

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Keemia Instituut

Helena Kase

METOODIKA ARENDAMINE ILMA EELTÖÖTLUSETA
VEREPLASMA ANALÜÜSIKS VEDELIKKROMATOGRAAFIA
MASSISPEKTROMEETRIA MEETODIL

(Bakalaureusetöö 12 EAP)

Juhendajad: PhD Karin Kipper

dots. Koit Herodes

Kaitsmisele lubatud

Juhendaja

allkiri, kuupäev

Tartu 2015

Sisukord

1. SISSEJUHATUS	5
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
2.1 Fosfolipiidid vereplasmas.....	6
2.2 Prooviettevalmistus	7
2.2.1 Valkude sadestamine	7
2.2.2 Vedelik-vedelik ekstraktsioon.....	8
2.2.3 Tahke faasi ekstraktsioon.....	8
2.2.4 Filtreerimine	9
2.2.5 Ultrafiltreerimine	9
2.3 β -laktaam antibiootikumid.....	9
2.4 Penitsilliinide ebastabiilsus.....	10
2.4.1 Penitsilliin G.....	10
2.4.2 Ampitsilliin.....	11
2.4.3 Piperatsilliin	11
2.5 Pöördfaasvedelikkromatograafia	12
2.5.1 Statsionaarsed faasid ja kolonnid	13
2.5.2 Mobiilsed faasid	13
2.5.3 Isokraatiline elueerimine ja gradientelueerimine	13
2.6 Massispektromeetria.....	14
2.6.1 Elektropihustus-ionisatsiooniallikas	14
2.6.2 Maatriksiefektid.....	15
2.7 1,1,1,3,3,3-Heksafluoro-2-propanool.....	16
3. METOODIKA, KEMIKAALID, APARATUUR.....	17
3.1 Kemikaalid.....	17
3.2 „Prooviettevalmistus“	17
3.3 Penitsilliinide emalahuste valmistamine	18

3.4 Eluendid ja nende pH-d.....	18
3.5 HPLC-ESI-MS instrument	19
4. TULEMUSED, ARUTELU.....	20
4.1 Prooviettevalmistusest loobumine	20
4.1.1 Eelkatsed kasutatud eelkolonnidega	21
4.1.2 Põhikatsed eelkolonnidega.....	22
4.2 Ainete lahutus	23
4.3 Fosfolipiidede monitoorimine.....	24
4.4 Jääkidesse suunamise klapi ja joajagaja kasutamine	26
4.5 Valideerimine.....	26
4.5.1 Selektiivsus.....	27
4.5.2 Maatriksiefektide mõju	27
4.5.3 Stabiilsus	29
4.5.4 Lineaarne ala	31
4.5.5 Mõõte- ja kordustäpsus (<i>Accuracy, precision</i>).....	32
4.5.6 Määramispiir (LLOQ).....	33
5. KOKKUVÕTE.....	34
5. SUMMARY	35
6. KASUTATUD KIRJANDUS	37

KASUTATUD LÜHENDID

A	Piigi pindala
Acc	Mõõtetäpsus, <i>accuracy</i>
CH ₃ COONH ₄	Ammooniumatsetaat
CV	Variatsioonikoefitsient
DAD	Diodrivi detektor
ESI	Elektropihustusionisatsioon
GPCh	Glütserofosfokoliin
HCOOH	Sipelghape
HFIP	1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanool
HPLC	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
LC	Vedelikkromatograafia
LC-MS	Vedelikkromatograafia-massispektromeetria
LLE	Vedelik-vedelik ekstraksioon
LLOQ	Määramispiir
MeCN	Atsetonitriil
MeOH	Metanool
ME%	Maatriksiefekt
MS	Massispektromeetria
MWCO	Molekulmassi piirang ehk <i>molecular weight cut-off</i>
<i>m/z</i>	Massi ja laengu suhe
PP	Valkude sadestamine
R ²	Korrelatsioonikordaja ruut
SD	Standardhälve
SPE	Tahkefaasiekstraksioon
ST%	Stabiilsus

1. SISSEJUHATUS

Prooviettevalmistust peetakse üheks enim ressursse nõudvaks etapiks bioloogiliste proovide analüüsimisel. See võib moodustada kuni 80% ajast, mis kulub analüüsiks ning tihti võib endas sisaldada keerukaid etappe, et meid huvitavat analüüti maatriksist eraldada. Sageli eelistatakse jätta prooviettevalmistus võimalikult lihtsaks, kiireks ja odavaks või piirduda ainult proovi lahjendamisega ning süstimisega. Siiski peaks, ükskõik kui lihtne see ka poleks, olema tagatud analüüsi korratavus ning võimalusel kindlustatud analüüdi piisav stabiilsus.

Antud töös kasutatav bioloogiline maatriks on inimese vereplasma. Kättesaadavates kirjandusallikates ja artiklites on välja toodud põhilisemad meetodid, mis käsitlevad prooviettevalmistust vereplasmas. Nendeks on tahke faasi ekstraktsioon, vedelik-vedelik ekstraktsioon, valkude sadestamine. Viimastel aastatel on väga palju töötatud just antud meetodite arendamise ja täiustamisega, et muuta neid lihtsamini automatiseeritavateks, efektiivsemateks ja vähem aeganõudvateks. Suureks probleemiks bioloogiliste proovide analüüsil on proovikomponentide segav mõju.

Töö eesmärgiks on leida võimalusi, kuidas oleks võimalik ilma prooviettevalmistust tegemata vereplasmat analüüsida kasutades pöördfaasvedelikkromatograafiat koos elektropihustusionisatsioon massispektromeetriaga. Töö rakendusena töötatakse välja meetoodika, mis võimaldab vereplasmat otse ilma prooviettevalmistuseta analüüsida, et määrata mõnede väljavalitud penitsilliinide kontsentratsiooni.

Metoodika valideerimise käigus hinnatakse maatriksiefektide mõju analüüdi signaalile, analüütide stabiilsust erinevatel tingimustel, lineaarset ala ning mõõte- ja kordustäpsust.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1 Fosfolipiidid vereplasmas

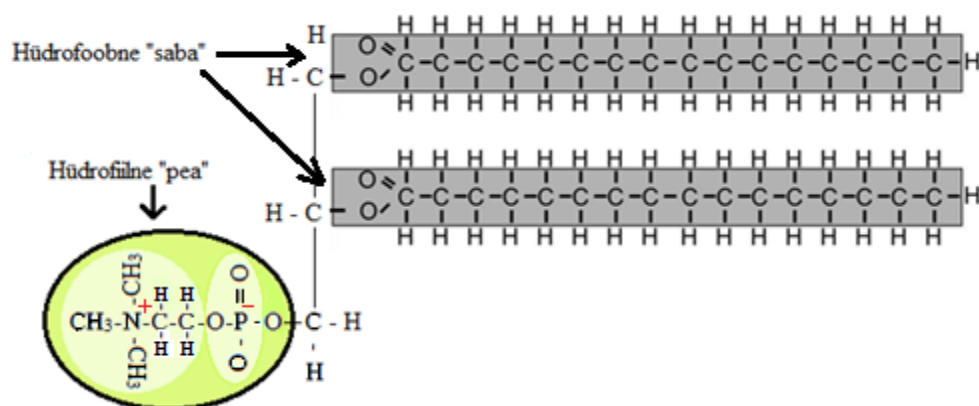
Täisveri koosneb 45% ulatuses rakulistest komponentidest ja 55% moodustab vereplasma [1]. Vere rakulised komponendid on punased verelibled (*erütrotsüüdid*), valged verelibled (*leukotsüüdid*) ja vereliistakud (*trombotsüüdid*) [1]. Täiskasvanud inimesel moodustab veri umbes 6-8% kehamassist (4-6 liitrit) [1].

Vereplasma on kollakas vedelik ning see moodustab vere vedela osa. Umbes 92% plasma koostisest on vesi, 6-8% on valgud (nt albumiin), 0,8% on soolad, 0,6% on rasvad ja umbes 0,1% moodustab veresuhkur ehk glükoos [2].

Vereseerum sarnaneb komponentide poolest vereplasmaga, kuid vereplasma sisaldab lisaks vere hüübimisfaktoreid, mida vereseerumis ei ole. Vere hüübimisel osaleb valk nimega fibrinogeen, mis muutub fibriiniks (fibrinogeeni aktiivsem vorm) [1].

Lipiidid on väga erineva struktuuriga biomolekulid, mis esinevad bioloogilistes membraanstruktuurides. Fosfolipiidid on keeruka ehitusega lipiidide klass.

Fosfolipiidide molekule iseloomustatakse tavaliselt kahte erinevat funktsionaalset gruppi sisaldavate osade järgi. Fosfolipiidid koosnevad hüdrofiilsest „peast“ ja hüdrofoobsest „sabast“. Polaarne „pea“ sisaldab ioniseeritavat negatiivselt laetud fosfaatrühma ja positiivselt laetud kvarternaarset ammooniumrühma (joonis 1) ning tagab selle, et fosfolipiid on ioniseeritud. Mitte-polaarne „saba“ koosneb ühest või kahest rasvhappe estri ahelast, mis tagavad fosfolipiidi hüdrofoobsuse [3,4,5].



Joonis 1. Fosfolipiid hüdrofoobse „saba“ ja hüdrofiilse „peaga“.

Glütserofosfokoliine (*glycerophosphocholines* GPCh) nagu näiteks fosfatidüülkoliin (*phosphatidylcholine*) loetakse üheks peamiseks fosfolipiidiks vereplasmas. GPCh-d moodustavad kuni 70% vereplasma fosfolipiididest. Teiseks suuremaks rühmaks on lüsofosfolipiidid, mis sisaldavad ühte rasvhappe estrit ning mis moodustavad kuni 10% vereplasma fosfolipiididest [3].

Fosfolipiidides esinevad koos hüdrofiilsed ja hüdrofoobsed omadused, mis muudavad nad ideaalseks materjaliks mitsellide ja rakumembraanide kaksikkihtide moodustamisel. Organismis esinevad lipiidide tüübid ja nende sisaldus veres varieerub, sõltudes toitumisest ja ainevahetusest. Fosfolipiidid esinevad nii bakterite, taimede kui ka loomade membraansete komponentidena [3].

Need bioloogilise pärituoluga ained lahustuvad hästi orgaanilistes solventides (kloroformis, eetris, metanoolis), halvasti vees [3].

2.2 Prooviettevalmistus

Prooviettevalmistus on üks tähtsamaid etappe bioloogiliste proovide analüüsimises [6,7]. Prooviettevalmistus võib moodustada kuni 80 protsenti ajast, mis kulub proovi analüüsimiseks [8,9]. Selleks, et analüüsi efektiivsust tõsta ja lühikese ajaga võimalikult palju proove analüüsida, on vaja, et prooviettevalmistus oleks võimalikult kiire, hästi korratav ning usaldusväärne [6]. Kirjanduses on hulgaliselt näiteid bioloogiliste proovide ettevalmistuse meetoditest kõrgefektiivse vedelikkromatograafia (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) analüüsi jaoks [6,7,8,9,10]. Enim kasutatavad neist on tahke faasi ekstraktsioon, vedelik-vedelik ekstraktsioon, valkude sadestamine [6] ning filtreerimine [10].

Proovi ettevalmistus on tihti kõige olulisemaks määramatuse allikaks ja (inimlike) vigade tekkekohaks.

2.2.1 Valkude sadestamine

Valkude sadestus (*protein precipitation*, PP) on üks lihtsaim, kiireim ja kõige vanem prooviettevalmistuse meetod, mis sobib nii hüdrofiilsete kui hüdrofoobsete analüütide määramiseks. Enim kasutatakse seda täisvere, vereplasma ja vereseerumi proovide analüüsimiseks [6]. Proovile lisatakse orgaanilist solventi (atsetonitriil MeCN või metanool MeOH), mille tulemusel sadenevad veres sisalduvad valgud. Proovist eraldatakse vedel faas

(supernatant) tsentrifuugimise teel [9]. Kuna pärast proovi tsentrifuugimist sisaldab supernatant olulises koguses sadestamata proovi komponente, siis on antud meetodi selektiivsus küllaltki madal. Ka osa analüüdist võib sadeneda, mistõttu võib sõltuvalt analüüsist olla selle proovi ettevalmistuse liigi saagis madal. Segavad komponendid võivad ka massispektromeetri signaali maha suruda. Segavate komponentide mõju võib täiendava tsentrifuugimisega vähendada [8].

2.2.2 Vedelik-vedelik ekstraktsioon

Vedelik-vedelik ekstraktsioon (*liquid-liquid extraction*, LLE) baseerub analüüdi jaotumisel kahe teineteises segunematu lahusti vahel. Analüüt jaotub solventide vahel vastavalt jaotuskoefitsiendile (näiteks veest orgaanilisse solventi) [8]. Vedelik-vedelik ekstraktsiooni puuduseks on madal selektiivsus, suhteliselt suur vajalik proovi kogus, emulsioonide teke [7,8] ja suur orgaanilise solvendi kulu, mis sageli on mürgine ja saastab keskkonda. Solvendi kulu teeb meetodi ka kalliks [8]. Samuti on välistatud ekstrakti otse süstimine vedelikkromatograafilis-massispektromeetrilisse (LC-MS) süsteemi, kuna paljud LLE solvendid on pöördfaaskromatograafias kasutatavate eluentidega segunematud. Proovide kontsentreerimine ja solvendi vahetamine (vedeliku kokkuaurutamise teel) võtab palju aega [6].

2.2.3 Tahke faasi ekstraktsioon

Tahke-faasi ekstraktsiooni (*solid-phase extraction*, SPE) hakati kasutama pärast vedelik-vedelik ekstraktsiooni. See põhineb analüütide jaotumisel tahke faasi ja vedela faasi ehk proovi lahuse vahel. Enamasti valitakse tingimused selliselt, et analüüdid omavad tahke faasi suhtes suuremat afiinsust kui proovi matriksi komponendid. SPE kasutab vähem solventi kui LLE ning meetodi automatiseerimine on lihtsam. See eemaldab näiteks vereplasma proovist nii fosfolipiidid kui valgud, mis on suureks eeliseks LLE ees [6,8]. Üheks SPE puuduseks on see, et paljud matriksi komponendid võivad adsorbeeruda sarnaselt analüütidega sorbendile ning sealt sarnaselt elueeruda, tuues kaasa matriksiefektid LC-MS analüüsis [9]. Kasutatavamad SPE tahked faasid on C18 ja C8 [10].

2.2.4 Filtreerimine

Filtreerimine on üks sagedamini kasutatavaid prooviettevalmistuse meetodeid. Võimalik on kasutada ainult filtreerimist või kombineerida seda teiste meetodiga. Filtreerimise efektiivsust saab tõsta, valides erinevaid membraane või automatiseerides protsessi. Bioloogiliste proovide puhastamiseks ja kontsentreerimiseks kasutatakse ultrafiltreerimist, mikrofiltreerimist ja nanofiltreerimist [6].

2.2.5 Ultrafiltreerimine

Ultrafiltreerimisel kasutatakse pool-läbilaskvat membraani, mis lahutab väga väikesed osakesed ja lahustunud molekulid vedelfaasist, põhinedes poori ja osakeste suurusel. Molekulid, mis on suuremad kui membraani poorid, jäävad membraani pinnale ja need kontsentreeritakse ultrafiltreerimise käigus [11,12].

Ultrafiltreerimisel kasutatavad membraanid on defineeritavad molekulmassi piirangu (*molecular weight cut-off*, MWCO) kaudu. *Molecular weight cut-off* on madalaima molekulmassiga lahustunud aine, mille puhul 90% lahustunud ainest säilitatakse membraanil (mõõdetakse kilodaltonites). Enne protseduuri läbiviimist on vaja kindlaks teha, millist MWCO-i kasutada [11].

Valkude eraldamisel on soovitatav, et seatud MWCO oleks 3-6 korda väiksem kui filtreerimisel eraldatud ainete molekulmass [11].

Ultrafiltreerimisel kasutavate membraanide poori suurused on vahemikus 0,1-0,01 µm (molekulmassi vahemik 10 000-1 000 000 Da [13], sinna jääb enamus valke – näiteks albumiini molekulmass on u 66 500 Da) [14].

Võrreldes ekstraktsiooni või tsentrifuugimisega on ultrafiltreerimine molekulide jaoks pehmem, ei nõua orgaaniliste solventidega ekstraheerimist, mis võib valke sadestada. Samuti on ultrafiltreerimine vähem aeganõudev ja säilitab keskkonna pH tasakaalu [11].

2.3 β-laktaam antibiootikumid

β-laktaam antibiootikumid hõlmavad üle poolte kõikidest antibiootikumidest ja neid peetakse antibiootikumide nurgakiviks. β-laktaamid on väga tõhusad Gram-positiivsete ja Gram-negatiivsete bakterite vastu, kuna nad pärsvad bakteriraku seinte sünteesi. Kuna paljud

bakterid on pikaajaliselt kasutuses olnud toimeinete suhtes resistentsed, siis järjest enam töötatakse välja uusi β -laktaam antibiootikume [15].

2.4 Penitsilliinide ebastabiilsus

Penitsilliinid on antibiootikumid, mis sisaldavad β -laktaam-tiasolidiin tsükli. Suurimaks takistuseks penitsilliinide ja teiste β -laktaam antibiootikumide kasutamisel on nende ebastabiilsus. Penitsilliinid ja teised β -laktaam antibiootikumid on tundlikud β -laktaam tsükli tõttu mitmetele nukleofiilidele, happelistele ja aluseliste reagentidele, metalli-ioonidele, oksüdeerivatele reagentidele ja isegi solventidele nagu vesi ja alkohol [16]. Kuigi erinevate β -laktaam antibiootikumide stabiilsus ning lagunemiskiirus erinevad, jäävad kõik nimetatud aineklassi kuuluvad ravimid ebastabiilseteks ning annavad stressitingimustes mitmed laguprodukte [16].

Penitsilliini molekuli omadusi ja nende antibakteriaalset toimet seletatakse β -laktaam- ja tiasolidiini tsükliga. Viiest lülist koosnev tiasolidiini tsükkel moodustab neljalülilise β -laktaami tsükliga mitteplanaarse tüve, millel on suur nurk ja ning, mis pöörleb jäigalt. Struktuuri eripära muudab molekuli ebastabiilseks ning vastuvõtlikuks nukleofiilsetele asendusreaktsioonidele, happelisele ja aluselisele hüdrolyüsile [16].

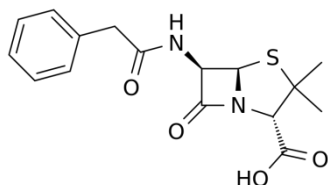
Happelises keskkonnas katkeb pingestatud β -laktaam tsükli amiidside ning annab hulga keerulisi ühendeid nagu penitsilliinhape, penitsilliinamiin ja penitsilliinaldehüüd. Penitsilliinhape esineb isomeerses vormis penamaldiinhappena (*penamaldic*) ja avab tiasolidiini tsükli.

Penitsilliinid lagunevad kiiresti ka aluselises keskkonnas (pH 7.5-9.0). Pärast amiidsideme katkemist toimub karboksüülrühma dekarboksüülimine ja tekib penitsilliinhape. Nende penitsilliinide laguproduktide tekkimine viib aktiivsuse vähenemiseni [16].

2.4.1 Penitsilliin G

Penitsilliin G ehk bensüülpenitsilliini kaaliumisool, [2S-[2 α , 5 α , 6 β]]-3,3-dimetüül-7-okso-6-[(fenüülatsetüül)amino]-4-tia-1-asabitsüklo[3.2.0]heptaan-2-karboksüülhappe kaaliumisool, on kristalliline aine, mis lahustub hästi vees, isotoonilises naatriumkloriidi lahuses ja glükoosilahuses [17].

Penitsilliin G (joonis 2) kuulub β -laktaam antibiootikumide hulka ja mõjub kiirelt bakterite vastu. Seda kasutatakse raskete infektsioonhaiguste raviks nagu streptokokid, difteeria, meningiit, gonorröa ja süüfilis. Penitsilliin G on kasutusel ka südameklappide infektsiooni ennetamiseks [18].

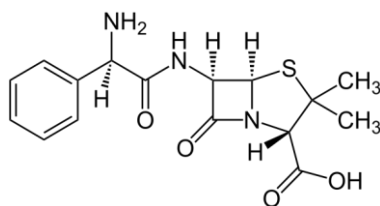


Joonis 2. Penitsilliin G/ bensüülpenitsilliini ($C_{16}H_{18}N_2O_4S$) keemiline struktuur.

2.4.2 Ampitsilliin

Ampitsilliin, [2S-[2a, 5a, 6b(S*)]]-6- [(aminofenüülatsetüül)amino]-3,3-dimetüül-7-okso-4-tia-1-asabitsüklo-[3.2.0]heptaan-2-karboksüülhape (joonis 3), kuulub sünteetiliste penitsilliinide hulka ja seda kasutatakse veenisiseselt [19]. Ta on laiema antimikroobse toimega kui penitsilliin G. Takistab Gram-positiivsete ja Gram-negatiivsete bakterite kasvu [20].

Ampitsilliini kasutatakse paljude bakterite poolt tekitatud infektsioonhaiguste raviks nagu kõrvainfektsioonid, põieinfektsioonid, kopsupõletik, gonorröa ja samuti kolibakteri ning salmonella infektsioonide raviks [21].



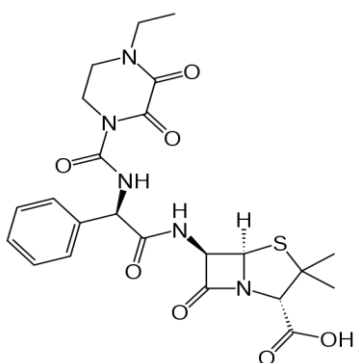
Joonis 3. Ampitsillini ($C_{16}H_{19}N_3O_4S$) keemiline struktuur.

2.4.3 Piperatsilliin

Piperatsilliin, (2S,5R,6R)-6- {[(2R)-2-[(4-etüül-2,3-diokso-piperasiin-1-karbonüül)amino]-2-fenüül-atsetüül]amino}-3,3-dimetüül-7-okso-4-tia-1-asabitsüklo[3.2.0]heptaan-2-karboksüülhape, kuulub penitsilliinide hulka (joonis 4) [22].

Piperatsilliin on antibakteriaalne aine. See takistab bakterite rakuseinte kasvu, mis omakorda tapab bakteri [23]. Piperatsilliini kasutatakse raskete infektsioonhaiguste raviks ja ka lõikustel, et ennetada infektsioonide teket [23].

Piperatsilliini kasutatakse tihti koos tasobaktaamiga, mis kuulub samuti β -laktaam antibiootikumide hulka, et ravida mitmeid bakterite tekitatud infektsioonhaigusi nagu luu- ja liigeste infektsioonhaigused, raskekujulisi vaginaalseid infektsioone, mao infektsioone, naha infektsioonhaiguseid ja ka kopsupõletikku [24].



Joonis 4. Piperatsilliini ($C_{23}H_{27}N_5O_6S$) keemiline struktuur.

2.5 Pöördfaasvedelikkromatograafia

Pöördfaaskromatograafia on enim kasutatud eraldusmeetod ainete lahutamiseks kromatograafiliselt. Umbes 90% kromatograafilistest analüüsides teostatakse tänapäeval pöördfaaskromatograafiaga [25,26]. Ainete segu kantakse läbi liikumatu ehk statsionaarse faasi eluendi vooluga. Pöördfaaskromatograafias on statsionaarne faas mittepolaarne, hüdrofoobne ning liikuv faas ehk mobiilne faas on polaarne. Normaalfaaskromatograafias on statsionaarne faas polaarne ja mobiilfaas mittepolaarne [27,28].

Pöördfaaskromatograafiat kasutatakse laialdaselt analüütiliste keemia harudes, nagu kriminalistika, toidutehnoloogia, biotehnoloogia, ravimitööstus ja meditsiin [29].

2.5.1 Statsionaarsed faasid ja kolonnid

Pöördfaaskromatograafias kasutatav statsionaarne faas on mittepolaarne. Enamasti on kolonnide täidismaterjaliks silikageel. On olemas ka polümeerseid aluseid ning alumiiniumoksiidist ja tsikooniumoksiidist aluseid, kuid neid kasutatakse enamasti vaid erirakendustes [25]. Kolonnid on täidetud väikese diameetriga poorsete osakestega. Kõige rohkem kasutatakse osakesi suurusega 5 mikromeetrit, 3,5 mikromeetrit ja 2,6 mikromeetrit. Kolonn täidetakse osakestega suure rõhu all, et nad oleksid kolonni kasutades stabiilsed [28]. Silikageeli baasil valmistatud statsionaarsed faasid annavad suurema efektiivsuse tänu suuremale eripinnale, võrreldes kõigi teiste alusmaterjalidega. Silikageel on mehaaniliselt tugev (jäik), mis tagab stabiilsed omadused. See ei pundu vees ega orgaanilistes solventides (mis võib esineda polümeersete aluste kasutamisel) ning see võimaldab gradientelueerimist. Pind on keemiliselt modifitseeritav ehk muudetav. Osakeste pinnale seotakse keemiliste sidemetega pinna modifitseerimiseks mittepolaarsed süsivesinikahelad (tavalisemad on C18 või C8 ehk vastavalt 18 või 8 süsinikku ahelas, aga kasutada võib ka lühemaid ahelaid, näiteks C2), millel on erinev interaktsioon erinevate proovi komponentidega, et neid segust lahutada [28].

2.5.2 Mobiilsed faasid

Pöördfaaskromatograafias kasutatakse analüütide elueerimiseks tavalise vee (solvent A) ja orgaaniliste solventide (solvent B) segu. Solvendid peavad omavahel segunema. Kõige enam kasutatavad orgaanilised solvendid on MeOH, MeCN ja tetrahüdrofuraan (THF) [28]. Võimalik on kasutada nii isokraatilist elueerimist kui ka gradientelueerimist. Mobiilfaasi pH mõjutab analüüdi retentsiooniga ja võib muuta teatud analüütide suhtes selektiivsust. Kui mobiilne faas on polaarsem kui statsionaarne faas, siis polaarne analüüt jaotub eelistatult mobiilfaasi, liigub kiiremini ning väljub kolonnist eespool võrreldes vähempolaarse ainega, mis jaotub eelistatult statsionaarsesse faasi [28].

2.5.3 Isokraatiline elueerimine ja gradientelueerimine

Isokraatilise elueerimise käigus mobiilse faasi koostis analüüsi/jooksu käigus ei muutu (näiteks MeOH - vesi 50/50). Elueerimisviis on enamlevinud lihtsate proovide analüüsimiseks ja kvaliteedikontrolli teostamiseks. Isokraatiline elueerimine võtab vähem aega, sest kolonni ei ole vaja analüüsi järel tasakaalustada. Võimaldab kasutada lihtsamat aparatuuri [26].

Gradientelueerimist kasutades mobiilse faasi koostis muutub analüüsi käigus (näiteks muudetakse MeOH osakaalu kromatograafilise jooksu käigus 5% kuni 100%). Tugevamat elueerivat jõudu omava mobiilfaasi komponendi sisaldus mobiilfaasis kasvab elueerimise käigus [26]. Nimetatud elueerimisviis on levinud bioloogiliste ning teiste keerukate proovide analüüsimiseks, mis sisaldavad rohkelt erinevate omadustega molekule. Kõige rohkem kasutatakse lineaarset gradienti. Gradientelueerimist kasutatakse ka proovide puhul, mis sisaldavad pika retentsioonijaga segavaid ühendeid ning mis võivad kolonni rikkuda või elueeruda alles järgmistel kromatograafilistel jooksudel [28]. Kõige tavalisem põhjus, miks valida gradientelueerimine, on analüütide lai retentsioonivahemik. Kui proovi mõni aine elueerub nõrgema mobiilse faasi juures (nt 50% solvent B-d) ja mõni tugevama mobiilse faasi juures (nt 80% solvent B-d), siis võikski kaaluda gradientelueerimist. Gradientelueerimine nõuab keerukamat aparatuuri ja kõik vedelikkromatograafias kasutatavad detektorid ei sobi selle meetodi jaoks [28].

2.6 Massispektromeetria

Massispektromeetria on analüüsimeetod, mille korral identifitseeritakse ja määratakse proovis leiduvaid aineid nende aatom- või molekulmasside järgi. Väike kogus proovi viiakse süsteemi ja analüüdist tekitatakse gaasifaasilised ioonid. Elektri- ja/või magnetvälja abil eraldatakse ioonid nende massi ja laengu suhte (m/z) järgi. Ioonid detekteeritakse ning nende tekitatud signaal registreeritakse massispektrina.

Massispektromeetrit kasutatakse ka vedelikkromatograafia detektorina. See aitab piike identifitseerida ja huvipakkuvaid aineid muudest maatriksi komponentidest eraldada [30].

2.6.1 Elektropihustus-ionisatsiooniallikas

Elektropihustusionisatsiooni (ESI) allikas on üks enamkasutatavaid ionisatsiooniallikaid LC-MS analüüsil. ESI allikat kasutades ioniseeritakse analüüt otse lahuses ning seejärel eemaldatakse solvent [31].

ESI allikas pihustatakse uuritav lahus peeneteks tilkadeks (aerosool) kapillaartorude süsteemi abil. Massispektromeetri sisendi ja pihusti kapillaari vahele rakendatakse kõrge pinge (700 V-5kV), mille tõttu tekivad laetud tilgad. Positiivse pinge rakendamisel tekivad positiivsed ioonid ja negatiivse pinge rakendamisel negatiivsed ioonid [30,32]. Solvent eemaldatakse

tilkadest kuuma gaasi pealejuhtimise teel ja kokkupõrkel (kuivatus)gaasiga. Tilkade läbimõõdu vähenedes suureneb nende laengutihedus veelgi. Tekitatakse üha väiksemaid tilgakesi, mis võivad omakorda protsessi korrata kuni tekivad analüüdi fragmenteerimata gaasifaasilised ioonid [30,32,33].

Kuna fragmenteerumist toimub vähe, nimetatakse ESI allikat pehme ionisatsiooni meetodiks [30,33].

2.6.2 Maatriksiefektid

LC-ESI-MS analüüsi juures on üheks suurimaks probleemiks maatriksiefektid.

Maatriksiefekte põhjustavad analüüdiga samal ajal elueeruvad molekulid, mis mõjutavad analüüdi ionide tekke efektiivsust. Ionisatsiooni mahasurumine või võimendamine tähendab, et analüüdi signaal on kas vähenenud või suurenenud. Kui proovis sisaldub palju erinevate omadustega komponente, siis võib osade komponentide (näiteks fosfolipiidid) interaktsioon statsionaarse faasiga olla nii tugev, et nad võivad elueeruda alles järgmise kromatograafilise süsti ajal ning põhjustada sellega ettenägematuid maatriksiefekte [4,7,34].

Üldiselt on polaarsete ühendite signaali mahasurumine suurem kui mittepolaarsete [3]. Maatriksiefektide esinemise korral väheneb ka tundlikkus ja suureneb avastamispiir. Samuti võivad maatriksiefekti põhjustavad ained MS-i saastada.

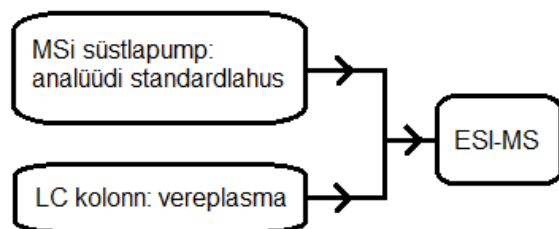
Üks võimalusi maatriksiefekti hindamiseks on ekstraktsioonijärgne analüüdi lisamine. Võrreldakse MS-i signaale võrdse kontsentratsiooniga analüüdiga rikastatud ehk *spaiitud* proovis ja solvendis [31]:

$$ME\% = \frac{A_{spaiitud}}{A_{standard}} * 100\%,$$

kus ME% on maatriksiefekt, $A_{spaiitud}$ on analüüdi piigi pindala analüüdiga rikastatud plasmaproovis ning $A_{standard}$ on analüüdi piigi pindala analüüdiga rikastatud standardlahus.

Kui maatriksiefekti väärtus jääb alla 100%, siis on tegemist ionisatsiooni mahasurumisega st analüüdi sisaldust hinnatakse väiksemaks kui see tegelikkuses on. Kui ME% on üle 100%, siis on tegu ionisatsiooni võimendamisega. MS-is võib esineda nii ionisatsiooniefektiivsuse mahasurumist kui võimendamist [31].

Teine võimalus maatriksiefektide hindamiseks on kolonnijärgne infuseerimine. Selleks infuseeritakse MS-i süstlapumbast analüüdi standardlahust ning see ühineb vereplasmaga, mis on kolonni juba läbinud. Analüüdi standardlahus ja LC-st tulev eluent koos vereplasmaga ühinevad enne ESI allikasse minemist (joonis 5).



Joonis 5. Analüüdi kolonni järgne infuseerimine maatriksiefektide uurimiseks.

Nii endogeensed (fosfolipiidid) kui eksogeensed ained võivad analüüdiga koos elueeruda ja mõjutada MS-i signaali. Üheks suurimaks maatriksiefektide tekitajaks vereproovide analüüsi juures loetaksegi fosfolipiide [4,7,34]. Nad mõjutavad ESI ionisatsiooniallikat kasutades ionisatsiooniefektiivsust suurel määral kuna on ionsete omadustega [5].

Kuna fosfolipiide on väga erinevate struktuuridega, on nende segav mõju keemilisel analüüsil LC-MS-iga suur, sest tihti elueeruvad nad terve kromatogrammi vältel. Fosfolipiidide mõju ionisatsioonile (signaali võimendamise või mahasurumise näol) esineb nende kaasa-elueerumisel pea terve kromatograafilise jooksu käigus [5].

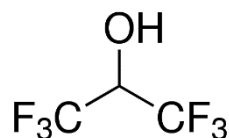
Prooviettevalmistuse üheks eesmärgiks on analüüt maatriksist eraldada ja vähendada maatriksiefekte.

Kuna vereplasma maatriksis on palju segavaid komponente nagu näiteks fosfolipiidid, siis on ka antud töös vaja uurida, kuidas ja kui palju mõjutavad need maatrikiefektide tekkimist kui soovime analüüsida vereplasmat ilma prooviettevalmistuseta.

2.7 1,1,1,3,3,3-Heksafluoro-2-propanool

1,1,1,3,3,3-Heksafluoro-2-propanool (heksafluoroisopropanool, HFIP) on polaarne solvent [35]. HFIP on värvusetu ühend, mis seguneb hästi veega ja paljude orgaaniliste solventidega, aga ei segune kõrgemate alkaanidega. HFIP on lenduv ja suure tihedusega ühend, sellel on madal viskoossus ja madal pindpinevus. UV spektrialas on HFIP läbipaistev ja sellel on väike murdumisnäitaja [36].

HFIP molekuli erilised omadused tulenevad tema struktuurist (joonis 6). Tal on kõrge oktanool-vesi jaotuskoefitsient ($\log P=1,66$) [37] ja tal on omadus moodustada tugevaid vesiniksidemeid. Kaks HFIP-i molekuli moodustavad vesinikidemed ühe fosfolipiidi „peaga“ [38].



Joonis 6. HFIP-i keemiline struktuur.

HFIP-i ja tema potentsiaali eluendi lisandina on uuritud meie töögrupis varasemalt ning katsed on näidanud, et ta muudab fosfolipiidide elueerumist kolonnist ning tekitab puhtama baasijooni LC-UV-s. 5 mM HFIP-i kasutamine andis kõrgemad signaali intensiivsused erinevatesse aineklassidesse kuuluvate antibiootikumide LC-ESI-MS analüüsil ja parema kromatograafilise lahutuse kui traditsioonilised puhverlahused ning see sobib kasutamiseks nii happeliste kui aluseliste ühendite määramisel [39,40].

3. METOODIKA, KEMIKAALID, APARATUUR

3.1 Kemikaalid

Penitsilliin G, piperatsilliini ja ampitsilliini standardained pärinevad firmast Sigma-Aldrich (USA). Käesolevas töös kasutatud kemikaalid ja nende omadused on toodud lisas 1.

3.2 „Prooviettevalmistus“

Vereplasma säilitati temperatuuril $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Enne analüüsi võeti vajalik kogus vereplasmat ning sulatati see toatemperatuurile ($+22\text{ }^{\circ}\text{C}$). Vereplasma proovid filtreeriti läbi kahe erineva poorisuurusega filtri, et vältida tahkete osakeste sattumist süstimisüsteemi:

1. Econofilter, regenereeritud tselluloos 25/45
2. Millex -GV $0,22\text{ }\mu\text{m}$

Sellega on proovid analüüsimiseks LC-MS-ga valmis. Kolonni süstiti $10\text{ }\mu\text{l}$ proovi.

3.3 Penitsilliinide emalahuste valmistamine

Penitsilliin G emalahuse valmistamiseks kaaluti 11,1 mg (0,0111 g) penitsilliin G kaaliumsoola (*Penicillin G potassium salt*) pulbrit, mis lahustati Milli-Q vees (9,9934 g) ruumalani 10 ml. Saadi emalahus kontsentratsiooniga 0,987 mg/g. Ampitsilliini emalahuse valmistamiseks kaaluti 11,3 mg (0,0113 g) ampitsilliin trihüdraat (*Ampicillin trihydrate*) pulbrit, mis viidi Milli-Q vee (9,9676 g) abil ruumalani 10 ml. Saadi emalahus kontsentratsiooniga 0,976 mg/g. Piperatsilliini emalahuse valmistamiseks kaaluti 10,7 mg (0,0107 g) piperatsilliini naatriumsoola (*Piperacillin sodium salt*) pulbrit, mis viidi Milli-Q vees (9,9288 g) ruumalani 10 ml. Saadi emalahus kontsentratsiooniga 0,982 mg/g. Kõik emalahused pipeteeriti 0,7 ml kaupa 2 ml Eppendorfi viaalidesse ning need säilitati -80 °C juures.

3.4 Eluendid ja nende pH-d

Töös kasutati nelja erinevat puhverlahust.

Puhverlahused:

- 1) HFIP puhverlahus pH 8,5. Valmistati 1 liiter 5 mM HFIP lahust pH väärtusega 8,5. Selleks kaaluti 0,8400 g HFIP-i. See viidi ruumalani 1 liiter, kasutades ülipuhast Milli-Q vett. Ammoniaagi lisamisel ja pH-meetri abil viidi puhverlahuse pH väärtusele 8,5. Seejärel filtreeriti puhverlahus läbi 0,22 µm poorisuurusega membraanfiltrit.
- 2) CH₃COONH₄ puhverlahus. Valmistati 1 liiter 5 mM CH₃COONH₄ lahust pH väärtusega 8,5. Selleks kaaluti 0,385 g ammooniumatsetaati. See viidi ruumalani 1 liiter, kasutades ülipuhast Milli-Q vett. Ammoniaagi lisamisel ja pH-meetri abil viidi puhverlahuse pH väärtusele 8,5. Seejärel filtreeriti puhverlahus läbi 0,22 µm poorisuurusega membraanfiltrit.
- 3) HFIP puhverlahus pH 2,6. Valmistati 1 liiter 5 mM HFIP lahust pH väärtusega 2,6. Selleks kaaluti 0,8400 g HFIP-i. See viidi ruumalani 1 liiter, kasutades ülipuhast Milli-Q vett. HCOOH lisamisel ja pH-meetri abil viidi puhverlahuse pH väärtusele 2,6. Seejärel filtreeriti puhverlahus läbi 0,22 µm poorisuurusega membraanfiltrit.
- 4) HCOOH vesilahus. Valmistati 1 liiter 0,1%-list HCOOH lahust. Selleks lisati 1 liitrilisse kolbi 1 ml 100%-list HCOOH lahust ja viidi ruumalani 1 liiter, kasutades ülipuhast Milli-Q vett. Lahust segati hoolikalt ja filtreeriti läbi 0,22 µm poorisuurusega membraanfiltrit.

Käesoleva töö üheks eesmärgiks on välja töötada LC-MS metoodika, et määrata penitsilliine inimese vereplasmas ilma eelneva prooviettevalmistuseta. Eelkolonnidega katsetel tehti gradientelueerimist voolukiirusel 0,55 ml/min. Kromatograafilise jooksu pikkus oli 7 minutit, kolonni stabiliseeriti 0,5 minutit. MeOH osakaalu tõsteti 0-5 minuti jooksul 20%-lt 100%-le, 5-6. minutil hoiti MeOH 100%-l ning 6-7. minutil viidi MeOH osakaal tagasi 20%-le. Penitsilliinide määramiseks kasutati antud töös gradientelueerimist voolukiirusel 0,8 ml/min. Mobiilfaasina olid kasutusel 5 mM HFIP puhverlahus pH-ga 8,5 ja MeOH. Süsti pikkus oli 20 minutit ning seejärel stabiliseeriti kolonni 1,5 minutit. Optimeerimiste käigus leiti ka sobiv gradientprogramm, mis on esitatud Tabelis 1.

Tabel 1. Penitsilliinide määramiseks kasutatud gradientprogramm.

Aeg (min)	Veefaas %	MeOH %
0	80	20
1	80	20
3	70	30
10	70	30
14	30	70
16	0	100
18	80	20
20	80	20

3.5 HPLC-ESI-MS instrument

- HPLC: Agilent, 1290 Infinity

DAD detektor, G4212A, 190-600 nm

- MS: Varian (Agilent), J320-MS Triple Quadrupole koos ESI allikaga
- Kasutatud teadmata ajalooga eelkolonnid: Hypersil BDS-C18 Guard Column 2.1 x 20 mm, 3,5- Micron (2 tk)
- Eelkolonnid erinevate eluentide katsetusteks: Agilent, ZORBAX Eclipse Plus – C18, Analytical Guard Column 4,6 x 12,5 mm, 5-Micron.
- Analüütiline kolonn: Gemini C18, 150 x 4,6 mm, 5-Micron
- Eelkolonnid analüütilisele kolonnile: Security Guard Cartridges, Gemini C18, 4 x 3,0 mm

Massispektromeetris kasutati nii positiivset kui negatiivset režiimi. Penitsilliini määramiseks kasutati negatiivses režiimis üleminekuid m/z 333 $[M-H]^- \rightarrow m/z$ 74, 193 (kvantifitseerimiseks) ja 289; ampitsilliini määramiseks kasutati negatiivses režiimis üleminekuid m/z 348 $[M-H]^- \rightarrow m/z$ 206,7, 208 (kvantifitseerimiseks) ja 304; piperatsilliini määramiseks kasutati positiivses režiimis üleminekuid m/z 540 $[M+Na]^+ \rightarrow m/z$ 165, 182 (kvantifitseerimiseks) ja 397. ESI allikas oli kuivatusgaasi rõhk 25 psi-d ja pihustusgaasi rõhk 55 psi-d. Detektori pinge oli 1750 V. Kolonni termostaat oli +30 °C ning autosampleri termostaat +4 °C.

4. TULEMUSED, ARUTELU

Töö metoodika väljatöötamine koosnes kolmest osast:

1. Katsed eelkolonnidega prooviettevalmistusest loobumiseks
2. Penitsilliinide määramismetoodika väljatöötamine ilma prooviettevalmistuseta
3. Penitsilliinide määramismetoodika valideerimine

4.1 Prooviettevalmistusest loobumine

Vereplasma sisaldab suures osas valke, mis kokkupuutel orgaaniliste solventidega sadenevad. Antud töö eesmärk on uurida, kas ilma prooviettevalmistuseta vereplasmat on võimalik ainult filtreerimisjärgselt analüüsida ning seda olukorras, kus pöördfaaskromatograafias kasutatakse orgaanilisi solvente. Filtreerimine aitab vabaneda vereplasmas esinevatest suurematest

koaguleerunud tükkidest, mis võivad süstimisüsteemi ummistada ning seetõttu takistada proovi jõudmist kromatograafilisse kolonni.

4.1.1 Eelkatsed kasutatud eelkolonnidega

Kuna polnud teada, mil määral võivad kolonnid vereplasma süstimiste tõttu ummistuda, katsetati esialgselt Hypersil eelkolonnidega ning tehti võrdluskatseid erinevate puhverlahustega ning erinevatel pH-del (peatükk 3.4). Ühe süsti ruumala oli 4 µl. Kolonni termostaat oli seatud +30 °C juurde ning autosampleri termostaat +4 °C juures. Voolukiirus oli 0,55 ml/min.

Kõigepealt kasutati laboris olemasolevat kahte vana eelkolonni, mille seisukord ning ajalugu oli teadmata. Igat kasutatud eluendi lisandit on vaadeldud eraldi ning hinnatud kuivõrd tõusis süsteemi rõhk vereplasma otsesüstimisel.

1) HFIP pH=8,5

Esialgne rõhk kolonnis oli 75,0 bar. Rõhk 294 süsti järel oli 112 bar-i, tõustes kokku 37 bar-i. Kokku süstiti kolonni 1,176 ml vereplasmata.

2) CH₃COONH₄ pH=8,5

Kolonni rõhk algselt oli 83,0 bar. Kolonni rõhk 297 süsti järel oli 192,0 bar-i. Kokku süstiti kolonni 1,188 ml vereplasmata.

3) HFIP pH=2,6

Kolonni rõhk katse alguses oli 144,0 bar. Maksimaalne rõhk kolonnis oli 25. süsti eel (214 bar), kuid langes siis järsult. Rõhu langus ja ühenduste lekkimine kinnitasid, et kolonn ummistus (0,1 ml vereplasma järel) ning edasi mõõta ei olnud võimalik.

4) 0,1% HCOOH

Kasutusele võeti uus eelnevalt kasutatud kolonn. Kolonni rõhk algselt oli 92,0 bar. Kolonni rõhk 300 süsti järel oli 136 bar-i. Maksimaalne rõhk kolonnis oli 85. süsti eel, olles 207 bar-i. Kokku süstiti kolonni 1,2 ml vereplasmata.

Antud katsetest on näha, et kõrge pH-ga HFIP-i kasutades tõusis kolonni rõhk üsna vähe. Selle tõestuseks on vaja kasutada kõigi puhverlahuste jaoks sarnase ajalooga kolonne. Kuna Hypersil eelkolonnid, mida esialgselt katsetati, olid eelnevalt kasutatud, siis paremaks võrdluseks telliti 4 uut Zorbax eelkolonni, millega teostati samasugused võrdlusmõõtmised.

4.1.2 Põhikatsed eelkolonnidega

Kasutati nelja samasugust Zorbax eelkolonni, iga puhverlahuse jaoks võeti uus kolonn. Ühe süsti ruumala oli 4 µl. Kolonni termostaat oli +30 °C ning autosampleri termostaat +4 °C. Tulemused on toodud Tabelis 2.

Uute eelkolonnide katsetuste tulemused on esitatud loeteluna lähtudes kasutatud eluendi lisanditest alljärgnevalt:

1) HFIP pH=8,5

Esialgne rõhk kolonnis oli 50,4 bar. Pärast esimest süsti tõusis rõhk kolonnis 53,9 bar-le. Rõhk 300 süsti järel oli 76 bar-i, tõustes kokku ainult 25 bar-i. Kokku süstiti kolonni 1,2 ml vereplasmat.

2) CH₃COONH₄ pH=8,5

Kolonni rõhk algselt oli 51,2 bar. Esimese vereplasma süsti järgselt tõusis see 55,9 bar-ni. Kolonni rõhk 300 süsti järel oli 149,5 bar-i. Kokku süstiti kolonni 1,2 ml vereplasmat.

3) HFIP pH=2,6

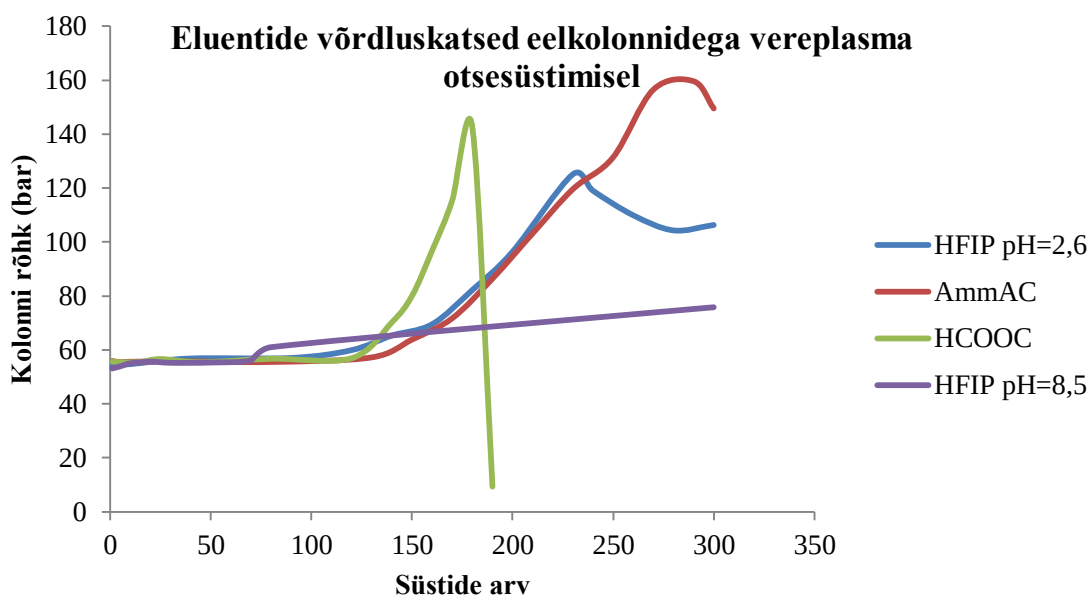
Kolonni rõhk katse alguses oli 49,3 bar. Esimese vereplasma süsti järel oli kolonni rõhk 54 bar. Kolonni rõhk 300 süsti lõpus oli 106,3 bar. Kokku süstiti kolonni 1,2 ml vereplasmat.

4) 0,1% HCOOH

Kolonni rõhk algselt oli 50,1 bar. Esimese vereplasma süsti järgselt oli kolonni rõhk 53,7 bar. Maksimaalne rõhk kolonnis oli 190. süsti eel (159 bar), kuid siis kolonn ummistus (0,76 ml vereplasma järel) ning edasi mõõta ei olnud võimalik.

Katsetest järeldub, et kõige väiksem rõhu tõus saavutati, kui kasutati puhvrina HFIP-i pH=8,5 juures (joonis 7). Samuti ei ummistunud kolonn HFIP-i kasutades. Sellest järeldub, et HFIP puhvrit kasutades saab eelkolonni vereplasmat otse süstida.

On ka näha, et tavapärased eluendi lisandid ei sobi kuna rõhk tõuseb palju või kolonn ummistub täielikult (joonis 7).



Joonis 7. Eelkolonnide rõhu muutused erinevate eluentide korral otse vereplasmat süstides.

Tabel 2. Erinevate puhverlahustega saavutatud vereplasma süstide arv.

Puhver	pH	Voolukiirus (ml/min)	Rõhk (bar)	Süstide arv
5 mM HFIP	8,5	0,55	45 -76	300
5 mM CH ₃ COONH ₄	8,5	0,55	47 – 150	300
5 mM HFIP	2,6	0,55	47 – 106	300
0,1% HCOOH	2,6	0,55	47 - 400	189 (ummistus)

4.2 Ainete lahutus

Kolme määratava aine lahutuse optimeerimiseks kasutati puhtaid standardlahuseid, milles iga analüüdi sisaldus oli umbes 100 µg/g. Ampitsilliini, penitsilliini ja piperatsilliini lahutust on raske saavutada, kuna nende molekulid on sarnase keemilise struktuuriga ning sellest

tulenevalt on neil ka sarnased omadused (karbolsüülrühma(-COOH) $pK_a \sim 2,5-2,74$, aminorühma $pK_a \sim 7,3$ (-NH₂)). Nende retentsiooniajad on lähedased, kuid orgaanilise solvendi osakaalu varieerimisel peaksid nad siiski lahutuma.

Ainete prima lahutuse saamiseks katsetati erinevaid gradiendiprogramme. Mida vähem on eluendis orgaanilist solvendi, seda rohkem aega kulub, et ained kolonnist väljuksid. Kromatograafilise jooksu 3-10 minutil hoiti MeOH osakaalu konstantsena (isokraatiline elueerimine), et saavutada parem lahutus. MeOH osakaalu isokraatilise elueerimise osas varieeriti erinevates gradiendiprogrammides 30%-50%, et teada saada, millise MeOH protsendi juures ained kõige paremini lahutuvad ning võrreldi neid (tabel 3).

Tabel 3. Retentsiooniaegade võrdlus erinevaid gradientprogramme kasutades.

Retentsiooniajad (min)	MeOH% gradiendi 3-10. minutil						
	30%	32%	34%	36%	38%	40%	50%
Ampitsiliin	6,6	6,1	5,8	5,5	5,3	5,2	4,7
Piperatsilliin	14	13,6*	12,9*	10,2*	8,5*	7,4	5,3
Penitsilliin	13,1	11,0*	9,6*	8,5*	7,6	7	5,4

Tabelis 3 on *-ga märgistatud piigid, mis olid väga laiad (piigi laius poolel kõrgusel > 3 minutit).

MeOH 40% ja 50% juures olid piigid küll kitsamad, aga ära oli kadunud ainete lahutus. Kõige parema lahutuse ning piisavalt kitsad piigid andis gradiendiprogramm, kus MeOH osakaalu hoiti jooksu keskel isokraatilisena 30% juures. Kasutati alampeatükis 3.4 tabelis 1 toodud gradientprogrammi.

Ampitsilliini retentsiooniaeg on 6,6 min (lisa 2). Penitsilliini retentsiooniaeg on 12,9 min (lisa 3). Piperatsilliini retentsiooniaeg on 14,0 min (lisa 4).

4.3 Fosfolipiidede monitoorimine

Fosfolipiidid segavad analüüsi jäädes kolonni kinni ning elueerudes sealt pika aja jooksul, põhjustades sellega maatriksiefekte. Töös uuriti, kuidas fosfolipiidid mõjutavad antud analüütide määramist ning elueeruvad HFIP-i kasutamisel. Selleks, et fosfolipiidid analüüsi võimalikult vähe segaks, peaksid nad kolonnist väljuma kas enne või pärast määratavaid analüüte.

Uuriti 15 erineva vereplasmas esineva fosfolipiidi elueerumist kolonnist. Fosfolipiidid ning vastavad üleminekud leiti erinevatest artiklitest ning on toodud välja lisas 5. Varasemalt [3,4,5,34,41] on nimetatud fosfolipiidid andnud signaali kogu kromatograafilise jooksu vältel.

Enamusel fosfolipiididel on tugev signaal enne 5. minutit ning samuti pärast 15. minutit.

Fosfolipiidid üleminekutel m/z 496, 520, 522 ja 524 $\rightarrow$ 184 andsid tugevat signaali (6-23 MCounts) alates 16. minutist. LC-jooksu alguses vastavad üleminekud signaali ei andnud (lisad 7-10). Fosfolipiidid üleminekutel m/z 704, 758, 760, 786 ja 810 $\rightarrow$ 184 andsid tugevat signaali retentsioonaja vahemikus 1-5 min (6-10 MCounts) ning ka alates 16,5-ndast minutist (üleminek m/z 760 $\rightarrow$ 184 alates 15. minutist) (4-11 McCounts) (lisad 11-15). Fosfolipiidid üleminekutel m/z 746,75, 790,5 ja 806 $\rightarrow$ 184 andsid signaali nii LC-jooksu alguses (kuni 5. minutini) kui ka lõpus (alates 15. minutist), kuid signaal oli üsna nõrk (1,5-5 MCounts) (lisad 16-18). Üleminekutel m/z 794,7 ja 904 $\rightarrow$ 184 olid signaali intensiivsused väga madalad (lisad 19-20).

Monitooritud fosfolipiidid ei andnud signaali retentsioonaja vahemikus 5-15 minutit ning kuna töös uuritud penitsilliinide retentsioonajad jäävad fosfolipiididest vabasse alasse, siis selles vahemikus on fosfolipiidide võimalik mõju analüütide signaalile väike.

Fosfolipiidide-vaba ala tekkimise põhjus võib olla selles, et kaks HFIP-i molekuli moodustavad vesiniksidemed ühe fosfolipiidi „peaga“ [38]. On teada, et HFIP kinnitub tugevalt kolonni C18 ahelate külge [39,40]. Seega võivad nii fosfolipiidide kui ka C18 ahelate külge kinnitunud HFIP-i molekulid avaldada mõju sellele, et fosfolipiidid ei elueeru terve kromatogrammi vältel, vaid omavad erinevat elueerumismustrit võrreldes seni kasutatud vedelikkromatograafia eluentidega. HFIP-iga seotud fosfolipiidide interaktsioon HFIP-i sisaldava ning seetõttu suhteliselt suurema polaarsusega n.ö. fluoreeritud statsionaarse faasiga on nõrgem, mis tingib osade fosfolipiidide elueerumise kromatograafilise jooksu algul. Suurema orgaanika sisaldusega mobiilfaasis (jooksu lõpul) väljub kolonnist ka see osa fosfolipiididest, mis kinnitub statsionaarse faasi külge olenemata HFIP-i mõjust, tugevamini.

Analüüte on kõige parem mõõta retentsioonaja vahemikus, kus fosfolipiidide signaali ei ole (5-15 min), sest eeldatavasti on selles vahemikus väiksemad maatriksiefektid.

4.4 Jääkidesse suunamise klapi ja joajagaja kasutamine

Kuna vereplasma proovid on üsna maatriksirohked ning saastavad MS süsteemi, kasutati proovi juhtimist teise (jääkidesse viivasse) kanalisse jääkidesse suunamise klapi ehk *divert valve*-i abil. Fosfolipiidide monitooringust on näha, et suurem osa fosfolipiide elueerub esimese 5 minuti (ja viimase 5 minuti) jooksul ning annab signaali just selle aja sees (lisad 6-20) ja see on üks põhjustest, miks esimese 5 minuti jooksul suunati LC-st tulev proov jääkidesse, mitte ESI allikasse (lisa 21). Huvipakkuvate ainete (penitsilliinide) retentsiooniajad olid samuti suuremad kui 5 minutit ning sellise tegevusega hoiti MS süsteemi puhtamana (lisad 2,3,4).

Et parandada ESI allikas ainete ionisatsiooni ning vähendada maatriksist tingitud komponentide segavat mõju, suunati LC-st tulev vool kaheks. Nii ei olnud ESI allikasse jõudev voolukiirus enam 0,8 ml/min. Eluendi voolu jagaja ehk *splitter* juhib MS süsteemi ainult osa LC-st tulevast proovist. MS-i jõudva voolukiiruse optimeerimiseks katsetati erinevatel voolukiirustel analüüdi signaali. Leiti, et ESI allikasse jõudev optimaalne voolukiirus võiks olla alla 0,3 ml/min.

Voolukiirust optimeeriti kapillaartoru pikkuse muutmisega ning voolu hulga (ml) mõõtmisega.

Selleks, et teada saada voolu hulka, mis juhitakse ESI allikast mööda, mõõdeti ära joajagaja abil jääkidesse jõudev voolu hulk ja aeg, mille jooksul voolu koguti. ESI allikasse jõudva voolukiiruse teadasaamiseks lahutati LC poolt tekitavast voolukiirusest (0,8 ml/min) joajagaja abil jääkidesse juhitud vooluhulk (lisa 21).

Optimeeritud tingimustel oli ESI allikasse viiva kapillaari pikkus 88,5 cm ja ESI allikast mööda juhitud proovi kapillaari pikkus 16 cm (kõigi kapillaaride siseläbimõõt on 0,13 mm). Voolukiirus, mis jõudis ESI allikasse oli 0,15 ml/min.

4.5 Valideerimine

Metoodika on osaliselt valideeritud Euroopa Ravimiameti valideerimisjuhise järgi (European Medicines Agency – Guideline on bioanalytical method validation) [43].

Valideerimise käigus uuriti selektiivsust, fosfolipiidide ning maatriksiefektide mõju analüütide signaalile, analüütide lühiajalist stabiilsust, pikaajalist stabiilsust, lineaarset ala, mõõte- ja kordustäpsust ning määramispiiri.

4.5.1 Selektiivsus

Analüütiline meetod peab olema võimeline määrama analüüdi sisaldust teiste proovi komponentide juuresolekul. Selektiivsuse hindamiseks testiti kuuest erinevast allikast pärinevat tühja vereplasma proovi. Tühjad plasmaproovid filtreeriti ning seejärel analüüsiti neid HPLC-ESI-MS aparatuuriga. Tulemustest selgus, et tühiproovid ei anna signaali vastavate analüütide m/z üleminekul.

4.5.2 Maatriksiefektide mõju

Maatrikiefekte ja nende mõju hinnati kahel erineval viisil.

1. Analüüdi vereplasmasse lisamise meetod
2. Kolonni järgse infuseerimise meetod

4.5.2.1 Analüüdi vereplasmasse lisamise meetod

Võimalike maatriksiefekte (ME%) uurimiseks võrreldi omavahel analüütide MS signaale rikastatud vereplasma proovides ning standardlahustes (5mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ puhverlahus pH=5,6-5,7) (alapeatükk 2.6.2). Erinevalt ekstraktsioonijärgsest analüüdi lisamisest on antud juhul lisatud analüüdid otse vereplasmasse, kuna vereplasma otsesüstimise puhul puudub prooviettevalmistus.

Maatriksiefektide uurimiseks tehti lahused seitsmel erineval kontsentratsioonil. Kontsentratsioonid jäid vahemikku 100-0,1 $\mu\text{g/g}$. Tulemused on toodud tabelis 4.

Maatriksiefektide väärtused piperatsilliini ja penitsilliini puhul jäid kõikide kontsentratsioonidel 100% lähedale. Piperatsilliini kontsentratsioonidel 100 $\mu\text{g/g}$, 25 $\mu\text{g/g}$ ja 0,5 $\mu\text{g/g}$ on toimunud signaali suurenemine 9-44% ulatuses. Kontsentratsioonidel 50 $\mu\text{g/g}$, 5 $\mu\text{g/g}$, 1 $\mu\text{g/g}$ ja 0,1 $\mu\text{g/g}$ on signaal maha surutud 8-27% ulatuses. Penitsilliinil on kontsentratsioonidel 5 $\mu\text{g/g}$, 1 $\mu\text{g/g}$, 0,5 $\mu\text{g/g}$ ja 0,1 $\mu\text{g/g}$ toimunud signaali suurenemine 3-32% ulatuses. Kontsentratsioonidel 100 $\mu\text{g/g}$, 50 $\mu\text{g/g}$, 25 $\mu\text{g/g}$ ja on signaali mahasurumine 8-11% ulatuses. Ampitsilliinil on kõikidel kontsentratsioonidel toimunud signaali mahasurumine 10-61% ulatuses võrreldes standardlahuse signaaliga. Maatriksiefektid mõjutavad kõige enam ampitsilliini signaali.

Tabel 4. Maatriksiefektide väärtused analüüdi lisamise meetodil.

Ainete kontsentratsioonid vereplasmas	ME%						
	100 µg/g	50 µg/g	25 µg/g	5 µg/g	1 µg/g	0,5 µg/g	0,1 µg/g
Penitsilliin <i>m/z</i> 333 – 193	89%	92%	89%	110%	132%	103%	124%
Piperatsilliin <i>m/z</i> 540 – 182	109%	91%	113%	92%	91%	144%	73%
Ampitsilliin <i>m/z</i> 348 – 208	90%	68%	66%	68%	55%	88%	39%

4.5.2.2 Kolonnijärgne infuseerimine

Maatriksiefektide mõju hindamiseks vaadeldi lisaks analüüdi vereplasmasse lisamise meetodile ka ainete signaali muutust LC-jooksu käigus. Selleks infuseeriti süstlapumba abil analüüdi standardlahust (10 µg/g, iga aine eraldi) ja samal ajal süstiti LC-st tühja, ilma ravimiteta, vereplasmat (alapeatükk 2.6.2, joonis 5).

Ampitsilliini infuseerimiskatse näitas, et signaal on tugevalt maha surutud (tähistatud noolega) esimese 5 minuti jooksul (lisa 22).

Penitsilliini infuseerimiskatse näitas, et signaal on tugevalt maha surutud (tähistatud noolega) samuti esimese 5 minuti jooksul (lisa 23).

Piperatsilliini infuseerimiskatse näitas, et signaal on tugevalt maha surutud (tähistatud noolega), nagu ka eelnevate analüütide puhul, esimese 5 minuti jooksul (lisa 24).

Infuseerimise katsed näitasid, et kõikidel ainetel on signaali mahasurumine jooksu alguses ühesugune (lisa 22,23,24). Eriti tugevalt surutakse signaali maha esimese 5 minuti jooksul. Fosfolipiidide monitooringust (peatükk 4.3) selgus samuti, et enamus fosfolipiide elueerub kolonnist kas enne 5. minutit või pärast 15. minutit (lisa 6-20). Kuna kolmest uuritavast ainest elueerub kõige varem ampitsilliin, siis tema signaal on ka fosfolipiidide poolt kõige enam mõjutatud. Penitsilliini ja piperatsilliini signaali fosfolipiidid väga suurel määral ei mõjuta.

4.5.3 Stabiilsus

Stabiilsuse uurimiseks teostati lühiajalise stabiilsuse katsed toatemperatuuril (22 +/- 3 °C) ning +4 °C juures. Selleks võrreldi analüüdi signaali enne ja pärast hoiustamist vastavalt siis toatemperatuuril või +4 °C juures.

$$ST\% = \frac{A_{pärast}}{A_{alguses}} * 100\%,$$

kus ST% on piigi pindalast säilinud protsent teatud aja möödudes, $A_{pärast}$ on analüüdi signaal teatud aja möödudes kindlaks määratud tingimustel ja $A_{alguses}$ on analüüdi signaal esimese süsti ajal (või enne hoiustamistingimuste rakendamist).

Samuti teostati pikaajalise (5 kuu jooksul) stabiilsuse katsed (proove hoiti -80 °C juures).

4.5.3.1 Lühiajaline stabiilsus

Analüütide lühiajalise stabiilsuse uurimiseks rikastati vereplasma proove ning seejärel proovid filtreeriti. Proove vaadeldi kolmel erineval kontsentratsioonil. Proovid seisis LC automaatses süstimisüsteemis ehk *autosampleris* ning neid süstiti järjest kromatograafilisse süsteemi. Kogu tsükli pikkus oli kokku 15 tundi. Lühiajalist stabiilsust automaatses süstimisüsteemis korraldati nii toatemperatuuril kui ka +4 °C juures. Tabelist 5 on näha, et analüütide signaali tugevus toatemperatuuril hoides väheneb ajas. Penitsilliini ja ampitsilliini puhul on esialgset piigi pindalast 15 tunni möödudes säilinud vastavalt 59% ja 58%. Piperatsilliini signaal on 15 tunni möödudes 18% vähenenud.

Tabel 5. Proovide lühiajaline stabiilsus toatemperatuuril. Piigi pindalast säilinud ST%.

Analüüt	c(µg/g)	ST%		
		3h	12h	15h
Penitsilliin	100	100%	75%	72%
	10	89%	79%	51%
	1	98%	78%	55%
Keskmine ST%		96%	77%	59%
Ampitsilliin	100	93%	82%	69%
	10	86%	87%	55%
	1	89%	80%	49%
Keskmine ST%		89%	83%	58%
Piperatsilliin	100	117%	108%	89%
	10	116%	99%	82%
	1	113%	76%	74%
Keskmine ST%		115%	94%	82%

Kuna analüüdid on vereplasmas toatemperatuuril ebastabiilsed, korraldati katsed tingimustel, kus automaatses süstimisüsteemis hoiustatud proovide temperatuur oli +4 °C.

Tabelist 6 on näha, et analüütide signaal +4 °C juures väheneb samuti ajas, kuid analüüdid on stabiilsemad kui toatemperatuuril hoides. Penitsilliini puhul on esialgset piigi pindalast 15 tunni möödudes säilinud 67%. Ampitsilliin ja piperatsilliini on 15 tunni möödudes säilinud vastavalt 91% ja 94% (kalkulatsioonid toodud ampitsilliini signaal 118% ei ole keskmise arvutamisel arvesse võetud).

Tabel 6. Proovide lühiajaline stabiilsus temperatuuril +4 °C. Piigi pindalast säilinud ST%.

Analüüt	c(µg/g)	ST%		
		3h	12h	15h
Penitsilliin	100	92%	83%	79%
	10	119%	95%	64%
	1	81%	68%	59%
Keskmine ST%		97%	82%	67%
Ampitsilliin	100	87%	90%	99%
	10	114%	96%	83%
	1	113%	105%	118%
Keskmine ST%		105%	97%	91%
Piperatsilliin	100	97%	102%	100%
	10	95%	85%	76%
	1	111%	89%	106%
Keskmine ST%		101%	92%	94%

Kuna stabiilsust hinnati analüütide piikide pindalade järgi, siis võivad piikide suurust mõjutada maatriksiefektid. Tabelis 5 on piperatsilliini piikide pindalad 3 tunni möödumisel suurenenud. Ka maatriksiefektide tabelist (alapeatükk 4.5.2.1 tabel 4) on näha, et piperatsilliinil esines mõnedel kontsentratsioonidel ionistatsiooni võimendumist, mis võib tingida antud juhul näilise kontsentratsiooni „kasvu“ proovis.

Tehtud katsetest järeldub, et proove tuleks analüüsida võimalikult kiirelt ja mitte säilitada neid toatemperatuuril vaid teha seda +4 °C juures.

4.5.3.2 Pikaajaline stabiilsus

Pikaajalise stabiilsuse hindamiseks säilitati ühel kõrgel ning ühel madalal kontsentratsioonil analüütidega rikastatud plasmaproove 5 kuud -80 °C juures. Mõlemal kontsentratsioonil oli 3 erinevat proovi. Võrdluseks võeti värskest analüütidega rikastatud proovid. Tabelis 7 on toodud tulemused analüütide pikaajalise stabiilsuse kohta. Kalkulatsioonid toodud ampitsilliini

väärtust kõrgel kontsentratsioonil ei ole keskmise arvutamisel arvesse võetud. 5 kuu möödudes oli kõrgel kontsentratsioonil säilinud keskmiselt 90-95% kõikidest analüütidest ning madalal kontsentratsioonil 91-101% kõikidest analüütidest.

Tabel 7. Proovide pikaajaline stabiilsus -80 °C juures. Piigi pindalast säilinud ST%.

	ST%		
	Piperatsilliin	Ampitsilliin	Penitsilliin
Kõrge kontsentratsioon 50 µg/g	82%	88%	96%
	89%	89%	124%
	102%	94%	94%
Keskmiselt säilinud	91%	90%	95%
	ST%		
	Piperatsilliin	Ampitsilliin	Penitsilliin
Madal kontsentratsioon 5 µg/g	109%	96%	93%
	102%	87%	89%
	92%	90%	95%
Keskmiselt säilinud	101%	91%	93%

4.5.4 Lineaarne ala

Metoodika lineaarne ala on kalibreerimisgraafiku ala, milles analüütilise signaali sõltuvus analüüdi kontsentratsioonist on lineaarne. Lineaarsuse hindamiseks valmistati kalibreerimisproovid vereplasmas kontsentratsioonivahemikuga 0,01-100 µg/g.

Kuna korrelatsioonikoefitsiendi ruudu (R^2) väärtused olid analüütidel madalad ning kõrgemate kontsentratsioonide alas oli moodustunud eraldi lineaarne ala, siis otsustati iga aine lineaarse ala jaoks koostada 2 eraldi kalibreerimisgraafikut. Kalibreerimisgraafikud koostati kõrgete kontsentratsioonide jaoks vahemikus 5-100 µg/g ja madalalate kontsentratsioonide jaoks vahemikus 0,01-5 µg/g. Lisas 25 on toodud analüütide kalibreerimisgraafikud ning R^2 väärtused ühe lineaarse ala korral. Penitsilliini R^2 väärtus esialgu oli 0,9882. Tehes kaks kalibreerimisgraafikut, paranes R^2 väärtus ja jäi vahemikku 0,9897 kuni 0,9998. Piperatsilliini R^2 väärtus esialgu oli 0,9735. Tehes kaks kalibreerimisgraafikut paranes R^2 väärtus jäädes vahemikku 0,9804 kuni 0,9991. Ampitsilliini R^2 väärtus esialgu oli 0,9991. Tehes kaks kalibreerimisgraafikut oli kõrgemal kontsentratsioonil R^2 väärtus veidi väiksem - 0,9987, kuid madalal kontsentratsioonil seevastu natuke suurem 0,9995.

R^2 parandamiseks võiks kasutada ka mõnda teist regressiooni tüüpi (nt ruut- või kuupvõrrand kasutamine), mida on lubatud kasutada ka valideerimisjuhendis.

Ampitsilliini lineaarse ala kontsentratsioonide vahemik jäi alasse 5,39 – 113,11 µg/g vereplasmas. Penitsilliini puhul 0,3 – 109,48 µg/g vereplasmas. Piperatsilliinil 0,3 – 97,9 µg/g vereplasmas.

4.5.5 Mõõte- ja kordustäpsus (*Accuracy, precision*)

Metoodika mõõtetäpsuseks loetakse mõõdetud väärtuse erinevust teadaolevast (tegelikust) väärtusest. Kordustäpsus on mõõteseeriade tulemuste omavaheline kokkulangevus. Metoodika mõõtetäpsuse ning kordustäpsuse hindamiseks koostati vereplasma proovidest kalibreerimisgraafik. Analüütide kontsentratsioonivahemik kalibreerimisgraafiku proovides oli 0,01-100 µg/g. Analüüsi jaoks kasutati madala, keskmise ja kõrge kontsentratsiooniga analüütidega rikastatud proove. Iga kontsentratsiooni jaoks tehti viis erinevat paralleeli, mida järgnevalt analüüsiti. Et hinnata kordustäpsust, analüüsiti proove kolmel erineval päeval.

Lisas 26 on toodud mõõte- ja kordustäpsuse tulemused kolmel päeval. Esimesel päeval ampitsilliini jaoks tulemusi ei arvestatud. Samuti ei saadud esimesel päeval arvestatavaid tulemusi penitsilliini ja piperatsilliini kohta madalatel kontsentratsioonidel. Lisas 26 kaldkirjas toodud kontsentratsioonide korral oli mõõtetäpsuse erinevus tegelikust väärtusest lubatust suurem. Keskmisel kontsentratsioonil muutus penitsilliini mõõtetäpsus 1-8% piires, kordustäpsus 2-13% piires. Piperatsilliini mõõtetäpsus varieerus 2-7% piires ning kordustäpsus samuti 2-7% piires. Ampitsilliini mõõtetäpsus varieerus 1-3% piires, kordustäpsus 8-10% piires (lisa 26). Selleks, et teha lõplike järeldusi analüütide mõõte- ja kordustäpsuse kohta, oleks vaja teostada korduskatsed.

Veaallikateks võib olla näiteks proovide ebastabiilsus ja ka maatriksiefekt. Alapeatükis 4.5.2.1 tabelis 4 on näha kuidas maatriksiefekti väärtus kõigub erinevate kalibreerimisgraafiku kontsentratsioonide lõikes. Kõige suurem maatriksiefekti väärtuse kõikumine oli ampitsilliini puhul ja sellest tulenevalt kõiguvad mõõte- ja kordustäpsuste tulemused selle analüüdi puhul kõige rohkem.

Selleks, et parandada metoodika mõõte ja kordustäpsust ning võtta arvesse nii ainete (eba)stabiilsust ja maatriksiefekte, peaks kasutama iga aine jaoks isotoopmärgistatud sisestandardit.

4.5.6 Määramispiir (LLOQ)

Metoodika määramispiir on madalaim analüüdi sisaldus proovis, mida metoodika võimaldab usaldusväärselt kvantitatiivselt määrata. Määramispiiri väärtusteks loeti mõõte- ja kordustäpsuse mõõtmistel saadud kontsentratsiooni, mille puhul saadud tulemus ei erinenud tegelikust väärtusest rohkem kui 20%. Ühtlasi on määramispiiri väärtus lineaarse ala madalaimaks kontsentratsiooniks (peatükk 4.5.4). Penitsilliinide määramispiiri väärtused on toodud tabelis 8.

Tabel 8. Analüütide määramispiirid.

LLOQ (µg/g)	
Penitsilliin	0,3
Piperatsilliin	0,3
Ampitsilliin	5,39

5. KOKKUVÕTE

Käesolevas töös uuriti võimalusi kuidas saaks LC-MS süsteemiga analüüsida eeltöötlusteta inimese vereplasmast. Kasutades mobiilfaasidena MeOH-i ja 5 mM HFIP puhverlahust (pH=8,5), osutus võimalikuks LC kolonni süstida eelnevalt vaid filtreeritud vereplasmast. Kolonn ei ummistunud ning süsteemi rõhk tõusis võrreldes teiste, n.ö. tavapäraste, eluentidega vähe. Leiti, et HFIP-i kasutamine mobiilfaasi lisandina aitab valkutel kolonnist paremini väljuda ning sellest tulenevalt pikendab kolonni eluiga.

Töö rakendusnäitena töötati välja meetodika mõnede penitsilliinide määramiseks inimese eeltöötlusteta vereplasmast.

Penitsilliin G, piperatsilliini ja ampitsilliini määramiseks eeltöötlusteta vereplasmast kasutati gradientelueerimist. LC kolonni süstiti korraga 10 µl vereplasmast. Töötati välja penitsilliinide lahutus, optimeeriti MS-i detekteerimisparameetreid ja leiti sobivad m/z väärtused ning üleminekud nende ainete määramiseks. MS-i puhtana hoidmiseks kasutati jääkidesse suunamise klappi ja optimaalse MS signaali saamiseks joajagajat.

Metoodika osalisel valideerimisel hinnati meetodika selektiivsust, fosfolipiidide ja maatriksiefektide mõju analüüdi signaalile, lühiajalist stabiilsust toatemperatuuril ning +4 °C juures, pikaajalist stabiilsust, lineaarset ala ning meetodika mõõte- ja kordustäpsust.

Maatriksiefektide uurimine näitas, et analüütide signaali surutakse tugevalt maha esimese 5 minuti sees. Täiendavast fosfolipiidide monitoorimisest selgus, et enamus fosfolipiide elueerubki just esimese 5 minuti jooksul ning pärast 15. minutit. Kõige parem on analüüte mõõta vahemikus, kus fosfolipiidide signaali ei ole (5-15 min).

Kokku on töö käigus analüütilisse kolonni süstitud rakendusnäite väljatöötamise ja meetodika valideerimise käigus umbes 7-8 ml vereplasmast ning kolonn ei ole veel ummistunud.

Töö edasiarendusena võiks uurida, kas antud meetodika võimaldab eeltöötlusteta vereplasmas mõõta vaba ravimi (valkudega mitteseotud ravimi osa) kontsentratsiooni võrreldes ravimite määramist tavapärase valke sadestava prooviettevalmistuse (määratakse kogu ravimi hulka) ning ultrafiltratsiooniga (määratakse vaba ravimi hulka).

DIRECT BLOOD PLASMA ANALYSIS WITHOUT SAMPLE PREPARATION USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Helena Kase

5. SUMMARY

The aim of current thesis was to develop a method for the direct human blood plasma analysis using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method. Aqueous hexafluoroisopropanol (HFIP) buffer solution (pH=8,5) and methanol (MeOH) were used as mobile phase components and it allowed to inject blood plasma without prior sample preparation. Only the plasma filtration through syringe filters was used. Direct blood plasma analysis did not cause the LC column clogging and the system pressure increase was lower compared to commonly used eluent additives for LC-MS. Using HFIP as eluent additive helps to remove proteins from the column and increases column lifetime.

For the direct blood plasma injection application the assay for the determination of some penicillin antibiotics was developed.

Gradient elution was applied to determine penicillin G, piperacillin and ampicillin from blood plasma without sample preparation. The LC injection volume was 10 μ l. Chromatographic conditions were optimized in order to achieve the separation between the analytes, suitable detection parameters and m/z values with corresponding transitions for MS/MS detection were optimized. Divert valve and splitter were used in order to keep MS system cleaner.

Penicillins assay validation involved selectivity, matrix effects, short term stability of analytes in matrix stored at room temperature and at +4 °C, long term stability of analytes in matrix stored at -80 °C, linear range, accuracy and precision evaluation.

Post-column infusion showed that the matrix effects are not occurring during the entire chromatographic run, but are mostly compressed to the beginning of the run (0-5 min). Monitoring plasma phospholipids showed that most of the phospholipids eluted in the 0-5 min region and after 15 min. Suitable region to determine analytes is the range where phospholipids do not give any MS signal (5-15 min).

Approximately 7-8 ml of blood plasma was injected to the analytical column during the assay development and validation and there is still no signs from the column clogging.

The method needs further development to evaluate if this direct blood plasma analysis approach enables to determine free drug (unbound to plasma proteins) concentration in blood plasma.

6. KASUTATUD KIRJANDUS

- 1) K. Hayat. Difference Between Plasma And Serum.
<http://medimoon.com/2012/07/difference-between-plasma-and-serum/> viimati alla
laetud 30.05.15.
- 2) American Red Cross. Blood Components.
<http://www.redcrossblood.org/learn-about-blood/blood-components> viimati alla
laetud 30.05.15.
- 3) O. A. Ismaiel, T. Zhang, R. G. Jenkins, H. T. Karnes, Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 878 (2010) 3303-3316.
- 4) V. Pucci, S. Di Palma, A. Alfieri, F. Bonelli, E. Monteagudo, A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC-ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50 (2009) 867-871.
- 5) P. K. Bennett, K. C. Van Horne, Identification of the Major Endogenous and Persistent Compounds in Plasma, Serum and Tissue That Cause Matrix Effects with Electrospray LC/MS Techniques. Tanden LABS (AAPS Conference), 2003.
- 6) S. Soltani, A. Jouyban, Biological sample preparation: attempts on productivity increasing in bioanalysis. Future Science. Bioanalysis 6(12) (2014) 1691-1710.
- 7) C. Singleton, Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC-MS analysis. Future Science. Bioanalysis 4(9) (2012) 1123-1140.
- 8) L. Novakova, H. Vlcova, A review of Current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. Analytica Chimica Acta. 656 (2009) 8-35.
- 9) P. L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. Biomedical Chromatography 25 (2010) 199-217.
- 10) R. E. Majors, Trends in Sample Preparation. Agilent Technologies, 2003.
- 11) Pall Corporation. Ultrafiltration Fundamentals.
<http://www.pall.com/main/laboratory/literature-library-details.page?id=35486> viimati alla
laetud 30.05.15.

- 12) Water Professionals. Ultrafiltration.
<http://www.waterprofessionals.com/ultrapure/ultrafiltration.html> viimati alla laetud 30.05.15.
- 13) Spectrum Labs. Pore Size Chart.
<http://www.spectrumlabs.com/filtration/PoreSize.html> viimati alla laetud 30.05.15.
- 14) Sigma-Aldrich. Human Albumin.
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/enzyme-reagents/human-albumin.html#MOP> viimati alla laetud 30.05.15.
- 15) E.I. Gamal, C-H. OH, Current Topics in Medicinal Chemistry 10 (2010) 1882-1897
<http://www.eurekaselect.com/86843/article/current-status-carbapenem-antibiotics> viimati alla laetud 30.05.15.
- 16) A. D. Deshpande, K. G. Baheti, N. R. Chatterjee, Degradation of β -lactam antibiotics. Current science. Vol 87, No 12. (2004).
- 17) drugs.com. Penicillin G Injection.
<http://www.drugs.com/pro/penicillin-g-injection.html> viimati alla laetud 30.05.15.
- 18) drugs.com. Penicillin G Potassium.
<http://www.drugs.com/mtm/penicillin-g-potassium.html> viimati alla laetud 30.05.15.
- 19) drugs.com. Ampicillin.
<http://www.drugs.com/pro/ampicillin.html> viimati alla laetud 30.05.15.
- 20) drugs.com. Ampicillin.
<http://www.drugs.com/dict/ampicillin.html> viimati alla laetud 30.05.15.
- 21) drugs.com. Ampicillin.
<http://www.drugs.com/mtm/ampicillin.html> viimati alla laetud 30.05.15.
- 22) Chem Spider. Piperacillin.
<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.39798.html> viimati alla laetud 30.05.15.
- 23) drugs.com. Piperacillin.
<http://www.drugs.com/cdi/piperacillin.html> viimati alla laetud 30.05.15.
- 24) drugs.com. Piperacillin and Tazobactam.
<http://www.drugs.com/mtm/piperacillin-and-tazobactam.html> viimati alla laetud 30.05.15.
- 25) H. A. Claessens, Characterisation of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography: column testing, classification and chemical stability, 1999.

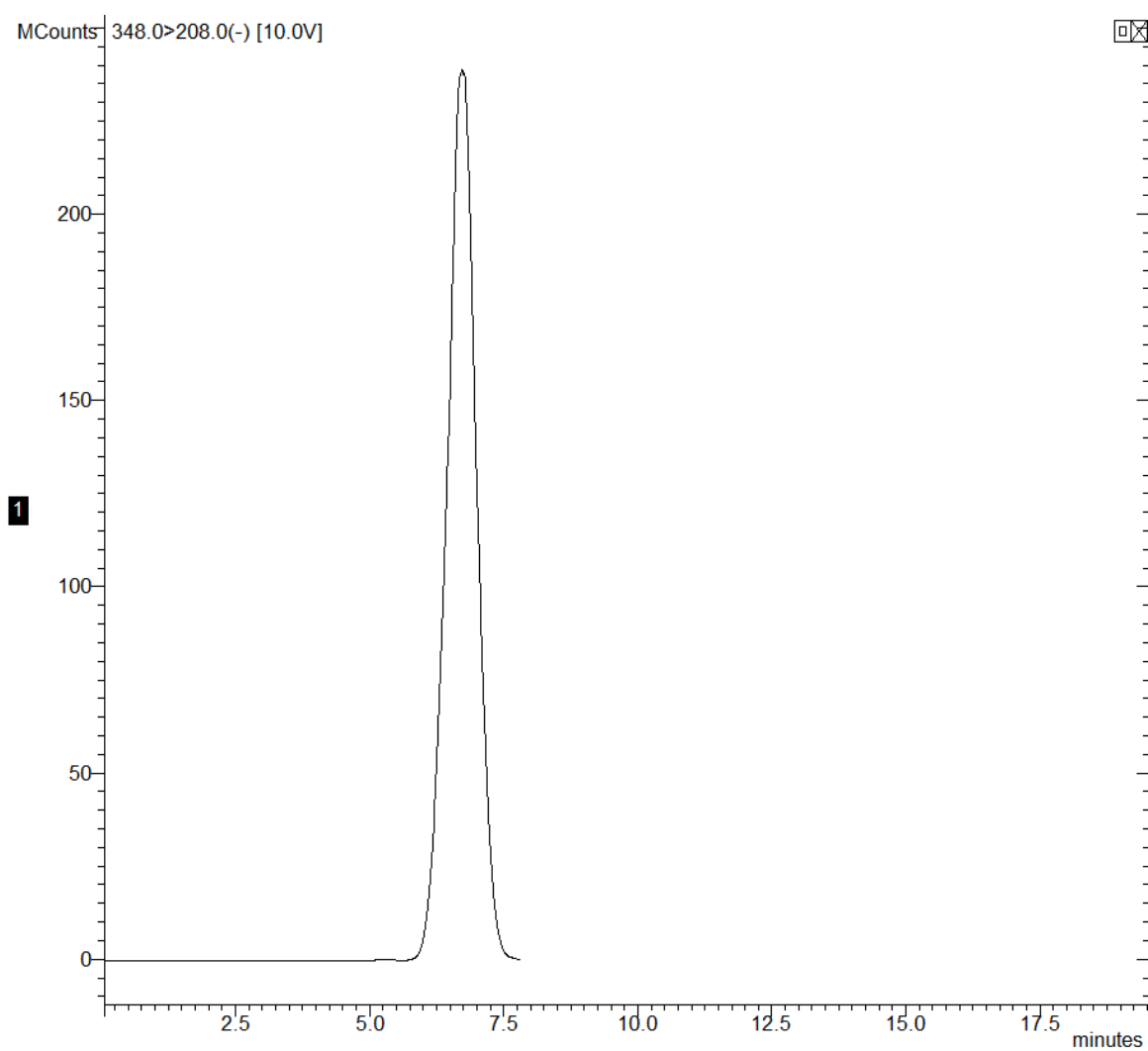
- 26) Agilent Technologies. Fundamentals of Liquid Chromatography (HPLC).
http://polymer.ustc.edu.cn/xwxx_20/xw/201109/P020110906263097048536.pdf
 viimati alla laetud 30.05.15.
- 27) A. D. McNaught, A. Wilkinson. Reversed-Phase Chromatography.
<http://goldbook.iupac.org/R05376.html> viimati uuendatud 24.02.14.
- 28) L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, Practical HPLC methods development, 2nd ed., Wiley, 1997.
- 29) A. Mehta, Principle of Reversed-Phase Chromatography HPLC/UPLC.
<http://pharmaxchange.info/press/2012/12/principle-of-reversed-phase-chromatography-hplc-uplc-with-animation/> viimati alla laetud 30.05.15.
- 30) F. Rouessac, A. Rouessac, Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques, 2nd ed., Wiley, 2007.
- 31) P. J. Taylor, Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography – electrospray – tandem mass spectrometry. Clinical Biochemistry 38 (2005) 328-334.
- 32) E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry principles and applications, 2nd ed., Wiley, 2002.
- 33) L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, S. Vahidi, Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. Analytical Chemistry 85 (2013) 2-9.
- 34) P. K. Bennett, M. Meng, V. Capka, Managing Phospholipid-Based Matrix Effects In Bioanalysis. Tandem LABS (2006).
- 35) Sigma-Aldrich. 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/105228?lang=en®ion=EE>
 viimati alla laetud 30.05.15.
- 36) DuPont Chemicals and Fluoroproducts. Hexafluoroisopropanol.
http://www2.dupont.com/FluoroIntermediates/en_US/assets/downloads/HFIP_TechSheet.pdf viimati alla laetud 30.05.15.
- 37) U.S. National Library of Medicine. Hexafluoroisopropanol.
<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/920-66-1> viimati alla laetud 30.05.15.

- 38) S. M. Ennaceur, J. M. Sanderson, Micellar Aggregates Formed Following the Addition of Hexafluoroisopropanol to Phospholipid Membranes. *Langmuir* 21 (2005) 552-561.
- 39) K. Kipper, K. Herodes, I. Leito, L. Nei, Two fluoroalcohols as components of basic buffers for liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometric determination of antibiotic residues. *Analyst* 136 (2011) 4587-4594.
- 40) K. Kipper, K. Herodes, I. Leito, Fluoroalcohols as novel buffer components for basic buffer solutions for liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry: Retention mechanisms. *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 8175-8180.
- 41) Y-Q. Xia, M. Jemal, Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 2125-2138.
- 42) R. Grant, B. Rappold, Development and Validation of Quantitative LC-MS/MS Assays for Use in Clinical Diagnostics. San Diego, CA, USA, 2014.
- 43) European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf viimati alla laetud 30.05.15.

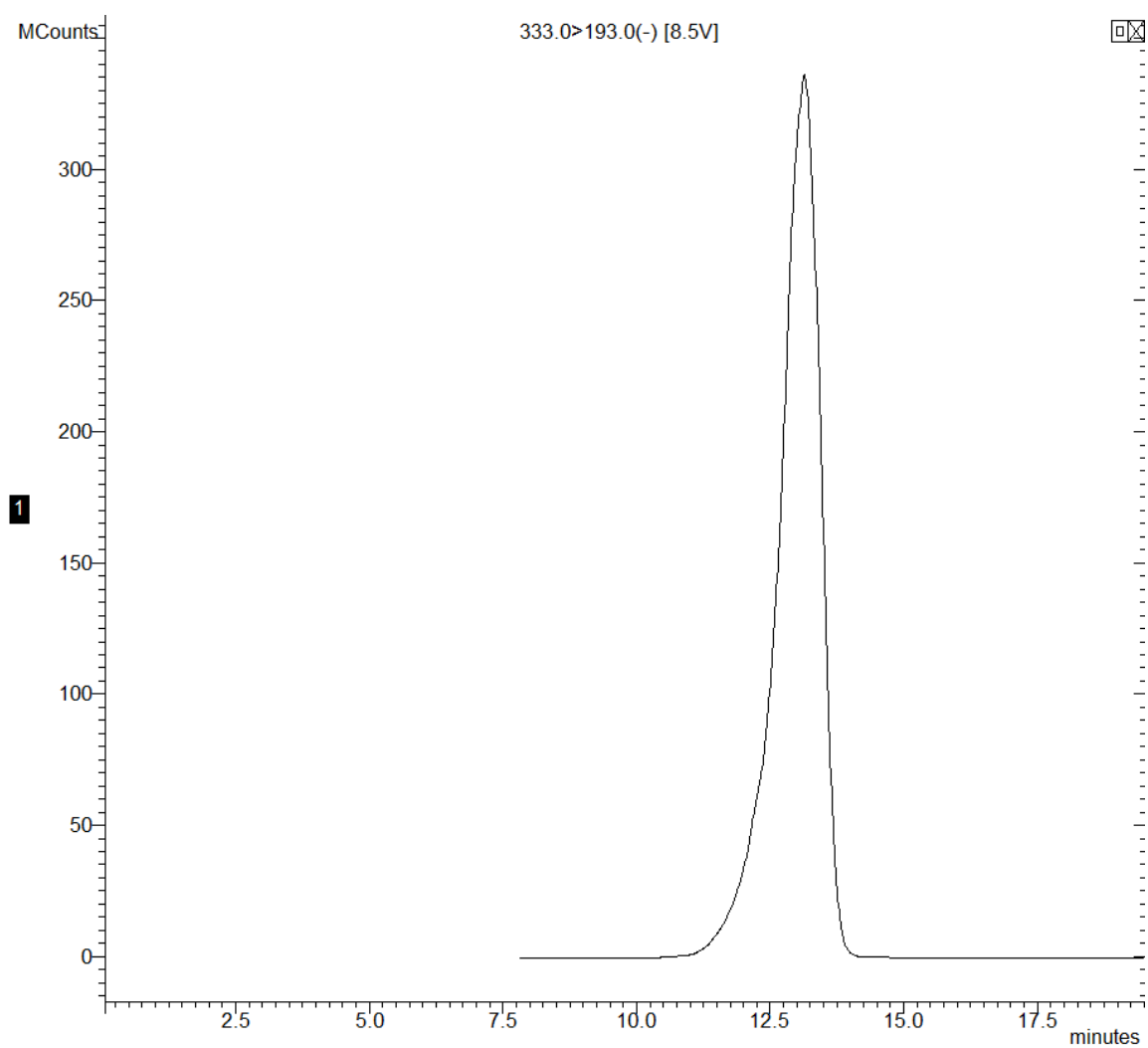
LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud kemikaalid.

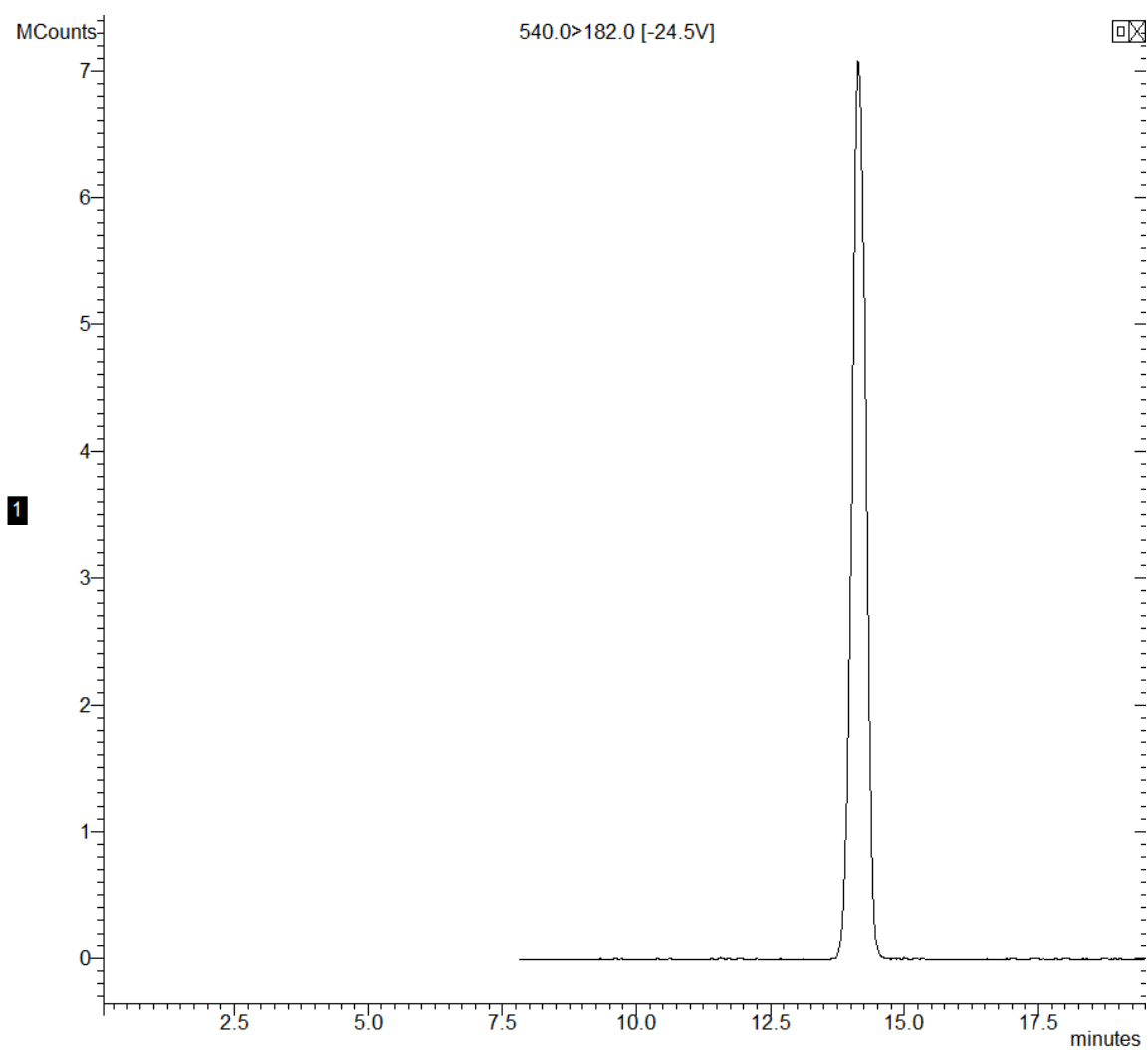
Kemikaal	Keemiline valem	Tootja	Lisainfo	M [g/mol]	pK_a
Penitsilliin G kaaliumi sool	C ₁₆ H ₁₇ KN ₂ O ₄ S	Sigma-Aldrich, USA	99,0%, HPLC puhtusega	372,48	
Piperatsilliin naatriumi sool	C ₂₃ H ₂₆ N ₅ Na O ₇ S	Sigma-Aldrich, USA	≥95%, HPLC puhtusega	539,54	
Ampistilliin trihüdraat	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	Sigma-Aldrich, USA	99,7%, HPLC puhtusega	403,45	
MeOH	CH ₃ OH	J. T. Baker, Holland	HPLC puhtusega	32,04	
HFIP	C ₃ H ₂ F ₆ O	Sigma-Aldrich, USA	≥99,8%, GC puhtusega	168,04	9,3
Sipelghape	HCOOH	Sigma-Aldrich, USA	≥98%, MS puhtusega	46,03	3,75
Ammooniumatsetaat	C ₂ H ₇ NO ₂	Sigma-Aldrich, USA	≥90,0%, HPLC puhtusega	77,08	9,3
Ammoniumhüdroksoid	NH ₄ OH	Sigma-Aldrich, USA	≥25% NH ₃ vees	35,05	
Milli-Q vesi	H ₂ O		Millipore Advantage A10 (0,22 µm)		



Lisa 2. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Ampitsilliini retentsiooniaeg vereplasmas (100 µg/g) üleminekul m/z 348→208.



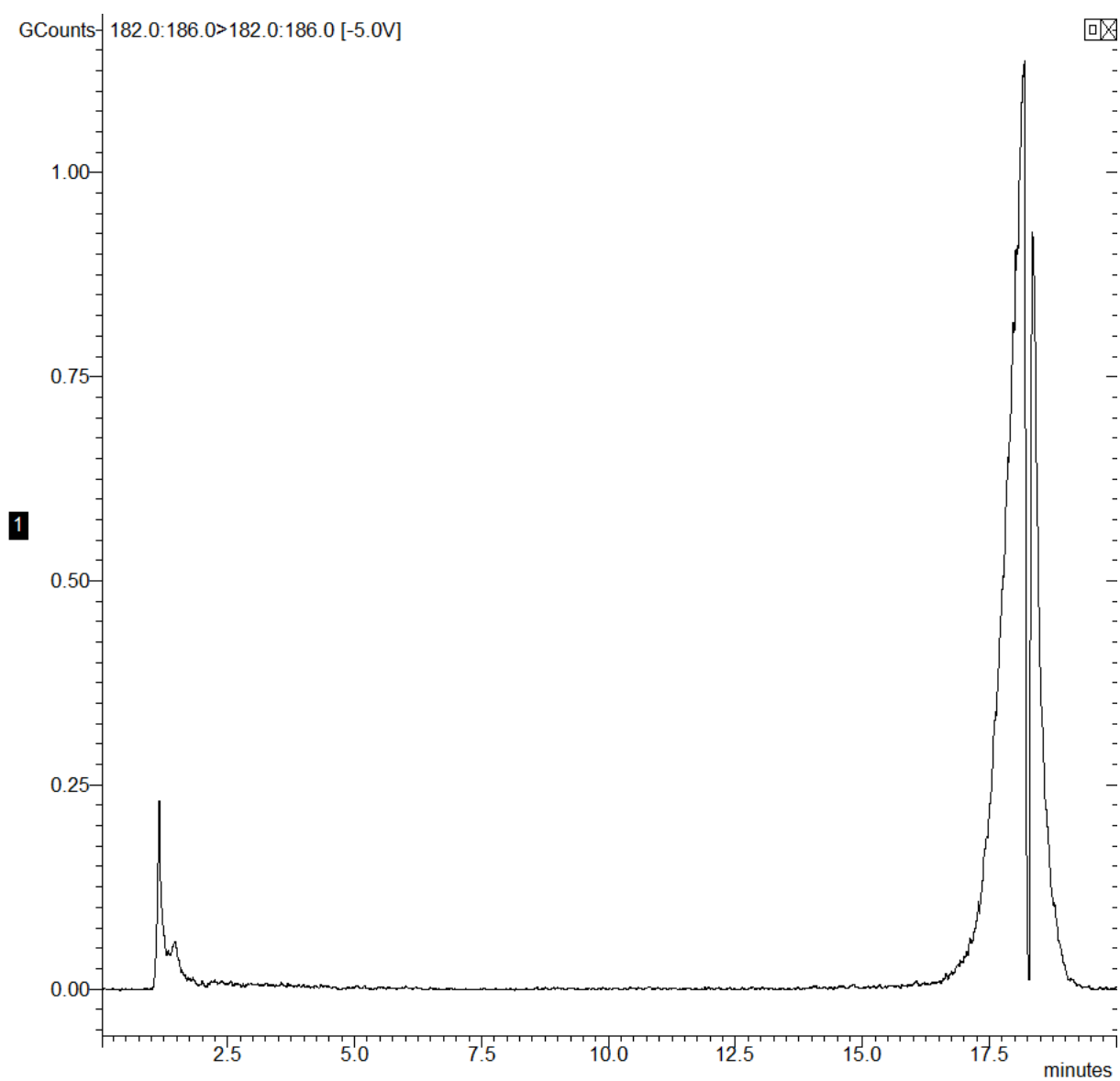
Lisa 3. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Penitsilliini retentsiooniaeg vereplasmas (100 μ /g) üleminekul m/z 333 $\rightarrow$ 193.



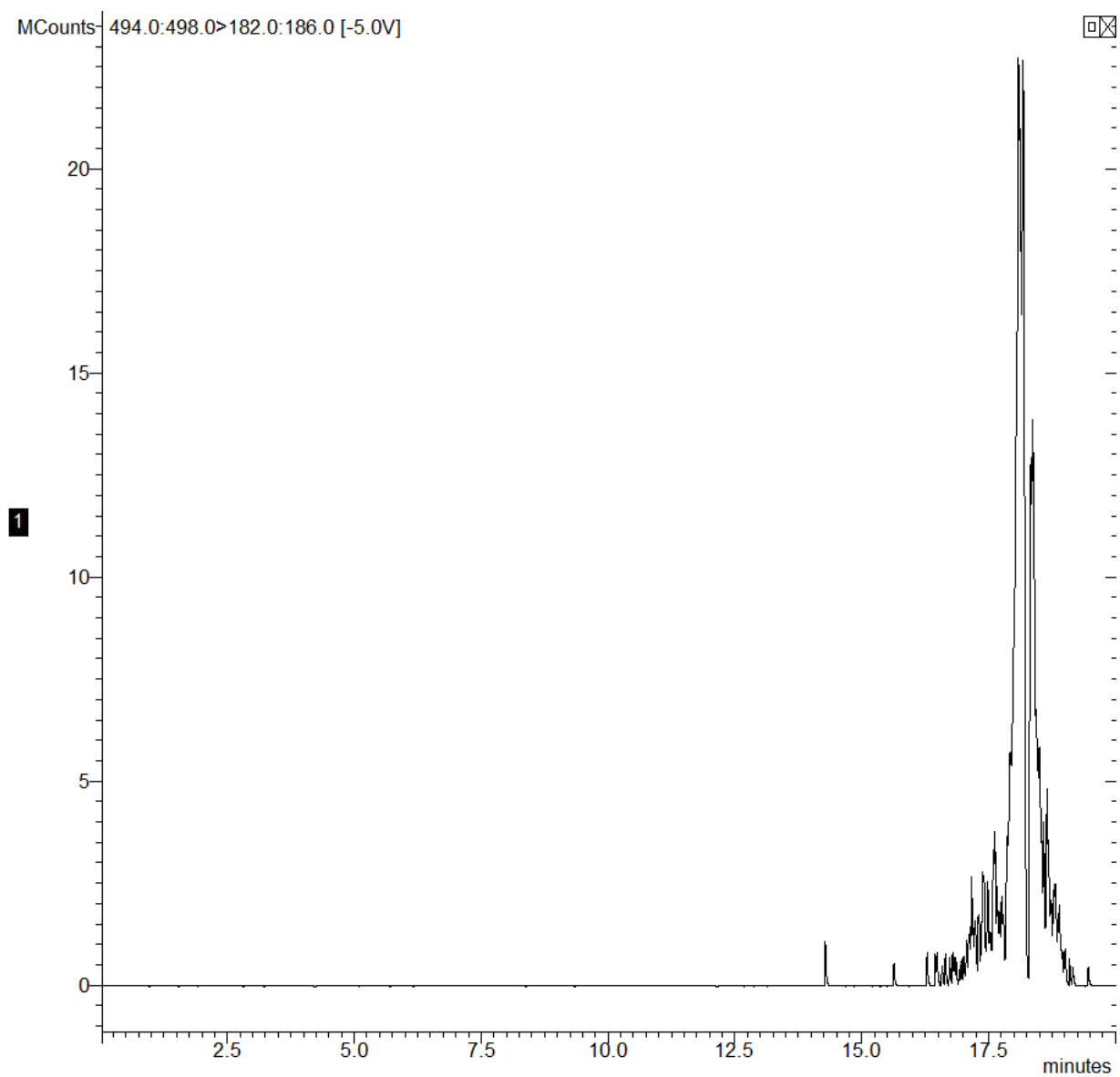
Lisa 4. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Piperatsilliini retentsiooniaeg vereplasmas (100 µg/g) üleminekul m/z 540→182.

Lisa 5. Vereplasmas monitooritud fosfolipiidid.

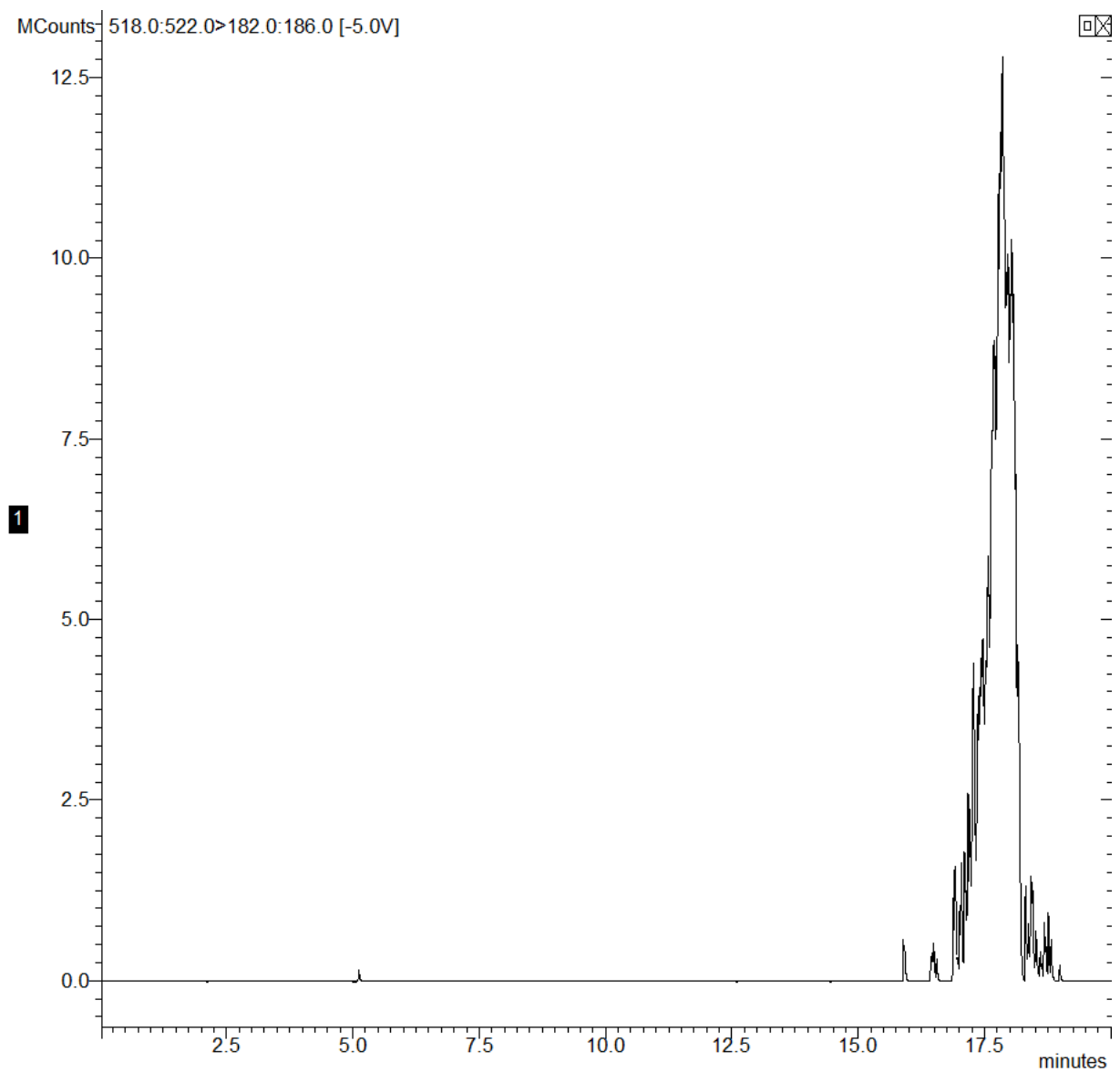
Üleminek	Nimetus	Mõõdetud <i>m/z</i> vahemik	Viide
<i>m/z</i> 184 → 184	Trimetüülammoonium-etüül fosfaatioon	<i>m/z</i> 182-186 → 182-186	[3]
<i>m/z</i> 496 → 184	1-palmitoüül-2-OH-sn-glütsero-fosfokoliin	<i>m/z</i> 494-498 → 182-186	[4, 5]
<i>m/z</i> 520 → 184	1-linoleoüül-2-OH-sn- glütsero-fosfokoliin	<i>m/z</i> 518-522 → 182-186	[5, 41]
<i>m/z</i> 522 → 184	1-otenoüül-2-OH-sn- glütsero-fosfokoliin	<i>m/z</i> 520-524 → 182-186	[5, 41]
<i>m/z</i> 524 → 184	1-stearoüül-2-OH-sn- glütsero-fosfokoliin	<i>m/z</i> 522-526 → 182-186	[4, 5]
<i>m/z</i> 704 → 184	Glütserofosfokoliin lipiid	<i>m/z</i> 702-706 → 182-186	[4]
<i>m/z</i> 758 → 184	1-palmitoüül-2-linoleoüül-sn- glütsero-fosfokoliin	<i>m/z</i> 756-760 → 182-186	[4, 5]
<i>m/z</i> 760 → 184	1-palmitoüül-2-oleoüül-sn- glütsero-fosfokoliin	<i>m/z</i> 758-762 → 182-186	[5, 41]
<i>m/z</i> 786 → 184	1-stearoüül-2-linoleoüül-sn-glütsero-fosfokoliin	<i>m/z</i> 784-788 → 182-186	[5, 34]
<i>m/z</i> 810 → 184	1-stearoüül-2-arakidonoüül-sn- glütsero-fosfokoliin	<i>m/z</i> 808-812 → 182-186	[42]
<i>m/z</i> 746,75 → 184	Fosfatidüületanoolamiin	<i>m/z</i> 745-749 → 182-186	[3]
<i>m/z</i> 790,5 → 184	Fosfatidüülseriin	<i>m/z</i> 788-792 → 182-186	[3]
<i>m/z</i> 806 → 184	1-(9Z,12Z-oktadekadienoüül)-2-(5Z,8Z,11Z,14Z-eikosatetraenoüül)-sn-glütsero-3-fosfokoliin	<i>m/z</i> 804-808 → 182-186	[4, 5, 34]
<i>m/z</i> 794,7 → 184	Fosfatidüülgütserool	<i>m/z</i> 793-797 → 182-186	[3]
<i>m/z</i> 904 → 184	Fosfatidüülinositool	<i>m/z</i> 902-906 → 182-186	[3]



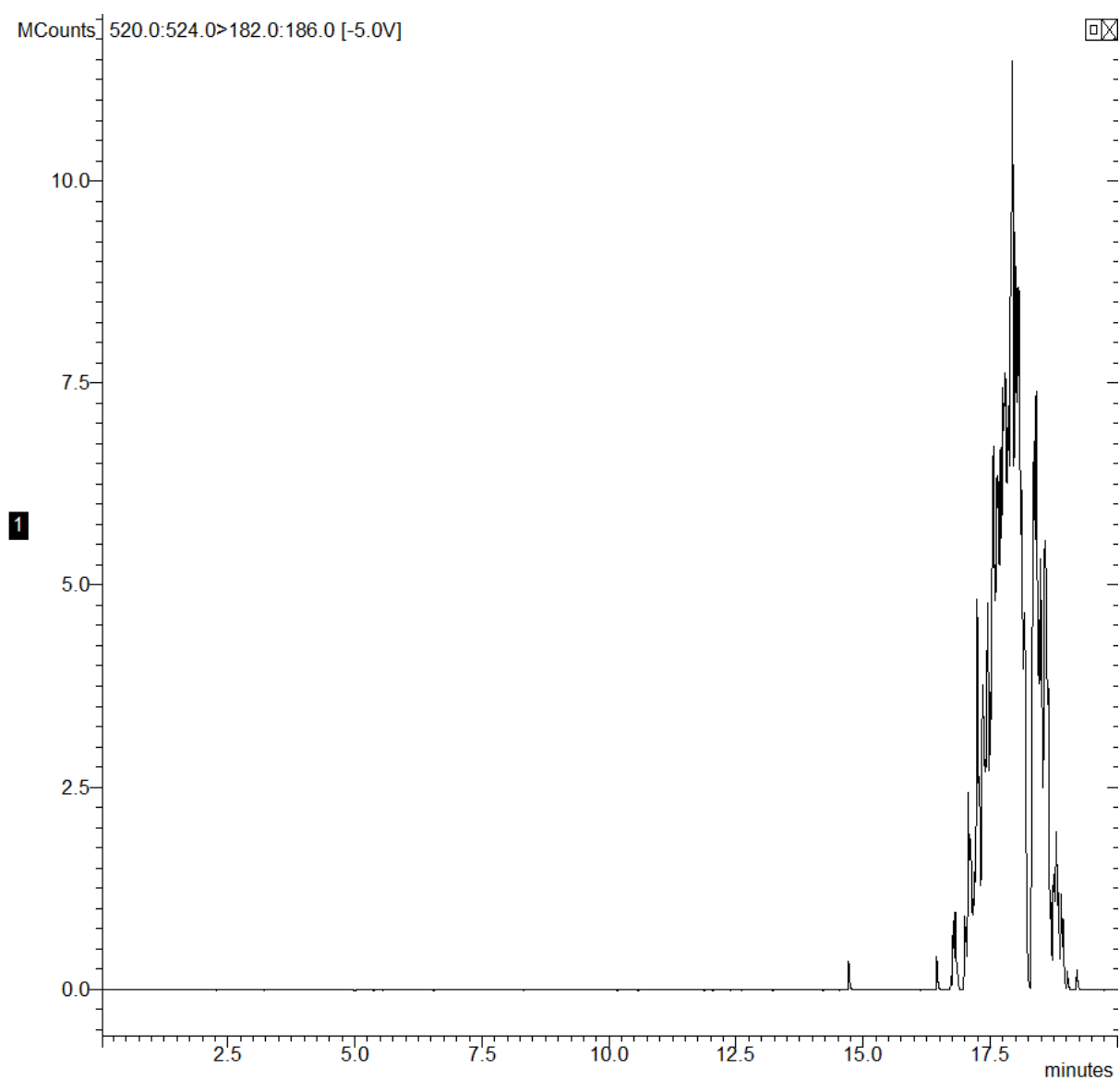
Lisa 6. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 182-186 $\rightarrow$ 182-186.



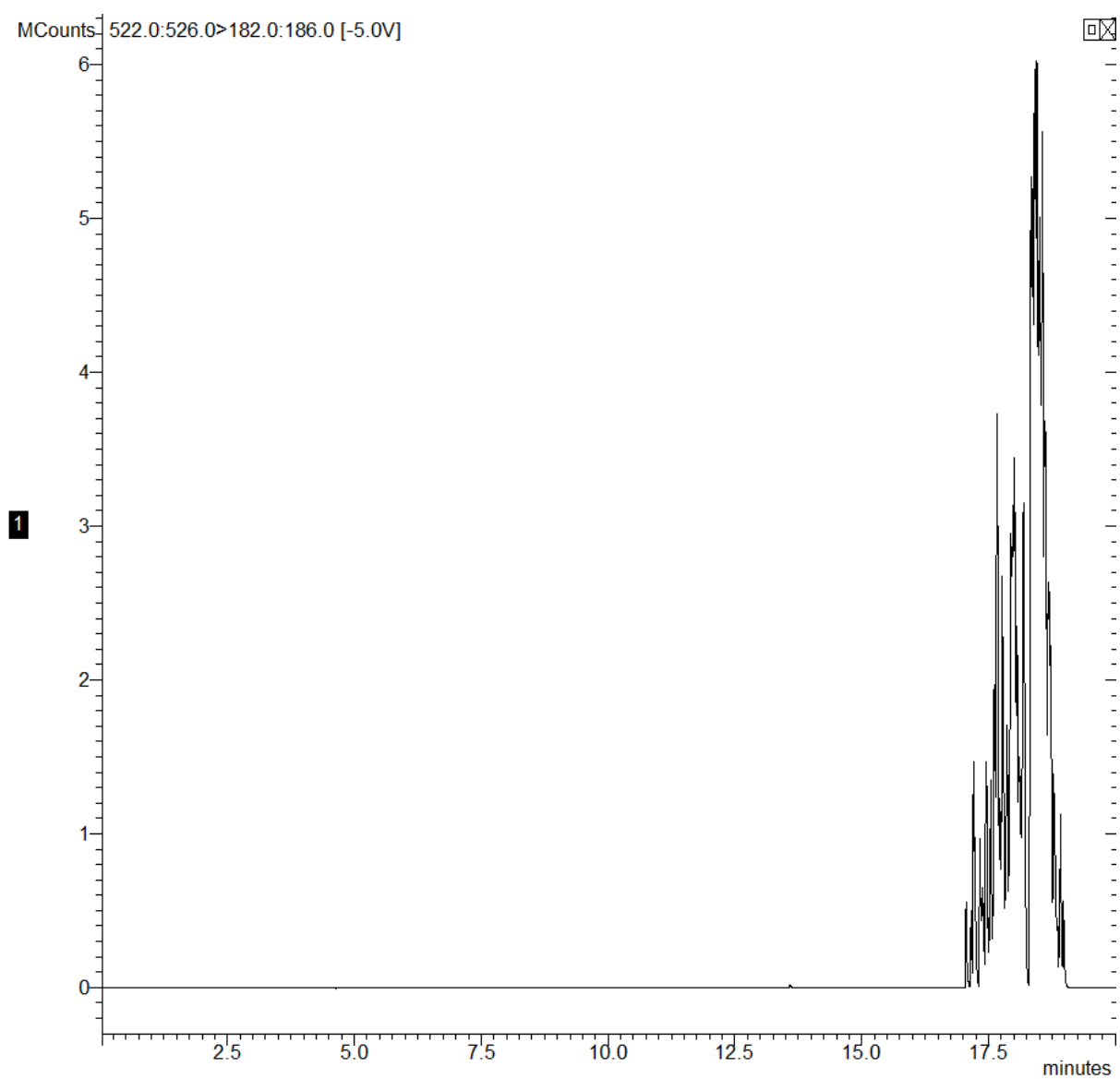
Lisa 7. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 494-498 $\rightarrow$ 182-186.



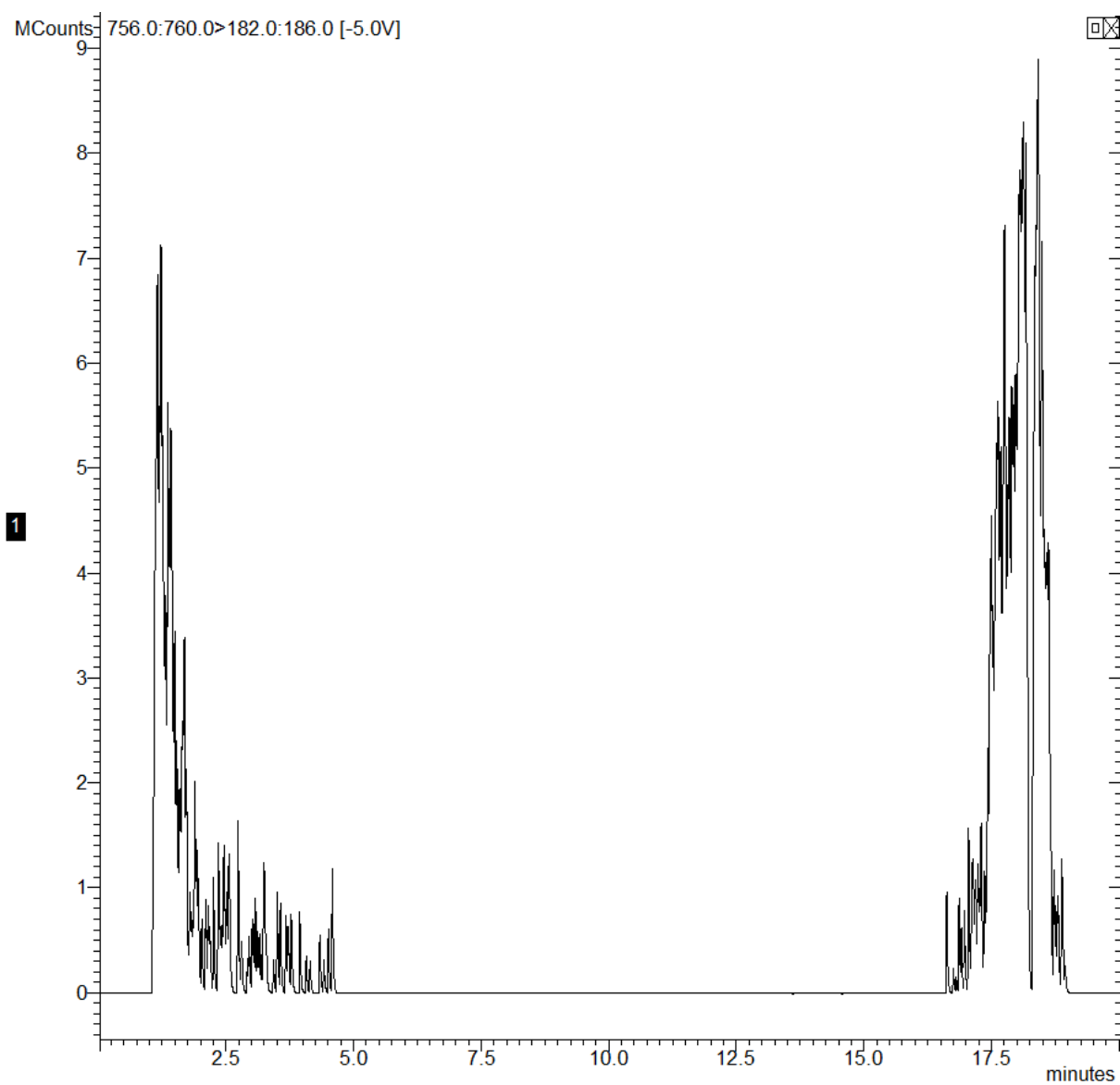
Lisa 8. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 518-522 $\rightarrow$ 182-186.



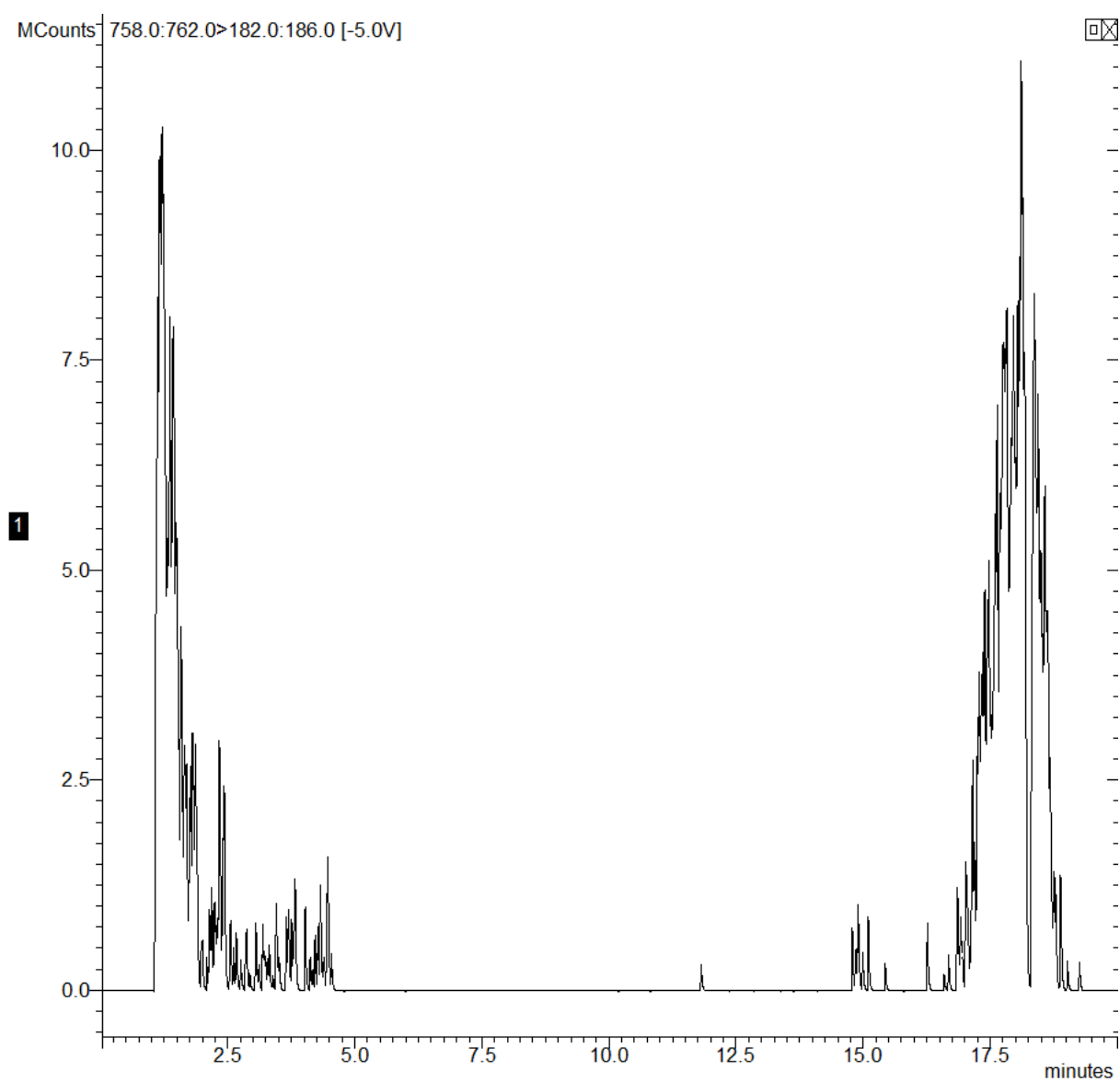
Lisa 9. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 520-524 $\rightarrow$ 182-186.



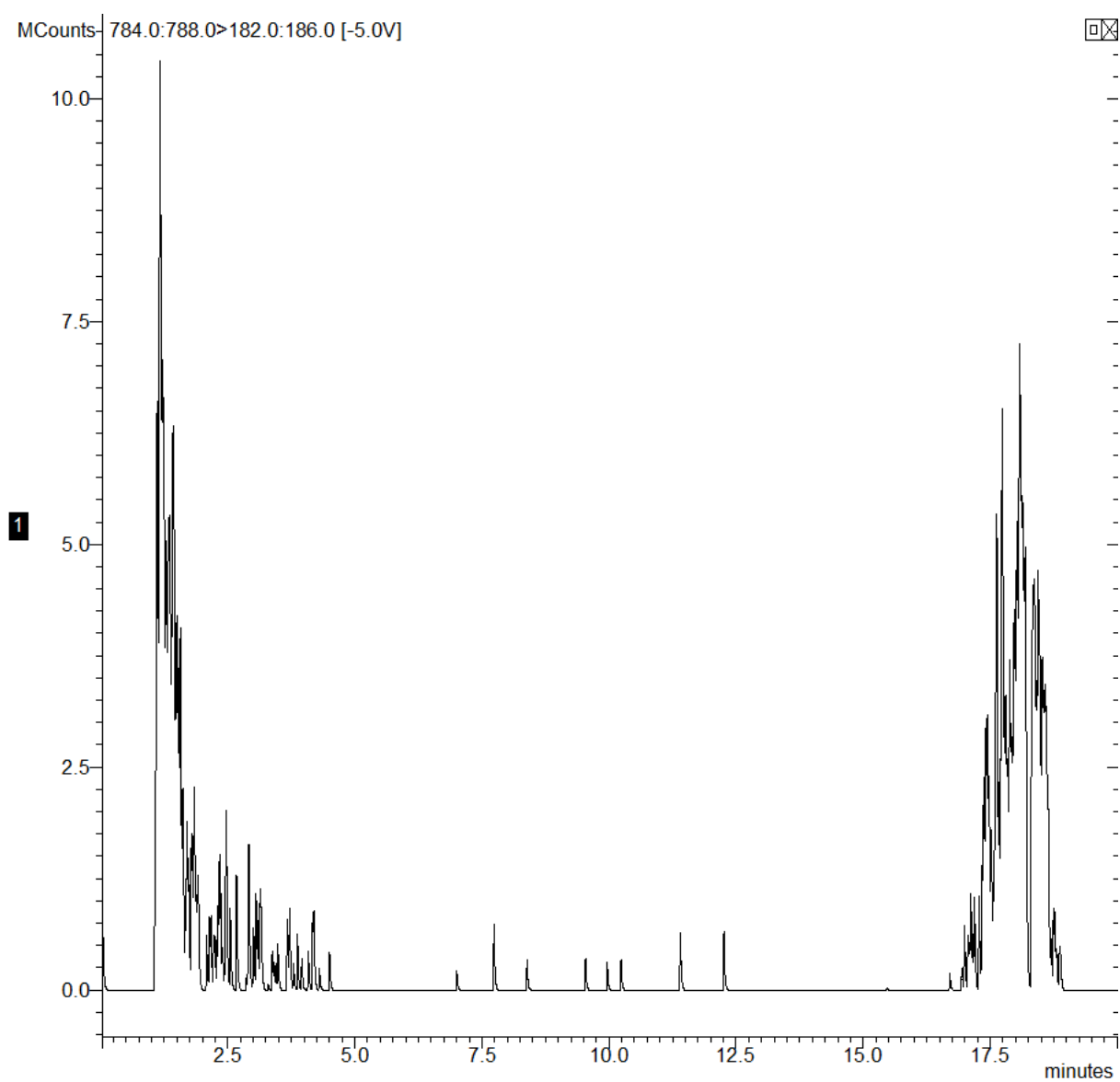
Lisa 10. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 522-526 $\rightarrow$ 182-186.



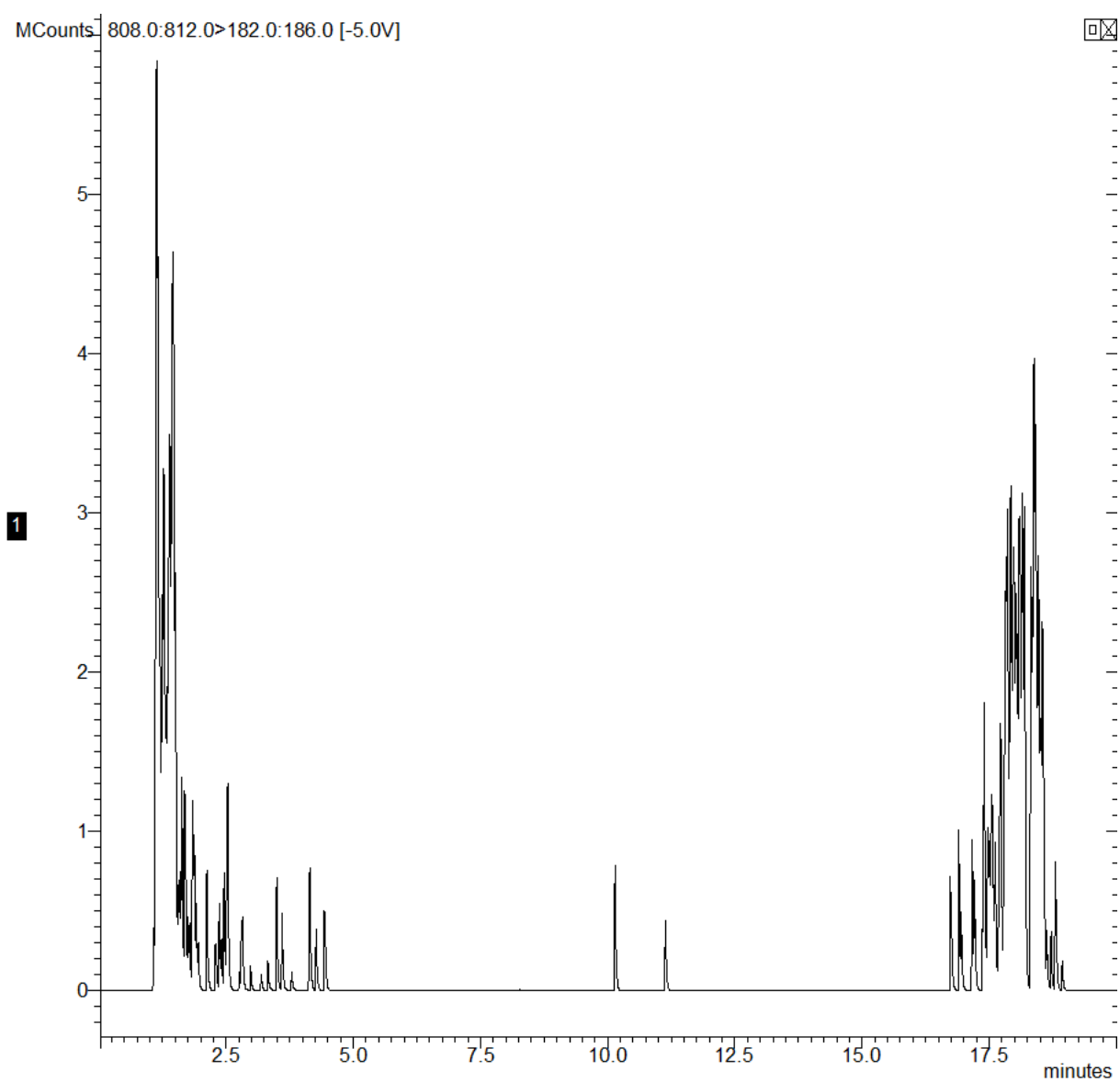
Lisa 11. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 756-760 $\rightarrow$ 182-186.



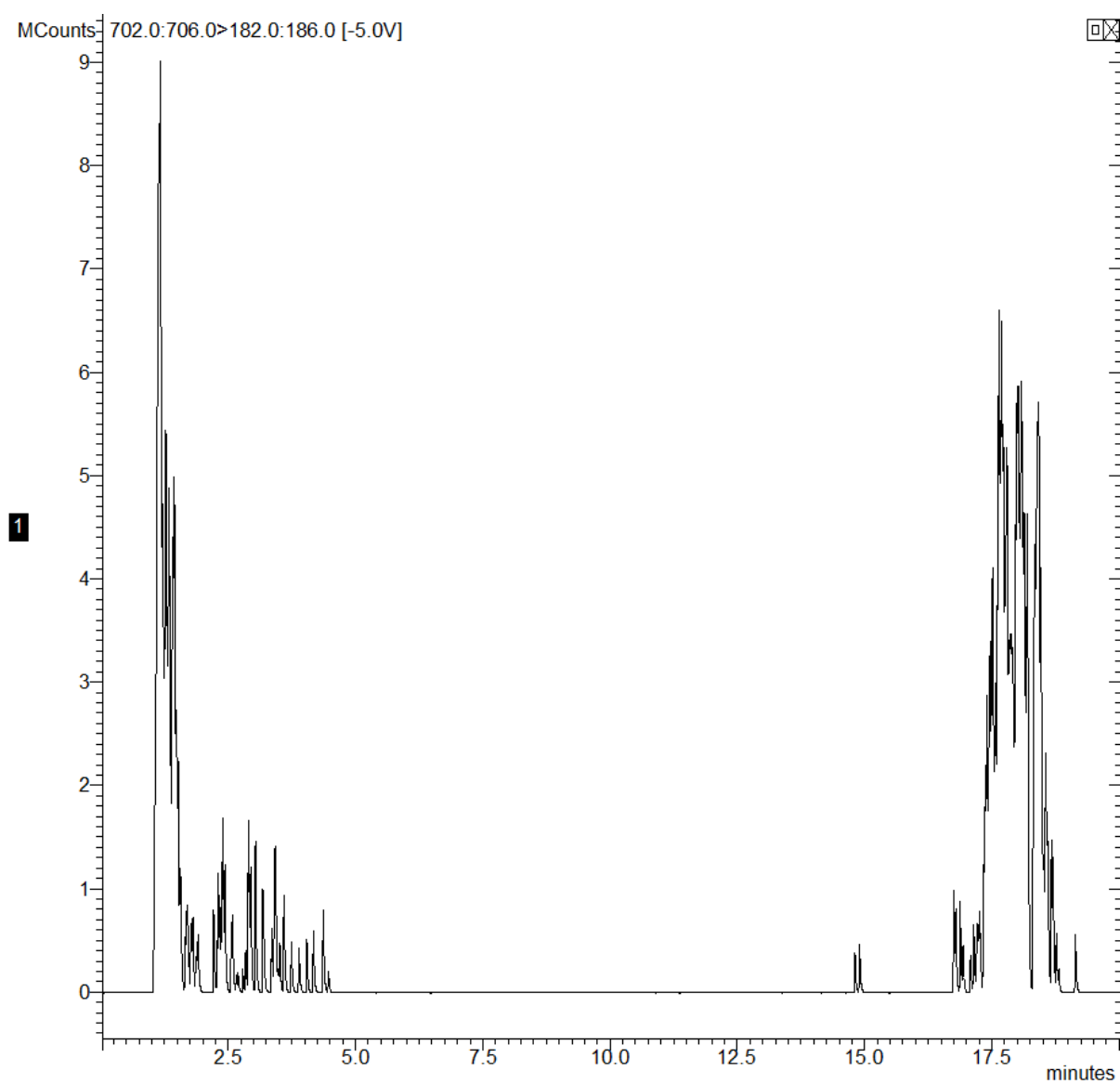
Lisa 12. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 758-762 $\rightarrow$ 182-186.



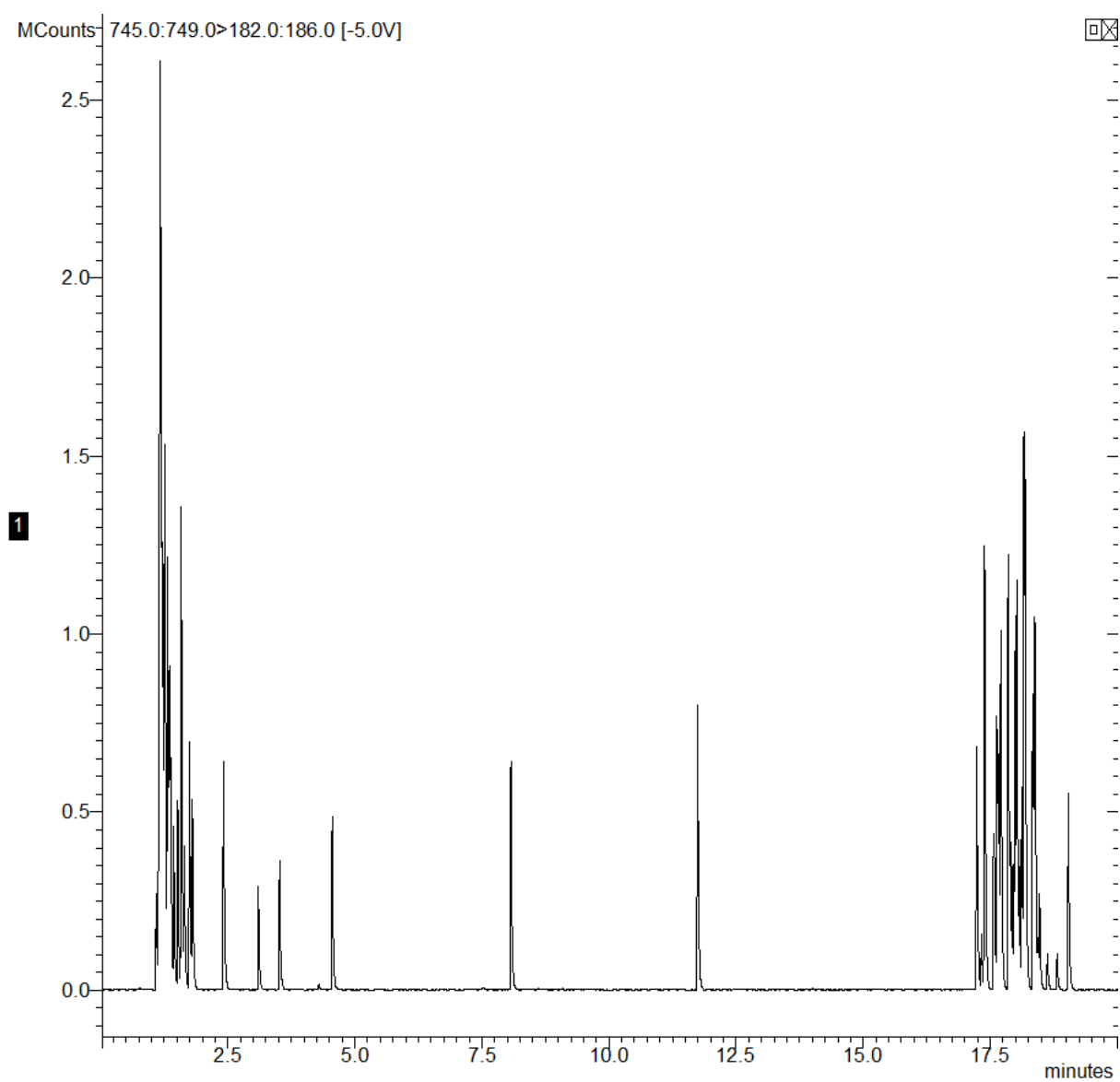
Lisa 13. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 784-788 $\rightarrow$ 182-186.



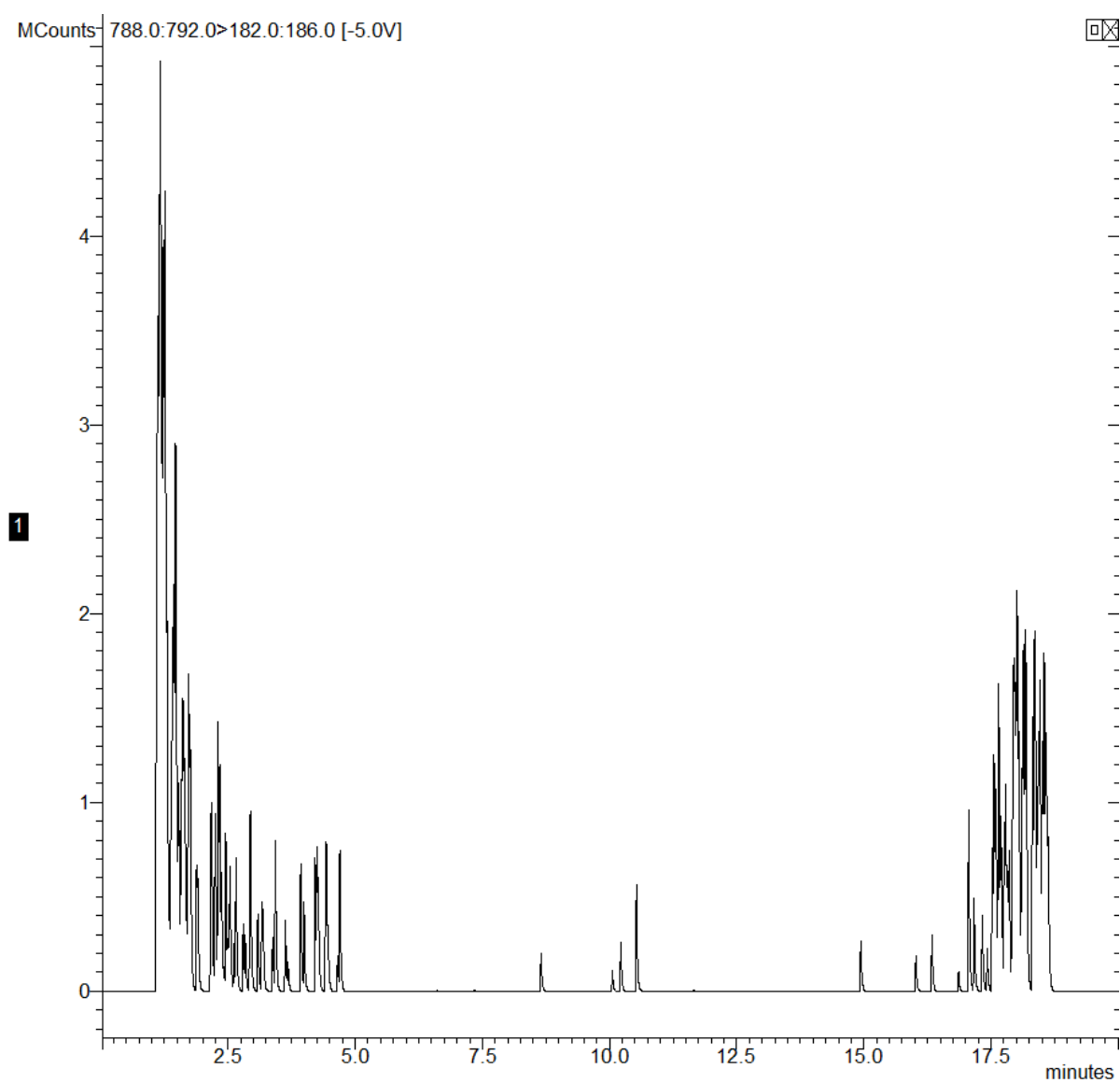
Lisa 14. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 808-812 $\rightarrow$ 182-186.



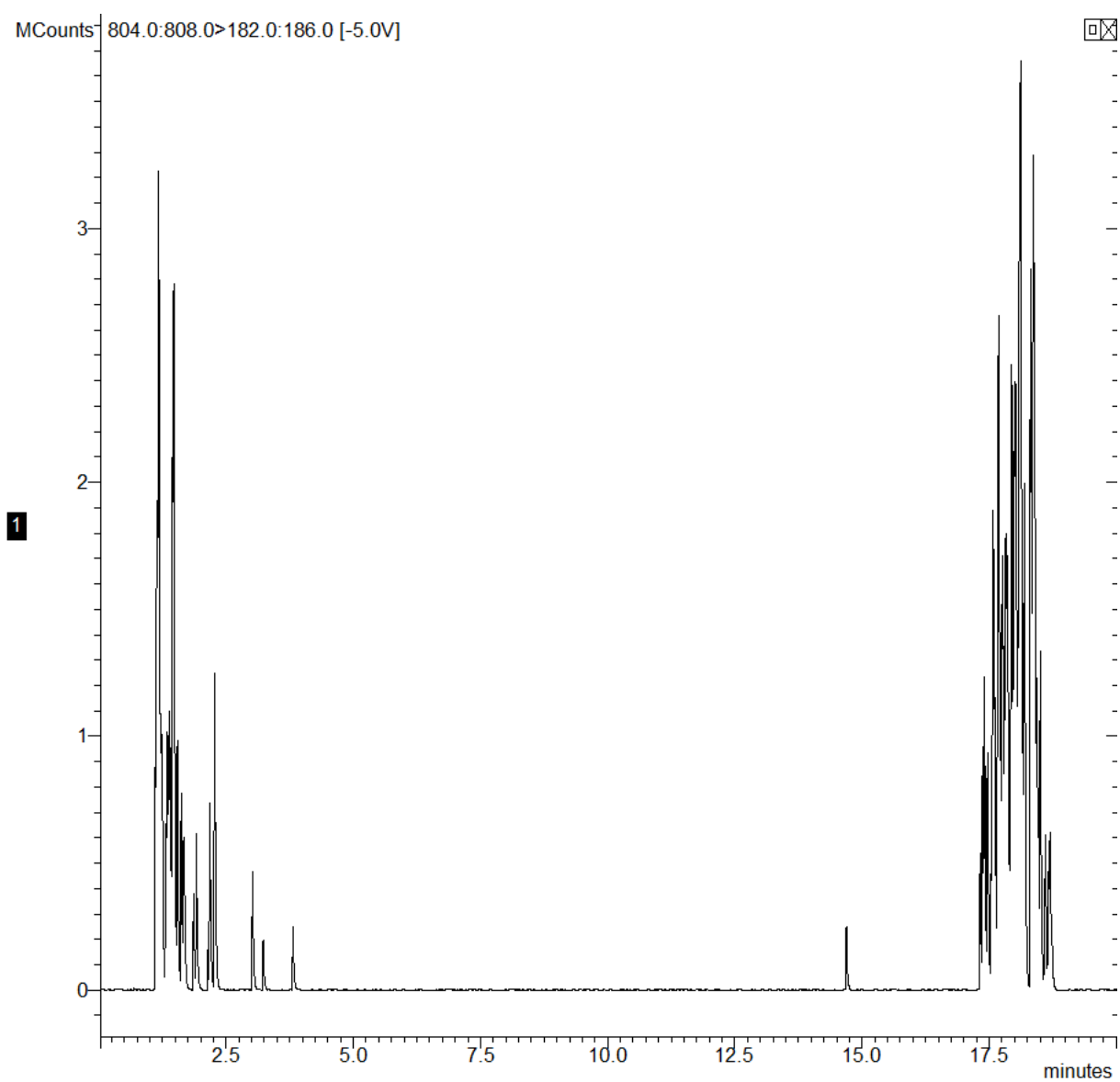
Lisa 15. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 702-706 $\rightarrow$ 182-186.



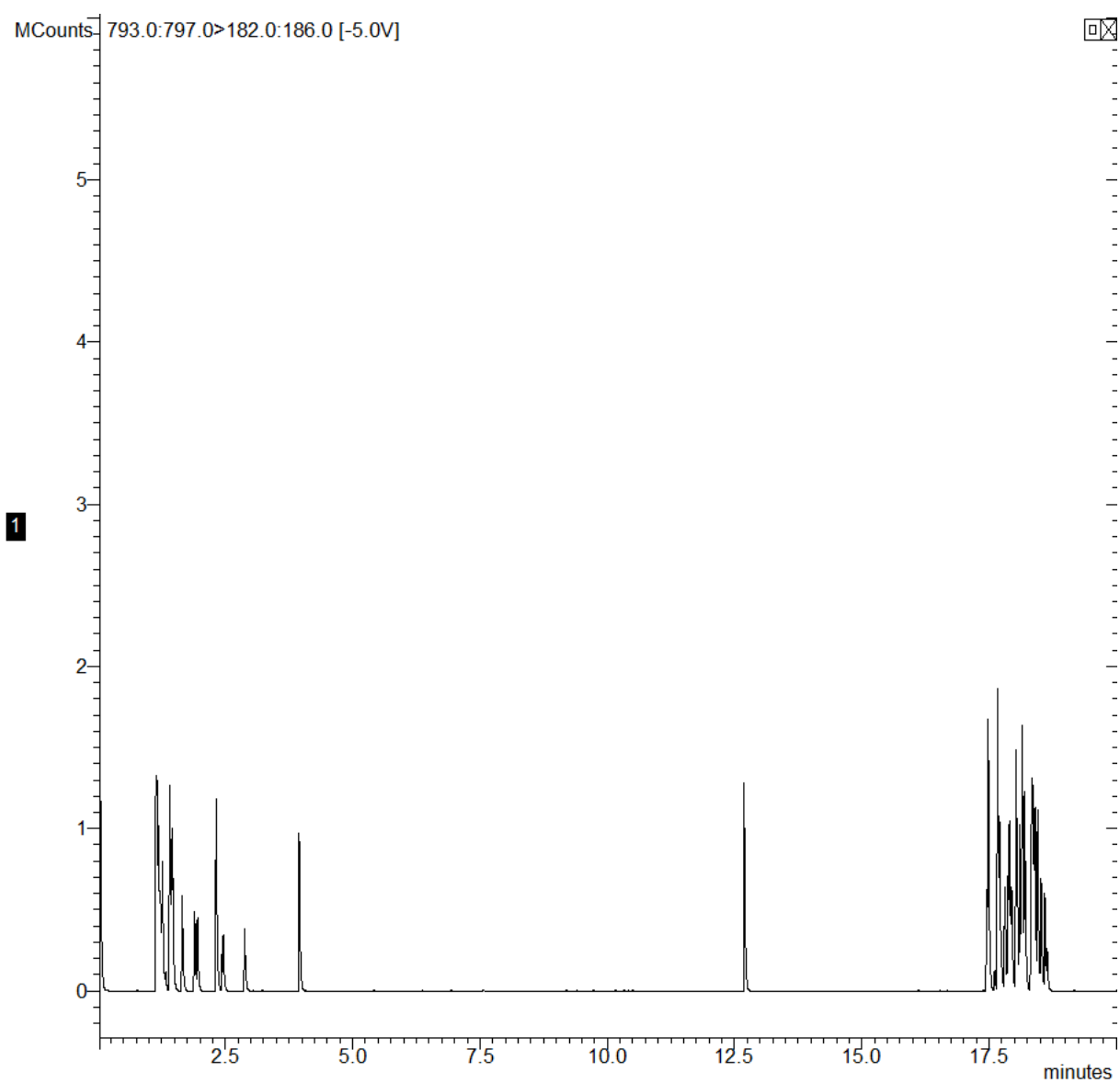
Lisa 16. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 745-749 $\rightarrow$ 182-186.



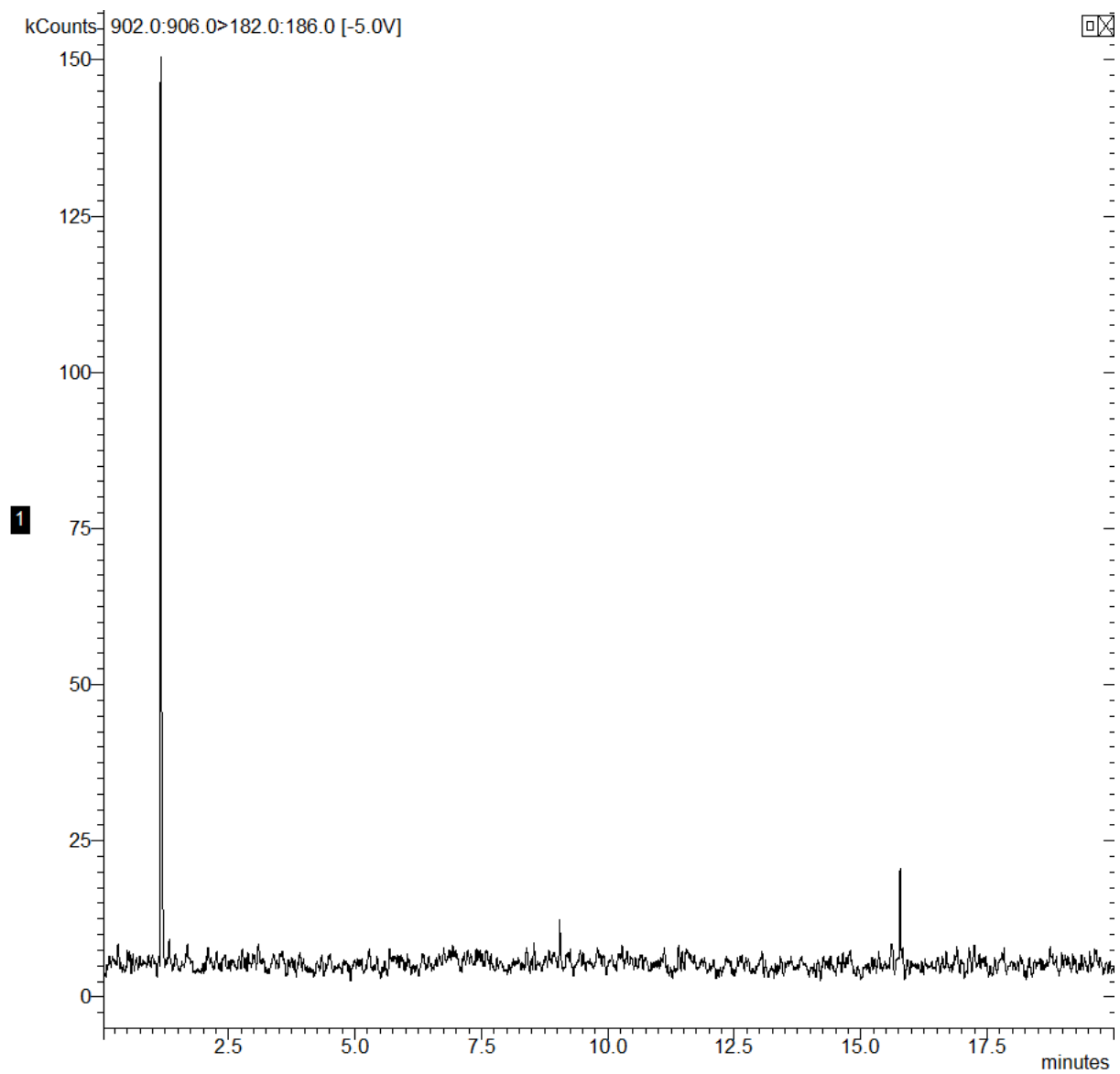
Lisa 17. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 788-792 $\rightarrow$ 182-186.



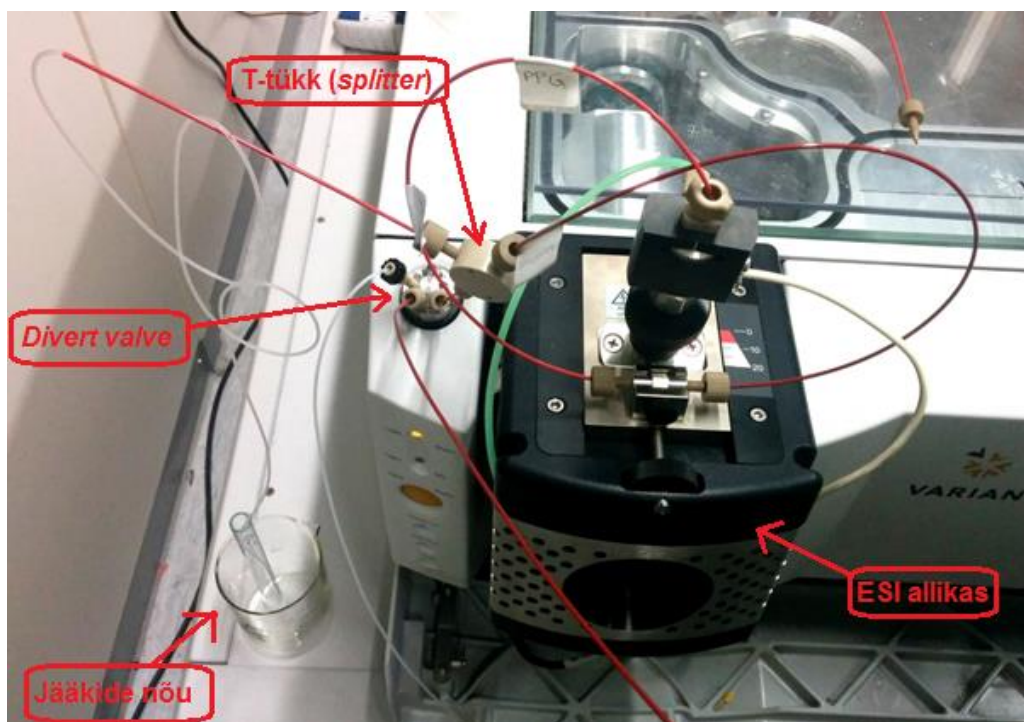
Lisa 18. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 804-808 $\rightarrow$ 182-186.



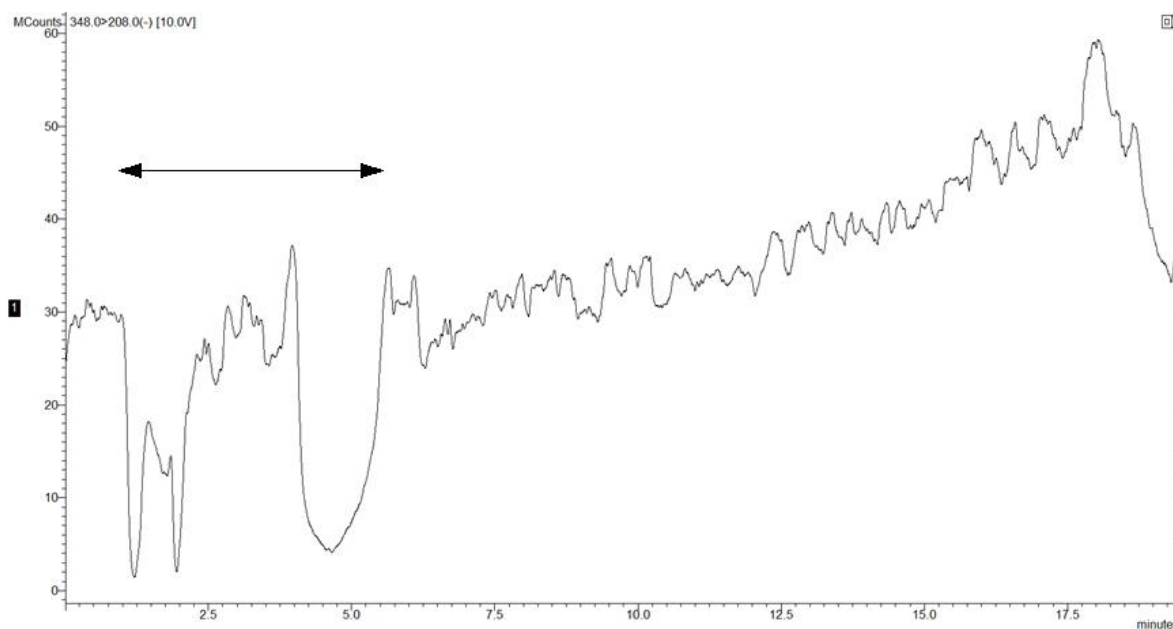
Lisa 19. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 793-797 $\rightarrow$ 182-186.



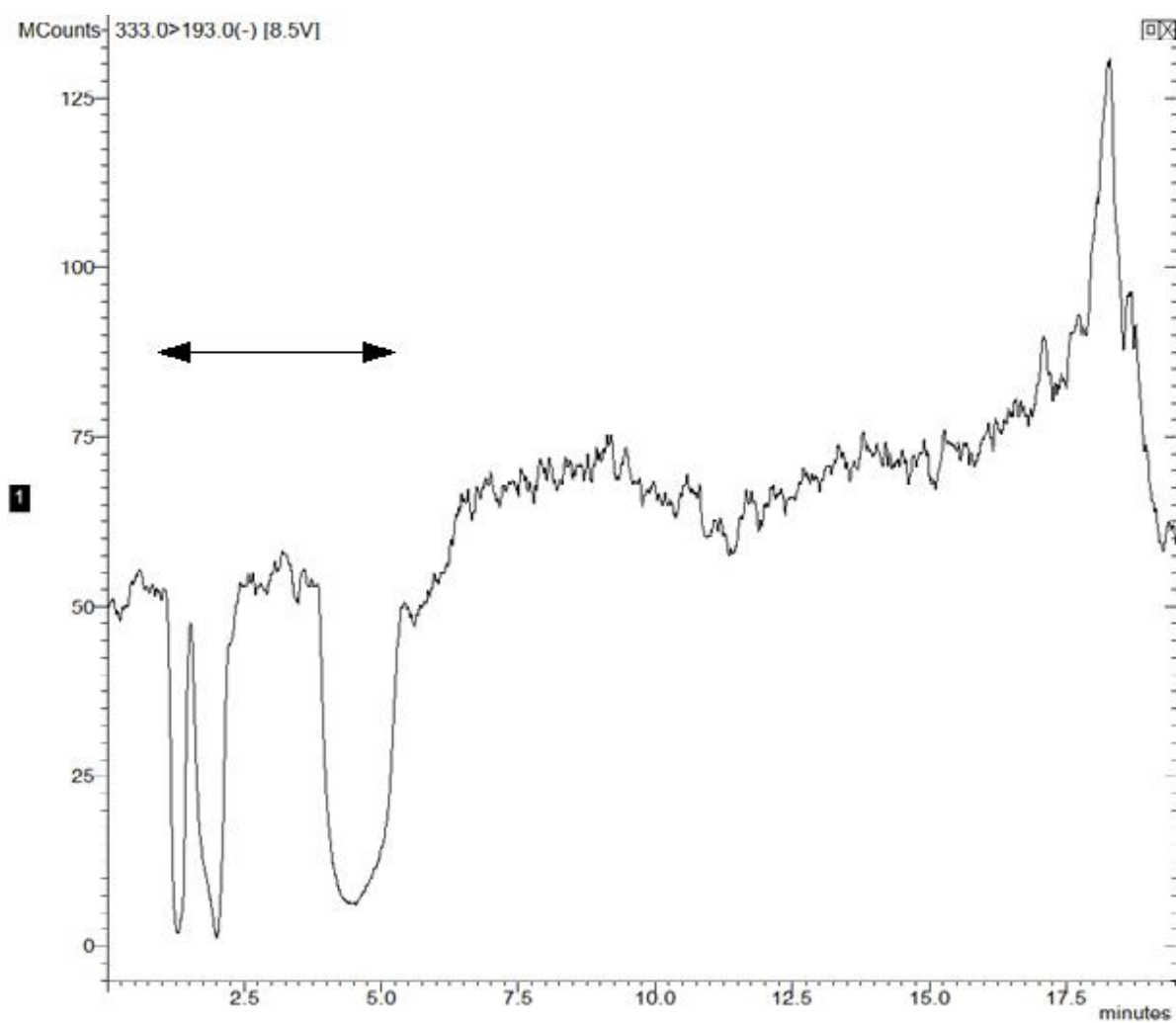
Lisa 20. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Fosfolipiidide monitooring vereplasmas. Üleminekud m/z 902-906 $\rightarrow$ 182-186.



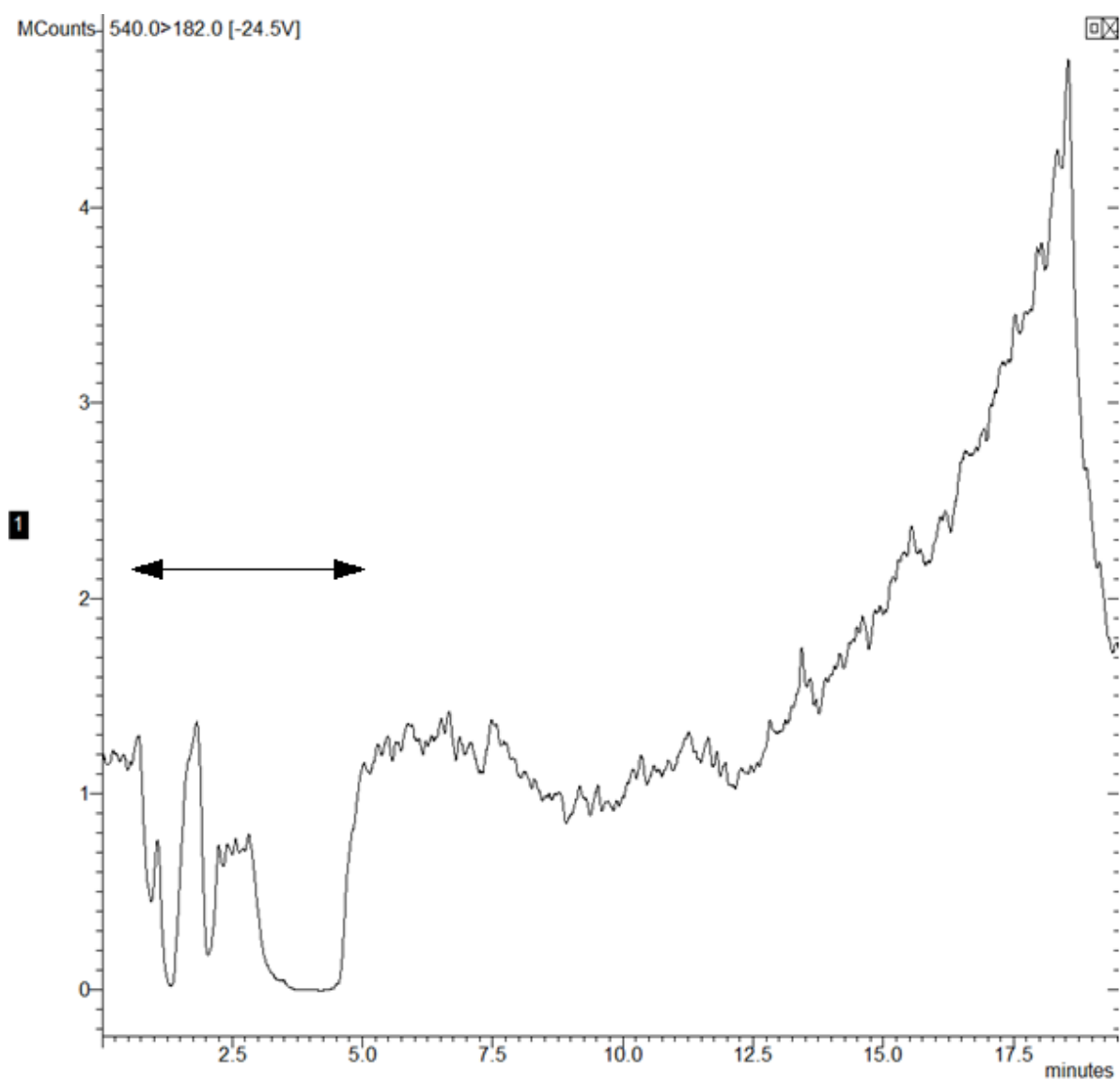
Lisa 21. ESI allikas koos eluendi voolu jagaja (*splitter*) ja jääkidesse suunamise klapiga (*divert valve*).



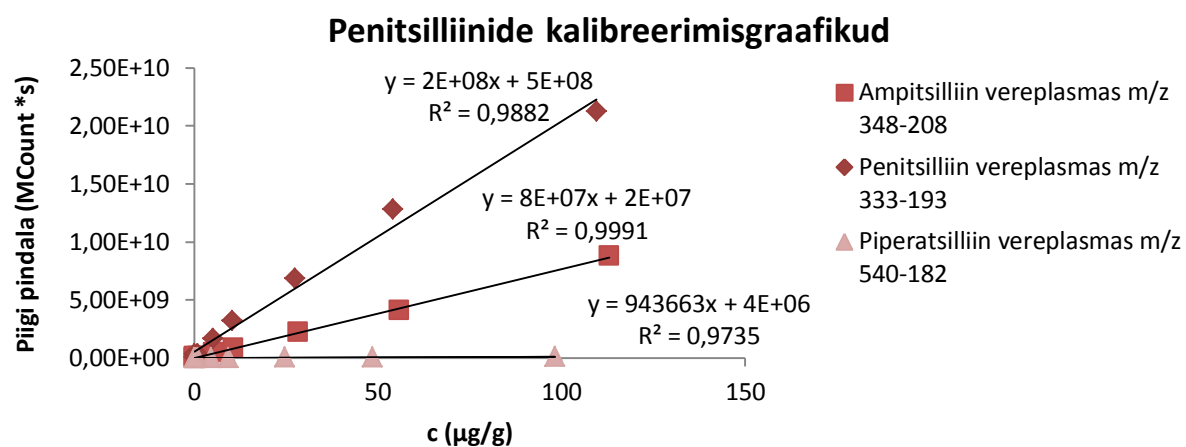
Lisa 22. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Ampitsilliini signaali muutus LC-jooksu käigus, üleminekul m/z 348 $\rightarrow$ 208.



Lisa 23. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Penitsilliini signaali muutus LC-jooksu käigus, üleminekul m/z 333 $\rightarrow$ 193.



Lisa 24. MS-kromatogramm, mobiilfaas MeOH ja 5 mM HFIP (pH=8,5). Piperatsilliini signaali muutus LC-jooksu käigus, üleminekul m/z 540→182.



Lisa 25. Penitsilliinide kalibreerimisgraafikud ja R^2 väärtused vereplasmas.

Lisa 26. Mõõte- ja kordustäpsus.

	Tegelik kontsentratsioon 54,32 µg/g				Tegelik kontsentratsioon 5,29 µg/g				Tegelik kontsentratsioon 0,3 µg/g			
	keskmine				keskmine				keskmine			
	tagasiarvutatud c (µg/g) (n=5)	Acc (%)	ST (µg/g)	CV (%)	tagasiarvutatud c (µg/g) (n=5)	Acc (%)	ST (µg/g)	CV (%)	tagasiarvutatud c (µg/g) (n=5)	Acc (%)	ST (µg/g)	CV (%)
Penitsilliin												
I päev	43,94	19	0,82	2	4,99	6	0,15	3				
II päev	55,37	2	0,57	1	4,97	8	0,08	2	0,33	9	0,03	10
III päev	55,81	3	2,58	5	5,23	1	0,68	13	0,35	17	0,04	10

	Tegelik kontsentratsioon 55,06 µg/g				Tegelik kontsentratsioon 5,17 µg/g				Tegelik kontsentratsioon 0,3 µg/g			
	keskmine				keskmine				keskmine			
	tagasiarvutatud c (µg/g) (n=5)	Acc (%)	ST (µg/g)	CV (%)	tagasiarvutatud c (µg/g) (n=5)	Acc (%)	ST (µg/g)	CV (%)	tagasiarvutatud c (µg/g) (n=5)	Acc (%)	ST (µg/g)	CV (%)
Piperatsilliin												
I päev	59,05	11	1,66	3	3,63	30	0,14	4				
II päev	63,34	19	1,97	3	5,26	2	0,37	7	0,35	16	0,04	11
III päev	62,2	17	5,74	9	5,23	7	0,13	2	0,35	16	0,01	2

	Tegelik kontsentratsioon 55,37 µg/g				Tegelik kontsentratsioon 5,39 µg/g				Tegelik kontsentratsioon 0,3 µg/g			
	keskmine				keskmine				keskmine			
	tagasiarvutatud c (µg/g) (n=5)	Acc (%)	ST (µg/g)	CV (%)	tagasiarvutatud c (µg/g) (n=5)	Acc (%)	ST (µg/g)	CV (%)	tagasiarvutatud c (µg/g) (n=5)	Acc (%)	ST (µg/g)	CV (%)
Ampitsilliin												
I päev												
II päev	66,54	20	2,47	4	5,44	1	0,55	10	0,8	167	0,07	9
III päev	54,4	2	2,94	5	5,25	3	0,41	8	0,37	22	0,06	16

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Helena Kase,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
METOODIKA ARENDAMINE ILMA EELTÖÖTLUSETA VEREPLASMA ANALÜÜSIKS
VEDELIKKROMATOGRAAFIA MASSISPEKTROMEETRIA MEETODIL,

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Karin Kipper, Koit Herodes,

(juhendaja nimi)

- 1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **01.06.2015**

