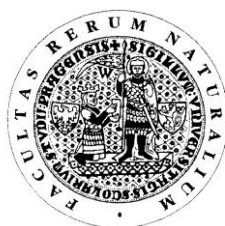


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie v přírodních vědách



Martin Vít

**Stanovení vybraných léčiv tandemovou hmotnostní
spektrometrií**

Determination of selected drugs using tandem mass-
spectrometry

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.

Praha 2012

Prohlášení

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

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

V Praze dne 28. května 2012.

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat svému vedoucímu školiteli doc. RNDr. Ivanu Jelínkovi, CSc. za cenné rady, konzultace a že mi umožnil vypracovat bakalářskou práci ve zdravotním zařízení CEPHA s.r.o. se souhlasem jednatele firmy RNDr. Ladislava Víta, čímž mu tímto také děkuji. Experimentální část bakalářské práce byla provedena v bioanalytické laboratoři. Rád bych také poděkoval vedoucímu laboratoře Dipl. Ing. Bohdanu Němcovi za poskytnutí cenných rad a konzultaci výsledků. Dále bych rád poděkoval Mgr. Petru Fejtovi za pomoc při uvedení do problematiky jak zacházet s tandemovým hmotnostním spektrometrem a softwarem Mass Lynx. Obzvláště bych poděkoval RNDr. Václavu-Bořkovi Dohálskému, za rady a čas strávený při vývoji metod pro stanovení Ibuprofenu a Atorvastatinu v lidské K₃EDTA plazmě.

Obsah práce

Úvod.....	7
1. Teoretická část.....	9
1.1. Základní veličiny charakterizující separaci.....	9
1.2. Stacionární fáze.....	13
1.3. Mobilní fáze.....	17
1.4. Kapalinová chromatografie.....	18
1.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	21
1.5.1 Schématické zapojení.....	21
1.5.2 Chemicko-fyzikální vlastnosti.....	26
1.6. Hmotnostní spektrometrie.....	30
1.6.1 Iontové zdroje.....	31
1.6.2 Iontové separátory.....	35
1.6.3 Detektory.....	41
1.7. Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	43
1.7.1 Iontové separátory.....	43
1.7.2 Kolizní cely a fragmentace iontů.....	47
2. Experimentální část.....	49
2.1. Stanovení IBUPROFENU a Atorvastatinu s metabolitem 2-Hydroxy Atorvastatinu v lidské K ₃ EDTA plazmě.....	49
2.1.1 Úvod.....	49
2.1.2 Chemické vlastnosti Ibuprofenu a Ketoprofenu.....	51
2.1.3 Chemické vlastnosti Atorvastatinu, 2-Hydroxy Atorvastatinu a kyseliny Simvastatinu.....	52
2.1.4 Použité chemikálie, laboratorní nádobí a technická zařízení.....	54
2.1.5 Příprava roztoků rozpouštědel, mobilní fáze, extrakčních činidel a kalibračních standardů Ibuprofenu a Ketoprofenu.....	56
2.1.6 Příprava roztoků rozpouštědel, mobilní fáze, extrakčních činidel a kalibračních standardů Atorvastatinu, 2-Hydroxy atorvastatinu a kyseliny Simvastatinu.....	58
2.1.7 Příprava biologických standardů v lidské K ₃ EDTA plazmě Ibuprofenu.....	61

2.1.8 Příprava biologických standardů Atorvastatinu a 2-Hydroxy Atorvastatinu v lidské K ₃ EDTA plazmě.....	61
2.1.9 Pracovní postup přípravy a měření biologických standardů v lidské K ₃ EDTA plazmě Ibuprofenu a Atorvastatinu s metabolitem 2-Hydroxy Atorvastatinu s přidavkem I.S. na reverzně fázové HPLC-MS/MS.....	62
2.1.10 Výsledky a diskuse metody stanovení Ibuprofenu a Atorvastatinu s metabolitem 2-Hydroxy Atorvastatinu v lidské K ₃ EDTA plazmě s přidavkem I.S.....	64
2.1.10.1 Optimalizace MS/MS pro Ibuprofen.....	64
2.1.10.2 Optimalizace HPLC pro Ibuprofen.....	65
2.1.10.3.a Naměřená hmotnostní spektra Ibuprofenu a Ketoprofenu....	66
2.1.10.3.b Vyhodnocení hmotnostních spekter Ibuprofenu a Ketoprofenu	67
2.1.10.4.a Naměřené chromatogramy Ibuprofenu a Ketoprofenu v lidské K ₃ EDTA plazmě.....	69
2.1.10.4.b Vyhodnocení chromatografických píků Ibuprofenu a Ketoprofenu... ..	70
2.1.10.5.a Výsledky ve vodné fázi pro Ibuprofen.....	70
2.1.10.5.b Vyhodnocení výsledků a kalibrační závislosti ve vodné fázi pro Ibuprofen.....	72
2.1.10.6.a Výsledky kalibrační závislosti v lidské K ₃ EDTA plazmě pro Ibuprofen a Ketoprofen.....	72
2.1.10.6.b Vyhodnocení kalibrační závislosti v lidské K ₃ EDTA plazmě pro Ibuprofen a Ketoprofen.....	75
2.1.10.7 Optimalizace MS/MS pro Atorvastatin a 2-Hydroxy Atorvastatin.....	76
2.1.10.8 Optimalizace HPLC pro Atorvastatin a 2-Hydroxy Atorvastatin.....	77
2.1.10.9.a Naměřená hmotnostní spektra Atorvastatinu, 2-Hydroxy Atorvastatinu a kyseliny Simvastatinu.....	78
2.1.10.9.b Vyhodnocení hmotnostních spekter Atorvastatinu s metabolitem 2-Hydroxy Atorvastatinu a kyseliny Simvastatinu.....	81

2.1.10.10.a	Naměřené chromatogramy Atorvastatinu, 2-Hydroxy Atorvastatinu a kyseliny Simvastatinu.....	82
2.1.10.10.b	Vyhodnocení chromatografických píků Atorvastatinu s 2-Hydroxy Atorvastatinem a I.S.....	84
2.2.10.11.a	Výsledky ve vodné fázi pro Atorvastatin.....	84
2.1.10.11.b	Vyhodnocení výsledků a kalibrační závislosti ve vodné fázi pro Atorvastatin a 2-Hydroxy Atorvastatin.....	85
2.1.10.12.a	Výsledky kalibrační závislosti v lidské K3EDTA plazmě pro Atorvastatin s 2-Hydroxy Atorvastatinem a kyselinou Simvastatinu....	86
2.1.10.12.b	Vyhodnocení kalibrační závislosti v lidské K3EDTA plazmě pro Atorvastatin s 2-Hydroxy Atorvastatinem a kyselinou Simvastatinu.....	90
3.	Závěr.....	92
3.1.1	Seznam použitých zkratk.....	93
3.2.2	Seznam použité literatury a internetových odkazů.....	94

Úvod

Standard lidské plazmy s přidavkem K_3EDTA nebo Na_2EDTA , které můžeme vyjádřit chemickými názvy jako tridraselná sůl nebo disodná sůl kyseliny ethylendiaminetetraoctové ve světové farmacii známé z anglického názvosloví Ethylenediaminetetraacetic Acid Tripotassium Salt or Disodium Salt, se dnes hojně využívá ve farmaceutických firmách pro stanovení koncentrace v různých chemických látek jako například lécích, což jsou z chemického hlediska organické sloučeniny a to směsi karboxylových kyselin, alifatických uhlovodíků, aromatických uhlovodíků, heteroatomů jako například síry, aminosloučeniny a dalších. K_3EDTA a Na_2EDTA se do lidské krve přidávají jako antikoagulační činidla¹, které zamezují nežádoucí srážení lidské krve. Do odebrané krve od dobrovolníka se přidávají zmíněná antikoagulační činidla a následně se krev centrifuguje, čímž se oddělí lidská plazma od krve.

Kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem, známé též jako HPLC-MS a tato zkratka je z anglického termínu High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry nebo pouze používané také pod zkráceným názvem LC-MS, fungující na bázi stanovení poměru velikosti náboje a hmotnosti látky. Další velmi často využívanou a zároveň velmi dostupnou detekční technologií je plynová chromatografie GC-MS. Obě tyto fyzikálně-chemické metody se dnes používají v analytické chemii jako velmi běžné zařízení pro stanovení široké škály chemických sloučenin. Toto rozmanité využití obou metod jim zabezpečuje vysoká rozlišovací schopnost chemických látek, možnost stanovení velmi malých množství analytu u hmotnostní spektrometrie až v jednotkách nanogramů na mililitr rozpouštědla.

Stanovení těchto chemických látek a v mém případě stanovení léků Ibuprofenu a Atorvastatinu probíhá v analytických a bioanalytických laboratořích. V těchto laboratořích musí být dodržována celá řada úředních předpisů a vyhlášek, jak pro bezpečnost, tak pro splnění regulí Evropské unie. Léčiva jsou podávána dobrovolníkům, kteří též musí projít řadou testů a vyšetření jako například zda-li neužívají návykové látky pod nimiž jsou považovány i kofein, tudíž dobrovolníci nemohou pít před a během studie čaje a kávu, požívat různé drogy, pod kterými si můžeme představit i například alkoholické látky. Dobrovolníci musí také splňovat normy pro BMI z anglického Body Mass Index, což se vztahuje k ideálnímu poměru mezi výškou a váhou. Dalším předpokladem k pozitivnímu přijetí jsou metabolické testy jako například pro měření tlaku krve-systolického a

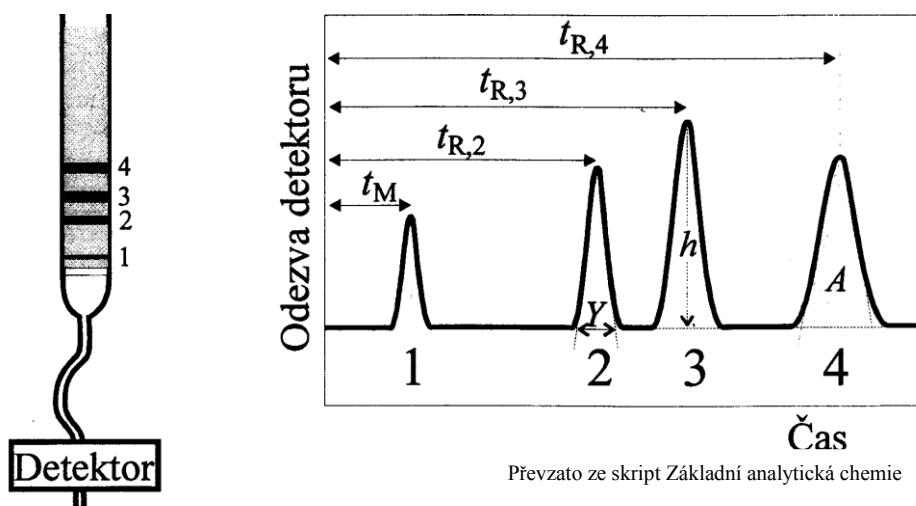
diastolického, tepové frekvenci, jaterní, ledvinové testy anebo zda-li dobrovolník netrpí cukrovkou či vrozenými metabolickými anomáliemi. Zároveň studie na daný lék bývají různého typu, záleží především, na které léčivo je vytvářena. Tím pádem mohou být přijeti dobrovolníci, kteří například trpí Alzheimerovou chorobou, jelikož testovaná léčiva, která by byla podána jedincům bez této nemoci, by mohlo vést k fatálním následkům.

1. Teoretická část

V teoretické části se nejdříve budu zabývat popisem základních parametrů udávajících separační schopnosti kolonové chromatografie, na jejímž základě se odvíjí fungování vysokoúčinnosti kapalinová chromatografie. Následně se zmíním o principech fungování hmotnostního spektrometru a poté nato navážu a objasním tandemový hmotnostní spektrometr.

1.1 Základní veličiny charakterizující separaci

Základním zdrojem kvalitativní a kvantitativní informace o separovaných složkách v analytu v kolonové chromatografii, jež je spojena s detektorem, je chromatogram. Chromatogram vyjadřuje grafické znázornění odezvy příslušné studované chemické látky na chromatografické koloně vztažené k času. Odezva je přímo úměrná koncentraci separované chemické látky. Výsledek naměřených odezev je zaznamenán ve formě chromatografických píků, které vyjadřují, jak moc byly zóny separovaných složek analytu v průběhu měření zachycovány, rozmývány v separačním prostoru. Ideální tvar chromatografického píku představuje Gaussovská křivka. Podrobně se o této problematice zmíním v oddíle 1.5.2. Obrázek č. 1 ztvárňuje průchod čtyř složek analytu, zároveň vyjadřující různý záchyt složek stacionární fází a tím i rychlost průchodu chromatografickou kolonou. Z chromatogramu můžeme následně určit základní veličiny charakterizující kvalitativní a kvantitativní popis analytu.



Převzato ze skript Základní analytická chemie

Obrázek č. 1: Chromatogram.

První chromatografický pík označuje tzv. mrtvý čas kolony t_M . Mrtvý čas separační kolony vyjadřuje časový interval potřebný k zachycení maximální koncentrace složky, která není zachycena v separačním prostoru stacionární fázi a tím její rychlost průtoku se shoduje s rychlostí průtoku mobilní fáze. Je vidět, že tato složka analytu prochází chromatografickou kolonou nejrychleji a proto bude na chromatogramu vůči ostatním složkám zachycena nejdříve. Chromatografické píky 2 až 4 vyjadřují složky analytu, které jsou již zachyceny v separačním prostoru na stacionární fázi a to různou mírou, která je především ovlivněna velikostí molekul jednotlivých molekul. Čas záchytu složek je nazýván retenční čas t_R . Opět představuje časový interval potřebný k zachycení maximální koncentrace složky, která je zachycena v separačním prostoru na stacionární fázi od nadávkování složky po její opuštění chromatografické kolony. Znamená to, že čím je retenční čas analytu delší, tím bude déle zadržován na koloně a naopak čím je kratší, tím rychleji opustí separační prostor. Z chromatogramu lze velikost této hodnoty odečíst jako vzdálenost maxima příslušného chromatografického píku od počátku záznamu tedy v čase nula.

Písmeno Y na obrázku č. 1 v případě 2 vyjadřuje šířku chromatografického píku. Hodnota se zpravidla měří při základní linii chromatogramu, kde vzestupná a sestupná část chromatografického píku je prodloužena tečnami pod základní linii a místě průsečíku se základní linií potom naměříme šířku píku. Tato šířka vyjadřuje, jak moc budou zóny separované složky analytu rozmývány v separačním prostoru. Čím tedy šířka píku bude menší, tím bude i rozmývání zón menší a naopak. Tuto hodnotu lze získat ještě v polovině výšky chromatografického píku jako hodnotu $Y_{1/2}$. Posledním možným způsobem, jak vyjádřit tuto veličinu je prostřednictvím časových jednotek odečtených z chromatogramu označovaných řeckým písmenem sigma $2\sigma^2$.

V případě píku 3 na obrázku č. 1 je charakterizována výška h chromatografického píku. Numerickou hodnotu výšky lze získat měřením od základní linie chromatogramu po inflexní bod píku. Tato výška vyjadřuje míru odezvy dané složky na detektoru.

V posledním případě píku 4 na obrázku č. 1 je vymezena plocha A chromatografického píku. Numerickou hodnotu plochy není jednoduché získat. Výpočet by se provedl integrací součtu tenkých ploch, které jsou na sebe naskládány jako dřevěné lamely od průsečíku základní linie s tečnami procházejících sestupnou a vzestupnou částí. V dnešní době je podstatně jednodušší výpočet zrealizovat prostřednictvím softwaru, který

integraci provede za nás během okamžiku. Výsledná hodnota šířky představuje koncentraci příslušné složky analytu. Experimentálně byl odvozen vztah (1) pro výpočet plochy píku:

$$1) A = 1,064 \cdot h \cdot Y_{1/2},$$

kde jednotka pro výšku h tak i pro šířku v polovině píku $Y_{1/2}$ je [mm].

Další veličiny charakterizují separační účinnost chromatografické kolony vycházející z teorie chromatografického patra. Tato teorie nám říká, že chromatografickou kolonu si můžeme představit jako sled na sebe navazujících teoretických pater. V každém tomto patře dochází ke kompletnímu separačnímu procesu mezi mobilní fází unášející složku analytu a stacionární fází. Složka analytu je zde navázána, nasorbována, následně opět desorbována do mobilní fáze a unášena ze separačního prostoru chromatografické kolony. Jedna z nich je veličina nazývaná se počet teoretických pater. Vztahy (2,3) vyjadřující počet teoretických pater jsou odvozeny z výše uvedených veličin:

$$2) n = \frac{t_{R,i}^2}{\sigma_i^2}$$

$$3) n = 16 \cdot \left(\frac{t_{R,i}}{Y_i} \right)^2,$$

kde $t_{R,i}^2$ představuje retenční čas složky i , σ_i je pološířka i -té složky chromatografického píku vztažena k časovým jednotkám a Y_i je šířka chromatografického píku, u kterého se protínají tečny vzestupné a sestupné části píku se základní linií. S rostoucím počtem teoretických pater zároveň roste i účinnost separačního procesu, jelikož látka se v průběhu průchodu chromatografickou kolonou vícekrát naváže do stacionární fáze.

Druhou veličinou charakterizující účinnost kolony, která vzájemně porovnává účinnost dvou různě dlouhých chromatografických kolon se nazývá výška teoretického patra H , jejíž numerickou hodnotu lze vyjádřit vztahem (4):

$$4) H = \frac{L}{n},$$

kde L představuje délku chromatografické kolony a n počet teoretických pater. Jak vidíme výška teoretického patra je nepřímo úměrná počtu teoretických pater, kde jak již bylo řečeno s rostoucí hodnotou teoretických pater roste účinnost separace, tím s menší hodnotou výšky teoretického patra nebudou zóny separovaných složek tolik rozmývány a jako výsledek budou užší chromatografické píky.

Z těchto základních veličin charakterizujících kvalitativní a kvantitativní informace o separovaných složkách a účinnosti, lze získat další odvozené veličiny upřesňující parametry chromatografické kolony.

První touto veličinou je reteční faktor k , vyjadřující velikost rychlosti, kterou analyt prochází separačním prostorem chromatografické kolony. Je definován vztahem (5):

$$5) k = \frac{t_{R,i} - t_{M,i}}{t_{M,i}} = \frac{t'_{R,i}}{t_{M,i}},$$

kde $t_{R,i}$ je retenční čas i -té složky a $t_{M,i}$ je mrtvý čas i -té složky a dále jsem zavedl dílčím vztahem $t'_{R,i} = t_{R,i} - t_{M,i}$ redukovaný retenční čas $t'_{R,i}$.

Další veličinou je rozlišení R_S , které je vždy spjato ke dvěma složkám analytu. Toto rozlišení nám udává stupeň rozdělení dvou příslušných složek analytu. Tyto látky, jež by byly detegovány na chromatogramu, můžeme považovat za zcela navzájem oddělené, pokud by numerická hodnota rozlišení dosahovala minimální hodnoty 1,5. Byla-li by tato hodnota nižší, chromatografické píky obou složek by se vzájemně překrývaly a to tím více, čím by hodnota byla nižší, jak znázorňuje obrázek č. 2. Rozlišení je definováno vztahem (6):

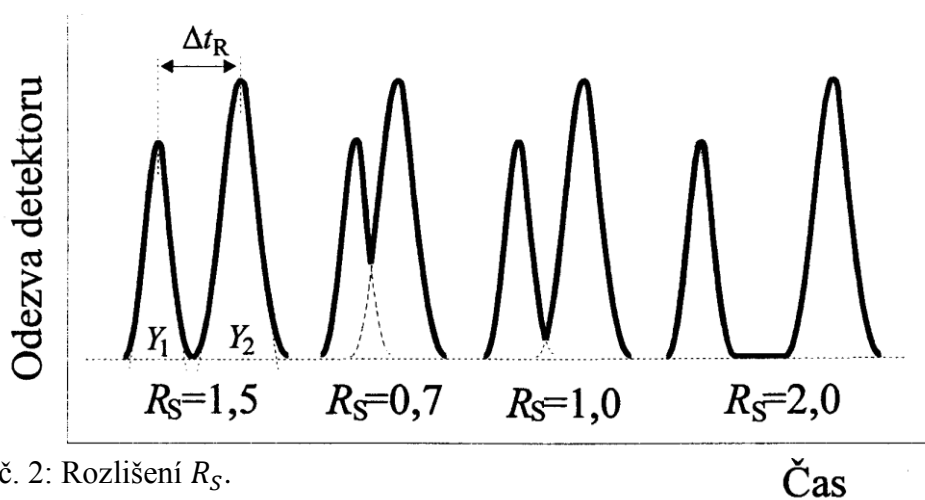
$$6) R_S = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5 \cdot (Y_2 - Y_1)},$$

kde $t_{R,2}$ a $t_{R,1}$ jsou retenční časy složky 2 a 1 analytu a Y_2 s Y_1 jsou příslušné šířky odpovídajícím složkám analytu.

Poslední touto dílčí veličinou je separační faktor α , vyjadřuje míru separačních schopností chromatografické kolony a je definován vztahem (7):

$$7) \alpha = \frac{t'_{R,2}}{t'_{R,1}},$$

kde $t'_{R,2}$ a $t'_{R,1}$ jsou redukované retenční časy separovaných složek 2 a 1 z analytu.



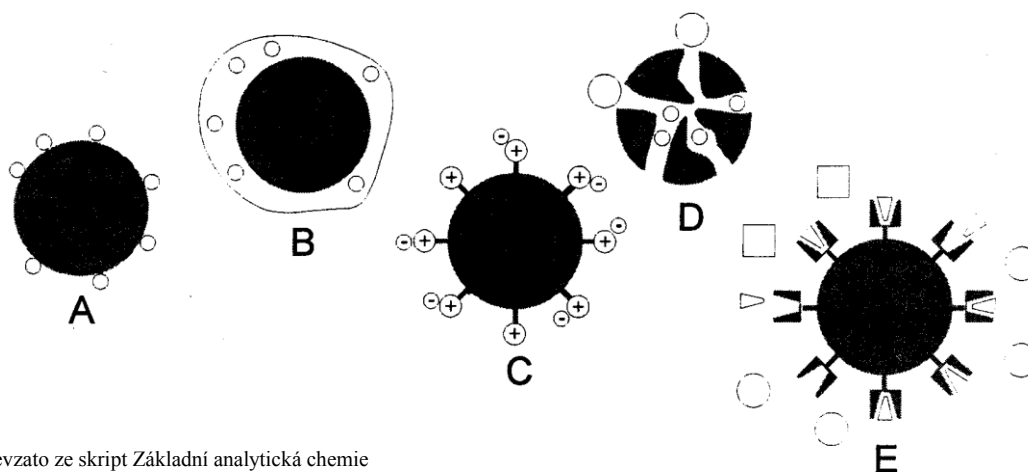
Obrázek č. 2: Rozlišení R_S .

1.2 Stacionární fáze

Před tím než začnu vysvětlovat, jak fungují jednotlivé typy kapalinových chromatografií, bude nutné vysvětlit základní pojmy týkající se této problematiky. Základem je tedy chromatografická kolona, která může být skleněná či kovová. Průměry těchto kolon bývají různé od 5mm do 50mm s délkou od 5cm do 1m. Kolona je naplněna stacionární fází, což je pevná složka kolony, na jejíž rozměrech a typu závisí účinnost a rozdělovací schopnosti kolony. Stacionární fáze nám zároveň rozdělují jednotlivé typy kapalinových kolonových chromatografických technik.

Základní typy chromatografických stacionárních fází s naznačeným typem interakcí jsou uvedeny na obrázku č. 3. Nejčastější a zároveň nejjednodušší uspořádání tvoří částice z pevného materiálu, na který se analyt naváže adsorpcí, jak se patrně z obrázku č. 3-A. Rozměry částic se pohybují řádově v jednotkách až stovkách mikrometrů. Kapalinová chromatografie využívající tento typ stacionární fáze je nazývána jako Kapalinová adsorpční chromatografie, známé pod zkratkou LSC. V mém případě, kdy stanovuji koncentraci a strukturu léčiv, mateřských iontů je zcela zásadní stanovit, zda příslušné léčivo má polární či nepolární charakter a podle toho musíme přizpůsobit i stacionární fázi. Pro polární látky³ je charakteristické, že ve své struktuře obsahují minimálně jednu polární až vazbu. Na polárních vazbách je charakteristické, že je realizována mezi dvěma vazebnými partnery s rozdílem elektronegativit kolem jedné. Tato vazba je nesměrového charakteru a je zrealizována prostřednictvím lokalizovaných nábojů na vazebných partnerech. Znamená to, že ke zmíněné polární sloučenině je nutné též vybrat stacionární fázi s polárním charakterem. Platí zde pravidlo, že s polární sloučeninou interaguje výhradně s polární pevnou fází a naopak s nepolární sloučeninou pouze s nepolární pevnou fází. To jsou například vazby v karboxylové funkční skupině COOH mezi kyslíkem a vodíkem. Polární stacionární fáze jsou označovány například jako dC18 a naopak nepolární jako dC8. Toto značení vyjadřuje jak dlouhé uhlovodíkové řetězce příslušná kolona obsahuje, v případě dC18 to je tedy soubor uhlovodíkových skeletů s 18 uhlíkovými atomy. To, zda-li je příslušná kolona polární či nepolární je dáno adsorbentem obsaženým v koloně. Silně polární prostředí vytváří silikagel, který obsahuje hydratované molekuly oxidu křemičitého SiO₂, které jsou na povrchu značně kyselé a zároveň velmi zpomalují bazické sloučeniny. Dalším sorbenem je alumina nebo-li oxid hlinitý Al₂O₃, který naopak na svém povrchu nese hydroxylové skupiny a tím je bazický, zvyšuje retenci

kyselých sloučenin. Posledním polárním používaným sorbentem je florisil, což je křemičitan hořečnatý $MgCO_3$. Pro nepolární prostředí se výhradně využívá aktivní uhlí⁴.



Převzato ze skript Základní analytická chemie

Obrázek č. 3: Základní typy chromatografických stacionárních fází: A-pevná fáze, B-kapalná fáze, C-iontoměnič, D-mikroporézní fáze, E-strukturně selektivní fáze.

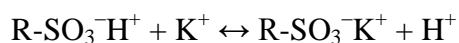
Dalším typem, který je znázorněn na obrázku 3 B, kdy mohou pevné částice mít okolo svého povrchu navázanou vrstvu filmu. Analyt, který interaguje s tímto typem stacionární fáze je absorbován a následně rozpouštěn do tohoto filmu. Bude se tedy ustavovat rozdělovací rovnováha mezi kapalným filmem stacionární fáze a protékající mobilní fází, již je analyt prostorem kolony unášen. Rozdělovací rovnováha obecně vyjadřuje míru interakce stanované látky, jež je unášena separačním prostorem se stacionární fází. Tato rozdělovací rovnováha je charakterizována veličinou K_D nazývané jako distribuční poměr, který je vyjádřen vztahem (8):

$$8) K_D = \frac{[X]_s}{[X]_m},$$

kde $[X]_s$ je molární koncentrace složky X zachycené ve stacionární fází a $[X]_m$ je molární koncentrace složky X v mobilní fází. Hodnota distribučního poměru nám říká, jak příslušná složka X bude zachycována a bržděna separačním prostorem kolony. Čím tedy bude hodnota distribučního poměru vyšší, tím bude koncentrace složky $[X]_m$ v mobilní fází bude menší a bude více interagovat se stacionární fází. Složka X bude tím pádem více bržděna separačním prostorem a míra tohoto brždění bude dána vazebnými interakcemi složky X mezi kapalnou a stacionární fází. Zároveň separační prostor bude opouštět pomaleji a její čas vyloučení z chromatografické kolony se navýší. Pokud by se v analytu nacházelo více stanovaných složek, tak každá ze složek bude mít svou charakteristickou

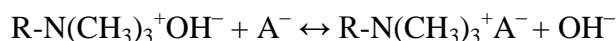
hodnotu distribučního poměru, která bude záviset na molekulové hmotnosti složky, na typu stacionární fáze, především na rozměrech stacionární fáze a také na složení mobilní fáze. Jestliže by obě stanovované složky měly stejnou hodnotu distribučního faktoru, došlo by k tomu, že obě látky není možné od sebe oddělit v separačním prostoru. Naopak, pokud by každá ze složek dosahovala jiné hodnoty distribučního faktoru, pak každá ze složek bude procházet separačním prostorem jinou rychlostí a bylo by možné každou zachytit. Kapalinová chromatografie využívající tento typ stacionární fáze se nazývá Kapalinová rozdělovací chromatografie, kterou též můžeme znát pod zkratkou LLC.

Na obrázku 3 C je stacionární fáze, která na svém povrchu má nasyntetizované funkční skupiny nesoucí buď záporný, anebo kladný náboj, což je princip iontoměničů nebo spíše nazývané používanějším termínem ionexy. Ionexy jsou obecně ve vodě nerozpustné vysokomolekulární látky na bázi styrenu nebo polyakrylátu, které ve vodných roztocích mají tu vlastnost, že dokáží vyměňovat ionty ze svého povrchu za ionty, které jsou v roztoku, jež protéká přes ionex. Skládá se z části hydrofobní, která je tvořena uhlíkovým skeletem a to zejména sesíťovaným polymerem divinylbenzenu⁵. Koncentrací divinylbenzenu je určena selektivnost a bobtnavost ionexu. Druhá část je tvořena hydrofilními funkčními skupinami, která zajišťují výměnu iontů mezi roztokem a ionexem. Navázané funkční skupiny mohou být kyselé nebo zásadité. Jak kyselé tak zásadité funkční skupiny rozdělujeme na silné či slabé funkční skupiny. Mezi silné kyselé funkční skupiny řadíme hydrogensířičitan $-\text{SO}_3\text{H}$, která v roztoku disociuje na sířičitanovou skupinu $-\text{SO}_3^-$. Z toho je patrné, že je nosičem záporného iontu a aby došlo k interakci s analytem, musí analyt být nosičem protiontu, tedy nést kladný náboj. Tato funkční skupina disociuje při všech hodnotách pH. Do slabých kyselých skupin spadá karboxylová funkční skupina $-\text{COOH}$, která opět disociuje na $-\text{COO}^-$. Tato skupina disociuje pouze v neutrálním a slabě bazickém prostředí. Tyto ionexy souhrnně nazýváme jako měniče kationtů nebo-li katexy. Pokud chceme analyt na katexu zachytit, je nutné nejdříve výše zmíněné funkční skupiny převést například do vodíkového cyklu, to znamená že protiontem je zde H^+ ion. Toho docílíme, když katex propláchneme například kyselinou chlorovodíkovou, ze které se uvolní zmíněné H^+ ionty na příslušnou kyselou skupinu. Principiálně můžeme funkci katexu vyjádřit následující rovnicí:



Mezi silné bazické funkční skupiny řadíme kvartérní amoniové soli $-\text{NR}^{4+}$, na které jsou navázány především methylové skupiny $-\text{CH}_3$ ve výslednou funkční trimethylaminovou

skupinu $-N(CH_3)_3^+$. Zcela analogicky pokud bychom chtěli, aby se analyt navázal k této skupině musel by nést kladný náboj. Tato skupina je schopna disociace při všech hodnotách pH. Do slabých bazických skupin poté řadíme amoniakální funkční skupiny $-NH_3^+$. Tyto skupiny jsou schopné disociovat v neutrálním a slabě bazickém prostředí. Tyto ionexy souhrnně nazýváme jako měniče aniontů nebo-li anexy. Pokud chceme analyt na anexu zachytit, je nutné nejdříve výše zmíněné funkční skupiny převést například do v hydroxilového cyklu, to znamená že protiontem je zde OH^- ion. Toho bychom docílili, když anex propláchneme vhodným hydroxidem například hydroxidem sodným, ze kterého se uvolní příslušné OH^- ionty na příslušnou bazickou skupinu. Funkci anexu můžeme vyjádřit pomocí následující rovnice:



Důležité je co tyto rovnice vyjadřují. Jde o rovnovážný proces výměny iontů mezi ionexem a příslušnými zachycovanými ionty. To znamená, že pokud bychom navýšili koncentraci iontů, které se původně uvolňovaly z ionexu, pak by rovnice probíhala v opačném směru, tedy zprava doleva, a tím by se ionex začal regenerovat do svého původního cyklu. Tento typ kapalinové chromatografie je nazýván jako Iontově výměnná chromatografie, též známa pod zkratkou IEC.

Další typ stacionární fáze je na obrázku č. 3 D. Pevné částice mají ve svém objemu dutiny, či kanálky, kterými podle rozměrů stanovovaných látek mohou být zachycovány, anebo je obtékat bez zachycení. Je logické, že molekuly převyšující svými rozměry rozměry kanálků částic nebudou jimi zachycovány a separačním prostorem projdou rychleji bez zachycení. Naopak molekuly, které se velikostně vejdu do kanálků stacionární fáze, se zpomalují a tím jsou rozdělovány od ostatních látek v analytu. Tento jev je označován jako zachycování molekul prostřednictvím síťovacího efektu. Tyto molekuly jsou tedy zachyceny ve stacionární fázi, tím získají jinou hodnotu distribučního koeficientu oproti obtékajícím molekulám a je potom možné jednotlivé molekuly od sebe navzájem stanovit. Rozměry kanálků uvnitř pevných částic mohou být různě veliké a podle potřeby můžeme ovlivňovat záchyt jednotlivých molekul. Kapalinová chromatografie využívající tento typ stacionární fáze je nazývána Gelová permeační chromatografie, kterou lze nalézt pod zkráceným názvem GPC nebo od síťovacího efektu jako SEC.

Posledním typem na obrázku č. 3 E je stacionární fáze fungující na základě specifické interakce s stanovovanou látkou. To znamená, že na stacionární fázi bude zachycena pouze taková složka analytu, která svými rozměry a zejména tvarem odpovídá

skulinkám na pevných částicích. Tento jev můžeme připodobnit k principu zámku, abychom otevřeli daný zámek, musí do něj zapadnout klíč příslušné velikosti a hlavně specifickým vykrojením, které zapadnou do západek zámku a následně je možné s ním pootočit. Kapalinová chromatografie fungující na tomto efektu je nazývána Afinitní chromatografie, pro níž literatura nemá příslušnou zkratku názvu.

1.3 Mobilní fáze

Vedle stacionární fáze se nachází v každé chromatografické koloně též mobilní fáze. Tato mobilní fáze představuje pohyblivou fázi unášející příslušnou stanovovanou látku separačním prostorem kolony. Mobilní fáze může být kapalná nebo plynná, záleží na tom pro jaký typ chromatografického zařízení ji používáme. V případě HPLC-MS se jedná tedy o kapalnou fázi. Stejně jako u stacionární fáze i mobilní fáze podléhá pravidlu polární látka k polární a nepolární k nepolární. Na základě polarity mezi mobilní a stacionární fází můžeme regulovat, jak jednotlivé chemické látky, které jsou obsažené v analytu, budou od sebe navzájem separovány. K tomu abychom získali mobilní fázi o příslušné polaritě je nutné si vytvořit specifický poměr rozpouštěděl obsažených ve výsledné mobilní fázi. Například voda je známé vysoce polární rozpouštědlo, dalším velmi dobrým ale ne tak silným polárním rozpouštědlem je acetonitril, naopak mezi nepolární rozpouštědla řadíme alkany s krátkým uhlovodíkovým skeletem asi do deseti atomů uhlíku, jak již bylo oddůvodněno v oddíle 1.2. Dalším skupinou chemických sloučenin patřících do nepolárních rozpouštědel jsou cykloalkany. Vhodnou volbou mobilní fáze můžeme též buď zkracovat, nebo prodlužovat retenční čas separované složky analytu. Mobilní fáze s větší polaritou dokáže zkrátit retenční čas a naopak mobilní fáze s menší polaritou, pak prodlouží retenční časy. Toto je velice důležitý jev, jelikož kdyby se v analytu nacházelo více složek, tak snížením polarity mobilní fáze bychom dosáhli prodloužení retenčního času a zároveň bychom tím získali lepší rozlišení daných složek, což je kvalitativní rozdělení odseparování složek zachycených na chromatogramu, kde jsou reprezentovány chromatografickými píky.

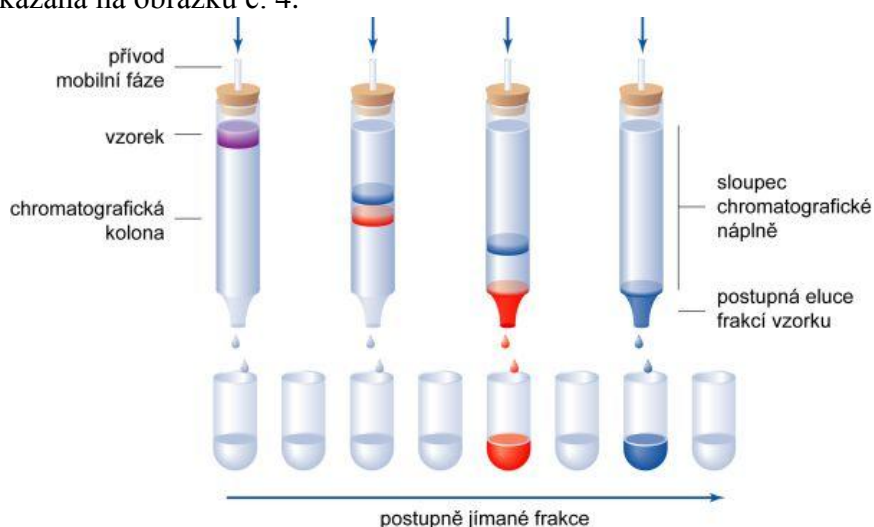
U sloupcové chromatografie se můžeme setkat s pojmem eluční činidlo, eluční roztok nebo eluent. Je to roztok, kterým promýváme kolonu během vlastního separačního

procesu za účelem, aby jednotlivé složky analytu byly vymyty z prostoru chromatografické kolony. Eluční roztok je tedy mobilní fází.

1.4 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie patří mezi separační analytické metody. V současné době rozdělujeme kapalinovou chromatografii na tři základní varianty a to podle toho jakých tlaků se dosahuje v prostoru dělicí kolóny. Velmi moderní metodou, jež se v poslední době využívá je kapilární kapalinová chromatografie. Poslední chromatografickou metodou, která není ovšem realizována prostřednictvím tlaku v chromatografické koloně je planární chromatografie.

V Nízkotlaké kolonové kapalinové chromatografii, též pouze nazývané jako kolová chromatografie nebo pouze jako LC. Tento typ kapalinové chromatografie vychází z úplně původního uspořádání kolony, kde eluční roztok protéká díky působení zemské přitažlivosti. Jejím objevitelem a strůjcem byl v roce 1903 ruský chemik a botanik Michail Semjonovič Cvět, který zároveň zavedl název chromatografie ze dvou řeckých slov vyjadřujících v překladu barva a psát. Jeho chromatografická kolona naplněná vápencem a směsí organických rozpouštěděl sloužila k dělení chloroplastových pigmentů z rostlinných extraktů. Technika nízkotlaké kolonové kapalinové chromatografie se používá pouze okrajově například k čištění směsí chemických látek. Realizace této chromatografické metody je ukázána na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: Nízkotlaká chromatografie.

Převzato z vydavatelství.vscht.cz

Vysokotlaká kolonová kapalinová chromatografie (správněji používaný název je vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je dnes dominantní chromatografickou metodou používanou v analytických laboratořích. Tohoto postavení ji zajišťuje vynikající dělicí schopnosti jednotlivých složek analytu a zároveň vynikající rozlišení analyzovaných složek v průběhu separačního procesu. Další výhodou této techniky je, že může být použita se všemi typy stacionárních fází, které již byly popsány v oddíle 1.2. Používá se zejména pro netěkavé kapalně vzorky. Více o této technologii si řekneme v oddíle 1.5, kde se podrobně zaměřím na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii HPLC.

Nejmodernějším typem kapalinové chromatografie současnosti je ultra či extrémně účinná kapalinová chromatografie U-HPLC⁶ z anglického termínu Ultra-High Performance Liquid Chromatography. Je to metoda u níž se pracuje s extrémně vysokými tlaky řádově tisíce barů, což má za následek ještě lepších separačních vlastností než u metody HPLC, zároveň rozlišení separovaných složek analytu je též vyšší a přitom se celkový proces analýzy zkrátí. Je to tím, že se používají kratší chromatografické kolony s menšími stacionární částicemi s rozměry menšími než 2 μ m.

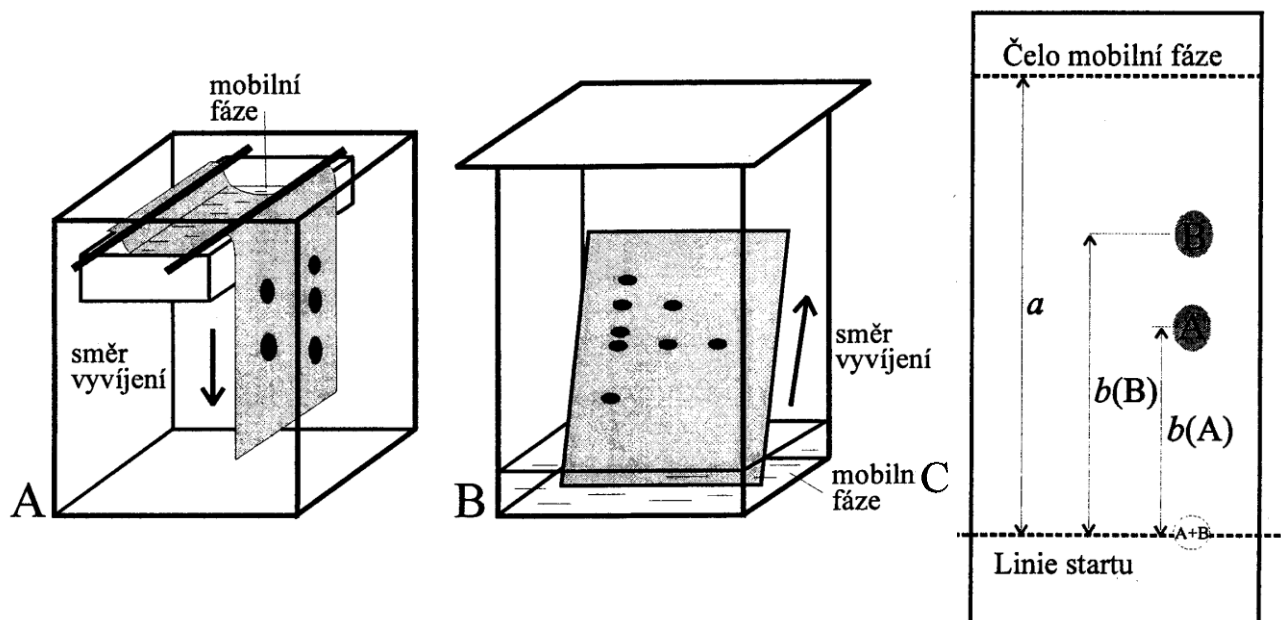
Další velice se rozvíjející metodou v současnosti je kapilární kapalinová chromatografie CLC⁷ z anglického termínu Capillary Liquid Chromatography. Tato technika kapalinové chromatografie využívá principů vysokoúčinné kapalinové chromatografie, kde jsou použity chromatografické kolony o velmi malých vnitřních průměrech, řádově menších než desítky milimetrů. Výhodou této technologie oproti HPLC je, že dosahuje stejných rozlišovacích a separačních schopností, ale při menších objemech použité mobilní fáze, čímž se stává ekonomičtější metodou.

Poslední zmiňovanou variantou kapalinové chromatografie je planární kapalinová chromatografie. Vzhledem k instrumentalizaci je tato metoda nejjednodušší svým složením a samotným zrealizováním. Je opět zvykem tuto metodu dělit podle použité stacionární fáze. První bych zmínil papírovou chromatografii PC z anglického Paper Chromatography. Jako stacionární fáze se v tomto případě používá kapalná fáze zachycená na filtrační papír, který je v této technice výhradně v sestupném uspořádání. Úplný název této techniky je papírová rozdělovací chromatografie. Druhým typem je tenkovrstvá chromatografie nebo také TLC z anglického Thin Layer Chromatography, která je naopak výhradně realizována ve vzestupném uspořádání a jako stacionární fáze se používá tenká hliníková destička pokryta sorbentem silikagelu či oxidu hlinitého. Opět úplný název je tenkovrstvá adsorpční chromatografie. Druhým typem je tenkovrstvá rozdělovací chromatografie u níž

stacionární fáze není pokryta sorbentem, ale kapalinou zachycenou na tenké vrstvě. V obou případech je celá aparatura uzavřena v nádobě, která je naplněna nasycenými parami mobilní fáze, aby nedocházelo k vysoušení mobilní fáze v aparatuře. Příslušný analyzovaný vzorek je rozpuštěn v těkavém rozpouštědle, to proto aby analyt mohl migrovat po stacionární fázi, která je ponořena do mobilní fáze a působením nasycených par mobilní fáze. Dávkování je realizováno prostřednictvím laboratorní mikrostříkačky, kde vzorek je nanesen na námi zvolenou linii startu na stacionární fázi. Výsledky posunu analyzovaného vzorku se porovnávají vůči standardům a zjišťujeme hodnotu retardačního faktoru R_F analytu, který je definován vztahem (9):

$$9) R_F = \frac{b}{a},$$

kde b je vzdálenost od počáteční linie startu ke středu skvrny analyzovaného vzorku a a je vzdálenost od počáteční linie k čelu mobilní fáze, což je vzdálenost, kterou mobilní fáze během procesu separace urazila po stacionární fázi. Aparatura PC a TLC chromatografie a vyhodnocení výsledků je zachycen na obrázku č. 5. PC lze využít pro stanovení souboru aminokyselin⁸, jejichž rozdělení je na základě molekulové hmotnosti. TLC se využívá v organické syntéze a k identifikaci toxických látek.



Převzato ze skript Základní analytická chemie

Obrázek č. 5: A-sestupné uspořádání aparatury u PC, B-vzestupné uspořádání aparatury u TLC, C-vyhodnocení výsledků na stacionární fázi.

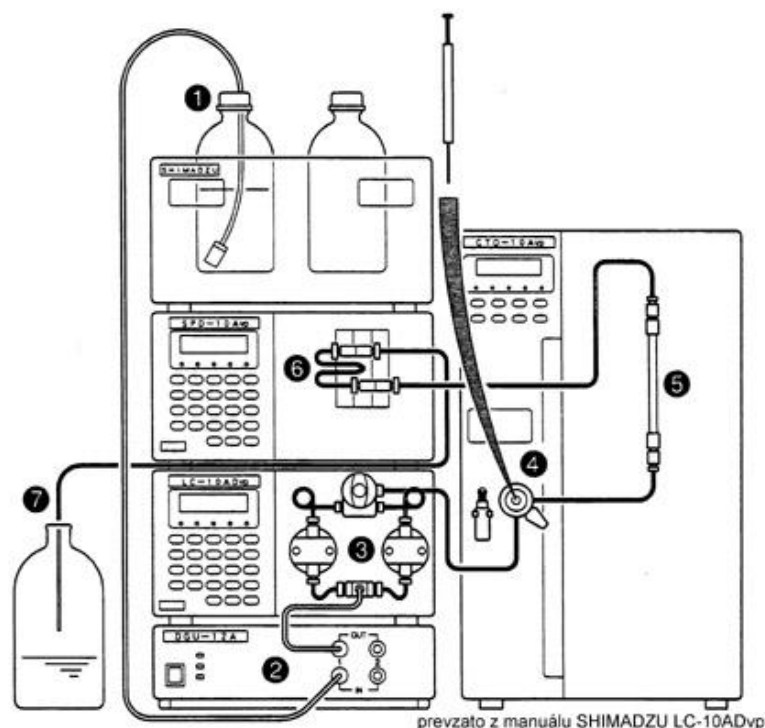
1.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie-HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je analytická metoda používaná v analytických laboratořích pro stanovení široké škály chemických látek. Oproti nízkotlaké kolonové chromatografii se v prostoru HPLC pracuje s velkými tlaky, řádově desítek až stovek baru. Díky velkému přetlaku je nutno provádět separaci ve speciálně přizpůsobených kolonách, které jsou naplněny vysoce homogenní stacionární fází s velmi malými částicemi. Vysoká homogenita stacionární fáze zapříčiňuje velký hydrodynamický odpor k mobilní fázi, jež je překonáván díky použitému velkému přetlaku.

1.5.1 Schématické zapojení

Zapojení jednotlivých částí vysokoučinné kapalinové chromatografie znázorňuje obrázek č. 6.

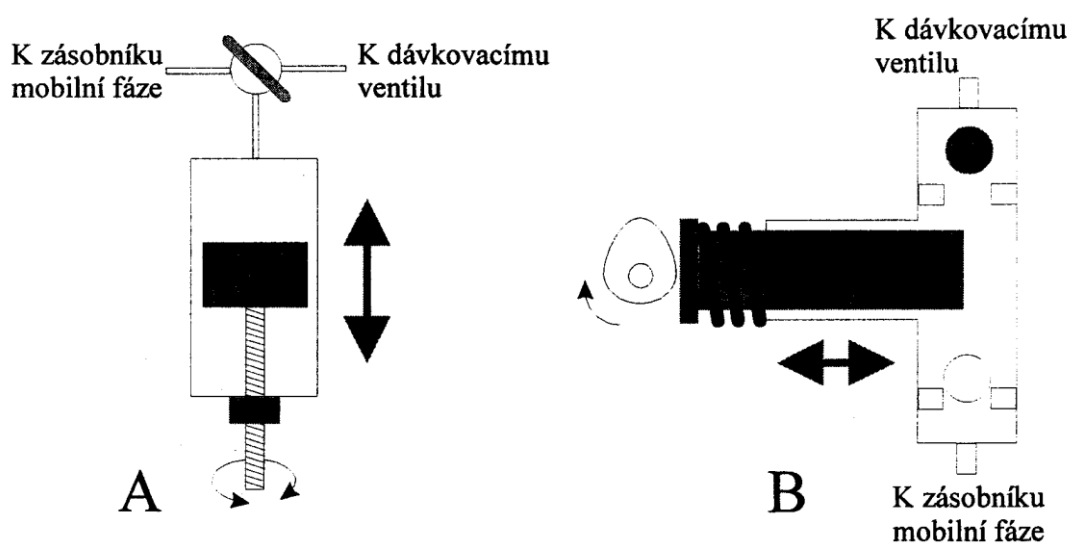
Blokové schéma HPLC



Obrázek č. 6: Schéma zapojení HPLC.

V dnešní době se využívá dvou základních typů vysokotlakých čerpadel. Prvním typem je lineární čerpadlo, jehož základní část tvoří válec o objemech řádově stovek mililitrů, na jehož dně je umístěn pohyblivý píst. Nejdříve je do tohoto válce zavedena směs mobilní fáze a po naplnění potřebného objemu válce se uzavře ventil, který odděluje prostor mezi přívodem mobilní fáze a šesticestného dávkovacího ventilu. Mobilní fáze je postupně stlačována pohyblivým pístem proti ventilu a po dosažení pracovního tlaku dojde k otevření ventilu a následnému vyvedení mobilní fáze z válce do další části HPLC tedy šesticestného dávkovacího ventilu. Rovnoměrný pohyb pístu je zprostředkován prostřednictvím krokového motoru, který otáčí pístem po závitech. Mezi výhody tohoto čerpadla patří plynulost provozu a tím absence nežádoucích rázů či pulzů. Nevýhodou je, že nelze v průběhu naplňování měnit mobilní fázi.

Druhým typem je reciproční čerpadlo, které je tvořeno nádobou tvaru písmena T, v němž jsou dva kuličkové ventily a posuvný píst, jež je umístěn z boku. Píst opět zaručuje dosažení pracovního tlaku mobilní fáze a kuličkové ventily zajišťují, aby mobilní fáze proudila v požadovaném směru od přívodu mobilní fáze k šesticestnému dávkovacímu ventilu. Výhodou tohoto zařízení je možnost měnit složení mobilní fáze v průběhu plnění. Nevýhodou je ovšem vytváření rázů a pulzů během stlačování mobilní fáze, které by mohly být teoreticky odstraněny při zařazení dalšího pístu, který by pracoval v opačném smyslu. Obě tato čerpadla jsou znázorněna na obrázku č. 7.

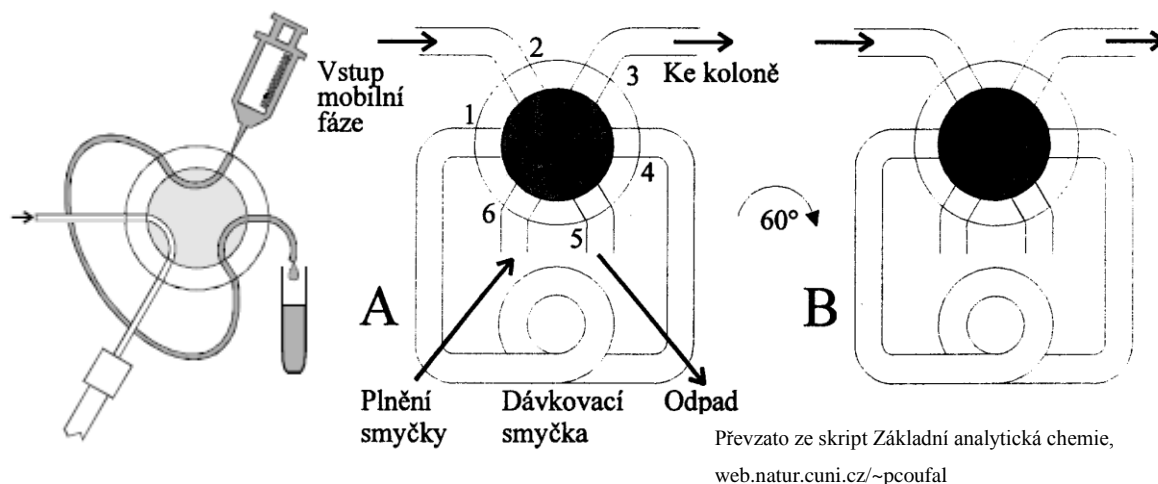


Převzato ze skript Základní analytická chemie

Obrázek č. 7: A-lineární čerpadlo, B-reciproční čerpadlo.

Může se stát že se čerpadlo a hadičky spojující jednotlivé komponenty zavzdušní. Mobilní fáze je ze zásobní lahve odčerpávána hadičkou, které je zakončena fritou. K zavzdušnění může dojít po delším používání chromatografické kolony a o to více, když jako mobilní fáze je použita voda, ve které je rozpuštěn kyslík. V tomto případě je čerpadlo zavzdušněno v malé míře a nijak zvlášť se to neprojeví na jeho funkci. Daleko častěji se stává, že při výměně zásobní lahve mobilní fáze dojde k nasátí vzduchu, když se nepozastaví čerpání mobilní fáze, anebo v zásobní lahvi nám dojde mobilní fáze a též se nasaje vzduch. V tomto případě již dochází k podstatnému ovlivnění funkce chromatografické kolony. Tento problém může odstranit odplyňovač, který sám odsaje vzduch, anebo u starších chromatografických kolon se otevře vývod z odplyňovače, čímž se částečně odvzdušní a pro důsledné odvzdušnění použijeme laboratorní stříkačku, kterou odsajeme mobilní fázi s podíly vzduchu.

Dále je mobilní fáze přiváděna do dávkovacího zařízení. U HPLC je dávkování vzorku kritické a to proto, že do separačního prostoru musí být přiváděno vždy konstantní množství analyzovaného vzorku. Při dávkování se nasaje do mikrostříkačky analyzovaný vzorek, která se nasadí na nástřikový port, kde se přednastaví požadovaný průtok analyzovaného vzorku. Průtok se pohybuje řádově v mikrolitrech za minutu. Zároveň nesmí dojít k výrazným výkyvům průtoku mobilní fáze, jež unáší takto nadávkovaný vzorek. K tomu se využívá šesticestného ventilu s dávkovací smyčkou. Již z názvu vypovídá, že tento ventil má šest různých vstupů, kde v obou cyklech jsou vždy dva propojeny hadičkou. V cyklu A, jak je patrné na obrázku č. 8 je vstupem číslo 6 plněna dávkovací smyčka o vnitřním objemu od 0,5 μ l do 2ml analyzovaným vzorkem od nástřikového portu. Pokud by došlo k navýšení objemu analyzovaného vzorku v prostoru dávkovací smyčky než je požadováno, dojde k vypuštění části vzorku z dávkovací smyčky vývodem pod číslem 5. Vstup č. 2 je vyveden od výše popsaných vysokotlakých čerpadel a vývod č. 3, jež představuje ústí ventilu, směřuje k separační koloně. Poté, co dojde k naplnění smyčky požadovaným množstvím analytu, se ventil pootočí o 60° ve směru hodinových ručiček do polohy B. V této poloze se uzavře přívod z nástřikového portu i odpadní vývod. Dojde k propojení dávkovací smyčky se vstupem od mobilní fáze, která začne unášet analyzovaný vzorek a ten je s mobilní fází veden k separační koloně.



Obrázek č. 8: Šesticestný dávkovací ventil s dávkovací smyčkou.

Takto nadávkovaný vzorek vstupuje do separační kolony. V důsledku působení velkého hydrodynamického odporu uvnitř separační kolony jsou zhotoveny buď z oceli, nebo ze skla o vnitřním průměru 3-6 milimetrů. Délka separačních kolon se pohybuje v rozmezí 10-300 centimetry. Separační kolony jsou naplněny vhodnou stacionární fází, nazývaným sorbentem o velikosti částic řádově 3-10 mikrometrů, které již byly popsány v oddíle 1.2.

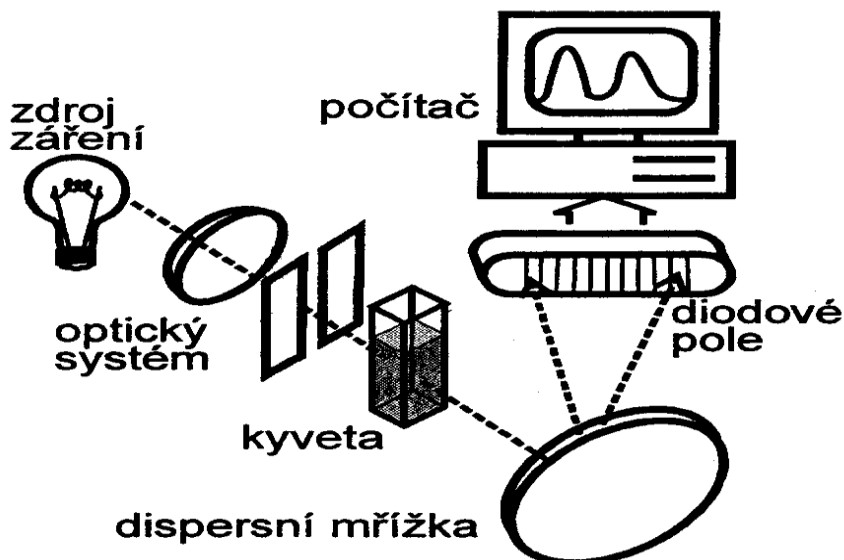
Zařízení, které zachycuje změny odezvy v průběhu analýzy a převádí je kvantitativně na elektrický signál se souhrnně nazývá detektor.

Velmi používaným detektorem je fotometrický detektor s diodovým polem, který zaznamenává změny světelného toku. Tento detektor je zobrazen na obrázku č. 9. Tyto změny jsou zaznamenávány ve formě absorpce světelného záření v intervalu vlnových délek od 190-800 nanometrů. Pro ultrafialovou oblast (190-350nm) se používá jako zdroj záření deuteriová výbojka⁹. Pro oblast viditelného záření VIS (350-800nm) se používá halogenová žárovka¹⁰. Základ tohoto detektoru tvoří průtočná měrná cela, též nazývaná kyveta, která bývá zhotovena z křemene, jelikož křemenné sklo nepohlcuje záření ani v UV oblasti, naproti tomu cely zhotovené ze skla pohlcují záření ve viditelné oblasti. Křemenné sklo je v tomto ohledu univerzální, ale oproti normálnímu sklu je podstatně dražší. Cely o vnitřním objemu 5-10 mikrolitru se napojují na výstup chromatografické kolony. Ze zdroje záření je vyzařován paprsek, který je zfokusován přes optickou štěrbinu a fokusační čočku. Takto zaostřený paprsek prochází přes kyvetu, ve které je paprsek zeslaben a rozptýlen a poté dopadá na dispersní mřížku, která rozkládá paprsek na svém povrchu podle vlnových délek. Například vlnové délky odpovídající červenému světlu

(760nm) budou vychylovány o menší úhel než vlnové délky delší odpovídající modrému světlu (500nm). Rozložené světlo je detegováno diodovým polem, na které tedy dopadá tok světla o určitých vlnových délkách, jež jsou zeslabeny absorpcí v měrné cele. Každá fotodioda absorbuje specifickou vlnovou délku a tím je možné jednorázově naměřit celé spektrum až do UV oblasti. Příslušné fotodiody jsou spojeny s kondenzátory, které jsou předem nabitý na určitou hodnotu napětí. Fotoelektrický proud vznikající po dopadu záření na diodu vybijí kondenzátor a následně se měří potřebný proud k opětovnému nabití kondenzátoru. Takto vzniklá elektrická odezva se následně vyhodnocuje na počítači za využití Lambert-Beerovova zákona (10):

$$10) A = \varepsilon \cdot c \cdot l,$$

Kde ε je molární absorpční koeficient v jednotkách [l / mol · cm], c je koncentrace analytu v [mol / l] a l je tloušťka absorbující vrstvy tedy kvivety v [cm].

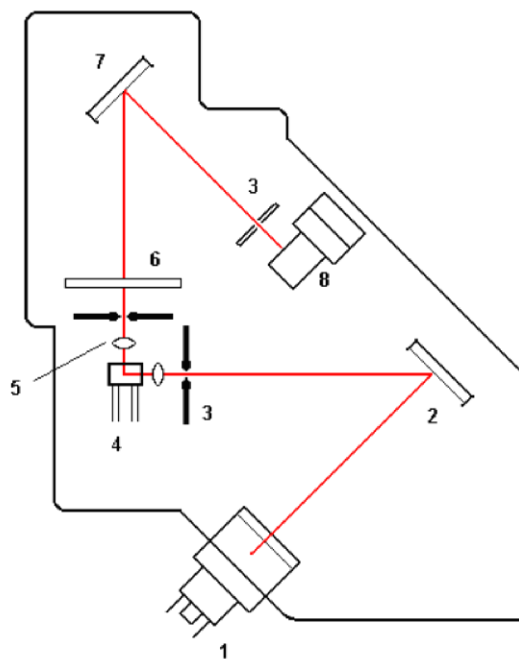


Obrázek č. 9: Fotometrický detektor s diodovým polem. Převzato ze skript Základní analytická chemie

Dalším využívaným detektorem je fluorimetrický detektor. Jeho schéma je uvedeno na obrázku č. 10 U tohoto detektoru se rozptýlené sekundární fluorescenční záření měří ve směru kolmém na dopadající záření. Jeho zdrojem jsou buď rtuťové, xenonové výbojky, anebo laser. Nejdříve analyt absorbuje vysoce monochromatické primární záření, čímž mu je dodáno množství energie potřebné k přechodu ze základního singletového elektronového stavu do energeticky vyššího excitovaného stavu. Zároveň s přechodem elektronových stavů dochází k přechodům vibračním a s přechody vibračními dochází k přechodům rotačním. Poté excitovaná molekula přechází z vyššího vibračního stavu do základního vibračního stavu a následně začne emitovat sekundární fluorescenční záření,

jehož energie odpovídá vlnové délce primárního absorbovaného záření. Vlnová délka sekundárního emitovaného záření ovšem zpravidla neodpovídá původnímu primárnímu záření, jelikož v průběhu přechodu z vyšších energeticky excitovaných hladin do původního stavu dochází k vibrační relaxaci molekuly. Tím pádem vlnové délky emitovaného záření budou delší a energie tohoto záření bude nižší. Projevem fluorescence je fotoluminiscence molekul, která řádově odpovídá 10^{-8} - 10^{-5} sekundy.

1. výbojka - rtuťová, xenonová nebo laser
2. monochromátor
3. optická štěrbin
4. průtočná měrná cela
5. mikro čočky
6. filtr
7. emisní mřížka - monochromátor
8. fotonásobič

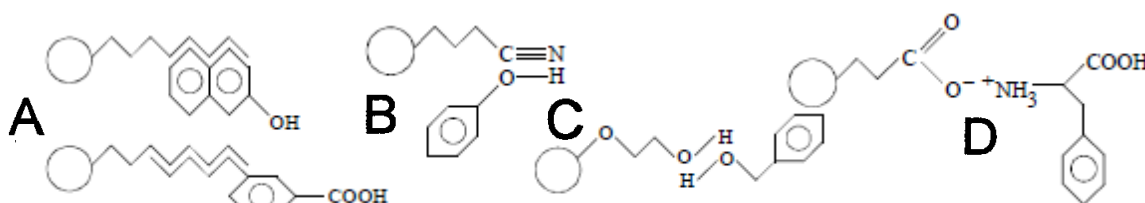


Obrázek č. 10: Fluorescenční detektor.

Převzato z hnlc.cz

1.5.2 Chemicko-fyzikální vlastnosti chromatografické kolony

Při popisu základních veličin a parametrů chromatografické kolony v oddíle 1.1 jsem zmínil základy fyzikálně-chemických vlastností ovlivňující průběh měření a zpracování výsledků z chromatogramu. Poté, co začne analyt být unášen do prostoru separační kolony naplněné stacionární fází, jsou složky vzorku různě zpomalovány. Začne se tedy ustavovat rozdělovací rovnováha mezi kapalnou a stacionární fází, jež je charakterizována prostřednictvím distribučního faktoru podle vztahu 8, jehož hodnota je charakteristická pro každou složku analytu. Na povrchu stacionární fáze může docházet k rozmanitým interakcím a velikost této interakce odpovídá brzdě síle stacionární fáze. Na obrázku č. 11 vidíme některé z typů těchto interakcí.

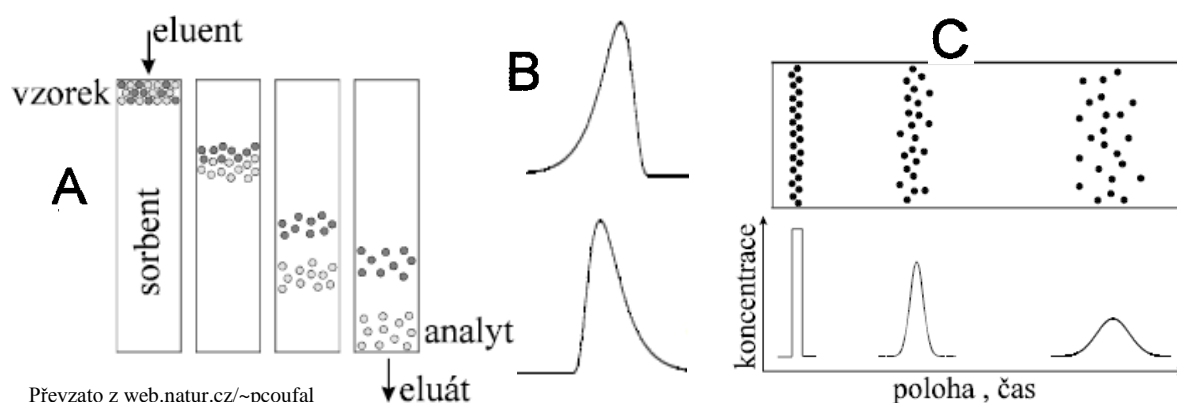


Převzato z web.natur.cz/~ncoufal

Obrázek č. 11: Typy interakcí mezi stacionární fází a analytem: A-Hydrofóbní interakce, B-interakce dipól-dipól, C-vodíková vazba, D- elektrostatické interakce.

Na obrázku 11 A je interakce zprostředkována prostřednictvím hydrofóbních částí dané molekuly, které jsou nejčastěji vytvářeny mezi uhlíkatými skelety dané molekuly. Na obrázku 11 B je interakce zejména mezi funkčními skupinami, které vytvářejí ať už krátkodobě nebo dlouhodobě dipólový moment. Na obrázku 11 C jsou interakce na základě vodíkových vazeb, které se uskutečňují mezi vodíkem a atomy, jež mají volné elektronové páry a jsou zároveň silně elektronegativní. Tím jsou schopny přetáhnout elektronovou hustotu vodíku k sobě a podhalit kladně nabitě jádro vodíku, což je místo kam zamíří volný elektronový pár elektronegativního atomu a vytvoří slabou vodíkovou vazbu. Poslední interakcí na obrázku 11 D je elektrostatická interakce, které je vytvářena prostřednictvím funkčních skupin, jež nesou kladný nebo záporný náboj. Funkční skupiny s opačným nábojem se budou navzájem přitahovat a naopak funkční skupiny se schodným nábojem by se odpuzovaly.

Díky těmto interakcím jsou zóny stanovovaných složek různě rozmývány. Jsou-li tyto zóny málo rozmyty, příslušná složka analytu opustí separační prostor rychle, jelikož není zachycená na stacionární fází, jak vyjadřuje obrázek č. 12 A. V ideálním případě je chromatogram reprezentován Gaussovskou křivkou, jejíž průběh v čase je symetrický. V neideálním případě by symetričnost byla narušena a pík by mohl mít nepravidelný a asymetrický tvar, jak je patrné z obrázku č. 12 B. Tvar tohoto píku může být zároveň různě široký a šířka chromatografického píku vyjadřuje, jak moc jsou zóny příslušné složky rozmývány. V praxi ovšem ideálního Gaussovského tvaru chromatografického píku není možné dosáhnout. Je to pouze modelové ztvárnění odezvy, vždy bude docházet více či méně k nepravidelnému rozmývání zón a čím máme přesnější, kvalitnější detektor, tak tím i bude ve výsledku zachyceno více nepravidelností na průběhu křivky. Tento jev zachycuje obrázek č. 12 C.



Převzato z web.natur.cz/~pcoufal

Obrázek č. 12: Rozmývání zón analytu a tvary chromatografických píků.

Rozmývání a tím rozšiřování zón separovaných složek analytu jsou také ovlivňovány jakou dráhu musí zóny urazit přes stacionární fázi. Rychlost pohybu analytu kolem částic stacionární fáze závisí na velikosti kanálků, které vytvářejí sousední. Pohyb těmito kanálky je zcela náhodilý. Některé částice analytu musejí urazit delší dráhu přes stacionární fázi a zároveň prostorách s užšími kanálkami bude proudit mobilní fáze rychleji než v širších, což je dáno navýšením hydrostatického tlaku. Dochází k podélnému rozmytí zón analytu, které je především ovlivněno velikostí částic analytu, jež musejí proudit v místech odpovídající rozměrově kanálkům mezi částicemi stacionární fáze a homoginitě stacionární fáze v separačním prostoru. Tento jev se nazývá vířivá difúze v mobilní fázi. Příspěvek vyjadřující rozmývání zón prostřednictvím vířivé difúze vyjadřuje vztah (11):

$$11) H_F = A,$$

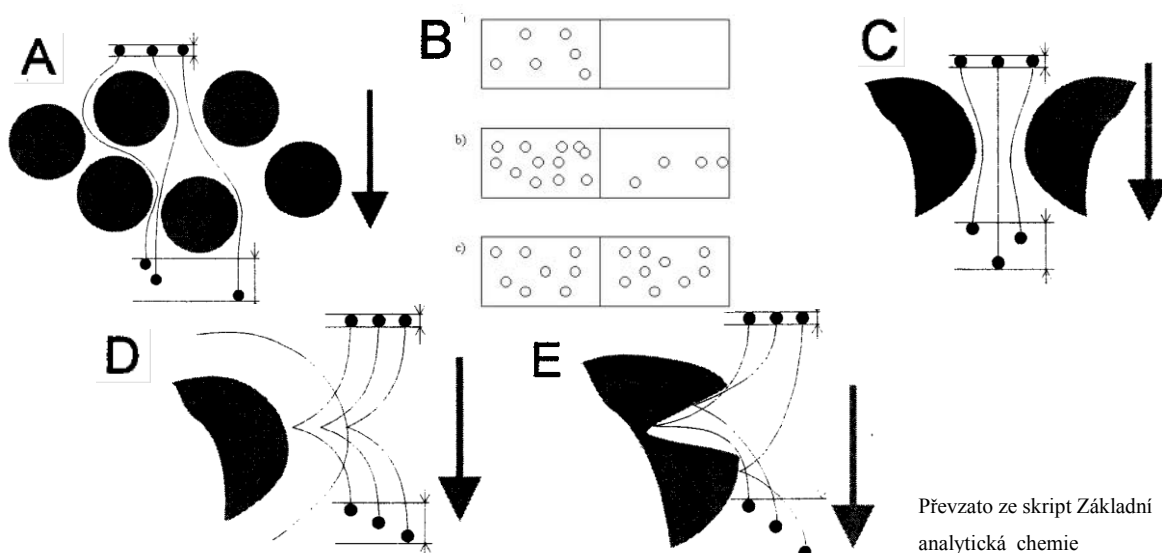
Kde H_F je dílčí příspěvek vířivé difúze k celkové výšce teoretického patra a A je konstanta, charakterizující velikost částic a nehomogenitu uspořádání stacionární fáze. Efekt vířivé difúze v mobilní fázi vidíme na obrázku č. 13 A.

Další vliv na rozmytí zón analytu má hodnota difúzního koeficientu, závisující na době setrvání. Po adsorbci na částice stacionární fáze, dojde ke snížení koncentrace analyzované složky v mobilní fázi, čímž se vytvoří koncentrační gradient. Zóny analytu, tak budou mít přirozenou tendenci vyrovnat tento úbytek, což se projeví zpětným přechodem do mobilní fáze. Tento jev se nazývá molekulární difúze v mobilní fázi a je přímo úměrný hodnotě difúzního koeficientu analytu a nepřímo úměrný průtokové rychlosti mobilní fáze. Molekulární difúze je popsána vztahem (12):

$$12) H_L = \frac{B}{u},$$

Kde B je konstanta vyjadřující závislost na difúzním koeficientu analytu a zároveň uspořádání částic stacionární fáze a u je průtoková rychlost. Je znázorněna na obrázku č. 13 B.

Na obrázku č. 13 C můžeme vidět rozmývání zón v důsledku existence různých třecích sil způsobených viskozitním efektem podél povrchu částic stacionární fáze. Zóny analytu budou různě rozmývány, jestliže protékají v jiné vzdálenosti od povrchu stacionární fáze. Ty, co budou nejbližší povrchu částic stacionární fáze, budou nejvíce interagovat s jejím povrchem a budou tedy více bržděny. Naopak ty co budou ve větší vzdálenosti, ideálně uprostřed kanálku dvou sousedních částic stacionární fáze, bude docházet k nejmenšímu tření a nejslabším interakcím s povrchem částic a budou protékat nejrychleji.



Obrázek č. 13: A-Vířivá difúze, B-Molekulární difúze, C-Odpor přenosu hmoty v mobilní fázi, D-Odpor přenosu hmoty ve stacionární fázi, E- Odpor přenosu hmoty v mikroporézní stacionární fázi.

Na obrázku 11 D vidíme rozmývání zón analytu působením stacionární fáze, jež má na svém povrchu tenký kapalným film. Zde bude docházet ke zpomalování částic analytu na základě toho, jak moc budou do tohoto tenkého kapalného filmu ponořeny. Částice analytu musí urazit různě velikou dráhu a zároveň difúze částic analytu z hlubších míst tenkého filmu zpět do mobilní fáze.

Posledním jevem je rozmývání zón u mikroporézních částic stacionární fáze (obrázek č. 13 E). Zde částice analytu, které jsou zachycovány do vnitřních kanálků stacionární fáze, musejí urazit větší dráhu než částice, které svými rozměry převyšují

vnitřní rozměry kanálků. Tím budou proudit mimo tyto kanálky v prostorech mezi částicemi stacionární fáze a urazí menší dráhu v porovnání s částicemi, které protékají kanálky stacionární fáze. Další vliv na zpomalení má částic analytu má tzv. efekt stagnující mobilní fáze. Částice protékající kanálky stacionární fáze budou častěji interagovat s vnitřním povrchem stacionární fáze než ty částice, co interagují pouze z vnějším povrchem stacionární fáze. Dílčí příspěvek k výšce teoretického patra způsobený odpory přenosu hmoty v mobilní a stacionární fázi vyjadřuje vztah (13):

$$13) H_M = (C_M + C_S) \cdot u,$$

kde C_M, C_S jsou konstanty pro přenos hmoty v mobilní a stacionární fázi závislé na difúzních koeficientech v mobilní a stacionární fázi a u je průtoková rychlost.

Sečteme-li všechny tyto dílčí příspěvky teoretického patra vyjádřené vztahy 11-13 získáme van Deemterovu rovnici, která má tvar (14):

$$14) H = A + \frac{B}{u} + (C_M + C_S) \cdot u$$

Z rovnice je patrné, že dílčí příspěvek vířivé difúze nezávisí na průtokové rychlosti a bude nabývat konstantní hodnoty. Příspěvek molekulární difúze je nepřímo úměrný vůči průtokové rychlosti a bude tedy hyperbolicky klesat. Poslední příspěvek zachycující převody hmot v mobilní a stacionární fázi jsou na průtokové rychlosti přímo úměrné a mají rostoucí charakter. Součtová křivka, která je vymezena těmito jednotlivými křivkami má tvar hyperboly s minimem. Toto minimum tedy vyjadřuje jaké průtokové rychlosti mobilní fáze by mělo být docíleno, aby účinnost separačního prostoru chromatografické kolony byla maximální.

1.6 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometr¹¹ funguje na základě ionizace molekuly látky a vzniku molekulového, případně fragmentových iontů. Takto vzniklý molekulový ion, též nazývaný jako mateřský ion, je následně rozštěpen na soubor fragmentů, které jsou charakteristické pro danou chemickou látku. Tyto fragmenty, též nazývané jako dceřinné ionty jsou následně urychlovány a rozdělovány na základě poměru hmotnosti k náboji (m/z), kde dopadají na detektor, který je registrován na základě poměru hmotnosti a náboje a zobrazuje se ve formě píků v hmotnostním spektru. Nejdůležitějšími komponentami hmotnostního spektrometru jsou: zdroj iontů, který vytváří z chemické látky mateřský ion, hmotnostní analyzátor, který rozděljuje vzniklé ionty a detektor. V dnešní době je využívána řada iontových zdrojů, které se používají pro daný typ chemických sloučenin.

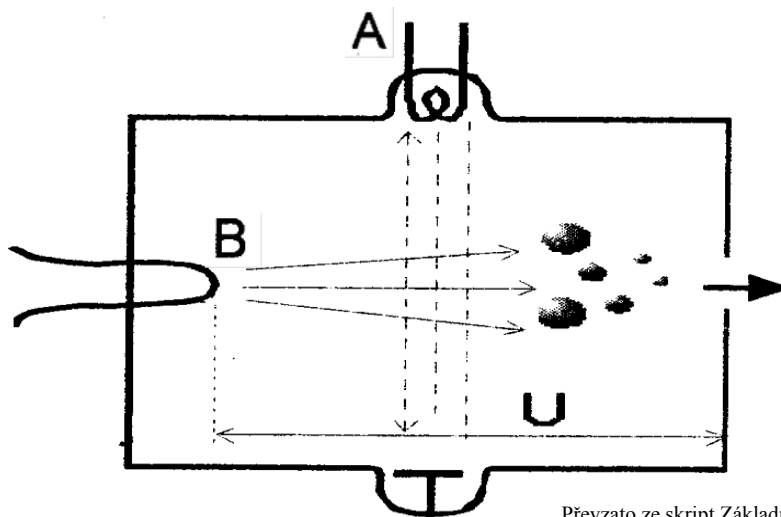
1.6.1 Iontové zdroje

První skupinou iontových zdrojů jsou zdroje pracující na základě ionizace za sníženého nebo atmosférického tlaku. Do této skupiny se řadí elektronová ionizace, jež je uváděn pod zkratkou EI z anglického názvu Electron Ionization, chemická ionizace uváděna pod zkratkou APCI z anglického Atmospheric Pressure Chemical Ionization, fotoionizace, která je uváděna pod zkratkou APPI, což je z původního názvu Atmospheric pressure photoionization a poslední velice užívanou metodou ionizace elektrosprejem, jejíž zkratka je ESI tedy Electrospray Ionization.

První metodou ionizace analytu je elektronová ionizace¹². V iontovém zdroji se vypaří malé množství analytu elektricky vyhřívaným vláknem a tyto páry jsou vystaveny působením proudu urychlených elektronů o vysoké energii, která se nejčastěji pohybuje okolo 70 elektronvoltů [eV]. Poté, co do analytu narážejí elektrony, vyrazí ze z valenční hladiny valenční elektron, čímž vytvoří kationradikál. Toto spojení vychází z kladně nabitého analytu, který se vytvořil z původního analytu a nese kladný náboj a radikál, jelikož analytu byl odtržen elektron z valenční hladiny a má tedy nepárový lichý elektron. Vezmeme si jako příklad molekulu o obecném složení AB a působením urychlených elektronů dostaneme tři možné ionty:

- a) $AB + e \rightarrow AB^{+\cdot} + 2e$
- b) $AB + e \rightarrow A^{+\cdot} + B + 2e$
- c) $AB + e \rightarrow A + B^{+\cdot} + 2e$

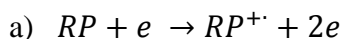
První rovnice vyjadřuje vznik molekulového iontu, jehož hmotnost odpovídá původní molekule analytu, další rovnice vyjadřují vznik fragmentových iontů. Obrázek č. 14 ukazuje na ionizační princip proudem urychlených elektronů. U řady sloučenin je molekulární ion nejvíce zastoupen ve výsledném hmotnostním spektru a je označován jako základní hmotnostní pík. Tomuto píku je ve spektru přiřazena intenzita odpovídající 100% a ostatní fragmentované ionty mají nižší zastoupení, které je vztaženo v poměru vůči základnímu hmotnostnímu píku. Zda-li molekula analytu bude pouze ionizována za odtržení elektronu z valenční sféry, či bude rovněž fragmentována, závisí především na předávané kinetické energii proudu urychlených elektronů. Nižší energie (kolem 20 eV) preferuje vznik molekulového iontu. Standardně používaná energie kolem zmíněných 70 eV, štěpí molekulu na fragmentové ionty.



Převzato ze skript Základní analytická chemie

Obrázek č. 14: Elektronová ionizace, A-elektronové dělo, B-analyzovaná látka po průchodu elektricky vyhřívanou spirálou.

Metoda chemické ionizace APCI¹³ je svým uspořádáním podobná technologii EI, doplněná o kapiláru přivádějící reakční plyn. Analyt vycházející z chromatografické kolony, je odpařován na elektricky vyhřívaném odpařovači v rozmezí teplot 250-400°C. Do takto odpařené plynné fáze se přimísí reakční plyn, například methan, amoniak, propan, voda a dusík. Plynná fáze je ionizovaná, náboj je převáděn na molekuly reakčního plynu, jež je ve značném nadbytku oproti analytu. Výhoda této metody oproti EI je šetrnost a daleko menší štěpení analytu na fragmentové ionty. Sled reakcí, kterými reční plyn RP postupně přenáší náboj na molekulu analytu AB vyjadřují následující rovnice:



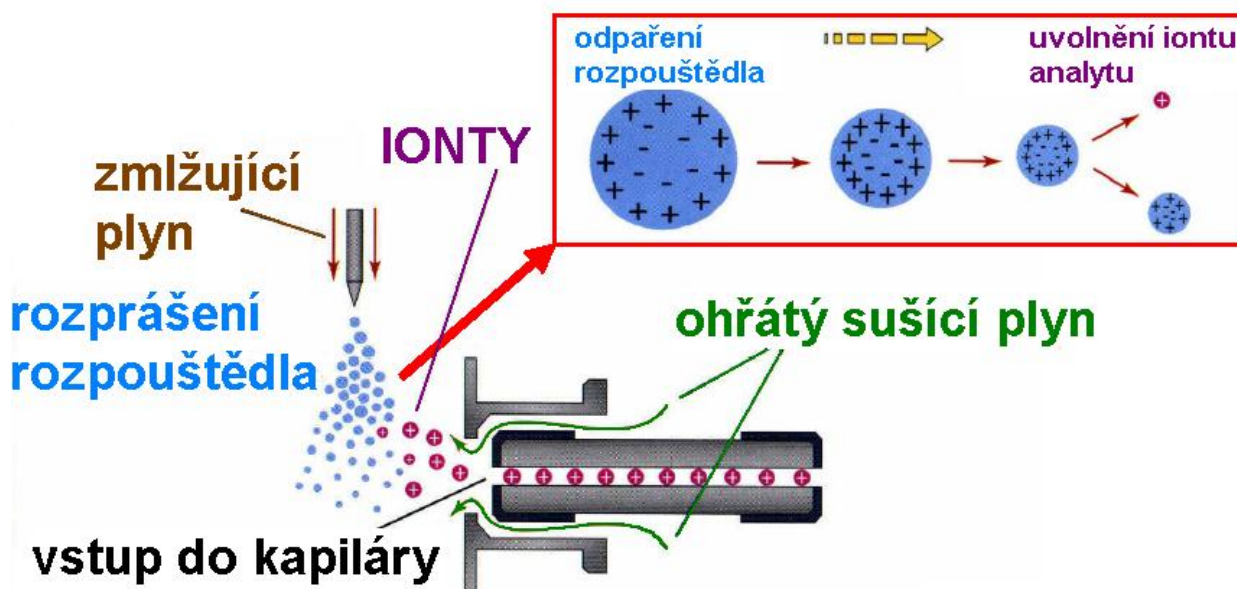
- b) $RP + RP^{+\cdot} \rightarrow [RP - H] + [RP + H]^{+\cdot}$
 c) $[RP + H]^+ + AB \rightarrow RP + [AB + H]^{+\cdot}$
 d) $[RP - H]^{+\cdot} + AB \rightarrow RP + [AB - H]^{+\cdot}$
 e) $RP^{+\cdot} + AB \rightarrow [RP + AB]^{+\cdot}$
 f) $RP^{+\cdot} + AB \rightarrow RP + AB^{+\cdot}$

V reakci (a) dochází k ionizaci reakčního plynu, poté může docházet k výměně náboje mezi molekulami reakčních plynů ion-molekulárními interakcemi (rovnice b). Nejdůležitějším krokem je přenos náboje z molekuly plynu na molekulu analytu podle rovnice (c). K přenosu náboje může také dojít na základě rovnice (d), kde vzniklým produktem je protonizovaná molekula analytu. Rovnice (e) a (f) rovněž ukazují, jak přenáší náboj reakční plyn na molekulu analytu. U reakce (e) se jedná o kondenzační reakci za vzniku aduktu a u reakce (f) se jedná o prostou výměnu náboje.

Metoda fotoionizace molekul analytu APPI patří mezi novější technologie ionizace. Stejně jako v předchozí metodě chemické ionizace je schéma iontového zdroje opět velmi příbuzné. Eluent vycházející ze separačního prostoru do nějž je zaváděn reakční plyn, je převáděn do plynné fáze prostřednictvím elektricky vyhřívané spirály v rozmezí teplot 250-400°C. Takto vzniklá plynná fáze je ionizována proudem elektromagnetického záření v ultrafialové oblasti (UV) realizována vodíkovou nebo deutériovou výbojkou. Ionizační energie závisí na druhu molekuly analytu, ale vybírá se taková energie, aby docházelo k co nejmenší ionizaci molekul rozpouštědla tedy reakčního plynu a co největší ionizaci molekul analytu. Oproti APCI metodě má fotoionizace výhodu v možnosti použití menších průtoků jak mobilní fáze, tak reakčního plynu při stejných výsledcích ionizace.

Nejčastěji používanou metodou ionizace je ionizace elektrosprejem ESI¹⁴. Tato metoda je značně využívána, díky šetrné ionizaci molekul analytu. Patří mezi měkké ionizační techniky a je možno ji použít i pro termicky nestálé biomolekuly jako jsou proteiny a peptidy¹⁵, jejichž převedení do plynné fáze je obtížné. Další výhodou je, že lze použít pouze malé průtoky eluentu v řádech jednotek až desítek mikrolitrů za minutu. Eluent vycházející z chromatografické kolony je opět ohříván a přiváděn vstupní kapilárou, na níž je nastaveno napětí v rozmezí 3-5 kilovoltů [kV], do prostoru před analyzátozem. Do tohoto prostoru přichází molekuly analytu rozprašené ve formě plynu, který nese vlivem vysokého gradientu elektrického pole záporný nebo kladný náboj, záleží na tom, jaká je nastavená polarita napětí na vstupní kapiláře. Do prostoru před analyzátozem je též zaváděn sušící plyn, jímž je nejčastěji dusík. Ten postupně odpařuje molekuly

rozpouštědla, čímž se kapičky molekuly analytu s navázaným rozpouštědlem zmenšují a tím se více zhušťuje povrchový náboj, jak ukazuje obrázek č. 15. Nakonec molekuly, kapičky analytu jsou tak malé, že dojde k jejich odtržení od větších kapiček s navázaným rozpouštědlem a vznikne tak protonovaný molekulární ion typu $[AB + H]^+$ při kladné polaritě nastavené na vstupní kapiláře. Deprotonovaný molekulární ion $[AB - H]^-$ vznikne při záporné polaritě na vstupní kapiláře. V této měkké technice ionizace v podstatě nevznikají fragmentované dceřinné ionty. Ke zvýšení účinnosti ionizace se mohou do eluentu přidávat organické kyseliny nebo báze pro snížení nebo navýšení hodnot pH. Organické kyseliny se využívají pro lepší protonizaci, nejčastěji se používá kyselina octová a mravenčí pro záznam kladných iontů v koncentračním rozsahu 0,1-1%. Pro deprotonizaci se využívá amoniak pro záznam záporných iontů v koncentračním rozsahu 0,1-0,5%.



Převzato z eso.vscht.cz/matejka

Obrázek č. 15: Schématické znázornění metody ESI s odpařováním molekul rozpouštědla.

V této měkké technice ionizace v podstatě nevznikají fragmentované dceřinné ionty. Takto vzniklé ionty jsou následně vtahovány do analyzátoru s vysokým vakuem, před jehož vstupem je soustava fokusačních elektrod, které zapříčiní, že neuspořádaný soubor molekul analytu vycházející ze vstupní kapiláry, je uspořádán do pravidelného proudu molekul. Za fokusačními elektrodami se nacházejí ještě urychlující elektrody, které tento proud urychlují před vstupem do vysokého vakua. Schématické znázornění metody ESI je na obrázku č. 15. Uvádí se, že molekuly sloučenin mající molekulovou hmotnost do 3000 podléhají protonizaci nebo deprotonizaci výše zmíněným způsobem. Naopak větší

molekuly podléhají několikanásobné protonizaci či deprotonizaci, které znesnadňují určení molekulové hmotnosti analytu. Obvykle jsou molekuly o molekulové hmotnosti 100000 protonovány pouze deseti protony a to samé platí i pro deprotonizaci. V dnešní době existují matematické metody, které dokáží přímo spočítat počet protonů, které se naprotonovaly na molekulu analytu a vypočítat původní molekulovou hmotnost analytu. Tyto matematické metody se nazývají dekonvoluce.

V poslední době nachází velký význam ionizační technika nazývaná MALDI z anglického termínu Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. Principem této metody je, že analyt se smísí s velkým nadbytkem, udává se až 5000:1, určité látky nebo-li matrice, která musí být schopna absorbovat ionizační záření. Do těchto matric patří například kyselina dihydroxybenzoová, chlorsalicylová či nikotinová. Smišená matrice s analytem je ionizována a jako zdroj energie se využívá laser. Jsou používány dva typy laserů, pro oblast ultrafialového záření to je dusíkový laser¹⁶ a pro infračerveného záření to je Er-YAG laser. Matrice absorbující ionizační záření tak zamezuje přebytečné fragmentaci molekul analytu a tím tuto metodu ionizace řadíme též mez měkké ionizační techniky používané především pro biomolekuly proteinů a oligosacharidů.

1.6.2 Iontové separátory

Po ionizaci molekuly analytu jsou jednotlivé ionty vycházející z iontového zdroje převáděny do další části hmotnostního spektrometru, kde jsou rozděleny dle m/z . Tyto separátory mohou být s jednoduchou fokusací, anebo s dvojitou fokusací, přičemž obě tyto techniky pracují ve vysokém vakuu. Na jiném principu funguje hmotností analyzátor, který se zároveň používá v tandemovém uspořádání pro zvýšení rozlišovacích schopností iontů.

Magnetický iontový separátor fungující na bázi jednoduché fokusace¹⁷, působí na ionty vylétající z iontového zdroje intenzivním magnetickým polem. Kladně nabitě ionty jsou vtahovány a urychlovány záporným potenciálem před vstupem do magnetického pole iontového separátoru. V opačném případě, kdybychom pracovali se zápornou polaritou na vstupní kapiláře iontového zdroje, bylo by naopak na vstupu do iontového separátoru nastaven kladný potenciál. Magnetické pole zakřivuje dráhy procházejících iontů podle hmotnosti iontů, takže ionty s vyšší molekulovou hmotností budou opisovat dráhu o větším poloměru, zato ionty o menší molekulové hmotnosti budou opisovat dráhu o menším poloměru. Tím se nám vytvoří několik svazků iontů uspořádaných podle molekulové hmotnosti, které prolétají v různých prostorách trubice. Na konci trubice je zaostřovací štěrbin, která slouží k vychytávání svazků iontů o molekulových hmotnostech, které

nechceme pozorovat, pokud bychom chtěli pozorovat jiný svazek iontů, tak změníme hodnotu potenciálu magnetického pole. Schématické znázornění separátoru iontů s jednoduchou fokusací je na obrázku č. 16. Po vstupu do iontového separátoru je iontům udělena kinetická energie o velikosti (15):

$$15) E_K = z \cdot V = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2,$$

kde z je náboj iontu, V je hodnota kladného nebo záporného potenciálu, jež jsou urychlovány ionty před vstupem do magnetického pole separátoru, m je hmotnost iontu a v je rychlost iontu. V magnetickém poli jsou ionty vychylovány na základě odstředivé síly, která vychyluje více hmotné ionty, ale tato síla musí být v rovnováze s dostředivou silou, kterou působí magnetické pole na ionty, tím získáme vztah (16):

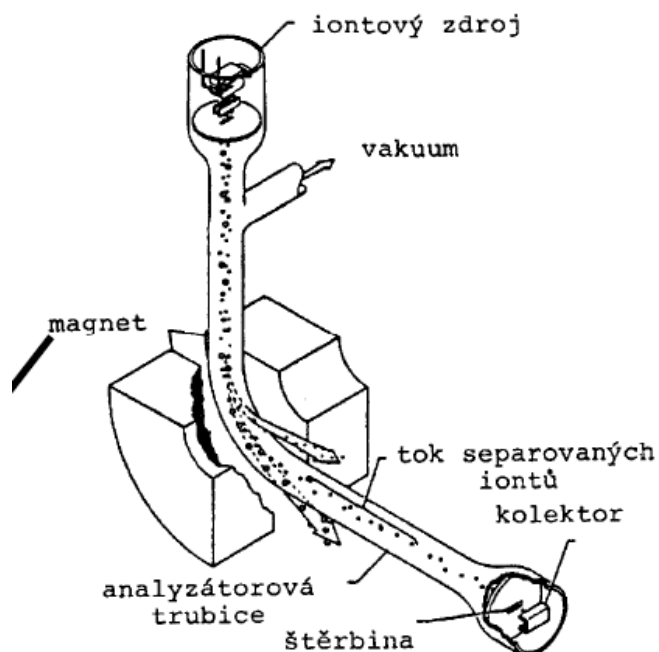
$$16) \frac{m \cdot v^2}{r} = B \cdot z \cdot v,$$

kde m je hmotnost iontu, v je rychlost iontu, r je poloměr opisující dráhy, B je magnetická indukce, z je náboj iontu. Nyní popíšeme postup získání základní rovnice hmotnostního spektrometru pro magnetický analyzátor. Vyjádříme si z rovnic 15 a 16 rychlost iontů. K tomu abychom mohli rychlost z rovnice 16 dosadit do rovnice 15 je nutné celou rovnici umocnit nadruhou, abychom rychlost iontů v obou rovnicích měla stejný tvar. Po dosazení do rovnice 15 si vyjádříme rovnici (17) ve tvaru:

$$17) \frac{m}{z} = \frac{B^2 \cdot r^2}{2V} \rightarrow r = \sqrt{\frac{m \cdot 2V}{z \cdot B^2}},$$

tato rovnice vyjadřuje, že poloměr opisující dráhy iontů je závislý na poměru hmotnosti a náboje daného iontu a zároveň je závislá na hodnotách nastavené magnetické indukce a potenciálu, přičemž když budeme obě tyto veličiny spojitě měnit, budou poté štěrbinou prolétávat svazky iontů o různé dráze, čímž dostaneme výsledné hmotnostní spektrum.

U iontového separátoru s dvojitou fokusací se ionty přicházející z iontového zdroje do trubice, kde působí opět magnetické pole na ionty a průchodu zaostřovací štěrbinou přicházejí do druhé trubice, ve které působí na ionty elektrické pole (elektrostatický analyzátor). Uspořádání trubic může být i opačné a dodnes jsou využívány čtyři koncepce uspořádání separátorů s dvojitou fokusací, jak vidíme na obrázku č. 17. Této dvojitě fokusace se využívá zejména z toho důvodu, že rozlišovací schopnost oproti jednoduché fokusaci se zvýší řádově tisíckrát až desetitisíckrát. Šířka píku je ovlivňována především



Obrázek č. 16: Separátor iontů s jednoduchou fokusací.

Převzato z eso.vscht.cz/mateika

distribucí kinetické energie, kterou ionty mají na vstupu do iontového separátoru a poté na výstupu iontového separátoru dochází vlivem magnetického pole k určitým odchýlkám v kinetické energii iontů. To zapříčiní, že ve stejném svazku iontů budou ionty opisovat poloměr dráhy o určité hodnotě, jenže ne všechny ionty budou opisovat tuto dráhu, ale některé vlivem rozdílné kinetické energie budou opisovat větší či menší dráhu. Tomuto jevu zabráníme, když se nám podaří ionty energeticky sjednotit na stejné hodnoty kinetické energie a k tomu právě slouží elektrostatický analyzátor. Po vstupu iontů do prostoru elektrostatického iontového separátoru jim je udělena kinetická energie, která závisí na hodnotě potenciálu vztahem (18):

$$18) E_K = z \cdot V = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2,$$

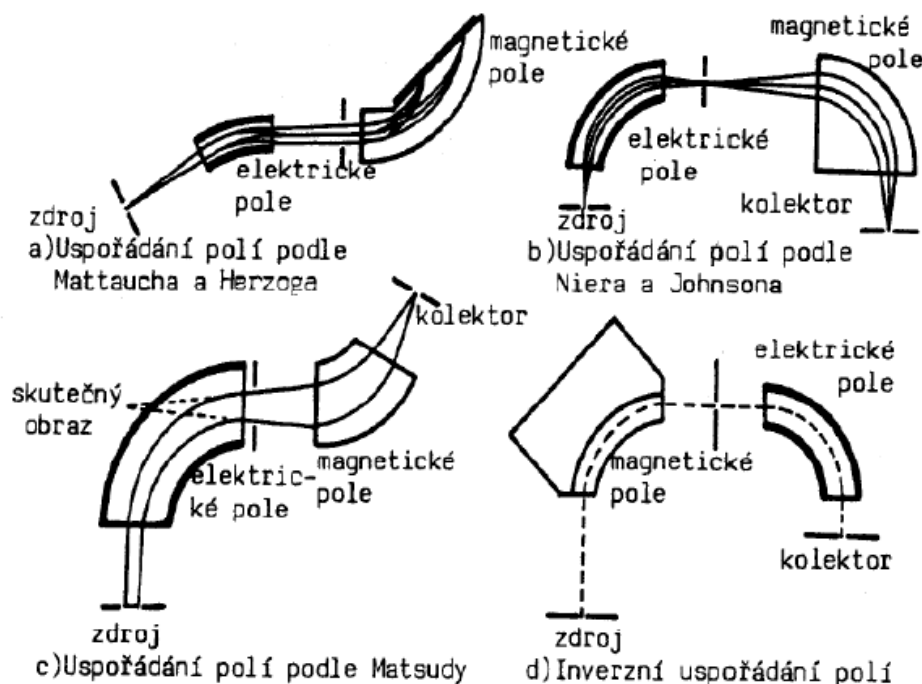
kde jednotlivé veličiny byly popsány u vztahu 15. V elektrickém poli jsou ionty vychylovány na základě odstředivé síly, která vychyluje více hmotné ionty, ale tato síla musí být v rovnováze s dostředivou silou, kterou působí elektrické pole na ionty, tím získáme vztah (19):

$$19) z \cdot E = \frac{m \cdot v^2}{r},$$

kde E je intenzita elektrického pole a ostatní veličiny byly popsány ve vztahu 16. Kombinací vztahů 18 a 19 získáme rovnici (20) vyjadřující závislost poloměru dráhy iontů v elektrickém poli.

$$20) r = \frac{2V}{E},$$

z této rovnice je patrné, že v elektrickém poli nezávisí na poměru hmotnosti iontu k náboji a dráha je ryze ovlivňována pouze velikostí potenciálu a velikostí intenzity elektrického pole, což znamená, že na výstupu získáváme svazky iontů o stejné energii.



Obrázek č. 17: Iontový separátor s dvojitou fokusací.

Převzato z eso.vscht.cz/mateika

Hojně využívaným iontovým separátorem jsou průletové analyzátoři, které jsou spíše známy z anglického termínu Time of flight, pouze ve zkratce TOF¹⁸. Tento analyzátor řadíme mezi pulzní hmotnostní analyzátoři, jelikož pracuje s pulzy iontů přiváděnými z iontového zdroje. Tímto pulzem jsou všechny ionty urychleny a získávají stejnou kinetickou energii o velikosti (21):

$$21) E_K = z \cdot V = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2,$$

kde jednotlivé veličiny byly popsány u vztahu 15. Schématické znázornění TOF je na obrázku č. 18. Různě těžkým iontům bude udělena různá kinetická energie a proto doletí k detektoru v jiných časových intervalech. Obecně iontům s menším poměrem hmotnosti a náboje bude udělena větší rychlost a tím doletí k detektoru v kratším čase a naopak těžším iontům bude udělena menší rychlost a tím doletí k detektoru později. K tomu abychom získali přesné informace o molekulových hmotnostech prolétajících iontů,

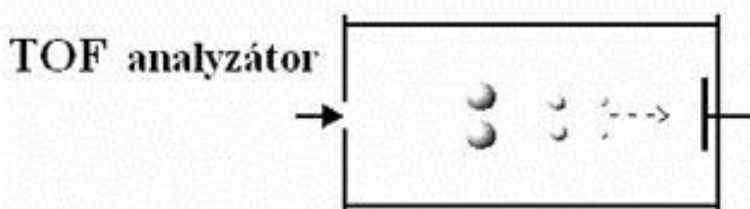
musíme měřit čas za který se ionty dostanou iontu z počátku iontové trubice na detektor. Dobu letu iontů analyzátorovou trubicí, lze vyjádřit následujícím vztahem (22):

$$22) t = \frac{l}{v},$$

Kde l je délka analyzátorové trubice a v je rychlost iontů. Kombinací vztahů 21 a 22 získáme výsledný vztah (23) pro vyjádření závislosti poměru hmotnosti a náboje na čase průletu iontu.

$$23) \frac{m}{z} = \frac{2 \cdot V \cdot t^2}{l^2}$$

Výhodou TOF je, že není omezen rozsah poměru hmotnosti a náboje, zároveň stanovení iontů je velmi rychlé a přesné.

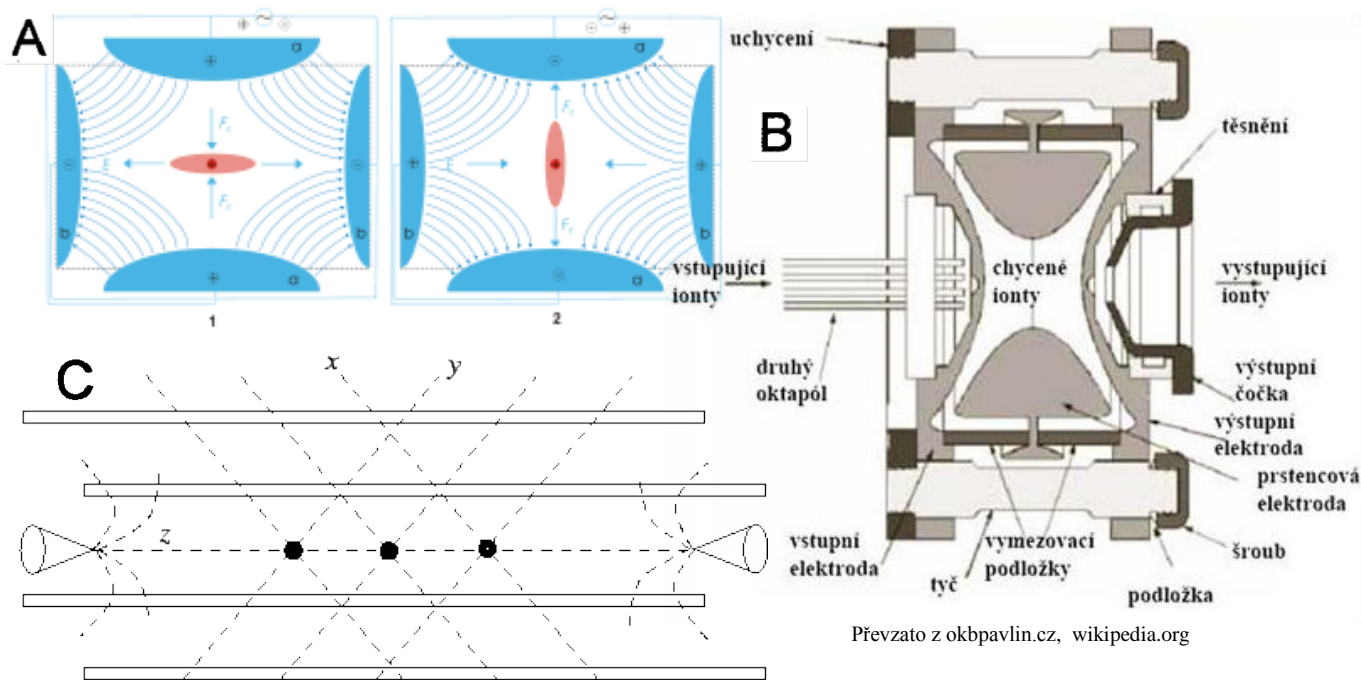


Obrázek č. 18: Průletový analyzátor TOF.

Převzato ze skript Základní analytické chemie

Na základě působení oscilujícího elektromagnetického pole, které je složeno ze stejnosměrného napětí a radiofrekvenčního napětí působící na ionty v uzavřeném prostoru, fungují iontové pasti (z anglického termínu Ions traps¹⁹). Tyto pasti se skládají ze dvou hyperbolických kovových elektrod umístěných v levé a v pravé části a dvou elektrod ve tvaru půl prstenců nahoře a ve spodní části, které dohromady vytvářejí komoru do níž jsou vháněny ionty z iontového zdroje. Na chycené ionty působí v komoře oscilující elektromagnetické pole, které naráz působí na ionty dvěma efekty. Nejdříve jsou ionty stlačovány v axiálním směru komory a vytlačovány v radiálním směru, poté jsou stlačovány v radiálním směru a vytlačovány v axiálním směru, tyto efekty se vytvářejí změnou potenciálů na elektrodách, přičemž přepínání mezi nimi probíhá ve velmi krátkých časových intervalech. Tento efekt se schématickým zapojením je znázorněn na obrázku č. 19. Ionty uvnitř iontové pasti vytvářejí rotující obláčky, které jsou následně vytlačovány polem se zvyšující se amplitudou kmitů do prostoru detektoru. Do komory iontové pasti bývá také zavedeno malé množství hélia, které napomáhá stabilizaci a případné fragmentaci iontů. Původní iontová past je nazývána podle svého objevitele jako Paulova 3D iontová past. Dalším možným uspořádáním je lineární iontová past, též nazývaná jako

2D past. V tomto uspořádání jsou elektrody umístěny paralelně nad sebou. Vytvářejí oscilující elektromagnetické pole ve směru osy x a druhé ve směru osy y . Zmíněným rychlým přepínáním mezi nimi jsou ionty chyceny, nemohou se v takto vytvořeném elektromagnetickém poli pohybovat, ale pouze vibrují a shlukují se uprostřed komory, kde elektromagnetické pole jim udává nejmenší kinetickou energii. Následně jsou vypuzovány ve směru osy z , tedy osy, která je paralelní se zapojením elektrod. Opět do této iontové pasti může být zavedeno hélium, které pomáhá stabilizovat a popřípadě štěpit ionty. Schématické zapojení 2D a 3D pasti je na obrázku č. 19.



Převzato z okbpařlin.cz, wikipedia.org

Obrázek č. 19: A-rotace iontů uvnitř 3D iontové pasti, B-schématiké znázornění 3D iontové pasti, C-lineární 2D iontová past.

Posledním iontovým separátorem o kterém se zmíním je Ion cyklotronová rezonance. Ve zkratce je tento typ ionizace označován FT-ICR²⁰ z anglického termínu Fourier Transform-ion Cyclotron Resonance. Tento separátor funguje na podobném principu jako zmíněné iontové pasti, kde jsou do prostoru komory přiváděny ionty z iontového zdroje, kterou tvoří homogenní permanentní supravodivý magnet, vytvářející silné magnetické pole. Ionty pod vlivem magnetického pole se začnou pohybovat po kruhových drahách tzv. cyklotronech. Kromě magnetického pole jsou ionty ovlivňovány radiofrekvenčním napětím, které je přiváděno na vysílací elektrody. Každá amplituda radiofrekvenčního napětí bude vychylovat různé ionty o specifickém poměru hmotnosti a náboje. Tím tedy je kruhový pohyb iontů uvnitř pasti umocněn a kruhové dráhy iontů se

prodlouží, zároveň se prodlouží doba pro opis celé dráhy kruhu. Podle toho, jaké dráhy budou opisovat ionty, zaznamenávají přijímací elektrody signál, jehož míra závisí na nastaveném radiofrekvenčním napětí, které vychyluje ionty z původních kruhových drah. Výsledná hmotnost iontů je přepočítána prostřednictvím Fourierovy transformace a tato hmotnost koresponduje s časem o který je prodloužen oblet jednoho cyklotronu a zároveň je nepřímo úměrná vloženému radiofrekvenčnímu napětí.

1.6.3 Detektory

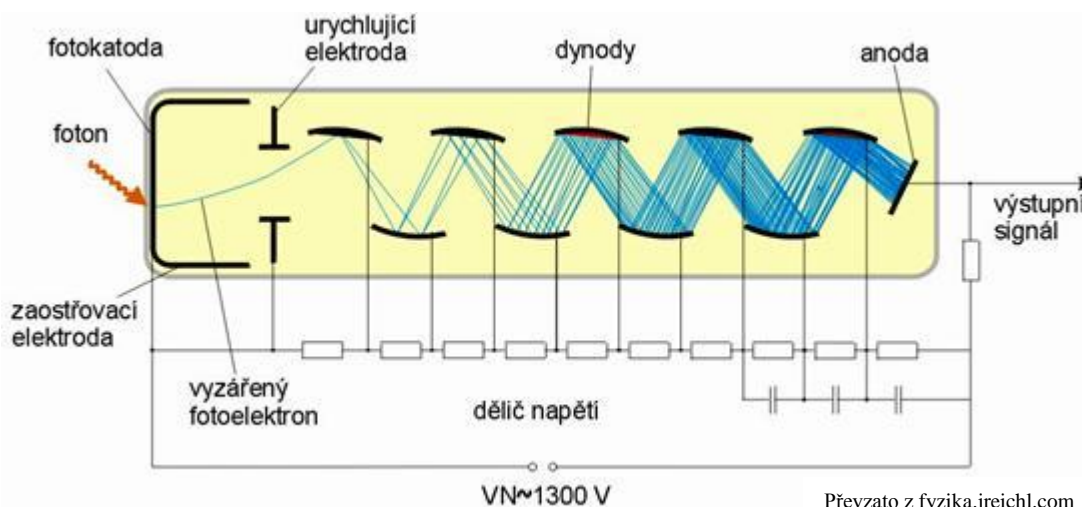
Poslední část hmotnostního spektrometru tvoří zařízení pro detekci iontů, které prolétnou přes iontový separátor.

Odezva iontů na detektoru je poskytována nábojem, který nesou a ten se na ploše detektoru shromažďuje ve formě celkového elektrického signálu. Elektrický signál je následně zpracován do formy hmotnostního spektra. Jednotlivé hmotnostní píky nám vyjadřují poměrné zastoupení fragmentovaných iontů v analytu v závislosti na poměru hmotnosti a náboje. Naprostá většina iontů je ionizována do protonované formy molekulárního iontu $[AB + H]^+$, anebo deprotonované formy molekulárního iontu $[AB - H]^-$, odkud můžeme rovnou odečíst molekulovou hmotnost. V případě protonované formy je skutečná molekulová hmotnost fragmentu analytu rovna rozdílu molekulové hmotnosti vodíku od naměřené molekulové hmotnosti a u deprotonované formy naopak musíme přičíst molekulovou hmotnost vodíku k naměřené molekulové hmotnosti fragmentu analytu v hmotnostním spektru.

Úplně prvním detektorem, který se začal využívat v hmotnostní spektrometrii byla fotografická deska²¹. Iont, který dopadl na desku, zanechal po sobě zčernalé místo, poté co dopadly na desku všechny měřené ionty, se celkové zatmavení fotografické desky přepočítávalo na intenzitu signálu, jež ionty po sobě zanechaly na povrchu desky. V dnešní době se výhradně využívají násobičové detektory a to fotonásobičové detektory a elektronové násobičové detektory.

Ve fotonásobiči²² ionty dopadají na fosforovou desku a po dopadu je iontem desce předána energie. Tato energie je využita na odtržení fotonu z povrchu desky a takto vzniklý foton směřuje prostorem fotonásobiče k fotokatodám. Po dopadu na fotokatodu dochází k fotoelektrickému jevu, což lze interpretovat jako děj, kde po dopadu elektromagnetického záření na povrch materiálu, dochází k vyražení elektronu, jenž je držen elektrostatickými silami na povrchu fotokatody. Byla-li by kinetická energie fotonu dopadajícího na desku příliš malá nedošlo by k emisi elektronu, jelikož předaná kinetická

energie by nepřevýšila množství elektrostatické energie, kterou je elektron držen na povrchu materiálu. Tyto elektrony jsou nazývány jako fotoelektrony a jsou následně urychlovány elektrickým potenciálem, který je vytvářen systémem dynod. Fotoelektron po dopadu na dynodu vyvolá emisi tzv. sekundárních elektronů. Po dopadu sekundárních elektronů na další dynodu dojde opět k emisi dalších elektronů, již terciálních, kterých se uvolní z povrchu ještě více než po dopadu primárního elektronu na první dynodu. Tímto procesem dojde ke znásobení počtu elektronů až na 10^8 elektronů, které nakonec dopadají na anodu, kde energie elektronů je zachycena ve formě elektrického signálu. Schématické zobrazení fotonásobiče je na obrázku č. 20.



Obrázek č. 20: Fotonásobič.

Elektronový násobič funguje analogicky jako fotonásobič. Rozdíl tkvív v tom, že u fotonásobiče byly uvolňovány elektrony prostřednictvím fotonu, který byl uvolněn ionty na fosforové desce, zde jsou jednotlivé elektrony uvolňovány prostřednictvím iontů, které dopadají na povrch dynod, odkud jsou postupně uvolňovány jednotlivé elektrony. Elektronový násobič dokáže dosáhnout stejného násobící efektu jako fotonásobič, ale oproti fotonásobiči má delší životnost. Schématické znázornění elektronového násobiče je tedy velice podobné obrázku č. 20 s tím rozdílem, že zde chybí počáteční část obsahující fotokatodu.

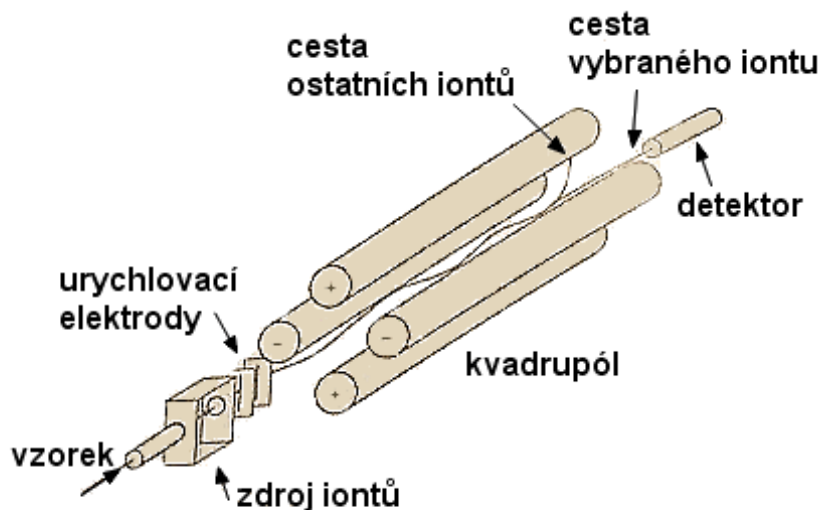
1.7 Tandemová hmotnostní spektrometrie

U tandemové hmotnostní spektrometrie je uspořádání jednotlivých komponent analogické jako u jednoduchých hmotnostních spektrometrů. První část přístroje tvoří iontové zdroje. Pro ionizaci analytu jsou i v tandemové hmotnostní spektrometri použity stejné techniky, které byly popsány v oddíle 1.6.1, přičemž dominantní postavení má ionizace elektrosprejem.

1.7.1 Iontové separátory

Už v oddíle 1.6.2, kde byly popisovány separátory fungující na bázi magnetického pole s jednoduchou fokusací a poté s dvojitou fokusací. Tím, že iontový separátor využívá magnetického pole pro separaci iontů a následně elektrického pole, můžeme považovat za jeden z typů tandemové hmotnostní spektrometrie.

Dalším využívaným iontovým separátorem je hmotnostní kvadrupólový filtr²³. Může být využíván pouze v jednoduchém uspořádání, kdy v hmotnostním spektrometru se nachází jeden hmotnostní kvadrupólový filtr, anebo stále více používanějším s uspořádáním kvadrupólových filtrů v sérii, v tzv. triple-quad tandemovém uspořádání. Kvadrupólový hmotnostní filtr sestává ze čtyř kovových tyčových paralelně uspořádaných elektrod, které dohromady vytínají tvar čtverce. Elektrody mohou mít kruhový tvar, anebo hyperbolický tvar a na délku mají od 10-30 centimetrů a pospolu jsou drženy prostřednictvím keramického pouzdra. Schématické znázornění hmotnostního kvadrupólového filtru je na obrázku č. 21. Na elektrody je přiváděno stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé napětí, které dohromady vytváří dvourozměrné elektromagnetické kvadrupólové pole. Stejně napětí je vždy vkládáno pouze na protilehlé elektrody. Ionty přicházejí z iontového zdroje a procházejí mezi elektrodami hmotnostního kvadrupólového filtru, jsou separovány na základě poměru hmotnosti a náboje daného iontu. Napětí nastavené na elektrodách a vytvářející kvadrupólové pole, rozkmitává prolétající ionty a ionty jejichž amplituda kmitu je příliš vysoká, jsou zachyceny na tyčích. Zároveň toto napětí nám určuje, které ionty prolétnou tímto polem, aniž by byly zachyceny a poté je můžeme pozorovat na detektoru. Spojitou změnou nastaveného napětí se mění amplitudy kmitů pro jednotlivé ionty a opět na základě poměru hmotnosti a náboje



Převzato z ksicht.natur.cuni.cz

Obrázek č. 21: Hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým filtrem.

jsou vychytávány na tyče jiné ionty. Takto spojitě měněné elektromagnetické pole umožňuje získat hmotnostní spektrum. Trajektorie dráhy iontů procházejících skrz elektromagnetické kvadrupólové pole je popsána Mathieuovými pohybovými rovnicemi (24,25):

$$24) a = \frac{-8U}{\frac{m}{z} \cdot r_0^2 \cdot \omega^2},$$

kde a je veličina popisující pohyb iontu v závislosti na stejnosměrném napětí, U je stejnosměrné napětí (potenciál), $\frac{m}{z}$ je poměr hmotnosti a náboje r_0 je vzdálenost iontu z nulové hodnoty trajektorie po amplitudu a ω je úhlová frekvence.

$$25) q = \frac{4V}{\frac{m}{z} \cdot r_0^2 \cdot \omega^2},$$

kde q je veličina popisující pohyb iontu v závislosti na střídavém napětí, V je střídavé napětí (potenciál). Pohyb iontů může být ovšem ovlivňován vzájemným odpuzováním iontů nebo přitahováním v elektromagnetickém poli. Hmotnostní kvadrupólový filtr pracuje ve vysokém vakuu, je zároveň elektricky izolován, ale i tak může prolétající ionty ovlivňovat nerovnoměrné elektromagnetické pole. Tyto anomálie, které mohou do jisté míry ovlivňovat pohyb iontů skrz hmotnostní analyzátor, nejsou začleněny v Mathieuových rovnicích. Kvadrupólové analyzátoři patří mezi levnější a méně citlivé iontové separátory, které jsou velice výhodné v jednoduchosti zapojení a kompatibilitou s kapalinovou anebo plynovou chromatografií. Problémem je, že tyto filtry jsou méně přesné a poskytují menší citlivost na studovaný analyt. Tomuto problému můžeme předejít pokud spojíme hmotnostní filtru s dalším hmotnostním kvadrupólovým filtrem. Velice využívané uspořádání je trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr nebo (z anglického termínu Triple quad mass spectrometer). Toto tandemové uspořádání se skládá z prvního

kvadrupólu (Q_1), po něm následuje další kvadrupól sloužící jako kolizní cela (q_2) a po kolizní cele druhý hmotnostní kvadrupólový filtr (Q_3). Kolizní cela nemá funkci hmotnostního filtru, ale dochází v ní ke štěpení iontů na fragmenty. V kolizní cele se využívají inertní plyny jako argon nebo helium, anebo je možné též použít dusík. Toto uspořádání je ve zkratce označováno jako QqQ nebo $Q_1q_2Q_3$. Toto uspořádání se zvyšuje citlivost přístroje, snižuje nežádoucí šum a umožňuje provádět tandemová měření. Schématické znázornění triple quad hmotnostního spektrometru znázorňuje obrázek č. 22. V tomto uspořádání můžeme provádět čtyři různé typy skenování²⁴ analyzovaných iontů.

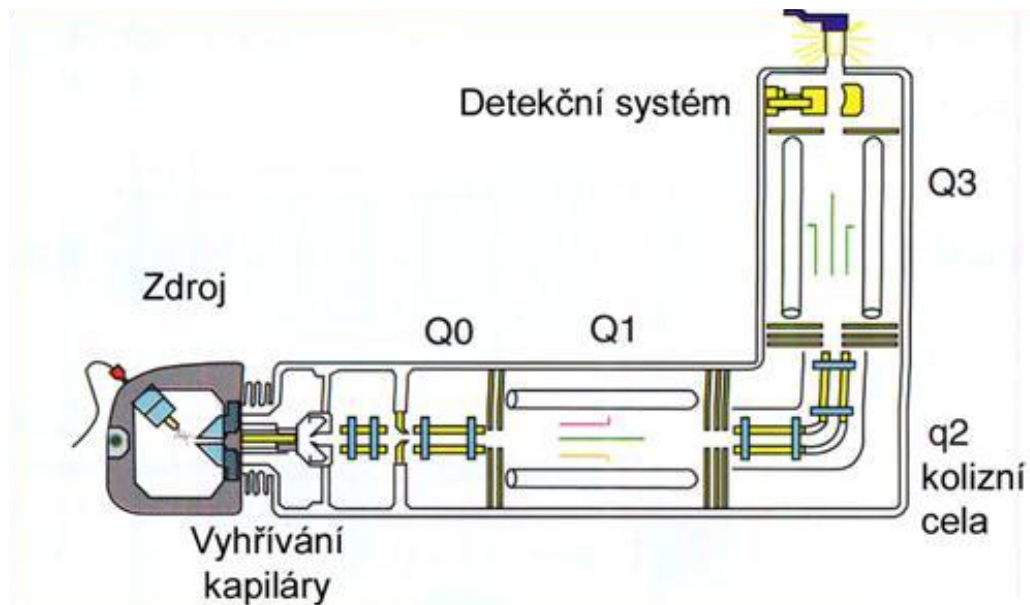
Prvním typem je skenování produktových iontů nebo též analogicky můžeme použít název skenování dceřinných iontů, tyto názvy vycházejí z anglického termínu Product ion scan. Vychází se z nastavení, kde na kvadrupólu Q_1 pozorujeme molekulový ion o známém poměru hmotnosti a náboje. Tento ion poté přichází do kolizní cely q_2 , kde je štěpen na dceřinné ionty. Kvadrupól Q_3 se následně nastaví na široký interval poměru hmotnosti a náboje, na němž poté sledujeme všechny vzniklé dceřinné ionty z molekulového iontu.

Dalé můžeme využívat mód na skenování prekurzorových iontů, který opět pochází z anglického termínu Precursor ion scan. Zde si na kvadrupólu Q_3 nastavíme určitý specifický poměr hmotnosti a náboje dceřinného iontu a na kvadrupólu Q_1 se nastaví široký interval poměrů hmotností a nábojů. Znamená to, že na kvadrupólu Q_1 jsou nejdříve vybírány ionty z námi nastaveného intervalu a kvadrupól Q_3 sleduje, vybírá a jestli vůbec vzniká požadovaný dceřinný ion z přednastaveného poměru hmotnosti a náboje, které jsme nastavili na Q_3 .

Třetím typem je skenování ztráty neutrální částice, což je přeloženo z původního anglického termínu Neutral loss scan. Kvadrupól Q_1 se nastaví na skenování určitého intervalu poměru hmotnosti a náboje, tento interval skenuje i kvadrupól Q_3 , ale je snížen o specifickou hodnotu molekulové hmotnosti, jež odpovídá ztrátě neutrální části molekulové hmotnosti ze struktury iontů. Přednastavené snížení hmotnosti odpovídá například molekulovým hmotnostem vody a amoniaku tedy osmnáct a sedmnáct. Tento mód nám říká, do jaké míry jsou odštěpovány neutrální molekuly z molekuly iontu.

Posledním typem scanu jsou monitorování vybraných reakcí nebo monitorování násobných reakcí, tyto scany jsou přeloženy z anglických termínů Selected reaction monitoring (ve zkratce SRM), a Multiple reaction monitoring (MRM). Oba kvadrupóly Q_1 a Q_2 jsou nastaveny na určité hodnoty poměru hmotnosti a náboje, to znamená, že ze všech

iontů, které vznikly z iontového zdroje se na Q_1 vybere pouze jeden ion a po jeho průchodu kolizní celou se sleduje na Q_3 pouze jediný dceřinný ion. Toto nastavení odpovídá SRM. Nastavíme-li na Q_1 a Q_3 více poměrů hmotností a náboje, mluvíme potom o MRM.

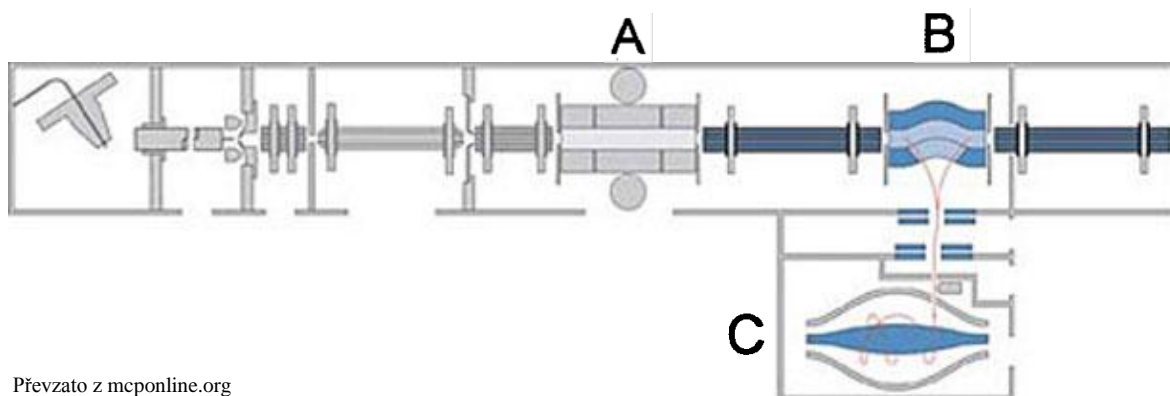


Převzato z okbpavlin.cz

Obrázek č. 22: Trojitý kvadrupolový hmotnostní spektrometr.

Hmotnostní analyzátor používaný pro detekci proteinů o molekulových hmotnostech až 100000 je orbitrap²⁵. Orbitrap můžeme charakterizovat jako elektrostatický hmotnostní analyzátor. Pro analyzování iontů vycházejících z iontového zdroje, není využíváno magnetické ani elektrické pole, nýbrž využívá kombinaci kvadrupolového pole, jež se sestává ze stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí dohromady s tzv. logaritmickým potenciálem. Toto pole je nazýváno jako kvadro-logaritmický elektrostatický potenciál. Základní součástí této techniky jsou dvě elektrody a to vnitřní nebo-li též nazývané jako centrální a vnější. Vnitřní centrální elektroda může dosahovat maximálního průměru 8 milimetrů a vnější elektroda, která má válcový tvar, může nabývat maximálního průměru 20 milimetrů. Před vstupem iontů do orbitrapu se nachází tzv. C-trap, jeho funkce je nashromáždit ionty vycházející z předcházejícího hmotnostního analyzátoru, kterým v této technice bývá lineární iontová past a následně je vpustit do orbitrapu. Schématické znázornění hmotnostního spektrometru s předcházejícím složením komponentů zobrazuje obrázek č. 23. Orbitrap musí být do hmotnostního spektrometru zapojen kolmo k toku iontů, to znamená, že je především zapojován pod předcházející hmotnostní analyzátor a ionty jsou do prostoru elektrod přiváděny právě

kolmo k ose orbitrapu. Ionty o specifickém poměru hmotnosti a náboje jsou přivedeny do prostoru mezi vnitřní a vnější elektrodou orbitrapu, kde oscilují vlivem elektrostatického potenciálu od jednoho konce vnitřní elektrody k druhému po prstencových drahách. Tím, že ionty krouží kolem elektrody, indukují svým nábojem na jejím povrchu elektrický proud, který je zaznamenáván v čase. Ten je následně vyhodnocován Fourierovou transformací na výsledný poměr hmotnosti a náboje iontu.



Převzato z mcponline.org

Obrázek č. 23: Schématického znázornění hmotnostního spektrometru s technikou orbitrap, A-lineární iontová past, B-C-trap, C-Orbitrap s trajektorií pohybu iontů.

1.7.2 Kolizní cely a fragmentace iontů

Část hmotnostního spektrometru, která slouží k fragmentaci molekulových iontů na dceřinné ionty se nazývá kolizní cely. Kolizní cely v tandemových hmotnostních spektrometrech typu triple quad jsou umístěny mezi iontovými separátory.

Častou technikou pro štěpení molekulových iontů je metoda disociace iontů prostřednictvím srážek s molekulami inertního plynu, tato metoda štěpení iontů nese svůj původní název z angličtiny a to Collision-induced Dissociation, nebo-li CID²⁶. Principiálně dochází ke štěpení molekulových iontů plynnou fází. Molekulové ionty vycházející z iontového zdroje přes první iontový separátor jsou zachyceny v prostoru kolizní cely. Uvnitř cely jsou molekulové ionty podrobeny působení urychlovacího napětí v prostoru vysokého vakua a to nejčastěji elektrickým potenciálem, aby molekulové ionty získaly vyšší hodnoty kinetické energie. Molekulé ionty s vyšší energií budou ochotněji štěpit vazby se svými vazebnými partnery, jelikož jim už není třeba dodat velké množství energie na disociaci chemické vazby. Takto energeticky bohaté molekulové ionty se střetávají s molekulami inertního plynu, nejčastěji je používán hélium a argon, anebo může být používán také dusík, které srážkou zapříčiní rozpad chemické vazby. Je to tím, že kinetická

energie molekul inertního plynu je po srážce předána molekulovému iontu ve formě disociační energie potřebné na rozštěpení chemické vazby. To má tedy za následek rozpad původní molekuly iontu na menší dceřinné fragmenty, které následně vstupují do dalšího hmotnostního analyzátoru až k detektoru.

Jednou z novějších metod, která se začíná v poslední době využívat a to zejména v oblasti biochemie pro stanovení peptidů a proteinů je disociace iontu elektronovým záchytem, která opět nachází svůj původní název z anglického termínu Electron Capture Dissociation, též také ECD. Tato metoda využívá ke štěpení molekulových iontů elektrony o nízké energii. Molekulový ion pohlcuje elektron a vytváří tak radikál, ty molekulu s nepárovým elektronem, které jsou zpravidla značně nestabilní. Tím dochází k disociaci molekuly na menší fragmenty a opětovné stabilizaci systému. Nejčastěji jsou štěpeny peptidové vazby, tedy vazby které jsou uskutečnění prostřednictvím dusíkového atomu jednoho peptidu nebo aminokyseliny spojené s karboxylovou skupinou dalšího peptidu či aminokyseliny za vývoje vody. Obecně molekuly peptidů díky své velké molekulové hmotnosti jsou několikanásobně protonizovány, jak již bylo vysvětleno v oddíle 1.6.1 u elektronspreje, a tím dochází k několikanásobné fragmentaci hlavního řetězce a tím možnému vytvoření celé řady peptidů s různými posttranslačními modifikacemi hlavního řetězce, které nejsou zpravidla příliš stabilní. S touto metodou je úzce spjata metoda ETD²⁷-Electron Transfer Dissociation nebo-li disociace přenosem elektronů, která funguje na podobném principu jako ECD. Liší se od ETD tím, že molekula peptidu, která musí být ve formě protonovaného molekulárního iontu $[AB + H]^+$ interaguje s aniontem fluorarethenu, jež je nositelem nepárového elektronu. Po přijetí elektronu se peptid opět štěpí v důsledku přerušení peptidových vazeb hlavního řetězce. Oproti ECD se díky této technice získávají lepší rozlišení ve výsledných hmotnostních spektrech a to zejména u peptidů s nižší molekulovou hmotností. ETD má výsadní postavení pro analýzu peptidů a proteinů v top-down proteomice.

2. Experimentální část

V experimentální části se nejdříve budu zabývat vývojem metody pro stanovení Ibuprofenu v lidské K_3EDTA plazmě. Ibuprofen²⁸ je medikament používaný na tlumení bolesti, potlačení zánětů a snížení horeček. V druhé části se budu zabývat vývojem metody pro stanovení Atorvastatinu v lidské K_3EDTA plazmě. Atorvastatin²⁹ se využívá ke snížení cholesterolu v cévách a také jako prevence před mozkovou mrtvicí.

2.1 Stanovení IBUPROFENU a ATORVASTATINU s metabolitem 2-Hydroxy ATORVASTATINU v lidské K_3EDTA plazmě metodou HPLC-MS/MS

2.1.1 Úvod

Navážením požadovaného množství Ibuprofenu a následným ředěním v koncentračním rozsahu 24,77 – 4993,10 $\mu\text{g/ml}$ byla provedena optimalizace MS/MS a záhy naměřena hmotnostní spektra. Poté byla provedena optimalizace HPLC. Po optimalizaci soustavy byla naměřena kalibrační závislost ve vodné fázi bez přidavku interního standardu I.S, jimž byl použit Ketoprofen. Po dosažení výsledků s maximálními odchylkami 15% v kalibrační závislosti ve výše zmíněném koncentračním rozsahu, byly naředěny biologické kalibrační standardy. Plazma obsahující Ibuprofen byla po přidavku interního standardu a 1,5% kyseliny trihydrogen fosforečné H_3PO_4 extrahována směsí diethylether-dichlormethan DEE-DCM (80:20, v/v), centrifugována a poté vymrazena. Horní organická vrstva byla následně odpařena do sucha na vakuové odparce. Rekonstituovaný Ibuprofen a I.S. byly stanovovány vysokoúčinnou chromatografií na koloně s reverzní fází a s následnou MS/MS detekcí. Vzorky byly před analýzou uchovávány v lednici a standardy Ibuprofenu a I.S. skladovány v mrazáku při teplotách v rozmezí -70 – -85°C. Pro stanovení Ibuprofenu v koncentračním rozsahu 0,25 – 49,93 $\mu\text{g/ml}$ bylo potřeba 250 μl lidské K_3EDTA plazmy.

Navážením požadovaného množství Atorvastatinu a jeho metabolitu 2-Hydroxy Atorvastatinu a následným ředěním v koncentračních rozsazích 10,28 – 4157,89 ng/ml a 20,85 – 3365,25 ng/ml byla provedena optimalizace MS/MS a záhy naměřena hmotnostní

spektra. Poté byla provedena optimalizace HPLC. Po optimalizaci soustavy byla naměřena kalibrační závislost ve vodné fázi bez přídavku interního standardu I.S, jímž byla použita kyselina Hydroxy Simvastatin. Po dosažení výsledků s maximálními odchylkami 15% v kalibrační závislosti ve výše zmíněném koncentračním rozsahu, byly naředěny biologické kalibrační standardy. Plazma obsahující Atorvastatin s jeho metabolit byly po přídavku interního standardu a 0,2 M mravenčanu amonného NH_4COOH extrahovány směsí diethylether-dichlormethan DEE-DCM (60:40, v/v), centrifugována a poté vymražena. Horní organická vrstva byla následně odpařena do sucha na vakuové odparce. Rekonstituovaný Atorvastatin s metabolitem a I.S. byly stanovovány vysokoúčinnou chromatografií na koloně s reverzní fází a s následnou MS/MS detekcí. Vzorky byly před analýzou uchovávány v lednici a standardy Atorvastatinu, metabolitu a I.S. byly skladovány v mrazáku při teplotách v rozmezí $-70 - -85^\circ\text{C}$. Pro stanovení Atorvastatinu v koncentračním rozsahu 0,10 – 49,93 ng/ml a 2-Hydroxy Atorvastatinu v koncentračním rozsahu 0,21 – 33,65 ng/ml bylo potřeba 250 μl lidské K_3EDTA plazmy.

2.1.2 Chemické vlastnosti Ibuprofenu a Ketoprofenu

Strukturní vzorce a základní chemicko-fyzikální vlastnosti Ibuprofenu a Ketoprofenu jsou uvedeny v následujících odstavcích.

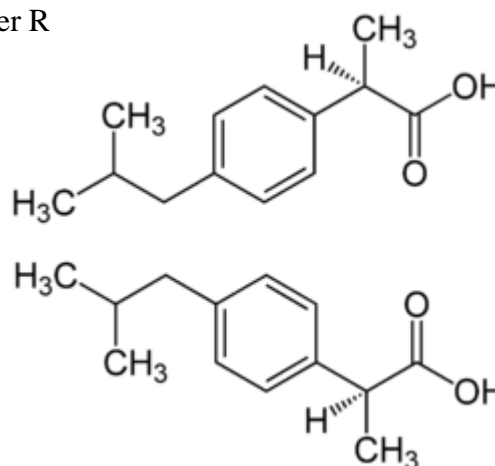
Ibuprofen:

Systematický název: (RS)-2-(4-(2-methylpropyl)fenyl)propanová kyselina

Sumární vzorec: $C_{13}H_{18}O_2$

Molekulová hmotnost: 206,28 g/mol

Chemický vzorec: 1.chemický vzorec-enantiomer R



Teplota tání: 74 – 76°C

Vzhled: bílý prášek

Rozpustnost: nízká ve vodě a vysoká v ethanolu

Konformace: vytváří enantiomery R,S

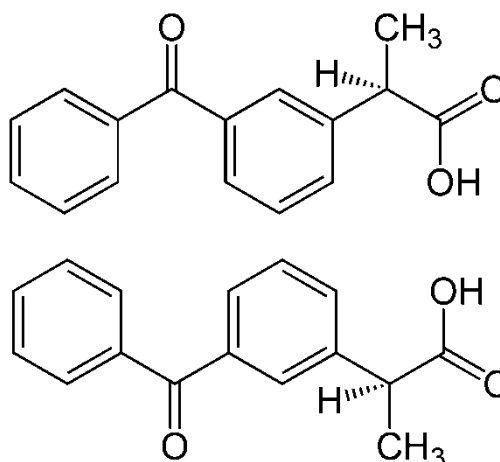
Ketoprofen:

Systematický název: (RS)-2-(3-benzoylfenyl) propanová kyselina

Sumární vzorec: $C_{16}H_{14}O_3$

Molekulová hmotnost: 254,28 g/mol

Chemický vzorec: 1.chemický vzorec-enantiomer R



Teplota tání: 94°C

Vzhled: bílý prášek

Rozpustnost: nízká ve vodě a vysoká v ethanolu

Konformace: vytváří enantiomery R,S

2.1.3 Chemické vlastnosti Atorvastatinu, 2-Hydroxy Atorvastatinu a kyseliny Simvastatinu

Strukturní vzorce a základní chemicko-fyzikální vlastnosti Atorvastatinu s metabolitem 2-Hydroxy Atorvastatinem a kyseliny Simvastatinu jsou uvedeny v následujících odstavcích.

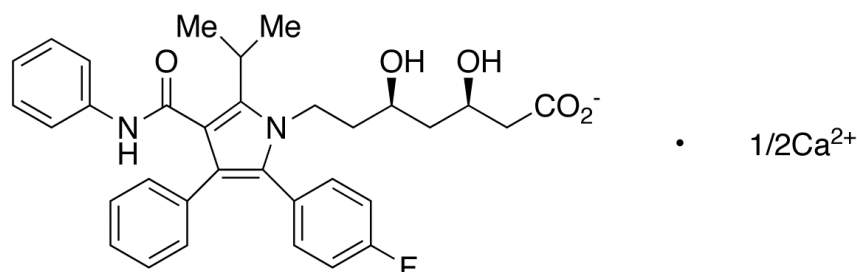
Monovápenatá sůl trihydrátu Atorvastatinu:

Systematický název: trihydrát monovápenaté soli kyseliny (3R,5R)-7-[3-fenyl-2-(4-fluorofenyl)-4-(fenylkarbamoyl)-5-propan-2-yl-pyrol-1-yl]-3,5-dihydroxyheptanové

Sumární vzorec: $C_{33}H_{34}FN_2O_5 \cdot 0,5Ca \cdot 1,5H_2O$

Molekulová hmotnost: 604,69 g/mol

Chemický vzorec:



Teplota tání: 176 – 178°C

Vzhled: bílý prášek

Rozpustnost: nízká ve vodě a rozpustný v methanolu

Konformace: nevytváří enantiomery R,S

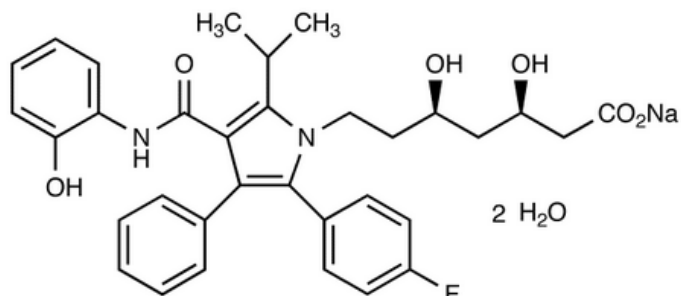
Monosodná sůl dihydrátu 2-Hydroxy Atorvastatinu:

Systematický název: dihydrát monosodné soli kyseliny(βR,σR)-2-(4-Fluorofenyl)-β,σ-dihydroxy-4-[(2-hydroxyfenyl)amino]karbonyl]-5-(1-methylethyl)-3-fenyl-1H-pyrol-1-heptanové

Sumární vzorec: $C_{33}H_{38}FN_2O_6Na \cdot 2H_2O$

Molekulová hmotnost: 632,65 g/mol

Chemický vzorec:



Teplota tání: 132 – 134°C

Vzhled: nažloutlý prášek

Rozpustnost: nízká ve vodě a rozpustný v methanolu

Konformace: nevytváří enantiomery R,S

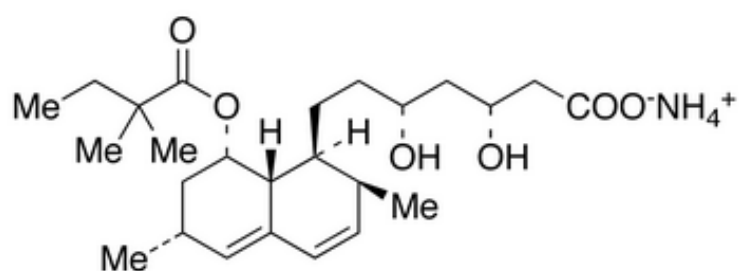
Amoniakální sůl kyseliny hydroxy Simvastatinu:

Systematický název: amoniakální sůl kyseliny (β R, δ R,1S,2S,6R,8S,8aR)-8-(2,2-Dimethyl-1-oxobutoxy)-1,2,6,7,8,8a-hexahydro- β , δ -dihydroxy-2,6-dimethyl-1-naftalenheptanové

Sumární vzorec: $C_{25}H_{43}NO_6$

Molekulová hmotnost: 453,61 g/mol

Chemický vzorec:



Teplota tání: 128 – 131°C

Vzhled: bílý prášek

Rozpustnost: rozpustný ve vodě a methanolu

Konformace: nevytváří enantiomery R,S

2.1.4 Použité chemikálie, laboratorní nádobí a technická zařízení

Ibuprofen, Sigma-Aldrich (IBU)

Ketoprofen, Sigma-Aldrich (I.S)

Atorvastatine Calcium Trihydrate, European Pharmacopeia (ATN)

2-Hydroxy Atorvastatin dihydrate monosodium salt, Toronto Research Chemicals Inc. (OH-ATN)

Simvastatin Hydroxy Acid Ammonium Salt, Toronto Research Chemicals Inc. (I.S.)

Methanol pro HPLC, J.T. Baker (MeOH)

Acetonitrile Ultra Gradient HPLC Grade, J.T. Baker (AcN)

Destilovaná voda, Aqua Osmotic (H₂O)

Diethylether, Sigma-Aldrich (DEE)

Dichlormethan, Merck (DCM)

Amoniak, Sigma-Aldrich (NH₃)

Kyselina octová, Merck (HAc)

Octan amonný, Sigma-Aldrich (NH₄Ac)

Kyselina ortho-fosforečná 85%, Merck (H₃PO₄)

Mravenčan amonný, Sigma-Aldrich (NH₄COOH)

Kyselina mravenčí, 98% Sigma-Aldrich (HCOOH)

K₃EDTA, Sigma-Aldrich

Analytické váhy, ER-120-A, A&D Comp.

Vortex, Thermolyne 16700 Mixer

Mrazák, -75°C, RUA Instruments

Lednice, Gorenje HS2966

Centrifuga K23 a K23 D, MLW

Automatické pipety 50 – 200 µl, 200 – 1000 µl, 1000 – 5000 µl

Kádinky 250 ml, 800 ml

Odměrné válce 50 ml, 100 ml, 500 ml

Odměrná baňka 100 ml

Magnetické míchadlo

Skleněné zkumavky s kulatým dnem, 100 x 16 mm, kónické zkumavky 100 x 10mm

Rotační vakuová odparka, RVC 2-25 a RVC Alpha, Christ

pH metr, PHM 210 Standard pH meter, Radiometer

HPLC-Autosampler & Pumpa, Waters Alliance 2695

Nástříkový port, Harvard apparatus pump 11

Hamiltoniánka, Hamilton Bonaduz-Schweiz, Gastight#1725

MS/MS, Waters Quattro Ultima VB 273

Program MassLynx V4.1

Kolona, Atlantis dC18, 10 cm x 3,0 mm, 3 μ m, Waters

Použitá plazma: lidská plazma + antikoagulants 20% K₃EDTA

Přídavek 100 μ l antikoagulants do 10 ml krve

koncentrace K₃EDTA: 2,0 mg / 1 ml lidské krve

2.1.5 Příprava roztoků rozpouštědel, mobilní fáze, extrakčních činidel a kalibračních standardů Ibuprofenu a Ketoprofenu

Rozpouštědla: AcN – H₂O, 75/25 – v/v, dále značeno jako R₁1

Bylo odměřeno 150 ml acetonitrilu v odměrném válci, které byly smíchány s 50 ml předem odměřené destilované vody do 250 ml kádinky. Roztok byl poté míchán na magnetické míchače 5 min.

MeOH – H₂O, 70/30 – v/v, dále značeno jako R₁2

Bylo odměřeno 70 ml methanolu v odměrném válci, které byly smíchány s 30 ml předem odměřené destilované vody do 250 ml kádinky. Roztok byl poté míchán na magnetické míchače 5 min.

Mobilní fáze A: AcN – H₂O, 80/20 – v/v

Bylo odměřeno 400 ml acetonitrilu v odměrném válci, které byly smíchány se 100 ml předem odměřené destilované vody do 800 ml kádinky. Mobilní fáze byla míchána na magnetické míchače 5 min.

Mobilní fáze B: NH₄Ac, 10mM

Bylo odváženo přesně 0,385 g octanu amonného, který byl rozpuštěn v 500 ml předem odměřené destilované vodě do 800 ml kádinky. Mobilní fáze byla míchána na magnetické míchače 5 min. K výpočtu navážky octanu amonného byl použit vztah (26):

$$26) \quad c = \frac{n}{V} = \frac{m}{M_r \cdot V} \rightarrow m = c \cdot M_r \cdot V,$$

kde c je molární koncentrace, n látkové množství, V objem rozpouštědla, M_r molekulová hmotnost rozpouštěné látky a m hmotnost rozpouštěné látky.

Mobilní fáze C: NH₄OH, 40mM

Bylo odváženo přesně 0,340 g amoniaku, který byl rozpuštěn ve 100 ml předem odměřené destilované vodě do 800 ml kádinky. K tomuto roztoku bylo přidáno 400 ml acetonitrilu. Mobilní fáze byla míchána na magnetické míchače 5 min. K výpočtu koncentrace byl použit vztah (26 a vztah 27):

$$27) \quad c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

Extrakční činidla: H_3PO_4 , 1,5% roztok H_3PO_4 , dále označováno jako E₁1

Bylo odměřeno 1,8 ml 85% H_3PO_4 , ke kterému bylo přilito 100 ml předem odměřené destilované vody do 250 ml kádinky. Roztok byl míchán na magnetické míchačce 5 min.

DEE – DCM, 80/20 – v/v, dále označováno jako E₁2

Bylo odměřeno 800 ml diethyletheru a převedeno do zásobní lahve, následně bylo přilito 200 ml dichlormethanu. Celý roztok byl promíchán a zavřen dávkovačem.

Pro přípravu kalibračních standardů bylo naváženo přesně 0,0490 g IBU a následně rozpuštěno v 10 ml R₁2. Výpočet koncentrace STOCK IBU vychází z následujících údajů:

Stechiometrický faktor standardu IBU (F_s): 1,0000

Faktor čistoty standardu IBU (F_c): 1,0190

$$\begin{aligned} \text{Výsledná koncentrace STOCK IBU:} \quad c &= \frac{m}{V} \cdot F_s \cdot F_c \\ c &= 4,9931 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml} = 4993,1 \text{ } \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Údaje o ředění standardů IBU jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Kalibrační standardy IBU – ředění standardů.

	Objem [ml]	Ředěný standard	Koncentrace standardu [$\mu\text{g/ml}$]	Objem [ml]	Ředěno MeOH–H ₂ O (70/30,v/v)	Výsledná koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]
A	1,00	STOCK IBU	4993,10	1,00	MeOH–H ₂ O	2496,55
B	1,00	A	2496,55	1,00	MeOH–H ₂ O	1248,28
C	1,00	B	1248,28	1,00	MeOH–H ₂ O	624,14
D	1,00	C	624,14	1,00	MeOH–H ₂ O	312,07
E	1,00	D	312,07	1,00	MeOH–H ₂ O	156,03
F	1,00	E	156,03	1,00	MeOH–H ₂ O	78,02
G	1,00	F	78,02	0,75	MeOH–H ₂ O	44,58
H	1,00	G	44,58	0,80	MeOH–H ₂ O	24,77

Pro přípravu I.S. bylo naváženo přesně 0,0100 g I.S. a následně rozpuštěno v 10 ml R₁2.

Výpočet koncentrace STOCK I.S. vychází z následujících údajů:

Stechiometrický faktor standardu I.S. (F_s): 1,0000

Faktor čistoty standardu I.S. (F_c): 1,0000

$$\begin{aligned} \text{Výsledná koncentrace STOCK I.S.:} \quad c &= \frac{m}{V} \cdot F_s \cdot F_c \\ c &= 0,0010 \text{ g/ml} = 1000,0 \text{ } \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Pro měření hmotnostních spekter byl použit tisíckrát ředěný standard I.S. Výpočet koncentrace vychází ze vztahu (27), kde bylo použito 99,9 ml R₁₂ a 100 µl I.S. na výslednou koncentraci 1,0000 µg/ml.

2.1.6 Příprava roztoků rozpouštědel, mobilní fáze, extrakčních činidel a kalibračních standardů Atorvastatinu, 2-Hydroxy atorvastatinu a kyseliny Simvastatinu

Rozpouštědlo: AcN – H₂O, 70/30 – v/v, dále označováno jako R_{A1}

Bylo odměřeno 140 ml acetonitrilu v odměrném válci, které byly smíchány s 60 ml předem odměřené destilované vody do 250 ml kádinky. Roztok byl poté míchán na magnetické míchačce 5 min.

Mobilní fáze A: AcN

Bylo odměřeno 500 ml acetonitrilu v odměrném válci. Toto množství bylo přelito do 800 ml kádinky.

Mobilní fáze B: NH₄COOH, 5mM

Bylo odváženo přesně 0,158 g mravenčanu amonného, který byl rozpuštěn v 500 ml předem odměřené destilované vodě do 800 ml kádinky. Mobilní fáze byla míchána na magnetické míchačce 5 min. K výpočtu navážky mravenčanu amonného byl použit vztah 26.

Mobilní fáze C: HCOOH, 0,5% roztok HCOOH

Bylo odpipetováno 2,5 ml koncentrované kyseliny mravenčí, která byla doplněna 500 ml předem odměřené destilové vody do 800 ml kádinky. Mobilní fáze byla míchána na magnetické míchačce 5 min.

Extrakční činidla: NH₄COOH, 0,2 M, dále označováno jako E_{A1}

Bylo naváženo 1,26 g mravenčanu amonného, ke kterému bylo přilito 100 ml předem odměřené destilované vody do 250 ml kádinky. Roztok byl míchán na magnetické míchačce 5 min.

DEE – DCM, 60/40 – v/v, dále označováno jako E_{A2}

Bylo odměřeno 600 ml diethyletheru a převedeno do zásobní lahve, následně bylo přilito 400 ml dichlormethanu. Celý roztok byl promíchán a zavřen dávkovačem.

Pro přípravu kalibračních standardů bylo naváženo přesně 0,0026 g ATN, převedeny do 100 ml odměrné baňky a následně doplněny po rysku v R_{A1}. Výpočet koncentrace STOCK ATN vychází z následujících údajů:

Stechiometrický faktor standardu ATN (F_s): 0,9239

Faktor čistoty standardu ATN (F_č): 0,9520

Výsledná koncentrace STOCK ATN: $c = \frac{m}{V} \cdot F_s \cdot F_{\check{c}}$
 $c = 22,8684 \cdot 10^3 \text{ ng/ml}$

Údaje o ředění standardů ATN jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Kalibrační standardy ATN – ředění standardů.

	Objem [ml]	Ředěný standard	Koncentrace standardu [ng/ml]	Objem [ml]	Ředěno AcN–H ₂ O (70/30,v/v)	Výsledná koncentrace [ng/ml]
A	0,20	STOCK ATN	$22,8684 \cdot 10^3$	0,90	AcN–H ₂ O	4157,89
B	0,60	A	4157,89	1,00	AcN–H ₂ O	1559,21
C	0,60	B	1559,21	1,00	AcN–H ₂ O	584,70
D	0,60	C	584,70	1,00	AcN–H ₂ O	219,26
E	0,60	D	219,26	1,00	AcN–H ₂ O	82,22
F	0,60	E	82,22	1,00	AcN–H ₂ O	30,83
G	0,50	F	30,83	1,00	AcN–H ₂ O	10,28

Pro přípravu kalibračních standardů bylo naváženo přesně 0,0013 g OHATN, převedeny do 100 ml odměrné baňky a následně doplněny po rysku v R_{A1}. Výpočet koncentrace STOCK OHATN vychází z následujících údajů:

Stechiometrický faktor standardu OHATN (F_s): 0,9083

Faktor čistoty standardu OHATN (F_č): 0,9500

Výsledná koncentrace STOCK OHATN: $c = \frac{m}{V} \cdot F_s \cdot F_{\check{c}}$
 $c = 11,2175 \cdot 10^3 \text{ ng/ml}$

Údaje o ředění standardů OHATN jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Kalibrační standardy OHATN – ředění standardů.

	Objem [ml]	Ředěný standard	Koncentrace standardu [ng/ml]	Objem [ml]	Ředěno AcN–H ₂ O (70/30,v/v)	Výsledná koncentrace [ng/ml]
A	0,30	STOCK OHATN	$11,2175 \cdot 10^3$	0,70	AcN–H ₂ O	4157,89
B	0,75	A	4157,89	1,00	AcN–H ₂ O	1559,21
C	0,75	B	1559,21	1,00	AcN–H ₂ O	584,70
D	0,75	C	584,70	1,00	AcN–H ₂ O	219,26
E	0,75	D	219,26	1,00	AcN–H ₂ O	82,22
F	0,75	E	82,22	1,00	AcN–H ₂ O	30,83
G	0,75	F	30,83	1,00	AcN–H ₂ O	10,28

Pro přípravu I.S. bylo naváženo přesně 0,0010 g I.S. a následně rozpuštěno ve 100 ml R_A1.

Výpočet koncentrace STOCK I.S. vychází z následujících údajů:

Stechiometrický faktor standardu I.S. (F_s): 1,0000

Faktor čistoty standardu I.S. (F_c): 1,0000

Výsledná koncentrace STOCK I.S.: $c = \frac{m}{V} \cdot F_s \cdot F_c$

$$c_{ST1} = 10 \mu\text{g/ml} = 10,0 \cdot 10^3 \text{ ng/ml}$$

Pro měření hmotnostních spekter byl použit standard s výše vypočtenou koncentrací. Standard I.S. použitý do biologických standardů v K₃EDTA plazmě byl desettisíckrát naředěn. Výpočet koncentrace vychází ze vztahu 27, kde bylo použito 99,9 ml R_A1 a 100 μ l I.S. na výslednou koncentraci $c_{ST2} = 10 \text{ ng/ml}$. Poté byl takto vzniklý standard ještě desetkrát zředěn, kde bylo použito 1 ml c_{ST2} a 9,0 ml R_A1 na výslednou koncentraci $c_{STV} = 1 \text{ ng/ml}$.

2.1.7 Příprava biologických standardů Ibuprofenu v lidské K₃EDTA plazmě

Pro přípravu biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě bylo využito koncentrační rozmezí kalibračních standardů podle tabulky č. 1. Ředění biologických standardů IBU bylo provedeno podle tabulky č. 4.

Tabulka č. 4: Ředění biologických standardů IBU v lidské K₃EDTA plazmě.

	Přidaný standard	Objem μl	Přidaná plazma ml	Koncentrace Standardu μg/ml
S1	STOCK IBU	100	9,90	49,93
S2	A	100	9,90	24,97
S3	B	100	9,90	12,48
S4	D	100	9,90	3,12
S5	E	100	9,90	1,56
S6	G	100	9,90	0,45
S7	H	100	9,90	0,25

2.1.8 Příprava biologických standardů Atorvastatinu a 2-Hydroxy Atorvastatinu v lidské K₃EDTA plazmě

Pro přípravu biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě bylo využito koncentrační rozmezí kalibračních standardů podle tabulky č. 2 a 3. Ředění biologických standardů ATN a OHATN bylo provedeno podle tabulky č. 5.

Tabulka č. 5: Ředění biologických standardů ATN a OHATN v lidské K₃EDTA plazmě.

	Přidaný Standard ATN	Objem μl	Přidaný Standard OHATN	Objem μl	Přidaná Plazma ml	Koncentrace standardu v plazmě ATN	ng/ml OHATN
S1	A	50	A	50	4,90	41,58	33,65
S2	B	50	B	50	4,90	15,59	14,42
S3	C	50	C	50	4,90	5,85	6,18
S4	D	50	D	50	4,90	2,19	2,65
S5	E	50	E	50	4,90	0,82	1,14
S6	F	50	F	50	4,90	0,31	0,49
S7	G	50	G	50	4,90	0,10	0,21

2.1.9 Pracovní postup přípravy a měření biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě Ibuprofenu a Atorvastatinu s metabolitem 2-Hydroxy Atorvastatinu s přidavkem I.S. na reverzně fázové HPLC-MS/MS

2.1.9 a)

Do skleněné zkumavky se závitem bylo napipetováno 250 μ l K₃EDTA plazmy. Tento vzorek byl využit jako blank.

2.1.9 b)

Do skleněné zkumavky se závitem bylo napipetováno 250 μ l K₃EDTA plazmy a 25 μ l I.S. Tento vzorek byl označen jako S₀ a byl promíchán 5 s na vortexu.

2.1.9 c)

Do skleněných zkumavek s označením S₇ – S₁ bylo do každé postupně napipetováno 250 μ l biologických standardů S₇ – S₁ z tabulky č. 4 (z tabulky č. 5 u ATN a OHATN) a do každé zkumavky bylo přidáno 25 μ l I.S. Každý vzorek byl promíchán 5 s na vortexu.

2.1.9 d)

Do každé skleněné zkumavky s označením S₇ – S₀ a blanku bylo přidáno 125 μ l extrakčního roztoku E_{I1} (E_{A1} u ATN a OHATN) a mícháno 5 s na vortexu.

2.1.9 e)

Do každé skleněné zkumavky s označením S₇ – S₀ a blanku byly přidány 3 ml extrakčního roztoku E_{I2} (E_{A2} u ATN a OHATN) a mícháno 45 s na vortexu.

2.1.9 f)

Sadu vzorků S₇ – S₀ a blanku byly po extrakci z biologické fáze do extakčních činidel umístěny do centrifugy a centrifugovány 10 min při asi 3000 ot./min.

2.1.9 g)

Do 500 ml kádinky byla připravena mrazící směs přibližně 100 g CO₂(s) s 10 ml methanolu.

2.1.9 h)

Po dokončení extrakce vzorků S₇ – S₀ a blanku byly ponořeny do mrazící směsi a vymrazovány přibližně 1 min.

2.1.9 i)

Horní vrstva organického rozpouštědla a extrakčních činidel byly přelity do připravených kónických zkumavek s odpovídajícím označením S₇ – S₀ a blank. V původních vzorcích zbyla pouze pevná fáze K₃EDTA plazmy.

2.1.9 j)

Směs organického rozpouštědla s extrakčními činidly v kónických zkumavkách byly odpařeny na rotační vakuové odparce do sucha při teplotě 40°C, tlaku 15 mbar asi 45 min.

2.1.9 k)

Ke vzniklým odparkům v sadě vzorků S₇ – S₀ a blanku bylo přidáno 100 µl rozpouštědla R₁1 (R_A1 u ATN a OHATN) a vzorky byly rekonstituovány 15 s na vortexu a poté 5 min na centrifuze při asi 4500 ot./min.

2.1.9 l)

Rekonstituované vzorky byly postupně injektovány do vialek 1 – 9 karucelu. Do vialky č. 1 bylo injektováno 100 µl blanku. Do vialky č. 2 bylo injektováno 100 µl S₀. Do vialek č. 3 – 9 byly postupně injektovány vzorky S₇ – S₁ po 100 µl.

2.1.9 m)

Takto připravené vzorky byly proměřeny a vyhodnoceny na optimalizovaném systému reverzně fázové HPLC-MS/MS.

2.1.10 Výsledky a diskuse metody stanovení Ibuprofenu a Atorvastatinu s metabolitem 2-Hydroxy Atorvastatinu v lidské K₃EDTA plazmě s přidavkem I.S.

2.1.10.1 Optimalizace MS/MS pro Ibuprofen

Optimalizované parametry nastavení hmotnostního spektrometru pro IBU jsou uvedeny v tabulce č. 6 a 7.

Tabulka č. 6: Nastavení parametrů iontového zdroje.

Type	MRM
Source	ES-
Capillary [kV]	3,5
Cone [V]	35
Source temperature [°C]	110
Desolvation temperature [°C]	380
Cone gas flow [l/h]	50
Desolvation gas flow [l/h]	400

Tabulka č. 7: Nastavení parametrů kvadrupólových hmotnostních filtrů.

LM Resolution 1	13
HM Resolution 1	13
Ion energy 1 [V]	-1
Multiplier 1 [V]	650
Collision cell [eV]	12
LM Resolution 2	15
HM Resolution 2	15
Ion energy 2 [V]	10
Multiplier 2 [V]	650
Gas cell pirani pressure [mbar]	$1,5 \cdot 10^{-3}$
MSSCAN of molecular ion IBU [m/z]	50 – 300
DAUSCAN of product ion IBU [m/z]	50 – 300
MSSCAN of molecular ion I.S. [m/z]	50 – 300
DAUSCAN of product ion I.S. [m/z]	50 – 300
Channel mass of product ion IBU [g/mol]	161
Channel mass of product ion I.S. [g/mol]	209
Scan time [s]	10
Dwell time [s]	0,5
Span [g/mol]	0,5

2.1.10.2 Optimalizace HPLC pro Ibuprofen

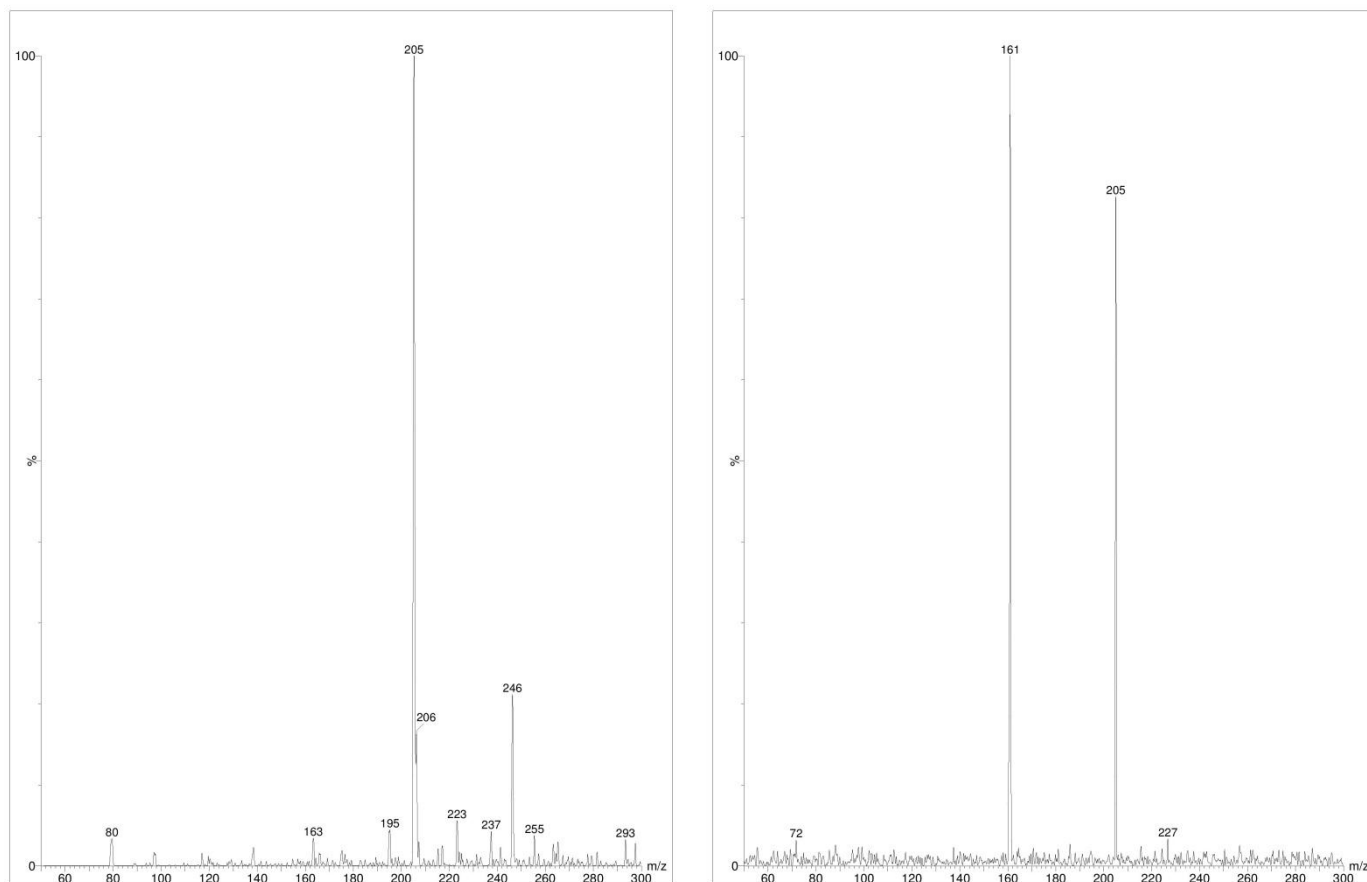
Parametry nastavení vysokoúčinného kapalinového chromatografu pro IBU jsou uvedeny v tabulce č. 8

Tabulka č. 8: Nastavení parametrů HPLC

Autosampler temperature [°C]	10
Stationary phase area temperature[°C]	35
Inject volume [μl]	1
Mobile phase flow [ml/min]	0,4
Mobile phase A [v/v]	AcN – water, 80/20
Mobile phase B [v/v]	NH ₄ Ac
Mobile phase C [v/v]	NH ₄ OH – AcN, 20/80
Inlet method – A,B,C [%]	60,20,20
Analytical column	dC18, 10 cm x 3,0 mm, 3 μm
End of run [min]	1,5

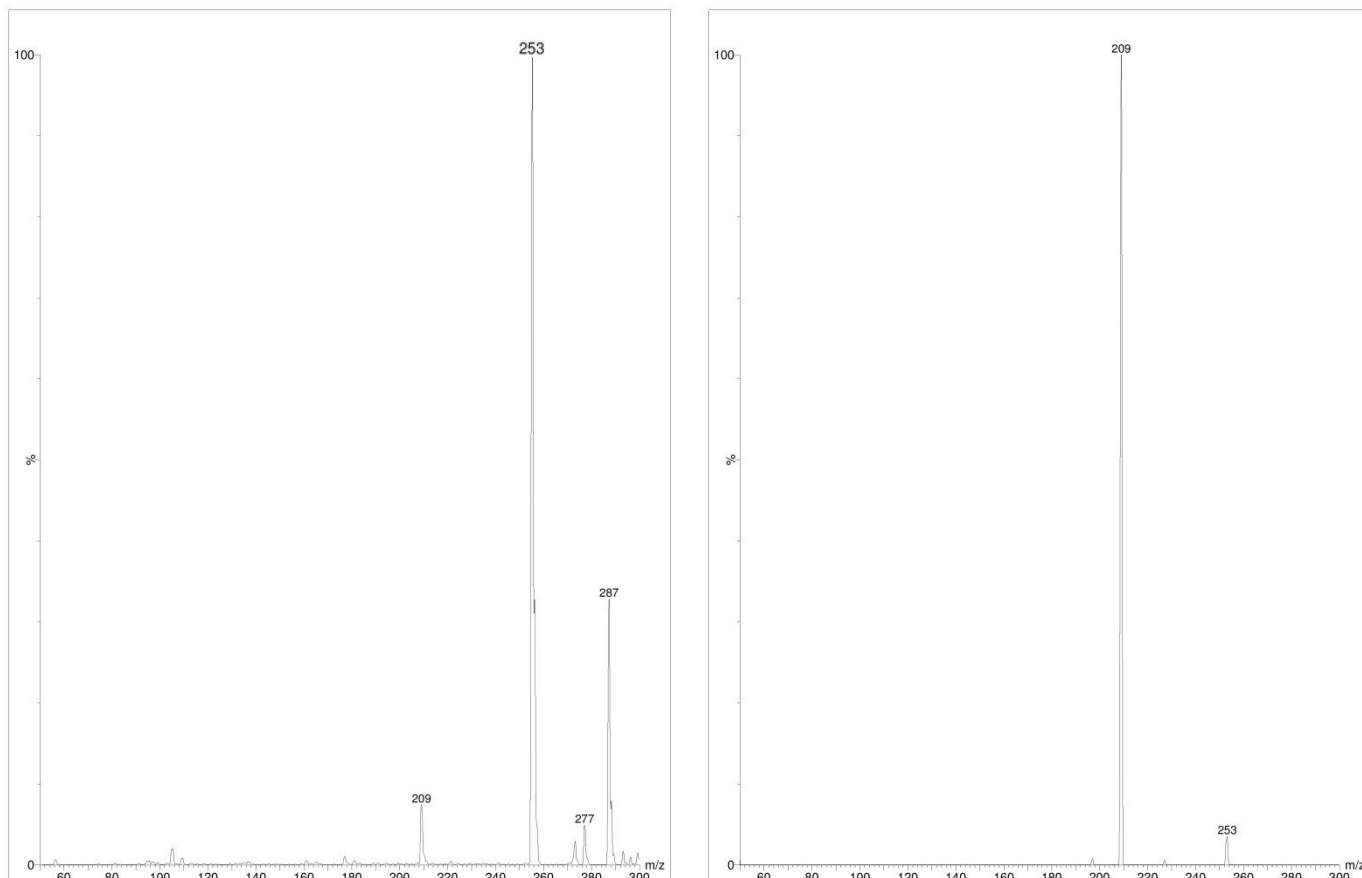
2.1.10.3.a Naměřená hmotnostní spektra Ibuprofenu a Ketoprofenu

Hmotnostní spektrum odpovídající molekulové hmotnosti 205 bylo naměřeno pro kalibrační standard IBU – C, hmotnostní spektra molekulového a dceřinného iontu IBU jsou uvedena na obrázku č. 24. První hmotnostní spektrum odpovídá molekulovému iontu a druhé hmotnostní spektrum dceřinnému iontu IBU – C o molekulové hmotnosti 161.



Obrázek č. 24: Hmotnostní spektra molekulového iontu IBU a dceřinného iontu IBU.

Hmotnostní spektrum odpovídající molekulové hmotnosti 253 bylo naměřeno pro I.S, hmotnostní spektra molekulového a dceřinného iontu I.S. jsou uvedena na obrázku č. 25. První hmotnostní spektrum odpovídá molekulovému iontu a druhé hmotnostní spektrum dceřinnému iontu I.S. o molekulové hmotnosti 209.



Obrázek č. 25: Hmotnostní spektrum molekulového iontu I.S. a dceřinného iontu I.S.

2.1.10.3.b Vyhodnocení hmotnostních spekter Ibuprofenu a Ketoprofenu

Při měření hmotnostních spekter kalibračních standardů IBU, které bylo proměřeno při záporné polaritě na vstupní kapiláře elektronspreje. U všech hmotnostních spekter kalibračních standardů IBU byl získán molekulový ion s molekulovou hmotností 205 s dominantní odezvou. Ve všech spektrech byly zároveň naměřeny adukty a s největším podílem byl naměřen adukt s molekulovou hmotností 246, viz obrázek č. 24. Nejčastějšími adukty v naměřených hmotnostních spektrech doprovázejícími stanovované analyty jsou sodné nebo draselné adukty, jež mají molekulové hmotnosti o 23 a 39,1 jednotek vyšší. Z uvedených spekter je zřejmé, že ani jeden z těchto aduktů není přítomen. Přirůstku

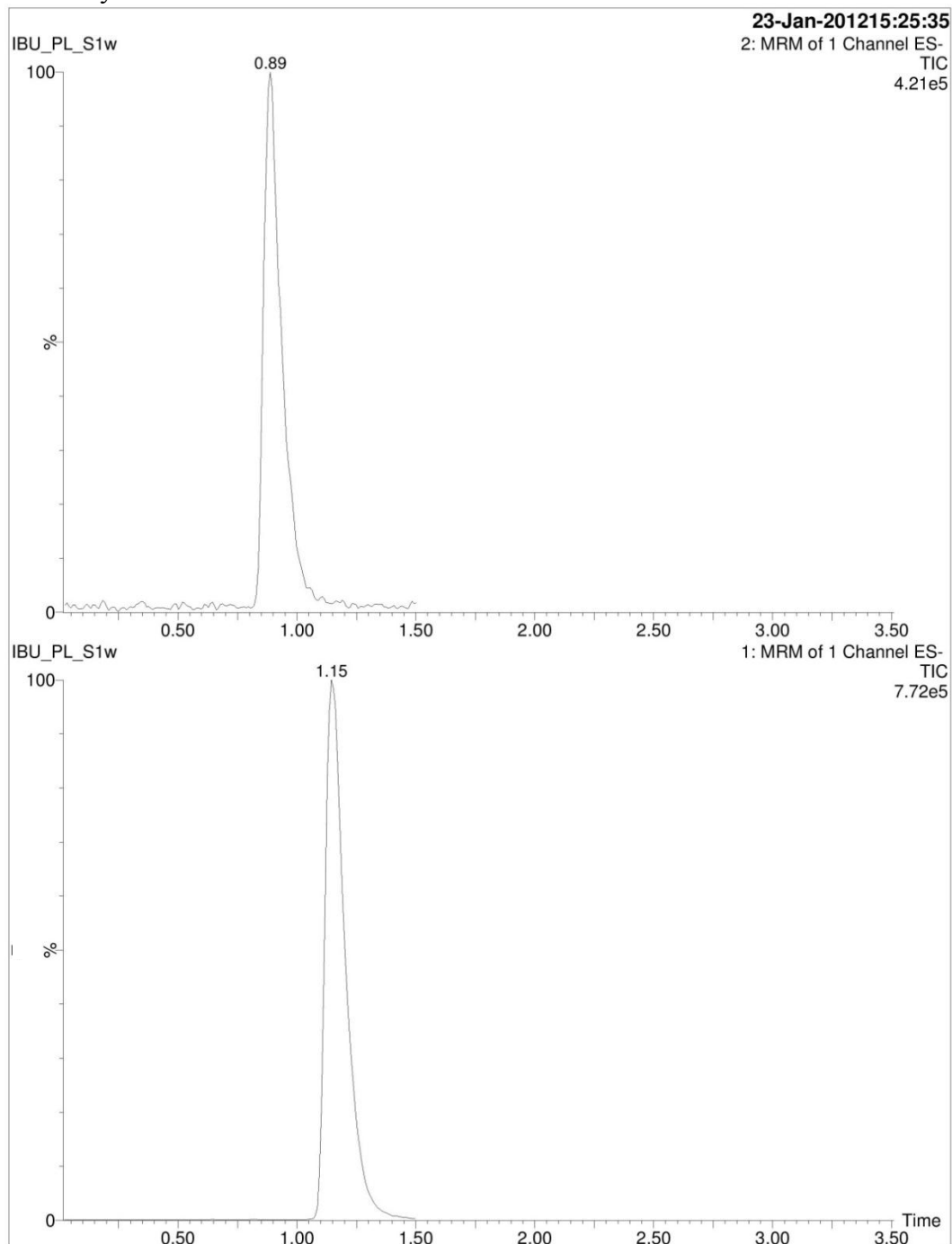
molekulové hmotnosti 41 odpovídá adukt s vápníkem. Použitý standard nebyl ve formě žádné soli IBU od Sigmy-Aldrich a po celou dobu experimentální práce byl patřičně skladován buď v lednici, anebo mrazáku. Jediné vysvětlení přítomnosti tohoto aduktového iontu může souviset s jeho již prošlou dobou trvanlivosti, po kterou je zaručena jeho 100% čistota a jakost.

Pozorovaný dceřinný ion odpovídal molekulové hmotnosti 161. Této molekulové hmotnosti odpovídá odštěpení karboxylové skupiny COOH, která má molekulovou hmotnost 45 a jelikož dceřinný ion byl naměřen v deprotonované formě, získáme odpovídající odečtenou molekulovou hmotnost 44. Ve všech hmotnostních spektrech byl zároveň naměřen molekulový ion, jehož odezva s klesající koncentrací kalibračních standardů a při zachovaném kolizním napětí klesala.

Při měření hmotnostních spekter I.S. (obrázek č. 25) byl naměřen molekulový ion o molekulové hmotnosti 253 a dceřinný ion o molekulové hmotnosti 209, což opět odpovídá odštěpení deprotonované karboxylové skupiny. Nejvíce zastoupený adukt měl molekulovou hmotnost 287.

2.1.10.4.a Naměřené chromatogramy Ibuprofenu a Ketoprofenu v lidské K₃EDTA plazmě

Chromatogram s retenčním časem 0,89 min odpovídá I.S. a chromatogram s retenčním časem 1,15 min odpovídá IBU. Zobrazené chromatogramy jsou pro výsledné biologické standardy v lidské K₃EDTA plazmě IBU, jejichž retenční časy se liší od standardů ve vodné fázi, jak zobrazuje tabulka č.5. Ukázkové chromatogramy IBU a I.S. jsou uvedeny na obrázku č. 26.



Obrázek č. 26: Chromatogramy pro I.S. a IBU.

2.1.10.4.b Vyhodnocení chromatografických píků Ibuprofenu a Ketoprofenu

Při měření nedocházelo k nadměrnému rozmývání chromatografických píků ať už při vzorků rozpuštěných ve vodné fázi, anebo v biologických standardech. Jak vyplývá z tabulky č. 5 v oddíle 2.1.10.5.b, je zřejmé že retenční časy IBU (RT- Retention time) ve vodné fázi jsou delší než u standardů v K₃EDTA plazmě a to téměř dvojnásobně. Bylo to pravděpodobně tím, že rekonstituované standardy byly rozpouštěny v směsi rozpouštědla acetonu s destilovanou vodou (R₁) v poměru 72:25 a kalibrační standardy byly rozpuštěny ve směsi methanolu s destilovanou vodou (R₂) v poměru 70:30. Směs rozpouštědla R₁ je méně polární než směs rozpouštědla R₂ a zjevně svou polaritou odpovídá polaritě IBU. Bylo také vyzkoušeno, že kalibrační standardy které byly rozpuštěny v rozpouštědle R₁, vykazovaly kratší retenční časy a to u IBU i I.S. při stejné optimalizaci HPLC-MS/MS.

2.1.10.5.a Výsledky ve vodné fázi pro Ibuprofen

Do karuselu chromatografu byl do vialky č. 1 napipetován blank a to roztok R₂. Do vialek č. 2 – 9 bylo napipetováno 0,25 ml kalibračních standardů H – A, tedy ve vzestupném koncentačním rozsahu podle tabulky č. 1 v oddíle 2.1.5. Výsledky kalibračních standardů IBU ve vodné fázi jsou v tabulce č. 5.

Compound name: IBU

Coefficient of Determination: $R^2 = 0,998052$

Calibration curve: $-2549,39 * x^2 + 210779 * x + 71455,2$

Response type: External Std., Area

Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

Tabulka č. 5: Výsledky kalibračních standardů IBU.

	Vial	Name	RT	Area	IS Area	Response	Std. Conc	µg/ml	%Dev	Flags	Factor
1	1	IBU_NEAT_Blank	2,04	6568	-	6567,8	-	-	-	bdl	0,0
2	2	IBU_NEAT_S8	2,13	93132	-	93131,7	24,77	10,20	-58,8	bbX	1,0
3	3	IBU_NEAT_S7	2,11	151794	-	151793,5	44,58	37,93	-14,9	bb	1,0
4	4	IBU_NEAT_S6	2,09	239009	-	239009,4	78,02	80,28	2,9	bb	1,0
5	5	IBU_NEAT_S5	2,09	437954	-	437953,5	156,03	177,72	13,9	bb	1,0
6	6	IBU_NEAT_S4	2,10	715141	-	715141,3	312,07	317,68	1,8	bb	1,0
7	7	IBU_NEAT_S3	2,15	1264219	-	1264218	624,14	611,03	-2,1	bb	1,0
8	8	IBU_NEAT_S2	2,12	2256833	-	2256832	1248,28	1215,82	-2,6	MM	1,0
9	9	IBU_NEAT_S1	2,16	3770887	-	3770886	2496,55	2521,52	1,3	bb	1,0

Získaná kalibrační závislost pro IBU ve vodné fázi je uvedena na obrázku č. 27.

Quantify Calibration Report MassLynx 4.1

Page 1 of 1

ibuprofen

Dataset: C:\MassLynx\Vyvoj_IBUPROFEN.PRO\ibuprofen-summary.qld

Last Altered: Monday, May 07, 2012 10:25:13 Central Europe Daylight Time

Printed: At Monday, May 07, 2012 17:02:03 Central Europe Daylight Time

By CEPHA\vondrakova (Daniela Vondrakova)

Method: C:\MassLynx\Vyvoj_IBUPROFEN.pro\MethDB\pokus3.mdb 16 Dec 2011 14:18:02

Calibration: C:\MassLynx\Vyvoj_IBUPROFEN.PRO\CurveDB\ibuprofen_1.cdb 07 May 2012 10:25:13

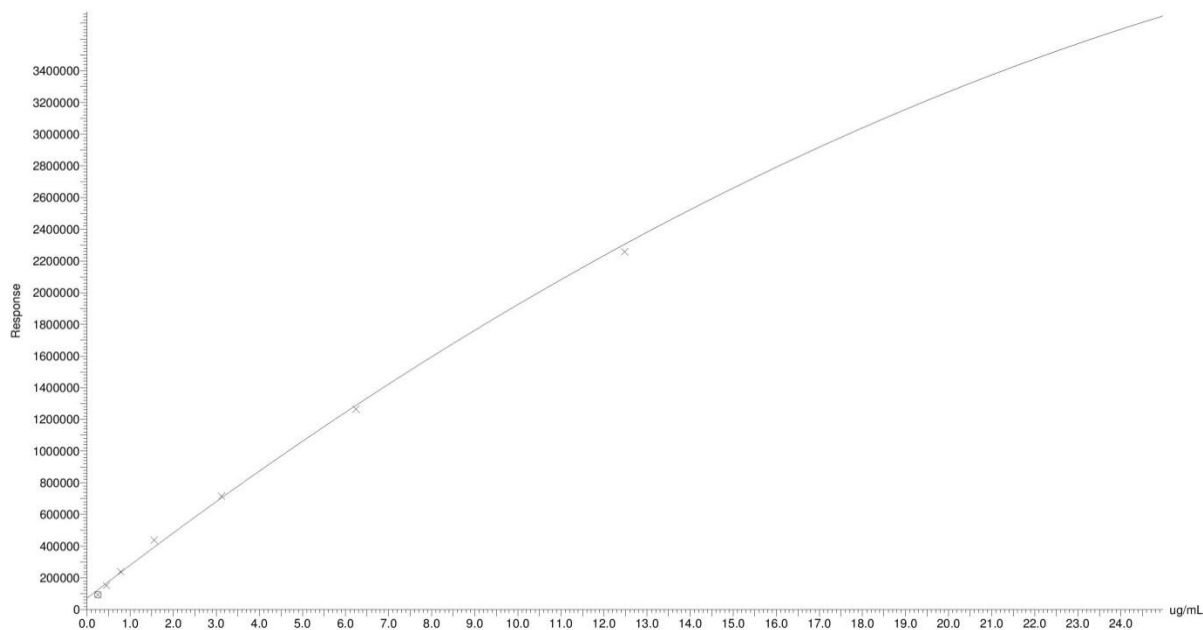
Compound name: IBU

Coefficient of Determination: R² = 0.998052

Calibration curve: $-2549.39 * x^2 + 210779 * x + 71455.2$

Response type: External Std. Area

Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Obrázek č. 27: Kalibrační křivka kalibračních standardů IBU ve vodné fázi.

2.1.10.5.b Vyhodnocení výsledků a kalibrační závislosti ve vodné fázi pro Ibuprofen

Z výsledků je patrné, že pro kalibračními standardy ve vodné fázi lépe vyhovovala kvadratická závislost, která proložila experimentální body s nejmenší chybou. V úvodu 2.1.1 bylo řečeno, že experimentální kalibrační závislost pro kalibrační standardy musí vykazovat maximální odchylku do 15% od jimi proloženou kalibrační závislostí. Z tabulky č. 5 je patrné, že kalibrační standard S₈ tuto podmínku nespnil a byl z kalibrační závislosti vyřazen (bbX). U kalibračního standardu S₂ byly ručně pozměněny parametry integrace chromatografického píku, jelikož původně nastavená integrace metodou programu MassLynx V4.1, nezintegrovala chromatografický pík po celé jeho ploše (MM).

2.1.10.6.a Výsledky kalibrační závislosti v lidské K₃EDTA plazmě pro Ibuprofen a Ketoprofen

Po proměření a vyhodnocení sady vzorků S₇ – S₀ byly získány údaje z tabulky č. 6.

Compound name: IBU

Correlation coefficient: $r = 0,999705$, $r^2 = 0,999411$

Calibration curve: $0,0406398 * x + 0,018677$

Response type: Internal Std. (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

Tabulka č. 6: Výsledky měření biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě pro IBU

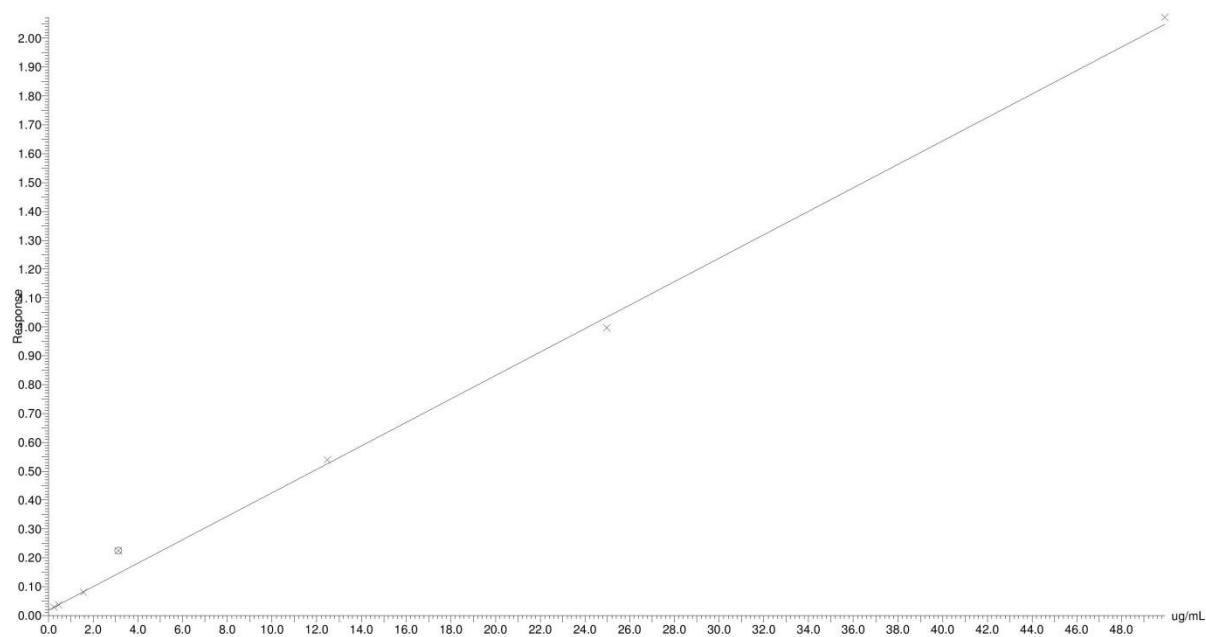
	Vial	Name	RT	Area	IS Area	Response	Std. Conc	µg/ml	%Dev	Flags	Factor
1	1	IBU_PL_Blank	1,14	152	195	0,77898	-	-	-	bb	0,0
2	2	IBU_PL_S0	-	-	39491	-	0,00	-	-	-	1,0
3	3	IBU_PL_S7	1,15	996	34475	0,02890	0,25	0,25	0,6	bb	1,0
4	4	IBU_PL_S6	1,14	1457	39190	0,03717	0,45	0,46	1,1	bb	1,0
5	5	IBU_PL_S5	1,15	3224	39873	0,08087	1,56	1,53	-1,9	bb	1,0
6	6	IBU_PL_S4	1,15	7020	31249	0,22466	3,12	5,07	62,5	bbX	1,0
7	7	IBU_PL_S3	1,15	19378	35933	0,53926	12,48	12,81	2,6	bb	1,0
8	8	IBU_PL_S2	1,14	36754	36884	0,99646	24,97	24,06	-3,6	bb	1,0
9	9	IBU_PL_S1	1,15	74995	36188	2,07236	49,93	50,53	1,2	bb	1,0

Kalibrační závislost biologických standardů K₃EDTA plazmu pro IBU jsou uvedeny na obrázku č. 28.

Quantify Calibration Report MassLynx 4.1 Page 1 of 2
 ibuprofen
 Dataset: C:\MassLynx\Vyvoj_IBUPROFEN.PRO\ibuprofen-summary_plasma.qld
 Last Altered: Monday, May 07, 2012 10:18:57 Central Europe Daylight Time
 Printed: At Monday, May 07, 2012 17:02:41 Central Europe Daylight Time
 By CEPHA\vondrakova (Daniela Vondrakova)

Method: C:\MassLynx\Vyvoj_IBUPROFEN.PRO\MethDB\VSE3.mdb 08 Feb 2012 13:28:01
 Calibration: C:\MassLynx\Vyvoj_IBUPROFEN.PRO\CurveDB\ibuprofen.cdb 07 May 2012 10:18:57

Compound name: IBU
 Correlation coefficient: $r = 0.999705$, $r^2 = 0.999411$
 Calibration curve: $0.0406398 * x + 0.018677$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Obrázek č. 28: Kalibrační křivka biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě pro IBU.

Výsledky měření biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě pro I.S. jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Compound name: I.S.

Response Factor: 36660,4

RRF SD: 2917,83, Relative SD: 795907

Response type: External Std, Area

Curve type RF

Tabulka č. 8: Výsledky biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě pro I.S.

	Vial	Name	RT	Area	IS Area	Response	Std. Conc	µg/ml	%Dev	Flags	Factor
1	1	IBU_PL_Blank	1,43	195	-	194,78	1,00	0,01	-99,5	bb	1,0
2	2	IBU_PL_S0	0,89	39491	-	39490,56	1,00	1,08	7,7	bb	1,0
3	3	IBU_PL_S7	0,89	34475	-	34474,83	1,00	0,94	-6,0	bb	1,0
4	4	IBU_PL_S6	0,89	39190	-	39190,18	1,00	1,07	6,9	bb	1,0
5	5	IBU_PL_S5	0,89	39873	-	39873,20	1,00	1,09	8,8	bb	1,0
6	6	IBU_PL_S4	0,89	31249	-	31248,76	1,00	0,85	-14,8	bb	1,0
7	7	IBU_PL_S3	0,89	35933	-	35933,26	1,00	0,98	-2,0	bb	1,0
8	8	IBU_PL_S2	0,88	36884	-	36884,05	1,00	1,01	0,6	bb	1,0
9	9	IBU_PL_S1	0,89	36188	-	36188,28	1,00	0,99	-1,3	bb	1,0

Kalibrační závislost biologických standardů K₃EDTA plazmu pro I.S. jsou uvedeny na obrázku č. 29.

Quantify Calibration Report MassLynx 4.1

Page 2 of 2

ibuprofen

Dataset: C:\MassLynx\Vyvoj_IBUPROFEN.PRO\ibuprofen-summary_plasma.qld

Last Altered: Monday, May 07, 2012 10:18:57 Central Europe Daylight Time

Printed: At Monday, May 07, 2012 17:02:41 Central Europe Daylight Time

By CEPHA\vondrakova (Daniela Vondrakova)

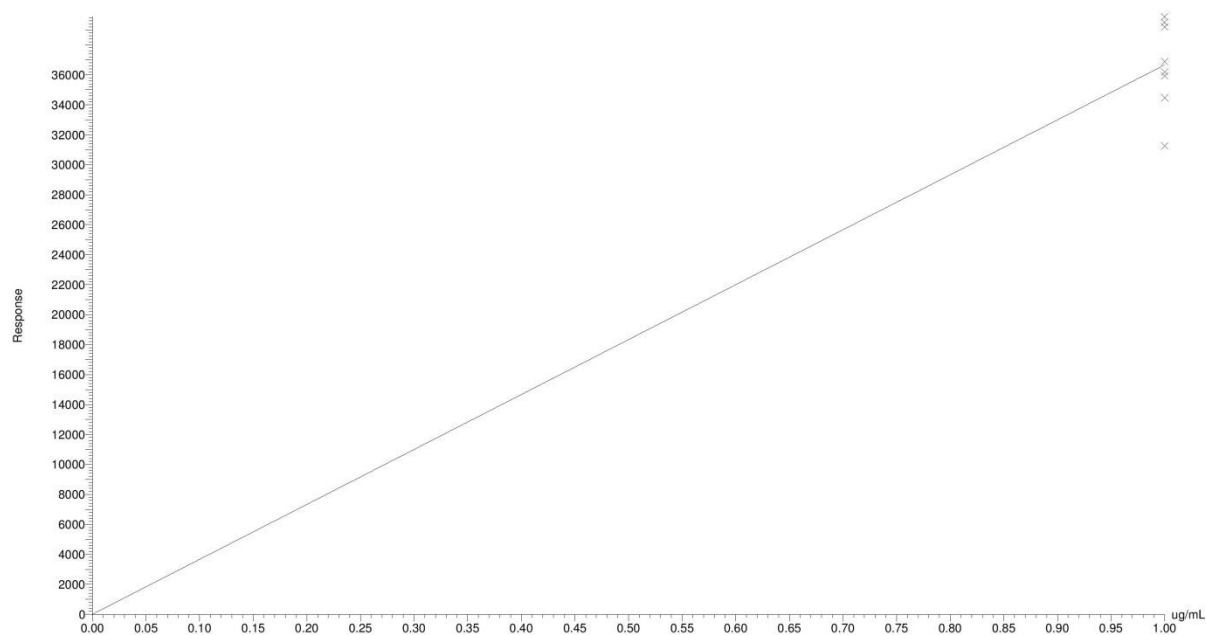
Compound name: I.S.

Response Factor: 36660.4

RRF SD: 2917.83, % Relative SD: 7.95907

Response type: External Std, Area

Curve type: RF

Obrázek č. 29: Kalibrační křivka biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě pro I.S.

2.1.10.6.b Vyhodnocení kalibrační závislosti v lidské K_3EDTA plazmě pro Ibuprofen a Ketoprofen

Výsledky měření pro kalibrační standardy ve vodné fázi byly použity jako předloha výsledné metody, zda je vůbec možné takto optimalizovanou metodou použít pro měření reálných vzorků v plazmě. U biologických standardů byly používány s každým pipetováním nové špičky pro automatické pipety, zároveň byly vždy připravovány čerstvé vzorky jejichž stáří nepřesáhlo dvě hodiny. Naproti tomu u kalibračních standardů byly použity vzorky, jejichž stáří bylo jeden den a tím již mohlo dojít k částečnému rozkladu. Z tabulky č. 6 je patrné, že biologický standard S_4 vykazoval odchylku 62,5% a byl proto z kalibrační závislosti vyřazen (bbX). Mohlo dojít k chybě při pipetování přidané plazmy a to konkrétně menšímu přidanému množství, kdy vzorek potom byl koncentrovanější oproti teorii. Z tabulky č. 8 je zřejmé, že nedošlo k žádným větším koncentračním odchylkám při použití Ketoprofenu jako I.S. Ve firmě CEPHA s.r.o. je úspěšné přijetí metody pro stanovení daného léčiva na studii tehdy, když maximálně dva biologické standardy svými odchylkami převyšují zmíněnou 15% koncentrační odchylku. Tyto standardy mohou potom být vyřazeny z příslušné kalibrační závislosti. Poslední tolerancí je, že pokud by nějaký třetí bod z kalibrační závislosti se nevešel do zmíněných 15% odchylky, ale nepřesáhl by odchylku 20%, potom může být tento bod použit do kalibrační závislosti. Lze konstatovat, že pro vývoj metody stanovení Ibuprofenu v lidské K_3EDTA plazmě s použitím Ketoprofenu jako I.S. byla splněna všechna kritéria a cíle, která jsou stanovena firmou CEPHA s.r.o. jako podmínky pro úspěšné stanovení léčiva metodou HPLC-MS/MS.

2.1.10.7 Optimalizace MS/MS pro Atorvastatin a 2-Hydroxy Atorvastatin

Optimalizované parametry nastavení hmotnostního spektrometru pro IBU jsou uvedeny v tabulce č. 9 a 10.

Tabulka č. 9: Nastavení parametrů iontového zdroje

Type	MRM
Source	ES+
Capillary [kV]	4,0
Cone [V]	25
Source temperature [°C]	110
Desolvation temperature [°C]	400
Cone gas flow [l/h]	50
Desolvation gas flow [l/h]	400

Tabulka č. 10: Nastavení parametrů kvadrupólových hmotnostních filtrů

LM Resolution 1	10
HM Resolution 1	10
Ion energy 1 [V]	-1
Multiplier 1 [V]	550
Collision cell [eV]	16
LM Resolution 2	12
HM Resolution 2	12
Ion energy 2 [V]	15
Multiplier 2 [V]	550
Gas cell pirani pressure [mbar]	$1,5 \cdot 10^{-3}$
MSSCAN of molecular ion ATN [m/z]	450 – 650
DAUSCAN of product ion ATN [m/z]	350 – 550
MSSCAN of molecular ion OHATN [m/z]	400 – 600
DAUSCAN of product ion OHATN [m/z]	350 – 550
MSSCAN of molecular ion I.S. [m/z]	50 – 500
DAUSCAN of product ion I.S. [m/z]	50 – 500
Channel mass of product ion ATN [g/mol]	440
Channel mass of product ion OHATN [g/mol]	440
Channel mass of product ion I.S. [g/mol]	199
Scan time [s]	10
Dwell time [s]	0,2
Span [g/mol]	0,5

2.1.10.8 Optimalizace HPLC pro Atorvastatin a 2-Hydroxy Atorvastatin

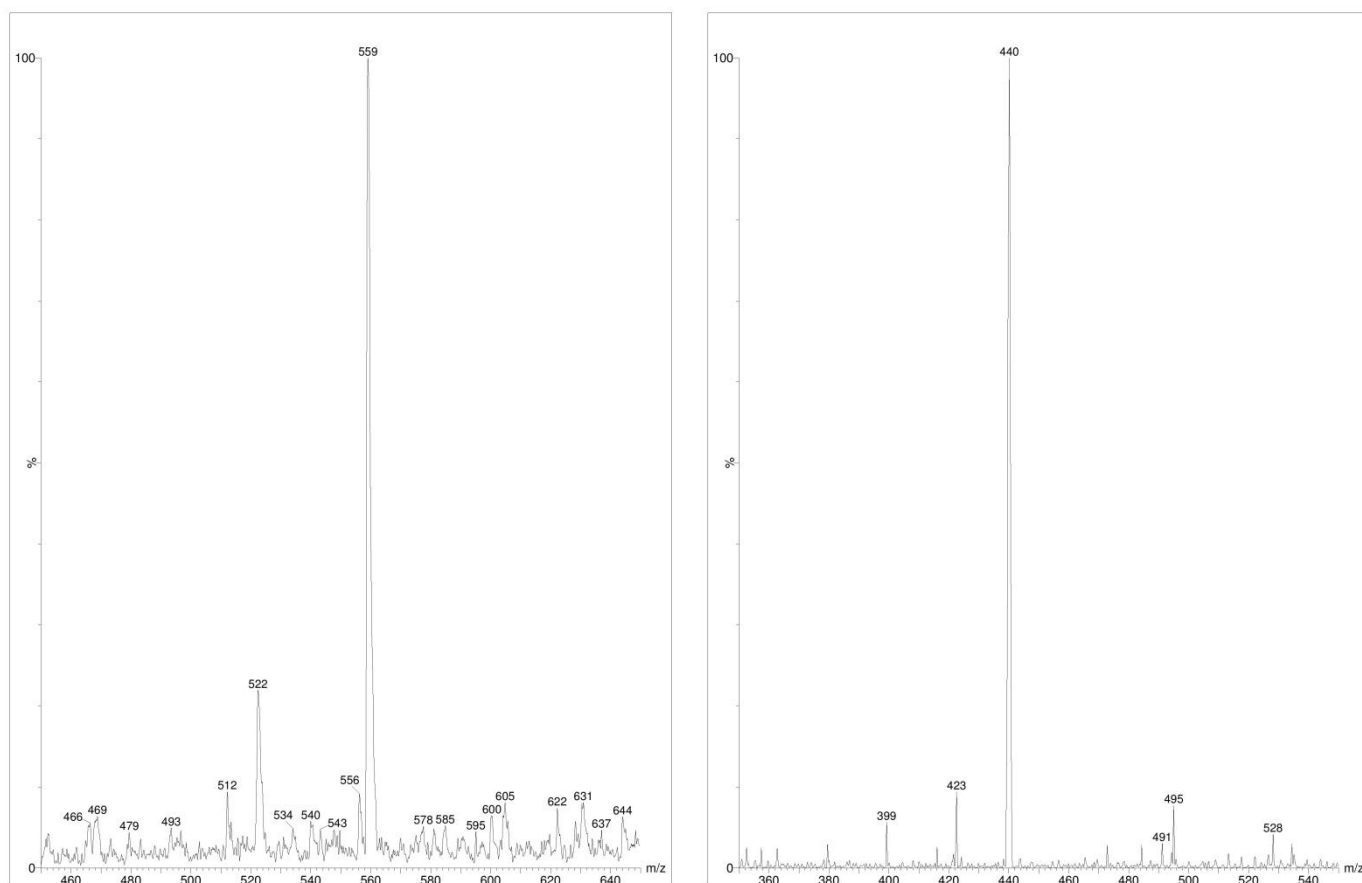
Parametry nastavení vysokoúčinného kapalinového chromatografu pro IBU jsou uvedeny v tabulce č. 11

Tabulka č. 11: Nastavení parametrů HPLC.

Autosampler temperature [°C]	10
Stationary phase area temperature [°C]	35
Inject volume [μl]	10
Mobile phase flow [ml/min]	0,5
Mobile phase A [v/v]	AcN
Mobile phase B [v/v]	NH ₄ COOH
Mobile phase C [v/v]	HCOOH
Inlet method – A,B,C [%]	80,10,10
Analytical column	dC18, 10 cm x 3,0 mm, 3 μm
End of run [min]	2,5

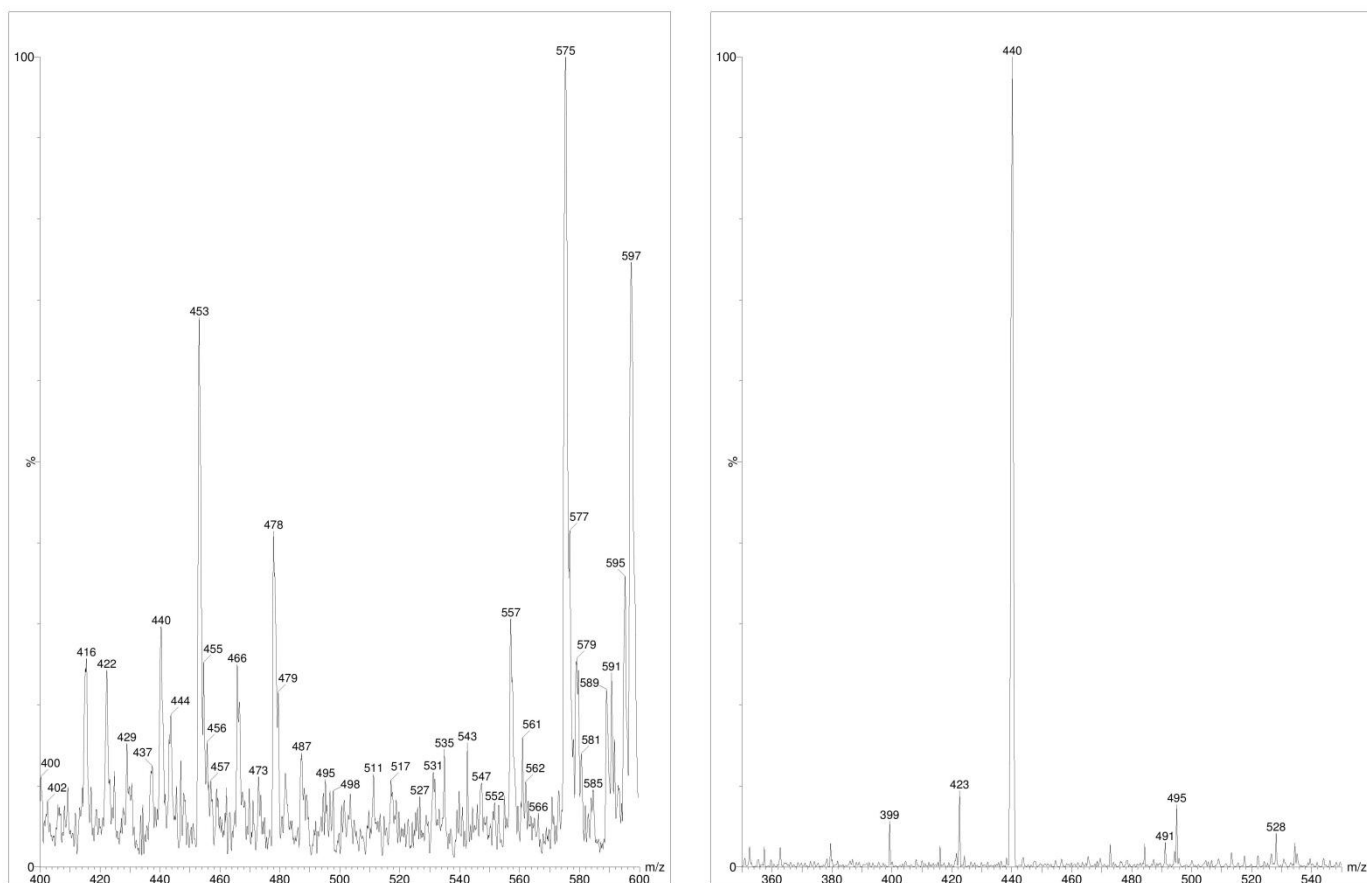
2.1.10.9.a Naměřená hmotnostní spektra Atorvastatinu, 2-Hydroxy Atorvastatinu a kyseliny Simvastatinu

Hmotnostní spektrum odpovídající molekulové hmotnosti 559 bylo naměřeno pro kalibrační standard ATN – B, hmotnostní spektra molekulového a dceřinného iontu ATN jsou uvedena na obrázku č. 30. První hmotnostní spektrum odpovídá molekulovému iontu a druhé hmotnostní spektrum dceřinnému iontu ATN – B o molekulové hmotnosti 440.



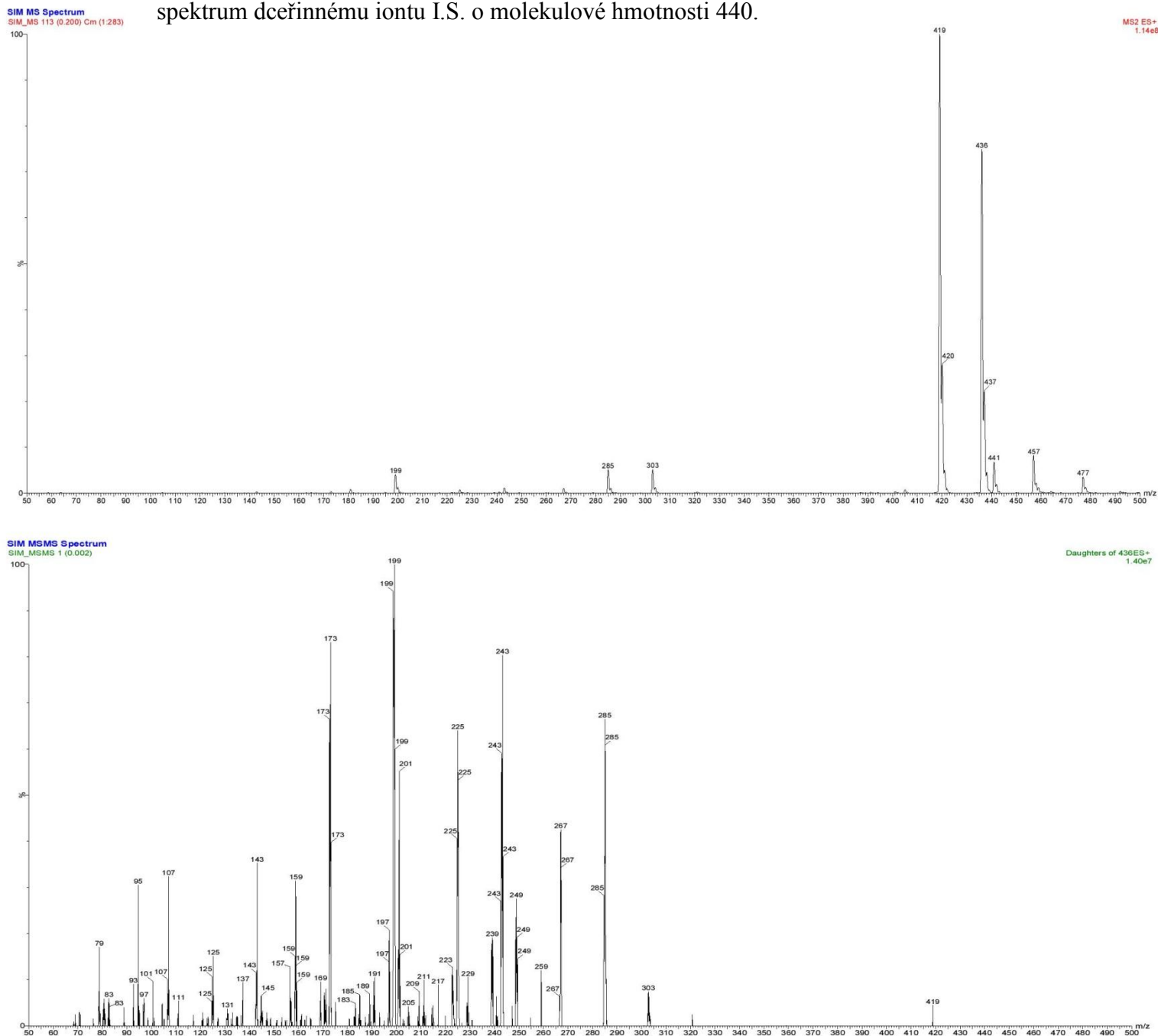
Obrázek č. 30: Hmotnostní spektra molekulového iontu ATN a dceřinného iontu ATN.

Hmotnostní spektrum odpovídající molekulové hmotnosti 575 bylo naměřeno pro OHATN – B, hmotnostní spektra molekulového a dceřinného iontu ATN jsou uvedena na obrázku č. 31. První hmotnostní spektrum odpovídá molekulovému iontu a druhé hmotnostní spektrum dceřinnému iontu OHATN – B o molekulové hmotnosti 440.



Obrázek č. 31: Hmotnostní spektra molekulového iontu OHATN a dceřinného iontu OHATN.

Hmotnostní spektrum odpovídající molekulové hmotnosti 575 bylo naměřeno pro I.S., hmotnostní spektra molekulového a dceřinného iontu I.S. jsou uvedena na obrázku č. 32. První hmotnostní spektrum odpovídá molekulovému iontu a druhé hmotnostní spektrum dceřinnému iontu I.S. o molekulové hmotnosti 440.



Obrázek č. 32: Hmotnostní spektra molekulového iontu I.S. a dceřinného iontu I.S.

2.1.10.9.b Vyhodnocení hmotnostních spekter Atorvastatinu s metabolitem 2-Hydroxy Atorvastatinu a kyseliny Simvastatinu.

Měření hmotnostních spekter kalibračních standardů ATN a OHATN bylo provedeno při kladné polaritě na vstupní kapiláře elektronspreje. U všech hmotnostních spekter kalibračních standardů ATN byl získán molekulový ion s molekulovou hmotností 559 (obrázek č. 30). U hmotnostních spekter ATN kalibračních standardů F a G byla získána odezva molekulového iontu už v nízkém podílu vůči aduktům. Tyto adukty měly molekulovou hmotnost 605 a 631. Molekulové hmotnosti 605 odpovídá buď disodný adukt, anebo původní vápenatá sůl ATN. Aduktu s molekulovou hmotností 631 ovšem neodpovídá ani jeden z možných zmíněných aduktů. Je možné, že se jedná o hydrát původní vápenaté soli, která sama je monohemihydrátem, potom by této molekulové hmotnosti přibližně odpovídal trihydrát. Použitý standard ATN od European Pharmacopoeia, splňoval v době měření lhůtu po otevření standardu, která zajišťuje 100% čistotu a jakost. Standard byl v průběhu měření patřičně skladován v lednici, anebo v mrazáku.

Dceřinný ion odpovídal molekulové hmotnosti 440 (obrázek č. 30). Této molekulové hmotnosti odpovídá odštěpení čtyř uhlíkového skeletu s karboxylovou skupinou a dvěma hydroxylovými skupinami, jež vychází z dusíkového atomu pyrolu, která má molekulovou hmotnost 119. U dceřinných spekter byl u kalibračních standardů C a G naměřen další fragmentový ion s molekulovou hmotností 399, čemuž by odpovídalo odštěpení celého šesti uhlíkového skeletu vycházejícího z dusíkového atomu pyrolu.

U všech hmotnostních spekter kalibračních standardů OHATN byl získán molekulový ion s molekulovou hmotností 575 (obrázek č. 31). U hmotnostních spekter OHATN kalibračních standardů A,B a C byla získána odezva fragmentu s molekulovou hmotností 478 a 453, která s klesající koncentrací kalibračních standardů též klesala. U všech hmotnostních spekter byl také naměřen adukt s molekulovou hmotností 597, který svou molekulovou hmotností odpovídá sodnému aduktu, anebo zachování původní molekuly sodné soli. Použitý standard OHATN od Toronto Research Chemicals Inc. splňoval v době měření lhůtu po otevření standardu, která zajišťuje 100% čistotu a jakost. Standard byl v průběhu měření patřičně skladován v lednici, anebo v mrazáku.

Dceřinný ion odpovídal molekulové hmotnosti 440 jako u ATN (obrázek č. 31). Této molekulové hmotnosti odpovídá naprosto stejný čtyř uhlíkový fragment

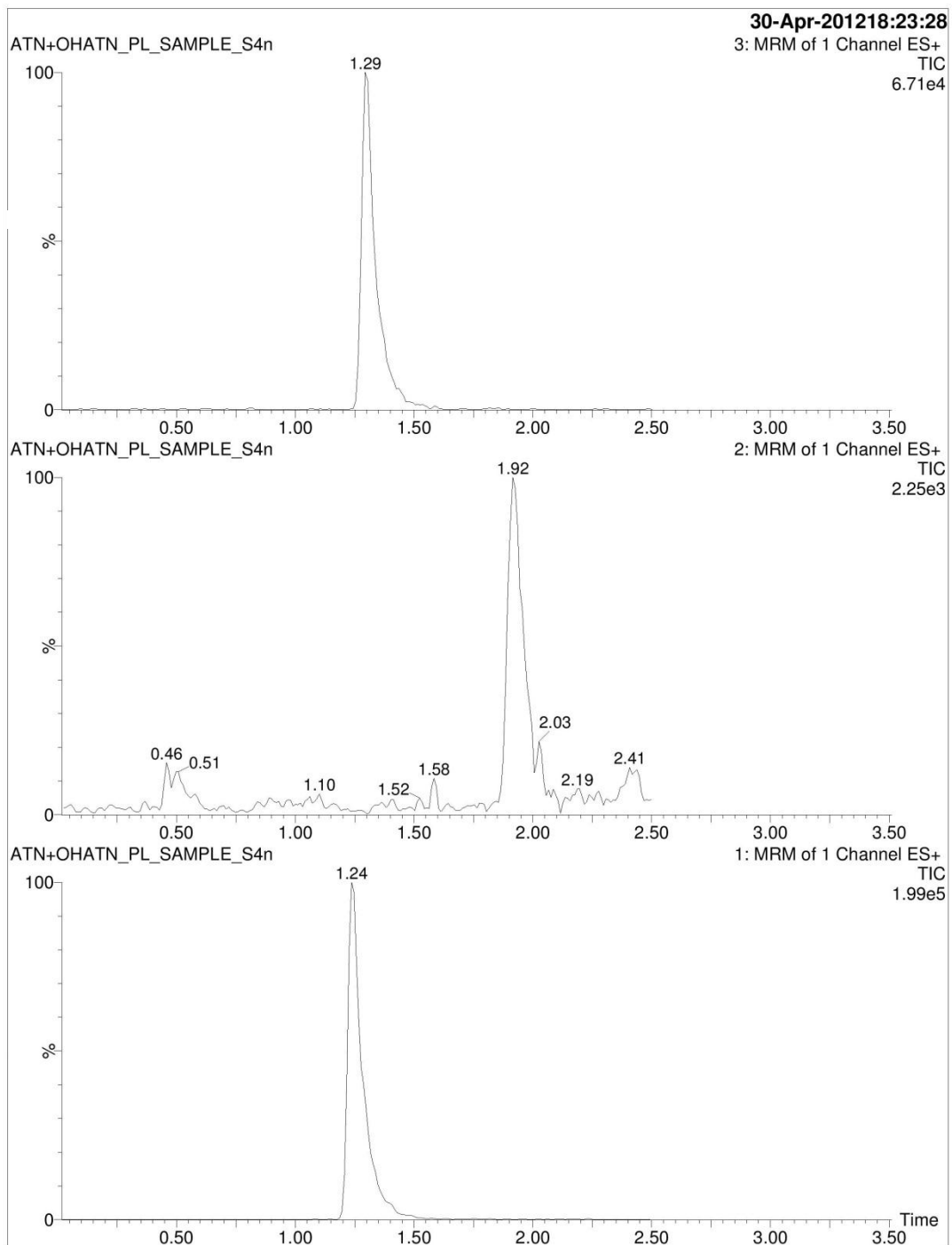
s karboxylovou skupinou a dvěma hydroxyly, jež vycházejí z dusíkového atomu pyrolu. Rozdíl 16 vytváří odštěpení hydroxylové skupiny 2-OH z benzenového jádra a následnému zpětnému nasycení benzenového skeletu.

Při měření hmotnostních spekter I.S. byl naměřen molekulový ion o molekulové hmotnosti 436 (obrázek č. 32) a zároveň s vysokým podílem fragmentový ion s molekulovou hmotností 419, což by odpovídalo odštěpení jedné methylové skupiny -CH₃.

Dceřinné spektrum nepřineslo pouze jeden dceřinný ion, ale širokou škálu různých fragmentových iontů s molekulovými hmotnostmi 199, 177 a 243 v největším zastoupení, ale také ionty s molekulovými hmotnostmi 285 a 225, jak je patrné z obrázku č. 32.

2.1.10.10.a Naměřené chromatogramy Atorvastatinu, 2-Hydroxy Atorvastatinu a kyseliny Simvastatinu

Chromatogram s retenčním časem 1,29 min odpovídá ATN, chromatogram s retenčním časem 1,92 min odpovídá I.S. a 1,24 min odpovídá OHATN. Zobrazené chromatogramy jsou pro výsledné biologické standardy v lidské K₃EDTA plazmě ATN s OHATN, jejichž retenční časy se liší od standardů ve vodné fázi, jak zobrazuje tabulka č. 12. Ukázkové chromatogramy ATN s OHATN a I.S. jsou uvedeny na obrázku č. 26.



Obrázek č. 33: Chromatogramy pro ATN, I.S. a OHATN.

2.1.10.10.b Vyhodnocení chromatografických píků Atorvastatinu s 2-Hydroxy Atorvastatinem a I.S.

U biologických standardů nedošlo k žádnému nepravidelnému rozmývání zón analytu a ani nebyla naměřena žádná další komponenta, jak je patrné z obrázku č. 33. Pouze u I.S. byly naměřeny další komponenty, ale v malé odezvě vůči I.S. Na rozdíl od Ibuprofenu, byly retenční časy ATN a OHATN v lidské K₃EDTA plazmě přibližně o polovinu delší než ve vodné fázi. V obou případech bylo použito rozpouštědlo aceton s destilovanou vodou (R_A1) a to i po rekonstituci vzorku. Jedno z možných vysvětlení bylo, že ve vodné fázi byl naměřen pouze ATN a naopak v K₃EDTA plazmě byly měřeny vedle ATN, metabolit OHATN s I.S., čímž mohlo dojít k určitému vzájemnému ovlivnění chemických látek změnou polarity. Další možné vysvětlení je, že rekonstituovaný vzorek v sobě nese organické látky, které jsou obsažené v K₃EDTA plazmě, a tak mateřský roztok má bohatší a složitější složení než ve vodné fázi.

2.2.10.11.a Výsledky ve vodné fázi pro Atorvastatin

Do karuselu chromatografie byl do vialky č. 1 napipetován blank a to roztok R_A1. Do vialek č. 2 – 8 bylo napipetováno 0,25 ml kalibračních standardů G – A, tedy ve vzestupném koncentračním rozsahu podle tabulky č. 2 v oddíle 2.1.6. V tabulce č. 12 jsou uvedeny výsledky kalibračních standardů ATN.

Compound name: ATN

Coefficient of Determination: $R^2 = 0,998720$

Calibration curve: $-0,0031408 * x^2 + 36,7688 * x + (-149,863)$

Response type: External Std, Area

Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

Tabulka č. 12: Výsledky kalibračních standardů ATN

	Vial	Name	RT	Area	IS Area	Response	Std. Conc	ng/ml	%Dev	Flags	Factor
1	1	ATN_NEAT_blank	0,77	994	-	994,39	-	31,20	-	bd	0,0
2	2	ATN_NEAT_S7	0,85	1310	-	1309,70	10,65	39,83	274,0	MMX	1,0
3	3	ATN_NEAT_S6	0,84	1263	-	1263,31	41,09	38,56	-6,2	MM	1,0
4	4	ATN_NEAT_S5	0,83	4428	-	4427,96	123,28	125,86	2,1	MM	1,0

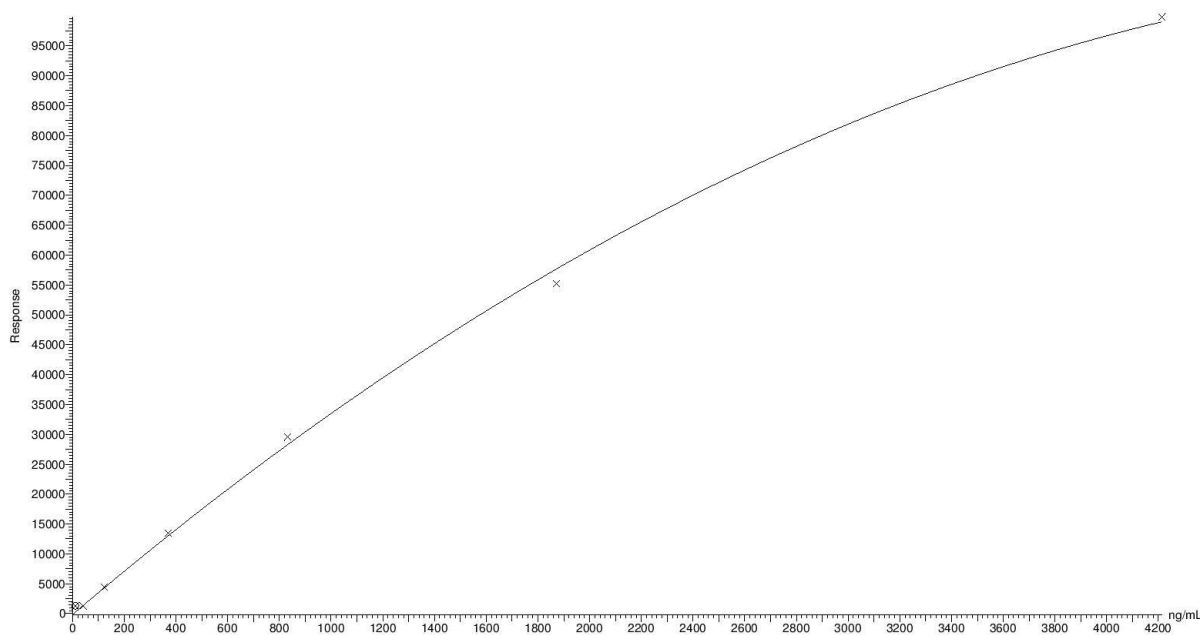
5	5	ATN_NEAT_S4	0,83	13437	-	13437,36	369,84	382,00	3,3	MM	1,0
6	6	ATN_NEAT_S3	0,83	29517	-	29516,84	832,13	871,76	4,8	MM	1,0
7	7	ATN_NEAT_S2	0,83	55199	-	55199,47	1872,30	1774,23	-5,2	MM	1,0
8	8	ATN_NEAT_S1	0,83	99825	-	99825,26	4212,68	4294,16	1,9	MM	1,0

Získaná kalibrační závislost pro ATN ve vodné fázi je na obrázku č. 34.

Quantify Calibration Report		MassLynx 4.1	Page 1 of 1
atorvastatin			
Dataset:	C:\MassLynx\Vyvoj_ATORVASTATIN.PRO\atorvastatin-summary.qld		
Last Altered:	Monday, May 07, 2012 09:41:44 Central Europe Daylight Time		
Printed:	At Monday, May 07, 2012 16:59:02 Central Europe Daylight Time		
By:	CEPHA\vondrakova (Daniela Vondrakova)		

Method: C:\MassLynx\Vyvoj_ATORVASTATIN.PRO\MethDB\pokus_ATN4.mdb 16 Mar 2012 11:29:33
 Calibration: C:\MassLynx\Vyvoj_ATORVASTATIN.PRO\CurveDB\atorvastatin.cdb 07 May 2012 09:41:44

Compound name: ATN
 Coefficient of Determination: $R^2 = 0.998720$
 Calibration curve: $-0.0031408 * x^2 + 36.7688 * x + -149.863$
 Response type: External Std, Area
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Obrázek č. 34: Kalibrační křivka kalibračních standardů ATN ve vodné fázi.

2.1.10.11.b Vyhodnocení výsledků a kalibrační závislosti ve vodné fázi pro Atorvastatin a 2-Hydroxy Atorvastatin

Z výsledků je patrné, že pro kalibračními standardy ve vodné fázi lépe vyhovovala kvadratická závislost, která proložila experimentální body s nejmenší chybou. V úvodu 2.1.1 bylo řečeno, že experimentální kalibrační závislost pro kalibrační standardy musí vykazovat maximální odchylku do 15% od jimi proloženou kalibrační závislostí. Z tabulky č. 12 je patrné, že kalibrační standard S₇ tuto podmínku nespnil, byl z kalibrační závislosti

vyřazen a ještě před tím byla manuálně upravena integrace plochy chromatografického píku (MMX). U kalibračního standardu $S_7 - S_1$ byla ručně pozměněna integrace chromatografického píku, jelikož integrace vyhodnocovací metodou programu MassLynx V4.1, nezintegrovala chromatografický pik po celé jeho ploše (MM). Bylo to způsobeno nepravidelným rozmytím zón separovaných složek. Chromatografické píky chvostovaly a vyhodnocovací metoda programu MassLynx V4.1 měla nastaveno integrování ploch chromatografických píků v čase $0,80 \pm 0,1$ min a zachycování zón analytu skončilo v čase 1,1 min.

2.1.10.12.a Výsledky kalibrační závislosti v lidské K_3EDTA plazmě pro Atorvastatin s 2-Hydroxy Atorvastatinem a kyselinou Simvastatinu

Po proměření a vyhodnocení sady vzorků $S_7 - S_0$ byly získány údaje z tabulky č. 13.

Compound name: ATN

Coefficient of Determination: $R^2 = 0,998354$

Calibration curve: $-0,0065051 * x^2 + 1,50111 * x + 0,0176726$

Response type: Internal Std. (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

Tabulka č. 13: Výsledky biologických standardů v lidské K_3EDTA plazmě pro ATN.

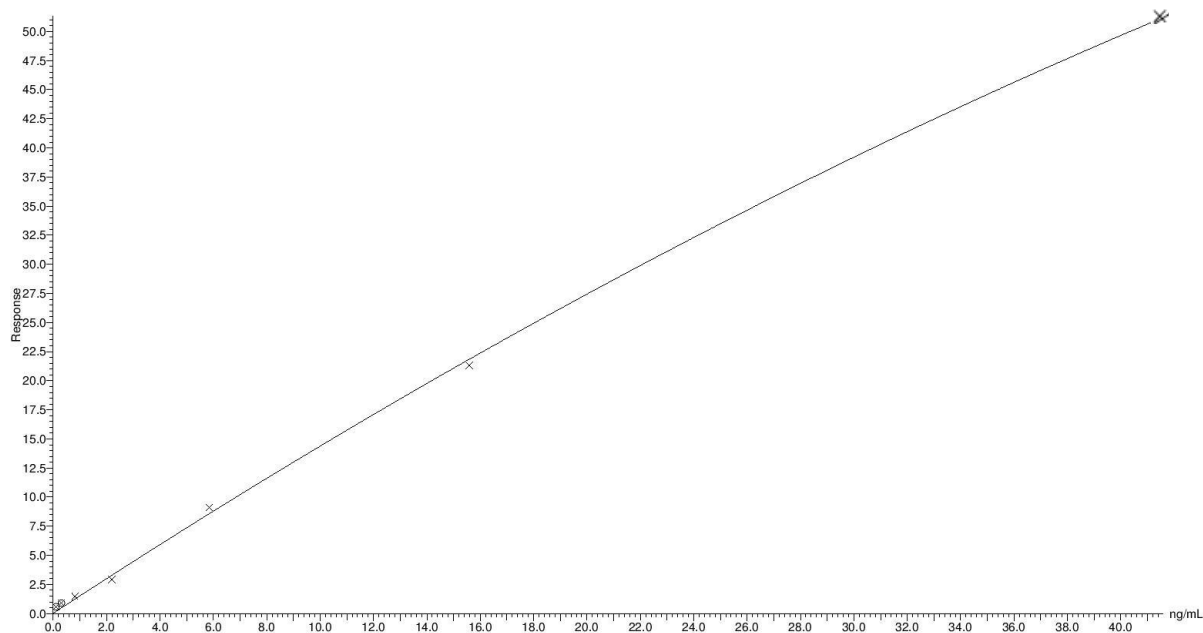
	Vial	Name	RT	Area	IS Area	Response	Std. Conc	ng/ml	%Dev	Flags	Factor
1	1	ATN_PL_Blank	1,29	185	164	0,71269	-	-	-	bb	0,0
2	2	ATN_PL_S0	1,30	254	406	0,62620	0,00	0,41	0,4	bb	0,0
3	3	ATN_PL_S7	1,30	218	371	0,58603	0,10	0,38	271,8	bbX	1,0
4	4	ATN_PL_S6	1,30	353	392	0,89964	0,31	0,59	91,2	bbX	1,0
5	5	ATN_PL_S5	1,29	638	435	1,46730	0,82	0,97	18,0	bb	1,0
6	6	ATN_PL_S4	1,29	1236	420	2,94534	2,19	1,97	-10,3	bb	1,0
7	7	ATN_PL_S3	1,30	3983	438	9,09194	5,85	6,21	6,2	bb	1,0
8	8	ATN_PL_S2	1,30	9917	466	21,28154	15,59	15,16	-2,7	bb	1,0
9	9	ATN_PL_S1	1,29	22682	442	51,32654	41,57	41,73	0,4	bb	1,0

Získaná kalibrační závislost pro ATN v lidské K₃EDTA plazmě je na obrázku č. 35.

Quantify Calibration Report MassLynx 4.1		Page 1 of 3
atorvastatin		
Dataset:	C:\MassLynx\Vyvoj_ATORVASTATIN.PRO\atorvastatin-summary_plasma.qld	
Last Altered:	Monday, May 07, 2012 09:57:48 Central Europe Daylight Time	
Printed:	At Monday, May 07, 2012 16:59:58 Central Europe Daylight Time	
	By CEPHA\vondrakova (Daniela Vondrakova)	

Method: C:\MassLynx\Vyvoj_ATORVASTATIN.PRO\MethDB\VSE-ATN2.mdb 30 Apr 2012 18:55:49
 Calibration: C:\MassLynx\Vyvoj_ATORVASTATIN.PRO\CurveDB\atorvastatin-plasma.cdb 07 May 2012 09:57:48

Compound name: ATN
 Coefficient of Determination: R² = 0.998354
 Calibration curve: $-0.0065051 * x^2 + 1.50111 * x + 0.0176726$
 Response type: Internal Std (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: 2nd Order, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Obrázek č. 35: Kalibrační křivka biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě pro ATN

Compound name: OHATN

Correlation coefficient: $r = 0,992865$, $r^2 = 0,985780$

Calibration curve: $0,584381 * x + (-0,0496333)$

Response type: Internal Std. (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

V tabulce č. 14 jsou uvedeny výsledky biologických standardů OHATN.

Tabulka č. 14: Výsledky biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě pro OHATN.

	Vial	Name	RT	Area	IS Area	Response	Std. Conc	ng/ml	%Dev	Flags	Factor
1	1	ATN_PL_Blank	1,29	185	164	0,71269	-	-	-	bb	0,0
2	2	ATN_PL_S0	1,25	254	406	0,62620	0,00	0,41	0,4	bb	0,0
3	3	ATN_PL_S7	-	-	-	-	-	-	-	bb	1,0
4	4	ATN_PL_S6	1,24	115	392	0,29395	0,49	0,59	20,0	bb	1,0
5	5	ATN_PL_S5	1,25	183	435	0,420029	1,14	0,80	-29,5	bb	1,0
6	6	ATN_PL_S4	1,25	430	420	1,02442	2,65	1,84	-30,6	bb	1,0
7	7	ATN_PL_S3	1,25	1840	438	4,20006	6,18	7,27	17,7	bb	1,0
8	8	ATN_PL_S2	1,24	4263	466	9,14954	14,42	15,74	9,2	bb	1,0
9	9	ATN_PL_S1	1,25	8316	442	18,81778	33,65	32,29	-4,1	bb	1,0

Získaná kalibrační závislost pro OHATN v lidské K₃EDTA plazmě je na obrázku č. 36.

Quantify Calibration Report MassLynx 4.1

Page 2 of 3

atorvastatin

Dataset: C:\MassLynx\Vyvoj_ATOMVASTATIN.PRO\atorvastatin-summary_plasma.qld

Last Altered: Monday, May 07, 2012 09:57:48 Central Europe Daylight Time

Printed: At Monday, May 07, 2012 16:59:58 Central Europe Daylight Time

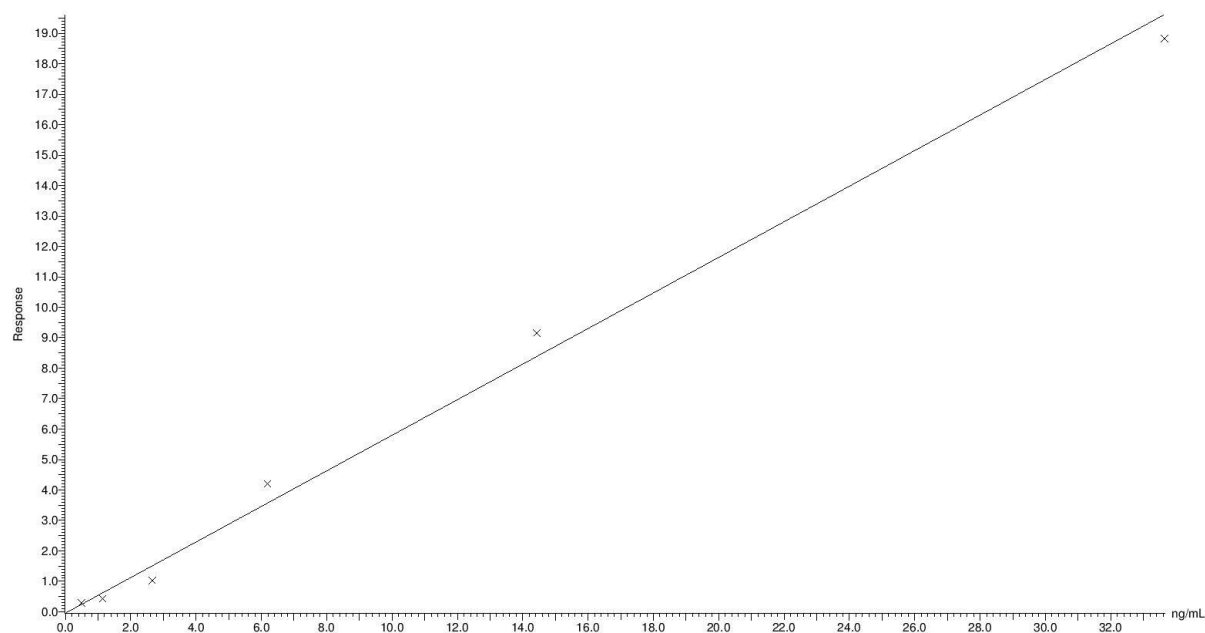
By CEPHA\vondrakova (Daniela Vondrakova)

Compound name: OHATN

Correlation coefficient: $r = 0.992865$, $r^2 = 0.985780$ Calibration curve: $0.584381 * x + -0.0496333$

Response type: Internal Std (Ref 3), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Obrázek č. 36: Kalibrační křivka biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě pro OHATN.

Compound name: I.S.

Response Factor: 423,419

RRF SD: 32,1826, Relative SD: 7,60065

Response type: External Std, Area

Curve type RF

V tabulce č. 15 jsou uvedeny výsledky biologických standardů OHATN.

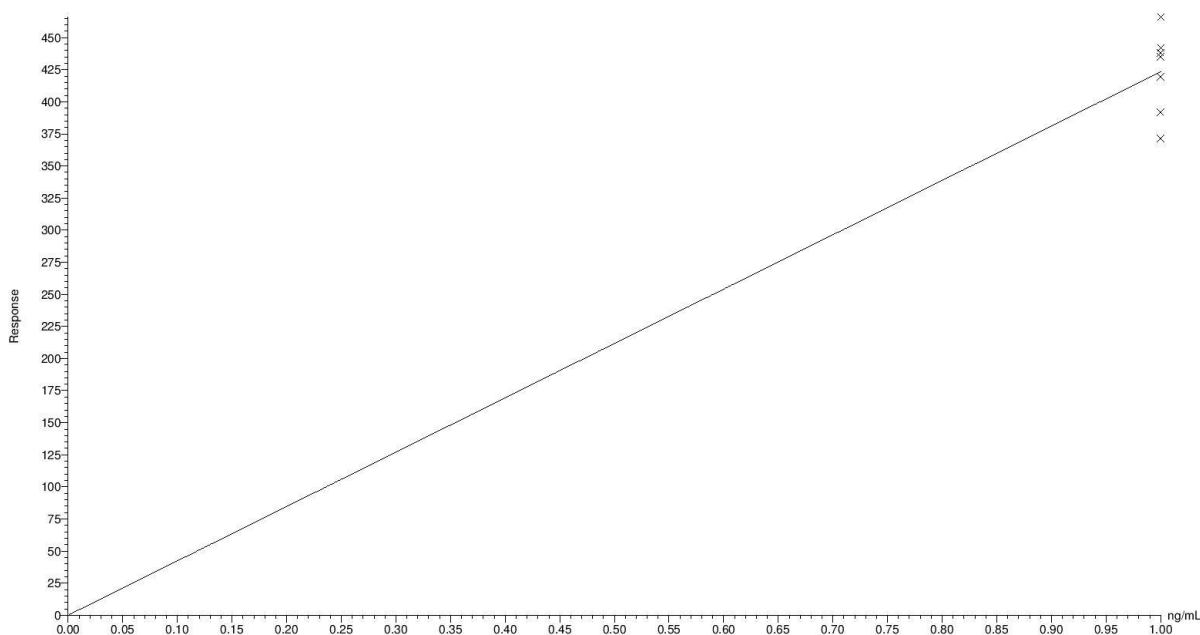
Tabulka č. 15: Výsledky biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě pro I.S.

	Vial	Name	RT	Area	IS Area	Response	Std. Conc	ng/ml	%Dev	Flags	Factor
1	1	ATN_PL_Blank	1,29	164	-	164,11	1,00	0,39	-61,2	bb	0,0
2	2	ATN_PL_S0	1,90	406	-	406,00	1,00	0,96	-4,1	bb	1,0
3	3	ATN_PL_S7	1,91	442	-	441,92	1,00	1,04	4,4	bb	1,0
4	4	ATN_PL_S6	1,91	466	-	465,98	1,00	1,10	10,1	bb	1,0
5	5	ATN_PL_S5	1,91	438	-	438,04	1,00	1,03	3,5	bb	1,0
6	6	ATN_PL_S4	1,91	420	-	419,522	1,00	0,99	-0,9	bb	1,0
7	7	ATN_PL_S3	1,91	435	-	435,13	1,00	1,03	2,8	bb	1,0
8	8	ATN_PL_S2	1,91	392	-	391,88	1,00	0,93	-7,4	bb	1,0
9	9	ATN_PL_S1	1,91	371	-	371,46	1,00	0,88	-12,3	bb	1,0

Získaná kalibrační závislost pro OHATN v lidské K₃EDTA plazmě je na obrázku č. 37.

Quantify Calibration Report		MassLynx 4.1	Page 3 of 3
atorvastatin			
Dataset:	C:\MassLynx\Vyvoj_ATOMVASTATIN.PRO\atorvastatin-summary_plasma.qld		
Last Altered:	Monday, May 07, 2012 09:57:48 Central Europe Daylight Time		
Printed:	At Monday, May 07, 2012 16:59:58 Central Europe Daylight Time		
By	CEPHA\vondrakova (Daniela Vondrakova)		

Compound name: I.S.
 Response Factor: 423.419
 RRF SD: 32.1826, % Relative SD: 7.60065
 Response type: External Std, Area
 Curve type: RF



Obrázek č. 37: Kalibrační křivka biologických standardů v lidské K₃EDTA plazmě pro I.S.

2.1.10.12.b Vyhodnocení kalibrační závislosti v lidské K₃EDTA plazmě pro Atorvastatin s 2-Hydroxy Atorvastatinem a kyselinou Simvastatinu

Z výsledků je patrné, že biologické standardy v lidské K₃EDTA plazmě obsahující ATN a metabolit OHATN bohužel nesplnily kritéria pro úspěšné stanovení dané firmou CEPHA s.r.o. V případě ATN byly jednotlivé biologické standardy vyhodnoceny prostřednictvím kvadratické závislosti, stejně jako u kalibračních standardů ve vodné fázi. Do 15% hranice se nevešly hned tři biologické standardy a to S₇, S₆ a S₅. Standardy S₇ a S₆ se svými odchylkami 271,8 a 91,2% byly vyřazeny z kalibrační závislosti (bbX). V případě S₅ odchylka nabyla 18,0%, ale jak již bylo zmíněno, tento biologický standard se vešel do 20% hranice při vyřazení dvou dalších biologických standardů a je možné s tímto standardem nadále počítat. V případě OHATN byla použita pro vyhodnocení biologických standardů lineární závislost, která vyhovovala lépe než kvadratická. Bohužel ale hned pět

biologických standardů nevyhovovalo kalibrační závislosti. U standardu S₇ byly zóny analytu natolik rozmyty, že nebylo možné s příslušným chromatografickým píkem pracovat a podrobit ho integraci. U biologických standardů S₅ a S₄ dosahovaly odchylky -29,5% a -30,6%. U biologických standardů S₆ a S₃ byly odchylky 20,0% a 17,7%. Ani po vyřazení dvou různých biologických standardů z kalibrační závislosti nesplňovala tato metoda stanovení OHATN v lidské K₃EDTA plazmě požadavky, které jsou nastavené firmou CEPHA s.r.o. pro úspěšné přijetí metody pro stanovení léčiva ke studii. ATN mezně vyhovoval těmto kritériím. Největším problémem stanovení ATN a OHATN za použití kyseliny Simvastatinu jako I.S. byl nedostatek přiděleného strojového času na stanovení těchto léčiv. Na vývoj metody bylo velmi málo času a všechna experimentální data byla nashromážděna během deseti dní, přičemž měření biologických standardů v K₃EDTA plazmě probíhalo během posledního možného dne, který mi byla firmou poskytnut. Z tabulky č. 15 lze vyčíst, že i I.S. měl v každém biologickém standardu různou koncentraci, což by nasvědčovalo nepřesnostem během pipetování. Lze konstatovat, že pro vývoj metody stanovení Atorvastatinu a 2-Hydroxy Atorvastatinu v lidské K₃EDTA plazmě s použitím kyseliny Simvastatinu jako I.S. nebyla splněna všechna kritéria a cíle, které jsou stanoveny firmou CEPHA s.r.o. jako podmínky pro úspěšné stanovení léčiva metodou HPLC-MS/MS.

3. Závěr

Tato bakalářská práce se zaměřuje v první polovině teoretické části na popis chromatografických kapalinových metod s detailním zaměřením na metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V druhé polovině popisuje hmotnostní spektrometrii a tandemovou hmotnostní spektrometrii. V obou částech jsou podrobně popsány jednotlivé části obou přístrojů a zároveň vysvětluje chemicko-fyzikálními vlastnosti, které jsou s jejich fungováním úzce spjaty.

V první části experimentální části byl stanovován Ibuprofen za použití Ketoprofenu jako interního standardu v lidské K_3EDTA plazmě metodou HPLC-MS/MS. Tato metoda byla velice úspěšná a v roce 2012 bude firmou CEPHA s.r.o. použita ke dvěma studiím. Následně je popsán vývoj metody pro stanovení Atorvastatinu a metabolitu 2-Hydroxy Atorvastatinu za použití kyseliny Simvastatinu jako interního standardu v lidské K_3EDTA plazmě metodou HPLC-MS/MS neposkytla uspokojivé výsledky pro její následné využití do studií. Je možno konstatovat, že veškeré zadané cíle bakalářské práce byly splněny.

3.1.1 Seznam použitých zkratk

- K_3 EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid Tripotassium salt – Tridraselná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové
- Na_2 EDTA – Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium salt – Disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové
- BMI – Body Mass Index - Poměr mezi výškou a váhou
- LC – Liquid Chromatography – Kapalinová chromatografie
- HPLC-MS – High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry – Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
- U-HPLC - Ultra-High Performance Liquid Chromatography – Extrémně účinná kapalinová chromatografie
- GC-MS – Gas Chromatography – Plynová chromatografie
- CLC – Capillary Liquid Chromatography – Kapilární kapalinová chromatografie
- PC – Paper Chromatography – Papírová chromatografie
- TLC – Thin Layer Chromatography – Tenkovrstvá kapalinová chromatografie
- LSC – Liquid Solid Chromatography – Kapalinová adsorpční chromatografie
- LLC – Liquid-liquid Chromatography – Kapalinová rozdělovací chromatografie
- IEC – Ion Exchange Chromatography – Iontově výměnná chromatografie
- GPC – Gel Permeation Chromatography – Gelová permeační chromatografie
- SEC – Size-exclusion Chromatography – Chromatografie se síťovacím efektem
- EI – Electron Ionization – Elektronová ionizace
- APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization – Chemická ionizace
- APPI – Atmospheric pressure photoionization – Fotoionizace
- ESI – Electrospray Ionization – Ionizace elektrosprejem
- MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
- TOF – Time Of Flight – Průletový analyzátor
- FT-ICR – Fourier transform-ion cyclotron resonance - Fourierova transformace s využitím cyklotronové rezonance
- SRM – Selected Reaction Monitoring – Monitorování vybraných reakcí
- MRM – Multiple Reaction Monitoring – Monitorování násobných reakcí
- CID – Collision-induced Dissociation – Kolizně indukovaná disociace
- ECD – Electron Capture Dissociation – Disociace iontů elektronovým záchytem
- ETD – Electron Transfer Dissociation – Disociace přenosem elektronů

3.1.2 Seznam použité literatury a internetových odkazů

- Rudolf Brdička, Jiří Dvořák, *Základy fyzikální chemie*, nakladatelství Českoslov. akademie věd, Praha 1977
Kolektiv autorů, *Malá encyklopedie chemie*, nakladatelství Obzor-Bratislava 1968, Technické literatury Praha 1976
Zdeněk Mička, Ivan Lukeš, *Teoretické základy anorganické chemie*, nakladatelství Karolinum, Praha 2009
John McMurry, *Organická chemie, Vysoké učení technické v Brně/nakladatelství VUTIUM-Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*
<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc>
<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/tlcp.html>
¹ http://www.wikiskripta.eu/index.php/Biochemick%C3%A1_anal%C3%BDza_krve
² F. Opekar, I. Jelínek, P. Rychlovský, Z. Plzák, *Základní analytická chemie*, nakladatelství Karolinum, Praha 2010
³ F. Albert Cotton, Geoffrey Wilkinson, F.R.S., *Anorganická chemie-souborné vydání pro pokročilé 1. vydání*, nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1973,
⁴ <http://web.telecom.cz/silcarbon/vseobecn%C4%9B.html>
⁵ http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4277758.htm
⁶ <http://www.labmanager.com/?articles.view/articleNo/3845/article/UHPLC>
⁷ http://www.polymicro.com/catalog/3_5.htm
⁸ Kolektiv autorů, *Biochemie základní kurz*, nakladatelství Karolinum, Praha 2009
⁹ http://www.photronlamp.com/assets/brochures/deuterium_lamp.pdf
¹⁰ http://en.wikipedia.org/wiki/Halogen_lamp
¹¹ William Aston – the man behind the mass spectrograph, *European Journal of Mass Spectrometry* 13 (3), KM Downard, 2007: 177–190
Price, Phil (1991), Standard definitions of terms relating to mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2 (4), 1991, 336–348
¹² A. P. Bruins, Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure, *Mass Spectrometry Reviews* 10 (1), 1991, 53–77
¹³ Godula M., Ionizace laserem za přítomnosti matrice za atmosférického tlaku – nový směr v analýze peptidů a proteinů, *Chemické listy*, 2005, 99, 930 – 936
¹⁴ Bier M. E. Coupling ESI and MALDI Sources to the Quadrupole Mass Filter, Quadrupole Ion Trap, Linear Quadrupole Ion Trap, and Orbitrap Mass Analyzers in Cole R. B. (editor), *Electrospray and MALDI mass spectrometry fundamentals, instrumentation, practicalities and biological applications*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2010, 265-345
L. M. Matz, G. R. Asbury and H. H. Hill, Two-dimensional separations with electrospray ionization ambient pressure high-resolution ion mobility spectrometry/quadrupole mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16 (7) 2002, 670–675
¹⁵ Kolektiv autorů, *Biochemie základní kurz*, nakladatelství Karolinum, Praha 2009
¹⁶ <http://www.finearradiography.com/hobbies/lasers/nitrogen/>
¹⁷ <http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/mag-sect.htm>
¹⁸ Wollnik, H, In the event that the ions do not start at identical kinetic energies, some ions may lag behind higher kinetic energy ions decreasing resolution. Reflectron geometries are commonly employed to correct this problem, *Time-of-flight mass analyzers*, *Mass Spectrometry Reviews* 12 (2) 1993, 89
¹⁹ R. E. March, Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century, *International Journal of Mass Spectrometry* 200 (1–3), 2000, 285–312
Schwartz, Jae C., Michael W. Senko, John E. P. Syka, A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 13 (6), 2002, 659–669
<http://www.okbpavlin.cz/prirucka/JVATM>
²⁰ Agilent technologies, *Innovating the HP Way, Basics of LC/MS*, 2001, 6-14
²¹ <http://en.wikipedia.org/wiki/Photodetector>
²² <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/747-fotonasobic>
²³ http://en.wikipedia.org/wiki/Quadrupole_mass_analyzer
²⁴ Robert K. Boyd, Linked-scan techniques for MS/MS using tandem-in-space instruments, *Mass Spectrometry Reviews* 13 (5–6), 1994, 359–410
Arnott D., *Basics of Triple-Stage Quadrupole/Ion-Trap Mass Spectrometry: Precursor, Product and Neutral-Loss Scanning*, *Electrospray ionization and Nanospray ionization in James P. (editor), Proteome Research Mass Spectrometry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001, 11 – 31

-
- ²⁵ Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman and R. G. Cooks, The Orbitrap: a new mass spectrometer, *Journal of Mass Spectrometry* 40 (4), 2005: 430–443
Makarov A., Scigelová M., Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, *Journal of Chromatography*, 2010, 1217, 3938 – 3945
- ²⁶ http://rodgers.chem.wayne.edu/pire/education/Collision-induced%20dissociation_PIRE.pdf
- ²⁷ McAlister G. C. a kol., A Proteomics Grade Electron Transfer Dissociation – enabled Hybrid Linear Ion Trap – Orbitrap Mass Spectrometer, *Journal of Proteome Research*, 2008, 7, 3127 – 3136
- ²⁸ <http://en.wikipedia.org/wiki/Ibuprofen>
- ²⁹ Spark System Solutions BV, Determination of Atorvastatin and its ortho-, para-Hydroxy metabolites in serum by XLC-MS using symbiosis™Pharma, *Bendienplein 5*, 2005