

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra analytické chemie

**UPLC-MS jako nový trend v separačních technikách –
aplikace v analýze biologicky aktivních látek**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Hradec Králové, 2008

Lukáš Ořapka

NÁZEV:

UPLC-MS jako nový trend v separačních technikách – aplikace v analýze biologicky aktivních látek

ABSTRAKT:

Neopterin, pterinový derivát, je produkován lidskými monocyty-makrofágy po stimulaci interferonem gama. Představuje důležitý parametr v monitorování aktivity imunitního systému, který doprovází mnoho onemocnění. Ve vědeckých pracích je popisována spojitost neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu s intracelulárním oxidativním stresem a apoptózou buněk. Hodnoty neopterinu popř. jiných látek ze skupiny pterinů se v klinické praxi vyjadřují v poměru neopterin / kreatinin. Tato diplomová práce se zabývá vypracováním analytické metody určené k identifikaci a stanovení biologicky aktivních látek neopterinu, biopterinu, 7,8-dihydroneopterinu, 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu a kreatininu pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu. Byla vyvinuta analytická metoda k stanovení biologicky aktivních látek neopterinu, biopterinu, 7,8-dihydroneopterinu, 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu a kreatininu pomocí UPLC.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Neopterin, 7,8-dihydroneopterin, 5,6,7,8-tetrahydroneopterin, Biopterin, Kreatinin, UPLC, Hmotnostní spektrometrie, Trojitý kvadrupól

TITLE:

UPLC-MS as a new trend in separation processes – application in analysis of biological active substances

SUMMARY:

Neopterin, a pterine derivate, is produced by human monocytes/macrophages stimulated by interferon gama. Neopterin represents an important parameter for the monitoring of the immune system activation that accompanies different diseases. In several scientific studies the coherency between neopterin and 7,8-dihydroneopterin and intracelular oxidative stress and apoptosis of the cells was demonstrated. The value of neopterin or other substances from pterin´s group in clinical practice are expressed as the ratio of neopterin / creatinin. This diploma work was dealing with the development of an analytical method for the identification and quantitation of biological active substances neopterin, biopterin, 7,8-dihroneopterin, 5,6,7,8-tetrahydroneopterin and creatinin by ultra-performance liquid chromatography connected to the mass spectrometry triple of quadrupole type. Analytical method for the determination of biological active substances neopterin, biopterin, 7,8-dihroneopterin, 5,6,7,8-tetrahydroneopterin and creatinin by UPLC has been developed.

KEYWORDS:

Neopterin, 7,8-dihydroneopterin, 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu, biopterin, creatinin, UPLC, mass spectrometry, triple quadrupole

Zvláštní poděkování patří PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné a vstřícné vedení mé diplomové práce, za cenné praktické rady a připomínky a za pomoc při zdolávání všech úskalí spojených s mojí prací. Děkuji také všem pracovníkům katedry analytické chemie za ochotu a vstřícné jednání.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou v práci řádně citovány.

v Hradci Králové 9. 5. 2008

.....
Lukáš Ořapka

Obsah

Obsah.....	6
Seznam zkratk	9
1. Úvod.....	11
2. Cíl práce	13
3. Teoretická část.....	15
3.1. Kapalinová chromatografie.....	16
3.1.1. UPLC = ultra účinná kapalinová chromatografie.....	18
3.1.2. Sub-2-micronová technologie.....	19
3.2. UPLC Acquity systém	19
3.2.1. Binary Solvent Manager	19
3.2.2. Sample manager.....	20
3.2.3. Kolonový termostat.....	20
3.3. Kolony pro UPLC.....	21
3.4 HILIC = Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography.....	22
3.4.2 Přehled stacionárních fází pro HILIC	24
3.5. Hmotnostní spektrometrie.....	26
3.5.1. Ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii.....	28
3.5.1.1. Ionizace elektrosprejem – ESI.....	29
3.5.1.2. Ionizace nanoelektrosprejem – nano-ESI.....	31
3.5.1.3. Desorpce elektrosprejem – DESI	31
3.5.1.4. Chemická ionizace za atmosférického tlaku – APCI.....	32
3.5.1.5. Fotoionizace za atmosférického tlaku – APPI.....	32
3.5.1.7 Chemická ionizace – CI.....	34
3.5.1.8 Ionizace termosprejem – TSI.....	34
3.5.2 Analyzátoři v hmotnostní spektrometrii.....	34
3.5.2.1 Kvadrupólový analyzátor – Q	35
3.5.2.2 Trojitý kvadrupól – QqQ.....	35
3.5.2.3 Průletový analyzátor – TOF	36
3.5.2.4 Magnetický hmotnostní analyzátor.....	37
3.5.2.5 Iontová past.....	37

3.5.3. Detektory v hmotnostní spektrometrii.....	37
3.5.3.1. Elektronový násobič	37
3.5.3.2. Scintilační fotonásobičové detektory.....	38
3.5.4. Typy skenů v hmotnostní spektrometrii.....	39
3.7.1 Test vhodnosti systému – System Suitability Test (SST).....	39
3.6.3. Opakovatelnost v rámci SST (system suitability testu).....	40
3.6.4. Limit detekce – LOD	40
3.6.5 Limit kvantifikace - LOQ.....	40
3.9. Stanovení neopterinu pomocí kapalinové chromatografie.....	46
4. Experimentální část	47
4.1. Materiál a pomůcky	48
4.1.1. chemikálie	48
4.1.2. přístroje a pomůcky.....	48
4.2. Příprava zásobních roztoků a pracovních roztoků.....	49
4.2.1. Příprava zásobních roztoků.....	49
4.2.1.1. Výpočty pro přípravu zásobních roztoků.....	49
4.2.2. Příprava pracovních roztoků	50
4.3. Optimalizace podmínek pro UPLC-MS/MS spojení.....	50
4.3.2 Optimalizace podmínek pro MS detekci	52
4.3.2.1 Optimalizace podmínek v modu SIM	52
4.3.2.2. Sken produktových iontů.....	53
4.3.2.3. Optimalizace podmínek v modu SRM	53
5. Výsledky a diskuze	54
5.1. Optimalizace podmínek pro UPLC-MS/MS spojení.....	55
5.1.2.1 Analytická kolona Acquity UPLC™ BEH Shield RP18	58
5.1.2.2. Analytická kolona Acquity UPLC™ BEH HILIC.....	59
5.1.4.1. Optimalizace podmínek MS detekce v modu SIM.....	68
5.1.4.2. Opakovatelnost metody pro selektivní záznam iontu (SIM).....	72
5.3.2. Ověření linearity a citlivosti metody	77
6. Závěr.....	83
7. Použitá literatura	85

Seznam zkratek

AcAc	Acetic acid – kyselina octová
APCI	atmospheric pressure chemical ionization - chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	atmospheric pressure ionization – ionizace za atmosférického tlaku
APPI	atmospheric pressure photoionization – fotoionizace za atmosférického tlaku
BEH	bridged ethyl/siloxane silica hybrid – hybridní technologie silikagelu a polymeru
BH4	5,6,7,8-tetrahydrobiopterin
BIO	Biopterin
BSM	binary solvent manager – binární pumpa
CI	chemical ionization – chemická ionizace
CREA	Creatinin – Kreatinin
DESI	desorption electrospray ionization – desorpce elektrosprejem
DHN	7,8-dihydroneopterin
EI	elektronová ionizace
ESI	electrospray ionization – ionizace elektrosprejem
FAc	formic acid – kyselina mravenčí
GTP	guanosintrifosfát
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
INF- γ	interferon gama
LC	liquid chromatography – kapalinová chromatografie
LOD	limit of detection – limit detekce
LOQ	limit of quantification – limit kvantifikace
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MeOH	methanol
MS	mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NEO	Neopterin

NO	oxid dusnatý
NOS	NO-syntáza
PTFE	polytetrafluoethylen
Q	kvadrupól
QqQ	trojitý kvadrupól
RPLC	reverse phase liquid chromatography – chromatografie na reverzních fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka
S/N	poměr signálu k šumu
SM	sample manager – automatický dávkovač
SRM	selected reaction monitoring
SST	system suitability test – test vhodnosti systému
THN	5,6,7,8-tetrahydroneopterin
TNF- α	tumor nekrotizující faktor
TOF	time of flight – průletový analyzátor
TSI	thermospray ionization - ionizace termosprejem
UPLC	ultra performance liquid chromatography – ultra-účinná kapalinová chromatografie

1. Úvod

Neopterin, derivát pteridinu, je produkován lidskými monocyty / makrofágy po stimulaci interferonem gama. Koncentrace neopterinu vyjádřená jako poměr neopterin / kreatinin představuje užitečný parametr v monitorování aktivace imunitního systému. Zvýšené hodnoty neopterinu v séru a moči byly prokázány v různých patologických situacích. Neopterin a jeho derivát 7,8-dihydroneopterin je také spojován s intracelulárním oxidativním stresem a apoptózou buněk.

Kapalinová chromatografie (Liquid chromatography - LC) je separační metodou a dnes je jednou z dominantních analytických technik, která se rutinně využívá ve všech typech analytických laboratořích ať se zabývají analýzou potravin, životního prostředí, kontrolou léčiv, monitorování lékových hladin, toxikologií, biochemií nebo diagnostikou markerů různých patologických stavů.

Vývoj kapalinové chromatografie dnes dospěl k ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografii (UPLC). Tato metoda je charakteristická vysokou účinností separačního procesu, minimalizací potřebných systémových objemů, vysokým tlakem systému a zkrácení času analýz.

Hmotnostní spektrometrie je analytická detekční technika určená k identifikaci neznámých sloučenin, objasnění jejich struktury a kvantifikaci známých sloučenin. Proces identifikace a kvantifikace látek hmotnostním spektrometrem se odehrává ve třech hlavních krocích. Nejprve musí dojít k ionizaci vzorku v iontovém zdroji, poté k rozdělení a urychlení iontů v analyzátoru a nakonec k detekci iontů a zesílení signálu v detektoru. Paralelně jako u každé instrumentální metody dochází ke sběru dat pomocí sofistikovaného softwaru.

Hmotnostní spektrometrie jako detekční metoda v kapalinové chromatografii je metoda vysoce citlivá a spojení LC/MS se stalo jednou z nejdůležitějších analytických technik, které se velmi rychle rozvíjí a stává se metodou volby pro mnoho aplikací.

2. Cíl práce

Tato diplomová práce se zabývá analýzou biologicky aktivních látek neopterinu, biopterinu, 7,8-dihydroneopterinu, 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu a kreatininu pomocí UPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií využívající trojitý kvadrupól, jehož hlavními výhodami při kvantifikaci je vysoká citlivost a široký lineární rozsah.

Budou hledány optimální podmínky pro spojení UPLC/MS. V první fázi experimentu budou hledány optimální chromatografické podmínky pro separaci analyzovaných látek. Budou zkoušeny dvě chromatografické kolony určené k separaci polárních látek a hledáno optimální složení mobilní fáze. Poté bude optimalizováno nastavení MS detektoru. Nejprve bude zvolena vhodná ionizační technika a bude vybrán prekurzorový iont a poté bude následovat důkladná optimalizace parametrů MS detektoru v modu SIM (selected ion monitoring). Po provedení fragmentárních pokusů a vybrání produktových iontů bude provedena optimalizace metody v SRM (selected reaction monitoring) a budou ověřeny některé validační parametry.

3. Teoretická část

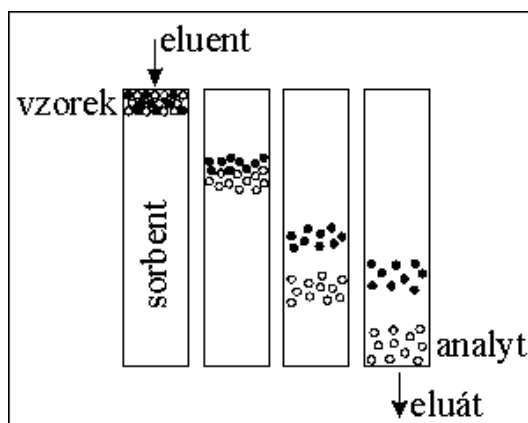
3.1. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie byla objevena v roce 1906 M. S. Tswettem, který provedl separaci barevných pigmentů obsažených v zelených listech na koloně s křídovou, aluminovou a sacharozovou náplní.

Kapalinová chromatografie je vysoce účinná separační technika, při které dochází k oddělení jednotlivých složek analyzované směsi. Současně je možné provést jejich identifikaci a kvantifikaci.

Společným principem všech chromatografických metod tedy i kapalinové chromatografie je dělení analyzovaných látek mezi dvěma fázemi, pevnou stacionární fází (nepohyblivá) a mobilní fází (pohyblivá). V průběhu chromatografického procesu dochází k postupnému a mnohokrát opakovanému vytváření rovnovážných stavů dělených látek mezi stacionární fází a mobilní fází, která unáší separované látky.

V kapalinové chromatografii je pevnou stacionární fází analytická kolona naplněná sorbentem a mobilní fází kapalina (směs rozpouštědel), která touto kolonou protéká a označuje se jako eluent. Při realizaci kapalinové chromatografie je analyzovaná směs látek nejprve rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle a poté dávkována do chromatografického systému, kterým protéká mobilní fáze, jež je hybnou silou chromatografického procesu. Mobilní fáze unáší analyzovanou směs přes chromatografickou kolonu, kde dochází k dělení směsi na jednotlivé složky. Míra rozdělení směsi závisí na rozsahu interakcí jednotlivých složek analyzované směsi se stacionární a mobilní fází. Jednotlivé složky směsi (analyty) jsou stacionární fází rozdílně zadržovány a zpožďovány (viz. obr.1). Interakce analytů s mobilní a stacionární fází může být ovlivňována jak změnami ve složení mobilní fáze, tak použitím různých typů stacionárních fází [1-3].



Obr. 1: separace analytů při kapalinové chromatografii [4]

Jednotlivé chromatografické metody lze podle mechanismu separačního děje rozdělit na chromatografii [4] :

✚ **Gelová permeační chromatografie:**

využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti

✚ **Rozdělovací chromatografie:**

využívá rozdílné rozpustnosti (a tudíž i rozdílné distribuce) molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami

✚ **Adsorpční chromatografie:**

využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry

✚ **Iontově výměnná chromatografie:**

využívá rozdílné výměnné interakce analytů (iontů) na povrchu iontového měniče.

✚ **Afinitní chromatografie:**

je založena na principu reakce mezi analytem a specifickou protilátkou

✚ **Chirální chromatografie**

využívá chirálních interakcí mezi chirálním selektorem jako součástí mobilní nebo stacionární fáze

V kapalinové chromatografii se používají dva způsoby eluce. Jsou to eluce izokratická a gradientová. Při izokratické eluci je po celou dobu analýzy používána mobilní fáze stejného složení, zatímco u eluce gradientové se složení mobilní fáze v průběhu analýzy mění [1].

V dnešní době je dominantní a prakticky nejpoužívanější chromatografickou analytickou metodou HPLC (= vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Vývoj v oblasti kapalinové chromatografie dospěl k modernější tzv. UPLC (= ultra účinná kapalinová chromatografie), která se dostává do popředí zájmu. Přínosem UPLC je

především mnohonásobná účinnost dělicího procesu, kratší doba analýzy a vyšší citlivost (viz. obr.2).

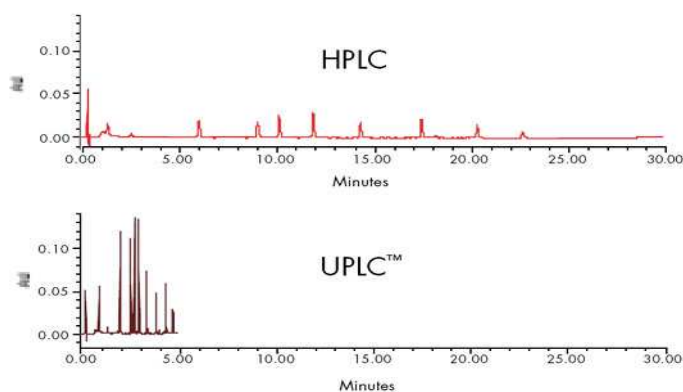
3.1.1. UPLC = ultra účinná kapalinová chromatografie

UPLC je novým směrem v kapalinové chromatografii. Technologie UPLC patří mezi tzv. rychlé přístupy LC analýzy. Principiálně využívá UPLC k separaci látek stejné mechanismy jako konvenční HPLC, tedy opakované ustanovování rovnováhy mezi pevnou stacionární fází a mobilní fází (viz. kapitola 3.1).

Jako stacionární fáze se při kapalinové chromatografii využívají analytické kolony, které jsou plněny sorbentem tvořeným malými sférickými částicemi, na jejichž povrchu dochází k separaci látek. Obecně platí pravidlo, že čím menší je velikost těchto částic, tím větší je jejich celkový povrch, a tím účinnější a časově méně náročnější je separace látek. V analytických kolonách určených pro konvenční HPLC jsou obvykle částice o velikosti 3-5 μm . Vývojový trend při vývoji a výrobě nových typů stacionárních fází logicky spěje ke zmenšování částic stacionární fáze.

V praxi se stávají populární tzv. sub-2-micronové částice, tedy částice menší než 2 μm . Avšak takto malé částice kladou v systému vysoký odpor a způsobují vysoký tzv. zpětný tlak. Tento zpětný tlak je poté hlavním limitem využití takových kolon v konvenční HPLC. Se zvyšováním průtoku sice dochází k urychlení analýzy, ale k dosažení vyššího průtoku je potřeba působit na systém vyšším tlakem, který je dostatečný k překonání zpětného tlaku. V případě HPLC je zvyšování tlaku možné jen do určité míry, a to cca do 30-40 MPa.

Systém UPLC je oproti klasickým HPLC konstruován tak, aby odolával mnohem vyšším tlakům, a to až do hodnot cca 100 MPa. Systém UPLC tak dokáže plně využít výhod sub-2-micronových částic [5-7].



Obr. 2: porovnání chromatografických záznamů HPLC a UPLC [7]

3.1.2. Sub-2-micronová technologie

Kvalita sorbentu má rozhodující vliv na účinnost separace. Důležitá je velikost a stejnoměrnost částic, dále jejich tvar, porozita a struktura. Sub-2-micronové analytické kolony jsou obvykle naplněny částicemi s průměrem 1,8 / 1,7 μm , popř. i 1,9 μm , ale obecně pro ně platí, že velikost částic je do 2 μm . Analytické kolony využívající sub-2-micronovou technologii jsou navrženy speciálně pro velmi rychlé analýzy pomocí UPLC a podobných technik. Právě proto, že velikost těchto částic je takto malá, účinnost analytické kolony stoupá, a to i se zvyšujícím se průtokem mobilní fáze, což vyplývá z Van Deemterovy teorie [8].

Tyto malé sférické částice stacionární fáze mezi sebou mají jen velmi malé prostory a kladou tak velký odpor toku mobilní fáze. Pro optimální separaci je zapotřebí použití vysokých tlaků, někdy až okolo hodnot 100 MPa. Nutnost použití takto vysokých tlaků vyplývá z velkého povrchu, na kterém dochází k separaci látek. Odtud název ultra-účinná kapalinová chromatografie – UPLC.

Použití částic s takto malým průměrem vyžaduje několik systémových úprav, aby bylo dosaženo jejich co nejlepší účinnosti. Musí být minimalizovány systémové objemy, zvýšena rychlost sběru dat, aby bylo získáno dostatečné množství bodů potřebných k zaznamenání chromatografického píku, který je při vysoce účinných analýzách eluován ve velmi krátkém čase, musí být optimalizován způsob dávkování malých objemů vzorku a musí být zajištěn opakovatelný průtok společně s opakovatelným složením mobilní fáze pro isokratickou i gradientovou eluci i při enormně vysokých tlacích [9-10].

3.2. UPLC Acquity systém

Existuje několik komerčně dostupných přístrojů pracujících v modu UPLC. Měření v rámci mé diplomové práce bylo prováděno na ACQUITY UPLC od firmy Waters. Tento UPLC systém je sestaven ze čtyř hlavních modulů [11] viz obr 3.

3.2.1. Binary Solvent Manager

Binary solvent manager (BSM) je vysokotlaká binární pumpa, která umožňuje nastavení průtoků mobilní fáze systémem v rozmezí od 0,01 až do 2,00 ml/min (s přesností < 0,075% RSD). Tato pumpa umožňuje výběr ze čtyř solventů, což je výhodné pro tvorbu gradientů a také to umožňuje snadnou automatizaci, a tím i snadnou

výměnu solventů a přepínání různých metod. Maximální pracovní tlak je asi 100 MPa (15 000 psi, 1000 bar) a umožňuje tak maximální využití sorbentů s velmi malým zrněním plněných do kolon s úzkým průměrem. Pro odplynění je zde uložen šesti-komůrkový degasser.



Obr. 3: ACQUITY UPLC systém od firmy Waters [11]

3.2.2. Sample manager

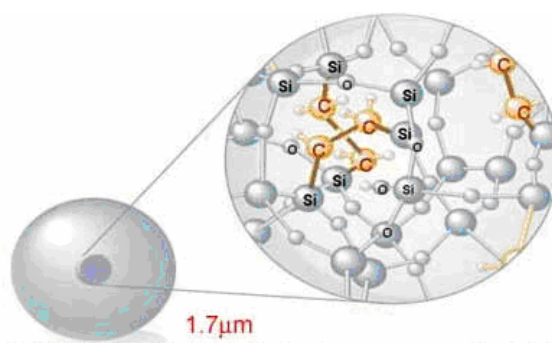
Sample manager (SM) je automatický dávkovač, který umožňuje dávkování analyzovaného vzorku v rozsahu od 0,1 μ l do 50,0 μ l. Doba mezi jednotlivými nástřiky je velmi krátká, což velmi urychluje dávkovací cyklus - do 25 s bez oplachu jehly, do 45 s s jedním oplachem jehly a do 60 s s dvěma oplachy jehly. Pro oplach jehly jsou používány dvě kapaliny, tzv. silná a slabá, které volíme podle povahy analyzovaných vzorků. Nástřik vzorku je tlakově asistovaný a je zde použit design jehla v jehle. Tím je omezen přenos vzorku mezi jednotlivými nástřiky na méně než 0,005% a současně je tím také eliminována možnost ucpání jehly. Sample manager je také vybaven vlastním termostatem, který umožňuje temperování prostoru sample manageru v rozsahu od +4 °C do +40 °C.

3.2.3. Kolonový termostat

Kolonový termostat je samostatnou součástí a jsou v něm uloženy analytické kolony určené pro UPLC. Umožňuje temperaci kolony od +5°C do 65°C. Kolony jsou navíc opatřeny mikročipem eCord, který je trvale připevněn k tělu kolony a během měření zaznamenává informace ze „života kolony“. Jsou zaznamenávány např. tyto informace: počet měřených vzorků, počet realizovaných nástřiků, tlaky, kterým je kolona vystavena nebo teploty, na které je kolona temperována.

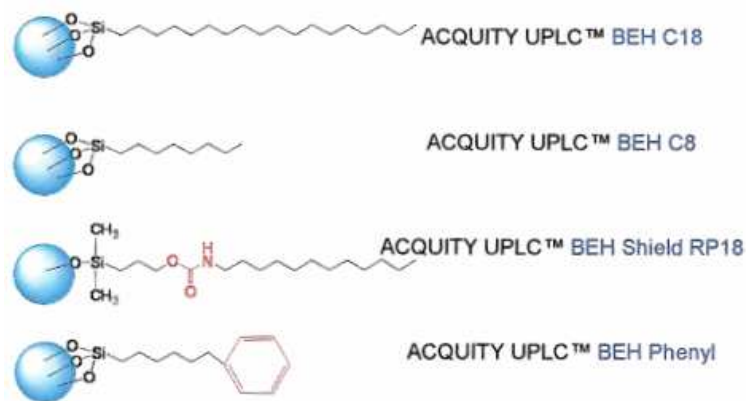
3.3. Kolony pro UPLC

Při použití UPLC je velmi důležité, aby i stacionární fáze, stejně jako celý systém, byla schopna odolávat ultra vysokým tlakům, které mohou dosahovat hodnot až 100 MPa. Pro spojení s Acquity UPLC systémem byly vyvinuty speciální analytické kolony, které využívají tzv. BEH technologii („bridged ethyl/siloxane silica hybrid“) – obr. 4. Stacionární fáze těchto kolon je tvořena speciálním hybridním sorbentem, který je syntetizován z polymeru a silikagelu a spojuje výhody obou těchto materiálů. Tyto hybridní sorbenty vykazují jednak velmi vysokou účinnost a zároveň vysokou jak mechanickou (odolávají vysokým tlakům), tak chemickou stabilitu (odolnost v rozmezí pH 1 až 12). Fyzikální a chemická odolnost těchto kolon je založena na přítomnosti ethylenových můstků v silikagelové matici. Tím získávají částice vysokou odolnost pro podmínky UPLC [11 - 12].



Obr. 4: struktura BEH částice

Acquity BEH analytické kolony pro UPLC jsou dostupné s C₈, C₁₈ hydrofóbními alkylovými ligandy vázanými na povrch stacionární fáze. Dále je k dispozici kolona se stacionární fází Shield, na kterou je vázán hydrofobní alkylový ligand s vloženou hydrofilní polární skupinou. Posledním typem je kolona, kde je stacionární fází reverzní fáze s fenylovým ligandem (obr. 5) [13]. Nově firma Waters dodává analytické kolony pro HILIC (viz. kapitola 3.4.).



Obr. 5: Acquity UPLC BEH kolony a možnosti chemických modifikací

3.4 HILIC = Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

HILIC je technologie kapalinové chromatografie určená k separaci polárních, hydrofilních látek. Technologie HILIC je novým trendem v kapalinové chromatografii, který v posledních letech nabývá na velkém významu. Použití HILIC chromatografie je alternativou klasické chromatografie na reverzních fázích (RPLC), která využívá k separaci nepolární stacionární fáze (různé hydrofobní modifikace silikagelu) a mobilní fázi tvořenou polární kapalinou (např. směsí vody, acetonitrilu nebo/a methanolu). Pro separaci polárních látek není vhodná ani chromatografie na normálních fázích, protože v nepolárních rozpouštědlech je většina analytů, jejichž stanovení bylo předmětem této práce, nerozpustných.

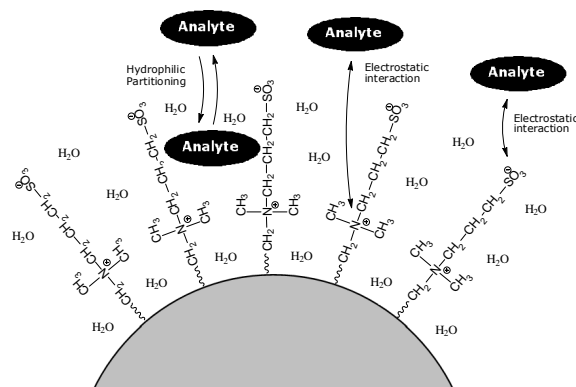
základní charakteristiky HILIC:

- ✚ kolona naplněná polární hydrofilní stacionární fází, která nejčastěji obsahuje hydroxyl-ethylové, amino nebo zwitteriontové skupiny
- ✚ mobilní fáze tvořená vodnou složkou a organickým rozpouštědlem ve vysoké koncentraci mísitelným s vodou

Typická mobilní fáze pro HILIC obsahuje organické rozpouštědlo (např. acetonitril nebo methanol) v koncentraci mezi 50 až 95% a vodnou složku s aditivou jako je např. octan amonný, mravenčan amonný, kyselina mravenčí nebo kyselina octová. Použití HILIC chromatografie je tedy vhodné i v systému UPLC/MS, protože využívá

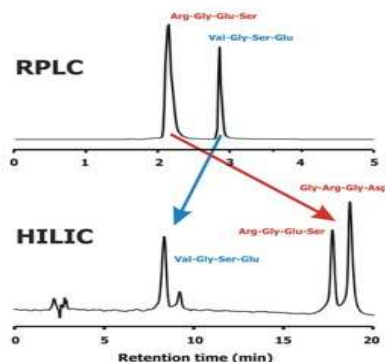
mobilní fáze složené z těkavých organických rozpouštědel a malého podílu vody, což je plně kompatibilní z hlediska MS detekce.

Voda přítomná v mobilní fázi vytváří na povrchu stacionární fáze tzv. stagnantní vodnou vrstvu. A právě interakce mezi analyty a touto stagnantní vodnou vrstvou jsou podstatou separace jednotlivých složek analyzované směsi mezi převážně organickou mobilní fází a modifikovanou stacionární fází. Na mechanismu separace analytů se kromě rozdělování podílejí také elektrostatické interakce typu vodíkových můstků a interakcí dipól-dipól mezi stagnantní vodnou vrstvou a molekulami analyzovaných látek viz. obr. 6.



Obr. 6:

Mezi faktory ovlivňující sílu interakcí, a tím i separaci tedy patří polarita a dipólový moment analytů, pH mobilní fáze a přítomnost funkčních skupin schopných tvořit vodíkové můstky. Separace látek je tedy v tomto systému dosaženo mechanismem rozdělování společně s elektrostatickými interakcemi. Jednotlivé analyty jsou ze systému eluovány v pořadí rostoucí hydrofility, tedy v opačném pořadí než při RPLC viz. obr. 7 [14 - 16].



Obr. 7: porovnání separace peptidů při použití techniky HILIC a klasické chromatografie a reverzních fázích (RPLC). Při HILIC jsou analyty eluovány v pořadí rostoucí polarity, tedy v opačném pořadí než při RPLC.

3.4.2 Přehled stacionárních fází pro HILIC

Analytické kolony pro HILIC jsou většinou plněné sorbenty na bázi silikagelu nebo porézního polymeru, které jsou modifikované různými funkčními skupinami jako jsou např. amino, aminopropyl, diol nebo zwitterion skupiny (chemicky sulfonylalkylbetainové funkční skupiny).

V současnosti je na výběr velké množství analytických kolon speciálně navržených pro HILIC chromatografii. Výběr vhodné stacionární fáze, resp. analytické kolony pro HILIC závisí na směsi analytů, které mají být separovány.

Příklady analytických kolon pro HILIC chromatografii a stacionárních fází, kterými jsou tyto kolony plněny je uveden v tabulce 1.

KOMERČNÍ NÁZEV KOLONY	VÝROBCE	NOSIČ	MODIFIKUJÍCÍ FUNKČNÍ SKUPINA	POUŽITÍ	CITACE
ZIC-HILIC ZIC-p-HILIC	SeQuant	Silikagel polymer	sulfonylalkylbetain	separace N- glykosilovaných peptidů	[17]
PolyHydroxyethyl A	PolyLC	silikagel	poly(2-hydroxyethyl aspartamid)	analýza peptidů a nukleových kyselin	[18]
PolySulfoethyl A	PolyLC	silikagel	Poly(2-sulfonylethyl aspartamid)	analýza peptidů	[19]
PolyCAT A	PolyLC	silikagel	Polyaspartamid	analýza H1 histonů	[20]
Alltima™Cyano	Grace Alltech	silikagel	3-kyanopropyl	stanovení Piperazinu	[21]
Lichrospher	Merk	silikagel	2,3-dihydroxypropyl	analýza acetylcholinu a cholinu v reálných vzorcích	[22]
Spherisorb®NH ₂	Waters	silikagel	3-aminopropyl	separace peptidů	[23]

Tabulka 1: přehled komerčně vyráběných kolon a stacionárních fází pro HILIC

3.5. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je moderní a vysoce výkonná fyzikálně-chemická analytická metoda, jejíž princip je založen na separaci různě těžkých a různě elektricky nabitých iontů v magnetickém nebo elektrickém poli či jejich kombinaci. Tato analytická metoda byla vyvinuta počátkem 20 století a její objev je spojen se jménem Sira Josepha J. Thomsona [24]. Původně byla tato metoda využívána především ve fyzice a v chemii. Během druhé světové války hrála MS například hlavní roli v tzv. projektu Manhattan [citace]. Během posledních dvaceti let se použití této metody rozšířilo snad do všech oblastí přírodních věd, od geologie, přes fyziku, astronomii a chemii k biologii, ale též do farmacie a medicíny. Hmotnostní spektrometrie jako detekční metoda v kapalinové chromatografii je metoda vysoce citlivá a spojení LC/MS se stalo jednou z nejdůležitějších analytických technik, které se velmi rychle rozvíjí a stává se metodou volby pro mnoho aplikací. Rostoucí popularita hmotnostní spektrometrie je výsledkem jejích jedinečných vlastností:

- ✚ umožňuje separaci látek, jejich kvantifikaci a identifikaci pomocí standardů a naměřených hmotnostních spekter
- ✚ poskytuje reprodukovatelné informace o molekulové hmotnosti a struktuře analyzovaných látek
- ✚ je vysoce selektivní a vysoce citlivou analytickou metodou
- ✚ spojení hmotnostního spektrometru s moderními separačními metodami jako je např. UPLC umožňuje provádět kvalitativní i kvantitativní analýzu látek ve směsích ve stopovém množství
- ✚ dostupnost moderních iontových zdrojů rozšiřuje oblast využitelnosti MS na vysokomolekulární netěkavé látky (biochemický, klinický výzkum a monitorování lékových hladin)
- ✚ je použitelná pro všechny typy vzorků – těkavé, netěkavé; polární, nepolární; pro pevné, kapalné i plynné substance
- ✚ hmotnostní spektrometrie také umožňuje určit izotopový poměr prvků ve vzorku (např. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, $^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$), protože různé izotopy téhož prvku mají různou hmotnost, a tak je lze pomocí MS separovat a změřit jejich zastoupení

Základní princip hmotnostní spektrometrie spočívá v ionizaci neutrálních molekul a následné separaci vzniklých elektricky nabitých iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) při jejich průchodu magnetickými nebo elektrickými poli.

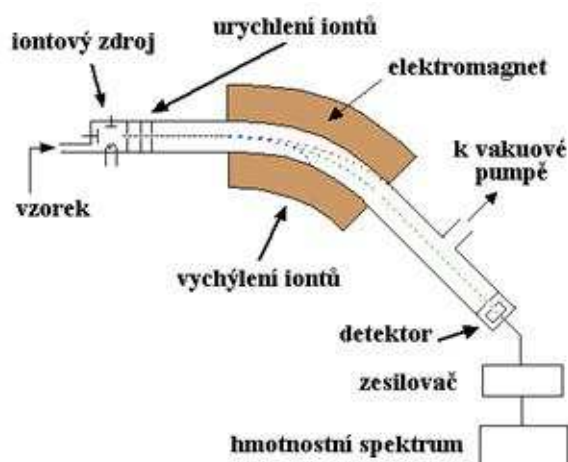
jednotlivé kroky při analýze pomocí MS:

- ✚ **ionizace atomů nebo molekul**, při které dochází k oddělení nebo přijetí elektronů nebo protonů a jejich převedení na elektricky nabitě ionty. Nejvýznamnějším produktem ionizace je tzv. molekulový (prekurzorový) iont, který vzniká z původní molekuly analyzované látky přijetím nebo oddělením jedné nabitě částice. Během ionizace dochází i k dalším dějům, kdy se molekulový iont nebo původní molekula rozpadá na menší částice. Tyto jevy se označují jako fragmentace.

- ✚ takto vzniklá směs nabitých iontů je poté **urychlována** (nejčastěji v elektrickém poli) a **separována** v magnetickém podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) nabitých částic

- ✚ v posledním kroku jsou jednotlivé separované **ionty detekovány**

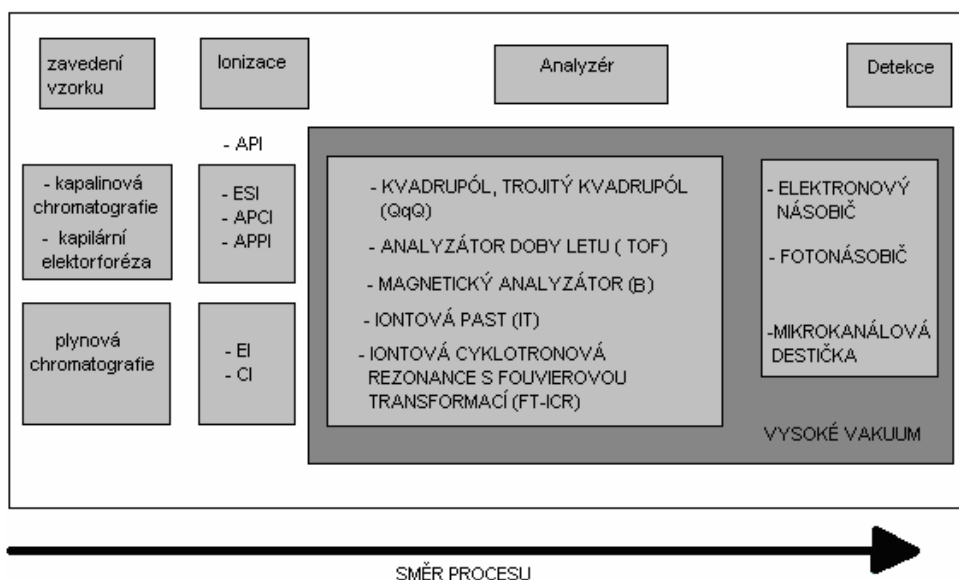
Schéma jednotlivých kroků realizovaných při analýze hmotnostním detektorem je znázorněno na obr. 8. [26]



Obr. 8: základní schéma hmotnostního spektrometru

základní komponenty, ze kterých se skládá hmotnostní spektrometr:

- 1) **iontový zdroj** – slouží k ionizaci neutrálních molekul analytu na nabitě částice a fragmentaci. Konstrukce se liší podle použité ionizační techniky
- 2) **hmotnostní analyzátor** – slouží k rozdělení směsi iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z)
- 3) **detektor** – slouží k detekci iontů po jejich separaci m/z a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů
- 4) **řídící jednotka** – nahrává, zpracovává, ukládá a zobrazuje data. Kromě toho řídí chod celého chromatografického systému
- 5) **vakuový zdroj** – udržuje v hmotnostním spektrometru velmi nízký tlak. V oblasti iontového zdroje udržuje tlak v rozmezí 10^{-4} až 10^{-8} torr podle typu iontového zdroje. Výjimkou jsou ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (viz. kapitola 3.5.1.). Poněkud nižší tlak je udržován v oblasti hmotnostního analyzátoru [25 - 26].



Obr. 9: možnosti spojení separačních technik s technikami MS

3.5.1. Ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii

Ionizace analyzovaných látek je prvním významným krokem při analýze pomocí hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní detektory využívají k ionizaci analytů různé ionizační techniky (obr. 9).

Klíčem k úspěšné analýze pomocí MS je převedení molekul analyzované látky do plynného ionizovaného stavu, protože veškeré informace poskytované hmotnostním spektrometrem se týkají pouze částic nesoucích náboj. S elektricky nabitými částicemi je navíc jednodušší manipulace ve smyslu řízení jejich pohybu. Aplikací elektrických a magnetických sil se energie a rychlost iontů dají kontrolovat a obojí tak přispívá k jejich separaci a detekci. Neutrální neionizovaná plynná fáze by se pohybovala libovolně a necíleně. Ionizace je také nutná k eliminaci rozpouštědla.

Ionty produkované iontovým zdrojem hmotnostního spektrometru mají významný vliv na kvalitu dat získaných při analýze. Výběr ionizační techniky je proto velmi důležitý a závislý na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu, konkrétně na jeho těkavosti, molekulové hmotnosti, tepelné stabilitě, a složitosti matrice, ve které je analyt obsažen aj.

V prostoru iontového zdroje dochází k většině fragmentačních reakcí. Při fragmentaci dochází k rozpadu tzv. prekurzorového iontu nebo původní molekuly analyzované látky na menší částice (fragmenty), přičemž tyto fragmenty jsou pro každou látku specifické.

Podle množství dodané energie je obvyklé dělit ionizační techniky na měkké a tvrdé. Při měkkých ionizačních technikách je energetický přebytek dodaný molekule látky malý a pravděpodobnost fragmentace primárně vzniklého iontu je nízká. Naopak při tvrdých ionizačních technikách dodaná energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu [25 - 26].

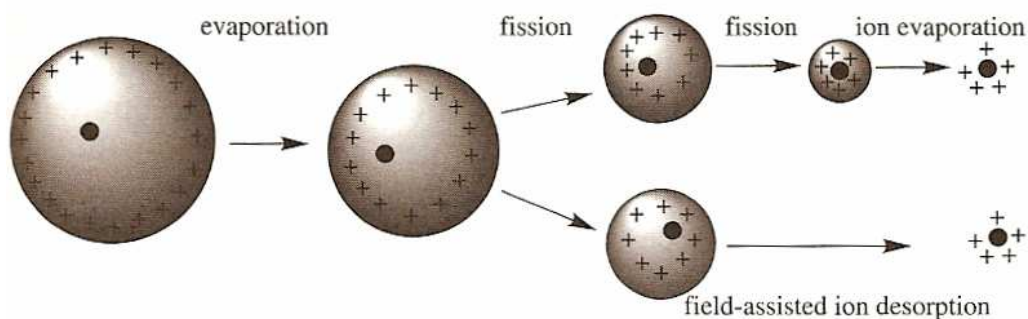
3.5.1.1. Ionizace elektrosprejem – ESI

Ionizace elektrosprejem patří mezi ionizační techniky realizované za atmosférického tlaku, tzv. API (atmospheric pressure ionization) techniky. ESI je technikou, která umožňuje ionizaci a následně analýzu velkých biomolekul jako jsou např. proteiny, peptidy nebo nukleotidy [27]. Samozřejmostí je možnost analýzy látek s malými molekulovými hmotnostmi nebo případně vyšší polaritou. ESI je také nejvhodnější ionizační technikou pro spojení LC/MS [28].

Jak již naznačuje pojmenování této techniky, ESI je proces při kterém dochází k produkci spreje tvořeného vysokým počtem elektricky nabitých kapének, které vznikají působením silného elektrického pole. Analyt, který je rozpuštěný ve vhodném eluentu směřuje z kapalinového chromatografu do hmotnostního spektrometru kovovou kapilárou kolem které proudí dusík. Na kapiláru je současně vkládáno vysoké napětí 3

až 5 kV. V proudu dusíku vzniká velké množství kapének, které nesou velké množství ionizovaných molekul.

Poté dochází k dalšímu odpařování rozpouštědla z povrchu kapiček, následkem toho se zmenšuje jejich objem a narůstá povrchová hustota elektrického náboje. Jakmile dosáhne povrchová hustota elektrického náboje kritické hodnoty dojde k rozpadu kapičky na několik menších kapiček nesoucích náboj. Tento jev se označuje jako tzv. Coulombická exploze. Proces Coulombických explozí a odpařování rozpouštědla se opakuje tak dlouho, až je kapička dostatečně malá na to aby došlo k uvolnění elektricky nabitě částice z jejího povrchu, tzv. vypařování iontů (obr.10). Jednotlivé uvolněné ionty jsou poté unášeny směrem k analyzátoru a detektoru MS.



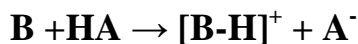
Obr. 10: vypařování iontů; schéma Coulombických explozí a odpařování rozpouštědla při ionizaci elektrosprejem [25]

Na průběh ionozace technikou ESI má kromě jiného vliv pH mobilní fáze. Hodnota pH by měla být upravena podle charakteru analytu, který je ionizován. Vhodná úprava pH má pozitivní vliv na kvalitu ionizace, a tím i celé MS analýzy. Kyselá oblast pH podporuje ionizaci při stanovení bazických sloučenin. Pro tento záměr se nejčastěji používají přísady organických kyselin jako je např. kyselina octová nebo kyselina mravenčí v koncentraci do 0,1 %, které podporují protonace molekul analyzovaných látek a vznik kladných iontů (ESI positive = ESI⁺).

schéma protonizace bazických sloučenin pro záznam kladných iontů :

po přidání kyselé substance HA (např. CH₃COOH, HCOOH)

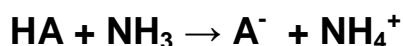
(podtržením jsou označeny kyselá vodíky organických kyselin)



Zásaditá oblast pH naopak podporuje ionizaci, a tím MS analýzu kyselých sloučenin. Pro podpoření ionizace, resp. deprotonace analytů a vznik záporných iontů (ESI negative = ESI⁻) se používá přídavek 0,1 až 0,5% NH₃.

schéma deprotonace kyselých sloučenin pro záznam záporných iontů :

po přidání bazické substance – např. NH₃



Při ESI mají vliv na průběh ionizace také použitá rozpouštědla. Methanol je proton donorové rozpouštědlo a v průběhu ESI podporuje vznik kladných iontů. Naproti tomu acetonitril je proton akceptorové rozpouštědlo a podporuje deprotonaci a vznik záporně nabitých iontů.

Optimální účinnosti ESI a citlivosti hmotnostního spektrometru je dosaženo při průtokové rychlosti od 2 do 10 µl/min.

Technika ionizace elektrosprejem (ESI) je využívaná hmotnostním detektorem v UPLC laboratoři na katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, kde byla realizována tato diplomová práce, a proto je tato ionizační technika popsána podrobněji [29 - 31]. U ostatních ionizačních technik bude popsán pouze základní princip, na kterém pracují.

3.5.1.2. Ionizace nanoelektrosprejem – nano-ESI

Ionizace nanoelektrosprejem je miniaturizovaná verze standardní ESI a je navržena pro analýzy při použití průtokových rychlostí v řádech nl/min [32]. Při nano-ESI se používá zlatem potažená jemná kapilára, na kterou se vkládá menší napětí (obvykle 500-800 V). Při této technice se nepoužívá rozprašující plyn a objem nástřiku vzorku je typicky menší než 1µl. Vznikající kapénky jsou logicky menší než při ESI. Obvykle mají průměr menší než 200 nm [25].

3.5.1.3. Desorpce elektrosprejem – DESI

Jedná se o novou metodu, která kombinuje ESI s ionizací desorpcí [33]. Při této metodě dochází k vzniku kapének jako při ESI pomocí proudu dusíku. Avšak tyto kapénky jsou absorbovány na speciální povrch tvořený např. PTFE. Z tohoto povrchu se poté uvolňují pouze jednotlivé elektricky nabitě částice. Tato metoda se dá použít při

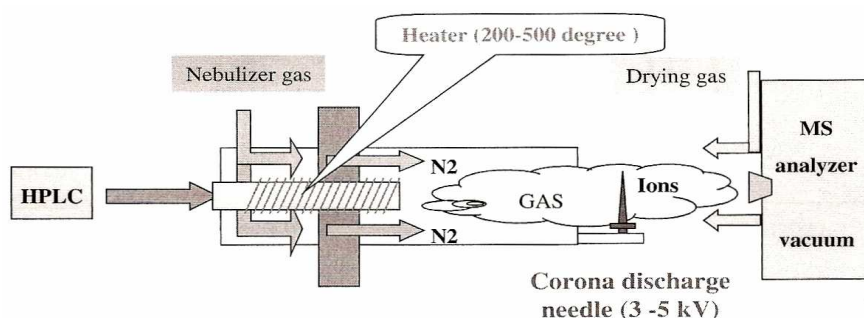
stanovení polárních i nepolárních látek. Mohou jí být analyzovány jak malé jako molekuly, tak velké molekuly typu peptidů a proteinů [25].

3.5.1.4. Chemická ionizace za atmosférického tlaku – APCI

Tato metoda je vhodná pro analýzu eluátu směřujícího od kapalinového chromatografu, tedy při spojení LC/MS. Je vhodná k analýze méně polárních látek s molekulovou hmotností do 1500 Daltonů. Patří mezi měkké ionizační techniky.

Princip APCI je obdobný jako u konvenční chemické ionizace CI (viz. kapitola 3.5.1.7), ale ionizace probíhá za atmosférického tlaku. Konstrukce je obdobná jako u ESI, oproti které je v APCI přidána výbojová elektroda (jehla), na kterou je vkládáno vysoké napětí. Působením rozprašovacího plynu a teploty na kapiláře (350 až 500 °C) vzniká proud plynu. Tento proud plynu následně prochází přes výbojovou elektrodu, která ionizuje jednotlivé molekuly podle jejich protonové afinity. Nejprve jsou tedy ionizovány molekuly mobilní fáze (H_2O , CH_3OH , CH_3CN), které opouštějí systém speciálními zúženými otvory. Molekuly analyzované látky jsou ionizovány se zpožděním, vlivem ion-molekulárních chemických reakcí s mobilní fází a směřují dále k analyzátoru (obr. 11).

Metoda APCI je použitelná pouze pro dobře těkavé a termostabilní analyty a použitá mobilní fáze musí být vhodná pro acido-bazické reakce v plynné fázi [25].

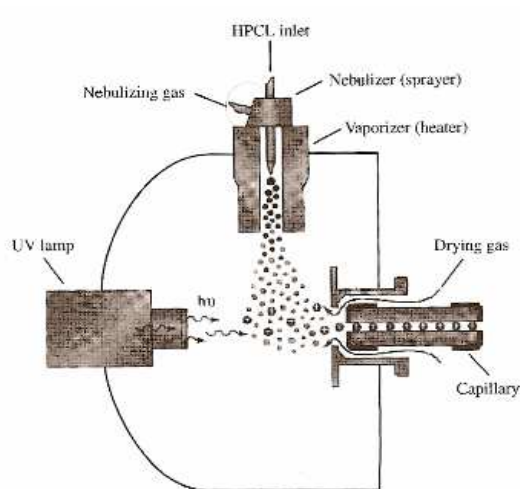


Obr. 11: APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku [25]

3.5.1.5. Fotoionizace za atmosférického tlaku – APPI

Tato technika pracuje na obdobném principu jako APCI a stejně jako APCI patří mezi měkké ionizační techniky. Místo koronárního výboje je k ionizaci molekul v plynné fázi použito UV záření (obr. 12). Zdrojem UV záření je kryptonová výbojka. Energie fotonů je volena tak, aby byla vyšší než ionizační energie většiny organických

molekul, ale při tom menší než ionizační energie jednotlivých složek použité mobilní fáze [25].

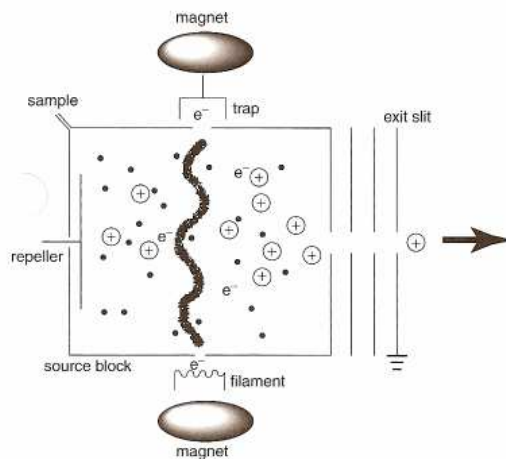
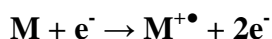


Obrázek 12: schématické znázornění fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [25]

3.5.1.6. Elektronová ionizace – EI

Elektronová ionizace patří mezi nejstarší ionizační techniky a poprvé byla použita již v roce 1918 [34]. Tato ionizační technika je označovaná jako „tvrdá“. Ionizovaná molekula při ní získá nadbytek vnitřní energie a dochází k fragmentaci molekuly na menší části (obr. 13).

Při elektronové ionizaci je analyzovaný vzorek ve formě plynu bombardován proudem energeticky nabitých elektronů, které směřují od katody, která je generuje k anodě. Dochází k interakcím mezi elektrony a molekulami analyzované látky, ze kterých vznikají kladně nabitě radikálové ionty ($M^{+\bullet}$).



Obr. 13: schéma elektronové ionizace [25]

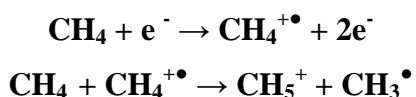
K ionizaci dochází pokud je kinetická energie elektronů emitovaných katodou vyšší než ionizační energie molekul analyzované látky. Obvykle se používá proud elektronů s energií 70 eV. Ionizované molekuly dále putují směrem k analyzátoru [25].

3.5.1.7 Chemická ionizace – CI

Chemická ionizace pracuje na obdobném principu jako EI nebo APCI. Analyzovaný vzorek ve formě plynu reaguje s tzv. reakčním plynem. Tato reakce je podstatou ionizace molekul analytu. Před vlastní ionizací molekul analytu musí dojít k aktivaci reakčního plynu (ionizaci reakčního plynu). Jako reakční plyny se nejčastěji používají methan, isobutan, vodní pára nebo amoniak [25].

reakční schéma chemické ionizace při použití methanu jako reakčního plynu:

1. ionizace reakčního plynu:



2. vlastní ionizace molekul analytu:



3.5.1.8 Ionizace termosprejem – TSI

Zajímavostí je, že se jedná o první techniku navrženou pro spojení LC/MS. Dnes tato technika nahrazena ESI a APCI.

Rozpuštěná látka se přivede kapilárou do iontového zdroje, kde je kapilára vyhřívána v bloku. Dochází k částečnému odpaření rozpouštědla a vzniku malých kapiček s nábojem, dochází pak ke Coulombickým explozím a vypařování iontu, které jsou unášeny k analyzátoru. Ionizaci lze podpořit elektrony nebo elektrickým výbojem [25].

3.5.2 Analyzátoři v hmotnostní spektrometrii

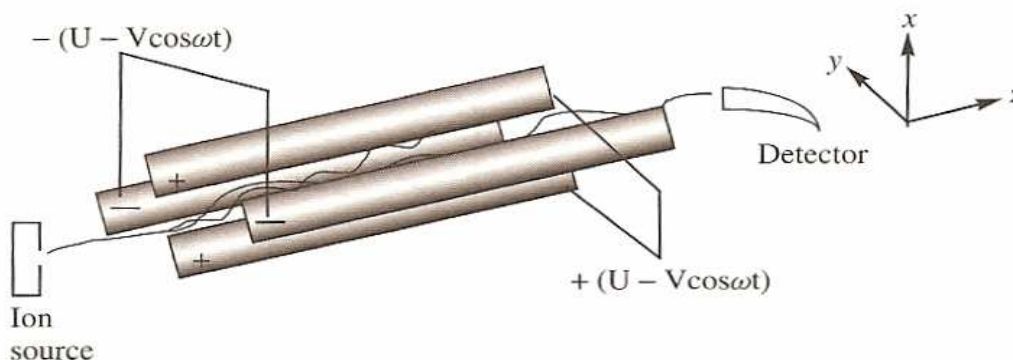
Hmotnostní analyzátor je označován za srdce celého hmotnostního spektrometru a výsledek analýzy (citlivost a rozlišení) velkou měrou závisí právě na designu a

principu tohoto analyzátoru a jeho spojení s detektorem. V hmotnostním analyzátoru dochází k rozdělení iontů vzniklých při ionizaci podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Hmotnostní analyzátoři pracují za vysokého vakua [25].

3.5.2.1 Kvadrupólový analyzátor – Q

Kvadrupólový analyzátor (obr. 14) je dnes nejrozšířenějším analyzátořem používaným v MS a byl používán i v rámci experimentu diplomové práce. Konstrukčně je kvadrupólový analyzátor složen ze čtyř paralelních kovových tyčí hyperbolického nebo kruhového průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a střídavého napětí. Ionty se dostávají do prostoru mezi tyčemi, kde na ně působí vysokofrekvenční střídavé elektrické pole. Působením tohoto pole začnou ionty oscilovat. Při vhodném poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí a dané hodnotě těchto napětí projdou kvadrupólem pouze ionty o určitém poměru m/z , které poté směřují k detektoru.

Kvadrupól se tedy chová jako jakýsi filtr, který lze nastavit tak, že jím procházejí pouze určité ionty (podle poměru m/z). Ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích. Změnou vkládaných napětí je možné nechat projít kvadrupólem postupně ionty v celém rozsahu hodnot m/z [35 - 36].

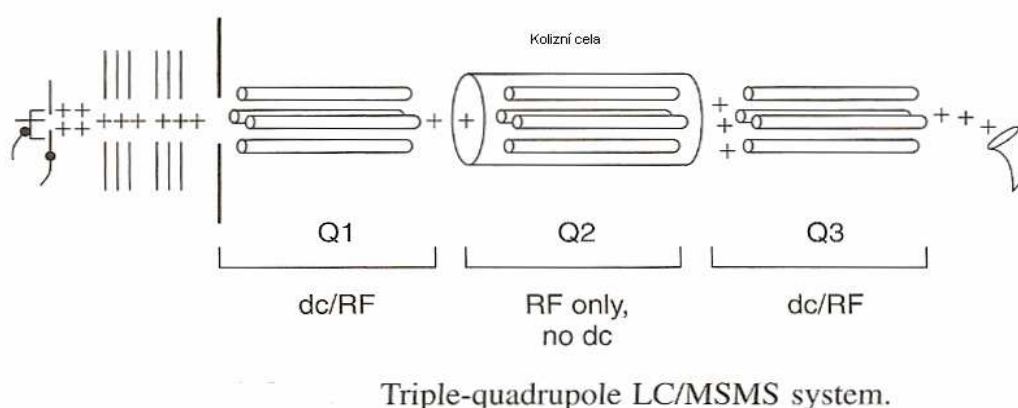


Obr. 14: kvadrupólový analyzátor Q [25]

3.5.2.2 Trojitý kvadrupól – QqQ

QqQ je sestaven ze tří kvadrupólů řazených za sebou (obr. 15). Prostřední (q) slouží jako tzv. kolizní cely. Do kolizní cely se v průběhu MS detekce zavádí kolizní plyn, kterým je nejčastěji argon. Zavedení argonu do kolizní cely vyvolá fragmentaci prekurzorového iontu, který byl „vybrán“ v prvním kvadrupólu Q_1 .

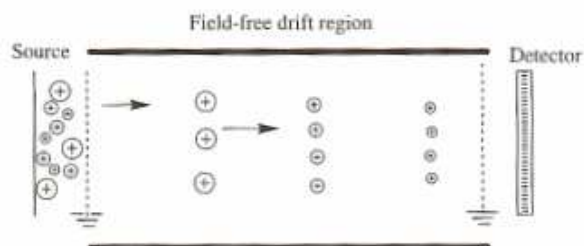
Trojité kvadrupól se využívá při tzv. tandemové hmotnostní spektrometrii (LC/MS/MS). V prvním kvadrupólu Q_1 je realizován výběr prekurzorového iontu z iontového zdroje. Tento iont poté podléhá fragmentaci v kolizní cele (q) a ve druhém kvadrupólu Q_3 dochází k analýze a výběru vzniklých fragmentů. Trojitý kvadrupól nám tak umožňuje realizovat selektivnější kvantifikaci a získání podrobnějších informací o struktuře látky než samotné provedení LC/MS. Vše se děje také díky kvalitním počítačovým programům a zvládnuté technice sběru dat, jejich uchovávání a jejich analýz [25] [37].



Obr. 15:

3.5.2.3 Průletový analyzátor – TOF

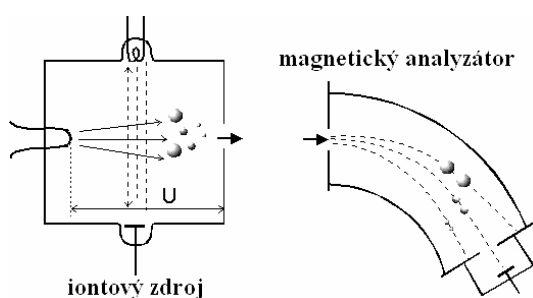
Průletový analyzátor je nejjednodušším hmotnostním analyzátozem. Skládá z trubice, která je dlouhá asi 100 cm. Základní princip separace iontů pomocí TOF spočívá v různé době letu iontů z iontového zdroje do detektoru podle jejich poměru m/z (viz obr. 16). Při průletu iontů trubicí platí, že těžší ionty (vyšší poměr m/z) se pohybují nižší rychlostí než ionty lehčí (nižší poměr m/z) a dorazí do detektoru později [38]. Separace iontů je úměrná délce dráhy, kterou ionty v průletovém analyzátozem urazí. Průletový analyzátozem vyžaduje použití iontového zdroje pracujícího v pulsním režimu [25].



Obr. 16: Princip průletového analyzátozem. Těžší ionty (znázorněny vlevo) se analyzátozem pohybují pomaleji než ionty lehčí (znázorněny vpravo) [25]

3.5.2.4 Magnetický hmotnostní analyzátor

Jedná se o nejstarší a z hlediska rozlišení a hmotnostního rozsahu analyzátor s vysokým rozlišením [24]. Umožňuje prostorové rozdělení monoenergetického svazku iontů podle hodnoty m/z . Konstrukčně se jedná o elektromagnet, kterým procházejí ionty směřující z iontového zdroje (obr. 17). Při vstupu iontů se stejnou kinetickou energií a rozdílném poměru m/z do magnetického hmotnostního analyzátoru opisují tyto ionty dráhy o různých poloměrech a dochází k prostorové separaci iontů podle jejich hmotnosti [25] [26].



Obrázek 17: schéma magnetického analyzátoru [26]

3.5.2.5 Iontová past

Iontová past je zařízení, které umožňuje účinkem elektrického pole uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Iontová past se skládá ze vstupní a z výstupní elektrody kruhového průřezu a z prstencové středové elektrody. Kruhové elektrody jsou uzemněny a na středovou elektrodu je vkládáno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Ionty jsou nuceny pohybovat se uvnitř iontové pasti po uzavřených kruhových drahách. S rostoucí amplitudou napětí se ionty s rostoucím m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor iontové pasti směrem do detektoru [25] [26].

3.5.3. Detektory v hmotnostní spektrometrii

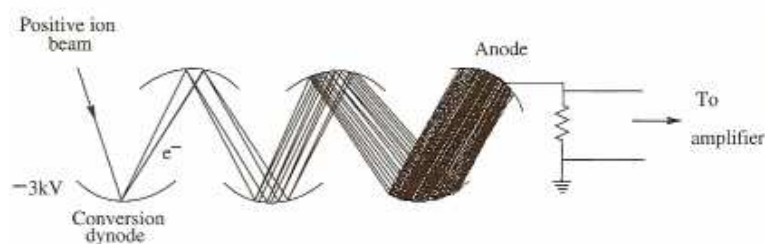
Funkcí detektoru je poskytnout operátorovi informace o analytu, který opouští hmotnostní analyzátor ve formě iontového toku. Detektor převádí signál paprsku iontů na elektrický signál, který může být zesílen, uložen a zobrazen řídicí počítačovou jednotkou do formy, kterou může operátor snadno interpretovat [25].

3.5.3.1. Elektronový násobič

V dnešní době je nejběžněji používaným detektorem v hmotnostní spektrometrii. Rozlišujeme dva typy elektronových násobičů [25] [26].

✚ Elektronový násobič s diskretním dynodovým polem:

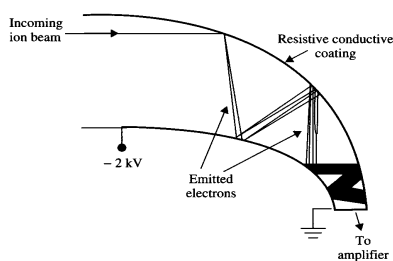
Tento detektor se skládá ze série kovových elektricky propojených dynod. Po vložení napětí mezi první a poslední dynodu mohou být elektrony postupně urychlovány elektrickým polem k následujícím dynodám a nakonec jsou zachyceny kolektorem. Po dopadu iontu na povrch jsou z materiálu první konverzní dynody vyzářeny elektrony, jejichž počet se dopadem na další dynody násobí. Násobiče s diskretními dynodami bývají konstruovány až jako dvacetistupňové a dosahují hodnot zesílení $10^7 - 10^8$ (obr. 18).



Obr. 18: elektronový násobič s diskretním dynodovým polem [25]

✚ Elektronový násobič s kontinuální dynodou:

V tomto případě je detektor tvořen zakřivenou trubicí, která je obvykle z olovnatého skla s vysokým elektrickým odporem. Trubice je na vnitřní straně pokryta vrstvičkou oxidu berylnatého nebo hlinitého. Kontakty při ústí a na konci trubice jsou připojeny ke zdroji vysokého napětí. Po dopadu iontu jsou z materiálu trubice uvolněny elektrony, které jsou elektrickým polem urychlovány směrem ke kolektoru. Opakovanými nárazy elektronů na stěnu trubice jejich počet lavinovitě roste (obr. 19).



Obr. 19: elektronový násobič s kontinuální dynodou [25]

3.5.3.2. Scintilační fotonásobičové detektory

Dopadající ionty jsou nejprve na scintilačním stínítku konvertovány na fotony. Fotony jsou poté zesíleny a detegovány běžným fotonásobičem. Hlavní výhodou

scintilačního fotonásobičového detektoru je možnost jeho umístění mimo oblast vysokého vakua [25] [26].

3.5.4. Typy skenů v hmotnostní spektrometrii

Fullscan (základní sken):

V tomto modu je proměřeno hmotnostní spektrum ve zvoleném rozsahu hodnot poměru m/z [25].

Selektivní záznam iontu (SIM):

V tomto modu je měřena citlivost odezvy pouze u předem vybraného iontu. Tento iont se označuje jako tzv. prekursorový a vzniká z analyzované látky v iontovém zdroji [25].

Sken produktových iontů (MS/MS sken):

Tímto skenem je získáno spektrum produktových iontů prekursorového iontu. Interpretace hmotnostních spekter umožňuje výběr fragmentů prekursorového iontu použitelných pro kvantifikační mod SRM [25].

Selected reaction monitoring (SRM):

Mod SRM je kvantifikační mod, při kterém se hodnotí citlivost detekce produktových iontů vzniklých při fragmentaci [25].

3.6. Validační parametry

3.7.1 Test vhodnosti systému – System Suitability Test (SST)

Nedílnou součástí vývoje analytické metody je ověření vhodnosti systému neboli System Suitability Test. Při tomto testu se zjišťují parametry vhodnosti analytického systému jako celku (zahrnuto je přístrojové vybavení, elektronika, analytické operace i analyzovaný vzorek) ověřením odpovídajících chromatografických parametrů: opakovatelnost nástřiku, rozlišení píků, asymetrie píku, kapacitní faktor, počet

teoretických pater. V rámci této diplomové práce byla hodnocena opakovatelnost (viz. kapitola 3.6.3.).

3.6.2. Linearita

Linearita analytické metody je schopnost poskytovat výsledky měření přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku. Linearita se obvykle stanovuje minimálně na pěti koncentračních hladinách. Popisuje se rovnicí přímky, korelačním koeficientem případně dalšími parametry lineární regrese [39].

3.6.3. Opakovatelnost v rámci SST (system suitability testu)

Opakovatelnost analytické metody je ověření metody za stejných podmínek, během krátkého časového intervalu, ve stejné laboratoři a stejným pracovníkem. Obvykle je vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky [% R. S. D.] [39].

3.6.4. Limit detekce – LOD

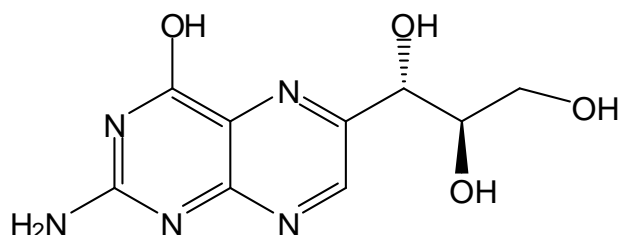
Limit detekce je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, ne však nutně kvantifikováno. Patří mezi parametry citlivosti metody. Existují různé přístupy určování limitu detekce. Třemi hlavními jsou: vizuální stanovení limitu detekce, metoda využívající poměr signálu k šumu (limit detekce je pak trojnásobek tohoto poměru) a třetí metodou je složitější výpočet založený na směrodatné odchylce signálu odpovědi [39].

3.6.5 Limit kvantifikace - LOQ

Limit kvantifikace je dalším parametrem citlivosti metody, zejména u metod. Definuje nejnižší množství analytu ve vzorku, který lze kvantitativně stanovit s vhodnou přesností a správností. Opět existují různé přístupy určování limitu kvantifikace. Třemi hlavními jsou podobně jako u LOD: vizuální stanovení limitu kvantifikace, metoda využívající poměr signálu k šumu (limit kvantifikace je pak desetinásobek tohoto poměru) a třetí metodou je složitější výpočet využívající určení směrodatné odchylky signálu odpovědi a rozsahu kalibrační křivky.

3.7. Pteriny

Historie pterinů se začíná psát v roce 1889, kdy Hopkins izoloval žlutý pigment z křídel lepidoptera. Později skupina těchto pigmentů dostala název pteridiny a byla zjištěna jejich struktura. Neopterin (NEO) byl poprvé izolován v roce 1963 z larev včel a ve včelích dělnicích [40]. V roce 1967 byl neopterin izolován z lidské moči [41] a ve stejném roce byla objasněna jeho chemická struktura viz. obr. 20 [42].

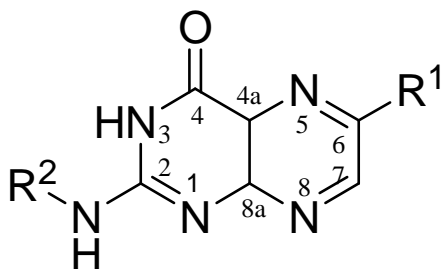


Obr. 20: chemická struktura neopterinu

V roce 1979 publikoval Watcher et al. práci o zvýšených hladinách neopterinu v moči u pacientů s malignitami a infekcemi [43]. Později bylo v celé řadě studií *in vitro* a *in vivo* prokázáno, že produkce neopterinu úzce souvisí s aktivací buněčného imunitního systému. Zvýšené hladiny neopterinu v séru i moči byly prokázány u různých patologických situacích jako např. autoimunitních onemocnění, akutního infarktu myokardu, u nefrotického syndromu, inzulínové rezistence, rakoviny pankreatu a mnoha dalších [44].

3.7.1. Chemická charakteristika pterinů

Základní struktura pterinů je odvozena od pyrazino-[2,3-d]-pyrimidinového bicyklického systému (obr. 21), který se nazývá pteridin. Deriváty pteridinu se podle substituce pyrimidinového cyklu dělí na pteriny (deriváty 2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridinu) a lumaziny (deriváty 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropteridinu)



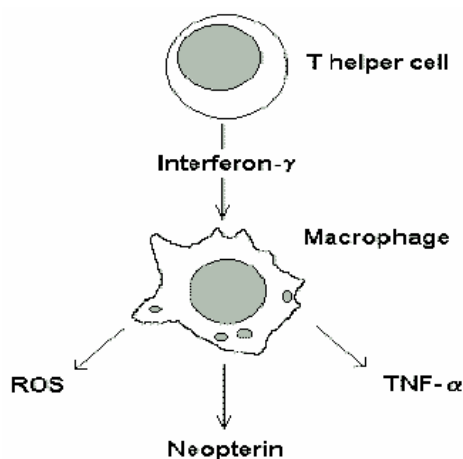
Obr. 21: strukturální vzorec pterinů v oxidované formě

Podle velikosti substituentů lze deriváty pteridinu rozdělit na nekonjugované (pteridiny s relativně malými substituenty, jako např. neopterin, biopterin) a konjugované, které obsahují větší substituenty vázané na pteridinový cyklus (např. kyselina listová, riboflavin). Jednotlivé pteriny se od sebe vzájemně odlišují charakterem postranního řetězce v pozici 6 a oxidačním stavem pteridinového cyklu.

Pteriny jsou fotosenzitivní sloučeniny a na světle se rozkládají na různé deriváty pteridinu. Vyskytují se ve třech oxidačních formách, v 5,6,7,8-tetrahydro-, 7,8-dihydro- nebo v plně oxidované (aromatické) formě. Redukované formy pterinů snadno podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem, zvláště v přítomnosti iontů kovů [44 - 45].

3.7.2. Funkce pterinů v organismu

Neopterin je ve významném množství produkován lidskými monocyty-makrofágy po stimulaci interferonem gama (INF- γ), který je produkován aktivovanými pomocnými T-buňkami (obr. 22). Neopterin, případně jeho redukované formy 7,8-dihydroneopterin a 5,6,7,8-tetrahydroneopterin, tak představují důležitý a užitečný parametr v monitorování aktivace imunitního systému, která doprovází mnoho patologických situací.



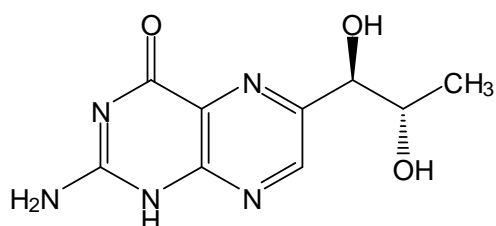
Obr. 22: aktivace imunitního systému a produkce neopterinu monocyty-makrofágy indukovaný INF- γ

Neopterin a jeho redukované formy jsou také spojovány s intracelulárním oxidativním stresem a je popisována i možná spojitost neopterinu s apoptózou buněk, která je vyvolaná tímto oxidativním stresem [46]. V souvislosti s tím je výzkum v oblasti pterinů směřován také k onemocněním jako je neurodegenerativní onemocnění, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a mnoho dalších. Neopterin

také stimuluje expresi inducibilní NO-synthasy (NOS) v endotelu cév [47]. Tento enzym poté katalyzuje NADPH-dependentní oxidaci L-argininu za vzniku oxidu dusnatého.

7,8-dihydroneopterin je schopen aktivovat transkripční faktory a indukovat expresi HIV-1 genu [48].

Biopterin (obr. 23) a jeho 5,6,7,8-tetrahydroforma (BH₄) je nezbytným kofaktorem řady monooxygenáz aromatických aminokyselin a je také odpovědný za konverzi argininu na citrulin a oxid dusnatý.



Obr. 23: chemická struktura biopterinu

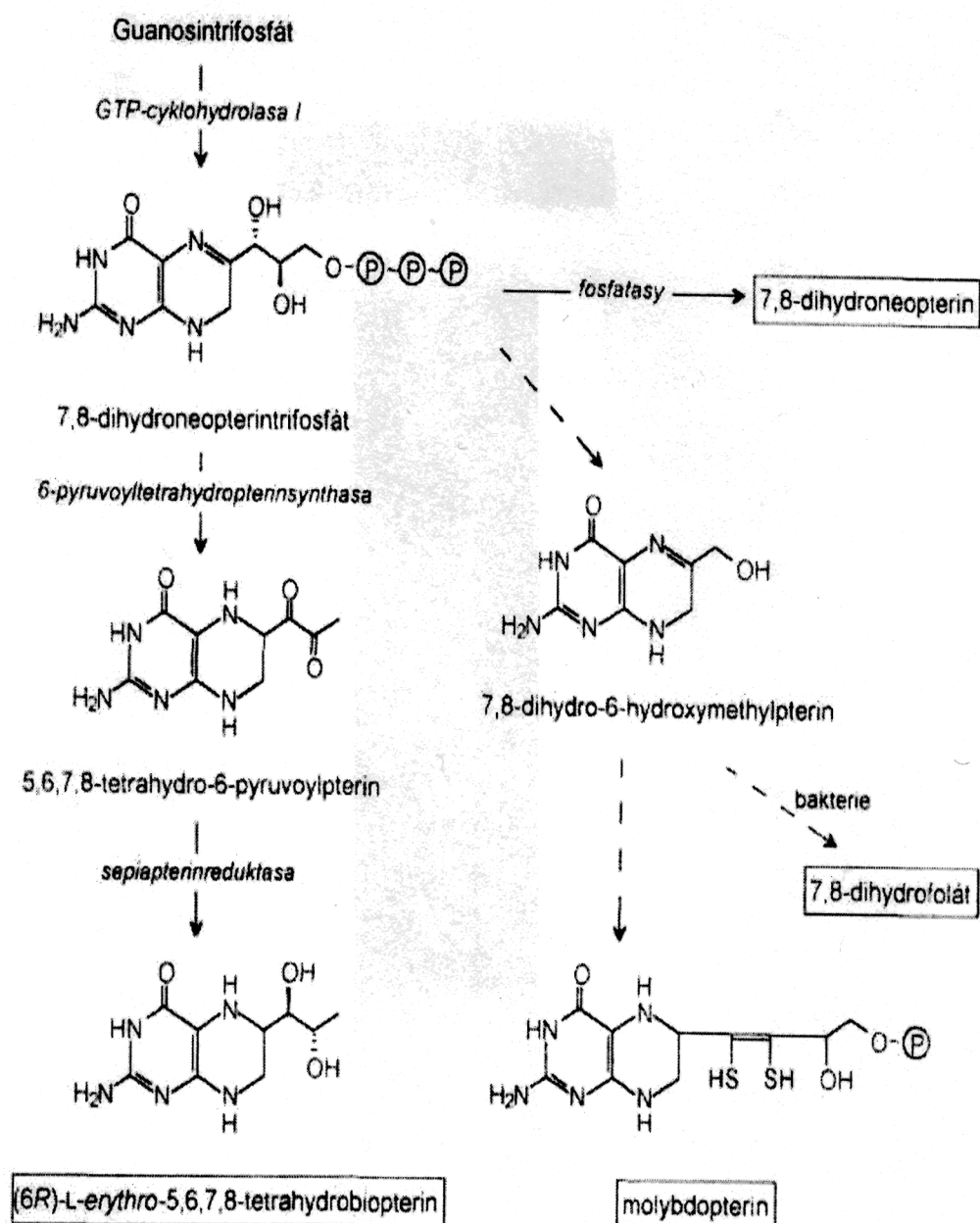
3.7.3. Biosyntéza pterinů

Biosyntéza všech pterinů a pteridinů začíná hydrolytickým štěpením GTP pomocí GTP cyklohydrolas. První reakční krok biosyntézy většiny známých pteridinů katalyzuje enzym GTP cyklohydrolasa I. V tomto kroku se molekula GTP štěpí na D-erythro-1,8-dihydroneopterintrifosfát. Tato sloučenina je klíčovým meziproduktem v biosyntéze většiny ostatních pteridinů. V dalším stupni je 7,8-dihydroneopterintrifosfát oxidačně defosforylován Mg²⁺-dependentní 6-pyruvoyltetrahydropterinsynthasou na 6-pyruvoyltetrahydropterin. V posledním stupni jsou dvě oxoskupiny v postranním řetězci 6-pyruvoyltetrahydropterinu redukovány NADPH-dependentní sepiapterinreduktasou na 6R-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin.

Biosyntéza tetrahydrobiopterinu probíhá především v hepatocytech, v lymfocytech a v dopaminergních a serotoninergních synaptosomech. 6-pyruvoyltetrahydropterinsyntháza chybí v lidských monocyttech-makrofázích. Následkem toho dochází k akumulaci 7,8-dihydroneopterintrifosfátu v těchto buňkách a 7,8-dihydroneopterintrifosfátu je po hydrolýze uvolňován jako 7,8-dihydroneopterin a neopterin.

Zvýšená biosyntéza neopterinu probíhá ve větším měřítku právě v monocyttech-makrofázích aktivovaných cytokiny, především INF- γ . U aktivovaných makrofágů je

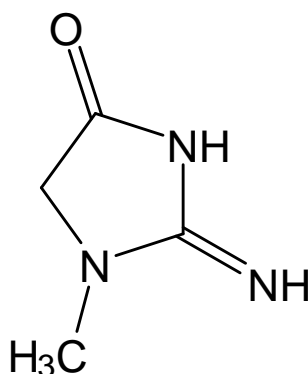
poměr celkového neopterinu k celkovému biopterinu přibližně 50:1. Prozářlivé cytokiny stimulují biosyntézu pteridinů zvýšenou transkripcí a následnou *de novo* syntézou GTP cyklohydrolasy I. Nejúčinnějším stimulem je již zmiňovaný INF- γ . Velmi silným kostimulem je TNF- α , který však sám o sobě nevykazuje stimulační efekt. Biosyntéza pteridinů je znázorněna na následujícím schématu (obr. 24) [45].



Obr. 24: schéma biosyntézy pteridinů z guanosinetrifosfátu

3.8. Kreatinin

Kreatinin (obr. 25) je látka, která vzniká jako konečný produkt svalového energetického metabolismu a to neenzymovou dehydratací kreatinu. Kreatinin obsažený v krevní plazmě je při průchodu ledvinou z 90 % filtrován do glomerulárního filtrátu, přičemž jen 10 % je secernováno do moči ledvinnými tubuly. Za běžných okolností je poměr produkce a exkrece kreatininu konstantní a mezi oběma pochody se ustavuje rovnovážný stav. Koncentrace kreatininu je výrazem této rovnováhy je přímo úměrná množství svalové hmoty (a tedy nepřímo závislá na věku a pohlaví) a funkci glomerulů. Její koncentrace v krvi odráží funkci ledvin. Vyšetření clearance kreatininu se běžně používá pro stanovení glomerulární filtrace [49].



Obr. 25: chemická struktura kreatininu

3.8.1. Kreatinin při stanovení neopterinu a jeho derivátů

Hodnoty neopterinu popř. jiných látek ze skupiny pterinů se v klinické praxi vyjadřují v poměru neopterin / kreatinin (NEO / CREA), a to především při stanovení neopterinu v moči. V porovnání s jinými biologickými tekutinami totiž nemá moč konstantní obsah vody a v závislosti na kolísání obsahu vody v moči kolísají v moči i koncentrace neopterinu, případně jeho derivátů. Kreatinin se do moči vylučuje v konstantním množství, a právě proto se používá poměr NEO / CREA. Tento poměr je zdravých jedinců delší dobu konstantní a prakticky nezávislí na příjmu a ztrátách vody.

Muži mají normálně více svalové hmoty než ženy, a proto existuje závislost poměru NEO / CREA na pohlaví a také na věku [50].

3.9. Stanovení neopterinu pomocí kapalinové chromatografie

K prvnímu měření neopterinu v moči pacientů s malignitami a virovými infekcemi použil v roce 1979 Wachter techniku HPLC [43]. Stanovení pomocí HPLC je dosud považováno za standardní techniku a referenční metodu. Stanovení pomocí HPLC je v současné době společně s technikou RIA (radioimmunoassay) [51- 52] nejčastěji používanou metodou pro stanovení neopterinu v biologických materiálech. V poslední době bylo publikováno několik prací využívajících spojení HPLC s fluorimetrickou detekcí. Použití techniky UPLC/MS pro stanovení neopterinu a jeho derivátů nebylo zatím publikováno.

Podrobnosti o hodnocení pterinů pomocí HPLC vycházející z literární rešerše jsou uvedeny v následujícím přehledu (tabulka 2).

Látka	stacionární fáze	mobilní fáze	detekce	citace
neopterin	Spherisorb RP-18 (250 x 4,6 i.d, 5µm)	voda / acetonitril (99:1)	FD λ _{exc} 353 λ _{emis} 438	[53]
oncopterin	Develosil ODS-K-5 (150 x 4,6 i.d, 5µm)	50 mM amonium fosfátový pufr pH 3,0	FD λ _{exc} 355 λ _{emis} 450	[54]
neopterin biopterin	µ Bondapack C ₁₈	10 mM fosfátový pufr pH 3,2 Methanol (96:4)	FD λ _{exc} 335 λ _{emis} 440	[55]
neopterin biopterin kreatinin	Nova-Pack C ₁₈ column (150 x 3.9mm, 5 µm)	Tris-NaCl pufr pH 6,8	FD λ _{exc} 280 λ _{emis} 444	[56]
neopterin	Seladon SGX RP-18 (150 x 3.3mm, 5 µm)	15 mM fosfátový pufr pH 6,4	FD λ _{exc} 353 λ _{emis} 438	[57]

Tabulka 2: hodnocení pterinů pomocí HPLC

4. Experimentální část

4.1. Materiál a pomůcky

4.1.1. chemikálie

- (1'R,2'S)-Biopterin (>98%, Sigma-Aldrich, ČR)
- D-(+)-Neopterin (>98,5%, Sigma-Aldrich, ČR)
- 7,8-dihydroneopterin (>97%, Sigma-Aldrich, ČR)
- 5,6,7,8-tetrahydro-D-neopterin (poskytnuto fakultní nemocnicí v HK)
- Kreatinin (poskytnuto fakultní nemocnicí v HK)
- Methanol LC-MS, Sigma-Aldrich, ČR
- Acetonitril LC-MS, Sigma-Aldrich, ČR
- Acetic acid LC-MS, Sigma-Aldrich, ČR
- Formic acid, 98-100%, Sigma-Aldrich, ČR

4.1.2. přístroje a pomůcky

- váhy Sartorius 2004 MP
- chromatografické kolony:
 - Acquity UPLC™ BEH HILIC (1,7μm, 2,1 x 100 mm), Waters, ČR
 - Acquity UPLC™ BEH Shield RP18 (1,7μm, 2,1 x 100 mm), Waters, ČR
- UPLC systém, Waters, ČR:
 - Binary solvent manager
 - Sample manager
 - Kolonový termostat
 - TUV detektor
- vakuová pumpa a filtrační zařízení, Chromservis, ČR
- ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITEC
- další pomůcky:
 - automatické pipety se špičkami, BIOHIT, ČR
 - membránové filtry, Albet, Chromservis, ČR

4.2. Příprava zásobních roztoků a pracovních roztoků

4.2.1. Příprava zásobních roztoků

Jako rozpouštědlo pro přípravu zásobních roztoků zkoušených látek byla použita ultračistá voda pro MS. Všechny zkoušené látky jsou ve vodě při důkladném míchání poměrně dobře rozpustné. Rozpustnost biopterinu byla horší a k dokonalému rozpuštění zbývajících částic byla použita ultrazvuková lázeň. Zásobní roztoky neopterinu, biopterinu a kreatininu jsou při dodržení určitých zásad, především způsobu jejich skladování, relativně stabilní. Naproti tomu zásobní roztoky 7,8-dihydroneopterinu a především 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu jsou nestabilní a podléhají oxidaci. Zásobní roztoky byly připravovány v hnědých odměrných baňkách, které byly pro zvýšení stability zabaleny do celofánu. Ihned po přípravě byly umístěny do lednice při teplotě 4 ° C. Zásobní roztoky sledovaných látek byly připravovány v koncentracích 10⁻⁴ mol / l.

4.2.1.1. Výpočty pro přípravu zásobních roztoků

Zásobní roztoky zkoušených látek byly připravovány do 100 ml odměrných baněk v koncentracích 10⁻⁴ mol / l. Výpočet teoretických navážek zkoušených látek pro přípravu výše uvedených zásobních roztoků (viz. tabulka 3) se provede podle vztahu:

$$m = c \cdot V \cdot M$$

kde: m navážka látky
M molární hmotnost navažované látky
c koncentrace zásobního roztoku
V objem zásobního roztoku

látka	sumární vzorec	molekulová hmotnost	koncentrace zásobního roztoku [mol.l ⁻¹]	objem zásobního roztoku [l]	navážka [mg]
NEO	C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₄	253,08	10 ⁻⁴	0,1	2,53
BIO	C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₃	237,09	10 ⁻⁴	0,1	2,37
DHN	C ₉ H ₁₃ N ₅ O ₄	255,10	10 ⁻⁴	0,1	2,55
THN	C ₉ H ₁₅ N ₅ O ₄	257,11	10 ⁻⁴	0,1	2,57
CREA	C ₄ H ₇ N ₃ O	113,06	10 ⁻⁴	0,1	1,13

Tabulka 3: výpočet teoretických navážek zkoušených látek pro přípravu zásobních roztoků o koncentraci 10⁻⁴ mol / l.

4.2.2. Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztoky jednotlivých látek analyzovaných v rámci experimentu byly připravovány ze zásobních roztoků (viz. kapitola 4.2.1) smísením 100 µl zásobního roztoku a 900 µl vhodného rozpouštědla. Koncentrace pracovních roztoků tedy byla 10^{-5} mol.l⁻¹ pro pteriny. Výjimkou byl kreatinin, který byl při prvních nástřicích detekován velmi citlivě a jeho pík byl na chromatografickém záznamu natolik dominantní, že zhoršoval a znesnadňoval vyhodnocování výsledků. Z tohoto důvodu byly pracovní roztoky kreatininu připravovány smísením 20 µl zásobního roztoku kreatininu a 980 µl vhodného rozpouštědla. Koncentrace pracovního roztoku kreatininu tedy byla $2 \cdot 10^{-6}$ mol.l⁻¹.

V průběhu experimentu byly připravovány tři druhy pracovních roztoků. Jednalo se o vodné roztoky, dále roztoky methanolické a acetonitrilové. Pracovní roztoky byly připravovány každý den před zahájením práce, případně v čas potřeby. Pokud se jednalo o vodné roztoky, byla použita čerstvě filtrovaná voda.

4.3. Optimalizace podmínek pro UPLC-MS/MS spojení

4.3.1. Optimalizace podmínek pro UPLC separaci

Při spojení UPLC/MS byly nejprve optimalizovány podmínky separace, ale již od počátku s ohledem na odezvu hmotnostního detektoru, protože použitá rozpouštědla mají velký vliv na odezvu detektoru. V první fázi optimalizace byl vybrán prekurzorový iont změřením spekter jednotlivých látek. Následně bylo optimalizováno složení mobilní fáze a jeho vliv na separaci analyzovaných látek. Zároveň byla hodnocena intenzita odezvy prekurzorového iontu s ohledem na parametr S/N v modu SIM (selected ion monitoring). Retence a separace těchto polárních látek v chromatografickém systému byla problematická.

4.3.1.1. Hledání optimální mobilní fáze

V dalším kroku optimalizace bylo definováno složení mobilní fáze a koncentrace aditiva pro podporu ionizace a pro optimální separaci neopterinu, biopterinu, kreatininu, 7,8-dihydroneopterinu a 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu.

Byly testovány dvě chromatografické kolony:

- 1) Acquity UPLC™ BEH Shield RP18 (1,7µm, 2,1 x 100 mm)
- 2) Acquity UPLC™ BEH HILIC (1,7µm, 2,1 x 100 mm)

Při všech analýzách byl použit výše popsaný UPLC systém Acquity (viz. kapitola 4.1.2.). Poměrné složení jednotlivých součástí mobilní fáze bylo nastaveno pomocí binary solvent manageru UPLC systému. Na BSM byly nastaveny i další parametry, a to limity maximálního tlaku na koloně a průtok mobilní fáze. Výchozí hodnota průtoku mobilní fáze byla při všech měřeních 0,2 ml/min. Teplota autosampleru byla z důvodu stability analytů pro všechna měření nastavena na 4 ° C.

Všechny složky mobilní fáze připravované přímo pro potřeby měření byly nejprve filtrovány přes membránový filtr s jmenovitou velikostí pórů nejvýše 0,2 µm za sníženého tlaku pod vakuovou pumpou.

Složení mobilní fáze bylo uzpůsobeno také zamýšlenému použití MS detekce. Vzhledem k vlastnostem hmotnostního detektoru existují pro výběr mobilní fáze určitá omezení. Mobilní fáze musí nutně obsahovat těkavé složky, pokud možno acetonitril nebo methanol v kombinaci s vodnou fází, která by také měla splňovat podmínku těkavosti. Zde připadá v úvahu několik málo aditiv jako je např. kyselina octová, kyselina mravenčí, roztok amoniaku a pufrů typu octanu nebo mravenčanu amonného. Z těchto omezení vyplývá, že optimalizace separace látek ve směsi může být často poněkud problematická.

Pro kolonu Acquity UPLC™ BEH Shield RP18 byly zkoušeny tyto typy mobilních fází:

1. methanol, acetát amonný (10:90) až (90:10)
2. acetonitril, acetát amonný (90:10) až (70:30)

Pro kolonu Acquity UPLC™ BEH HILIC byly zkoušeny tyto typy mobilních fází:

1. acetonitril, acetát amonný (50:50) až (95:5)
2. acetonitril, kyselina mravenčí (50:50) až (90:10)
3. methanol, kyselina mravenčí (50:50) až (95:5)
4. acetonitril, kyselina octová (20:80) až (80:20)
5. methanol, kyselina octová (20:80) až (90:10)

4.3.2 Optimalizace podmínek pro MS detekci

4.3.2.1 Optimalizace podmínek v modu SIM

Po optimalizaci podmínek pro UPLC separaci následovala optimalizace nastavení vlastního MS detektoru. V modu SIM (selected ion monitoring) byla měřena citlivost odezvy prekurzorových iontů. Tedy iontů sledovaných látek vzniklých ionizací pomocí metody ESI v pozitivním modu – $[M+H]^+$.

Důležitými podmínkami jsou teplota, napětí vkládané na kapiláru, průtok dusíku jako sušícího plynu a nastavení iontové optiky (RF lens a Extraktoru). Jedním z nejdůležitějších parametrů je napětí vkládané na vstupní kužel, tzv. cone voltage, které je specifické pro každou látku a lze ho tak nastavit v každém časovém úseku individuálně s ohledem na typ analytu. Při optimalizaci podmínek detekčních schopností MS byl testován vliv jednotlivých parametrů MS na citlivost detekce sledovaných látek. Tato optimalizace byla realizována proměřováním pracovních roztoků sledovaných látek o koncentraci 10^{-5} mol.l⁻¹, za použití analytické kolony Acquity UPLC™ BEH HILIC a mobilní fáze methanol : kyselina mravenčí o koncentraci 0,01% v poměru (80:20). Jednotlivé optimalizované parametry a rozmezí, ve kterých byl sledován jejich vliv na citlivost detekce je uveden v tabulce 4.

OPTIMALIZOVANÝ PARAMETR MS DETEKTORU	TESTOVANÉ ROZMEZÍ
sušící teplota	250 – 450 °C
napětí vkládané na kapiláru	2,0 – 3,5 kW
extraktor	0,0 – 10,0 V
RF Lens	0,0 – 3,0 V
cone gas	0 – 200 l/ hod
gas flow	100 – 600 l/hod
cone voltage	20 – 60

Tabulka 4: optimalizace parametrů MS detektoru v modu SIM

Po optimalizaci podmínek v modu SIM byla změřena opakovatelnost metody – SST (systém suitability test). Pro ověření opakovatelnosti byla provedena série 10 po sobě následujících měření, které byly provedeny při stejném nastavení všech parametrů, tedy za stejných podmínek, během krátké časové doby a ve stejné laboratoři. Opakovatelnost metody byla vyjádřena pomocí relativních směrodatných odchylek [% R.S.D.] retenčních časů a ploch píků jednotlivých sledovaných látek.

4.3.2.2. Sken produktových iontů

Po získání maximální intenzity prekurzorového iontu byly sledované látky měřeny modu MS/MS. Při tzv. MS/MS skenu byl prekurzorový iont podroben fragmentaci a byla proměřována produktová hmotnostní spektra. Jako kolizní plyn byl použit argon. Vyhodnocením těchto spekter byly vybrány fragmenty prekurzorového iontu vhodné pro kvantifikační mod SRM.

4.3.2.3. Optimalizace podmínek v modu SRM

Poté následovala optimalizace parametrů v modu SRM (selected reaction monitoring). Cílem této optimalizace byl výběr takového fragmentového iontu, který by poskytoval dostatečnou intenzitu pro tzv. přechod (transition) potřebný pro nastavení SRM kvantifikačního modu. Kromě výběru vhodného iontu byla optimalizována kolizní energie dodávaná do kolizní cely trojitého kvadrupolu QqQ.

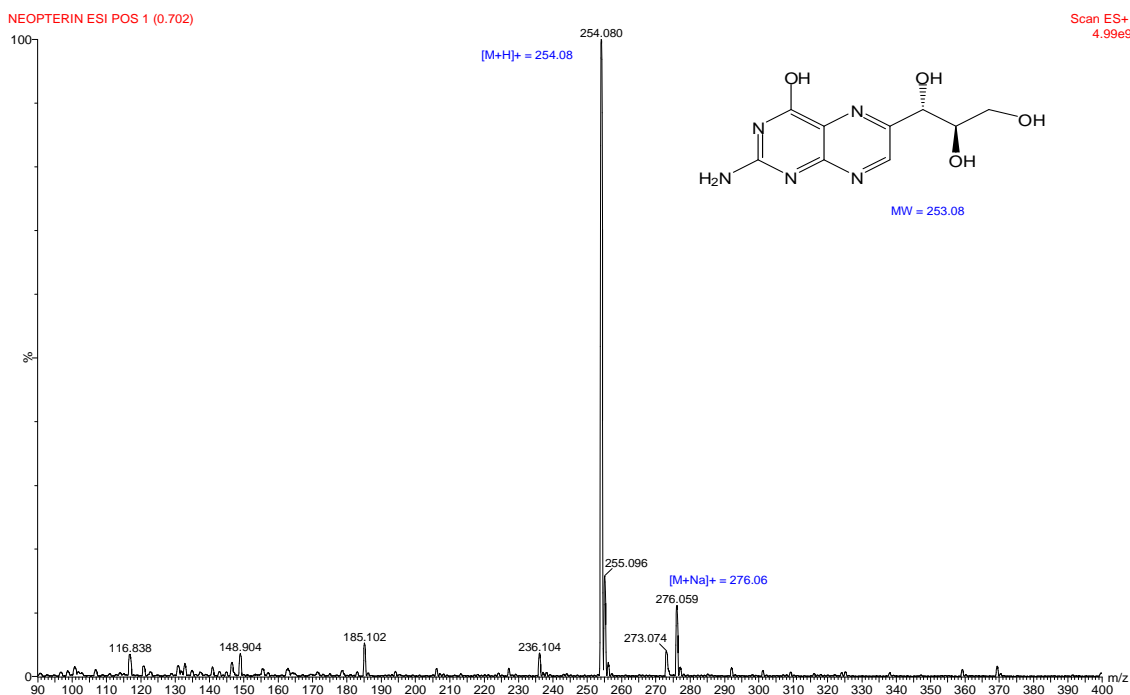
Za optimalizovaných podmínek byla změřena opakovatelnost metody v modu SRM, která byla vyjádřena pomocí relativních směrodatných odchylek [% R.S.D.] retenčních časů a ploch píků jednotlivých sledovaných látek. Na závěr bylo provedeno ověření linearity dané metody proměřením kalibračních křivek sledovaných látek v rozmezí koncentrací 10^{-6} až 10^{-10} mol/l.

5. Výsledky a diskuze

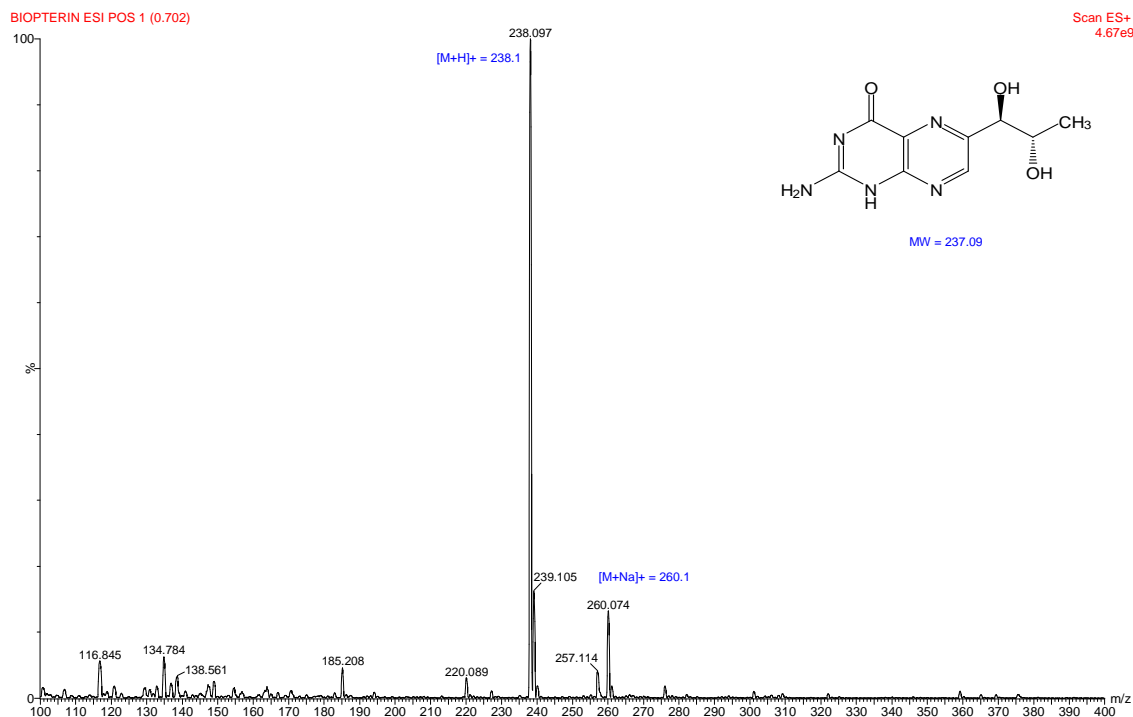
5.1. Optimalizace podmínek pro UPLC-MS/MS spojení

Jako ionizační technika byla při vývoji této metody použita ESI (viz. kapitola 3.5.1.1). Intenzita odezvy MS detektoru je hodnocena jednak jako plocha píku na chromatogramu a současně jako poměr signálu k šumu (S/N), protože některé mobilní fáze mohou vykazovat vysokou intenzitu šumu, a tak výsledná metoda nemusí mít požadovanou citlivost. Byla testována jak ionizace v negativním modu za vytvoření iontu $[M-H]^-$, tak ionizace v pozitivním modu za tvorby iontu $[M-H]^+$. Všechny sledované látky vykazují lepší citlivost v pozitivním modu a pro následnou kvantifikaci byly vybrány ionty $[M+H]^+$ v pozitivním modu ionizace ESI jako nejintenzivnější ionty v hmotnostním spektru. Kromě iontů $[M+H]^+$ byly ještě pozorovatelné dukty se sodíkem $[M+Na]^+$. Přehled hmotnostních spekter jednotlivých analyzovaných látek následuje (viz. obr. 26 až obr. 29).

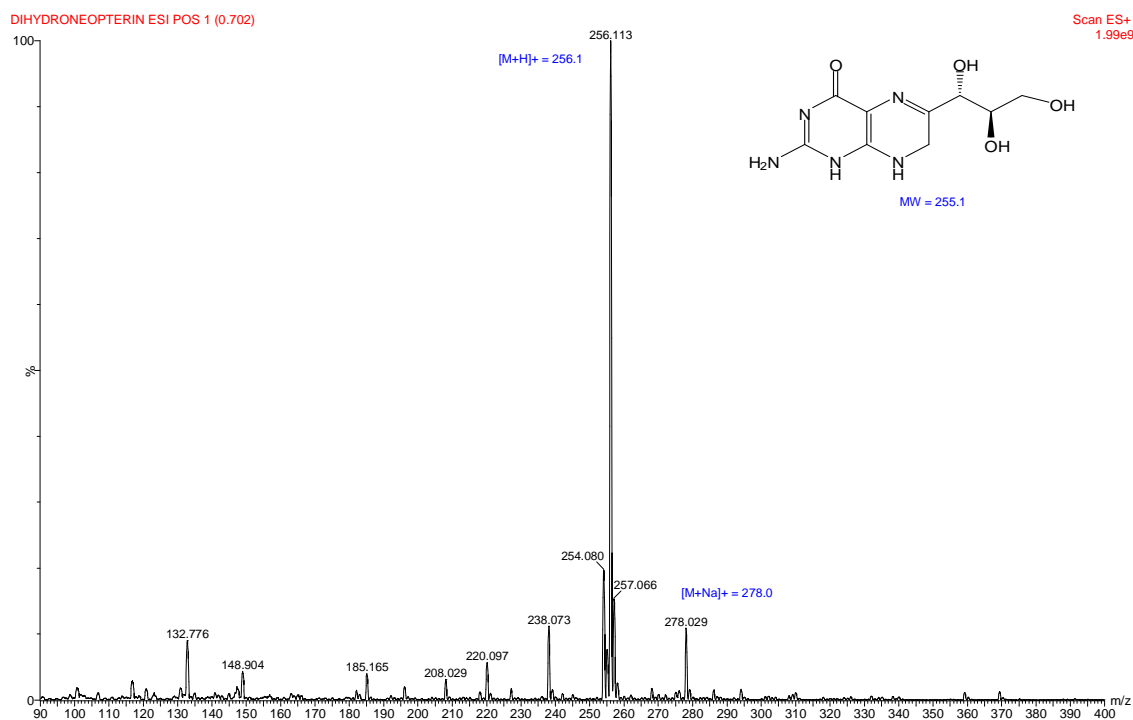
Problematická byla interpretace hmotnostního spektra tetrahydroneopterinu. V době měření hmotnostních spekter analyzovaných látek byl k dispozici pouze starší standard této látky, a při měření hmotnostního spektra bylo zjištěno, že došlo k téměř úplnému rozložení 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu, a to především na 7,8-dihydroneopterin (viz. obr. 30).



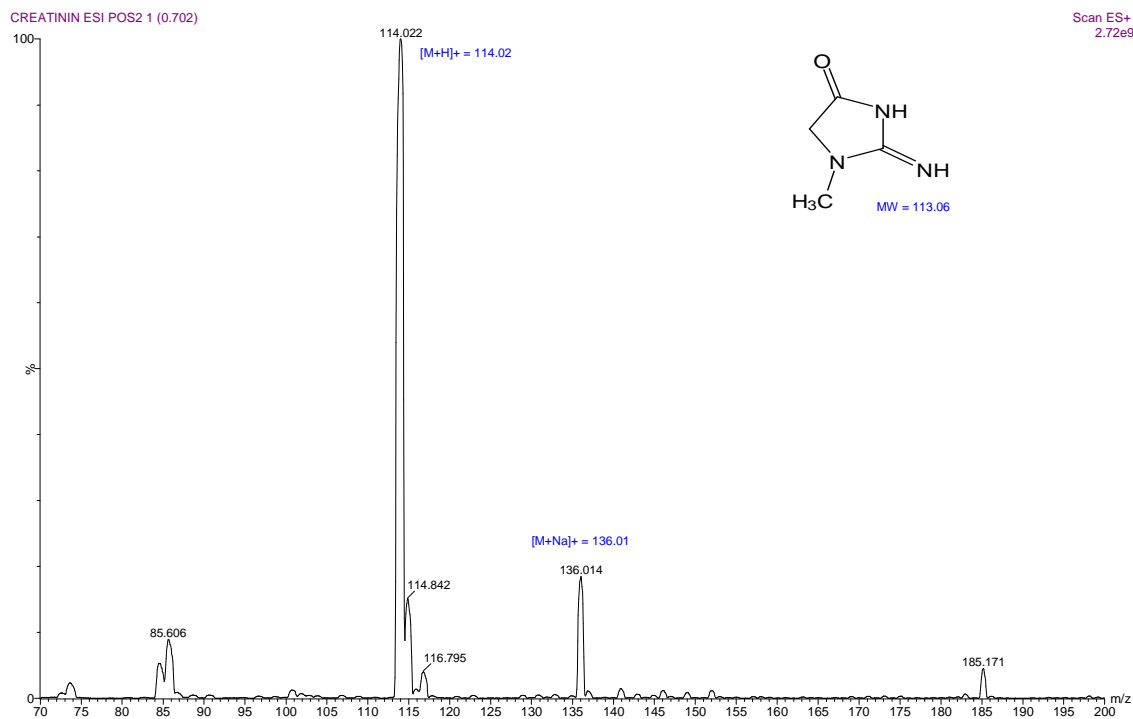
Obr. 26: hmotnostní spektrum neopterinu



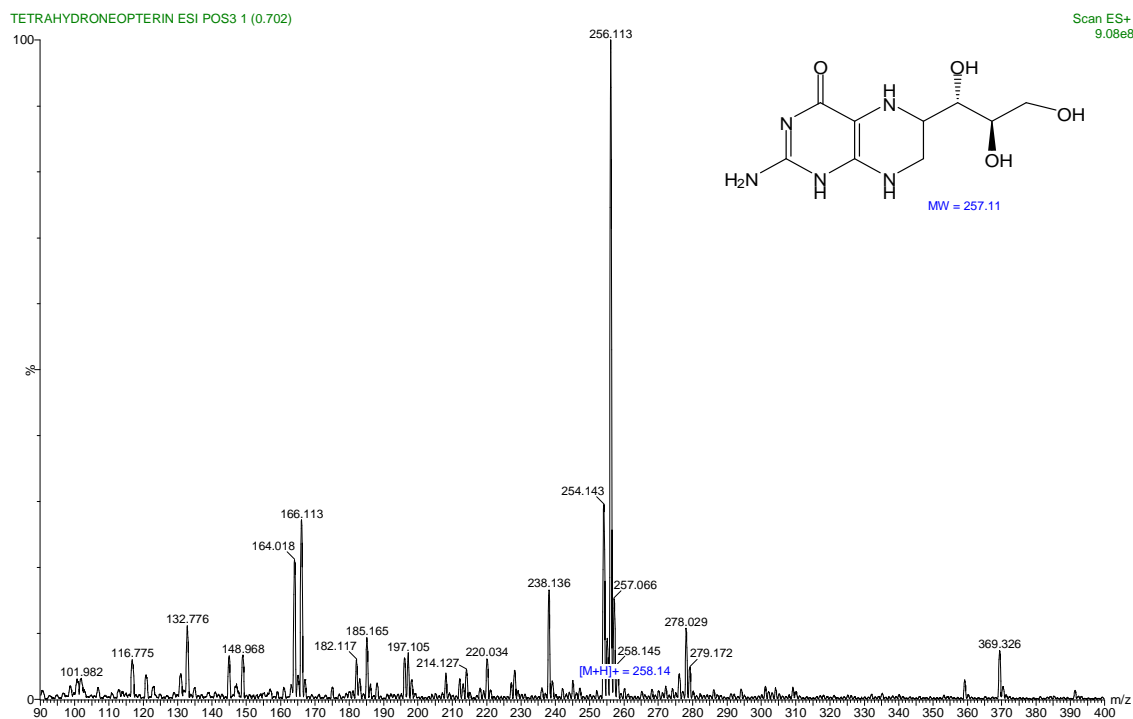
Obr. 27: hmotnostní spektru biopterinu



Obr. 28: hmotnostní spektrum 7,8-dihydroneopterinu



Obr. 29: hmotnostní spektrum kreatininu



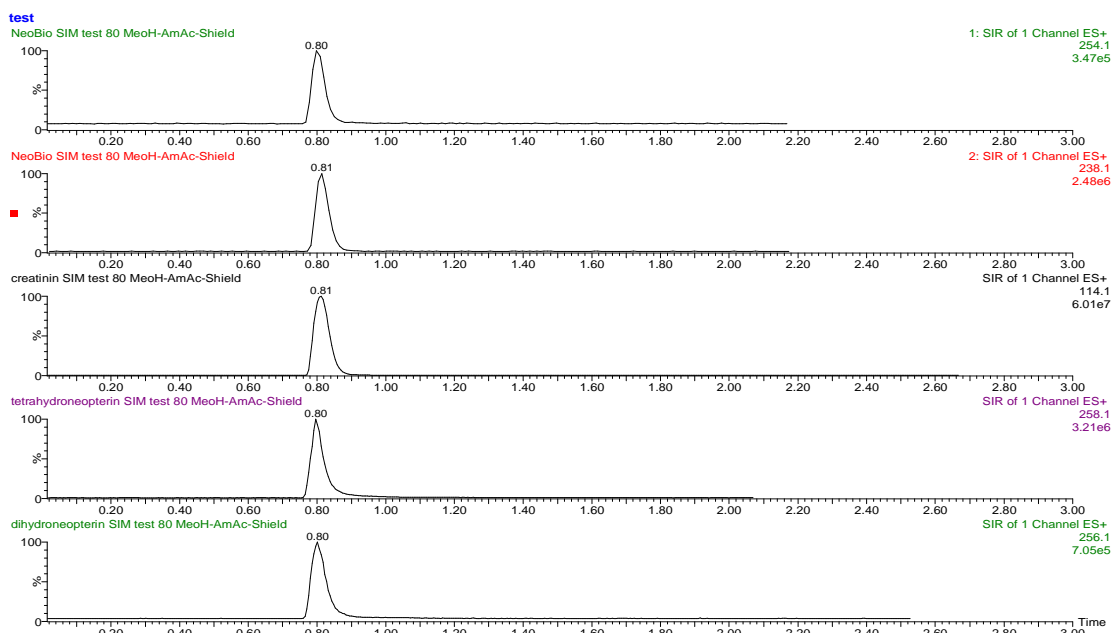
Obr. 30: hmotnostní spektrum 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu; největší odezvu má iont s hodnotou poměru m/z 256,1, což odpovídá iontu $[M+H]^+$ 7,8-dihhydroneopterinu a ukazuje na oxidační rozklad původního 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu, jehož odezva je minimální

5.1.1. Volba optimálního složení mobilní fáze

Cílem tohoto kroku bylo získat takové kvalitativní složení mobilní fáze, které by umožňovalo dokonalou separaci zkoušených látek, v našem případě neopterinu, biopterinu, kreatininu, 7,8-dihydroneopterinu a 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu v nepřiliš dlouhém čase analýzy. Vzhledem k vlastnostem hmotnostního detektoru byla škála organických rozpouštědel použitelných do mobilní fáze omezena (viz. kapitola 4.3.1.1).

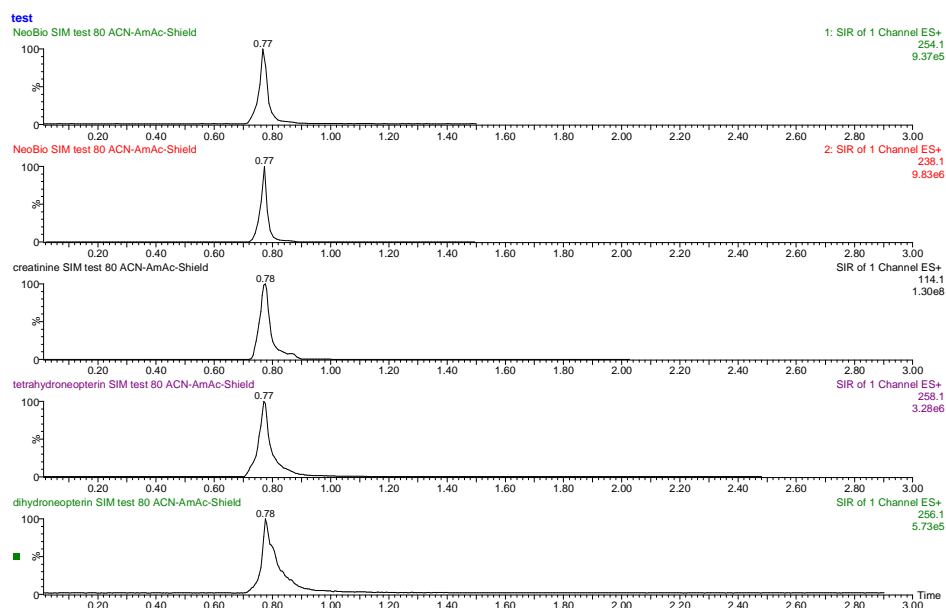
5.1.2.1 Analytická kolona Acquity UPLC™ BEH Shield RP18

Tato analytická kolona je určena k retenci polárních látek, a proto byla vybrána k prvním pokusům o separaci analyzovaných látek. Při použití analytické kolony Acquity UPLC™ BEH Shield RP18 byly zkoušeny různé poměry methanolu a acetátu amonného, a to v rozmezí 10:90 až 90:10. Toto složení mobilní fáze nepřineslo v žádném z uvedených poměrů uspokojivé výsledky separace analytů. Při vyšším podílu acetátu amonného byly píky neostré, rozmyté a retenční časy jednotlivých látek dosahovaly téměř totožných hodnot a jejich separace byla minimální. Při otočení poměru ve prospěch methanolu (tzn. poměry methanol : acetát amonný od 70:30 do 90:10) byly píky sice ostré a měly lepší tvar, ale ani při tomto složení mobilní fáze nedocházelo k dostatečné separaci zkoušených látek (viz. obr. 31).



Obr. 31: chromatogramy sledovaných látek při použití mobilní fáze methanol-acetát amonný (v poměru 80:20) a kolony Acquity UPLC™ BEH Shield RP18

Při dalším měření byl jako organická část mobilní fáze použit acetonitril, a to rovněž ve směsi s acetátem amonným. Tato směs byla použita v poměrech 90:10 až 70:30 ve prospěch organické složky. Výsledné chromatografické záznamy sledovaných látek byly obdobné jako v předchozím pokusu (obr. 31). Došlo k nepatrnému zkrácení retenčních časů, avšak u všech sledovaných látek současně, takže výměna methanolu za acetonitril ve směsi s acetátem amonným nevedla k lepší separaci. Navíc došlo ke zhoršení kvality píků, což není žádoucí z hlediska integrace a opakovatelnosti metody.



Obr. 32: chromatogramy sledovaných látek při použití mobilní fáze acetonitril-acetát amonný (v poměru 80:20) a kolony Acquity UPLC™ BEH Shield RP18

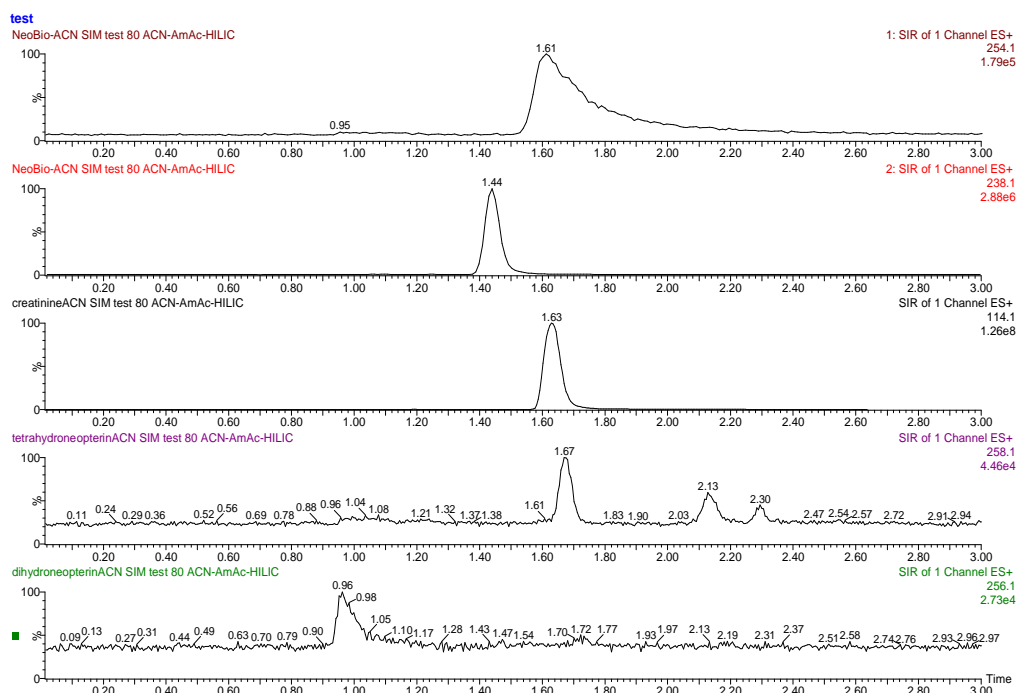
Na koloně Acquity UPLC™ BEH Shield RP18 nedocházelo k dostatečné separaci sledovaných látek, a to ani při použití mobilní fáze složené z methanolu a acetátu amonného, ani při použití mobilní fáze složené z acetonitrilu a acetátu amonného. Při použití těchto mobilních fází docházelo pouze k nepatrnému zkrácení nebo prodloužení retenčních časů sledovaných látek. Proto bylo rozhodnuto pokračovat v měření s jinou chromatografickou kolonou.

5.1.2.2. Analytická kolona Acquity UPLC™ BEH HILIC

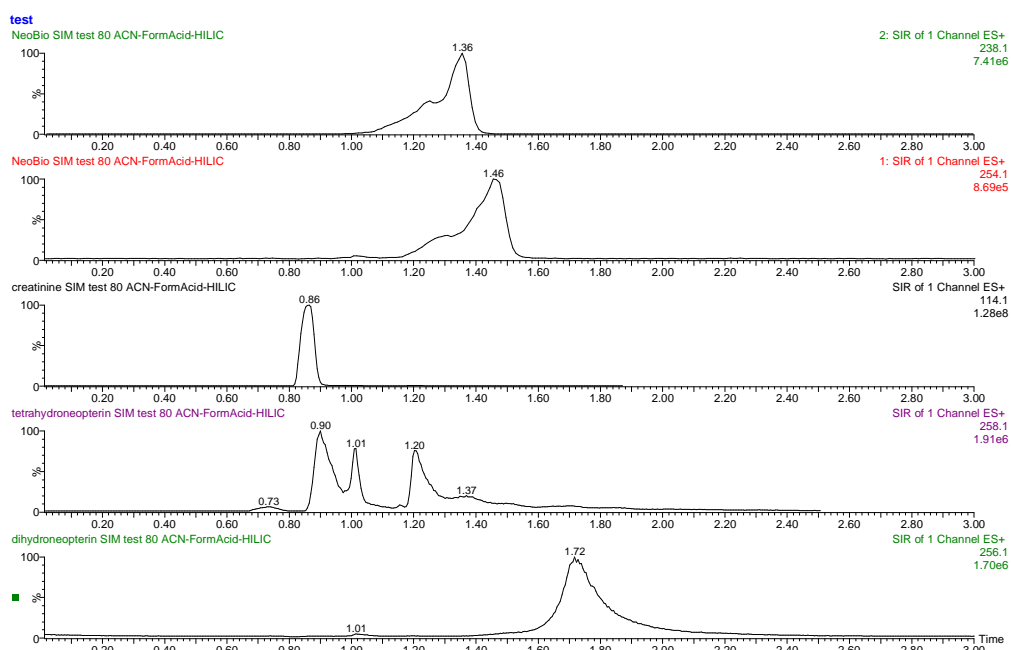
V dalším hledání optimálního složení mobilní fáze byla použita analytická kolona s technologií HILIC, která je vhodná k retenci a separaci polárních látek.

Na analytické koloně Acquity UPLC™ BEH HILIC byla nejprve zkoušena mobilní fáze acetonitril : acetát amonný, a to v různém zastoupení obou složek (poměry 50:50 až 95:5). Při použití kolony s HILIC přístupem došlo k lepší separaci sledovaných látek. Jako první byla testována směs acetonitril : acetát amonný v poměru 50:50.

Došlo k částečné separaci píků jednotlivých sledovaných látek, avšak píky byly nekvalitní, a to zejména u tetrahydroneopterinu a dihydroneopterinu. Lepší výsledky nepřineslo ani použití této mobilní s vyšším podílem acetonitrilu (80:20, 90:10) ani použití acetonitrilových roztoků sledovaných látek. Nejhorší odezvu měl dihydroneopterin a tetrahydroneopterin (obr. 33).



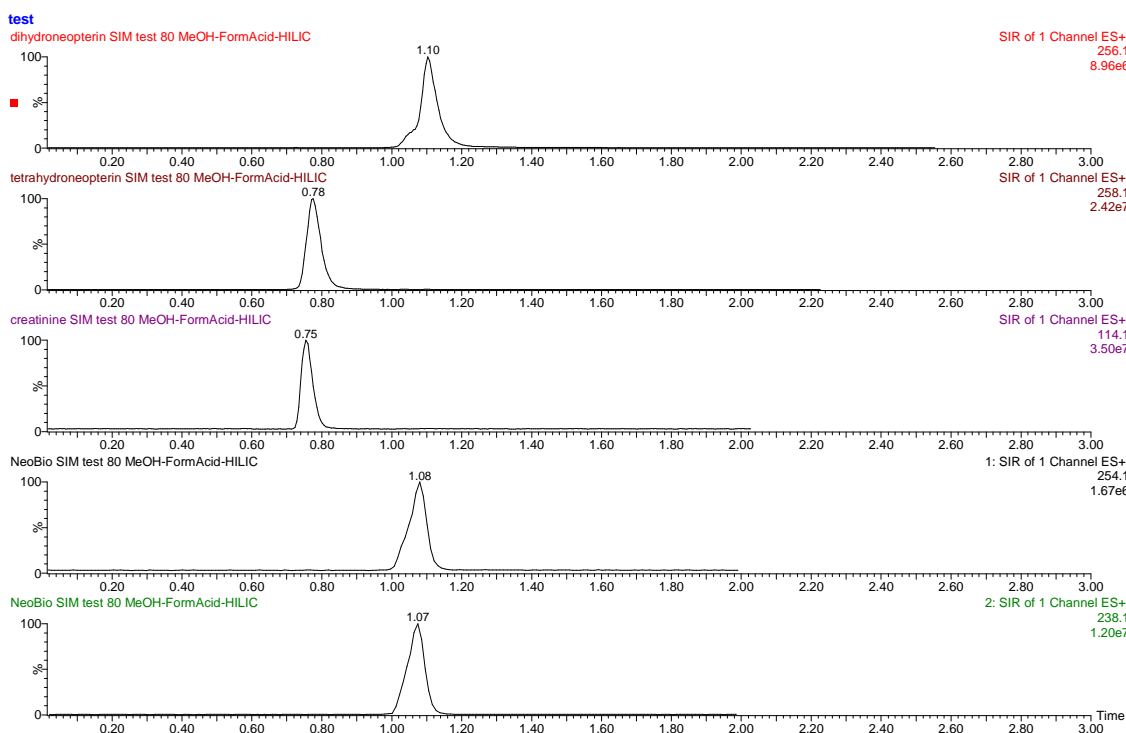
Obr. 33: chromatogramy sledovaných látek při použití mobilní fáze acetonitril – acetát amonný (v poměru 80:20) a použití acetonitrilových roztoků na koloně Acuity UPLC™ BEH HILIC



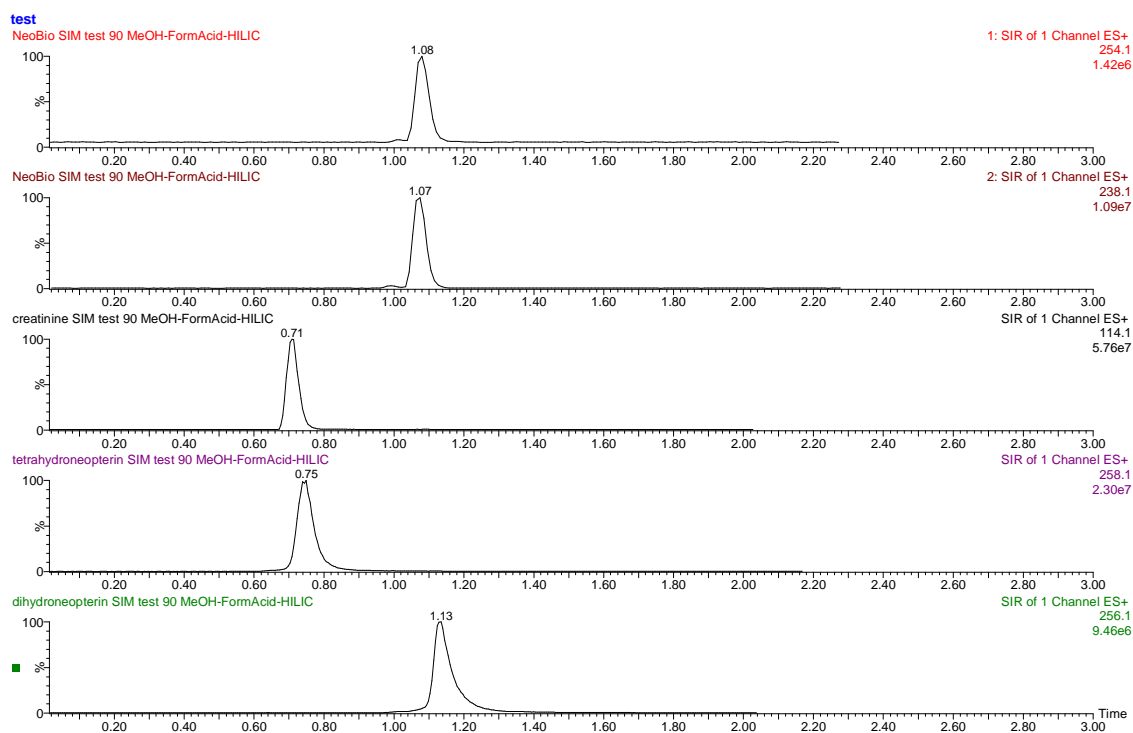
Obr. 34: chromatogramy sledovaných látek při použití mobilní fáze acetonitril – kyselina mravenčí (v poměru 80:20) na koloně Acuity UPLC™ BEH HILIC

Dále byla zkoušena mobilní fáze, ve které byl acetonitril ve směsi s kyselinou mravenčí. Byly provedeny nástřiky, kdy byl poměr acetonitrilu a kyseliny mravenčí 70:20, 80:20 a 90:10. Tato mobilní fáze byla nevhodná a to ve všech uvedených poměrech (viz. obr. 34).

Další mobilní fází byla směs methanolu a kyseliny mravenčí v poměrech od 50:50 do 90:10. Zejména při poměrech 80:20 a 90:10 docházelo k částečné separaci sledovaných látek, které tak bylo možno rozdělit do dvou skupin (obr. 35). Při nástřiku směsi methanol kyselina mravenčí v poměru 80:20 byl nejprve eluován kreatinin (retenční čas 0,75) a tetrahydroneopterin (retenční čas 0,78), od kterých byl separován biopterin (retenční čas 1,07), neopterin (retenční čas 1,08) a dihydroneopterin (1,10). S vyšší koncentrací methanolu (90:10) byly navíc jednotlivé píky ostřejší a štíhlejší a došlo k nepatrnému zkrácení retenčních časů kreatininu a tetrahydroneopterinu a prodloužení retenčního času dihydroneopterinu (obr. 36). Kvalita píků zůstala na stejné úrovni a nebyly pozorovány větší odlišnosti. Naopak při snižování podílu methanolu v mobilní fázi (poměry 70:30, 50:50) docházelo ke zhoršování kvality píků a i separace sledovaných látek byla horší.



Obr. 35: chromatogramy sledovaných látek při použití mobilní fáze methanol – kyselina mravenčí (v poměru 80:20) na koloně HILIC.



Obr. 36: chromatogramy sledovaných látek při použití mobilní fáze methanol – kyselina mravenčí (v poměru 90:10) na koloně HILIC.

Na závěr byla k separaci sledovaných látek použita mobilní fáze složená z methanolu a kyseliny octové v poměrech 70:30 až 90:10 ve prospěch methanolu. Při použití této mobilní fáze, a to zejména v poměru 80:20 docházelo k téměř totožné separaci sledovaných látek jako při použití mobilní fáze methanol, kyselina mravenčí.

Jako první tedy bylo definováno kvalitativní složení mobilní fáze. K nejlepší separaci docházelo při použití přibližně 80% methanolu v mobilní fázi ve směsi s těkavým vodným aditivem.

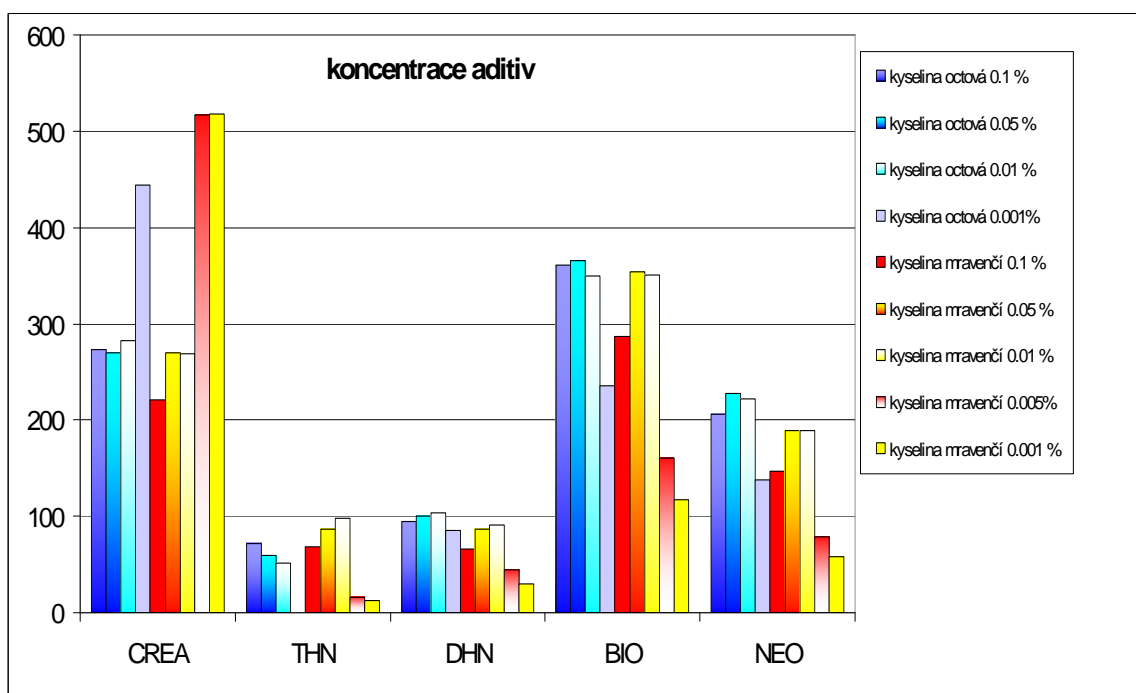
Následně byl hodnocen vliv koncentrace aditiv na ionizaci sledovaných látek, a tím na citlivost odezvy MS detektoru – vyhodnocována je plocha píku a poměr S/N (viz. obr. 37). Současně byl sledován vliv koncentrace aditiv na separaci sledovaných látek (viz. tabulky 5 a 6). Byla testována klasická aditiva jako je kyselina octová a kyselina mravenčí.

ČÍSLO	KONCENTRACE KYSELINY	CREA T _R	THN T _R	DHN T _R	BIO T _R	NEO T _R
1	0,001%	0,73	0,78	1,10	1,06	1,08
2	0,005%	0,73	0,76	1,09	1,07	1,09
3	0,01%	0,74	0,78	1,09	1,07	1,07
4	0,05%	0,74	0,79	1,08	1,06	1,07
5	0,1%	0,74	0,78	1,09	1,07	1,08

Tabulka 5: vliv koncentrace kyseliny mravenčí na retenční časy kreatininu, tetrahyroneopterinu, dihyroneopterinu, biopterinu a neopterinu.

ČÍSLO	KONCENTRACE KYSELINY	CREA T _R	THN T _R	DHN T _R	BIO T _R	NEO T _R
1	0,001%	0,90	0,94	1,10	1,07	1,08
2	0,01%	0,73	0,74	1,09	1,07	1,08
3	0,05%	0,73	0,74	1,08	1,08	1,08
4	0,1%	0,74	0,74	1,09	1,07	1,09

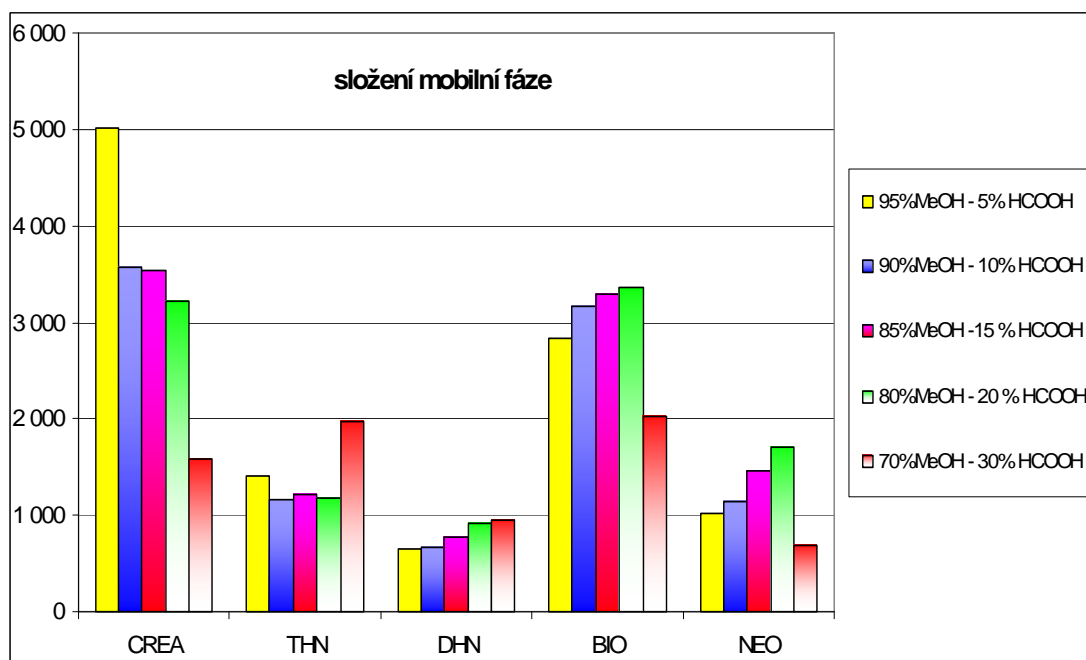
Tabulka 6: : vliv koncentrace kyseliny octové na retenční časy kreatininu, tetrahydroneopterinu, dihydroneopterinu, biopterinu a neopterinu.



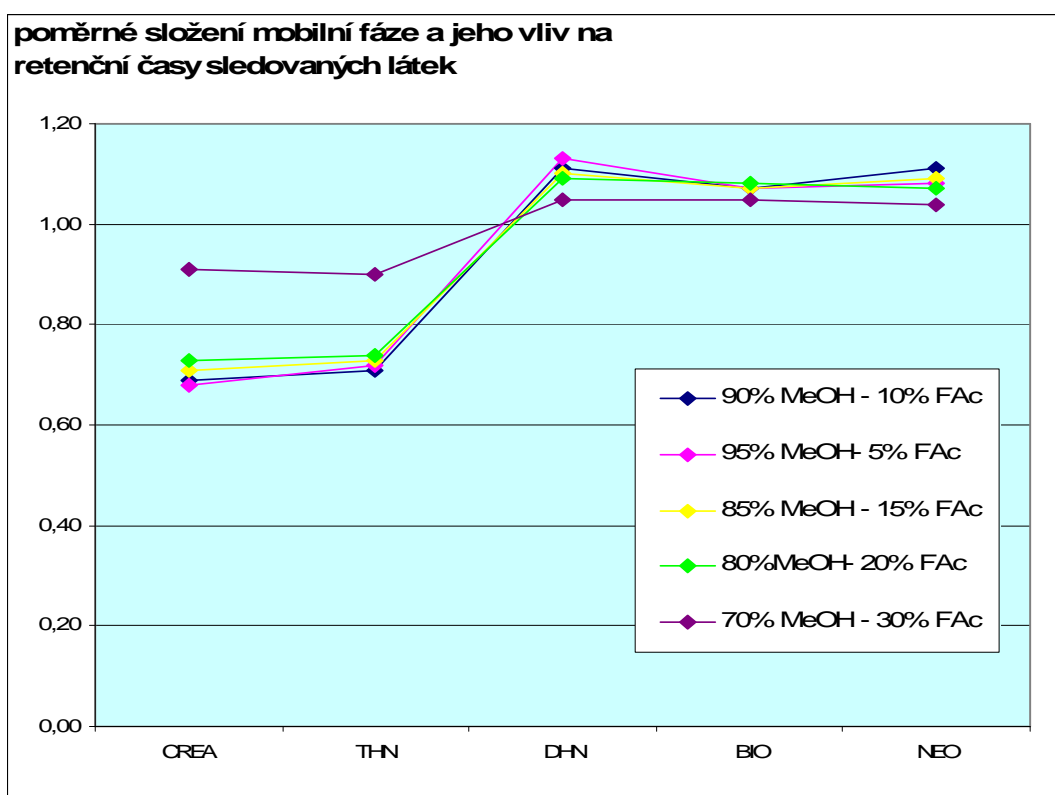
Obr. 37: vliv koncentrace aditiv na citlivost odezvy MS detektoru

Při hodnocení vlivu jednotlivých aditiv na citlivost MS detekce se jako kompromis optimální pro všechny sledované látky jevílo použití kyseliny mravenčí o koncentraci 0,01%. Různé koncentrace aditiv neměly téměř žádný vliv ani na retenční časy a tvary píků sledovaných látek. Pouze při použití kyseliny octové o koncentraci 0,001% došlo k výraznějšímu prodloužení retenčních časů kreatininu a tetrahydroneopterinu, což však pro nás nemělo žádný praktický význam.

Následujícím krokem optimalizace byla optimalizace poměrného složení mobilní fáze s ohledem na separaci, odezvu MS detektoru, ale také dobu trvání analýzy (viz. obr. 38, 39). Složení mobilní fáze je udáváno v pořadí methanol : kyselina mravenčí o koncentraci 0,01%.



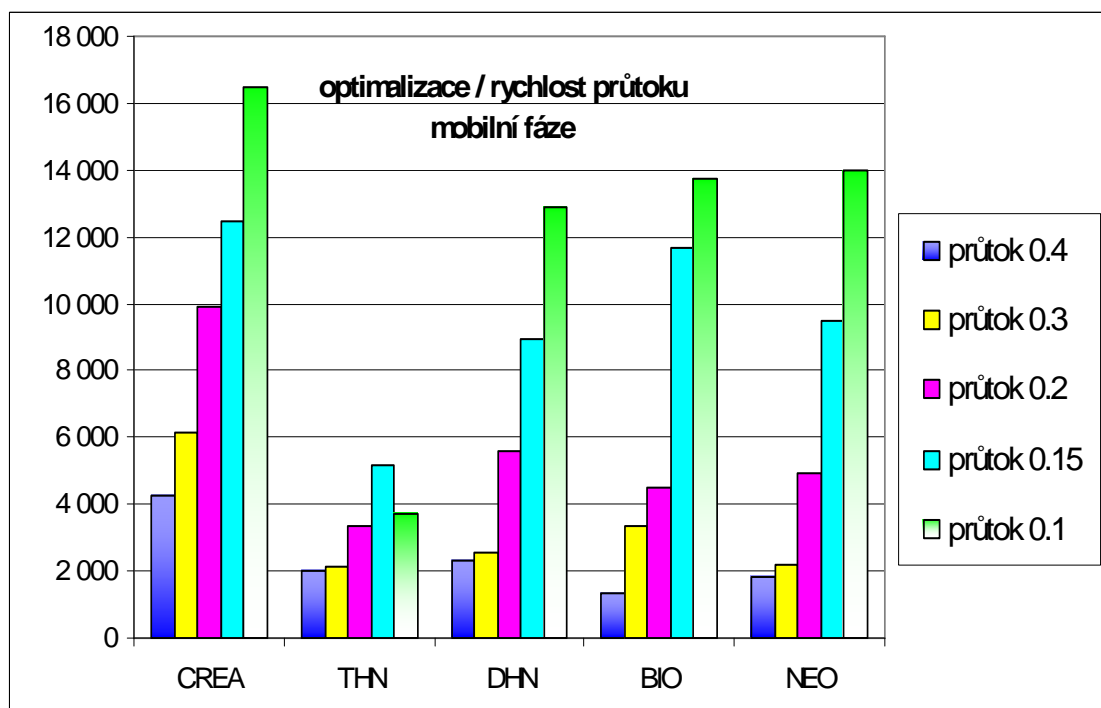
Obr. 38: optimalizace poměrného složení mobilní fáze (methanol : kyselina mravenčí o koncentraci 0,01%) a jeho vliv na citlivost odezvy MS detektoru



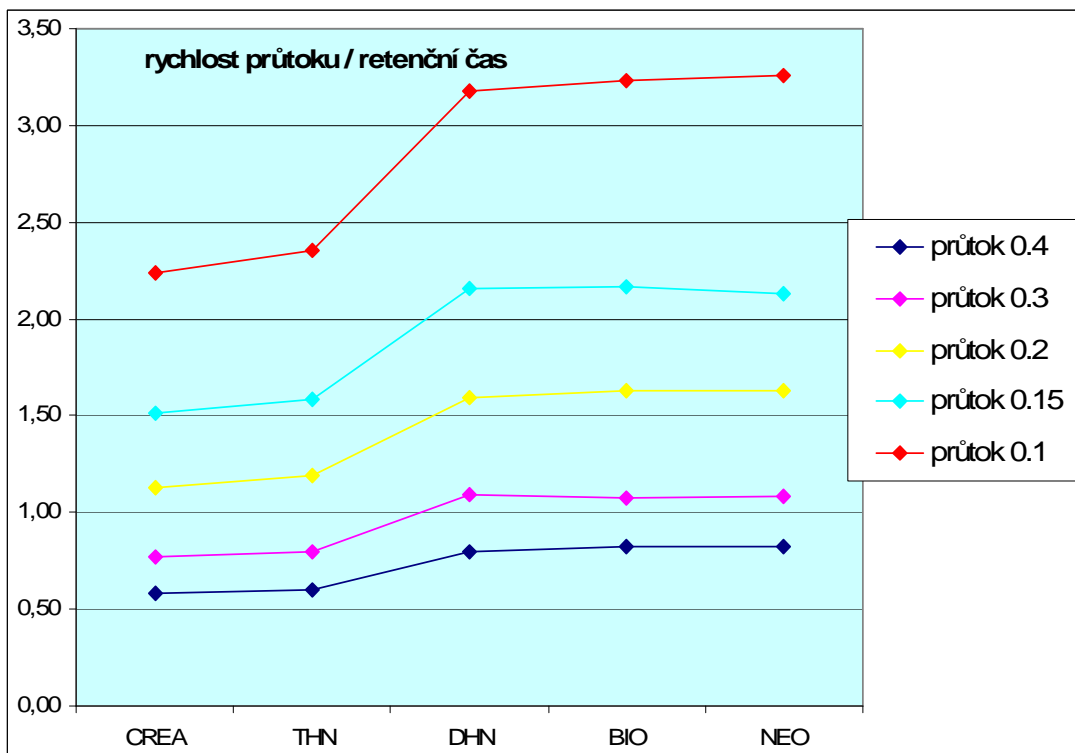
Obr. 39: optimalizace poměrného složení mobilní fáze (methanol : kyselina mravenčí o koncentraci 0,01%) a jeho vliv na separaci sledovaných látek a dobu trvání analýzy

Z hlediska všech pěti sledovaných látek byla optimální mobilní fází směs methanolu a kyseliny mravenčí o koncentraci 0,01% v poměru 80:20. Při použití této mobilní fáze vykazují dobrou citlivost zejména dihydroneopterin a tetrahydroneopterin, tedy látky jejichž citlivost je obecně slabší. Poměrné složení mobilní fáze mělo minimální vliv na retenční časy sledovaných látek a při použití různých směsí mobilní fáze docházelo jen k nepatrnému posunu retenčních časů jednotlivých sledovaných látek. Pouze při poměru 70:30 došlo k určitému posunu retenčních časů kreatininu a tetrahydroneopterinu, avšak tento posun retenčních časů byl směrem k ostatním sledovaným látkám, takže separace všech pěti sledovaných látek byla při tomto poměru nejhorší. Při ostatních poměrech (80:20 až 95:5) byly retenční časy jednotlivých sledovaných látek téměř totožné a zaznamenané rozdíly byly minimální.

Dalším optimalizovaným parametrem byl průtok mobilní fáze analytickou kolonou. Byla proměřována citlivost detekce při průtocích 0,1 až 0,4 ml / min (obr. 40). Současně byl sledován vliv průtoku mobilní fáze na separaci sledovaných látek a délku analýzy (obr. 41).



Obr. 40: optimalizace průtoku mobilní fáze analytickou kolonou a jeho vliv na citlivost detekce MS



Obr. 41: optimalizace průtoku mobilní fáze analytickou kolonou a jeho vliv na separaci sledovaných látek a celkovou délku analýzy

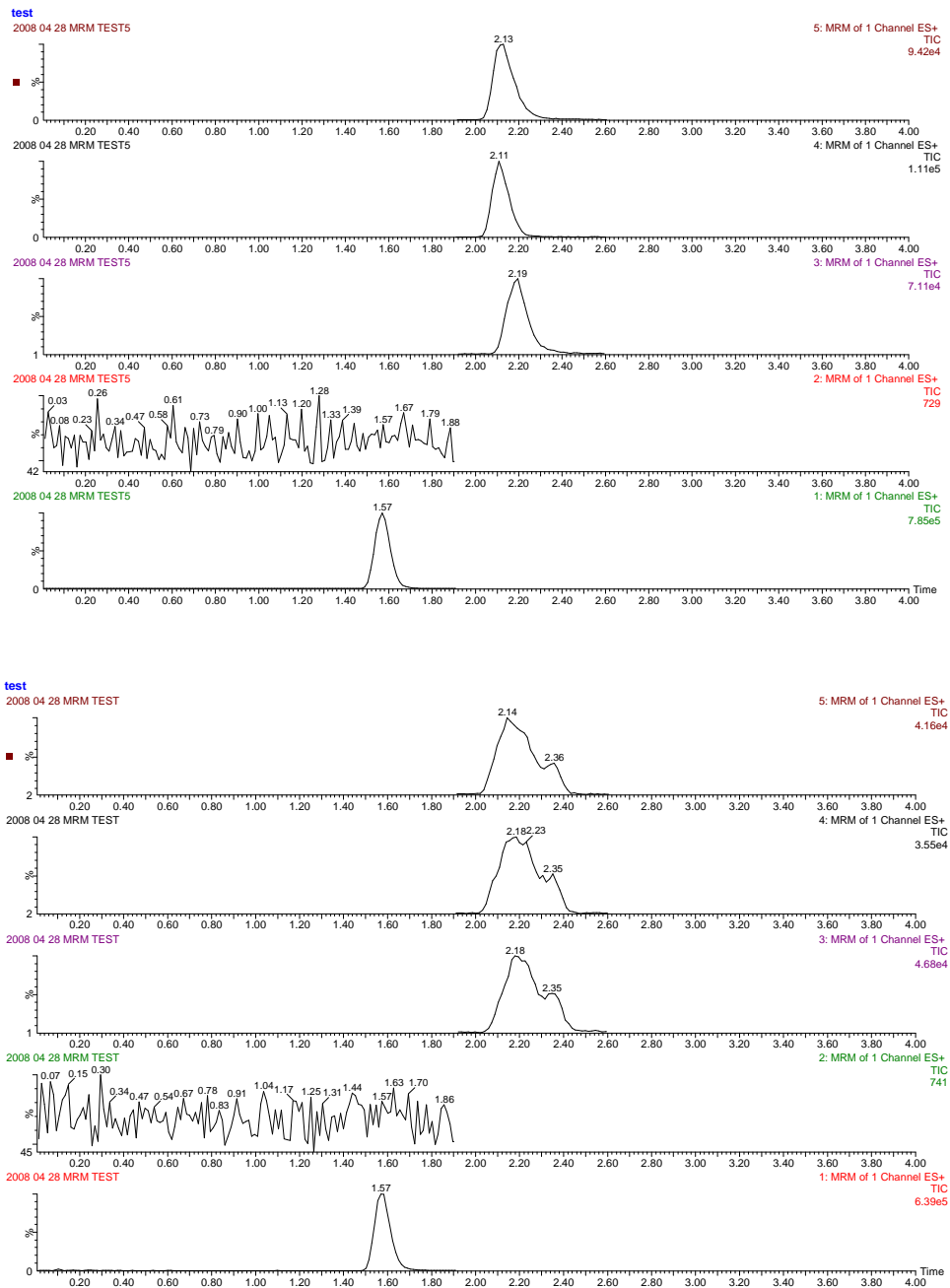
Průtok mobilní fáze kolonou musí být kompromisem mezi odezvou detektoru a délkou analýzy. Ionizační technika ESI umožňuje lepší ionizaci, resp. citlivost MS detektoru při nižších průtokových rychlostech. Pro retenční časy sledovaných látek platí, že při zvyšující se rychlosti průtoku mobilní fáze kolonou se retenční časy prodlužují, vzájemně k sobě přibližují a separace sledovaných látek je tedy horší. Z obou grafů vyplývá, že jako optimální průtok mobilní fáze analytickou kolonou byl zvolen průtok 0,15 ml/ min.

Optimalizované podmínky pro UPLC separaci jsou tedy následující:

- ✓ stacionární fáze: Acquity UPLC™ BEH HILIC
(100 x 2,1 mm, 1,7 μm)
- ✓ mobilní fáze: methanol : kyselina mravenčí (c = 0,01%) v
poměru 80:20
- ✓ průtok mobilní fáze: 0,15 ml/ min
- ✓ dávkovaný objem: 5 μl
- ✓ teplota na koloně: 30 °C
- ✓ teplota v autosampleru: 4 °C

5.1.3. Rozpouštědla pro přípravu pracovních roztoků

V průběhu experimentu se ukázalo, že volba rozpouštědla pro přípravu pracovních roztoků analyzovaných látek má velký vliv na kvalitu píků. Jako vhodná se ukázala rozpouštědla, která svým složením odpovídala složení mobilní fáze. Z tohoto důvodu byly při optimalizaci nastavení MS detektoru používány methanolicke pracovní roztoky analyzovaných látek. Porovnání kvality píků při použití methanolicke a vodných roztoků je ukázáno na následujícím obrázku (obr. 42). Nahrazení metanolu acetonitrilem vedlo k přímo drastickému zhoršení tvaru píku.

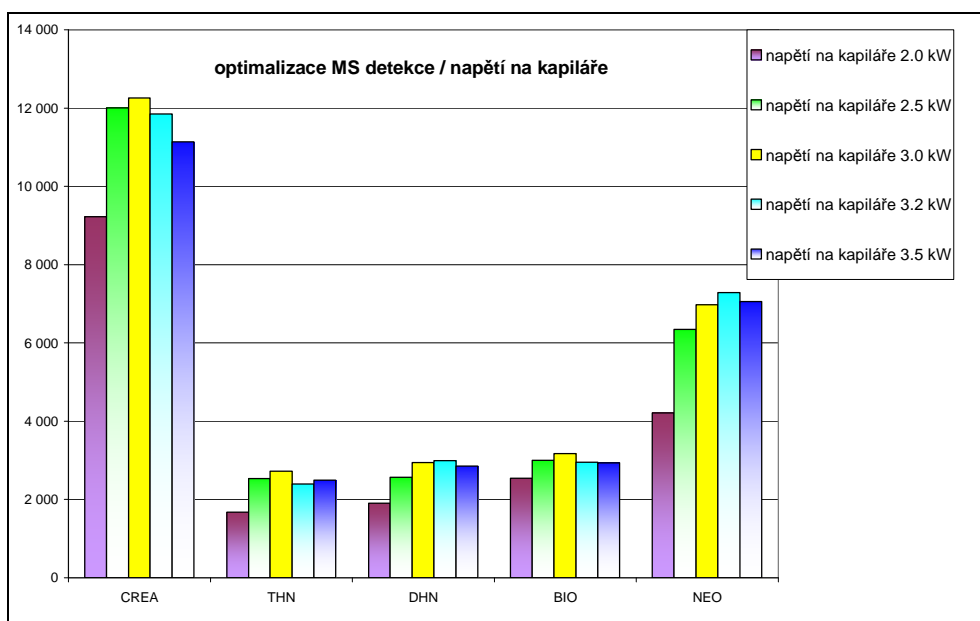


Obr. 42: porovnání methanolickeho a vodného pracovního roztoku a vliv použitého rozpouštědla na kvalitu píků

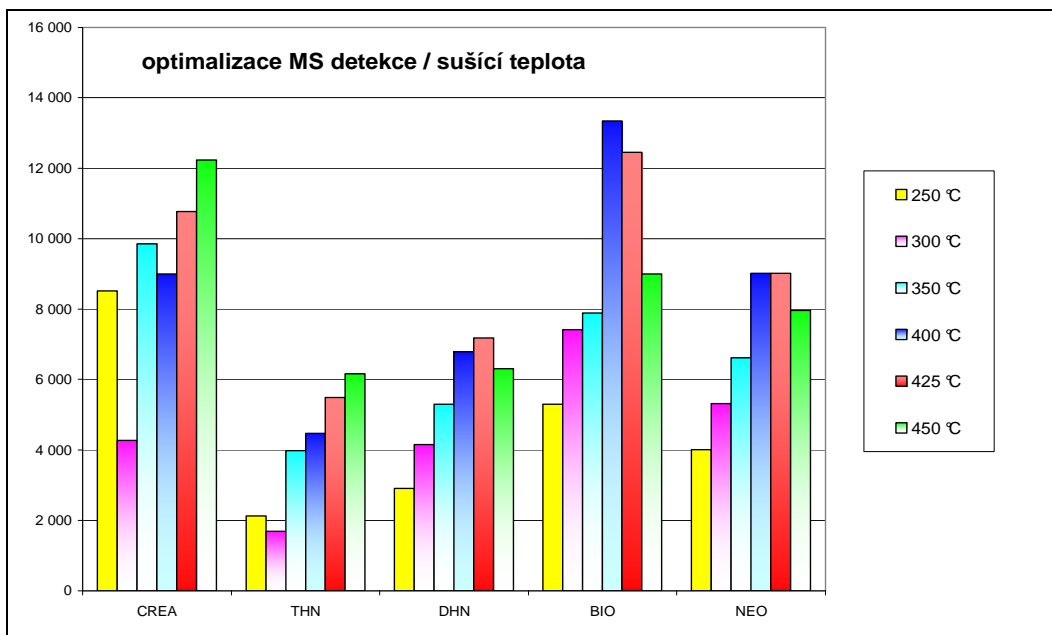
5.1.4. Optimalizace nastavení MS detektoru

5.1.4.1. Optimalizace podmínek MS detekce v modu SIM

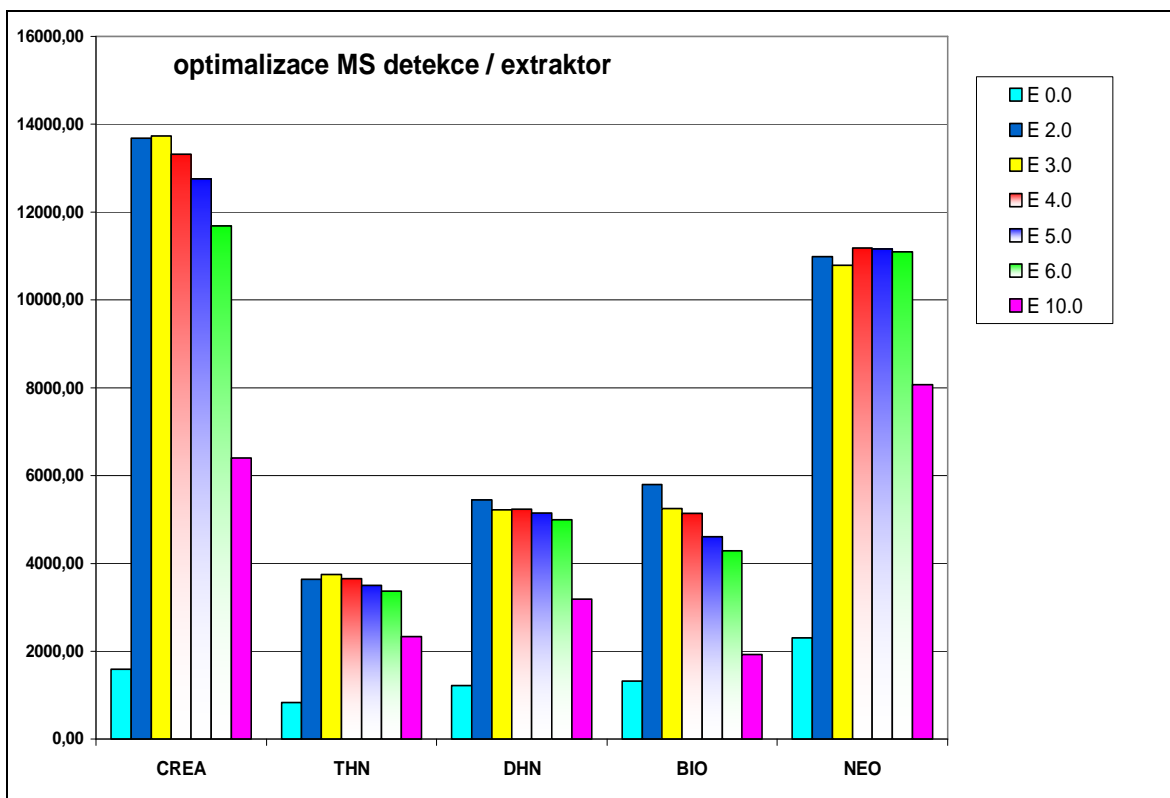
Následovala optimalizace nastavení vlastního MS detektoru, a to zejména podmínek pro ionizaci. Důležitými parametry jsou teplota, napětí vkládané na kapiláru, průtok dusíku jako sušícího plynu a nastavení iontové optiky (RF lens a Extraktor). Přehled optimalizovaných parametrů MS detektoru následuje (viz. obrázky 43 až 48).



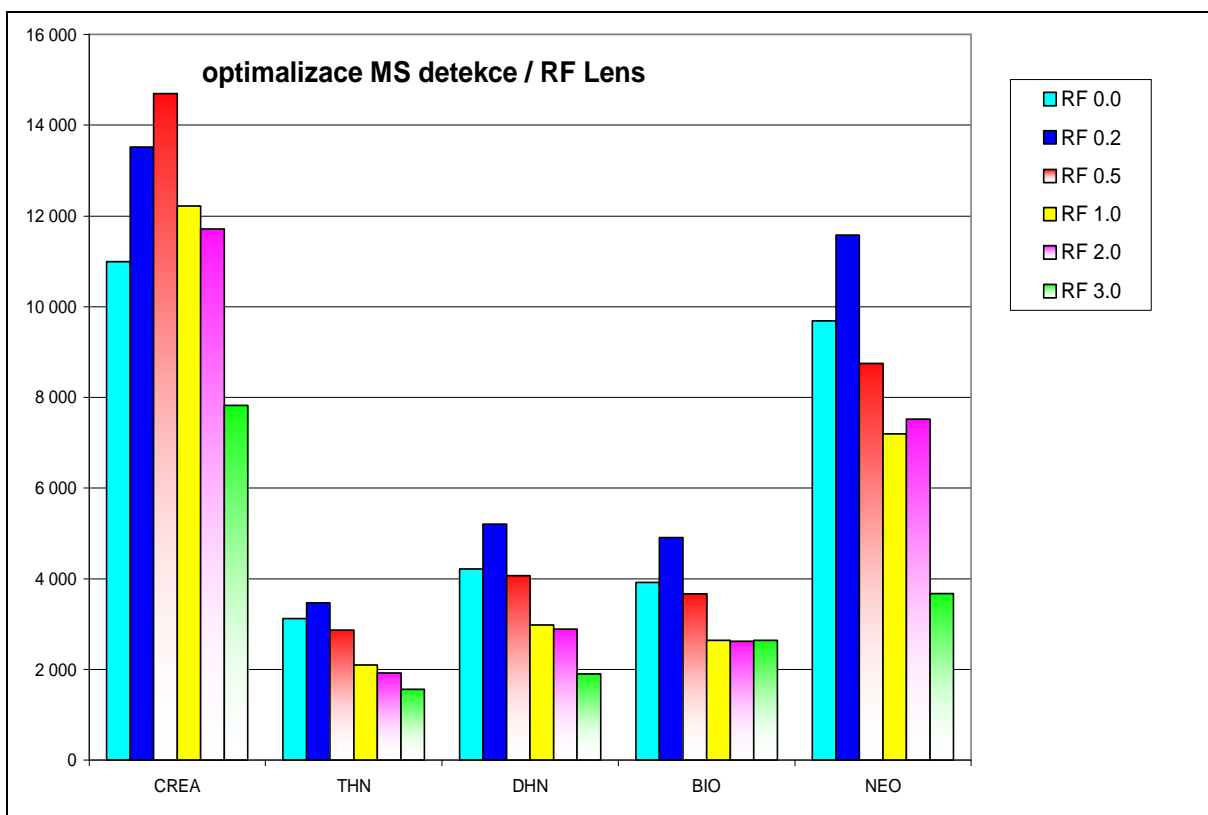
Obr. 43: optimalizace napětí na kapiláře a jeho vliv na citlivost MS detekce



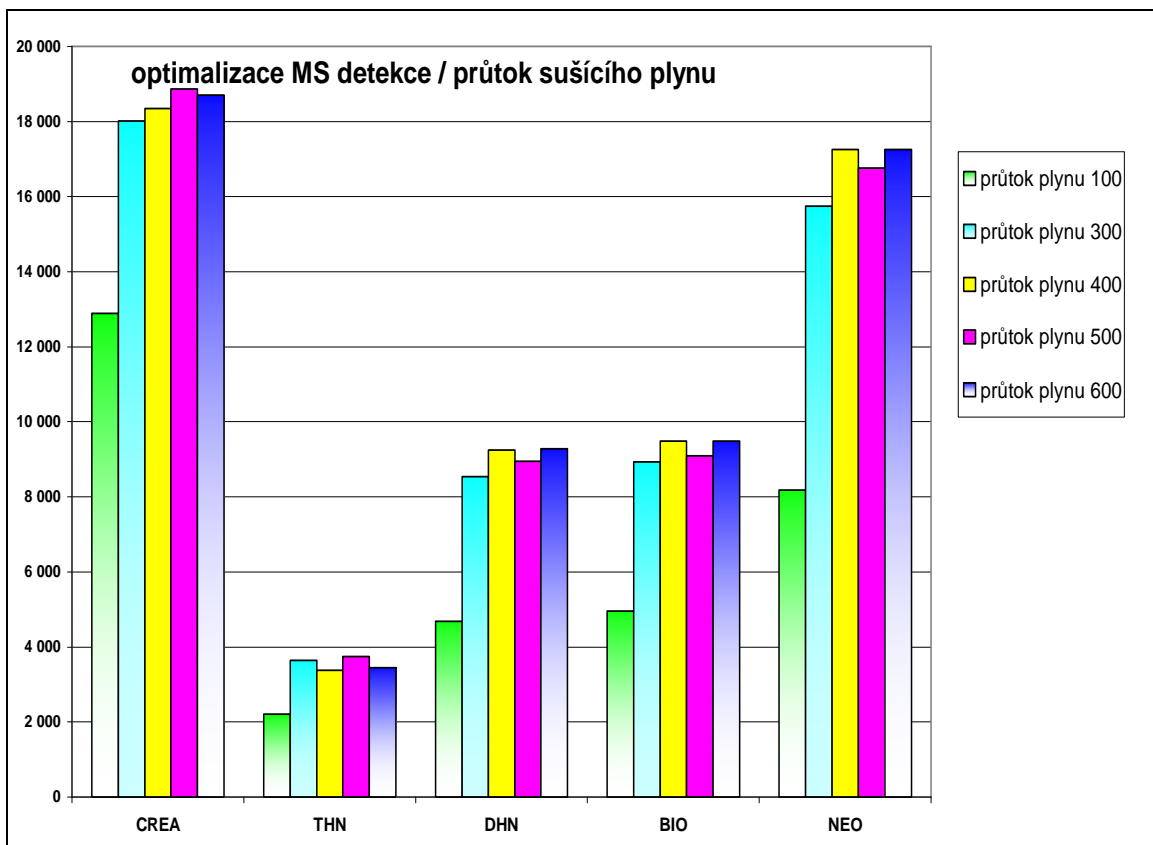
Obr. 44: optimalizace sušící teploty a její vliv na citlivost MS detekce



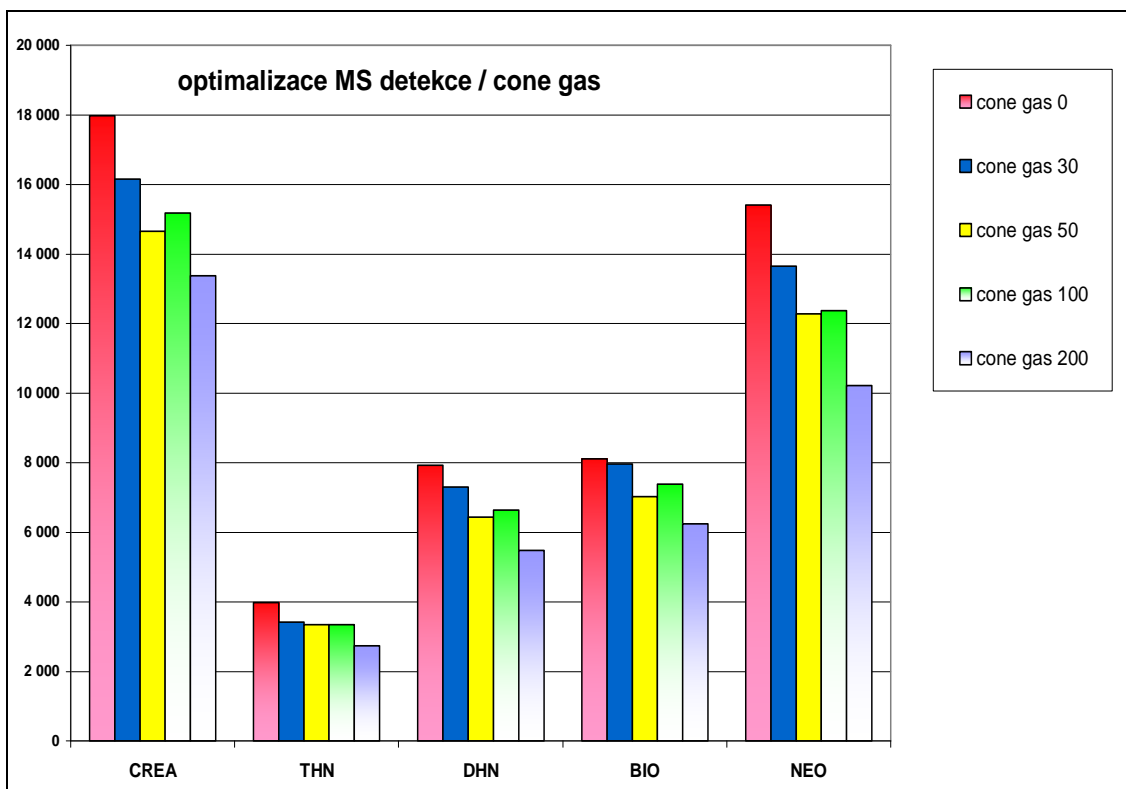
Obr. 45: optimalizace nastavení extraktoru iontové optiky a jeho vliv na citlivost MS detekce



Obr. 46: optimalizace nastavení iontové optiky (RF lens) a jeho vliv na citlivost MS detekce



Obr. 47: optimalizace průtoku dusíku jako sušícího plynu a jeho vliv na citlivost MS detekce



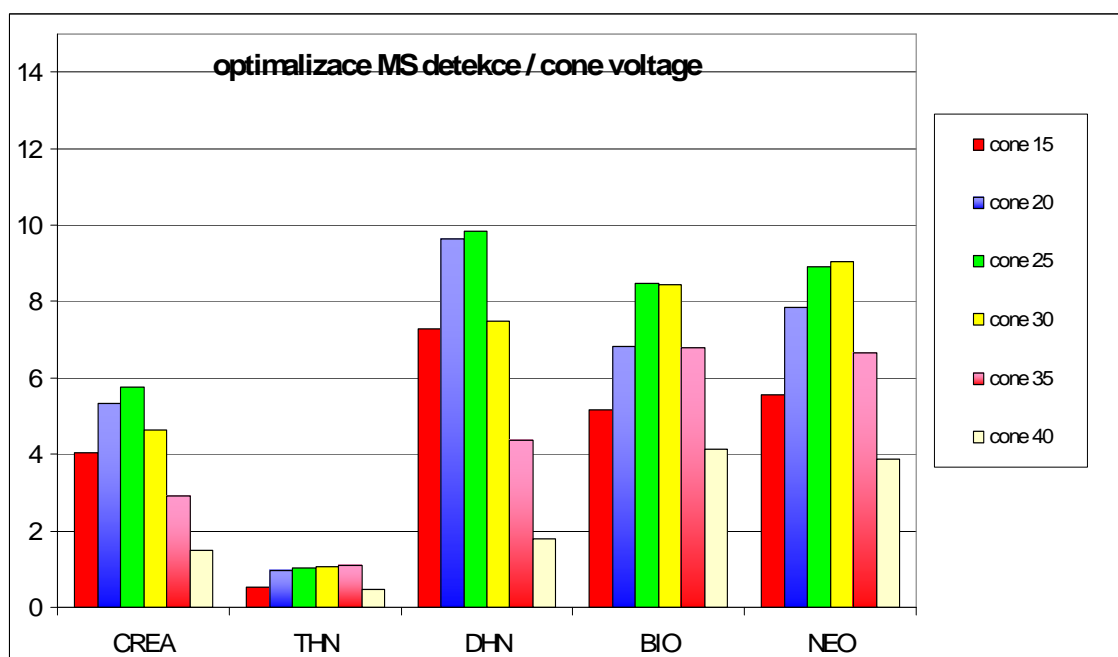
Obr. 48: optimalizace cone gas a jeho vliv na citlivost MS detekce

Výsledné podmínky pro ionizaci byly tedy kompromisem pro sledování daných látek ve směsi. Parametr source temperature, což je teplota v iontovém zdroji není optimalizován a byl nastaven automaticky na 130 °C, jak je doporučováno při průtocích LC-MS.

Optimalizované podmínky MS detektoru jsou následující:

- ✓ typ ionizace: ESI⁺
- ✓ napětí na kapiláře: 3.0 kV
- ✓ extractor: 2 V
- ✓ RF Lens: 0,2 V
- ✓ desolvation temperature: 375 °C
- ✓ gas flow: 400 l/ hod
- ✓ cone gas flow: 50 l/ hod
- ✓ source temperature: 130 °C

Jak bylo uvedeno dříve individuálně byl nastaven parametr cone voltage (viz. kapitola 4.3.2), který určuje typ iontů vstupujících vstupním kuželem do analyzátoru (obr. 49).



Obr. 49: optimalizace cone voltage a jeho vliv na citlivost MS detekce

5.1.4.2. Opakovatelnost metody pro selektivní záznam iontu (SIM)

Po optimalizaci podmínek pro UPLC separaci a podmínek pro MS detekci byla při zvolených podmínkách změřena opakovatelnost metody pro prekurzorové ionty sledovaných látek. Opakovatelnost metody byla vyjádřena pomocí relativních směrodatných podmínek [% R.S.D.] retenčních časů a ploch píků jednotlivých sledovaných látek (viz. tabulka 7).

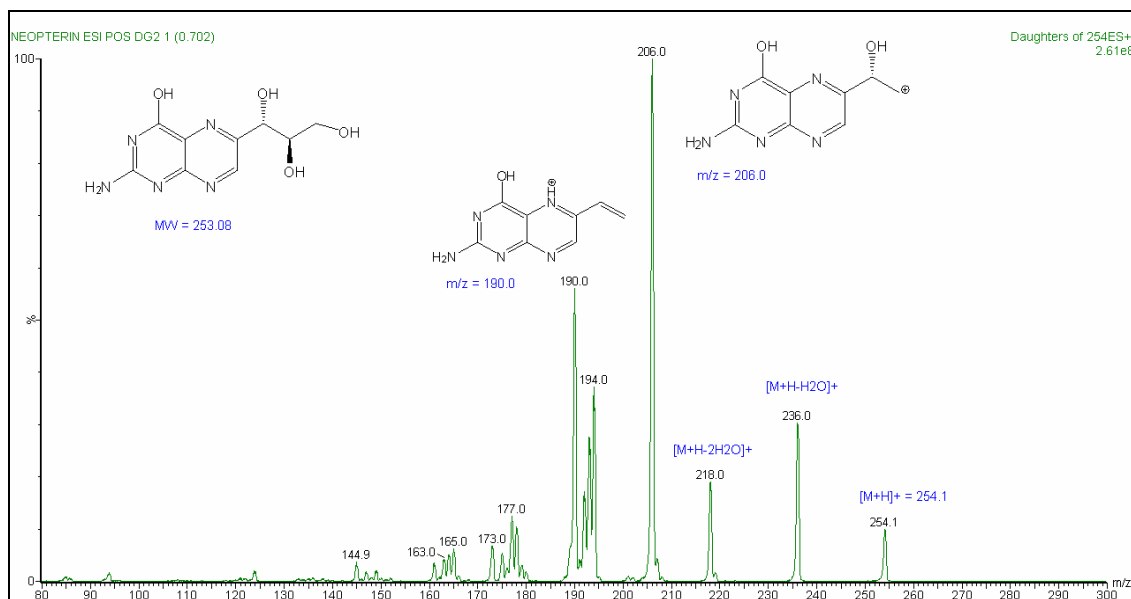
	NEO	BIO	DHN	THN	CREA
SIM [M+H] ⁺	254,08	238,09	256,10	258,11	114,06
t _r	2,12	2,18	2,15	1,57	1,504
cone V	30	25	25	25	25
t _r [% RSD]	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34
A [% RSD]	1,44	2,06	2,02	7,18	1,66

Tabulka 7: opakovatelnost metody pro prekurzorové ionty sledovaných látek v modu SIM

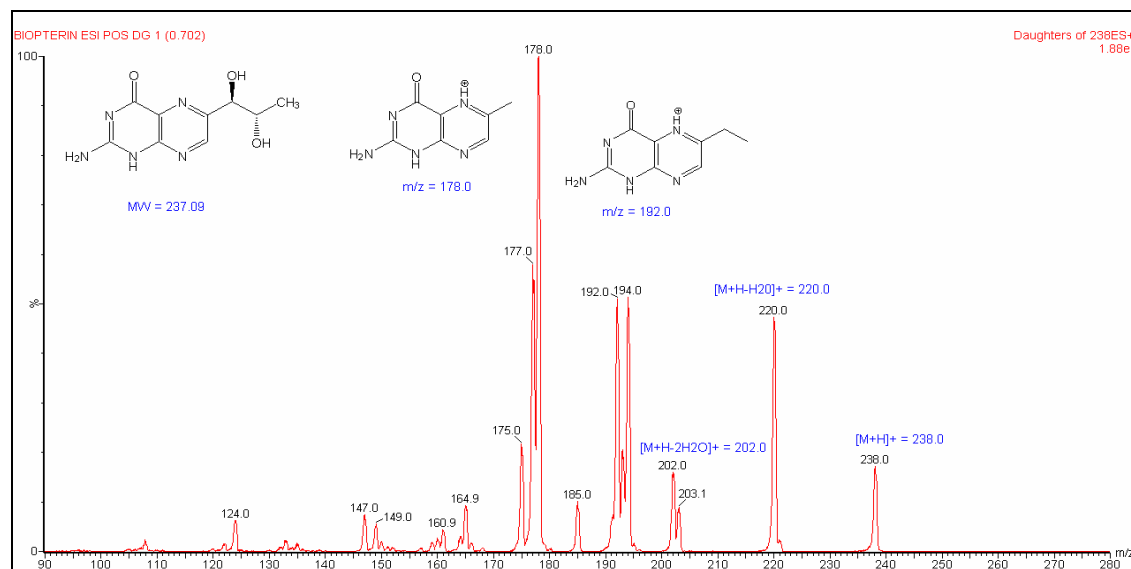
5.3. Sken produktových iontů

Po získání maximální intenzity prekurzorového iontu bylo třeba získat fragment specifický pro každou látku, čehož bylo docíleno tzv. MS/MS skenem produktových iontů. Nastavení analyzátoru obnáší dodání kolizní energie a nastavení minimálních hodnot poměru m/z na vstupu a výstupu druhého kvadrupolu.

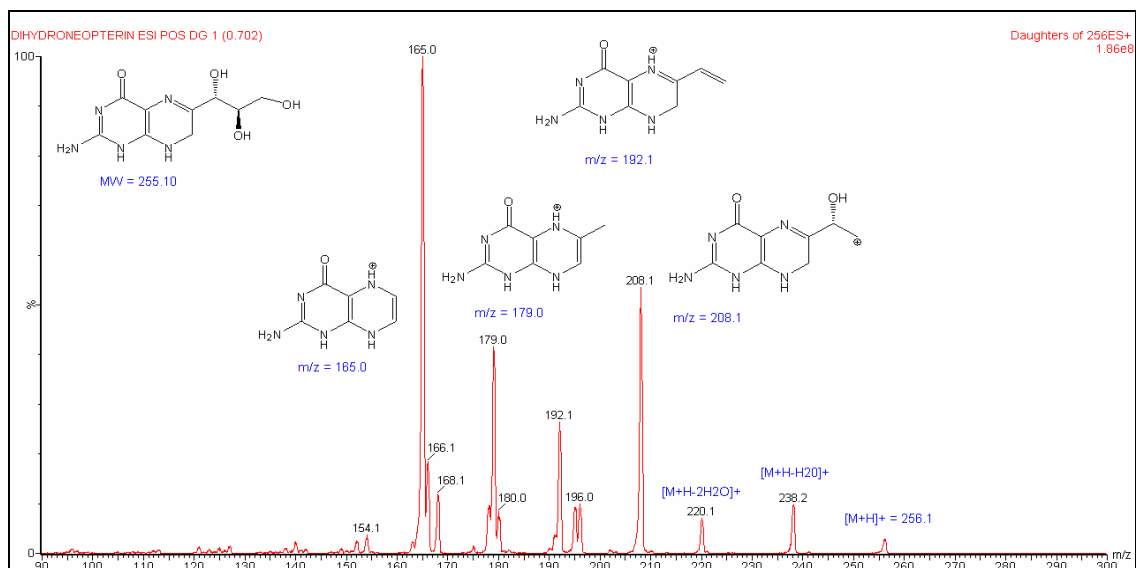
MS/MS skenem produktových iontů (viz. kapitola 4.3.2.2.) a interpretací hmotnostních spekter byly vybrány fragmenty prekurzorových iontů použitelné pro kvantifikační mod SRM. Interpretace spekter produktových iontů sledovaných látek následuje (obr. 50 až obr. 54).



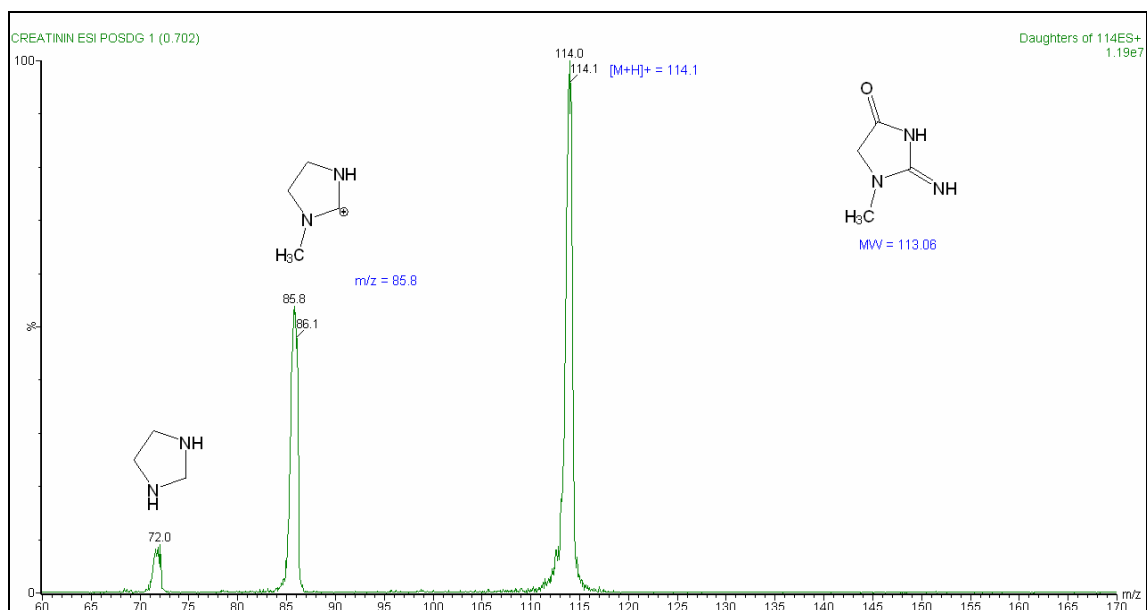
Obr. 50: hmotnostní spektrum produktových iontů neopterinu a jeho interpretace



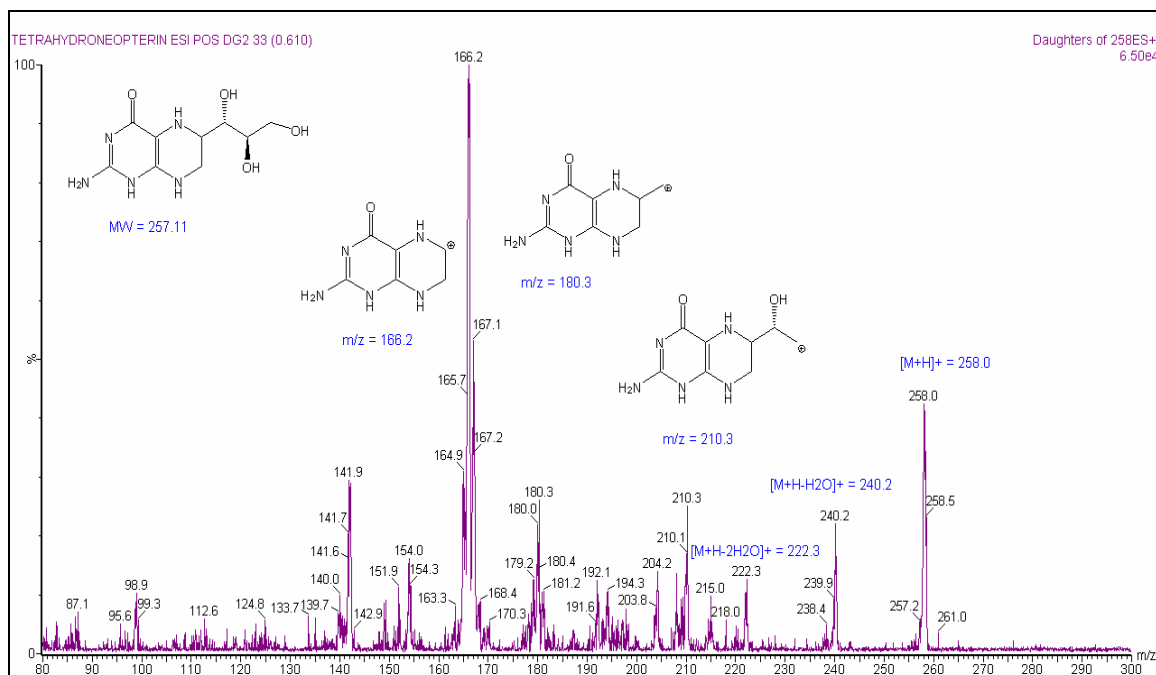
Obr. 51: hmotnostní spektrum produktových iontů biopterinu a jeho interpretace



Obr. 52: hmotnostní spektrum produktových iontů dihydroneopterinu a jeho interpretace



Obr. 53: hmotnostní spektrum produktových iontů creatininu a jeho interpretace

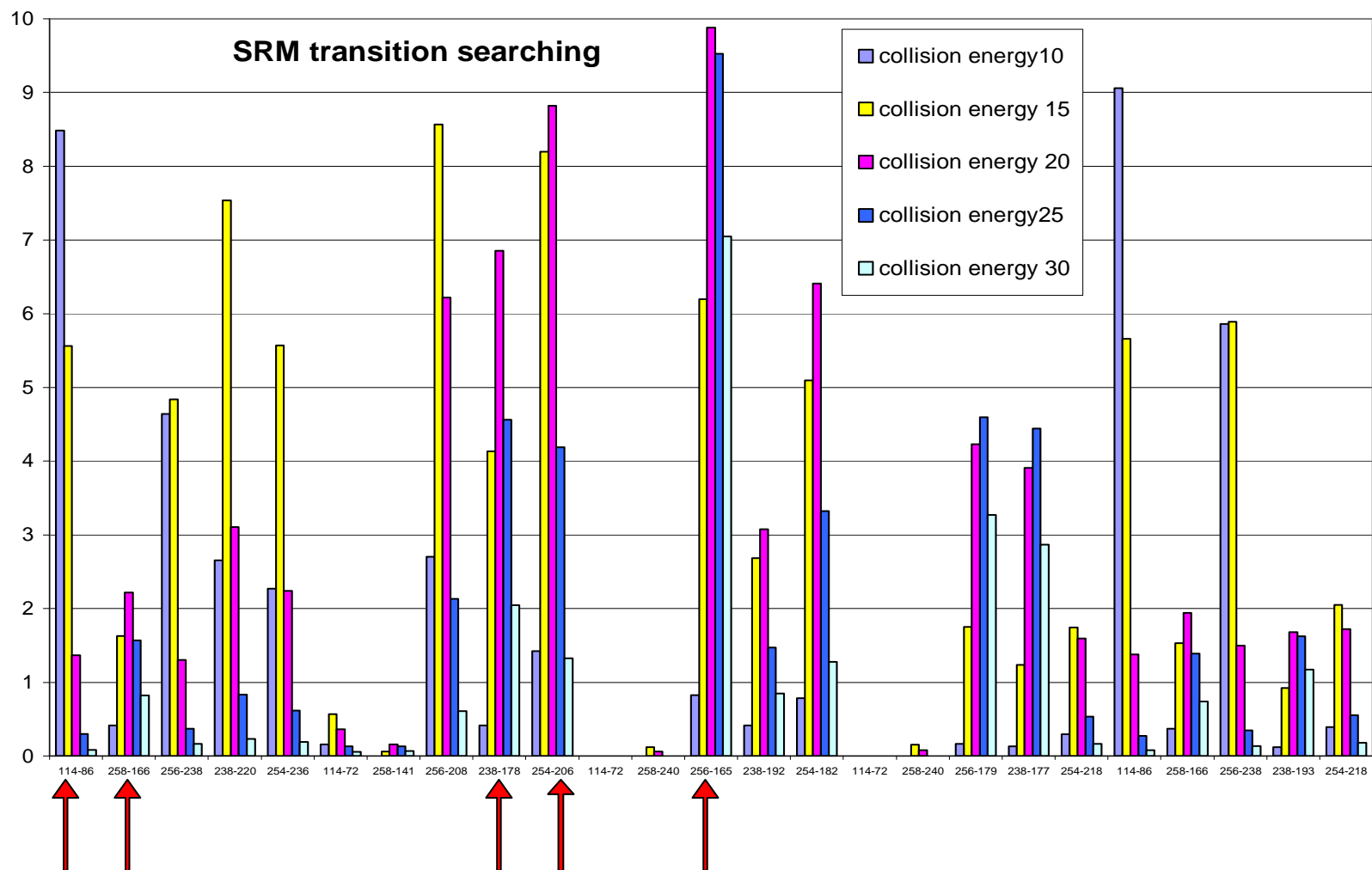


Obr. 54: hmotnostní spektrum produktových iontů tetrahydroneopterinu a jeho interpretace

Dalším krokem byla optimalizace kolizní energie dodávaná do kolizní cely a výběr takového produktového iontu, který by poskytoval dostatečnou intenzitu pro tzv. přechod (transition) potřebný pro nastavení SRM kvantifikačního modu (obr. 55).

fragmentový iont vhodný pro SRM kvantifikaci a optimální kolizní energie:

- přechod pro kreatinin 114,06 → 85,8 při kolizní energii 10
- přechod pro neopterin 254,1 → 206,0 při kolizní energii 20
- přechod pro biopterin 238,09 → 178,0 při kolizní energii 20
- přechod pro tetrahydroneopterin 258,11 → 166,2 při kolizní energii 20
- přechod pro dihydroneopterin 256,1 → 165,2 při kolizní energii 20



Obr. 55: optimalizace kolizní energie a její vliv na intenzitu MS detekce fragmentových iontů sledovaných látek; červenou šipkou jsou vyznačeny zvolené podmínky

5.3.1. Opakovatelnost metody v modu SRM

Po optimalizaci podmínek v modu SRM a byla při zvolených podmínkách změřena opakovatelnost metody. Opakovatelnost metody byla vyjádřena pomocí relativních směrodatných podmínek [% R.S.D.] retenčních časů a ploch píků jednotlivých sledovaných látek (viz. tabulka 8).

X	NEO	BIO	DHN	THN	CREA
SRM transition	254,08 ↓ 206,00	238,09 ↓ 178,00	256,10 ↓ 165,02	258,11 ↓ 166,0	114,06 ↓ 86,00
t _r	2,13	2,13	2,17	1,57	1,51
cone V	30	25	25	30	25
t _r [% RSD]	0,00	0,00	0,00	0,31	0,35
A [% RSD]	3,36	3,73	3,28	4,15	1,25

Tabulka 8: opakovatelnost metody v modu SRM

5.3.2. Ověření linearity a citlivosti metody

Na závěr bylo provedeno ověření linearity dané metody a testování její citlivosti (tabulka 9 a obr. 56 až 59). Linearita metody byla vyjádřena pomocí korelačního koeficientu a její citlivost pomocí limitu detekce (LOD) metodou využívající poměr signálu k šumu. Kde limit detekce je trojnásobek tohoto poměru (viz. kapitola 3.6.3). Limit kvantifikace (LOQ) je pak desetnásobkem tohoto poměru.

Problematické bylo ověření linearity a citlivosti metody tetrahydroneopterinu, protože v době měření byl k dispozici pouze starý standard této látky (viz. kapitola 5.1.).

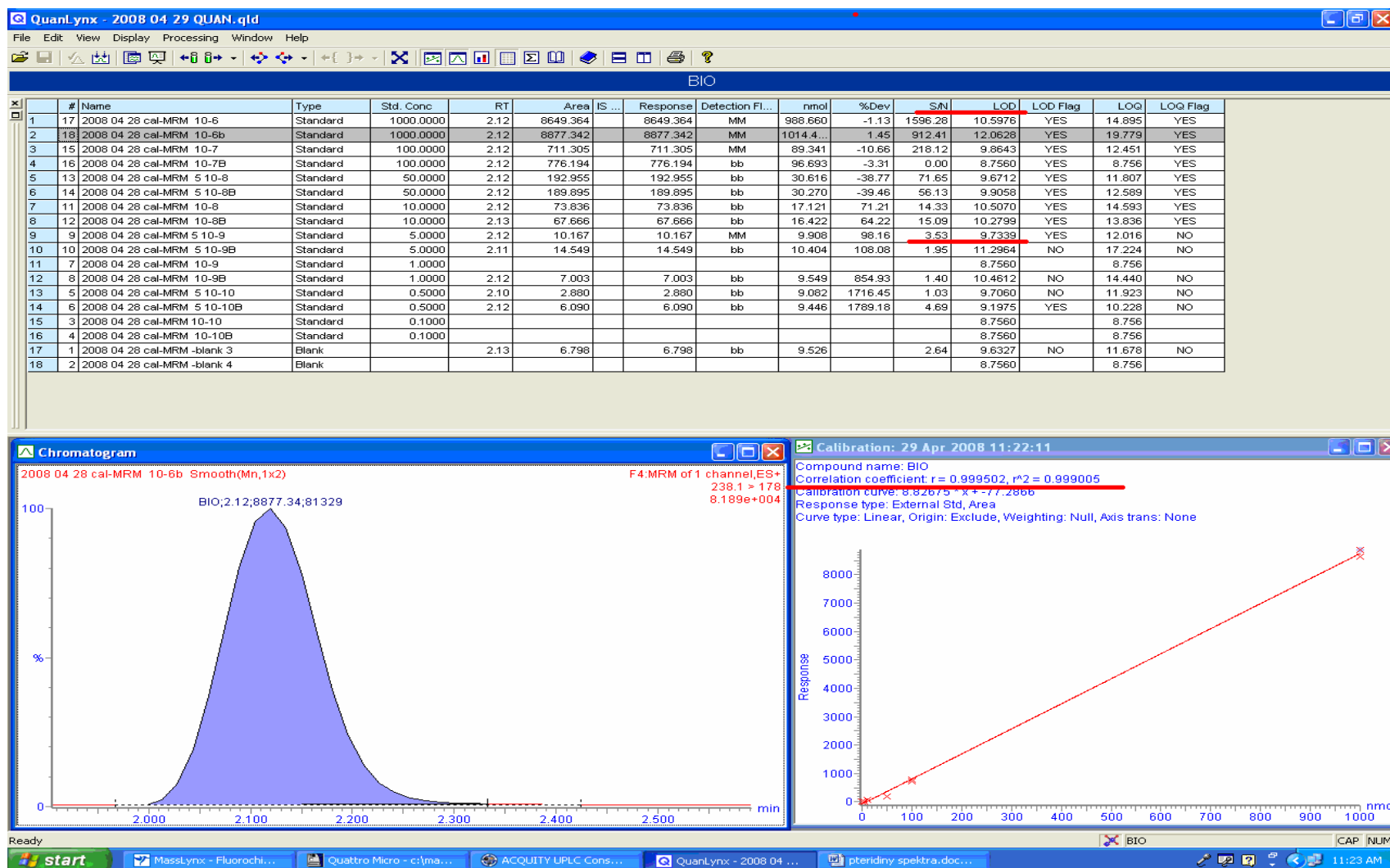
	NEO	BIO	DHN	CREA
korelační koeficient r	0,99947	0,9995	0,99918	0,99959
Citlivost [mol/l]	10 ⁻¹⁰	5.10 ⁻⁹	5.10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
LOD [nmol]	3,48	9,73	28,98	5,68
LOQ [nmol]	11,48	32,1	95,64	18,74

Tabulka 9: ověření linearity (pomocí korelačního koeficientu) a citlivost metody pro jednotlivé analyzované látky

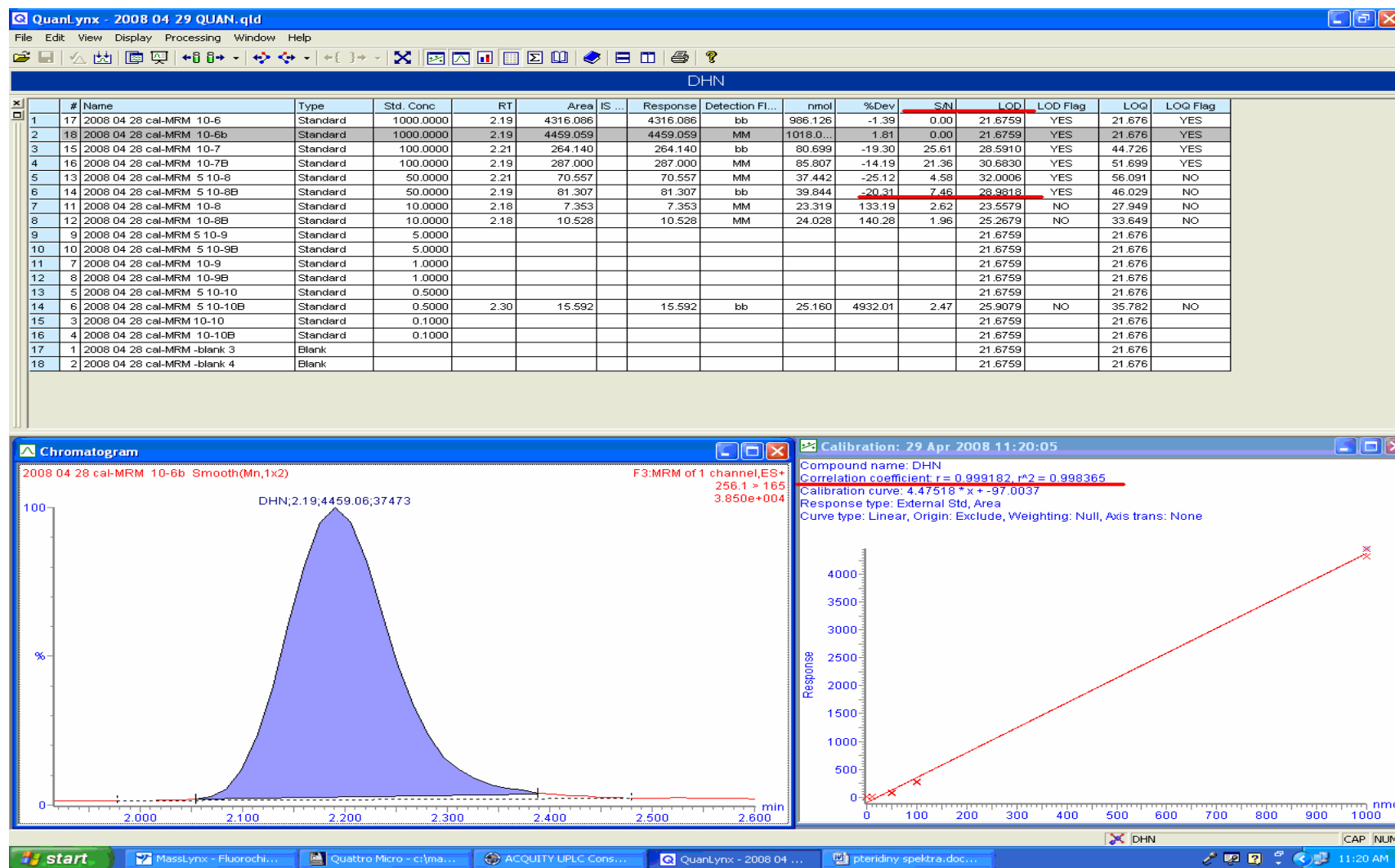
Metoda byla lineární v rozsahu koncentrací:

- 10^{-6} až 10^{-10} mol/l pro neopterin
- 10^{-6} až $5 \cdot 10^{-9}$ mol/l pro biopterin
- 10^{-6} až $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l pro dihydroneopterin
- 10^{-6} až 10^{-9} mol/l pro kreatinin

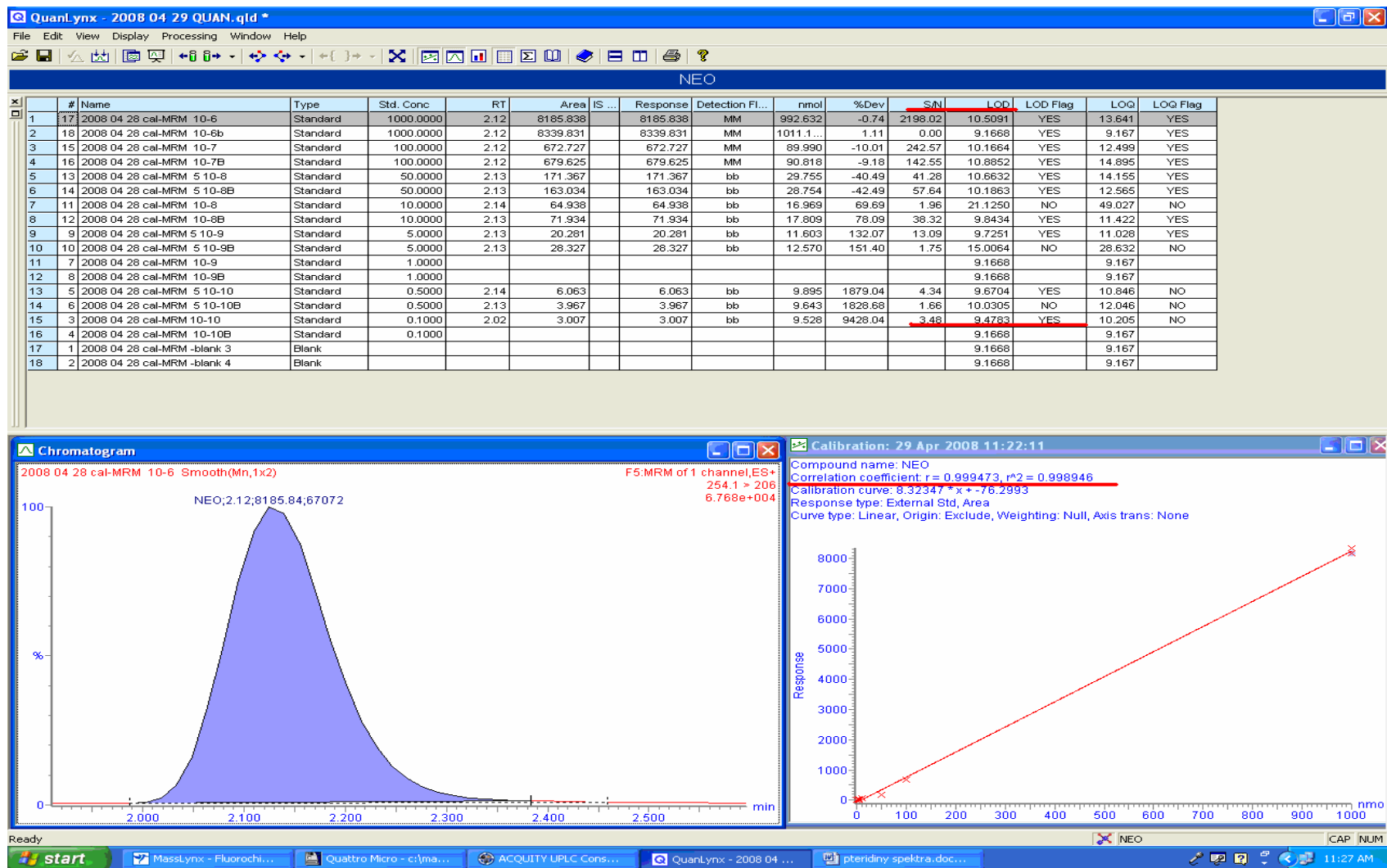
Limity detekce se pohybovaly od 3,48 nmol u neopterinu po 28,98 nmol u dihydroneopterinu (viz. tabulka 9).



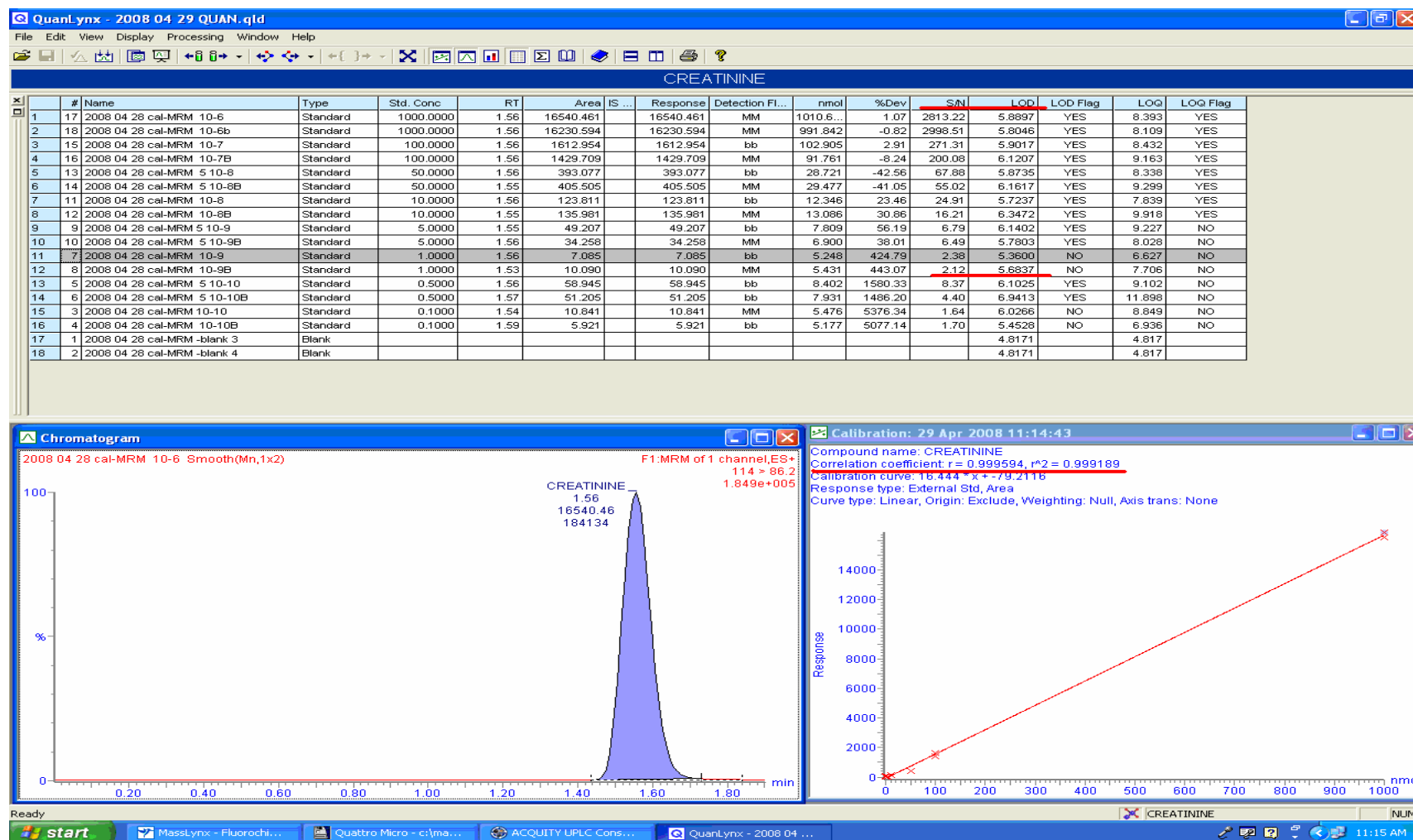
Obr. 56: citlivost a linearita metody pro biopterin



Obr. 57: citlivost a linearita metody pro dihydroneopterin



Obr. 58: citlivost a linearita metody pro neopterin



Obr. 59: citlivost a linearita metody pro kreatinin

6. Závěr

1. Byla vybrána vhodná ionizační technika a prekurzorové ionty pro MS detekci neopterinu, biopterinu, 7,8-dihydroneopterinu, 5,6,7,8-tetrahydroneopterinu a kreatininu. Pro všechny látky byly vybrány prekurzorové ionty $[M+H]^+$ v pozitivním modu ionizace ESI.
2. Byla vybrána analytická kolona a nalezena optimální mobilní fáze pro separaci sledovaných látek. Konkrétně se jednalo o analytickou kolonu Acquity UPLC™ BEH HILIC a mobilní fázi a směs methanolu a kyseliny mravenčí o koncentraci 0,01% v poměru 80:20.
3. Byl vybrán optimální průtok mobilní fáze chromatografickým systémem, konkrétně 0,15 ml/min.
4. Bylo vybráno optimální nastavení MS detektoru pro měření citlivosti odezvy prekurzorových iontů $[M+H]^+$ hodnocených látek v modu SIM.
5. Byla hodnocena opakovatelnost, resp. reprodukovatelnost metody v modu SIM. Reprodukovatelnost metody byla vyhovující.
6. Byla změřena MS/MS produktová spektra pro získání produktových iontů vhodných pro kvantifikační mod SRM.
7. Byl vybrán nejintenzivnější produktový iont a kolizní energie k jeho fragmentaci optimální pro kvantifikační mod SRM.
8. Byla hodnocena opakovatelnost metody v modu SRM, vyhovující.
9. Byl ověřena linearita metody a stanovena citlivost metody pro jednotlivé analyzované látky, metoda je lineární.

7. Použitá literatura

- [1] J. Klimeš a kolektiv: Kontrola léčiv I, Praha, KAROLINUM, 2006
- [2] E. Heftman, Chromatography 6th edition, Journal of Chromatography library vol. 69 A, Elsevier 2004
- [3] http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/ (Y.Kazachevich, H. McNair, Textbook on High Performance Liquid Chromatography)
- [4] <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> - 18. 4. 2008
- [5] Ultra Performance LCTM by Design, 720000880EN, Waters Corporation, Milford, USA, 2004
- [6] M. Swartz, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, **28** (2005) 1253
- [7] <http://www.waters.cz/docs/acquity.pdf> - 12. 3. 2008
- [8] J. J. Van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klingengerg, J. Chem. Eng. Sci. **5** (1956) 272
- [9] M. Joseph, High-throughput HPLC with Short Columns and New Sub Two-Micron Particles, Agilent Technologies, Separation Times **16** (2003)
- [10] <http://www.chromatographyonline.com> – Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) : An Introduction, Acquity UPLC Systems, 2006
- [11] <http://www.waters.cz/ie/index.html>
- [12] M. Gilar, Van Deemterovy křivky a sorbent pro UPLC, Vize 2005, Waters, 02. 11. 2004, Praha
- [13] Acquity UPLC columns, 720001140EN, Waters Corporation, Milford, USA, 2005
- [14] A Practical Guide to Hilic, ISBN 678-91-631-8370-6, SeQuant AB, Umea, Sweden, 2007
- [15] <http://www.sequant.com/default.asp?ml=11625> – 12. 3. 2008
- [16] P. Hemstrom et al., Hydrophilic interaction chromatography, J. Sep. Sci. **29** (2006) 1784 – 1821
- [17] P. Hagglund, J. Bunkenborg, F. Elortza, O. N. Jensen, P. Roepstorff, Journal Proteome Res., **3** (2004) 556 – 566
- [18] A. J. Alpert, Journal Chromatography, **499** (1990) 177 – 196
- [19] D. L. Crimmins, Anal.Chim.Acta, **352** (1997) 21-30
- [20] H. Lindner, B. Sarg, W. Helliger, J. Chromatogr. A **782** (1997) 55-62
- [21] C. McClintic, D.M. Remick, J. A. Peterson, D. S. Risley, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. **26** (2003) 3093 - 3104

- [22] P. Uutela, R. Reinila, P. Piepponen, R. A. Ketola, R. Kostianen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **19** (2005) 2950-2956
- [23] A. R. Oyler, B. L. Armstrong, J. Y. Cha, M. X. Zhou, et. Al., *J. Chromatogr. A* **724** (1996) 378 - 383
- [24] J. J. Thomson, *Rays of Positive Electricity and the Application of Chemical Analyse*, Longmans, Green & Co., London, 1913
- [25] Ch. Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Wiley, USA, 2007
- [26] http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm
- [27] R. D. Smith, J.A. Loo, R. R. Ogorzalek Loo, M. Busman, H. R. Udseth, Principles and practice of electrospray ionization of mass spectrometry of large polypeptides and proteins, *Mass Spectrom. Rev.* **10** (1991) 359 – 451
- [28] C. Dass, Recent developments and applications of high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Curr. Org. Chem.* **3** (1999) 193 – 209
- [29] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, Electrospray ionization: principles and practice, *Mass Spectrom. Rev.* **9** (1990) 37 – 70
- [30] M. Gamero-Castano and J. F. de la Mora, Kinetic od small ion evaporation from the charge and mass distribution of multiply charged clusters in electrospray, *J. Mass Spectrom* **35** (2000) 790 – 803
- [31] P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanism involved in electrospray mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 804
- [32] M. Vilm and M. Mann, Analytical properties of the nanoelectrospray ion source, *Anal. Chem.* **68** (1996) 1 – 8
- [33] Z. Takáts, J. M. Wiseman, B. Gologan and R. G. Cooks, Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization, *Science* **306** (2004) 471
- [34] A. J. Dempster, *Phys. Rev.* **18** (1921) 398
- [35] P. H. Dawson, Quadrupole mass analyzer: performance, design, and some recent application, *Mass Spectrom. Rev.* **5** (1986) 1 – 37
- [36] P. E. Miller and M. Bonner Denton, The Quadrupole mass filter: basic operating concepts, *J. Chem. Educ.* **63** (1986) 617 – 622
- [37] <http://www.i-mass.com/guide/technique.html> - 23. 4. 2008

- [38] W. E. Stephens, A pulsed mass spectrometer with time disperzion, *Phys. Rev.* **69** (1946) 691
- [39] International Conference on Harmonization (ICH), Q2(R1): Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register, November 2005
- [40] Wachter H., Fuchs D., Hnusen A. et al. NEOPTERIN- Biochemistry – Methods Clinical Application. Berlin – New York, Walter de Gruyter 1992
- [41] A. Sakurai, M. Goto, Neopterin: isolation from human urine. *J. Biochem (Tokyo)* **61** (1967) 142 – 145
- [42] T. H. D. Jones, G. M. Brown, The biosynthesis of folic acid. VII. Enzymatic synthesis of pteridines from guanosine triphosphate. *J. Biol. Chem.* **242** (1967) 3989 – 3997
- [43] H. Wachter, A. Hausen, K. Grabmayr, Erhote Ausscheidung von Neopterin im Harn von Patienten mit Malignen Tumoren und mit Viruserkrankungen, *Hoppe-Seyler's Z. Pchysiol. Chem.* **360** (1979) 1957 – 1960
- [44] D. Solichová, B. Melichar, M. Klejna, B. Jurašková, V. Bláha, P. Žďárský, Z. Zadák, Stanovení neopterinu v moči u gerontologických pacientů, *Česká geriatrická revue*, **2** (2003) 6
- [45] J. Tomandl, PTERINY, *Chem. Listy* **92** (1998) 689 – 690
- [46] G. Baier-Bitterlich, D. Fuchs, H. Wachter: Chronic immune stimulation, oxidative stres and apoptosis in HIV infection. *Biochem Pharmacol* **53** (1997) 755 – 763
- [47] W. Schobersberger, G. Hoffmann, J. Grote, H. Wachter, D. Fuchs: *FEBS Lett.* **377** (1995) 461
- [48] H. Mori, T. Arai, K. Mori, T. Suzuki, K. Makino: *Biochem. Mol. Biol. Int.* **40** (1996) 799
- [49] R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, Harperova Biochemie, H+H, Česká Republika, 2002.
- [50] K. Daňová, Neopterin a jeho klinický význam, *LEK OBZOR*, **47** (1998) 117
- [51] E. R. Werner et. al, Determonation of neopterin in serum and urine. *Clin. Chem.* **33** (1987) 62 – 66
- [52] T. Nagatsu et. al, Radioimmunoassay for neopterin in body fluids and tissues. *Anal. M Biochem* **141** (1984) 472
- [53] C. Carru et. al, *Biomed. Chromatogr.* **18** (2004) 360 - 366
- [54] M. Hibiya et. al, *Journal of Chromatography B*, **691** (1997) 223 – 227

- [55] M. Pocar et. al, *Journal of Chromatography A*, **724** (1996) 193 – 197
- [56] I. D. Merás, *Analytical Biochemistry*, **346** (2005) 201 – 209
- [57] D. Soclichová et. al, *Talanta* **60** (2003) 459 – 465

