav intenzív csúcsot eredményezett a szalicilsav MRM átmenetén (m/z 137,0 → 92,8). Az acetilszalicilsav ugyanis az ionizáció során szintén CO_2-vesztést szenved, azonos anyaion–leányaion átmenetet produkálva a szalicilsavval. A megfelelő

kromatográfiás felbontás azonban lehetővé tette e két komponens elkülönítését, így a mennyiségi meghatározást az interferencia nem befolyásolta. A mintaelőkészítés lényegében a minták megfelelő mértékű hígítását és nagy térfogatú injektálását jelentette. Bár a vizek mátrixhatása a szennyvizekhez képest kisebb, a nagy injektálási térfogatok miatt a mátrixkomponensek feldúsulása a csapdázó oszlopon a mérés érzékenységét és reprodukálhatóságát is ronthatja. Ezért a módszer kidolgozása során kiemelt figyelmet fordítottunk a mátrixhatás vizsgálatára. A mátrixhatás elemzéséhez a különböző víztípusokat ioncserélt vízzel hígítottuk: ivóvíz esetén 99,9%, 50% és 20%; felszíni víz esetén 50% és 20%; szennyvíz esetén 20% és 10% eredeti mintaarányt alkalmaztunk. Ezeket a mintákat és a desztillált vízzel készült kontrollt standard keverékkel 10 ng/mL koncentrációra addícionáltuk, majd a kapott jelintenzitásokat hasonlítottuk össze.



49. ábra. Tíz nem-szteroid gyulladáscsökkentő egyidejű meghatározása 1 ng/mL szintre addícionált mintában.

Az ivóvíz mátrixhatását elhanyagolhatónak találtuk: legfeljebb ~10% eltérés jelentkezett az acetaminofen, indometacin és naproxen esetében, ezért ezeknél hígítás nélküli meghatározást alkalmaztunk. A felszíni vizek és szennyvizek esetében a különböző hígítási arányok jelentős eltéréseket mutattak, amelyek az érzékenységet, a visszanyerést és a műszer terhelését is kedvezőtlenül befolyásolták. Kompromisszumos megoldásként felszíni vizeknél 20%, szennyvizeknél pedig 10% eredeti mintaarányt választottunk.
A módszert végül validáltuk, majd éles minták mérésére alkalmaztuk. Az egyes mátrixokra meghatározott LOD és LOQ értékeket a Függelék F7. táblázat foglalja össze [SP15].

5.2.1.2. Fermentációs tápoldatok aminosavtartalmának meghatározása

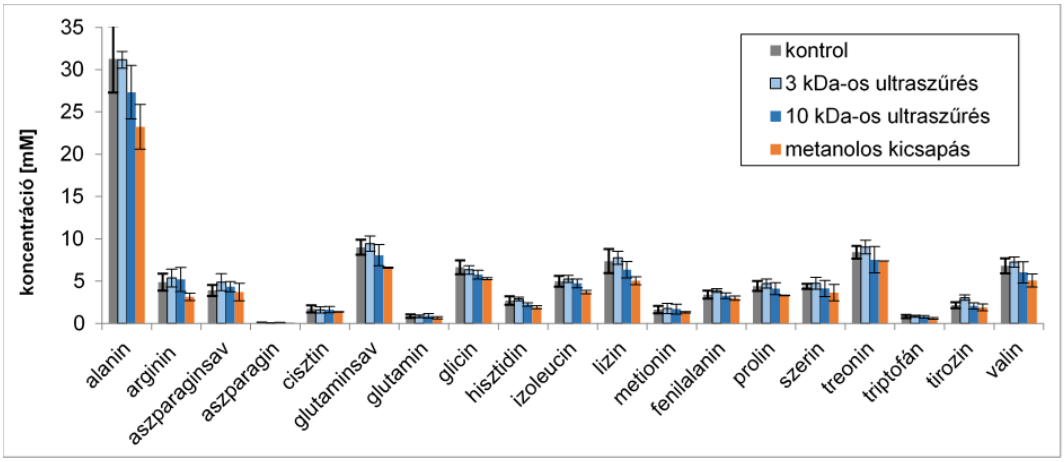
A fejezetben bemutatott munka egy ipari együttműködés keretében indult módszerfejlesztési projekt része volt, amelynek célja emlőssejtes fermentáció során alkalmazott tápoldatok aminosav-összetételének gyors és megbízható mennyiségi meghatározása volt. A fejlesztés közvetlen ipari igényre reagált, mivel a korábban alkalmazott, külső szolgáltató által végzett NMR-alapú meghatározás költséges és időigényes megoldást jelentett. A cél ezért egy olyan LC–MS/MS módszer kidolgozása volt, amely ipari környezetben is robusztusan alkalmazható, és alkalmas a nagy koncentrációjú, összetett mátrixú minták rutinszerű elemzésére.

A módszerfejlesztés részleteit az 5.1.2.2. fejezetben részletesen bemutattam. A probléma megoldásának kulcsát az RX-Sil oszlop jelentette, amely HILIC módban alkalmazva mind a 20 fehérjeépítő aminosavat megfelelő visszatartással és egymástól jól elválasztható módon tudta kezelni (5.1.2.2. fejezet 16. ábra).

A vizsgált fermentációs minták rendkívül tömények voltak, ezért a mintaelőkészítés és a kalibráció megválasztása kritikus jelentőségűvé vált. A kalibrációt ismert aminosav-tartalmú standard oldatokkal végeztem. A komplex mátrix miatt vizes kalibráció nem volt alkalmazható, ugyanakkor olyan modellmátrix sem állt rendelkezésre, amely a fermentációs tápoldatok összes egyéb komponensét is tartalmazta volna. Emiatt a klasszikus külső kalibráció nem jöhetett szóba. A mennyiségi meghatározást ezért standard addíciós módszerrel végeztem. Ehhez a mérendő aminosavakra nézve öt különböző koncentrációszintű kalibrációs oldatot készítettem 0,5 mM koncentrációjú törzsoldatokból. Kísérő standardként gamma-amino-vajsavat (GABA) alkalmaztam, amely szerkezetében hasonló az aminosavakhoz, ugyanakkor a fermentációs tápoldat nem tartalmazza. A mintaelőkészítés során alapvető szempont volt, hogy a mintákat és a kalibrációs oldatokat azonos módon készítsem elő, valamint hogy a nagy mátrixterhelésből adódó ionelnyomást minimalizáljam. Megfigyeltem, hogy nem megfelelő hígítás esetén az egyes aminosavak kromatográfiás csúcsainak egymáshoz viszonyított intenzitása torzul, ami egyértelműen mátrixhatásra utalt. Végül az 500-szoros hígítás bizonyult optimális kompromisszumnak: kisebb hígításnál a mátrixhatás jelentkezett, nagyobb hígításnál pedig a mérendő komponensek túlzott mértékben hígultak volna.

A laboratóriumba érkező fermentációs minták bizonyos esetekben fehérjéket is tartalmazhatnak, amelyek jelenléte egyrészt kromatográfiás és ionizációs mátrixhatást okozhat, másrészt hosszabb távon az analitikai oszlop elszennyeződéséhez is vezethet. Bár

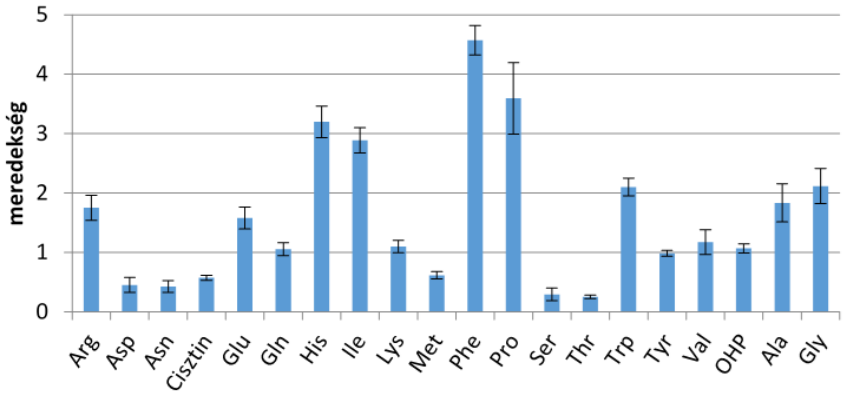
a szabad aminosavak többsége nem kötődik specifikusan fehérjékhez, a fehérjetartalom közvetett módon befolyásolhatja a mérés reprodukálhatóságát és robusztusságát. A jelenség vizsgálata céljából egy kiválasztott mintán 3 kDa-os és 10 kDa-os ultraszűrést, valamint metanolos fehérjekicsapást alkalmaztam lehetséges fehérjementesítési módszerként, és az így előkészített minták aminosav-koncentrációit összevetettem a kezeletlen kontroll mintában mért értékekkel. Az eredményeket a 50. ábra szemlélteti. Mivel a különböző előkészítési módok nem eredményeztek szignifikáns eltérést a mért koncentrációkban, a további mérések során fehérjementesítési lépést nem alkalmaztunk.



50. ábra. Különböző mintaelőkészítési módok hatása 19 aminosav MRM-alapú mennyiségi meghatározására.

A mérendő mintákat több, egymástól elkülönülő adagban kaptuk meg, ezért minden adaghoz külön kalibrációt készítettem. Ennek során az adott mintasorból véletlenszerűen kiválasztott három mintára végeztem el az addíciós kalibrációt. Minden minta esetében három párhuzamos HPLC–MS/MS mérést hajtottam végre, így egy aminosavra összesen kilenc kalibrációs egyenes állt rendelkezésre. A kalibrációs pontokat átlagoltam, majd ezekre illesztettem egyenest, amelyből az átlagos meredekséget határoztam meg. Hosszú távú célunk az volt, hogy a kalibrációt ne kelljen minden egyes mintasorozatra külön elvégezni, hanem egy átlagolt meredekséggel lehessen kiértékelni az adatokat. Ennek érdekében megvizsgáltam, hogy a különböző mintasorozatokhoz tartozó meredekségek között van-e szignifikáns eltérés. Az eredményeket a 51. ábra foglalja össze. Az. ábra alapján elmondható, hogy a legtöbb aminosav esetében a meredekségek átlaga kis relatív szórással (kisebb, mint 15%) rendelkezik, így hosszútávon lehetőség nyílhat arra, hogy ne kelljen minden mintasorozatra elvégezni a kalibrációs folyamatot, hanem egy átlagértékkel lehetne kiértékelni az adatokat.

szabopali_452_26



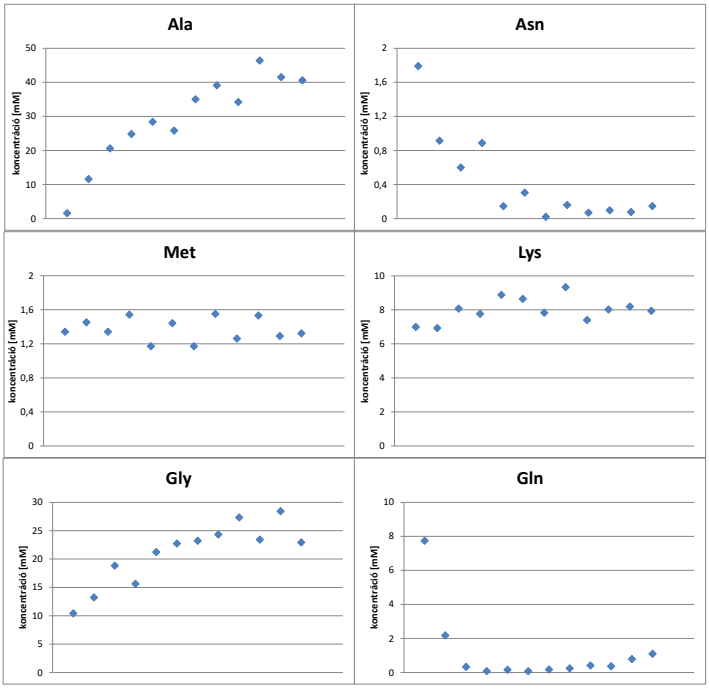
51. ábra. Az addíciós kalibrációs egyenesek meredekségeinek átlaga és szórása öt mintasorozat esetében.

Megvizsgáltam a kísérő standard (GABA) alkalmazásának hatását is, és azt tapasztaltam, hogy a módszer önmagában is megbízható eredményeket szolgáltatott, a kísérő standard használata a mérések precizitását csak minimális mértékben javította. Ezt követően a módszer készülékek közötti átjárhatóságát is teszteltem, mivel ipari környezetben egy esetleges műszerkiesés nem okozhat mérési leállást. Ugyanazt a mintasorozatot egy 3200 QTrap és egy 6500 QTrap rendszeren is megmértem, és az eredmények kiváló egyezést mutattak, igazolva a módszer teljes átjárhatóságát.

Mivel az általam fejlesztett LC–MS/MS módszernek egy már elfogadott és rutinszerűen alkalmazott NMR-alapú eljárást kellett kiváltania, elengedhetetlen volt a két módszer összehasonlítása. Ezt a megbízó gyár munkatársaival együttműködésben végeztük el. A módszer pontosságát először ismert koncentrációjú oldatok mérésével ellenőriztük, ahol jó egyezést tapasztaltunk az elméleti és mért értékek között. Ezt követően ugyanazon fermentációs minták aminosav-tartalmát NMR technikával is meghatározták. Ezt követően mind az LC-MS, mind pedig az NMR technikával kapott adatokkal páros t-próba segítségével hasonlítottuk össze. Az LC–MS/MS módszer esetében két aminosav – arginin és cisztin – esetében mutatkozott szignifikáns eltérés az elméleti értékhez képest, míg az NMR módszernél öt aminosav esetében volt tapasztalható hasonló eltérés. Ez összességében azt jelezte, hogy az LC–MS/MS módszer pontossága legalább a hagyományos NMR-alapú meghatározással összemérhető. (Függelék F1-F2 ábra)

A méréseket CHO emlős sejtkultúra tenyésztéséhez használt tápoldatokon végeztük. Az eredmények értékes információkat szolgáltattak a biológusok számára az optimális aminosav-koncentrációk beállításához. A sejtkultúra fenntartása során meghatározott időközönként mintát vettek a médiumból, és az egyes aminosavak koncentrációváltozását az idő függvényében követtük nyomon. Az eredmények alapján jól elkülönülő tendenciák

voltak megfigyelhetőek (52. ábra) Az aszparagin és a glutamin esetében a teljes tenyésztési periódus alatt folyamatos koncentrációcsökkenés jelentkezett, a periódus végére szinte teljes kimerüléssel. Ezzel szemben a glicin és az alanin koncentrációja a kezdetektől folyamatosan növekedett. Ezek az aminosavak nem esszenciálisak, ezért koncentrációjuk széles tartományban változhat. Az esszenciális aminosavak, mint a metionin és a lizin esetében viszont nem volt megfigyelhető jelentős koncentrációváltozás vagy egyértelmű trend. Ezen adatok lehetővé tették a sejtkultúrák célzott táplálásának optimalizálását. Az optimális aminosavszintek fenntartása kulcsfontosságú a sejtnövekedés, valamint a megfelelő mennyiségű és minőségű rekombináns fehérjék termelése szempontjából.



52. ábra. Néhány kiválasztott aminosav (alanin, aszparagin, metionin, lizin, glicin és glutamin) koncentrációjának időbeli változása.

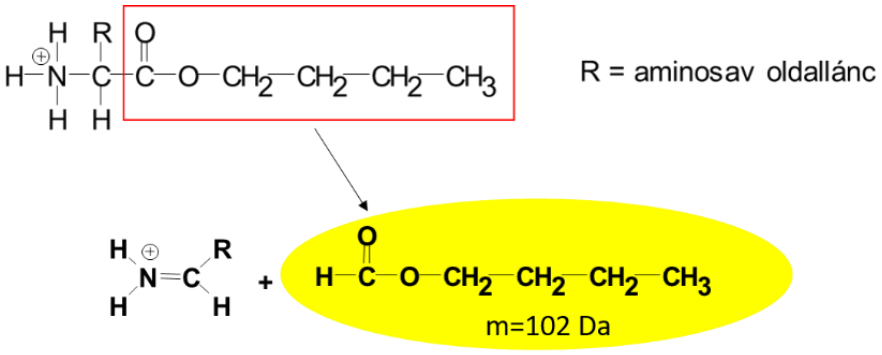
5.2.2. Klinikai, diagnosztikai mérések

5.2.2.1. Anyagcsere-betegségek diagnosztizálása aminosavak mérésével

A 2000-es évek elején a Kémiai Kutatóközpont Tömegspektrometriai Laboratóriumában megkezdődtek azok a kísérletek, amelyek célja a tömegspektrometriás méréseken alapuló anyagcsere-betegség-szűrés hazai bevezetésének előkészítése volt. A feladat a nyugati országokban már rutinszerűen alkalmazott technikák átvétele, adoptálása és analitikai finomítása volt, figyelembe véve a magyarországi diagnosztikai környezet sajátosságait.

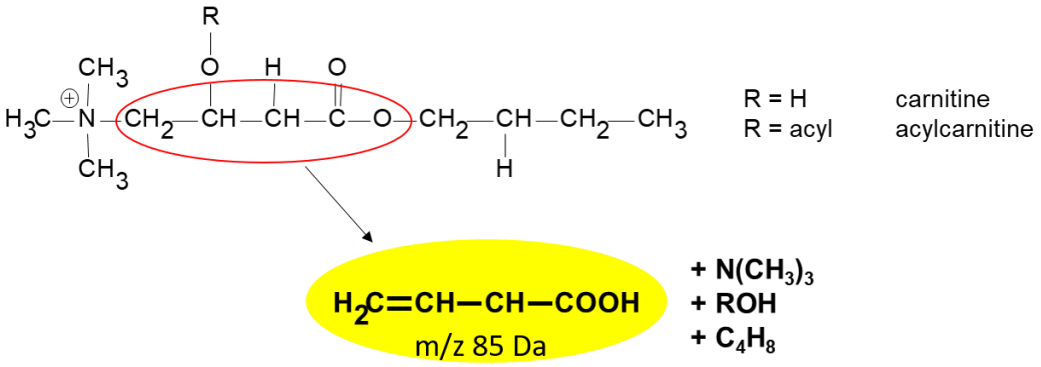
A vizsgálatok alapját speciális szűrőpapírra vett és beszárított vérminták (dried blood spot, DBS) képezték. A szűrőpapírból kivágott, beszáradt vért tartalmazó korongokat

izotópjelzett belső standardot tartalmazó metanollal extraháltuk. Az extraktumot ezt követően nitrogénáramban bepároltuk, majd ecetsav-anhidrid/n-butanol eleggyel származékképzést végeztünk, amelynek során az aminosavak és az acilkarnitinek butilészterei keletkeztek. Az elegyet ismét szárazra pároltuk, majd a mérési eluensben visszaoldva közvetlenül injektáltuk a tömegspektrométerbe. A módszer egyik sajátossága volt, hogy nem alkalmazott kromatográfiás elválasztást; a mintát egy 200 µL/perc térfogatáramú vivőáramba injektáltuk, és a szelektivitást teljes mértékben a tandem tömegspektrometriás detektálás biztosította. A mérési eljárás két vegyületcsoport – a szabad aminosavak és az acilkarnitinek – egyidejű meghatározását tette lehetővé. Az aminosavak butilészter származékai ütközési aktiválás során jellegzetes fragmentációt mutatnak: minden egyes aminosav esetében megfigyelhető egy 102 Da tömegű semleges veszteség, valamint egy, az adott aminosavra jellemző maradékion. Ennek kihasználásával a tömegspektrométert 102 Da semleges veszteséget figyelő pásztázási módban üzemeltettük, amely lehetővé tette az összes aminosav szelektív detektálását egyetlen mérési cikluson belül. (53. ábra)



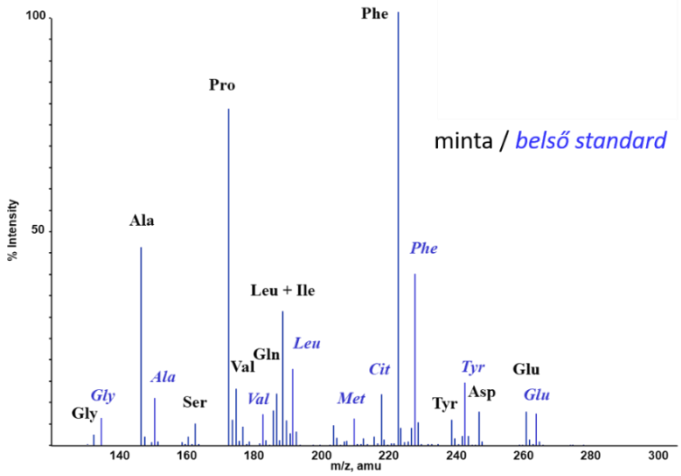
53. ábra. Butilezett aminosavak meghatározására alkalmas 102 Da-os semleges fragmentum képződése.

Az acilkarnitinek esetében az ütközési cellában végbemenő fragmentáció során valamennyi vegyületből egy közös, m/z 85 tömegű fragmension képződik. Ennek megfelelően prekurzorion-pásztázást alkalmaztunk az m/z 85 ionra, így minden olyan anyaion szelektíven kimutathatóvá vált, amelyből ez a fragmens keletkezik. (54. ábra) A két pásztázási mód egy mérési cikluson belüli kombinálásával – mintegy másfél perces ciklusidő mellett – valamennyi releváns szabad aminosav és acilkarnitin egyidejű meghatározása megvalósítható volt.



54. ábra. Az acilkarnitinek mérésére alkalmas m/z 85 fragmension képződése.

A módszer alapvetően relatív eredményeket szolgáltatott: az egyes komponensek egymáshoz, illetve az izotópjelzett belső standardhoz viszonyított arányából lehetett következtetni az adott anyagcsere-betegség fennállására. Egy jellemző mérési spektrumot a 55. ábra mutat be.



55. ábra. Aminosavakra jellemző NL 102 spektrum.

A módszert kezdetben kísérleti jelleggel újszülöttkori szűrésekben alkalmaztuk. Később – a mérési lehetőségek ismertté válásával – egyre gyakrabban érkeztek idősebb korú, igazolt vagy feltételezett anyagcsere-betegségben szenvedő páciensek vérmintái is. Az így kapott eredmények számos esetben közvetlen diagnosztikai segítséget nyújtottak a kezelőorvosok számára. 2008-tól Magyarországon is bevezetésre került a tömegspektrometriás alapú anyagcsere-szűrés, két országos központ (Budapest és Szeged) létrehozásával. Ettől az időponttól kezdve a rutinméréseket ezekben a laboratóriumokban végzik, ugyanakkor a munkakapcsolatom mindkét központtal megmaradt. A későbbiekben közös módszerfejlesztések és finomítások valósultak meg, illetve a felmerülő analitikai

problémák megoldásába is rendszeresen bevontak. Ezen együttműködések eredményeiről közös publikációkban számoltunk be [SP4].

Az újszülöttkori anyagcsere-betegségek szűrésében alkalmazott tömegspektrometriás módszerek az elmúlt két évtizedben jelentős fejlődésen mentek keresztül. Míg a kezdeti megközelítések elsősorban relatív jellegű, pásztázásalapú (Prec85, NL102) stratégiákra épültek, addig a klinikai diagnosztika növekvő igényei egyre inkább az abszolút mennyiségi meghatározást biztosító, célzott MRM-alapú módszerek irányába terelték a fejlesztéseket. Ez a szemléletváltás nemcsak a tömegspektrometriás detektálást, hanem a kromatográfiát, a mintaelőkészítést és a kalibrációs stratégiákat is újragondolásra kényszerítette.

Az aminosavak mérésére a vizsgáló laboratóriumokban két fő megközelítés terjedt el. Az egyik a származékképzésen alapuló, fordított fázisú kromatográfiával kombinált módszer, míg a másik a szabad aminosavak közvetlen meghatározását lehetővé tevő HILIC-alapú eljárás. Mindkét megoldásra léteznek kereskedelmi forgalomban elérhető, „kulcsrakész” rendszerek. Nagy mintaszám mellett azonban ezek jelentős anyagi terhet rónak az egészségügyi ellátórendszerre, mivel nemcsak a standardok, hanem gyakran az oszlopok és az eluensek is kizárólag a gyártótól szerezhetők be, sok esetben a pontos összetétel megadása nélkül. Ezen megfontolások alapján célunk az volt, hogy a korábban sikerrel alkalmazott saját módszerünket továbbfejlesszük, és alternatív, rugalmasan alkalmazható megoldást dolgozzunk ki a szabad aminosavak mennyiségi meghatározására. A módszer beállítása során újraértékeltük és finomhangoltuk a tömegspektrometriás, kromatográfiás és mintaelőkészítési lépéseket, bevezettük az izotópjelzett belső standardok alkalmazását, valamint részletesen megvizsgáltuk a különböző kalibrációs modellek alkalmasságát.

Tömegspektrometriás optimálás

A tömegspektrometriás optimálás során minden egyes aminosavra külön-külön újraoptimalizáltuk az ionforrás és az ionoptikai paramétereket. Az izobár aminosavpárok (pl. leucin/izoleucin, lizin/glutamin) esetében a megbízható azonosítás érdekében további MRM átmeneteket vezettünk be. Ezek lehetővé tették az egyértelmű megkülönböztetést nemcsak a retenciós idők különbsége alapján, hanem fragmentációs viselkedésük figyelembevételével is.

Kiemelt figyelmet fordítottunk azokra az aminosavakra, amelyek molekulatömege csupán 1 Da eltérést mutat, mivel ezek esetében a kisebb tömegű vegyület izotópionjai azonos m/z

értéken jelenhetnek meg, mint a nagyobb tömegű aminosav protonált molekulaionja. Ilyen kritikus párokat alkot például a Leu/Ile (132 m/z), az Asn (133 m/z) és az Asp (134 m/z), valamint a Lys/Gln (147 m/z) és a Glu (148 m/z). Ezek elkülönítését addicionális MRM átmenetek és a kromatográfiás retenciós idők együttes alkalmazásával biztosítottuk. A kevésbé fragmentálható aminosavak (glicin, alanin) esetében az 5.1.1.3 fejezetben részletesen tárgyalt pszeudo-MRM megközelítést alkalmaztuk, amely lehetővé tette megfelelő minőségi (qualifier) átmenetek definiálását. A cisztein és a cisztin esetében bár sikerült stabil MRM átmeneteket optimalizálni, ezek a komponensek végül nem kerültek be a végső módszerbe. Ennek oka, hogy a két molekula rendkívül érzékeny a környezeti hatásokra, és képesek egymásba átalakulni, ami jelentős bizonytalanságot eredményezett volna a kvantitatív meghatározás során. A méréseket pozitív ESI ionizációs módban végeztük. Az alkalmazott MRM átmenetek és az optimalizált paraméterek a Függelék F8. táblázatban kerültek összefoglalásra. Az egyes átmenetekre fordított pásztázási idő (dwell time) egységesen 15 ms volt.

Kromatográfiás optimálás

Az aminosavak kromatográfiás elválasztásához a korábbi munkáink során már eredményesen alkalmazott Rx-SIL, porózus szilika alapú HILIC oszlopot használtuk. Mozgófázisként 0,1 V/V% hangyasavat tartalmazó vizet és 0,1 V/V% hangyasavat tartalmazó acetonitrilt alkalmaztunk, inverz gradiens elúcióval, ahol a vizes komponens aránya fokozatosan növekedett az elválasztás során. Az optimális elválasztás elérése érdekében részletesen tanulmányoztuk a kezdeti eluensösszetétel, a gradiens meredeksége és a lineáris szakaszok számának hatását. Végül egy módosított, két lineáris szakaszból álló gradiensprogram bizonyult a legmegfelelőbbnek: az első, laposabb meredekségű szakaszt egy meredekebb gradiens követte. 5. táblázat.

5. táblázat. Optimált gradienstábla az aminosavak elválasztásához.

t (perc)	0	1	5	7	9	9,5	15
A% (V/V)	25	25	45	80	80	25	25
B% (V/V)	75	75	55	20	20	75	75

Ez a megoldás lehetővé tette az aminosavak megfelelő elkülönítését, miközben biztosította, hogy a kromatográfiás késés és holttérfogat ellenére valamennyi komponens a mosó fázis megkezdése előtt eluálódjon az analitikai oszlopról. Az optimalizált módszer teljes futási ideje 15 perc volt. Az egyes aminosavak jellemző kromatogramjait a Függelék

F3. ábra mutatja. Bár nem minden komponens esetében valósult meg alapvonali elválasztás, a tömegspektrometriás detektálás szelektivitása biztosította az egyes MRM átmenetek megbízható, interferenciamentes monitorozását.

Kalibrációs modell finomhangolása

Korábbi munkáink során a szabad aminosavak meghatározásához addíciós kalibrációt alkalmaztunk, GABA kísérő standard jelenlétében. A klinikai diagnosztikai célú fejlesztések azonban megkövetelik az izotópjelzett belső standard alkalmazását. Célunk egy egyszerű, gyors és költséghatékony megoldás kidolgozása volt, ezért kompromisszumos stratégiát választottunk: a teljes aminosavpanel kvantifikációját egyetlen izotópjelzett belső standardhoz viszonyítottuk. Két potenciális belső standardot vizsgáltunk: a 4-aminobutánsav-2,2-d_2-t (d_2-GABA) és az L-glutaminsav-2,3,3,4,4-d_5-t (d_5-Glu). Bár a jelöletlen GABA kromatográfiás viselkedését korábbi tapasztalataink alapján jól ismertük, végül a d_5-Glu mellett döntöttünk. Ennek oka az volt, hogy a d_5-Glu retenciós ideje a vizsgált aminosavak elúciós sorrendjének közepére esett, csúcsalakja szimmetrikusabb volt, és intenzívebb jelet adott, mint a d_2-GABA

Mintaelőkészítés

Biológiai mintaként újszülöttek és beteg gyermekek szérummintáit használtuk, amelyeket a Semmelweis Egyetem Gyermekgyógyászati Klinika Anyagcsere Szűrő és Diagnosztikai Központ laboratóriumából kaptunk. A mérések során keletkezett eredmények kizárólag másodlagos analitikai értékelés célját szolgálták. A minták anonimizált formában érkeztek a laboratóriumba, a páciensekről semmilyen klinikai információ nem állt rendelkezésünkre, és velük fizikai kontakt nem történt, ezért etikai engedély beszerzésére nem volt szükség.

A biológiai szérumminták előkészítése során többlépcsős hígítási és fehérjekicsapási eljárást alkalmaztunk. A jelentős mátrixhatás minimalizálása érdekében a minták nagymértékű hígítása volt szükséges, amelyet az LC–MS/MS módszer megfelelő érzékenysége lehetővé tett. A fehérjekicsapás célja egyrészt a potenciális fehérje–aminosav kölcsönhatások megszüntetése, másrészt az analitikai rendszer védelme volt. A belső standardot minden minta esetében a hígítás korai fázisában adtuk hozzá annak érdekében, hogy a mintaelőkészítés során fellépő veszteségeket és mátrixhatásokat korrigálni lehessen.

A kalibrációt standard addíciós módszerrel végeztük, mivel a komplex szérummátrix miatt sem vizes, sem modellmátrixos kalibráció nem adott volna megbízható eredményt. A kalibrációs oldatokat az analitikai mintákkal azonos mintaelőkészítési lépéseknek vetettük alá, biztosítva ezzel a mátrixazonosságot és a módszer pontosságát.

Az 5.2.1.2. fejezetben bemutatott felismerés analógiájára tesztkísérletet végeztünk annak vizsgálatára, hogy különböző szérumminták esetében az addíciós kalibrációval kapott egyenesek meredeksége reprodukálható-e. Az eredmények azt mutatták, hogy az egyes aminosavakra kapott meredekségek kis relatív szórással egyeztek meg a különböző minták között. (Függelék F4. ábra) Ez lehetővé tette, hogy egy mérési napon több minta alapján meghatározott átlagolt meredekséggel értékeljük ki az adatokat, jelentősen leegyszerűsítve a kalibrációs folyamatot anélkül, hogy a módszer pontossága romlott volna.

A módszer alkalmazása éles biológiai mintákon

A kidolgozott és validált módszert összesen 12 valódi biológiai szérummintán alkalmaztuk. A minták egészséges, illetve beteg, 18 év alatti páciensektől származtak; további klinikai információ nem állt rendelkezésünkre, és az általunk kapott eredmények nem kerültek felhasználásra semmilyen diagnosztikai vagy terápiás döntéshozatal során.

A statisztikai értékeléshez minden mintát háromszor készítettünk elő az adott mérési napon, és minden előkészített mintát háromszor mértünk le. A párhuzamos mérések jó pontosságot és precizitást mutattak (Függelék F9. táblázat). A kapott aminosav-koncentrációkat a Kaliforniai Egyetem referencia-adatbázisával [239] összehasonlítva megállapítható, hogy a legtöbb komponens az egészséges koncentrációtartományba esett. Az ettől eltérő, kiugró értékek a betegek eltérő anyagcsere-állapotára utalhatnak.

5.2.2.1. DNS metilációs fokának meghatározása

Az epigenetikai szabályozás egyik központi eleme a DNS citozinbázisainak metilációs állapota, amely döntő szerepet játszik a génexpresszió szabályozásában, a sejtdifferenciációban és számos kóros folyamat, köztük daganatos megbetegedések kialakulásában. Biológus kollégáink részéről régóta megfogalmazódott az igény olyan analitikai módszer kidolgozására, amely alkalmas epigenetikai folyamatok, ezen belül a DNS metilációs állapotának megbízható kvantitatív vizsgálatára. A módszerfejlesztés célja a DNS két kulcsfontosságú módosított bázisának, az 5-metil-citozin (5mC) és az 5-hidroximetil-citozin (5hmC) érzékeny és megbízható mennyiségi meghatározása volt. A kísérleteink kezdeti szakaszában a DNS lánc enzimatikus hidrolízisével próbáltunk kisebb, analitikailag könnyebben mérhető molekulákat előállítani. A hidrolízis során keletkező nukleozidokat HPLC-elválasztást követően detektáltuk. Bár ez a megközelítés alkalmas volt az 5mC kimutatására, az 5hmC biológiai mintákban előforduló rendkívül alacsony koncentrációja meghaladta az akkor rendelkezésre álló tömegspektrométer (MS#1: Sciex API 2000) érzékenységi határait. Emellett az alkalmazott enzim nem megfelelő tisztasága

miatt az 5mC méréseknél is jelentős reprodukálhatósági problémák jelentkeztek. Ezek a tapasztalatok indokolták az enzimatikus hasítás elhagyását, és a kémiai hidrolízisen alapuló megközelítés bevezetését, amely szabad nukleinsav-bázisokat eredményezett. Időközben érzékenyebb tömegspektrometriás berendezés állt rendelkezésünkre, amely már lehetővé tette az 5hmC megbízható detektálását is. Az új megközelítés azonban megkövetelte a mintaelőkészítési lépések, valamint a kromatográfiás és tömegspektrometriás körülmények átfogó újraoptimalizálását.

Tömegspektrometriás optimálás

A mérendő komponensek koncentrációja jelentős eltéréseket mutatott: míg a guanin (G) nagy mennyiségben volt jelen, addig az 5mC és különösen az 5hmC csak nyomnyi koncentrációban fordult elő. Ez szükségessé tette, hogy a tömegspektrometriás paraméterek optimalizálása során eltérő szempontokat vegyünk figyelembe az egyes komponenseknél. A guanin esetében az elektronikus telítődés elkerülése érdekében nem az abszolút maximális érzékenységre optimalizált beállításokat alkalmaztuk. Az 5hmC esetében viszont a kis koncentrációk miatt megnövelt dwell time-ot használtunk, amellyel javítható volt a jel/zaj arány és az érzékenység. Az optimált MS paramétereket a Függelék F10. táblázata tartalmazza.

Kromatográfiás optimálás

A nukleinsav-bázisok visszatartása és elválasztása jelentős kihívást jelentett. Számos kromatográfiás rendszer kipróbálását követően ebben a munkában alkalmaztam először az Rx-Sil oszlopot, amely porózus szilika alapú állófázisként fordított- és normál fázisú módban egyaránt használható. Az oszlopot hosszú időn keresztül, különböző elválasztási módokban, eltérő eluensösszetételekkel és gradiensprogramokkal teszteltük, miközben minden apró módosítás hozzájárult a módszer fokozatos finomításához.

A végleges megoldást normál fázisú módban sikerült kialakítani, ahol 0,1 V/V% hangyasavat tartalmazó vizet és 0,1 V/V% hangyasavat tartalmazó acetonitrilt alkalmaztunk mozgófázisként, a vizes fázist erősebb eluensként definiálva. Az áramlási sebesség 1 mL/perc volt, a gradiensprogramot a komponensek optimális elválasztásának figyelembevételével állítottuk össze. Az optimált LC paramétereket illetve az azokkal készült kromatogramokat a Függelék F11. táblázata és F5. ábrája szemlélteti.

Mintaelőkészítés

A minták előkészítésére savas hidrolízist alkalmaztunk. A módszerfejlesztés során

részletesen vizsgáltuk az alkalmazott sav mennyiségének, a hidrolízis idejének és hőmérsékletének, a bepárlási körülményeknek, valamint a visszaoldó oldat összetételének hatását. A hidrolízis során a magas hőmérséklet következtében jelentős gázképződés lép fel, amely túlnyomást és robbanásveszélyt okozhat, különösen tömény sav alkalmazása esetén. Ennek elkerülésére a vizsgálatokat 2 mL térfogatú, peremes, krimpelhető üvegben végeztük, amelyet szeptummal ellátott alumíniumkupakkal gáztömören lezártunk. Az edény térfogata elegendőnek bizonyult a keletkező gőzök befogadására, míg a szeptum rugalmassága lehetővé tette a nyomás biztonságos kiegyenlítődését.

A hidrolízis hatékonyságát nukleozidok és szabad nukleinsav-bázisok keverékéből előállított mintákon vizsgáltuk, modellrendszerként alkalmazva (C+G, dC+G, C+dG és dC+dG), és minden esetben kizárólag szabad bázisokat detektáltunk, nukleozidmaradványokat nem. A savmennyiség növelése az 5hmC mennyiségének csökkenéséhez vezetett, miközben a többi komponens koncentrációja változatlan maradt, ezért a továbbiakban biztonsági és analitikai szempontból egyaránt optimálisnak bizonyuló 50 µL tömény hangyasavat alkalmaztunk.

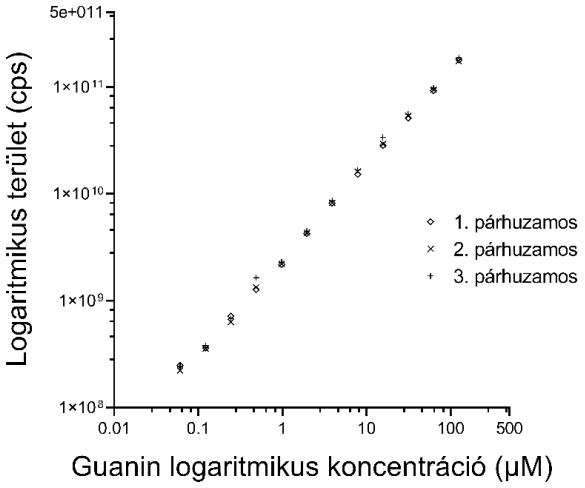
Az alacsonyabb hőmérsékleten végzett hidrolízis nem eredményezett megfelelő jelintenzitásokat, míg túl magas hőmérsékleten a bázisok további bomlása volt megfigyelhető. A vizsgált hőmérsékletek közül a 140 °C bizonyult optimálisnak. A hidrolízis időtartama (45–180 perc) nem befolyásolta szignifikánsan az eredményeket, ezért a későbbi mérésekhez 90 perces időtartamot választottunk.

A bepárlási lépések során megállapítottuk, hogy szabad levegőn oxidatív folyamatok lépnek fel, amelyek mesterségesen megnövelt 5hmC-szintet eredményeznek. Ezzel szemben nitrogéngáz alkalmazásával inert környezet volt biztosítható, amely a legmegbízhatóbb eredményeket adta. A visszaoldáshoz különböző oldószer-összetételeket és térfogatokat vizsgáltunk; a legjobb jelintenzitás és reprodukálhatóság a 0,1 V/V% hangyasavas víz–acetonitril (1:1) eleggyel, 70 µL térfogatban volt elérhető.

Kalibrációs modell kidolgozása

A szakirodalomban korábban alkalmazott módszerek abszolút mennyiségi meghatározásokon alapultak, amelyek külső kalibráció segítségével határozták meg az egyes komponensek koncentrációját, majd ezekből számolták a DNS metiláltsági fokát. Ezzel szemben egy új, relatív meghatározási módszert dolgoztunk ki, amelyben az 5mC és 5hmC mennyiségét egy belső referenciához viszonyítva határoztuk meg. A módszer kezdeti változatában az összes citozintartalomra vonatkoztattuk az 5mC és 5hmC értékeket,

amely reprodukálható és biológiailag releváns eredményeket szolgáltatott. Később azonban áttértünk arra a megközelítésre, hogy az 5mC és 5hmC mennyiségét a guaninra, mint stabil belső referenciára vonatkoztassuk. Ez a megoldás leegyszerűsítette a számításokat, és lehetővé tette, hogy a módszer függetlenné váljon a kiindulási DNS mennyiség pontos ismeretétől. A modell alkalmazhatóságának feltétele volt a koncentráció–intenzitás összefüggések linearitásának igazolása. Ennek érdekében dNTP, mdCTP és hmdCTP oldatokból a biológiai mintákban várható koncentrációtartományt lefedő standard sorozatot állítottunk elő. A guanin esetében négy nagyságrenden keresztül lineáris viselkedést tapasztaltunk (56. ábra), és hasonló linearitás igazolható volt az 5mC és 5hmC esetében is. (Függelék F6. ábra)

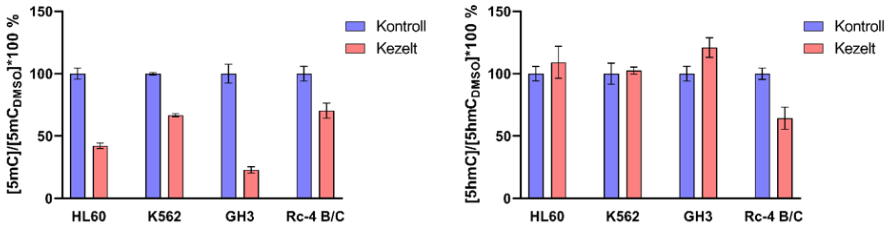


56. ábra. A guanin hígításának hatása a csúcsterületre.

További kísérletek igazolták, hogy az intenzitáshányadosok arányosan változnak a koncentrációhányadosokkal, és nem függenek sem az injektált térfogattól, sem az abszolút koncentrációktól. A végleges módszer maximum 10 µL injektálási térfogat mellett működött megbízhatóan. Ezt követően két kalibrációs oldatsort állítottunk össze 5mC, 5hmC és dNTP oldatok felhasználásával. A kalibrációs egyenesek kiváló illeszkedést mutattak a teljes mérési tartományban ($R > 0{,}999$). A kalibráció részleteit a Függelék F12. táblázata tartalmazza. A módszer validálása során megvizsgáltuk a mátrixnak a mért komponensekre gyakorolt hatását, és megállapítottuk, hogy az nem befolyásolja a kapott értékeket. Ugyancsak vizsgáltuk a stabilitásokat, és megállapítottuk, hogy az előkészített minták rövid és hosszú távon is stabilnak bizonyultak a mintatartó, illetve -20°C-on történő tárolás esetén.

Biológiai minták mérése

A kidolgozott és validált módszert különböző biológiai mintákon alkalmaztuk. Az 5mC és 5hmC meghatározását DNMT-inhibitorkezelés nélküli kontroll és decitabinnal kezelt sejtvonalakon végeztük. A minták RNS-mentességét spektrofotometriás módszerrel ellenőrizték. Patkány sejtvonal esetében három biológiai és három technikai párhuzamos, humán sejtvonalaknál négy biológiai párhuzamos állt rendelkezésre. Minden minta 1 µg DNS-t tartalmazott, és minden mintát háromszor mértünk. Az eredményeket DMSO-kontrollhoz normalizáltuk az irodalmi adatokkal való összehasonlíthatóság érdekében. Minden minta 5mC szintje a vártnak, korábbi eredményeknek megfelelően csökkent a demetilációs folyamat hatására. Az 5hmC szintje sejtvonal-specifikus változásokat mutatott: a humán sejtvonalakban (HL60, K562) és a patkány GH3 sejtvonalon nőtt, míg a patkány Rc-4 B/C sejtvonal 5hmC szintje csökkent a kezelés hatására. 5hmC szint sejtvonal-specifikus változásokat mutatott. (57. ábra). A patkány sejtvonalakon korábban izotópjelzett belső standarddal végzett meghatározásokkal összevetve az általunk kidolgozott módszer azonos eredményeket szolgáltatott.



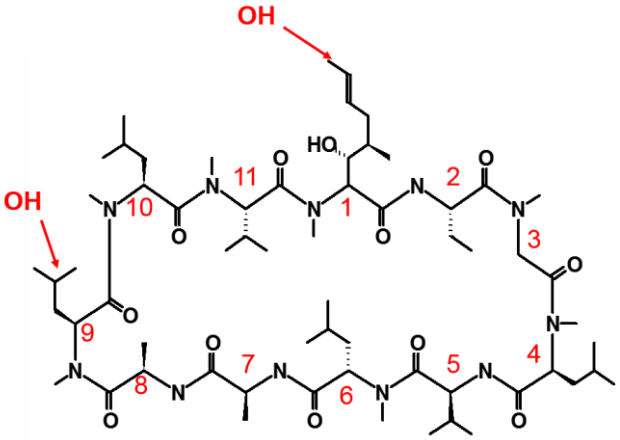
57. ábra. A különböző sejtvonalakon mért 5mC (felső) és 5hmC (alsó) mennyisége kontroll és kezelt mintákban.

Az analitikai precizitás vizsgálata során megállapítottuk, hogy a mérési szórás kisebb volt, mint a biológiai variabilitás. (Függelék F7. ábra) Az eredmények alapján javasolt legalább négy biológiai párhuzamos minta alkalmazása a megfelelő statisztikai megbízhatóság biztosítása érdekében.

5.2.2.2. A Ciklosporin A mennyiségi meghatározása transzplantált betegek véréből

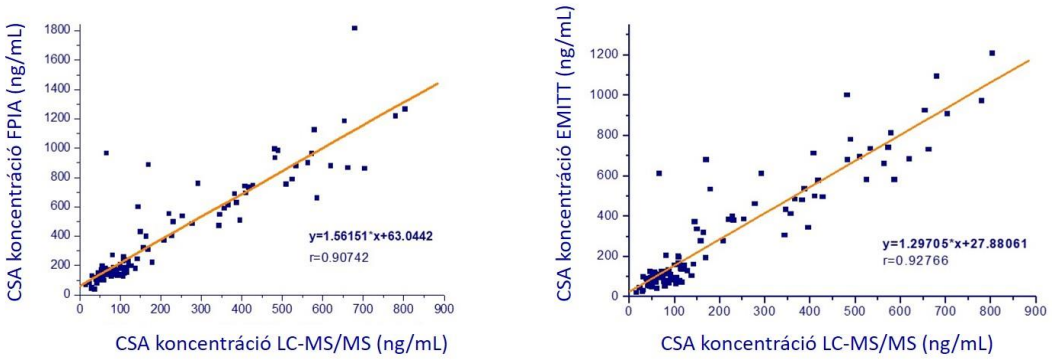
A ciklosporin-A (CSA) 11 aminosavból álló ciklikus polipeptid (58. ábra), amelyet eredetileg a *Tolypocladium inflatum gamsból* izoláltak [240,241]. Hatékony immunszuppresszív szer, amely szelektíven és reverzibilisen gátolja a T-limfociták aktivációját, ezért széles körben alkalmazzák szervtranszplantált betegek kezelésében. Terápiás alkalmazását azonban szűk terápiás tartomány (150–300 ng/mL), valamint

jelentős dózisfüggő mellékhatások – elsősorban nefrotoxicitás, hepatotoxicitás és metabolikus eltérések – korlátozzák, ami indokolttá teszi a vérszint pontos és megbízható monitorozását.



58. ábra. A CSA szerkezete és a metabolizáció helyei.

A Semmelweis Egyetem Transzplantációs Klinikájával együttműködésben vizsgáltuk a klinikai gyakorlatban alkalmazott immuntesztes módszerek és az LC–MS/MS alapú meghatározás közötti eltéréseket. A klinikán rutinszerűen alkalmazott immuntesztek eredményeit összevetettük az általunk fejlesztett LC–MS/MS módszerrel kapott CSA-koncentrációkkal. Az összehasonlítás során azt tapasztaltuk, hogy az immuntesztek átlagosan magasabb CSA-értékeket szolgáltattak, mint az LC–MS/MS módszer (59. ábra).

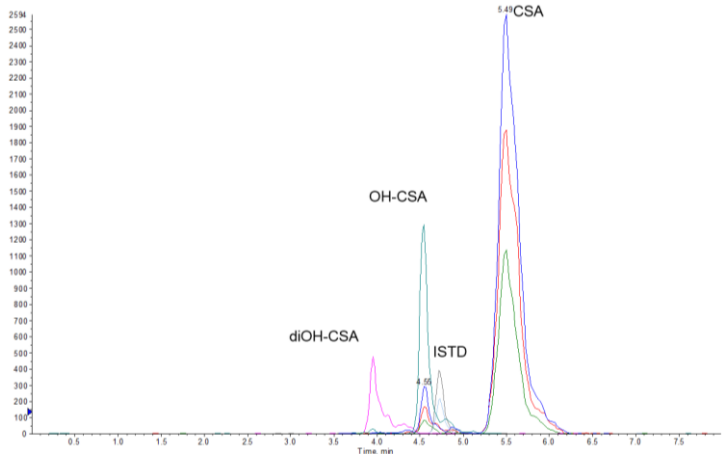


59. ábra. Az immunteszt és az LC-MS/MS mérések eredményeinek összehasonlítása.

Bár az eltérés egy korrekciós faktorral részben kompenzálható lenne, az adatokban előforduló kiugró értékek miatt a módszerek közötti megbízható korreláció nem volt biztosítható.

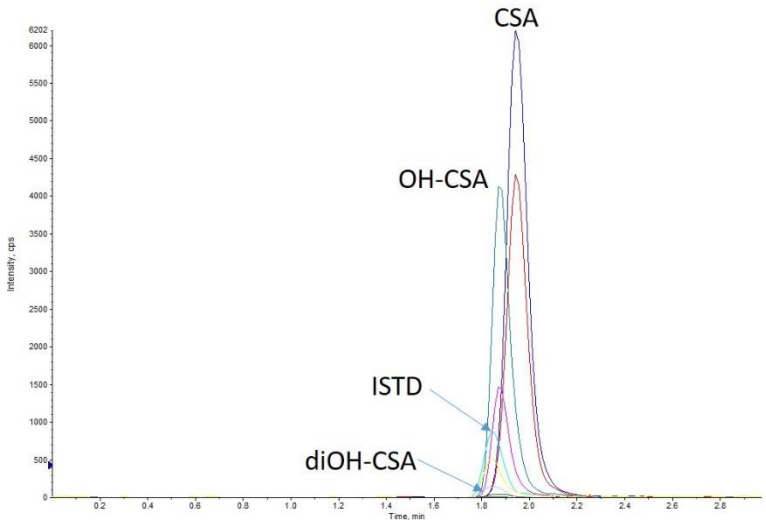
Az LC–MS/MS módszer egyik lényeges előnye, hogy nemcsak az anyavegyület pontos meghatározására alkalmas, hanem képes a CSA főbb metabolitjainak – mono- és dihidroxilált ciklosporin-származékok – elkülönített mérésére is. Az általam alkalmazott

módszerrel kapott kromatogramon jól elkülönül az anyavegyület, valamint a metabolitok csúcsai (60. ábra), az elúciós sorrend megfelel a várakozásoknak. A mennyiségi meghatározások során kísérő standard alkalmazása mellett döntöttem. Izotópjelzett CSA hiányában olyan exogén vegyületet kerestem, amely nem fordul elő a mintákban, szerkezetileg hasonló, stabil, és jól illeszthető a mérési módszerbe. Ezeknek a kritériumoknak egy másik immunszuppresszáns, a tacrolimus felelt meg, amelyet kísérő standardként alkalmaztam. A kromatogramokon jól látható, hogy a tacrolimus a CSA előtt eluálódik, így a mintaelőkészítési és mérési lépések során hatékonyan korrigálja az esetleges veszteségeket.



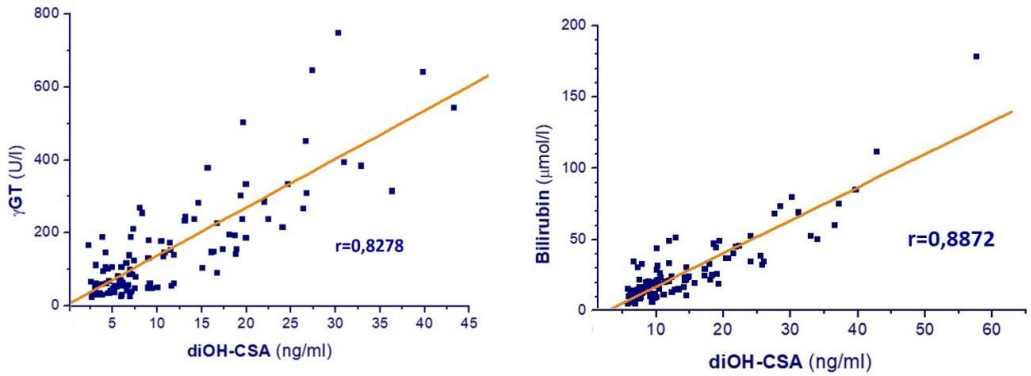
60. ábra. A CSA és főbb metabolitjainak LC–MS/MS kromatogramjai belső standard jelenlétében.

A kezdeti módszer teljes kromatográfiás ciklusideje – a mosási és ekvilibrálási lépésekkel együtt – 12 perc volt, ami kutatási környezetben elfogadható, klinikai alkalmazásban azonban korlátozza az áteresztőképességet. Ennek javítására on-line szilárd fázisú extrakciós (SPE) lépést építettem be a módszerbe. Csapdázó oszlopként rövid monolit oszlopot alkalmaztam, amelyre nagy áramlási sebesség mellett injektáltam a mintát. A komponensek átmosása az analitikai oszlopra, valamint a csapdázó oszlop párhuzamos regenerálása lehetővé tette, hogy a teljes mérési idő 3 percre csökkenjen. Ezzel a mérési kapacitás közel négyszeresére nőtt. Bár az új módszerrel a kromatográfiás csúcsok nem váltak el alapvonal szinten (61. ábra), a tömegspektrometriás szelektivitás lehetővé tette az egyes átmenetek megbízható integrálását. Az optimalizált módszert nagyszámú betegmintán alkalmaztam, ahol a CSA és metabolitjai koncentrációját összevetettük a rutin laborvizsgálatok eredményeivel. Egyes betegek esetében a vérképben kiugróan magas bilirubin- és γGT-értékeket figyeltek meg, amelyek toxikus állapotokra utalhatnak.



61. ábra. On-line csapdázással felvett LC–MS/MS kromatogramok.

Az általunk mért adatok elemzése során azt tapasztaltuk, hogy a megemelkedett bilirubin- és γGT-szintek összefüggést mutattak a vérben mért dihidroxilált ciklosporin-koncentrációval (62. ábra).



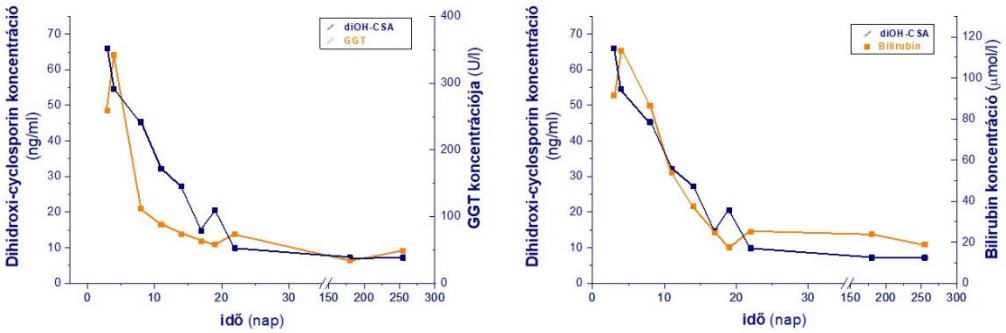
62. ábra. A bilirubin- és GGT-értékek változása a diOH-CSA koncentrációjának függvényében (n = 110).

Mivel a dihidroxilált ciklosporin toxikus tulajdonságai ismertek, az LC–MS/MS alapú módszer klinikai jelentősége túlmutat az anyavegyület pontos meghatározásán. A metabolitprofil egyidejű vizsgálata lehetőséget teremt a toxikus mellékhatások korábbi felismerésére és a terápia finomhangolására, ami a kezelőorvos számára közvetlen döntéstámogató információt jelent. Ezt a módszer gyakorlati hasznosságát a következő esettanulmányok is alátámasztják.

Esettanulmány I.

Egy 45 éves férfi beteg hepatitis C fertőzést követően májtranszplantáción esett át, az immunszuppresszív terápiában ciklosporin A-t (CSA) alkalmaztak. A dózisbeállítás időszakában a rutin laborvizsgálatok során a vér bilirubin- és γGT-értékei tartósan

emelkedettek voltak. A beteg véréből LC–MS/MS módszerrel meghatároztam a CSA, valamint főbb metabolitjainak koncentrációját. Az eredmények alapján mind az anyavegyület, mind a mono- és dihidroxilált CSA-származékok koncentrációja jelentősen meghaladta a terápiás tartományt. Az adatok arra utaltak, hogy a túldozírozás következtében kialakuló, megemelkedett dihidroxilált CSA-koncentráció állhatott a hepatotoxicitásra utaló laborparaméterek hátterében. A kezelőorvos a CSA dózisának csökkentéséről döntött. A dózismódosítást követően a CSA vérszintje a kívánt terápiás tartományba került, és néhány napon belül a bilirubin- és γGT-értékek is normalizálódtak (63. ábra). Az eset jól szemlélteti, hogy az LC–MS/MS alapú módszer nemcsak a pontos hatóanyagszint-meghatározást tette lehetővé, hanem az egyéni terápia optimalizálásához is közvetlen segítséget nyújtott.

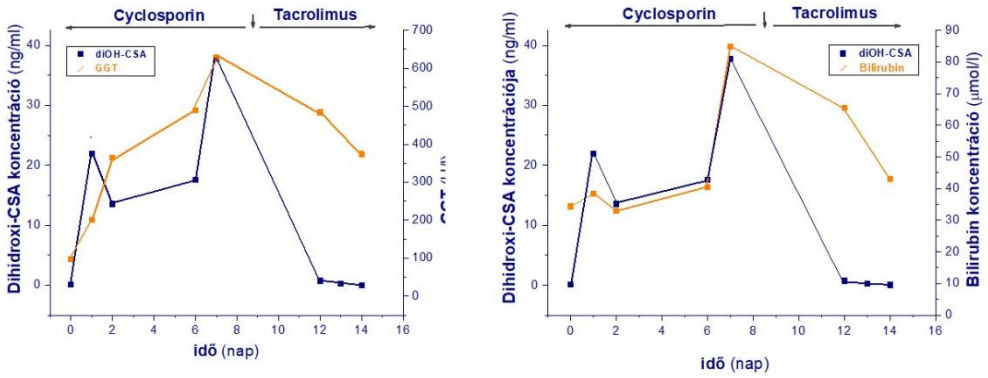


63. ábra. A GGT és a bilirubin koncentrációinak időbeli alakulása a dózisbeállítást követően.

Esettanulmány II.

Egy másik esetben egy 52 éves férfi beteg májtranszplantáción esett át, a donor szintén 52 éves nő volt. A posztoperatív immunszuppresszív kezelés során ciklosporin A-t alkalmaztak, azonban a terápia kezdetétől fogva a beteg vérében rendkívül magas bilirubin- és γGT-értékeket mértek, ami megnehezítette a dózis beállítását. Az LC–MS/MS vizsgálatok során alacsony CSA-anyavegyület-koncentráció mellett jelentősen megemelkedett dihidroxilált CSA-szintet mértem. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a CSA gyors metabolizációja állhat a toxikus tünetek hátterében. A további vizsgálatok során biológus kollégáink megállapították, hogy a transzplantált máj CYP3A4 enzimaktivitása kiemelkedően magas volt. Ennek következtében a szervezetbe jutó CSA jelentős része gyorsan metabolizálódott, ami a dihidroxilált metabolit felszaporodásához vezetett. Az analitikai és biológiai eredmények birtokában a kezelőorvos a CSA elhagyása mellett döntött, és a terápiát tacrolimusra állította át. A váltást követően a CSA és

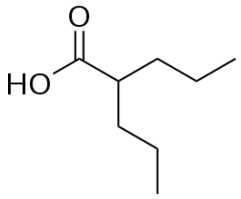
metabolitjai néhány napon belül kiürültek a szervezetből, a bilirubin- és γGT-értékek normalizálódtak (64. ábra), és a beteg stabil állapotban elhagyhatta a kórházat.



64. ábra. A GGT és a bilirubin koncentrációinak időbeli alakulása a gyógyszerváltást követően.

5.2.2.3. A rosszul megválasztott gyógyszer

A valproinsav (valproát, VPA) (65. ábra) az egyik leggyakrabban alkalmazott antiepileptikus gyógyszer. Hatását elsősorban a γ-amino-vajsav (GABA) anyagcseréjének befolyásolásán keresztül fejti ki: a glutaminsav-dekarboxiláz aktiválásával, valamint a GABA-transzamináz gátlásával jelentősen megemeli a szervezet GABA-szintjét [242,243]. A GABA gátló hatású neurotranszmitter, amely csökkenti a pre- és posztszinaptikus kisülések kialakulását, ezáltal megelőzi a görcsaktivitás kiterjedését. A betegek többsége a kezelést jól tolerálja, súlyos toxikus mellékhatások viszonylag ritkán fordulnak elő.



65. ábra. A valproát szerkezete

A valproát mennyiségi meghatározására több tömegspektrometriás módszer is ismert. Hao Cheng és munkatársai például egy érzékeny HPLC–MS/MS módszert dolgoztak ki a VPA és egyik toxikus metabolitja, a 2-propil-4-penténsav (4-én VPA) meghatározására humán plazmából, oszlop előtti származékképzést alkalmazva. A származékképzés szükségességét nem a VPA alacsony koncentrációja indokolta — a vérszint a µg/mL tartományba esik —, hanem a molekula rossz fragmentációs képessége. A valproát negatív ion módban ugyan jól detektálható $[M–H]^-$ ionként, azonban fragmentációja gyenge, így klasszikus MRM mérésre önmagában nem alkalmas. Laboratóriumunkban ezt a problémát az 5.1.1.3 fejezetben bemutatott pszeudo-MRM módszer alkalmazásával hidaltuk át, ahol

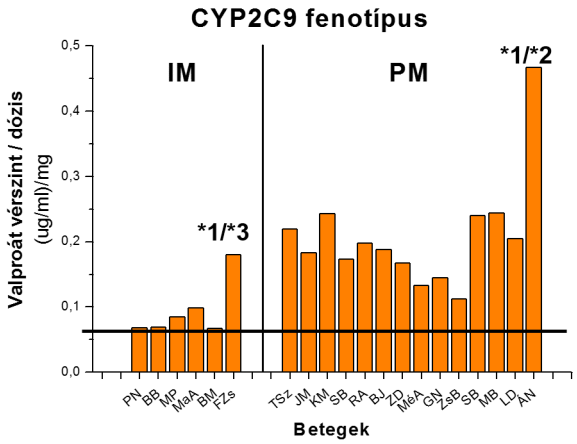
mind a prekurzor-, mind a fragmension tömegének a valproát 143-as m/z értékét adtuk meg. Ennek segítségével robusztus és jól reprodukálható HPLC–MS/MS módszert dolgoztunk ki a VPA vérszintjének rutinszerű meghatározására.

A módszer klinikai jelentőségét egy sürgős eset világította meg. Egy 31. terhességi héten született koraszülött csecsemő véréből érkezett minta valproát vérszint meghatározására. A csecsemőnél intraventrikuláris vérzést diagnosztizáltak, és az EEG epilepsziára utaló eltéréseket mutatott. A kezelést kezdetben fenobarbitállal indították, azonban a csecsemőkorban jelentkező súlyos hosszú távú mellékhatások miatt rövid időn belül valproátra tértek át. A kezelés megkezdését követően 17 nappal a csecsemő vérképe toxikus eltéréseket mutatott, amelyeket egyértelműen a VPA-kezeléshez kötöttek. A gyógyszert azonnal elhagyták, és a valproát kiürülését monitorozták. Az LC–MS/MS mérések alapján a vér VPA-szintje még 10 nappal a kezelés felfüggesztése után is magas volt (19,5 μg/mL), ami jelentősen elhúzódó eliminációra utalt. A kezelés időben történő megszakításának köszönhetően a vérkép rendeződött, és a csecsemő stabil állapotban elhagyhatta a kórházat.

A jelenség magyarázata a valproát metabolizmusában rejlett. A glükuronidáció — mint fázis II metabolikus út — újszülöttek és csecsemők esetében még nem működik megfelelően, ezért a VPA metabolizációja kerülő úton, elsősorban oxidációs folyamatokon keresztül, a CYP2C9 enzim közreműködésével valósul meg [244]. A szokatlanul lassú kiürülés felvetette egy csökkent aktivitású enzimváltozat jelenlétének gyanúját.

A Gyógyszer-kölcsönhatások Laboratóriumában kifejlesztett genotipizálási módszer alkalmazásával igazolták, hogy a beteg CYP2C9*3/*3 homozigóta mutáns genotípussal rendelkezett [245]. Ebben az esetben a kialakuló enzim gyakorlatilag inaktív, így nem képes részt venni a valproát oxidatív metabolizációjában. Ennek következtében a gyógyszer a szervezetben feldúsul, és toxikus tünetekhez vezet.

A további vizsgálatok során elemeztük a különböző CYP2C9 fenotípusok esetében a valproátdózisra vetített vérszinteket. A mérsékelten metabolizáló (intermediate metabolizer, IM) fenotípus esetében jellemzően ideális vérszintek alakultak ki, míg a gyengén metabolizáló (poor metabolizer, PM) fenotípusoknál azonos dózis mellett következetesen magasabb VPA-koncentrációkat mértünk (66. ábra). Az 1-1 kiugró értékhez mindkét esetben heterozigóta mutáns genotipus volt rendelhető.



66. ábra. A különböző fenotípusokhoz tartozó valproát vérszintek összehasonlítása.

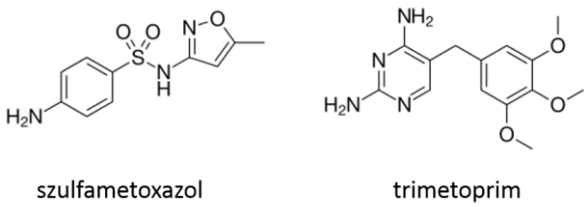
Az eredmények alapján az alábbi terápiás ajánlások fogalmazhatók meg:

- CYP2C9 homozigóta mutáns (*2/*2 vagy *3/*3): valproát alkalmazása nem javasolt.
- CYP2C9 heterozigóta (*1/*2 vagy *1/*3): esetén alacsony dózis javasolt még IM esetén is
- CYP2C9 homozigóta vad típus, IM esetén normál dózis javasolt
- CYP2C9 homozigóta vad típus, PM esetén alacsony dózis javasolt

Ezek az eredmények jól példázzák, hogy az LC–MS/MS alapú terápiás gyógyszerszint-monitorozás és a farmakogenetikai információk együttes alkalmazása hogyan járulhat hozzá a személyre szabott gyógyszeres kezelés megvalósításához, minimalizálva a mellékhatásokat és maximalizálva a terápiás hatékonyságot [SP3].

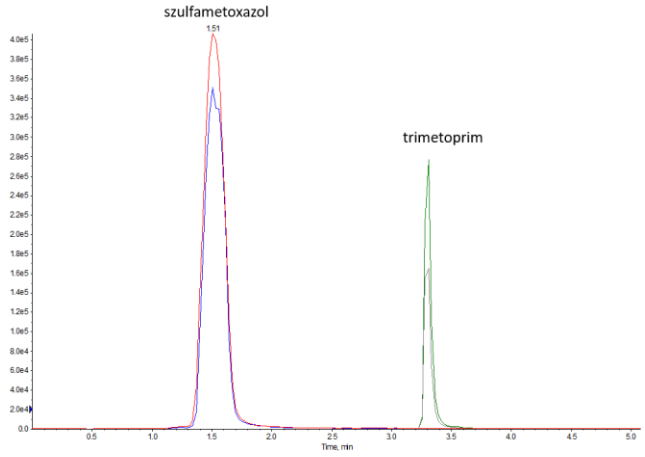
5.2.2.4. A be nem tartott terápia

Egy súlyos, bakteriális eredetű központi idegrendszeri fertőzés kezelésére a klinikán Sumetrolim terápiát alkalmaztak, a szokásosnál lényegesen magasabb dózisban (4 tabletta/adag), valamint rendkívül hosszú időtartamon keresztül (megközelítőleg hat hónapig). A kezelés eredményességének monitorozása érdekében a klinika részéről felmerült az igény a hatóanyagok vérszintjének analitikai meghatározására. A Sumetrolim kombinált antimikrobiális készítmény, amely két hatóanyagot tartalmaz: szulfametoxazolt és trimetoprimet (67. ábra).



67. ábra. A Szumetrolim hatóanyagainak szerkezete

A mennyiségi meghatározás céljára HPLC–MS/MS alapú módszert dolgoztam ki, amely a két fő komponens mellett a szulfametoxazol hidroxi-metabolitjának MRM átmeneteit is tartalmazta. A kvantitatív kiértékelés azonban kizárólag a szulfametoxazol alapján történt. A kidolgozott módszerrel mért vérminta kromatogramja a 68. ábrán látható. A kromatogramon jól elkülöníthető a két fő komponens csúcsa: az első a szulfametoxazol, a második a trimetoprim. A szulfametoxazol előtt csupán igen alacsony intenzitással jelentkezik a hidroxi-metabolit, ami arra utal, hogy a hatóanyag döntően változatlan formában van jelen a vérben.



68. ábra. A beteg vérmintájából felvett kromatogram

A dózisbeállítás célja egy igen magas, körülbelül 200 µg/mL vérszint elérése volt. Ennek meghatározásához ötpontos kalibrációs sort alkalmaztam 50–250 µg/mL koncentrációtartományban. Bár a magasabb koncentrációknál a kalibrációs görbe telítődési tendenciát mutatott, ebben a tartományban még megfelelő linearitás volt biztosítható. Az alkalmazott dózis mellett a beteg jelentős mellékhatásokat tapasztalt (hányinger, rosszullét), ezért a vérszint pontos monitorozása kiemelten fontos volt. A kezelés során a beteg rendszeresen szedte a gyógyszert, azonban a terápia vége felé az egyik vérmintában a korábban mért koncentrációkhoz képest körülbelül negyedakkora szulfametoxazol-szintet mértem. (6. táblázat) A mérést többször megismételtem, újbóli mintaelőkészítést követően is, és minden esetben azonosan alacsony értékeket kaptam.Az eredményekről konzultálva a kezelőorvossal végül a jelenség hátterére is fény derült. A beteg elmondása szerint a terápia során jelentkező kellemetlen mellékhatások miatt a kezelés vége felé — a kezelőorvos tudta nélkül — a javasolt napi dózisnak csupán az egynegyedét vette be. A vérszintmérés megbízhatóságában nem hitt, ezért döntött az önkényes dóziscsökkentés

mellett. A terápiás együttműködés hiánya azonban az LC–MS/MS mérések alapján egyértelműen kimutatható volt.

6. táblázat. Mért vérszint értékek

Minta	µg/mL
Vér 130516a	50,7
Vér 130516a	63,3
Vér 130516a	60,4
Vér 130516b	47,3
Vér 130516b	57,2
Vér 130516b	55,5
Friss A	47,5
Friss B	45,1

Ez az eset jól szemlélteti, hogy a terápiás gyógyszerszint-monitorozás nemcsak a dózisbeállítás és a toxicitás elkerülése szempontjából fontos, hanem objektív eszközt biztosít a terápiás együttműködés ellenőrzésére is. Az analitikai módszer ebben az esetben közvetlen klinikai döntést támogató információt szolgáltatott, és rávilágított arra, hogy a sikeres kezeléshez nemcsak megfelelő gyógyszer és dózis, hanem a beteg együttműködése is elengedhetetlen.

5.2.3. Transzportfolyamatok

Analitikai munkám jelentős részét olyan vizsgálatok tették ki, amelyek különböző transzportfolyamatokban részt vevő molekulák mennyiségi meghatározására irányultak. A dolgozat korábbi fejezeteiben több ilyen vegyület is bemutatásra került (például GABA, szukcinát, putreszcin, ornitin, spermidin és spermin), azonban a disszertáció terjedelmi korlátai nem teszik lehetővé valamennyi kapcsolódó munka részletes ismertetését. Az ezekhez a témákhoz kapcsolódó, de a dolgozatban nem tárgyalt eredményeket az irodalomjegyzékben külön, a disszertációhoz szorosan kapcsolódó közleményekként tüntetem fel.

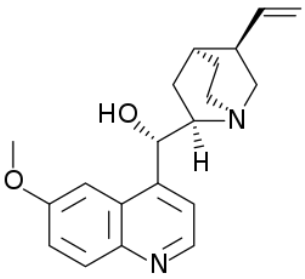
A transzportfolyamatok analitikai vizsgálatának egyik legnagyobb kihívása – és egyben sajátossága –, hogy nincs két teljesen azonos eset. Az egyes molekulák fizikai–kémiai tulajdonságai, várható koncentrációtartományai, valamint biológiai környezetük jelentős eltéréseket mutatnak, így minden vizsgálat egyedi módszerfejlesztést igényel. Ezek során a tömegspektrometriás paraméterek optimalizálása mellett a kromatográfiás elválasztás finomhangolása is elengedhetetlen. Ebben a fejezetben két, szemléletében és megközelítésében eltérő, mégis tanulságos transzporttal kapcsolatos munkát emelek ki.

Az első példa egy olyan analitikai módszerfejlesztéshez kapcsolódik, amelyet korábban, az 5.1.2.2. fejezetben már érintettem. A vizsgált célmolekula a bajkalin volt, amelynek transzportját együttműködő partnereink membránvezikulás rendszerben tanulmányozták. A módszerfejlesztés a szokásos módon indult, azonban már a kezdeti mérések során felmerült egy, a blank mintákban megjelenő, alacsony intenzitású jelenség a bajkalin MRM átmenetén, a megfelelő retenciós időnél. Bár ezt a jelenséget sok esetben egyszerű „carryover" hatásként kezelik, mi fontosnak tartottuk az okok részletes kivizsgálását.

A további vizsgálatok során egy addig nem ismert és szokatlan jelenséget sikerült azonosítanunk: a fordított fázisú C8-as oszlop bizonyos körülmények között HILIC-szerű tulajdonságokat mutatott. Bár ez a felismerés önmagában is jelentős módszertani érdekesség volt – amelyből önálló publikáció is született [SP7] –, a konkrét transzportvizsgálatok szempontjából mellékszálnak bizonyult. A célmolekula meghatározására kidolgozott módszert ennek ellenére teljes körűen validáltuk. A tízpontos kalibrációs modell – amely ritkán alkalmazott megoldás – három nagyságrendet fedett le (1–1000 nM), és megbízható kvantitatív eredményeket szolgáltatott. A módszer kimutatási határa 0,5 nM volt, ahol még legalább 3:1 jel/zaj arány volt elérhető. Az eljárást sikerrel alkalmaztuk a bajkalin membránvezikulákból történő mennyiségi meghatározására.

A második bemutatott munka egy eltérő jellegű transzportfolyamathoz kapcsolódott, amely nem klasszikus membrántranszportot, hanem gyógyszermolekulák célzott, orrüregen keresztüli agyi bejuttatását vizsgálta. A kísérletek célja annak tisztázása volt, hogy a P-glikoprotein milyen szerepet játszik az intranazálisan alkalmazott gyógyszerek felszívódásában, illetve hogy kombinált gyógyszeres kezelés esetén az egyes komponensek miként befolyásolják egymás transzportját. Modellvegyületként egy jól ismert P-gp-szubsztrátot, a kinidint (69. ábra) választották, amelyet orrgélbe keverve juttattak be. A kísérleti elrendezés során a kinidint intranazálisan alkalmazták, PSC-833 (specifikus P-gp-inhibitor) intravénás vagy intranazális adagolása mellett, valamint alacsony (50 ng) és magas (20 μg) dózisú intranazális adrenalin jelenlétében. A kontroll állatokban a kinidin agyi penetrációja a kimutatási határ közelében maradt, míg az intravénás PSC-833-mal kombinált kezelés esetében az agyi koncentrációk jelentős növekedést mutattak. Hasonló hatást figyeltünk meg a nagy dózisú intranazális adrenalin alkalmazásakor is, ahol az érszűkítő hatás következtében a perifériás eloszlás gátlása mellett fokozódott az agyi expozíció.

szabopali_452_26



69. ábra. A kinidin mint P-gp-szubsztrát modellvegyület

Az eredmények egyértelműen igazolták, hogy a P-glikoprotein nemcsak a klasszikus vér–agy gáton, hanem az intranazális alkalmazást követően is meghatározó szerepet játszik a gyógyszermolekulák sorsának alakításában. Az analitikai mérések lehetővé tették a különböző beavatkozások – transzporter-gátlás és hemodinamikai moduláció – hatásának kvantitatív összehasonlítását, és rávilágítottak arra, hogy az agyi expozíció nem kizárólag a beadás módjától, hanem a transzportfolyamatok komplex kölcsönhatásaitól is függ. Ez a megközelítés jól példázza, hogy a nagy érzékenységű LC–MS/MS alapú bioanalitika nélkülözhetetlen eszköze a modern transzport- és farmakokinetikai kutatásoknak [SP24].

A bemutatott példák jól illusztrálják, hogy a transzportfolyamatok vizsgálata során az analitikai kémia nem csupán mérési háttérként jelenik meg, hanem a biológiai és farmakológiai értelmezés szerves részévé válik. Akár membrántranszporttal, akár komplex, több tényező által befolyásolt felszívódási és eloszlási folyamatokkal van dolgunk, a megbízható következtetésekhez elengedhetetlen a célmolekulák pontos, szelektív és kellően érzékeny meghatározása. A fejezetben ismertetett munkák közös tanulsága, hogy a transzportjelenségek értelmezése gyakran csak akkor válik lehetővé, ha az analitikai módszerfejlesztés során nemcsak a mérhetőségre, hanem a jelenségek mögött álló fizikai–kémiai és biológiai összefüggések feltárására is hangsúlyt fektetünk. Ez a szemlélet végigkísérte a disszertációban bemutatott munkáimat, és alapvetően meghatározta az alkalmazott analitikai megközelítéseket.

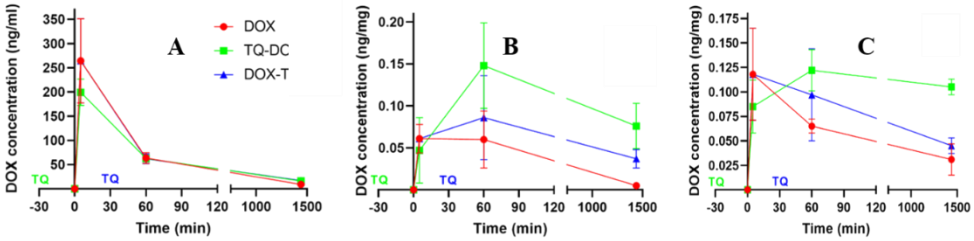
5.2.4. Farmakokinetikai vizsgálatok

5.2.4.1. Doxorubicin farmakokinetikai mérése egerekben

A farmakokinetikai vizsgálatok során a célmolekula koncentrációjának időbeli alakulását kell nyomon követni különböző biológiai mátrixokban, ami összetett analitikai kihívást jelent, különösen akkor, ha a vizsgált vegyület szöveti eloszlása és eliminációja is a kutatás

tárgyát képezi. Egy ilyen feladat keretében doxorubicinnel kezelt állatok vérében, májában és szívében kellett meghatároznom a hatóanyag koncentrációját az idő függvényében, különböző kezelési protokollok alkalmazása mellett. A kísérlet során az egerek három csoportba kerültek. Az első csoport t = 0 időpontban intravénás doxorubicin-kezelést kapott 5 mg/ttkg dózisban. A második csoport esetében a doxorubicin beadását 30 perccel megelőzően egy P-glikoprotein-gátlót, tariquidart (TQ) alkalmaztak 15 mg/ttkg dózisban, míg a harmadik csoport a doxorubicin-kezelést követően, a 30. percben kapott azonos dózisú TQ-kezelést. A vizsgálat célja annak feltárása volt, hogy a P-gp gátlás időzítése milyen hatással van a doxorubicin szintjére a különböző szervekben.

A méréseket Sciex 5600+ TripleTOF tömegspektrométeren végeztem TOF-MS módban, 500–660 Da tömegtartományban. A kromatográfiás elválasztás egy Shimadzu LC-20 rendszerrel történt Agilent XDB C8 (75 × 4,6 mm, 3,5 µm) oszlopon, gradiens elúció alkalmazásával, 0,1% hangyasavas víz és 0,1% hangyasavas acetonitril mozgófázisokkal. A mennyiségi meghatározáshoz hétpontos kalibrációs görbét vettem fel 0,45–600 ng/mL koncentrációtartományban, amelyre kvadratikus illesztést alkalmaztam 1/koncentráció súlyozással (r = 0,9999). A biológiai minták előkészítése acetonitriles fehérjekicsapással történt, majd centrifugálást követően a felülúszókat közvetlenül analizáltam. A kiértékelés során a mért koncentrációkat a minták hígulásának és az állatok testtömegének figyelembevételével korrigáltuk, és az így kapott adatokat a biológiai eredmények értelmezéséhez használtuk fel. A mérési eredmények egyértelműen azt mutatták, hogy a doxorubicin beadását megelőző tariquidar-kezelés emelkedett doxorubicin-szinteket eredményezett a vizsgált szervekben, különösen a májban és a szívben. Ez analitikailag jól alátámasztja, hogy a P-glikoprotein gátlása közvetlen hatással van a doxorubicin szöveti expozíciójára, és hogy az inhibitor alkalmazásának időzítése meghatározó tényező a farmakokinetikai viselkedés szempontjából. (70. ábra)



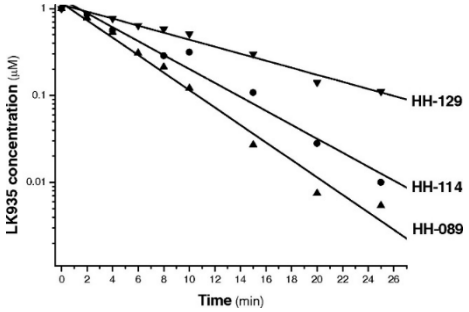
70. ábra. A doxorubicin farmakokinetikai profilja szérumban (A), májban (B) és szívben (C).
A doxorubicint t = 0 időpontban intravénásan kapták az állatok (piros görbe).
A tariquidar-kezelés a doxorubicin beadását 30 perccel megelőzően (zöld görbe), illetve azt 30 perccel követően (kék görbe) történt.

A vizsgálat jól példázza, hogy a megfelelően validált LC–MS alapú módszerek nemcsak a farmakokinetikai jelenségek leírását teszik lehetővé, hanem kvantitatív alapot szolgáltatnak komplex biológiai kérdések értelmezéséhez is [SP25], [SP26].

A fenti példa elsősorban az anyavegyület szöveti expozíciójára fókuszált. A farmakokinetikai vizsgálatok összetettebb esetei közé tartozik, amikor nem csupán az anyavegyület koncentrációjának időbeli változását kell nyomon követni, hanem a szervezetben végbemenő átalakulásokat is fel kell tárni. Ez egyrészt a metabolitok azonosítását, másrészt azok mennyiségi megjelenésének időfüggő követését jelenti, amely alapvető információt szolgáltat a molekula biológiai viselkedéséről és hatásmechanizmusáról.

5.2.4.2. Az LK935 molekula farmakokinetikai vizsgálata

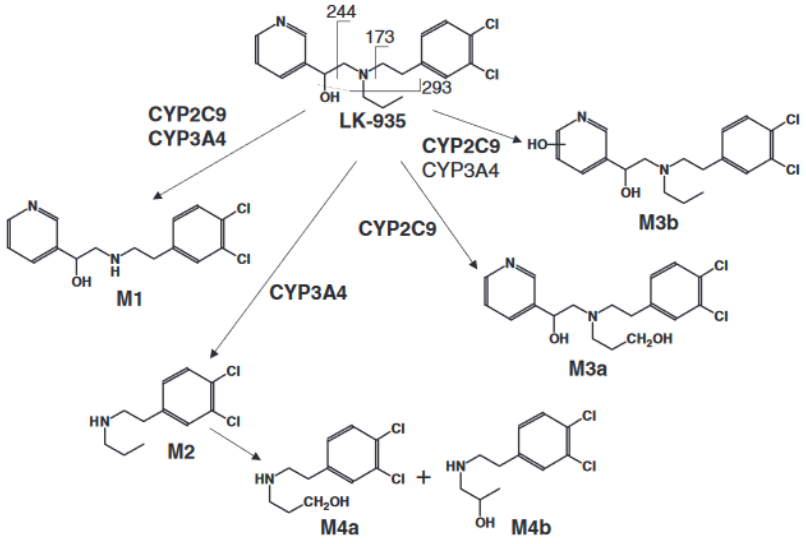
Egy korábbi munkánk során az LK-935 jelű, új, nem sztatin típusú koleszterincsökkentő molekula metabolizmusát tanulmányoztuk primer humán hepatocitákon. A molekula farmakológiai szempontból érdekes tulajdonsága volt, hogy humán pregnán X receptor (hPXR) aktiváló hatása hasonló mértékűnek bizonyult, mint a rifampiciné, ugyanakkor a CYP3A4 enzim indukciója lényegesen kisebb volt. Ez a jelenség arra utalt, hogy az LK-935 gyors átalakuláson megy keresztül, amely nem teszi lehetővé a maximális enzimindukció kialakulását. A hipotézis igazolására farmakokinetikai méréseket végeztünk három különböző donorból származó primer humán hepatocita szuszpenzióban, két koncentrációszinten (1 µM és 10 µM). Az LC–MS alapú analitikai mérések egyértelműen gyors anyavegyület-fogyást mutattak: 25 perc elteltével az 1 µM-os koncentráció esetében az LK-935 mintegy 80%-a, míg 10 µM esetén körülbelül 50%-a alakult át. A számított felezési idők rendre 6,06, illetve 23,6 percnek adódtak. Tekintettel arra, hogy a molekula kémiai stabilitása kiváló, az észlelt koncentrációcsökkenés kizárólag metabolikus folyamatokkal volt magyarázható. 71. ábra. Ennek megfelelően a koncentrációcsökkenés kizárólag metabolikus folyamatokkal volt magyarázható.



71. ábra. Az LK-935 in vitro farmakokinetikai vizsgálata három független humán hepatocita donoron.

A metabolizációs utak feltérképezése céljából LC–MS/MS méréseket végeztünk a 25 perces inkubációs időpontból származó mintákon. A vizsgálatokat egy 3200 QTrap tömegspektrométeren hajtottam végre ioncsapdás MS és MS/MS üzemmódban. A kromatográfiás elválasztás során összesen hat különböző metabolitot sikerült detektálni, amelyek mind az anyavegyület előtt eluálódtak, összhangban a metabolitok megnövekedett polaritásával. Az LK-935 és metabolitjainak extrahált ionkromatogramjait a Függelék F8. ábra szemlélteti. Az MS/MS spektrumok részletes kiértékelése alapján mind a hat metabolithoz szerkezeti hozzárendelést tudtunk végezni. Az M3 és M4 jelű metabolitok hidroxi-származékoknak bizonyultak, amelyek esetében az oxidáció a molekula különböző pozícióiban ment végbe, amit a kromatogramokon megjelenő kettős csúcsok is alátámasztottak. Az azonosított metabolikus útvonalakat a 72. ábra foglalja össze.

Az analitikai eredmények összességében alátámasztották, hogy az LK-935 gyors metabolizmusa magyarázatot ad a mérsékelt CYP3A4-indukcióra. A vizsgálat jól szemlélteti, hogy célzott LC–MS/MS mérések alkalmazásával már korai fázisban értékes információ nyerhető egy új molekula metabolikus viselkedéséről [SP27].



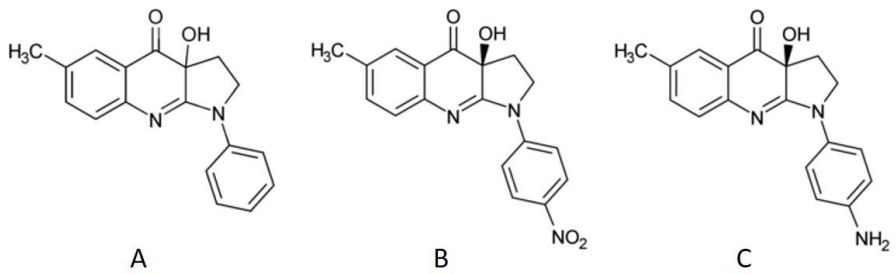
72. ábra. Az LK-935 molekula azonosított fő metabolikus útvonalai

A fenti példák jól szemléltetik, hogy az LC–MS alapú farmakokinetikai vizsgálatok már önmagukban is értékes információt szolgáltatnak egy adott molekula biológiai viselkedéséről. A módszerek valódi ereje azonban akkor mutatkozik meg igazán, amikor a koncentráció-idő profilok követése nagyfelbontású tömegspektrometriás mérésekkel és részletes metabolitazonosítással egészül ki. Ebben az esetben nemcsak az anyavegyület sorsának nyomon követése válik lehetővé, hanem az átalakulási utak feltérképezése és azok

kvantitatív értelmezése is. A következő fejezet egy olyan komplex farmakokinetikai vizsgálatot mutat be, amelyben az LC–MS/MS és HRMS technikák együttes alkalmazása révén a teljes ADME-profil analitikai feltárása vált lehetővé.

5.2.4.2. Blebbistatin származékok farmakokinetikai és metabolikus vizsgálatai

A blebbistatin és származékai szelektív miozin-II gátlóként széles körben alkalmazott kutatási modellvegyületek, ugyanakkor farmakológiai hasznosíthatóságukat kedvezőtlen farmakokinetikai tulajdonságaik, valamint gyors metabolikus átalakulásuk jelentősen korlátozza. A vegyületek in vivo hatásainak értelmezéséhez ezért elengedhetetlen volt a felszívódás, eloszlás, metabolizmus és elimináció (ADME) analitikai vizsgálata, különös tekintettel a gyors clearance hátterében álló metabolikus folyamatokra. Munkánk során a blebbistatin és két származáka, a p-amino- illetve a p-nitro-blebbistatin (73. ábra) farmakokinetikai viselkedését tanulmányoztuk in vivo kísérletekben, valamint kiegészítő in vitro rendszerekben.

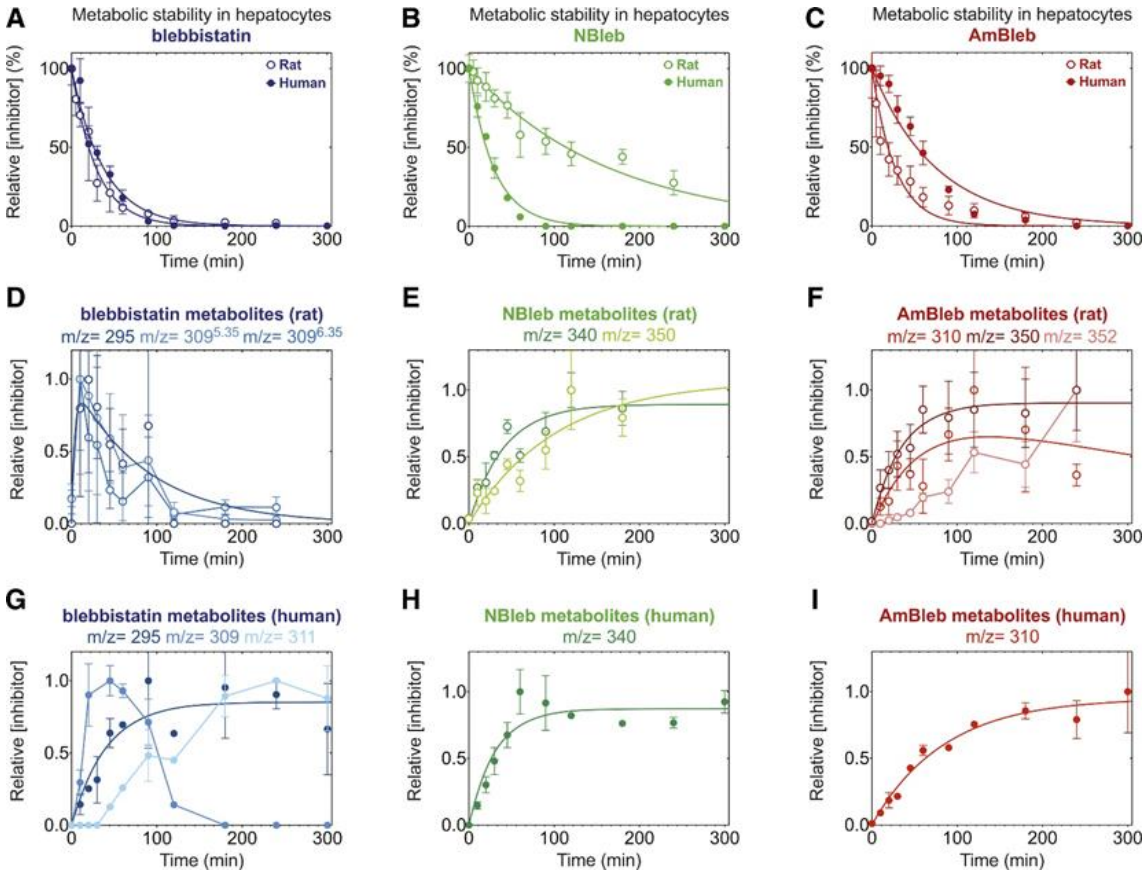


73. ábra. A vizsgált vegyületek: blebbistatin (A), p-NO2-blebbistatin (B), p-NH2-blebbistatin (C)

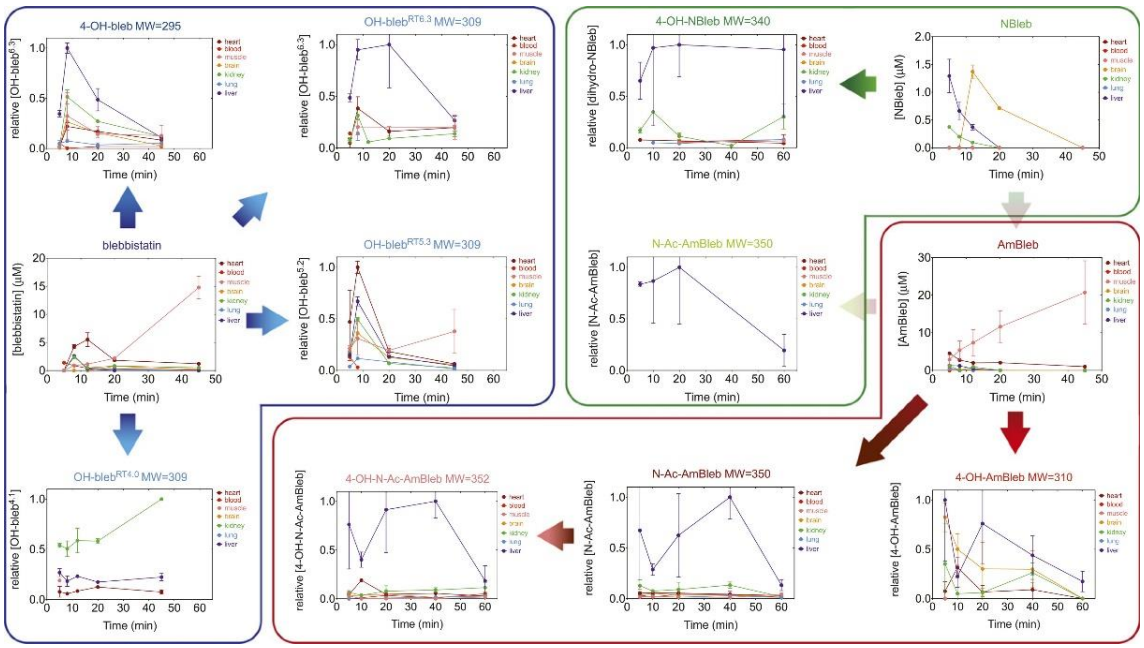
A szérum- és szövetmintákból történő mennyiségi meghatározást LC–MS alapú módszerekkel végeztük, amelyek alkalmasnak bizonyultak a gyors koncentrációváltozások megbízható követésére. A kapott koncentráció–idő görbék egyértelműen gyors eliminációt jeleztek, ami összhangban állt a vegyület korlátozott biológiai hozzáférhetőségével. (74. ábra A-C panel) A farmakokinetikai eredmények értelmezéséhez elengedhetetlen volt a blebbistatin metabolikus útvonalainak feltérképezése. Ennek érdekében nagyfelbontású LC–MS/MS méréseket alkalmaztunk, amelyek lehetővé tették a metabolitok nagy tömegpontosságú detektálását és szerkezeti jellemzését. A nagyfelbontású tömegspektrometriás adatok és az MS/MS fragmentációs mintázatok együttes értelmezésével több fő metabolitot sikerült azonosítani, valamint az egyes oxidációs és átalakulási folyamatokat elkülöníteni. (Függelék F9. ábra) A kvantitatív LC–MS adatok és a nagyfelbontású MS/MS-alapú szerkezeti információk integrált feldolgozása révén átfogó

képet kaptunk a blebbistatin metabolikus sorsáról. Az in vitro és in vivo megfigyelések között jó egyezést tapasztaltunk, ami megerősítette a vizsgált metabolikus utak relevanciáját. (74. ábra D-I panel) A kapott eredmények rávilágítottak arra, hogy a blebbistatin gyors eliminációja elsősorban intenzív metabolikus átalakulásának következménye. A szervi eloszlás vizsgálata további fontos információt szolgáltatott a blebbistatin és metabolitjai in vivo viselkedéséről. Az LC–MS alapú mérések alapján jól elkülöníthető volt az egyes vegyületek és metabolitok preferenciális felhalmozódása, ami egyrészt a metabolikus átalakulások szervspecifikus jellegére, másrészt a gyors elimináció mechanizmusára is magyarázatot adott (75. ábra).

Ez a munka jól szemlélteti, hogy a farmakokinetikai vizsgálatok, a metabolitazonosítás és a mennyiségi LC–MS mérések kombinált alkalmazása nélkülözhetetlen egy bioaktív molekula viselkedésének megértéséhez. A nagyfelbontású tömegspektrometria szerepe különösen hangsúlyos volt a metabolitok egyértelmű azonosításában, míg a kvantitatív LC–MS mérések biztosították az időbeli változások megbízható nyomon követését. Az alkalmazott analitikai stratégia komplex, mégis áttekinthető módon tette lehetővé a blebbistatin ADME-tulajdonságainak feltárását [SP28].



74. ábra. Az anyavegyületek (A-C) és a főbb metabolitok PK görbéi (D-I)



75. ábra. Az anyavegyület és a főbb metabolitok eloszlása a szervekben

6. Összefoglalás

A dolgozatban bemutatott munkák közös jellemzője a kvantitatív analitikai szemlélet következetes alkalmazása komplex biológiai és ipari rendszerek vizsgálatában. A feladatok sokfélesége – az ipari minőségellenőrzéstől és környezetanalitikától kezdve a klinikai diagnosztikán, farmakokinetikai és transzportvizsgálatokon át az epigenetikai és gyógyszerbiztonsági kérdésekig – jól szemlélteti, hogy a modern analitika nem elszigetelt mérések sorozata, hanem problémaközpontú gondolkodásmód, amelyben a módszerválasztás, a mintaelőkészítés, a kromatográfiás és tömegspektrometriás beállítások, valamint az adatfeldolgozás egységes stratégiát alkotnak.

A dolgozatban ismertetett példák azt mutatják, hogy komplex mátrixok esetén nincs univerzális megoldás: minden célmolekula, minden biológiai vagy ipari rendszer saját analitikai megközelítést igényel. A bemutatott stratégiák középpontjában ezért nem egy-egy technika önmagában, hanem a mérési probléma állt, amelyhez a legmegfelelőbb kvantitatív megoldást kellett kialakítani. Ennek során számos esetben vált szükségessé új mintaelőkészítési eljárások kidolgozása, alternatív kromatográfiás megoldások alkalmazása, innovatív kalibrációs modellek bevezetése, illetve az érzékenység és a mérési kapacitás növelése.

A biológiai alkalmazások esetében az analitikai módszerek nemcsak a koncentrációk pontos meghatározását tették lehetővé, hanem hozzájárultak komplex biológiai folyamatok – például metabolikus útvonalak, transzportmechanizmusok vagy epigenetikai változások – értelmezéséhez is. Klinikai és farmakológiai példákon keresztül bemutatható, hogy a megbízható kvantitatív analitika közvetlen hatással lehet a terápiás döntésekre, a dózisbeállításra és végső soron a betegek életminőségére. Ipari környezetben ugyanez a szemlélet a folyamatok optimalizálását, a minőségbiztosítást és a költséghatékonyság növelését szolgálta.

Összességében a dolgozat azt kívánja hangsúlyozni, hogy a kvantitatív analitikai stratégiák alkalmazása hidat képez az alapkutatás, az alkalmazott kutatás és a gyakorlati problémamegoldás között. A bemutatott eredmények igazolják, hogy a komplex rendszerek vizsgálata csak integrált, rugalmas és kritikus analitikai gondolkodással valósítható meg, amely túlmutat az egyes módszerek önmagukban vett alkalmazásán. E szemlélet mentén születtek meg a dolgozatban összefoglalt új tudományos eredmények is.

7. Új tudományos eredmények

I. MRM-alapú kvantitatív stratégiák fejlesztése

Scheduled MRM alapú, multikomponenses LC–MS/MS módszert dolgoztam ki 480 peszticid egyidejű, egy injektálásból történő meghatározására. Prediktív MRM vizsgálatok során igazoltam, hogy ritka esetekben szerkezeti interferenciák az MRM-átmenetek szintjén is megtévesztő eredményhez vezethetnek, amely nagyfelbontású MS alkalmazásával egyértelműen feloldható. Pszeudo-MRM megközelítést vezettem be kis molekulák mennyiségi meghatározására. Relatív kalibrációs modellt dolgoztam ki az epigenetikai markerek mennyiségi meghatározására, belső referenciaként a mintában természetesen jelen lévő guanint alkalmazva. A módszer független a kiindulási DNS mennyiségétől és az injektálási paraméterektől, ami a korábbi abszolút megközelítésekhez képest egyszerűbb és robusztusabb kvantitatív értékelést tett lehetővé. Munkám hozzájárult az MRM-alapú kvantitatív meghatározások szelektivitásának megbízhatóbb értelmezéséhez és alkalmazási körének bővítéséhez [SP2 - 4].

II. Nem konvencionális kromatográfiás viselkedések felismerése és analitikai hasznosítása

Azonosítottam egy C8-as állófázis HILIC-jellegű viselkedését poláros analitok esetében, amely lehetővé tette egy, a mérések során korábban félreértelmezett jelenség tisztázását. Az RX-Sil porózus szilika állófázist fordított fázisú eluensekkel, HILIC jellegű elválasztási mechanizmust kihasználva új kromatográfiás megközelítést dolgoztam ki poláros és bázikus molekulák visszatartására. A módszert sikeresen alkalmaztam epigenetikai markerek, szabad aminosavak, biogén aminok, valamint erősen bázikus komponensek mennyiségi meghatározására. Az RX-Sil ilyen irányú alkalmazása több, eltérő kémiai tulajdonságú vegyületcsoport megbízható elválasztását tette lehetővé, és alternatív megoldást kínált ipari és biológiai analitikai feladatokban [SP2, 4-5, 9-14].

III. Érzékenység- és hatékonyságnövelő analitikai stratégiák kidolgozása

On-line SPE technikával kombinált LC–MS módszereket dolgoztam ki, amelyek jelentősen növelték az analitikai áteresztőképességet klinikai és gyógyszeripari alkalmazásokban. Mikro- és kapilláris LC-technikák bevezetésével kis mintamennyiségek esetén is nagy érzékenységet biztosító mennyiségi meghatározásokat valósítottam meg. Új mintainjektálási stratégiát dolgoztam ki a mintaoldó erősségének csökkentésével és nagy térfogatú injektálással, amely a hígulás ellenére javította a csúcsalakot és a kimutatási

határt. Származékképzési megközelítést alkalmazva szteroid hormonok meghatározásakor pg/mL nagyságrendű kimutatási határt értem el [SP7, 15, 18-21].

IV. Komplex és extrém mátrixok analitikai kezelése

Speciális mintaelőkészítési és LC–MS alapú megközelítéseket dolgoztam ki analitikailag kihívást jelentő, komplex mátrixok vizsgálatára. A TNT-gyártás során alkalmazott kénsav szerves szennyezőinek azonosítása közvetlenül hozzájárult az ipari technológia optimalizálásához. Optimalizáltam a DNS savas hidrolízisének körülményeit, biztonságos és reprodukálható módon előállítva szabad nukleinsav-bázisokat epigenetikai vizsgálatokhoz. API-eredetű nitrózaminok pg/mL nagyságrendű meghatározására érzékeny és szelektív módszereket fejlesztettem, nagyfelbontású MS alkalmazásával feltárva interferenciákat és egyes esetekben határérték feletti szennyezéseket. Komplex gyógyszerfejlesztési projektekben (pl. favipiravir, remdesivir) az LC–MS analitika kulcsszerepet játszott a hatóanyagtartalom és stabilitás ellenőrzésében, valamint szennyezők azonosításában [SP1-2].

V. LC–MS alapú klinikai és terápiatámogató analitikai megoldások

Analitikai módszereket dolgoztam ki és validáltam több klinikai alkalmazásban, beleértve ciklosporin és metabolitjai, valproinsav, antibiotikum-kombinációk, valamint szabad aminosavak meghatározását. Közreműködtem az újszülöttkori anyagcserezavarok hazai LC–MS alapú szűrésének bevezetésében, hozzájárulva annak megbízható és rutinszerű alkalmazásához. Transzportvizsgálatok során modellvegyületek koncentrációváltozását igazoltam membránrendszerekben. Munkám közvetlenül támogatta a terápiás döntéshozatalt és a személyre szabott gyógyszeres kezelés optimalizálását [SP3, 4, 24].

VI. Integrált farmakokinetikai és metabolikus vizsgálatok LC–MS és HRMS alkalmazásával

Komplex in vivo és in vitro farmakokinetikai vizsgálatokat végeztem több, eltérő szerkezetű molekula esetében. Doxorubicin és liposzómás formulái esetében LC–MS méréseimmel hozzájárultam a P-glikoprotein-gátlás időzítésének szöveti expozícióra gyakorolt hatásának értelmezéséhez. Az LK-935 molekula gyors metabolizmusát és hat fő metabolitját azonosítottam, analitikai alapon magyarázatot adva farmakológiai viselkedésére. Blebbistatin-származékok esetében nagyfelbontású MS és célzott MRM mérések kombinációjával tártam fel a fő metabolikus útvonalakat és koncentráció-idő profilokat, bemutatva az LC–MS technikák integrált alkalmazásának lehetőségeit az ADME-folyamatok analitikai vizsgálatában [SP25-28].

8. Köszönetnyilvánítás

Egy doktori értekezés megszületéséig hosszú és gyakran rögös út vezet. Ezt az utat egyedül végigjárni elképzelhetetlen. Számos ember támogatása, biztatása, szakmai útmutatása és építő kritikája kísérte végig ezt a folyamatot.

Köszönettel tartozom Dinya Zoltánnak, aki egyetemi előadásain „megfertőzött" a tömegspektrometriával, és diákkörösként hamar befogadott az MS laboratóriumba. A szakmai tudás mellett előadói képessége és szakmai igényessége is példaként állt előttem. Mindkét területen igyekeztem a nyomdokaiba lépni.

Az MS laborba lépve találkoztam Lipták Miklóssal, akivel együtt kezdtük az ionok „kergetését". A közös szakmai indulásból életre szóló barátság és munkakapcsolat született, amely azóta is meghatározó része pályámnak.

Hálával gondolok Penke Botondra, aki még doktoranduszként csábított el Debrecenből Szegedre, hogy az Orvosi Vegytani Intézetbe érkezett első magyarországi elektroporlasztásos tömegspektrométeren dolgozhassak. A szegedi évek során Kele Zoltánnal és Janáky Tamással közösen indultunk el a proteomika útján, és a mikrotechnikák hazai bevezetésében is jelentős eredményeket értünk el.

Vékey Károlynak külön köszönettel tartozom. A debreceni PhD-előadásain ismertem meg a tömegspektrometria elméleti alapjait, később pedig ő kínált számomra lehetőséget a Központi Kémiai Kutatóintézetben. Igazi mentorként tekintek rá, aki szakmai gondolkodásmódját beszélgetések és – nem ritkán – komoly viták során adta tovább.

A Kémiai Kutatóközpont mindenkori főigazgatói – Pálinkás Gábor, Keserű György Miklós, Pokol György és Buday László – felismerték, hogy korszerű kémiai kutatás tömegspektrometriás háttér nélkül nem képzelhető el. A műszerbeszerzésekhez és a váratlan javítási költségek fedezéséhez egyaránt biztosított támogatásukért külön köszönet illeti őket.

A szakmai együttműködő partnerek száma szinte felsorolhatatlan. Mindenkinek hálás vagyok, aki megkeresett egy-egy analitikai probléma megoldásával. Külön szeretném kiemelni Monostory Katalint, akivel hosszú évtizedek óta egy hajóban evezünk. Neki köszönhetem szakmai önállóságom megerősödését: befogadott a csoportjába, és számos

klinikai, metabolomikai és farmakokinetikai munkában számított rám. Mindeközben – a feladatok tengerében – finom, de határozott ösztönzéssel segített a határidők betartásában.

Az elmúlt évek során számos hallgató dolgozott a laboratóriumban, akiknek témavezetője lehettem. A közös munka szakmailag és emberileg is gazdagító élmény volt. Külön büszkeség számomra, hogy Imre Tímea, Magda Balázs, Márta Zoltán és Németh Krisztina a közös munka eredményeként PhD-fokozatot szereztek. Simon Józsefet is szeretném megemlíteni, aki ugyan nem az én témavezetésemmel doktorált, de a labor csapatának tagjaként nélkülözhetetlen szereplőjévé vált a közös munkának.

Műszeres kutatóként a készülékek a mindennapi munka középpontjában állnak. Müller Tibornak köszönhetem az első elektroporlasztásos tömegspektrométer magyarországi üzembe helyezését, valamint az induláskor nyújtott felbecsülhetetlen segítséget. Lipták Miklós a közös indulás túl készülékforgalmazóként is meghatározó szerepet játszott abban, hogy laboratóriumunk korszerű műszerekkel dolgozhasson. A műszerek folyamatos működéséhez nélkülözhetetlen szerviztámogatásért Molnár Józsefnek és Motruk Róbertnek tartozom köszönettel.

Végül – de mindenekelőtt – a családomnak szeretném megköszönni azt a türelmet és támogatást, amely nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg. Hálával tartozom szüleimnek és testvéremnek a biztatásért és a belém vetett hitért. A legnagyobb köszönet azonban feleségemet és gyermekeinket illeti, akik végtelen türelemmel viselték a tudományos munka időigényét, és a nehezebb időszakokban is biztos hátteret jelentettek számomra.

9. A dolgozatban felhasznált saját publikációk

[SP1] **P.T. Szabó**, A. Darcsi, G. Turczel, G.M. Keserű, Ultra-sensitive HPLC–ESI–MS/MS quantitation of N-nitroso-phenylephrine in phenylephrine-containing anticold products, J. Pharm. Biomed. Anal. 274 (2026) 117441. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2026.117441.

[SP2] K. Németh, K. Mészáros, B. Szabó, H. Butz, T. Arányi, **P.T. Szabó**, A relative quantitation method for measuring DNA methylation and hydroxymethylation using guanine as an internal standard, Anal. Methods. 13 (2021). https://doi.org/10.1039/d1ay00897h.

[SP3] A. Nagy, T. Budi, M. Temesvári, Z. Szever, **P.T. Szabó**, K. Monostory, Adverse events in a newborn on valproate therapy due to loss-of-function mutations in CYP2C9, Epilepsy Behav. Case Reports. 4 (2015). https://doi.org/10.1016/j.ebcr.2015.08.006.

[SP4] K. Németh, I. Szatmári, V. Tőkési, **P.T. Szabó**, Application of Normal-Phase Silica Column in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Mode for Simultaneous Determination of Underivatized Amino Acids from Human Serum Samples via Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, Curr. Issues Mol. Biol. 45 (2023) 9354–9367. https://doi.org/10.3390/cimb45120586.

[SP5] E. Pászti-Gere, A. Szentkirályi-Tóth, **P. Szabó**, T. Steinmetzer, E. Fliszár-Nyúl, M. Poór, In vitro characterization of the furin inhibitor MI-1851: Albumin binding, interaction with cytochrome P450 enzymes and cytotoxicity, Biomed. Pharmacother. 151 (2022). https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113124.

[SP6] L. Héja, G. Nyitrai, O. Kékesi, T. Dobolyi, **P. Szabó**, R. Fiáth, I. Ulbert, B. Pál-Szenthe, M. Palkovits, J. Kardos, Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons, BMC Biol. 10 (2012). https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-26.

[SP7] B. Magda, Z. Márta, T. Imre, B. Kalapos-Kovács, I. Klebovich, J. Fekete, **P.T. Szabó**, Unexpected retention behavior of baicalin: Hydrophilic interaction like properties of a reversed-phase column, J. Pharm. Biomed. Anal. 111 (2015). https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.03.037.

[SP8] T. Molnár, P. Barabás, L. Héja, E.K. Fekete, B. Lasztóczi, **P. Szabó**, G. Nyitrai, E. Simon-Trompler, F. Hajós, M. Palkovits, J. Kardos, γ-Hydroxybutyrate binds to the synaptic site recognizing succinate monocarboxylate: A new hypothesis on astrocyte-neuron interaction via the protonation of succinate, J. Neurosci. Res. 86 (2008). https://doi.org/10.1002/jnr.21608.

[SP9] Y. Yamagata, **P. Szabó**, D. Szüts, C. Bacquet, T. Arányi, A. Páldi, Rapid turnover of DNA methylation in human cells, Epigenetics. 7 (2012). https://doi.org/10.4161/epi.7.2.18906.

[SP10] B. Vető, **P. Szabó**, C. Bacquet, A. Apró, E. Hathy, J. Kiss, J.M. Réthelyi, F. Szeri, D. Szüts, T. Arányi, Inhibition of DNA methyltransferase leads to increased genomic 5-hydroxymethylcytosine levels in hematopoietic cells, FEBS Open Bio. 8 (2018). https://doi.org/10.1002/2211-5463.12392.

[SP11] C.E. Németh, Z. Nemoda, P. Lőw, **P. Szabó**, E.Z. Horváth, A. Willaert, A. Boel, B.L. Callewaert, P.J. Coucke, M. Colombi, G. Bánhegyi, É. Margittai, Decreased nuclear ascorbate accumulation accompanied with altered genomic methylation pattern in fibroblasts from arterial tortuosity syndrome patients, Oxid. Med. Cell. Longev. 2019 (2019). https://doi.org/10.1155/2019/8156592.

[SP12] B. Szabó, K. Nemeth, K. Meszáros, L. Krokker, I. Likó, É. Saskoi, K. Nemeth, **P.T. Szabó**, N. Szücs, S. Czirják, G. Szalóki, A. Patócs, H. Butz, Aspirin Mediates Its Antitumoral Effect Through Inhibiting PTTG1 in Pituitary Adenoma, J. Clin. Endocrinol. Metab. 107 (2022). https://doi.org/10.1210/clinem/dgac496.

[SP13] Z. Kovács, S.N. Skatchkov, R.W. Veh, Z. Szabó, K. Németh, **P.T. Szabó**, J. Kardos, L. Héja, Critical Role of Astrocytic Polyamine and GABA Metabolism in Epileptogenesis, Front. Cell. Neurosci. 15 (2022). https://doi.org/10.3389/fncel.2021.787319.

[SP14] J. Simon, M. Kovács, **P.T. Szabó**, Finding the best column for polar basic analytes across reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography, Heliyon. 11 (2025) e42461. https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2025.E42461.

[SP15] Z. Márta, B. Bobály, J. Fekete, B. Magda, T. Imre, **P.T. Szabó**, Simultaneous determination of ten nonsteroidal anti-inflammatory drugs from drinking water, surface water and wastewater using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system, J. Pharm. Biomed. Anal. 160 (2018). https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.016.

[SP16] Z. Somogyi, P. Mag, D. Kovács, Á. Kerek, **P. Szabó**, L. Makrai, Á. Jerzsele, Synovial and Systemic Pharmacokinetics of Florfenicol and PK/PD Integration against Streptococcus suis in Pigs, Pharmaceutics. 14 (2022). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010109.

[SP17] Z. Somogyi, P. Mag, R. Simon, Á. Kerek, **P. Szabó**, E. Albert, I. Biksi, Á. Jerzsele, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Florfenicol in Plasma and Synovial Fluid of Pigs at a Dose of 30 mg/kg_{bw} Following Intramuscular Administration, Antibiotics. 12 (2023). https://doi.org/10.3390/antibiotics12040758.

[SP18] B. Magda, Z. Dobi, K. Mészáros, É. Szabó, Z. Márta, T. Imre, **P.T. Szabó**, Charged derivatization and on-line solid phase extraction to measure extremely low cortisol and cortisone levels in human saliva with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, J. Pharm. Biomed. Anal. 140 (2017). https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.028.

[SP19] Z. Márta, B. Bobály, J. Fekete, B. Magda, T. Imre, K.V. Mészáros, **P.T. Szabó**, Pushing quantitation limits in micro UHPLC–MS/MS analysis of steroid hormones by sample dilution using high volume injection, J. Pharm. Biomed. Anal. 129 (2016) 135–141. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.024.

[SP20] Z. Kele, T. Janáky, T. Mészáros, A. Fehér, D. Dudits, **P.T. Szabó**, Capillary chromatography/microelectrospray mass spectrometry used for the identification of putative cyclin-dependent kinase inhibitory protein in medicago, Rapid Commun. Mass Spectrom. 12 (1998). https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19981030)12:20<1564::AID-RCM351>3.0.CO;2-T.

[SP21] Z. Márta, B. Bobály, J. Fekete, B. Magda, T. Imre, K.V. Mészáros, M. Bálint, **P.T. Szabó**, Simultaneous determination of thirteen different steroid hormones using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system, J. Pharm. Biomed. Anal. 150 (2018). https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.12.014.

[SP22] G. Dormán, B. Buchholcz, I. Puskás, **P. Szabó**, E. Varga, L. Szente, G.M. Keserű, F. Darvas, Repetitive stability study of remdesivir/cyclodextrin complex on the international space station, Sci. Reports 2025 151. 15 (2025) 4182-. https://doi.org/10.1038/s41598-024-81428-5.

[SP23] A. Füredi, K. Szebényi, S. Tóth, M. Cserepes, L. Hámori, V. Nagy, E. Karai, P. Vajdovich, T. Imre, **P. Szabó**, D. Szüts, J. Tóvári, G. Szakács, Pegylated liposomal formulation of doxorubicin overcomes drug resistance in a genetically engineered mouse model of breast cancer, J. Control. Release. 261 (2017). https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.010.

[SP24] L.A. Bors, Á. Bajza, M. Mándoki, B.J. Tasi, G. Cserey, T. Imre, **P. Szabó**, F. Erdő, Modulation of nose-to-brain delivery of a P-glycoprotein (MDR1) substrate model drug (quinidine) in rats, Brain Res. Bull. 160 (2020). https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.04.012.

[SP25] K. Szebényi, A. Füredi, E. Bajtai, S.N. Sama, A. Csiszar, B. Gombos, **P. Szabó**, M. Grusch, G. Szakács, Effective targeting of breast cancer by the inhibition of P-glycoprotein mediated removal of toxic lipid peroxidation byproducts from drug tolerant persister cells, Drug Resist. Updat. 71 (2023). https://doi.org/10.1016/j.drup.2023.101007.

[SP26] A. Füredi, S. Tóth, K. Hegedüs, **P.T. Szabó**, A. Gaál, G. Barta, L.N. Naszályi, K. Kiss, K. Bölcskei, Z. Szeltner, E. Bajtai, B. Gombos, D. Kiss, M.T. Cserepes, A. Kiss, P. Pokreisz, L. Kenner, S. Högler, C. Magyar, J.D. Cowles, A. Csiszar, J. Tóvári, D. Szüts, Z. Helyes, Z. Varga, G. Mező, G. Szakács, Safe delivery of a highly toxic anthracycline derivative through liposomal nanoformulation achieves complete cancer regression, Mol. Cancer 2025 241. 24 (2025) 269-. https://doi.org/10.1186/S12943-025-02444-1.

[SP27] K. Monostory, J.-M. Pascussi, **P. Szabó**, M. Temesvári, K. Kohalmy, J. Acimovic, D. Kocjan, D. Kuzman, B. Wilzewski, R. Bernhardt, L. Kóbori, D. Rozman, Drug interaction potential of 2-((3,4-dichlorophenethyl)(propyl)amino)-1- (pyridin-3-yl)ethanol (LK-935), the novel nonstatin-type cholesterol-lowering agent, Drug Metab. Dispos. 37 (2009). https://doi.org/10.1124/dmd.108.023887.

[SP28] M. Gyimesi, A.Á. Rauscher, S.K. Suthar, K.Á. Hamow, K. Oravecz, I. Lorincz, Z. Borhegyi, M.T. Déri, Á.F. Kiss, K. Monostory, **P.T. Szabó**, S. Nag, I. Tomasic, J. Krans, P.J. Tierney, M. Kovács, L. Kornya, A. Málnási-Csizmadia, Improved inhibitory and absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicology (ADMET) properties of blebbistatin derivatives indicate that blebbistatin scaffold is ideal for drug development targeting myosin-2, J. Pharmacol. Exp. Ther. 376 (2021). https://doi.org/10.1124/jpet.120.000167.

10. A dolgozat témájához kapcsolódó, de abban fel nem használt egyéb saját publikációk

[SP29] T. Janáky, **P. Szabó,** Z. Kele, L. Baláspiri, C. Varga, M. Gálfi, M. Vecsernyés, L. Gáspár, A. Juhász, F.A. László, Identification of oxytocin and vasopressin from neurohypophyseal cell culture, Rapid Commun. Mass Spectrom. 12 (1998). https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0231(19981130)12:22<1765::aid-rcm359>3.3.co;2-l.

[SP30] Z. Kele, T. Janáky, T. Mészáros, A. Fehér, D. Dudits, **P.T. Szabó**, Capillary chromatography/microelectrospray mass spectrometry used for the identification of putative cyclin-dependent kinase inhibitory protein in medicago, Rapid Commun. Mass Spectrom. 12 (1998). https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19981030)12:20<1564::AID-RCM351>3.0.CO;2-T.

[SP31] Z. Kele, Z. Kupihár, L. Kovács, T. Janáky, **P.T. Szabó**, Electrospray mass spectrometry of phosphoramidites, a group of acid-labile compounds, J. Mass Spectrom. 34 (1999). https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199912)34:12<1317::AID-JMS886>3.0.CO;2-S.

[SP32] **P.T. Szabó**, Z. Kele, Z. Birkó, F. Szeszák, S. Bíró, T. Janáky, Identification of factor C protein from Streptomyces griseus by microelectrospray mass spectrometry, J. Mass Spectrom. 34 (1999). https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199912)34:12<1312::AID-JMS885>3.0.CO;2-9.

[SP33] **P.T. Szabó**, Z. Kele, Electrospray mass spectrometry of hydrophobic compounds using dimethyl sulfoxide and dimethylformamide as solvents, Rapid Commun. Mass Spectrom. 15 (2001) 2415–2419. https://doi.org/10.1002/rcm.526.

[SP34] G. Lengyel, Z. Veres, **P. Szabó,** L. Vereczkey, K. Jemnitz, Canalicular and sinusoidal disposition of bilirubin mono- and diglucuronides in sandwich-cultured human and rat primary hepatocytes, Drug Metab. Dispos. 33 (2005). https://doi.org/10.1124/dmd.105.004481.

[SP35] Á. Donkó, A. Orient, **P.T. Szabó**, G. Németh, T. Vántus, G. Kéri, L. Örfi, L. Hunyady, L. Buday, M. Geiszt, Detection of hydrogen peroxide by lactoperoxidase-mediated dityrosine formation, Free Radic. Res. 43 (2009). https://doi.org/10.1080/10715760902859069.

[SP36] M. Jani, **P. Szabó**, E. Kis, É. Molnár, H. Glavinas, P. Krajcsi, Kinetic characterization of sulfasalazine transport by human ATP-binding cassette G2, Biol. Pharm. Bull. 32 (2009). https://doi.org/10.1248/bpb.32.497.

[SP37] M. Jani, I. Makai, E. Kis, **P. Szabó**, T. Nagy, P. Krajcsi, A. Lespine, Ivermectin interacts with human ABCG2, J. Pharm. Sci. 100 (2011). https://doi.org/10.1002/jps.22262.

[SP38] J. Ačimovič, T. Korošec, M. Seliškar, I. Bjorkhem, K. Monostory, **P. Szabo**, J.-M. Pascussi, A. Belič, U. Urleb, D. Kocjan, D. Rozman, Inhibition of human sterol Δ^7-reductase and other postlanosterol enzymes by LK-980, a novel inhibitor of cholesterol synthesis, Drug Metab. Dispos. 39 (2011). https://doi.org/10.1124/dmd.110.035840.

[SP39] C. Brampton, Y. Yamaguchi, O. Vanakker, L. Van Laer, L.-H. Chen, M. Thakore, A. De Paepe, V. Pomozi, **P.T. Szabó,** L. Martin, A. Váradi, O.L. Saux, Vitamin K does not prevent soft tissue mineralization in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum, Cell Cycle. 10 (2011). https://doi.org/10.4161/cc.10.11.15681.

[SP40] K. Fülöp, Q. Jiang, K.V.D. Wetering, V. Pomozi, **P.T. Szabó**, T. Arányi, B. Sarkadi, P. Borst, J. Uitto, A. Váradi, ABCC6 does not transport vitamin K3-glutathione conjugate from the liver: Relevance to pathomechanisms of pseudoxanthoma elasticum, Biochem. Biophys. Res. Commun. 415 (2011). https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.10.095.

[SP41] B. Kalapos-Kovács, B. Magda, M. Jani, Z. Fekete, **P.T. Szabó**, I. Antal, P. Krajcsi, I. Klebovich, Multiple ABC Transporters Efflux Baicalin, Phyther. Res. 29 (2015). https://doi.org/10.1002/ptr.5477.

[SP42] P. Monostori, **P. Szabó**, O. Marginean, C. Bereczki, E. Karg, Concurrent Confirmation and Differential Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia from Dried Blood Spots: Application of a Second-Tier LC-MS/MS Assay in a Cross-Border Cooperation for Newborn Screening, Horm. Res. Paediatr. 84 (2015). https://doi.org/10.1159/000439380.

[SP43] K. Jemnitz, M. Szabo, A. Batai-Konczos, **P. Szabo**, B. Magda, Z. Veres, A modified procedure for estimating the impact of the uptake on the overall biliary clearance in sandwich culture of rat hepatocytes, Drug Metab. Lett. 9 (2015). https://doi.org/10.2174/1872312809666150119105646.

[SP44] A. Bóta, A. Wacha, Z. Varga, I.C. Szigyártó, S. Kristyán, A. Lőrincz, **P. Szabó**, M. Kálmán, L. Naszályi-Nagy, J. Mihály, Role of oligo(malic acid) on the formation of unilamellar vesicles, J. Colloid Interface Sci. 532 (2018). https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.08.020.

[SP45] Á. Bajza, D. Kocsis, O. Berezvai, A.J. Laki, B. Lukács, T. Imre, K. Iván, **P. Szabó**, F. Erdő, Verification of p-glycoprotein function at the dermal barrier in diffusion cells and dynamic "skin-on-a-chip" microfluidic device, Pharmaceutics. 12 (2020). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090804.

[SP46] M. Cserepes, D. Türk, S. Tóth, V.F.S. Pape, A. Gaál, M. Gera, J.E. Szabó, N. Kucsma, G. Várady, B.G. Vértessy, C. Streli, **P.T. Szabó**, J. Tovari, N. Szoboszlai, G. Szákacs, Unshielding multidrug resistant cancer through selective iron depletion of p-glycoprotein-expressing cells, Cancer Res. 80 (2020). https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-1407.

[SP47] Z. Varga-Medveczky, N. Kovács, M.E. Tóth, M. Sántha, I. Horváth, L.A. Bors, K. Fónagy, T. Imre, **P. Szabó,** D. Máthé, F. Erdő, Age-Related Inflammatory Balance Shift, Nasal Barrier Function, and Cerebro-Morphological Status in Healthy and Diseased Rodents, Front. Neurosci. 15 (2021). https://doi.org/10.3389/fnins.2021.700729.

[SP48] D. Kocsis, P.R. Varga, R. Keshwan, M. Nader, M. Lengyel, **P. Szabó**, I. Antal, K. Kánai, G. Keglevich, F. Erdő, Transdermal Delivery of α-Aminophosphonates as Semisolid Formulations—An In Vitro-Ex Vivo Study, Pharmaceutics. 15 (2023). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051464.

[SP49] K.B. Kovács, L. Szalai, **P. Szabó**, J.B. Gém, S. Barsi, B. Szalai, B. Perey-Simon, G. Turu, A.D. Tóth, P. Várnai, L. Hunyady, A. Balla, An Unexpected Enzyme in Vascular Smooth Muscle Cells: Angiotensin II Upregulates Cholesterol-25-Hydroxylase Gene Expression, Int. J. Mol. Sci. 24 (2023). https://doi.org/10.3390/ijms24043968.

[SP50] M. Kozsurek, K. Király, K. Gyimesi, E. Lukácsi, C. Fekete, B. Gereben, P. Mohácsik, Z. Helyes, K. Bölcskei, V. Tékus, K. Pap, E. Szűcs, S. Benyhe, T. Imre, **P. Szabó**, A. Gajtkó, K. Holló, Z. Puskár, Unique, Specific CART Receptor-Independent Regulatory Mechanism of CART(55-102) Peptide in Spinal Nociceptive Transmission and Its Relation to Dipeptidyl-Peptidase 4 (DDP4), Int. J. Mol. Sci. 24 (2023). https://doi.org/10.3390/ijms24020918.

[SP51] R. Martinek, R. Lózsa, Á. Póti, E. Németh, G. Várady, **P. Szabó**, D. Szüts, Comprehensive investigation of the mutagenic potential of six pesticides classified by IARC as probably carcinogenic to humans, Chemosphere. 362 (2024) 142700. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2024.142700.

11. Irodalomjegyzék

[1] J.J. Thomson, XIX. Further experiments on positive rays , London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci. 24 (1912) 209–253. https://doi.org/10.1080/14786440808637325.

[2] F.W. Aston, The constitution of the elements [4], Nature. 104 (1920) 393. https://doi.org/10.1038/104393b0.

[3] A.O. Nier, A mass-spectrographic study of the isotopes of argon, potassium, rubidium, zinc and cadmium, Phys. Rev. 50 (1936) 1041–1045. https://doi.org/10.1103/PhysRev.50.1041.

[4] W. Paul, H. Steinwedel, Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld, Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. A J. Phys. Sci. 8 (1953) 448–450. https://doi.org/10.1515/zna-1953-0710.

[5] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, Science. 246 (1989) 64–71. https://doi.org/10.1126/science.2675315.

[6] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2 (1988) 151–153. https://doi.org/10.1002/rcm.1290020802.

[7] A.O. Nier, A Mass Spectrometer for Routine Isotope Abundance Measurements, Rev. Sci. Instrum. 11 (1940) 212–216. https://doi.org/10.1063/1.1751688.

[8] C.C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, W.W. Wells, Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances, J. Am. Chem. Soc. 85 (2002) 2497–2507. https://doi.org/10.1021/ja00899a032.

[9] Z. Dinya, M. Lipták, P. Szabó, F. Sztaricskai, K. Vékey, Determination of active hydrogen in organic compounds by electron-impact mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 6 (1992). https://doi.org/10.1002/rcm.1290061110.

[10] J. Franck, E.G. Dymond, Elementary processes of photochemical reactions, Trans. Faraday Soc. 21 (1926) 536–542. https://doi.org/10.1039/TF9262100536.

[11] E. Condon, A Theory of Intensity Distribution in Band Systems, Phys. Rev. 28 (1926) 1182. https://doi.org/10.1103/PhysRev.28.1182.

[12] M.S.B. Munson, F.H. Field, Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction, J. Am. Chem. Soc. 88 (2002) 2621–2630. https://doi.org/10.1021/ja00964a001.

[13] S. Stein, R. Gates, Mass Spectral Reference Libraries: An Ever-Expanding Resource for Chemical Identification, Anal. Chem. 84 (2012) 7274–7282. https://doi.org/10.1021/ac301205z.

[14] C.S. Creaser, J.W. Stygall, Particle beam liquid chromatography–mass spectrometry: instrumentation and applications. A review, Analyst. 118 (1993) 1467–1480. https://doi.org/10.1039/AN9931801467.

[15] W.H. McFadden, The Development of the Moving Belt Interface for LC/MS, Encycl. Mass Spectrom. Vol. 9 Hist. Perspect. Part A Dev. Mass Spectrom. (2015) 172–179. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-043848-1.00021-3.

[16] R.M. Caprioli, Continuous-Flow Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry: Applications to Dynamic Systems, Mass Spectrom. Biomol. Sci. (1996) 273–297. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0217-6_12.

[17] R.M. Caprioli, T. Fan, J.S. Cottrell, Continuous-flow sample probe for fast atom bombardment mass spectrometry, Anal. Chem. 58 (1986) 2949–2954. https://doi.org/10.1021/ac00127a012.

[18] M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A.N. Tyler, M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A.N. Tyler, Barber, M., Bordoli, R. S., Sedgwick, R. D., Tyler, A. N., Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry, Natur. 293 (1981) 270–275. https://doi.org/10.1038/293270a0.

[19] H.R. Morris, M. Panico, M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick, A. Tyler, Fast atom bombardment: A new mass spectrometric method for peptide sequence analysis, Biochem. Biophys. Res. Commun. 101 (1981) 623–631. https://doi.org/10.1016/0006-291X(81)91304-8.

[20] R.D. Smith, J.A. Loo, C.G. Edmonds, C.J. Barinaga, H.R. Udseth, New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization, Anal. Chem. 62 (1990) 882–899. https://doi.org/10.1021/ac00208a002.

[21] P.J. Gates, Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for the routine analysis of low molecular weight analytes, Eur. J. Mass Spectrom. 27 (2021) 13–28. https://doi.org/10.1177/14690667211005055.

[22] S. Grosse, T. Letzel, Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry with post-column liquid mixing for the efficient determination of partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons, J. Chromatogr. A. 1139 (2007) 75–83. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.086.

[23] Y.C. Ma, H.Y. Kim, Determination of Steroids by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 8 (1997) 1010–1020. https://doi.org/10.1016/S1044-0305(97)00122-0.

[24] K.D. McCarty, F.P. Guengerich, Mass Spectral Analysis of Sterols and Other Steroids in Different Ionization Modes: Sensitivity and Oxidation Artifacts, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 36 (2025) 1702. https://doi.org/10.1021/jasms.5c00099.

[25] C.S. Kaddis, S.H. Lomeli, S. Yin, B. Berhane, M.I. Apostol, V.A. Kickhoefer, L.H. Rome, J.A. Loo, Sizing Large Proteins and Protein Complexes by Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Ion Mobility, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 18 (2007) 1206–1216. https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.02.015.

[26] S.L. Kaufman, A.R. Kuchumov, M. Kazakevich, S.N. Vinogradov, Analysis of a 3.6-MDa hexagonal bilayer hemoglobin from Lumbricus terrestris using a gas-phase electrophoretic mobility molecular analyzer, Anal. Biochem. 259 (1998) 195–202. https://doi.org/10.1006/abio.1998.2644.

[27] Quadrupole Mass Spectrometry and its Applications, Elsevier, 1976. https://doi.org/10.1016/c2013-0-04436-2.

[28] P.H. Dawson, Quadrupole mass filters with varying mathieu parameter, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process. 83 (1988) 295–309. https://doi.org/10.1016/0168-1176(88)80034-X.

[29] R.E. March, An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry, J. Mass Spectrom. 32 (1997) 351–369. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199704)32:4<351::AID-JMS512>3.0.CO;2-Y.

[30] I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, B.A. Thomson, An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, J. Mass Spectrom. 36 (2001) 849–865. https://doi.org/10.1002/jms.207.

[31] A.G. Marshall, C.L. Hendrickson, G.S. Jackson, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer, Mass Spectrom. Rev. 17 (1998) 1–35. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2787(1998)17:1<1::AID-MAS1>3.0.CO;2-K.

[32] A. Makarov, Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis, Anal. Chem. 72 (2000) 1156–1162. https://doi.org/10.1021/ac991131p.

[33] Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R.G. Cooks, The Orbitrap: A new mass spectrometer, J. Mass Spectrom. 40 (2005) 430–443. https://doi.org/10.1002/jms.856.

[34] J.L. Holmes, F. W. McLafferty (ED.) Tandem msss spectrometry. Wiley–Interscience, New York, 1983. Price US $46.20, Org. Mass Spectrom. 19 (1984) 530–530. https://doi.org/10.1002/oms.1210191019.

[35] J. V. Johnson, R.A. Yost, P.E. Kelley, D.C. Bradford, Tandem-in-Space and Tandem-in-Time Mass Spectrometry: Triple Quadrupoles and Quadrupole Ion Traps, Anal. Chem. 62 (1990) 2162–2172. https://doi.org/10.1021/ac00219a003.

[36] C. Hoang, W. Uritboonthai, L. Hoang, E.M. Billings, A. Aisporna, F.A. Nia, R.J.E. Derks, J.R. Williamson, M. Giera, G. Siuzdak, Tandem Mass Spectrometry across Platforms, Anal. Chem. 96 (2024) 5478–5488. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c05576.

[37] R.A. Yost, C.G. Enke, Triple Quadrupole Mass Spectrometry, Anal. Chem. 51 (1979) 1251A-1264A. https://doi.org/10.1021/ac50048a792.

[38] L.S. Ettre, K.I. Sakodynskii, M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899-1903), Chromatographia. 35 (1993) 223–231. https://doi.org/10.1007/BF02269707.

[39] G.A. Eiceman, J. Gardea-Torresdey, E. Overton, K. Carney, F. Dorman, Gas chromatography, Anal. Chem. 74 (2002) 2771–2780. https://doi.org/10.1021/ac020210p.

[40] J.G. Dorsey, W.T. Cooper, B.A. Siles, J.P. Foley, H.G. Barth, Liquid chromatography: Theory and methodology, Anal. Chem. 68 (1996). https://doi.org/10.1021/a19600202.

[41] W.T. Cooper, Normal-Phase Liquid Chromatography, Encycl. Anal. Chem. (2000). https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5913.

[42] A. Vailaya, Fundamentals of reversed phase chromatography: Thermodynamic and exothermodynamic treatment, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 28 (2005) 965–1054. https://doi.org/10.1081/JLC-200052969.

[43] B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique, Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 231–247. https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5.

[44] B.A. Bidlingmeyer, SEPARATION OF IONIC COMPOUNDS BY REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY - AN UPDATE OF ION-PAIRING TECHNIQUES., J. Chromatogr. Sci. 18 (1980) 525–539. https://doi.org/10.1093/chromsci/18.10.525.

[45] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, P. Molnar, Enhancement of retention by ion-pair formation in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, Anal. Chem. 49 (2002) 2295–2305. https://doi.org/10.1021/ac50022a048.

[46] R.K. Gilpin, J. Stinson, C.S. Gilpin, Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography: An Emerging Technique, in: Encycl. Anal. Chem., Wiley, 2010. https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9119.

[47] F. Ahmed, T. Eticha, A. Hymete, A. Ashenef, F. Ahmed, T. Eticha, A. Hymete, A. Ashenef, Principles and Applications of Ultra-High-Performance Liquid Chromatography, High Perform. Liq. Chromatogr. - Recent Adv. Appl. (2023). https://doi.org/10.5772/intechopen.110540.

[48] C.G. Horvath, B.A. Preiss, S.R. Lipsky, Fast Liquid Chromatography: An Investigation of Operating Parameters and the Separation of Nucleotides on Pellicular Ion Exchangers, Anal. Chem. 39 (1967) 1422–1428. https://doi.org/10.1021/ac60256a003.

[49] C. Horvath, S.R. Lipsky, Rapid Analysis of Ribonucleosides and Bases at the Picomole Level Using Pellicular Cation Exchange Resin in Narrow Bore Columns, Anal. Chem. 41 (1969) 1227–1234. https://doi.org/10.1021/ac60279a024.

[50] J.J. Kirkland, F.A. Truszkowski, C.H. Dilks, G.S. Engel, Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules, J. Chromatogr. A. 890 (2000) 3–13. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00392-7.

[51] G. Kroyer, K. Futschik, A. Gschwandtner, EUR-Lex - 32002D0657 - HU, Hivatalos L. L 221 , 17/08/2002 o. 0008 - 0036; CS.ES Fej. 3 Kötet 36 o. 493 - 521; ET.ES Fej. 3 Kötet 36 o. 493 - 521; HU.ES Fej. 3 Kötet 36 o. 493 - 521; LT.ES Fej. 3 Kötet 36 o. 493 - 521; LV.ES Fej. 3 Kötet 36 o. 493 - 521; MT.ES…. (1995).

[52] Y. Fillâtre, D. Rondeau, A. Jadas-Hécart, P.Y. Communal, Advantages of the scheduled selected reaction monitoring algorithm in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry multi-residue analysis of 242 pesticides: A comparative approach with classical selected reaction monitoring mode, Rapid Commun. Mass Spectrom. 24 (2010) 2453–2461. https://doi.org/10.1002/rcm.4649.

[53] P. Joseph-Nathan, Liquid-liquid extraction, J. Chem. Educ. 44 (1967) 176. https://doi.org/10.1021/ed044p176.

[54] M.E.I. Badawy, M.A.M. El-Nouby, P.K. Kimani, L.W. Lim, E.I. Rabea, A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis, Anal. Sci. 38 (2022) 1457–1487. https://doi.org/10.1007/s44211-022-00190-8.

[55] J. Adachi, C. Kumar, Y. Zhang, J. V. Olsen, M. Mann, The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins, Genome Biol. 7 (2006). https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-9-r80.

[56] J.K. Nicholson, J.C. Lindon, Systems biology: Metabonomics, Nature. 455 (2008) 1054–1056. https://doi.org/10.1038/4551054a.

[57] W. Schänzer, M. Thevis, Human sports drug testing by mass spectrometry, Mass Spectrom. Rev. 36 (2017) 16–46. https://doi.org/10.1002/mas.21479.

[58] N. Psychogios, D.D. Hau, J. Peng, A.C. Guo, R. Mandal, S. Bouatra, I. Sinelnikov, R. Krishnamurthy, R. Eisner, B. Gautam, N. Young, J. Xia, C. Knox, E. Dong, P. Huang, Z. Hollander, T.L. Pedersen, S.R. Smith, F. Bamforth, R. Greiner, B. McManus, J.W. Newman, T. Goodfriend, D.S. Wishart, The human serum metabolome, PLoS One. 6 (2011) e16957. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016957.

[59] E.A. Shirtcliff, D.A. Granger, E. Schwartz, M.J. Curran, Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: Cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results, Psychoneuroendocrinology. 26 (2001) 165–173. https://doi.org/10.1016/S0306-4530(00)00042-1.

[60] M. Gröschl, Current status of salivary hormone analysis, Clin. Chem. 54 (2008) 1759–1769. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108910.

[61] Y. Shibata, S. Arai, S. Honma, Methodological approach to the intracrine study and estimation of DHEA and DHEA-S using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 145 (2015) 193–199. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.002.

[62] M.A. Jensen, Å.M. Hansen, P. Abrahamsson, A.W. Nørgaard, Development and evaluation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of salivary melatonin, cortisol and testosterone, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 879 (2011) 2527–2532. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.005.

[63] J.G.H. Vieira, O.H. Nakamura, V.M. Carvalho, Determinação de cortisol e cortisona na saliva por método baseado em cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem, Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 58 (2014) 844–850. https://doi.org/10.1590/0004-2730000003347.

[64] W. Gao, T. Stalder, C. Kirschbaum, Quantitative analysis of estradiol and six other steroid hormones in human saliva using a high throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay, Talanta. 143 (2015) 353–358. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.004.

[65] G. Antonelli, F. Ceccato, C. Artusi, M. Marinova, M. Plebani, Salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS: Validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome, Clin. Chim. Acta. 451 (2015) 247–251. https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.10.004.

[66] Y. Shibayama, T. Higashi, K. Shimada, K. ichi Kashimada, T. Onishi, M. Ono, K. Miyai, S. Mizutani, Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for determination of salivary 17α-hydroxyprogesterone: A noninvasive tool for evaluating efficacy of hormone replacement therapy in congenital adrenal hyperplasia, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 867 (2008) 49–56. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.03.009.

[67] T. Bennike, U. Ayturk, C.M. Haslauer, J.W. Froehlich, B.L. Proffen, O. Barnaby, S. Birkelund, M.M. Murray, M.L. Warman, A. Stensballe, H. Steen, A normative study of the synovial fluid proteome from healthy porcine knee joints, J. Proteome Res. 13 (2014) 4377–4387. https://doi.org/10.1021/pr500587x.

[68] É. Csősz, E. Deák, G. Kalló, A. Csutak, J. Tőzsér, Diabetic retinopathy: Proteomic approaches to help the differential diagnosis and to understand the underlying molecular mechanisms, J. Proteomics. 150 (2017) 351–358. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.034.

[69] É. Csosz, P. Boross, A. Csutak, A. Berta, F. Tóth, S. Póliska, Z. Török, J. Tozsér, Quantitative analysis of proteins in the tear fluid of patients with diabetic retinopathy, J. Proteomics. 75 (2012) 2196–2204. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.019.

[70] E. Lendoiro, Ó. Quintela, A. de Castro, A. Cruz, M. López-Rivadulla, M. Concheiro, Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS, Forensic Sci. Int. 217 (2012) 207–215. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.11.006.

[71] M. Barroso, E. Gallardo, D.N. Vieira, M. López-Rivadulla, J.A. Queiroz, Hair: A complementary source of bioanalytical information in forensic toxicology, Bioanalysis. 3 (2011) 67–79. https://doi.org/10.4155/bio.10.171.

[72] G.A.A. Cooper, R. Kronstrand, P. Kintz, Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair, Forensic Sci. Int. 218 (2012) 20–24. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.024.

[73] D.K. Spracklin, D. Chen, A.J. Bergman, E. Callegari, R.S. Obach, Mini-Review: Comprehensive Drug Disposition Knowledge Generated in the Modern Human Radiolabeled ADME Study, CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol. 9 (2020) 428–434. https://doi.org/10.1002/psp4.12540.

[74] P. Coppola, A. Andersson, S. Cole, The Importance of the Human Mass Balance Study in Regulatory Submissions, CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol. 8 (2019) 792–804. https://doi.org/10.1002/psp4.12466.

[75] H. Wu, A.D. Southam, A. Hines, M.R. Viant, High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics, Anal. Biochem. 372 (2008) 204–212. https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.002.

[76] K. Dettmer, P.A. Aronov, B.D. Hammock, Mass spectrometry-based metabolomics, Mass Spectrom. Rev. 26 (2007) 51–78. https://doi.org/10.1002/mas.20108.

[77] R.J. Simpson, S.S. Jensen, J.W.E. Lim, Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives, Proteomics. 8 (2008) 4083–4099. https://doi.org/10.1002/pmic.200800109.

[78] M. Yáñez-Mó, P.R.M. Siljander, Z. Andreu, A.B. Zavec, F.E. Borràs, E.I. Buzas et. al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, J. Extracell. Vesicles. 4 (2015) 1–60. https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066.

[79] W.A. Salameh, M.M. Redor-Goldman, N.J. Clarke, R. Mathur, R. Azziz, R.E. Reitz, Specificity and predictive value of circulating testosterone assessed by tandem mass spectrometry for the diagnosis of polycystic ovary syndrome by the National Institutes of Health 1990 criteria, Fertil. Steril. 101 (2014). https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.056.

[80] J.W. Funder, R.M. Carey, C. Fardella, C.E. Gomez-Sanchez, F. Mantero, M. Stowasser, W.F. Young, V.M. Montori, H. Edwards, Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: An endocrine society clinical practice guideline, J. Clin. Endocrinol. Metab. 93 (2008) 3266–3281. https://doi.org/10.1210/jc.2008-0104.

[81] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, J. AOAC Int. 86 (2003) 412–431. https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412.

[82] Z. Márta, B. Bobály, J. Fekete, B. Magda, T. Imre, K.V. Mészáros, M. Bálint, P.T. Szabó, Simultaneous determination of thirteen different steroid hormones using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system, J. Pharm. Biomed. Anal. 150 (2018) 258–267. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.12.014.

[83] V. Cirimele, P. Kintz, V. Dumestre, J.P. Goullé, B. Ludes, Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry, in: Forensic Sci. Int., Elsevier Ireland Ltd, 2000: pp. 381–388. https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00180-2.

[84] Z. Chen, J. Li, J. Zhang, X. Xing, W. Gao, Z. Lu, H. Deng, Simultaneous determination of hair cortisol, cortisone and DHEAS with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in negative mode, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 929 (2013) 187–194. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.04.026.

[85] M. Rauh, M. Gröschl, W. Rascher, H.G. Dörr, Automated, fast and sensitive quantification of 17α-hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction, Steroids. 71 (2006) 450–458. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.01.015.

[86] N. Quinete, J. Bertram, M. Reska, J. Lang, T. Kraus, Highly selective and automated online SPE LC-MS3 method for determination of cortisol and cortisone in human hair as biomarker for stress related diseases, Talanta. 134 (2015) 310–316. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.034.

[87] W. Gao, T. Stalder, P. Foley, M. Rauh, H. Deng, C. Kirschbaum, Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 928 (2013) 1–8. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.008.

[88] D. Vukmanic, M. Chiba, Effect of organic solvents in sample solutions and injection volumes on chromatographic peak profiles of analytes in reversed-phase high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 483 (1989) 189–196. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93121-8.

[89] J. Layne, T. Farcas, I. Rustamov, F. Ahmed, Volume-load capacity in fast-gradient liquid chromatography: Effect of sample solvent composition and injection volume on chromatographic performance, in: J. Chromatogr. A, Elsevier, 2001: pp. 233–242. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01199-7.

[90] J.W. Dolan, How much can I inject? Part I: Injecting in mobile phase, LC-GC North Am. 32 (2014) 780–785. https://www.scopus.com/pages/publications/84978248577 (accessed March 16, 2026).

[91] F. Gritti, G. Guiochon, Overload behavior and apparent efficiencies in chromatography, J. Chromatogr. A. 1254 (2012) 30–42. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.07.015.

[92] M.E. León-González, N. Rosales-Conrado, L. V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, Large injection volumes in capillary liquid chromatography: Study of the effect of focusing on chromatographic performance, J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 7507–7513. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.076.

[93] M.J. Mills, J. Maltas, W.J. Lough, Assessment of injection volume limits when using on-column focusing with microbore liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 759 (1997) 1–11. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00753-4.

[94] B.L. Karger, M. Martin, G. Guiochon, Role of Column Parameters and Injection Volume on Detection Limits in Liquid Chromatography, Anal. Chem. 46 (1974) 1640–1647. https://doi.org/10.1021/ac60348a053.

[95] F. Gritti, C.A. Sanchez, T. Farkas, G. Guiochon, Achieving the full performance of highly efficient columns by optimizing conventional benchmark high-performance liquid chromatography instruments, J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 3000–3012. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.044.

[96] T. Higashi, S. Ogawa, Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI–MS/MS quantification of steroids in biological samples: a review, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 162 (2016) 57–69. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.10.003.

[97] C. Mesaros, Q. Wang, I.A. Blair, What are the main considerations for bioanalysis of estrogens and androgens in plasma and serum samples from postmenopausal women?, Bioanalysis. 6 (2014) 3073–3075. https://doi.org/10.4155/bio.14.277.

[98] I.A. Blair, Analysis of estrogens in serum and plasma from postmenopausal women: Past present, and future, Steroids. 75 (2010) 297–306. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.01.012.

[99] Q. Wang, K. Rangiah, C. Mesaros, N.W. Snyder, A. Vachani, H. Song, I.A. Blair, Ultrasensitive quantification of serum estrogens in postmenopausal women and older men by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Steroids. 96 (2015) 140–152. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.01.014.

[100] G. Singh, A. Gutierrez, K. Xu, I.A. Blair, Liquid chromatography/electron capture atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry: Analysis of pentafluorobenzyl derivatives of biomolecules and drugs in the attomole range, Anal. Chem. 72 (2000) 3007–3013. https://doi.org/10.1021/ac000374a.

[101] L. Xu, D.C. Spink, Analysis of steroidal estrogens as pyridine-3-sulfonyl derivatives by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry, Anal. Biochem. 375 (2008) 105–114. https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.11.028.

[102] X. Xu, T.D. Veenstra, S.D. Fox, J.M. Roman, H.J. Issaq, R. Falk, J.E. Saavedra, L.K. Keefer, R.G. Ziegler, Measuring fifteen endogenous estrogens simultaneously in human urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, Anal. Chem. 77 (2005) 6646–6654. https://doi.org/10.1021/ac050697c.

[103] S.S.C. Tai, M.J. Welch, Development and evaluation of a reference measurement procedure for the determination of estradiol-17β in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Anal. Chem. 77 (2005) 6359–6363. https://doi.org/10.1021/ac050837i.

[104] R.E. Nelson, S.K. Grebe, D.J. O'Kane, R.J. Singh, Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry Assay for Simultaneous Measurement of Estradiol and Estrone in Human Plasma, Clin. Chem. 50 (2004) 373–384. https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.025478.

[105] K. Yamashita, M. Okuyama, Y. Watanabe, S. Honma, S. Kobayashi, M. Numazawa, Highly sensitive determination of estrone and estradiol in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, Steroids. 72 (2007) 819–827. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.07.003.

[106] W.C. Yang, F.E. Regnier, D. Sliva, J. Adamec, Stable isotope-coded quaternization for comparative quantification of estrogen metabolites by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 870 (2008) 233–240. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.06.026.

[107] P. Keski-Rahkonen, R. Desai, M. Jimenez, D.T. Harwood, D.J. Handelsman, Measurement of Estradiol in Human Serum by LC-MS/MS Using a Novel Estrogen-Specific Derivatization Reagent, Anal. Chem. 87 (2015) 7180–7186. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01042.

[108] S. Arai, Y. Miyashiro, Y. Shibata, B. Kashiwagi, Y. Tomaru, M. Kobayashi, Y. Watanabe, S. Honma, K. Suzuki, New quantification method for estradiol in the prostatic tissues of benign prostatic hyperplasia using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Steroids. 75 (2010) 13–19. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.09.004.

[109] T. Nishio, T. Higashi, A. Funaishi, J. Tanaka, K. Shimada, Development and application of electrospray-active derivatization reagents for hydroxysteroids, J. Pharm. Biomed. Anal. 44 (2007) 786–795. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.007.

[110] M. Olkowicz, I. Rybakowska, S. Chlopicki, R.T. Smolenski, Development and analytical comparison of microflow and nanoflow liquid chromatography/mass spectrometry procedures for quantification of cardiac troponin T in mouse hearts, Talanta. 131 (2015) 510–520. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.029.

[111] W. Rosner, R.J. Auchus, R. Azziz, P.M. Sluss, H. Raff, Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: An endocrine society position statement, J. Clin. Endocrinol. Metab. 92 (2007) 405–413. https://doi.org/10.1210/jc.2006-1864.

[112] A. Cappiello, G. Famiglini, A. Berloni, Large volume injection of acidic pesticides by reversed-phase micro high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 768 (1997) 215–222. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)01094-1.

[113] C.C. Christianson, C.J.L. Johnson, S.R. Needham, The advantages of microflow LC-MS/MS compared with conventional HPLC-MS/MS for the analysis of methotrexate from human plasma, Bioanalysis. 5 (2013) 1387–1396. https://doi.org/10.4155/bio.13.73.

[114] S. Cortés-Bautista, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Miniaturized liquid chromatography in environmental analysis. A review, J. Chromatogr. A. 1730 (2024) 465101. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465101.

[115] G. Hopfgartner, E. Bourgogne, Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry, Mass Spectrom. Rev. 22 (2003) 195–214. https://doi.org/10.1002/mas.10050.

[116] R.J. Rotello, T.D. Veenstra, Mass Spectrometry Techniques: Principles and Practices for Quantitative Proteomics, Curr. Protein Pept. Sci. 22 (2020) 121–133. https://doi.org/10.2174/1389203721666200921153513.

[117] H. Wang, P. Bennett, Performance assessment of microflow LC combined with high-resolution MS in bioanalysis, Bioanalysis. 5 (2013) 1249–1267. https://doi.org/10.4155/bio.13.93.

[118] C.C. Christianson, C.J.L. Johnson, S.R. Needham, The advantages of microflow LC-MS/MS compared with conventional HPLC-MS/MS for the analysis of methotrexate from human plasma, Bioanalysis. 5 (2013) 1387–1396. https://doi.org/10.4155/bio.13.73.

[119] A.E. Steuer, M. Poetzsch, M. Koenig, E. Tingelhoff, S.N. Staeheli, A.T. Roemmelt, T. Kraemer, Comparison of conventional liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus microflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry within the framework of full method validation for simultaneous quantification of 40 antidepressants and neuroleptics, J. Chromatogr. A. 1381 (2015) 87–100. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.084.

[120] ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA), (n.d.). https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline (accessed February 10, 2026).

[121] ICH M10 on bioanalytical method validation - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA), (n.d.). https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline (accessed December 10, 2025).

[122] M10 Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis | FDA, (n.d.). https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/m10-bioanalytical-method-validation-and-study-sample-analysis (accessed December 10, 2025).

[123] M.J. Farrukh, M.H. Tariq, O. Malik, T.M. Khan, Valsartan recall: global regulatory overview and future challenges, Ther. Adv. Drug Saf. 10 (2019) 2042098618823458. https://doi.org/10.1177/2042098618823458.

[124] R.C. Cioc, C. Joyce, M. Mayr, R.N. Bream, Formation of N-Nitrosamine Drug Substance Related Impurities in Medicines: A Regulatory Perspective on Risk Factors and Mitigation Strategies, Org. Process Res. Dev. 27 (2023) 1736–1750. https://doi.org/10.1021/acs.oprd.3c00153.

[125] K.L. Dobo, N. Greene, M.O. Cyr, S. Caron, W.W. Ku, The application of structure-based assessment to support safety and chemistry diligence to manage genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients during drug development, Regul. Toxicol. Pharmacol. 44 (2006) 282–293. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.01.004.

[126] A.L. Demain, P. Vaishnav, Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, Biotechnol. Adv. 27 (2009) 297–306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008.

[127] G. Walsh, Biopharmaceutical benchmarks 2018, Nat. Biotechnol. 36 (2018) 1136–1145. https://doi.org/10.1038/nbt.4305.

[128] K.P. Jayapal, K.F. Wlaschin, W.S. Hu, M.G.S. Yap, Recombinant protein therapeutics from CHO Cells - 20 years and counting, Chem. Eng. Prog. 103 (2007) 40–47.

[129] F.M. Wurm, Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, Nat. Biotechnol. 22 (2004) 1393–1398. https://doi.org/10.1038/nbt1026.

[130] J.Y. Kim, Y.G. Kim, G.M. Lee, CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential, Appl. Microbiol. Biotechnol. 93 (2012) 917–930. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5.

[131] N. Templeton, J. Dean, P. Reddy, J.D. Young, Peak antibody production is associated with increased oxidative metabolism in an industrially relevant fed-batch CHO cell culture, Biotechnol. Bioeng. 110 (2013) 2013–2024. https://doi.org/10.1002/bit.24858.

[132] H. Kaspar, K. Dettmer, W. Gronwald, P.J. Oefner, Advances in amino acid analysis, Anal. Bioanal. Chem. 393 (2009) 445–452. https://doi.org/10.1007/s00216-008-2421-1.

[133] J. Qiu, P.K. Chan, P. V. Bondarenko, Monitoring utilizations of amino acids and vitamins in culture media and Chinese hamster ovary cells by liquid chromatography tandem mass spectrometry, J. Pharm. Biomed. Anal. 117 (2016) 163–172. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.08.036.

[134] G. Gałęzowska, J. Ratajczyk, L. Wolska, Determination of amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography: critical review, Amino Acids. 53 (2021) 993–1009. https://doi.org/10.1007/s00726-021-03002-x.

[135] R. Zhao, B. Huang, G. Lu, S. Fu, J. Ying, Y. Zhao, A Practical Method for Amino Acid Analysis by LC-MS Using Precolumn Derivatization with Urea, Int. J. Mol. Sci. 24 (2023) 7332. https://doi.org/10.3390/ijms24087332.

[136] D.S. Wishart, M. Rout, B.L. Lee, M. Berjanskii, M. LeVatte, M. Lipfert, Practical Aspects of NMR-Based Metabolomics, in: Handb. Exp. Pharmacol., Handb Exp Pharmacol, 2023: pp. 1–41. https://doi.org/10.1007/164_2022_613.

[137] A.H.M. Emwas, The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research, Methods Mol. Biol. 1277 (2015) 161–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13.

[138] I.A. Darwish, Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances, Int. J. Biomed. Sci. 2 (2006) 217–235. https://doi.org/10.59566/ijbs.2006.2217.

[139] K. Sztefko, Interferences in immunoassay, Przegląd Lek. 59 (2002) 477–480. https://doi.org/10.1016/b978-012214730-2/50008-x.

[140] Q. Zhang, D. Mu, Y. Ma, Y. Li, Y. Gao, Y. Hu, K. Zhang, F. Zhao, R. Gao, L. Xia, H. Zhu, S. Yu, L. Qiu, X. Cheng, Comparative evaluation of four new immunoassays and LC-MS/MS for the measurement of urinary free cortisol in Cushing's syndrome diagnosis, Pract. Lab. Med. 46 (2025) e00484. https://doi.org/10.1016/j.plabm.2025.e00484.

[141] M. Sundström, A. Pelander, I. Ojanperä, Comparison between drug screening by immunoassay and ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry in post-mortem urine, Drug Test. Anal. 7 (2015) 420–427. https://doi.org/10.1002/dta.1683.

[142] S.K. Baid, N. Sinaii, M. Wade, D. Rubino, L.K. Nieman, Radioimmunoassay and tandem mass spectrometry measurement of bedtime salivary cortisol levels: A comparison of assays to establish hypercortisolism, J. Clin. Endocrinol. Metab. 92 (2007) 3102–3107. https://doi.org/10.1210/jc.2006-2861.

[143] A.H. Payne, D.B. Hales, Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones, Endocr. Rev. 25 (2004) 947–970. https://doi.org/10.1210/er.2003-0030.

[144] S. Nussey, S. Whitehead, Endocrinology, (2001). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22/ (accessed March 17, 2026).

[145] A. Hammes, T.K. Andreassen, R. Spoelgen, J. Raila, N. Hubner, H. Schulz, J. Metzger, F.J. Schweigert, P.B. Luppa, A. Nykjaer, T.E. Willnow, Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids, Cell. 122 (2005) 751–762. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.032.

[146] C. Shackleton, Clinical steroid mass spectrometry: A 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 121 (2010) 481–490. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.02.017.

[147] M.M. Kushnir, A.L. Rockwood, W.L. Roberts, B. Yue, J. Bergquist, A.W. Meikle, Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories, Clin. Biochem. 44 (2011) 77–88. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.07.008.

[148] L.K. Nieman, B.M.K. Biller, J.W. Findling, J. Newell-Price, M.O. Savage, P.M. Stewart, V.M. Montori, H. Edwards, Salivary cortisol and cortisone by LC–MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing's syndrome, Clin. Chim. Acta. 451 (2015) 247–251. https://doi.org/10.1210/jc.2008-0125.

[149] F.Z. Stanczyk, J. Jurow, A.W. Hsing, Limitations of direct immunoassays for measuring circulating estradiol levels in postmenopausal women and men in epidemiologic studies, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 19 (2010) 903–906. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0081.

[150] A.N. Hoofnagle, M.H. Wener, The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry, J. Immunol. Methods. 347 (2009) 3–11. https://doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.003.

[151] A. Gaudl, J. Kratzsch, Y.J. Bae, W. Kiess, J. Thiery, U. Ceglarek, Liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry for quantitative steroid hormone analysis in plasma, urine, saliva and hair, J. Chromatogr. A. 1464 (2016) 64–71. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.087.

[152] W. Gao, C. Kirschbaum, J. Grass, T. Stalder, LC–MS based analysis of endogenous steroid hormones in human hair, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 162 (2016) 92–99. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.022.

[153] J.G. Lewis, Steroid analysis in saliva: an overview., Clin. Biochem. Rev. 27 (2006) 139–46. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1579286/ (accessed March 17, 2026).

[154] E. Dmitrieva, A. Temerdashev, A. Azaryan, E. Gashimova, Quantification of steroid hormones in human urine by DLLME and UHPLC-HRMS detection, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1159 (2020). https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122390.

[155] F. Wang, E. Eikeland, R.J. Reidunsdatter, L. Hagen, M.J. Engstrøm, J. Geisler, M. Haanpää, E. Hämäläinen, G.F. Giskeødegård, T.F. Bathen, Quantification of multiple steroid hormones in serum and human breast cancer tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis, Front. Oncol. 14 (2024). https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1383104.

[156] B.G. Keevil, LC–MS/MS analysis of steroids in the clinical laboratory, Clin. Biochem. 49 (2016) 989–997. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.04.009.

[157] T. Tuzimski, A. Petruczynik, Review of Chromatographic Methods Coupled with Modern Detection Techniques Applied in the Therapeutic Drugs Monitoring (TDM), Molecules. 25 (2020) 4026. https://doi.org/10.3390/molecules25174026.

[158] C. Dupont, D.R. Armant, C.A. Brenner, Epigenetics: Definition, mechanisms and clinical perspective, Semin. Reprod. Med. 27 (2009) 351–357. https://doi.org/10.1055/s-0029-1237423.

[159] P.A. Jones, S.B. Baylin, The fundamental role of epigenetic events in cancer, Nat. Rev. Genet. 3 (2002) 415–428. https://doi.org/10.1038/nrg816.

[160] H. Shi, M.X. Wang, C.W. Caldwell, CpG islands: Their potential as biomarkers for cancer, Expert Rev. Mol. Diagn. 7 (2007) 519–531. https://doi.org/10.1586/14737159.7.5.519.

[161] M.S. Rocha, R. Castro, I. Rivera, R.M. Kok, Y.M. Smulders, C. Jakobs, I.T. De Almeida, H.J. Blom, Global DNA methylation: Comparison of enzymatic- and non-enzymatic-based methods, Clin. Chem. Lab. Med. 48 (2010) 1793–1798. https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.346.

[162] A.S. Wilson, B.E. Power, P.L. Molloy, DNA hypomethylation and human diseases, Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer. 1775 (2007) 138–162. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.08.007.

[163] R.M. Kok, D.E.C. Smith, R. Barto, A.M.W. Spijkerman, T. Teerlink, H.J. Gellekink, C. Jakobs, Y.M. Smulders, Global DNA methylation measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Analytical technique, reference values and determinants in healthy subjects, Clin. Chem. Lab. Med. 45 (2007) 903–911. https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.137.

[164] M. Santiago, C. Antunes, M. Guedes, N. Sousa, C.J. Marques, TET enzymes and DNA hydroxymethylation in neural development and function - How critical are they?, Genomics. 104 (2014) 334–340. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.018.

[165] A. Lejart, G. Salbert, S. Huet, Cytosine hydroxymethylation by TET enzymes: From the control of gene expression to the regulation of DNA repair mechanisms, and back, AIMS Biophys. 5 (2018) 182–193. https://doi.org/10.3934/biophy.2018.3.182.

[166] L. de A. Costa, I.C.B. da Silva, B.A.L.A. Mariz, M.B. da Silva, G.M. Freitas-Ribeiro, N.F.P. de Oliveira, Influence of smoking on methylation and hydroxymethylation levels in global DNA and specific sites of KRT14, KRT19, MIR-9-3 and MIR-137 genes of oral mucosa, Arch. Oral Biol. 72 (2016) 56–65. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.013.

[167] B. Vető, P. Szabó, C. Bacquet, A. Apró, E. Hathy, J. Kiss, J.M. Réthelyi, F. Szeri, D. Szüts, T. Arányi, Inhibition of DNA methyltransferase leads to increased genomic 5-hydroxymethylcytosine levels in hematopoietic cells, FEBS Open Bio. 8 (2018). https://doi.org/10.1002/2211-5463.12392.

[168] T. Jiang, L. Zong, L. Zhou, Y. Hou, L. Zhang, X. Zheng, H. Han, S. Li, W. Zhang, J. Zhang, C. Deng, Y. Jia, C. Zhao, Variation in global DNA hydroxymethylation with age associated with schizophrenia, Psychiatry Res. 257 (2017) 497–500. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.08.022.

[169] C.W. Hu, J.L. Chen, Y.W. Hsu, C.C. Yen, M.R. Chao, Trace analysis of methylated and hydroxymethylated cytosines in DNA by isotope-dilution LC-MS/MS: First evidence of DNA methylation in Caenorhabditis elegans, Biochem. J. 465 (2015) 39–47. https://doi.org/10.1042/BJ20140844.

[170] P.W. Laird, Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis, Nat. Rev. Genet. 11 (2010) 191–203. https://doi.org/10.1038/nrg2732.

[171] A.H. Laszlo, I.M. Derrington, H. Brinkerhoff, K.W. Langford, I.C. Nova, J.M. Samson, J.J. Bartlett, M. Pavlenok, J.H. Gundlach, Detection and mapping of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine with nanopore MspA, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110 (2013) 18904–18909. https://doi.org/10.1073/pnas.1310240110.

[172] H. Heyn, M. Esteller, DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges., Nat. Rev. Genet. 13 (2012) 679–692. https://doi.org/10.1038/nrg3270.

[173] K. Németh, K. Mészáros, B. Szabó, H. Butz, T. Arányi, P.T. Szabó, A relative quantitation method for measuring DNA methylation and hydroxymethylation using guanine as an internal standard, Anal. Methods. 13 (2021). https://doi.org/10.1039/d1ay00897h.

[174] A. Carel, La technique opératoire des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères, Lyon Med. 98 (1902) 859–864.

[175] R. SCHWARTZ, A. EISNER, W. DAMESHEK, The effect of 6-mercaptopurine on primary and secondary immune responses, J. Clin. Invest. 38 (1959) 1394–1403. https://doi.org/10.1172/JCI103915.

[176] G. Offermann, Immunosuppression for long-term maintenance of renal allograft function, Drugs. 64 (2004) 1325–1338. https://doi.org/10.2165/00003495-200464120-00005/FIGURES/2.

[177] K.A. Jørgensen, P.B. Koefoed-Nielsen, N. Karamperis, Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus, Scand. J. Immunol. 57 (2003) 93–98. https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01221.x.

[178] L.M. Shaw, D.W. Holt, P. Keown, R. Venkataramanan, R.W. Yatscoff, Current opinions on therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs, Clin. Ther. 21 (1999) 1632–1652. https://doi.org/10.1016/S0149-2918(99)80044-7.

[179] D. Andrews, R. Cramb, Immunoassay techniques in clinical chemistry, Ann. Clin. Biochem. 39 (2002) 424–435.

[180] R.G. Morris, Immunosuppressant drug monitoring: Is the laboratory meeting clinical expectations?, Ann. Pharmacother. 39 (2005) 119–127. https://doi.org/10.1345/aph.1E287.

[181] B. Hille, Hille_Ion Channels of Excitable Membranes_Chapter1.pdf, (2001) 5–22.

[182] S.K. Nigam, What do drug transporters really do?, Nat. Rev. Drug Discov. 14 (2014) 29–44. https://doi.org/10.1038/nrd4461.

[183] K.M. Giacomini, S.M. Huang, Transporters in drug development and clinical pharmacology, Clin. Pharmacol. Ther. 94 (2013) 3–9. https://doi.org/10.1038/clpt.2013.86.

[184] M.A. Hediger, B. Clémençon, R.E. Burrier, E.A. Bruford, The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): Introduction, Mol. Aspects Med. 34 (2013) 95–107. https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.009.

[185] A. Váradi, G. Szakács, É. Bakos, B. Sarkadi, P glycoprotein and the mechanism of multidrug resistance, Novartis Found. Symp. 243 (2002) 54–68. https://doi.org/10.1002/0470846356.ch5.

[186] G. Szakács, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, C. Booth-Genthe, M.M. Gottesman, Targeting multidrug resistance in cancer, Nat. Rev. Drug Discov. 5 (2006) 219–234. https://doi.org/10.1038/nrd1984.

[187] M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates, Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters, Nat. Rev. Cancer. 2 (2002) 48–58. https://doi.org/10.1038/nrc706.

[188] S. V. Ambudkar, C. Kimchi-Sarfaty, Z.E. Sauna, M.M. Gottesman, P-glycoprotein: from genomics to mechanism, Oncogene. 22 (2003) 7468–7485. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206948.

[189] Z. Gao, K. Huang, X. Yang, H. Xu, Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of Scutellaria baicalensis Georgi, Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1472 (1999) 643–650. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00152-X.

[190] M. Li-Weber, New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin, Cancer Treat. Rev. 35 (2009) 57–68. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.09.005.

[191] S. Bin Yoon, Y.J. Lee, S.K. Park, H.C. Kim, H. Bae, H.M. Kim, S.G. Ko, H.Y. Choi, M.S. Oh, W. Park, Anti-inflammatory effects of Scutellaria baicalensis water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages, J. Ethnopharmacol. 125 (2009) 286–290. https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.06.027.

[192] M. Guo, N. Zhang, D. Li, D. Liang, Z. Liu, F. Li, Y. Fu, Y. Cao, X. Deng, Z. Yang, Baicalin plays an anti-inflammatory role through reducing nuclear factor-κB and p38 phosphorylation in S. aureus-induced mastitis, Int. Immunopharmacol. 16 (2013) 125–130. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.03.006.

[193] J.A. Wu, A.S. Attele, L. Zhang, C.S. Yuan, Anti-HIV activity of medicinal herbs: Usage and potential development, Am. J. Chin. Med. 29 (2001) 69–81. https://doi.org/10.1142/S0192415X01000083.

[194] J. Yáñez, V. Vicente, M. Alcaraz, J. Castillo, O. Benavente-García, M. Canteras, J.A. Lozano Teruel, Cytotoxicity and antiproliferative activities of several phenolic compounds against three melanocytes cell lines: Relationship between structure and activity, Nutr. Cancer. 49 (2004) 191–199. https://doi.org/10.1207/s15327914nc4902_11.

[195] L. Tong, M. Wan, L. Zhang, Y. Zhu, H. Sun, K. Bi, Simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, oroxylin A and chrysin of Radix scutellariae extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry, J. Pharm. Biomed. Anal. 70 (2012) 6–12. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.051.

[196] S.Y.K. Fong, Y.C. Wong, Z. Zuo, Development of a SPE-LC/MS/MS method for simultaneous quantification of baicalein, wogonin, oroxylin A and their glucuronides baicalin, wogonoside and oroxyloside in rats and its application to brain uptake and plasma pharmacokinetic studies, J. Pharm. Biomed. Anal. 97 (2014) 9–23. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.03.033.

[197] Z. Zhu, L. Zhao, X. Liu, J. Chen, H. Zhang, G. Zhang, Y. Chai, Comparative pharmacokinetics of baicalin and wogonoside by liquid chromatography-mass spectrometry after oral administration of Xiaochaihu Tang and Radix scutellariae extract to rats, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 878 (2010) 2184–2190. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.06.021.

[198] M.-Y. Lai, S.-L. Hsiu, S.-Y. Tsai, Y.-C. Hou, P.-D.L. Chao, Comparison of metabolic pharmacokinetics of baicalin and baicalein in rats, J. Pharm. Pharmacol. 55 (2003) 205–209. https://doi.org/10.1211/002235702522.

[199] L. Zhang, G. Lin, B. Kovács, M. Jani, P. Krajcsi, Z. Zuo, Mechanistic study on the intestinal absorption and disposition of baicalein, Eur. J. Pharm. Sci. 31 (2007) 221–231. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.04.001.

[200] K. Herédi-Szabó, E. Kis, P. Krajcsi, The vesicular transport assay: Validated in vitro methods to study drug-mediated inhibition of canalicular efflux transporters ABCB11/BSEP and ABCC2/MRP2, Curr. Protoc. Toxicol. 1 (2012). https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2304s54.

[201] I. Sziráki, F. Erdo, E. Beéry, P.M. Molnár, C. Fazakas, I. Wilhelm, I. Makai, E. Kis, K. Herédi-Szabó, T. Abonyi, I. Krizbai, G.K. Tóth, P. Krajcsi, Quinidine as an abcb1 probe for testing drug interactions at the blood-brain barrier: An in vitro in vivo correlation study, J. Biomol. Screen. 16 (2011) 886–894. https://doi.org/10.1177/1087057111414896.

[202] P. Krajcsi, M. Jani, B. Tóth, F. Erdo, E. Kis, E. Beéry, I. Sziráki, Efflux transporters in the bloodbrain interfaces in vitro and in vivo methods and correlations, Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 8 (2012) 419–431. https://doi.org/10.1517/17425255.2012.668184.

[203] N.H. Hendrikse, A.H. Schinkel, E.G.E. De Vries, E. Fluks, W.T.A. Van Der Graaf, A.T.M. Willemsen, W. Vaalburg, E.J.F. Franssen, Complete in vivo reversal of P-glycoprotein pump function in the blood-brain barrier visualized with positron emission tomography, Br. J. Pharmacol. 124 (1998) 1413–1418. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701979.

[204] U. Mayer, E. Wagenaar, B. Dorobek, J.H. Beijnen, P. Borst, A.H. Schinkel, Full blockade of intestinal P-glycoprotein and extensive inhibition of blood-brain barrier P-glycoprotein by oral treatment of mice with PSC833, J. Clin. Invest. 100 (1997) 2430–2436. https://doi.org/10.1172/JCI119784.

[205] J.H. Lin, A.Y.H. Lu, Role of Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery and Development, Pharmacol. Rev. 49 (1997) 403–449. https://doi.org/10.1016/s0031-6997(24)01340-1.

[206] U.M. Zanger, M. Schwab, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, Pharmacol. Ther. 138 (2013) 103–141. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.

[207] S.K.G. Grebe, R.J. Singh, LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here?, Clin. Biochem. Rev. 32 (2011) 5–31. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3052391/ (accessed March 19, 2026).

[208] K.S.Y. Leung, B.M.W. Fong, LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: Has its time come?, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 2289–2301. https://doi.org/10.1007/s00216-013-7542-5.

[209] E.T.H. Yeh, C.L. Bickford, Cardiovascular Complications of Cancer Therapy, J. Am. Coll. Cardiol. 53 (2009) 2231–2247. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.02.050.

[210] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologie developments in antitumor activity and cardiotoxicity, Pharmacol. Rev. 56 (2004) 185–229. https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6.

[211] M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates, Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters, Nat. Rev. Cancer. 2 (2002) 48–58. https://doi.org/10.1038/nrc706.

[212] R.W. Robey, K.M. Pluchino, M.D. Hall, A.T. Fojo, S.E. Bates, M.M. Gottesman, Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer, Nat. Rev. Cancer. 18 (2018) 452–464. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8.

[213] K.L.R. Brouwer, D. Keppler, K.A. Hoffmaster, D.A.J. Bow, Y. Cheng, Y. Lai, J.E. Palm, B. Stieger, R. Evers, In vitro methods to support transporter evaluation in drug discovery and development, Clin. Pharmacol. Ther. 94 (2013) 95–112. https://doi.org/10.1038/clpt.2013.81.

[214] H.E. Bays, D. Neff, J.E. Tomassini, A.M. Tershakovec, Ezetimibe: Cholesterol lowering and beyond, Expert Rev. Cardiovasc. Ther. 6 (2008) 447–470. https://doi.org/10.1586/14779072.6.4.447.

[215] J.C. LaRosa, Low-Density Lipoprotein Cholesterol Reduction: The End Is More Important Than the Means, Am. J. Cardiol. 100 (2007) 240–242. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.02.089.

[216] P.J. Neuvonen, M. Niemi, J.T. Backman, Drug interactions with lipid-lowering drugs: Mechanisms and clinical relevance, Clin. Pharmacol. Ther. 80 (2006) 565–581. https://doi.org/10.1016/j.clpt.2006.09.003.

[217] I. Buhaescu, H. Izzedine, Mevalonate pathway: A review of clinical and therapeutical implications, Clin. Biochem. 40 (2007) 575–584. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.03.016.

[218] J. Armitage, The safety of statins in clinical practice, Lancet. 370 (2007) 1781–1790. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60716-8.

[219] A.A. Alsheikh-Ali, P. V. Maddukuri, H. Han, R.H. Karas, Effect of the Magnitude of Lipid Lowering on Risk of Elevated Liver Enzymes, Rhabdomyolysis, and Cancer. Insights From Large Randomized Statin Trials, J. Am. Coll. Cardiol. 50 (2007) 409–418. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.02.073.

[220] N. Debeljak, M. Fink, D. Rozman, Many facets of mammalian lanosterol 14α-demethylase from the evolutionarily conserved cytochrome P450 family CYP51, Arch. Biochem. Biophys. 409 (2003) 159–171. https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00418-6.

[221] J. Limouze, A.F. Straight, T. Mitchison, J.R. Sellers, Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II, J. Muscle Res. Cell Motil. 25 (2004) 337–341. https://doi.org/10.1007/s10974-004-6060-7.

[222] A.F. Straight, A. Cheung, J. Limouze, I. Chen, N.J. Westwood, J.R. Sellers, T.J. Mitchison, Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor, Science (80-.). 299 (2003) 1743–1747. https://doi.org/10.1126/science.1081412.

[223] B.I. Roman, S. Verhasselt, C. V. Stevens, Medicinal Chemistry and Use of Myosin II Inhibitor (S)-Blebbistatin and Its Derivatives, J. Med. Chem. 61 (2018) 9410–9428. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00503.

[224] A. Rauscher, M. Gyimesi, M. Kovács, A. Málnási-Csizmadia, Targeting Myosin by Blebbistatin Derivatives: Optimization and Pharmacological Potential, Trends Biochem. Sci. 43 (2018) 700–713. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.006.

[225] M. Képiró, B.H. Várkuti, L. Végner, G. Vörös, G. Hegyi, M. Varga, A. Málnási-Csizmadia, Para-nitroblebbistatin, the non-cytotoxic and photostable myosin II inhibitor, Angew. Chemie - Int. Ed. 53 (2014) 8211–8215. https://doi.org/10.1002/anie.201403540.

[226] B.H. Várkuti, M. Képiró, I.Á. Horváth, L. Végner, S. Ráti, Á. Zsigmond, G. Hegyi, Z. Lenkei, M. Varga, A. Málnási-Csizmadia, A highly soluble, non-phototoxic, non-fluorescent blebbistatin derivative, Sci. Rep. 6 (2016). https://doi.org/10.1038/srep26141.

[227] P.T. Szabó, A SCIEX API2000 Proto#1 története – egy prototípus tömegspektrométer útja a laborból a kiállításig, (2026). https://www.ttk.hun-ren.hu/rolunk/muszermuzeum/a-sciex-api2000-proto1-tomegspektrometer.

[228] L. Mogler, M. Wilde, L.M. Huppertz, G. Weinfurtner, F. Franz, V. Auwärter, Phase I metabolism of the recently emerged synthetic cannabinoid CUMYL-PEGACLONE and detection in human urine samples, Drug Test. Anal. 10 (2018) 886–891. https://doi.org/10.1002/dta.2352.

[229] L. Mogler, S. Halter, M. Wilde, F. Franz, V. Auwärter, Human phase I metabolism of the novel synthetic cannabinoid 5F-CUMYL-PEGACLONE, Forensic Toxicol. 37 (2019) 154–163. https://doi.org/10.1007/s11419-018-0447-4.

[230] J.A. Eckstein, G.M. Ammerman, J.M. Reveles, B.L. Ackermann, Analysis of glutamine, glutamate, pyroglutamate, and GABA in cerebrospinal fluid using ion pairing HPLC with positive electrospray LC/MS/MS, J. Neurosci. Methods. 171 (2008) 190–196. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.02.019.

[231] A.F.G. Gargano, T. Leek, W. Lindner, M. Lämmerhofer, Mixed-mode chromatography with zwitterionic phosphopeptidomimetic selectors from Ugi multicomponent reaction, J. Chromatogr. A. 1317 (2013) 12–21. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.07.095.

[232] P. Jandera, J. Urban, V. Škeříková, P. Langmaier, R. Kubíčková, J. Planeta, Polymethacrylate monolithic and hybrid particle-monolithic columns for reversed-phase and hydrophilic interaction capillary liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 1217 (2010) 22–33. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.041.

[233] Y. Li, Z. Xu, Y. Feng, X. Liu, T. Chen, H. Zhang, Preparation and evaluation of poly-l-lysine stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography, Chromatographia. 74 (2011) 523–530. https://doi.org/10.1007/s10337-011-2120-5.

[234] X. Wang, W. Li, H.T. Rasmussen, Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities, J. Chromatogr. A. 1083 (2005) 58–62. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.082.

[235] N.F. Al-Tannak, S. Bawazeer, T.H. Siddiqui, D.G. Watson, The hydrophilic interaction like properties of some reversed phase high performance liquid chromatography columns in the analysis of basic compounds, J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 1486–1491. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.036.

[236] T. Liang, Q. Fu, A. Shen, H. Wang, Y. Jin, H. Xin, Y. Ke, Z. Guo, X. Liang, Preparation and chromatographic evaluation of a newly designed steviol glycoside modified-silica stationary phase in hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 1388 (2015) 110–118. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.019.

[237] K. Ohyama, Y. Inoue, N. Kishikawa, N. Kuroda, Preparation and characterization of surfactin-modified silica stationary phase for reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography, J. Chromatogr. A. 1371 (2014) 257–260. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.073.

[238] P.T. Szabó, A. Darcsi, G. Turczel, G.M. Keserű, Ultra-sensitive HPLC–ESI–MS/MS quantitation of N-nitroso-phenylephrine in phenylephrine-containing anticold products, J. Pharm. Biomed. Anal. 274 (2026) 117441. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2026.117441.

[239] plasma amino acids migraine.pdf, (n.d.). https://www.ucsfhealth.org/care/medical-tests/plasma-amino-acids (accessed March 19, 2026).

[240] J.F. Borel, C. Feurer, H.U. Gubler, H. Stähelin, Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. 1976, Agents Actions. 43 (1994) 179–186. https://doi.org/10.1007/BF01986686.

[241] K.E. Bushley, R. Raja, P. Jaiswal, J.S. Cumbie, M. Nonogaki, A.E. Boyd, C.A. Owensby, B.J. Knaus, J. Elser, D. Miller, Y. Di, K.L. McPhail, J.W. Spatafora, The Genome of Tolypocladium inflatum: Evolution, Organization, and Expression of the Cyclosporin Biosynthetic Gene Cluster, PLoS Genet. 9 (2013). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003496.

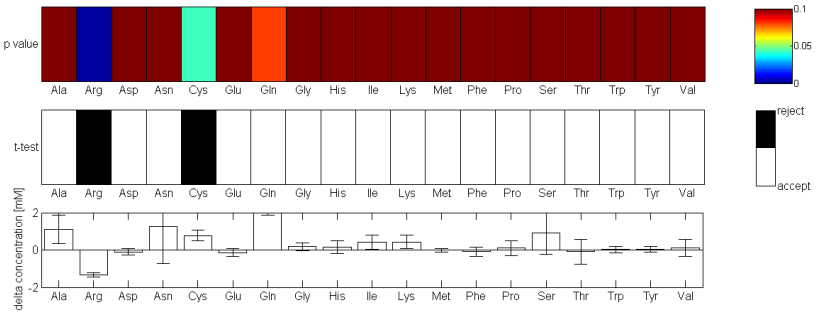
[242] E. Perucca, Pharmacological and therapeutic properties of valproate: A summary after 35 years of clinical experience, CNS Drugs. 16 (2002) 695–714. https://doi.org/10.2165/00023210-200216100-00004.

[243] M.A. Rogawski, W. Löscher, The neurobiology of antiepileptic drugs, Nat. Rev. Neurosci. 5 (2004) 553–564. https://doi.org/10.1038/nrn1430.

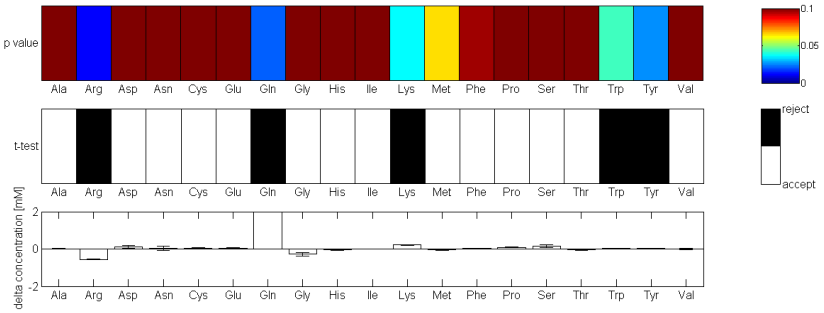
[244] K. Tóth, T. Bdi, Á. Kiss, M. Temesvári, E. Háfra, A. Nagy, Z. Szever, K. Monostory, Phenoconversion of CYP2C9 in epilepsy limits the predictive value of CYP2C9 genotype in optimizing valproate therapy, Per. Med. 12 (2015) 199–207. https://doi.org/10.2217/pme.14.82.

[245] M. Temesvári, L. Kóbori, J. Paulik, E. Saŕvaŕy, A. Belic, K. Monostory, Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression, J. Pharmacol. Exp. Ther. 341 (2012) 294–305. https://doi.org/10.1124/jpet.111.189597.

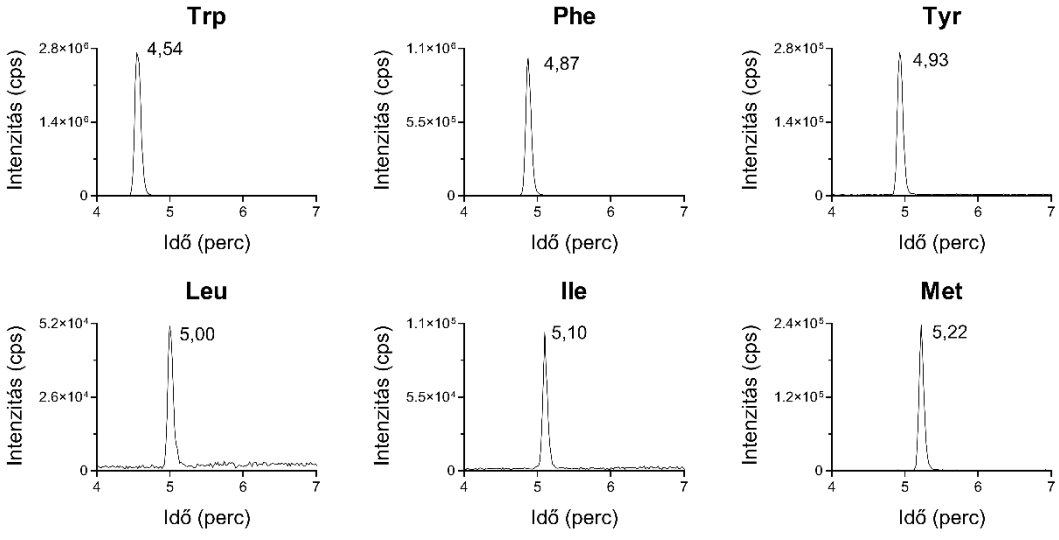
Függelék



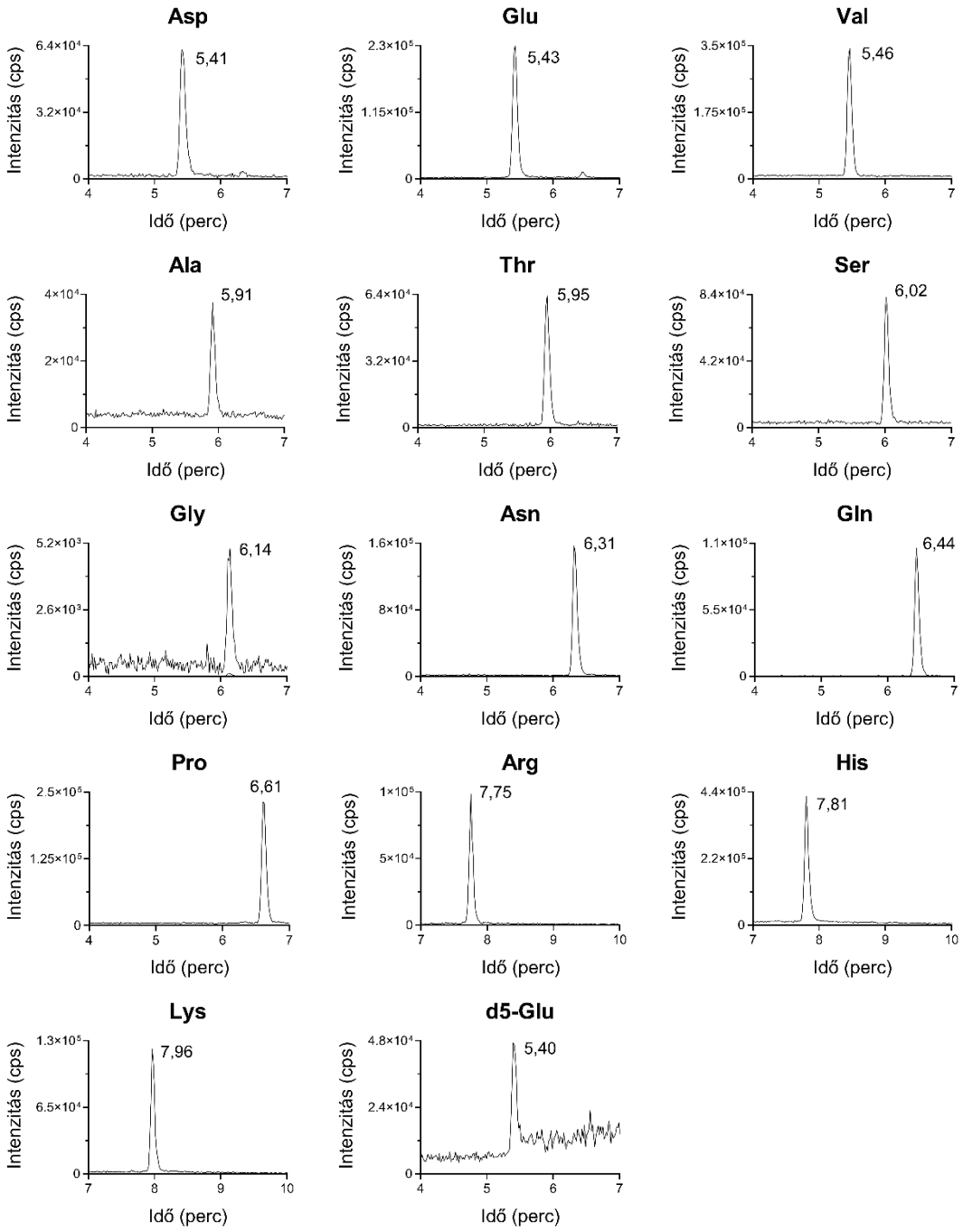
F1. ábra. Az LC-MS/MS módszerrel mért és az elméleti koncentrációk összehasonlítása ismert összetételű minta esetében, páros t-próbával



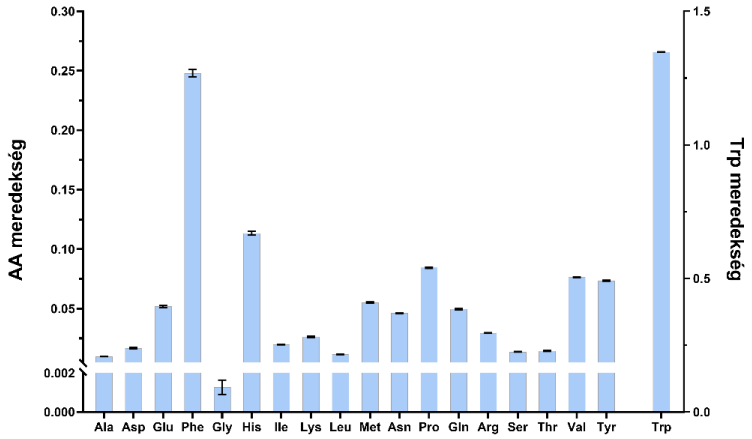
F2. ábra. Az NMR módszerrel mért és az elméleti koncentrációk összehasonlítása ismert összetételű mintán, páros t-próbával.



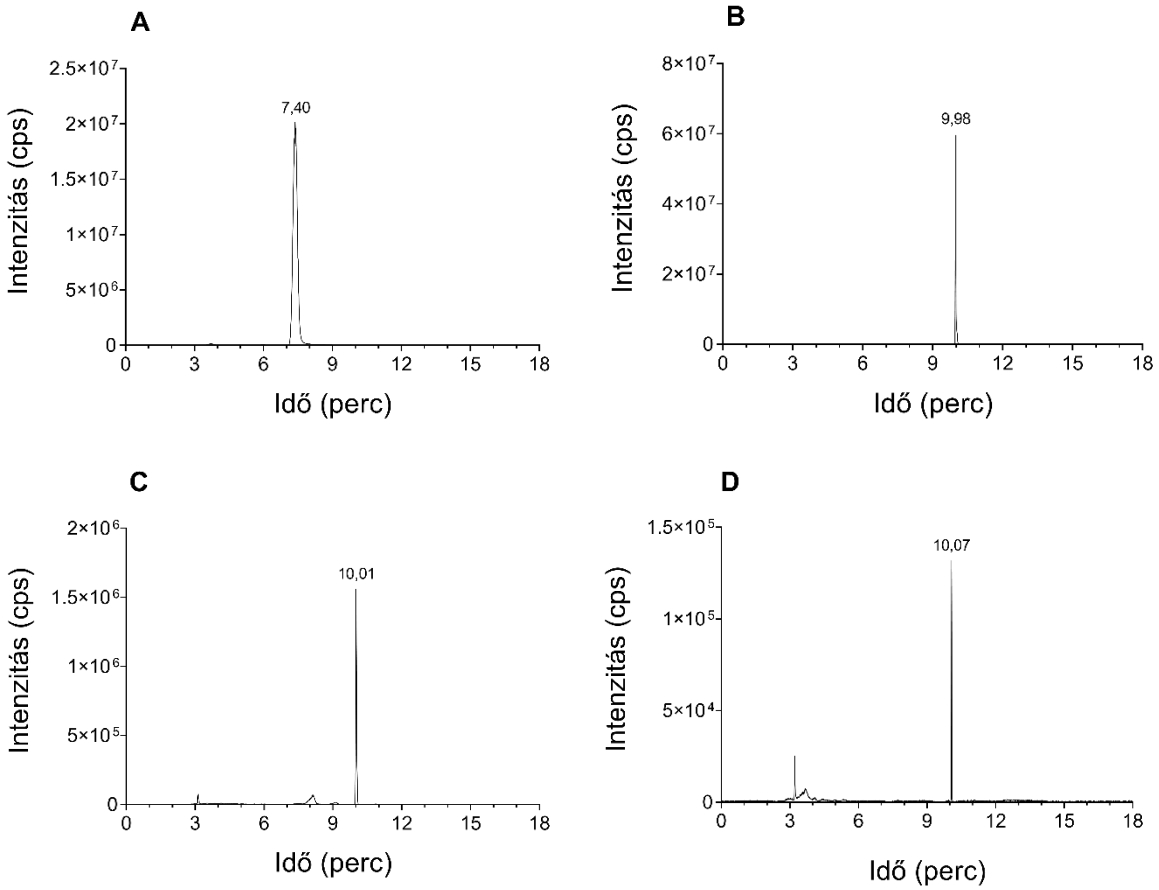
F3. ábra. Az aminosavak és a belső standardként alkalmazott d5-Glu extrahált ionkromatogramjai (folytatódik)



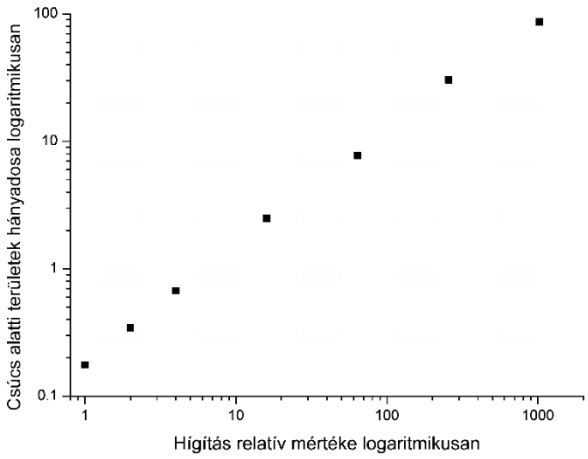
F3. ábra. Az aminosavak és a belső standardként alkalmazott d5-Glu extrahált ionkromatogramjai (folytatás)



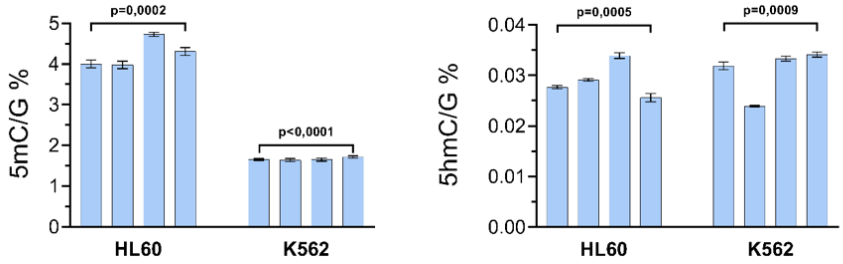
F4. ábra. Párhuzamos kalibrációs mérésekből származó meredekségértékek ábrázolása.
A bal oldali y-tengely az aminosavak, a jobb oldali y-tengely a triptofán (Trp) meredekségértékeit mutatja; a hibasávok az RSD%-értékeket jelölik.



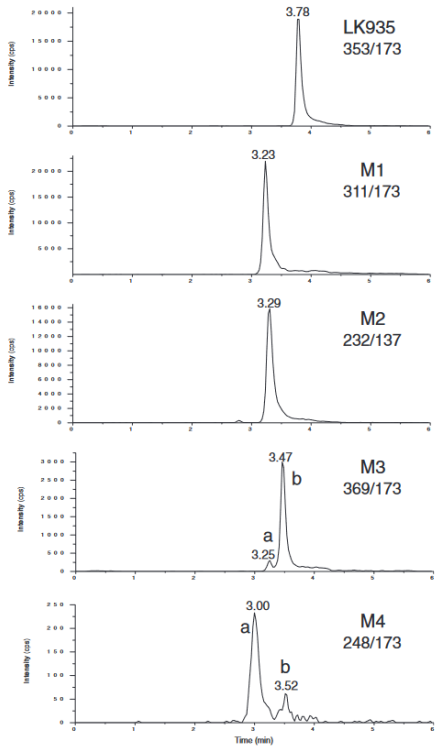
F5. ábra. Kalibrációs oldatok extrahált ionkromatogramjai: guanin és citozin (100%), valamint 5-metil-citozin (3%) és 5-hidroximetil-citozin (0,2%) kalibrációs pontjai. (A–D panelek sorrendjében.)



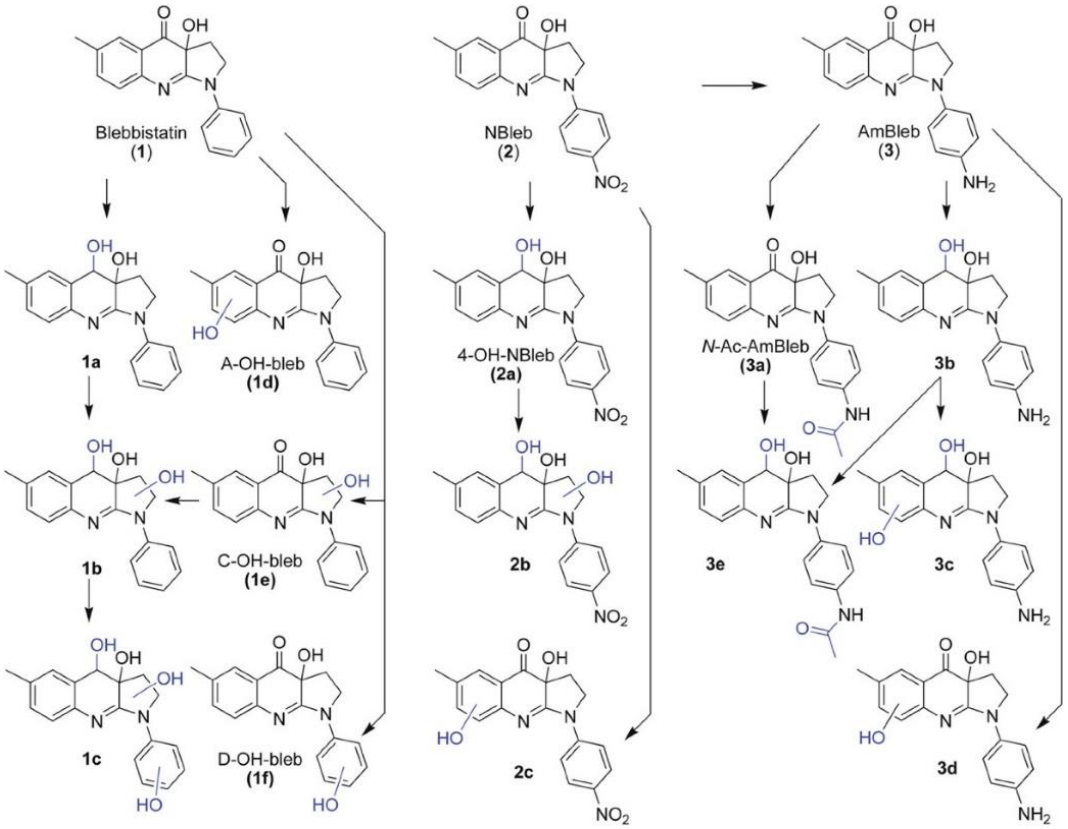
F6. ábra. Az 5-metil-citozin/guanin csúcsterület-arány alakulása felező hígítással előállított oldatsorozatban, a relatív kalibrációs modell alkalmazhatóságának igazolására.



F7. ábra. Analitikai párhuzamos mérések eredményei a módszer precizitásának bemutatására.



F8. ábra. Az LK-935 molekula és azonosított metabolitjaihoz tartozó extrahált ionkromatogramok.



F9. ábra. A blebbistatin és származékaik metabolikus útvonalai az azonosított metabolitokkal

F1. táblázat. A bázikus vegyületek elválasztása sor'n tesytelt oszlopok

	Gyártó	Oszlop neve	Rövidítés	Hossz (mm)	Átmérő (mm)	Szemcse (µm)
1	Agilent	Zorbax RX-SIl	RXS0	250	4,6	5
2	Agilent	Zorbax RX-SIl	RXS1	150	2,1	5
3	Agilent	Zorbax SB-C18	SBC18	250	4,6	5
4	YMC	ODS-AM	ODS	250	4,6	5
5	Phenomenex	Kinetex F5	F5	100	4,6	5
6	Phenomenex	Luna HILIC	LunaHILIC	150	3	5
7	Waters	XBridge BEH Amide	BEHA	75	3	2,5
8	Waters	XBridge BEH HILIC	BEHH	75	3	2,5
9	Merck	SeQuant ZIC-HILIC	ZHIL	150	2,1	5

F2. táblázat. Az oazloptesztekhez felhasznált vegyületek adatai

	Név	Rövidítés	Összegképlet	Mmóltömeg	c (ng/mL)
1	Agmatine	AGM	$C_5H_{14}N_4$	130,2	100
2	Creatinine	CRE	$C_4H_7N_3O$	113,12	22,62
3	Lamotrigine	LAM	$C_9H_7N_5Cl_2$	256,09	50
4	MI1851	MI	$C_{34}H_{53}N_{15}O_6$	767,43	500
5	N,N-dimethylaziridinium ion	DMA	$C_4H_{10}N^+$	72,08	80
6	Pramipexole	PRA	$C_{10}H_{17}N_3S$	211,33	105,67
7	Putrescine	PUT	$C_4H_{12}N_2$	88,15	1000
8	Risperidone	RIS	$C_{23}H_{27}N_4O_2F$	410,49	10
9	Spermidine	SPD	$C_7H_{19}N_3$	145,25	72,63
10	Spermine	SPN	$C_{10}H_{26}N_4$	202,35	10,12

F3. táblázat. Az optimált MS paraméterek

Vegyület	Q1(Da)	Q3(Da)	CE(V)	CXP(V)	DP(V)
AGM1	131,1	72,1	19	8	26
AGM2	131,1	114,1	11	12	41
CRE1	114,1	43,9	21	20	56
CRE2	114,1	43,1	55	20	56
LAM1	255,9	210,6	35	24	126
LAM2	255,9	144,6	49	16	126
MI1	384,7	130,8	41	14	126
MI2	384,7	346,9	21	18	126
DMA1	72,0	58,1	23	8	56
DMA2	72,0	42,0	17	16	56
PRA1	212,1	152,7	19	18	61
PRA2	212,1	110,6	30	15	100
PUT1	89,0	29,9	31	14	60
PUT2	89,0	71,5	11	12	60
RIS1	411,1	190,8	35	22	121
RIS2	411,1	109,7	65	14	121
SPD1	146,1	71,5	17	10	120
SPD2	146,1	111,5	19	12	120
SPN1	203,1	111,8	23	14	120
SPN2	203,1	128.7	17	18	120

F4. táblázat. A kidolgozott SPE módszer körülményei.

Idő (min)	Áramlási sebesség (ml/min)	Gradiens elúció (A+B pumpa) B pumpa (%)	Idő (min)	Izokratikus elúció (C pumpa) Áramlási sebesség (ml/min)	Idő (min)	Szelepváltó pozíciója
0	0,8	5	0	0,8	0	waste
2,5	0,8	5	2,1	0,8	2	MS
3,5	0,8	90	2,2	0,1		
5	0,8	90	5,9	0,1		
5,5	0,8	5	6,0	0,8		
7	0,8	5	7,0	0,8	7	waste

F5. táblázat. A kapott regresszió, LOD és LOQ értékek

Vegyület	R	LOD(ng/mL)	LOQ(ng/mL)
11-deoxikortikoszterone	0,9983	1	2,5
11-deoxikortizol	0,9985	0,05	0,1
17-hidroxiprogeszteron	0,9985	0,1	0,25
21-deoxikortizol	0,998	0,05	0,1
aldoszteron	0,9988	0,1	0,25
androsztendion	0,9979	0,01	0,025
kortikiszteron	0,997	0,1	0,25
kortizol	0,9986	0,1	0,25
kortizon	0,9989	0,01	0,025
dihidrotesztoszteron	0,9974	0,05	0,1
pregnenolon	0,9962	0,1	0,25
progeszteron	0,9961	0,1	0,25
tesztosteron	0,999	0,01	0,025

F6. Táblázat. Optimált MS paraméterek (NSAID)

Polaritás	Komponens	MRM	dwell time (msec)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
pozitív	Acetaminofen	152.0/108.8	5	1	10	23	13
pozitív	Acetilszalicilsav	296.0/214.0	5	96	10	47	18
pozitív	Diklofenák	358.1/138.9	5	11	10	21	22
negatív	Fenoprofén	178.9/136.8	5	-10	-10	-8	-11
negatív	Flurbiprofén	197.1/92.9	5	-100	-10	-28	-11
negatív	Ibuprofén	199.0/177.0	5	-100	-10	-28	-19
negatív	Indometakin	205.1/160.9	5	-125	-10	-10	-11
negatív	Ketoprofén	253.1/209.0	5	-15	-10	-10	-17
negatív	Naproxen	185.2/169.9	5	-70	-10	-12	-13
negatív	Szalicilsav	137.0/92.8	5	-30	-10	-22	-7

F7. Táblázat. A kalibráció eredményei, LOD LOQ értékek

Vegyület	ivóvíz			felszíni víz			szennyvíz		
	LOQ (ng/ml)	LOD (ng/ml)	R	LOQ (ng/ml)	LOD (ng/ml)	R	LOQ (ng/ml)	LOD (ng/ml)	R
Acetaminofen	0,05	0,025	0,9984	0,1	0,05	0,9991	0,25	0,1	0,9983
Acetilszalicilsav	0,1	0,05	0,999	1	0,5	0,9979	2,5	1	0,9952
Diklofenák	0,05	0,025	0,9985	0,1	0,05	0,9981	0,25	0,1	0,9993
Fenoprofén	0,025	0,01	0,9954	0,05	0,025	0,9968	0,1	0,05	0,9987
Flurbiprofén	0,05	0,025	0,9954	0,25	0,1	0,9984	0,25	0,1	0,9981
Ibuprofén	0,05	0,01	0,9974	0,25	0,1	0,9956	0,5	0,25	0,995
Indometakin	0,005	0,001	0,9956	0,01	0,005	0,999	0,025	0,01	0,9992
Ketoprofén	0,025	0,01	0,9951	0,25	0,1	0,9994	0,5	0,1	0,9993
Naproxen	0,01	0,005	0,9982	0,025	0,01	0,9994	0,05	0,025	0,9995
Szalicilsav	0,05	0,025	0,9972	0,1	0,05	0,9987	0,5	0,25	0,9993

F8. táblázat. Aminosavak tandem tömegspektrometriás paraméterei.

Aminosavak/rövidítésük		MRM átmenet (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Alanin	Ala	90 → 90	26	6,5	7	4
		90 → 44	21	10,5	17	4
Aszparaginsav	Asp	134 → 74	30	10	15	5
		134 → 88	30	10	25	5
Glutaminsav	Glu	148 → 84	30	10	20	5
		148 → 130	30	10	15	5
Fenilalanin	Phe	166 → 120	30	10	15	15
		166 → 103	30	10	15	15
Glicin	Gly	76 → 30	30	10	15	15
		76 → 76	30	10	15	15
Hisztidin	His	156 → 110	30	10	20	5
		156 → 83	30	10	30	5
Izoleucin	Ile	132 → 86	30	10	15	5
		132 → 69	30	10	21	5
		132 → 44	30	10	15	5
Lizin	Lys	147 → 84	1	10	21	14
		147 → 130	1	10	13	16
		147 → 41	1	10	41	8
Leucin	Leu	132 → 86	30	10	15	5
		132 → 44	1	10	29	20
		132 → 43	1	10	33	20
Metionin	Met	150 → 104	30	10	15	15
		150 → 56	30	10	20	15
Aszparagin	Asn	133 → 87	30	10	13	5
		133 → 74	30	10	19	5
Prolin	Pro	116 → 70	30	10	20	15
		116 → 68	30	10	30	15
Glutamin	Gln	147 → 84	1	10	13	8
		147 → 130	1	10	23	12
		147 → 56	1	10	39	26
Arginin	Arg	175 → 70	30	10	20	5
		175 → 116	30	10	30	5
Serin	Ser	106 → 60	30	10	15	15
		106 → 42	30	10	25	15
Treonin	Thr	120 → 74	30	10	15	15
		120 → 56	30	10	20	15
Valin	Val	118 → 70	30	10	15	15
		118 → 55	30	10	30	15
Triptofán	Trp	205 → 188	30	10	15	15
		205 → 146	30	10	20	15
Tirozin	Tyr	182 → 136	30	10	15	15
		182 → 91	30	10	15	15
Belső standard						
d5-glutaminsav	d5-Glu	153 → 135	11	10	13	14
		153 → 88	11	10	21	8

F9. táblázat. A módszer alkalmazása 12 humán szérummintán. A párhuzamos mérések eredményei az átlagos koncentrációval (µM) és az RSD értékekkel (%) láthatók.

AA	Koncentrációk (átlag ± RSD% µM)											
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
Ala	346,8 ± 9,3	302,2 ± 6,7	220,5 ± 0,6	265,6 ± 9,5	270,5 ± 9,7	138,9 ± 7,9	892,5 ± 5,7	164,0 ± 1,7	244,6 ± 6,5	155,1 ± 3,0	219,5 ± 8,9	170,4 ± 3,2
Asp	43,3 ± 3,7	27,1 ± 0,5	39,0 ± 5,4	32,5 ± 3,0	117,1 ± 2,0	29,1 ± 2,8	119,7 ± 2,5	40,9 ± 9,7	25,1 ± 2,5	30,2 ± 2,1	28,2 ± 5,0	33,1 ± 8,4
Glu	316,8 ± 3,8	109,4 ± 1,1	144,2 ± 0,1	126,3 ± 7,7	224,1 ± 0,6	152,4 ± 2,7	516,0 ± 5,3	222,5 ± 8,8	128,0 ± 1,0	123,1 ± 1,5	209,3 ± 7,1	166,7 ± 3,4
Phe	111,3 ± 4,9	100,4 ± 3,5	93,7 ± 1,7	85,3 ± 3,8	126,5 ± 3,0	78,9 ± 0,7	305,7 ± 4,8	80,8 ± 4,5	81,5 ± 0,3	74,3 ± 0,7	85,8 ± 6,1	68,4 ± 1,3
Gly	422,3 ± 3,7	364,7 ± 8,9	375,4 ± 8,0	361,0 ± 6,5	858,7 ± 7,3	267,7 ± 4,8	492,2 ± 0,9	306,7 ± 3,1	454,6 ± 2,5	345,5 ± 2,0	287,8 ± 6,9	319,4 ± 3,6
His	121,4 ± 3,7	98,5 ± 3,0	83,1 ± 5,8	98,8 ± 4,9	136,6 ± 0,4	85,4 ± 2,0	133,8 ± 2,9	117,0 ± 3,1	103,4 ± 1,9	95,6 ± 3,4	96,4 ± 3,3	96,7 ± 7,9
Ile	116,4 ± 7,1	100,2 ± 1,8	59,1 ± 3,6	77,7 ± 1,4	129,6 ± 2,0	62,5 ± 4,6	151,8 ± 2,8	87,7 ± 4,6	95,6 ± 1,0	58,3 ± 2,2	74,6 ± 7,1	57,0 ± 7,0
Lys	458,1 ± 2,0	222,4 ± 1,8	200,6 ± 4,0	218,0 ± 4,1	258,5 ± 2,7	170,9 ± 1,1	598,8 ± 6,7	207,3 ± 8,1	160,5 ± 1,9	178,1 ± 4,2	259,5 ± 4,3	272,3 ± 8,4
Leu	236,4 ± 1,3	185,0 ± 6,4	125,4 ± 5,2	151,2 ± 2,8	233,0 ± 2,7	130,1 ± 1,5	345,9 ± 2,7	181,2 ± 2,8	156,3 ± 0,8	120,3 ± 1,0	140,6 ± 8,6	112,0 ± 5,3
Met	38,8 ± 3,6	28,9 ± 1,2	16,1 ± 3,0	21,1 ± 6,1	31,8 ± 1,6	15,7 ± 0,4	25,2 ± 5,3	16,9 ± 6,7	26,4 ± 3,0	17,2 ± 0,4	39,5 ± 5,2	36,7 ± 3,0
Asn	16,6 ± 7,2	11,7 ± 2,0	14,4 ± 5,5	11,4 ± 1,6	17,3 ± 7,1	10,4 ± 1,0	31,4 ± 4,7	11,1 ± 2,3	12,7 ± 0,1	10,2 ± 4,4	13,0 ± 7,1	10,4 ± 4,7
Pro	272,2 ± 4,6	306,5 ± 2,7	151,1 ± 2,5	152,2 ± 3,3	265,3 ± 1,3	134,2 ± 1,2	353,6 ± 3,8	107,1 ± 4,8	197,3 ± 1,1	125,5 ± 0,3	173,7 ± 6,6	159,5 ± 5,0
Gln	128,2 ± 3,5	89,7 ± 3,1	52,8 ± 2,6	71,1 ± 2,7	54,2 ± 1,9	71,7 ± 1,5	222,5 ± 2,4	60,4 ± 4,9	81,4 ± 0,5	73,4 ± 0,7	127,7 ± 7,5	98,7 ± 6,2
Arg	129,3 ± 4,8	129,5 ± 1,3	223,4 ± 2,4	155,6 ± 3,3	121,0 ± 0,1	51,3 ± 3,7	96,3 ± 0,6	158,1 ± 10,0	101,6 ± 3,6	115,6 ± 2,9	172,3 ± 0,1	242,1 ± 9,3
Ser	220,9 ± 5,3	192,2 ± 0,4	146,2 ± 5,9	152,5 ± 1,2	660,4 ± 0,3	129,5 ± 3,6	169,6 ± 4,2	182,6 ± 3,1	179,2 ± 1,2	159,6 ± 0,7	169,9 ± 6,5	168,0 ± 2,3
Thr	173,2 ± 0,2	112,3 ± 3,5	68,0 ± 5,7	88,6 ± 4,7	174,6 ± 2,6	48,6 ± 5,0	± 65,6 ± 2,9	70,8 ± 3,7	104,4 ± 0,1	77,7 ± 1,4	103,5 ± 9,3	154,9 ± 5,1
Val	240,9 ± 3,8	317,2 ± 2,2	192,5 ± 4,0	245,2 ± 3,8	345,1 ± 3,2	177,8 ± 0,3	443,0 ± 3,9	283,6 ± 4,3	228,5 ± 3,4	214,9 ± 0,1	159,6 ± 7,7	166,1 ± 2,7
Trp	6,8 ± 1,2	11,7 ± 4,6	9,7 ± 2,3	12,1 ± 7,9	13,0 ± 6,2	9,9 ± 2,6	15,7 ± 2,7	9,4 ± 4,5	11,1 ± 3,0	8,7 ± 3,6	13,6 ± 10,0	11,0 ± 4,1
Tyr	149,7 ± 2,2	114,7 ± 6,3	66,8 ± 3,6	85,1 ± 7,9	153,5 ± 3,4	80,5 ± 1,0	134,4 ± 5,1	56,5 ± 9,5	76,0 ± 0,4	59,8 ± 0,5	132,3 ± 6,2	118,7 ± 0,2

F10. táblázat. A DNS metilációjának vizsgálata során használt optimált értékek

Vegyület	MRM átmenet (m/z)	Dwell time (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (eV)	CXP (V)
G	152 → 110	25	100	10	40	15
	152 → 135	25	50	10	15	12
C	112 → 95	25	50	7	25	10
	112 → 94	25	80	6	25	12
5mC	126 → 83	25	60	9	17	15
	126 → 108	25	60	9	25	12
5hmC	142 → 81	80	50	9	30	10
	142 → 124	35	80	5	20	14

F11. táblázat. A DNS metilációs mérésekhez optimált kromatográfiás gradiens

t (perc)	0	6	9	11	11,5	17
A% (V/V)	15	15	90	90	15	15
B% (V/V)	85	85	10	10	85	85

F12. táblázat. A DNS metilációs mérések kalibrációs pontjainak statisztikai eredményei

Vegyület		Névleges koncentráció (%)						
5mC		1	3	5	7	10	12	15
	Átlag	1,0	3,0	5,1	7,1	9,9	12,0	15,1
	Pont, (%)	1,0	0,3	1,2	1,0	1,0	0,4	0,6
	Prec, (RSD%)	3,0	1,7	1,4	1,4	2,3	1,8	1,5
5hmC		0,005	0,01	0,02	0,05	0,2		0,5
	Átlag	0,005	0,010	0,020	0,050	0,199		0,501
	Pont, (%)	2,0	1,0	0,5	0,4	0,5		0,2
	Prec, (RSD%)	2,0	2,0	4,5	1,8	3,5		2,6