

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jan Slováček

POROVNÁNÍ HPLC-UV A HPLC-MS/MS METOD
V ANALÝZE VYBRANÝCH 1,4-BENZODIAZEPINŮ

Comparison of HPLC-UV and HPLC-MS/MS methods
for analysis of selected 1,4-benzodiazepines

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Petr Kozlík

Praha 2014

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 1. května 2014.

Abstrakt

Cílem této práce byla optimalizace separačních podmínek vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro separaci oxazepamu a lorazepamu. Dále byla porovnána detekce s diodovým polem a hmotnostním spektrometrem. Pro hmotnostní spektrometr byly použity dva druhy iontových zdrojů – klasického elektrosprej a elektrosprej s přídavným tryskovým proudem.

Optimálních separačních podmínek bylo dosaženo použitím mobilní fáze obsahující acetonitril/0,1% octovou kyselinu (30/70) (v/v) a separační kolony Kinetex C8 100A (75 x 2,1 mm, 2,6 μm). Za těchto separačních podmínek došlo k rozdělení studovaných analytů na základní linii a celková doba analýzy nepřesáhla tři minuty.

Ze studovaných detekcí bylo dosaženo nejnižších hodnot limitu detekce (LOD) a limitu stanovitelnosti (LOQ) pomocí ionizace elektrosprejem s přídavným tryskovým proudem. Pro tento typ ionizace se limity detekce pohybovaly od 17 μg ml⁻¹ do 32 μg ml⁻¹.

Klíčová slova

1,4-benzodiazepiny, HPLC-UV a HPLC-MS/MS

Abstract

This work was focused on the optimization of separation of oxazepam and lorazepam in high performance liquid chromatography. Diode array detection and mass spectrometric detection using electrospray ionization and electrospray ionization with Jet Stream technology were optimized and compared.

The optimal chromatographic system consisted of a Kinetex C8 100A (75 x 2.1 mm, 2.6 μm) and binary mobile phase of acetonitrile/0.1% formic acid (30/70) (v/v). Under the optimized separation conditions both studied compounds were baseline resolved and eluted within 3 min.

Electrospray ionization with Jet Stream technology provided the lowest values of the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). Limits of detection were ranging from 17 to 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Keywords

1,4-benzodiazepines, HPLC-UV and HPLC-MS/MS

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Petru Kozlíkovi a své konzultantce doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za pomoc při řešení mé bakalářské práce, a také za rady, odbornost a velikou míru trpělivosti, kterou se mnou měli.

Také bych chtěl poděkovat své rodině, že mi dodávali energii do práce a nechávali mi klid, když jsem ho nejvíce potřeboval.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	7
2. ÚVOD.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Benzodiazepiny	10
3.2 Metody využívané k detekci benzodiazepinů	11
3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	15
3.4 Typy detekce v HPLC.....	16
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
4.1 Chemikálie.....	19
4.2 Přístroje.....	19
4.3 Programy.....	19
4.4 Příprava vzorků	19
4.5 Optimalizace separace oxazepamu a lorazepamu.....	20
4.6 Optimalizace nastavení hmotnostního detektoru	20
4.7 Kalibrační závislosti, limit detekce a limit stanovitelnosti.....	21
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	22
5.1 Optimalizace separačních podmínek	22
5.2 Optimalizace hmotnostního spektrometru	26
5.3 Kalibrační závislosti pro testované typy detekce	32
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	37

1. SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

°C	stupeň Celsiův, jednotka teploty
ACPI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
A_s	faktor asymetrie píku
a.u.	relativní jednotka prošlého světla
CZE	zónová kapilární elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
ESI	ionizace elektrosprejem
ESI-JS	ionizace elektrosprejem s přídatným tryskovým proudem
dm^3	decimetr krychlový, jednotka objemu
g	gram, jednotka hmotnosti
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GABA _A -receptor	podjednotka receptoru pro γ -aminomáselnou kyselinu
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IT	iontová past
k	retenční faktor
λ	vlnová délka
LD ₅₀	letální dávka pro 50 % jedinců
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
m	metr, jednotka délky
min	minuta, jednotka času
MRM	mód multiplexní reakce
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr molekulové hmotnosti a nábojového čísla
N	teoretický počet pater na metr kolony
NP	normální fáze

Pa	pascal, jednotka tlaku
PDA	fotodiodové pole
PPSP	průtok přídavného sušícího plynu
Q	kvadrupól
$R_{1,2}$	rozlišení dvou píků
RP	reversní fáze
s.....	sekunda, jednotka času
S	siemens, jednotka vodivosti
SD	směrodatná odchylka
SIM	monitorování vybraných iontů
SPE	extrakce na pevné fázi
t	čas
TOF.....	průletový analyzátor
TPSP	teplota přídavného sušícího plynu
UV	ultrafialová oblast
V	volt, jednotka napětí
VIS.....	oblast viditelného světla

2. ÚVOD

Benzodiazepiny jsou nedílnou součástí dnešních léků, působí jako psychoaktivní látky¹. Jsou v přípravcích určených k nespavosti, v lécích na zklidnění, mohou se používat i při léčbě epilepsie. Při dlouhodobém používání se mohou vyskytnout i negativní účinky poruchy změny osobnosti jako je apatie či ztráta soustředění.

Benzodiazepiny jsou nejčastěji stanovovány v krvi, séru, moči a ve vlasech. Kvůli nadměrnému používání mnoha léčiv, včetně benzodiazepinů, se mohou tyto látky dostávat do životního prostředí. Benzodiazepiny se spolu s dalšími látkami stanovují ve vzorcích vod a kalů.

Pro separaci této skupiny léčiv se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC) a kapilární elektroforéza (CZE). Méně častá jsou stanovení pomocí imunoanalytických metod, voltametrie či potenciometrie.

Cílem této bakalářské práce bylo nalézt vhodné podmínky k separaci oxazepamu a lorazepamu na separační koloně obsahující povrchově porézní částice. Dále byly porovnány z hlediska citlivosti dva typy detekce a to detekce s diodovým polem a tandemová hmotnostní detekce. Optimalizovaná LC-MS metoda bude v budoucnu použita ke stanovení benzodiazepinů v reálných vodných vzorcích.

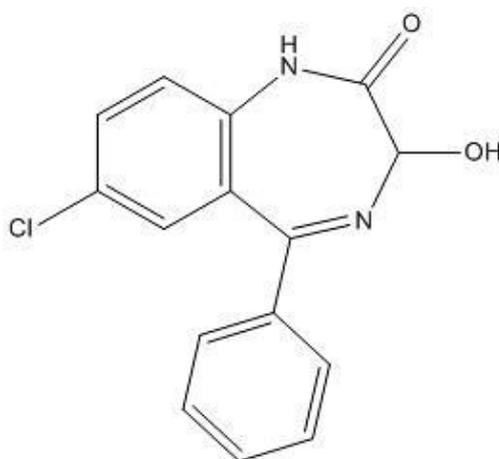
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Benzodiazepiny

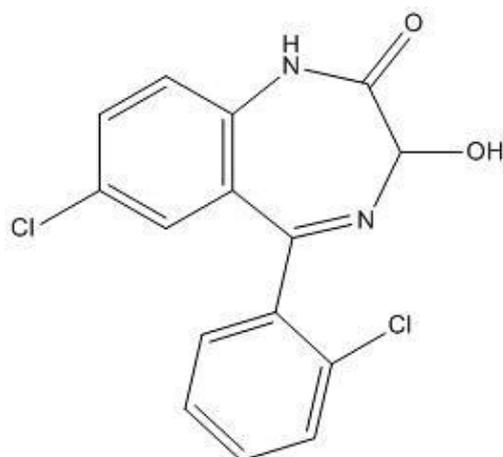
Benzodiazepiny jsou psychoaktivní látky, které se vážou na GABA_A -receptor pro γ -aminomáselnou kyselinu (GABA)¹. GABA je jedním z neurotransmiterů, který snižuje dráždivost buněk. Navázáním GABA na GABA_A -receptor dojde k otevření iontového kanálu pro chloridy a následnému zvýšení membránového potenciálu. Touto kaskádou dějů dojde ke snížení citlivosti buňky. Na tento receptor působí nejenom benzodiazepiny, ale i barbituráty, nebenzodiazepinová hypnotika nebo ethanol².

Jako první pro perorální podání byl syntetizován diazepam pod obchodní značkou Valium³. Oxazepam se používá jako střednědobé hypnotikum, lorazepam slouží jako antiepileptikum.

Základní strukturální jednotkou je 1,4-benzodiazepin, který je různě substituovaný dalšími funkčními skupinami. Mezi zkoumanými látkami v této práci byl oxazepam, který je na obr. 1 a lorazepam na obr. 2. V tab. 1 jsou uvedeny vybrané vlastnosti obou analytů.



Obr. 1: Strukturální vzorec oxazepamu. (7-chloro-3-hydroxy-5-fenyl-1,3-dihydro-2H-benzo[e][1,4]diazepin-2-on)



Obr. 2: Strukturální vzorec lorazepamu. (7-chloro-5-(2-chlorofenyl)-3-hydroxy-1,3-dihydro-2*H*-benzo[e][1,4]diazepin-2-on)

Tab. 1: Vybrané vlastnosti oxazepamu a lorazepamu.

Látka	Relativní hmotnost	Molekulový vzorec	pK_A	LD ₅₀ (myš, orálně) [mg kg ⁻¹]
oxazepam	286,715	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	11,2	1540
lorazepam	321,157	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	11,0	1850

3.2 Metody využívané k detekci benzodiazepinů

Nejčastější metodou detekce a separace benzodiazepinů, respektive oxazepamu a lorazepamu, je HPLC-MS/MS⁶⁻¹⁸ nebo HPLC-UV^{4,5}. Biologické vzorky a vzorky vod jsou často analyzovány plynovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií^{19,20}. V menší míře jsou k analýze benzodiazepinů použity kapilární elektroforéza²¹, imunoanalytické metody²², voltametrie²³ nebo potenciometrie²⁴.

Většina analýz je provedena pomocí HPLC s reversními fázemi. Nejčastěji používanými stacionárními fázemi byla oktadecylová stacionární fáze^{4,8,9,18} nebo oktylová fáze^{5,6,10}. Jako mobilní fáze se používala kombinace vody a acetonitrilu⁴ často s přídavkem mravenčí kyseliny⁶. Byly publikovány práce, které používaly tříslózkové mobilní fáze obsahující acetonitril, methanol a octan amonný⁷. Isokratické eluce⁴ jsou méně časté než gradientové.

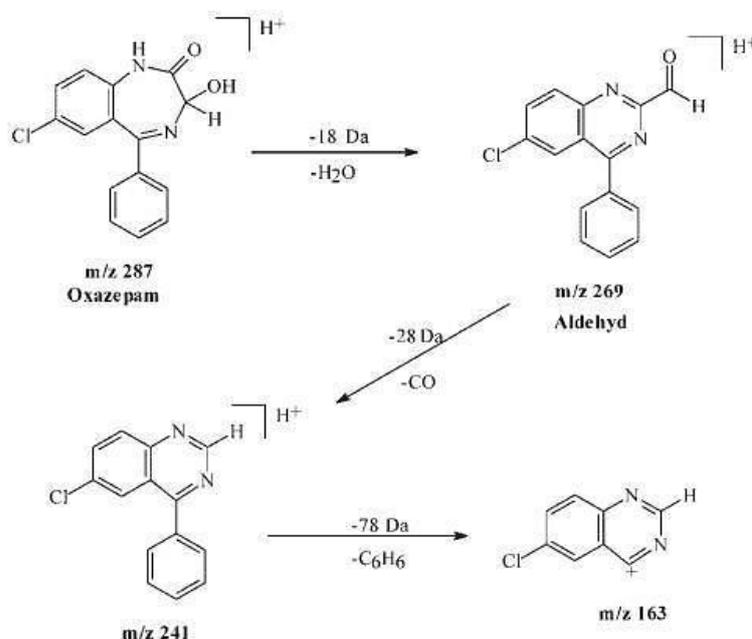
Benzodiazepiny jsou nejčastěji stanovovány v biologických vzorcích, jako jsou vlasy, krev či krevní sérum, sliny a moč. Vybrané separace biologických materiálů jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2: Přehled vybraných separací pro stanovení benzodiazepinů v lidských a zvířecích biologických vzorcích.

Benzodiazepiny	Mobilní fáze	Stacionární fáze (kolona)	Teplota kolony [°C]	Původ vzorku	LOD [ng ml ⁻¹]	LOQ [ng ml ⁻¹]	Detekce
Oxazepam, lorazepam a jiné ⁴	KH ₂ PO ₄ /CH ₃ OH/ (C ₂ H ₅) ₂ O	Supelcosil LC-18 DB (4,6 x 250 mm, 5 μm)	35	lidská plasma	50 50	75 75	UV (245 nm)
Oxazepam a jiné ⁵	CH ₃ CN/H ₂ O	Zorbax Eclipse C8 (4,6 x 150 mm, 5 μm)	-	kryší plasma a mozková tkáň	0,7	2,0	UV (238 nm)
Oxazepam a jiné ⁶	CH ₃ CN/HCOOH	XTerra MS C8 (2,1 x 250 mm, 5 μm)	-	lidská moč	13,9	42,0	ESI-Q-MS
Oxazepam, lorazepam a jiné ⁸	HCOOH/CH ₃ CN/ HCOONH ₄	Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm)	40	perorální tekutina	0,5 0,25	0,5 0,5	MS/MS
Oxazepam, lorazepam a jiné ⁹	HCOOH/CH ₃ CN/ HCOONH ₄	Waters SunFire C18 (2,1 x 150 mm, 3,2 μm)	30	krev, plasma a sérum	0,1 0,005	0,2 0,03	MS/MS
Oxazepam, lorazepam a jiné ¹⁰	CH ₃ CN/HCOOH	XTerra MS C8 (2,1 x 100 mm, 3,5 μm)	-	lidské vlasy	- -	1 5	MS/MS

Biologické materiály byly před analýzou přečištěny a zakoncentrovány pomocí extrakce na pevné fázi (SPE) nebo extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)^{4,10,13,14}.

T. Smyth a kol. se zabývali fragmentací oxazepamu v MS za použití elektrospreje jako iontového zdroje s dvěma různými hmotnostními analyzátoři¹¹. Prvně byl použit kvadrupól spojený s iontovou pastí (ESI-Q-IT) a následně kvadrupól spojený s průletovým analyzátořem (ESI-Q-TOF). Fragmentace oxazepamu je znázorněna na obr. 3.



Obr. 3: Fragmentace oxazepamu v MS¹¹.

Benzodiazepiny a jejich metabolity se vyskytují také v odpadních vodách¹². V publikaci z roku 2013 bylo zkoumáno 22 psychoaktivních látek včetně oxazepamu a lorazepamu v čistírnách odpadních vod v Pekingu v Číně. Předúprava vzorku byla pomocí SPE a separace probíhala na koloně X-bridge C18 (2 x 150 mm, 3,5 μm) při gradientové eluci. Mobilní fáze obsahovala 0,2% mravenčí kyseliny s hydroxidem amonným o pH 3,5 a druhá složka obsahovala 50/50 acetonitril/methanol (v/v). Detekce probíhala pomocí MS a jako iontový zdroj byl použit elektrosprej. Další stanovení benzodiazepinů pomocí HPLC v různých vzorcích vod jsou uvedena v tab. 3.

Tab. 3: Přehled vybraných separací pro stanovení benzodiazepinů z vodních zdrojů.

Benzodiazepiny	Mobilní fáze	Stacionární fáze (kolona)	Teplota kolony [°C]	Původ vzorku	LOD [ng ml ⁻¹]	LOQ [ng ml ⁻¹]	Detekce
Oxazepam a jiné ¹³	A: H ₂ O/CH ₃ OH/ CH ₃ COOH B: CH ₃ OH/CH ₃ COOH	Aquity UPLC BEH C18 (1 x 150 mm, 1,7 μm)	30	odpadní vody, kal	0,15	0,98	MS/MS
Lorazepam a jiné ¹⁴	CH ₃ OH/HCOOH	Pursuit UPS C18 (2,1 x 50 mm, 2,4 μm)	35	odpadní vody	2	6	MS/MS
Lorazepam a jiné ¹⁵	CH ₃ CN/H ₂ O	Purospher Star RP-18 (2,0 x 150 mm, 5 μm)	-	říční voda	-	-	MS/MS
Oxazepam a jiné ¹⁶	CH ₃ OH/HCOOH/ H ₂ O	XBridge C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μm)	21	odpadní vody	-	0,004	MS/MS
Oxazepam, lorazepam, a jiné ¹⁷	HCOONH ₄ /CH ₃ CN	Atlantis C18 (2,1 x 50 mm, 3 μm)	-	říční voda	-	10 10	MS/MS

Druhou nejčastěji používanou separační technikou po HPLC v analýze benzodiazepinů je plynová chromatografie (GC)^{19,20}. Dále mohou být benzodiazepiny stanoveny pomocí kapilární elektroforézy²¹.

3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Objevení kapalinové chromatografie je přisuzováno M. S. Cvětovi, kterému se podařilo na přelomu 19. a 20. století rozdělit rostlinná barviva pomocí systému, kde jako separační kolona sloužila skleněná trubice naplněná uhličitanem vápenatým a jako mobilní fáze byla použita různá organická rozpouštědla²⁵.

HPLC je separační metoda založená na různé distribuci látky mezi stacionární a mobilní fází. Separace v chromatografické koloně probíhá kvůli rozdílné afinitě látek ke stacionární a mobilní fázi. Čím silněji je vázán analyt, pohybující se s mobilní fází, na stacionární fázi, tím se zvyšuje jeho retenční čas a dojde k postupné separaci látek do jednotlivých zón.

Základní rozdělení kapalinové chromatografie je na chromatografii s normálními fázemi (NP) a na chromatografii s reversními fázemi (RP)²⁶. Jako první byla objevena chromatografie s normálními fázemi, kdy stacionární fáze je polární a mobilní fáze složkou nepolární. Nejběžněji používanými mobilními fázemi v chromatografii s normálními fázemi jsou například hexan či heptan. Stacionární fáze jsou většinou na bázi porézního oxidu hlinitého, oxidu křemičitého nebo oxidu hořečnatého. Chromatografie s normálními fázemi se využívá pro separaci polárních látek.

Chromatografie s reversními fázemi je opakem chromatografie s normálními fázemi, tzn. používá nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. Téměř 90 % analýz nízkomolekulárních látek se provádí pomocí chromatografie s reversními fázemi. V současné době se na trhu vyskytuje celá řada stacionárních fází určených pro chromatografii s reversními fázemi, ať už se jedná o klasické silikagelové stacionární fáze, které mohou být modifikovány řadou ligandů (oktadecyl, oktyl, fenyl, bifenyl, fenylhexyl a jiné), přes polymerní či monolitické až po hybridní stacionární fáze, které jsou velmi populární v ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Jedním se současných trendů v HPLC je použití kolon s povrchově porézními částicemi. Povrchově porézní částice jsou tvořeny neporézním silikovým jádrem, na kterém je nanesena vrstva stacionární fáze. Tyto kolony poskytují vysokou separační

účinnost kvůli užší distribuci velikosti částic a vyšší hustotě naplnění kolony v porovnání s klasickými plně porézními částicemi. Kolony s povrchově porézními částicemi o velikosti částic 2,6 μm poskytují podobnou účinnost jako klasické kolony s plně porézními částicemi o velikosti pod 2 μm .

V dnešní době se stále více hledí na miniaturizaci stacionárních fází²⁷. Vznikají tím oblasti výzkumu jako čipové nano-kapalinové-chromatografické systémy.

3.4 Typy detekce v HPLC

Pro detekci analytů ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii se používají různé typy detektorů²⁸. Nejběžnějšími jsou detektory absorpční fotometrické (měřící prošlé světlo), hmotnostní spektrometry (MS), fluorescenční (měřící sekundární záření po absorpci primárního elektromagnetického záření), amperometrické (měřící vzniklý proud při průchodu oxidované či redukované formy látky) a refraktometrické (pracující na indexu lomu světla).

Nejběžněji používaným detektorem je absorpční fotometrický²⁹, který pracuje v UV/VIS oblasti. Měřenou veličinou je absorbance, která je dána Lambertovým-Beerovým zákonem podle rovnice (3.1).

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot c = -\log T \quad (3.1)$$

kde A je absorbance, ε_{λ} molární absorpční koeficient [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$], l délka květy [cm], c molární koncentrace [mol dm^{-3}] a T transmitance.

Důležitou součástí fotometrického detektoru je zdroj světla. Pro světlo ve viditelné oblasti se využívá wolframová žárovka, v ultrafialové oblasti je to deuteriová výbojka. Pracuje se při stálé vlnové délce.

Existují také detektory diodového pole, PDA – fotodiodové pole, které měří absorbanci v celém rozsahu spektra, aniž by se přerušovala samotná separace. Výsledkem je záznam ve 3D – na hlavní ose x je eluční čas, na ose y je velikost absorbance a na ose z vlnové délky.

Dalším velmi hojně využívaným detektorem je hmotnostní spektrometr. Metoda hmotnostní spektrometrie je založena na převedení molekuly na kladné či záporné ionty a následné separaci iontů na základě jejich poměru molekulové hmotnosti a nábojového čísla (m/z).

Velmi důležitou částí MS je iontový zdroj, který slouží k převedení analytu na kladně či záporně nabitě ionty. Ve spojení LC/MS se používají ionizační techniky za atmosférického tlaku: ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).

Elektrosprej je nejčastěji používaným iontovým zdrojem²⁹. Princip vzniku iontů je následující. Mobilní fáze s analytem prochází kapilárou, na které je vloženo napětí. Intenzivní pole na konci kapiláry tvoří kónický meniskus, ze kterého se uvolňuje sprej vysoce nabitých kapiček. Následným odpařením rozpouštědla (pomocí inertního plynu) vznikají ionty, které jsou iontovou optikou vedeny do hmotnostního analyzátoru. Mohou vznikat záporné i kladné ionty, závisí na polaritě vloženého napětí. Výhodou elektrospreje je široká oblast použití, nevýhodou je omezená použitelnost pro nepolární mobilní fáze a látky.

Některé komerční firmy používají různé modifikace elektrospreje. Například firma Agilent umožňuje k ionizaci analytů používat elektrosprej s přídavným tryskovým proudem (ESI-JS). Tato technologie zlepšuje desolvataci iontů a jejich prostorové zaostření, čímž u řady analytů dochází k citlivější detekci.

Druhým nejčastěji používaným ionizačním zdrojem je chemická ionizace za atmosférického tlaku. Princip vzniku iontů je následující. Mobilní fáze s analytem je rozprašována do vyhřívané komůrky. Zdrojem elektronů je koronový výboj, který ionizuje plyny ve zdroji. Vzniklé ionty kolidují s molekulami rozpouštědla za vzniku sekundárních reakčních iontů, které následně ionizují molekuly analytu. Výhodou APCI je uplatnění pro méně polární látky, nevýhodou je nevhodnost pro termálně labilní látky.

Třetím nejčastěji používaným ionizačním zdrojem je fotoionizace za atmosférického tlaku. APPI využívá UV lampy, která je zdrojem fotonů, které jsou absorbovány molekulami analytu za vzniku iontů. APPI je vhodná pro látky, které se špatně ionizují v ESI a APCI.

Hmotnostní analyzátory rozlišují ionty podle jejich podílu hmotnosti a náboje (m/z). Využívá se magnetický hmotnostní analyzátor, kvadrupólový analyzátor, průletový analyzátor (TOF) a iontová past (IT). Nejstarším hmotnostním analyzátozem je magnetický analyzátor. Ten funguje na principu elektromagnetů, mezi kterými prolétávají ionty. Dalším typem hmotnostního analyzátoru je kvadrupólový analyzátor,

který je tvořen čtyřmi kruhovými tyčemi připojenými ke stejnosměrnému a střídavému napětí. Ionty uvnitř tohoto pole začnou oscilovat a k detektoru projdou pouze ionty o určené m/z . Průletový analyzátor je tvořený pouze trubicí, která je evakuována. Separace iontů je dána jejich odlišnou dobou letu z iontového zdroje do detektoru. Iontová past zadržuje ionty mezi elektrodami a propouští je dále.

Výsledkem snahy spojit výhody jednotlivých analyzátorů jsou hybridní analyzátoři – trojitý kvadrupól (QQQ), kde druhý kvadrupól funguje jako kolizní cela (někdy označováno QqQ), iontová past-kvadrupól (IT-Q) a kvadrupól-průletový analyzátor (Q-TOF).

Další součástí hmotnostního spektrometru je detektor. Používají se elektronásobiče nebo fotonásobiče²⁹. Elektronásobič je založen na sérii dynod se vzrůstajícím potenciálem. Fotonásobičové detektory jsou citlivější a mají delší životnost. Fungují na principu přeměny iontu na konverzní dynodě na elektrony, které dále dopadají na fosforovou destičku, kde dochází k emisi fotonů. Ty dopadají na fotokatodu, kde fotoelektrickým jevem dojde k emisi elektronů, které jsou znásobeny soustavou dynod.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

- acetonitril (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma – Aldrich, Německo)
- methanol (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma – Aldrich, Německo)
- mravenčí kyselina (čistota 98 – 100 %, Merck, Německo)
- deionizovaná voda (vodivost 1,85 μS)
- lorazepam (čistota ≥ 99 %, poskytnuto Martinem Schmidem, Univerzita ve Štýrském Hradci, Štýrský Hradec, Rakousko)
- oxazepam (čistota ≥ 99 %, poskytnuto Martinem Schmidem, Univerzita ve Štýrském Hradci, Štýrský Hradec, Rakousko)

4.2 Přístroje

- HPLC – kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1260 Infinity s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Agilent Technologies Triple Quad
- kolona: Kinetex C8 100A (75 x 2,1 mm, velikost částic 2,6 μm), (Phenomenex, Torrance, Kalifornie, USA)
- analytické váhy – APX-100 (Denver Instrument, Německo)
- ultrazvuk – Ultrasonic LC 30H (Německo)

4.3 Programy

- sbírání dat v programu Agilent MassHunter Workstation Acquisition verze B.03.01 (Agilent Technologies, USA)
- zpracování dat v programu Agilent MassHunter Qualitative Analysis verze B.03.01 (Agilent Technologies, USA), Microsoft Excel 2010 Professional (Microsoft Co., USA) a OriginPro 8.0 (OriginLab Co., USA)

4.4 Příprava vzorků

Zásobní roztoky byly připraveny navážením 10,0 mg oxazepamu a 9,5 mg lorazepamu, které byly kvantitativně převedeny do 10,0 ml odměrných baněk a rozpuštěny 50% acetonitrem. Odměrné baňky s roztoky byly následně umístěny

na deset minut do ultrazvukové lázně. Zásobní roztoky byly použity pro měření kalibračních závislostí.

4.5 Optimalizace separace oxazepamu a lorazepamu

Bylo optimalizováno složení mobilní fáze vhodné k separaci oxazepamu a lorazepamu. Byly testovány mobilní fáze obsahující acetonitril nebo methanol jako organický modifikátor s 0,1% mravenčí kyselinou v různém objemovém poměru. Všechny analýzy probíhaly při průtoku mobilní fáze $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ za isokratické eluce. Teplota kolony byla nastavena na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a vzorky udržovány při teplotě $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Objem nástřiku byl $1 \text{ } \mu\text{l}$. Byl sledován vliv obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi na retenci sledovaných analytů, symetrii píků, počet teoretických pater na metr kolony a rozlišení analytů.

4.6 Optimalizace nastavení hmotnostního detektoru

Za již optimalizovaných separačních podmínek byl proveden scan blanku a vzorku, obsahující oba analyty. Po zjištění prekurzorových iontů obou analytů bylo optimalizováno napětí na fragmentoru v módu monitorování vybraných iontů (SIM). Následně byly zjištěny produktové ionty a byla optimalizována v módu multiplexní reakce (MRM) hodnota kolizního napětí.

Byla hledána optimální hodnota napětí na fragmentoru, která je potřebná k tomu, aby maximální počet iontů daného analytu byl vtažen do hmotnostního spektrometru.

V kolizní cele se optimalizuje kolizní energie, která ovlivňuje fragmentaci prekurzorového iontu. Hodnota kolizní energie by měla být taková, aby z prekurzorového iontu vznikl specifický fragment o co nejvyšší intenzitě.

Byly hledány prekurzorové ionty oxazepamu a lorazepamu za použití ESI jako iontového zdroje za podmínek: teplota sušícího plynu $305 \text{ }^\circ\text{C}$, průtok sušícího plynu 10 l min^{-1} a tlaku nebulizéru $275,8 \text{ kPa}$. Fragmentace iontů probíhala při napětí 135 V a napětí kapiláry bylo 5000 V .

Byly zaznamenávány kladné $[\text{M} + \text{H}]^+$ ionty, které se tvoří snadněji, protože oba analyty obsahují sekundární aminoskupinu, kterou lze snadno protonizovat za tvorby kationtu.

Byly použity dva iontové zdroje – ESI a ESI-JS pro MS. U ESI byla optimalizována teplota plynu, průtok plynu, tlak nebulizéru a napětí kapiláry. U ESI-JS se

optimalizovaly hodnoty teploty plynu, průtoku plynu, tlaku nebulizéru, teplota přídavného sušícího plynu a průtok přídavného sušícího plynu. Hodnota napětí kapiláry byla vzata stejná z předchozí optimalizace.

4.7 Kalibrační závislosti, limit detekce a limit stanovitelnosti

Byly provedeny tři kalibrace za optimalizovaných separačních podmínek s různými způsoby detekce: HPLC-UV, HPLC-ESI-MS/MS, HPLC-ESI-JS-MS/MS. Linearita a test významnosti úseků byly vyhodnoceny pomocí Studentova testu.

Pro UV detekci bylo zjištěno absorpční maximum obou analytů, byla provedena kalibrační závislost oxazepamu od koncentrace $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ po koncentraci 122 ng ml^{-1} a lorazepamu od koncentrace $475 \mu\text{g ml}^{-1}$ po koncentraci 116 ng ml^{-1} .

Pro kalibraci HPLC-ESI-MS/MS byly nejdříve optimalizovány podmínky iontového zdroje ESI a poté měřena koncentrační řada oxazepamu v rozsahu od $31 \mu\text{g ml}^{-1}$ do 2 ng ml^{-1} . Lorazepam byl měřen v koncentračním rozsahu od $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ do 2 ng ml^{-1} .

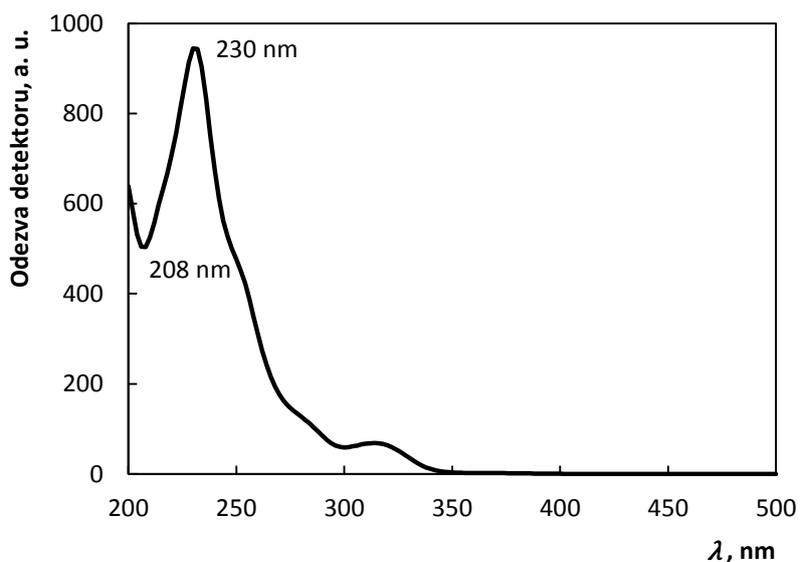
Pro kalibrační závislost HPLC-ESI-JS-MS/MS byly měřeny koncentrace oxazepamu stejné jako v předešlé analýze HPLC-ESI-MS/MS, pro lorazepam byly koncentrace v rozsahu od $32 \mu\text{g ml}^{-1}$ do 2 ng ml^{-1} .

Limit detekce (LOD) byl počítán jako trojnásobek šumu základní linie a vydělen směrnici kalibrační přímky závislosti výšky píku na koncentraci daného analytu. Limit stanovitelnosti (LOQ) byl brán jako desetinásobek šumu základní linie a vydělen směrnici kalibrační přímky. Šum základní linie byl stanoven jako rozptyl hodnot při desetinásobku šířky píku při základně.

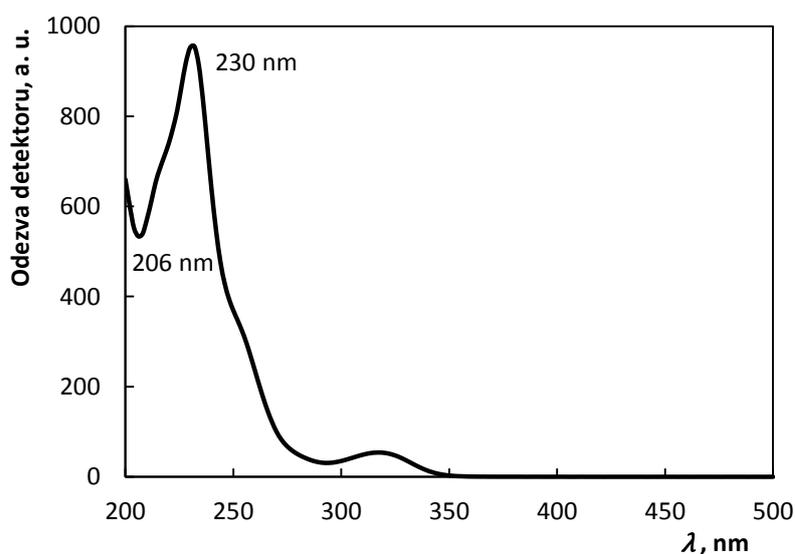
5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace separačních podmínek

Optimalizace separačních podmínek byla prováděna za měření HPLC-UV. Jako vhodná vlnová délka detekce byla zvolena vlnová délka 230 nm, neboť se jedná o vlnovou délku absorpčního maxima, kdy dochází k maximální odezvě detektoru. Absorpční spektrum pro oxazepam je uvedeno na obr. 4 a pro lorazepam na obr. 5.



Obr. 4: Spektrum oxazepamu v UV/VIS oblasti.



Obr. 5: Spektrum lorazepamu v UV/VIS oblasti.

Nejprve byl použit acetonitril jako organická fáze a jako vodná fáze 0,1% mravenčí kyselina. Byl sledován vliv poměru organické a vodné složky v mobilní fázi na různé separační faktory: retenční faktor, faktor asymetrie píku, počet teoretických pater na metr kolony a rozlišení obou analytů. Údaje jsou uvedeny v tab. 4. Všechna měření byla prováděna v tripletech a do tabulky byly vzaty průměry naměřených veličin.

Z tab. 4 je zřejmé, že nejrychlejší eluce obou analytů probíhá při větším zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. Při vyšším obsahu acetonitrilu v mobilní fázi analyty eluují téměř s mrtvým časem a nedochází k jejich separaci. Symetrie píku je nejlepší pro 30% obsah acetonitrilu v mobilní fázi, kdy jsou píky nejméně odlišné od gaussovského píku. Při zvyšování obsahu acetonitrilu v mobilní fázi byl faktor asymetrie píků nižší než jedna, což značí rozmývání píků vpředu.

Tab. 4: Vliv poměru organické a vodné fáze na separaci analytů. (k – retenční faktor, A_s – faktor asymetrie píku, N – počet teoretických pater na metr kolony, $R_{1,2}$ – rozlišení píků a SD směrodatná odchylka. Mrtvý čas kolony je při výše daných podmínkách 0,49 min.

Analyt	CH ₃ CN/0,1% HCOOH		k (SD)	A_s (SD)	N (SD)	$R_{1,2}$ (SD)
	[obj. %]					
oxazepam	20/80		15,3 (0,0)	1,36 (0,0)	162190 (4300)	
	25/75		6,2 (0,1)	1,17 (0,0)	115060 (4110)	
	30/70		3,0 (0,0)	0,90 (0,0)	63160 (2180)	
	35/65		1,6 (0,0)	0,93 (0,1)	33460 (1750)	
	40/60		1,0 (0,0)	1,20 (0,0)	35670 (210)	
	45/55		0,6 (0,0)	0,87 (0,0)	14430 (1150)	
	50/50		0,4 (0,1)	0,78 (0,1)	9520 (870)	
lorazepam	20/80		20,7 (0,2)	1,33 (0,0)	163900 (1450)	7,7 (0,2)
	25/75		8,1 (0,1)	1,20 (0,1)	131130 (2240)	5,4 (0,1)
	30/70		3,7 (0,0)	0,94 (0,1)	74870 (2300)	3,0 (0,0)
	35/65		1,9 (0,0)	0,86 (0,1)	37990 (430)	1,5 (0,1)
	40/60		1,1 (0,0)	0,63 (0,0)	31320 (50)	1,0 (0,0)
	45/55		0,7 (0,0)	0,85 (0,1)	15140 (130)	- ^a
	50/50		0,5 (0,1)	0,87 (0,2)	11730 (1290)	- ^a

^a koeluce

Další studovanou mobilní fází byla směs methanol/0,1% mravenčí kyselina. Eluční síla methanolu je v reversní chromatografii menší než acetonitrilu, proto byly sledovány poměry s větším zastoupením methanolu ve směsi.

Opět byl sledován retenční faktor, faktor asymetrie píku, počet teoretických pater na metr kolony a rozlišení píků. Údaje jsou uvedeny v tab. 5.

Snižování zastoupení methanolu v mobilní fázi vedlo ke zvýšení účinnosti separace, k vyššímu rozlišení obou píků, k vyššímu retenčnímu faktoru, ale zároveň i delšímu času analýzy. Asymetrie píků je vyšší než jedna, píky se tedy rozmývají vzadu.

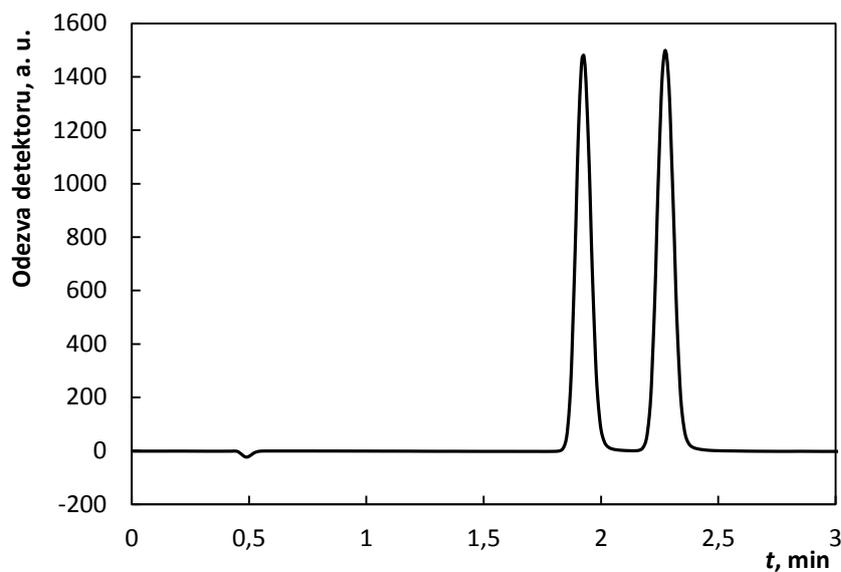
Methanol nebyl brán v úvahu pro separaci analytů, neboť s acetonitrem analýza trvala mnohem kratší dobu se shodným rozlišením píků. Nejvyšších hodnot retenčního faktoru bylo dosaženo při 35 obj. % methanolu ve směsi a zvyšováním zastoupení methanolu v mobilní fázi se retenční faktor snižoval.

Tab. 5: Vliv poměru organické a vodné fáze na separaci analytů. (k – retenční faktor, A_s – faktor asymetrie píku, N – počet teoretických pater na metr kolony, $R_{1,2}$ – rozlišení píků a SD – směrodatná odchylka. Mrtvý čas kolony je při výše daných podmínkách 0,61 min.

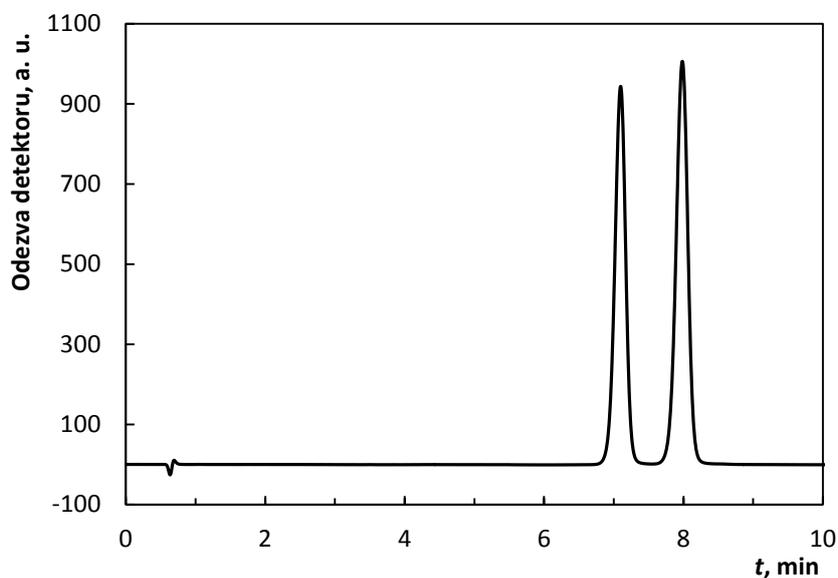
Analyt	CH ₃ OH/0,1% HCOOH	k (SD)	A_s (SD)	N (SD)	$R_{1,2}$ (SD)
	[obj. %]				
oxazepam	35/65	18,7 (0,1)	1,3 (0,04)	165090 (4492)	
	40/60	10,2 (0,0)	1,2 (0,05)	136330 (2550)	
	45/55	5,7 (0,1)	1,0 (0,07)	98400 (3550)	
	50/50	3,3 (0,1)	0,8 (0,00)	59480 (386)	
lorazepam	35/65	22,4 (0,1)	1,2 (0,04)	166890 (9490)	4,8 (0,1)
	40/60	11,6 (0,1)	1,1 (0,05)	144520 (4060)	3,0 (0,0)
	45/55	6,2 (0,1)	0,9 (0,07)	102150 (3090)	1,5 (0,1)
	50/50	3,4 (0,0)	0,8 (0,00)	56170 (2130)	- ^a

^a koeluce

Na obr. 6 je chromatogram za optimalizovaných separačních podmínek pro 30 obj. % acetonitrilu ve směsi. Analýza směsi oxazepamu a lorazepamu netrvá déle než tři minuty. Při použití methanolu jako mobilní fáze se prodloužila doba separace o více jak pět minut. To je zobrazeno na obr. 7. Objemové zastoupení methanolu bylo 40 obj. %.



Obr. 6: Chromatogram za optimalizovaných separačních podmínek: složení mobilní fáze acetonitril/0,1% mravenčí kyselina 30/70 (v/v), průtok $0,4 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$, objem nástřiku $1 \text{ } \mu\text{l}$ a vlnová délka 230 nm . Koncentrace oxazepamu byla $615 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, koncentrace lorazepamu $675 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.



Obr. 7: Chromatogram při složení mobilní fáze methanol/0,1% mravenčí kyselina 40/60 (v/v), průtok $0,4 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$, objem nástřiku $1 \text{ } \mu\text{l}$ a vlnové délce 230 nm . Koncentrace oxazepamu byla $615 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, koncentrace lorazepamu $675 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

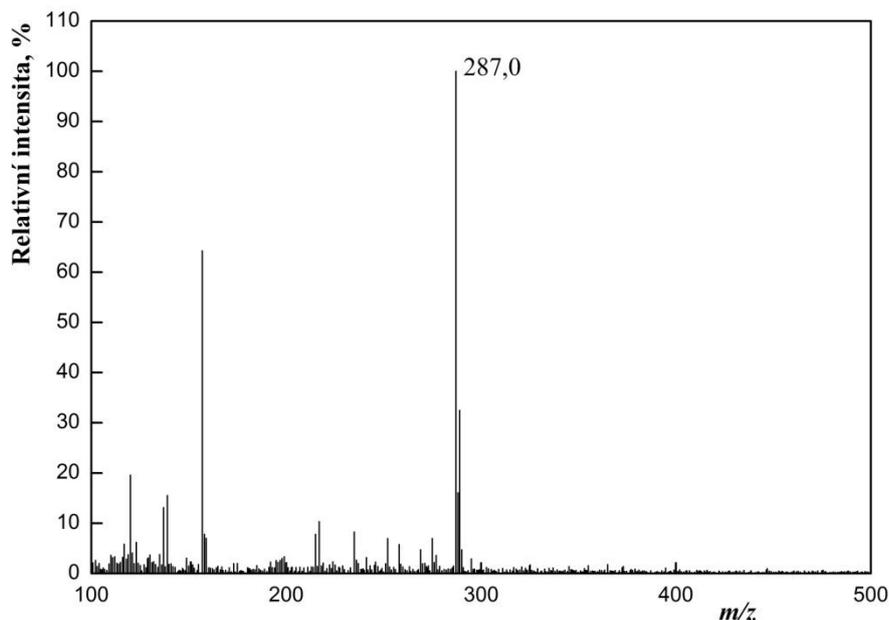
Pro další práci byla vybrána mobilní fáze ve složení 30/70 acetonitril/0,1% mravenčí kyselina (v/v), jelikož při tomto složení probíhala separace analytů nejrychleji a rozlišení píků bylo rovno 3,0.

5.2 Optimalizace hmotnostního spektrometru

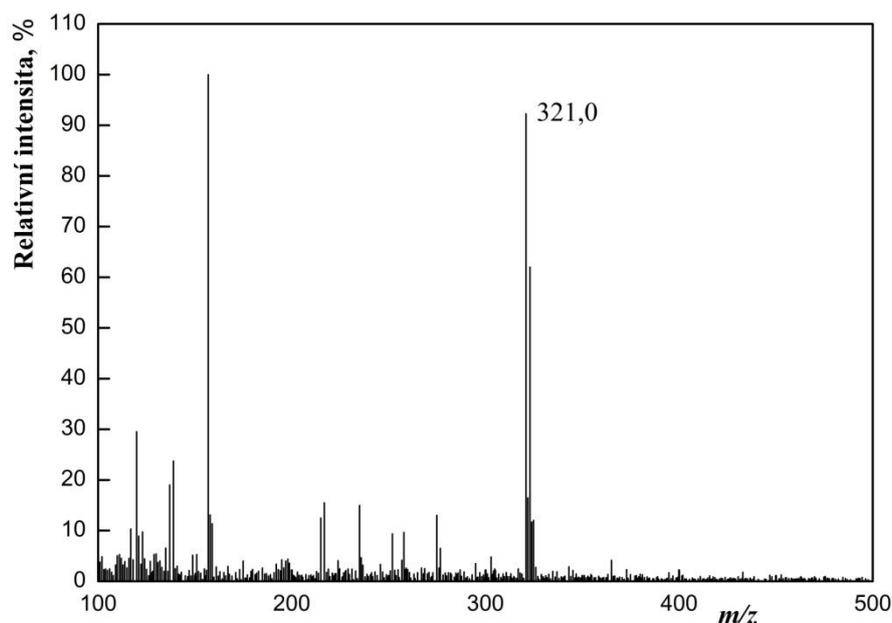
Za optimalizovaných separačních podmínek mobilní fáze acetonitril/0,1% mravenčí kyselina 30/70 (v/v), průtoku mobilní fáze $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ a teploty kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$ byla provedena optimalizace hmotnostního spektrometru.

Na obr. 8 je hmotností spektrum oxazepamu, na obr. 9 je hmotností spektrum lorazepamu. Zkoumané rozmezí bylo $100 - 500 \text{ m/z}$. Prekurzorovým iontem oxazepamu je iont o m/z 287,0, pro lorazepam je prekurzorový iont 321,0. Tyto fragmenty vykazovaly nejvyšší intenzitu.

Vysokou intenzitu měl pík o hodnotě m/z 156,9, který nepochází z ionizace studovaných látek, ale jedná se o kontaminaci iontového zdroje.



Obr. 8: Hmotnostní spektrum oxazepamu. Závislost relativní intenzity na poměru m/z .



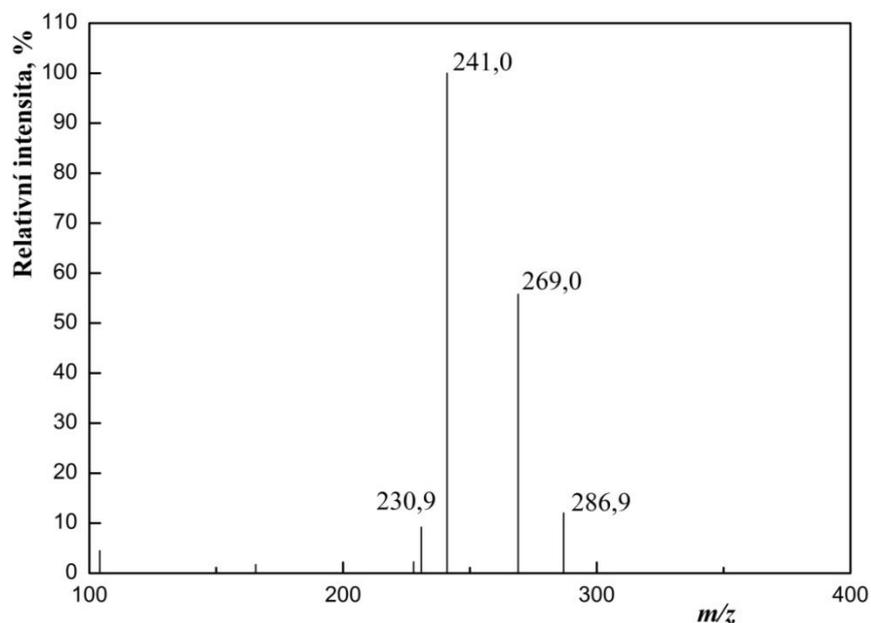
Obr. 9: Hmotnostní spektrum lorazepamu. Závislost relativní intenzity na poměru m/z .

Následně bylo optimalizováno napětí na fragmentoru. Údaje jsou uvedeny v tab. 6. Výška píku o nejvyšší intenzitě oxazepamu byla dosažena při napětí na fragmentoru 100 V, pro lorazepam při 105 V. Následně byly prekurzorové ionty štěpeny v kolizní cele. Hmotnostní spektra vzniklých fragmentací prekurzorových iontů jsou uvedena na obr. 10 pro oxazepam a na obr. 11 pro lorazepam.

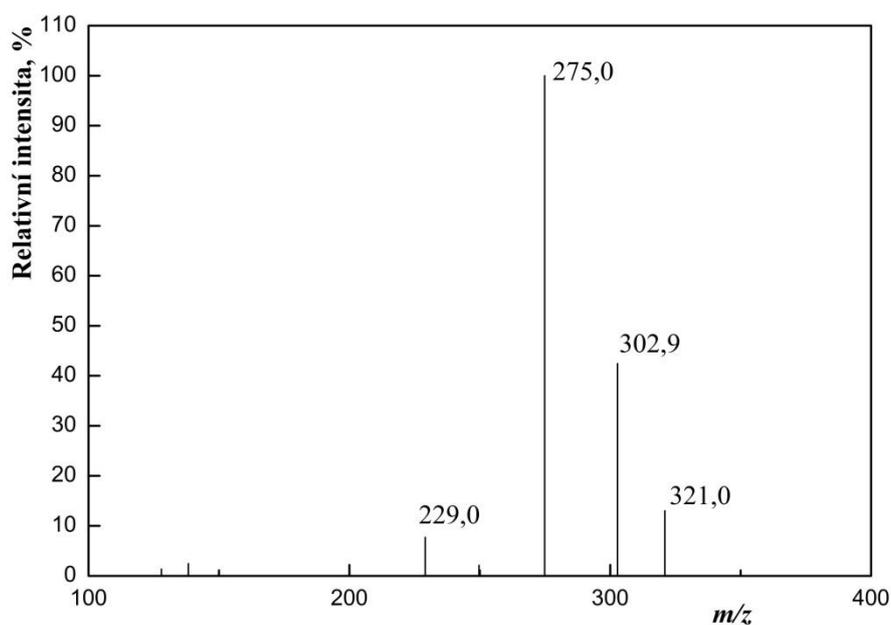
Tab. 6: Výšky píků oxazepamu a lorazepamu při změně napětí na fragmentoru.

Napětí na fragmentoru [V]	Výšky píků [a. u.]	
	Oxazepam	Lorazepam
90	49651	33720
95	49995	33572
100	52513	33143
105	50451	34413
110	51581	34032
130	48450	- ^a
135	52260	32254
150	48792	31595

^a nebylo měřeno

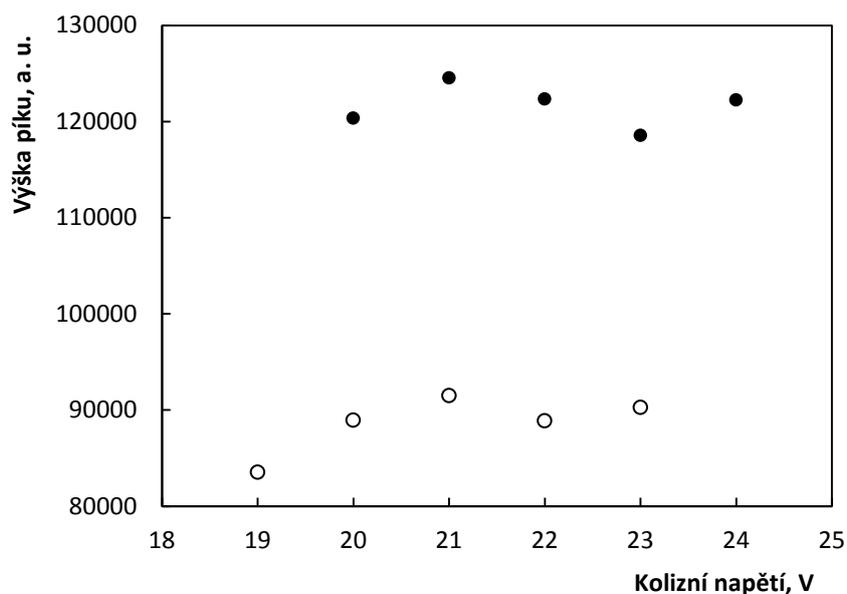


Obr. 10: Produktové ionty oxazepamu o m/z 287,0. Závislost relativní intenzity na poměru m/z .



Obr. 11: Produktové ionty lorazepamu o m/z 321,0. Závislost relativní intenzity na poměru m/z .

Dalším parametrem, který byl optimalizován, bylo kolizní napětí. Závislost intenzity výšky píku na kolizním napětí je uvedena na obr. 12. Pík o nejvyšší intenzitě byl zjištěn pro hodnotu kolizního napětí 21 V pro oba analyty, se kterou byly následně provedeny všechny další experimenty.



Obr. 12: Závislost výšky píku na kolizním napětí. (●oxazepam, ○ lorazepam)

Pro oxazepam, jehož prekurzorový iont měl m/z rovno 287,0 byl zvolen fragment o m/z 241,0, protože intenzita tohoto fragmentu byla nejvyšší. Prekurzorový iont lorazepamu měl hodnotu m/z 321,0 a jeho fragment o nejvyšší intenzitě byl o m/z 275,0. Všechny optimalizované údaje jsou uvedeny v tab. 7.

Tab. 7: Souhrn optimalizovaných veličin.

Analyt	Prekurzorový iont (m/z)	Produktový iont (m/z)	Napětí na fragmentoru [V]	Kolizní napětí [V]
Oxazepam	270,0	241,0	100	21
Lorazepam	321,0	275,0	105	21

Pro optimalizaci ESI jako iontového zdroje byly sledovány tyto parametry: teplota plynu, průtok plynu a tlak nebulizéru. Sledované parametry jsou uvedeny v tab. 8.

Tab. 8: Hodnoty výšek píků analytů pro měřené parametry: teplota plynu, průtok plynu a tlak nebulizéru.

Teplota plynu [°C]	Průtok plynu [dm ³ min ⁻¹]	Tlak nebulizéru [kPa]	Výšky píků [a. u.]	
			Oxazepam	Lorazepam
305	10	275,8	11731	9085
305	10	379,2	9809	7757
305	10	172,4	12725	9783
305	10	103,4	11847	9185
305	13	275,8	10509	8489
305	5	275,8	9684	7268
330	10	275,8	12147	9454
350	10	275,8	12836	10035
350	10	172,4	14455	11824

Pro optimální hodnoty – teplotu plynu 350 °C, průtok plynu 10 dm³ min⁻¹ a tlak nebulizéru 172,4 kPa bylo dále zjišťováno napětí kapiláry. Tyto parametry byly vybrány na základě nejvyšších výšek píků pro jednotlivá měření.

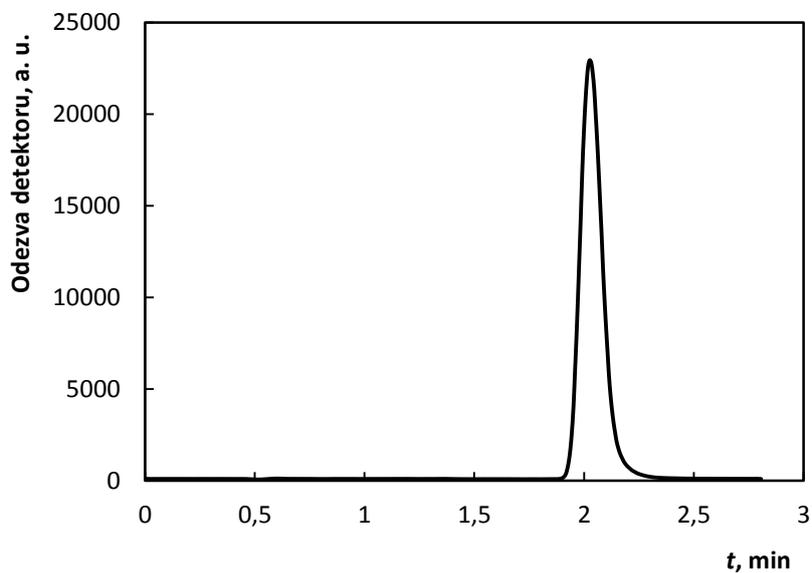
Pro oxazepam je výhodnější napětí 1000 V, pro lorazepam 2000 V. Jako optimální napětí kapiláry bylo vzato 2000 V, jelikož u oxazepamu nebyl veliký rozdíl výšek při 1 kV a 2 kV. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 9.

Tab. 9: Změřené parametry výšek píků pro různé kladné napětí kapiláry pro [M + H]⁺ ionty analytů.

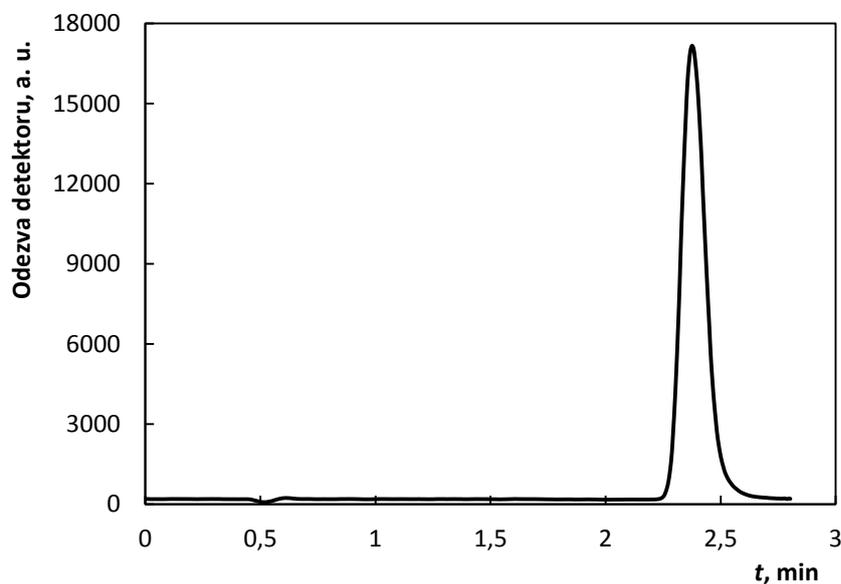
Napětí kapiláry [kV]	Výšky píků [a. u.]	
	Oxazepam	Lorazepam
5	13057	10231
4	14584	11351
3	17297	13520
2	22857	16963
1	23951	12572

Za všech optimalizovaných podmínek pro ESI a hmotností spektrometr: teploty plynu 350 °C, průtoku plynu 10 dm³ min⁻¹, tlaku nebulizéru 172,4 kPa, kolizním

napětí 21 V pro oba analyty a napětí na fragmentoru 100 V pro oxazepam a 105 V pro lorazepam byly změřeny záznamy LC-MS/MS. Záznam oxazepamu v MRM módu je na obr. 13, lorazepamu na obr. 14.



Obr. 13: Chromatogram v MRM módu pro oxazepam z prekurzorového iontu o m/z 287 na produktový iont o m/z 241.



Obr. 14: Chromatogram v MRM módu pro lorazepam z prekurzorového iontu o m/z 321 na produktový iont o m/z 275.

Následně byly optimalizovány parametry iontového zdroje ESI-JS. Zkoumány byly tyto parametry: teplota plynu, průtok plynu, tlak nebulizéru, teplota přídavného sušícího plynu (TPSP) a průtok přídavného sušícího plynu (PPSP). Napětí kapiláry bylo ponecháno na 2 kV, což bylo optimalizováno při optimalizaci ESI. Všechny optimalizované veličiny jsou uvedeny v tab. 10.

Tab. 10: Optimalizace parametrů iontového zdroje ESI-JS pro oba analyty.

Teplota plynu [°C]	Průtok plynu [dm ³ min ⁻¹]	Tlak nebulizéru [kPa]	TPSP [°C]	PPSP [dm ³ min ⁻¹]	Výšky píků [a. u.]	
					Oxazepam	Lorazepam
350	10	172,4	300	10	8148	5879
350	10	172,4	250	10	6878	4635
350	10	172,4	350	10	9416	7183
350	10	172,4	400	10	10945	7643
350	10	172,4	300	7	7064	4634
350	10	172,4	300	12	8394	6071
350	10	241,3	300	10	7405	5355
350	10	103,4	300	10	8101	5412
350	10	310,3	300	10	6845	4861
350	13	172,4	300	10	7331	5164
350	7	172,4	300	10	7813	5522
300	10	172,4	300	10	7542	5247
350	10	172,4	400	10	11657	8416

Parametry jako je teplota plynu, průtok plynu a tlak nebulizéru zůstaly stejné jako u požití ESI jako iontového zdroje. Nejvyšší hodnoty výšek píků pro ESI-JS měla hodnota 400 °C pro TPSP a PPSP měl nejlepší hodnotu 10 dm³ min⁻¹. Všechny tyto parametry jsou závislé na průtoku mobilní fáze.

5.3 Kalibrační závislosti pro testované typy detekce

Separční podmínky pro kalibraci oxazepamu a lorazepamu byly následující: acetonitril/0,1% mravenčí kyselina 30/70 (v/v), průtok mobilní fáze 0,4 ml min⁻¹, teplota kolony 30 °C, teplota vzorků 22 °C a objem nástřiku 1 µl. Měřilo se vždy

v tripletech.

Optimalizované podmínky pro ESI jsou: teplota plynu 350 °C, průtok plynu 10 dm³ min⁻¹ a tlak nebulizéru 172,4 kPa a ESI-JS jsou: teplota plynu 350 °C, průtok plynu 10 dm³ min⁻¹, tlak nebulizéru 172,4 kPa, teplota přídavného sušícího plynu 400 °C a průtok přídavného sušícího plynu 10 dm³ min⁻¹.

Výsledky regresní analýzy pro závislost výšky píku na koncentraci analytu jsou uvedeny v tab. 11. Regresní analýza pro plochy píku je uvedena v tab. 12.

Tab. 11: Výsledky regresní analýzy vyhodnocené z výšek píku. (R^2 je koeficient determinace a SD směrodatná odchylka)

Detekce	Analyt	Směrnice (SD) [a. u. ml ng ⁻¹]	Úsek (SD) [a. u.]	R^2	Lineární dynamický rozsah [ng ml ⁻¹]	LOD [ng ml ⁻¹]	LOQ [ng ml ⁻¹]
UV	oxazepam	10629 (40)	0,26 (1,76)	0,9999	122 – 125000	79	263
	lorazepam	9196 (148)	3,87 (6,06)	0,9977	116 – 119000	91	304
ESI	oxazepam	159,3 (2,4)	1321 (451)	0,9984	2 – 488	0,214	0,714
	lorazepam	150,9 (3,5)	531 (178)	0,9973	2 – 116	0,695	2,32
ESI-JS	oxazepam	629,2 (6,2)	783 (392)	0,9997	7 – 122	0,017	0,058
	lorazepam	363,6 (4,2)	449 (272)	0,9996	8 – 124	0,032	0,107

Tab. 12: Výsledky regresní analýzy vyhodnocené z ploch píku. (R^2 je koeficient determinace a SD směrodatná odchylka)

Detekce	Analyt	Směrnice (SD) [a. u. s ml ng ⁻¹]	Úsek (SD) [a. u.]	R^2	Lineární dynamický rozsah [ng ml ⁻¹]
UV	oxazepam	66262 (100)	-8,2 (4,3)	0,9999	122 – 125000
	lorazepam	59724 (906)	21,8 (37,2)	0,9979	116 – 119000
ESI	oxazepam	1177 (15)	8239 (2833)	0,9989	2 – 488
	lorazepam	1135 (27)	4441 (1375)	0,9971	2 – 116
ESI-JS	oxazepam	4103 (24)	2541 (1525)	0,9999	8 – 122
	lorazepam	2540 (42)	758 (2683)	0,9992	8 – 125

Z tab. 11 a 12 je patrné, že nejméně citlivou detekcí je UV detekce, která poskytovala LOQ v řádech stovek ng ml^{-1} . Na druhou stranu tato detekce poskytovala nejširší lineární dynamický rozsah měření. Při použití tandemové hmotnostní detekce s ESI se LOQ pohybovaly v řádech jednotek ng ml^{-1} . Při použití ESI-JS došlo ke snížení LOQ o další řád oproti ESI, na hodnoty desetín až setin ng ml^{-1} , což je způsobeno účinnějším odsušením mobilní fáze s tím spojené zvýšené tvorby iontů. Z tab. 11 je také vidět, že MS detekce poskytuje užší lineární dynamický rozsah koncentrací oproti UV detekci.

6. ZÁVĚR

Byla vyvinutá rychlá RP-HPLC metoda s UV a MS/MS detekcí pro stanovení oxazepamu a lorazepamu. Byl sledován vliv složení mobilní fáze na separaci studovaných analytů. Optimální separační podmínky byly následující: kolona Kinetex C8 s povrchově porézními částicemi o velikosti 2,6 μm , mobilní fáze 30/70 acetonitril/0,1% mravenčí kyselina (v/v), průtok mobilní fáze 0,4 ml min⁻¹ a teplota kolony 30 °C.

Následně byly optimalizovány parametry tandemového hmotnostního spektrometru. Byly nalezeny prekurzorové a produktové ionty studovaných analytů s optimálními hodnotami napětí na fragmentoru a kolizní energie vhodné k MRM měření. Oxazepamu odpovídal prekurzorový iont o m/z 287,0 (napětí na fragmentoru 100 V) a produktový iont o m/z 241,0 (kolizní energie 21 V). Lorazepamu odpovídal prekurzorový iont o m/z 321,0 (napětí na fragmentoru 105 V) a produktový iont o m/z 275,0 (kolizní energie 21 V). V závislosti na složení a průtoku mobilní fáze byla provedena optimalizace ESI a ESI-JS, aby došlo k odsušení mobilní fáze a efektivní tvorbě iontů.

Za optimalizovaných separačních a detekčních podmínek (UV, tandemová MS s ESI a ESI-JS) byla změřena kalibrační závislost ploch a výšek píků na koncentraci studovaných analytů. Nejnižších limitů detekce pro studované analyty bylo dosaženo s tandemovou hmotnostní detekcí využívající ESI-JS jako ionizační zdroj. LOD pro oxazepam byl 0,017 ng ml⁻¹ a pro lorazepam 0,032 ng ml⁻¹. Nejméně citlivou detekcí byla UV detekce, která však poskytovala nejširší lineární dynamický rozsah.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Lutz, H.: *Barevný atlas farmakologie*. Praha, Grada Publishing 2012.
2. Farghali, H.; Canová Kutinová, N.: Allosterická vazebná místa jako molekulární cíle pro vývoj, design a působení nových léčiv. *Chemické listy* **107**, 518–521 (2013).
3. Fraser, A. D.: Use and abuse of the benzodiazepines. *Therapeutic Drug Monitoring* **20**, 481–489 (1998).
4. Borges, K. B.; Freire, E. F.; Martins, I.; de Siqueira, M. E. P. B.: Simultaneous determination of multibenzodiazepines by HPLC/UV: Investigation of liquid–liquid and solid–phase extractions in human plasma. *Talanta* **78**, 233–241 (2009).
5. Mercolini, L.; Mandrioli, R.; Ianello, C.; Matrisciano, F.; Nicoletti, F.; Raggi, M. A.: Simultaneous analysis of diazepam and its metabolites in rat plasma and brain tissue by HPLC-UV and SPE. *Talanta* **80**, 279–285 (2009).
6. Karampela, S.; Vardakou, I.; Papoutsis, I.; Spiliopoulou, C.; Athanaselis, S.; Constantinos, P.: Direct urine analysis for the identification and quantification of selected benzodiazepines for toxicology screening. *Journal of Chromatography B* **902**, 42–46 (2012).
7. Dussy, F. E.; Hamberg, C.; Briellmann, T. A.: Quantification of benzodiazepines in whole blood and serum. *International Journal of Legal Medicine* **120**, 323–330 (2006).
8. Jang, M.; Chang, H.; Yang, W.; Choi, H.; Kim, E.; Yu, B.-H.; Oh, Y.; Chung, H.: Development of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of 25 benzodiazepines and zolpidem in oral fluid and its application for authentic samples from regular drug users. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **74**, 213–222 (2013).
9. Montenarh, D.; Hopf, M.; Maurer, H. H.; Schmidt, P.; Ewald, A. H.: Detection and quantification of benzodiazepines and Z-drugs in human whole blood, plasma, and serum samples as part of a comprehensive multi-analyte LC-MS/MS approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**, 803–818 (2014).
10. Villain, M.; Concheiro, B.; Cirimele, V.; Kintz, P.: Screening method for benzodiazepines and hypnotics in hair at pg/mg level by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **825**, 72–78 (2005).
11. Smyth, T. J. P.; Robledo, V. R.; Smyth, W. F.: Characterisation of oxazepam

degradation products by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**, 651–658 (2010).

12. Yuan, S.; Jiang, X.; Xia, X.; Zhang, H.; Zheng, S.: Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere* **90**, 2520–2525 (2013).

13. Baker, D. R.; Kasprzyk-Hordern, B.: Multi-residue determination of the sorption of illicit drugs and pharmaceuticals to wastewater suspended particulate matter using pressurised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1218**, 7901–7913 (2011).

14. Sousa, M. A.; Gonçalves, C.; Cunha, E.; Hajšlová, J.; Alpendurada, M. F.: Cleanup strategies and advantages in the determination of several therapeutic classes of pharmaceuticals in wastewater samples by SPE-LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**, 807–822 (2011).

15. Mendoza, A.; López de Alda, M.; Gonzáles-Alonso, S.; Mastroianni, N.; Barceló, D.; Valcárcel, Y.: Occurrence of drugs of abuse and benzodiazepines in river waters from the Madrid region (Central Spain). *Chemosphere* **95**, 247–255 (2014).

16. Bijlsma, L.; Emke, E.; Hernández, F.; de Voogt, P.: Performance of the linear ion trap Orbitrap mass analyzer for qualitative and quantitative analysis of drugs of abuse and relevant metabolites in sewage water. *Analytica Chimica Acta* **768**, 102–110 (2013).

17. González-Alonso S.; Catalá M.; Maroto R. R.; Gil J. L. R.; de Miguel A. G.; Valcárcel, Y.: Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environment International* **36**, 195–201 (2010).

18. Moore, C.; Coulter, C.; Crompton, K.; Zumwalt, M.: Determination of benzodiazepines in oral fluid using LC/MS/MS. *Journal of Analytical Toxicology* **31**, 596–600 (2007).

19. Papoutsis, I. I.; Athanaselis, S. A.; Nikolaou, P. D.; Pistos, C. M.; Spiliopoulou, C. A.; Maravelias, C. P.: Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: Applications in

- clinical and forensic toxicology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **52**, 609–614 (2010).
20. Pirnay, S.; Ricordel, I.; Libong, D.; Bouchonnet, S.: Sensitive method for the detection of 22 benzodiazepines by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **954**, 235–245 (2002).
21. Kalíková, K.; Reisová, M.; Chudoba, R.; Schmid, G. M.; Tesařová E.: Separation and quantification of 1,4-benzodiazepines: HPLC versus CZE. *Croatica Chemica Acta* **84**, 367–373 (2011).
22. Kyle, P. B.; Spencer, J. L.; Purser, C. M.; Eddleman, K. C.; Hume, A. S.: Suspected pediatric ingestions: Effectiveness of immunoassay screens vs. gas chromatography/mass spectroscopy in the detection of drugs and chemicals. *Journal of Toxicology – Clinical Toxicology* **41**, 919–925 (2003).
23. Monzon, L. M. A.; Yudi, L. M.: Voltammetric analysis of lipophilicity of benzodiazepine derivatives at the water vertical bar 1,2-dichloroethane interface. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **495**, 146–151 (2001).
24. Salem, A. A.; Barsoum, B. N.; Izake, E. L.: Potentiometric determination of diazepam, bromazepam and clonazepam using solid contact ion-selective electrodes. *Analytica Chimica Acta* **498**, 79–91 (2003).
25. Vucinich, A.: *Science in Russian culture*. London, P. Owen 1965.
26. Kazakevich, V. Y.; LoBrutto, R.: *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. USA, John Wiley & Sons 2007.
27. Unger, K. K.; Skudas, R.; Schulte, M. M.: Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal. *Journal of Chromatography A* **1184**, 393–415 (2008).
28. Corradini, D.; Eksteen, E.; Eksteen, R.; Schoenmakers, P.; Miller, N.: *Handbook of HPLC*. USA, CRC Press 1998.
29. Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum 2004.