

**Stanovení 8-methoxypsoralenu
při extrakorporální fotochemoterapii metodou LC-MS/MS**

Metoda byla vypracována při řešení grantu ERDF OPPK 24001

Jiří Suttnar, Leona Chrastinová, Jan E. Dyr

Praha, jaro 2013

Úvod

8-methoxypsoralen (8-MOP) je pro léčebné účely využíván jako fotosensibilisátor pro extrakorporální fotochemoterapii (EF, fotoferézu) – léčebnou metodu, při níž jsou fotosenzibilované buňky mononukleární frakce z periferní krve (lymfocyty a monocyty) ozářeny UVA zářením a transfundovány zpět pacientovi. Odběr mononukleárních buněk se provádí technikou leukaferézy. Cílem EF je snížení počtu atypických (maligních) lymfocytů. Pro kontrolovaný průběh EF je nutné kontrolovat hladinu 8-MOP v preparátech v různém stadiu jejich přípravy.

Pro stanovení 8-MOP byla vypracována metoda LC-MS/MS využívající monitorování vybraných reakcí (selected reactions monitoring, SRM), která zajišťuje rychlé a spolehlivé stanovení jeho koncentrace v preparátech mononukleárních frakcí. Jako vnitřní standard by použit 5-methoxypsoralen (5-MOP).

Příprava standardů

Zásobní roztoky

8-MOP 22.4 mg/50 ml MeCN (448 µg/ml), Sigma-Aldrich kat.č. M3501

5-MOP (IS) 18.6 mg/50 ml MeCN (372 µg/ml), Sigma-Aldrich kat.č. 275727

Pracovní roztoky

8-MOP 535 µl zásobního roztoku bylo přidáno do 10 ml vody – výsledná koncentrace 8-MOP činí 24000 ng/ml; dále je ředěno vodou na koncentrační řadu 12000, 6000, 3000, 1500, 750 a 375 ng/ml

5-MOP 350 µl zásobního roztoku bylo přidáno do 50 ml vody

Příprava vzorku a kalibrační řady

Ke 200 µL plazmy v Eppendorfově zkumavce je přidáno 25 µL 8-MOP (z koncentrační řady 24000-0 ng/ml nebo voda (u vzorků pacientů) a 25 µL - pracovního roztoku IS. Koncentrace 8-MOP v plasmě pro kalibraci je potom 3000, 1500, 750, 375, 187.5, 93.75, 46.875, 0 ng/ml.

Do zkumavky je přidáno 25 µL 20 % ZnSO₄ a 250 µL MeCN a vortexováno asi 10 s a třepáno 10 min na třepačce Vibrax (Scholler, Praha) při 1500 ot/min. Následuje centrifugace 30 min 40000 g, 4 °C. Ke 200 µL supernatantu je přidáno 200 µL 0,1%

kyseliny mravenčí a promícháno. Do jamek dávkovací destičky autosampleru je umístěno 200 μ L vzorku , dávka 10 μ L.

Podmínky chromatografie pro stanovení 8-methoxypsoralenu (8-MOP).

Chromatografický systém: Shimadzu Prominence (Shimadzu s.r.o., Praha)

Kolona: Atlantis dC18, 100 x 2.1 mm, 5 μ m (Waters, Praha)

Mobilní fáze A: 0,1 % HCOOH

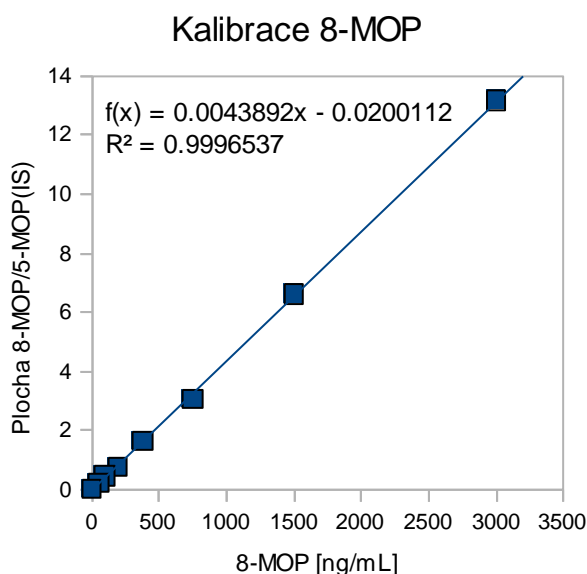
Mobilní fáze B: 80 % methanol

Mobilní fáze jsou čerpány v konstantním poměru A/B = 30/70, celkový průtok 0,25 mL/min. Eluát je pomocí přepínacího kohoutu směřován do ESI zdroje od 3,3 min do 8 min chromatografie.

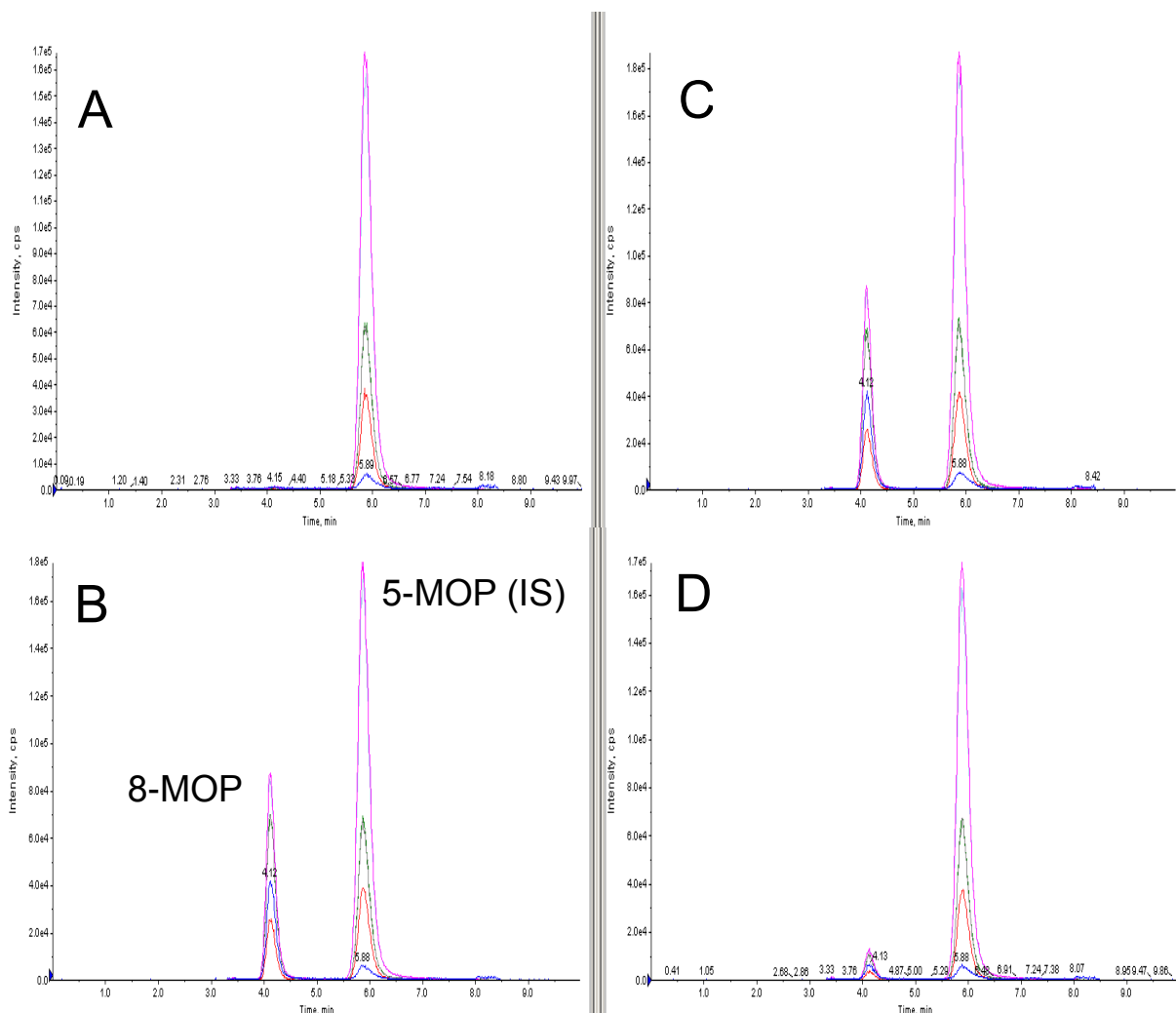
Hmotnostní spektrometr: QTRAP 4000 (ABSciex, Praha)

Podmínky ESI zdroje byly nastaveny takto: potenciál iontového spraye +5500 V, teplota 450°C. [MH]⁺ ionty byly analyzovány využitím vybraných iontových přechodů (selected reactions monitoring - SRM) analyzovaných látek. Použité SRM přechody byly m/z 217→161 pro 8-MOP a m/z 217→118 pro 5-MOP. Protože jsou obě látky velice dobře rozděleny lze použít i přechody společné pro oba analyty: m/z 217→174 a m/z 217→202.

Nejnižší stanovitelná koncentrace je pro uvedenou přípravu vzorku 10 ng/ml 8-MOP.



Příklad kalibrační křivky



Příklad chromatogramů vzorku pacienta před přidáním 8-MOP (A), po přidání 8-MOP (B) a po ozáření (C). Chromatogram D ukazuje přítomnost zbytkového množství 8-MOP (28 ng/mL) v preparátu mononukleárních buněk pacienta, které byly pro opakovanou fotoferézu připraveny v následujícím dni.

Export metody pro QTRAP 4000 do textového souboru:

Comment:

Synchronization Mode: LC Sync
Auto-Equilibration: Off
Acquisition Duration: 9min60sec
Number Of Scans: 952
Periods In File: 1
Acquisition Module: Acquisition Method
Software version Analyst 1.6

MS Method Properties:

Period 1:

Scans in Period: 952
Relative Start Time: 0.00 msec
Experiments in Period: 1

Period 1 Experiment 1:

Scan Type: MRM (MRM)
Scheduled MRM: No
Polarity: Positive
Scan Mode: N/A
Ion Source: Turbo Spray
Resolution Q1: Unit
Resolution Q3: Unit
Intensity Thres.: 0.00 cps
Settling Time: 0.0000 msec
MR Pause: 5.0070 msec
MCA: No
Step Size: 0.00 Da

@Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	Dwell(msec)	Param	Start	Stop	ID
217.000	161.000	100.00	CE	33.00	8-MOP	
	CXP	10.00	10.00			
217.000	117.900	100.00	CE	49.00	5-MOP(IS)	
	CXP	6.00	6.00			
217.000	174.000	100.00	CE	39.00	8-MOP	
	CXP	10.00	10.00			
217.000	173.900	100.00	CE	39.00	5-MOP(IS)	
	CXP	10.00	10.00			
217.000	201.900	100.00	CE	29.00	8-MOP	
	CXP	14.00	14.00			
217.000	202.000	100.00	CE	31.00	5-MOP(IS)	
	CXP	12.00	12.00			

Parameter Table(Period 1 Experiment 1):

CUR: 25.00
CAD: 6.00
IS: 5500.00
TEM: 450.00
GS1: 30.00
GS2: 30.00
ihe: ON
DP 81.00
EP 10.00

Shimadzu LC Method Properties

Shimadzu LC system Equilibration time = 0.00 min

Shimadzu LC system Injection Volume = 5.00 ul

Shimadzu LC Method Parameters

Pumps

=====

Pump A Model: LC-20AD

Pump B Model: LC-20AD

Pumping Mode: Binary Flow

Total Flow: 0.2500 mL/min.

Pump B Conc: 70.0 %

B Curve: 0

Pressure Range (Pump A/B): 0.0 - 20.0 MPa

Autosampler

=====

Model: SIL-20AC/HT

Rinsing Volume: 200 uL

Needle Stroke: 52 mm.

Rinsing Speed: 35 uL/sec.

Sampling Speed: 15.0 uL/sec.

Purge Time: 25.0 min.

Rinse Dip Time: 0 sec.

Rinse Mode: No rinsing

Cooler Enabled: Yes

Cooler Temperature: 15 deg. C

Control Vial Needle Stroke: 52 mm

System Controller

=====

Model: CBM-20A Lite

Power: On

Event 1: Off

Event 2: Off

Time Program

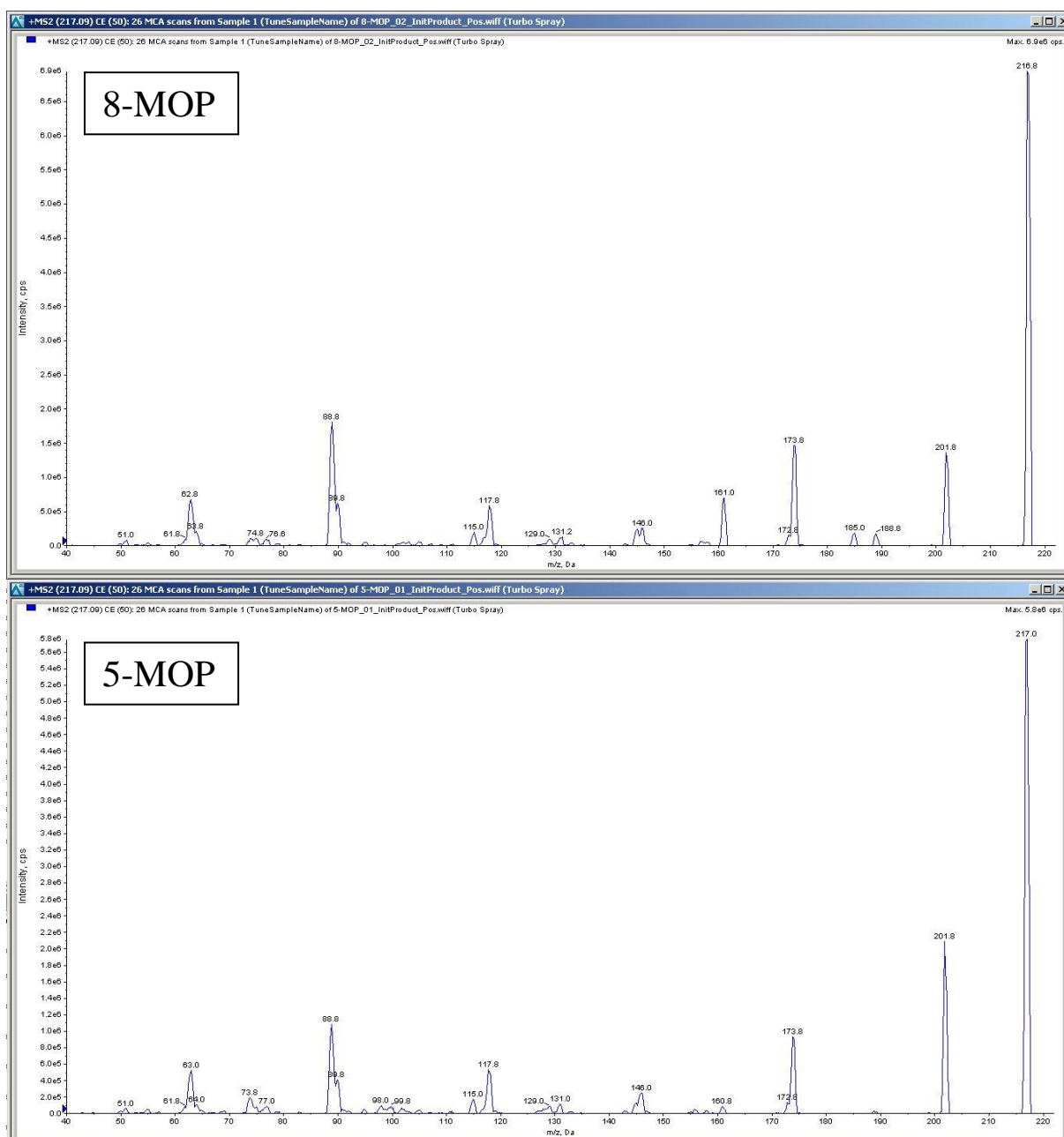
=====

Time	Module	Events	Parameter
0.01	Pumps	Pump B Conc.	70
3.30	System Controller	Event	2
8.00	Pumps	Pump B Conc.	70
8.00	System Controller	Event	1
10.00	System Controller	Stop	

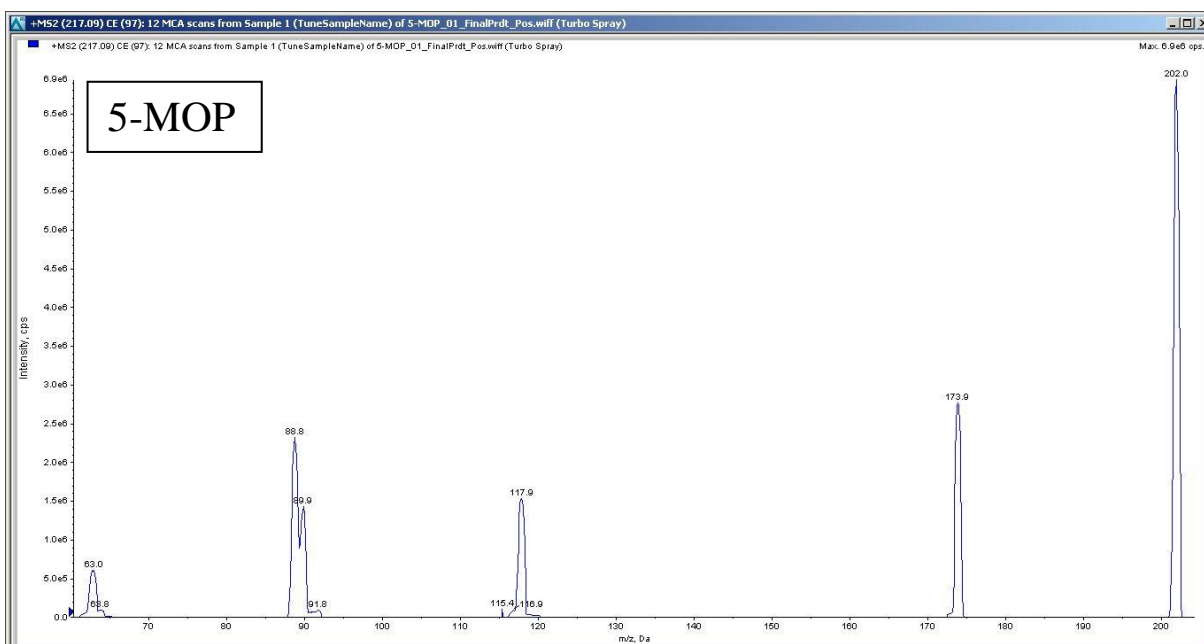
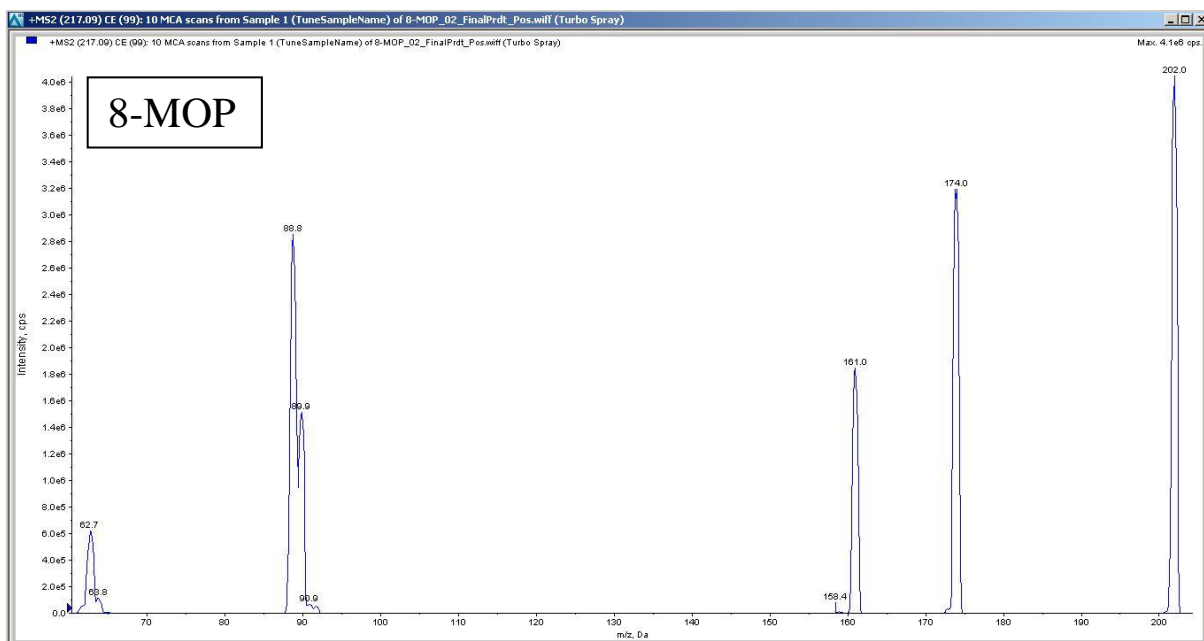
Hledání podmínek pro LC-MS/MS

Složení mobilní fáze bylo postupně měněno tak, aby kapacitní faktor měl hodnotu alespoň 3,5. Tak je zabezpečen dostatečný odstup málo zadržovaných nízkomolekulárních látek v plasmě od detegovaných analytů a omezen matriční efekt. Do 3,3 min ($k=2,75$) je eluát veden mimo ESI zdroj.

Vhodné iontové přechody a ostatní parametry (deklastrační potenciál, kolizní energie,...) byly získány infuzí roztoků 8-MOP nebo 5-MOP (0,2 pmol/ μ L) rychlostí 5 μ L/min do ESI zdroje hmotnostního spektrometru QTRAP 4000. Jsou součástí shora uvedené metody exportované do textového souboru. Následují výchozí a finální (optimalizovaná) produktová hmotnostní spektra pro oba analyty.



Výchozí produktová hmotnostní spektra pro 8-MOP a 5-MOP



Finální optimalizovaná produktová spektra 8-MOP a 5-MOP.

V obou finálních produktových spektrech je uvedeno vždy 5 nejintenzivnějších píků. Vzhledem k výchozím produktovým spektrům jsou však přechody $m/z\ 217 \rightarrow 161$ a $m/z\ 217 \rightarrow 117,9$ detegovány při chromatografii v pících 8-MOP i 5-MOP. Vzhledem k dokonalému rozdělení obou chromatografických píků jsou však použitelné všechny nalezené iontové přechody. Při analýze 50 různých plazem od různých dárců nebyly pozorovány interferující píky nečistot.