

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lucie Havelková

VÝVOJ UHPLC-MS/MS SCREENINGOVÉ METODY PRO  
ANALÝZU BENZODIAZEPINŮ VE VZORCÍCH MOČI

Development of UHPLC-MS/MS screening method for  
the determination of benzodiazepines in urine samples

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Konzultant: doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2018

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 8. srpna 2018.

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za odborné vedení práce, za vstřícnost, velkou trpělivost a za cenné rady v průběhu práce i při jejím zpracování. Děkuji také svému konzultantovi doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. za jeho ochotu, pomoc a odborný dohled.

Velké díky patří také Mgr. Zuzaně Hampejsové za pomoc s experimentální částí práce a Mgr. Miroslavě Bursové za pomoc při návrhu experimentálního designu.

## ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce byl vývoj screeningové metody pro analýzu 17 benzodiazepinů ve vzorcích moči pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS). Dílčím úkolem bylo optimalizovat podmínky enzymatické hydrolyzy glukuronidů benzodiazepinů v moči s využitím metody plánování experimentů (DOE).

Optimalizovaný chromatografický systém se skládal z kolony Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), dvousložkové mobilní fáze tvořené vodou s 0,1% obsahem octové kyseliny (složka A) a acetonitrilem s 0,1% obsahem octové kyseliny (složka B) v různém poměru dle gradientového programu. Průtok činil 0,2 ml/min, teplota kolony byla 40 °C. Celková doba analýzy činila 12 min. Za optimalizovaných podmínek byly proměřeny kalibrační křivky všech analytů v methanolu i v moči.

Byly nalezeny optimální detekční podmínky pro oxazepam-glukuronid, který byl v rámci pilotního experimentu hydrolyzován za použití β-glukuronidasy z ušně, čímž byla potvrzena funkčnost enzymu. Optimalizace podmínek enzymatické hydrolyzy prostřednictvím 27 experimentů vygenerovaných programem Minitab 16 podle Box-Behnken design bude realizována později.

## ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was the development of a screening method for analysis of 17 benzodiazepines in urine samples using ultra high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. The partial task was to optimize the conditions for the enzymatic hydrolysis of benzodiazepine glucuronides present in urine using design of experiments (DOE).

The optimized chromatographic system consisted of a Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD column (100 × 2.1 mm, 1.8 µm) and mobile phase consisting of water with 0.1 % acetic acid (component A) and acetonitrile with 0.1 % acetic acid (component B) in various ratios according to the gradient program. Flow rate was 0.2 ml/min, column temperature was 40 °C, and total analysis time was 12 min. Calibration curves for all analytes were measured under optimized conditions in methanol and urine.

After optimal detection conditions for oxazepam-glucuronide were found, oxazepam glucuronide was hydrolysed using β-glucuronidase from the abalone to confirm the functionality of the enzyme within the pilot experiment. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions *via* 27 experiments proposed by program Minitab 16 using the Box-Behnken design will be realized later.

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>8</b>
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
2.1 Benzodiazepiny .....	12
2.1.1 Farmakologické indikace .....	12
2.1.2 Struktura .....	14
2.1.3 Působení na receptory GABA (farmakodynamika) .....	17
2.2 Metabolismus léčiv v organismu .....	18
2.2.1 Absorpce.....	18
2.2.2 Distribuce .....	18
2.2.3 Biotransformace a exkrece .....	19
2.2.4 Farmakokinetika benzodiazepinů.....	20
2.3 Metody pro analýzu benzodiazepinů .....	22
2.4 Metody pro zpracování biologických vzorků pro analýzu benzodiazepinů .....	26
2.5 Kolony, stacionární fáze, současné trendy .....	31
2.5.1 Příprava chemicky vázaných reverzních fází na bázi silikagelu .....	32
2.6 Hmotnostní detekce .....	34
2.7 Optimalizace pomocí metody plánování experimentů .....	36
2.7.1 Metoda one factor at a time (OFAT).....	36
2.7.2 DOE, Design of experiments.....	36
2.7.2.1 Průběh experimentu.....	37
2.7.3 Typy experimentálních designů .....	38
2.7.3.1 Modelování DOE .....	39
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>40</b>
3.1 Chemikálie.....	40
3.2 Instrumentace a pomůcky .....	41
3.3 Výchozí UHPLC-MS/MS parametry .....	42
3.4 Příprava zásobních a pracovních roztoků benzodiazepinů v methanolu.....	42
3.5 Příprava směsného roztoku všech benzodiazepinů .....	42
3.6 Příprava roztoku interního standardu .....	43
3.7 Příprava roztoků pro kalibraci v methanolu .....	43
3.8 Příprava roztoků pro kalibraci v moči .....	44

3.9	Příprava vzorků moči.....	44
3.10	Příprava modelového vzorku moči pro pilotní experiment.....	46
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>47</b>
4.1	Optimalizace detekce a separačního systému.....	47
4.1.1	Podmínky hmotnostní detekce .....	47
4.1.2	Gradient.....	48
4.1.3	Složení mobilní fáze.....	52
4.1.4	Separační podmínky .....	54
4.2	Kalibrace v methanolu.....	62
4.3	Kalibrace v moči.....	64
4.4	Optimalizace podmínek enzymatické hydrolýzy .....	66
4.4.1	Glukuronidy benzodiazepinů .....	66
4.4.1.1	Podmínky hmotnostní detekce .....	66
4.4.2	Pilotní experiment na modelovém vzorku moči.....	68
4.4.3	Sestavení plánu experimentů.....	70
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>72</b>
	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>74</b>

## SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

a.u.	relativní jednotka (Arbitrary Unit)
ACN	acetonitril
AP-MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice za atmosferického tlaku (Atmospheric Pressure Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
BZD	benzodiazepiny
CAS	registrační číslo (Chemical Abstracts Service)
CCD	central composite design
CNS	centrální nervová soustava
DAD	detektor diodového pole (Diode Array Detector)
DOE	design of experiments
ECD	detektor elektronového záchytu (Electron Capture Detector)
ESI	ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GIT	gastrointestinální trakt
IPA	isopropylalkohol
IS	interní standard
LLE	extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction)
$M_r$	relativní molekulová hmotnost
$M_{\text{mon.}}$	monoizotopická molekulová hmotnost
$m/z$	poměr molekulové hmotnosti a nábojového čísla
MeOH	methanol
MRM	sken jedné nebo více iontových reakcí (Multiple Reaction Monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)



MS/MS	tandemová hmotnostně spektrometrická detekce
OFAT	one factor at a time
$P$	rozdělovací koeficient oktanol/voda
$pK_a$	záporně vzatý logaritmus kyselé disociační konstanty
Scan	základní sken - sken hmotnostních spekter v určitém rozsahu $m/z$
SIM	selektivní záznam vybraného iontu (Selected Ion Monitoring)
SPE	extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction)
$t$	čas (min)
$T_{1/2}$	poločas eliminace (h)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)
TOF	analyzátor doby letu (Time of Flight)
RT	laboratorní teplota (Room Temperature, 25 °C)
UHPLC	ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie (Ultra-High Performance Liquid Chromatography)
UTLC	ultra tenkovrstvá chromatografie (Ultrathin-Layer Chromatography)
UV	ultrafialová oblast (ultraviolet)
$v/v$	objem/objem
$V_d$	distribuční objem (l)

# 1 ÚVOD

Benzodiazepiny jsou široce využívány ve farmakoterapii pro své anxiolytické, sedativní, hypnotické a myorelaxační účinky, zprostředkované ovlivněním GABA<sub>A</sub> receptorů v mozku. Ruku v ruce s rozšířením těchto léků v klinické praxi šla i vzrůstající četnost intoxikací benzodiazepiny. Ačkoliv je toxicita benzodiazepinů obvykle klasifikována jako nízká, zejména ve srovnání s jejich předchůdci – barbituráty, mohou i ony způsobovat problémy [1]. Středně toxické projevy jsou vyvolány přibližně až dvacetinásobkem terapeutické dávky, šedesátinásobek potom může být letální, přičemž však toxicita výrazně stoupá při kombinaci s alkoholem, opiáty nebo tricyklickými antidepresivy [2]. Kromě intoxikací se sebevražedným úmyslem, bývají benzodiazepiny zneužívány v kriminálních případech, například k ovládnutí oběti [3]. Tudíž jsou benzodiazepiny často stanovovány jak v klinických, tak ve forenzních případech, což si žádá zavedení spolehlivých a citlivých metod jejich detekce v biologických matricích. Spojení separačních metod jako je kapalinová nebo plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí je proto častou volbou.

Velmi často analyzovanou biologickou matricí pro prokázání přítomnosti benzodiazepinů je moč, vzhledem k jejich vyšším koncentracím a zároveň delší persistenci [4]. Benzodiazepiny jsou v těle intenzivně metabolizovány, aby se tak usnadnilo jejich vylučování, proto jsou v moči původní formy léčiva přítomny pouze ve velmi malém množství. Hydrolýza metabolitu, tedy konjugátu kyseliny glukuronové a benzodiazepinů, je proto ke zlepšení citlivosti detekce nezbytná. Enzymatická hydrolýza glukuronidů může být co do účinnosti méně efektivní a časově náročnou variantou, je však v posledních letech stále více využívána. Vzhledem k její šetrnosti a zachování původní struktury léčiva tento postup nabízí možnost přesněji určit původně podané léčivo. Optimalizací podmínek enzymatické hydrolýzy lze zvýšit efektivitu a zároveň omezit čas nutný ke zpracování vzorku.

Výrazné urychlení procesu optimalizace podmínek enzymatické hydrolýzy může přinést použití přístupu plánování experimentů („Design of experiment“), kdy se současně mění více faktorů, které by mohly mít vliv na účinnost enzymu. Použitím této statistické metody lze značně snížit počet experimentů, nutných k optimalizaci podmínek enzymatické reakce. V odborné literatuře lze sice vypátrat několik prací,

zabývající se porovnáváním účinnosti  $\beta$ -glukuronidas z různých zdrojů [5, 6], avšak zřídka se soustředí na vhodnost použitých podmínek reakce a jejich optimalizaci (nebo to nezmiňují).

Předkládaná práce vznikla ve spolupráci s laboratoří Ústavu soudního lékařství a toxikologie, Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy. Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat UHPLC metodu s hmotnostní detekcí pro screening 17 benzodiazepinů a jejich metabolitů, která by byla vhodným nástrojem k prokázání léčiva v moči intoxikovaného pacienta. Dále s využitím statistické metody plánování experimentů (Design of Experiments, DOE) optimalizovat postup a podmínky enzymatické hydrolyzy glukuronidů benzodiazepinů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Benzodiazepiny

#### 2.1.1 Farmakologické indikace

Psychofarmaka patří v dnešní době celosvětově k jednomu z nejčastěji předepisovaných léčiv. Do této skupiny látek patří i benzodiazepiny (BZDs) a díky jejich širokému spektru farmakologických vlastností jsou jedny z nejčastěji používaných látek pro léčbu poruch centrálního nervového systému [7].

Benzodiazepiny se používají k potlačení strachu, napětí a úzkosti (anxiolytika), ke zklidnění a utlumení pacienta (sedativa), jako látky navozující spánek (hypnotika) a dále pak je možno je využít k uvolnění křečí (myorelaxancia) či jako antiepileptika [8].

Vůbec první benzodiazepin, chlordiazepoxid, byl syntetizován v 50. letech minulého století rakouským chemikem L. H. Sternbachem, pracujícím pro farmaceutickou firmu Hoffman-La Roche. V 60. letech, po prokázání jeho sedativně hypnotických účinků, byl uveden na trh. Nedlouho poté následoval objev mnohem známějšího diazepamu, prodávaného pod obchodním názvem Valium. V následujících desetiletích bylo připraveno přes 50 dalších derivátů benzodiazepinů.

Jednotlivé benzodiazepiny se mezi sebou liší farmakokinetickými vlastnostmi jako je doba jejich účinku v organismu a následná rychlost jejich vyloučení. Tyto údaje jsou důležité mimo jiné pro stanovení správného dávkování. Podle průměrné doby vylučování z organismu je můžeme dělit na benzodiazepiny s ultrakrátkým, krátkým až středně dlouhým a dlouhým působením. Srovnávacím faktorem je v tomto případě eliminační poločas ( $T_{1/2}$ ), tedy doba, za kterou je organismus schopen vyloučit polovinu podané látky. Každá skupina je potom vhodná na jiný typ léčby. Benzodiazepiny s ultrakrátkým a středním poločasem vylučování jsou s výhodou využívány jako hypnotika, k léčbě nespavosti, zatímco benzodiazepiny s dlouhou dobou eliminace se používají jako anxiolytika, k léčbě úzkostí. Hodnoty biologického poločasu a další farmakokinetické parametry benzodiazepinů studovaných v této práci jsou uvedeny v tab. 1.

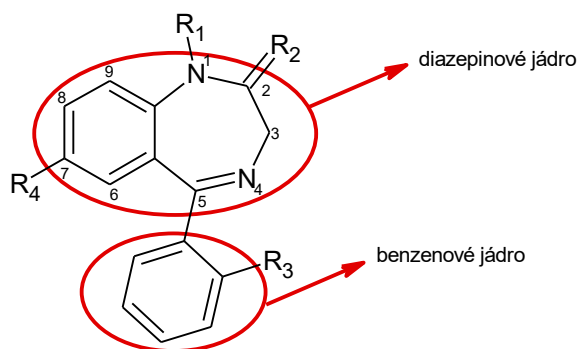
**Tab. 1:** Přehled vybraných obchodních názvů benzodiazepinů, používaných terapeutických rozmezí a jejich toxické hladiny, obojí měřené v plazmě (ng/ml).  $T_{1/2}$  je eliminační poločas léčiva [9].

Látka	Obchodní název	Koncentrace v plazmě (ng/ml)		
		Terapeutické rozmezí	Toxická od	$T_{1/2}$ (h)
Alprazolam	Xanax, Neurool	5-80	100-400	6-20
Midazolam	Dormicum	40-250	1000-1500	1,5-3
Bromazepam	Lexaurin	50-200	300-400	8-22
Clonazepam	Rivotril	4-80	100	20-60
Flunitrazepam <sup>a)</sup>	Rohypnol	5-15	50	10-30
Lorazepam <sup>a)</sup>	Loram, Tavor	20-250	300-500	10-40
Oxazepam	Serax	200-1500	2000	6-20
Temazepam <sup>a)</sup>	Levanxol	20-900	1000	6-25
Diazepam	Valium	100-2500	3000-5000	24-48
Medazepam	Ansilan	100-1000	600	2-5

<sup>a)</sup> léčivo není v České republice v distribuci[10]

## 2.1.2 Struktura

Další přirozené dělení benzodiazepinů je podle jejich struktury. Můžeme je rozdělit do dvou hlavních skupin: (a) jednoduché 1,4-BZDs (bromazepam, clonazepam, diazepam, chlordiazepoxid, lorazepam, medazepam, nitrazepam, flunitrazepam, oxazepam, temazepam, medazepam) (b) heterocyklické 1,4-BZDs (alprazolam, midazolam) mající na základní strukturu připojený další, heterocyklický kruh. Základní struktura benzodiazepinů je tvořena napojením benzenového jádra na sedmičlenný diazepinový kruh v poloze pět [11] (viz obr. 1).

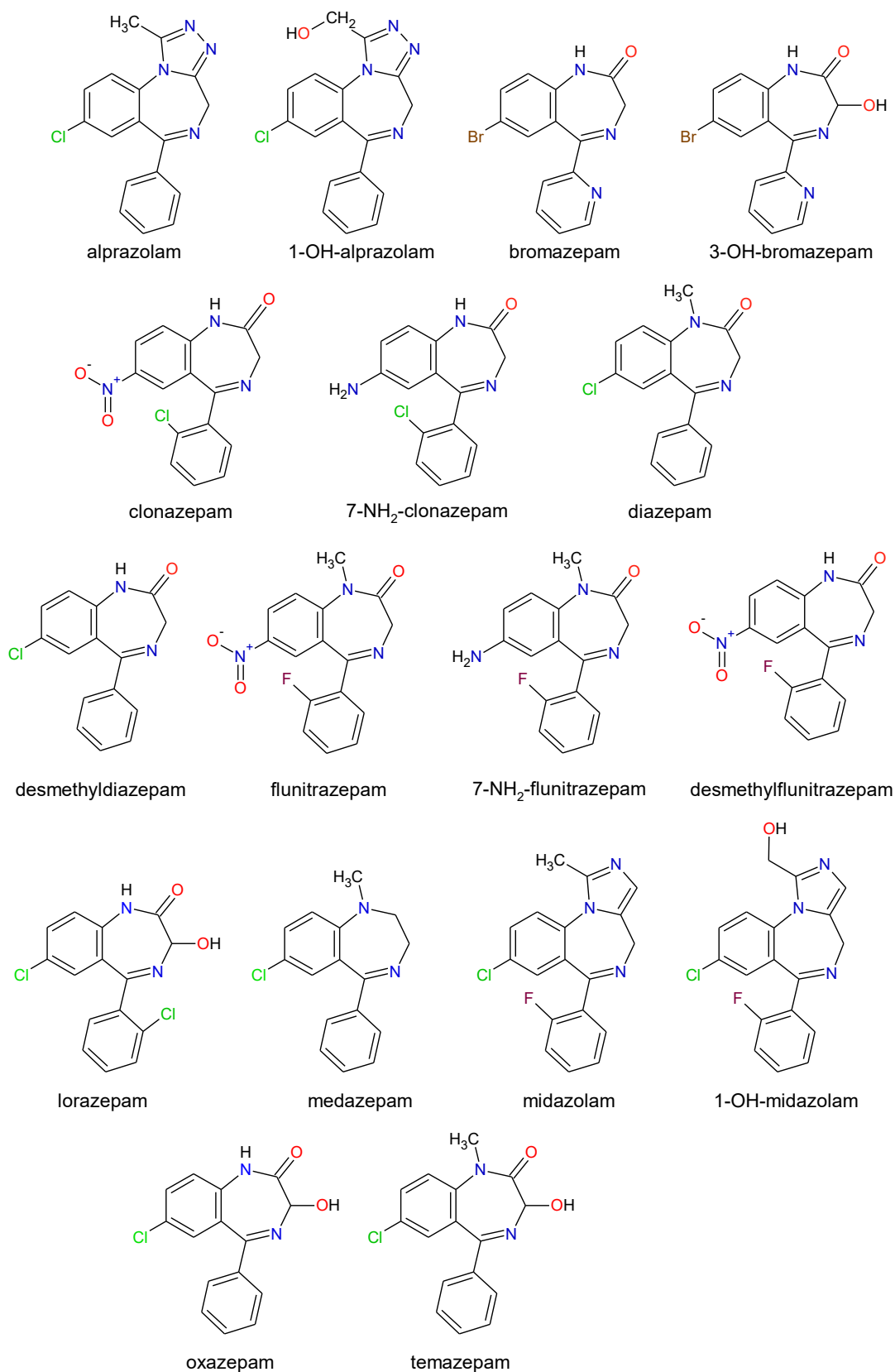


**Obr. 1:** Základní chemická struktura 1,4-BZD.

Pro početnější skupinu benzodiazepinů, tedy jednoduché 1,4-benzodiazepiny, může být charakterizován vztah mezi strukturou a aktivitou následovně. Substituce na uhlíku v pozici 7 má rozhodující vliv na aktivitu u širokého spektra benzodiazepinových derivátů. Nejčastěji se jedná o substituci nitro skupinou nebo atomy Br, Cl, F (schopnost zvyšovat aktivitu  $\text{NO}_2 > \text{Br} > \text{Cl} > \text{F} = \text{H}$ ) (flunitrazepam, nitrazepam, clonazepam). Substituce methylovou skupinou v pozici 1 (diazepam) zvyšuje lipofilitu, biologickou aktivitu látky a zároveň usnadňuje absorpci z gastrointestinálního traktu (GIT) [12]. Lipofilita látek (a především léčiv) se vyjadřuje jako logaritmus rozdělovacího koeficientu  $\log P$  (viz kapitola 2.2). Základní fyzikálně-chemické vlastnosti studovaných benzodiazepinů a jejich metabolitů jsou uvedeny v tab. 2 a jejich struktura je znázorněna na obr. 2.

**Tab. 2:** Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti studovaných benzodiazepinů, kde  $M_r$  je relativní molekulová hmotnost a  $\log P$  je logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda [13].

název látky	CAS	$M_r$	$\log P$
1-OH-midazolam	59468-90-5	341,77	3,16
3-OH-bromazepam	13132-73-5	332,16	2,26
midazolam	59467-70-8	325,77	3,97
1-OH-alprazolam	37115-43-8	324,76	2,21
lorazepam	846-49-1	321,16	3,53
clonazepam	1622-61-3	315,71	3,15
bromazepam	1812-30-2	316,16	2,54
flunitrazepam	1622-62-4	313,29	2,55
alprazolam	28981-97-7	308,77	3,02
temazepam	846-50-4	300,74	2,79
desmethylflunitrazepam	2558-30-7	299,26	2,69
oxazepam	604-75-1	286,72	2,92
7-NH <sub>2</sub> -clonazepam	4959-17-5	285,73	2,38
diazepam	439-14-5	284,70	3,08
7-NH <sub>2</sub> -flunitrazepam	34084-50-9	283,31	1,79
desmethyldiazepam	1088-11-5	270,76	3,21
medazepam	2898-12-6	270,76	4,21



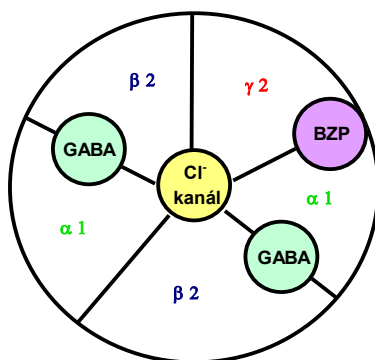
**Obr. 2:** Struktury studovaných benzodiazepinů.



### 2.1.3 Působení na receptory GABA (farmakodynamika)

Benzodiazepiny ovlivňují různé části lidského mozku například míchu (tonus svalů), mozeček (koordinace vůlí ovládaných pohybů), mozkový kmen (hypnotická a antiepileptická aktivita), vnitřní mozek a mozkovou kůru (emoční reakce). Z počátku se myslelo, že benzodiazepiny působí na centrální nervovou soustavu nespecificky [14]. Později bylo prokázáno, že působení benzodiazepinů spočívá v ovlivňování receptorů kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné (GABA) [15].

Kyselina  $\gamma$ -aminomáselná je důležitým inhibičním neurotransmiterem v centrální nervové soustavě (CNS) savců kontrolující vzrušivost neuronů. Primárně působí na receptor  $GABA_A$ , což je ionotropní transmembránový receptor, umístěný v membránách postsynaptických neuronů a zároveň fungující jako ligandem řízený iontový kanál [16-18]. Receptor  $GABA_A$  je pentamer skládající se ze tří různých podjednotek ( $2x\alpha$ ,  $2x\beta$ ,  $\gamma$ ), přičemž pro každou z těchto podjednotek existuje mnoho isoform [11]. Mezi těmito podjednotkami najdeme dvě vazebná místa pro  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinu, jakožto endogenní ligand, a jedno alosterické vazebné místo pro různá xenobiotika včetně benzodiazepinů (viz obr. 3).



**Obr. 3:** Schematická struktura  $GABA_A$  receptorového proteinu s vyznačenými vazebnými místy pro GABA a BZD a s rozmístěním jednotlivých podjednotek ( $2 \times \alpha 1$ ,  $2 \times \beta 2$  a  $1 \times \gamma 2$ ), které vytvářejí kanál pro chloridové ionty.

Navázání benzodiazepinů na receptor způsobí zesílení inhibičního účinku kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné [19]. Takováto aktivace postsynaptických  $GABA_A$  receptorů vede k hyperpolarizaci buněčné membrány v důsledku zvýšení frekvence otevírání chloridového kanálu, vedoucí ke vstupu chloridových iontů do buňky. Touto kaskádou dojde k prohloubení postsynaptického inhibičního potenciálu projevujícího se sníženou

vzrušivosti (excitabilitou) buněk CNS [11]. Rozdíl v působení jednotlivých benzodiazepinů spočívá v tom, jak silně se na receptor váží. Na tento receptor působí nejen benzodiazepiny, ale i barbituráty, nebenzodiazepinová hypnotika či ethanol [20].

## 2.2 Metabolismus léčiv v organismu

Hlavní procesy řídící transport a distribuci léčiv v organismu mohou být vyčleněny do tří fází: (a) adsorpce z místa aplikace, (b) distribuce léčiva v organismu a (c) biotransformace léčiva, jeho eliminace a exkrece.

### 2.2.1 Absorpce

Pro účinek léčiva je nezbytné, aby se z místa aplikace dostalo do krevního řečiště, a tak i k cílovému orgánu svého působení. Rychlost a rozsah absorpce léčiva jsou významně ovlivněny způsobem podání. Snad jen s výjimkou intravenosního podání je prvním procesem absorpce léčiva z gastrointestinálního traktu (perorální podání), popřípadě z plic (inhalační podání), z místa vpichu (např. intramuskulární podání) nebo z povrchu kůže (perkutánní podání). V případě perorálního podání k hlavním fyzikálně-chemickým faktorům, které ovlivňují penetraci léčiva skrze žaludeční či střevní stěnu, patří lipofilita léčiv, vyjadřovaná nejčastěji jako rozdělovací koeficient. Rozdělovací koeficient  $P$  charakterizuje schopnost látky rozpouštět se v tucích (tedy i prostupovat skrze lipofilní membrány a bariéry v těle), přičemž běžně se v literatuře uvádí hodnota  $\log P$ . Přirozeně platí, že čím vyšší je hodnota  $\log P$ , tím je látka více rozpustná v tucích,

$$P = \frac{[c]_{\text{oktanol}}}{[c]_{\text{voda}}}$$

kde  $[c]_{\text{oktanol}}$  je koncentrace látky rozpuštěné v oktanolové fázi a  $[c]_{\text{voda}}$  je koncentrace látky rozpuštěná ve vodné fázi.

### 2.2.2 Distribuce

Léčivo je z krevního řečiště distribuováno dále do různých míst těla, přičemž míra distribuce do jednotlivých tělních kompartmentů závisí na mnoha faktorech, jako je například: prokrvenost příslušných tkání či velikost a polarita léčiva. Některé látky, především ty lipofilní, mohou být distribuovány po těle ve vazbě na proteiny krevní plasmy. Má-li léčivo projít z plazmy do dalších kompartmentů, musí překonat buněčné

bariéry, například hematoencefalickou bariéru (chránící mozek) nebo placentární bariéru (chránící plod). Překonání těchto bariér léčivem může být nežádoucí a vést například k poškození vývoje plodu, na což je třeba brát zřetel zvláště u léčiv lipofilních, která mohou tyto bariéry překonávat poměrně snadno.

Distribuční objem  $V_d$  je dalším ze zaváděných charakteristik léčiva, je to konstanta závislá na chemické struktuře. Vyjadřuje teoretický objem, ve kterém by se muselo celkové množství podaného léku teoreticky rozpustit, aby bylo dosaženo stejné koncentrace léčiva ( $c$ ) jako v plasmě.

$$V_d[l] = \frac{\text{dávka [mg]}}{c[\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}]}$$

### 2.2.3 Biotransformace a exkrece

Než se ovšem léčivo dostane do oběhu, dochází k presystémové eliminaci. Tento jev se nejvýrazněji uplatňuje u perorálního podání, přičemž v různé míře dochází k negativnímu ovlivnění množství biologické dostupnosti léčiva. Množství látky, které se dostane do oběhu, je ovlivněno řadou faktorů. Může docházet k přeměně látky v játrech, neúplné absorpci v GIT, částečnému rozkladu látky v žaludku vlivem pH nebo rozkladu látky působením střevní mikroflóry. Různou kombinací těchto faktorů dochází k tomu, že perorálně podané množství látky je sníženo.

Majoritní úlohu v presystémové eliminaci hraje tzv. efekt prvního průchodu játry. Léčivo podané perorálně je vstřebáváno z tenkého střeva, odkud putuje portální žilou do hlavního biotransformačního orgánu – jater. V játrech dochází k biotransformaci různého podílu podaného léčiva, s cílem látku učinit polárnější a tím ji vyloučit z organismu. Z hlediska účinku léčiva může tímto způsobem dojít ke dvojí přeměně: (a) biodeaktivaci, kdy vzniklý metabolit je farmakologicky méně účinný nebo neúčinný; (b) bioaktivaci, kdy se podané (pro)léčivo mění na farmakologicky účinný metabolit.

Přeměny léčiv v těle lze rozdělit do dvou biotransformačních fází. Během první fáze biotransformace dochází, pomocí hydrolytických, redukčních nebo oxidačních reakcí, k zavádění či k transformaci již stávajících funkčních skupin ve snaze vytvořit polární metabolit. Biotransformační reakce druhé fáze se označují také jako konjugační. Za pomoci enzymů transferas při nich dochází ke kovalentnímu navázání konjugačního činidla na funkční skupinu metabolitu (nebo léčiva). Konjugační činidla jsou endogenní

látky, například glutathion, glycin, kyselina glukuronová, sírová nebo octová. Takto vznikají neaktivní polární konjugáty, které mohou být rychle vylučovány do moči nebo do stolice. Konjugáty s vyšší molekulovou hmotností jsou převážně vylučovány do žluči a mohou být v přítomnosti střevních bakteriálních reduktas opět štěpeny na původní léčivo, čímž dochází k enterohepatální cirkulaci a prodlužování biologického účinku léčiva [8].

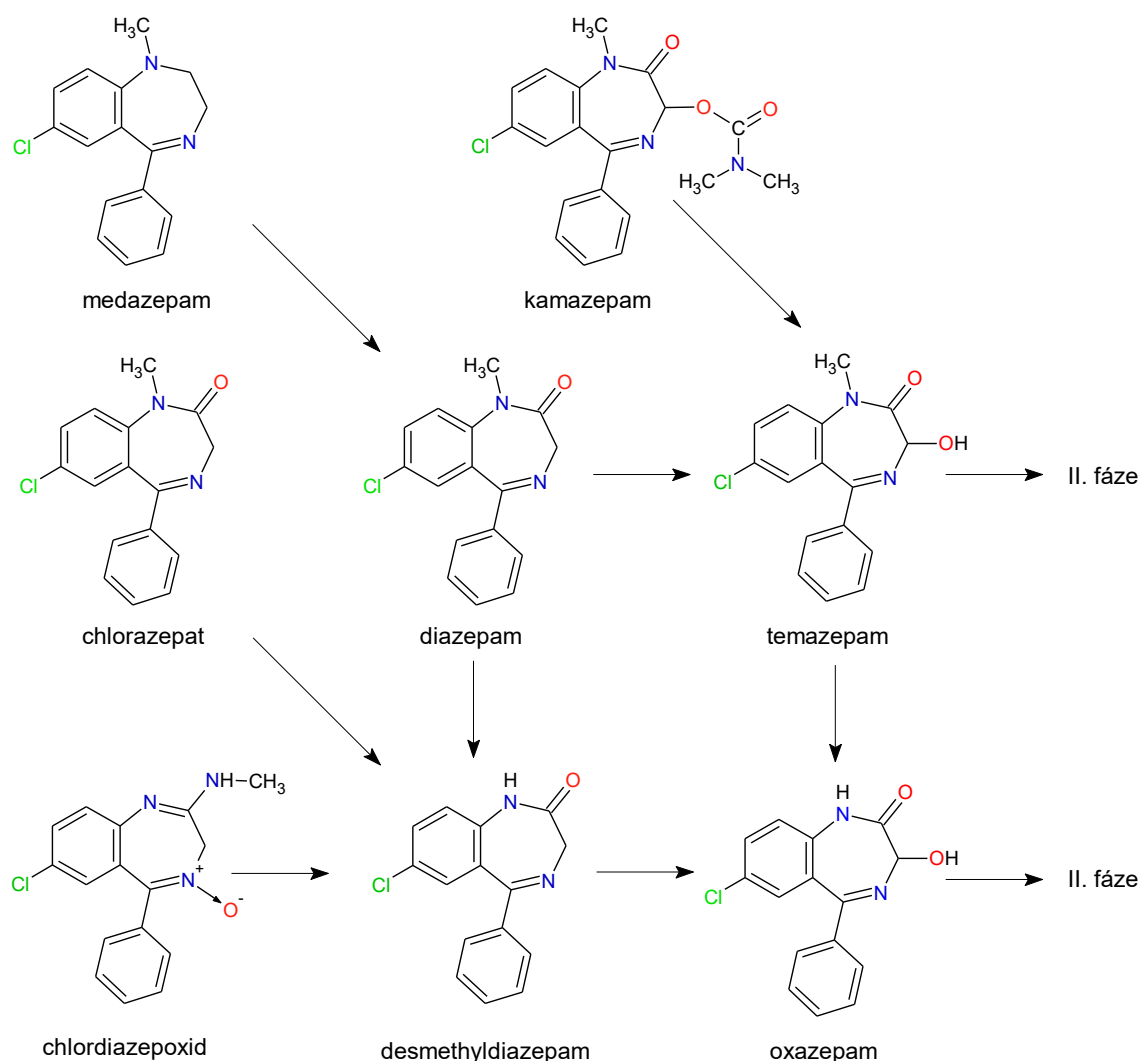
#### **2.2.4 Farmakokinetika benzodiazepinů**

Benzodiazepiny se v případě většiny indikací podávají perorálně, z gastrointestinálního traktu jsou rychle absorbovány a mají díky své značné lipofilite téměř 100% biologickou dostupnost [21]. Maximální plazmatické koncentrace bývá u většiny zástupců dosahováno po jedné hodině po podání, avšak například oxazepam, lorazepam a temazepam mají nástup účinku pomalejší. Po vstupu do oběhu jsou transportovány ve vazbě na plazmatické proteiny, například diazepam je téměř z 99-ti % vázán na albumin, alprazolam pouze ze 70-ti %; biologicky aktivní jsou pouze volné formy léčiva [22]. Vysoká lipofilita a zároveň vaznost na plazmatické proteiny jsou parametry, které přispívají ke zvyšování distribučního objemu těchto léčiv. Lipofilita, která na jedné straně umožňuje pronikání hematoencefalickou bariérou a centrální působení těchto léčiv na straně druhé, způsobuje nežádoucí pronikání benzodiazepinů skrz placentu nebo do mateřského mléka, zároveň také dochází k jejich akumulaci v tukové tkáni.

Benzodiazepiny jsou v první fázi biotransformovány pomocí mikrosomálního systému cytochromu P450, kdy dochází k jejich dealkylaci na N1 a hydroxylaci na C3. Právě hydroxylace na C3 uhlíku umožňuje v druhé fázi biotransformace konjugaci benzodiazepinů s glukuronovou kyselinou. Oxazepam a lorazepam jsou glukuronovány přímo, bez předchozí biotransformace. V každém případě je výsledkem biotransformace metabolit rozpustný ve vodě a může být tedy vyloučen z těla ledvinami. Některé metabolity si zachovávají farmakologickou aktivitu původní látky, základním účinným metabolitem několika zástupců benzodiazepinů (diazepam, pramazepam, chlordiazepoxid, klorazepát, aj.) je desmethyldiazepam, který je pak dále přeměňován na oxazepam. Z toho vyplývá, že některé metabolity mohou být jednoznačnými markery konkrétního benzodiazepinu, a naopak jiné metabolity, mohou být společným

výsledným produktem přeměn více různých benzodiazepinů. Například v moči nalezený metabolit 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, lze považovat za specifický ukazatel požití flunitrazepamu, toto analogicky platí i pro nalezený redukovaný metabolit clonazepamu a nitrazepamu [23]. Naopak je-li v moči nalezen oxazepam, nelze přesněji určit, který benzodiazepin byl aplikován. Schéma biotransformací benzodiazepinů je pro názornost uvedeno na obr. 4.

Podle hodnoty biologického poločasu mohou být benzodiazepiny rozděleny na (a) krátkodobě účinné (oxazepam, midazolam), (b) střednědobě účinné (bromazepam, flunitrazepam, alprazolam, lorazepam, temazepam) a (c) dlouhodobě účinné (diazepam, medazepam) [8]. Avšak rozřazení jednotlivých zástupců benzodiazepinů do těchto skupin není ustálené a různí se.



**Obr. 4:** Ukázka některých reakcí první fáze biotransformace vedoucí ke vzniku identických metabolitů desmethyldiazepamu, temazepamu a oxazepamu [12, 24].

### 2.3 Metody pro analýzu benzodiazepinů

V posledních letech bylo publikováno velké množství metod pro screening a kvantifikaci (analýzu) benzodiazepinů, případně pro analýzu širšího spektra psychoaktivních látek, zahrnujících mimo jiné i benzodiazepiny z nejrůznějších matic především biologické povahy [12, 21]. Chromatografické metody mají v tomto ohledu stále největší zastoupení. Nejčastější metodou separace je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (LC), nejčastěji spojená s tandemovou hmotnostní detekcí (MS/MS) či s hmotnostní detekcí s analyzátozem doby letu (TOF-MS) [25]. Dalšími často využívanými detektory jsou UV detektor či detektor diodového pole (DAD) [26].

Méně často se při analýze benzodiazepinů využívá plynová chromatografie (GC), pokud ano, je nejčastěji v kombinaci s hmotnostním (MS) [27] detektorem nebo s detektorem elektronového záhytu (ECD) [28]. Důvodem pro upozadění plynové chromatografie pro detekci těchto analytů je tepelná nestabilita a zároveň nedostačující těkavost některých benzodiazepinů, a to i po derivatizaci [29-31].

Navzdory nepopíratelné převaze čistě chromatografických metod, se objevují případy využití metod v tomto ohledu spíše alternativních jako jsou imunoanalytické metody [32-34], voltametrie [35, 36] či potenciometrie [37]. K analýze benzodiazepinu je taktéž možné využít metodu kapilární elektroforézy [38, 39].

Většina analýz je prováděna v systému HPLC s reverzními fázemi, mezi nejpoužívanější stacionární fáze patří oktadecylová (C18), oktylová (C8) či fenyl-hexylová fáze. Jako mobilní fáze se často používá kombinace acetonitrilu či methanolu a vody, v mnoha případech s okyselením mravenčí nebo octovou kyselinou, nebo s použitím pufru a gradientové eluce převažují nad isokratickými. Vybrané podmínky separace benzodiazepinů pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí jsou uvedeny v tab. 3.

**Tab. 3:** Přehled vybraných LC-MS/MS metod pro analýzu benzodiazepinů z biologických matric.

analyty (počet)	stacionární fáze (kolona)	mobilní fáze	typ eluce a průtok	matrice	cit.
BZD (26)	XTerra MS C18 (150 × 2,1 mm, 3,5 μm)	A: voda s 0,1 % mravenčí kyseliny B: methanol	gradient, 0,2 ml/min	krev, moč	[40]
BZD (23)	Uptisphere ODB C18 (150 × 2 mm, 5 μm)	A: vodný roztok 2 mM mravenčanu amonného (pH 3) B: acetonitril	gradient, 0,2 ml/min	krev, moč	[41]
BZD (11)	Rocket EPS C18 (30 × 2.1 mm, 1.5 μm)	A: vodný roztok 0,01 M mravenčanu amonného (pH 3) B: acetonitril (A : B,62:38, v/v)	isokraticky, 0,2 ml/min	moč	[42]
BZD (5)	Gemini C18 column (150 × 2,0 mm, 3,5 μm)	A: voda s 0,1 % mravenčí kyseliny B: methanol	gradient, 0,2 ml/min	moč	[43]
BZD (8)	Waters Symmetry C18 (100 × 2,1 mm, 3,5 μm)	A: vodný roztok 5 mM octanu amonného (pH 5) B: acetonitril	gradient, 0,3 ml/min	moč	[44]
BZD (19)	XTerra MS C18 (150 × 2.1 mm, 5 μm)	A: vodný roztok 2 mM mravenčanu amonného (pH 3) B: acetonitril a vodný roztok 2 mM mravenčanu amonného (pH 3) (v/v, 90/10)	gradient, 0,2 ml/min	moč	[45]
BZD (4)	Uptisphere ODB C18 (150 × 2 mm, 5 μm)	A: vodný roztok 2 mM mravenčanu amonného (pH 3) B: acetonitril	gradient, 0,2 ml/min	moč, vlasy	[46]
BZD (8)	Xterra MS C18 (50 × 3,0 mm, 2,5 μm)	A: vodný roztok 5 mM octanu amonného s 0,05 % octové kyseliny B: acetonitril	gradient, 0,8 ml/min	moč	[47]



Pokračování **tab. 3**

analyty (počet)	stacionární fáze (kolona)	mobilní fáze	typ eluce a průtok	matrice	cit.
BZD (15)	Phenomenex Luna phenyl hexyl (50 × 2 mm, 3 μm)	A: vodný roztok 2 mM mravenčanu amonného B: acetonitril	gradient, 0,2 ml/min	vlasý, nehty	[48]
BZD (21)	Eclipse XBD C18 (50 × 4,6 mm, 1,8 μm)	A: voda B: methanol	gradient, 1 ml/min	moč	[49]
BZD (rac-lorazepam)	Chiralpak OD-R (250 × 4,6 mm, 10 μm)	A: voda B: acetonitril C: octová kyselina (80:20:0,1 v/v/v)	isokraticky, 1 ml/min	plasma	[50]
BZD (18)	Resteck Allure PFP Propyl (100 × 2,1 mm, 5 μm)	A: vodný roztok 20 mM octanu amonného s 0,1 % mravenčí kyseliny (pH 4) B: acetonitril	gradient, 0,2 ml/min	vlasý	[51]
BZD (14)	XTerra MS C8 (100 × 2,1 mm, 3,5 μm)	A: voda s 0,1 % mravenčí kyseliny B: acetonitril	gradient, 0,2 ml/min	vlasý	[52]

## 2.4 Metody pro zpracování biologických vzorků pro analýzu benzodiazepinů

Biologické materiály vhodné pro použití k detekci, případně kvantifikaci benzodiazepinů, mohou být rozděleny do dvou skupin: (a) konvenční: plná krev [53, 54], sérum/plasma [50, 55], moč a (b) alternativní: vlasy [40, 56], nehty [48], sliny [57, 58], sklivec [59]. V posledních letech se také v literatuře objevují analýzy ze zcela netypických matric, jako jsou otisky prstů [60] nebo vydechované plyny [61]. Benzodiazepiny a jejich metabolity mohou být, mimo jiné, stanovovány například v odpadních vodách [62].

Ačkoliv volba způsobu přípravy vzorku závisí na mnoha faktorech (vlastnosti matrice i analytu, cíl analýzy, atd.), pro izolaci benzodiazepinů z biologických matric se naprosto dominantně užívá extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) či extrakce na tuhé fázi (SPE). Tyto techniky předpřípravy vzorku se s výhodou používají jednak z důvodu zakoncentrování analytů v menším objemu cílového rozpouštědla, a také k přečištění. Pokud to charakter přirozené biologické matrice dovoluje, je možné vzorky analyzovat bez předchozí extrakční procedury, což značně zjednodušuje a urychluje celý proces přípravy vzorku. Tento postup je možné aplikovat u vzorků plasmy/séra [63], slin [64] nebo moči [65], avšak před samotnou analýzou je nutné precipitovat (a následně oddělit filtrací nebo centrifugací) přítomné proteiny, například pomocí methanolu s 0,1 % obsahem mravenčí kyseliny [65] nebo acetonitrilem [64], aby se předcházelo jejich vysrážení v koloně v průběhu analýzy.

Benzodiazepiny a jejich metabolity první fáze biotransformace mohou být konjugovány s kyselinou glukuronovou případně sírovou. Míra četnosti výskytu konjugovaných metabolitů jednak koresponduje s dobou uplynulou od expozice léčivu a také s typem matrice [24]. Vzhledem k tomu, že většina benzodiazepinů je intenzivně metabolizována, lze původní formu prokázat jen v séru (nebo žaludečním obsahu), zatímco v moči musí k identifikaci původní látky postačovat nález metabolitů, který odkazuje na určitou skupinu strukturně podobných látek, podléhajících stejným biotransformačním reakcím. Glukuronidy přítomné v moči je proto nutné hydrolyticky rozštěpit, aby byla umožněna analýza příslušných analytů. Štěpení je možno provádět pomocí tzv. kyselá hydrolyzy kyselinou chlorovodíkovou, s čímž se však pojí nemalé

komplikace (viz kapitola 3.9). Poměrně nově se proto k hydrolýze glukuronidů využívají enzymy, vykazující hydrolytickou aktivitu, a to glukuronidasy a sulfatasy.

Vzhledem k vyšším koncentracím a zároveň delšímu přetrvání (persistenci) benzodiazepinů v moči (v porovnání například s krví) je moč, jakožto biologická matrice pro průkaz benzodiazepinů, například ve forenzní analýze, velmi často využívána. Na druhou stranu v případech akutních otrav či pro posouzení vlivu léčiva na pozornost (řízení automobilů) poskytuje mnohem více vypovídající hodnotu koncentrace léčiva v krvi [4].

Vybrané způsoby zpracování vzorků moči a zejména podmínky enzymatické hydrolýzy jsou shrnuty v tab. 4.

**Tab. 4:** Přehled vybraných postupů pro zpracování vzorků moči a podmínek enzymatické hydrolýzy pomocí  $\beta$ -glukuronidasy pro analýzu benzodiazepinů.

analyty (počet)	příprava	zdroj enzymu	pufř, pH	teplota (°C)	čas (h)	podmínky extrakce	detekce	cit.
BZD (3)	1 ml vzorku, 50 $\mu$ l pufřu, 100 $\mu$ l enzymu	$\beta$ -glukuronidasa ( <i>neovedeno</i> ) 10x nařeňena na 25 kU/ml	octan sodný, pH 3,8	37	3	SPE	LC-MS/MS	[66]
BZD (3)	3 ml vzorku, 0,9 ml pufřu, 0,1 ml enzymu	$\beta$ -glukuronidasa z <i>Helix pomatia</i> 143 kU/ml	Britton-Robinson pufř, pH 4,6	56	2-3	SPE	voltametrie	[35]
BZD (7)	1 ml vzorku, 0,2 ml pufřu, 5500 U enzymu ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> pH 9,3)	$\beta$ -glukuronidasa z <i>Helix pomatia</i> 112,4 kU/ml	2 M octan sodný, pH 4,5	56	1,5	SPE	UTLC, AP-MALDI-MS, AP-MALDI-MS/MS	[67]
BZD (8)	0,5 ml vzorku, 0,5 ml pufřu, 4500U (0,5 ml fosfát. pufř 0,1M, pH 7,5)	$\beta$ -glukuronidasa (Typ L- II, z <i>Patella vulgata</i> 1-3 MU/g	0,1 M octan sodný, pH 4	60	2	SPE	LC-MS/MS	[44]
BZD (rac-lorazepam)	0,1 ml vzorku, 1 ml pufřu, 50 $\mu$ l enzymu (80 $\mu$ l NaOH=pH 10)	$\beta$ -glukuronidasa z <i>Helix pomatia</i> HP2 typ	0,25 M octan sodný, pH 5	37	16	LLE (methyl <i>tert</i> -butyl ether)	LC-MS/MS	[50]
BZD (21)	3 ml vzorku, 2 ml pufřu, 50 $\mu$ l enzymu (3 ml fosfátového pufřu pH 7,5)	$\beta$ -glukuronidasa z <i>Helix pomatia</i>	fosfátový pufř, pH 6	55	1	LLE (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> a propanol)	LC-MS/MS	[49]

Pokračování **tab. 4** (2/3)

analyty (počet)	příprava	zdroj enzymu	pufř, pH	teplota (°C)	čas (h)	podmínky extrakce	detekce	cit.
BZD (35)	1 ml vzorku, 1 ml pufřu, 10000 U enzymu (1 ml 1,5 M uhličitán sodný)	$\beta$ -glukuronidasa 90 kU/ml a sulfatasa 10 kU/ml)	octán sodný, pH 5,2	37	4	LLE (CHCl <sub>3</sub> a IPA)	LC-TOF-MS	[68]
BZD (41)	0,5 ml vzorku, 10000 U enzymu (3 ml 0,1 M borát. pufř pH 9)	$\beta$ -glukuronidasa	1 M octán draselný, pH 5	55	4	LLE (chlorbután)	LC-TOF-MS	[25]
BZD (4)	0,5 ml vzorku, pufřováno, enzym 2800 U (0,2 ml NH <sub>4</sub> Cl pH 9,6 pomocí NH <sub>4</sub> OH)	$\beta$ -glukuronidasa z <i>Helix pomatia</i>	1 M octán sodný pH 4,5	56	1,5	LLE (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	sweeping CE	[39]
BZD (13)	0,5 ml vzorku, 0,1 ml enzymu	$\beta$ -glukuronidasa z <i>E. coli</i>	neuveđeno	60	1,5	bez extrakce precipitace 1 ml MeOH 0,2 % HCOOH	UPLC-MS/MS	[65]
BZD (5)	1 ml vzorku, 2 ml pufřu, 50 $\mu$ l enzymu	$\beta$ -glukuronidasa z <i>E. coli</i>	0,1 M octán sodný, pH 4,5	70	0,5	SPE	GC-MS	[69]
BZD (6)	1 ml vzorku, 2 ml pufřu, 50 $\mu$ l enzymu nad 5 kU	$\beta$ -glukuronidasa z <i>Helix pomatia</i>	0,1 M octán sodný, pH 4,5	70	0,5	SPE	GC-MS	[6]

Pokračování **tab. 4** (3/3)

analyty (počet)	příprava	zdroj enzymu	pufr, pH	teplota (°C)	čas (h)	podmínky extrakce	detekce	cit.
BZD (6)	1 ml vzorku, 2 ml pufru, 50 µl enzymu nad 5 kU	β-glukuronidasa z <i>Haliotis sp.</i> (ušeň)	0,1 M octan sodný, pH 4,5	70	0,5	SPE	GC-MS	[6]
BZD (15)	1 ml vzorku, 2 ml pufru, 5500 U enzymu (hydroxid sodný a fosfát pufr na pH 6,8)	β-glukuronidasa z <i>Helix pomatia</i>	0,2 M octan sodný, pH 4,5	56	1	SPE	GC-MS	[70]
BZD (9)	0,25 ml vzorku, 20 µl enzymu 20 kU/ml, 40 µl pufru	β-glukuronidasa z <i>Haliotis sp.</i> (ušeň)	0,8 M octan draselný pufr pH 4,8	65	0,5	bez extrakce	HPLC-MS/MS	[5]
rac-oxazepam, rac-lorazepam	50 µl roztoku glukuronidu a 0,55 ml vody, 0,1 ml enzymu	β-glukuronidasa z <i>Helix pomatia</i> 10x naředěna na 8940 U/ml	0,2 M octan sodný, pH 5,8	25 60	24 1	bez extrakce (0,3 ml MeOH precipitace)	GC-MS	[71]
BZD (11)	1 ml vzorku, 0,2 ml pufru, 1000 U enzymu	β-glukuronidasa typ B-1 (hovězí játra)	0,5 M fosfátový pufr, pH 5	36	24	bez extrakce jen filtrace	LC-MS (APCI)	[72]
BZD (6)	1 ml vzorku 5000 U	β-glukuronidasa z <i>Helix pomatia</i>	pH 4,5	56	2	neuvedeno	GC-MS	[73]

## 2.5 Kolony, stacionární fáze, současné trendy

Kolony pro HPLC jsou vyráběny z materiálů, které jsou schopny odolávat vysokým tlakům a zároveň jsou odolné i proti chemické korozi. Nejčastěji používaným materiálem je nerezová ocel nebo kombinace nerezové oceli se sklem a polymery. Kolony tradiční délky 25 cm a průměru 4,6 mm jsou dnes stále častěji nahrazovány kratšími kolonami (2-10 cm) s menším průměrem (2-4 mm).

Běžně se používají tzv. kolony náplňové, které jsou naplněny částicemi kulovitěho tvaru o různé velikosti zrnění a míře pórovitosti. Zkracování kolon jde nutně ruku v ruce se zmenšováním velikostí částic stacionární fáze. V porovnání s tradiční velikostí zrnění 5  $\mu\text{m}$  jsou dnes stále běžněji dostupné kolony s velikostí zrn 3  $\mu\text{m}$  a méně. Výsledkem těchto miniaturizací je zkrácení doby analýzy, menší spotřeba rozpouštědel a zároveň zlepšení separační účinnosti kolon (úzké a vysoké píky). K dosažení vysoké účinnosti separace je nutná také úzká distribuce velikostí částic a homogenní naplnění kolon.

V HPLC separaci rozlišujeme několik separačních módů: NP-HPLC (chromatografie s normálními fázemi, tedy polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze), RP-HPLC (chromatografie s reverzními fázemi, tedy nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze) a HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí).

V současnosti nejrozšířenější technikou je separace v RP-HPLC, přičemž dominantní je použití chemicky vázaných fází na bázi silikagelových částic jakožto nosiče, které jsou dále modifikovány alkylovými řetězci, nejčastěji (C18, C8, fenyl). Formát samotného nosiče stacionární fáze také velkou měrou ovlivňuje účinnost separace. Silikagelové sorbenty mohou být:

- a) *plně porézní*, tvořené převážně difúzivními póry, nevýhodou bývá, především pro větší velikosti zrn, pomalý přenos hmoty ve stacionární fázi,
- b) *perfúzní* obsahující jednak dominující difúzivní, tak rozměrově větší tzv. through pores, skrze které může proudit mobilní fáze, což zvyšuje rychlost přenosu hmoty ve stacionární fázi a zajišťuje lepší separační účinnost
- c) *core-shell*, tedy pouze povrchově porézní částice, tvořené jádrem z neporézního silikagelu (nebo jiného polymeru) a povrchovým filmem s porézním (modifikovaným) silikagelem, díky čemuž dochází k velmi rychlému přenosu hmoty ve stacionární fázi, a tak k vysoké separační účinnosti, nevýhodou je snížená sorpční kapacita.

### 2.5.1 Příprava chemicky vázaných reverzních fází na bázi silikagelu

Obliba silikagelu jako výchozího nosiče pro následné chemické modifikace tkví především v dobře zvládnuté metodice přípravy monodispersních částic s velkou variabilitou ladění velikosti pórů. Pro HPLC se nejčastěji využívá porézní amorfní silikagel  $\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$  se specifickým povrchem v rozmezí  $50\text{-}500 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Voda je v silikagelu vázána za vzniku reaktivních silanolových skupin Si-OH, které jsou snadno kovalentně modifikovatelné. Různé typy silanolových skupin jsou na povrchu silikagelu zastoupeny v nestejně míře a zastoupení jednotlivých typů má na chromatografické chování velký vliv. Reverzní fáze jsou nejčastěji připravovány reakcí silikagelu s monofunkčním organosilanem. Tato reakce však vede ke zreagování pouhé poloviny silanolových skupin na povrchu silikagelu [74]. Volné Si-OH skupiny mohou nepříznivě ovlivňovat retence zejména bazických látek.

K přípravě kvalitní reverzní fáze je v první řadě zapotřebí, aby i používaný silikagel byl připravován z velmi čistých vstupních surovin a za přesně daných podmínek, jedině tak lze dosáhnout materiálu, který má vhodné a dobře kontrolovatelné vlastnosti.

Hlavní nevýhodou silikagelu je jeho omezená stálost v bazickém a silně kyselém pH. Pokud je pH nižší než 3 dochází ke kyselé katalyzované hydrolyze vazby mezi siloxanem a organosilanem, což vede ke ztrátám vázané fáze a tím i ke ztrátě retence hydrofobních analytů [74]. Bylo prokázáno, že připravená fáze je tím více odolná čím větší (a hydrofobnější) je navázaný alkyl [75]. Dále lze vyšší odolnost fáze v kyselém prostředí dosáhnout pomocí většího počtu kovalentních vazeb mezi silikagelami a modifikujícím silanem (bi-, tridentátní), avšak vznik takových fází je špatně reprodukovatelný. Upřednostňují se proto monofunkční organosilany, které jsou navíc stericky chráněné objemnými isopropylými či isobutylými skupinami, zajišťujícími dobré stínění siloxanové vazby proti kyselé hydrolyze.

Při hodnotách pH nad 9 dochází naopak k rozpouštění silikagelové matrice, což má za následek vznik volného prostoru v koloně a postupnou destrukci stacionární fáze [76]. Úsilí je v tomto případě zaměřeno ke zvýšení stupně pokrytí silikagelové matrice hydrofobními skupinami. Tohoto může být opět dosaženo prodloužením délky řetězců navazovaných alkylů, čímž dojde k lepšímu sterickému stínění matrice [74]. Efektivnějším způsobem jsou však dodatečné modifikující reakce tzv. endcapping



s činidly jako jsou trimethylchlorsilan nebo hexamethyldisilazanem [77]. Tyto látky díky malým rozměrům dokáží proniknout až k povrchu silikagelu a zreagovat další podíl silanolových skupin, které byly pro objemný organosilan, použitý v prvním kroku, nepřístupné. Ještě výraznějšího odstínění matrice je dosaženo pomocí násobného (double, triple) endcappingu [78].

Vedle pH je stabilita stacionární fáze výrazně ovlivňována teplotou [74]. Teplotní stabilita reverzních silikagelových stacionárních fází se pohybuje v rozmezí od 5 do 100 °C [78]. Platí ovšem, že vysoká teplota navíc v kombinaci s extrémními hodnotami pH vede k rychlejší degradaci náplně a zničení kolony.

Vybrané specifikace kolon používaných v této práci jsou uvedeny v tab. 5.

**Tab. 5:** Specifikace kolon využitých v této práci [79].

	Typ RP	Rozsah pH	Endcapping	Obsah uhlíku (%)	Velikost porů (Å)	Specifický povrch (m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> )
<b>Zorbax RRHD (100 x 2,1 mm, 1,8 μm)</b>						
Eclipse	C18	2,0-9,0	dvojitý	9	95	160
Plus	Phenyl-Hexyl	2,0-8,0	dvojitý	9	95	160
Stable	C18	1,0-8,0	ne	10	80	180
Bond	Phenyl	1,0-8,0	ne	5,5	80	180
Extend	C18	2,0-11,5 <sup>a)</sup>	dvojitý	12,5	80	180
<b>Kinetex (100 x 2,1 mm, 1,7 μm)</b>						
Core shell	Phenyl-Hexyl	1,5-8,8 <sup>b)</sup>	ano	11	100	200

<sup>a)</sup> teplotní limit je 60 °C, ale pouze pro pH < 8, pro pH 8-11 je teplotní limit 40 °C

<sup>b)</sup> v gradientových podmínkách

## 2.6 Hmotnostní detekce

Propojení separačních technik s hmotnostním spektrometrem (MS) je v poslední době stále častěji využívaným způsobem detekce v analytické chemii. Na rozdíl od jiných typů detektorů, MS vyniká zejména vysokou citlivostí a selektivitou stanovení značně univerzální škály zkoumaných analytů. Zároveň, je-li to třeba, je možno jej s výhodou využít také k identifikaci neznámých analytů na základě hmotnostních spekter. Princip MS je založený na určení hodnoty  $m/z$ , kde  $m$  je relativní molekulová hmotnost iontu a  $z$  je nábojové číslo, resp. počet elementárních nábojů daného iontu. Hmotnostní spektrometr se skládá z několika hlavních částí: (a) iontový zdroj (b) hmotnostní analyzátor (c) detektor iontů a (d) zdroj vakua.

Prvním krokem detekce iontů je zplynění analytů obsažených v mobilní fázi a jejich následná ionizace odehrávající se v iontovém zdroji. Jednotlivé ionizační techniky se obecně rozdělují na tzv. „tvrdé“ a „měkké“ na základě množství energie dodaném při ionizaci. V této práci byla použita ionizace elektrosprejem (ESI), což je měkká ionizační technika pracující za atmosferického tlaku.

Vzniklé ionty dále putují do hmotnostního analyzátoru, pracujícího už za vakua. V analyzátoru dochází k separaci iontů na základě  $m/z$ . Rozlišujeme několik typů analyzátorů vzájemně se lišící jak možným dosaženým rozlišením, tak cenou. Pravděpodobně nejvíce rozšířeným typem analyzátoru je kvadrupól. Ten je tvořen 4 paralelními tyčemi kruhového (nebo hyperbolického) průřezu, na které je vkládáno (vždy v páru na proti sobě) stejnosměrné a střídavé napětí. Ionty vstupující mezi tyče začnou vlivem napětí oscilovat. Oscilace jsou stabilní pouze pro ionty s určitým  $m/z$  a jen tyto jsou schopny kvadrupólem projít až do konce. Ostatní ionty zaniknou nárazem do tyčí. V této práci byl použit trojitý kvadrupól, tedy analyzátor tvořený třemi kvadrupóly spojenými sériově za sebou, přičemž první a třetí kvadrupól slouží jako filtry hmot a prostřední kvadrupól, v našem případě hexapól (6 tyčí), funguje jako kolizní cela. Systém trojitého kvadrupólu umožňuje sledování specifického přechodu mezi prekursorovým a produktovým iontem analytu. Analyt zakoncentrovaný v úzké zóně separací na koloně putuje do iontového zdroje, kde je převeden na iont a jako už nabitá částice je iontovou optikou veden do prvního kvadrupólu. Na výstupu z iontové kapiláry se nachází tzv. fragmentor, na který je vkládáno napětí. První kvadrupól propustí jen ionty s námi zvolenou hodnotou  $m/z$  tzv. prekursorový iont. Velikost napětí

fragmentoru je jedním z parametrů ovlivňujících vznik a intenzitu prekurzorových iontů. Prekurzorový iont je veden dále do kolizní cely (druhý kvadrupól), kde dochází na základě zvolené kolizní energie k fragmentaci a vzniku tzv. produktových iontů. Následujícím třetím kvadrupólem projde opět jen produktový iont o námi zvolené hodnotě  $m/z$ , který je následně detekován.

Ionty prošlé analyzátozem jsou zaznamenávány detektorem a signál je převeden do digitálního formátu. Nejčastěji se používají detektory fungující na principu elektronového násobiče nebo fotonásobiče. Elektronový násobič je tvořen soustavou dynod se vzrůstajícím potenciálem. Ionty z hmotnostního analyzátozem narážejí na povrch dynody. Tento náraz způsobuje sekundární emisi elektronů, které jsou přitahovány dalšími dynodami v sérii, postupně díky násobné emisi dochází ke kaskádovitému efektu a znásobení signálu.

Trojité kvadrupól v tandemovém zapojení umí pracovat v různých typech skenů, tedy různou kombinací jednotlivých kvadrupólů lze získat různé informace o analytu. V této práci byly použity 4 typy skenů: SCAN, SIM, Product Ion a MRM. Základní mód SCAN pracuje na principu jednoduchého kvadrupólu. První i druhý kvadrupól v tomto případě soužijí pouze jen jako iontová optika, k filtraci iontů dochází na třetím kvadrupólu. Třetí kvadrupól propustí na detektor všechny ionty v nastaveném rozmezí hodnot  $m/z$ , díky čemuž se získá celkové hmotnostní spektrum daného analytu. Druhým typem skenu je SIM mód (Selected Ion Monitoring), kdy je aktivní pouze první kvadrupól, druhý a třetí slouží jen jako iontová optika. První kvadrupól je nastaven tak, aby propouštěl pouze vybranou hodnotu  $m/z$ . V tomto módu se zpravidla optimalizuje nastavení napětí fragmentoru, na takovou hodnotu, aby intenzita prekurzorového iontu byla co nejvyšší. Třetím typem skenu je Product Ion, kdy MS pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. Prvním kvadrupólem projde iont o vybrané  $m/z$  (prekurzorový iont), v kolizní cele poté dojde k jeho fragmentaci a vzniku produktových iontů. Vzniklé produktové ionty jsou skenovány třetím kvadrupólem a detekovány detektorem. Díky tomuto módu je získáno hmotnostní spektrum fragmentů daného prekurzorového iontu. Změnami kolizní energie lze najít nejintenzivnější produktový iont. Posledním typem skenu je MRM mód (Multiple Reaction Monitoring), ve kterém MS opět pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. Prvním kvadrupólem projde prekurzorový iont o zvolené hodnotě  $m/z$ , následně je fragmentován v kolizní cele a třetím kvadrupólem projde

pouze produktový iont o vybrané hodnotě  $m/z$  a ten je detekován. Právě MRM mód umožňuje detekci s vysokou selektivitou založenou na dvojici hodnot prekurzorového a produktového iontu analytu [80].

## 2.7 Optimalizace pomocí metody plánování experimentů

Optimalizace podmínek nebo postupu přípravy je nejen v chemii běžně řešeným tématem. Optimalizací se, v kontextu analytické chemie, obvykle rozumí souhrn postupů vedoucích k nalezení experimentálních podmínek, jejichž použitím je získána maximální nebo jiná požadovaná odpověď, ať už se jedná o optimalizaci podmínek separace nebo o optimalizaci postupu zpracování a přípravy vzorku.

Z důvodu neustáleného českého názvosloví bylo pro popis optimalizací v této kapitole použito původní anglické názvosloví.

### 2.7.1 Metoda one factor at a time (OFAT)

Tradičním přístupem k optimalizaci experimentů v analytické chemii je metoda OFAT. Při této metodě jsou jednotlivé faktory testovány jeden po druhém, přičemž vždy dochází ke změně hodnoty pouze jednoho faktoru, zatímco ostatní jsou drženy konstantní. Tento postup je pak opakován pro každý z faktorů, a to až do nalezení nejvhodnějšího nastavení systému. Na jedné straně nízké nároky na provedení statistiky a analýzy dat jsou však vykoupeny značnou časovou náročností a s tím spojenou i finanční náročností provedení všech experimentů. Hlavní nevýhodou tohoto postupu však je, že nedochází k prozkoumání celého experimentálního prostoru, a tak skutečné optimální nastavení nemusí být nalezeno [81]. Nalézt tímto postupem optimum by bylo možné pouze v případě, kdy by všechny optimalizované faktory byly na sobě úplně nezávislé. Ovlivňování se faktorů navzájem musí proto být nutně vzato v úvahu [82].

### 2.7.2 DOE, Design of experiments

Elegantnějším řešením je využití více rozměrových statistických metod plánování experimentů, které umožňují s minimálním počtem experimentů efektivně prozkoumat celý experimentální prostor. Oproti OFAT dochází ke změně několika faktorů v rámci jednoho kroku a následnému statistickému zpracování a vyhodnocení

výsledků matematickou funkcí. Výhody experimentálního designu (DOE, design of experiments) lze zestručnit do několika bodů [82]:

- DOE bere v úvahu interakce mezi jednotlivými faktory.
- DOE umožňuje prozkoumání celého experimentálního prostoru, a tedy dává možnost nalézt optimum i v bodech prostoru, které nebyly přímo změřeny.
- Pro získání velkého množství informací o zkoumaném systému je při DOE dostačující provedení nižšího počtu experimentů.

### 2.7.2.1 Průběh experimentu

Prvním krokem je výběr faktorů, které mají, nebo mohou mít, vliv na testovaný systém. Tyto faktory mohou být jak kvantitativního (teplota, pH, množství látky, čas apod.), tak kvalitativního charakteru (druh rozpouštědla, druh pufru apod.). Jelikož hodnota kvantitativního faktoru se může spojitě měnit, je nutné pro ni vytyčit rozmezí hodnot, které vzhledem k typu optimalizovaného systému má smysl sledovat (například je-li optimalizována enzymatická hydrolýza, nemá smysl uvažovat podmínky, při nichž by docházelo k denaturaci enzymu). Dále je na základě vymezených hodnot a celkovém počtu parametrů zvolen typ experimentálního designu, který udává konkrétní nastavení hodnot faktorů v testech experimentu. Jednotlivé testy experimentu jsou shrnuty v tzv. worksheetu, podle kterého analytik dále postupuje.

Existuje množství statistických softwarů využívaných k tvorbě experimentálního designu. Při vypracování této diplomové práce byl použit software Minitab 16.

Dále je nutné definovat odpověď systému, která je relevantní vzhledem k sledovanému problému a bude v rámci jednotlivých testů sledována (například rozlišení píku, plocha píku).

Po provedení všech předepsaných testů v experimentu je DOE na základě získaných odpovědí vyhodnocen.

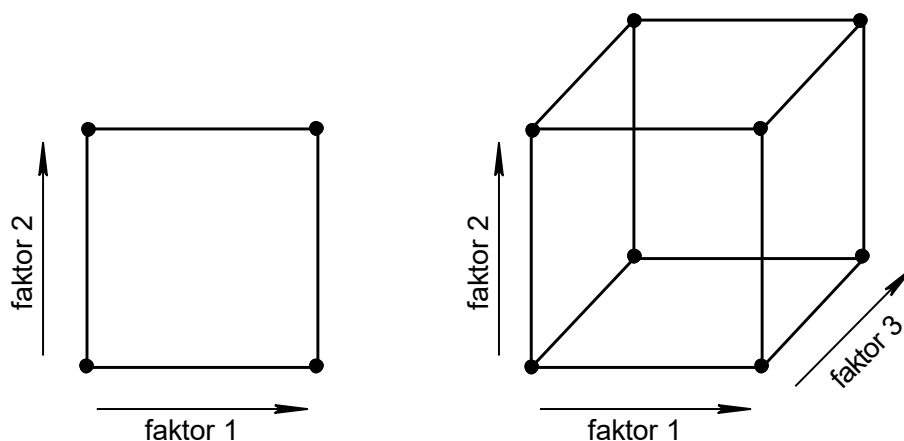
### 2.7.3 Typy experimentálních designů

Volba typu experimentálního designu závisí v první řadě na fázi vývoje. Experimentální vývoj lze rozdělit na 3 fáze: (i) screening na začátku experimentálního procesu, kdy jsou vybrány faktory s největším vlivem; (ii) optimalizace, kdy jsou do plánu zařazeny pouze faktory s požadovaným vlivem a jsou hledána jejich optimální nastavení; (iii) testování robustnosti, kdy je sledována schopnost systému odolávat malým změnám hodnot faktorů. Dále výběr experimentálního designu ovlivňuje různá časová a finanční náročnost.

Základním typem experimentálního designu je **plný faktorový plán** (full factorial designs), kdy dochází k prokombinování všech možných úrovní faktorů a je tak možné postihnout jejich interakce. Tento postup je sice výhodný pro přesný popis systému, ale již postrádá výhodu časové a finanční úspory. Zvláště pak pro větší počet faktorů je počet nezbytných experimentů značně vysoký, jak je patrné ze vztahu:

$$N = L^k$$

kde  $N$  je počet nezbytných experimentů,  $L$  je počet úrovní faktoru a  $k$  je počet sledovaných faktorů. Nejjednodušším a často používaným typem vícefaktorového designu je  $2^k$ , přičemž z výše uvedeného vztahu vyplývá, že pro tento typ designu jsou každému faktoru přiřazeny právě 2 úrovně. Graficky si lze dvoufaktorový design představit jako čtverec a třífaktorový jako krychli (obr. 5), experimenty s více než 3 faktory se označují jako  $n$ -dimensionální [83].



**Obr. 5:** Grafické znázornění studovaného experimentálního prostoru při plném dvou- a třífaktorovém designu, přičemž v obou případech mají faktory dvě úrovně. Černé body představují počet nezbytných experimentů.

Jak již bylo zmíněno výše, při větším množství faktorů přestává být přístup plného faktorového designu výhodný. Proto se v takových případech využívá **částečný faktorový design** (fractional factorial designs), který umožňuje při stejném množství faktorů provedení znatelně menšího počtu experimentů. Toho je docíleno zredukováním některých faktorů do jednoho a zanedbáním vlivu interakcí třetího a vyššího řádu, které jsou velmi malé [84, 85].

### 2.7.3.1 Modelování DOE

Cílem DOE ve fázi optimalizace je získat matematický model schopný přesně definovat závislost odezvy na hodnotách (screeningem) vybraných faktorů. Avšak v této fázi nejsou dvouúrovňové faktorové designy k popisu dostačující. Proto se pro vytvoření modelu (rovnice) používají návrhy, které zkoumají i vzájemné interakce mezi jednotlivými faktory. Mezi takové často používané experimentální modely sloužící k odhadu a tvorbě polynomického modelu patří Central composite design (CCD) a Box-Behnken design [86, 87].

CCD se vyznačuje kombinací dvou různých designů: (a) plným  $2^k$  faktorovým designem (dvě úrovně faktoru jsou kódovány jako -1 a +1) a (b) star designem, který počítá jednak s centrálním bodem 0 nacházejícím je mezi hodnotami faktorů -1 a +1 a pak s tzv. axiálními body  $-\alpha$  a  $+\alpha$ , které umožňují charakterizaci možného kvadratického zakřivení. Z toho vyplývá, že v CCD je uvažováno 5 úrovní každého faktoru:  $-\alpha$ , -1, 0, +1,  $+\alpha$ . Pro CCD je dále typické opakované měření v centrálním bodě [88].

Box-Behnken design také slouží k popisu vlivu více faktorů (a jejich vzájemných interakcí) na sledovanou odezvu. Principiálně je založen na kombinaci částečných faktorových designů a neuvažuje axiální  $\pm\alpha$  body. Jedná se proto o design s menším počtem nezbytných experimentů a je tak časově i finančně úspornější variantou CCD [86], [89].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

- standardy benzodiazepinů: 1-hydroxy midazolam (1-OH-midazolam), 3-hydroxy bromazepam (3-OH-bromazepam), midazolam, 1-hydroxy alprazolam (1-OH-alprazolam), lorazepam, clonazepam, bromazepam, flunitrazepam, alprazolam, temazepam, 1-demethylflunitrazepam (desmethylflunitrazepam), oxazepam, 7-amino clonazepam (7-NH<sub>2</sub>-clonazepam), diazepam, 7-amino flunitrazepam (7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam), 1-demethyldiazepam (desmethyldiazepam), medazepam  
(vše čistota < 99,5 %, Toronto Research Chemicals, Canada, zásobní roztoky v methanolu, koncentrace 200 µg/ml)
- diazepam-d5 (čistota < 99,5 %, Toronto Research Chemicals, Canada, zásobní roztok v methanolu, koncentrace 200 µg/ml)
- oxazepam β-D-glukuronid (Toronto Research Chemicals, Canada, zásobní roztok v methanolu, koncentrace 100 µg/ml)
- β-glukuronidasa z ušně (*Haliotis sp.*), vodný roztok, 150000-250000 U/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- acetonitril (čistota ≥ 99,9 %, LC-MS, Honeywell Riedel-de Haën, Německo)
- methanol (čistota ≥ 99,9 %, LC-MS, Honeywell Riedel-de Haën, Německo)
- mravenčí kyselina (čistota 98–100 %, Sigma-Aldrich, Německo)
- octová kyselina (99 % p.a., Penta, Česká republika)
- amoniak (25% vodný roztok, p.a., Lachner, Česká republika)
- octan amonný (čistota ≥ 98,5 %, PENTA, Česká republika)
- octan sodný (čistota ≥ 99 %, p.a., Merck, Německo)
- deionizovaná voda (vodivost 1,85 µS, Milli-Q Millipore, Bedford, USA)



### 3.2 Instrumentace a pomůcky

- HPLC Agilent Technologies 1290 Infinity (Agilent Technologies, Německo), sestávající se z odplyňovače mobilní fáze, kvartérní pumpy, automatického dávkovače a kolonového termostatu
- MS/MS Triple Quad LC-MS Agilent Technologies 6460 tandemový hmotnostní spektrometr (Agilent Technologies, Německo)
- sbírání dat bylo provedeno v programu Agilent MassHunter Workstation Acquisition verze B.03.01 (Agilent Technologies, CA, USA)
- zpracování dat bylo provedeno v programu Agilent MassHunter Qualitative Analysis verze B.03.01 (Agilent Technologies, CA, USA), Microsoft Excel 2010 Professional (Microsoft Co., USA) a OriginPro 8.0 (OriginLab Co., CA, USA)
- UHPLC kolony:
  - Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), Agilent Technologies, Německo
  - Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), Agilent Technologies, Německo
  - Zorbax SB C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), Agilent Technologies, Německo
  - Zorbax SB Phenyl RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), Agilent Technologies, Německo
  - Zorbax Extend C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), Agilent Technologies, Německo
  - Kinetex Phenyl-Hexyl (100 × 2,1 mm, 1,7 μm), Phenomenex, USA
- analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, Německo)
- pH metr 3540 Combined pH & Conductivity (Jenway, Velká Británie)
- centrifuga Gusto (P-LAB, Česká republika)
- ultrazvuk LC30H (Elma, Česká republika)
- Orbital Shaker-Incubator ES-20 (Biosan, Litva)

### **3.3 Výchozí UHPLC-MS/MS parametry**

Tato diplomová práce vychází z metody pro screening benzodiazepinů, používané v laboratoři Oddělení toxikologie Ústavu soudního lékařství a toxikologie, Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy [3]. Stávající metodu však aktualizuje, rozšiřuje o několik dalších analytů a klade si za cíl zlepšit stěžejní parametry metody jako je rozlišení, symetrie píků a mez detekce. Na zmiňovaném pracovišti používají pro screening analytů kolonu Zorbax XDB-C18 (50 × 4,6 mm) s velikostí zrnění 1,8 μm a jako mobilní fázi binární směs, voda (A) : acetonitril (B) s gradientem: 0 min – 50 % A, 0,1min – 90 % A, 4 min – 10 % A, 4,5 min – 50 % A, 6 min – 50 % A; a průtokem 1,1 ml/min. Pro optimalizaci podmínek hmotnostní detekce byla použita tato metoda. Při dalším postupu byla metoda modifikována a optimalizována.

### **3.4 Příprava zásobních a pracovních roztoků benzodiazepinů v methanolu**

Z pracoviště Ústavu soudního lékařství a toxikologie byly k dispozici zásobní roztoky všech benzodiazepinů v methanolu o koncentraci 200 μg/ml.

Zásobní roztok lorazepamu byl připraven v naší laboratoři z pevného standardu. Pro přípravu roztoku o koncentraci 1 mg/ml bylo naváženo 5,0 mg lorazepamu do 5 ml odměrné baňky a doplněno po rysku methanolem. Pro přípravu roztoku o koncentraci 200 μg/ml bylo z 5 ml odměrné baňky o koncentraci 1 mg/ml odpipetováno 200 μl do 2 ml vialky a doplněno 800 μl methanolu do 1 ml.

### **3.5 Příprava směsného roztoku všech benzodiazepinů**

Směsný roztok všech 17 benzodiazepinů o koncentraci 5 μg/ml byl připraven ze zásobních roztoků jednotlivých standardů o koncentraci 200 μg/ml. Do 2 ml vialky bylo napipetováno 25 μl od každého standardu a následně doplněno 575 μl methanolu do 1 ml.

Tento směsný roztok byl dále využit pro přípravu méně koncentrovaných roztoků o koncentracích 5; 1 a 0,1 μg/ml, ze kterých byly připraveny jednotlivé body kalibrace v methanolu i v moči.

### 3.6 Příprava roztoku interního standardu

Pracovní roztok interního standardu byl připraven ve dvou koncentracích, a to 1 a 10 µg/ml. Pro přípravu roztoku o koncentraci 10 µg/ml byl použit roztok diazepamu-d5 o koncentraci 200 µg/ml. Do 2 ml vialky bylo napipetováno 50 µl tohoto zásobního roztoku a doplněno 950 µl methanolu do 1 ml. Takto vzniklý roztok byl použit k přípravě roztoku 1 µg/ml desetinásobným naředěním.

### 3.7 Příprava roztoků pro kalibraci v methanolu

Kalibrační roztoky benzodiazepinů v methanolu byly připraveny podle schématu uvedeného v tab. 6 napipetováním uvedených objemů příslušných roztoků přímo do měřicí vialky s insertem tak, aby výsledný objem (i po přidání IS) byl vždy 200 µl.

**Tab. 6:** Schéma přípravy kalibračních roztoků benzodiazepinů v methanolu (MeOH). K přípravě byly použity směsné roztoky benzodiazepinů o koncentracích 5 µg/ml (A), 1 µg/ml (B) a 0,1 µg/ml (C), a roztok diazepamu-d5 o koncentraci 1 µg/ml jako interní standard (IS).

Měřená koncentrace (ng/ml)	směsný roztok BZD			IS (ul)	MeOH (ul)
	A (µl)	B (µl)	C (µl)		
2	-	-	4	20	176
10	-	-	20	20	160
100	-	20	-	20	160
500	-	100	-	20	80
1000	40	-	-	20	140
2500	100	-	-	20	80
4500	180	-	-	20	-

### 3.8 Příprava roztoků pro kalibraci v moči

Byly připraveny kalibrační roztoky benzodiazepinů v moči podle schématu uvedeného v tab. 7. Do 1,5 ml ependorfy bylo odpipetováno pokaždé 200  $\mu\text{l}$  těchto roztoků a následně bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  vychlazeného acetonitrilu s cílem vzorek moči jednak naředit a také vysrážet případné bílkoviny přítomné v moči. Takto připravený vzorek byl odstředěn (10 min, 5000 RPM, laboratorní teplota). Poté bylo 200  $\mu\text{l}$  tohoto vzorku odebráno do měřicí vialky s insertem.

**Tab. 7:** Schéma přípravy kalibračních roztoků benzodiazepinů v moči. K přípravě byly použity směsné roztoky benzodiazepinů o koncentracích 5  $\mu\text{g/ml}$  (A), 1  $\mu\text{g/ml}$  (B) a 0,1  $\mu\text{g/ml}$  (C), a roztok diazepam-d5 o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  jako interní standard (IS).

Měřená koncentrace (ng/ml)	Připravovaná koncentrace (ng/ml)	směsný roztok BZD			IS (ul)	moč (ul)
		A ( $\mu\text{l}$ )	B ( $\mu\text{l}$ )	C ( $\mu\text{l}$ )		
2	4	-	-	40	20	940
10	20	-	20	-	20	960
50	100	-	100	-	20	880
100	200	40	-	-	20	940
500	1000	200	-	-	20	780
1000	2000	400	-	-	20	580

### 3.9 Příprava vzorků moči

Benzodiazepiny se v moči intoxikovaného pacienta v různém čase od podání mohou vyskytovat v hydroxylované či demethylované jako metabolity první fáze biotransformace nebo ve formě konjugátů s glukuronovou kyselinou (glukuronidů) jako metabolity druhé fáze biotransformace. Původní formy benzodiazepinů většinou v moči nelze prokázat. Před vlastní úpravou vzorku precipitací nebo extrakcí je proto nutné benzodiazepiny z konjugace hydrolyticky uvolnit, aby tak byla umožněna jejich následná detekce [2].

Nejčastěji používaným postupem je kyselá hydrolýza varem s minerální kyselinou chlorovodíkovou, čímž dojde ke změně struktury benzodiazepinů na deriváty

benzofenonu. Benzofenony jsou poté markrem léčiv benzodiazepinového typu při tenkovrstvé chromatografické analýze (TLC) [2, 90]. Ačkoliv je TLC jednou z nejrobustnějších metod, tak jí v současné době konkurují LC-MS metody. Hlavními nevýhodami TLC analýzy je velké množství zpracovávaného materiálu (mnohdy tolik materiálu není k dispozici) a také interpretace chromatogramu, vyžadující letité zkušenosti s touto metodou.

Původní metoda z laboratoře Ústavu soudního lékařství a toxikologie popisuje přípravu vzorku jako spojení dvou extrakcí: LLE 1 ml moči *tert*-butylmethyletherem z bazického prostředí borátového pufru a kyselou hydrolyzu dalšího 1 ml moči koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou při 110 °C, hydrolyzát je po úpravě pH analogicky extrahován. Spojením obou extraktů, jejich odpařením a rozpuštěním odparku v mobilní fázi vzniká vzorek připravený k analýze [3]. Benzofenony vzniklé kyselou hydrolyzou v mnoha případech nemohou, vzhledem k podobnosti biotransformačních cest, sloužit k jednoznačné identifikaci konkrétního léčiva.

Překládaná práce proto přichází s návrhem nového postupu přípravy vzorku moči, a to pomocí šetrnější, enzymatické hydrolyzy  $\beta$ -glukuronidasou, jejíž účinnost bude maximalizována optimalizací podmínek reakce (podrobněji o optimalizaci viz kapitola 4.4).

Navzdory tomu, že je enzymatická hydrolyza nákladnější a často také časově náročnější alternativou, v současné době je tento postup při analýze benzodiazepinů upřednostňován oproti kyselé hydrolyze, protože při té dochází často k degradaci benzodiazepinů a vzniku benzofenonů [6, 69, 72]. K enzymatické hydrolyze se využívá  $\beta$ -glukuronidasa z různých zdrojů: *Helix pomatia* [70, 71], *Escherichia coli* [6], hovězí játra [72], *Patella vulgata* [44, 91] a *Haliothis sp.* (ušň) [6], přičemž enzymy z různých zdrojů vykazují odlišnou hydrolytickou účinnost a reakční doba se pohybuje v rozmezí 0,5 – 20 hodin [5]. V literatuře používané podmínky enzymatické hydrolyzy a reakční časy jsou uvedeny v kapitole 2.4 tab. 4.

Z výše jmenovaných zdrojů je  $\beta$ -glukuronidasa z ušně (*Haliothis sp.*; mořský plž) v odborné literatuře méně často používaným enzymem v porovnání s ostatními zdroji, avšak pro hydrolyzu glukuronidů benzodiazepinů se ukázala být nejúčinnější a zároveň cenově dostupnou alternativou [5, 6], a proto byla vybrána i do této práce.

### 3.10 Příprava modelového vzorku moči pro pilotní experiment

Byly připraveny pracovní roztoky oxazepam-glukuronidu o koncentraci 0,1 a 5  $\mu\text{g/ml}$  naředěním jeho zásobního roztoku o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Koncentrace 100 ng/ml byla připravena pro optimalizaci podmínek hmotnostní detekce pro oxazepam-glukuronid. Koncentrace 5  $\mu\text{g/ml}$  byla použita při přípravě pilotního experimentu.

Modelový vzorek moči byl připraven do 1,5 ml ependorfky smícháním 180  $\mu\text{l}$  blankové moči a 60  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku oxazepam-glukuronidu o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$ . Do vzorku moči bylo potom přidáno 60  $\mu\text{l}$  roztoku IS o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ , aby výsledná měřená koncentrace IS s ohledem na další zpracování vzorku byla 100 ng/ml. Připravovaná koncentrace oxazepam-glukuronidu byla 1000 ng/ml tak, aby měřená koncentrace vzhledem k další přípravě vzorku mohla být 500 ng/ml oxazepamu za předpokladu 100% účinnosti hydrolýzy.

Vzorek moči byl po přidání 50  $\mu\text{l}$  0,8 M pufru octanu sodného pH 4,8 a 50  $\mu\text{l}$  enzymu  $\beta$ -glukuronidasy (200 U/ $\mu\text{l}$ ) inkubován 2 h, při teplotě 42 °C. Enzymatická reakce byla poté zastavena precipitací proteinu po přidání 200  $\mu\text{l}$  vychlazeného acetonitrilu. Denaturovaný enzym byl centrifugací oddělen (5 min, 5000 RPM, RT) a z ependorfky bylo do vialky s insertem odebráno 200  $\mu\text{l}$  roztoku k analýze.

Souběžně byl stejným způsobem připraven také kontrolní vzorek, do kterého však nebyl přidán enzym. Chybějící enzym byl pro zachování stejného objemu nahrazen dalšími 50  $\mu\text{l}$  pufru.

Postup přípravy modelového vzorku moči byl z části inspirován článkem [5].

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Optimalizace detekce a separačního systému

#### 4.1.1 Podmínky hmotnostní detekce

Nejdříve byly nastaveny parametry elektrospreje, a to teplota a průtok sušícího plynu, napětí na kapiláře a tlak nebulizačního plynu. Vstupní nastavení bylo následující:

- teplota sušícího plynu: 350 °C;
- průtok sušícího plynu: 10 l/min;
- napětí na kapiláře: 4000 V;
- tlak nebulizačního plynu: 40 psi.

Následně byly optimalizovány detekční podmínky pro 1-OH-midazolam, 3-OH-bromazepam, midazolam, 1-OH-alprazolam, lorazepam, clonazepam, bromazepam, flunitrazepam, alprazolam, temazepam, desmethylflunitrazepam, oxazepam, 7-NH<sub>2</sub>-clonazepam, diazepam, 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, desmethyldiazepam, medazepam a interní standard (IS) diazepam-d5 (tab. 8). Měření byla provedena v pozitivním ionizačním módu. Nejprve byla proměřena spektra v režimu SCAN v rozsahu 100 – 400 *m/z* s fragmentačním napětím 100 V. Z tohoto spektra byl vybrán prekurzorový iont s nejvyšší intenzitou. Poté byl tento iont sledován v SIM módu a zároveň byla na fragmentor vkládána různá napětí (80, 100, 110 a 120 V) s cílem najít optimální hodnotu, při které bude mít vybraný prekurzorový iont nejvyšší intenzitu. Následně bylo sledováno štěpení vybraného prekurzorového iontu v módu Product Ion za použití různých hodnot kolizní energie (15, 20, 25, 30 a 35 V) a byl vybrán nejintenzivnější produktový iont. Nakonec byly vybrané dvojice prekurzorový - produktový iont potvrzeny v MRM modu. V případě, že bylo štěpením v kolizní cele získáno více podobně intenzivních iontů, byl MRM mód použit k výběru té nejvhodnější dvojice pro detekci.

**Tab. 8:** Optimalizované podmínky hmotnostní detekce pro studované benzodiazepiny a diazepam-d5 jako IS.  $M_{\text{mon.}}$  je monoizotopická molekulová hmotnost.

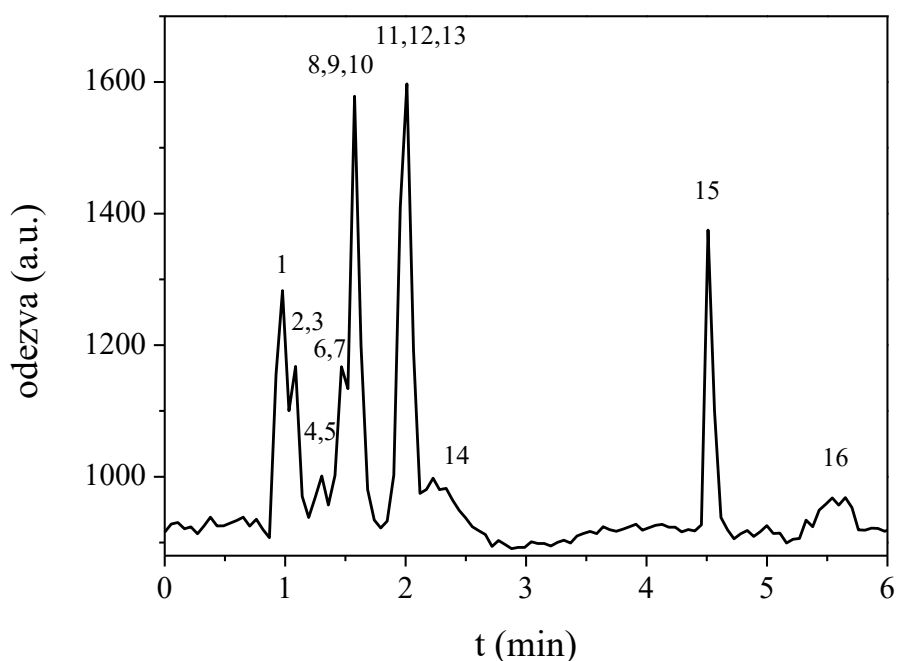
název látky	$M_{\text{mon.}}$	Prekurzorový iont [ $m/z$ ]	Produktový iont [ $m/z$ ]	Fragmentační energie [V]	Kolizní energie [V]
1-OH-midazolam	341,1	342	324	100	20
3-OH-bromazepam	331,0	331,9	286,9	100	20
midazolam	325,1	326	291	120	30
1-OH-alprazolam	324,1	325	297	100	30
lorazepam	320,0	321	275	100	30
clonazepam	315,0	316	276	100	30
bromazepam	315,0	315,9	182	100	35
flunitrazepam	313,1	314	268	100	30
alprazolam	308,1	309	281	100	30
temazepam	300,1	301	255	100	20
desmethylflunitrazepam	299,1	300	254	100	30
diazepam-d5	289,1	290	154	100	30
oxazepam	286,1	287	241	100	20
7-NH <sub>2</sub> -clonazepam	285,1	286	121	100	30
diazepam	284,1	285	154	100	30
7-NH <sub>2</sub> -flunitrazepam	283,1	284	135	100	30
desmethyldiazepam	270,1	271	139,9	100	30
medazepam	270,1	271	207	100	30

#### 4.1.2 Gradient

Jednotlivé analyty mají velmi podobné struktury a molekulové hmotnosti lišící se často jen o jednotku, proto v zájmu zlepšení separační účinnosti a citlivosti metody bylo vhodné analyty v rámci možností co nejvíce separovat. Nejprve byl upravován gradientový program tak, aby bylo dosaženo co možná nejlepšího rozdělení píků, v porovnání s původní metodou. Optimalizace původního gradientu: 0 min – 50 % A, 0,1min – 90 % A, 4 min – 10 % A, 4,5 min – 50 % A, 6 min – 50 % A byla prováděna v systému používaném na pracovišti Ústavu soudního lékařství a toxikologie, Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, tedy na



koloně Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm). V čase byly měněny poměry mobilních fází, voda (A) : acetonitril (B), za průtoku mobilní fáze 0,2 ml/min. Potupně bylo vyzkoušeno více než 20 různých gradientových programů. Profil gradientu v původní metodě způsobuje, že většina analytů eluuje z kolony v prvních 3 minutách a jednotlivé píky se překrývají (viz obr. 6). Proto byl vyzkoušen gradient s nižší počáteční eluční silou s poměrem voda : acetonitril 90 : 10 pro prodloužení retence studovaných analytů.



**Obr. 6:** Chromatogram methanolické směsi benzodiazepinů při nastavení původního gradientu, s mobilní fází voda : acetonitril, na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm); koncentrace každého analytu byla 100 ng/ml. (1: 7-NH<sub>2</sub>-clonazepam, 2: 3-OH-bromazepam, 3: 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, 4: 1-OH-alprazolam, 5: bromazepam, 6: desmethylflunitrazepam, 7: oxazepam, 8: alprazolam, 9: 1-OH-midazolam, 10: clonazepam, 11: flunitrazepam, 12: temazepam, 13: desmethyldiazepam, 14: midazolam, 15: diazepam, 16: medazepam); a.u. - relativní jednotka (arbitrary unit)

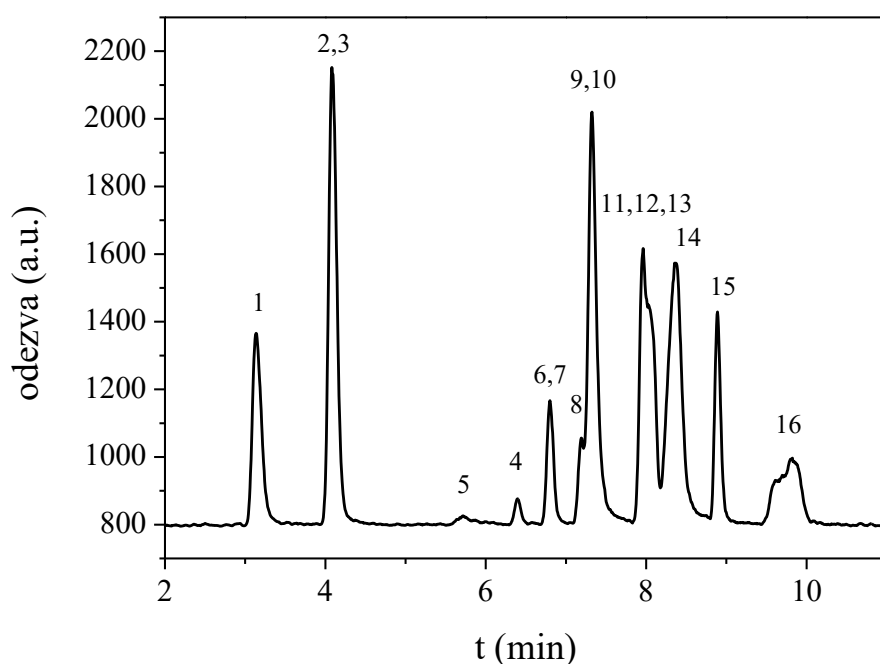
Z prvotních experimentů se jako nejvhodnější jevil gradient: 0 min – 90 % A, 5 min – 50 % A, 6 min – 20 % A, 7 min – 20 % A, 9 min – 90 % A. Za těchto podmínek všechny analyty eluovaly z kolony až mezi 4. a 7. minutou a byly o poznání lépe rozdělené oproti původnímu gradientu.

Dále bylo vyzkoušeno postupné snižování počátečního obsahu vodné složky mobilní fáze. Hlavním důvodem byla snaha posunout začátek eluce některých analytů zpět k dřívějším časům, oproti výše zmiňovanému gradientu, což by mohlo vést k ještě lepší separaci. Neméně důležitým důvodem byla snaha nezatěžovat kolonu 90% vodnou fází. Počáteční složení mobilní fáze se postupně měnilo na: 85:15, 80:20, 75:25, 70:30 (voda : acetonitril), zároveň byl zkoušen různý časový profil gradientu. Postupně byl gradient optimalizován s ohledem na separaci či částečnou separaci co největšího počtu píků.

Nejvhodnější se ukázalo snížení počátečního obsahu vody v mobilní fázi na 75 obj. %. Při takto nastavených gradientech bylo docíleno nejlepšího vzájemného rozdělení analytů a zároveň všechny analyty eluovaly z kolony mezi 3. a 10. min. Gradient poskytující nejlepší rozdělení analytu je přehledně znázorněn v tab. 9. Chromatogram znázorňující eluci analytů při vybraném gradientu je na obr. 7.

**Tab. 9:** Optimalizovaný gradientový program.

Čas (min)	Složka A (%) H <sub>2</sub> O	Složka B (%) ACN
0	75	25
5	50	50
6	20	80
7	20	80
9	75	25

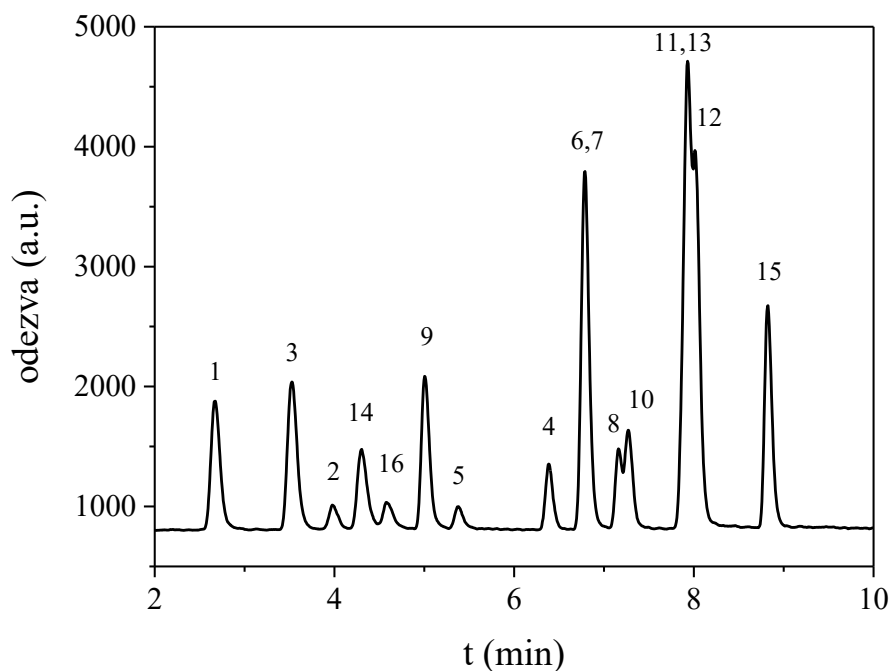


**Obr. 7:** Chromatogram směsi benzodiazepinů v methanolu při nastavení optimalizovaného gradientu, s mobilní fází voda : acetonitril a na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm); koncentrace každého analytu byla 100 ng/ml. (1: 7-NH<sub>2</sub>-clonazepam, 2: 3-OH-bromazepam, 3: 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, 4: 1-OH-alprazolam, 5: bromazepam, 6: desmethylflunitrazepam, 7: oxazepam, 8: alprazolam, 9: 1-OH-midazolam, 10: clonazepam, 11: flunitrazepam, 12: temazepam, 13: desmethyl diazepam, 14: midazolam, 15: diazepam, 16: medazepam)

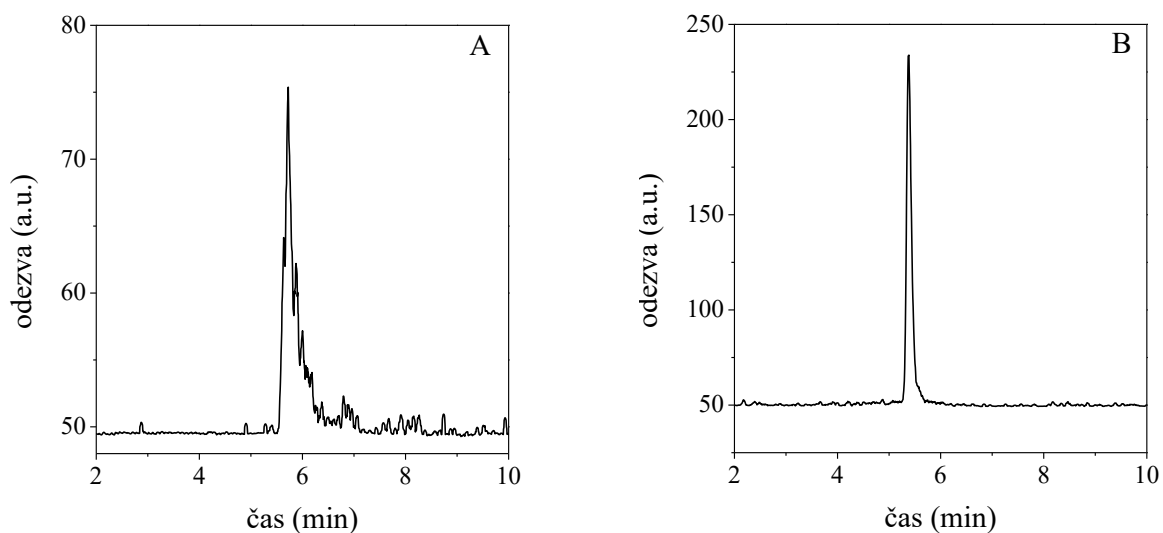
### 4.1.3 Složení mobilní fáze

Nalezení vhodného gradientového programu sice výrazně napomohlo separaci jednotlivých píků, avšak některé analyty (medazepam, bromazepam, 3-OH-bromazepam) poskytovaly deformované píky, případně píky s velmi nízkou intenzitou, což značilo nevhodnost separačního systému. Tento problém byl vyřešen okyselením mobilních fází, jak je popsáno i v literatuře, kde je použití okyselených mobilních fází při analýze benzodiazepinů velmi časté. S cílem najít nejvhodnější složení mobilní fáze bylo na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm) vyzkoušeno následující složení mobilních fází: (a) A: voda s 0,1% obsahem mravenčí kyseliny; B: acetonitril s 0,1% obsahem mravenčí kyseliny; (b) A: voda s 0,1% obsahem octové kyseliny; B: acetonitril s 0,1% obsahem octové kyseliny; (c) A: vodný roztok 2 mM mravenčanu amonného pH 3; B: acetonitril; (d) A: vodný roztok 2 mM octanu amonného pH 4; B: acetonitril. Pro octanový pufr byly vyzkoušeny další dvě modifikace v hodnotě pH, (e) pH 7 a (f) pH 3.

Při vyhodnocování bylo postupováno tak, že byl sledován vliv změny složení mobilní fáze jednak na retenci píků a také na intenzitu odezvy jednotlivých analytů. Změny složení mobilních fází nejvíce ovlivňovaly retence 1-OH-midazolamu, midazolamu, medazepamu, a dále pak analytů obsahujících aminoskupinu protonizovatelnou již při mírně kyselém pH, jako jsou 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepamu a 7-NH<sub>2</sub>-clonazepamu, kdy se jejich retenční časy měnily v rozmezí až několika minut. Podle očekávání se u některých složení mobilních fází podařilo zvýšit intenzitu odezvy analytů. Jednoznačně pozitivní vliv vykazovalo okyselení obou složek mobilní fáze octovou kyselinou (obr. 8). Tato modifikace ve všech případech poskytla vyšší intenzitu píků než původní fáze bez přídavku kyseliny. Okyselení mobilní fáze mělo také pozitivní vliv na tvar původně deformovaných píků, a to bez současného prodloužení retence. Nejvýraznější fokusace bylo dosaženo u píků bromazepamu (obr. 9), 3-OH-bromazepamu a medazepamu.



**Obr. 8:** Chromatogram methanolické směsi benzodiazepinů při nastavení optimalizovaného gradientu, s mobilní fází voda : acetonitril okyselenou octovou kyselinou a na koloně **Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD** (100 × 2,1 mm, 1,8 μm); koncentrace každého analytu byla 100 ng/ml. (1: 7-NH<sub>2</sub>-clonazepam, 2: 3-OH-bromazepam, 3: 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, 4: 1-OH-alprazolam, 5: bromazepam, 6: desmethylflunitrazepam, 7: oxazepam, 8: alprazolam, 9: 1-OH-midazolam, 10: clonazepam, 11: flunitrazepam, 12: temazepam, 13: desmethyldiazepam, 14: midazolam, 15: diazepam, 16: medazepam)



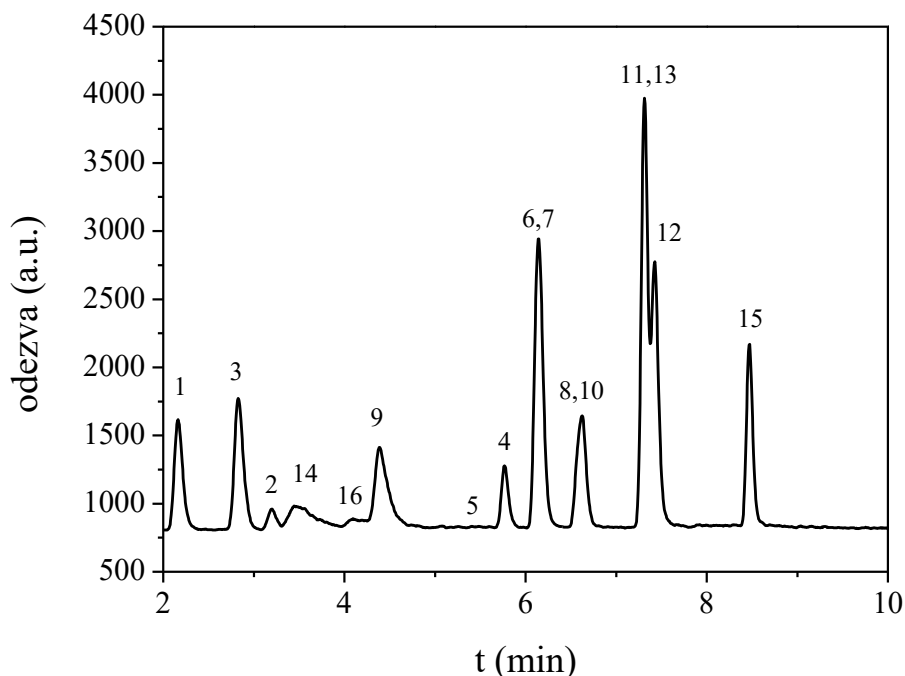
**Obr. 9:** Chromatogram bromazepamu v methanolu A: před okyselením; B: po okyselení mobilní fáze octovou kyselinou, koncentrace analytu v obou případech byla 100 ng/ml. Měřeno při nastavení optimalizovaného gradientu a na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm).

#### 4.1.4 Separační podmínky

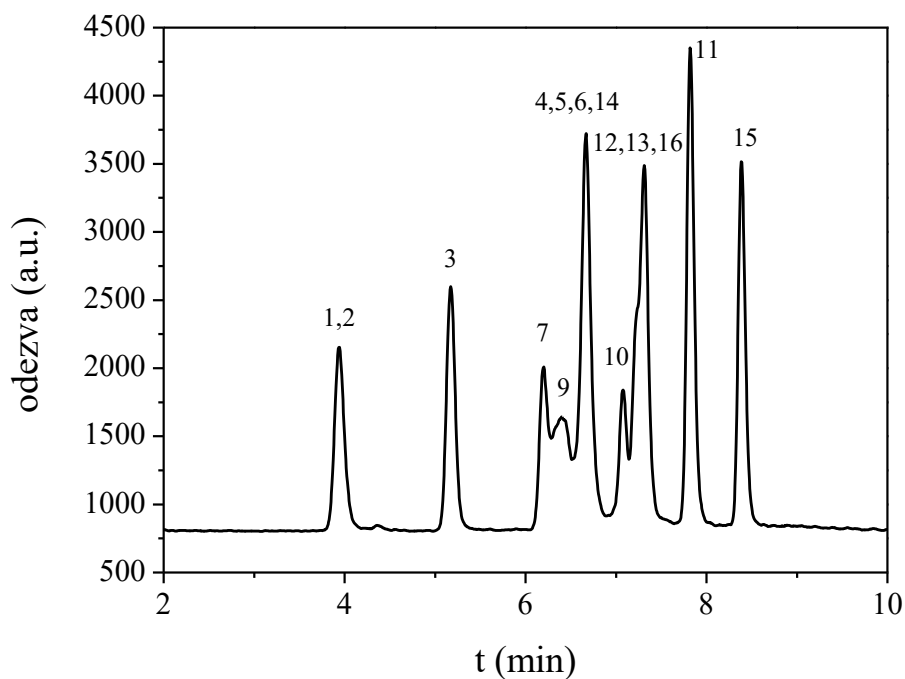
Vedle optimalizace složení mobilní fáze a gradientu byla také snaha najít stacionární fázi, na které by se vybraných 17 benzodiazepinů a jejich metabolitů nejlépe dělilo. Se složením mobilní fáze A: voda s 0,1% obsahem octové kyseliny; B: acetonitril s 0,1% obsahem octové kyseliny a nastavením gradientu podle tab. 9, bylo vyzkoušeno celkem 5 kolon s plně porézními částicemi a jedna kolona typu core-shell, navzájem se lišících typem reverzní fáze, obsahem uhlíku či mírou endcappingu. Zvolené kolony měly vždy stejné rozměry a s výjimkou kolony s core-shell částicemi i stejnou velikost částic. Cílem bylo dokončit optimalizaci separačního systému výběrem kolony, která by poskytovala nejúčinnější separaci píků. Testované kolony jsou uvedeny v kapitole 2.5.1 tab. 5.

U jednotlivých analytů byly během separace na vybraných kolonách sledovány změny v retenčním čase a separační účinnosti, poskytující co možná nejnižší hodnotu LOD, jakožto jednoho z podstatných parametrů screeningových metod. Změnou stacionárních fází docházelo k posunu retencí jednotlivých analytů mnohem významněji, než tomu bylo u změn ve složení mobilní fáze, ačkoliv se, až na výjimky, jednalo o posuny v rozmezí maximálně 2 min. Nejvýrazněji byly změnou separačního

systému opět ovlivněny retence OH-midazolamu, midazolamu, medazepamu, 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepamu a 7-NH<sub>2</sub>-clonazepamu. Z hlediska separační účinnosti se jako naprosto nevyhovující ukázala být kolona Zorbax Extend C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm) (obr. 10), na které všechny analyty poskytly píky nejnižší odezvy v porovnání s ostatními kolonami. Zároveň na této koloně došlo k opětovné deformaci tvaru píků midazolamu, medazepamu i bromazepamu. K podobně nepříznivé deformaci píku docházelo v případě midazolamu na kolonách Zorbax SB Phenyl RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm) (obr. 11) i Kinetex Phenyl-Hexyl (100 × 2,1 mm, 1,7 μm) (obr. 12). Nejkritičtější analytem pro separaci se ukázal být bromazepam, jehož pík byl při separaci jak na již zmiňovaných kolonách, tak na koloně Zorbax SB C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm) (obr. 13) téměř nerozlišitelný od šumu.

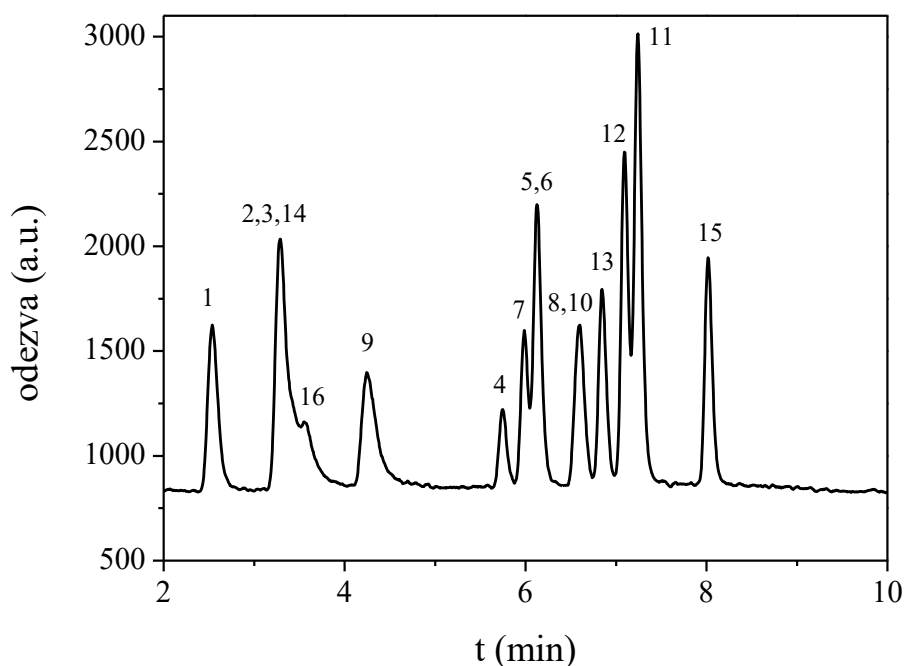


**Obr. 10:** Chromatogram methanolické směsi benzodiazepinů při nastavení optimalizovaného gradientu, s mobilní fází voda : acetonitril okyselenou octovou kyselinou a na koloně **Zorbax Extend C18 RRHD** (100 × 2,1 mm, 1,8 μm); koncentrace každého analytu byla 100 ng/ml. (1: 7-NH<sub>2</sub>-clonazepam, 2: 3-OH-bromazepam, 3: 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, 4: 1-OH-alprazolam, 5: bromazepam, 6: desmethylflunitrazepam, 7: oxazepam, 8: alprazolam, 9: 1-OH-midazolam, 10: clonazepam, 11: flunitrazepam, 12: temazepam, 13: desmethyldiazepam, 14: midazolam, 15: diazepam, 16: medazepam)

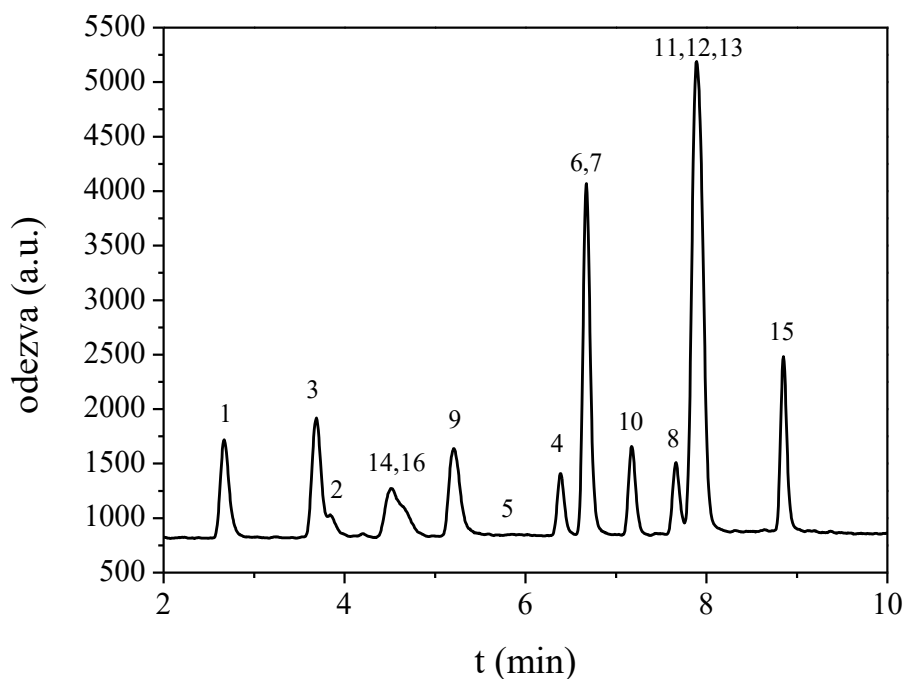


**Obr. 11:** Chromatogram methanolické směsi benzodiazepinů při nastavení optimalizovaného gradientu, s mobilní fází voda : acetonitril okyselenou octovou kyselinou a na koloně **Zobrax SB Phenyl RRHD** (100 × 2,1 mm, 1,8 μm); koncentrace každého analytu byla 100 ng/ml. (1: 7-NH<sub>2</sub>-clonazepam, 2: 3-OH-bromazepam, 3: 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, 4: 1-OH-alprazolam, 5: bromazepam, 6: desmethylflunitrazepam, 7: oxazepam, 8: alprazolam, 9: 1-OH-midazolam, 10: clonazepam, 11: flunitrazepam, 12: temazepam, 13: desmethyldiazepam, 14: midazolam, 15: diazepam, 16: medazepam)





**Obr. 12:** Chromatogram methanolicke směsi benzodiazepinů při nastavení optimalizovaného gradientu, s mobilní fází voda : acetonitril okyselenou octovou kyselinou a na koloně **Kinetex Phenyl-Hexyl** (100 × 2,1 mm, 1,7 μm); koncentrace každého analytu byla 100 ng/ml. (1: 7-NH<sub>2</sub>-clonazepam, 2: 3-OH-bromazepam, 3: 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, 4: 1-OH-alprazolam, 5: bromazepam, 6: desmethylflunitrazepam, 7: oxazepam, 8: alprazolam, 9: 1-OH-midazolam, 10: clonazepam, 11: flunitrazepam, 12: temazepam, 13: desmethyldiazepam, 14: midazolam, 15: diazepam, 16: medazepam)

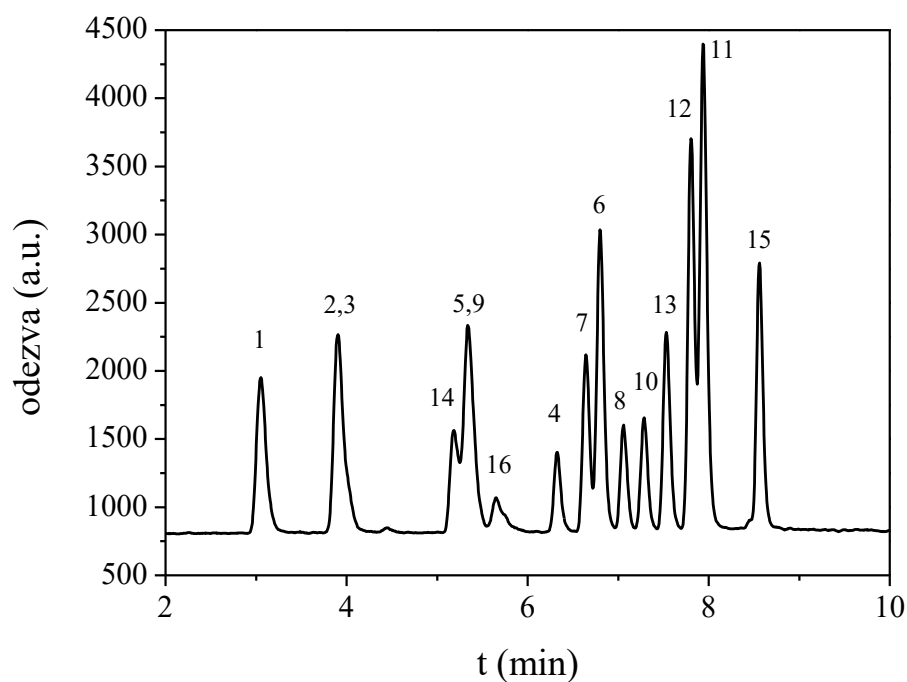


**Obr. 13:** Chromatogram methanolicke směsi benzodiazepinů při nastavení optimalizovaného gradientu, s mobilní fází voda : acetonitril okyselenou octovou kyselinou a na koloně **Zorbax SB C18 RRHD** (100 × 2,1 mm, 1,8 μm); koncentrace každého analytu byla 100 ng/ml. (1: 7-NH<sub>2</sub>-clonazepam, 2: 3-OH-bromazepam, 3: 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, 4: 1-OH-alprazolam, 5: bromazepam, 6: desmethylflunitrazepam, 7: oxazepam, 8: alprazolam, 9: 1-OH-midazolam, 10: clonazepam, 11: flunitrazepam, 12: temazepam, 13: desmethyldiazepam, 14: midazolam, 15: diazepam, 16: medazepam)

Nejvyšší odezvy téměř všech píků a zároveň přijatelné rozdělení analytů bylo dosaženo na koloně Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm). Výjimku z tohoto tvořil pouze bromazepam, jehož pík dosahoval nejvyšší odezvy na původní koloně Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm) (obr.8), která však byla pro zbývající analyty méně vhodná.

Vhodnost kolony Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD (100 x 2,1 mm, 1,8 μm) pravděpodobně spočívá v možnosti uplatnění  $\pi$ - $\pi$  interakcí mezi analyty a stacionární fází obsahující fenyl v kombinaci s nepolárními interakcemi, které jsou zajištěny alkylovou (hexylovou) částí stacionární fáze.

Optimalizované podmínky vyvinuté metody jsou pro přehlednost uvedeny v tab. 10, chromatogram je zobrazen na obr. 14.



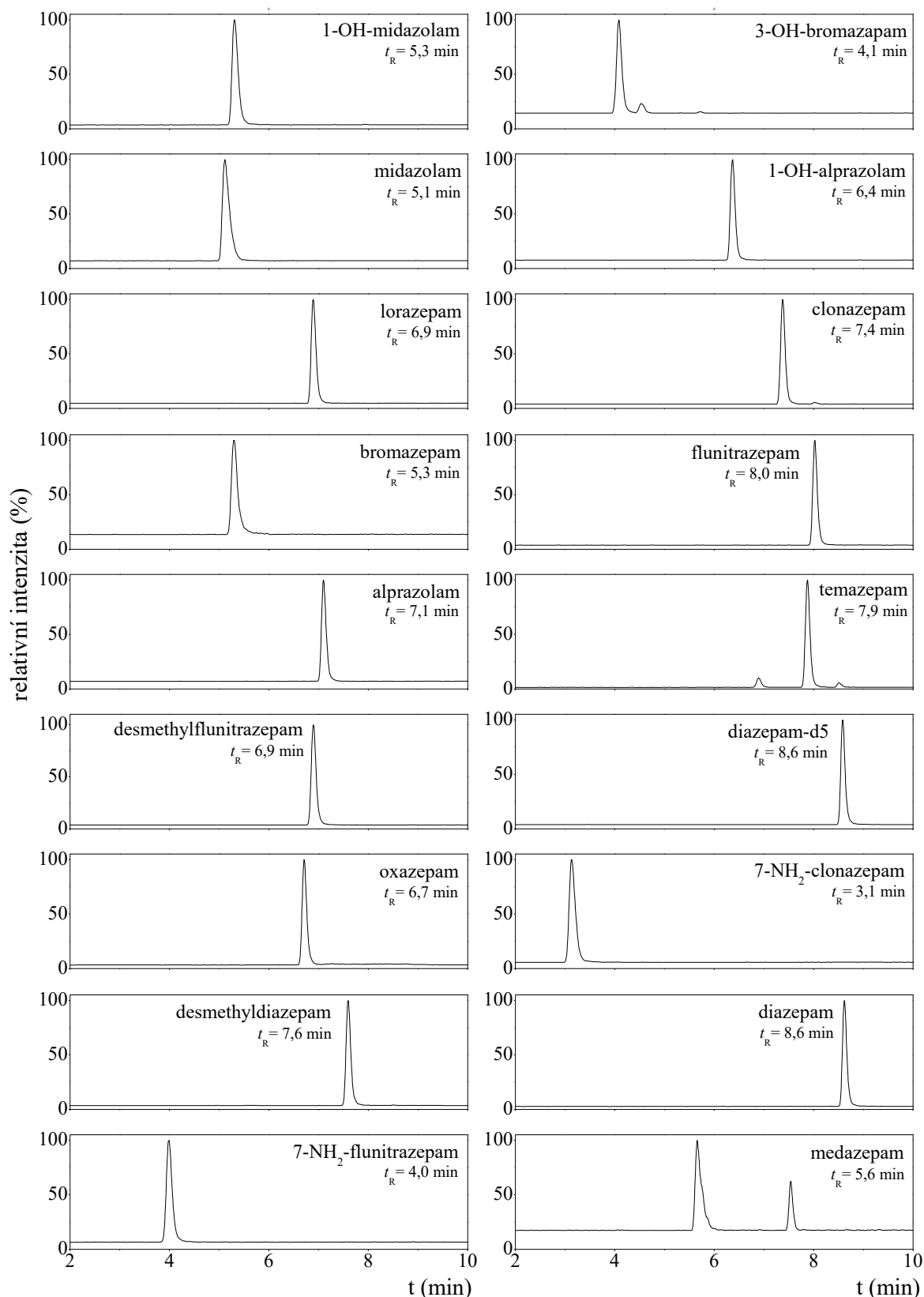
**Obr. 14:** Chromatogram methanolické směsi benzodiazepinů při nastavení optimalizovaného gradientu, s mobilní fází voda : acetonitril okyselenou octovou kyselinou a na koloně **Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD** (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), koncentrace každého analytu byla 100 ng/ml. (**1:** 7-NH<sub>2</sub>-clonazepam, **2:** 3-OH-bromazepam, **3:** 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, **4:** 1-OH-alprazolam, **5:** bromazepam, **6:** desmethylflunitrazepam, **7:** oxazepam, **8:** alprazolam, **9:** 1-OH-midazolam, **10:** clonazepam, **11:** flunitrazepam, **12:** temazepam, **13:** desmethyldiazepam, **14:** midazolam, **15:** diazepam, **16:** medazepam)

**Tab. 10:** Souhrn optimalizovaných separačních podmínek pro analýzu benzodiazepinů.

<b>kolona</b>	Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm)	
<b>mobilní fáze</b>	složka A	voda s 0,1 % CH <sub>3</sub> COOH;
	složka B	acetonitril s 0,1 % CH <sub>3</sub> COOH
<b>průtok MF</b>	0,2 ml/min	
<b>dávkovaný objem</b>	1 μl	
<b>teplota na koloně</b>	40 °C	
<b>gradientová eluce</b>	čas (min): 0-5-6-7-9, složka B (%): 25-50-80-80-25	

Chromatogramy získané pro jednotlivé analyty za optimalizovaných detekčních podmínek jsou uvedeny na obr. 15. Z chromatogramů je patrné, že téměř všechny analyty poskytly jediný hlavní pík. Přítomnost více píků v chromatogramu změřeném v MRM módu lze vysvětlit jednak podobností hodnot prekurzorových a produktových iontů a zároveň nižší rozlišovací schopností trojitého kvadrupólu. Obzvláště markantní to bylo v případě medazepamu, kdy první (hlavní) pík medazepamu má přechod  $m/z$  271>207 a retenční čas  $t_R = 5,6$  min a druhý, na chromatogramu se vyskytující pík, lze na základě retenčního času a shodné hodnotě prekurzorového iontu přiřadit desmethyldiazepamu (271>139,9;  $t_R = 7,6$  min). To lze vysvětlit podobností hodnot produktových iontů těchto analytů. Nejintenzivnější produktové ionty medazepamu mají hodnoty  $m/z$  207 a 91; nejintenzivnější produktové ionty desmethyldiazepamu mají hodnoty  $m/z$  208 a 139,9. Dochází tak k tomu, že v MRM spektru je v kolizní cele vznikající produktový iont  $m/z$  208 kvůli nižší rozlišovací schopnosti trojitého kvadrupólu ( $m/z \pm 0,5$  jednotky), monitorován jako iont s  $m/z$  207 a tedy je v MRM pro přechod 271>207 detekován jako medazepam.

Ačkoliv byla nalezena i jiná dvojice prekurzorový > produktový iont pro medazepam (271>91) bylo by použití tohoto přechodu na úkor intenzity píku. Zároveň použití iontu  $m/z > 100$  je v případě složité matrice nevýhodné, protože by mohlo docházet k interferencím s nízkomolekulárními látkami v moči. Jiné vznikající produktové ionty byly velmi málo intenzivní a jejich použití při detekci by vedlo k ještě nižší citlivosti. Dále byl tento jev pozorován v MRM spektru temazepamu (301>255), kde se vyskytoval i malý pík, identifikovaný i na základě shody retenčních časů jako desmethylflunitrazepam (300>254,  $t_R = 6,9$  min).



**Obr. 15:** Chromatogramy jednotlivých benzodiazepinů, získané změřením směsi všech studovaných benzodiazepinů za optimalizovaných detekčních a separačních podmínek v MRM módu; koncentrace každého benzodiazepinu 100 ng/ml.

## 4.2 Kalibrace v methanolu

Za optimalizovaných detekčních a separačních podmínek (kolona Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD 100 × 2,1 mm, 1,8 μm, ACN/H<sub>2</sub>O (v/v) s 0,1% obsahem octové kyseliny v obou složkách, 0,2 ml/min, 1 μl, MRM přechody viz tab. 8), byly proměřeny kalibrační závislosti ploch a výšek píků na koncentraci 17 benzodiazepinů a jejich metabolitů v methanolu. Měřené koncentrace byly 2, 10, 100, 500, 1000, 2500 a 4500 ng/ml. Tento rozsah byl zvolen tak, aby pokrýval všechna terapeutická rozmezí benzodiazepinů (viz tab. 1). Jako vnitřní standard byl použit diazepam-d<sub>5</sub> o koncentraci 100 ng/ml. Každá z těchto koncentrací s vnitřním standardem byla proměřena pětkrát.

Získané závislosti poměru plochy (píku) analytu a plochy (píku) interního standardu na koncentraci byly zpracovány metodou lineární regrese. Výsledky lineární regrese jsou uvedeny v tab. 11. Získané závislosti poměru výšky (píku) analytu a výšky (píku) interního standardu na koncentraci byly zpracovány metodou lineární regrese a ze získaných rovnic byly vypočítány hodnoty LOD a LOQ jako poměr trojnásobku, respektive desetinásobku výšky šumu základní linie a směrnice kalibrační závislosti. Výsledné hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v tab. 11.

**Tab. 11:** Výsledky lineární regrese získané ze závislosti poměru ploch analytů a interního standardu ( $A/A_{IS}$ ) na koncentraci měřené v **methanolu**;  $R^2$  koeficient determinace; limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) získané ze závislosti poměru výšky (píku) analytu a výšky (píku) interního standardu na koncentraci.

název látky	$A/A_{IS}$			LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
	$R^2$	směrnice (l·a.u.·min/ng)	úsek (a.u.·min)		
1-OH-midazolam	0,9891	0,0165	-1,348	0,3	0,9
3-OH-bromazepam	0,9887	0,0037	-0,333	0,9	3,0
midazolam	0,9899	0,0101	-0,834	0,3	1,0
1-OH-alprazolam	0,9873	0,0077	-0,822	0,4	1,2
lorazepam	0,9917	0,0093	-0,685	0,3	1,1
clonazepam	0,9922	0,0122	-0,849	0,3	1,0
bromazepam	0,9909	0,0045	-0,355	0,8	2,6
flunitrazepam	0,9926	0,0119	-0,806	0,3	0,9
alprazolam	0,9877	0,0075	-0,739	0,4	1,3
temazepam	0,9898	0,0339	-2,917	0,3	1,0
desmethylflunitrazepam	0,9950	0,0124	-0,604	0,2	0,8
oxazepam	0,9886	0,0157	-1,446	0,4	1,5
7-NH <sub>2</sub> -clonazepam	0,9910	0,0105	-0,749	0,4	1,5
diazepam	0,9924	0,0166	-1,173	0,5	1,8
7-NH <sub>2</sub> -flunitrazepam	0,9924	0,0088	-0,596	0,8	2,8
desmethyldiazepam	0,9904	0,0143	-1,189	0,2	0,8
medazepam	0,9908	0,0031	-0,298	1,7	5,5

### 4.3 Kalibrace v moči

Vzhledem k tomu, že reálným vzorkem pro screening benzodiazepinů bude moč, byly za optimalizovaných detekčních a separačních podmínek (kolona Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD 100 × 2,1 mm, 1,8 μm, ACN/H<sub>2</sub>O (v/v) s 0,1% obsahem octové kyseliny v obou složkách, 0,2 ml/min, 1 μl, MRM přechody viz tab. 8) proměřeny kalibrační závislosti ploch píků a výšek píků na koncentraci 17 benzodiazepinů a jejich metabolitů v moči. Rozsah měřených koncentrací byl po zkušenostech s předešlou kalibrací snižen o dva nejvyšší body, které již nespádaly do lineární oblasti. Zároveň byl do kalibrace přidán jeden nový bod odpovídající koncentraci 50 ng/ml proto, aby výsledná přímka lineární regrese byla podpořena více experimentálními body v oblasti nižších koncentrací. Měřené koncentrace byly 2, 10, 50, 100, 500 a 1000 ng/ml. Jako vnitřní standard byl použit diazepam-d<sub>5</sub> o koncentraci 100 ng/ml. Každá z těchto koncentrací s vnitřním standardem byla proměřena pětkrát.

Získané závislosti poměru plochy (píku) analytu a plochy (píku) interního standardu na koncentraci byly zpracovány metodou lineární regrese. Výsledky lineární regrese jsou uvedeny v tab. 12. Získané závislosti poměru výšky (píku) analytu a výšky (píku) interního standardu na koncentraci byly zpracovány metodou lineární regrese a ze získaných rovnic byly vypočítány hodnoty LOD a LOQ jako poměr trojnásobku, respektive desetinásobku výšky šumu základní linie a směrnice kalibrační závislosti. Výsledné hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v tab. 12. Získané hodnoty koeficientu determinace, uvedené v tab. 12, svědčí o dobré linearitě závislostí.



**Tab. 12:** Výsledky lineární regrese získané ze závislosti poměru ploch analytů a interního standardu ( $A/A_{IS}$ ) na koncentraci měřené v **moči**;  $R^2$  koeficient determinace; limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) získané ze závislosti poměru výšky (píku) analytu a výšky (píku) interního standardu na koncentraci.

název látky	$A/A_{IS}$			LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
	$R^2$	směrnice (l·a.u.·min/ng)	úsek (a.u.·min)		
1-OH-midazolam	0,9999	0,0134	0,0418	1,5	5,1
3-OH-bromazepam	1,0000	0,0029	0,0047	1,7	5,6
midazolam	1,0000	0,0029	0,0047	1,7	5,6
1-OH-alprazolam	0,9999	0,0064	0,0090	0,6	2,0
lorazepam	0,9999	0,0083	0,0200	0,8	2,7
clonazepam	1,0000	0,0097	0,0050	0,4	1,3
bromazepam	1,0000	0,0036	0,0047	2,4	8,1
flunitrazepam	0,9999	0,0115	0,0320	0,7	2,2
alprazolam	0,9999	0,0064	0,0196	0,6	2,0
temazepam	1,0000	0,0293	0,0491	0,6	2,0
desmethylflunitrazepam	0,9999	0,0103	0,0385	0,4	1,3
oxazepam	0,9999	0,0103	0,0385	1,5	4,9
7-NH <sub>2</sub> -clonazepam	0,9996	0,0080	0,0044	1,9	6,3
diazepam	0,9999	0,0140	0,0313	1,0	3,3
7-NH <sub>2</sub> -flunitrazepam	0,9999	0,0076	0,0348	2,6	8,8
desmethyldiazepam	0,9999	0,0126	0,0175	0,9	3,0
medazepam	0,9998	0,0028	-0,0016	6,3	21,1

Dosažené hodnoty LOD a LOQ pro kalibraci v moči jsou ve srovnání s týmiž hodnotami pro kalibraci v methanolu vyšší. Důvodem je negativní vliv matrice, která snižuje citlivost detekce pro všechny analyzované benzodiazepiny. Navzdory vyšším hodnotám LOD a LOQ při analýze v matrici, lze dosažené limity považovat za více než vyhovující. Vezme-li se v úvahu, že primárním cílem metody je analyty detekovat, jsou

dosažené hodnoty LOD benzodiazepinů pro všechny analyty nižší než terapeutické meze příslušných léčiv.

Nejvýrazněji byl přítomností matrice ovlivněn limit detekce 1-OH midazolamu, midazolamu, 7-NH<sub>2</sub>-clonazepamu, desmethylclonazepamu a medazepamu, u kterých se zvýšil více než 4krát. Naopak nejmenší vliv matrice byl zaznamenán u 1-OH-alprazolamu, alprazolamu, clonazepamu a desmethylflunitrazepamu, u kterých se limit detekce nenavýšil více než dvakrát.

## **4.4 Optimalizace podmínek enzymatické hydrolýzy**

### **4.4.1 Glukuronidy benzodiazepinů**

Výběr glukuronidů benzodiazepinů byl determinován jednak jejich komerční a cenovou dostupností a také snahou obsáhnout metabolity jednoduchých i heterocyklických benzodiazepinů. K optimalizaci enzymatické hydrolýzy byly nakonec vybrány tři komerčně dostupné glukuronidy benzodiazepinů: oxazepam  $\beta$ -D-glukuronid (Oxa-Gluk), midazolam N- $\beta$ -D-glukuronid (Mid-Gluk) a lorazepam 2-O- $\beta$ -D-glukuronid (Lor-Gluk). Účinnost hydrolýzy glukuronidů těchto tří léčiv bude následně zobecněna pro zbylé benzodiazepiny. Vzhledem k značné podobnosti struktur je zobecnění v rámci skupiny léčiv benzodiazepinového typu možné.

Roztok oxazepam glukuronidu byl poskytnut z laboratoře Ústavu soudního lékařství a toxikologie, zbylé dva byly v únoru 2018 objednány a bohužel do chvíle sepisování práce nebyla objednávka doručena kompletní. Vzhledem k těmto okolnostem mohla být realizována pouze dílčí část experimentů. Vlastní optimalizace enzymatické hydrolýzy metodou plánování experimentů bude doměřena později.

#### **4.4.1.1 Podmínky hmotnostní detekce**

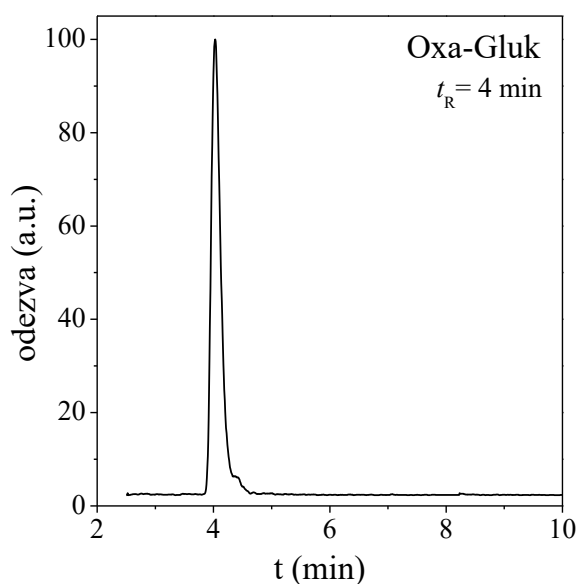
Účinnost enzymatické reakce bude sledována prostřednictvím nárůstu plochy píku volného benzodiazepinu a také poklesem plochy píku konjugovaného benzodiazepinu. Vzhledem k tomu, že byl k dispozici pouze oxazepam-glukuronid, byl v této práci sledován nárůst plochy píku volného oxazepamu a pokles plochy píku konjugovaného Oxa-Gluk.

Dle postupu popsaného v kapitole 4.1.1 byly analogicky optimalizovány podmínky hmotnostní detekce pro Oxa-Gluk a byla nalezena dvojice prekurzorový > produktový iont (viz tab. 13).

**Tab. 13:** Optimalizované podmínky hmotnostní detekce pro oxazepam-glukuronid.  $M_{\text{mon.}}$  je monoizotopická molekulová hmotnost.

název látky	$M_{\text{mon.}}$	prekurzorový iont [ $m/z$ ]	produktový iont [ $m/z$ ]	fragmentační energie [V]	kolizní energie [V]
oxazepam $\beta$ -D-glukuronid	462,1	463	287	100	15

Chromatogram získaný pro oxazepam-glukuronid za optimalizovaných detekčních podmínek je uveden na obr. 16.

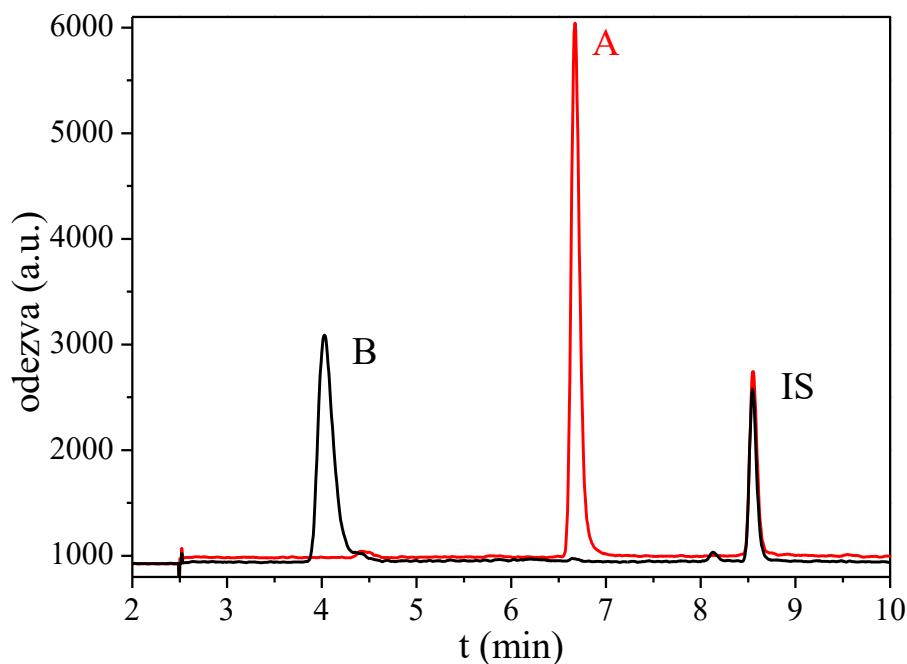


**Obr. 16:** Chromatogram oxazepam-glukuronidu získaný změřením jeho roztoku v methanolu za optimalizovaných detekčních podmínek v MRM módu a při nastavení optimalizovaného gradientu, s mobilní fází voda : acetonitril okyselenou octovou kyselinou a na koloně Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ), koncentrace oxazepam-glukuronidu je 100 ng/ml.

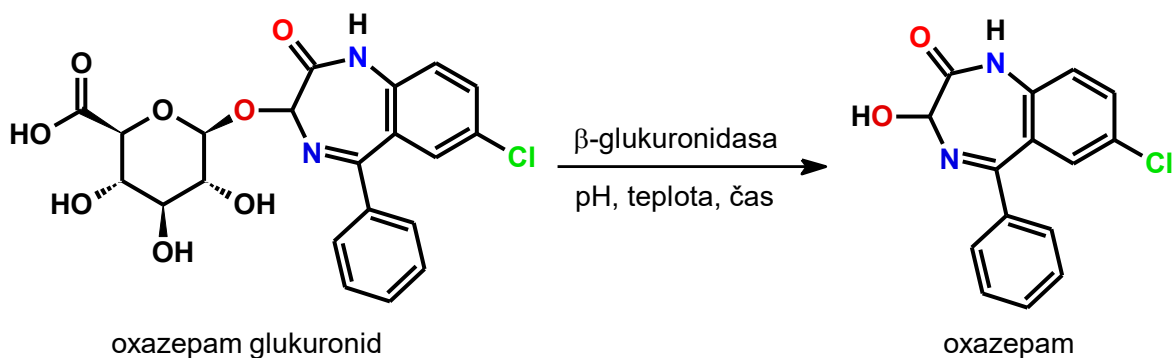
#### 4.4.2 Pilotní experiment na modelovém vzorku moči

S cílem ověřit funkčnost enzymu a schopnost metody detekovat volný oxazepam i jeho konjugát byl proveden pilotní experiment na dvou připravených modelových vzorcích moči (A, B) o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$  oxazepam-glukuronidu. Do obou modelových vzorků byl přidán interní standard (IS) na výslednou měřenou koncentraci 100 ng/ml. Poté bylo pH obou vzorků upraveno přidáním 0,8 M pufru octanu sodného o pH 4,8. Do vzorku A byl navíc přidán enzym  $\beta$ -glukuronidasa, který měl štěpit oxazepam-glukuronid. Podmínky enzymatické reakce byly navrženy (ačkoliv mírně modifikovány) podle odborné literatury [5, 6] a nastaveny tak, aby byl úspěšný průběh reakce maximálně podpořen. Bylo použito 10 kU enzymu, což odpovídalo maximálnímu množství nalezenému v odborné literatuře. Navíc, vzhledem k deklarované aktivitě použité  $\beta$ -glukuronidasy, kdy 1 U uvolní 1  $\mu\text{g}$  fenolftaleinu z jeho glukuronidu, byl enzym použit ve velkém nadbytku. Vzorek B byl ponechán bez enzymu, jinak byl zpracováván stejně. Reakční doba byla 2h a reakční teplota byla nastavena na 42 °C.

Hydrolytická reakce vzorku A  $\beta$ -glukuronidasou proběhla úspěšně, což je patrné z příloženého chromatogramu na obr. 17, který je pro porovnání proložen i chromatogramem analýzy vzorku B. Ve vzorku A došlo působením enzymu k hydrolytickému štěpení konjugátu, a to evidentně s maximální účinností, jelikož v chromatogramu (A) vidíme pouze pík volného oxazepamu. Ve vzorku B dle očekávání žádná enzymatická hydrolyza neproběhla (ani nemohla), proto v chromatogramu (B) tohoto vzorku vidíme pouze pík oxazepam-glukuronidu. Schématické znázornění enzymatické reakce proběhlé ve vzorku A je uvedeno na obr. 18.



**Obr. 17:** Proložené chromatogramy dvou modelových vzorků oxazepam-glukuronidu o měřené koncentraci 500 ng/ml v moči, přičemž roztok A byl inkubován s enzymem a roztok B bez enzymu. Přiřazení píků: A – oxazepam ( $t_R = 6,7$  min); B – oxazepam glukuronid ( $t_R = 4,0$  min); IS – diazepam-d5 ( $t_R = 8,6$  min). Měřeno za optimalizovaných detekčních i separačních podmínek.



**Obr. 18:** Schématické znázornění hydrolýzy oxazepam glukuronidu katalyzované hydrolytickým enzymem  $\beta$ -glukuronidasou; katalytická účinnost enzymu je ovlivněna především pH prostředí, teplotou a reakčním časem.

#### 4.4.3 Sestavení plánu experimentů

V rámci optimalizace podmínek enzymatické hydrolýzy pomocí DOE bude provedeno celkem 27 experimentů uvedených v tab. 14. Plán experimentů byl vygenerován pomocí programu Minitab 16 podle modelu Box-Behnken design na základě zadaných kvantitativních faktorů. Do designu byly vybrány následující faktory a jejich sledovaná rozmezí:

- teplota (25 – 70 °C);
- pH (3 – 7);
- reakční doba (10 min – 15 h);
- množství enzymu (2 – 10 kU).

Interval hodnot faktorů byl nastaven na základě podmínek enzymatické hydrolýzy uvedených v odborné literatuře (viz kapitola 2.4 tab. 4) a zároveň tak, aby optimální hodnota daného faktoru byla v tomto rozmezí pravděpodobná (rozsah hodnot faktorů je limitován teplotní a pH stabilitou enzymu).

Účinnost enzymatické hydrolýzy bude sledována vyhodnocením změny poměru plochy píku benzodiazepinu (oxazepamu, lorazepamu, midazolamu) a/nebo jejich glukuronidu a interního standardu.

**Tab. 14:** Vygenerované pokusy plánovaného experimentu.

číslo exp.	teplota (°C)	pH	čas (h)	aktivita enzymu (U)
1	70	7	7,58	6000
2	47,5	5	15	2000
3	25	5	7,58	10000
4	47,5	5	7,58	6000
5	25	5	0,16	6000
6	70	3	7,58	6000
7	70	5	7,58	2000
8	47,5	7	7,58	10000
9	47,5	3	7,58	10000
10	70	5	7,58	10000
11	25	7	7,58	6000
12	25	5	15	6000
13	47,5	3	0,16	6000
14	25	3	7,58	6000
15	47,5	5	0,16	2000
16	47,5	5	7,58	6000
17	47,5	3	7,58	2000
18	25	5	7,58	2000
19	47,5	7	0,16	6000
20	70	5	0,16	6000
21	47,5	5	15	10000
22	47,5	5	7,58	6000
23	47,5	5	0,16	10000
24	47,5	3	15	6000
25	47,5	7	7,58	2000
26	70	5	15	6000
27	47,5	7	15	6000

## 5 ZÁVĚR

Byla vyvinuta screeningová UHPLC-MS/MS metoda pro detekci benzodiazepinů a jejich metabolitů v moči, jmenovitě pro 1-OH-midazolam, 3-OH-bromazepam, midazolam, 1-OH-alprazolam, lorazepam, clonazepam, bromazepam, flunitrazepam, alprazolam, temazepam, desmethylflunitrazepam, oxazepam, 7-NH<sub>2</sub>-clonazepam, diazepam, 7-NH<sub>2</sub>-flunitrazepam, desmethyldiazepam a medazepam.

Optimalizovaný separační systém byl tvořen kolonou Zorbax Eclipse Plus Phenyl-Hexyl RRHD (100 × 2,1 mm, 1,8 μm), mobilní fáze obsahovala vodu s 0,1 % octové kyseliny (složka A) a acetonitril s 0,1 % octové kyseliny (složka B). Eluce byla gradientová (čas: 0-5-6-7-9, složka B: 25-50-80-80-25), průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min a teplota kolony byla 40 °C. Detekce probíhala na hmotnostním spektrometru s trojitým kvadrupólem, iontový zdroj byl elektrosprej pracující v pozitivním modu, pro každý analyt byly optimalizovány podmínky pro nalezení dvojice prekurzorový a produktový iont.

Za optimalizovaných detekčních a separačních podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti všech 17 benzodiazepinů v methanolu v koncentračním rozsahu 2 – 4500 ng/ml a v moči v koncentračním rozsahu 2 – 1000 ng/ml, jako vnitřní standard byl použit diazepam-d<sub>5</sub> o koncentraci 100 ng/ml. Výsledky závislosti poměru ploch (výšek) pík analytu a píku interního standardu na koncentraci byly zpracovány metodou lineární regrese. Dále byly určeny meze detekce a kvantifikace všech analytů v methanolu i v moči. Meze detekce analytů v moči se pohybovaly v rozmezí 0,4 – 6,3 ng/ml.

Pro enzymatickou hydrolýzu glukuronidů benzodiazepinů byla na základě literární rešerše vybrána β-glukuronidasa z ušně (*Haliotis sp.*). Byly optimalizovány detekční podmínky pro oxazepam-glukuronid a byl proveden pilotní experiment, kterým byla potvrzena funkčnost vybraného enzymu.



Byly definovány kvantitativní faktory ovlivňující míru účinnosti enzymatické reakce a pro tyto faktory (teplota, pH, reakční doba a množství enzymu) byly nastaveny intervaly hodnot. S využitím statistické metody DOE byl pomocí programu Minitab 16, podle modelu Box-Behnken design vygenerován seznam experimentů, jejichž provedením a vyhodnocením příslušné změny poměru plochy píku oxazepamu (nebo oxazepam-glukuronidu) a interního standardu bude možné určit optimální podmínky enzymatické hydrolýzy. Tyto experimenty budou realizovány, až budou k dispozici všechny vybrané benzodiazepin-glukuronidy.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Fraser, A. D.: Use and abuse of the benzodiazepines. *Therapeutic Drug Monitoring* **20**:5, 481–489 (1998).
- [2] Hirt, M.; Vorel, F.: *Soudní lékařství II. díl*. 1. vyd. Praha, Grada 2016.
- [3] Chytil, L.; Marešová, V.; Slanař, O.: Průkaz benzodiazepinů v moči pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. *Soudní lékařství* **56**, 10–16 (2011).
- [4] Gunnar, T.; Mykkänen, S.; Ariniemi, K.; Lillsunde, P.: Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection. *Journal of Chromatography. B* **806**, 205-219 (2004).
- [5] Morris, A. A.; Chester, S. A.; Strickland, E. C.; McIntire, G. L.: Rapid enzymatic hydrolysis using a novel recombinant B-glucuronidase in benzodiazepine urinalysis. *Journal of Analytical Toxicology* **38**, 610-614 (2014).
- [6] Malik-wolf, B.; Vorce, S.; Holler, J.; Bosy, T.: Evaluation of abalone  $\beta$ -glucuronidase substitution in current urine hydrolysis procedures. *Journal of Analytical Toxicology* **38**, 171-176 (2014).
- [7] Griffin, C. E.; Kaye, A. M.; Rivera Bueno, F.; Kaye, A. D.: Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *The Ochsner Journal* **13**, 214-223 (2013)
- [8] Lincová, D.; Farghali, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 1. vyd. Praha, Galén 2005.
- [9] Schulz, M.; Schmoldt, A.: Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care* **16**:R136 (2012).
- [10] Benzodiazepinová poradna. [on-line] Dostupné z URL: <<http://www.benzo.cz/clanky/prehled-benzodiazepinu.html>> [cit. 12.4.2018].
- [11] Riss, J.; Cloyd, J.; Gates, J.; Collins, S.: Benzodiazepines in epilepsy: Pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurologica Scandinavica* **118**, 69-86 (2008).
- [12] Szatkowska, P.; Koba, M.; Kośliński, P.; Wandas, J.; Bączek, T.: Analytical methods for determination of benzodiazepines. A short review. *Central European Journal of Chemistry* **12**:10, 994–1007 (2014).

- [13] Chemicalize. [on-line] Dostupné z URL: <<https://chemicalize.com/#/>> [cit. 15.11.2017].
- [14] Bogunovic, O. J.; Greenfield, S. F.: Practical geriatrics: Use of benzodiazepines among elderly patients. *Psychiatric Services* **55**:3, 233–235 (2004).
- [15] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Lutz, H.: *Barevný atlas farmakologie*. Praha, Grada 2012.
- [16] Chebib, M.; Johnston, G.; Albert, A.: The ‘ABC’ of GABA receptors: a brief review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **26**, 937–940 (1999).
- [17] D’Hulst, C.; Atack, J. R.; Kooy, F. R.: The complexity of the GABA<sub>A</sub> receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discovery Today* **14**:17/18, 866-875 (2009).
- [18] Gerecke, M.: Chemical structure and properties of midazolam compared with other benzodiazepines. *British Journal of Clinical Pharmacology* **16**, 11-16 (1983).
- [19] Costa, E.; Auta, J.; Grayson, D.; Matsumoto, K.; Pappas, G.; Zhang, X.; Guidotti, A.: GABA<sub>A</sub> receptors and benzodiazepines: A role for dendritic resident subunit mRNAs. *Neuropharmacology* **43**, 925-937 (2002).
- [20] Farghali, H.; Kutinová Canová, N.: Allosterická vazebná místa jako molekulární cíle pro vývoj, design a působení nových léčiv. *Chemické Listy* **107**, 518–521 (2013).
- [21] Persona, K.; Madej, K.; Knihnicki, P.; Piekoszewski, W.: Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **113**, 239-264 (2015).
- [22] Lader, M.: Effectiveness of benzodiazepines: Do they work or not? *Expert Review of Neurotherapeutics* **8**:8, 1189-1191 (2008).
- [23] Večerková, J.: *Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi*. Praha, Karolinum 1997.
- [24] Balíková, M.: *Forezní a klinická toxikologie - laboratorní toxikologická vyšetření*. Praha, Galén 2004.
- [25] Hayashida, M.; Takino, M.; Terada, M.; Kurisaki, E.; Kudo, K.; Ohno, Y.: Time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) exact mass database for benzodiazepine screening. *Legal Medicine* **11**, 423-425 (2009).

- [26] Uddin, M. N.; Samanidou, V. F.; Papadoyannis, I. N.: Development and validation of an HPLC method for the determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in biological fluids after sequential SPE. *Journal of Separation Science* **31**, 2358–2370 (2008).
- [27] Kinani, S.; Bouchonnet, S.; Milan, N.; Ricordel, I.: A sensitive and selective method for the detection of diazepam and its main metabolites in urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1141**, 131-137 (2007).
- [28] Bravo, F.; Lobos, C.; Venegas, K.; Benites, J.: Development and validation of a GC-NPD/micro-ECD method using dual column for the determination of benzodiazepine in human whole blood and plasma. *Journal of the Chilean Chemical Society* **55**:4, 454–457 (2010).
- [29] Sioufi, A.; Dubois, J.: Chromatography of benzodiazepines. *Journal of Chromatography B* **531**, 459–480 (1990).
- [30] Poletti, A.; Groppi, A.; Vignali, C.; Montagna, M.: Fully-automated systematic toxicological analysis of drugs, poisons, and metabolites in whole blood, urine, and plasma by gas chromatography-full scan mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **713**, 265-279 (1998).
- [31] Staerk, U.; K lpmann, W.: High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detection of drugs by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **745**, 399-411 (2000).
- [32] Kyle, P. B.; Spencer, J. L.; Purser, C. M.; Eddleman, K. C.; Hume, A. S.: Suspected pediatric ingestions: effectiveness of immunoassay screens vs. gas chromatography/mass spectroscopy in the detection of drugs and chemicals. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology* **41**:7, 919-925 (2003).
- [33] Bertol, E.; Vaiano, F.; Furlanetto, S.; Mari, F.: Cross-reactivities and structure-reactivity relationships of six benzodiazepines to EMIT® immunoassay. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **84**, 168-172 (2013).
- [34] Watterson, J. H.; Botman, J. E.: Detection of acute diazepam exposure in bone and marrow: Influence of tissue type and the dose-death interval on sensitivity of detection by ELISA with liquid chromatography tandem mass spectrometry confirmation. *Journal of Forensic Sciences* **54**:3, 708-714 (2009).

- [35] Lozano-Chaves, M. E.; Palacios-Santander, J. M.; Cubillana-Aguilera, L. M.; Naranjo-Rodríguez, I.; Hidalgo-Hidalgo-de-Cisneros, J. L.: Modified carbon-paste electrodes as sensors for the determination of 1,4-benzodiazepines: Application to the determination of diazepam and oxazepam in biological fluids. *Sensors and Actuators B* **115**, 575-583 (2006).
- [36] Ghasemi, J.; Niazi, A.; Ghorbani, R.: Determination of trace amounts of lorazepam by adsorptive cathodic differential pulse stripping method in pharmaceutical formulations and biological fluids. *Analytical Letters* **39**:6, 1159-1169 (2006).
- [37] Salem, A. A.; Barsoum, B. N.; Izake, E. L.: Potentiometric determination of diazepam, bromazepam and clonazepam using solid contact ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta* **498**, 79-91 (2003).
- [38] Chemica, C.; Ccacia, A.; Kalíková, K.; Riesová, M.; Chudoba, R.; Schmid, M.; Tesařová, E.: Separation and quantification of 1,4-benzodiazepines: HPLC versus CZE. *Croatia Chemica Acta* **84**:3, 367-373 (2011).
- [39] Chiang, J. F.; Hsiao, Y. T.; Ko, W. K.; Wu, S. M.: Analysis of multiple abused drugs and hypnotics in urine by sweeping CE. *Electrophoresis* **30**, 2583-2589 (2009).
- [40] Laloup, M.; Ramirez Fernandez, M.; De Boeck, G.; Wood, M.; Maes, V.; Samyn, N.: Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair. *Journal of Analytical Toxicology* **29**:7, 616-626 (2005).
- [41] Chèze, M.; Duffort, G.; Deveaux, M.; Pépin, G.: Hair analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in toxicological investigation of drug-facilitated crimes: Report of 128 cases over the period June 2003 - May 2004 in metropolitan Paris. *Forensic Science International* **153**:1, 3-10 (2005).
- [42] Cheng, W.-C.; Yau, T.-S.; Wong, M.-K.; Chan, L.-P.; Mok, K.-K.: A high-throughput urinalysis of abused drugs based on a SPE-LC-MS/MS method coupled with an in-house developed post-analysis data treatment system. *Forensic Science International* **162**, 95-107 (2006).
- [43] Laloup, M.; Ramirez Fernandez, M.; Wood, M.; Maes, V.; De Boeck, G.; Vanbeckevoort, Y.; Samyn, N.: Detection of diazepam in urine, hair and preserved oral fluid samples with LC-MS-MS after single and repeated administration of Myolastan® and Valium®. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388**:7, 1545-1556 (2007).

- [44] Hegstad, S.; Øiestad, E.; Johansen, U.; Christophersen, A.: Determination of benzodiazepines in human urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* **30**:1, 31–37 (2006).
- [45] Quintela, O.; Sauvage, F.-L.; Charvier, F.; Gaulier, J.-M.; Lachâtre, G.; Marquet, P.: Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for detection of low concentrations of 21 benzodiazepines, metabolites, and analogs in urine: Method with forensic applications. *Clinical Chemistry* **52**:7, 1346-1355 (2006)
- [46] Chèze, M.; Villain, M.; Pépin, G.: Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes. *Forensic Science International* **145**, 123-130 (2004).
- [47] Feng, J.; Wang, L.; Dai, I.; Harmon, T.; Bernert, J. T.: Simultaneous Determination of Multiple Drugs of Abuse and Relevant Metabolites in Urine by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology* **31**:7, 359–368 (2007).
- [48] Irving, R. C.; Dickson, S. J.: The detection of sedatives in hair and nail samples using tandem LC-MS-MS. *Forensic Science International* **166**, 58-67 (2007).
- [49] Salomone, A.; Gerace, E.; Brizio, P.; Gennaro, M.; Vincenti, M.: A fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **56**, 582-591 (2011).
- [50] Papini, O.; Bertucci, C.; da Cunha, S. P.; dos Santos, N. A. G.; Lanchote, V. L.: Quantitative assay of lorazepam and its metabolite glucuronide by reverse-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human plasma and urine samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**:2, 389–396 (2006).
- [51] Xiang, P.; Sun, Q.; Shen, B.; Chen, P.; Liu, W.; Shen, M.: Segmental hair analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry after a single dose of benzodiazepines. *Forensic Science International* **204**, 19-25 (2011).
- [52] Villain, M.; Concheiro, M.; Cirimele, V.; Kintz, P.: Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **825**, 72-78 (2005).

- [53] Sauve, E. N.; Langødegård, M.; Ekeberg, D.; Øiestad, A. M. L.: Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid-liquid extraction and UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* **883-884**, 177-188 (2012).
- [54] Bugey, A.; Rudaz, S.; Staub, C.: A fast LC-APCI/MS method for analyzing benzodiazepines in whole blood using monolithic support. *Journal of Chromatography B* **832**, 249–255 (2006).
- [55] Nakamura, M.; Ohmori, T.; Itoh, Y.; Terashita, M.; Hirano, K.: Simultaneous determination of benzodiazepines and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a high-resolution octadecyl silica column compatible with aqueous compounds. *Biomedical Chromatography* **23**, 357-364 (2009).
- [56] Anderson, R. A.; Ariffin, M. M.; Cormack, P. A. G.; Miller, E. I.: Comparison of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) with classical solid-phase extraction (SPE) for the detection of benzodiazepines in post-mortem hair samples. *Forensic Science International* **174**, 40-46 (2008).
- [57] Moore, C.; Coulter, C.; Crompton, K.; Zumwalt, M.: Determination of Benzodiazepines in Oral Fluid Using LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology* **31**, 596-600 (2007).
- [58] Kempf, J.; Wuske, T.; Schubert, R.; Weinmann, W.: Pre-analytical stability of selected benzodiazepines on a polymeric oral fluid sampling device. *Forensic Science International* **186**, 81-85 (2009).
- [59] Cabarcos, A. M. B. P.; Taberner, M.J.; Álvarez, I.; López, P.; Fernández, P.: Analysis of Six Benzodiazepines in Vitreous Humor by High-Performance Liquid Chromatography – Photodiode-Array Detection. *Journal of Analytical Toxicology* **34**, 539-542 (2010).
- [60] Goucher, E.; Kicman, A.; Smith, N.; Jickells, S.: The detection and quantification of lorazepam and its 3-O-glucuronide in fingerprint deposits by LC-MS/MS. *Journal of Separation Science* **32**, 2266-2272 (2009).
- [61] Beck, O.; Stephanson, N.; Sandqvist, S.; Franck, J.: Detection of drugs of abuse in exhaled breath using a device for rapid collection: Comparison with plasma, urine and self-reporting in 47 drug users. *Journal of Breath Research* **7**, (2013).
- [62] Bijlsma, L.; Emke, E.; Hernández, F.; De Voogt, P.: Performance of the linear ion trap Orbitrap mass analyzer for qualitative and quantitative analysis of drugs of abuse and relevant metabolites in sewage water. *Analytica Chimica Acta* **768**, 102-110 (2013).

- [63] Lee, X.-P.; Kumazawa, T.; Fujishiro, M.; Hasegawa, C.; Marumo, A.; Shoji, Y.; Arinobu, T.; Seno, H.; Sato, K.: Simple method for determination of triazolam in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spektrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 64–69 (2006).
- [64] Di Corcia, D.; Lisi, S.; Pirro, V.; Gerace, E.; Salomone, A.; Vincenti, M.: Determiation of pharmaceutical and illicit drugs in oral fluid by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spektrometry. *Journal of Chromatography B* **927**, 113-141 (2013).
- [65] Ming, D. S.; Heathcote, J.: A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine. *Journal of Chromatography B* **879**, 421-428 (2011).
- [66] Wang, K.-C.; Cheng, M.-C.; Hsieh, C.-L.; Hsu, J.-F.; Wu, J.-D.; Lee, C.-K.: Determiation of nimetazepam and 7-aminonimetazepam in human urine by using liquid chromatography–tandem mass spektrometry. *Forensic Science International* **224**, 84-89 (2013).
- [67] Salo, P. K.; Vilmunen, S.; Salomies, H.; Ketola, R. A.; Kostiainen, R.: Two-dimensional ultra-thin-layer chromatography and atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in bioanalysis. *Analytical Chemistry* **79**, 2101-2108 (2007).
- [68] ElSohly, M. A.; Gul, W.; Avula, B.; Murphy, T. P.; Khan, I. A.: Simultaneous Analysis of Thirty-Five Benzodiazepines in Urine Using Liquid Chromatography– Mass Spectrometry-Time of Flight. *Journal of Analytical Toxicology* **32**, 547–561 (2008).
- [69] Vorce, S. P.; Levine, B.; McDonough, P. C.; Past, M. R.: An Overdose Death Involving the Insufflation of Extended-Release Oxymorphone Tablets. *Journal of Analytical Toxicology* **34**, 521–526 (2010).
- [70] Borrey, D.; Meyer, E.; Duchateau, L.; Lambert, W.; Van Peteghem, C.; De Leenheer, A.: Enzymatic Hydrolysis Improves the Sensitivity of Emit Screening for Urinary Benzodiazepines. *Clinical Chemistry* **48**, 2047–2049 (2002).
- [71] O’Neal, C. L.; Poklis, A.: Validation of benzodiazepine  $\beta$ -glucuronide primary reference materials for hydrolysis and quality assurance controls. *Forensic Science International* **79**, 69-81 (1996).



- [72] Miki, A.; Tatsuno, M.; Katagi, M.; Nishikawa, M.; Tsuchihashi, H.: Simultaneous determination of eleven benzodiazepine hypnotics and eleven relevant metabolites in urine by column-switching liquid chromatography - Mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* **26**, 87-93 (2002).
- [73] Meatherall, R.: Optimal enzymatic hydrolysis of urinary benzodiazepine conjugates. *Journal of Analytical Toxicology* **18**, 382–384 (1994).
- [74] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.: *Practical HPLC method development*. 2. vyd. New York, Wiley-Interscience 1997.
- [75] Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; Farlee, R. D.: Synthesis and Characterization of Highly Stable Bonded Phases for High-Performance Liquid Chromatography Column Packings. *Analytical Chemistry* **61**:1, 2–11 (1989).
- [76] Claessens, H. A.; Van Straten, M. A.; Kirkland, J. J.: Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **728**, 259-270 (1996).
- [77] Neue, U. D.: *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*. New York, Wiley & Sons 2001.
- [78] Sýkora, D.; Tesařová, E.; Vosmanská, M.; Zvolánková, M.: Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické Listy* **101**, 190–199 (2007).
- [79] Agilent Technologies: [on-line]. Dostupné z URL: <<https://www.agilent.com/en-us/products/liquid-chromatography/columnchoices>> [cit. 20.11.2017]
- [80] Friedecký, D.; Lemr, K.: Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **20**:41, 152–157 (2012).
- [81] Wahid, Z.; Nadir, N.: Improvement of one factor at a time through design of experiments. *World Applied Sciences Journal* **21**, 56-61 (2013).
- [82] Leardi, R.: Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* **652**, 161-172 (2009).
- [83] Eriksson, L.; Johansson, E.; Kettaneh-Wold, N.; Wikström, C.; Wold, S.: *Design of Experiments: Principles and Applications*. 3. vyd. Umetrics Academy 2008.
- [84] Brereton, R. G.: *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. London, John Wiley and sons 2003.
- [85] Tošenovský J.: Plánování experimentů. Dostupné z URL: <<http://www.person.vsb.cz/archivcd/FMMI/DOE/Planovani%20experimentu.pdf>> [cit. 20.2.2018]

- [86] Wang, J.; Wan, W.: Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* **34**, 235-244 (2009).
- [87] Čabala, R.; Bursová, M.: Bell-shaped extraction device assisted liquid-liquid microextraction technique and its optimization using response-surface methodology. *Journal of Chromatography A* **1230**, 24-29 (2012).
- [88] Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escaleira, L. A.: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965-977 (2008).
- [89] Hibbert D. B.: Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B* **910**, 2–13 (2012).
- [90] Večerková, J.: Systematic analytic procedure for identification of unknown medicaments in biological materiál. *Sborník lékařský* **95**:4, 357–361 (1994).
- [91] Combie, J.; Blake, J. W.; Nugent, T. E.; Tobln T.: Morphine glucuronide hydrolysis: Superiority of  $\beta$ -glucuronidase from *Patella vulgata*. *Clinical Chemistry* **28**:1, 83-86 (1982).