



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Ověření stability vybraných
tetrahydroisochinolinů a jejich
prekursorů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Petra Nyklová
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Eva Hényková, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petra Nyklová
Název práce	Ověření stability vybraných tetrahydroisochinolinů a jejich prekursorů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Eva Hényková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Bakalářská práce se zabývá stabilitou vybraných tetrahydroisochinolinových derivátů ((<i>R</i>)-salsolinol, kyselina salsolinol-1-karboxylová a N-methyl-(<i>R</i>)-salsolinol) a jejich prekursorů (dopamin, levodopa). V teoretické části je charakterizována skupina tetrahydroisochinolinů, jsou popsána neurodegenerativní onemocnění obecně a vysvětlena souvislost zkoumaných látek s Parkinsonovou chorobou. Následně jsou popsány jednotlivé parametry validace bioanalytických metod. V rámci experimentální části je hodnocena stabilita krátkodobá, dlouhodobá a stabilita látek během 3 cyklů rozmrazování, a to za různých experimentálních podmínek.
Klíčová slova	Tetrahydroisochinoliny, salsolinol, Parkinsonova choroba, validace bioanalytické metody, stabilita
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Petra Nyklová
Title of thesis	Verification of stability of selected tetrahydroisoquinolines and their precursors
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Eva Hényková, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	This bachelor thesis deals with determination of stability of selected tetrahydroisoquinoline derivatives ((<i>R</i>)-salsolinol, salsolinol-1-carboxylic acid, N-methyl-(<i>R</i>)-salsolinol) and their precursors (dopamine, levodopa). Within theoretical part is described the group of tetrahydroisoquinoline compounds, neurodegenerative diseases and the link between investigated substances and Parkinson's disease. Subsequently, the parameters of validation of bioanalytical methods are described. The short-term, long-term and freeze-thaw stability of investigated compounds under the different experimental conditions are evaluated within practical part.
Keywords	Tetrahydroisoquinolines, salsolinol, Parkinson's disease, bioanalytical method validation, stability
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně
za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Petra Nyklová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí Mgr. Evě Hénykové, Ph.D. za odborné vedení, obrovskou trpělivost a ochotu. Dále bych ráda poděkovala paní laborantce Haně Svobodové za pomoc a užitečné rady při provádění experimentů praktické části. Mé poděkování patří také mé rodině a příteli za podporu během celého studia. Tato práce byla realizována s podporou Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA_PrF_2020_021).

OBSAH

Seznam zkratk	8
1 ÚVOD	10
2 TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Neurotransmitery a neuromodulátory	11
2.1.1 Katecholaminy	11
2.1.2 Tetrahydroisochinoliny	12
2.1.2.1 Biosyntéza a metabolismus TIQ derivátů	13
2.1.2.2 Endogenní výskyt a účinky TIQ derivátů	15
2.1.2.3 Analýza TIQ derivátů	16
2.2 Neurodegenerativní onemocnění	16
2.2.1 Parkinsonova choroba	17
2.2.2 TIQ v etiologii Parkinsonovy choroby	18
2.3 Validace bioanalytických metod	19
2.3.1 Správnost a přesnost měření	20
2.3.2 Linearita	21
2.3.3 Selektivita	21
2.3.4 Specifita	22
2.3.5 Matricové efekty	22
2.3.6 Carry-over	22
2.3.7 Integrita ředění	22
2.3.8 Reprodukovatelnost nástřiku	23
2.3.9 Stabilita	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1 Přístrojové vybavení a materiál	25
3.2 Použité chemikálie	25
3.3 Metody	26
3.3.1 Příprava roztoků	26
3.3.2 Příprava QC vzorků a kalibrační křivky	29
3.3.3 Stabilitní testy	30
3.3.4 Analýza vzorků pomocí UPLC-MS/MS	32
4 VÝSLEDKY	33
4.1 Test krátkodobé stability	33
4.2 Test dlouhodobé stability	39
4.3 Test stability během 3 cyklů rozmrazování	40
5 DISKUSE	44
6 ZÁVĚR	47

CITOVANÁ LITERATURA	48
---------------------------	----

Seznam zkratek

AO	Aminoxidasa
AT	Teplota autosampleru (autosampler temperature)
BBB	Hematoencefalická bariéra (blood–brain barrier)
DA	Dopamin
DDC	Dopamindekarboxylasa
DBH	Dopamin beta-hydroxylasa
EMA	European Medicines Agency
FDA	The Food and Drug Administration
GC-MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (gas chromatography - mass spectrometry)
HQC	Kontrolní vzorek kvality o vysoké koncentraci (high quality control)
IS	Interní standard
LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography - mass spectrometry)
L-DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanin, levodopa
LLOQ	Spodní mez kvantifikace (lower limit of quantification)
LQC	Kontrolní vzorek kvality o nízké koncentraci (low quality control)
MAO	Monoaminoxidasa
MIX-2-IS	Směs 2 interních standardů
MIX-5-US	Směs 5 neznačených standardů
MPDP	1-methyl-4-fenyl-2,3-dihydropyridinium
MPP ⁺	1-methyl-4-fenylpyridinium
MPTP	1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MQC	Kontrolní vzorek kvality o střední koncentraci (medium quality control)
NMS	<i>N</i> -methylsalsolinol
PD	Parkinsonova choroba (Parkinson's disease)
PTFE	Polytetrafluoroethylen
RT	Pokožová teplota (room temperature)
SAL	Salsolinol
SAL synthasa	Salsolinol synthasa
SCA	Kyselina salsolinol-1-karboxylová (salsolinol-1-carboxylic acid)
SD	Standartní směrodatná odchylka (standard deviation)
SNMT	Salsolinol <i>N</i> -methyltransferasa
TDP-43	Transaktivní DNA vázající protein o molární hmotnosti 43 kDA (transactivation response DNA binding protein 43)
TH	Tyrosinhydroxylasa

TIQ	Tetrahydroisochinoliny (tetrahydroisoquinolines)
QC	Kontrola kvality (quality control)
ULOQ	Horní mez kvantifikace (upper limit of quantification)
UPLC-MS/MS	Ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (ultra-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry)
US	Neznačená látka (unlabelled standard)

1 ÚVOD

Tetrahydroisochinolinové deriváty (TIQ) jsou molekuly, jejichž chemická struktura vychází z 1,2,3,4-tetrahydroisochinolinu. Jedná se o heterocyklické bazické látky, které ve své struktuře obsahují atom dusíku a jejichž biosyntéza vychází z aminokyseliny tyrosinu. Bývají řazeny mezi skupinu alkaloidů a zahrnují obsáhlou skupinu látek. TIQ byly detekovány v rostlinách mnohem dříve než v živočišné říši (Rommelspacher, 1985; Zarranz De Ysern, 1981). Byl prokázán také jejich obsah v různých potravinách a nápojích, jako např. v sýru, mléce, banánech, vejcích, víně a kakau (Makino, 1988; Niwa, 1989b). Koncem 80. let 20. století pak byly poprvé identifikovány jako endogenní látky také i v živočišných organismech, konkrétně v lidské mozkové tkáni (Niwa, 1987; Niwa, 1989a). Jejich přítomnost byla prokázána také v tělních tekutinách včetně moči, plasmy a mozkomíšního moku (Sjöquist, 1985; Kotake, 1995; Haber, 1996; Maruyama, 1996).

Většina TIQ derivátů nacházejících se v lidském mozku je spojována s neurotoxicitou, a to hlavně kvůli strukturní podobnosti s 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinem (MPTP). MPTP jako neaktivní forma (tzv. pro-drug) a jeho oxidační neurotoxický produkt 1-methyl-4-fenylpyridiniový ion (MPP^+) jsou pak substance spojované se vznikem a rozvojem příznaků parkinsonismu (Herraiz, 2016).

TIQ vznikají v lidském organismu metabolickou dráhou vedoucí od 3,4-dihydroxyfenylalaninu (levodopa, L-DOPA) a dopaminu (Naoi, 2004). Dopamin je neurotransmiter strukturně se řadící mezi katecholaminy. Za jistých okolností může mít i toxické účinky, které bývají přisuzovány nestabilitě katecholové skupiny – dopamin podléhá snadno oxidaci za tvorby nestabilních chinonů a volných radikálů, které jsou pro buňky toxické a způsobují jejich poškození (Hastings, 1996; Asanuma, 2003). Obdobně se u TIQ derivátů obsahujících v molekule katecholové jádro předpokládá nestabilita a tendence podléhat oxidaci a následné tvorbě reaktivních chinonů (Surh, 2010).

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše týkající se jednak tématu TIQ derivátů, zejména salsolinolu a dále obecný popis validace bioanalytických metod. V rámci experimentální části byl zkoumán jeden z validačních parametrů, a to stabilita vybraných prekursorů a metabolitů salsolinolu (dopamin, L-DOPA, (*R*)-salsolinol, kyselina salsolinol-1-karboxylová a *N*-methyl-(*R*)-salsolinol). Postup pro hodnocení stability těchto analytů vycházel z doporučení organizace EMA (European Medicines Agency), která v roce 2019 vydala tzv. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation (EMA, 2019).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Neurotransmitery a neuromodulátory

Neurotransmitery jsou látky uvolňované z neuronu do synaptické štěrbiny, které se podílí na přenosu signálu mezi jednotlivými neurony. U cílové buňky pak vyvolají specifickou reakci. Skupinu důležitých neurotransmiterů, rozšířených v celém mozku během vývoje i dospělosti představují monoaminy (serotonin, dopamin, adrenalin, noradrenalin) (Vizi, 2008). Mezi další významné neurotransmitery se řadí acetylcholin a aminokyseliny (glutamát, glycin, kyselina gama-aminomáselná). Přes hematoencefalickou bariéru (BBB) do centrální nervové soustavy neprostupují většinou neurotransmitery samotné, ale pouze jejich prekursory (Bohlen und Halbach, 2006).

Neuromodulátory jsou potom látky, které mění citlivost receptorů na post-synaptické membráně a modulují tak (zeslabují nebo zesilují) účinky neurotransmiterů (Bohlen und Halbach, 2006).

2.1.1 Katecholaminy

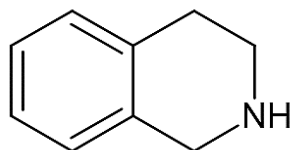
Katecholaminy jsou skupinou látek obsahující katecholové jádro a aminovou skupinu, jež jsou odvozeny od pyrokatecholu (o-dihydroxybenzenu). V organismu hrají důležitou roli jako hormony a neurotransmitery. *In vivo* se u člověka v nervové soustavě vyskytuje trojice katecholaminových sloučenin: dopamin, adrenalin a noradrenalin (Tsunoda, 2006).

Výchozím substrátem syntézy katecholaminů je L-tyrosin, ten je v reakci katalyzované tyrosinhydroxylasou (TH) přeměněn na 3,4-dihydroxyfenylalanin neboli levodopu (L-DOPA). Dopamindekarboxylasou (DDC) je L-DOPA poté převedena na dopamin (DA) (Gnagy, 2012).

Ten může být následně degradován, klíčovou roli v tomto směru hrají enzymy monoaminoxidas (MAO) a katechol-O-methyltransferasa (Bicker, 2013). Pomocí MAO je DA deaminován za vzniku 3,4-dihydroxyfenylacetaldehydu, jenž je dále oxidován a za účasti katechol-O-methyltransferasy vzniká kyselina homovanilová. Ta je hlavním katabolickým produktem DA a může sloužit také jako nepřímý ukazatel funkčnosti dopaminové dráhy (Marín-Valencia, 2008). Alternativní cestou může být DA v katecholaminergních neuronech dále metabolizován na adrenalin a noradrenalin enzymem dopamin beta-hydroxylasou (DBH) (Marín-Valencia, 2008). Konečným produktem je kyselina vanilmandlová (Tsunoda, 2006). Další možnou metabolickou drahou katecholaminů je pak jejich přeměna na tetrahydroisochinoliny (Naoi, 2004; Kurnik-Łucka, 2018).

2.1.2 Tetrahydroisochinoliny

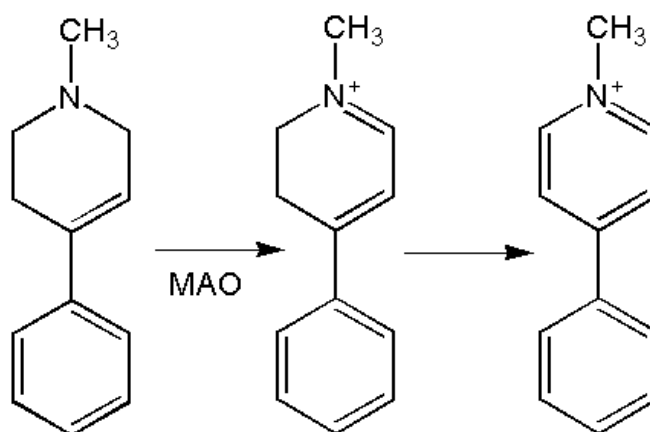
Tetrahydroisochinolínové (TIQ) deriváty jsou širokou skupinou organických sloučenin, jejichž struktura vychází z 1,2,3,4-tetrahydroisochinolínu (Obr.1).



Obr.1 Struktura 1,2,3,4-TIQ

Zájem o tyto látky vzrostl během 80. let minulého století v souvislosti s objevem 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinu (MPTP) a jeho účinků. První případ parkinsonismu způsobeného MPTP byl popsán v roce 1979 u mladého, drogově závislého muže, který syntetizoval ethyl-4-fenyl-1-methylpiperidin-4-karboxylát (meperidin) neboli „syntetický heroin“ (Davis, 1979). Při nitrožilním podání této drogy byl do jeho organismu vpraven ale také MPTP, který vznikl jako vedlejší produkt reakce. Pacient následně projevoval příznaky podobné Parkinsonově chorobě (PD). Během několika následujících let byly nahlášeny 4 další případy s obdobným průběhem (Langston, 1983).

Samotný MPTP je neaktivní forma neurotoxinu (tzv. pro-drug), který je v mozku metabolizován pomocí MAO na kationt 1-methyl-4-fenyl-2,3-dihydropyridinium (MPDP). Ten dále podléhá oxidaci za vzniku aktivního neurotoxinu 1-methyl-4-fenylpyridinia (MPP⁺) (Nagatsu, 2002) (Obr.2).



Obr.2 Schéma přeměny MPTP na jeho metabolit - aktivní neurotoxickou látku MPP⁺

Symptomy způsobené MPTP jsou velmi podobné patologickým změnám v průběhu PD. Jelikož je ale vystavení lidského organismu exogennímu MPTP sporadické a náhodné, vznikla hypotéza, že na rozvoj této nemoci by mohlo mít značný vliv dlouhodobé působení endogenních látek, jež se strukturou MPTP podobají. V této souvislosti byl výzkum zaměřen zejména na 2 skupiny sloučenin: β -karboliny a TIQ (Nagatsu, 1997; Herraiz, 2016).

2.1.2.1 Biosyntéza a metabolismus TIQ derivátů

Tetrahydroisochinoliny vznikají Pictet-Spenglerovou kondenzací biogenních aminů (např. katecholaminů, fenylethylaminů) s aldehydy nebo alfa-keto kyselinami (kyselina pyrohroznová) (Deitrich, 1980; McNaught, 1998). Některé mohou být syntetizovány také enzymaticky (Naoi, 2004). V závislosti na chemické struktuře biogenního aminu, účastníciho se reakce, bývá skupina TIQ dělena na sloučeniny s katechol- a nekatecholovou strukturou (Antkiewicz-Michaluk, 2014).

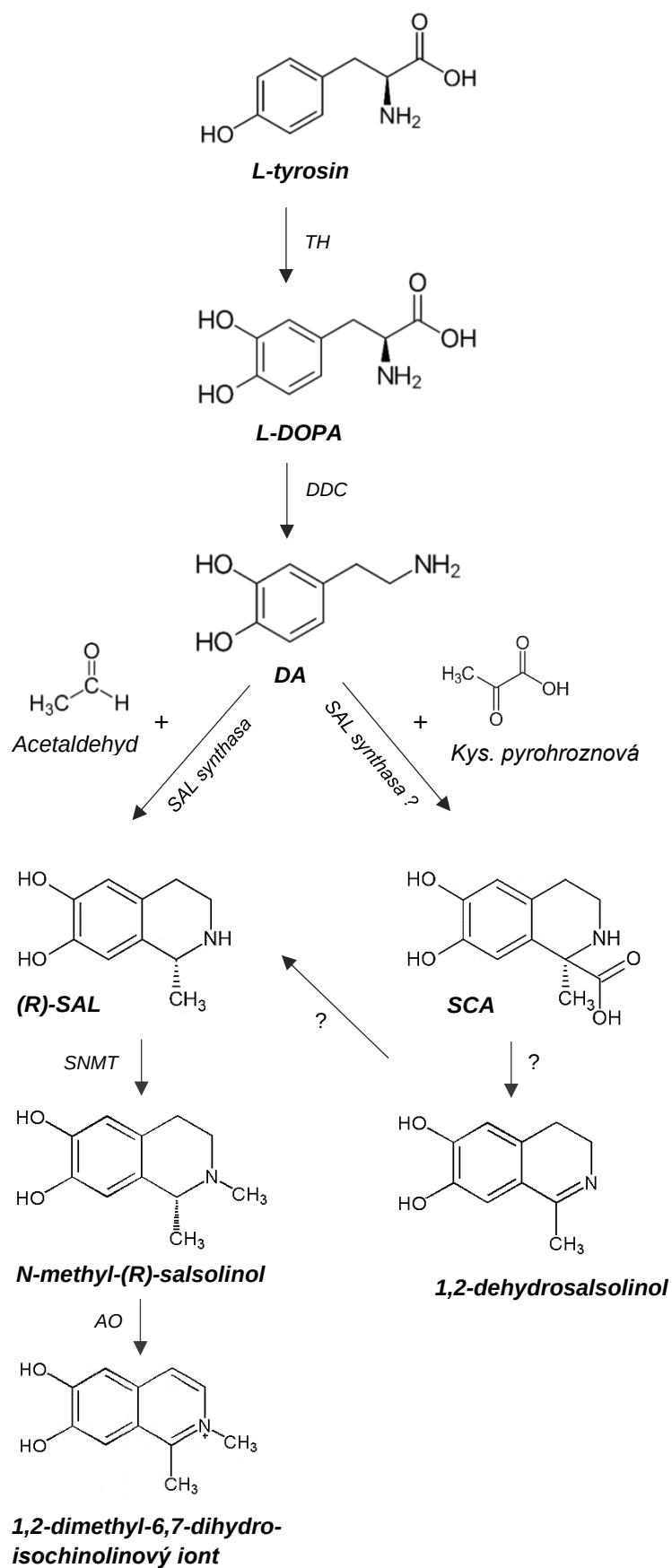
Velká pozornost v rámci TIQ derivátů je v současnosti zaměřena především na SAL (1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin), a to nejen ve spojitosti s etiologií PD. Předpokládá se, že může také fungovat jako neuromodulátor dopaminergních drah, jelikož se TIQ deriváty mohou vázat na jejich vlastní vysoce afinitní místa na neuronální membráně v blízkosti vazebných míst pro neurotransmitery. Tato jeho role ovšem není zatím přesně objasněna (Mravec, 2006; Kurnik-Łucka, 2018). Na rozdíl od TIQ derivátů 1,2,3,4-TIQ a 1-methyl-TIQ, není jednorázově podaný SAL schopen přecházet přes hematoencefalickou bariéru (BBB) (Song, 2006a; Song, 2006b), takže jeho přítomnost v mozkové tkáni ukazuje na endogenní syntézu. Nicméně, v jiné studii (Quintanilla, 2014) bylo zjištěno, že systematicky podávaný SAL byl schopen BBB procházet.

Salsolinol může v lidském těle vznikat třemi různými drahami:

- 1) Neenzymatickou Pictet-Spenglerovou reakcí,
- 2) Pomocí salsolinol synthasy (SAL synthasy),
- 3) Přes intermediát salsolinol-1-karboxylovou kyselinu (SCA).

První dvě dráhy vychází z DA a acetaldehydu: během Pictet-Spenglerovy reakce vzniká racemická směs (*R*)- a (*S*)- enantiomerů SAL (Deng, 1995). V druhém případě katalyzuje SAL synthasa vznik (*R*)-SAL (Obr.3). Tento enzym byl poprvé izolován M. Naoi a kol. (1996a), jeho sekvence byla ale určena až studií X. Chen (2018). Substráty tohoto enzymu jsou DA, acetaldehyd, formaldehyd a kyselina pyrohroznová (Naoi, 1996a).

V třetí, předpokládané dráze, reaguje DA s kyselinou pyrohroznovou za vzniku meziproduktu SCA, ta může být přeměněna na 1,2-dehydrosalsolinol, nebo přímo na (*R*)-SAL. Enzym katalyzující přeměnu SCA na (*R*)-SAL nebyl doposud popsán (Mravec, 2006; Chen, 2018).



Obr.3 Schéma enzymatické biosyntézy a metabolismu (R)-SAL a jeho derivátů
 (TH = Tyrosinhydroxylasa, DDC = dopamindekarboxylasa, SAL synthasa = salsolinol synthasa, SNMT = salsolinol N-methyltransferasa, AO = aminoxidasa). Upraveno dle Naoi, 2002

Jelikož biosyntéza SAL vychází z DA, je vyšší výskyt SAL a jeho derivátů typický právě v oblastech mozku bohatých na tento neurotransmitter (Musshoff, 1999). Studie X. Chen a kol. (2018) potvrdila také vyšší aktivitu SAL synthasy v těchto oblastech, s vrcholem v oblasti *substantia nigra* (Chen, 2018).

Jak již bylo zmíněno, SAL se vyskytuje ve dvou formách: (*R*)- a (*S*)- enantiomeru, díky chirálnímu uhlíku v jeho struktuře. Zatímco v lidské plasmě a moči byla detekována přítomnost obou enantiomerů (Haber, 1996), v mozku výrazně převyšuje (*R*)- forma této látky (Deng, 1997; Lee, 2010).

Biodegradace SAL probíhá za účasti salsolinol *N*-methyltransferasy (SNMT), kdy dojde k přeměně SAL na *N*-methyl-salsolinol (NMS), jenž poté podléhá autooxidaci nebo je oxidován pomocí aminoxidasy (AO) na 1,2-dimethyl-6,7-dihydroisochinolinový iont (Naoi, 2002, 2004).

2.1.2.2 Endogenní výskyt a účinky TIQ derivátů

TIQ deriváty byly doposud detekovány a kvantifikovány nejen v lidské mozkové tkáni, ale také v mozkomíšním moku, plasmě a moči. Stejně tak byly prokázány u hlodavců a opic (Kohno, 1986; Kotake, 1995; Yamakawa, 1999; DeCuypere, 2008).

Například Sandler a kol. (1973) detekovali v moči parkinsoniků, léčených pomocí L-DOPA, TIQ derivát salsolinol (SAL). Roku 1986 pak Kohno a kol. potvrdili přítomnost 1,2,3,4-TIQ a 1-methyl-TIQ v krysí mozkové tkáni (Kohno, 1986), a to v množství 5-7 ng/g 1,2,3,4-TIQ a 1-3 ng/g 1-methyl-TIQ. Další studie pak stanovily následující TIQ deriváty také v lidské mozkové tkáni: 1,2,3,4-TIQ (Niwa, 1987; Ohta, 1987), 1-methyl-TIQ (Ohta, 1987) a *N*-methyl-salsolinol (Niwa, 1991). 1-benzyl-TIQ byl detekován v mozkomíšním moku pacientů trpících PD v třikrát větší koncentraci než u kontrolní skupiny pacientů s jinými neurologickými poruchami (Kotake, 1995). Ze skupiny TIQ derivátů přítomných v mozkové tkáni byla značná toxicita připisována zejména 1-benzyl-TIQ a SAL (Antkiewicz-Michaluk, 2014).

Na rozdíl od výše zmíněných neurotoxických látek, jiné TIQ deriváty vykazují aktivitu neuroprotektivní a zvažuje se jejich možný terapeutický účinek. Jedná se např. o 1-methyl-TIQ (Antkiewicz-Michaluk, 2011). Ten má schopnost předcházet příznakům parkinsonismu způsobených MPTP, TIQ nebo 1-benzyl-TIQ (Tasaki, 1991; Kotake, 1995). Na rozdíl od neurotoxických TIQ se jeho hladina při PD snižuje, a navíc klesá také s věkem (Ohta, 1987).

Množství TIQ derivátů se také běžně vyskytuje v potravinách. Makino a kol. potvrdili výskyt TIQ derivátů 1,2,3,4-TIQ a 1-methyl-TIQ v potravinách s vyšším obsahem fenylethylaminu – v kakau, sýru a víně (Makino, 1988). Další studií byl 1,2,3,4-TIQ prokázán také v mléce, banánech a vejcích (Niwa, 1989b).

2.1.2.3 Analýza TIQ derivátů

Široce používanou metodou pro analýzu TIQ derivátů je spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) (Sjöquist, 1985; Musshoff, 1993; Haber, 1995; Kotake, 1995). Dále se pro jejich kvantitativní stanovení využívá kapalinové chromatografie s elektrochemickou (Baum, 1994) a fluorometrickou detekcí (Inoue, 2008) a v posledních letech také kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) (DeCuyper, 2008; Sari, 2010; Kotake, 2014).

Ačkoliv metody kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí jsou velmi citlivé, jejich nedostatkem je nižší selektivita - schopnost identifikace konkrétního metabolitu v komplexních matricích. Metody založené na GC-MS pak nabízí nízké detekční limity společně s vyšší citlivostí a selektivitou. Na druhé straně pak stojí nevýhody jako např. nutnost derivatizace netěkavých látek a nižší reprodukovatelnost nástřiků. Použití LC-MS metod pak usnadňuje přípravu vzorků a analýzu, jelikož eliminuje nutnost derivatizace. Navíc se jedná o vysoce selektivní a citlivou analytickou techniku (Rojkovicova, 2008).

2.2 Neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění jsou charakterizována postupným zánikem specifických skupin neuronů, s čímž pak souvisí klinický obraz dané choroby (Golpich, 2017).

Jedná se o poměrně různorodou skupinu onemocnění, u které není zcela jednotná klasifikace. Mohou být děleny např. na základě primárních klinických projevů, oblasti neurodegenerativního poškození mozku, nebo molekulárně biologických příčin onemocnění. Jejich společným rysem bývá většinou změna a ukládání určitého specifického proteinu v mozkové tkáni (Dugger, 2017). Mezi nejběžnější onemocnění tohoto druhu patří zejména: amyloidózy, tauopatie, synukleinopatie a TDP-43 (transactivation response DNA binding protein 43) proteinopatie (Dugger, 2017).

V případě amyloidóz je typické hromadění amyloidu, peptidu o řetězci s 36 až 43 aminokyselinami (amyloid beta peptid, β -amyloid, amyloid B). Řadí se sem nejrozšířenější Alzheimerova choroba (Ghisso, 2002). Jako tauopatie (Lee, 2001) jsou označovány stavy, kdy dochází k patologickému hromadění proteinu tau, např. progresivní supranukleární obrna, nebo chronická traumatická encefalopatie. Synukleinopatie jsou charakteristické ukládáním proteinu alfa-synukleinu, jenž vytváří tzv. Lewyho tělíska. Mezi synukleinopatie se řadí Parkinsonova choroba, multisystémová atrofie nebo také demence s Lewyho tělisky (Dugger, 2017). TDP-43 je transaktivní DNA vázající protein o molární hmotnosti 43 kDa, jenž je hlavní složkou inklusí vyskytujících se v případě amyotrofické laterální sklerózy a frontotemporální lobární degenerace (Neumann, 2006).

Jelikož problematika TIQ derivátů zkoumaných v této práci souvisí úzce s PD, je další popis zaměřen právě na toto onemocnění.

2.2.1 Parkinsonova choroba

Jedná se o chronické, progresivní onemocnění, které výrazně snižuje kvalitu života pacientů. Jde o druhou nejčastější poruchu neurodegenerativního charakteru (Schwab, 2020), která postihuje všechny etnické skupiny, s průměrným nástupem nemoci mezi 60. a 70. rokem života (s výjimkou tzv. young-onset a juvenilních forem, u kterých je nástup časnější) (Lew, 2007). Mezi lety 1990 a 2016 byl zaznamenán více než dvojnásobný globální nárůst případů této choroby (Dorsey, 2018).

Mezi hlavní patologické znaky PD patří poškození nebo smrt dopaminergních neuronů ve struktuře bazálních ganglií, která se nazývá *substantia nigra*, s čímž souvisí snížená produkce neurotransmiteru DA (Yasuda, 2013). Dalším znakem je výskyt tzv. Lewyho tělísek (proteinových inklusí, tvořených zejména alfa-synukleinem) v neuronech (Shults, 2006).

Snížená hladina DA souvisí s typickými pohybovými poruchami PD jako jsou svalová ztuhlost, bradykineze (celkové zpomalení pohybů) a klidový třes (Yasuda, 2013). Později se objevují také problémy s chůzí, posturální nestabilita. Charakteristickým znakem PD (odlišujícím ji v rámci širší skupiny parkinsonských syndromů) je asymetrický nástup motorických symptomů a pozitivní odpověď na dopaminergní léčbu (Lew, 2007). S PD se pojí i neméně závažné symptomy nemotorické. Jedná se nejčastěji o kognitivní poruchy, poruchy spánku, čichu (hyposmie), deprese, ale také potíže gastrointestinální, aj. (Chaudhuri, 2009).

Příčiny vzniku PD dosud nejsou úplně vysvětleny. Obvykle je ve spojitosti s etiologií PD uváděn vliv stárnutí, genetických a environmentálních faktorů (např. neurotoxinů) (Lew, 2007). Významná role je přikládána neuronálním zánětlivým procesům (Hirsch, 2009), jež mohou být způsobeny hromaděním alfa-synukleinu, ale také narušením střevní mikroflóry. Studie Cassani a kol. (2015) prokázala, že se u pacientů trpících PD objevuje stav dysbiózy (tj. změna složení střevního mikrobiomu). Nejenže jsou střevní mikrobiom a enterický nervový systém důležitým zdrojem serotoninu a DA v lidském organismu (Martinucci, 2015), ale pravděpodobně mají také spojitost se zánětlivými procesy nervové tkáně v PD. Braak a kol. navrhli hypotézu, že proces patologického hromadění alfa-synukleinu začíná právě ve střevech, odkud se následně šíří do centrálního nervového systému (Braak, 2003).

Dále, vzhledem k vysokým energetickým nárokům nervové tkáně je pro ni zvláště nebezpečné poškození a dysfunkce mitochondrií, což může být také významný faktor v případech neurodegenerativních onemocnění (Golpich, 2017).

Diagnostika a léčba PD je velmi obtížná, jelikož první klinické symptomy se většinou objevují až ve chvíli, kdy je už minimálně 50% dopaminergních neuronů ztraceno (Ross, 2004). Jsou proto potřeba rané specifické markery PD, které by umožnily včasnou diagnózu a sledování průběhu nemoci (Schlossmacher, 2010). V současnosti je dostupná léčba PD většinou symptomatická, snaží se zmírnit příznaky choroby dodáním chybějícího DA nebo zvýšením jeho produkce. Nejčastěji používanou látkou je v tomto ohledu L-DOPA, která je schopná přejít přes BBB do mozku, kde je přeměněna na DA. Dále jsou používány inhibitory MAO, které inhibicí tohoto enzymu chrání endogenní DA před degradací (Schwab, 2020).

2.2.2 TIQ v etiologii Parkinsonovy choroby

Účinek TIQ derivátů, problematika jejich fyziologických funkcí v organismu a vztahu k neurodegeneraci je relativně komplexní. Jejich role v organismu není stále jednoznačně objasněna, a ačkoliv většina z těchto látek je spojována s MPTP (a jeho toxickým metabolitem MPP⁺), objevují se také důkazy o neuroprotektivních vlastnostech některých zástupců, jako např. 1-methyl-TIQ (shrnutí v Peana, 2019). Je pravděpodobné, že jejich biologické účinky a role v organismu závisí na mnoha různých faktorech, jako jsou např. stereoisomerie, dávka, biologická dostupnost a metabolismus (Kurnik-Łucka, 2018).

Zmiňovaný MPP⁺ působí jako selektivní dopaminergní neurotoxin: hromadí se v mitochondriích dopaminergních neuronů a inhibuje komplex I dýchacího řetězce, což má za následek snížení ATP a zvýšenou tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů (Nicklas, 1985; Hasegawa, 1990). Zásadní pro toxicitu MPP⁺ je přítomnost N-methylové skupiny (Bradbury, 1985).

Předpokládá se, že většina TIQ derivátů (s výjimkou 1-benzyl-TIQ a zástupců odvozených od DA, jako např. SAL) jsou bioaktivní látky, ale ve své základní formě a běžné míře vystavení, nevykazují neurotoxické vlastnosti. Naproti tomu, jejich oxidované formy, TIQ⁺ kationty se strukturou i vlastnostmi podobají MPP⁺, ačkoliv je míra jejich toxicity nižší a jsou také méně selektivní (Herraiz, 2016).

Co se týče SAL a 1-benzyl-TIQ, bylo navrženo, že hlavním důvodem jejich toxicity je především oxidativní poškození skrze produkci kyslíkových radikálů (Herraiz, 2016). V případě SAL bylo také prokázáno, že inhibuje klíčový enzym biosyntézy katecholaminů – tyrosinhydroxylasu (TH) (Weiner, 1978; Minami, 1992).

Vzhledem k tomu, že k přeměně MPTP v potentní neurotoxin je důležitá metabolická aktivace, existuje předpoklad, že by obdobně také TIQ deriváty mohly zvyšovat svoji toxicitu po N-methylaci a oxidaci (Nagatsu, 1997). Oxidace N-methylových TIQ derivátů na N-methylisochinolinové ionty zvýšila jejich schopnost inhibovat komplex I dýchacího řetězce (Morikawa, 1998), prokázána byla také inhibice komplexu II. Maruyama a kol. při

zkoumání mozkomíšního moku neléčených parkinsoniků zjistili, že hladina (*R*)-enantiomeru NMS byla významně vyšší než u kontrolní skupiny (Maruyama, 1996). Cytotoxicita NMS vůči dopaminovým neuronům byla prokázána ve studiích na zvířecím modelu, kdy NMS vyvolal příznaky parkinsonismu (Naoi, 1996b). Mechanismus buněčné smrti byl studován na buněčné linii SH-SY5Y lidského dopaminergního neuroblastomu (Maruyama, 1997a; Akao, 1999). Také byl potvrzen výskyt a akumulace oxidačního produktu NMS 1,2-dimethyl-6,7-dihydroisochinolinového iontu v oblasti *substantia nigra* (Maruyama, 1997a; Maruyama, 1997b). Dále byla v likvoru potvrzena zvýšená koncentrace (trojnásobná oproti kontrolní skupině) 1-benzyl-TIQ (Kotake, 1995). Literatura popisující účinky SAL je rozsáhlá, výsledky studií ovšem nejsou jednotné. Storch a kol. například potvrdili toxicitu SAL pro dopaminové neurony formou poškození mitochondrií, v jejich případě ale došlo k inhibici komplexu II, nikoliv komplexu I (Storch, 2000).

V souvislosti s uvedenými nálezy a poznatky, jsou TIQ deriváty považovány za potencionální biomarkery v diagnostice PD. S ohledem na nízké koncentrace TIQ v lidských tkáních a tělních tekutinách (v řádech ng/g ve tkáních, resp. pg/ml - ng/ml v tělních tekutinách) (Niwa, 1987; Ohta, 1987; Niwa, 1989a; Kotake, 1995; DeCuypere, 2008) je důležitý vývoj přesných a vysoce citlivých bioanalytických metod pro jejich kvantitativní stanovení a další studium.

2.3 Validace bioanalytických metod

Bioanalýza a bioanalytické metody hrají důležitou roli v mnoha vědeckých disciplínách, jako např. ve vývoji léků, dopingové kontrole, forenzní analýze nebo stanovení biomarkerů při diagnostice různých chorob. Bioanalýza zahrnuje identifikaci a kvantifikaci analytu v biologických vzorcích (např. v krvi, plazmě, séru, slinách, moči, aj.). Pro správné kvantitativní stanovení zkoumaného analytu v biologickém vzorku je validace použité analytické metody zásadní (Moein, 2017).

Validace bioanalytické metody je definována jako prokázání, že tato metoda je vhodná k zamýšlenému účelu a poskytuje tak věrohodné výsledky. Ověřuje se, že je úroveň měření dostatečná, postupy korektní a je řádně provedena kalibrace (Friedecký, 2011). Základní požadavky a kritéria pro provádění validace bioanalytických metod formulovaly agentury EMA (European Medicines Agency) a FDA (The Food and Drug Administration). Obě tyto organizace vydaly své návody – EMA vydala Guideline on bioanalytical method validation (EMA, 2019) a FDA vydala Bioanalytical method validation – Guidance for industry (FDA, 2018), přičemž ani jeden z těchto dokumentů není právně závazný, mají spíše formu doporučení. Obě agentury se obecně v rozsahu a průběhu validace shodují, existují ovšem mírné odchylky v metodice a akceptačních kritériích (Kaza, 2019).

Obvykle je validovanou metodou měřen jeden analyt, ovšem v některých případech může být vhodné stanovení více látek, např. výchozí látky a jejích metabolitů, nebo různých izomerů jedné látky (EMA, 2019).

Validace se dělí na plnou (kompletní), částečnou a tzv. cross validaci. Pokud je do praxe zaváděna nová metoda, je nutné provést plnou validaci. Ta by v případě chromatografických metod měla zahrnovat následující parametry: selektivitu, specifitu, matricové efekty, linearitu, měřicí rozsah, přesnost, správnost, stabilitu, carry-over, integritu ředění a reprodukovatelnost nástřiku (EMA, 2019).

Nové modifikace plně validované metody jsou posuzovány částečnou validací. Rozsah částečné validace záleží na míře a charakteru provedených změn. Podle doporučení EMA je částečná validace považována za úspěšnou, pokud testované parametry splňují kritéria pro plnou validaci – v opačném případě je nutné další přezkoumání.

Při srovnávání dat získaných pomocí dvou různých metod, nebo pomocí stejné metody aplikované v různých laboratořích se využívá tzv. cross validace.

Postup validace se liší podle druhu validované metody. Informace uvedené v doporučeních EMA a FDA se vztahují především k chromatografickým metodám a tzv. ligand binding assays. Ultraúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UPLC-MS/MS) patří díky své vysoké sensitivitě a specifitě mezi velmi často využívané analytické metody (Moein, 2017). Jelikož bylo v experimentální části této práce využito UPLC-MS/MS, další popis validačních parametrů se bude vztahovat k tomuto typu metod.

2.3.1 Správnost a přesnost měření

Správnost metody udává, jak blízké jsou naměřené hodnoty koncentrací skutečným hodnotám. Přesnost je pak míra shody výsledků v rámci několika sérií měření. Je vyjádřena v procentech jako variační koeficient, nebo relativní směrodatná odchylka. Přesnost a správnost měření se vyhodnocuje na základě analýzy tzv. quality control (QC) vzorků v rámci série a mezi různými sériemi. Tyto vzorky obsahují známou koncentraci analytu, měly by napodobovat studované vzorky a také být uchovávány za stejných podmínek (EMA, 2019).

Během validace se QC vzorky připravují v těchto 4 koncentracích:

- LLOQ (lower limit of quantification) – spodní mez kvantifikace
- LQC vzorek (low quality control) – trojnásobek koncentrace LLOQ
- MQC vzorek (medium quality control) – v 30-50 % rozsahu kalibrační křivky
- HQC vzorek (high quality control) – minimálně 75 % ULOQ (upper limit of quantification)

Ke všem kalibračním standardům, QC vzorkům a testovaným vzorkům by se měly přidávat vhodné interní standardy (IS) – to mohou být například strukturní analogy analytů nebo stabilní isotopově značené analyty. Koncentrace těchto látek je předem daná a stálá, čímž je umožněna kvantifikace cílového analytu. Pokud daná metoda využívá detekci pomocí hmotnostní spektrometrie, je vhodné použití isotopově značených analytů. Ty musí mít vysokou čistotu a nesmí u nich docházet ke změně isotopového složení (EMA, 2019).

Akceptační kritéria správnosti na každé hladině jsou $\pm 15\%$ nominálních hodnot koncentrací, s výjimkou LLOQ, kde je kritérium $\pm 20\%$. U přesnosti by pak hodnoty variačního koeficientu neměly překročit $\pm 15\%$, resp. $\pm 20\%$ na hladině LLOQ (EMA, 2019).

2.3.2 Linearita

Linearita vyjadřuje schopnost metody produkovat signál, který je přímo úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Doporučuje se testování na minimálně 6 koncentračních hladinách kalibračních standardů spolu s měřením slepého vzorku (blanku) a nulového vzorku, což je vzorek matrice s přidaným IS (Kadian, 2016).

Kalibrační standardy by měly být v případě bioanalytických metod připraveny přidáním známého množství analytu do matrice, která by měla být stejná jako v případě analyzovaných vzorků. Kalibrační standardy pokrývají rozsah kalibrační křivky a předpokládaný rozsah měřených koncentrací analytu. Pokud vzorky obsahují více než jeden analyt, měla by pro každý z nich být připravena kalibrační křivka. Nulové a slepé vzorky slouží pouze ke zhodnocení případných interferencí, do kalibrační křivky by zahrnuty být neměly (EMA, 2019).

Měřicí rozsah kalibrační křivky je určen spodním limitem LLOQ a horním limitem ULOQ. Termín LLOQ je definován jako nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která může být danou metodou kvantitativně změřena s přijatelnou správností a přesností. ULOQ je pak nejvyšší koncentrace analytu ve vzorku, která může být takto změřena.

Při zpětném výpočtu koncentrací kalibračních standardů by správnost měla být v rozmezí $\pm 20\%$ jejich nominální hodnoty v případě LLOQ a $\pm 15\%$ na ostatních hladinách. Tuto podmínku musí splňovat minimálně 75 % všech kalibračních standardů na minimálně 6 hladinách (EMA, 2019).

2.3.3 Selektivita

Selektivita je schopnost analytické metody rozlišit a kvantitativně změřit analyt i v přítomnosti interferujících látek. Selektivita metody je testována srovnáním odezvy analytu ve vzorku na hladině LLOQ a odezvy slepých vzorků (blanků) pocházejících z minimálně 6 různých zdrojů. Selektivita pro IS by taktéž měla být stanovena.

Testování by mělo prokázat, že v retenčním čase analytu nemají interferující látky žádnou významnou odezvu (tj. menší než 20% odezvy analytu na hladině LLOQ a méně než 5% odezvy IS v LLOQ) (EMA, 2019).

2.3.4 Specificita

Specificita popisuje schopnost metody detekovat analyt a rozlišit ho od jiných látek (např. látky strukturně podobné analytu, jeho metabolity, součásti matrice, nečistoty), resp. schopnost měřit pouze signál analytu a žádné jiné látky (Kollipara, 2011).

U potenciálně nestabilních analytů by také měla být zohledněna a zhodnocena možnost zpětné konverze metabolitu v původní analyt (EMA, 2019).

2.3.5 Matricové efekty

Matricové efekty představují zásadní problém při použití metod založených na LC-MS, jelikož mohou způsobit zvýšení nebo naopak snížení míry ionizace, což negativně ovlivňuje přesnost a správnost měření. Potlačení ionizace analytu mohou zapříčinit látky obsažené v biologických matricích jako např. soli, proteiny, fosfolipidy, aj. (Moein, 2017).

Dle doporučení EMA by tento parametr měl být testován pomocí minimálně 3 replikátů vzorků LQC a HQC za použití matric pocházejících z minimálně 6 různých zdrojů. Tyto matrice by se neměly za účelem testování spojovat, ale měly by být analyzovány samostatně (EMA, 2019).

2.3.6 Carry-over

Carry-over efekt je způsoben přítomností zbytkového množství analytu předchozích vzorků (především těch obsahujících vysokou koncentraci analytu) (Kadian, 2016). Případný vliv tohoto efektu by měl být posouzen na základě analýzy ULOQ kalibračního standardu a následného měření slepých vzorků (EMA, 2019).

2.3.7 Integrita ředění

Při validaci by mělo být také zajištěno, že ředění vzorků nemá vliv na přesnost a správnost validované metody (EMA, 2019). Hodnotí se schopnost metody podat spolehlivé výsledky i u vzorků s koncentrací vyšší než ULOQ nebo naopak při analýzách vzorků o nižším objemu (Kollipara, 2011).

2.3.8 Reprodukovatelnost nástřiku

Reprodukovatelnost metody bývá většinou hodnocena v rámci stanovení přesnosti a správnosti. Pokud se ale předpokládá možnost opětovného nástřiku vzorků (např. kvůli poruše přístroje), měla by být také stanovena reprodukovatelnost nástřiku (EMA, 2019).

2.3.9 Stabilita

Jelikož se bakalářská práce zabývá testováním stability studovaných látek, bude tento parametr rozepsán podrobněji. Stanovení stability je během validace bioanalytických metod důležitým krokem (Kollipara, 2011). Při zkoumání tohoto parametru se hodnotí, zda jakýkoliv krok během procesu přípravy vzorků, jejich zpracování, analýzy a skladování neovlivňuje výsledné hodnoty koncentrace analytu, resp. jestli během těchto procesů nedochází u analytu k degradaci (EMA, 2019).

Mezi faktory ovlivňující stabilitu analytu patří světlo, teplota, pH, oxidace nebo působení enzymů (Briscoe, 2009). V případě některých látek je na základě struktury možné nestabilitu odhadnout předem, jako např. u esterové skupiny, thiolových nebo katecholových derivátů (Li, 2011). Je známo, že mnohé alkoholy, fenoly a jejich metabolity podléhají oxidační degradaci, a to působením kyslíku, nebo zásaditého prostředí (Dell, 2004). V této souvislosti byla pozornost věnovaná také studiu stability katecholaminů (Thorré, 1997; Goldstein, 2014). Bylo prokázáno, že DA a jeho metabolity obsahující dvě hydroxylové skupiny mohou být *in vivo* snadno autooxidovány na jejich chinonové, značně reaktivní formy (Asanuma, 2003). Tyto molekuly vykazují vysokou cytotoxicitu na dopaminergních neuronech a mohou tak nevratně poškozovat funkci proteinů tvorbou 5-cysteiny-katecholů. Podobná reaktivita katecholaminů a jejich derivátů se předpokládá také u látek bez biologické matrice.

Obě organizace, EMA i FDA, formulují svá doporučení k provádění validace parametru stability. Postoj agentur EMA a FDA je v zásadě podobný - obě agentury navrhuje, aby prováděné stabilitní testy odrážely situace a podmínky, které v průběhu manipulace se vzorky a analýzy vzorků pravděpodobně nastanou (EMA, 2019; FDA, 2018).

Stanovení stability analytu v dané matici se provádí pomocí QC vzorků. Alikvoty těchto vzorků se analyzují ihned po přípravě (v „čase nula“) a poté po aplikaci zkoumaných podmínek, přičemž v každém čase pro každou testovanou podmínku a koncentraci je třeba připravit minimálně tři QC vzorky (triplikáty). Výsledky analýzy těchto vzorků jsou srovnány s kalibrační křivkou, která by měla být čerstvě připravena (EMA, 2019). V případě, že se ve zkoumaných vzorcích vyskytuje více různých analytů, pak by stabilitní testy měly být provedeny s roztokem obsahujícím veškeré analyty (EMA, 2019).

V rámci stabilitních testů doporučených agenturou EMA se zjišťuje:

- *Stabilita zásobních a pracovních roztoků analytů a IS* – na základě analýzy nejnižší a nejvyšší koncentrace všech těchto roztoků. Hodnotí se stálost roztoků za podmínek uskladnění. Pokud se jejich stabilita v závislosti na koncentraci mění, pak je nutné stabilitu vyhodnotit na všech koncentračních hladinách.
- *Stabilita analytu při cyklech zmrazování a tání* – hodnotí se dopad minimálně 3 cyklů zmrazení a rozmrazení na stabilitu QC vzorků. Doba zamrazení mezi každým cyklem by měla být minimálně 12 hodin.
- *Stabilita látek při manipulaci se vzorkem a v průběhu jeho analýzy* – hodnotí se dopad manipulace se vzorkem na laboratorním stole před analýzou a v průběhu analýzy vzorku.
- *Krátkodobá stabilita analytu na matrici* – testování QC vzorků, které jsou po rozmrazení uchovávány při daných laboratorních podmínkách.
- *Dlouhodobá stabilita analytu na matrici* – hodnotí se stálost QC vzorků uskladněných v mrazáku (za stejných podmínek a přinejmenším po stejnou dobu jako vzorky ve studii). U malých molekul (tzv. chemical drugs) je možné stanovenou stabilitu při jedné teplotě předpokládat i pro teploty nižší. U větších molekul (tzv. biological drugs, např. proteiny, peptidy) se doporučuje stabilitu stanovit u 2 krajních teplot určitého intervalu, čímž je pak potvrzena stabilita i uvnitř tohoto intervalu.

Ve srovnání s výše zmíněnými body, se doporučení FDA mírně liší. Ve svém Guidance for Industry například zmiňuje pouze testování roztoků zásobních, a nikoliv těch pracovních nebo IS. FDA také doporučuje stanovení stability v autosampleru, pokud toto není pokryto stabilitou v průběhu analýzy vzorku. Co se týče dlouhodobé stability, je dle návodu FDA možné vztáhnout stabilitu stanovenou při -20 °C na všechny nižší teploty.

V rámci bakalářské práce byla studována stabilita 5 analytů za podmínek, které simulovaly manipulaci se vzorkem na laboratorním stole před UPLC-MS/MS analýzou a v průběhu analýzy vzorku a bylo testováno jeho možné dlouhodobé uskladnění před analýzou. Vzorky byly připraveny do roztoků, jejichž složení odpovídá rozpouštědлу použitému pro přípravu vzorků pro UPLC-MS/MS analýzu. Testované podmínky v těchto experimentech nezohledňovaly vliv biologické matrice vzorku, ale vliv pH, světla a teploty na stabilitu zkoumaných látek.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení a materiál

Analytická kolona: ACQUITY UPLC HSS T3 Column 1,8 µm; 2,1 mm × 100 mm (Waters)

Analytické laboratorní váhy (Sartorius Weighing Technology)

Automatické pipety (Eppendorf)

Hlubokomrazicí box –20 °C (Whirlpool)

Hlubokomrazicí box –80 °C (Sanyo)

Třepačka Wizard Advanced IR Vortex Mixer (Velp Scientifica)

Ultra-účinný kapalinový chromatograf (Acquity UPLC™, Waters) ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (Xevo TQ MS, Waters MS Technologies)

Zařízení na úpravu vody Direct-Q®3UV (Millipore)

Laboratorní sklo a plast:

Kádinky, odměrné baňky, odměrné válce a plastové mikrozkuřavky (VWR)

Skleněné vialky s inserty, plastová víčka, septa PTFE (polytetrafluoroethylen)/silikon (Labicom)

3.2 Použité chemikálie

Acetonitril (gradient grade for liquid chromatography, Merck)

Kyselina mravenčí (p.a., Honeywell Fluka)

Kyselina chlorovodíková (p.a., Lach-Ner)

Redestilovaná voda (Ultrapure type 1 water, Millipore)

Testované látky:

Dopamin hydrochlorid (≥ 97.5 %, Sigma-Aldrich)

Levodopa (≥ 98 %, Sigma-Aldrich)

N-methyl-salsolinol hydrobromid (≥ 95 %, Santa Cruz Biotechnology)

Salsolinol hydrobromid (≥ 96 %, Sigma-Aldrich)

Salsolinol-1-karboxylová kyselina (HPLC čistota výrobcem neuvedena, Santa Cruz Biotechnology)

Izotopicky značené interní standardy (IS):

D₃-levodopa (98 % D, CDN Isotopes)

D₄-dopamin (98 % D, CDN Isotopes)

3.3 Metody

V experimentální části této práce byla hodnocena krátkodobá stabilita včetně po sobě jdoucích cyklů rozmrazování a dlouhodobá stabilita TIQ derivátů (SAL, NMS, SCA). Do studie byly také dále zařazeny vybrané prekursory (L-DOPA, DA) (Tab.1). Stabilita těchto analytů byla testována v čistém rozpouštědle, bez vlivu biologické matrice. Kvantifikace látek byla provedena za použití isotopově značených standardů. Popisovaný zvolený postup a provedení validačních testů vycházel z doporučení EMA (EMA, 2019).

V rámci provedené studie byla stabilita látek za zvolených podmínek ověřena na koncentračních hladinách MQC a HQC.

3.3.1 Příprava roztoků

V průběhu experimentů byly používány roztoky s označením I, II a III o různém pH za účelem zjištění vlivu okyselení roztoku na stabilitu analytů.

Roztok I: 1% acetonitril ve vodě

Roztok II: 1% acetonitril ve vodě okyselen 0,1% kyselinou mravenčí

Roztok III: 1% acetonitril ve vodě okyselen 1% kyselinou mravenčí

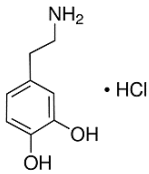
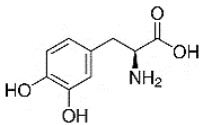
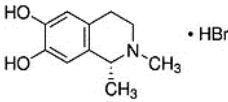
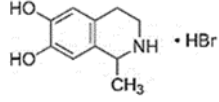
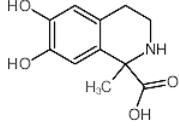
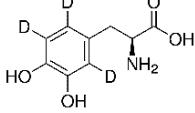
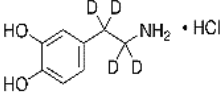
Příprava standardů testovaných látek (MIX-5-US):

Neznačené standardy (unlabelled standards, US) byly naváženy a rozpuštěny v daných rozpouštědlech tak, aby výchozí koncentrace každého US byla 1×10^{-2} mol/l. Směs těchto 5 standardů byla dále ředěna roztoky I, II a III do koncentrační řady 1×10^{-3} - 1×10^{-7} mol/l – 3 sady US v roztocích I, II nebo III (Tab.2).

Příprava zásobního roztoku izotopicky značených interních standardů (MIX-2-IS):

Výchozí koncentrace roztoků D₃-levodopy (D₃-L-DOPA) i D₄-dopaminu (D₄-DA) byla 1×10^{-2} mol/l. Ty byly následně ředěny roztoky I, II a III do koncentrační řady 1×10^{-3} - 1×10^{-6} mol/l (Tab.3). Výsledné látkové množství každého IS v nástriku bylo 1 pmol.

Tab.1 Struktury a molární hmotnosti analytů a jejich isotopově značených standardů
(ve formě dodané výrobcem)

Název látky	Zkratka	Molární hmotnost	Struktura
Dopamin hydrochlorid	DA . HCl	189,64	
Levodopa	L-DOPA	197,19	
N-methyl-salsolinol hydrobromid	NMS . HBr	274,15	
Salsolinol hydrobromid	SAL . HBr	260,13	
Salsolinol-1-karboxylová kyselina	SCA	223,23	
D₃-levodopa	D ₃ -L-DOPA	200,21	
D₄-dopamin	D ₄ -DA . HCl	193,67	

Tab.2 Schéma ředění US

Roztok US	Jednotlivé US (DA, L-DOPA, NMS,SAL, SCA)	MIX-5-US	MIX-5-US	MIX-5-US	MIX-5-US
Výchozí konc. [mol/l]	1×10^{-2}	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-6}
Požadovaná konc. MIX-5-US [mol/l]	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-6}	1×10^{-7}
Celkový objem [μl]	100	100	100	100	100
Pipetovaný objem roztoku I, II nebo III [μl]	90	90	90	90	90
Pipetovaný objem US [μl]	10	10	10	10	10

Tab.3 Schéma ředění IS

Roztok IS	D ₃ -L-DOPA	D ₄ -DA	MIX-2-IS	MIX-2-IS	MIX-2-IS
Výchozí konc. [mol/l]	1×10^{-2}	1×10^{-2}	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}
Požadovaná konc. MIX-2-IS [mol/l]	1×10^{-3}		1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-6}
Celkový objem [μl]	100		100	300	100
Pipetovaný objem roztoku I, II nebo III [μl]	80		90	270	90
Pipetovaný objem IS [μl]	10	10	10	30	10

3.3.2 Příprava QC vzorků a kalibrační křivky

Všechny QC vzorky byly připravovány v technických triplikátech, do tří testovaných roztoků I, II, III (Tab.4).

Vzorky na hladině MQC obsahovaly 30 pmol každého US a 1 pmol každého IS v nástřiku. Do vialek bylo napipetováno 30 μl MIX-5-US o koncentraci 1×10^{-4} mol/l, 10 μl MIX-2-IS o koncentraci 1×10^{-5} mol/l a doplněno 60 μl roztoku I, II, nebo III na celkový objem 100 μl (3 sady MQC vzorků).

Vzorky na hladině HQC obsahovaly 50 pmol každého US a 1 pmol každého IS v nástřiku. Do vialek bylo napipetováno 50 μl MIX-5-US o koncentraci 1×10^{-4} mol/l, 10 μl MIX-2-IS o koncentraci 1×10^{-5} mol/l a doplněno 40 μl roztoku I, II, nebo III na celkový objem 100 μl (3 sady HQC vzorků).

Tab.4 Příprava QC vzorků

Výchozí roztoky a jejich objemy			
	MIX-5-US 1×10^{-4} mol/l [μl]	MIX-2-IS 1×10^{-5} mol/l [μl]	Roztok I (II nebo III) [μl]
MQC	30	10	60
HQC	50	10	40

Kalibrační křivka byla připravena jako sedmibodová (resp. osmibodová v případě testu stability během 3 cyklů rozmrazování) pro každý z roztoků I, II, III. Jednotlivé body byly: 0,05 pmol; 0,1 pmol; 0,5 pmol; 1 pmol; 5 pmol; 10 pmol; 50 pmol (a 100 pmol) MIX-5-US/ 1pmol MIX-2-IS na 10 μl nástřiku.

Do skleněných vialek byl napipetován příslušný objem MIX-5-US, poté 10 μl MIX-2-IS a doplněno do objemu 100 μl roztoky I, II nebo III (viz Tab.5). Kalibrační křivka byla připravována vždy čerstvá, pro každý typ experimentu.

Tab.5 Příprava kalibrační křivky

Výchozí roztoky a jejich objemy						
Kalibrační bod (V= 100 µl)	MIX-5-US 1×10 ⁻⁴ mol/l [µl]	MIX-5-US 1×10 ⁻⁵ mol/l [µl]	MIX-5-US 1×10 ⁻⁶ mol/l [µl]	MIX-5-US 1×10 ⁻⁷ mol/l [µl]	MIX-2-IS 1×10 ⁻⁶ mol/l [µl]	Roztok I (II nebo III) [µl]
1	-	-	-	5	10	85
2	-	-	1	-	10	89
3	-	-	5	-	10	85
4	-	1	-	-	10	89
5	-	5	-	-	10	85
6	-	10	-	-	10	80
7	5	-	-	-	10	85
(8)	10	-	-	-	10	80

3.3.3 Stabilitní testy

- *Test krátkodobé stability analytů*

Cílem tohoto testu bylo zmapovat míru stability standardů během standardních podmínek nakládání se vzorkem v laboratorních podmínkách – tj. jaký vliv mají na jejich stabilitu faktory jako změna teploty, světlo a délka vystavení těmto podmínkám.

Pro každý z testovaných roztoků I, II a III byla připravena a analyzována sedmibodová kalibrační křivka. V rámci experimentu byly připraveny tři sady vzorků (čas 0, AT - autosampler temperature, RT - room temperature) na dvou hladinách (MQC, HQC), všechny v technických triplicátech. Sada vzorků „čas 0“ byla analyzována ihned po přidavku směsi MIX-2-IS do vialky, současně s body kalibrační křivky.

Sady vzorků AT a RT byly připraveny a uskladněny bez přidavku směsi MIX-2-IS. Během uskladnění byly látky vystaveny testovaným podmínkám a změřeny v čase po 24 hodinách (sada vzorků „24 hod“) a 48 hodinách (sada vzorků „48 hod“). Směs MIX-2-IS byla uchovávána v mrazáku při -80 °C a byla do vzorků vždy přidána před samotnou UPLC-MS/MS analýzou:

- Vzorky AT byly připraveny do tmavých vialek a ihned po přípravě byly umístěny do lednice (4 °C). Tyto podmínky odpovídaly umístění vzorku do autosampleru UPLC-MS/MS při analýze sady vzorků.

- Vzorky RT byly umístěny do světlých skleněných vial a ponechány na laboratorním stole za pokojové teploty až do doby analýzy na UPLC-MS/MS.

Jako blanky byly použity čisté roztoky I, II, III bez přídavku MIX-5-US a MIX-2-IS, které byly uskladněny a analyzovány za identických UPLC-MS/MS podmínek jako sady vzorků.

- *Test dlouhodobé stability analytů*

Tento test by měl poskytnout informace o podmínkách, v jakých mohou být látky dlouhodobě skladovány před UPLC-MS/MS analýzou, aniž by došlo k jejich degradaci.

Pro tento experiment byly připraveny dvě sady vzorků, z nichž první byla po přípravě do skleněných vial uskladněna v -20 °C (sada vzorků „-20 °C“) a druhá v -80 °C (sada vzorků „-80 °C“). Každá ze sady obsahovala látky na dvou hladinách (MQC, HQC). Vzorky byly připraveny jako MIX-5-US v příslušných objemech a různých testovaných solventech (I-III) (Tab.2, 3, 4). Každá z testované koncentrace byla připravena v triplicátu. Vzorky byly následně měřeny po 5 týdnech skladování, s použitím čerstvě připravené kalibrační křivky. K rozmrazeným vzorkům MIX-5-US (v roztocích I-III) byly před UPLC-MS/MS analýzou přidány interní standardy (MIX-2-IS) o příslušné koncentraci a roztoky I, II nebo III v příslušných objemech. Jako blanky byly použity čisté roztoky I, II, III vystavené stejným skladovacím podmínkám jako vzorky a byly analyzovány za identických podmínek společně se vzorky a kalibrační křivkou.

- *Test stability analytů během 3 cyklů rozmrazování*

Účelem tohoto experimentu bylo stanovit vliv opakovaného rozmrazování na stabilitu analytů. Stabilita látek byla testována při 3 cyklech zmrazení a rozmrazení. Mezi každým cyklem byly vzorky pokaždé zmrazeny po dobu 24 hodin, než byly opětovně rozmrazeny a analyzovány.

Vzorky byly připraveny na koncentračních hladinách MQC a HQC, pro všechny roztoky I, II, III, a to celkem ve 4 sadách („cyklus 0“, „cyklus 1“, „cyklus 2“, „cyklus 3“). V tomto experimentu byly vzorky mezi jednotlivými testovanými cykly zamrazeny a uchovávány v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.

Do 1. sady vzorků („cyklus 0“) obsahující MIX-5-US a roztoky I, II nebo III byl přidán MIX-2-IS podle Tab.4 a tato sada byla následně změřena, bez vystavení analytů cyklu zmrazování a rozmrazování. Společně s touto sadou byla také připravena a proměřena kalibrační křivka v roztocích I-III (Tab.5). Ostatní vzorky (2., 3. a 4. sada) byly uloženy do hlubokomrazícího boxu (-80 °C).

Všechny vzorky 2., 3. a 4. sady byly následně po 24 hodinách z boxu vyjmuty, rozmrazeny, a do sady č.2 byl přidán MIX-2-IS podle Tab.4 a následně byla tato sada změřena na UPLC-MS/MS („cyklus 1“). Ostatní vzorky (3. a 4. sada) byly po úplném

rozmrazení opět vráceny zpět do hlubokomrazícího boxu. Po 24 hodinách byly sady č. 3 a 4 rozmrazeny, do 3. sady vzorků byl přidán MIX-2-IS a následně byla tato sada změřena („cyklus 2“). Vzorky sady č. 4 byly po úplném rozmrazení znovu vráceny zpět do hlubokomrazícího boxu. Po dalších 24 hodinách byla rozmrazena poslední sada č. 4, do vzorků byl přidán MIX-2-IS a následně byla tato sada změřena („cyklus 3“).

3.3.4 Analýza vzorků pomocí UPLC-MS/MS

Po aplikaci výše popsaných podmínek jednotlivých testů byly vzorky spolu s kalibračními standardy a blanky analyzovány pomocí UPLC-MS/MS. Metodika analýzy byla vyvinuta vedoucí práce, proto ji dále nepopisuji. Měření vzorků a přípravě analýz jsem byla ovšem pokaždé přítomna a v jejich průběhu jsem si osvojila základní principy této metody a obsluhu konkrétního přístroje UPLC-MS/MS (příprava/doplnění mobilní fáze, instalace a kondicionace kolony a předkolony, práce v programu MassLynx™ (Waters) - kontrola průtoku a tlaku na koloně, příprava seznamu vzorků, spouštění analýz). Získaná data byla vedoucí zpracována v programu TargetLynx™ (Waters) a převedena do tabulkového procesoru Microsoft Excel, kde jsem je poté sama zpracovala a převedla do grafů, které dále uvádím.

4 VÝSLEDKY

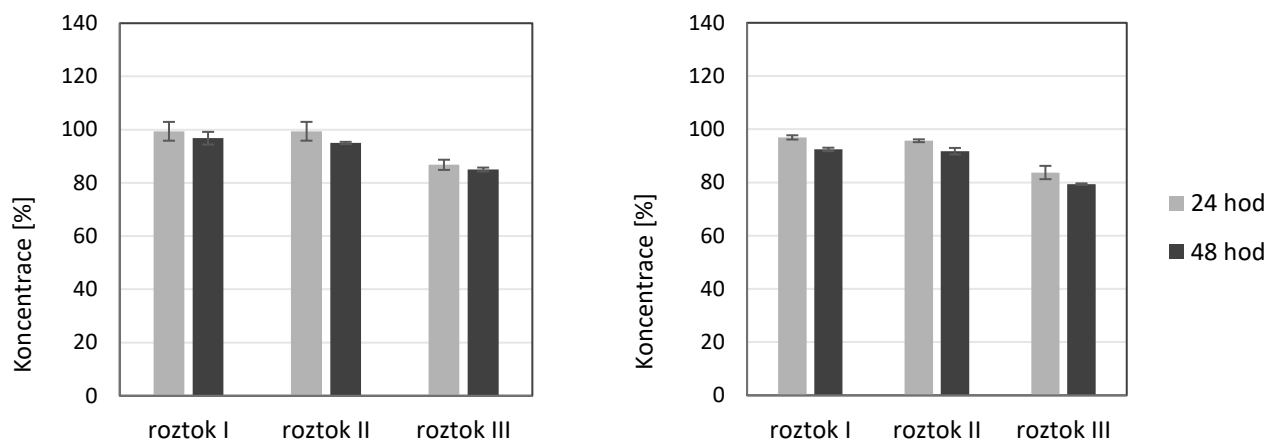
Změřené koncentrace testovaných látek ve vzorcích po aplikaci daných podmínek byly vztaženy ke koncentraci IS, které byly pokaždé přidány až před analýzou vzorků a nebyly tudíž ovlivněny podmínkami testů. Uváděné hodnoty v tabulce a grafech jsou procentuální koncentrace testované látky ve vzorku vztažené ke zvolenému IS s vyjádřením standardní směrodatné odchylky (SD) vypočtené z triplikátů testovaných vzorků.

4.1 Test krátkodobé stability

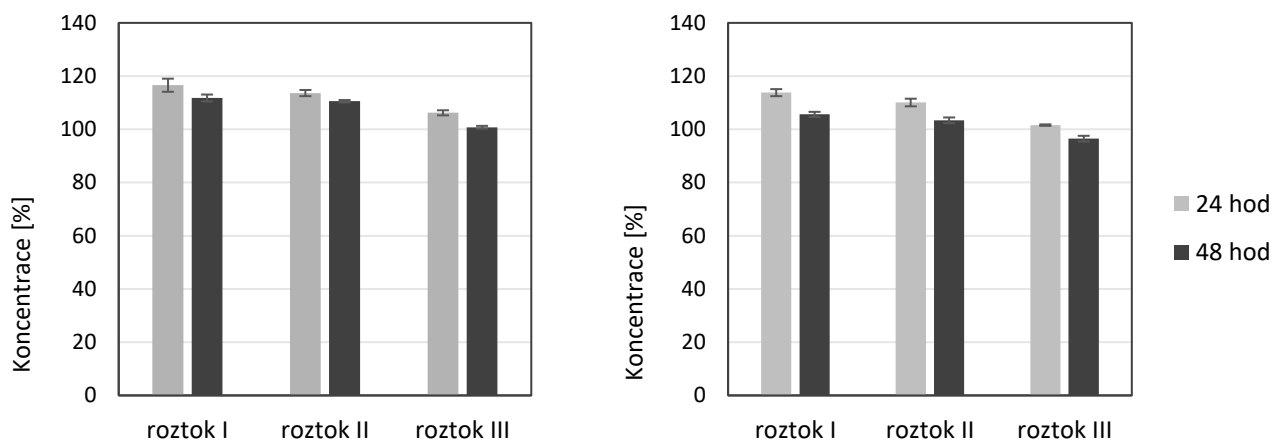
Sada vzorků RT byla v tomto testu vystavena působení světla a pokojové teploty, druhá sada AT byla skladována ve tmě a při teplotě 4 °C. Po 24 hodinách a 48 hodinách působení podmínek byly vzorky analyzovány. Výsledky jsou prezentovány v grafech (Obr.4 - 13).

Ze srovnání AT a RT hodnot v rámci MQC nebo HQC hladin u každé látky lze vyvodit, že rozdíl mezi těmito sadami byl minimální a výsledky se shodují pro obě testované koncentrace. Rozdíl mezi hodnotami naměřenými v čase 24 hod a 48 hod u všech látek na obou hladinách byl taktéž nepatrný. Z toho vyplývá, že vystavení látek světlu, skladování vzorku při pokojové teplotě ani délka působení těchto podmínek neměly zásadní vliv na stabilitu testovaných standardů. Testované látky vykazovaly stabilitu po celou dobu provádění testu.

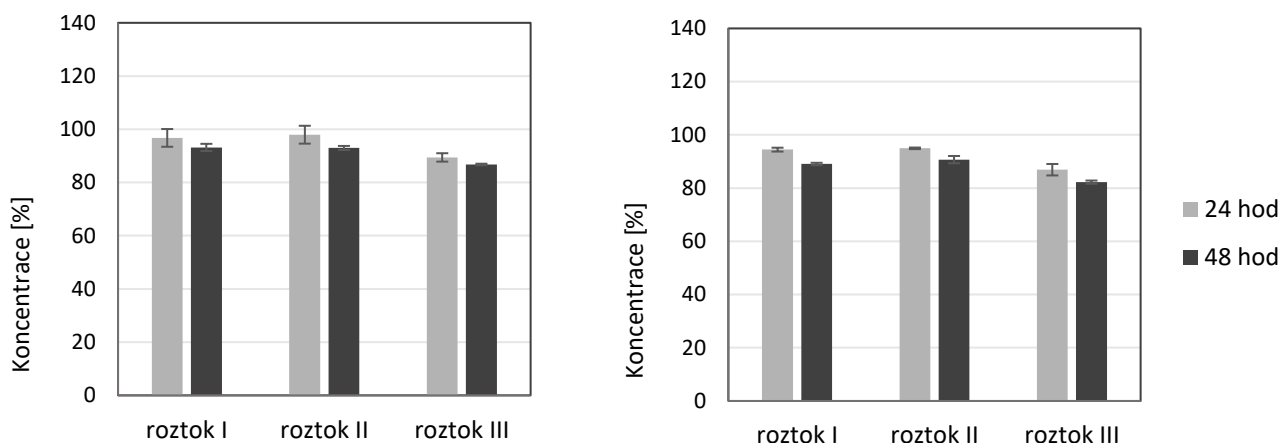
Zkoumaný analyt SAL v roztoku III vykazoval na hladině MQC mírný pokles koncentrace (přibližně na 80-85 %), ten byl ale pozorován u obou sad AT i RT, v době po 24 i 48 hodinách, navíc podobný trend není potvrzen u HQC vzorků vystavených stejným podmínkám. Podobnou tendenci lze sledovat i u ostatních MQC vzorků analytů, kde došlo k mírné degradaci, jež se nevyskytuje na hladině HQC. V případě SCA byly všechny hodnoty změřené v roztoku III mírně nižší (přibližně o 10 %) oproti zbylým roztokům, s nejnižšími hodnotami na hladině MQC, sady AT: 78,31 % $\pm$ 2,50 % po 24 hodinách a 74,35 % $\pm$ 0,58 % po 48 hodinách. Obdobně také u látky L-DOPA byl pozorován úbytek látky v roztoku III na hladině MQC v obou sadách (sada AT: 79,13 % $\pm$ 2,44 % po 24 hodinách a 76,50 % $\pm$ 0,73 % po 48 hodinách). Také MQC vzorky DA v roztoku III mírně degradovaly, znatelněji v sadě AT (86,16 % $\pm$ 2,96 % po 24 hodinách a 84,00 % $\pm$ 0,74 % po 48 hodinách). U obou analytů na hladině HQC ovšem nebyl potvrzen tento trend.



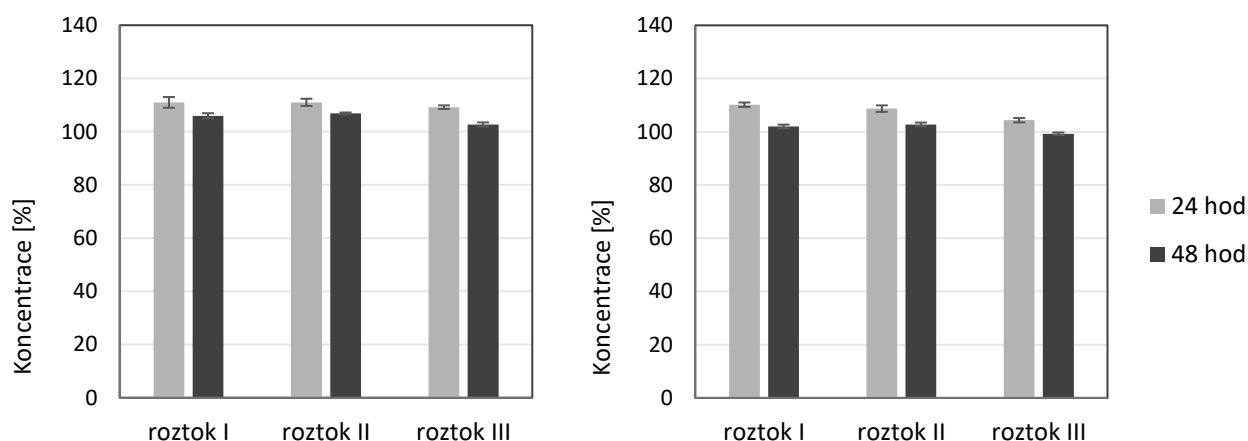
Obr.4 Procentuální koncentrace SAL (testovaného v roztocích I, II, III) na hladině MQC, po aplikaci podmínek testu (vlevo sada RT, vpravo sada AT) v čase po 24 hod a 48 hod. Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



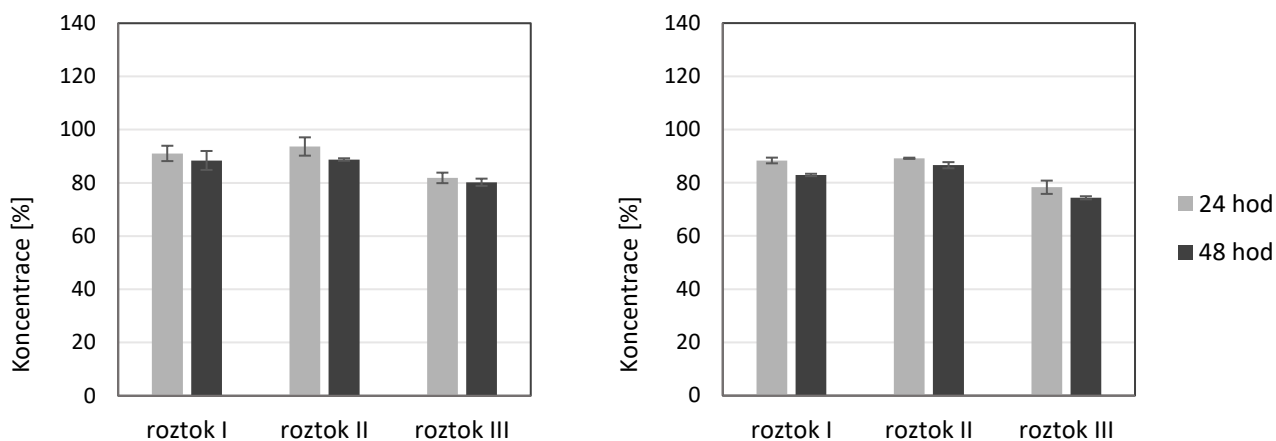
Obr.5 Procentuální koncentrace SAL (testovaného v roztocích I, II, III) na hladině HQC, po aplikaci podmínek testu (vlevo sada RT, vpravo sada AT) v čase po 24 hod a 48 hod. Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



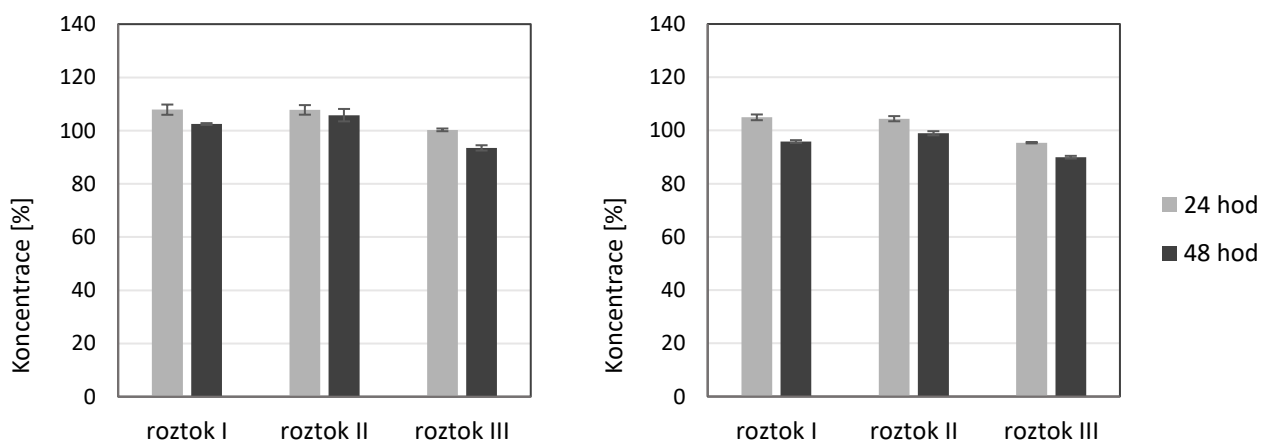
Obr.6 Procentuální koncentrace NMS (testovaného v roztocích I, II, III) na hladině MQC, po aplikaci podmínek testu (vlevo sada RT, vpravo sada AT) v čase po 24 hod a 48 hod. Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



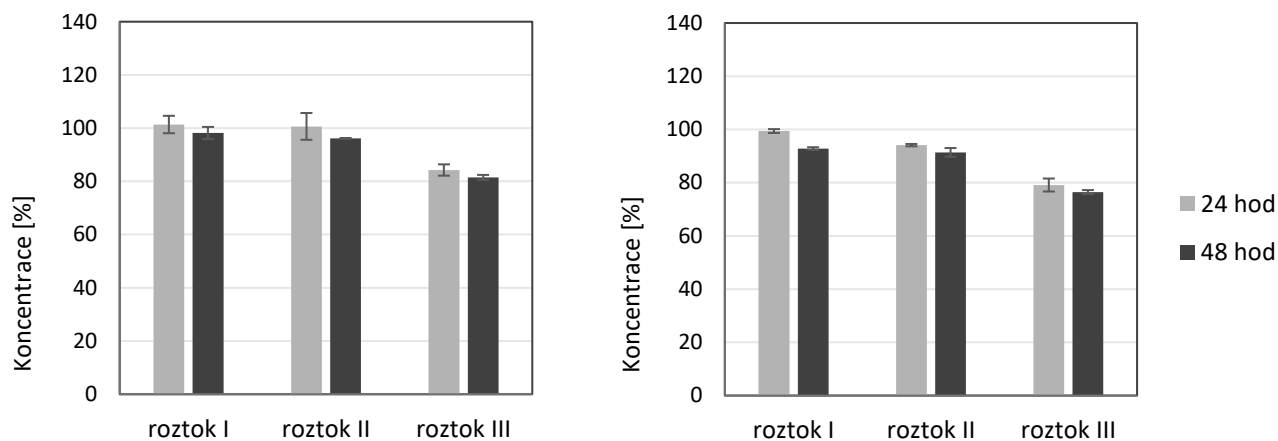
Obr.7 Procentuální koncentrace NMS (testovaného v roztocích I, II, III) na hladině HQC, po aplikaci podmínek testu (vlevo sada RT, vpravo sada AT) v čase po 24 hod a 48 hod. Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



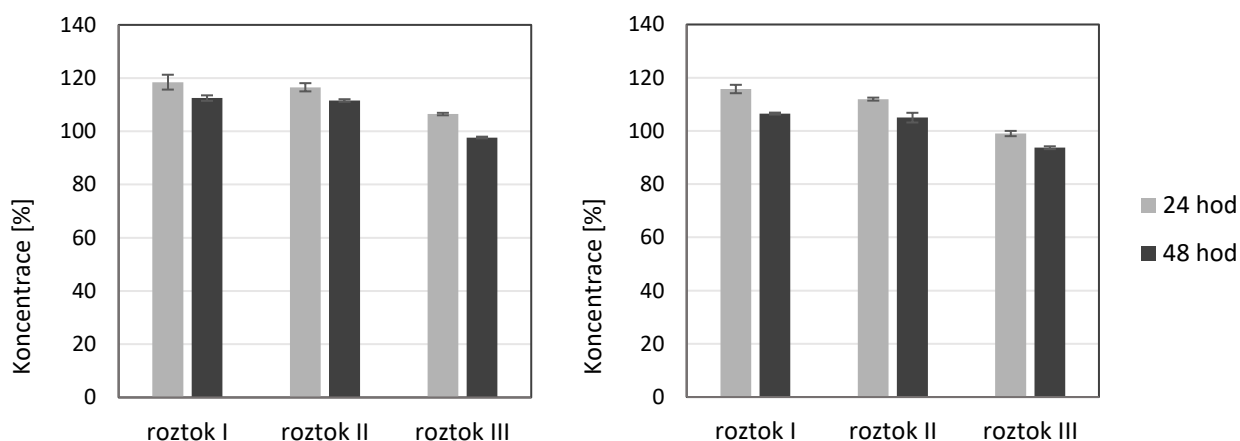
Obr.8 Procentuální koncentrace SCA (testované v roztocích I, II, III) na hladině MQC, po aplikaci podmínek testu (vlevo sada RT, vpravo sada AT) v čase po 24 hod a 48 hod. Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



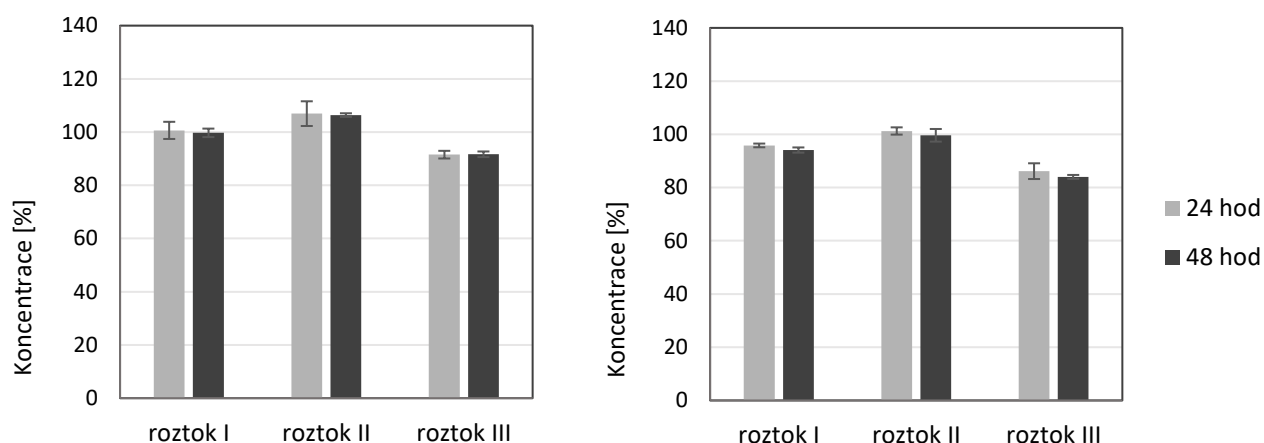
Obr.9 Procentuální koncentrace SCA (testované v roztocích I, II, III) na hladině HQC, po aplikaci podmínek testu (vlevo sada RT, vpravo sada AT) v čase po 24 hod a 48 hod. Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



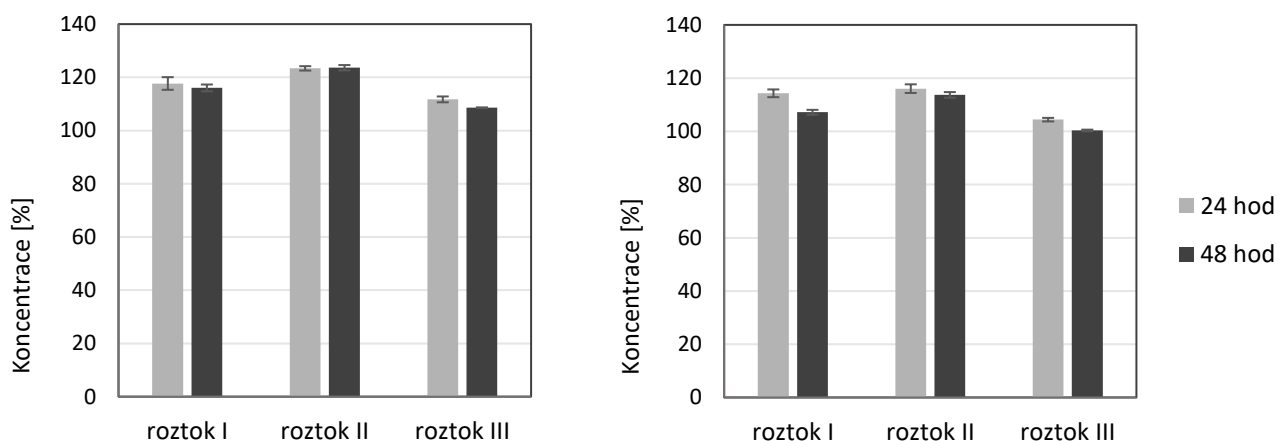
Obr.10 Procentuální koncentrace L-DOPA (testované v roztocích I, II, III) na hladině MQC, po aplikaci podmínek testu (vlevo sada RT, vpravo sada AT) v čase po 24 hod a 48 hod. Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



Obr.11 Procentuální koncentrace L-DOPA (testované v roztocích I, II, III) na hladině HQC, po aplikaci podmínek testu (vlevo sada RT, vpravo sada AT) v čase po 24 hod a 48 hod. Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



Obr.12 Procentuální koncentrace DA (testovaného v roztocích I, II, III) na hladině MQC, po aplikaci podmínek testu (vlevo sada RT, vpravo sada AT) v čase po 24 hod a 48 hod. Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



Obr.13 Procentuální koncentrace DA (testovaného v roztocích I, II, III) na hladině HQC, po aplikaci podmínek testu (vlevo sada RT, vpravo sada AT) v čase po 24 hod a 48 hod. Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).

4.2 Test dlouhodobé stability

Připravené sady vzorků byly vystaveny různým podmínkám uskladnění (-20 °C nebo -80 °C) a po 5 týdnech byly vzorky (s přídavkem čerstvých IS) přeměřeny proti čerstvé kalibrační křivce. Výsledné procentuální koncentrace analytů kvantifikované ve vzorcích proti IS (jež nepodléhaly testovaným podmínkám), jsou znázorněné v Tab.6.

Ze získaných dat vyplývá, že teplota, při níž byly látky v tomto experimentu uskladněny, měla minimální vliv na jejich stabilitu. V rámci jednotlivých QC vzorků nebyl mezi sadami „-20 °C“ a „-80 °C“ signifikantní rozdíl (jednotky %). Výsledky byly srovnatelné taktéž pro obě testované koncentrace MQC a HQC.

Tři z pěti testovaných látek vykazovaly při dlouhodobém skladování vzorku částečnou nestabilitu – u SAL, NMS a DA došlo ve všech testovaných sadách k degradaci. Koncentrace SAL a NMS klesla v roztoku III až pod 50 %. Látky SCA a L-DOPA se jeví celkově stabilnější, s výjimkou SCA v testovaném roztoku III. Naopak použití roztoku I a II mělo na látku SCA protektivní charakter a k degradaci látky téměř nedocházelo. Pro látku L-DOPA neměl typ použitého solventu na její stabilitu vliv a k degradaci látky při dlouhodobém skladování nedocházelo v podstatě vůbec.

Z testovaných roztoků byl nejméně vhodný roztok III. Ve srovnání s použitým roztokem I byl u všech analytů rozpuštěných v roztoku III zaznamenán pokles koncentrace o 15 % až 20 %. Rozdíl mezi roztoky I a II byl menší/roven 10 % (kromě látky NMS na hladině HQC při -20 °C, kde je ovšem také větší SD měření).

Tab.6 Koncentrace testovaných látek (v roztocích I, II, III) na hladinách MQC a HQC po 5 týdnech skladování při teplotě -20 °C nebo -80 °C. Uvedeny jsou průměrné procentuální hodnoty a jejich SD (n = 3).

látky	hladina	teplota	roztok I		roztok II		roztok III	
			průměr [%]	SD [%]	průměr [%]	SD [%]	průměr [%]	SD [%]
SAL	MQC	-20 °C	65,50	0,68	64,12	0,72	49,87	1,18
		-80 °C	66,12	0,20	61,64	0,28	46,62	2,53
	HQC	-20 °C	63,56	0,74	59,04	0,71	47,63	0,78
		-80 °C	60,38	0,19	55,53	1,74	44,57	1,53
NMS	MQC	-20 °C	61,90	0,81	57,92	0,20	46,62	1,56
		-80 °C	63,16	1,23	57,21	0,58	44,28	1,59
	HQC	-20 °C	59,22	0,28	46,99	8,58	44,74	0,18
		-80 °C	57,16	0,99	50,55	1,99	41,80	1,22
SCA	MQC	-20 °C	91,68	0,50	89,56	1,20	72,24	2,13
		-80 °C	93,13	0,99	86,99	0,66	67,66	3,67
	HQC	-20 °C	93,49	1,38	87,49	1,62	73,63	1,00
		-80 °C	90,61	0,50	82,67	3,55	69,42	2,78
L-DOPA	MQC	-20 °C	110,46	6,96	113,21	0,56	97,49	3,48
		-80 °C	118,63	0,76	111,49	1,97	93,14	4,63
	HQC	-20 °C	121,19	1,43	114,00	1,78	101,32	0,72
		-80 °C	117,29	0,90	107,58	5,30	95,33	3,25
DA	MQC	-20 °C	68,98	2,74	68,05	0,23	59,78	1,62
		-80 °C	72,96	0,93	66,19	1,73	56,27	2,54
	HQC	-20 °C	72,72	1,18	66,28	0,97	59,18	0,20
		-80 °C	70,30	0,83	62,22	2,16	55,16	1,17

4.3 Test stability během 3 cyklů rozmrazování

Byl hodnocen vliv opakovaného rozmrazování na stabilitu analytů: 4 sady vzorků byly vystaveny 3 cyklům zmrazení (-80 °C) a rozmrazení, v intervalech 24 hodin.

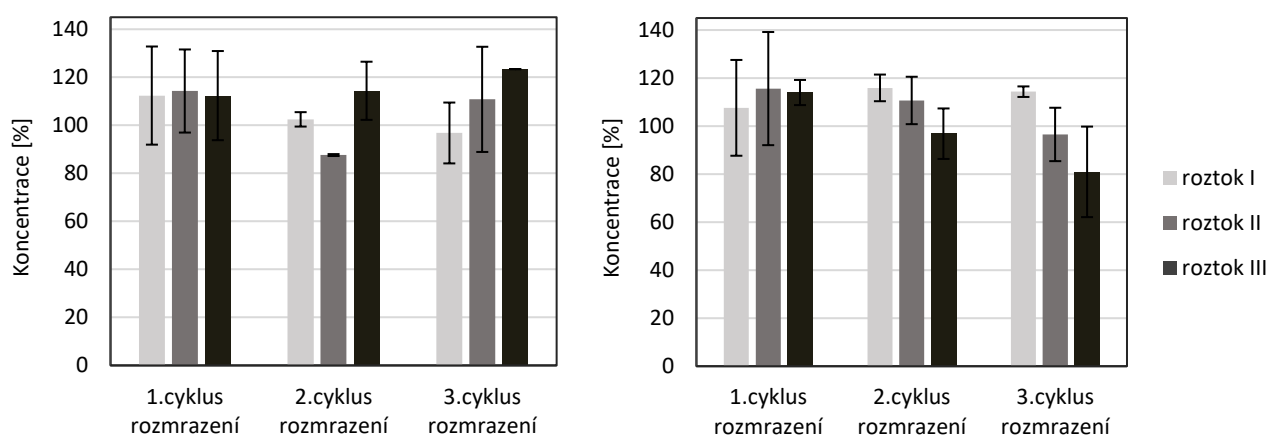
V případě testovaného analytu SAL (Obr.14) byly u většiny vzorků poměrně vysoké SD, což znesnadňovalo vyhodnocení. Tato nepřesnost mohla být způsobena chybou při pipetování vzorků. Na hladině MQC ani HQC se ovšem nevyskytl zásadní úbytek látky, s výjimkou cyklu 3 u HQC vzorků v roztoku III (pokles na 80,9 % ± 18,9 %).

NMS byl na hladině MQC i HQC ve všech testovaných roztocích stabilní (Obr.15). Vliv na stabilitu této látky nemělo ani použité rozpouštědlo, látka nedegradovala ani v jednom z nich.

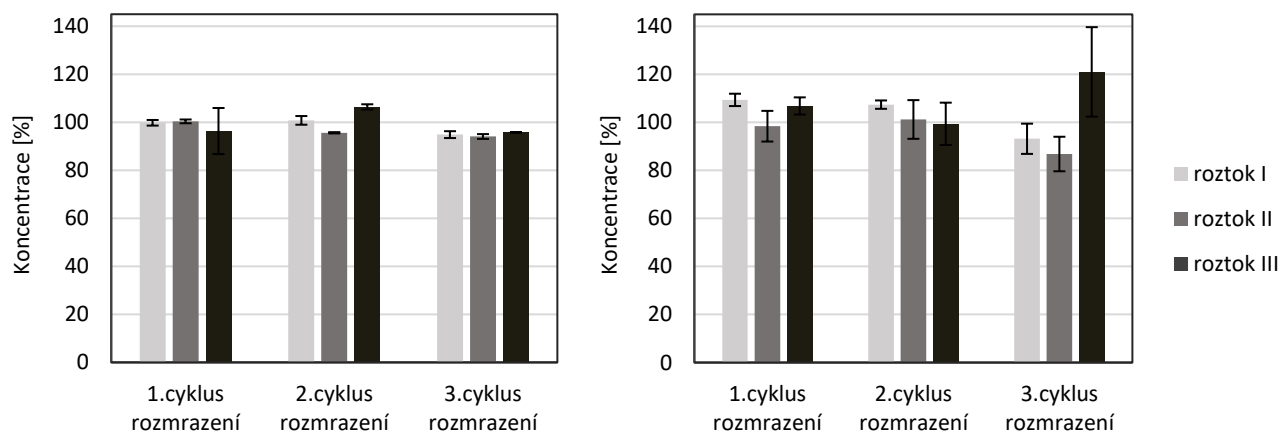
Co se týká SCA (Obr.16), taktéž se jevila na obou hladinách stabilní – koncentrace žádného vzorku neklesla pod 85 % (nejnižší hodnota činila 85,19 % ± 8,94 %). Na rozdíl od testu dlouhodobé stability, v tomto experimentu byly hodnoty v testovaném roztoku III

srovnatelné s roztoky I a II. L-DOPA i DA se ukazovaly jako stabilní na hladinách MQC i HQC, ve všech testovaných roztocích (Obr.17 a 18). Použité rozpouštědlo nemělo na stabilitu látek vliv.

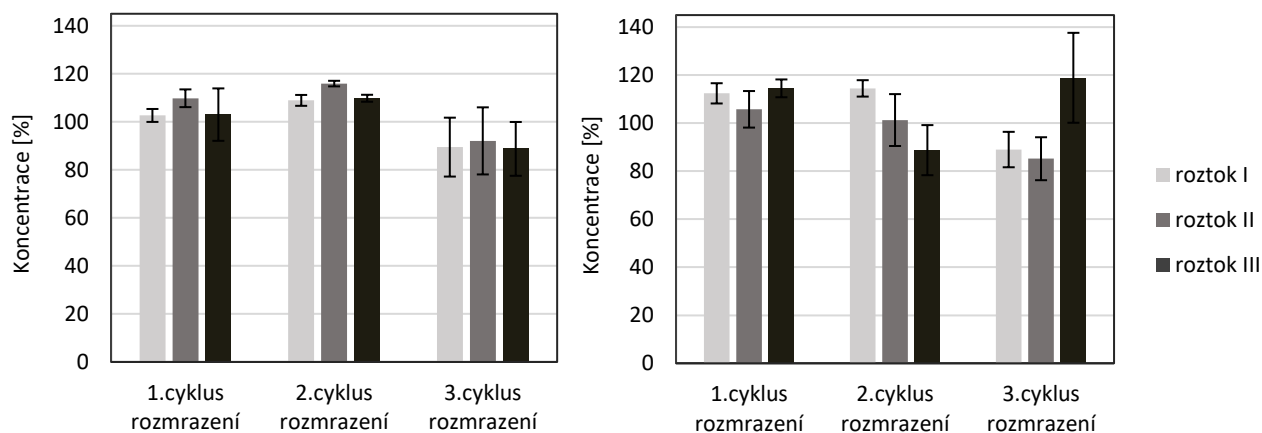
Vyšší hodnoty získané v případě HQC vzorků 3. cyklu analytů NMS, SCA, L-DOPA a DA v roztoku III a vysoké SD v případě všech analytů v roztoku III na hladině HQC v 3.cyklu, byly pravděpodobně způsobeny nepřesným pipetováním při přípravě vzorků, nebo chybou měření. Jelikož podobný trend látky nevykazovaly na hladině MQC, nejednalo se pravděpodobně o degradaci vlivem změny teplot. Vzorky na hladině HQC, oproti vzorkům MQC, vykazovaly u všech zkoumaných látek mírně větší kolísání koncentrací, jak mezi cykly 1-3, tak mezi roztoky I-III.



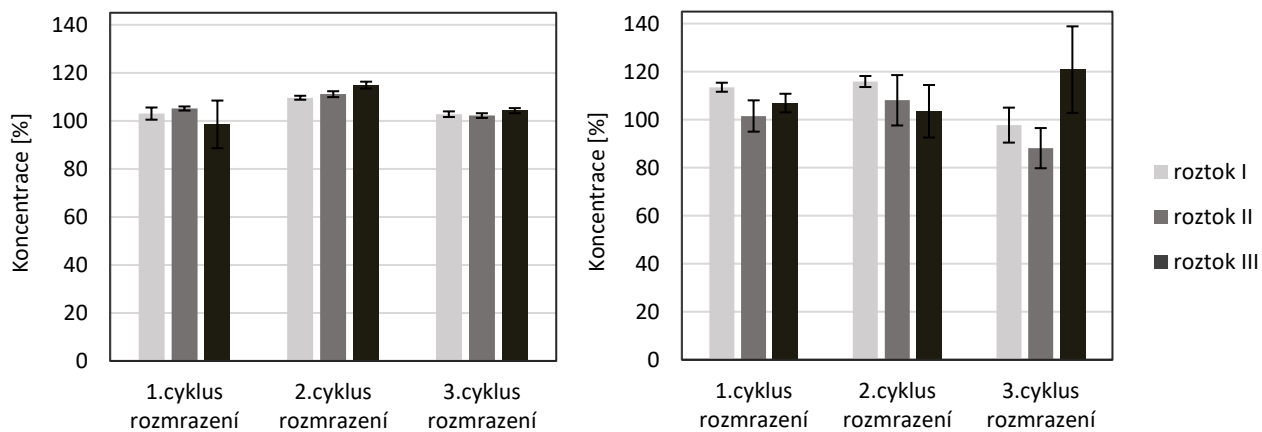
Obr.14 Vliv 3 cyklů zmrazení a rozmrazení na stabilitu SAL v roztocích I, II nebo III na koncentrační hladině MQC (vlevo) a HQC (vpravo). Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



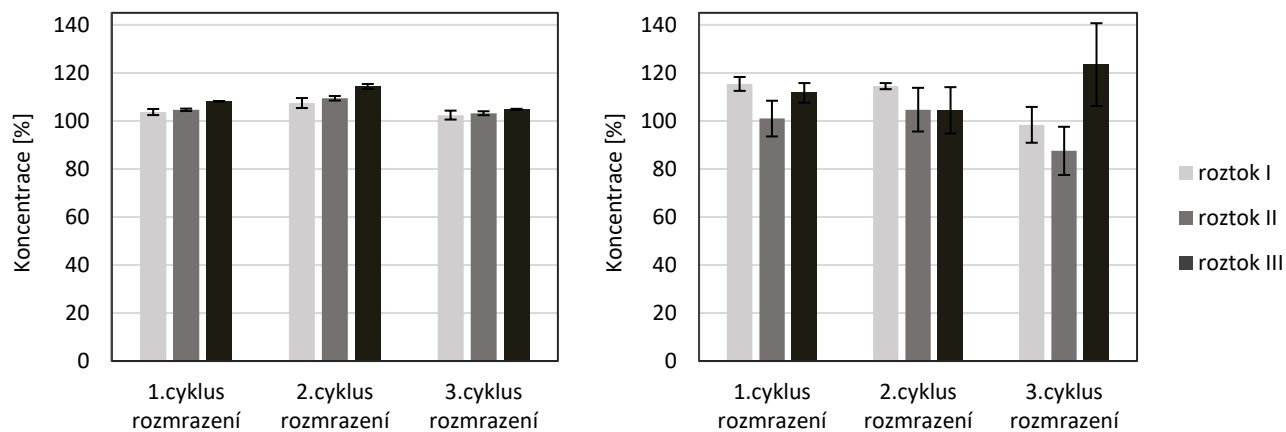
Obr.15 Vliv 3 cyklů zmrazení a rozmrazení na stabilitu NMS v roztocích I, II nebo III na koncentrační hladině MQC (vlevo) a HQC (vpravo). Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



Obr.16 Vliv 3 cyklů zmrazení a rozmrazení na stabilitu SCA v roztocích I, II nebo III na koncentrační hladině MQC (vlevo) a HQC (vpravo). Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



Obr.17 Vliv 3 cyklů zmrazení a rozmrazení na stabilitu L-DOPA v roztocích I, II nebo III na koncentrační hladině MQC (vlevo) a HQC (vpravo). Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).



Obr.18 Vliv 3 cyklů zmrazení a rozmrazení na stabilitu DA v roztocích I, II nebo III na koncentrační hladině MQC (vlevo) a HQC (vpravo). Grafy zobrazují hodnoty průměru $\pm$ SD ($n = 3$).

5 DISKUSE

V experimentální části této práce byl hodnocen stabilitní parametr vybraných TIQ derivátů (SAL, NMS, SCA) a jejich prekursorů (L-DOPA, DA) na základě 3 provedených experimentů, během nichž byla testována krátkodobá stabilita, dlouhodobá stabilita a stabilita analytů během 3 cyklů rozmrazování. Všechny látky byly rozpuštěny v čistých rozpouštědlech (roztoky I, II, III) s různou mírou okyselení.

Test krátkodobé stability nepotvrdil zásadní vliv působení světla, tepla, ani délky působení těchto podmínek na stabilitu testovaných látek. U všech látek v roztoku III lze sice na hladině MQC pozorovat snížení koncentrace, tento jev se ovšem vyskytuje v obou sadách AT i RT, podobně v čase 24 hod i 48 hod. Tyto podmínky zde tedy pravděpodobně nehrají roli. Potvrzení tohoto trendu navíc nelze sledovat u HQC vzorků. Dá se tudíž předpokládat, že během přípravy vzorků, jejich další manipulaci a analýze v autosampleru (až po dobu 48 hodin) nedochází k zásadní degradaci těchto látek.

Výsledky testu dlouhodobé stability ukazují trend úbytku některých analytů, zejména SAL, NMS a DA při uskladnění v daných roztocích po dobu 5 týdnů. Dle doporučení EMA je přijatelné stabilitu malých molekul stanovenou při určité teplotě (-20 °C) předpokládat i pro teploty nižší (-80 °C) (EMA, 2019). Aplikovaná teplota uskladnění (-20 °C nebo -80 °C) v experimentech nehrála roli, výsledky získané při obou teplotách byly podobné.

Test stability během 3 cyklů rozmrazování v souhrnu neprokázal zásadní degradaci testovaných látek, dá se tedy tvrdit, že rozmrazování vzorků nepředstavuje velké riziko pro stabilitu analytů. Nejhuře z tohoto testu vyšel SAL a SCA, s nejnižšími hodnotami koncentrací 80,9 % ± 18,9 %, resp. 85,19 % ± 8,94 %.

Stabilita analytů byla testována v roztocích I-III, vyhodnocován byl vliv okyselení roztoku na možnou (auto)oxidaci zkoumaných látek a jejich přechod na nestabilní chinonovou formu. Data změřená v této práci nepotvrzují předpoklad, že by nejvíce okyselený roztok (III) byl nejvíce protektivní proti oxidaci (a degradaci) zkoumaných látek. U většiny vzorků v testech krátkodobé stability a stability během 3 cyklů rozmrazování nebyl mezi použitými roztoky I-III pozorován zásadní rozdíl. Určitý trend lze sledovat ve výsledcích testu dlouhodobé stability, kde se z testovaných roztoků jeví nejméně vhodný roztok III, pro všechny zkoumané látky. Nejzřetelnějším příkladem je SCA, u níž se koncentrace v roztocích I a II pohybuje kolem 90 %, ale v roztoku III došlo k úbytku látky na přibližně 70 %.

Ačkoliv je agenturou EMA doporučováno provádět vlastní stabilitní studie zkoumaných látek (spoléhat se na data uváděná v literatuře není dostatečné) (EMA, 2019), v případě TIQ derivátů jsem při provádění rešerše nenalezla mnoho studií zabývajících se jejich stabilitou. Obecně je pravděpodobně jejich stabilita předpokládána, a to v souvislosti

s aromatickým charakterem a planární strukturou této skupiny látek (Martin, 1963; DeCuyper, 2008).

Dostatek literatury je možné najít ohledně stability katecholaminů, které jsou chemicky nestabilní, náchylné k oxidaci a degradaci v prostředí s vyšším pH. Většinou je proto s nimi pracováno při nižších teplotách a bez vystavení světlu, ve snaze zabránit jejich oxidaci (Bicker, 2013).

Hipólito a kol. ve svém přehledovém článku posuzují roli SAL v etiologii alkoholismu, jež je považována za kontroverzní kvůli nejednotným hlášením zvýšené koncentrace SAL v mozkové tkáni po konzumaci alkoholu (Hipólito, 2012). Rozporuplnost publikovaných výsledků přikládají několika možným faktorům, které v dřívějších studiích nebyly mnohdy ošetřeny – mezi nimi i stanovení stability (či případné nestability) zkoumaných látek (dále také analytickým omezením použitých metod, technice přípravy bez použití isotopicky značených interních standardů, nakládání se vzorky, nebo vlivu stravy).

Studie DeCuyper a kol. (2008) je jedna z mála studií hodnotících stabilitu TIQ derivátů. Tito autoři zkoumali regionální distribuci vybraných TIQ derivátů (1,2,3,4-TIQ; *N*-methyl-TIQ; 1-benzyl-TIQ; (*R/S*)-SAL; *N*-methyl-(*R/S*)-SAL; norsalsolinol; DA; kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová a kyselina homovanilová) v mozkové tkáni, a také jejich stabilitu za použití ^1H -NMR spektroskopie. Jejich výsledky mimo jiné indikují, že všechny zkoumané látky byly ve vodných roztocích tepelně stálé, nevykazovaly žádné strukturní změny po vystavení různým tepelným podmínkám (22 °C, 37 °C a 60 °C) v délce až 28 dní, ani během cyklů zmrazení a rozmrazování (-80 °C/22 °C).

Siddhuraju a Becker (2001) kvantifikovali L-DOPA, methylované a nemethylované TIQ deriváty (L-3-karboxy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin a 1-methyl-3-karboxy-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin) v semenech rostliny *Mucuna pruriens*. Jejich studie ukázala, že všechny látky byly stabilní ve vodných roztocích po dobu 2 dnů při 2 °C a po dobu 8 hodin při 22 °C. Při skladování po dobu 3 dnů při 2 °C v roztoku 0,1N kyseliny chlorovodíkové taktéž nedocházelo ke znatelné degradaci, zvýšení teploty na 22 °C pak přineslo úbytek látek o 10-15 %.

Ve srovnání s uvedenými studiemi se většina výsledků dosažených v této práci shoduje. Během testů krátkodobé stability nedošlo k významnému úbytku látek, jenž by probíhal shodně na obou testovaných hladinách MQC i HQC. Siddhuraju a Becker (2001) při skladování vzorků ve 2 °C taktéž nepozorovali degradaci, při pokojové teplotě pak mírnou. Studie DeCuyper a kol. nepozorovala významnou nestabilitu, a to ani při vyšších teplotách. Ve shodě jsou i výsledky testu stability během 3 cyklů rozmrazování, kdy bylo prokázáno, že tyto podmínky nepředstavují riziko degradace pro testované látky. Testování dlouhodobé stability zmrazených látek nebylo provedeno ani v jedné studii. Právě v tomto

testu byla u tří z pěti testovaných látek (SAL, NMS a DA) prokázána částečná nestabilita, a to ve všech sadách.

6 ZÁVĚR

V teoretické části předložené bakalářské práce byla popsána skupina tetrahydroisochinolinů, jejich souvislost s etiologií PD a dále jednotlivé parametry validace bioanalytických metod, včetně parametru stabilitního. Ten byl hodnocen u vybraných TIQ derivátů a jejich prekursorů v experimentální části na základě tří provedených experimentů.

Při porovnání testovaných analytů byly výsledky získané po aplikaci daných podmínek u většiny z nich srovnatelné. Určitý rozdíl byl pozorován mezi MQC a HQC vzorky všech analytů v testu krátkodobé stability, v testu stability během rozmrazování pak určitá chyba při měření HQC vzorků, obdobná u většiny látek. Rozdíl mezi použitými látkami lze nalézt v testu dlouhodobé stability, kdy u tří z pěti látek došlo k částečné degradaci.

Manipulace se vzorkem na laboratorním stole neodhalila tendenci TIQ derivátů ani jejich prekursorů k degradaci, a to ani při skladování na světle a při pokojové teplotě po dobu až 48 hodin. Krátkodobě se všechny testované analyty jevily jako stabilní, bez ohledu na použité rozpouštědlo. Současně nebyl sledován ani negativní vliv opakovaného rozmrazení vzorku na jeho stabilitu. Jistá nestabilita látek byla zjištěna během dlouhodobého skladování vzorku před UPLC-MS/MS analýzou, a to jak při teplotě -20 °C tak i -80 °C. Toto zjištění poukazuje na nevhodnost zamrazování a dlouhodobého uskladňování již připravených a v rozpouštědle rozpuštěných vzorků. Vzorky připravené pro UPLC-MS/MS analýzu by měly být bez odkladu zpracovány.

Nicméně, toto zjištění neznamená zásadní problém pro samotné stanovení látek ve vzorcích. V rámci bioanalytických metod je doporučeno připravovat současně se vzorky také externí kalibrační křivku, a to na identické, případně arteficiální matici, a to za podmínek shodných se zpracováním vzorků (EMA, 2019). Navíc se při zpracování reálných vzorků předpokládá použití isotopově značených analogů jako IS. Tímto přístupem jsou případné ztráty látek ve vzorcích ošetřeny tak, aby kvantifikace analytů dávala správné výsledky.

V rámci bakalářské práce byla studována stabilita látek v čistých rozpouštědlech, bez vlivu matrice biologického materiálu. Plná validace by měla dále pokračovat ověřením stability metabolitů také v přítomnosti pozadí biologické matrice, jako je např. mozkomíšní mok, sérum, moč nebo mozková tkáň. Plně validovaná metoda by pak měla být využita pro stanovení TIQ derivátů a katecholaminů u pacientů s diagnostikovanou PD a výsledky studie by měly potvrdit nebo vyvrátit možnost využití těchto látek jako možných markerů neurodegenerativních onemocnění.

CITOVANÁ LITERATURA

AKAO, Y., Y. NAKAGAWA, W. MARUYAMA, T. TAKAHASHI a M. NAOI, 1999. Apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, is mediated by activation of caspase 3. *Neuroscience Letters*. **267**(3), 153-156.

ANTKIEWICZ-MICHALUK, L., A. WĄSIK a J. MICHALUK, 2014. 1-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline, an Endogenous Amine with Unexpected Mechanism of Action: New Vistas of Therapeutic Application. *Neurotoxicity Research*. **25**(1), 1-12.

ANTKIEWICZ-MICHALUK, L., A. WĄSIK, I. ROMAŃSKA, A. BOJARSKI a J. MICHALUK, 2011. Both Stereoselective (R)- and (S)-1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Enantiomers Protect Striatal Terminals Against Rotenone-Induced Suppression of Dopamine Release. *Neurotoxicity Research*. **20**(2), 134-149.

ASANUMA, M., I. MIYAZAKI a N. OGAWA, 2003. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*. **5**(3), 165-176.

BAUM, S. a H. ROMMELSPACHER, 1994. Determination of total dopamine, R- and S-salsolinol in human plasma by cyclodextrin bonded-phase liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **660**(2), 235-241.

BICKER, J., A. FORTUNA, G. ALVES a A. FALCÃO, 2013. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples - A review. *Analytica Chimica Acta*. **768**, 12-34.

BOHLEN UND HALBACH, O. a R. DERMETZEL, 2006. *Neurotransmitters and neuromodulators: handbook of receptors and biological effects*. 2nd. rev. and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 3-527-31307-9.

BRAAK, H., U. RÜB, W. GAI a K. DEL TREDICI, 2003. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of Neural Transmission*. **110**(5), 517-536.

BRADBURY, A.J., B. COSTALL, A.M. DOMENEY, B. TESTA, P.G. JENNER, C.D. MARSDEN a R.J. NAYLOR, 1985. The toxic actions of MPTP and its metabolite MPP⁺ are not mimicked by analogues of MPTP lacking an N-methyl moiety. *Neuroscience Letters*. **61**(1-2), 121-126.

BRISCOE, Ch. a D. HAGE, 2009. Factors affecting the stability of drugs and drug metabolites in biological matrices. *Bioanalysis*. **1**(1), 205-220.

CASSANI, E., M. BARICHELLA, R. CANCELLO et al., 2015. Increased urinary indoxyl sulfate (indican): New insights into gut dysbiosis in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. **21**(4), 389-393.

DAVIS, G., A. WILLIAMS, S. MARKEY, M. EBERT, E. CAINE, CH.I. REICHERT a I. KOPIN, 1979. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Research*. **1**(3), 249-254.

DECUYPERE, M., Y. LU, D. MILLER a M. LEDOUX, 2008. Regional distribution of tetrahydroisoquinoline derivatives in rodent, human, and parkinson's disease brain. *Journal of Neurochemistry*. **107**(5), 1398-1413.

DEITRICH, R. a V. ERWIN, 1980. Biogenic Amine-Aldehyde Condensation Products: Tetrahydroisoquinolines and Tryptolines (β -Carbolines). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. **20**(1), 55-80.

DELL, D., 2004. Labile Metabolites. *Chromatographia*. **59**(2), 139–148.

DENG, Y., W. MARUYAMA, P. DOSTERT, T. TAKAHASHI, M. KAWAI a M. NAOI, 1995. Determination of the (R)- and (S)-enantiomers of salsolinol and N-methylsalsolinol by use of a chiral high-performance liquid chromatographic column. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **670**(1), 47-54.

DENG, Y., W. MARUYAMA, M. KAWAI, P. DOSTERT, H. YAMAMURA, T. TAKAHASHI a M. NAOI, 1997. Assay for the (R)- and (S)-enantiomers of salsolinols in biological samples and foods with ion-pair high-performance liquid chromatography using β -cyclodextrin as a chiral mobile phase additive. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **689**(2), 313-320.

DORSEY, E., A. ELBAZ, E. NICHOLS et al., 2018. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. **17**(11), 939-953.

DUGGER, B. a D. DICKSON, 2017. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. **9**(7), 028035.

EMA, 2019. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation [online]. European Medicines Agency [cit. 2020]. Dostupné z:

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-2b_en.pdf

FDA, 2018. Bioanalytical method validation. Guidance for industry. [online]. U.S. Food and Drug Administration [cit. 2020]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

FRIEDECKÝ, B., L. ŠPRONGL, J. KRATOCHVÍLA a Z. PLZÁK, 2011. Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus*. **19**(40), 36-44.

GHISO, J. a B. FRANGIONE, 2002. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **54**(12), 1539-1551.

GNEGY, M., 2012. Catecholamines. BRADY, Scott T., George J. SIEGEL, R. Wayne ALBERS, Donald L. PRICE a Joyce BENJAMINS, ed., S. BRADY, G. SIEGEL, R. ALBERS, D. PRICE, J. BENJAMINS. *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*. 8th ed. Boston: Elsevier/Academic Press, s. 283-299. ISBN 978-0-12-374947-5.

GOLDSTEIN, D. S., I. J. KOPIN a Y. SHARABI, 2014. Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. *Pharmacology & Therapeutics*. **144**(3), 268-282.

GOLPICH, M., E. AMINI, Z. MOHAMED, R. ALI, N.M. IBRAHIM a A. AHMADIANI, 2017. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. **23**(1), 5-22.

HABER, H., H.M. HABER a M.F. MELZIG, 1995. A New Rapid Method for the Analysis of Catecholic Tetrahydroisoquinolines from Biological Samples by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*. **224**(1), 256-262.

HABER, H., A. WINKLER, I. PUTSCHER, P. HENKLEIN, I. BAEGER, M. GEORGI a M. MELZIG, 1996. Plasma and Urine Salsolinol in Humans: Effect of Acute Ethanol Intake on the Enantiomeric Composition of Salsolinol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. **20**(1), 87-92.

HASEGAWA, E., K. TAKESHIGE, T. OISHI, Y. MURAI a S. MINAKAMI, 1990. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances

NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **170**(3), 1049-1055.

HASTINGS, T. G., D. A. LEWIS a M. J. ZIGMOND, 1996. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **93**(5), 1956-1961.

HERRAIZ, T., 2016. N-methyltetrahydropyridines and pyridinium cations as toxins and comparison with naturally-occurring alkaloids. *Food and Chemical Toxicology*. **97**, 23-39.

HIPÓLITO, L., M. SÁNCHEZ-CATALÁN, L. MARTÍ-PRATS, L. GRANERO a A. POLACHE, 2012. Revisiting the controversial role of salsolinol in the neurobiological effects of ethanol: Old and new vistas. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **36**(1), 362-378.

HIRSCH, E. a S. HUNOT, 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. *The Lancet Neurology*. **8**(4), 382-397.

CHAUDHURI, K. a A. SCHAPIRA, 2009. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurology*. **8**(5), 464-474.

CHEN, X., X. ZHENG, S. ALI et al., 2018. Isolation and Sequencing of Salsolinol Synthase, an Enzyme Catalyzing Salsolinol Biosynthesis. *ACS Chemical Neuroscience*. **9**(6), 1388-1398.

INOUE, H., D. MATSUBARA a Y. TSURUTA, 2008. Simultaneous analysis of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines by high-performance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride as a fluorescent labeling reagent. *Journal of Chromatography B*. **867**(1), 32-36.

KADIAN, N., K. RAJU, M. RASHID, M. MALIK, I. TANEJA a M. WAHAJUDDIN, 2016. Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **126**, 83-97.

KAZA, M., M. KARAŻNIEWICZ-ŁADA, K. KOSICKA, A. SIEMIĄTKOWSKA a P. RUDZKI, 2019. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse?. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **165**, 381-385.

KOHNO, M., S. OHTA a M. HIROBE, 1986. Tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydroisoquinoline as novel endogenous amines in rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **140**(1), 448-454.

- KOLLIPARA, S., G. BENDE, N. AGARWAL, B. VARSHNEY a J. PALIWAL, 2011. International Guidelines for Bioanalytical Method Validation: A Comparison and Discussion on Current Scenario. *Chromatographia*. **73**(3-4), 201-217.
- KOTAKE, Y., Y. SEKIYA, K. OKUDA a S. OHTA, 2014. Detection of a novel neurotoxic metabolite of Parkinson's disease-related neurotoxin, 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline. *The Journal of Toxicological Sciences*. **39**(5), 749-754.
- KOTAKE, Y., Y. TASAKI, Y. MAKINO, S. OHTA a M. HIROBE, 1995. 1-Benzyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline as a Parkinsonism-Inducing Agent: A Novel Endogenous Amine in Mouse Brain and Parkinsonian CSF. *Journal of Neurochemistry*. **65**(6), 2633-2638.
- KURNIK-ŁUCKA, M., P. PANULA, A. BUGAJSKI a K. GIL, 2018. Salsolinol: an Unintelligible and Double-Faced Molecule - Lessons Learned from In Vivo and In Vitro Experiments. *Neurotoxicity Research*. **33**(2), 485-514.
- LANGSTON, J., P. BALLARD, J. TETRUD a I. IRWIN, 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. **219**(4587), 979-980.
- LEE, V., M. GOEDERT a J. TROJANOWSKI, 2001. Neurodegenerative Tauopathies. *Annual Review of Neuroscience*. **24**(1), 1121-1159.
- LEE, J., V. A. RAMCHANDANI, K. HAMAZAKI, E. A. ENGLEMAN, W. J. MCBRIDE, T. K. LI a H. Y. KIM, 2010. A Critical Evaluation of Influence of Ethanol and Diet on Salsolinol Enantiomers in Humans and Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. **34**(2), 242-250.
- LEW, M., 2007. Overview of Parkinson's Disease. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. **27**(122), 155-160.
- LI, W., J. ZHANG a F. TSE, 2011. Strategies in quantitative LC-MS/MS analysis of unstable small molecules in biological matrices. *Biomedical Chromatography*. **25**, 258-277.
- MAKINO, Y., S. OHTA, O. TACHIKAWA a M. HIROBE, 1988. Presence of tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydro-isoquinoline in foods: Compounds related to Parkinson's disease. *Life Sciences*. **43**(4), 373-378.
- MARÍN-VALENCIA, I., M. SERRANO, A. ORMAZABAL, B. PÉREZ-DUEÑAS, A. GARCÍA-CAZORLA, J. CAMPISTOL a R. ARTUCH, 2008. Biochemical diagnosis of dopaminergic disturbances in paediatric patients: Analysis of cerebrospinal fluid homovanillic acid and other biogenic amines. *Clinical Biochemistry*. **41**(16-17), 1306-1315.

MARTIN, H. a B. GUDZINOWICZ, 1963. Thermal Stability of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons and the Polarographic Half-wave Reduction Potential. *Nature*. **200**(4901), 69-70.

MARTINUCCI, I., C. BLANDIZZI, N. DE BORTOLI et al., 2015. Genetics and pharmacogenetics of aminergic transmitter pathways in functional gastrointestinal disorders. *Pharmacogenomics*. **16**(5), 523-539.

MARUYAMA, W., T. ABE, H. TOHGI, P. DOSTERT a M. NAOI, 1996. A dopaminergic neurotoxin, (R)-N-methylsalsolinol, increases in parkinsonian cerebrospinal fluid. *Annals of Neurology*. **40**(1), 119-122.

MARUYAMA, W., M. NAOI, T. KASAMATSU, Y. HASHIZUME, T. TAKAHASHI, K. KOHDA a P. DOSTERT, 1997a. An Endogenous Dopaminergic Neurotoxin, N-Methyl-(R)-Salsolinol, Induces DNA Damage in Human Dopaminergic Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Journal of Neurochemistry*. **69**(1), 322-329.

MARUYAMA, W., G. SOBUE, K. MATSUBARA, Y. HASHIZUME, P. DOSTERT a M. NAOI, 1997b. A dopaminergic neurotoxin, 1(R), 2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl(R)salsolinol, and its oxidation product, 1,2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ion, accumulate in the nigro-striatal system of the human brain. *Neuroscience Letters*. **223**(1), 61-64.

MCNAUGHT, K. S.P., P.A. CARRUPT, C. ALTOMARE, S. CELLAMARE, A. CAROTTI, B. TESTA, P. JENNER a C.D. MARSDEN, 1998. Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology*. **56**(8), 921-933.

MINAMI, M., T. TAKAHASHI, W. MARUYAMA, A. TAKAHASHI, P. DOSTERT, T. NAGATSU a M. NAOI, 1992. Inhibition of Tyrosine Hydroxylase by R and S Enantiomers of Salsolinol, 1-Methyl-6,7-Dihydroxy-1,2,3,4- Tetrahydroisoquinoline. *Journal of Neurochemistry*. **58**(6), 2097-2101.

MOEIN, M., A. E. BEQQALI a M. ABDEL-REHIM, 2017. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *Journal of Chromatography B*. **1043**, 3-11.

MORIKAWA, N., M. NAOI, W. MARUYAMA et al., 1998. Effects of various tetrahydroisoquinoline derivatives on mitochondrial respiration and the electron transfer complexes. *Journal of Neural Transmission*. **105**(6-7), 677-688.

- MRAVEC, B., 2006. Salsolinol, a derivate of dopamine, is a possible modulator of catecholaminergic transmission: a review of recent developments. *Physiological Research*. **55**(4), 353-364.
- MUSSHOFF, F., T. DALDRUP a W. BONTE, 1993. Gas chromatographic—mass spectrometric screening procedure for the identification of formaldehyde-derived tetrahydroisoquinolines in human urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **619**(2), 235-242.
- MUSSHOFF, F., P. SCHMIDT, R. DETTMAYER, F. PRIEMER, H. WITTIG a B. MADEA, 1999. A systematic regional study of dopamine and dopamine-derived salsolinol and norsalsolinol levels in human brain areas. *Forensic Science International*. **105**(1), 1-11.
- NAGATSU, T., 1997. Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease. *Neuroscience Research*. **29**(2), 99-111.
- NAGATSU, T., 2002. Amine-related neurotoxins in Parkinson's disease: Past, present, and future. *Neurotoxicology and Teratology*. **24**(5), 565-569.
- NAOI, M., W. MARUYAMA, Y. AKAO a H. YI, 2002. Dopamine-derived endogenous N-methyl-(R)-salsolinol: Its role in Parkinson's disease. *Neurotoxicology and Teratology*. **24**(5), 579-591.
- NAOI, M., W. MARUYAMA, P. DOSTERT, K. KOHDA a T. KAIYA, 1996a. A novel enzyme enantio-selectively synthesizes (R)salsolinol, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol. *Neuroscience Letters*. **212**(3), 183-186.
- NAOI, M., W. MARUYAMA, P. DOSTERT, Y. HASHIZUME, D. NAKAHARA, T. TAKAHASHI a M. OTA, 1996b. Dopamine-derived endogenous 1(R),2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, N-methyl-(R)-salsolinol, induced parkinsonism in rat: biochemical, pathological and behavioral studies. *Brain Research*. **709**(2), 285-295.
- NAOI, M., W. MARUYAMA a G. NAGY, 2004. Dopamine-Derived Salsolinol Derivatives as Endogenous Monoamine Oxidase Inhibitors: Occurrence, Metabolism and Function in Human Brains. *NeuroToxicology*. **25**(1-2), 193-204.
- NEUMANN, M., D. SAMPATHU, L. KWONG et al., 2006. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*. **314**(5796), 130-133.

NICKLAS, W. J., I. VYAS a R. E. HEIKKILA, 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sciences*. **36**(26), 2503-2508.

NIWA, T., N. TAKEDA, T. SASAOKA, N. KANEDA, Y. HASHIZUME, H. YOSHIZUMI, A. TATEMATSU a T. NAGATSU, 1989a. Detection of tetrahydroisoquinoline in parkinsonian brain as an endogenous amine by use of gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **491**, 397-403.

NIWA, T., H. YOSHIZUMI, A. TATEMATSU, S. MATSUURA a T. NAGATSU, 1989b. Presence of tetrahydroisoquinoline, a parkinsonism-related compound, in foods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **493**, 347-352.

NIWA, T., N. TAKEDA, H. YOSHIZUMI, A. TATEMATSU, M. YOSHIDA, P. DOSTERT, M. NAOI a T. NAGATSU, 1991. Presence of 2-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, novel endogenous amines, in parkinsonian and normal human brains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **177**(2), 603-609.

OHTA, S., M. KOHNO, Y. MAKINO, O. TACHIKAWA a M. HIROBE, 1987. Tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydroisoquinoline are present in the human brain: Relation to Parkinson's disease. *Biomedical Research*. **8**(6), 453-456.

PEANA, A. T., V. BASSAREO a E. ACQUAS, 2019. Not Just from Ethanol. Tetrahydroisoquinolinic (TIQ) Derivatives: from Neurotoxicity to Neuroprotection. *Neurotoxicity Research*. **36**(4), 653-668.

QUINTANILLA, M., M. RIVERA-MEZA, P. BERRIOS-CÁRCAMO et al., 2014. Salsolinol, free of isosalsolinol, exerts ethanol-like motivational/sensitization effects leading to increases in ethanol intake. *Alcohol*. **48**(6), 551-559.

ROJKOVICOVA, T., Y. MECHREF, J. STARKEY, G. WU, R. BELL, W. MCBRIDE a M. NOVOTNY, 2008. Quantitative chiral analysis of salsolinol in different brain regions of rats genetically predisposed to alcoholism. *Journal of Chromatography B*. **863**(2), 206-214.

ROMMELSPACHER, H. a R. SUSILO, 1985. Tetrahydroisoquinolines and β -carbolines: putative natural substances in plants and mammals. JUCKER, E., ed. *Progress in Drug Research*. 29. Basel: Birkhäuser Basel, 1985, s. 415-459. ISBN 978-3-0348-9992-5.

ROSS, G., H. PETROVITCH, R. ABBOTT et al., 2004. Parkinsonian signs and substantia nigra neuron density in decedents elders without PD. *Annals of Neurology*. **56**(4), 532-539.

SANDLER, M., S. CARTER, K. HUNTER a G. STERN, 1973. Tetrahydroisoquinoline Alkaloids: in vivo Metabolites of L-Dopa in Man. *Nature*. **241**(5390), 439-443.

SARI, Y., L. A. HAMMAD, M. M. SALEH, G. V. REBEC a Y. MECHREF, 2010. Alteration of selective neurotransmitters in fetal brains of prenatally alcohol-treated C57BL/6 mice: quantitative analysis using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *International Journal of Developmental Neuroscience*. **28**(3), 263-269.

SHULTS, C., 2006. Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**(6), 1661-1668.

SCHLOSSMACHER, M. a B. MOLLENHAUER, 2010. Biomarker research in Parkinson's disease: objective measures needed for patient stratification in future cause-directed trials. *Biomarkers in Medicine*. **4**(5), 647-650.

SCHWAB, A., M. THURSTON, J. MACHHI, K. OLSON, K. NAMMINGA, H. GENDELMAN a R. MOSLEY, 2020. Immunotherapy for Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*. **137**, 104760.

SIDDHURAJU, P. a K. BECKER, 2001. Rapid reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the quantification of L-Dopa (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), non-methylated and methylated tetrahydroisoquinoline compounds from Mucuna beans. *Food Chemistry*. **72**(3), 389-394.

SJÖQUIST, B. a Ch. LJUNGQUIST, 1985. Identification and quantification of 1-carboxysalsolinol and salsolinol in biological samples by gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **343**, 1-8.

SONG, Y., J. XU, A. HAMME a Y. M. LIU, 2006a. Capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry of tetrahydroisoquinoline derived neurotoxins: A study on the blood–brain barrier of rat brain. *Journal of Chromatography A*. **1103**(2), 229-234.

SONG, Y., Y. FENG, M. H. LEBLANC, N. CASTAGLONI a Y. M. LIU, 2006b. 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline passes through the blood–brain barrier of rat brain: An in vivo microdialysis study. *Neuroscience Letters*. **395**(1), 63-66.

STORCH, A., A. KAFTAN, K. BURKHARDT a J. SCHWARZ, 2000. 1-Methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol) is toxic to dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via impairment of cellular energy metabolism. *Brain Research*. **855**(1), 67-75.

SURH, Y.-J. a H.-J. KIM, 2010. Neurotoxic effects of tetrahydroisoquinolines and underlying mechanisms. *Experimental neurobiology*. **19**(2), 63-70.

TASAKI, Y., Y. MAKINO, S. OHTA a M. HIROBE, 1991. 1-Methyl- 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline, Decreasing in 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Treated Mouse, Prevents Parkinsonism-Like Behavior Abnormalities. *Journal of Neurochemistry*. **57**(6), 1940-1943.

THORRÉ, K., M. PRAVDA, S. SARRE, G. EBINGER a Y. MICHOTTE, 1997. New antioxidant mixture for long term stability of serotonin, dopamine and their metabolites in automated microbore liquid chromatography with dual electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **694**(2), 297-303.

TSUNODA, M., 2006. Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **386**(3), 506-514.

VIZI, S. a Á. LAJTHA, ed., 2008. 3rd edition. New York: Springer Science & Business Media. ISBN 978-0-387-30351-2 .

WEINER, C. D. a M. A. COLLINS, 1978. Tetrahydroisoquinolines derived from catecholamines or dopa: Effects on brain tyrosine hydroxylase activity. *Biochemical Pharmacology*. **27**(23), 2699-2703.

YAMAKAWA, T., Y. KOTAKE, M. FUJITANI, H. SHINTANI, Y. MAKINO a S. OHTA, 1999. Regional distribution of parkinsonism-preventing endogenous tetrahydroisoquinoline derivatives and an endogenous parkinsonism-preventing substance-synthesizing enzyme in monkey brain. *Neuroscience Letters*. **276**(1), 68-70.

YASUDA, T., Y. NAKATA a H. MOCHIZUKI, 2013. Alfa-Synuclein and Neuronal Cell Death. *Molecular Neurobiology*. **47**(2), 466-483.

ZARRANZ DE YSERN, M. E. a L. A. ORDOÑEZ, 1981. Tetrahydroisoquinolines: A review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology*. **5**(4), 343-355.