

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**LC-MS/MS METODES IZSTRĀDE OTRĀS IZVĒLES
PRETTUBERKULOZES ZĀĻU VIELU UN TO
METABOLĪTU KVANTITATĪVAI NOTEIKŠANAI
ASINS PLAZMĀ**

MAGISTRA DARBS

Autors: **Baiba Gukālova**

Studenta apliecības Nr.: bg12010

Darba vadītāja: Dr. chem. Solveiga Grīnberga

RĪGA

2022

ANOTĀCIJA

LC-MS/MS metodes izstrāde otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu kvantitatīvai noteikšanai asins plazmā. Gukālova B., zinātniskā vadītāja Dr. chem. Grīnberga S. Maģistra darbs, 52 lappuses, 12 attēli, 11 tabulas, 7 pielikumi, 56 literatūras avoti. Latviešu valodā.

Darbā apkopota literatūra par LC-MS/MS pielietošanas iespējām otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu kvantitatīvai noteikšanai, raksturotas bioloģisko paraugu sagatavošanas metodes. Darba gaitā tika pārbaudītas dažādas paraugu sagatavošanas metodes, veikta hromatogrāfisko un masspektrometrisko apstākļu pielāgošana kvantitatīvai prettuberkulozes zāļu un to metabolītu noteikšanai asins plazmā. Izstrādātā metode tika validēta atbilstoši EMA validācijas vadlīnijām.

LEVOFLOKSACĪNS, LINEZOLĪDS, BEDAKVILĪNS, DELAMANĪDS, METABOLĪTI, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Development of a LC-MS/MS method for quantitative determination of second-line anti-tuberculosis drugs and their metabolites in blood plasma. Gukālova B., supervisor Dr. chem. Grīnberga S. Master thesis, 52 pages, 12 figures, 11 tables, 7 appendices, 56 literature references. In Latvian.

The theoretical part of this thesis contains a literature review of biological sample preparation and methods for quantitative analysis of second-line anti-tuberculosis drugs and their metabolites by LC-MS/MS. During this study, various sample preparation methods, chromatographic and mass spectrometric parameters were experimentally tested for quantitative determination of anti-tuberculosis drugs and their metabolites in blood plasma. The developed method was validated according to the EMA validation guidelines.

LEVOFLOXACIN, LINEZOLID, BEDAQUILINE, DELAMANID, METABOLITES, LC-MS/MS.

SATURS

APZĪMĒJUMU SARAKSTS	4
IEVADS.....	5
1. LITERATŪRAS APSKATS	6
1.1. Otrās izvēles prettuberkulozes zāles	6
1.2. Levofloksacīns (LFX).....	8
1.3. Linezolidis (LZD)	10
1.4. Bedakvilīns (BDQ)	12
1.5. Delamanīds (DLM).....	12
1.6. Prettuberkulozes zāļu vielu kvantitatīvās noteikšanas metodes	14
1.7. Bioloģiskā parauga ņemšana un sagatavošanas metodes	16
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	20
2.1. Izmantotās vielas un reaģenti.....	20
2.2. Iekārtas un aparātūra	20
2.3. Šķīduma hromatogrāfijas- tandēmmasspektrometrijas parametri.	21
2.4. Šķīdumu sagatavošana.....	22
2.5. Paraugu sagatavošana LC-MS/MS analīzei.....	24
2.6. Metodes validācija	25
3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	31
3.1. Analītiskās metodes izstrāde.....	31
3.2. Paraugu sagatavošana	34
3.3. Otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu kvantitatīvās noteikšanas metodes validācija.....	36
3.4. Otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu kvantitatīvās noteikšanas metodes validācijas kopsavilkums.....	44
SECINĀJUMI	45
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	46
PIELIKUMI.....	53
1. pielikums. Selektivitāte.....	53
2. pielikums. Kvantitatīvās noteikšanas diapazons.....	54
3. pielikums. Pareizība un precizitāte	61
4. pielikums. Atšķaidīšanas integritāte	64
5. pielikums. Matricas efekts	65
6. pielikums. Stabilitāte	67
7. pielikums. Analizējamo vielu masspektri.....	69

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

ACN	acetonitrils
BDQ	bedakvilīns
D-BDQ	N-demetilbedakvilīns
D-LFX	N-demetillevofloksacīns
DLM	delamanīds
ESI	elektroizsmidzināšanas jonizācija
FA	skudrskābe
HPLC	augsti efektīvā šķidruma hromatogrāfija
IS	iekšējais standarts
LC-MS	šķidruma hromatogrāfija-masspektrometrija
LC-MS/MS	šķidruma hromatogrāfija-tandēmmasspektrometrija
LFX	levofloksacīns
LFX-N	levofloksacīna N-oksīds
LLOQ	zemākā kvantificēšanas robeža
LOD	zemākā detektēšanas robeža
LZD	linezolīds
MeOH	metanols
MF	matricas faktors
MRM	multireakciju monitorings
MS	masspektrometrija
RK	relatīvā kļūda
RSN	relatīvā standartnovirze
RT	izdalīšanās laiks
S/N	signāla un trokšņa attiecība
TB	tuberkuloze
UPLC-MS/MS	ultra augsti efektīvā šķidruma hromatogrāfija tandēmmasspektrometrija

IEVADS

Tuberkuloze (TB) mūsdienās ir aktuāla infekcijas slimība, ko izraisa *Mycobacterium tuberculosis* baktērija, tā izplatās ar gaisa pilieniem. Visbiežāk sastopama ir plaušu tuberkuloze, bet šī slimība var attīstīties arī citās ķermeņa daļās. Apmēram 1/3 pasaules iedzīvotāju pārnēsā šo slimību, bet 10% no tiem parādās simptomi, slimība attīstās un spēj aplipināt citus. Tuberkulozes epidēmija turpinās neraugoties uz pieejamo vakcīnu zīdaiņiem (BCG). Šī vakcīna ir daļēji efektīva, jo tā pasargā bērnus no vissmagākajām tuberkulozes formām, kas apdraud bērna dzīvību, bet nepasargā no iespējas saslimt ar šo slimību. 2019. gadā ar TB saslima 10 miljoni no pasaules iedzīvotājiem un 1,4 miljoni no tiem nomira. TB epidēmijas izbeigšana ir viens no ANO ilgtspējīgas attīstības mērķiem [1].

Prettuberkulozes zāles izmanto jau daudzus gadus, bet, lietojot zāles nepareizi, tuberkulozes baktērijas paliek nejutīgas pret šīm zālēm un rodas multirezistenta tuberkuloze (MR-TB). MR-TB ārstē izmantojot otrās izvēles prettuberkulozes zāles (tajā skaitā levofloksacīnu, linezolīdu, bedakvilīnu un delamanīdu), šīs zāles ir dārgas, un ir nepieciešama ilga terapija (2 gadi) [2].

Dati par otrās izvēles prettuberkulozes zālēm un to galveno metabolītu koncentrācijām bioloģiskajos paraugos izmantojami optimizētas un individualizētas zāļu devas noteikšanai tuberkulozes pacientiem ārstēšanās gaitā.

Maģistra darba mērķis bija izstrādāt LC-MS/MS metodi kvantitatīvai otrās izvēles prettuberkulozes zāļu un to metabolītu noteikšanai asins plazmas paraugos.

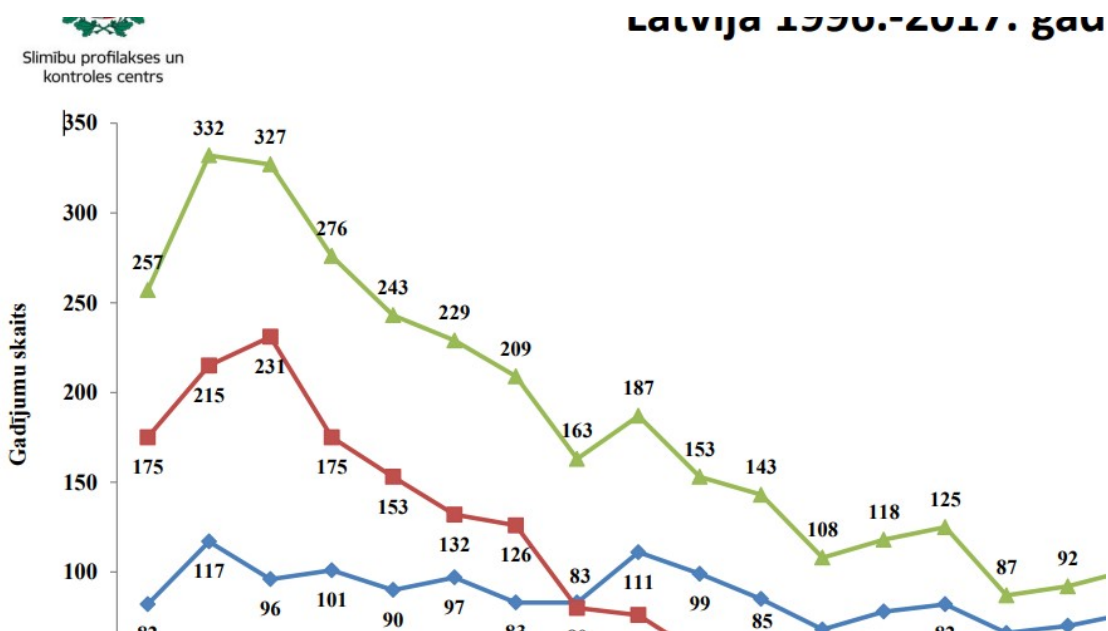
Mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi darba uzdevumi:

- apkopot literatūru par šķidrums hromatogrāfijas-tandēmmasspektrometrijas (LC-MS/MS) pielietošanas iespējām otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu pētījumiem;
- raksturot bioloģisko paraugu sagatavošanas metodes;
- izvērtēt levofloksacīna, linezolīda, bedakvilīna un delamanīda un to metabolītu maisījuma sadalīšanas iespējas, izmantojot hromatogrāfiskās metodes;
- masspektrometrisko parametru noteikšana levofloksacīna, linezolīda, bedakvilīna, delamanīda un to metabolītu LC-MS/MS kvantitatīvās analīzes metodes izstrādei;
- veikt izstrādātās metodes validāciju atbilstoši EMA bioanalītisko metožu validācijas vadlīnijām.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Otrās izvēles prettuberkulozes zāles

Pasaules veselības organizācijas (PVO) vadlīnijās tuberkulozes ārstēšanai norādīts, ka ārstēšana jāuzsāk ar četriem medikamentiem – izoniazīdu, rifampicīnu, pirazinamīdu un etambutolu. Nepabeidzot ārstēšanas kursu, neregulāri lietojot zāles vai atkārtoti saslimstot, var attīstīties tuberkulozes baktēriju rezistence pret šīm zālēm, un slimībai progresējot tā kļūst grūti ārstējama vai pat neārstējama. Baltijas valstīs ir visaugstākais risks saslimt ar tuberkulozi starp Eiropas savienības valstīm. Kopš 1998. gadā tuberkulozes epidemioloģiskā situācija Baltijas valstīs ir uzlabojusies (skatīt 1.1. attēlu), pateicoties multirezistentas tuberkulozes ārstēšanas iespējām [3], tomēr joprojām Latvijas epidemioloģisko situāciju nevar uzskatīt par labvēlīgu. Slimību profilakses un kontroles centra dati liecina, ka 2017. gadā tika reģistrēti 483 jauni tuberkulozes gadījumi, 36 multirezistentas tuberkulozes pacienti un 71 pacienta nāves gadījums, kas saistīts ar tuberkulozes slimību.



1.1. att. Multirezistentas tuberkulozes gadījumi Latvijā [4]

Multirezistentā tuberkuloze (MR-TB) ir rezistence pret izoniazīdu un rifampicīnu ar vai bez rezistences pret citām pirmās izvēles prettuberkulozes zālēm. Plaša zāļu rezistentā tuberkuloze (XDR-TB) rodas, ja ir rezistence pret izoniazīdu, rifampicīnu un fluorhinolona savienojumiem

un kādu no trim otrās izvēles injicējamām zālēm (amikacīnu, kapreomicīnu vai kanamicīnu). Iespējama arī pilnīga rezistence pret prettuberkulozes zālēm (TDR-TB). Atklājot pacientus ar MR-TB vai XDR-TB, ir ļoti svarīgi, lai tuberkulozes ārstēšanas metodes atbilstu starptautiskiem standartiem [5].

Multirezistentas tuberkulozes ārstēšanai izmanto 2. līnijas prettuberkulozes zāles, piemēram bedakvilīnu, delamanīdu, linezolīdu levofloksacīnu un citas.

Tuberkulozi ārstē ar kombinētu terapiju, jo *M. tuberculosis* rezistence strauji attīstās, ja ārstēšanā izmanto atsevišķas zāles. Vairāku zāļu terapija ir paredzēta ne tikai, lai novērstu zāļu rezistences rašanos, bet arī lai ārstētu dažādas tuberkulozes baciļu populācijas [6;7]

Pasaules veselības organizācija ir izveidojusi ārstēšanas shēmu MR-TB ārstēšanai, kas sastāv no trīs zāļu vielu grupām. A grupa iekļauj trīs prettuberkulozes zāles: levofloksacīnu (vai moksifloksacīnu), bedakvilīnu un linezolīdu. B grupa iekļauj klofazimīnu vai cikloserīnu. C grupas zāles (tajā skaitā delamanīdu) izvēlas, ja nav iespējams pielietot A vai B grupas prettuberkulozes zāles [8].

Personalizētā medicīna. Tuberkulozes slimības attīstības riska faktori (indivīda dzīvesveids, ģenētiskie faktori, citas slimības un vides faktori) ir endogēns process, kuru nosaka šūnu imūnsistēma. Rezistentās formas attīstība ir saistīta ar suboptimālu antibiotiku koncentrāciju asins plazmā, to ietekmē dažādi pacienta riska faktori. Tiek uzskatīts, ka 20 – 95 % zāļu farmakokinētikas un farmakodinamikas izmaiņu ir saistītas ar ģenētiskiem faktoriem, atkarībā no sekvenču variantiem gēnos, kas kodē zāļu vielas metabolizējošos enzīmus. Farmakoģenētikas mērķis ir ārstēšanas optimizēšana atbilstoši indivīda ģenētiskajai uzbūvei, tādējādi nodrošinot maksimālu efektivitāti un minimālu toksicitāti [9].

Otrās izvēles prettuberkulozes zāles ir toksiskākas nekā pirmās izvēles zāles. Visbiežāk novērotās blakusparādības ir hematoloģiskās izmaiņas, hepatoksicitāte, neirotoksicitāte un neiromuskulārā blokāde. Zinot zāļu vielu koncentrāciju asins plazmā un personalizējot zāļu devu pacientiem, ir iespējams samazināt blakusparādības. Piemēram, linezolīda efektīvā deva ir 600 mg dienā, bet citiem pacientiem nepieciešams palielināt devu līdz 1200 mg dienā, bet citiem samazināt līdz 300 mg dienā [10].

Terapeitiskā zāļu kontrole (TDM) ir individuāla zāļu dozēšana, vadoties pēc zāļu koncentrācijas plazmā, lai optimizētu nepieciešamo devu [11]. Personalizēta prettuberkulozes zāļu terapijas metode ir nepieciešama klīnisko panākumu uzlabošanai un rezistences novēršanai. Prioritārajām pacientu grupām (piemēram HIV pozitīviem un diabēta pacientiem) ir īpaši svarīgi veikt kontroles zāļu vielu koncentrācijas mērījumus asins plazmā, lai nepieļautu

multirezistentas tuberkulozes attīstību par plašu zāļu vielu rezistentu tuberkulozi. Jauni farmakodinamikas dati un informācija par individuālām devām īpašās pacientu grupās sniegtu jaunus pielietojumus klīniskajā praksē [12].

Metabolomika ir metabolītu augstas caurlaidības analīze, kas ļauj identificēt vielmaiņas profilus, kas korelē ar slimības stāvokļiem vai veiksmīgu ķīmijterapiju. Jebkuras novērotās izmaiņas metabolomā zāļu terapijas rezultātā var sniegt informāciju par zāļu aktivitāti un selektivitāti. Šīs metodes ir parādījušas lielu ietekmi uz fenotipu klasifikāciju, fizioloģiskā stāvokļa izpēti, slimību diagnostiku, zāļu devas efektivitāti un biomarkieru atklāšanu [13].

1.1. tabulā ir norādītas otrās izvēles prettuberkulozes zāļu devas un maksimālā koncentrācija plazmā.

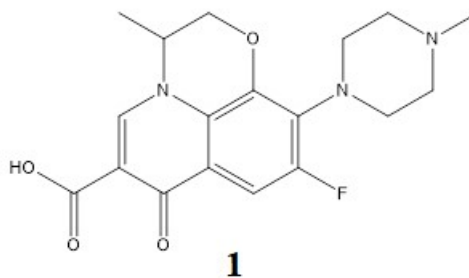
1.1. tabula

Farmakokinētikas dati izmantojot prettuberkulozes zāļu terapiju perorāli, tabletes formā

Zāles	Deva	γ_{\max} ($\mu\text{g/mL}$)	Atsauce
Levofloksacīns	750 mg, vienreizēja deva	$9,3 \pm 1,6$	[14]
	750 mg, ik pēc 24h	$8,6 \pm 1,9$	
Linezolid	400 mg, vienreizēja deva	$8,1 \pm 1,8$	[15]
	400 mg, ik pēc 24h	11 ± 4	
Bedakvilīns	450 mg, vienreizēja deva	$3,8 \pm 1,2$	[16]
	400 mg ik pēc 24h	$2,8 \pm 1,2$	
Delamanīds	100 mg x 2, ik pēc 24h	0,24–0,43	[17]

1.2. Levofloksacīns (LFX)

Levofloksacīns (**1**) pieder pie fluorhinolonu grupas antibiotikām. Fluorhinolona (FLQ) savienojumiem piemīt plaša spektra aktivitāte pret grampozitīvajām, gramnegatīvajām un netipiskajām baktērijām, piemēram, mikroplazmu, hlamīdijām un leģionellām. Darbības princips ir baktēriju enzīmu inhibīcija: DNS girāze un DNS topioizomerāze IV. Šie enzīmi ir nepieciešami baktēriju DNS atdalīšanai, kas noved pie šūnu replikācijas kavēšanas. Rezistence, kas rastos pret levofloksacīnu spontānas mutācijas dēļ, ir reti sastopama [14; 18].

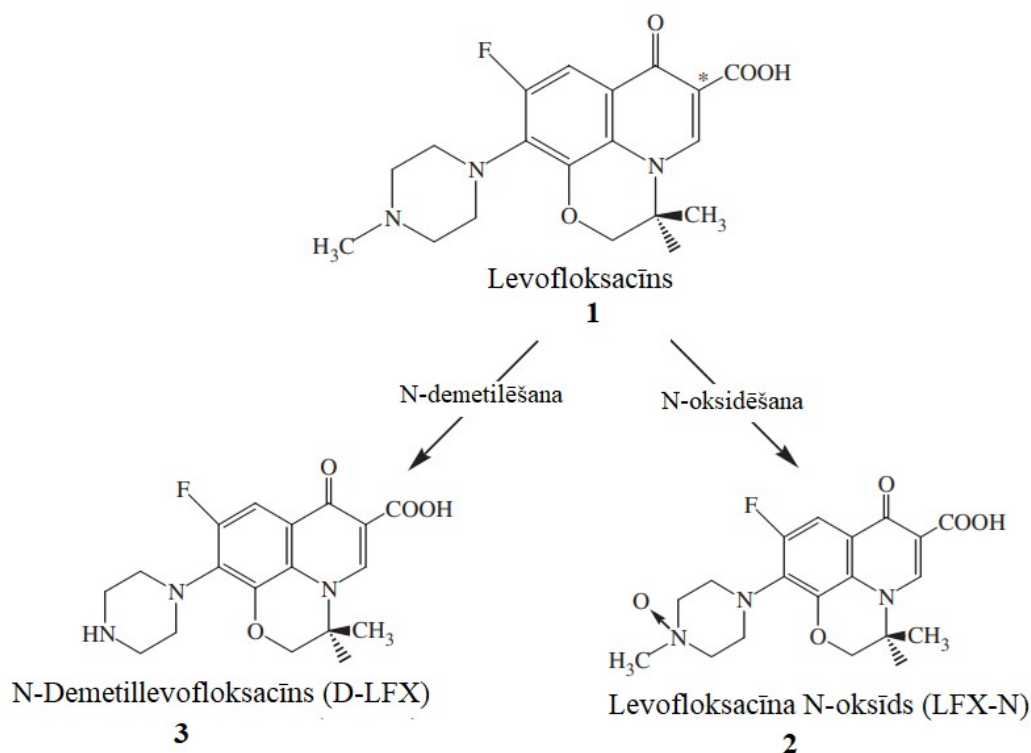


Apkopojot farmakokinētikas datus levofloksacīna terapijas izmantošanai (skatīt 1.1. tabulu), var secināt, kādas ir iespējamās ārstēšanas devas un sasniegtās koncentrācijas asins plazmā. Levofloksacīna deva ir 750 mg, maksimālā zāļu vielas koncentrācija plazmā ir 9 ± 3 $\mu\text{g/mL}$.

Metabolisms. Levofloksacīns (**1**) ir stereoķīmiski stabils plazmā, urīnā un nemetabolizējas par enantiomēru D-ofloksacīnu. Cilvēkos levofloksacīns metabolizējas ierobežoti un galvenokārt tiek izvadīts no organisma neizmainītā veidā ar ekskreciju, aptuveni 87 % no ievadītās devas 48h laikā. Ar fēcēm tika atgūts mazāk par 4 % no ievadītās devas 72h laikā. Mazāk par 5 % no ievadītās devas tika atgūts ar ekskreciju N-demetillevofloksacīna (**3**) un levofloksacīna N-oksīda (**2**) metabolīta formā, kas ir vienīgie levofloksacīna metabolīti, kas identificēti cilvēkos. Šiem metabolītiem ir maznozīmīga farmakoloģiskā aktivitāte [14].

Pētījumos ar vīriešu dzimtas rēzus pērtiķiem (*Macacus rhesus*) [19], pēc vienreizējas orālas levofloksacīna devas saņemšanas (15 mg/kg), ar plazmu pirmajā stundā tika atgūts 4,50 $\mu\text{g/mL}$ levofloksacīna un 0,175 $\mu\text{g/mL}$ levofloksacīna N-oksīda. Ar urīnu pirmajās 8h tika atgūts 54,7 $\mu\text{g/mL}$ levofloksacīna, 2,01 $\mu\text{g/mL}$ levofloksacīna N-oksīda un 1,75 $\mu\text{g/mL}$ N-demetillevofloksacīna. Ar fēcēm tika atgūts 1,17 $\mu\text{g/mL}$ levofloksacīna.

Cilvēka organismā levofloksacīna (**1**) metabolizēšana par levofloksacīna N-oksīdu (**2**) iespējama pateicoties oksidēšanās reakcijām, kurās levofloksacīna molekulā veidojas skābekli saturošas funkcionālās grupas – levofloksacīna N-oksīds. Šajā reakcijā darbojas enzīmu sistēma – mikrosomālās oksigenāzes, kas saistās ar šūnu endoplazmatisko tīklu. Monoksigenāzes aktivē molekulāro skābekli un tas saistās ar substrātu (skatīt 1.2. attēlu) [19].

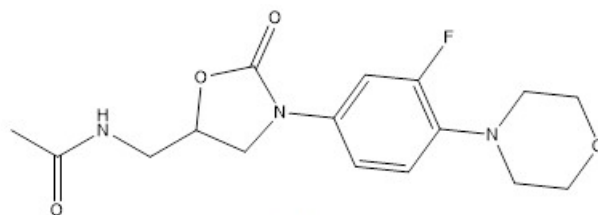


1.2. att. Levofloksacīna metabolisms [19]

Levofloksacīna degradācija. Andrzej Czyrski publikācijā [20] ir aprakstījis levofloksacīna degradācijas eksperimentu. Analīzes tika veiktas izmantojot šķidrums hromatogrāfiju-masspektrometriju (LC-MS) un gāzu hromatogrāfiju-masspektrometriju ar lidojuma laika analizatoru (GC-MS-TOF). Eksperiments pierādīja to, ka levofloksacīns ir stabils 0,9 % NaCl un 5 % glikozes šķīdumos, kas glabāti 84 dienas tumšā vietā vai pakļauti dienas gaismas iedarbībai. Levofloksacīns ir nestabils Ringera šķīdumā, kas pakļauts dienas gaismas iedarbībai (palikušais levofloksacīna daudzums 86 % pēc 84 dienām). Gan LC-MS, gan GC-MS-TOF apstiprināja, ka degradācijas produkts ir ar molekulmasu 377 g/mol, tā atbilst levofloksacīna N-oksīdam (**2**). Pēc šī eksperimenta var secināt, ka levofloksacīna N-oksīds rodas ne tikai metabolisma ceļā, bet arī sadaloties levofloksacīnam.

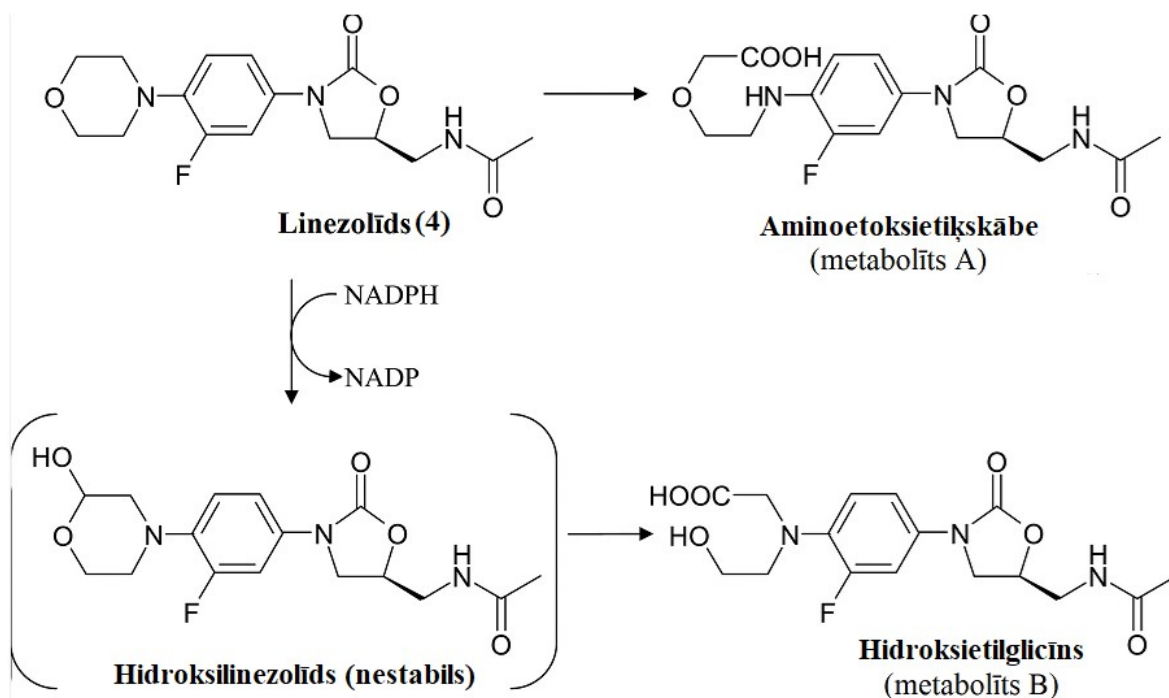
1.3. Linezolīds (LZD)

Linezolīds (**4**) ir oksazolidinona klases antibiotika, tas ir efektīvs pret grampozitīvajām baktērijām. Linezolīds selektīvi inhibē baktēriju proteīnu sintēzi, saistoties ar baktērijas 23S rRNS [21].



4

Metabolisms. Oksidējoties morfolīna gredzenam linezolīda molekulā, tas tiek metabolizēts par diviem neaktīviem metabolītiem – aminoetoksietiķskābi (metabolīts A) un hidroksietilglicīnu (metabolīts B), kas tiek izvadīti ar urīnu (skatīt 1.3. attēlu). Lielākā daļa linezolīda eliminācija notiek ar urīnu, neizmainītā zāļu formā. Ar urīnu tiek atgūts $84 \pm 3 \%$, bet ar fēcēm $10 \pm 3 \%$ linezolīda [22;23].



1.3. att. Linezolīda (4) metabolisms [21]

Pasaules veselības organizācija (WHO) iesaka linezolīda terapiju papildināt ar 3 līdz 4 otrās izvēles prettuberkulozes zālēm multirezistentās tuberkulozes ārstēšanai [24].

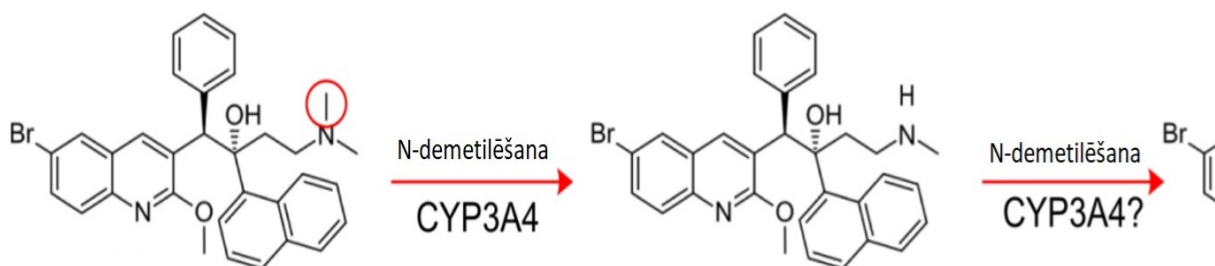
Parasti linezolīdu lieto kopā ar levofloksacīnu (skatīt 1.2. tabulu). Linezolīda deva multirezistentas tuberkulozes ārstēšanā ir 400 mg ik pēc 24 h, maksimālā koncentrācija plazmā ir $11 \pm 4 \mu\text{g/mL}$ (skatīt 1.1. tabulu).

1.4. Bedakvilīns (BDQ)

Bedakvilīns (**5**) ir diarilhinolīns, tas darbojas inhibējot baktēriju ATP sintēzi [17; 25].

Metabolisms. Cilvēka organismā ir novērots bedakvilīna I fāzes metabolisms. Bedakvilīns tiek metabolizēts aknās ar citohroma P450 (CYP) enzīmu 3A4 (skatīt 1.4. attēlu) par N-demetilbedakvilīnu (**6**). N-Demetilbedakvilīns (D-BDQ) ir aktīvs pret *M. tuberculosis*, bet apmēram 5 reizes mazāk nekā bedakvilīns. Asins plazmā D-BDQ koncentrācija ir 3 reizes mazāka nekā BDQ. N-Demetilbedakvilīns demetilēšanas ceļā veido N-didemetilbedakvilīnu (**7**), bet asins plazmā tā koncentrācija ir daudz mazāka nekā D-BDQ un tam ir niecīga mikrobioloģiskā aktivitāte. Gan N-demetilbedakvilīnam, gan N-didemetilbedakvilīnam ir lielāka citotoksicitāte un fosfolipofilitāte, nekā bedakvilīnam.

Bedakvilīns eliminējas galvenokārt ar fekālijām, 75 – 85 % bedakvilīna un 4 – 7 % N-demetilbedakvilīna metabolīta formā. BDQ un D-BDQ saistīšanās ar olbaltumvielām ir > 99 %. Ar urīnu izvadās < 0,001 % no perorālās devas 24 h laikā. BDQ izdalīšanās pusperiods ($t_{1/2}$) ir no 62 līdz 408 dienām, D-BDQ izdalīšanās pusperiods ($t_{1/2}$) ir no 69 – 407 dienas (deva: 400 mg 1x dienā, 2 nedēļas, pēc tam 200 mg 3x nedēļā, 6 nedēļas). BDQ un D-BDQ saistās ar intracelulāriem fosfolipīdiem, izraisot to uzkrāšanos audos [25; 26; 27].



1.4. att. Bedakvilīna metabolisms [28]

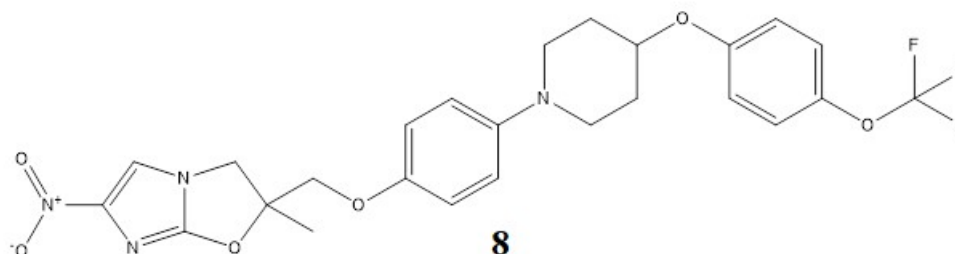
Lietojot bedakvilīnu 400 mg ik pēc 24 h, maksimālā koncentrācija plazmā ir $4,2 \pm 1,1$ $\mu\text{g/mL}$ (skatīt 1.1. tabulu).

1.5. Delamanīds (DLM)

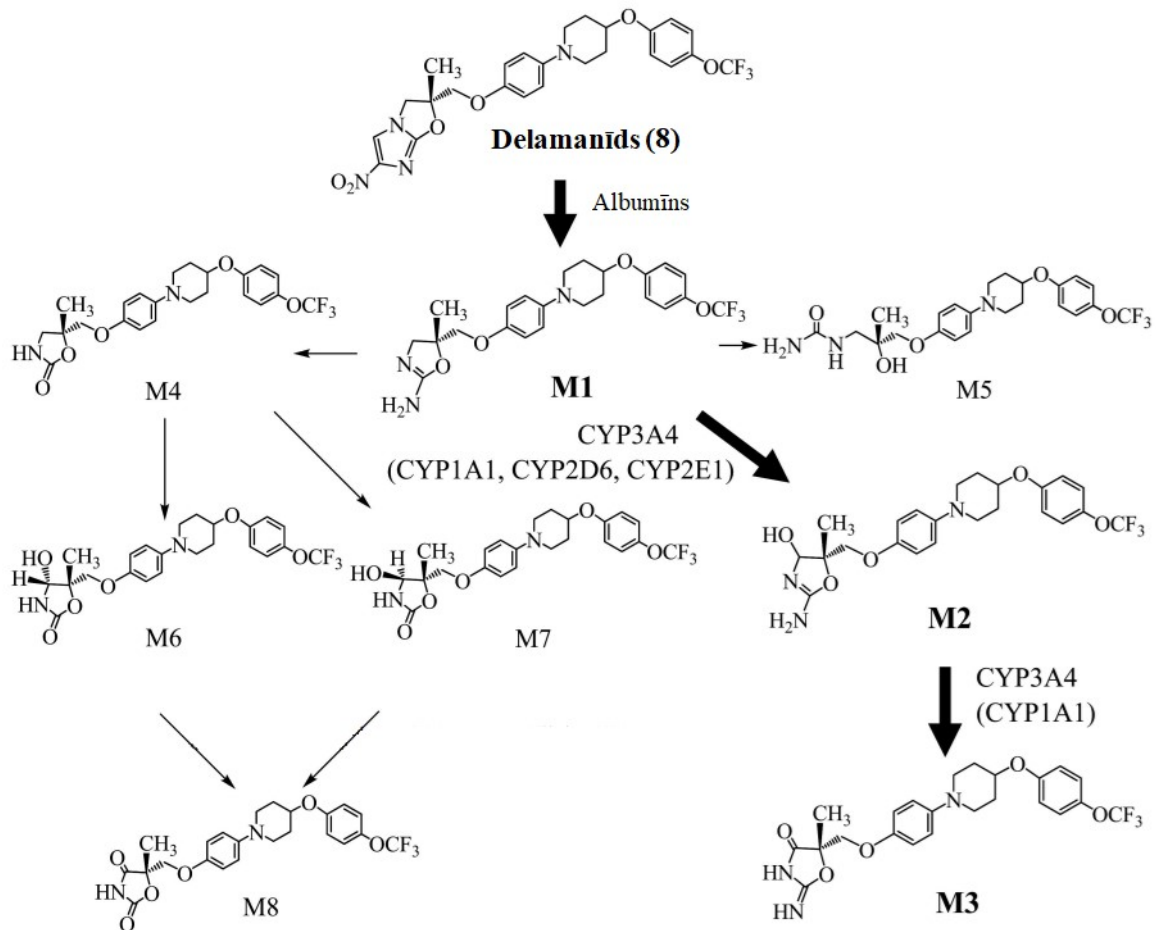
Delamanīds (**8**) ir biciklisks nitroimidazola savienojums, kas inhibē metoksi- un ketomikolskābes sintēzi, izmantojot F420 koenzīma mikobaktēriju sistēmu un veidojot slāpekļa oksīdu. Delamanīds ir izolēts no *Streptomyces eurocidicus* sugas baktērijām. Tas ir racemātisks maisījums, un prettuberkulozes aktivitāte piemīt R-enantiomēram [29].

Delamanīda iedarbība ir novērota gan multirezistentas tuberkulozes, gan plašu zāļu rezistentas tuberkulozes ārstēšanā. Lietojot delamanīdu netiek novērota krusteniskā rezistence ar citām prettuberkulozes zāļu vielām. Delamanīds ir prozāles, ko aktivizē nitroreduktāze [30].

Delamanīds spēcīgi saistās ar visiem plazmas proteīniem, $\geq 99,5\%$. Ieteicamā delamanīda deva ir 100 mg divas reizes dienā, 8 nedēļas. Maksimālā delamanīda koncentrācija asins plazmā ir 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (skatīt 1.1. tabulu). Eliminējas tieši ar asins plazmu, pusperiods ir no 30 līdz 38 h, tas netiek izvadīts ar urīnu [31;32].



Metabolisms. Delamanīdu galvenokārt metabolizē albumīns. Identificētie metabolīti neuzrāda anti-mikobaktēriju aktivitāti, to maksimālā koncentrācija asins plazmā tiek sasniegta pēc 6 – 10 nedēļām [30]. Metabolisms nav pilnībā noskaidrots, bet tiek uzskatīts, ka delamanīds metabolizējas par primāro metabolītu (DM-6705), pēc tam hidrolīzes ceļā ar CYP3A4 enzīmu metabolizējas līdz vairākiem citiem metabolītiem (skatīt 1.5. attēlu) [33].



1.5. att. Delamanīda metabolisms [34]

1.6. Prettuberkulozes zāļu vielu kvantitatīvās noteikšanas metodes

Ārstējot pacientus ar multirezistentu tuberkulozi, tiek lietotas zāļu kombinācijas, to izvēle ir atkarīga no zāļu jutības testa un pacienta stāvokļa [35]. Izvērtējot pieejamo literatūru netika atrasta neviena analīzes metode, lai vienlaicīgi kvantitatīvi noteiktu levofloksacīnu, linezolidu, delamanīdu, bedakvilīnu un to metabolītus.

Šķidrums hromatogrāfija tandēmmaspektrometrija (LC-MS/MS) tiek izmantota daudzās laboratorijās medicīniskajā diagnostikā, to bieži vien nevar aizstāt ar alternatīvām metodēm. Pašreizējais metodes ikdienas pielietojums aptver plašu analītu klāstu terapeitisko zāļu uzraudzībā, endokrinoloģijā, tostarp jaundzimušo skrīningā un toksikoloģijā. LC-MS/MS metode ievērojami palielina analītisko potenciālu farmakodinamikas un farmakokinētikas pētījumiem [36].

Trīskāršās kvadrupolu MS (TQMS) sistēmas daudzus gadu desmitus ir bijušas “zelta standarts” sākotnējo zāļu, to metabolītu vai biomarkieru kvantitatīvai noteikšanai, pateicoties to izcilajai selektivitātei izvēlētajā reakciju monitoringa (SRM) vai multireakciju monitoringa (MRM) režīmā [37].

Salīdzinot ar citām analīzes metodēm LC-MS/MS piedāvā augstāku jutību, vienlaikus analīzes veikšanai nepieciešam mazs parauga daudzums (10-50 µL plazmas) [38].

Lielākajai daļai mazu molekulu zāļu kvantitatīvās noteikšanas metožu izstrādei LC-MS/MS ir viens no spēcīgākajiem analītiskās ķīmijas instrumentiem. Visizplatītākie jonizācijas režīmu veidi ir elektrosmidzināšanas jonizācija (ESI); atmosfēras spiediena ķīmiskā jonizācija (APCI) un atmosfēras spiediena fotojonizācija (APPI). ESI ir labāk piemērota lielākas molekulmasas un polāriem savienojumiem, savukārt APCI ir vislabāk piemērota savienojumiem ar zemu vai vidēju polaritāti ar ierobežotu augšējo masas diapazonu ($m/z < 1000$ Da) [39].

Levofloksacīna, linezolīda, bedakvilīna un delamanīda kvantitatīvai analīzei visbiežāk izmanto hromatogrāfiskās metodes: RP-HPLC, UPLC un LC-MS/MS. 1.2. tabulā ir apkopotas LC-MS/MS pielietošanas iespējas otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu kvantitatīvai noteikšanai.

Levofloksacīna, linezolīda, bedakvilīna un delamanīda noteikšanai ar LC-MS/MS, kustīgā fāze sastāv no ūdens vai ūdens buferšķīduma un organiskā šķīdinātāja. Parasti par buferšķīdumu izmanto amonija formiātu, acetātu vai bikarbonātu. Papildus var pievienot trifluoretiķskābi (TFA), kas ir jonu pāra reaģents, ko pievieno ūdenim, lai uzlabotu hromatogrāfiskās joslas formu. Tā saturs nedrīkst pārsniegt 1 % [11]. Ūdens fāzei pievieno skudrskābi labākai jonizācijai. Parasti par organisko šķīdinātāju izmanto acetonitrilu (ACN) vai metanolu (MeOH). Izokrātiskajā režīmā organiskā šķīdinātāja saturs ir 15-20 %. Levofloksacīna, delamanīda, linezolīda un bedakvilīna noteikšanai ar apgrieztās fāzes HPLC visbiežāk izmanto C18 kolonnu, bet var izmantot arī C4 vai T3 kolonnu (skatīt 1.2. tabulu).

Izvērtējot pieejamo literatūru tika secināts, ka ir izstrādātas LC-MS/MS metodes, lai kvantitatīvi noteiktu linezolīdu kopā ar levofloksacīnu, bedakvilīnu kopā delamanīdu, kā arī levofloksacīnu ar N-demetillevofloksacīnu un bedakvilīnu ar N-demetilbedakvilīnu (skatīt 1.2. tabulu), bet nav nevienas LC-MS/MS metodes, lai analizētu visus šos savienojumus kopā.

1.7. Bioloģiskā parauga ņemšana un sagatavošanas metodes

Ierobežota paraugu ņemšana ir stratēģija, kurā tiek izvēlēti optimālie laika punkti, samazinot paraugu skaitu, parasti pietiek ar 2-3 paraugiem, lai novērtētu zāļu vielas efektivitāti. Optimālie paraugu ņemšanas laiki tiek aprēķināti izmantojot farmakokinētikas (PK) modeļus un Montekarlo simulācijas. Izmantojot šo metodi tiek samazināts invazīvais risks un paraugu skaits tiek samazināts līdz minimumam, tādējādi samazinot izmaksas un patērēto laiku. *Alsultan* ar kolēģiem (2015) eksperimentā pierādīja, ka samazināts paraugu daudzums, veicot levofloksacīna analīzi tikai 1h un 6h pēc devas ievadīšanas, ir pietiekams, lai noteiktu AUC (laukums zem PK līknes) [40].

Farmakokinētika (PK) apraksta, kas notiek ar zālēm organismā. Parasti zāles absorbējas (A) sistemātiskajā cirkulācijā pēc iekšķīgas lietošanas, pēc tam tiek izplatītas (D) pa visu ķermeni, ieskaitot TB infekcijas vietas. Pēc metabolisma (M) (galvenokārt aknās), zāles tiek izvadītas (E) (galvenokārt caur nierēm). Šo parametru integrāciju rāda PK modelis, kas apraksta šos procesus (ADME). Farmakokinētikas modeļus ietekmē ne tikai zāļu fizikālās un ķīmiskās īpašības, bet arī pacienta individuālās īpašības. PK mainīgums ir labi zināma problēma, kas ietekmē zāļu iedarbību un līdz ar to arī tuberkulozes ārstēšanas panākumus. [40].

Farmakodinamika (PD) apraksta zāļu ietekmi uz *Mycobacterium tuberculosis*, to raksturo terapeitiskais diapazons, kurā tuberkulozes zālēm ir augsta efektivitāte un zema toksicitāte.

Pašreizējā prettuberkulozes ārstēšana ir balstīta uz vienādas devas izsniegšanu visiem pacientiem noteiktā vecuma grupā. Tomēr ir pacienti, kam ADMES īpašības ir atšķirīgas un nepietiekamas zāļu devas gadījumā rodas rezistence, bet pārāk lielas zāļu devas gadījumā – toksicitāte. [40].

Šobrīd starptautiskās vadlīnijas nenosaka nepieciešamību izmantot terapeitisko zāļu kontroli. Pasaules veselības organizācija iesaka lietot zāļu jutības testus. Šie testi tiek veikti tikai pirmās līnijas zālēm un izvērtējot tikai ar rifampicīna iespējamo rezistenci saistītas mutācijas. Tas ir lēts un ātrs diagnostikas veids, bet nesniedz informāciju par alternatīvām iespējām un efektīvu ārstēšanas režīmu. [40].

Zāļu vielu farmakokinētikas un farmakodinamikas izvērtēšanai ir svarīga pareiza paraugu ņemšana, sagatavošana un uzglabāšana. Asins paraugus parasti savāc mēģenēs, kurās

ir antikoagulants un pēc tam uzglabā istabas temperatūrā, ledusskapī vai sasaldē. Antikoagulanta un paraugu uzglabāšanas apstākļi ir jāizvēlas atbilstoši analizējamo vielu īpašībām, lai varētu pareizi novērtēt zāļu vielu un to metabolītu koncentrāciju paraugā. Paraugu sagatavošanas un uzglabāšanas apstākļi tiek izvēlēti izstrādājot analītisko metodi. Etilēndiamīntetraetiķskābe (EDTA), heparīns un trinātrija citrāts (TSC) ir visbiežāk izmantotie antikoagulanti.

Yahdiana Harahap veica pētījumu [41], salīdzinot EDTA, heparīna un TSC antikoagulanta ietekmi uz levofloksacīna kvantitatīvu noteikšanu cilvēka asins plazmā ar HPLC fotodiodes matricas detektoru. Pētījuma ietvaros tika secināts, ka izmantotie antikoagulanti neietekmē metodes pareizību vai precizitāti gan vienas sērijas, gan starp-sēriju ietvaros. Antikoagulants neietekmē levofloksacīna īstermiņa, ilgtermiņa vai sasaldēšanas-atkausēšanas stabilitāti asins plazmā. Salīdzinot levofloksacīna hromatogrāfiskās joslu laukumus dažādu antikoagulantu asins plazmā, tika secināts, ka vismazākie joslas laukumi bija izmantojot citrāta antikoagulantu, bet vislielākie EDTA un heparīna antikoagulantam.

Linezolīda, bedakvilīna un delamanīda kvantitatīvai noteikšanai asins plazmā visbiežāk izmanto heparīna vai EDTA antikoagulantu.

Sauso asins pilienu (DBS) metodei nepieciešams viens piliens asins parauga, kas savākts uz speciāla filtrpapīra un izžāvēts gaisā. Veicot analīzi, filtrpapīra aplis, uz kura ir asins paraugs, tiek izņemts, izšķīdināts šķīdinātājā un analizēts. DBS metode ir lēta, vienkārša, paraugi ir ērti uzglabājami un transportējami, nepieciešams mazs parauga tilpums un samazināts bioloģiskais bīstamības risks [40]. *Lee, Kyunghoon* un kolēģi [42] salīdzināja izžāvēta asins pilienu (DBS) paraugu sagatavošanas metodi ar plazmas metodi. Levofloksacīna LOQ vērtība bija 0,5 µg/mL DBS metodei un 1,0 µg/mL plazmas metodei. Linezolīda LOQ vērtības bija 1,0 µg/mL DBS metodei un 0,5 µg/mL plazmas metodei.

Visām iepriekš minētajām metodēm ir nepieciešama pareiza paraugu sagatavošana kvantitatīvai analīzei. Proteīnu izgulsnēšanu parasti veic ar ACN, MeOH vai to maisījumiem (skatīt 1.2. tabulu). Lai uzlabotu metodes jutību, izgulsnēšanas šķīdumiem visbiežāk pievieno 0,1 % FA.

Lai attīrītu paraugu un iekonzentrētu vielu, savienojumus var ekstrahēt no plazmas izmantojot cietfāzes ekstrakciju (SPE). Lai SPE būtu efektīva, ir jāizvēlas savienojumam atbilstošas SPE kolonnas, atkarībā no vielas ķīmiskajām un fizikālajām īpašībām. *Andrew Ebers* un kolēģi [11] levofloksacīna cietfāzes ekstrakcijai izmantoja *Oasis HLB* kolonnas, kuru stacionārā fāze ir universāla. Tas ir apgrieztās fāzes ūdeni saistošs polimērs, kam piemīt hidrofilas-lipofilas

īpašības. Polimērs ir piemērots gan skābiem, gan neitrāliem, gan bāziskiem analītiem, jo tas ir stabils plašā pH diapazonā (no pH0 līdz pH14) [43]. Kursa darbā “Otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu kvantitatīva noteikšana asins plazmā ar LC-MS/MS metodi” tika secināts, ka SPE *Oasis HLB* kolonnas nav piemērotas, lai iekoncentrētu un uzlabotu metodes jutību visām izvēlētajām prettuberkulozes zāļu vielām [44].

**Levofloksacīna (LFX), linezolidā (LZD), bedakvilīna (BDQ) un delamanīda (DLM) kvantitatīvās noteikšanas metodes,
izmantojot LC-MS/MS**

Zāles	Matrica	Kolonna	Kustīgā fāze	Paraugu sagatavošana	LOQ, µg/mL	Atsauce
LFX	Serums	HSS T3 (50 × 2.1 mm, 1.8 mm)	A: 10 mM amonija formiāts; B: ACN ar 0,1% FA	Ekstrakcija ar paskābinātu MeOH un neitralizācija ar NaOH	1,0	[45]
LZD					0,5	
LFX	Asinis	HSS T3 (50 × 2.1 mm, 1.8 mm)	A: 10 mM amonija formiāts ar 0,1% FA; B: ACN ar 0,1 % FA	izzāvēti asins pilieni (DBS) + 50 % MeOH	0,5	[42]
LZD					1,0	
LFX	Plazma	Nav norādīts	A: amonija acetāts 5,0 g/L, etiķskābe 35mL/L, TFA 2 mL/L; B: ūdens, C: ACN	MeOH	0,1	[46]
D-LFX					0,1	
LFX	Plazma	C4 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)	A: ūdens ar 0,05 % FA; B: MeOH	MeOH	0,02	[47]
LFX	Plazma	C18 (150 × 2.0 mm, 3 µm)	A: ūdens ar 0,1% FA; B: ACN ar 0,1% FA	1) ACN 2) ūdens ar 0,1% FA	0,2	[35]
LZD					0,4	
LZD	Serums	C18 (150 x 4.6 mm, 3.5 µm)	A: ūdens ar 0,1% FA; B: ACN ar 0,1% FA	ACN	0,1	[48]
BDQ	Serums	C18 (50 x 2.1 mm, 3 µm)	A: Amonija acetāts 5,0 g/L, etiķskābe 15mL/L, TFA 2 mL/L; B: ACN; C: H ₂ O	MeOH - ACN (160:840, v/v)	0,05	[49]
D-BDQ					0,05	
DLM	Plazma	C18 (50 x 2.1 mm, 1,7 µm)	A: 5 mM Amonija bikarbonāts ar 0,2% NH ₄ OH; B: MeOH ar 0,2% NH ₄ OH	1) 50 % MeOH, 2) MeOH	0,001	[50]
DLM	Plazma	C18 (150 × 4.6 mm, 2.7 µm)	Izokrātiskais režīms: 10 mM amonija acetāts (0,25% etiķskābe, 0,02% TFA) un ACN (20:80, v/v)	SPE, iztvaicēts paraugs tika izšķīdināts kustīgajā fāzē.	0,01	[51]
BDQ					0,01	
BDQ	Plazma	C18 (50 × 2.1 mm, 5 µm)	A: 10mM amonija acetāts: MeOH (1:1); B MeOH ar 0,5% FA	SPE, iztvaicēts paraugs tika izšķīdināts 0,1% citronskābes MeOH šķīdumā + ūdens	0,02	[52]
D-BDQ					0,05	
BDQ	Plazma	C18 (100 × 2,1 mm, 3.5µm)	Izokrātiskais režīms: A: 5 mM amonija formiāts ar 0,1% FA; B: Metanols (15:85, v/v)	ACN	0,1	[53]

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

2.1. Izmantotās vielas un reaģenti

- Levofloksacīns, ≥98 % (*Sigma–Aldrich*);
- N-Demetillevofloksacīns, ≥98 % (*Cayman Chemical*);
- Levofloksacīna N-oksīds, ≥98 % (*Carbosynth*);
- Linezolid, ≥98 % (*Carbosynth*);
- Bedakvilīns, ≥97 % (*Carbosynth*);
- N-Demetilbedakvilīns (*Clearsynth*)
- Delamanīds, ≥98 % (*Carbosynth*);
- Varfarīns, 97,2 % (*Sigma–Aldrich*);
- Rezerpīns, ≥99,0 % (*Sigma–Aldrich*);
- Dimetilsulfoksīds, ≥99,7 %, (*Honeywell, Sigma–Aldrich*);
- Acetonitrils, ≥99.9 %, (*Supelco, Sigma–Aldrich*);
- Metanols, ≥99.8 % (*Supelco, Sigma–Aldrich*);
- Skudrskābe, ≥98 % (*Honeywell, Sigma–Aldrich*);
- Dejonizēts ūdens (*Millipore MilliQ-plus*);
- Cilvēka asins plazma (antikoagulants EDTA, *Innovative Research, Inc.*), izmantoja metodes izstrādei.
- Cilvēka asins plazma (Nacionālā biobanka – Valsts iedzīvotāju genoma datubāze [54], atzinums Nr.01–29.1.2/1736), izmantoja LC–MS/MS validācijas procesā

2.2. Iekārtas un aparatūra

- Šķidrums hromatogrāfs, *Acquity UPLC H–class, Waters*;
- Kolonna #1: *Acquity UPLC BEH C18 50 mm×2,1 mm; 1,7 μm (Waters)*;
- Kolonna #2: *Acquity UPLC CSH C18 100 mm×2,1 mm; 1,7 μm (Waters)*;
- Kolonna #3: *Acquity UPLC BEH C8 75 mm×2,1 mm; 1,7 μm (Waters)*;
- Tandēmmasspektrometrs, *XEVO TQ–S, Waters*, ar *ZSpray* elektroizsmidzināšanas jonizāciju (ESI);

- Vadības un datu apstrādes programmas, *MassLynx 4.1* un *TargetLynx*, *Waters*;
- Analītiskie svāri ($\pm 0,1$ mg un $\pm 0,01$ mg), *Sartorius*;
- Magnētiskais maisītājs (*IKA*);
- Centrifūga *IEC Multi*, *Thermo*;
- Centrifūga, 1–14K (*Sigma*);
- Automātiskās mikropipetes ar maināmu tilpumu (1-10 μL , 10-100 μL , 30-300 μL , 100-1000 μL), *Thermo*;
- Ependorfa mēģenes, 1,5 mL;
- Hromatogrāfijas pudelītes, 1,5 mL.

2.3. Šķidrums hromatogrāfijas- tandēmmasspektrometrijas parametri.

Hromatogrāfiskie parametri

- Kolonna: Acquity UPLC BEH C18 50 mm \times 2,1 mm; 1,7 μm (*Waters*);
- Plūsmas ātrums: 0,4 mL/min;
- Injekcijas tilpums: 1 μL ;
- Kolonnas termostata temperatūra: 40 °C;
- Autosamplera temperatūra: 4 °C;
- Analīzes laiks: 7 min
- Kustīgās fāzes sastāvs: A – 0,1 % FA ūdens šķīdums; B – ACN;
- Kustīgās fāzes gradienta režīms:
 - 1) 0 min A – 95 %; B – 5 %;
 - 2) 0,5 min A – 95 %; B – 5 %;
 - 3) 4,0 min A – 2 %; B – 98 %;
 - 4) 5,5 min A – 2 %; B – 98 %;
 - 5) 6,0 min A – 95 %; B – 5 %;
 - 6) 7,0 min A – 95 %; B – 5 %.

Masspektrometrijas parametri

- Pozitīvā elektroizsmidzināšanas jonizācija (ESI+);
- Kapilāra spriegums: 3,0 kV;
- Jonu avota temperatūra: 140 °C;

- Desolvācijas gāzes (N₂) temperatūra: 600 °C, plūsma 1000 L/h;
- Kolīzijas (sadursmju) gāze: argons;
- Konusa gāzes (N₂) plūsma: 200 L/h.

MS/MS jonu pāreju izveide. Katras analizējamās vielas MS/MS parametrus (skatīt 2.1. tabulu) noteica, izmantojot tiešo injekciju masspektrometra jonu avotā. Analizējamās vielas jonu pāreju noteikšanai izmantoja standartšķīdumus ar koncentrāciju $\gamma = 0,4 \mu\text{g/mL}$.

2.1. tabula

MS/MS jonu pārejas

Analizējamā viela	Molmasa, g/mol	Jonizācijas polaritāte	Prekursorjons, m/z	Fragmentjons, m/z	Konusa spriegums, V	Kolīzijas enerģija, eV
LFX	361	ESI+	362	261	30	25
D-LFX	347	ESI+	348	304	30	15
N-LFX	377	ESI+	378	317	30	18
LZD	337	ESI+	338	296	30	15
BDQ	554	ESI+	555	58	30	20
D-BDQ	540	ESI+	541	480	30	15
DLM	534	ESI+	535	352	30	20
IS (Varfarīns)	308	ESI+	309	163 251	12	15
IS (Rezerpīns)	608	ESI+	609	195	80	36

2.4. Šķīdumu sagatavošana

Kustīgās fāzes pagatavošana. 0,1 % skudrskābes šķīdumu ūdenī pagatavoja 1,0 L dejonizēta ūdens izšķīdinot 1,0 mL koncentrētas skudrskābes. Iegūto šķīdumu samaisīja. 0,1 % skudrskābes šķīdumu acetonitrilā (ACN) pagatavoja 1,0 L ACN izšķīdinot 1,0 mL koncentrētas skudrskābes. Iegūto šķīdumu samaisīja.

Standartšķīdumu pagatavošana. Hromatogrāfijas pudelītē uz analītiskajiem svāriem iesvēra precīzu iesvaru standartvielas un pievienoja nepieciešamo dimetilsulfoksīda (DMSO) daudzumu, lai iegūtu šķīduma koncentrāciju ~5 mg/mL (precīzas koncentrācijas parādītas 2.2. tabulā). Iegūto šķīdumu samaisīja. Darba šķīdums tika pagatavots atšķaidot dimetilsulfoksīda šķīdumu koncentrātus 15 reizes ar dimetilsulfoksīda. Lai iegūtu zemāko kvalitātes kontroles paraugu (LQC), darba šķīdums tika atšķaidīts 50 reizes ar DMSO (skatīt 2.2. tabulu).

Analizējamo vielu darba šķīdumu pagatavošana

	LFX	LZD	D-LFX	BDQ	D-BDQ	DLM	LFX-N
Standartšķīdums, $\mu\text{g/mL}$	4980	4900	4900	5000	4850	4950	4900
Darba šķīdums, $\mu\text{g/mL}$	332	327	327	117	194	17	196
50x atšķaidīts darba šķīdums*, $\mu\text{g/mL}$	6,64	6,53	6,53	2,33	3,88	0,33	3,92

* tika izmantots LQC un LLOQ paraugiem (skatīt kvalitātes kontroles paraugu pagatavošanu)

Iekšējā standarta (IS) šķīdumu pagatavošana. Hromatogrāfijas pudelītē uz analītiskajiem svāriem iesvēra precīzu iesvaru IS (rezerpīnu vai varfarīnu) un pievienoja nepieciešamo dimetilsulfoksīda daudzumu, lai iegūtu šķīduma koncentrāciju 1,00 mg/mL. Iegūto šķīdumu samaisīja. Lai iegūtu proteīnu izgulsnēšanas šķīdumu kopā ar iekšējo standarta šķīdumu ($\gamma=0,05 \mu\text{g/mL}$), koniskajā kolbā pie 100 mL ACN/MeOH (3:1, v/v) pievienoja 0,005 mL varfarīna vai rezerpīna standartšķīdumu ar koncentrāciju 1 mg/mL.

Šķīdumu sagatavošana proteīnu izgulsnēšanas eksperimentam. Proteīnu izgulsnēšanai izmantoja ACN, MeOH un to šķīdumu maisījumus (3:1; 1:3 un 1:1). Centrifūgas mēģenē pie 20 μL asins plazmas ar analizējamās vielas piedevu, pievienoja 300 μL izgulsnētāja šķīduma. Paraugu samaisīja ar maisītāju un centrifugēja (10000 apgr./min, 10 min). 200 μL centrifugāta pārnesa LC pudelītē un pievienoja 600 μL 0,1 % skudrskābes šķīduma ūdenī.

Optimālās attiecības plazma-izgulsnētājs noteikšanai tika pagatavoti paraugi, kuros plazma pret proteīnu izgulsnētāju ir attiecībā 1:4, 1:9 un 1:15. Centrifūgas mēģenē pie 50 μL plazmas ar analizējamās vielas piedevu (30 $\mu\text{g/mL}$) pievienoja 200 μL ACN/MeOH (3:1, v/v). Paraugu samaisīja ar maisītāju un centrifugēja (10000 apgr./min, 10 min). 50 μL centrifugāta pārnesa LC pudelītē un pievienoja 590 μL 0,1 % skudrskābes šķīduma ūdenī. Ieguva paraugu, kurā plazma pret proteīnu izgulsnētāju ir attiecībā 1:4. Plazmas un proteīnu izgulsnētāja šķīdumi attiecībā 1:9 un 1:15 tika pagatavoti līdzīgi, gala koncentrācija analizējamām vielām visos paraugos bija vienāda.

2.5. Paraugu sagatavošana LC-MS/MS analīzei

Kalibrācijas paraugu pagatavošana. Darba šķīdumu diapazons tika izvēlēts balstoties prettuberkulozes zāļu vielu mērķa koncentrācijām klīniskajos paraugos (skatīt 1.1. tabulu), kalibrācijas standartšķīdumu koncentrācijas apkopotas 2.3. tabulā. Centrifūgas mēģenē pie 230 μ L plazmas pievienoja 10 μ L analizējamo vielu darba šķīdumus (skatīt 2.2. tabulu), ieguva standartšķīdumu ar augstāko analīta koncentrāciju. Pārējos piecus standartšķīdumus ieguva veicot pakāpenisko atšķaidīšanu, atšķaidot 2,5 reizes katru iepriekšējo standartšķīdumu ar asins plazmu.

2.3. tabula

Analizējamo vielu kalibrēšanas diapazons asins plazmā

#	Standartšķīduma koncentrācija, μ g/mL						
	LFX	LZD	D-LFX	BDQ	D-BDQ	DLM	LFX-N
Std6	13,83	13,61	13,61	4,86	8,08	0,69	8,17
Std5	5,53	5,44	5,44	1,94	3,23	0,28	3,27
Std4	2,21	2,18	2,18	0,78	1,29	0,11	1,31
Std3	0,89	0,87	0,87	0,31	0,52	0,04	0,52
Std2	0,35	0,35	0,35	0,12	0,21	0,02	0,21
Std1	0,14	0,14	0,14	0,05	0,08	0,01	0,08

Kvalitātes kontroles paraugu pagatavošana. Nepieciešamās kvalitātes kontroles paraugu koncentrācijas tika izvēlētas balstoties uz bioanalītisko metožu validācijas vadlīnijām [55]. Veicot pakāpenisko atšķaidīšanu tika pagatavoti QC paraugi četros koncentrācijas līmeņos, kas aptver visu kalibrēšanas diapazonu, proti: 1) QC paraugs, kas atbilst zemākās kvantitatīvās noteikšanas robežai (LLOQ), 2) QC paraugs, kas raksturo LQC līmeni (3 reizes lielāks nekā LLOQ), 3) QC paraugs, kas raksturo vidējo koncentrāciju līmeni MQC (36% no kalibrēšanas līknes diapazona) un 4) QC paraugs, kas raksturo augstāko koncentrāciju līmeni HQC (75% no augšējās kalibrēšanas līknes diapazona). Kvalitātes kontroles vielu koncentrācijas apkopotas 2.3. tabulā. Centrifūgas mēģenē pie 160 μ L plazmas pievienoja 5 μ L analizējamo vielu darba šķīdumu (skatīt 2.2. tabulu), ieguva augstāko kvalitātes kontroles paraugu (HQC). Vidējo kvalitātes kontroles paraugu (MQC) ieguva 2 reizes atšķaidot HQC, pie 40 μ L asins plazmas pievienoja 40 μ L HQC asins plazmas paraugu. Lai iegūtu zemāko kvalitātes kontroles paraugu (LQC), pie 145 μ L asins plazmas pievienoja 10 μ L 50 reizes atšķaidīto darba šķīdumu (skatīt 2.2. tabulu). Zemāko kvantitatīvās noteikšanas robežas

paraugu (LLOQ) ieguva 3 reizes atšķaidot LQC paraugu, pie 40 µL asins plazmas pievienoja 20 µL LQC asins plazmas parauga. Kvalitātes kontroles paraugu koncentrācijas asins plazmā ir apkopotas 2.4. tabulā.

2.4. tabula

Analizējamo vielu QC paraugu koncentrācijas asins plazmā, µg/mL

	LFX	LZD	D-LFX	BDQ	D-BDQ	DLM	LFX-N
HQC	10,06	9,90	9,90	3,54	5,88	0,50	5,94
MQC	5,03	4,95	4,95	1,77	2,94	0,25	2,97
LQC	0,43	0,42	0,42	0,15	0,25	0,02	0,25
LLOQ	0,14	0,14	0,14	0,05	0,08	0,01	0,08

Analītisko paraugu pagatavošana

Centrifūgas mēģenē pie 20 µL asins plazmas standartšķīduma vai QC parauga pievienoja 500 µL atdzesēta proteīnu izgulsnēšanas šķīdumu (varfarīns, $\gamma = 0,05 \mu\text{g/mL}$, ACN/MeOH, 3:1, v/v). Proteīnu izgulsnēšanu veica uz ledus. Paraugus samaisīja ar magnētisko maisītāju un centrifugēja 10 minūtes pie 10000 apgriezieniem minūtē. 400 µL centrifugāta pārnesa LC pudelītē un pievienoja 400 µL dejonizēta ūdens.

2.6. Metodes validācija

Jebkuras analītiskās metodes validācija palīdz sasniegt ticamus rezultātus, kas ir nepieciešami, lai pieņemtu pareizus lēmumus par zāļu vielu devām un pacientu drošību. Izstrādātās metodes validācija tika veikta saskaņā ar Eiropas Zāļu aģentūras (EMA) izstrādātajām vadlīnijām [55]. Lai nodrošinātu pieņemamu metodes veiktspēju un analītisko rezultātu ticamību, tika noteikta selektivitāte, precizitāte un pareizība, matricas ietekme, plazmas paraugu un darba šķīdumu stabilitāte un izvērtētas paraugu apstrādes iespējas.

Selektivitāte ir analītiskās metodes spēja diferencēt analītu no endogēnajiem matricas komponentiem un citiem savienojumiem kas ir matricā. Analītiskās metodes selektivitātes noteikšanai analizēja 6 dažādas tukšo paraugu ($n=2$) matricas (bez analīta) un novērtēja traucējošo komponentu ietekmi uz analītisko signālu.

Traucējošie komponenti neietekmē metodes veiktspēju, ja tukšā parauga signāls nepārsniedz 20 % no zemākās kvantitatīvās noteikšanas robežas (LLOQ) signāla analizējamai

vielai. Selektivitātes ietekme uz analizējamās vielas signālu tika aprēķināta pēc 2.1. vienādojuma.

$$\text{Selektivitāte, \%} = \frac{I_0}{I_{LLOQ}} \cdot 100 \quad (2.1.),$$

kur I_0 ir tukšā parauga signāla intensitāte,

I_{LLOQ} ir zemākas kvantitatīvās robežas signāla intensitāte

Tukšā parauga pagatavošanai, centrifūgas mēģenē pie 20 μL asins plazmas pievienoja 500 μL iekšējā standartšķīduma. Paraugus samaisīja ar magnētisko maisītāju un centrifugēja 10 minūtes pie 10000 apgriezieniem minūtē. 400 μL centrifugāta pārnesa LC pudelītē un pievienoja 400 μL dejonizēta ūdens.

Masas pārneses novērtēšanai tika salīdzināts tukšā parauga radītais signāls pēc lielākās koncentrācijas kalibrēšanas standartšķīduma. Signālu intensitātes attiecība nedrīkst būt lielāka par 20 % no zemākās kvantitatīvās robežas signāla intensitātes. Masas pārnese tika aprēķināta pēc 2.2. vienādojuma.

$$\text{Masas pārnese} = \frac{I_0}{I_{LLOQ}} \cdot 100\% \quad (2.2.),$$

kur I_0 ir tukšā parauga signāla intensitāte,

I_{LLOQ} ir zemākas kvantitatīvās robežas signāla intensitāte

Zemākā kvantificēšanas robeža (LLOQ) ir zemākā analizējamās vielas koncentrācija paraugā, kam ir apmierinoša pareizība (RK) un precizitāte (RSN) un kura analīta signāls pret tukšā parauga radīto signālu ir vismaz 5 reizes lielāks, to aprēķina pēc 2.3. formulas.

$$LLOQ = \frac{I_{LLOQ}}{I_0} \quad (2.3.),$$

kur I_{LLOQ} ir zemākas kvantitatīvās robežas signāla intensitāte,

I_0 ir tukšā parauga signāla intensitāte,

RK un RSN vērtības nedrīkst pārsniegt 20 % LLOQ līmenī. Bioekvivalences pētījumiem LLOQ vērtībai nevajadzētu pārsniegt 5% no C_{max} vērtības, bet farmakokinētikas pētījumiem nav nepieciešamas tik zemas noteikšanas robežas. Paraugu sagatavošana aprakstīta 2.5. nodaļā.

Kalibrēšanas diapazona intervāls un paraugu sagatavošana tika aprakstīta 2.5. nodaļā. Kalibrēšanas diapazona pareizības un precizitātes novērtēšanai tika izmantotas trīs kalibrēšanas taisnes, trīs dažādās dienās. Vismaz 50 % no katra kalibrēšanas standarta līmeņa aprēķinātajām koncentrācijas vērtībām, jābūt 15 % kļūdas robežās no to nominālās vērtības (LLOQ līmenī 20 %). Šiem kritērijiem jāizpildās vismaz 75% no kalibrēšanas standartiem, vismaz 6 dažādos koncentrāciju līmeņos.

Pareizība (accuracy) un precizitāte (precision). Analītiskās metodes pareizība raksturo rezultātu atbilstību analizējamās vielas nominālajai koncentrācijai, tā novērtēšanai izmanto relatīvo kļūdu (RK). Precizitāte raksturo rezultātu izkliedi, tā novērtēšanai izmanto relatīvo standartnovirzi (RSN). Pareizības un precizitātes noteikšanai izmantoja sešus paralēlos kvalitātes kontroles paraugus četros koncentrāciju līmeņos gan vienas sērijas, gan starp-sērijas ietvaros, kad kvalitātes kontroles paraugi tika analizēti trīs dažādās dienās. Vidējai kvalitātes kontroles koncentrāciju RK un RSN vērtībai ir jābūt 15% robežās (20% LLQC līmenī). Relatīvā kļūda (RK) un relatīvā standartnovirze (RSN) tika aprēķināta pēc 2.4. un 2.5. vienādojumiem.

$$RK, \% = \frac{A-B}{B} \cdot 100 \text{ (2.4.)},$$

kur A - vidējā parauga izmērītā koncentrācija, B - parauga nominālā koncentrācija

$$RSN, \% = \frac{S_n}{\bar{X}} \cdot 100 \text{ (2.5.)},$$

kur S_n - standartnovirze, \bar{X} - vidējā izmērītā koncentrācija

Atšķaidīšana. Paraugu atšķaidīšana nedrīkst ietekmēt rezultātu pareizību un precizitāti. Atšķaidīšanas ietekmes novērtēšanai tika pagatavoti asins plazmas paraugi ar pievienotu analizējamo vielu, kuru koncentrācija ir divas reizes lielāka kā augšējā noteikšanas robeža (6. kalibrēšanas standarts). Centrifūgas mēģenē pie 230 μ L asins plazmas pievienoja 20 μ L analizējamo vielu darba šķīdumu (skatīt 2.2. tabulu), ieguva paraugu, kura koncentrācija bija 2 reizes lielāka nekā 6. kalibrēšanas standartam.

Atšķaidīšana ar asins plazmu. Centrifūgas mēģenē pie 80 μ L asins plazmas pievienoja 20 μ L asins plazmas parauga, kura koncentrācija ir 2 reizes lielāka nekā 6. kalibrēšanas standartam, paraugs tika atšķaidīts 5 reizes ar asins plazmu. Centrifūgas mēģenē pie 90 μ L asins plazmas pievienoja 10 μ L asins plazmas paraugu, kura koncentrācija ir 2 reizes lielāka

nekā 6. kalibrēšanas standartam, paraugs tika atšķaidīts 10 reizes ar asins plazmu. Pie 20 µL ar asins plazmu atšķaidītajiem paraugiem pievienoja 500 µL atdzesētu iekšējā standartšķīduma. Paraugus samaisīja ar magnētisko maisītāju un centrifugēja 10 minūtes pie 10000 apgriezieniem minūtē. 400 µL centrifugāta pārnesa LC pudelītē un pievienoja 400 µL dejonizēta ūdens.

Atšķaidīšana ar asins plazmas ekstraktu. Plazmas ekstrakts tika pagatavots kā tukšais paraugs, centrifūgas mēģenē pie 3000 µL atdzesēta iekšējā standartšķīduma pievienoja 120 µL asins plazmu, paraugus samaisīja ar magnētisko maisītāju un centrifugēja 10 minūtes pie 10000 apgriezieniem minūtē. 3000 µL centrifugāta pārnesa pudelītē un pievienoja 3000 µL dejonizēta ūdens, tika iegūts asins plazmas ekstrakts. Pie 20 µL asins plazmas parauga, kura koncentrācija ir 2 reizes lielāka nekā 6. kalibrēšanas standartam pievienoja 500 µL iekšējā standartšķīduma. Paraugus samaisīja ar magnētisko maisītāju un centrifugēja 10 minūtes pie 10000 apgriezieniem minūtē. 400 µL centrifugāta pārnesa LC pudelītē un pievienoja 400 µL dejonizēta ūdens. Lai atšķaidītu paraugus 5 reizes ar asins plazmas ekstraktu, pie 100 µL sagatavotā parauga pievienoja 400 µL plazmas ekstrakta. Lai atšķaidītu paraugus 10 reizes ar asins plazmas ekstraktu, pie 50 µL sagatavotā parauga pievienoja 450 µL plazmas ekstrakta.

Visus parauga sagatavošanas soļus veica uz ledus.

Katram atšķaidīšanas faktoram tika analizēti 5 paralēlie paraugi. RSN un RK vērtības nedrīkst pārsniegt 15 %.

Matricas efekts. Matricas ietekme uz analītisko signālu tika izvērtēta analizējot 6 dažādus tukšās asins plazmas paraugus ($n=2$), kuriem pēc plazmas ekstrakcijas pievienoja analizējamās vielas divās QC līmeņos (LQC un HQC). Centrifūgas mēģenē pie 20 µL tukšās asins plazmas pievienoja 500 µL atdzesēta IS, paraugus samaisīja ar magnētisko maisītāju un centrifugēja 10 minūtes pie 10000 apgriezieniem minūtē. Pie 160 µL centrifugāta pievienoja 5 µL darba šķīdumu, ieguva HQC paraugu, kuram analizējamā viela pievienota pēc asins plazmas ekstrakcijas. Pie 145 µL centrifugāta pievienoja 10 µL 50 reizes atšķaidīto darba šķīdumu, ieguva LQC paraugu, kuram analizējamā viela pievienota pēc asins plazmas ekstrakcijas. Iegūtos paraugus atšķaidīja divas reizes ar dejonizēta ūdens.

Salīdzināšanai izmantoja QC paraugus ($n=2$), kuriem netika pievienota matrica. Centrifūgas mēģenē pie 20 µL dejonizēta ūdens pievienoja 500 µL IS. Pie 160 µL iegūtā šķīduma pievienoja 5 µL darba šķīdumu, ieguva HQC paraugu, kuram analizējamā viela pievienota paraugam bez asins plazmas. Pie 145 µL iegūtā šķīduma pievienoja 10 µL 50x

atšķaidīto darba šķīdumu, ieguva LQC paraugu, kuram analizējamā viela pievienota paraugam bez asins plazmas. Iegūtos paraugus atšķaidīja divas reizes ar dejonizēta ūdens.

Matricas efekta novērtēšanai izmantoja matricas faktoru (MF), kuru aprēķināja pēc 2.6. formulas. Ja MF vērtības ir <1,0 norāda uz negatīvu matricas efektu, bet > 1,0 uz pozitīvu matricas efektu. Rezultātu RSN starp dažādiem asins plazmas paraugiem nedrīkst būt lielāka par 15%.

$$MF = \frac{A_M}{A_{B/M}} \quad (2.6.),$$

kur A_M - hromatogrāfiskās joslas laukums paraugam ar matricas piedevu,

$A_{B/M}$ – hromatogrāfiskās joslas laukums paraugam bez matricas piedevas

Stabilitāte. Pētījumā tika izvērtēta asins plazmas paraugu un standartvielu sagatavošanas un uzglabāšanas apstākļu ietekme uz analizējamo vielu stabilitāti. Analīta stabilitāte asins plazmā tika novērtēta analizējot zemas un augstas kvalitātes kontroles līmeņa paraugus (LQC un HQC). Kvalitātes kontroles paraugu sagatavošanu skatīt 2.5. nodaļā. Sasaldētu asins plazmas paraugu atkausēšanu veica ledusskapī (+4 °C)

Tika veikti sekojoši stabilitātes testi:

- analizējamo vielu standartšķīdumu stabilitāte, paraugus uzglabājot saldētavā (-20 °C) 14 mēnešus ($n=2$);
- analizējamo vielu stabilitāte sagatavotajos paraugos, glabājot šķidrumu hromatogrāfa automātiskajā paraugu ņemšanas ierīcē (*autosampler*) 23 stundas, +4 °C ($n=6$);
- analizējamo vielu ilgtermiņa stabilitāte asins plazmā, veicot sasaldēšanas un atkausēšanas eksperimentu, trīs cikli 10 dienu laikā, uzglabājot saldētavā (-20 °C) un atkausējot ledusskapī, +4 °C ($n=2$);
- analizējamo vielu īstermiņa stabilitāte asins plazmā, inkubējot paraugus istabas temperatūrā, ACN/MeOH (3:1, v/v) tika pievienots pēc 15; 30; 60 un 240 min ($n=1$);
- analizējamo vielu īstermiņa stabilitāte asins plazmā, paraugus glabājot +4 °C, proteīnu izgulsnēšanu veica uz ledus ar atdzesētu ACN/MeOH (3:1, v/v) pēc 15; 30; 60 un 240 min ($n=2$);
- analizējamo vielu ilgtermiņa stabilitāte asins plazmā, paraugus glabājot saldētavā (-20 °C) 1 dienu, 7 dienas un 30 dienas ($n=2$);

- analizējamo vielu ilgtermiņa stabilitāte asins plazmā, paraugus glabājot saldētavā (-80 °C) 30 dienas ($n=2$).

Analizējamo vielu stabilitāti aprēķināja pēc 2.7. vai 2.8. formulas.

$$Stabilitāte, \% = \frac{A_{stab}}{A_0} \cdot 100 \quad (2.7.)$$

kur A_{stab} – hromatogrāfiskās joslas laukums stabilitātes paraugam

A_0 – hromatogrāfiskās joslas laukums sākuma paraugam

$$Stabilitāte, \% = \frac{C_{stab}}{C_0} \cdot 100 \quad (2.8),$$

kur C_{stab} – analizējamās vielas koncentrācija stabilitātes paraugam

C_0 – analizējamās vielas koncentrācija sākuma paraugam

Paraugu stabilitātei jābūt robežās no 85 % līdz 115 %, lai paraugu varētu uzskatīt par stabilu.

3. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

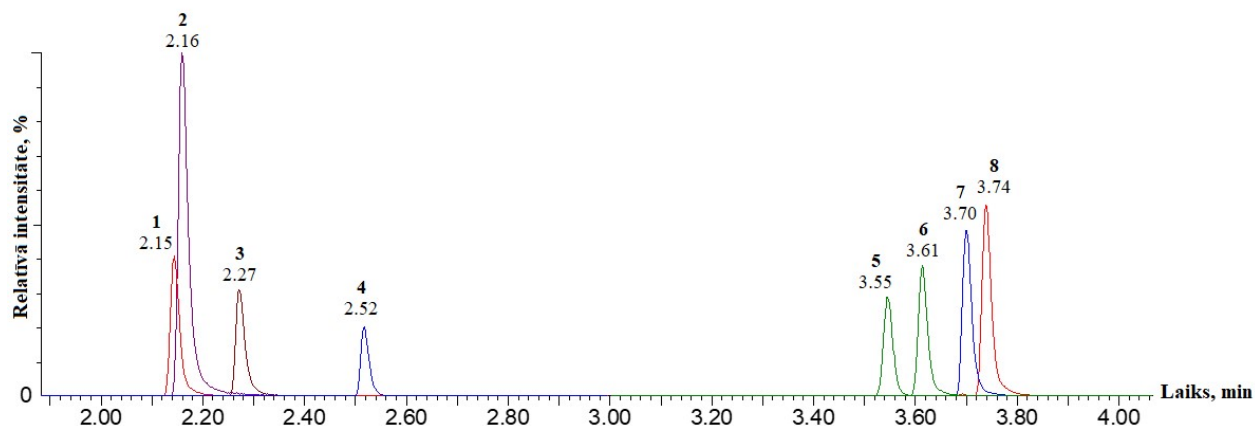
3.1 Analītiskās metodes izstrāde

Otrās izvēles prettuberkulozes zāļu un to metabolītu kvantitatīvai analīzei asins plazmas paraugos izmantoja hromatogrāfijas-tandēmmasspektrometrijas metodi ar pozitīvās elektroizsmidzināšanas jonizāciju (ESI+). Šī metode ir jutīga un selektīva, piemērota prettuberkulozes zāļu un to metabolītu kvantitatīvai analīzei bioloģiskās matricās.

Masspektrometrijas parametri. Metodes izstrādei tika veikta MS/MS jonu pāreju noteikšana, izmantojot *XEVO TQ-S (Waters)* masspektrometru. Prettuberkulozes zāļu un to metabolītu jonu pārejas noteica, mainot konusa enerģiju un kapilāra spriegumu, pēc kura izvēlējās intensīvāko prekursorjonu. Mainot kolīzijas enerģiju, izvēlējās intensīvāko fragmentjonu. Piemērotākie masspektrometra parametri prettuberkulozes zāļu, to metabolītu un varfarīna (IS) noteikšanai norādīti 2. nodaļā 2.1. tabulā. Analizējamo vielu pilnas jonu strāvas un protonētā molekulārā jona sabrukšanas masspektri ir pievienoti 7. pielikumā.

Hromatogrāfijas parametri. Metodes izstrādei tika veikta hromatogrāfisko joslu atdalīšana un šauru joslu iegūšana, izmantojot *Acquity UPLC H-class* šķīduma hromatogrāfu (*Waters*).

Lai novērtētu analizējamo vielu maisījumu sadalīšanas iespējas, tika izvēlētas 3 dažādas *Waters* hromatogrāfiskās kolonnas: Acquity UPLC BEH C18 (50 mm×2,1 mm 1,7 μm); Acquity UPLC BEH C8 (75 mm×2,1 mm 1,7 μm) un Acquity UPLC CSH C18 (100 mm×2,1 mm 1,7 μm). Analizējamās vielas spēcīgi mijiedarbojas gan ar C8, gan C18 kolonnu stacionāro fāzi, tika iegūtas šauras hromatogrāfiskās joslas. N-Demetillevofloksacīna un levofloksacīna joslu iznākšanas laiki atšķiras tikai par vienu minūtes simtdaļu (skatīt 3.1. attēlā), tāpēc tika izmēģinātas analizējamo vielu sadalīšanas iespējas, izmantojot Acquity UPLC CSH C18 (100 mm×2,1 mm 1,7 μm) hromatogrāfisko kolonnu. Garākas kolonas un garākas hromatogrāfiskās metodes izmantošana nenodrošināja savstarpēji pārklājošos joslu atdalīšanu. Par stacionāro fāzi izvēlējās Acquity UPLC BEH C18 (50 mm×2,1 mm 1,7 μm) hromatogrāfisko kolonnu.

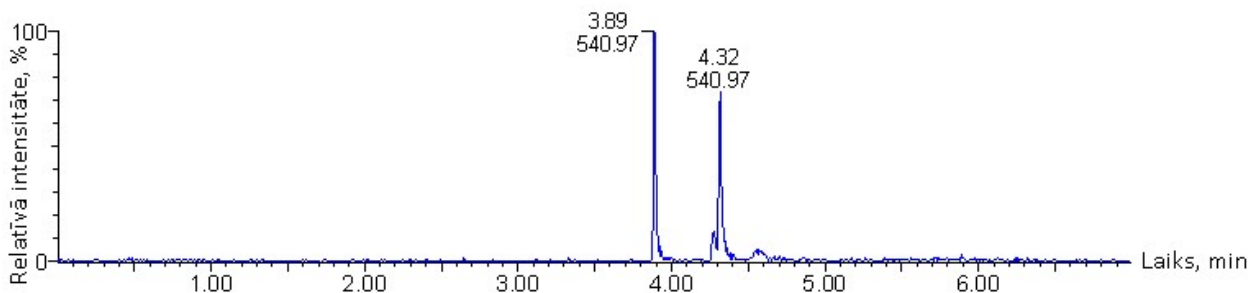


3.1. att. Analizējamo vielu MRM hromatogrammu pārklājums, 1. D-LFX (2,15); 2. LFX (2,16); 3. LFX-N (2,27); 4. LZD (2,52); 5. IS (3,55); 6. DLM (3,61); 7. D-BDQ (3,70); 8. BDQ (3,74)

Hromatogrāfisko joslu pārklājumu savstarpēji traucējošo ietekmi novērtēja, analizējot katru analizējamo vielu atsevišķi. Eksperimenta laikā netika novērota analītiskā signāla parādīšanās citā kanālā, kā arī metodes validācijas selektivitātes rezultāti (skatīt 3.3. nodaļu) apstiprina, ka izstrādātā metode ir selektīva.

Literatūras apskatā iekļautajās publikācijās (skatīt 1.7. nodaļas 1.2. tabulu) analizējamo vielu un to metabolītu kvantitatīvai noteikšanai visbiežāk par kustīgo fāzi izmantoja ACN vai MeOH šķīdumus un ūdens fāzi ar skudrskābes piedevu, lai iegūtu labāku joslu formu un signāla intensitāti.

Par kustīgo fāzi izvēlējās ACN vai MeOH un 0,1 % skudrskābes ūdens šķīdumu gradienta režīmā. N-Demetilbedakvilīna hromatogrāfiskā josla sadalās, ja par kustīgo fāzi izmanto MeOH un 0,1 % skudrskābes ūdens šķīdumu (skatīt 3.2. attēlu).



3.2. att. N-Demetilbedakvilīna MRM hromatogramma, kustīgā fāze: MeOH un 0,1 % skudrskābes ūdens šķīdums

Izmantojot ACN un 0,1 % skudrskābes ūdens šķīdumu tika iegūtas smailas joslas, kas nedalās.

Izvērtējot literatūrā aprakstītās metodes, tika izmēģināta 0,1% skudrskābes piedevas pievienošana ACN kustīgajai fāzei. Eksperimenta laikā netika novērota analītiskā signāla intensitātes palielināšanās, salīdzinot ar ACN kustīgo fāzi bez FA piedevas, tāpēc par kustīgo fāzi izvēlējās ACN un 0,1 % skudrskābes ūdens šķīdumu.

Strukturāli atšķirīgo analizējamo vielu maisījumu sadalīšanai izvēlējās ACN un 0,1% skudrskābes šķīdumu ūdenī gradienta apstākļos, kas sākas ar 5 % organiskā šķīdinātāja saturu, lai apgrieztās fāzes apstākļos eluētu polārākos savienojumus (LFX, D-LFX, N-LFX un LZD) un pakāpeniski palielinot ACN saturu līdz 98 %, kad eluējas mazāk polārie savienojumi (BDQ, D-BDQ, DLM un IS). Lai palielinātu hromatogrāfisko joslu intensitāti un samazinātu matricas efektu, savienojumu detektēšanas intervāls tika sadalīts divās daļās. No 0. līdz 3. min tika detektēts LFX, D-LFX, N-LFX un LZD, no 3. līdz 7. min tika detektēts BDQ, D-BDQ, DLM un IS.

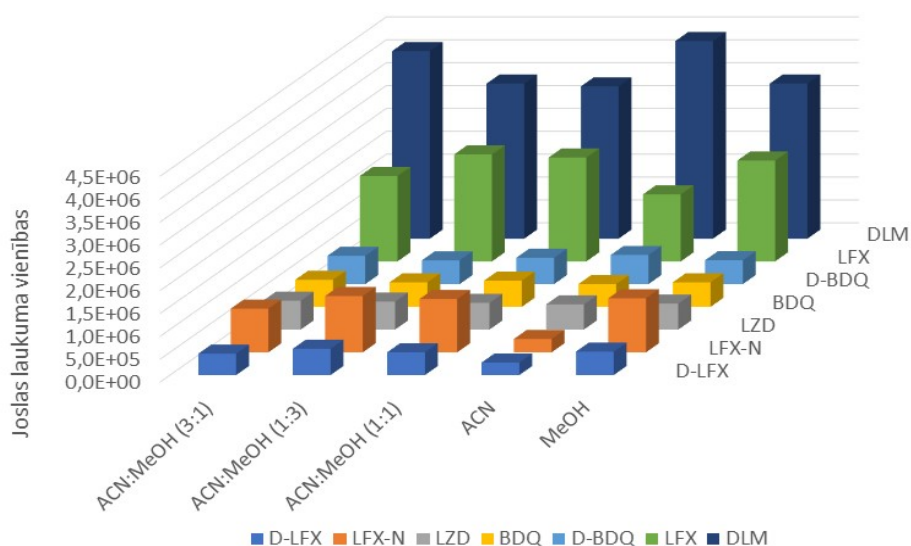
Plūsmas ātruma izvēle. Palielinot plūsmas ātrumu var uzlabot joslas formu, samazināt joslas platumu un palielināt augstumu, jo palielinās līdzsvara iestāšanās ātrums. Piemērotākais kustīgās fāzes plūsmas ātrums ir 0,40 mL/min [44].

Organiskā šķīdinātāja daudzums kustīgajā fāzē. Balstoties uz literatūras datiem par organiskā šķīdinātāja daudzumu kustīgajā fāzē (15 – 20 % izokrātiskajā režīmā, skatīt 1.6. nodaļu), tika pārbaudīti trīs gradienta režīmi, kuros ACN sākuma koncentrācija ir 5 %; 10 % un 15 %. Izmantojot kustīgo fāzi ar ACN saturu sākot no 15 %, hromatogrāfijas joslas forma nav piemērota kvantitatīvai analīzei, N-demetillevofloksacīna (D-LFX) un levofloksacīna (LFX) joslas sadalās. Kustīgajā fāzē ar ACN saturu sākot no 10 % hromatogrāfijas joslas forma ir apmierinoša, joslas nedalās. Kustīgajā fāzē ar ACN saturu sākot no 5 % hromatogrāfijas joslas forma ir šaura, un šāds kustīgās fāzes saturs ir piemērots visu analizējamo vielu un to metabolītu kvantitatīvai analīzei [44].

Injekcijas tilpuma izvēle. Nepieciešamības gadījumā analizējamā signāla jutības palielināšanai vai samazināšanai ir iespējams mainīt parauga injekcijas tilpumu no 1 µL līdz 5 µL [44].

3.2. Paraugu sagatavošana

Proteīnu izgulsnēšana. Proteīni, saskaroties ar kustīgās fāzes organiskajiem šķīdinātājiem, veido nogulsnes un absorbējas stacionārajā fāzē, tāpēc nepieciešama proteīnu atdalīšana pirms paraugu analīzes ar LC-MS. Masspektrometra detektoram piemērotākie šķīdinātāji ir ACN, MeOH un to maisījumi. Plazmas proteīnu izgulsnēšanai, lai kvantitatīvi noteiktu prettuberkulozes zāles un to metabolītus, tika izvēlēts ACN, MeOH un to maisījumi dažādās tilpuma attiecībās (1:3, 3:1 un 1:1). Visiem izvēlētajiem proteīnu izgulsnēšanas šķīdumiem bija apmierinošas atsauces uz hromatogrāfijas joslas formu, un šķīdumi bija dzidri.



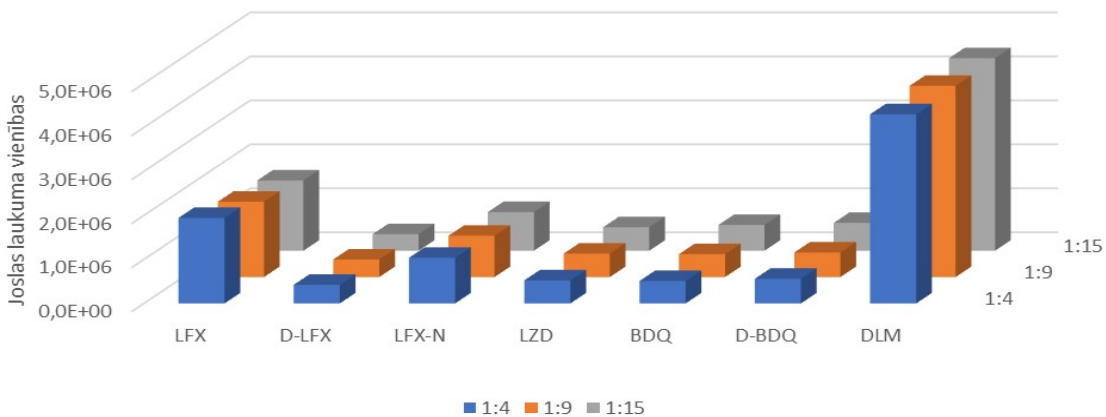
3.3. att. Plazmas proteīnu izgulsnētāja ietekme uz otrās izvēles prettuberkulozes zāļu un to metabolītu joslu laukumiem.

3.4. attēlā var redzēt, ka levofloksacīnam (LFX) un levofloksacīna N-oksīdam (LFX-N) piemērotākais proteīnu izgulsnētājs ir MeOH un šķīdumi ar augstu MeOH saturu, savukārt delemānīdam (DLM) piemērotākais proteīnu izgulsnētājs ir ACN un šķīdumi ar augstu ACN saturu. Kolonnā vēlams ievadīt paraugu, kas izšķīdināts šķīdinātājā, kas līdzīgs kustīgajai fāzei. Grafikā var novērot, ka nav lielas atšķirības hromatogrāfiskās joslas laukumā izvēloties par izgulsnētāju ACN:MeOH (1:3; v/v) vai ACN:MeOH (3:1; v/v), tāpēc, lai paraugs būtu līdzīgāks kustīgās fāzes sastāvam par plazmas proteīnu izgulsnētāju izvēlētajās ACN:MeOH (3:1; v/v).

Paraugu atšķaidīšana pēc proteīnu izgulsnēšanas ar ūdens fāzi ir nepieciešama, lai parauga šķīdinātāja sastāvs būtu pēc iespējas līdzīgāks kustīgās fāzes sastāvam. Paraugus

atšķaidot ar 0,1 % skudrskābes šķīdumu ūdenī, iegūtā signāla intensitāte bija lielāka, salīdzinot ar dejonizētu ūdeni, bet skudrskābes šķīdumu paraugi bija nedaudz duļķaini, tāpēc, lai novērstu kolonnas piesārņojumu, paraugu atšķaidīšanai izmantoja dejonizētu ūdeni.

Minimālā nepieciešamā plazma-izgulsnētājs attiecība ir 1:3. Palielinot proteīna izgulsnētāja daudzumu, norit pilnīgāka proteīnu izgulsnēšana, samazinās matricas efekts (paraugs tiek vairāk atšķaidīts).



3.4. att. Plazmas un proteīnu izgulsnētāja attiecības ietekme uz otrās izvēles prettuberkulozes zāļu un to metabolītu joslu laukumiem.

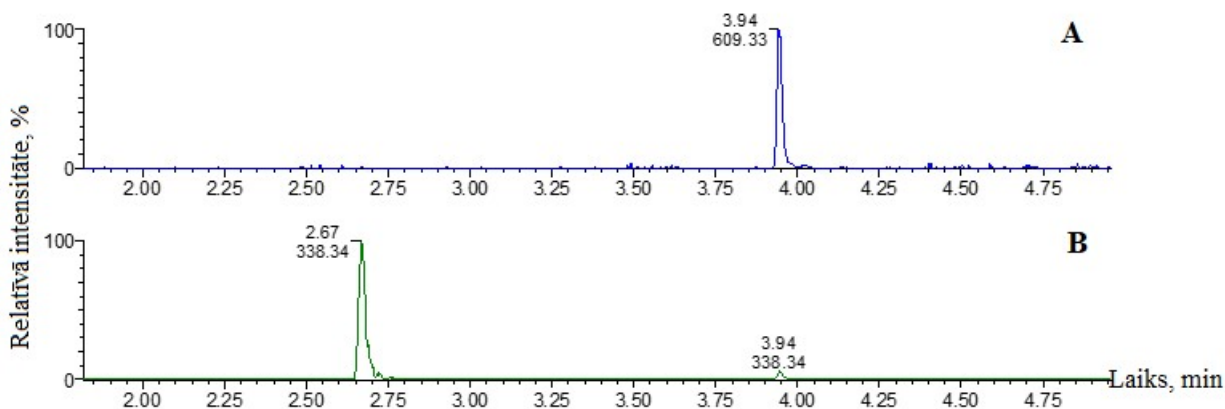
3.4. attēls uzskatāmi parāda, ka nav būtiskas atšķirības, kāda ir plazmas un ACN/MeOH (3:1, v/v) attiecība paraugu sagatavošanai.

Iekšējā standarta izvēle. Iekšējā standarta (IS) izmantošana ļauj izvērtēt metodes precizitāti un pareizību paraugu sagatavošanā, kā arī kompensēt iespējamās instrumenta kļūdas. Piemērotākais IS ir izotopiski iezīmēts standarts (analizējamās vielas analogs). Šie standarti ir dārgi un to pieejamība ir ierobežota, tāpēc par iekšējo standartu tika izvēlēts rezerpīns vai varfarīns, ko pievienoja ACN/MeOH (3:1, v/v) plazmas proteīnu izgulsnēšanas šķīdumam.

Rezerpīns un varfarīns ir strukturāli atšķirīgi no izvēlētajām prettuberkulozes zālēm un to metabolītiem, tāpēc šie IS nevar kompensēt parauga sagatavošanas laikā radušos zudumus, matricas efektu, analizējamās vielas sabrukšanu, bet tos var izmantot, lai pārbaudītu hromatogrāfiskās sistēmas veiktspēju. IS pagatavošana aprakstīta 2.4. nodaļā.

Izmantojot rezerpīnu kā iekšējo standartu, tika novērots papildus signāls linezolīda kanālā (RT – 3,94), kura izdalīšanās laiks sakrīt ar rezerpīna hromatogrāfiskās joslas

izdalīšanās laiku (skatīt 3.5. attēlu). Šī hromatogrāfiskā josla (RT – 3,94) linezolīda kanālā iespējams palielinātu rezerpīna hromatogrāfiskās joslas signālu, tāpēc rezerpīns netika izvēlēts par IS kvantitatīvās analīzes metodei.



3.5. att. A – rezerpīna (RT – 3,94) MRM hromatogramma, B – linezolīda (RT – 2,67) MRM hromatogramma

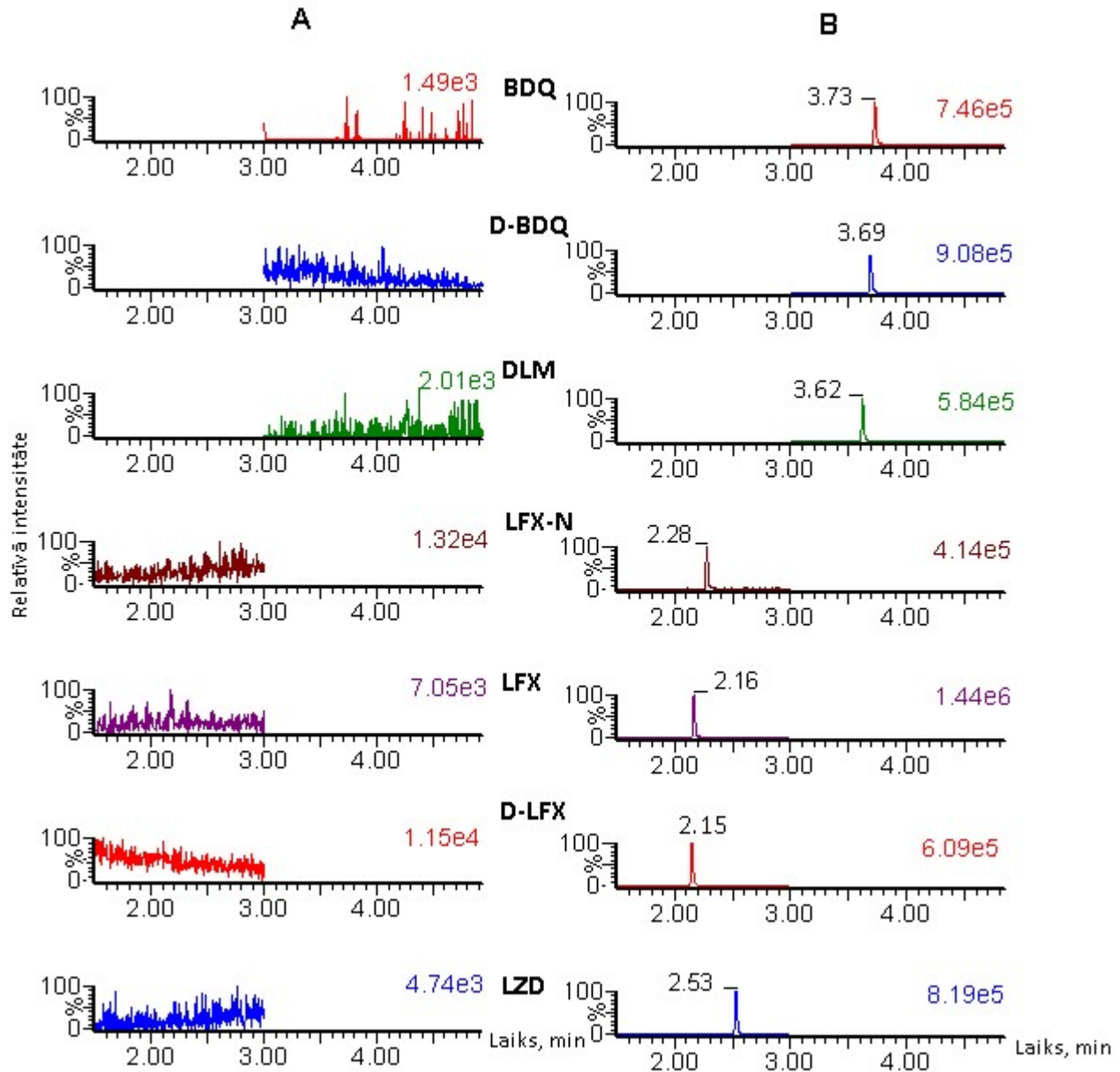
Varfarīna koncentrācija ACN/MeOH (3:1, v/v) šķīdumā $\gamma = 0,05 \mu\text{g/mL}$. Matrica nerādīja detektējamu signālu IS kanālā. Analizējot garas paraugu sekvenču, tika novērots, ka iekšējā standarta joslas laukums laika gaitā mainās un līdzsvars neiestājas pat pēc 6h. Relatīvā kļūda QC paraugiem ir $>20\%$ (skatīt 3. pielikuma 2. tabulu), ja aprēķinus veic izmantojot iekšējā standarta laukumu. Varfarīns nav piemērots IS izstrādātajai analīzes metodei un metodes validācijas aprēķini tika veikta bez IS.

3.3. Otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu kvantitatīvās noteikšanas metodes validācija

Selektivitāte. Izstrādātās metodes selektivitātes noteikšanai salīdzināja 6 dažādu cilvēku asins plazmas tukšo paraugu ($n=2$) radīto signālu ar analizējamās vielas radīto signālu LLOQ paraugā. Paraugu sagatavošana un selektivitātes aprēķināšanas formula aprakstīta 2.6. sadaļā.

3.6. attēla A daļā parādīta tukšā parauga MRM hromatogramma, kurā netika konstatēti matricas komponentu radītie signāli, kas varētu ietekmēt analizējamo vielu kvantitatīvu noteikšanu, bet B daļā parādīta LLOQ parauga MRM hromatogramma. Visu analizējamo vielu tukšā parauga radītais hromatogrāfiskās joslas signāls nepārsniedza 4 % no LLOQ signāla

(skatīt 1. pielikuma 1. tabulu), kas norāda uz to, ka izstrādātā metode ir selektīva analizējamo vielu noteikšanai dažādu cilvēku asins plazmā.



3.6. att. Analizējamo vielu MRM hromatogrammas. A – tukšā parauga hromatogramma, B – LLOQ

Masas pārnesē. Lai novērtētu masas pārnesi, injicēja tukšo paraugu uzreiz pēc augstākās koncentrācijas standarta. Tukšā parauga analītiskā signāla intensitāte tika salīdzināta ar LLOQ parauga signāla intensitāti. Iegūtie masas pārneses rezultāti ir no 0,6 līdz 14,0 % (skatīt 3.1. tabulu), kas atbilst validācijas prasībām.

Masas pārnese

Analizējamā viela	Signālu intensitāte LLOQ paraugā, intensitātes vienības • 10 ⁴	Signālu intensitāte tukšajā paraugā, intensitātes vienības •10 ⁴	Masas pārnese, %
LFX	144	20	13,9
D-LFX	60,9	7,63	12,5
LFX-N	41,4	2,31	5,6
LZD	81,9	0,515	0,6
BDQ	74,6	9,43	12,6
D-BDQ	90,8	12,7	14,0
DLM	58,4	3,32	5,7

Kvantitatīvās noteikšanas diapazons. Kalibrēšanas paraugus sagatavoja atbilstoši 2.5. nodaļā minētai metodikai. Kalibrēšanas diapazona pareizības un precizitātes pārbaudei izmantoja trīs kalibrēšanas taisnes ar sešiem koncentrāciju līmeņiem, kas tika iegūtas dažādās dienās, trīs analītisko sēriju ietvaros. Iegūtos rezultātus apstrādāja *TargetLynx* un *Excel* datu apstrādes programmās, kur iegūtajiem rezultātiem tika aprēķināta rezultātu precizitāte (RSN) un pareizība (RK), tā nepārsniedza 14 % visiem koncentrāciju līmeņiem (skatīt 2. pielikuma 1. – 7. tabulas), kas atbilst validācijas prasībām [55].

Metodes darba diapazonā novēroja kvadrātisku koncentrācijas un atsauces sakarību visām analizējamām vielām, izņemot delamanīdu, kuram novēroja lineāru sakarību. Determinācijas un korelācijas koeficientu R^2 vērtības bija no 0,996 līdz 0,99986 (skatīt 2. pielikuma 1. – 7. tabulas).

Zemākā kvantificēšanas robeža (LLOQ). Lai noteiktu zemāko drošas kvantificēšanas robežu, salīdzināja hromatogrāfiskās joslas signāla attiecību analizējamā paraugā un tukšajā paraugā. Atbilstoši validācijas vadlīnijām, signālam analītiskajā paraugā ir jābūt vismaz 5 reizes lielākam nekā tukšajā paraugā [55]. Signālu intensitāšu attiecība ir ≥ 33 . Iegūtie rezultāti apkopoti 3.2. tabulā.

Zemākās kvantificēšanas robežas (LLOQ)

Savienojums	Konc., µg/mL LLOQ paraugā	Signāla intensitāte tukšajā paraugā, intensitātes vienības •10 ⁴	Signāla intensitāte LLOQ paraugā, intensitātes vienības •10 ⁴	Signālu intensitāšu attiecība
LFX	0,142	0,588	144	245
D-LFX	0,139	0,861	60,9	71
LFX-N	0,084	1,26	41,4	33
LZD	0,139	0,459	81,9	178
BDQ	0,050	0,101	74,6	739
D-BDQ	0,083	1,18	90,8	77
DLM	0,007	0,211	58,4	277

LLOQ relatīvā kļūda un relatīvā standartnovirze nedrīkst pārsniegt 20 % [55]. Izvērtējot metodes pareizību un precizitāti vienas vienas analītiskās sērijas ($n=6$) un starp-sēriju ietvaros, redzams, ka iegūtās vērtības nepārsniedz 17 % (skatīt 3. pielikuma 1. tabulu).

Maģistra darba izstrādātās metodes LLOQ vērtības ir salīdzināmas ar literatūrā pieejamām analīzes metožu LLOQ vērtībām (skatīt 1.2. un 3.2. tabulas).

Pareizība un precizitāte. Kvalitātes kontroles paraugus sagatavošana aprakstīta 2.4. nodaļā. Metodes pareizības un precizitātes noteikšanai vienas analītiskās sērijas ietvaros, izmantoja kvalitātes kontroles paraugus ($n=6$) četros koncentrāciju līmeņos: LLOQ; LQC; MQC un HQC. Starp-sēriju pareizības un precizitātes aprēķināšanai izmantoja datus, kas iegūti no trīs analītiskajām sērijām.

Metodes pareizība ir eksperimentālo kvalitātes kontroles vērtību atbilstība nominālajai koncentrācijai, to izsaka kā relatīvo kļūdu (RK). Analizējamo vielu kvalitātes kontroles paraugiem RK ir $\leq 12\%$ ($\leq 17\%$ LLOQ līmenī) vienas sērijas ietvaros un $\leq 7\%$ starp-sērijas ietvaros visos koncentrāciju līmeņos.

Metodes precizitāte ir novirze no vidējās eksperimentālās vērtības, ko izsaka kā relatīvo standartnovirzi (RSN). Analizējamo paraugu RSN vērtības ir $\leq 8\%$ vienas sērijas ietvaros un $\leq 5\%$ starp-sērijas ietvaros, visos koncentrācijas līmeņos.

Iegūtās RK un RSN vērtības atbilst validācijas prasībām, tās tika apkopotas 3. pielikuma 1. tabulā.

Paraugu atšķaidīšana. Gadījumos, kad analītu koncentrācija paraugos pārsniedz metodē izmantoto kalibrēšanas intervālu, nepieciešama paraugu atšķaidīšana ar asins plazmu vai

ekstraktu. Atšķaidīšanas process nedrīkst ietekmēt metodes precizību un precizitāti. Lai novērtētu atšķaidīšanas ietekmi, paraugi ($n=5$) tika sagatavoti atbilstoši 2.5. nodaļas metodikai un piemēroti atšķaidīšanas faktori 1:4 un 1:9.

Veicot paraugu atšķaidīšanu ar asins plazmas ekstraktu (1:9), levofloksacīna un N-demetillevofloksacīna RK pārsniedz 15 %. Atšķaidot paraugus ar asins plazmas ekstraktu (1:4) linezolīda RK pārsniedz 15 %. Atšķaidot paraugus ar asins plazmu, RK bija mazāka par 10%, abiem atšķaidīšanas faktoriem, RSN visiem paraugiem bija 5 % robežās.

Pēc iegūtajiem datiem var secināt, ka paraugu atšķaidīšana ar plazmas ekstraktu dod rezultātus, kas neatbilst validācijas prasībām, bet paraugus drīkst atšķaidīt ar tukšo asins plazmu, piemērojot atšķaidīšanas faktoru 1:4 vai 1:9.

Matricas efekts. Matricas efekta novērtēšanai izmantoja LQC un HQC kvalitātes kontroles paraugus. Sešiem dažādiem asins plazmas paraugiem ($n=2$) pēc proteīnu izgulsnēšanas pievienoja analizējamo vielu atbilstoši 2.5. nodaļā aprakstītajai metodikai. Lai aprēķinātu matricas faktoru (MF), pagatavoja salīdzināšanas paraugus ($n=2$) bez pievienotas matricas. Matricas faktora vērtības, kas ir $<1,0$ norāda uz negatīvu matricas efektu, bet $> 1,0$ uz pozitīvu matricas efektu. Rezultātu RSN starp dažādiem asins plazmas paraugiem nedrīkst būt lielāka par 15%.

Iegūtie rezultāti tika apkopoti 5. pielikuma 1. tabulā. Pozitīvs matricas efekts tika noteikts levofloksacīnam (MF 1,14 un 1,30) un N-demetillevofloksacīnam (MF 1,12 un 1,35). Pārējiem savienojumiem matrica būtiski neietekmē analīzes rezultātus, iegūtās MF vērtības bija no 0,97 – 1,05. Iegūtās RSN vērtības (≤ 5) norāda uz to, ka matricas atšķirības neietekmē analizējamo vielu noteikšanas precizitāti.

Stabilitāte. Paaugstināta vai pazemināta temperatūra var ietekmēt metodes precizību, mainot matricas efektu, vai arī degradēt paraugā esošos savienojumus. Stabilitātes novērtēšanai izmantoja kvalitātes kontroles paraugus (LQC un HQC) un analizējamo vielu standartšķīdumus, kuri uzglabāti dažādos apstākļos. QC paraugu sagatavošana aprakstīta 2.4. nodaļā un eksperimentu apraksts pieejams 2.5. nodaļā.

Īstermiņa stabilitātes paraugu hromatogrāfisko joslu signāli tika salīdzināti ar paraugu, kas netika pakļauts stabilitātes eksperimentam.

Analizējamo vielu stabilitāte, glabājot paraugus ($n=6$) 23 stundas šķidrums hromatogrāfa automātiskajā paraugu ņemšanas ierīcē (*autosampler*), atbilst validācijas prasībām. Analīzējamās vielas joslas laukums stabilitātes paraugam (pēc 23 h) ir robežās no 86

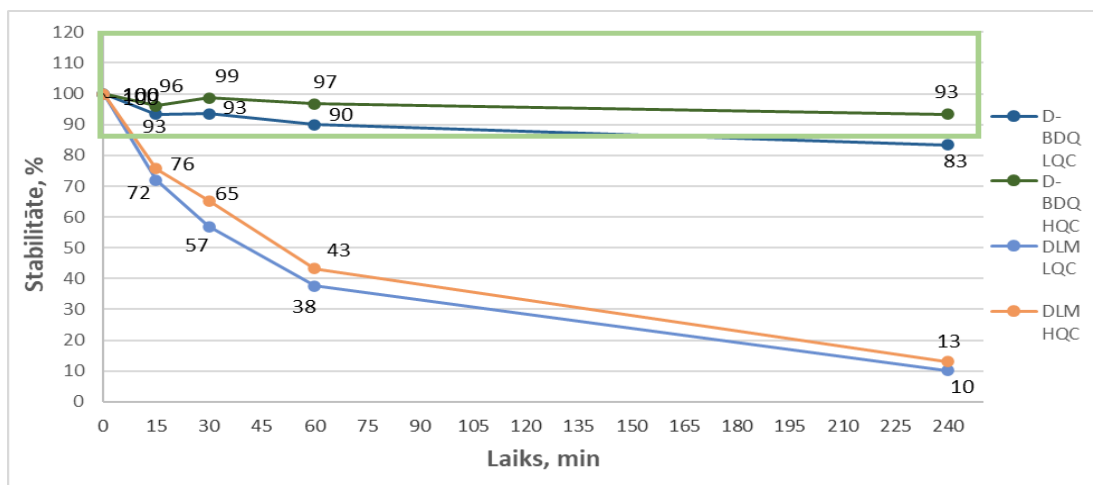
% līdz 109 % (skatīt 3.3. tabulu), salīdzinot ar joslas laukumu, kas detektēts pirmajā stundā.

3.3. tabula

Analizējamo vielu stabilitāte glabājot paraugus 23 stundas šķidrumu hromatogrāfa automātiskajā paraugu ņemšanas ierīcē (autosampler), +4 °C

Analizējama viela	QC līmenis	Stabilitāte, % (n=6)
LFX	LQC	88,3
	HQC	86,3
D-LFX	LQC	88,9
	HQC	85,8
LFX-N	LQC	94,4
	HQC	91,3
LZD	LQC	104,5
	HQC	95,8
BDQ	LQC	100,3
	HQC	96,8
D-BDQ	LQC	97,5
	HQC	95,0
DLM	LQC	108,5
	HQC	104,8

Īstermiņa stabilitātes eksperimentā redzams, ka uzglabājot asins plazmas paraugus ($n=1$) istabas temperatūrā (+22,5 °C), delamanīda joslas laukums pēc 15 min bija samazinājies par 28 % un N-demetilbedakvilīna joslas laukums LQC līmenī pēc 240 min samazinājās par 17 % (skatīt 3.7. attēlu). Pārējām analizējamām vielām joslas laukumu izmaiņas pēc 240 min bija no 88 % līdz 101 % (skatīt 6. pielikuma 1. tabulu).



3.7. att. Delamanīda un N-demetilbedakvilīna īstermiņa stabilitāte istabas temperatūrā

Sasahara ar kolēģiem [34] asins plazmas paraugus ar delamanīda piedevu centrifugēja +4 °C. Maģistra darba ietvaros tika veikta analizējamo vielu stabilitātes pārbaude ($n=2$) atkarībā no centrifugēšanas temperatūras (+ 4 °C vai + 22,5 °C). Eksperimentam tika izmantotas dažādas centrifūgas: 1–14K (*Sigma*), paraugu centrifugēšana notika +4 °C un *IEC Multi, Thermo*, paraugu centrifugēšana notika istabas temperatūrā. Centrifugēšanas temperatūras ietekmes novērtēšanai izmantoja LQC un HQC paraugu aprēķinātās koncentrācijas. Pēc iegūtajiem rezultātiem (skatīt 6. pielikuma 3. tabulu) var secināt, ka relatīvā kļūda (RK), salīdzinot aprēķināto vielu koncentrācijas ar nominālajām vērtībām, neatkarīgi no centrifugēšanas temperatūras ir 9 % robežās. Paraugu stabilitātes rezultāti bija no 93 līdz 108 %, pieņemot, ka sākuma koncentrācija ir paraugiem, kas tika centrifugēti +4 °C, tāpēc tiek secināts, ka paraugu centrifugēšanas temperatūra neietekmē analizējamo vielu stabilitāti.

Iepriekš tika aprakstīts, ka delamanīds ir stabils, glabājot sagatavotos paraugus 23 stundas šķidrums hromatogrāfa automātiskajā paraugu ņemšanas ierīcē (*autosampler*). Pēc iegūtajiem rezultātiem var izdarīt pieņēmumu, ka delamanīds īstermiņa periodā ir nestabils asins plazmā, bet ne asins plazmas ekstraktā.

Literatūrā apskatītajās publikācijās delamanīda [34;56] īstermiņa stabilitāte tika novērtēta uzglabājot paraugus ledussaukstā stāvoklī, tāpēc tika veikts īstermiņa stabilitātes eksperiments glabājot analizējamos asins plazmas paraugus ($n=2$) ledusskapī (+4 °C). Proteīnu izgulsnēšanu veica uz ledus, pievienojot atdzesētu ACN/MeOH (3:1) šķīdumu.

Delamanīda stabilitātes rādītāji ir apmierinoši, uzglabājot (240 min) un apstrādājot paraugus ledusaukstā stāvoklī. LLOQ paraugam izmērītais joslas laukums stabilitātes paraugam bija 88% no sākotnējā joslas laukuma un HQC 93% no sākotnējā joslas laukuma. Pārējo savienojumu stabilitāte ir robežās no 96 % līdz 102 %. Rezultāti apkopoti 6. pielikuma 2. tabulā.

Lai novērstu delamanīda stabilitātes samazināšanos, visi ilgtermiņa stabilitātes paraugi ($n=2$) tika atkausēti ledusskapī (+4 °C). Ilgtermiņa stabilitātes paraugiem tika salīdzinātas analizējamo vielu koncentrācijas stabilitātes paraugos ar svaigi pagatavotu paraugu analizējamo vielu koncentrācijām, izmantojot svaigi pagatavotu kalibrēšanas vienādojumu. Rezultāti apkopoti 3.4. tabulā.

Analizējamo vielu stabilitāte bija apmierinoša, uzglabājot asins plazmas paraugus saldētavā (-20 °C) līdz 6 dienām. Stabilitātes rezultāti bija no 88 līdz 107 %. Pēc 27 dienām

izmērītā delamanīda koncentrācija bija samazinājusies par 33 % (LQC līmenī) un 23 % (HQC līmenī), pārējām analizējamām vielām izmērītā koncentrācija bija ± 4 % robežās no sākuma parauga.

Paraugus glabājot saldētavā (- 80 °C) 27 dienas, visiem savienojumiem tika atgūts 90 % - 107 % satura no sākotnējās koncentrācijas.

Delamanīda koncentrācija pēc 3 sasaldēšanas – atkausēšanas cikliem samazinājās par 37% (LQC līmenī) un 32 % (HQC līmenī), pārējām analizējamām vielām tika atgūts 96 % - 104 % no nominālās koncentrācijas.

3.4. tabula

Analizējamo vielu ilgtermiņa stabilitāte

Laiks	QC	Stabilitāte, %						
		LFX	D-LFX	LFX-N	LZD	BDQ	D-BDQ	DLM
pēc 24h -20 °C	LQC	94	91	95	100	101	100	93
	HQC	90	91	93	93	94	93	96
Pēc 6 dienām -20 °C	LQC	102	103	101	97	104	107	88
	HQC	105	105	103	111	104	102	94
Pēc 27 dienām -20 °C	LQC	97	102	98	97	100	104	67
	HQC	100	100	96	101	99	99	77
Pēc 27 dienām -80 °C	LQC	96	102	99	97	101	107	90
	HQC	99	101	97	103	99	98	96
Sasaldēšana- atkausēšana -20 °C	LQC	97	103	96	98	98	104	63
	HQC	97	98	96	102	98	96	68

Analizējamo vielu standartšķīdumu stabilitāti novērtēja, salīdzinot hromatogrāfiskās joslas laukumu stabilitātes paraugiem, kas tika glabāti 14 mēnešus saldētavā (-20 °C), viens no paraugiem tika pakļauts sasaldēšanas un atkausēšanas eksperimentam (vismaz 10 cikli). Salīdzināšanai iesvēra un izšķīdināja standartvielas analīzes dienā, izņemot delamanīdu, kura standartšķīduma stabilitāte tika aprēķināta, salīdzinot 14 mēnešus glabātu (- 20 °C) sasaldētu – atkausētu standartšķīdumu ar tādu pašu standartšķīdumu, kas tika atkausēts tikai 1 reizi. Standartšķīdumu stabilitāte bija no 96 % līdz 106 % (skatīt 3.5. tabulu), kas atbilst validācijas prasībām.

Analizējamo vielu standartšķīdumu stabilitāte

Eksperiments	Standartšķīdumu stabilitāte, % ($n=2$)						
	LFX	D-LFX	LFX-N	LZD	BDQ	D-BDQ	DLM
14 mēneši, -20 °C, sasaldēts - atkausēts >10 reizes	106	102	102	99	96	106	97
14 mēneši, -20 °C	103	98	101	98	96	106	-

3.4. Otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu kvantitatīvās noteikšanas metodes validācijas kopsavilkums

Izstrādātā metode tika validēta saskaņā ar Eiropas Zāļu aģentūras (EMA) izstrādātajām bioanalītisko metožu validācijas vadlīnijām [55]. Validācijas gaitā iegūtās nosakāmo parametru vērtības ļauj secināt, ka analītiskā metode ir specifiska un selektīva analizējamo vielu noteikšanai dažādu cilvēku asins plazmā, pareizības un precizitātes vērtības liecina par ticamiem rezultātiem visā darba diapazonā.

Iegūtās analizējamo vielu zemākās kvantificēšanas robežas (LLOQ) vērtības ir salīdzināmas ar literatūrā pieejamām līdzīgu analīzes metožu LLOQ vērtībām. Kvantitatīvās analīzes metodes darba diapazons ir atbilstošs, lai to varētu sekmīgi izmantot analizējamo vielu farmakokinētikas un metabolisma pētījumiem. Nepieciešamības gadījumā paraugus ar augstu analītu saturu var atšķaidīt ar asins plazmu.

Plazmas komponenti izraisa pozitīvu matricas efektu levofloksacīna un N-demetillevofloksacīna analīzes gaitā. Analītu stabilitātes pētījumos konstatēts, ka delamanīds ir nestabils asins plazmā istabas temperatūrā, tāpēc paraugus nepieciešams apstrādāt pēc iespējas ātrāk aukstumā (+4 °C) ar atdzesētu šķīdinātāju. Asins plazmas paraugi ir stabili uzglabājot līdz 27 dienām -80 °C vai 6 dienas -20 °C, izvairoties no paraugu atkārtotas atkausēšanas un sasaldēšanas.

SECINĀJUMI

- 1) Izstrādātā un validētā LC-MS/MS metode ir ātra, specifiska un selektīva vienlaicīgi četrus prettuberkulozes zāļu vielu un trīs to metabolītu kvantitatīvai analīzei cilvēka asins plazmas paraugos.
- 2) Asins plazmas paraugu sagatavošana, izmantojot proteīnu izgulsnēšanu, nodrošina vienkāršu, ātru un efektīvu traucējošo matricas komponentu atdalīšanu.
- 3) Izstrādātās kvantitatīvās analīzes metodes darba koncentrāciju diapazons ir atbilstošs, lai to varētu sekmīgi izmantot prettuberkulozes zāļu vielu farmakokinētikas un metabolisma pētījumiem.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- (1) WHO position paper. Weekly Epidemiological Record. **2018**, 93 (08): 73 – 96
- (2) Tuberculosis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (skatīts 31.05.2022).
- (3) World Health Organization, Global Tuberculosis Report. Incidence of tuberculosis (per 100,000 people) - Lithuania, Latvia, Estonia. ID: SH.TBS.INCD. <https://data.worldbank.org/> (skatīts 31.05.2022).
- (4) Tuberkuloze. Dati par saslimstību. Publicēts: **2020**. <https://www.spkc.gov.lv/lv/tuberkuloze-1> (skatīts 31.05.2022).
- (5) Drug-resistant tuberculosis. <https://www.who.int/news/item/13-01-2012-drug-resistant-tuberculosis> **2012**, (skatīts 31.05.2022)
- (6) Dartois, V.A., Rubin, E.J. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nature Reviews Microbiology* **2022**, Apr 27:1–17. DOI: 10.1038/s41579-022-00731-y.
- (7) Ramachandran, Geetha, and Soumya Swaminathan. Role of pharmacogenomics in the treatment of tuberculosis: a review. *Pharmacogenomics and personalized medicine* **2012**, vol. 5, 89-98. DOI: 10.2147/PGPM.S15454
- (8) WHO operational handbook on tuberculosis. Module 4: treatment - drug-resistant tuberculosis treatment. *Geneva: World Health Organization* **2020**. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- (9) Jain, K.K. Pharmacogenetics. In: Textbook of Personalized Medicine. *Springer, New York*, **2009**, 69-103, DOI: 10.1007/978-1-4419-0769-1_4
- (10) Centers for Disease Control and Prevention. Provisional CDC Guidance for the Use of Pretomanid as part of a Regimen [Bedaquiline, Pretomanid, and Linezolid (BPAL)] to Treat Drug-Resistant Tuberculosis Disease, **2022** <https://www.cdc.gov/tb/topic/drtb/bpal/default.htm> (skatīts 31.05.2022).
- (11) Ebers A, Stroup S, Mpagama S, Kisonga R, Lekule I, Liu J, Heysell S. Determination of plasma concentrations of levofloxacin by high performance liquid chromatography for use at a multidrug-resistant tuberculosis hospital in Tanzania. *PloS One*. **2017**, 12(1):e0170663. DOI: 10.1371/journal.pone.0170663.

- (12) Gao CH, Yu LS, Zeng S, Huang YW, Zhou Q. Personalized therapeutics for levofloxacin: a focus on pharmacokinetic concerns. *Ther Clin Risk Manag.* **2014**, 10:217-27. DOI: 10.2147/TCRM.S59079.
- (13) Tuyiringire, N., Tusubira, D., Munyampundu, J., Tolo, C. U., Muvunyi, C. M., Ogwang, P. E. Application of metabolomics to drug discovery and understanding the mechanisms of action of medicinal plants with anti-tuberculosis activity. *Clinical and translational medicine* **2018**, 7.1: 1-12. DOI: 10.1186/s40169-018-0208-3
- (14) LEVAQUIN
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/020634s040,020635s043,021721s007lbl.pdf (skatīts 31.05.2022).
- (15) ZYVOX (linezolid) Injection, Tablets and Oral Suspension Initial U.S.
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021130s032,021131s026,021132s031lbl.pdf (skatīts 31.05.2022).
- (16) van Heeswijk RP, Dannemann B, Hoetelmans RM. Bedaquiline: a review of human pharmacokinetics and drug-drug interactions. *J Antimicrob Chemother* **2014**, (9):2310-8. DOI: 10.1093/jac/dku171.
- (17) Alghamdi, W. A., Al-Shaer, M. H., Kipiani, M., Barbakadze, K., Mikiashvili, L., Kempker, R. R., & Peloquin, C. A. Pharmacokinetics of bedaquiline, delamanid and clofazimine in patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2020**, 76(4), 1019–1024. DOI: 10.1093/jac/dkaa550
- (18) Czyrski A. Analytical Methods for Determining Third and Fourth Generation Fluoroquinolones: A Review. *Chromatographia* **2017**, 80(2):181-200. DOI: 10.1007/s10337-016-3224-8.
- (19) Hemeryck A, Mamidi RN, Bottacini M, Macpherson D, Kao M, Kelley MF. Pharmacokinetics, metabolism, excretion and plasma protein binding of ¹⁴C-levofloxacin after a single oral administration in the Rhesus monkey. *Xenobiotica.* **2006**, 36(7):597-613. DOI: 10.1080/00498250600674436.
- (20) Czyrski, A., Anusiak, K. & Teżyk, A. The degradation of levofloxacin in infusions exposed to daylight with an identification of a degradation product with HPLC-MS. *Scientific Reports*, 9.9, 3621 **2019**. DOI: 10.1038/s41598-019-40201-9
- (21) Brier, M. E.; Stalker, D. J.; Aronoff, G. R.; Batts, D. H.; Ryan, K. K.; O'Grady, M.; Hopkins, N. K.; Jungbluth, G. L. Pharmacokinetics of Linezolid in Subjects with Renal

- Dysfunction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, 47(9), 2775–2780. DOI: 10.1128/AAC.47.9.2775-2780.2003
- (22) Alghamdi, Wael A.; AL-Shaer, Mohammad H.; An, Guohua; Alsultan, Abdullah; Kipiani, Maia; Barbakadze, Ketevan; Mikiashvili, Lali; Ashkin, David; Griffith, David E.; Cegielski, J. Peter; Kempker, Russell R.; Peloquin, Charles A. Population Pharmacokinetics of Linezolid in Tuberculosis Patients: Dosing Regimens Simulation and Target Attainment Analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2020**, DOI: 10.1128/AAC.01174-20
- (23) IR, Bruss JB, Sams JP, Johnson MG, Sanders PE, Hauer MJ, Fagerness PE, Stryd RP, Peng GW, Shobe EM. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of linezolid following an oral dose of [(14)C]linezolid to healthy human subjects. *Drug Metab Dispos.* **2001**, 1136-45. PMID: 11454733.
- (24) WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. *World Health Organization, Geneva, Switzerland.* **2019**, WHO/CDS/TB/2019.7.
- (25) Svensson EM, Dosne AG, Karlsson MO. Population Pharmacokinetics of Bedaquiline and Metabolite M2 in Patients With Drug-Resistant Tuberculosis: The Effect of Time-Varying Weight and Albumin. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* **2016**, 5(12):682-691. DOI: 10.1002/psp4.12147
- (26) R. P. G. van Heeswijk, B. Dannemann, R. M. W. Hoetelmans, Bedaquiline: a review of human pharmacokinetics and drug–drug interactions, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 69, Issue 9, September **2014**, Pages 2310–2318, DOI: 10.1093/jac/dku171
- (27) SIRTURO safely and effectively. SIRTURO™ (bedaquiline) Tablets https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/204384s0001bl.pdf (skatīts 31.05.2022).
- (28) Svensson, E. M., Aweeka, F., Park, J. G., Marzan, F., Dooley, K. E., & Karlsson, M. O. Model-based estimates of the effects of efavirenz on bedaquiline pharmacokinetics and suggested dose adjustments for patients coinfecting with HIV and tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2013**, 57(6), 2780-2787. DOI: 10.1128/AAC.00191-13
- (29) Khoshnood, S., Taki, E., Sadeghifard, N., Kaviar, V. H., Haddadi, M. H., Farshadzadeh, Z., Kouhsari, E., Goudarzi, M., & Heidary, M. Mechanism of Action, Resistance,

- Synergism, and Clinical Implications of Delamanid Against Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in microbiology*, **2021**, 12, 717045. DOI: 10.3389/fmicb.2021.717045
- (30) Xavier, AlphienesStanley; Lakshmanan, Mageshwaran. Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* **2014**, 5(3), 222. DOI: 10.4103/0976-500X.136121
- (31) SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS Deltyba 50 mg film-coated tablets https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/deltyba-epar-product-information_en.pdf (skatīts 31.05.2022.)
- (32) Wang, Xiaofeng; Mallikaarjun, Suresh; Gibiansky, Ekaterina. Population Pharmacokinetic Analysis of Delamanid in Patients with Pulmonary Multi-Drug Resistant Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2020** DOI: 10.1128/aac.01202-20
- (33) Lewis JM, Sloan DJ. The role of delamanid in the treatment of drug-resistant tuberculosis. *Therapeutics and clinical risk management* **2015** May 13;11:779-91. DOI: 10.2147/TCRM.S71076.
- (34) Sasahara K, Shimokawa Y, Hirao Y, Koyama N, Kitano K, Shibata M, Umehara K. Pharmacokinetics and Metabolism of Delamanid, a Novel Anti-Tuberculosis Drug, in Animals and Humans: Importance of Albumin Metabolism In Vivo. *Drug Metabolism and Disposition* **2015**, 43(8):1267-76. DOI: 10.1124/dmd.115.064527.
- (35) Kim HJ, Seo KA, Kim HM, Jeong ES, Ghim JL, Lee SH, Lee YM, Kim DH, Shin JG. Simple and accurate quantitative analysis of 20 anti-tuberculosis drugs in human plasma using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* **2015**, 102:9-16. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.08.026.
- (36) SEGER, Christoph; SALZMANN, Linda. After another decade: LC–MS/MS became routine in clinical diagnostics. *Clinical biochemistry* **2020**, 82: 2-11. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2020.03.004
- (37) KLONT, Frank; HOPFGARTNER, Gérard. Mass spectrometry based approaches and strategies in bioanalysis for qualitative and quantitative analysis of pharmaceutically relevant molecules. *Drug Discovery Today: Technologies* **2021**, 40: 64-68. DOI: 10.1016/j.ddtec.2021.10.004

- (38) Kuhlin, Johanna; Sturkenboom, Marieke G.G.; Ghimire, Samiksha; Margineanu, Ioana; van den Elsen, Simone H.J.; Simbar, Noviana; Akkerman, Onno W.; Jongedijk, Erwin M.; Koster, Remco A.; Bruchfeld, Judith; Touw, Daan J.; Alffenaar, Jan-Willem C. Mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of anti-tuberculosis drugs. *Clinical Mass Spectrometry* **2018** S2376999818300151 DOI: 10.1016/j.clinms.2018.10.002
- (39) Chunang Gu, David Russell, Peter Yehl. Application of LCMS in small-molecule drug development **2016**
<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/43628/application-lcms-small-molecule-drug-development/> (skatīts 31.05.2022).
- (40) Zuur MA, Bolhuis MS, Anthony R, den Hertog A, van der Laan T, Wilffert B, de Lange W, van Soolingen D, Alffenaar JW. Current status and opportunities for therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* **2016** May;12(5):509-21. DOI: 10.1517/17425255.2016.1162785.
- (41) Harahap, Y., Bahaudin, A. A. I., Sari, S. P. Quantification of levofloxacin in human plasma by high performance liquid chromatography and the impact of the anticoagulants type. *Journal of International Research in Medical and Pharmaceutical Sciences* **2016**, 54-62.
- (42) Lee, Kyunghoon; Jun, Sun-Hee; Han, Minje; Song, Sang Hoon; Park, Jong Sun; Lee, Jae Ho; Park, Kyoung Un; Song, Junghan. Multiplex Assay of Second-Line Anti-Tuberculosis Drugs in Dried Blood Spots Using Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Annals of Laboratory Medicine* **2016**, 36(5), 489 DOI: 10.3343/alm.2016.36.5.489.
- (43) Xin Zhang, Pamela C. Iraneta, Frank J Marszalkowski Jr., Kenneth J. Fountain A Simplified Solid Phase Extraction (SPE) Protocol for Bioanalysis Using Oasis HLB **(2014)** <https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2014/720005140/720005140-en.pdf> (skatīts 31.05.2022).
- (44) Gukālova B. Otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu kvantitatīva noteikšana asins plazmā ar LC-MS/MS metodi. Kurša darbs. *LU Ķīmijas fakultāte, Rīga, 2021.*
- (45) Han, M., Jun, S. H., Lee, J. H., Park, K. U., Song, J., & Song, S. H. Method for simultaneous analysis of nine second-line anti-tuberculosis drugs using UPLC-MS/MS.

- Journal of Antimicrobial Chemotherapy **2013**, 68(9), 2066–2073. DOI: 10.1093/jac/dkt154
- (46) Ghimire, S., van Hateren, K., Vrubleuskaya, N., Koster, R., Touw, D., & Alffenaar, J. W. C. Determination of levofloxacin in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Applied Bioanalysis* **2018**, 4(1), 3152. DOI: 10.17145/jab.18.004
- (47) Fang PF, Cai HL, Li HD, Zhu RH, Tan QY, Gao W, Xu P, Liu YP, Zhang WY, Chen YC, Zhang F. Simultaneous determination of isoniazid, rifampicin, levofloxacin in mouse tissues and plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2010**, 878(24):2286-91. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.06.038.
- (48) Souza, E., Felton, J., Crass, R. L., Hanaya, K., & Pai, M. P. Development of a sensitive LC–MS/MS method for quantification of linezolid and its primary metabolites in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2020**, 178, 112968. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.112968
- (49) Alffenaar, J.-W. C., Bolhuis, M., van Hateren, K., Sturkenboom, M., Akkerman, O., de Lange, W., Greijdanus B., Tjip van der Werf, Touw, D.. Determination of Bedaquiline in Human Serum Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, 59(9), 5675–5680. DOI: 10.1128/aac.00276-15
- (50) Meng, M., Smith, B., Johnston, B., Carter, S., Brisson, J., & Roth, S. E. Simultaneous quantitation of delamanid (OPC-67683) and its eight metabolites in human plasma using UHPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B* **2015**, 1002, 78-91., DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.07.058
- (51) Kumar, A. H., Sudha, V., Vijayakumar, A., & Padmapriyadarsini, C. Simultaneous method for the estimation of bedaquiline and delamanid in human plasma using high-performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2021**, 13(6), 36-40. DOI: 10.22159/ijpps.2021v13i6.40853
- (52) Gray, W. A., Waldorf, B., Rao, M. G., Stiles, B. L., Griffiss, J. M., Salata, R. A., & Blumer, J. L. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of bedaquiline and rifabutin in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* **2019**, 112775. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.07.023

- (53) Hui, Z. H. U., Zhong-quan, L. I. U., Li, X. I. E., Shao-chen, G. U. O., Bin, W. A. N. G., Lei, F. U., & Yu, L. U. Determination of bedaquiline plasma concentration by high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Chinese Journal of Antituberculosis* **2018**, 1319. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2018.12.015
- (54) X. Rovite, V.; Wolff–Sagi, Y.; Zaharenko, L.; Nikitina–Zake, L.; Grens, E.; Klovins, J. Genome Database of the Latvian Population (LGDB): Design, Goals, and Primary Results. *J. Epidemiol.* **2018**, 28, 353–360. DOI: 10.2188/jea.JE20170079
- (55) Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**; European Medicines Agency; United Kingdom, London, **2012**.
- (56) Hirao, Y. , Koga, T. , Koyama, N. , Shimokawa, Y. and Umehara, K. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods for Determination of Delamanid in Mouse Plasma and Lung. *American Journal of Analytical Chemistry* **2015**, 6, 98-105. DOI: 10.4236/ajac.2015.62009.

PIELIKUMI

1. pielikums. Selektivitāte

1. tabula

Selektivitātes rezultāti

	LFX		D-LFX		LFX-N		LZD	
	I, vienības	S, %	I, vienības	S, %	I, vienības	S, %	I, vienības	S, %
LLOQ	144		60,9		41,4		81,9	
Plazma # 1	2,31	1,60	1,18	1,94	1,32	3,19	0,59	0,72
Plazma # 2	1,41	0,98	1,25	2,05	1,19	2,87	0,60	0,74
Plazma # 3	0,89	0,62	1,14	1,87	1,38	3,33	0,51	0,62
Plazma # 4	0,80	0,56	1,35	2,22	1,48	3,57	0,53	0,65
Plazma # 5	0,98	0,68	1,13	1,86	1,30	3,14	0,66	0,81
Plazma # 6	0,76	0,53	1,04	1,70	1,31	3,16	0,46	0,56
vid		0,8		1,9		3,2		0,7
	BDQ		D-BDQ		DLM			
LLOQ	74,6		90,8		58,4			
Plazma # 1	0,58	0,78	1,16	1,27	0,22	0,37		
Plazma # 2	0,35	0,46	1,33	1,46	0,16	0,27		
Plazma # 3	0,26	0,34	1,06	1,16	0,37	0,64		
Plazma # 4	0,24	0,32	1,11	1,22	0,45	0,77		
Plazma # 5	0,17	0,23	1,31	1,44	0,21	0,36		
Plazma # 6	0,18	0,24	1,06	1,17	0,21	0,36		
vid		0,4		1,3		0,5		

I - signāla intensitāte ($n=2$), intensitātes vienības ($\cdot 10^4$)

S - selektivitāte, %

2. pielikums. Kvantitatīvās noteikšanas diapazons

1. tabula

Levofloksacīna kalibrēšanas diapazons

LFX	Nominālā konc., μg/mL	Izmērītā konc., μg/mL	Sn, μg/mL	Precizitāte (RSN), %	Pareizība (RK), %	Joslas laukums	Virziena koeficienti	R ²
1. diena								
1.STD	0,142	0,139	0,002	1,38	-2,11	45988	a=-3953,24 b=312335 c=2799,26	0,3500
2.STD	0,350	0,359	0,008	2,34	2,57	114533		
3.STD	0,89	0,90	0,02	2,22	0,90	280077		
4.STD	2,210	2,210	0,011	0,48	0,00	674172		
5.STD	5,53	5,51	0,09	1,57	-0,36	1602415		
6.STD	13,8	13,8	0,2	1,60	0,00	3568666		
2. diena								
1.STD	0,142	0,139	0,002	1,23	-2,11	44547	a=-2856,58 b=286118 c=4954,49	0,9994
2.STD	0,350	0,347	0,009	2,46	-0,86	103867		
3.STD	0,890	0,927	0,007	0,76	4,16	267732		
4.STD	2,21	2,24	0,05	2,30	1,36	632024		
5.STD	5,5	5,4	0,2	3,91	-1,82	1475022		
6.STD	13,83	13,87	0,14	0,98	0,29	3423487		
3. diena								
1.STD	0,142	0,140	0,004	2,82	-1,41	46009	a=-3971,71 b=309745 c=2759,71	0,9994
2.STD	0,35	0,351	0,007	1,87	0,29	111000		
3.STD	0,89	0,90	0,02	2,63	1,12	277395		
4.STD	2,21	2,26	0,04	1,68	2,26	682085		
5.STD	5,53	5,45	0,11	2,00	-1,45	1571970		
6.STD	13,8	13,9	0,5	3,81	0,72	3533355		

N-Demetillevofloksacīna kalibrēšanas diapazons

D-LFX	Nominālā konc., μg/mL	Izmērītā konc., μg/mL	S _n , μg/mL	Precizitāte (RSN), %	Pareizība (RK), %	Joslas laukums	Virziena koeficienti	R ²
1. diena								
1.STD	0,139	0,138	0,002	1,61	-0,72	10553	a=-799,204 b=75998,7 c=91,5312	0,9997
2.STD	0,348	0,353	0,007	2,09	1,44	26790		
3.STD	0,87	0,87	0,02	1,90	0,00	65845		
4.STD	2,18	2,16	0,03	1,18	-0,92	160515		
5.STD	5,44	5,46	0,07	1,34	0,37	391156		
6.STD	13,6	13,6	0,4	2,77	0,00	886091		
2. diena								
1.STD	0,139	0,139	0,002	1,23	0,00	10276	a=-556,572 b=69530,6 c=633,294	0,9994
2.STD	0,348	0,340	0,005	1,53	-2,30	24185		
3.STD	0,870	0,892	0,008	0,94	2,53	62193		
4.STD	2,18	2,20	0,07	3,30	0,92	150755		
5.STD	5,4	5,4	0,2	4,45	0,00	359385		
6.STD	13,6	13,6	0,2	1,80	0,00	844787		
3. diena								
1.STD	0,139	0,139	0,004	2,91	0,00	10810	a=-726,682 b=76425,8 c=256,558	0,9994
2.STD	0,348	0,345	0,006	1,81	-0,86	26545		
3.STD	0,87	0,88	0,04	4,11	1,15	66937		
4.STD	2,18	2,21	0,04	1,95	1,38	165264		
5.STD	5,4	5,4	0,2	2,94	0,00	391243		
6.STD	13,61	13,6	0,4	3,05	-0,07	906775		

Levofloksacīna N-oksīda kalibrēšanas diapazons

LFX-N	Nominālā konc., $\mu\text{g/mL}$	Izmērītā konc., $\mu\text{g/mL}$	S_n , $\mu\text{g/mL}$	Precizitāte (RSN), %	Pareizība (RK), %	Joslas laukums	Virziena koeficienti	R^2
1. diena								
1.STD	0,084	0,083	0,001	1,52	-1,19	12448	a=-2787,21 b=146766 c=255,037	0,99986
2.STD	0,209	0,212	0,007	3,40	1,44	31211		
3.STD	0,520	0,526	0,010	1,83	1,15	76707		
4.STD	1,310	1,285	0,012	0,93	-1,91	184254		
5.STD	3,270	3,294	0,008	0,24	0,73	453459		
6.STD	8,17	8,16	0,05	0,59	-0,12	1012545		
2. diena								
1.STD	0,084	0,082	0,002	1,83	-2,38	12798	a=-2184,54 b=144427 c=1021,52	0,9993
2.STD	0,209	0,206	0,003	1,28	-1,44	30690		
3.STD	0,520	0,551	0,009	1,56	5,96	79988		
4.STD	1,31	1,32	0,04	3,12	0,76	187252		
5.STD	3,27	3,22	0,07	2,15	-1,53	443323		
6.STD	8,2	8,2	0,2	2,85	0,00	1037427		
3. diena								
1.STD	0,084	0,084	0,002	2,45	0,00	11805	a=-3095,52 b=147276 c=-509,056	0,9994
2.STD	0,209	0,209	0,003	1,20	0,00	30155		
3.STD	0,52	0,52	0,03	5,67	0,00	75532		
4.STD	1,310	1,310	0,014	1,08	0,00	187130		
5.STD	3,27	3,27	0,07	2,07	0,00	447543		
6.STD	8,2	8,2	0,3	3,74	0,00	996266		

Linezolīda kalibrēšanas diapazons

LZD	Nominālā konc., μg/mL	Izmērītā konc., μg/mL	S _n , μg/mL	Precizitāte (RSN), %	Pareizība (RK), %	Joslas laukums	Virziena koeficienti	R ²
1. diena								
1.STD	0,139	0,124	0,003	2,18	-10,79	10609	a=-819,38 b=60691,2 c=3095,5	0,998
2.STD	0,348	0,377	0,016	4,17	8,33	25871		
3.STD	0,87	0,94	0,03	3,04	8,05	59585		
4.STD	2,18	2,17	0,07	3,10	-0,46	131041		
5.STD	5,4	5,3	0,2	4,59	-1,85	302087		
6.STD	13,6	13,7	0,5	3,80	0,74	679860		
2. diena								
1.STD	0,139	0,120	0,003	2,75	-13,67	13249	a=-1200,73 b=70486,3 c=4813,73	0,996
2.STD	0,348	0,369	0,014	3,85	6,03	30687		
3.STD	0,87	0,98	0,04	4,46	12,64	72606		
4.STD	2,18	2,30	0,12	5,08	5,50	160619		
5.STD	5,4	5,1	0,2	3,16	-5,56	330760		
6.STD	13,6	13,8	0,4	2,87	1,47	748748		
3. diena								
1.STD	0,139	0,136	0,006	4,55	-2,16	7434	a=-625,171 b=50367,5 c=611,727	0,9993
2.STD	0,348	0,355	0,003	0,91	2,01	18418		
3.STD	0,870	0,900	0,001	0,06	3,45	45413		
4.STD	2,18	2,12	0,05	2,32	-2,75	104408		
5.STD	5,4	5,5	0,2	3,28	1,85	257877		
6.STD	13,6	13,6	0,4	3,07	-0,07	569991		

Bedakvilīna kalibrēšanas diapazons

BDQ	Nominālā konc., µg/mL	Izmērītā konc., µg/mL	S _n , µg/mL	Precizitāte (RSN), %	Pareizība (RK), %	Joslas laukums	Virziena koeficienti	R ²
1. diena								
1.STD	0,050	0,049	0,001	1,95	-2,00	13338	a=-9420,2 b=258143 c=822,513	0,99986
2.STD	0,124	0,127	0,004	2,77	2,42	33359		
3.STD	0,310	0,317	0,008	2,41	2,26	81620		
4.STD	0,780	0,782	0,009	1,12	0,26	196842		
5.STD	1,940	1,924	0,014	0,73	-0,82	462713		
6.STD	4,86	4,87	0,05	0,95	0,21	1034092		
2. diena								
1.STD	0,050	0,048	0,001	1,04	-4,00	16042	a=-9192,76 b=293588 c=2024,79	0,9996
2.STD	0,124	0,127	0,002	1,36	2,42	39148		
3.STD	0,310	0,323	0,007	2,17	4,19	95803		
4.STD	0,78	0,78	0,01	1,88	0,00	226752		
5.STD	1,94	1,91	0,04	2,13	-1,55	529462		
6.STD	4,86	4,87	0,05	1,11	0,21	1214277		
3. diena								
1.STD	0,05	0,049	0,002	3,86	-2,00	12775	a=-9788,96 b=252859 c=317,381	0,9998
2.STD	0,124	0,125	0,003	2,57	0,81	31661		
3.STD	0,310	0,317	0,008	2,63	2,26	79423		
4.STD	0,780	0,773	0,011	1,40	-0,90	189895		
5.STD	1,94	1,94	0,03	1,65	0,00	453935		
6.STD	4,860	4,861	0,013	0,28	0,02	998201		

N-Demetilbedakvilīna kalibrēšanas diapazons

D-BDQ	Nominālā konc., $\mu\text{g/mL}$	Izmērītā konc., $\mu\text{g/mL}$	S_n , $\mu\text{g/mL}$	Precizitāte (RSN), %	Pareizība (RK), %	Joslas laukums	Virziena koeficienti	R^2
1. diena								
1.STD	0,083	0,077	0,002	2,25	-7,23	23615	a=-5890,65 b=242510 c=5076,22	0,9991
2.STD	0,207	0,216	0,004	2,02	4,35	57185		
3.STD	0,520	0,553	0,009	1,66	6,35	137425		
4.STD	1,29	1,32	0,04	3,08	2,33	314876		
5.STD	3,23	3,12	0,02	0,79	-3,41	705139		
6.STD	8,08	8,13	0,14	1,67	0,62	1587068		
2. diena								
1.STD	0,083	0,074	0,001	1,35	-10,84	27573	a=-5652,69 b=261909 c=8339,73	0,9986
2.STD	0,207	0,223	0,007	3,05	7,73	66430		
3.STD	0,520	0,573	0,017	2,97	10,19	156628		
4.STD	1,29	1,29	0,02	1,89	0,00	335529		
5.STD	3,23	3,14	0,06	1,84	-2,79	774610		
6.STD	8,1	8,1	0,2	2,66	0,00	1763059		
3. diena								
1.STD	0,083	0,080	0,001	1,02	-3,61	23361	a=-7121,08 b=256491 c=2873,59	0,9996
2.STD	0,207	0,209	0,007	3,45	0,97	56155		
3.STD	0,52	0,54	0,02	2,83	3,85	138512		
4.STD	1,290	1,324	0,003	0,26	2,64	329974		
5.STD	3,23	3,15	0,03	0,87	-2,48	740063		
6.STD	8,08	8,12	0,03	0,43	0,50	1615638		

Delamanīda kalibrēšanas diapazons

DLM	Nominālā konc., μg/mL	Izmērītā konc., μg/mL	S _n , μg/mL	Precizitāte (RSN), %	Pareizība (RK), %	Joslas laukums	Virziena koeficienti	R ²
1. diena								
1.STD	0,007	0,007	0,000	0,00	0,00	9809	a=1477620 b=-492,232	0,9989
2.STD	0,018	0,018	0,001	3,21	0,00	26012		
3.STD	0,044	0,046	0,002	3,32	4,55	66970		
4.STD	0,110	0,111	0,003	2,27	0,91	162936		
5.STD	0,275	0,261	0,002	0,59	-5,09	384878		
6.STD	0,688	0,700	0,005	0,76	1,74	1033900		
2. diena								
1.STD	0,007	0,007	0,000	0,00	0,00	13875	a=1803970 b=1616,94	0,9993
2.STD	0,018	0,018	0,000	0,00	0,00	34182		
3.STD	0,044	0,046	0,001	2,51	4,55	84970		
4.STD	0,110	0,109	0,000	0,00	-0,91	198348		
5.STD	0,275	0,273	0,004	1,32	-0,73	494510		
6.STD	0,69	0,69	0,02	3,19	0,00	1244077		
3. diena								
1.STD	0,007	0,007	0,000	0,00	0,00	11629	a=1626970 b=606,458	0,9994
2.STD	0,018	0,017	0,001	3,40	-5,56	28865		
3.STD	0,044	0,046	0,001	2,17	4,55	75467		
4.STD	0,110	0,114	0,002	1,34	3,64	184879		
5.STD	0,275	0,279	0,005	1,86	1,45	454593		
6.STD	0,69	0,68	0,01	1,41	-1,45	1106326		

3. pielikums. Pareizība un precizitāte

1.tabula

Pareizības (RK) un precizitātes (RSN) noteikšanas rezultāti

Analīts	QC līmenis	1. diena					2. diena					3. diena					Starp-sēriju	
		Nominālā konc., µg/mL	Izmērītā konc., µg/mL	S _n , µg/mL	RK, %	RSN, %	Nominālā konc., µg/mL	Izmērītā konc., µg/mL	S _n , µg/mL	RK, %	RSN, %	Nominālā konc., µg/mL	Izmērītā konc., µg/mL	S _n , µg/mL	RK, %	RSN, %	RK, %	RSN, %
BDQ	LLOQ	0,050	0,048	0,002	-4,00	4,17	0,050	0,047	0,002	-6,00	4,26	0,050	0,048	0,001	-4,00	2,08	-4,67	3,50
	LQC	0,151	0,153	0,005	1,32	3,27	0,151	0,146	0,002	-3,31	1,37	0,151	0,148	0,002	-1,99	1,35	-1,32	2,00
	MQC	1,77	1,68	0,03	-5,08	1,79	1,77	1,75	0,04	-1,13	2,29	1,77	1,76	0,04	-0,56	2,27	-2,26	2,11
	HQC	3,54	3,28	0,10	-7,34	3,05	3,54	3,50	0,08	-1,13	2,29	3,54	3,48	0,08	-1,69	2,30	-3,39	2,54
D-BDQ	LLOQ	0,083	0,084	0,005	1,20	5,95	0,083	0,074	0,003	-10,84	4,05	0,083	0,077	0,002	-7,23	2,60	-5,62	4,20
	LQC	0,25	0,28	0,02	12,00	7,14	0,250	0,250	0,007	0,00	2,80	0,250	0,252	0,004	0,80	1,59	4,27	3,84
	MQC	2,9	3,0	0,2	3,45	6,67	2,94	2,91	0,08	-1,02	2,75	2,94	2,89	0,08	-1,70	2,77	0,24	4,06
	HQC	5,9	5,9	0,3	0,00	5,08	5,88	5,86	0,10	-0,34	1,71	5,9	5,5	0,2	-6,78	3,64	-2,37	3,48
DLM	LLOQ	0,007	0,008	0,000	14,29	0,00	0,007	0,007	0,000	0,00	0,00	0,007	0,007	0,000	0,00	0,00	4,76	0,00
	LQC	0,021	0,022	0,001	4,76	4,55	0,021	0,023	0,001	9,52	4,35	0,021	0,022	0,001	4,76	4,55	6,35	4,48
	MQC	0,25	0,24	0,02	-4,00	8,33	0,250	0,274	0,008	9,60	2,92	0,250	0,260	0,005	4,00	1,92	3,20	4,39

Pareizības (RK) un precizitātes (RSN) noteikšanas rezultāti

Analīts	QC līmenis	1. diena					2. diena					3. diena					Starp-sēriju	
		Nominālā konc., µg/mL	Izmērītā konc., µg/mL	S _n , µg/mL	RK, %	RSN, %	Nominālā konc., µg/mL	Izmērītā konc., µg/mL	S _n , µg/mL	RK, %	RSN, %	Nominālā konc., µg/mL	Izmērītā konc., µg/mL	S _n , µg/mL	RK, %	RSN, %	RK, %	RSN, %
LFX	LLOQ	0,143	0,153	0,004	6,99	2,61	0,143	0,146	0,004	2,10	2,74	0,143	0,134	0,003	-6,29	2,24	0,93	2,53
	LQC	0,428	0,435	0,010	1,64	2,30	0,428	0,424	0,012	-0,93	2,83	0,428	0,408	0,007	-4,67	1,72	-1,32	2,28
	MQC	5,03	5,09	0,13	1,19	2,55	5,03	5,10	0,18	1,39	3,53	5,03	4,92	0,13	-2,19	2,64	0,13	2,91
	HQC	10,1	10,2	0,3	0,99	2,94	10,1	10,1	0,3	0,00	2,97	10,1	9,4	0,3	-6,93	3,19	-1,98	3,03
D-LFX	LLOQ	0,141	0,144	0,003	2,13	2,08	0,141	0,138	0,004	-2,13	2,90	0,141	0,130	0,002	-7,80	1,54	-2,60	2,17
	LQC	0,422	0,414	0,010	-1,90	2,42	0,422	0,391	0,013	-7,35	3,32	0,422	0,390	0,007	-7,58	1,79	-5,61	2,51
	MQC	4,95	5,08	0,10	2,63	1,97	5,0	4,9	0,2	-2,00	4,08	4,95	4,87	0,14	-1,62	2,87	-0,33	2,97
	HQC	9,9	10,2	0,3	3,03	2,94	9,9	10,1	0,3	2,02	2,97	9,9	9,4	0,3	-5,05	3,19	0,00	3,03
LFX-N	LLOQ	0,084	0,090	0,001	7,14	1,11	0,084	0,082	0,002	-2,38	2,44	0,084	0,085	0,002	1,19	2,35	1,98	1,97
	LQC	0,253	0,251	0,005	-0,79	1,99	0,253	0,244	0,004	-3,56	1,64	0,253	0,242	0,007	-4,35	2,89	-2,90	2,17
	MQC	2,97	2,97	0,08	0,00	2,69	2,97	2,99	0,08	0,67	2,68	2,97	2,92	0,08	-1,68	2,74	-0,34	2,70
	HQC	5,9	6,0	0,2	1,69	3,33	5,9	6,0	0,2	1,69	3,33	5,9	5,7	0,2	-3,39	3,51	0,00	3,39
LZD	LLOQ	0,141	0,131	0,002	-7,09	1,53	0,141	0,118	0,007	-16,31	5,93	0,141	0,144	0,005	2,13	3,47	-7,09	3,64
	LQC	0,42	0,41	0,02	-2,38	4,88	0,422	0,417	0,014	-1,18	3,36	0,422	0,437	0,007	3,55	1,60	0,00	3,28
	MQC	4,95	4,76	0,14	-3,84	2,94	5,0	4,7	0,2	-6,00	4,26	4,95	4,84	0,14	-2,22	2,89	-4,02	3,36
	HQC	9,9	9,6	0,2	-3,03	2,08	9,9	9,3	0,2	-6,06	2,15	9,9	9,3	0,3	-6,06	3,23	-5,05	2,49

Iekšējā standarta (IS) ietekme uz rezultātu pareizību (RK) un precizitāti (RSN)

Analīts	QC līmenis	Nominālā konc., µg/mL	Bez IS				Ar IS			
			Izmērītā konc., µg/mL	S _n , µg/mL	RSN, %	RK, %	Izmērītā konc., µg/mL	S _n , µg/mL	RSN, %	RK, %
LFX	LLOQ	0,143	0,138	0,004	2,84	-3,73	0,116	0,004	3,24	-18,71
	LQC	0,428	0,429	0,008	1,76	0,33	0,429	0,009	2,17	0,18
	MQC	5,030	5,1	0,2	3,61	2,28	5,41	0,06	1,09	7,47
	HQC	10,060	10,1	0,2	2,38	0,61	10,4	0,3	2,80	3,79
D-LFX	LLOQ	0,141	0,138	0,005	3,28	-2,19	0,118	0,004	3,35	-16,19
	LQC	0,422	0,420	0,007	1,76	-0,41	0,422	0,010	2,29	-0,08
	MQC	4,950	5,1	0,2	3,11	2,35	5,34	0,05	0,85	7,79
	HQC	9,900	10,0	0,2	1,91	1,31	10,3	0,3	3,20	4,54
LFX-N	LLOQ	0,084	0,078	0,003	3,27	-7,44	0,066	0,003	4,61	-21,92
	LQC	0,253	0,240	0,003	1,32	-5,30	0,239	0,004	1,86	-5,57
	MQC	2,970	2,96	0,07	2,49	-0,33	3,12	0,06	1,93	4,90
	HQC	5,940	5,9	0,2	2,72	-0,82	6,09	0,15	2,45	2,45
LZD	LLOQ	0,141	0,128	0,005	3,63	-9,40	0,102	0,004	3,74	-27,72
	LQC	0,422	0,473	0,014	2,98	12,11	0,471	0,013	2,81	11,67
	MQC	4,950	4,9	0,2	3,58	-1,76	5,14	0,08	1,62	3,78
	HQC	9,900	9,2	0,2	2,05	-6,71	9,6	0,2	1,65	-2,73
BDQ	LLOQ	0,050	0,045	0,001	2,80	-10,67	0,037	0,002	5,55	-25,50
	LQC	0,151	0,148	0,004	2,73	-1,88	0,148	0,003	1,96	-1,71
	MQC	1,770	1,79	0,07	3,65	0,92	1,89	0,02	0,88	6,77
	HQC	3,540	3,47	0,07	1,98	-1,90	3,61	0,06	1,59	1,89
D-BDQ	LLOQ	0,083	0,067	0,003	4,16	-19,38	0,053	0,004	7,77	-35,94
	LQC	0,250	0,264	0,006	2,36	5,63	0,265	0,008	2,83	6,07
	MQC	2,940	3,05	0,10	3,30	3,59	3,22	0,03	1,06	9,46
	HQC	5,880	5,88	0,04	0,67	-0,06	6,1	0,2	2,82	3,67
DLM	LLOQ	0,007	0,007	0,000	0,00	0,00	0,007	0,000	7,47	-5,95
	LQC	0,021	0,023	0,001	3,03	8,33	0,022	0,001	3,84	6,75
	MQC	0,250	0,272	0,010	3,57	8,73	0,277	0,003	1,17	10,67
	HQC	0,500	0,536	0,010	1,88	7,18	0,551	0,011	1,98	10,22

4. pielikums. Atšķaidīšanas integritāte

1.tabula

Paraugu atšķaidīšanas ietekme uz analītisko signālu

Analīts	Atšķaidīšanas faktors	Matrica	Nominālā konc., µg/mL	Vid. izmērītā konc. (n=5), µg/mL	Sn, µg/mL	Pareizība (RK), %	Precizitāte (RSN), %
LFX	1:4	Plazma	5,53	5,05	0,11	-8,68	2,14
		Plazmas ekstr.	5,5	4,7	0,2	-14,55	4,63
	1:9	Plazma	2,77	2,56	0,11	-7,58	4,31
		Plazmas ekstr.	2,77	2,31	0,06	-16,61	2,81
D-LFX	1:4	Plazma	5,44	5,01	0,13	-7,90	2,66
		Plazmas ekstr.	5,4	4,6	0,2	-14,81	4,69
	1:9	Plazma	2,72	2,50	0,12	-8,09	4,63
		Plazmas ekstr.	2,72	2,27	0,07	-16,54	3,08
LFX-N	1:4	Plazma	3,27	3,05	0,06	-6,73	1,99
		Plazmas ekstr.	3,27	2,85	0,14	-12,84	4,90
	1:9	Plazma	1,63	1,55	0,05	-4,91	3,12
		Plazmas ekstr.	1,63	1,40	0,04	-14,11	2,81
LZD	1:4	Plazma	5,44	4,88	0,15	-10,29	3,05
		Plazmas ekstr.	5,4	4,5	0,2	-16,67	4,69
	1:9	Plazma	2,72	2,60	0,08	-4,41	3,04
		Plazmas ekstr.	2,72	2,41	0,10	-11,40	4,18
BDQ	1:4	Plazma	1,94	1,83	0,05	-5,67	2,92
		Plazmas ekstr.	1,94	1,72	0,07	-11,34	4,20
	1:9	Plazma	0,97	0,95	0,03	-2,06	2,82
		Plazmas ekstr.	0,97	0,87	0,02	-10,31	2,49
D-BDQ	1:4	Plazma	3,23	3,02	0,09	-6,50	2,91
		Plazmas ekstr.	3,23	2,84	0,11	-12,07	4,03
	1:9	Plazma	1,62	1,57	0,05	-3,09	3,04
		Plazmas ekstr.	1,62	1,45	0,03	-10,49	2,15
DLM	1:4	Plazma	0,275	0,291	0,012	5,82	3,99
		Plazmas ekstr.	0,275	0,279	0,012	1,45	4,18

5. pielikums. Matricas efekts

1.tabula

Matricas efekts

Paraugs	Levofloksacīns					N-Demetillevfloksacīns				
	Joslas laukums	MF	Vidējais MF	STD	RSN, %	Joslas laukums	MF	Vidējais MF	STD	RSN, %
LQC bez matricas	115008					27017				
LQC ar matricu 1	129539	1,1	1,14	0,03	2,23	30405	1,1	1,12	0,03	2,58
LQC ar matricu 2	136313	1,2				31537	1,2			
LQC ar matricu 3	131578	1,1				30085	1,1			
LQC ar matricu 4	128564	1,1				29200	1,1			
LQC ar matricu 5	128842	1,1				29776	1,1			
LQC ar matricu 6	132233	1,1				30119	1,1			
HQC bez matricas	1822109					434341				
HQC ar matricu 1	2363222	1,3	1,30	0,03	2,16	583227	1,3	1,35	0,03	2,22
HQC ar matricu 2	2295660	1,3				565874	1,3			
HQC ar matricu 3	2393956	1,3				587911	1,4			
HQC ar matricu 4	2406580	1,3				594571	1,4			
HQC ar matricu 5	2437209	1,3				601411	1,4			
HQC ar matricu 6	2335619	1,3				574646	1,3			
	Levofloksacīna N-oksīds					Linezolid				
Paraugs	Joslas laukums	MF	Vidējais MF	STD	RSN, %	Joslas laukums	MF	Vidējais MF	STD	RSN, %
LQC bez matricas	41282					13788				
LQC ar matricu 1	40136	1,0	0,99	0,02	1,68	12870	0,9	0,97	0,02	2,08
LQC ar matricu 2	41952	1,0				13610	1,0			
LQC ar matricu 3	41659	1,0				13457	1,0			
LQC ar matricu 4	40472	1,0				13176	1,0			
LQC ar matricu 5	40897	1,0				13549	1,0			
LQC ar matricu 6	41054	1,0				13417	1,0			
HQC bez matricas	754609					300638				
HQC ar matricu 1	792715	1,1	1,05	0,02	2,26	313208	1,0	1,05	0,05	5,05
HQC ar matricu 2	761357	1,0				295827	1,0			
HQC ar matricu 3	808797	1,1				312633	1,0			
HQC ar matricu 4	798387	1,1				326897	1,1			
HQC ar matricu 5	807043	1,1				337388	1,1			
HQC ar matricu 6	781429	1,0				299445	1,0			

Matricas efekts

Paraugs	Bedakvilīns					N-Demetilbedakvilīns				
	Joslas laukums	MF	Vidējais MF	STD	RSN, %	Joslas laukums	MF	Vidējais MF	STD	RSN, %
LQC bez matricas	43238					70261				
LQC ar matricu 1	42163	1,0	0,99	0,02	2,03	66671	0,9	0,97	0,03	2,95
LQC ar matricu 2	44432	1,0				70208	1,0			
LQC ar matricu 3	43186	1,0				69950	1,0			
LQC ar matricu 4	42296	1,0				65742	0,9			
LQC ar matricu 5	43397	1,0				68631	1,0			
LQC ar matricu 6	42382	1,0				65945	0,9			
HQC bez matricas	841759					1282819				
HQC ar matricu 1	865492	1,0	1,03	0,03	2,52	1334499	1,0	1,03	0,03	3,30
HQC ar matricu 2	836683	1,0				1264082	1,0			
HQC ar matricu 3	880604	1,0				1317101	1,0			
HQC ar matricu 4	887339	1,1				1383026	1,1			
HQC ar matricu 5	881638	1,0				1324714	1,0			
HQC ar matricu 6	841510	1,0				1273103	1,0			
Delamanīds										
Paraugs	Joslas laukums	MF	Vidējais MF	STD	RSN, %					
LQC bez matricas	31994									
LQC ar matricu 1	30964	1,0	0,980	0,015	1,53					
LQC ar matricu 2	31770	1,0								
LQC ar matricu 3	32091	1,0								
LQC ar matricu 4	31199	1,0								
LQC ar matricu 5	31344	1,0								
LQC ar matricu 6	30848	1,0								
HQC bez matricas	671323									
HQC ar matricu 1	708429	1,1	1,04	0,04	3,41					
HQC ar matricu 2	661816	1,0								
HQC ar matricu 3	708059	1,1								
HQC ar matricu 4	709774	1,1								
HQC ar matricu 5	715130	1,1								
HQC ar matricu 6	667903	1,0								

6. pielikums. Stabilitāte

1. tabula

Analizējamo vielu īstermiņa stabilitāte, glabājot paraugus istabas temperatūrā, 22,5 °C

Analizējamā viela	QC līmenis	Stabilitāte, % (n=1)			
		15 min	30 min	60 min	240 min
LFX	LQC	96	93	94	91
	HQC	99	98	97	97
D-LFX	LQC	96	92	94	91
	HQC	97	96	97	96
LFX-N	LQC	97	93	95	91
	HQC	102	101	99	101
LZD	LQC	97	102	98	96
	HQC	97	98	100	97
BDQ	LQC	95	93	94	88
	HQC	99	100	100	99
D-BDQ	LQC	93	93	90	83
	HQC	96	99	97	93
DLM	LQC	72	57	38	10
	HQC	76	65	43	13

2. tabula

Analizējamo vielu īstermiņa stabilitāte, glabājot paraugus ledusskapī, 4 °C

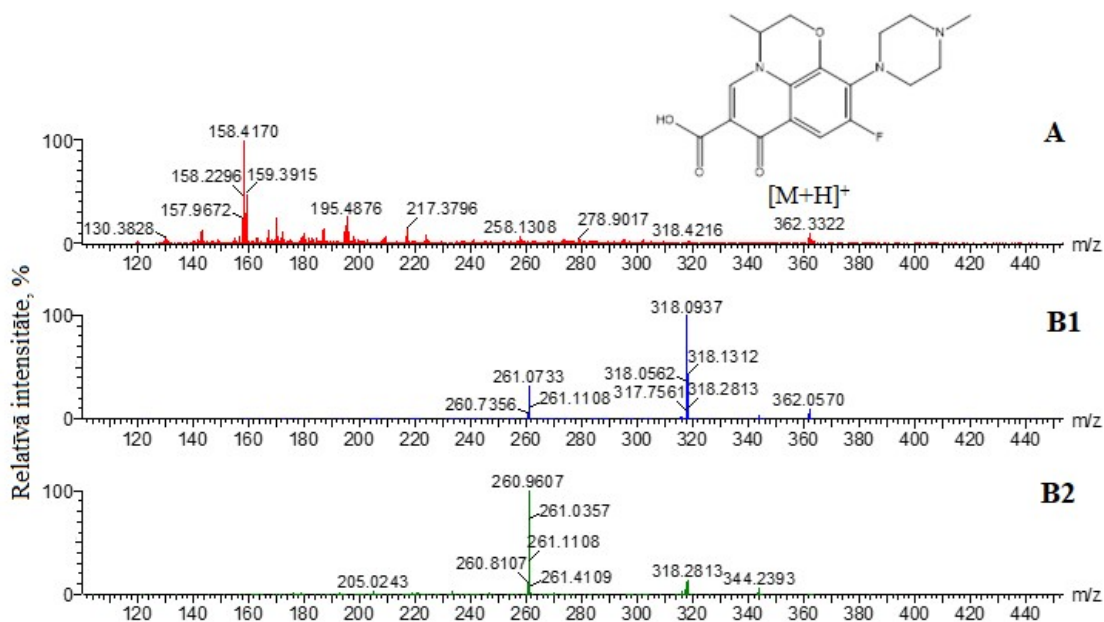
Analizējamā viela	QC līmenis	Stabilitāte, % (n=2)			
		15 min	30 min	60 min	240 min
LFX	LQC	100	96	101	96
	HQC	104	102	101	101
D-LFX	LQC	100	96	100	97
	HQC	106	102	102	102
LFX-N	LQC	99	96	100	96
	HQC	104	100	99	102
LZD	LQC	103	101	99	102
	HQC	103	100	100	101
BDQ	LQC	100	99	99	98
	HQC	101	100	99	100
D-BDQ	LQC	100	100	100	97
	HQC	101	100	100	101
DLM	LQC	98	95	96	88
	HQC	100	96	97	93

Centrifugēšanas temperatūras (+4 un 22,5 °C) ietekme uz rezultātu pareizību un analīta stabilitāti*

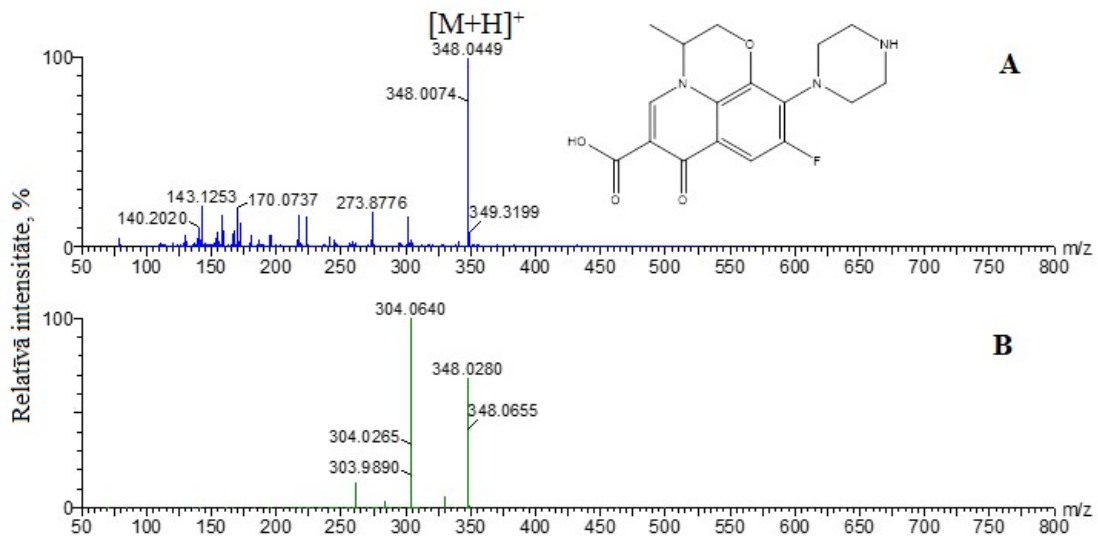
Analizējamā viela	QC līmenis	Nominālā konc., µg/mL	Konc., µg/mL (4 °C)	RK, %	Konc., µg/mL (22,5 °C)	RK, %	Stabilitāte*, %
LFX	LQC	0,428	0,436	1,81	0,433	1,17	99
	HQC	10,060	10,082	0,22	10,854	7,89	108
D-LFX	LQC	0,422	0,416	-1,36	0,417	-1,18	100
	HQC	9,900	9,900	0,00	10,717	8,25	108
LFX-N	LQC	0,253	0,257	1,48	0,251	-0,69	98
	HQC	5,940	6,040	1,69	6,313	6,28	105
LZD	LQC	0,422	0,433	2,67	0,426	0,95	98
	HQC	9,900	9,901	0,01	10,362	4,66	105
BDQ	LQC	0,151	0,156	3,31	0,145	-4,14	93
	HQC	3,540	3,750	5,93	3,658	3,32	98
D-BDQ	LQC	0,250	0,251	0,40	0,237	-5,10	95
	HQC	5,880	5,970	1,53	5,796	-1,42	97
DLM	LQC	0,021	0,023	7,14	0,022	2,38	96
	HQC	0,500	0,543	8,65	0,516	3,15	95

*Pieņemot, ka sākuma koncentrācija ir paraugā, kas tika centrifugēts +4 °C

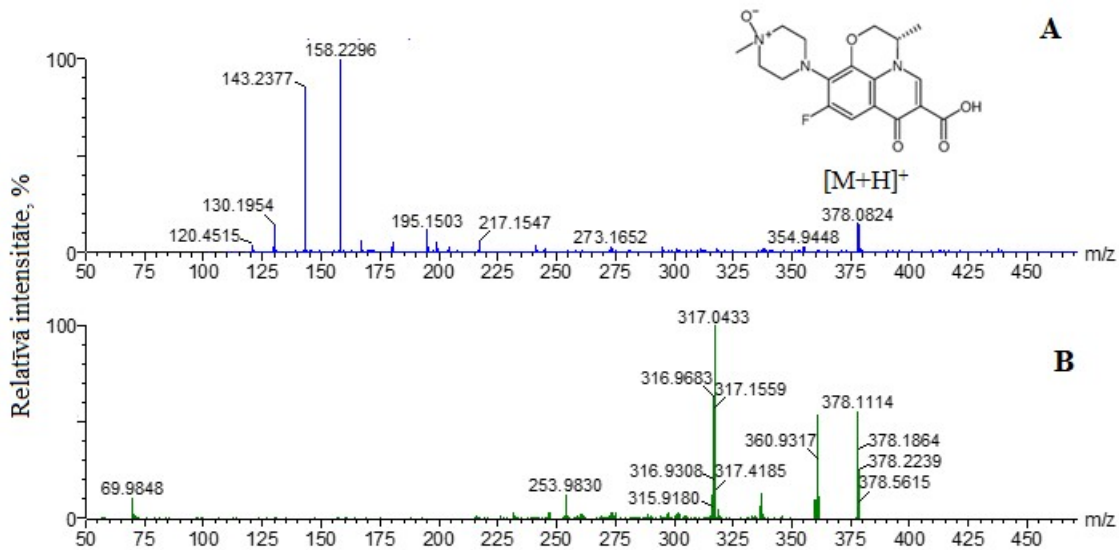
7. pielikums. Analizējamo vielu masspektri



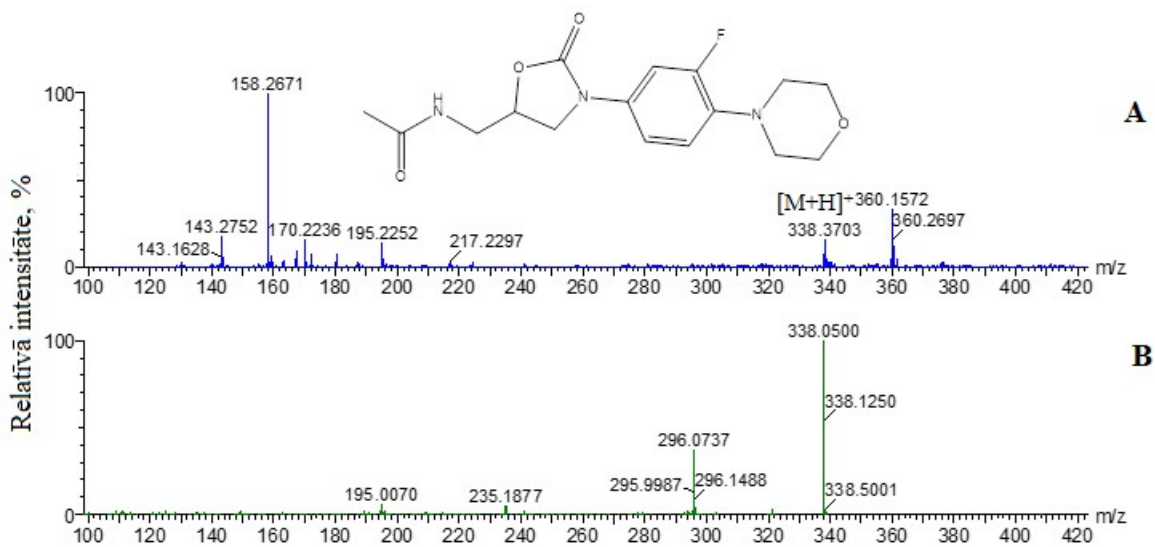
1. att. A – levofloksacīna pilnas jonu strāvas masspektrs, B1 - protonēta molekulārā jona sabrukšanas masspektrs (kolīzijas enerģija 18, eV), B2 - protonēta molekulārā jona sabrukšanas masspektrs (kolīzijas enerģija 25, eV)



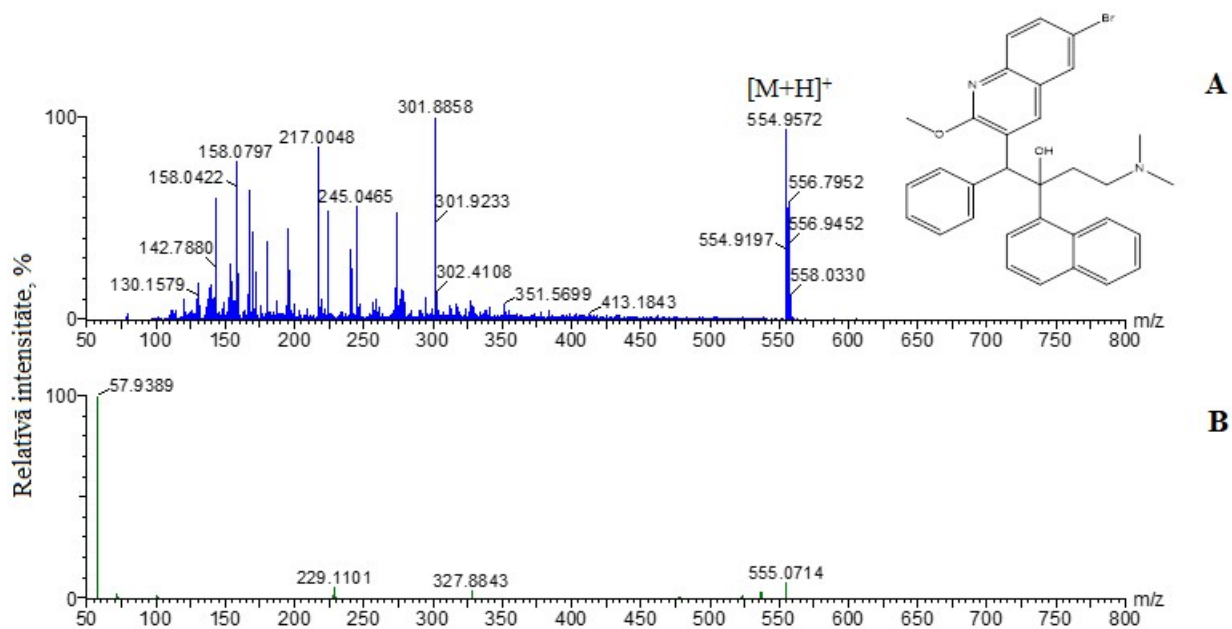
2. att. A – N-demetillevofloksacīna pilnas jonu strāvas masspektrs, B - protonēta molekulārā jona sabrukšanas masspektrs



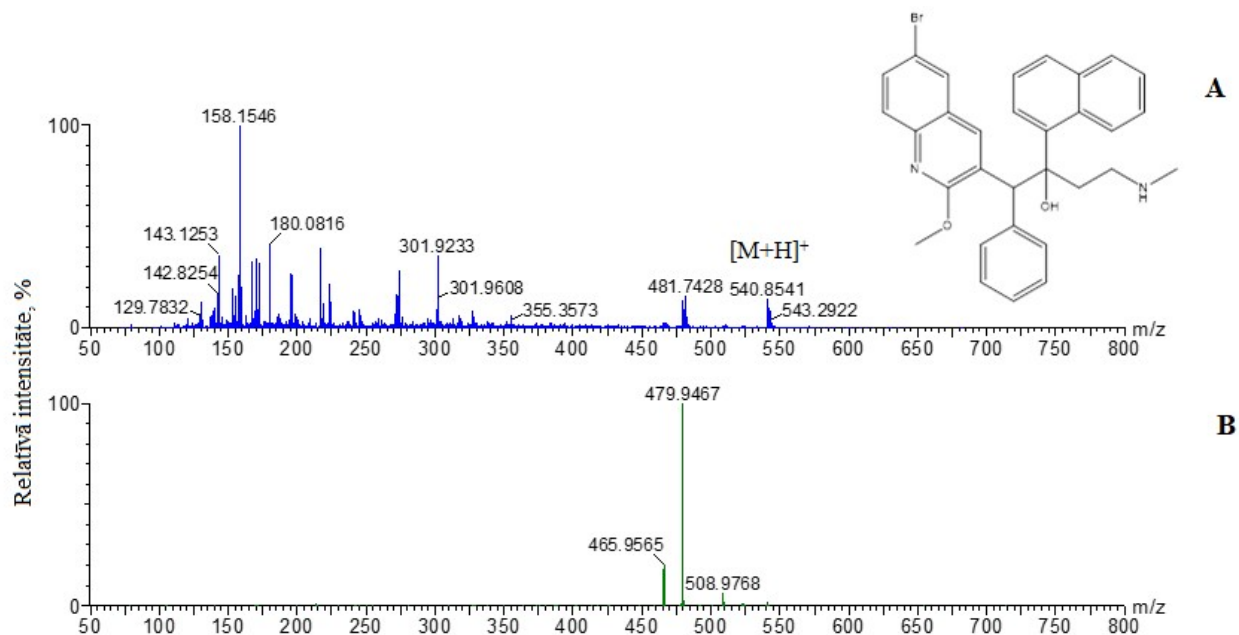
3. att. A – levofloksacīna N-oksīda pilnas jonu strāvas masspektrs, B - protonēta molekulārā jona sabrukšanas masspektrs



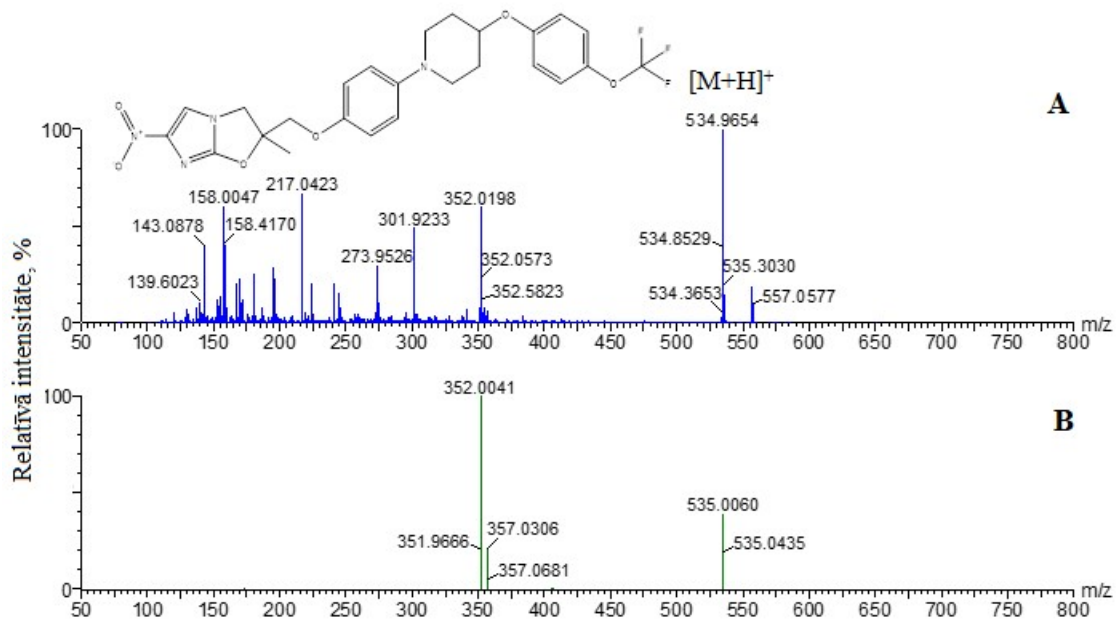
4. att. A - linezolīda pilnas jonu strāvas masspektrs, B - protonēta molekulārā jona sabrukšanas masspektrs



5. att. A – bedakvilīna pilnas jonu strāvas masspektrs, B - protonēta molekulārā jona sabrukšanas masspektrs



6. att. A – N-demetilbedakvilīna pilnas jonu strāvas masspektrs, B - protonēta molekulārā jona sabrukšanas masspektrs



7. att. A – delamanīda pilnas jonu strāvas masspektrs, B - protonēta molekulārā jona sabrukšanas masspektrs

Maģistra darbs „LC-MS/MS metodes izstrāde otrās izvēles prettuberkulozes zāļu vielu un to metabolītu kvantitatīvai noteikšanai asins plazmā.” izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūta Fizikāli organiskās ķīmijas laboratorijā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: Baiba Gukālova _____
(personiskais paraksts)

Rekomendēju/nerekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja *Dr. chem.* Solveiga Grīnberga: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Recenzents docents, *Dr. chem.* Vadīms Bartkevičs: _____
(personiskais paraksts) (datums)

Darbs iesniegts Ķīmijas fakultātē: _____ (datums)

Dekāna pilnvarotā persona, metodiķe: _____ Ilze Gaile
(personiskais paraksts)

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē:

_____ protokols Nr. _____
(datums) (protokola Nr.)

Komisijas sekretāre, lektore: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)