

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



HODNOCENÍ TRANSKARBAMU 12 A JEHO NEČISTOT POMOCÍ HPLC S MS
DETEKČÍ

RIGORÓZNÍ PRÁCE

2007

Mgr. Jana Folbrová

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Teoretická část.....	7
2.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	7
2.1.1. Úvod do HPLC	7
2.1.2. Rozdělení chromatografických metod.....	8
2.1.3. Základní parametry v HPLC	10
2.1.4. Jednotlivé součásti kapalinového chromatografu.....	12
2.1.5. Detektory	16
2.1.6. Hodnocení látek pomocí HPLC	17
2.2. Hmotnostní spektrometrie	18
2.2.1. Základní charakteristiky	18
2.2.2. Iontové zdroje.....	19
2.2.3. Hmotnostní analyzátory	24
2.2.4. Detektory	29
2.2.5. Vakuové systémy	30
2.2.6. Spojení MS a separačních technik.....	31
2.3. Transkarbam 12	33
2.3.1. Akceleranty transdermální penetrace	33
2.3.2. Charakteristika transkarbamů	34
2.3.3. Transkarbam 12 a jeho nečistoty.....	35
2.3.4. Publikované metody	37
3. Cíl práce	39
4. Experimentální část	40
4.1. Použitý materiál.....	40
4.1.1. Chemikálie.....	40
4.1.2. Přístrojové vybavení	40

4.2.	Úprava vzorků	41
4.3.	Chromatografické podmínky	42
4.3.1.	Mobilní fáze	42
4.3.2.	Výsledný profil gradientu.....	42
4.3.3.	Dávkování vzorků	42
4.3.4.	Kolona	42
4.4.	Parametry hmotnostního spektrometru	42
5.	Výsledky a diskuse	44
5.1.	Metoda přímého nástřiku.....	44
5.1.1.	ϵ -aminokapronová kyselina.....	45
5.1.2.	8-aminooktanová kyselina.....	46
5.1.3.	ϵ -kaprolaktam	47
5.1.4.	Transkarbam 12	48
5.1.5.	Adukt T 12 a Ak	50
5.2.	Spojení HPLC/MS.....	51
5.2.1.	Acidita mobilní fáze	52
5.2.2.	Profil gradientu.....	52
5.2.3.	Parametry hmotnostní spektrometrie.....	58
5.2.4.	Analýza vzorku.....	59
6.	Závěr.....	63
7.	Literatura	64

Seznam zkratk

ACN	Acetonitril
Ak	ϵ -aminokapronová kyselina
Ao	ϵ -aminooktanová kyselina
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	Ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
CI	Chemická ionizace
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DDA	Dodecylalkohol
DDEAK	Dodecylester aminokapronové kyseliny
EI	Elektronová ionizace
ESI	Ionizace elektrosprejem
FAB	Ionizace urychlenými atomy
FI	Ionizace polem
FIB	Ionizace urychlenými ionty
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IT	Iontová past
Ka	ϵ -kaprolaktam
LC	Kapalinová chromatografie
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice
MS	Hmotnostní spektrometrie
Q	Kvadrupól
QqQ	Trojité kvadrupólový analyzátor
RSD	Relativní směrodatná odchylka
RIC	Reconstructed ion current
Rt	Retenční čas

SIM	Selective Ion Monitoring
SRM	Selective Reaction Monitoring
T 12	Transkarbam 12
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
TOF	Analyzátor doby letu
TSI	Ionizace termosprejem
UV	Ultrafialové spektrum
VIS	Spektrum viditelného světla

1. ÚVOD

Transkarbam 12 je relativně nová látka, patřící do skupiny akcelerantů transdermální penetrace. Jedná se o látky usnadňující prostup léčiva kožní bariérou do systémové cirkulace. Tyto látky dočasně mění vlastnosti kůže, která se stává propustnější pro vlastní léčivou látku. Transdermální podání léčiv má oproti klasickým cestám podání mnohé výhody, díky nimž je jeho použití stále častější. Léčivá látka je z transdermální lékové formy postupně uvolňována, přechází kožní bariéru a vstupuje do cévního systému. Transdermálně podaná léčivá látka se vyhne rychlé metabolizaci v játrech, first pass effectu, který bývá velkým problémem u perorálií. Nedochozí také k interakci léčivé látky s potravou nebo ke dráždění trávicího traktu léčivou látkou. Bezbolestný neinvazivní způsob aplikace je velkou výhodou oproti parenterálním lékovým formám.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie patří v současnosti mezi jednu z nejdůležitějších a nejvíce využívaných separačních technik. Ve spojení s HPLC jsou nejvíce využívány UV-VIS detektor, detektor fluorimetrický a detektory založené na elektrochemických dějích. V posledních letech se také rozšířilo používání hmotnostního spektrometru jako detektoru pro HPLC.

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, jejíž princip spočívá v převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle jejich poměru hmotnosti a náboje a zaznamenání relativních intenzit jednotlivých iontů. Oblast využití MS je velmi široká. Umožňuje určení struktury a identifikaci látek, pro svou vysokou citlivost lze pomocí MS stanovovat nečistoty i ve velmi malých množstvích. V poslední době MS stále častěji slouží jako detektor pro GC a HPLC, což umožňuje provádět složité strukturní analýzy látek ve směsích, stanovení stopových nečistot nebo analýzu léčiv v biologickém materiálu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Vysokoučinná kapalinová chromatografie

2.1.1. Úvod do HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) patří mezi separační metody a je dnes jednou z nejvyužívanějších analytických technik.

Chromatografický proces je separační proces, při kterém dochází k dělení látek podle jejich afinity ke stacionární a mobilní fázi. Kapalinová chromatografie využívá k separaci složek směsi pevnou stacionární fázi (analytická kolona naplněná sorbentem) a kapalnou mobilní fázi (směs různě polárních rozpouštědel). Složky směsi jsou nejprve rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle a poté nadávkovány do chromatografického systému za určitého průtoku mobilní fáze a pod vysokým tlakem. Na chromatografické koloně dochází k dělení směsi na jednotlivé složky. Míra rozdělení závisí na rozsahu interakcí jednotlivých složek mezi stacionární a mobilní fází. Interakce analytu s mobilní a stacionární fází může být ovlivňována změnami ve složení jak mobilní fáze tak použitím různých typů stacionárních fází ^(1,2).

Historie kapalinové chromatografie se datuje od roku 1906, kdy M. S. Tswett provedl separaci barevných pigmentů obsažených v zelených listech na koloně s náplní křídovou, aluminovou a sacharozovou ⁽³⁾.

Na počátku byl hlavním kritériem moderní HPLC separace tlak, a tak byla metoda původně nazývána „vysokotlaká kapalinová chromatografie“ (High Pressure Liquid Chromatography - HPLC). Tento název však vedl k domněnce, že účinek je zapříčiněn hlavně díky vysokému tlaku. Vysoký tlak je potřeba k získání požadovaného průtoku mobilní fáze, ovšem vysoký zpětný tlak je spíše negativní faktor, který nepřispívá ke zlepšení separace. Vysoká účinnost je ve skutečnosti výsledkem mnoha faktorů, např ⁽³⁾:

velmi malá velikost částic a jejich distribuce

jednotná velikost pórů a jejich distribuce

vysokotlaké techniky používané k naplňování kolon

přesný objem dávkovací smyčky
citlivost detektorů
použití kvalitních pumpovacích zařízení

Proto se dnes technika nazývá vysokoúčinná kapalinová chromatografie se stejnou zkratkou HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ⁽³⁾.

2.1.2. Rozdělení chromatografických metod

Existují různá hlediska rozdělení chromatografických metod. K nejdůležitějším patří dělení dle ⁽⁴⁾

povahy mobilní fáze: plynová (GC), kapalinová (LC)
způsobu provedení: kolonová (sloupcová), plošná (planární)
principu separace: adsorpční, rozdělovací, iontově výměnná, gelová, afinitní, chirální
pracovního způsobu: eluční, frontální, vytěšňovací
účelu: analytická, preparativní (preparační)

Podrobněji bude popsáno dělení dle principu separace.

Adsorpční chromatografie

Podstatou separace je rozdílná adsorbovatelnost dělených látek na aktivní povrch adsorbentu. Separace analytů je založena na opakované adsorpci a desorpci. Mobilní fázi je v kapalinové chromatografii kapalina (liquid-solid chromatography), v plynové pak nosný plyn (gas-solid chromatography) ^(1,3).

Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie využívá rozdílné afinity dělených látek, které jsou zpravidla v iontové formě, k iontovýměnným skupinám iontoměničů (katexy nebo anexy). Mechanismus separace tedy spočívá v opakovaném ustalování iontovýměnné rovnováhy. Stacionární fázi je iontovýměnný povrch sorbentu opačného náboje než ionty analytu. Tato technika se používá téměř výhradně u ionizovatelných látek. Čím silnější náboj má vzorek, tím silněji bude přitahován k iontovému povrchu sorbentu, a tak bude eluován v delším čase. Tento typ lze realizovat jen jako chromatografii kapalinovou ^(1,2,3).

Gelová (vylučovací) chromatografie

Jedná se o kapalinovou chromatografii využívající mechanického dělení molekul analytů v pórech sorbentu na základě jejich rozdílné velikosti. Chromatografická kolona je zde naplněna materiálem o přesně dané velikosti pórů a vzorek je v podstatě „filtrován“ podle velikosti své molekuly. Malé molekuly pronikají do pórů všech velikostí, větší jen do větších pórů a velké molekuly vycházejí z kolony bez zadržení ^(1,3).

Rozdělovací chromatografie

Stacionární fází je kapalina ukotvená na pevném nosiči. V kapalinové rozdělovací chromatografii je mobilní fází také kapalina, nemísitelná s kapalinou použitou jako stacionární fáze (LLC). V plynové rozdělovací chromatografii je mobilní fází plyn (GLC). Separace je založena na rozdílné rozpustnosti dělených látek unášených nosným plynem v kapalně stacionární fází ^(1,3).

Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie využívá činidla kovalentně vázaného na pevném povrchu nosného materiálu, které se nazývá afinitní ligand. Typickými afinitními ligandy jsou například protilátky, enzymové inhibitory nebo ostatní molekuly, které se reverzibilně a selektivně váží na molekuly analytu ve vzorku. Při průchodu vzorku analytickou kolonou jsou zadržovány pouze molekuly, které se selektivně naváží na afinitní ligand. Molekuly, které nejsou vázány, prochází kolonou s mobilní fází, a tak jsou odstraněny. Změnou mobilní fáze dojde k eluci daného analytu. Hlavní výhodou afinitní chromatografie je její výjimečná specifita. Používá se zejména pro rychlou izolaci biomolekul v preparativním měřítku ⁽³⁾.

Chirální chromatografie

Chirální chromatografie slouží k separaci chirálních látek, tzv. enantiomerů. Pro jejich separaci je nutné použití buď chirálního aditiva v mobilní fází nebo chirální stacionární fáze ⁽³⁾.

2.1.3. Základní parametry v HPLC

Po nástřiku vzorku na kolonu dojde k separaci jednotlivých látek podle jejich afinity ke stacionární a mobilní fázi. Po výstupu z kolony jsou látky v eluátu detekovány a je zaznamenán příslušný pík. Výsledný záznam separace se nazývá chromatogram ⁽¹⁾. Jednotlivé chromatografické píky mají gaussovský tvar a mohou být definovány ⁽⁵⁾

retenčním časem (t_R) jako kvalitativním ukazatelem

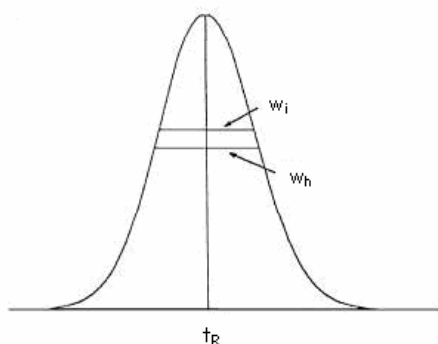
plochou píku (A) nebo výškou píku (h) jako kvantitativními ukazateli

šířkou píku v poloviční výšce (w_h)

šířkou píku mezi body inflexe (w_i).

Pro gaussovské píky (obr. 1) platí vzorec ⁽⁵⁾

$$w_h = 1.18w_i$$



Obr. 1: Znárodnění charakteristik chromatografického píku.

Retenční čas (t_R) je doba, která uplyne od nástřiku vzorku po dosažení maxima eluční křivky.

Relativní retence (r) se vypočítá podle vzorce

$$r = t_{R2} - t_M / t_{R1} - t_M$$

kde t_{R2} je retenční čas sledovaného píku, t_{R1} je retenční čas referenčního píku, t_M je mrtvý čas (čas od bodu nástřiku ke kolnici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce) ⁽⁵⁾.

Počet teoretických pater (N) je veličina používaná k hodnocení účinnosti kolony. Zjistí se experimentálně, dosazením naměřených hodnot do vztahu

$$N = 5.54 (t_R/w_h)$$

kde w_h je šířka píku v polovině jeho výšky. Počet teoretických pater se mění při změně stanovované složky, kolony nebo retenčního času ⁽⁵⁾.

Rozlišení (R_s) vyjadřuje účinnost dělení.

$$R_s = 1.18(t_{R2} - t_{R1})/w_{h1} + w_{h2}$$

kde t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků a w_{h1} a w_{h2} jsou šířky píků v poloviční výšce.

Rozlišení větší než 1.5 znamená rozdělení píků až na základní linii ⁽⁵⁾.

Faktor symetrie píku (A_s) se vypočítá podle vzorce

$$A_s = w_{0.05}/2d$$

kde $w_{0.05}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky a d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vstoupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. A_s by se měl pohybovat v rozsahu 0.8 až 1.5, hodnota 1.0 znamená úplnou symetrii píku ⁽⁵⁾.

Poměr signálu k šumu S/N má vliv na přesnost stanovení obsahu složek. Zjistí se podle vzorce

$$S/N = 2H/h$$

kde H je výška píku a h je absolutní hodnota nejvyšší výchylky šumu od základní linie ⁽⁵⁾.

Poměr výšky píku k sedlu p/v se užívá, jestliže není dosaženo separace dvou dělených látek až na základní linii.

$$p/v = H_p/H_v$$

kde H_p je výška píku menšího píku nad extrapolovanou linií a H_v je výška nejnižšího bodu křivky oddělujícího menší a větší pík nad extrapolovanou základní linií ⁽⁵⁾.

2.1.4. Jednotlivé součásti kapalinového chromatografu

V principu existují dvě základní uspořádání kapalinového chromatografu.

1) Stavebnicový systém – poskládání chromatografu z jednotlivých součástí, možnost vybavení podle požadavků uživatele, ekonomicky méně náročné.

2) Kompletní sestava – nesnadný přístup k jednotlivým součástem, ekonomicky náročnější. Výhodou zde je, že mrtvý objem je redukován na minimum ⁽⁶⁾.

HPLC sestava pro chromatografickou analýzu (obr. 2) se obecně skládá z ⁽³⁾:

rezervoárů mobilní fáze

odplyňovacího zařízení

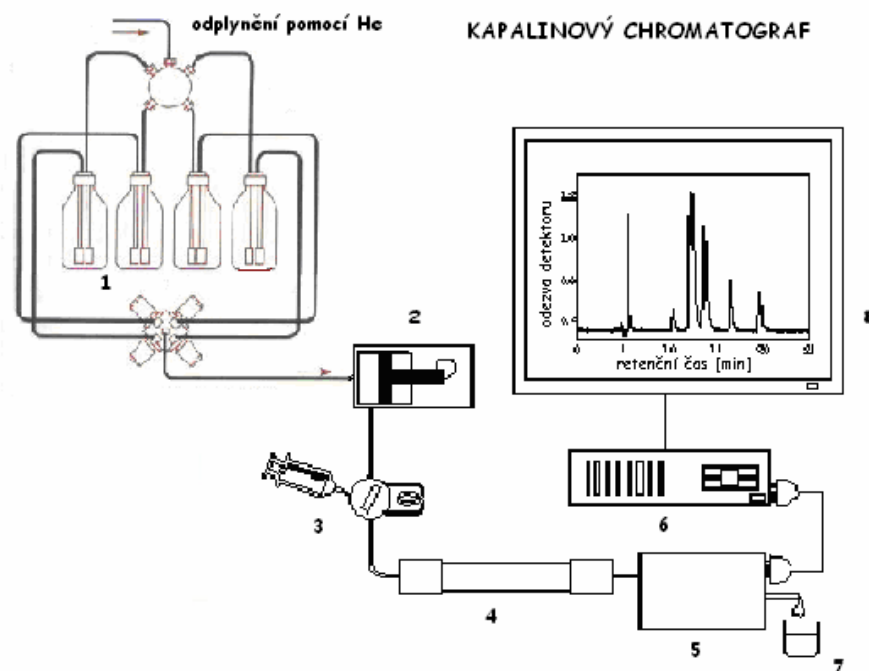
pumpy

injektoru

chromatografické kolony a případně předklony

detektoru

procesoru pro vyhodnocování dat.



Obr. 2: Schematický obrázek HPLC systému. Zásobníky mobilní fáze + odplynění pomocí He, dnes častěji pomocí degasseru (1), pumpa (2), dávkovací kohout se smyčkou (3) dnes většinou nahrazen automatickými dávkovači (autosamplery), chromatografická kolona (4), bývá často doplněna předkolonou, detektor (5), počítač pro vyhodnocování dat (6), odpad (7) a výsledný záznam-chromatogram (8).

Rezervoáry mobilní fáze

Zásobníky bývají vyrobené ze skla nebo nerezového materiálu, o objemu 250 ml až 2 litry. Se směšovačem a čerpadlem jsou spojeny pomocí trubiček z plastu nebo nerezové oceli. Částice větší než 5 μm mechanicky poškozují čerpadlo, proto je mobilní fáze nasávána přes filtr ⁽⁷⁾.

Odplyňovací zařízení

Z mobilní fáze je potřeba odstranit bubliny plynů, neboť způsobují kolísání tlaků v chromatografickém systému a negativně ovlivňují odezvu detektorů. Mobilní fázi je možné odplynit vakuem při současném míchání, ultrazvukem nebo probubláváním inertním plynem, nejčastěji heliem. V současnosti má většina přístrojů zabudovaný degasser ⁽⁷⁾.

Pumpy

Požadavky na chromatografickou pumpu zahrnují schopnost pracovat pod tlakem až do 40 MPa, v rozmezí průtokových rychlostí 0,1 - 10 ml/min, přičemž tok mobilní fáze musí být bez pulzů.

Pumpy lze rozdělit podle toho, zda pracují při konstantním tlaku nebo konstantním objemovém průtoku. První typ využívá tlak plynu přiváděného z tlakové nádoby přes redukční ventil. Druhý typ využívá k pohybu pístu nebo membrány mechanický pohon, čímž se dosahuje konstantního průtoku mobilní fáze.

Jiný způsob rozdělení je na čerpadla pulzní a bezpulzní. Objem pracovní komory pulzních čerpadel je malý, potřebný průtok je dosažen opakovaným stlačením a vypuzením mobilní fáze z pracovní komory. Objem komory bezpulzních pump je podstatně větší (100 až 500 ml). Díky tomu je možné pracovat delší čas bez opětovného plnění pumpy. Tím je zajištěn hladší průtok mobilní fáze bez speciálních přídavných zařízení pro tlumení tlakových impulzů.

V kapalinové chromatografii se používají dva způsoby eluce, jsou to eluce izokratická a gradientová. Při izokratické eluci je po celou dobu analýzy používána mobilní fáze stejného složení, zatímco u eluce gradientové se složení mobilní fáze v průběhu analýzy mění podle gradientového programu. Pumpy by měly umožňovat plynulou změnu gradientu ve smyslu změny zastoupení jednotlivých složek mobilní fáze nebo změny průtokové rychlosti ^(3,6,7).

Dávkovací zařízení

K zavedení vzorku do systému většinou slouží dávkovací smyčka, umožňující okamžité dávkování vzorku do proudu mobilní fáze. Dávkování lze provést manuálně pomocí Hamiltonovy stříkačky nebo automaticky s využitím automatického dávkovače (autosampleru). Dávkování pomocí autosampleru v dnešní době naprosto převládá.

Dávkovací zařízení musí umožňovat co nejpřesnější dávkování definovaných objemů a musí minimalizovat rozmytí píku ^(3,6,7).

Chromatografická kolona a předklony

Nejdůležitější částí chromatografického systému je analytická kolona, na které dochází k separaci látek ve směsi. Přes kolonu je pumpována mobilní fáze. Každá

separovaná složka je z kolony vymývána jako úzký pás (pík), který je zaznamenáván procesorem.

Chromatografické kolony jsou trubice, většinou ocelové, naplněné sorbetem. Pro analytické účely se používají kolony o délce 5 až 30 cm, s vnitřním průměrem 3 až 5 mm. Náplně mají velikost částic 3 až 10 μm .

Kolony lze rozdělit podle polaritv fází. Při chromatografii na normálních fázích je stacionární fáze silně polární (např. silikagel) a mobilní fáze je nepolární (hexan, chloroform). Polární látky jsou takto zadržovány na polárním povrchu stacionární fáze déle než látky nepolární. Naopak, chromatografie na reverzních fázích používá nepolární stacionární fázi (hydrofobní modifikace silikagelu jako je např. C_{18} nebo C_8) a mobilní fází je polární kapalina (směsi vody, acetonitrilu nebo methanolu). V tomto uspořádání kapalinové chromatografie dochází k silné retenci nepolárních látek ^(2,3). Existují však některé typy stacionárních fází, které lze použít v obou uspořádáních kapalinové chromatografie, jako jsou třeba silikagelové fáze modifikované $-\text{CN}$ nebo $-\text{NH}_2$ skupinou ⁽³⁾.

U moderních přístrojů je možno použít najednou několik kolon zapojených za sebou, tzv. column switching. Tento způsob umožňuje lepší separaci látek a zkracuje čas analýzy.

Pro ochranu a zvýšení životnosti analytické kolony je často používána tzv. předklona (guard column). Předkolony se využívají hlavně při analýze biologických vzorků k odstranění nečistot s velkou molekulovou hmotností.

Kolonový prostor bývá často termostatován, čímž lze přesně kontrolovat aktuální teplotu analýzy a eliminovat vliv teplotních výkyvů v laboratoři. Je také možné provádět analýzu při zvýšené teplotě ^(3,6,8).

Detektor

O detektorech bude podrobněji pojednáno v kapitole 2.1.5.

Zařízení pro vyhodnocování a uchovávání dat

Signál detektoru odpovídající každé složce je zobrazen ve tvaru píku na obrazovce počítače a nazývá se chromatogram. Tvar píku se v ideálním případě blíží Gaussově křivce, přičemž plocha píku je úměrná koncentraci látky prošlé detektorem. K hodnocení

chromatogramů se využívá především počítačová technika vybavená vhodným chromatografickým programem ^(3,6).

2.1.5. *Detektory*

V kapalinové chromatografii existuje mnoho způsobů detekce látek, nejběžnější detektory uvádí tab. 1. Hlavními požadavky na HPLC detektory jsou:

vysoká citlivost

stabilita a reprodukovatelnost odezvy

nízká hladina šumu

široký lineární dynamický rozsah

rychlá odezva

minimální objem detekční cely - minimalizuje rozmývání píků

Detekce by měla být co nejméně ovlivnitelná vnějšími vlivy jako je změna teploty nebo typu rozpouštědla. Nemělo by docházet k opětovnému smíchání rozdělených látek. Detektor by měl být nastavitelný tak, aby se odezva dala optimalizovat pro různé látky a měl by být nedestruktivní ^(1,3,8).

HPLC detektory mohou být univerzální nebo v různé míře selektivní. Mezi nejvíce používané dnes patří **UV-VIS detektor** pro svoji univerzálnost a poměrně vysokou citlivost. Tento detektor proměřuje absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky eluentem, protékajícím celou detektorem. Podle konstrukce může jít o vlnovou délku fixní (nejčastěji 254 nebo 280 nm), nastavitelnou (látka se proměřuje ve svém absorpčním maximu) nebo se jedná o tzv. scanovací detektor, který snímá během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnocené látky. Látky neabsorbující v UV-VIS oblasti je možno pomocí vhodných činidel převést na absorbující deriváty.

Modernějším analogem UV-VIS detektoru je DAD (**diode-array detektor**), který umožňuje trojrozměrnou projekci a kontinuální snímání celého absorpčního spektra ⁽¹⁾.

Fluorescenční detektor je poměrně selektivní, neboť pouze 10% organických látek vykazuje fluorescenci. Díky tomu však lze výběrem vhodné excitační a emisní vlnové délky velmi citlivě detekovat pouze vybranou látku bez interference ostatních složek. Látky, které nefluoreskují, lze často reakcí s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty ⁽¹⁾.

Do **elektrochemické detekce** se řadí detektory voltametrické, amperometrické a polarografické; jedná se o nejselektivnější běžné detektory. Jejich princip je založen na oxidačních nebo redukčních vlastnostech některých látek. Není ovšem možné většinu z nich použít při gradientové eluci ⁽¹⁾.

Refraktometrický detektor měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluentem vytékajícím z kolony, obsahujícím analyzovanou látku. Přes svou univerzálnost se používá zřídka, neboť má poměrně nízkou citlivost, jeho odpověď je velmi závislá na teplotě a neumožňuje gradientovou eluci ⁽¹⁾.

Mezi novější detektory patří ELSD (**Evaporative Light Scattering Detector**). Eluent vycházející z kolony je nebulizován, těkavá mobilní fáze je odpařena a netěkavé částice jsou detekovány měřením rozptylu světla. Jedná se o poměrně univerzální způsob detekce, jejímž hlavním omezením je požadavek na netěkavost analyzované látky. Výhodou je zde kompatibilita s gradientovou elucí ⁽⁹⁾.

V poslední době se rozšiřuje použití hmotnostně spektrometrického detektoru (**MS**), i přes jeho poměrně vysokou cenu ve srovnání s ostatními HPLC detektory. O MS je podrobněji pojednáno v kapitole 2.2..

Tab. 1: Nejčastěji používané detektory v HPLC

Detektor	Selektivita	Snímaná veličina	Citlivost (g ml ⁻¹)
Ultrafialový	ano	absorpce záření	10 ⁻⁹ až 10 ⁻¹⁰
Fluorimetrický	ano	fluorescence	10 ⁻¹⁰ až 10 ⁻¹²
Elektrochemický	ano	oxido-redukční změny	10 ⁻⁹ až 10 ⁻¹²
ELSD	ne	rozptyl světla	10 ⁻⁸
Refraktometrický	ne	index lomu	10 ⁻⁶
Hmotnostní spektrometr	ne	poměr m/z	10 ⁻¹² až 10 ⁻²¹

2.1.6. Hodnocení látek pomocí HPLC

Kvalitativní hodnocení

Nejdůležitější kvalitativní charakteristikou v HPLC je retenční čas (Rt). Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčního času dané látky v analyzovaném vzorku s retenčním časem standardu.

Nejprůkaznější potvrzení totožnosti umožňuje spojení HPLC s MS detektorem na základě shody retenčních časů, molekulových hmotností, případně spekter MS² ⁽¹⁰⁾.

Kvantitativní hodnocení

Pro zjištění obsahu látky ve vzorku se používá porovnávání plochy píku dané látky s plochou píku standardu. Nejčastější jsou dva způsoby:

Metoda vnějšího standardu sestává ze dvou kroků. Nejprve se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku. V druhém kroku se provede nástřik roztoku standardu. Jako vnější standard se obvykle používá u substancí standard stanovované látky (chemická referenční látka, CRL), u směsí jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek se vypočítá z ploch piků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku standardu.

Metoda vnitřního standardu je přesnější a méně časově náročná. Ke známému objemu roztoku vzorku se přidá známý objem roztoku vhodného vnitřního standardu a tato směs se nastříkne na kolonu. Koncentrace stanovovaných látek se určí z poměru ploch piků jednotlivých složek a plochy píku vnitřního standardu. Vnitřní standard musí splňovat určitá kritéria. Musí být eluován v blízkosti piků hodnocených látek, musím mít podobnou koncentraci a musí být chemicky inertní ⁽¹⁰⁾.

2.2. Hmotnostní spektrometrie

2.2.1. Základní charakteristiky

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Jedná se o metodu vysoce citlivou, destruktivní, s minimální spotřebou vzorku, umožňující určení M_r a dalších strukturních informací díky interpretaci spekter. Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které separuje ionty podle poměru jejich m/z .

Historicky první pokusy byly provedeny roku 1898, kdy Wien objevil zakřivení dráhy letu urychlených iontů v elektrickém a magnetickém poli. Za zakladatele MS je považován Thompson, který roku 1913 rozdělil izotopy neonu ²⁰Ne a ²²Ne pomocí tzv. parabolového spektrografu, za což získal roku 1922 Nobelovu cenu. V roce 1966 zavedli

Munson a Field chemickou ionizaci jako první měkkou ionizační techniku. O spojení HPLC-MS se jako první pokusili roku 1973 Baldwin a McLafferty. 1984 byla Fennem zavedena ionizace elektrosprejem a roku 2002 získal Fenn a Tanaka Nobelovu cenu za vynález elektrospreje a inspiraci MALDI ⁽¹¹⁾.

Využití MS je mnohostranné. Umožňuje strukturní analýzu a identifikaci chemických látek, určení izotopového složení, stopovou analýzu plynných směsí anorganického i organického původu, určování nečistot ve velmi čistých látkách. Je zde možnost aplikace v kvantitativní analýze na základě lineární závislosti mezi iontovým proudem a koncentrací látky, a to s vysokou přesností a správností. V posledních letech se také velice rozšiřuje využití MS jako detektoru pro GC a HPLC ^(11,12).

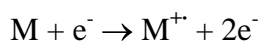
Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí: z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Mezi další součásti patří vakuový systém, sonda pro zavádění vzorků, iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů, počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr a ukládání dat, porovnání spekter s knihovnou ⁽¹¹⁾.

2.2.2. *Iontové zdroje*

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice. Ionizační techniky jsou následující: elektronová ionizace (EI), chemická ionizace (CI), ionizace polem (FI), ionizace urychleními atomy (FAB), ionizace termosprejem (TSI), ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a některé další méně používané techniky ⁽¹¹⁾.

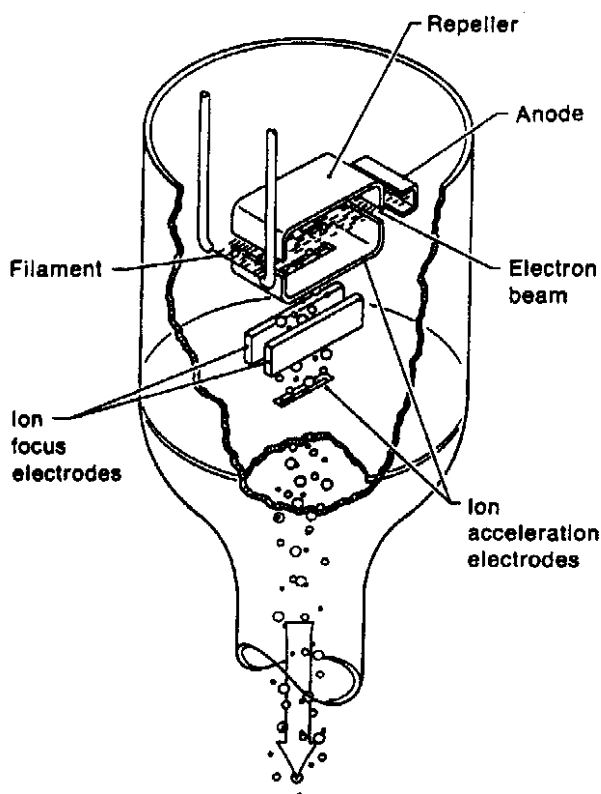
Elektronová ionizace (EI)

Jedná se o nejtvrdější ionizační techniku, při jejímž použití ionizované molekuly získávají nabytek vnitřní energie a nastává rozsáhlá fragmentace, molekuly se rozpadají na menší nabitě a nenabitě částice. Ionizace probíhá za silného vakua. Používá se většinou ve spojení s plynovou chromatografií (GC), neboť k ionizaci dochází v plynné fázi a je potřeba mít dostatečně těkavé a termostabilní analyty. Analyzovaná látka zde interaguje a proudem urychlených elektronů za vzniku radikalkationtu



Zdrojem elektronů je rozžhavená katoda (W nebo Re vlákno), proud elektronů směřuje k anodě. Při přiblížení elektronů k valenční vrstvě analytu vzniká M^+ . Vznikající ionty jsou vypuzeny z iontového zdroje, fokusovány a urychleny směrem k analyzátoru (obr. 3). Standardní ionizační potenciál se pro všechny organické látky používá 70 eV, neboť při tak vysoké energii je nejvyšší citlivost, spektrum je bohaté na fragmentové ionty, pro většinu látek je zde i molekulární ion.

Tato technika je nejvíce prozkoumána a pro jednotlivé třídy látek jsou popsány mechanismy jejich fragmentace. Existují knihovny a databáze spekter, které umožňují rychlou identifikaci neznámé látky ^(11,12).



Obr. 3: Elektronová ionizace

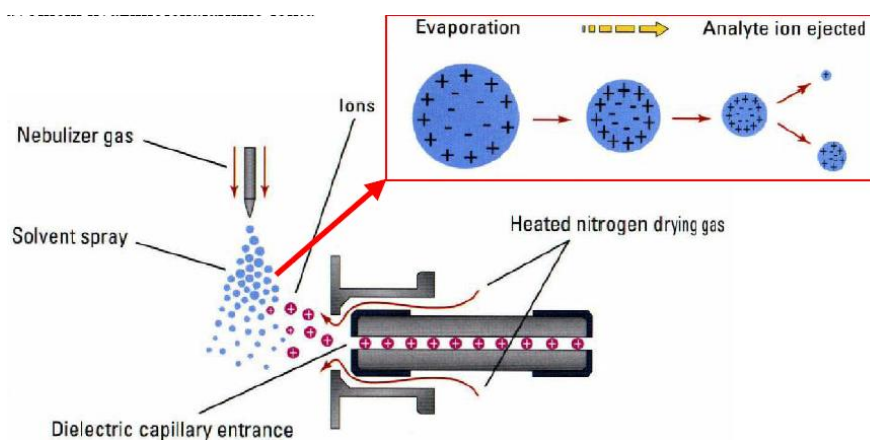
Ionizace elektrosprejem (ESI)

Zatímco EI je technikou nejtvrděší, v případě elektrosprejové ionizace se jedná o nejšetrnější ionizační techniku. ESI probíhá za atmosférického tlaku. Používá se k analýze malých molekul i biomakromolekul (možnost vzniku vícenásobně nabitých iontů), lze ji použít pro biopolymery až cca do 150 kDa. Je vhodná pro sloučeniny středně polární až

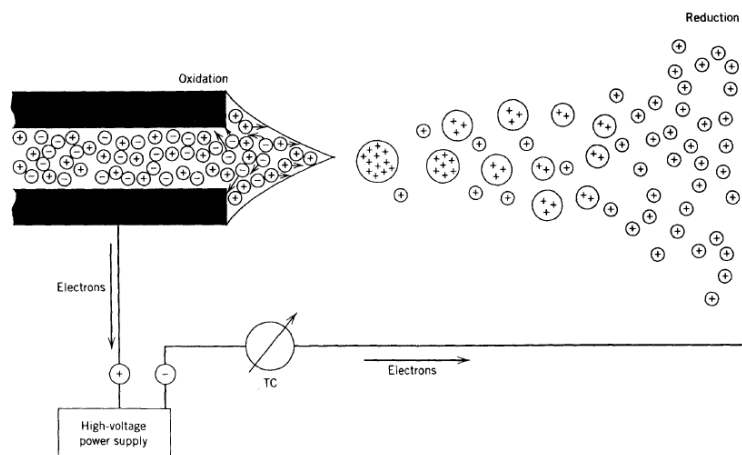
iontové. ESI umožňuje studium prostorového uspořádání proteinů, v některých případech studium nekovalentních interakcí a různých iontových asociátů.

Analyt rozpuštěný ve vhodném eluentu je přiveden kovovou kapilárou do iontového zdroje. Za pomoci zmlžovacího plynu (N_2) vzniká jemný aerosol. Díky vysokému napětí vloženému na kapiláru (3-5 kV) nesou kapičky velké množství nábojů (obr. 4). Na konci kapiláry vzniká tzv. Taylorův kužel, dochází zde k emisi malých kapiček o kladném nebo záporném náboji (obr. 5). Odpařením rozpouštědla dojde k zvýšení hustoty náboje na povrchu. Jakmile hustota povrchového náboje dosáhne určité kritické hodnoty, dojde k tzv. Coulombické explozi, tj. k rozpadu nabité kapičky na řadu ještě menších kapiček nesoucích náboj. Tento proces Coulombických explozí a odpařování rozpouštědla z povrchu kapiček se opakuje tak dlouho, až je kapička dostatečně malá a může dojít k uvolnění (desorpci) protonované či deprotonované molekuly z jejího povrchu. Tento způsob vzniku iontů bývá označován jako tzv. vypařování iontů.

ESI je nejčastěji užívaná pro spojení HPLC-MS⁽¹¹⁾.



Obr. 4: Schéma ESI.



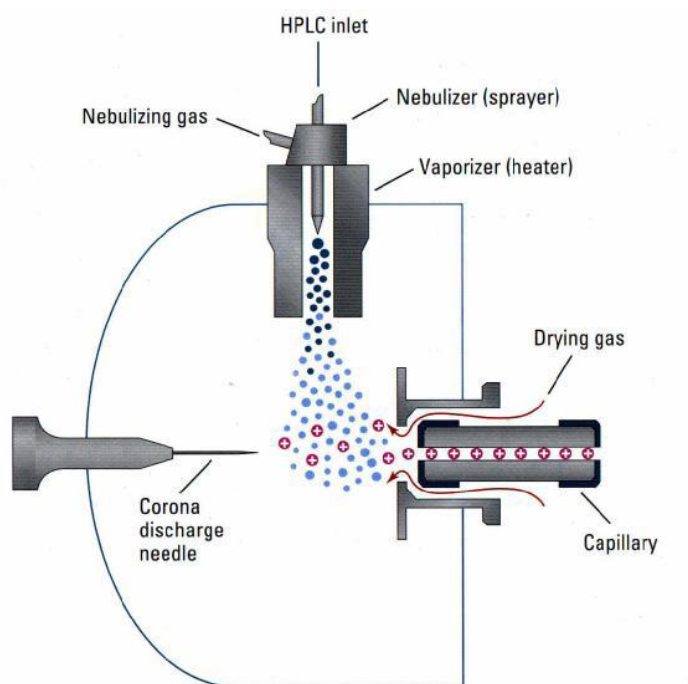
Obr. 5: Schéma elektrospreje v záznamu kladných iontů.

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Jedná se o měkkou ionizační techniku. Ionizace analytu probíhá za atmosférického tlaku, v plynné fázi, dochází ke štěpení labilních vazeb.

Na výbojovou elektrodu je vloženo vysoké napětí, vzniká koronární výboj, kterým jsou ionizovány nejprve molekuly mobilní fáze (v nadbytku) a ty následně ion-molekulárními reakcemi ionizují analyt. Vzniklé ionty jsou urychleny do analyzátoru. Protiproudem N_2 dochází k rozbití nekovalentních klastrů a asociátů (obr. 6).

APCI se užívá se ve spojení s HPLC, spolu s ESI patří mezi standardně dodávané iontové zdroje⁽¹¹⁾.

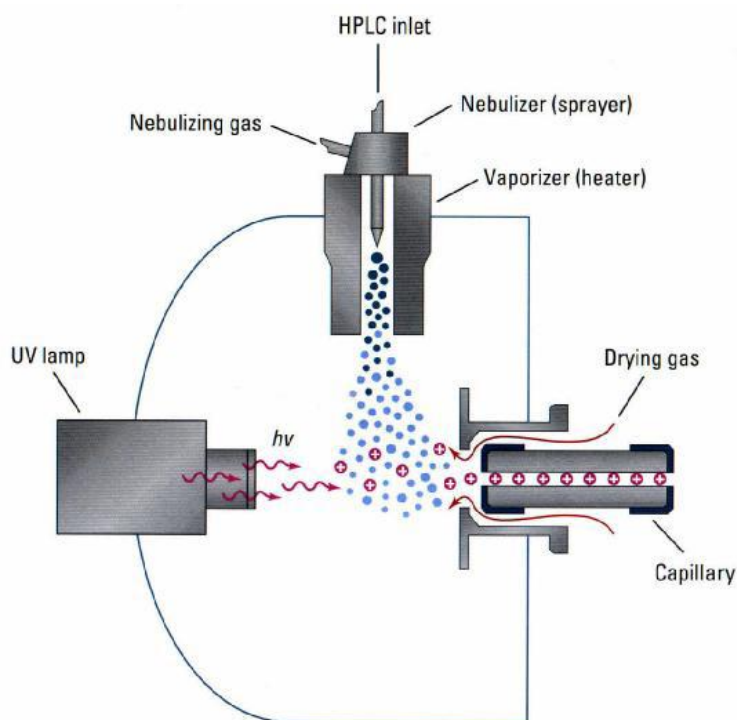


Obr. 6: Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

Jedná se o analogickou techniku k APCI, místo koronárního výboje však dochází k ionizaci UV zářením (obr. 7).

Zdrojem UV záření je kryptonová výbojka – energie fotonů 10 a 10.6 eV. Energie je větší než ionizační energie organických molekul, ale menší než ionizační energie mobilní fáze, tím je umožněna selektivní ionizace analytu a nikoliv mobilní fáze. Je možné podpořit ionizaci přidavkem dopantu (toluen, benzen) a tím zvýšit selektivitu ionizace ⁽¹¹⁾.



Obr. 7: Fotoionizace za atmosférického tlaku

Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)

Jedná se o velmi šetrnou ionizační techniku, zvláště vhodnou pro analýzu biopolymerů (peptidů).

Vzorek je rozpuštěn a smísen s vhodnou matricí. Krátkým laserovým impulzem matrice absorbuje energii. Dochází k přenosu energie (k přenosu fotonu) na analyt, k ionizaci a desorpci iontů analytu.

Matrice musí absorbovat laserový impuls, tvořit krystaly s analytem, nereagovat s ním, být netěkavá a stabilní. Nejčastěji se používají aromatické kyseliny (např. kyselina gentisová).

Tato technika je spojována zásadně s TOF analyzátozem ⁽¹¹⁾.

2.2.3. Hmotnostní analyzátory

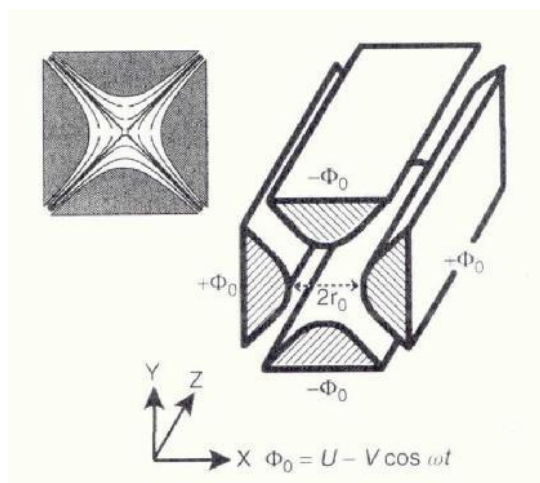
Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Mezi nejdůležitější analyzátory patří: Quadrupole – kvadrupól (Q), Ion Trap - sférická iontová past (IT), Linear Ion Trap - lineární iontová past (LIT), Time of Flight - analyzátor doby letu (TOF), iontová cyklotronová rezonance (ICR)

nebo magnetický analyzátor. Existují i hybridní (kombinované) analyzátory: trojnásobný kvadrupól (QqQ), dvojnásobný kvadrupól s analyzátozem doby letu (QqTOF) a řada další možností⁽¹¹⁾.

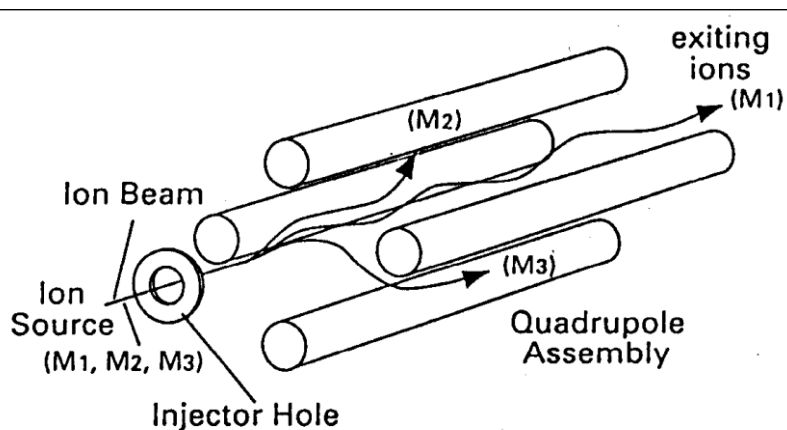
Kvadrupólový analyzátor (Q)

Kvadrupólový analyzátor (obr. 8,9) je tvořen 4 stejnými kovovými tyčemi kruhového průřezu, s délkou 20 - 30 cm. Na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí, na všechny je dále superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ion je přiveden do středu osy kvadrupólu a začne oscilovat. V daný časový okamžik pro určitý poměr U/V jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou m/z , který projde kvadrupólem a dostane se na detektor, všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou (skenováním) poměru stejnosměrného napětí a amplitudy U/V jsou postupně propuštěny na detektor všechny ionty, jedná se vlastně o hmotnostní filtr⁽¹¹⁾.

Hmotnostní spektrometr vybavený kvadrupólem byl ve spojení s HPLC použit např při stanovení remifentanilu v plazmě⁽¹³⁾.



Obr. 8: Kvadrupólový analyzátor



Obr. 9: Kvadrupólový analyzátor

Trojité kvadrupól (QqQ)

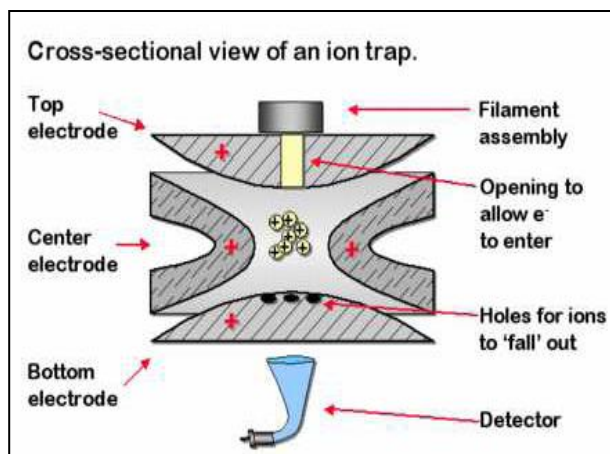
U tohoto typu analyzátoru jsou uspořádány 3 kvadrupóly za sebou, prostřední z nich (q) slouží jako kolizní cela. Zavedením kolizního plynu do druhého kvadrupólu způsobíme kolizní aktivaci vybraných iontů kvadrupólovým analyzátozem Q1 s kolizním plynem a jejich následnou fragmentaci ⁽¹¹⁾.

Hmotnostní spektrometr vybavený trojitým kvadrupólem byl ve spojení s HPLC použit např. k analýze fenolických metabolitů panenského olivového oleje v lidských lipoproteinech o nízké hustotě ⁽¹⁴⁾ a ke stanovení cilnidipinu v plazmě ⁽¹⁵⁾.

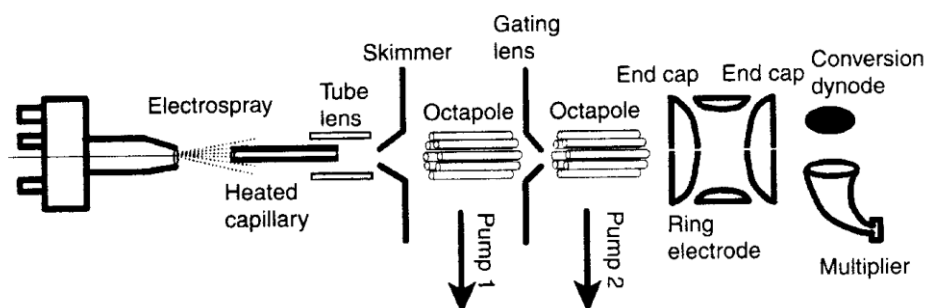
Iontová past (IT)

Iontová past je složena ze dvou koncových a jedné kruhové elektrody. Ionty jsou pulzně přivedeny do pasti, zde jsou zachyceny a poté jsou postupně vypuzovány na detektor podle jejich m/z, jedná se v podstatě o trojrozměrný kvadrupól (obr. 10,11). Lze použít buď externí ionizaci (obvyklé zejména u ESI a APCI) nebo interní ionizaci v iontové pasti (lze použít u EI a CI). Ve spojení s externí ionizací dochází k ionizaci mimo iontovou past a ionty jsou krátkým napěťovým pulzem přivedeny („dávkování iontů“) do pasti vstupním otvorem koncové elektrody. Vhodnými poměry stejnosměrného a střídavého napětí vloženými na kruhovou a dvě koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti a postupnou změnou těchto napětí jsou podle jejich m/z vypuzovány na detektor výstupním otvorem. Při použití IT je potřeba dodávat 2 plyny: N₂ jako nosný plyn, zaváděný do zdroje, a He jako tlumící plyn, zaváděný přímo do pasti ⁽¹¹⁾.

Hmotnostní spektrometr vybavený iontovou pastí byl ve spojení v HPLC použit např. k následujícím studiím: stanovení amiodaronu a desethylamiodaronu v koňské plazmě a moči ⁽¹⁶⁾, analýza nefopamu a jeho metabolitu desmethyl-nefopamu v plazmě ⁽¹⁷⁾, stanovení bupivakainu v plazmě ⁽¹⁸⁾, stanovení tamsulosinu v séru ⁽¹⁹⁾ nebo stanovení oxidů stigmasterolu a cholesterolu ⁽²⁰⁾.



Obr. 10: Iontová past

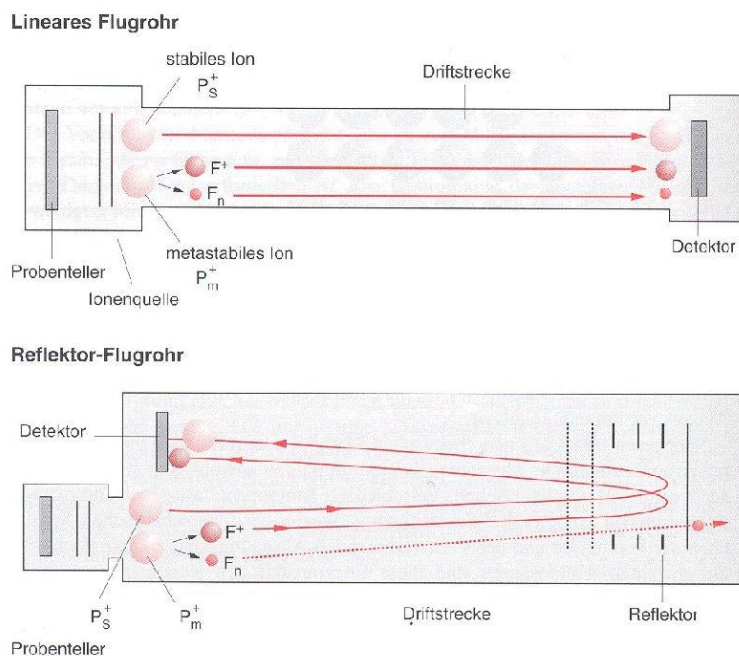


Obr. 11: Schéma hmotnostního analyzátoru – ionizace elektrosprejem s iontovou pastí

Analýzátor doby letu (TOF)

Jedná se o typický pulzní hmotnostní analyzátor. Nejdříve jsou velmi krátkým pulzem ionty urychleny na vstupu do analyzátorové trubice a potom se přesně měří čas, za který ionty “dolétnou” k detektoru, podle čehož se určí jejich m/z (obr. 12). Ionty s menší hodnotou m/z se při udělení stejné kinetické energie pohybují rychleji, takže se rychleji dostanou na detektor. Skenování je velice rychlé a hmotnostní rozsah m/z není teoreticky

omezen, záleží pouze na době, po kterou se bude čekat na dopad iontů (hodnota m/z musí být větší než 106) ⁽¹¹⁾.

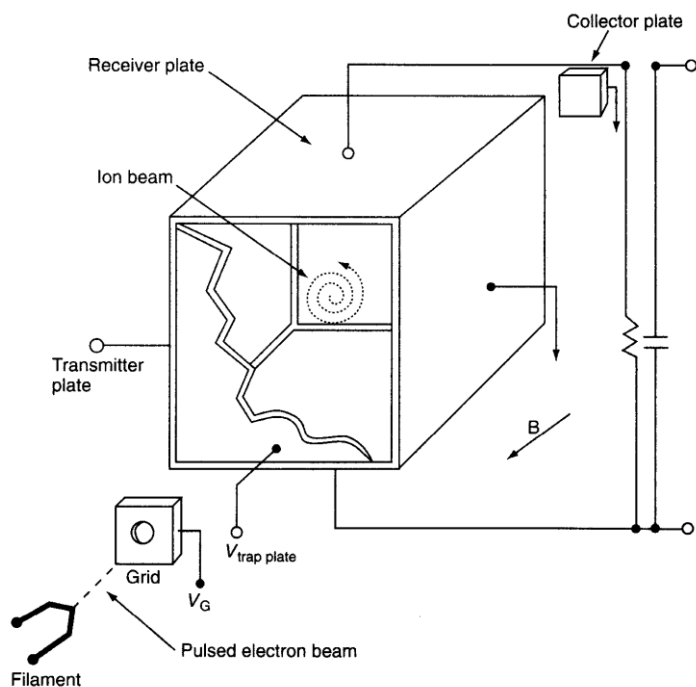


Obr. 12: Lineární a v reflexní průletový analyzátor

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (ICR)

Jedná se o typ analyzátoru, jehož parametry vybočují z rámce všech ostatních analyzátorů (cena, rozlišení, vakuum). Jestliže se ion dostane do silného magnetického pole, začne se pohybovat po cykloidální trajektorii s cyklotronovou frekvencí. V cyklotronu má každá hodnota m/z charakteristickou cyklotronovou frekvenci. Fourierovou transformací se přepočtou tyto frekvence do škály m/z , čímž se získá hmotnostní spektrum (obr. 13) ⁽¹¹⁾.

Příkladem studie založené na iontové cyklotronové rezonanci je strukturní analýza protoberberinových alkaloidů v léčivých rostlinách ⁽²¹⁾.



Obr. 13: Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

2.2.4. Detektory

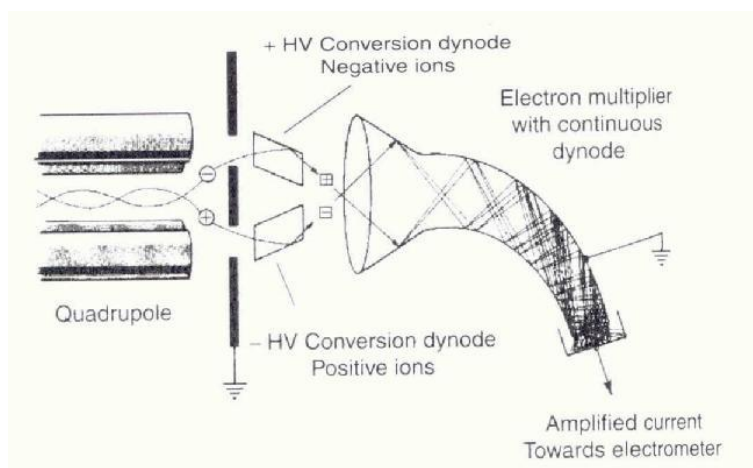
Detektor slouží k detekci iontů po jejich separaci podle m/z a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů.

Historicky se používala **fotografická deska**, podle zčernání se odhadovala intenzita.

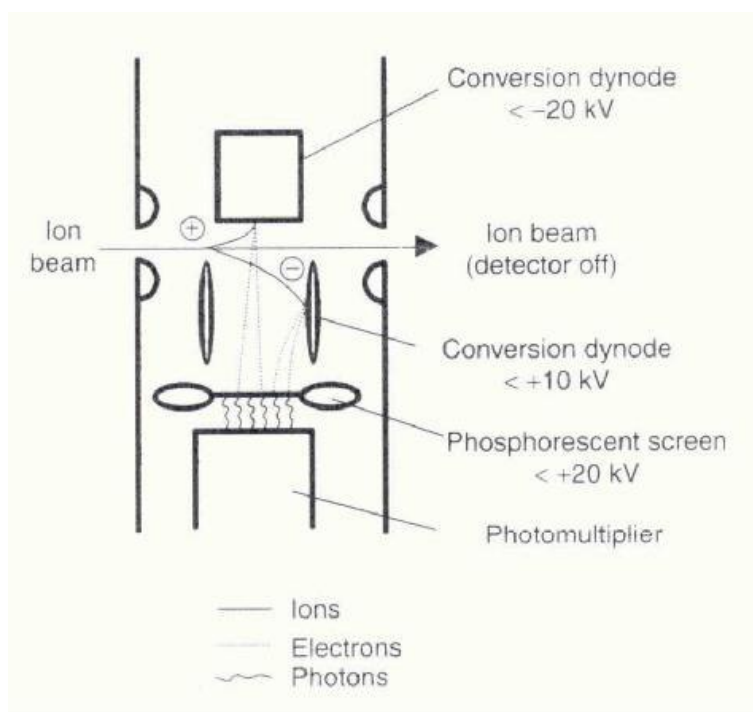
Faradayova klec patří mezi velmi přesné detektory, používá se na přesná izotopická měření.

Elektronový násobič je asi nejběžnějším detektorem, umožňuje zesílení až 10^7 , v uspořádání s polem až 10^8 (obr. 14).

Fotonásobič je také často používaný, jeho předností je delší životnost než u elektronového násobiče, zesílení je zde 10^4 - 10^5 (obr. 15) ⁽¹¹⁾.



Obr. 14: Elektronový násobič



Obr. 15: Fotonásobič

2.2.5. Vakuové systémy

Hmotnostní analyzátory vždy pracují za vysokého vakua. Hodnota vakua se liší podle typu analyzátoru. Také iontové zdroje většinou potřebují prostředí vakua. Výjimkou jsou ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI). K vytvoření tak vysokého vakua je zapotřebí dvoustupňové (někdy i vícestupňové) čerpání vakuovými pumpami. V prvním stupni bývají využity rotační pumpy, v následujícím stupni turbomolekulární nebo difúzní pumpy.

MS musí pracovat za vysokého vakua, neboť ionty potřebují dostatečně dlouhou střední dráhu a nesmí docházet ke srážkám s neutrálními atomy. Při elektronové ionizaci by navíc vzdušný kyslík způsobil přepálení odporového drátku produkujícího elektrony ⁽¹¹⁾.

2.2.6. *Spojení MS a separačních technik*

Kombinace obou technik přináší možnost během jedné analýzy identifikovat složení složitých směsí.

GC/MS

Spojení GC/MS bylo realizováno jako první, dnes se jedná o již rutinní techniku. Technické provedení je zde jednodušší než u LC/MS spojení, neboť mobilní fáze je zde plyn, který lze snadno odstranit před vstupem do vakuové části. Používá se výhradně ve spojení s kapilárními kolonami (průtok nosného plynu je zde řádově v ml/min, vakuové pumpy jej zvládají odčerpávat). Dříve při použití náplňových kolon se používaly různé separátory k odstranění nadbytku nosného plynu. Užívané ionizační techniky bývají EI nebo CI. Koncentrace používané v GC a MS jsou přibližně podobné, což usnadňuje spojení.

Použití EI umožňuje přímé softwarové porovnání s databází spekter v počítači. Výhodou je výběr několika málo nejpravděpodobnějších struktur (vyjádřeno procentuální shodou). Porovnání spekter s knihovnou může být

přímé – snaha o nalezení všech iontů z knihovního spektra v neznámém spektru (nečistoty nebo koelující látky nezhoršují porovnání)

zpětné – snaha nalezení všech iontů neznámého spektra v knihovním spektru (píky, které jsou ve spektru navíc, zhoršují shodu).

Vysoký koeficient shody ještě neznamená potvrzení struktury, vždy musí operátor posoudit rozdíly ve spektrech. I když není v knihovně nalezeno správné spektrum, porovnání s knihovnou výrazně urychluje práci.

Nejběžnější analyzátoři v GC/MS jsou Q, IT, TOF, QqQ ⁽¹¹⁾.

HPLC/MS

Jedná se o technicky náročnější metodu než GC/MS. Mobilní fázi v LC je kapalina, často obsahující vysoké procento vody. Hmotnostní spektrometr pracuje ovšem za podmínek vysokého vakua a kapalnou mobilní fázi je potřeba odstranit. Při prvních pokusech o spojení LC/MS se izolovaly jednotlivé frakce vycházející z HPLC kolony, následovalo odstranění mobilní fáze, nejčastěji jejím odpařením, a následoval přenos analytu do hmotnostního spektrometru. Tento zdoluhavý a komplikovaný postup byl nahrazen přímým spojením, kdy mobilní fáze je odstraněna proudem sušícího plynu a vysokou teplotou kapiláry⁽¹²⁾.

Spektra získaná pomocí LC/MS není možno porovnávat s knihovnou – závisí na typu přístroje, použité ionizační technice, pracovních podmínkách. Je proto nutné interpretovat manuálně, velmi přitom záleží na zkušenosti operátora.

Vynález ionizace za atmosférického tlaku (API) znamenal průlom ve spojení HPLC/MS. Díky technikám ESI, APCI a později APPI se z HPLC/MS stala rutinní analytická technika s obrovským polem působnosti (strukturní analýza organických látek ve směsích, identifikace reakčních produktů, nečistot atd.). Velmi významná je možnost citlivě a selektivně stanovovat obsah léčiv v biologickém materiálu.

Rozpouštědla pro HPLC/MS se používají vždy v nejvyšší možné kvalitě. Nejběžnější bývá vodný methanol, acetonitril, ethanol. Při vyšší koncentraci vodné složky je třeba zvýšit teplotu a průtok sušícího a zmlžujícího plynu, což vede k nižší citlivosti. Jako aditiva mají přednost těkavá činidla v co nejnižší koncentraci (kyselina mravenčí, octová, amoniak, octan nebo mravenčan amonný)⁽¹¹⁾.

Byly publikovány studie zabývající se analýzou určité látky a jejích nečistot pomocí HPLC-MS. Lze uvést několik z nich.

Z tablet obsahujících alprazolam byl izolován jeho hlavní rozkladný produkt a pomocí MS byla určena jeho struktura. Metoda byla validována pro obsah alprazolamu a této nečistoty⁽²²⁾. Ve vzorku streptomycinu byla pomocí HPLC-MSⁿ charakterizována struktura jeho dvou hlavních nečistot. Streptomycin a nečistoty byly poté stanoveny za použití HPLC-ELSD⁽²³⁾. V medikovaném premixu s obsahem doxycyklinu byly s použitím HPLC-DAD a HPLC-MS identifikovány jeho dvě hlavní nečistoty metacyklin a

6-epidoxycyklin. Validace byla provedena pomocí HPLC s UV detekcí ⁽²⁴⁾. Pomocí HPLC-MS byla určena struktura dvou hlavních nečistot diminazen aceturatu. Byla vypracována metoda jejich stanovení pomocí HPLC-UV ⁽²⁵⁾. Další studie se týká srovnání LC-UV a LC-MS metod pro určení nečistot v tabletách trimetoprimu. Z výsledků vyplývá, že metoda LC-MS je výrazně citlivější a navíc poskytuje i strukturní informace o nečistotách a degradačních produktech trimetoprimu ⁽²⁶⁾. Spojením HPLC-MS byly identifikovány nečistoty obsažené ve vzorku pesticidu d-allethrinu ⁽²⁷⁾. Ve vzorku piperachin fosfátu byly pomocí HPLC-MS detekovány jeho čtyři hlavní nečistoty a metoda byla validována na jejich obsah ⁽²⁸⁾.

CZE/MS

Technicky je toto spojení obtížnější než HPLC/MS. Nelze jej zatím považovat za rutinní techniku, vyskytují se problémy s robustností a citlivostí systému. Je zde nutné nahradit netěkavé pufrы fosfát, borát za např. octan amonný. CZE/MS je považováno za efektivní alternativu k HPLC/MS pro analýzu látek iontové povahy. Nejrozšířenější a nejrobustnější je metoda CZE/MS-ESI s přídavným tokem kapaliny ⁽¹¹⁾.

2.3. Transkarbam 12

2.3.1. Akceleranty transdermální penetrace

Transdermální aplikace léčiv nachází v současnosti stále širší uplatnění. Léčivo je konstantní rychlostí uvolňováno z transdermální lékové formy a po překonání kožní bariéry vstupuje do krevního oběhu. Tímto způsobem je možné dosáhnout stálých plasmatických koncentrací léčivé látky s minimálním kolísáním. To je výhodou především u léčiv s nízkým terapeutickým indexem. Na rozdíl od perorálního způsobu podání nedochází při transdermální aplikaci k dráždění trávicího traktu. Další výhodou je eliminace first-pass effectu, tedy rychlé metabolizace v játrech. Při používání transdermálních lékových forem je zajištěna dobrá compliance pacientů díky snadné nebolestivé aplikaci a dlouhodobému účinku. Na rozdíl od perorálních lékových forem s prodlouženým uvolňováním lze v případě výskytu nežádoucích účinků léčbu okamžitě přerušit ^(29,30,31).

Širší uplatnění této lékové formy je ovšem pro většinu účinných látek omezeno bariérovými vlastnostmi kůže. Proto jsou používány různé přístupy, které umožňují

transdermální absorpci léčiv zvýšit. Vedle způsobů založených na elektrických jevech nebo ultrazvuku je jedním z řešení využití speciálních pomocných látek - akceleraantů transdermální penetrace. Akceleranty transdermální penetrace mají schopnost dočasně změnit vlastnosti kůže a tím výrazně urychlit průchod léčiv přes tuto bariéru. Stejně jako ostatní pomocné látky musí být akceleranty nedráždivé, netoxické, hypoalergenní, nesmí mít vlastní farmakologickou aktivitu a musí být kompatibilní s účinnou látkou. Ideální akceleraant by také měl být účinný pro látky různé chemické struktury. Většina dosud vyráběných akceleraantů však vyhovuje těmto požadavkům jen částečně ^(30,31). Některé akceleranty uvádí tab. 2.

Tab. 2: Vybrané akceleranty transdermální penetrace^(32,33,34,35).

Název	Cílová skupina léčiv
1-dodecyl-2-azepanon (Azone®)	látky hydrofilní i lipofilní
kyselina undecylenová	analgetika, anodyna
kyselina o-dodecylcitronová	isosorbiddinitrát
kyseliny ikosapentaenová a linolenová	léčiva bércových vředů
dimethylsulfoxid	látky hydrofilní
monoolein	doxorubicin
isopropyl myristát	testosteron
limonen	haloperidol
terpeny	diklofenak

Použití většina akceleraantů je možné pouze pro určitou účinnou látku. Zavedení univerzálního akceleraantu by umožnilo významně rozšířit možnosti transdermální aplikace léčiv.

2.3.2. Charakteristika transkarbamů

Transkarbamý patří do skupiny akceleraantů transdermální penetrace. Jedná se o symetrické amoniové soli karbamové kyseliny, vznikající reakcí esterů 6-aminohexanové kyseliny s oxidem uhličitým. Jsou to bezbarvé až slabě nažloutlé mikrokrytalické látky, velmi málo rozpustné ve vodě a nerozpustné ve většině organických rozpouštědel. Beze změny struktury se dobře rozpouštějí v toluenu, ze kterého je možné je krystalizovat. Výborně se rozpouštějí v chloroformu, ovšem za rozkladu soli karbamové kyseliny a uvolnění oxidu uhličitého. K rozkladu karbamátu dochází také působením velmi slabých kyselin v bezvodém prostředí, působením ultrazvuku a tepla ⁽³⁶⁾.

2.3.3. Transkarbam 12 a jeho nečistoty

Transkarbam 12 ((5-(dodecyloxykarbonyl)pentylamonium-5 (dodecyloxykarbonyl)pentylkarbamát, T12) je nově syntetizovaným a patentovaným akcelerantem transdermální penetrace ⁽³⁶⁾.

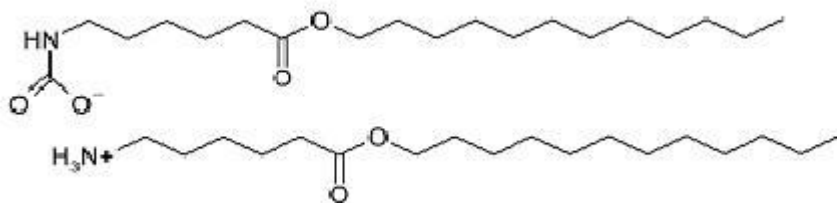
T 12 ve srovnání s ostatními transkarbamy vykazuje nejvyšší akcelerační aktivitu, nízkou toxicitu a lokální dráždivost ⁽³⁷⁾. Jeho akcelerační účinnost zahrnuje široké spektrum léčiv s různými fyzikálně chemickými vlastnostmi ⁽³⁸⁾. T12 je složen ze dvou identických řetězců dodecylesteraminokapronové kyseliny (DDEAK) stabilizovaných pomocí CO₂ ⁽³⁶⁾. Mechanismus účinku akcelerantů je obecně založen na interakci s lipidovými součástmi stratum corneum resp. s korneocyty. V případě T12 se jedná o interakci polární karbamové hlavičky, zatímco aminoester zůstává neaktivní ⁽³⁰⁾. Struktura T12 je také charakteristická svou malou stálostí. Již při mírné změně podmínek může dojít k odštěpení CO₂ a T12 se následně rozpadne na dva řetězce DDEAK ⁽³⁹⁾. Možnými znečištěninami T 12 jsou hydrolytické rozkladné produkty DDEAK: ε-aminokapronová kyselina (Ak) a dodecylalkohol (DDA). Další nečistoty T 12 mohou pocházet z výroby, buď jsou to výchozí látky syntézy (ε-kaprolaktam, Ka), nebo vedlejší produkty syntézy (dodecylester kyseliny 6-(6-aminohexanoylamino)hexanové, adukt T12 a Ak).

Transkarbam 12 (T12)

Mr = 643.0

Sumární vzorec: C₃₇H₇₄N₂O₆

Strukturní vzorec:



ε-aminokapronová kyselina (Ak)

Mr = 131.2

Sumární vzorec: C₆H₁₃NO₂

Strukturní vzorec:



Dodecylalkohol (DDA)

Mr = 186.1

Sumární vzorec: C₁₂H₂₆O

Strukturní vzorec:

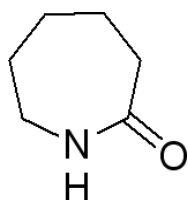


ε-kaprolaktam (Ka)

Mr = 113.2

Sumární vzorec: C₆H₁₁NO

Strukturní vzorec:

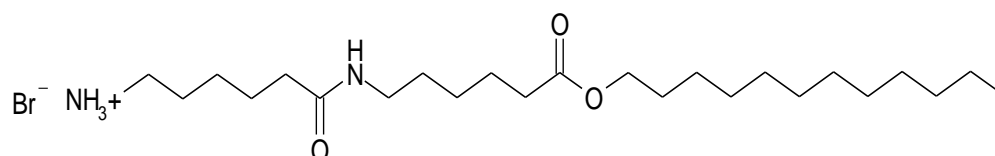


**Hydrobromid dodecylesteru kyseliny 6-(6-aminohexanoylamino)hexanové
(adukt T 12 a Ak)**

Mr hydrobromidu = 492 (Mr aduktu = 413)

Sumární vzorec: C₂₃H₄₉BrN₂O₃

Strukturní vzorec:



2.3.4. *Publikované metody*

Bylo publikováno několik článků zabývajících se transkarbamem 12 a jeho analogy. Jednotlivé publikace se zaměřují na deriváty ϵ -aminokyselin, jejich přípravu a použití⁽³⁶⁾, na vztah struktury a aktivity amfifilních permeačních enhancerů⁽³⁷⁾, na fázové chování T 12⁽³⁹⁾, na ketonické, amidické a alkylové analogy T 12, na jejich syntézu a permeační aktivitu⁽²⁹⁾; dále na syntézu a aktivitu analogů kyseliny uhličité a karbámové⁽³⁸⁾ a jejich esterů⁽⁴⁰⁾; a dále na termotropní chování T 12 a jeho analogů pomocí diferenční scanovací kalorimetrie (DSC), termogravimetrické analýzy (TGA), infračervené spektroskopie (FTIR) a rentgenových metod (temperature-dependent X-ray powder diffraction)⁽⁴¹⁾.

Konkrétně se analytickým hodnocením T12 zabývají pouze dvě publikované práce. Jsou zaměřeny na optimalizaci podmínek pro hodnocení T12 a jeho rozkladných produktů a obě využívají metody HPLC s UV detekcí^(42,43).

V první studii jsou hledány optimálních podmínky pro důkaz T 12 pomocí TLC a HPLC-UV⁽⁴²⁾. V případě TLC byl jako stacionární fáze použit Silufol UV₂₅₄. Byly vyzkoušeny mobilní fáze o různém složení, nejlepší výsledky byly získány při použití směsi o složení chloroform, ethanol a octová kyselina (3:3:1; v/v/v). Detekce byla provedena v prostředí par jodu. V případě HPLC byly vyzkoušeny tři různé analytické kolony (Silasorb SPH C 18, Silasorb SPH nitrile a LiChrosorb Si-60). Nejlepší výsledky byly získány s použitím třetí z nich, která byla proto použita i při kvantitativním hodnocení T 12. Detekce bylo provedena pomocí UV detektoru při vlnové délce 230 nm. Jelikož T 12 neobsahuje ve své molekule žádný chromofor, bylo před detekcí nutno provést derivatizaci benzoylchloridem za vzniku benzoylderivátu, absorbujícího v UV oblasti. Z kvantitativních parametrů byla hodnocena linearita, přesnost a správnost. Kalibrační křivka byla vypracována z pěti koncentračních úrovní v rozmezí 0.8-1.5 mg ml⁻¹, s korelačním koeficientem 0.9955. Zjištěný limit detekce byl 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$, limit kvantifikace 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Přesnost analytické metody vyjádřená jako RSD byla na všech analyzovaných koncentracích nejvýše 3.3 %⁽⁴²⁾.

Druhá studie se zabývá optimalizací HPLC chromatografických podmínek pro stanovení transkarbamu 12 a jeho dvou hlavních degradačních produktů ϵ -aminokapronové kyseliny a dodecylalkoholu⁽⁴³⁾. Separace byla provedena na analytické koloně Separon SGX C18. K detekci byl použit UV detektor při vlnové délce 230 nm. Vzorek bylo potřeba předem derivatizovat pomocí 3,5-dinitrobenzoylchloridu, neboť T 12, Ak ani DDA

neobsahují v molekule chromofor. Všechny tři látky byly derivatizovány stejným způsobem s jediným rozdílem: T 12 a DDA byly rozpuštěny v chloroformu, zatímco Ak v methanolu. Byl vyzkoušen isokratický způsob eluce, pro dostatečnou separaci bylo ovšem potřeba využít eluce gradientové. Z různých gradientových schémat byl nakonec vybrán následující: 0-7 min: 30% (ACN); 7-12 min: 30→80% (ACN); 12-25 min: 80% (ACN); 25-30 min: 80→30% (ACN); 30-35 min: 30% (ACN). Byly zkoušeny mobilní fáze různého složení; nejprve acetonitril/voda s kyselinou octovou, poté acetonitril/20 mM acetátový pufr. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při složení acetonitril a acetátový pufr o pH 4.5 ⁽⁴³⁾.

Analýzou ϵ -kaprolaktamu se zabývá několik studií. Metody jsou založeny na vysokoúčinné kapalinové chromatografii ^(44,45) a na voltmetrickém stanovení po předchozí separaci tenkovrstvou chromatografií ⁽⁴⁶⁾. Další článek se zabývá identifikací 24 nečistot kaprolaktamu pomocí plynové chromatografie s MS detekcí ⁽⁴⁷⁾.

Analýza ϵ -aminokapronové kyseliny byla popsána v několika článcích. Jedná se o fluorimetrické stanovení Ak v léčivých přípravcích s využitím sekvenční injekční analýzy ⁽⁴⁸⁾. Další článek popisuje chromatografické stanovení Ak v tělních tekutinách ⁽⁴⁹⁾. Odlišným způsobem je potom využití antifibrinolytických vlastností Ak. Přidáním Ak ke vzorku plazmy dojde k prodloužení času fibrinolýzy. Na tomto principu je vypracována studie měřící obsah Ak v moči ⁽⁵⁰⁾.

3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je vyvinout metodu pro separaci transkarbamu 12, jeho tří nečistot ϵ -aminokapronové kyseliny, ϵ -kaprolaktamu a dodecylesteru kyseliny 6-(6-aminohexanoylamino)hexanové, a vnitřního standardu, kterým byla zvolena kyselina 8-aminooktanová. Tato metoda je založena na spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Nejprve budou zjišťovány molekulové hmotnosti jednotlivých látek metodou přímého nástřiku a vyladěny optimální podmínky pro MS detekci. Bude zjištěna fragmentace látek v režimu MS/MS.

V dalším kroku dojde k propojení kapalinového chromatografu s hmotnostním detektorem. Bude vyvinuta metoda účinné separace všech pěti látek a její záznam v režimu SIM.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použitý materiál

4.1.1. *Chemikálie*

voda ultračisté kvality, upravená systémem Milli Q-RG (Millipore, USA)

transkarbam 12 (KAOCH, FaF UK, Hradec Králové, ČR)

ϵ -aminokapronová kyselina 99 % (Merck, Hohenbrunn, Germany)

ϵ -kaprolaktam 99 % (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany)

8-aminooktanová kyselina 99 % (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany)

dodecylester kyseliny 6-(6-aminohexanoylamino)hexanové (KAOCH, FaF UK, Hradec Králové, ČR)

mravenčí kyselina gradient grade (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany)

acetonitril gradient grade (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany)

methanol gradient grade (Merck, Darmstadt, Germany)

4.1.2. *Přístrojové vybavení*

HPLC systém

Měření bylo realizováno na kapalinovém chromatografu Prominence Liquid Chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan), skládajícího se z

degasovací jednotky (DGU-20A3)

dvou pump (LC-20AD)

autosampleru pro 70 vzorků (SIL-20AC)

komunikačního modulu (CBM-20A)

vyhřívaného prostoru pro kolonu (CTO-20AC).

Chromatografická kolona

K měření byla použita analytická kolona Luna Phenyl-Hexyl 5 μ m, 150 x 3.0 mm (Phenomenex, USA).

Hmotnostní spektrometr

K detekci byl použit hmotnostní spektrometr LCQ Advantage Max (Thermo Electron Corporation, Finnigan, San Jose, CA, USA). Iontovým zdrojem byla v případě tohoto měření ESI, analyzátozem byla iontová past.

Software

Pro sběr a vyhodnocování získaných dat byl použit software Xcalibur™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.2. Úprava vzorků

Při přípravě vzorků byla k ředění zásobních roztoků použita vodná mobilní fáze se složením 4 % acetonitrilu (v/v) a 0.025 % mravenčí kyseliny (v/v).

Transkarbam 12

Zásobní roztok 0.1 mg ml^{-1} T 12 byl připraven rozpuštěním navážky 0.001 g substance ve směsi acetonitril/voda 4:1 (v/v) v 10 ml odměrné baňce.

ϵ -aminokapronová kyselina

Zásobní roztok 0.5 mg ml^{-1} Ak byl připraven rozpuštěním navážky 0.0025 g substance ve směsi acetonitril/voda 1:1 (v/v) v 5 ml odměrné baňce.

8-aminooktanová kyselina

Zásobní roztok 0.5 mg ml^{-1} Ao byl připraven rozpuštěním navážky 0.0025 g substance ve směsi acetonitril/voda 1:1 (v/v) v 5 ml odměrné baňce.

ϵ -kaprolaktam

Zásobní roztok 0.5 mg ml^{-1} Ca byl připraven rozpuštěním navážky 0.0025 g substance ve směsi acetonitril/voda 1:1 (v/v) v 5 ml odměrné baňce.

Adukt T 12 a Ak

Zásobní roztok 1.0 mg ml^{-1} aduktu byl připraven rozpuštěním navážky 0.005 g substance ve směsi acetonitril/voda 1:1 (v/v) v 5 ml odměrné baňce.

4.3. Chromatografické podmínky

4.3.1. Mobilní fáze

Nejlepší separace bylo dosaženo při počáteční mobilní fázi obsahující 4% ACN s konstantním přídavkem 0.025% HCOOH, při průtoku 0.3 ml min⁻¹. Vzhledem k tomu, že na počátku obsahuje mobilní fáze vysoké procento vody, nebylo možné průtok zvýšit, aby došlo k dostatečnému odpaření mobilní fáze v iontovém zdroji.

4.3.2. Výsledný profil gradientu

Pro separaci byl použit následující gradientový profil:

0. - 1. min	4 % acetonitril
1. - 25. min	4 → 55 % acetonitril
25. – 30. min	ekvilibrace kolony 4 % acetonitrem.

4.3.3. Dávkování vzorků

Vzorky byly dávkovány pomocí autosampleru, nástřikový objem všech vzorků byl 10 µl. Prostor autosampleru byl temperován na 15 °C.

4.3.4. Kolona

Byla použita analytická kolona Luna Phenyl-Hexyl. Kolony s fenylovou skupinou se vyznačují obecně vyšší selektivitou než alkyl-fáze, jejich nevýhodou je nízká stabilita a reprodukovatelnost výsledků. Při použití hexylové (C-6) alkylskupiny jako článku spojujícího fenylovou skupinu s povrchem silikagelu je dosaženo mnohem vyšší stability a reprodukovatelnosti. Rozsah pH, při kterých lze s tímto typem kolony pracovat, je 1.5 až 10⁽⁵¹⁾.

Kolonový prostor byl temperován na 30 °C.

4.4. Parametry hmotnostního spektrometru

Pro měření byl použit ESI iontový zdroj. Nejvyšší citlivosti pro všechny hodnocené látky bylo dosaženo v pozici sondy D 0.5. Další parametry nastavení iontového zdroje byly následující:

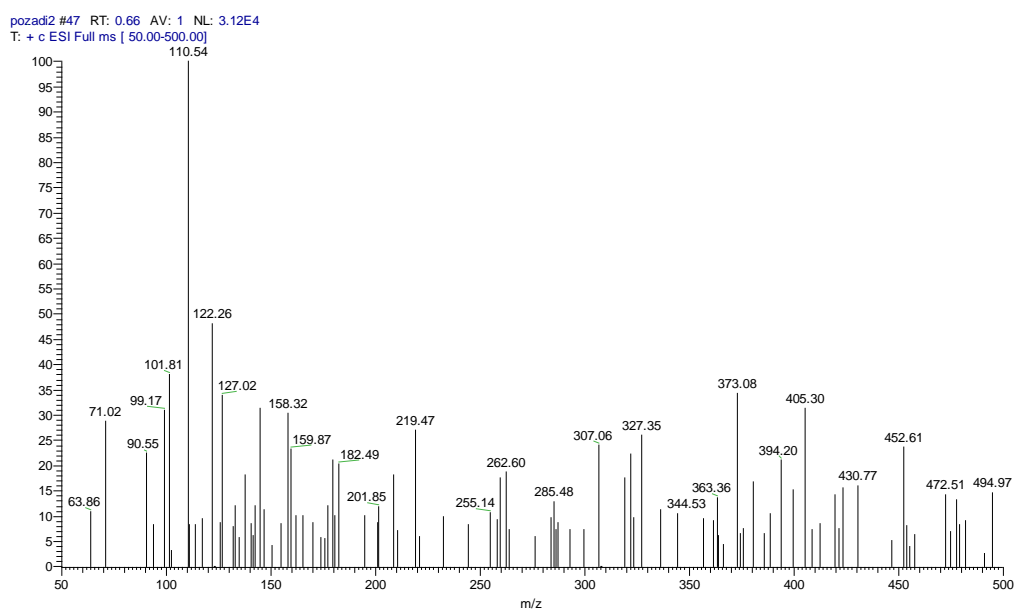
Sheath Gas Flow Rate	75 arb
Aux/Sweep Gas Flow Rate	40 arb
Capillary Temperature	250 °C
Capillary Voltage	-30.0 V
Tube Lens	0 V, sp

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

Pro hodnocení Transkarbamu 12, jeho hydrolytického rozkladného produktu – kyseliny ϵ -aminokapronové, dvou nečistot z výroby – ϵ -kaprolaktamu a aduktu, a vnitřního standardu bylo potřeba nejdříve vyoptimalizovat podmínky pro jejich hodnocení pomocí MS detektoru. Toho bylo docíleno pomocí metody přímého nástřiku. Pro každou látku byly nejdříve vyladěny jednotlivé parametry nastavení detektoru. Z těchto hodnot se poté vybraly optimální podmínky, při kterých bude možno měřit všechny látky během jedné analýzy a zároveň docílit dostatečné citlivosti. Při výsledných podmínkách bylo poté vždy změřeno spektrum ve full scanu, ze kterého bylo možné zjistit molekulovou hmotnost dané látky. Dalším krokem byla optimalizace procenta kolizní energie, která způsobuje fragmentaci mateřského iontu na dceřinné ionty. Byla změřena spektra MS/MS a fragmentace jednotlivých látek vysvětlena. Poté, co byly nalezeny optimální podmínky pro hodnocení všech látek a naměřena MS a MS/MS spektra, bylo možné použít metodu LC/MS a zaměřit se na optimalizaci chromatografických podmínek, které umožní dobrou separaci jednotlivých látek a tím i jejich kvalitní hodnocení. Metodou založenou na hmotnostní spektrometrii nebylo možné hodnotit další nečistotu transkarbamu, dodecylalkohol, neboť ve své molekule neobsahuje žádnou ionizovatelnou skupinu.

5.1. Metoda přímého nástřiku

Pomocí nástřiku roztoku látky přímo do detektoru byla ze záznamu iontu ve full scanu vždy zjištěna příslušná molekulová hmotnost látky na základě poměru m/z . Nejdříve však byl nastříknut vzorek rozpouštědla, aby se zjistil profil pozadí a potvrdilo se, že dané hmoty neinterferují s rozpouštědlem; viz obr. 16.

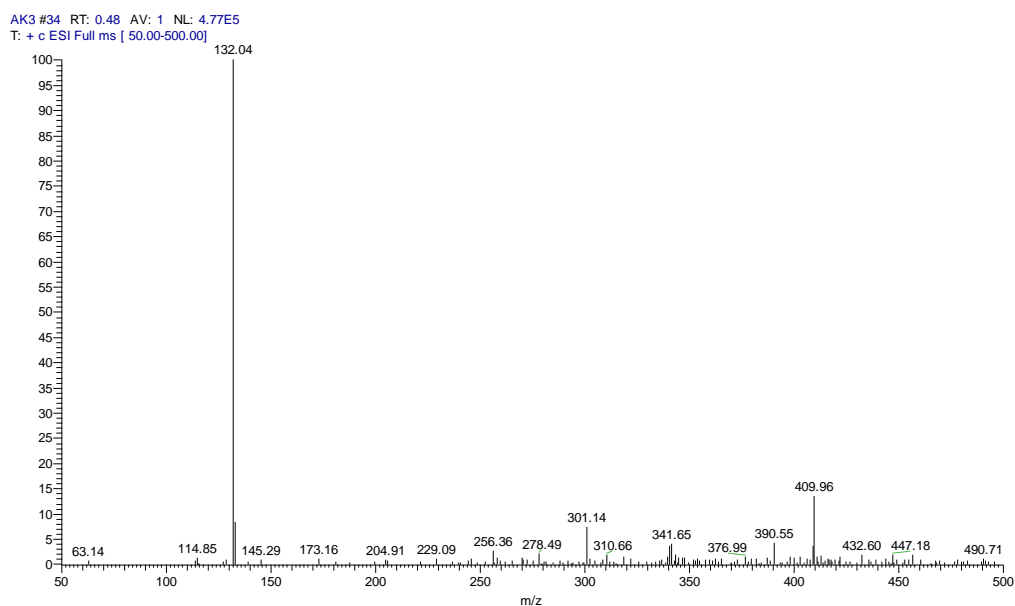


Obr. 16: Full scan 50 % acetonitrilu v rozmezí 50 – 500 m/z.

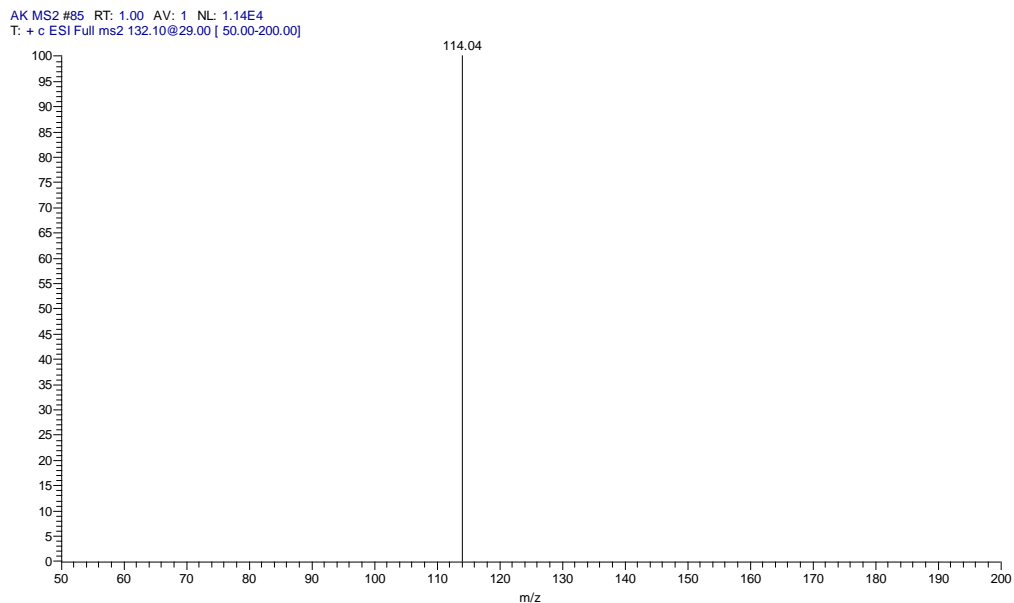
5.1.1. ϵ -aminokapronová kyselina

Nástřikem Ak o koncentraci $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ bylo zjištěno, že její poměr m/z je 132.04 (obr. 17), což odpovídá deklarované molekulové hmotnosti 131.2. V režimu MS/MS při kolizní energii 29 % dochází k následující fragmentaci (obr. 18):

poměr m/z = 114 ztráta 18 odštěpení H_2O



Obr. 17: Přímý nástřik aminokapronové kyseliny $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$.



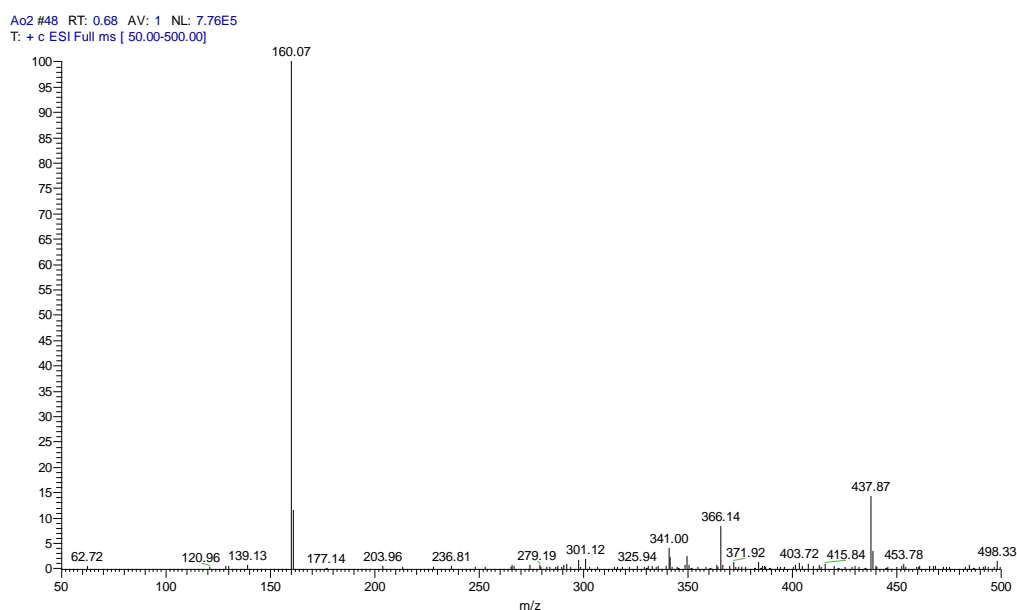
Obr. 18: Záznam fragmentace Ak v módu MS/MS při kolizní energii 29 %.

5.1.2. 8-aminooktanová kyselina

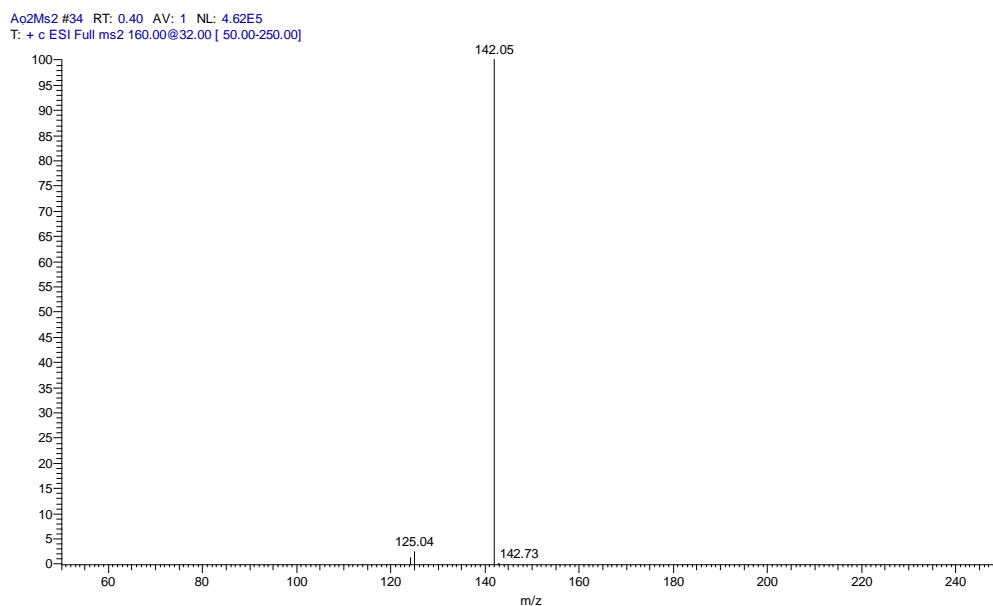
Nástřikem Ao jako vnitřního standardu o koncentraci $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ bylo zjištěno, že poměr m/z Ao je 160.07 (obr. 19), což odpovídá deklarované molekulové hmotnosti 159.0.

V režimu MS/MS při kolizní energii 32 % dochází k následující fragmentaci (obr. 20):

poměr m/z = 142	ztráta 18	odštěpení H ₂ O
poměr m/z = 125	ztráta 35	odštěpení H ₂ O a -NH ₃



Obr. 19: Přímý nástřik aminooktanové kyseliny $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$.



Obr. 20: Záznam fragmentace Ao v módu MS/MS při kolizní energii 32 %.

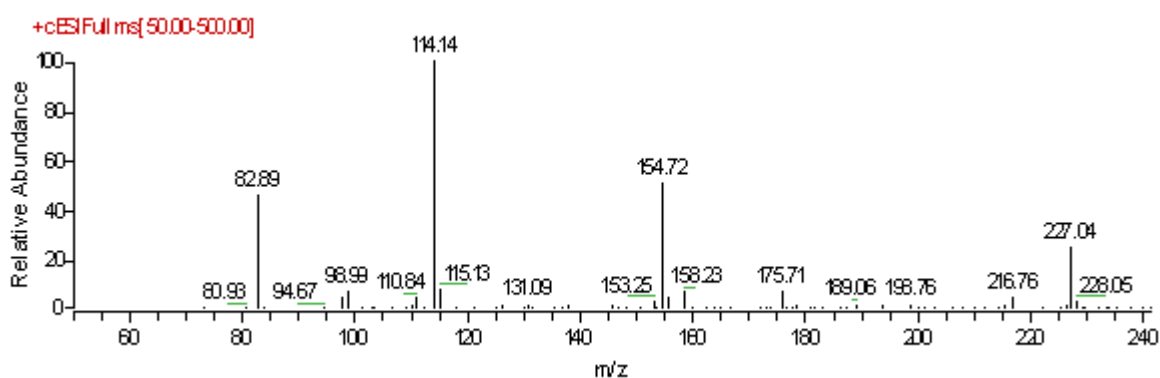
5.1.3. ϵ -kaprolaktam

Nástřikem Ka o koncentraci $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ bylo zjištěno, že poměr m/z Ka je 114.09, což odpovídá deklarované molekulové hmotnosti 113.2. Ka nepodléhá snadno ionizaci, optimalizace zde proto byla obtížná. Ve full spektru se vyskytují i jiné výrazné hmoty (obr. 21):

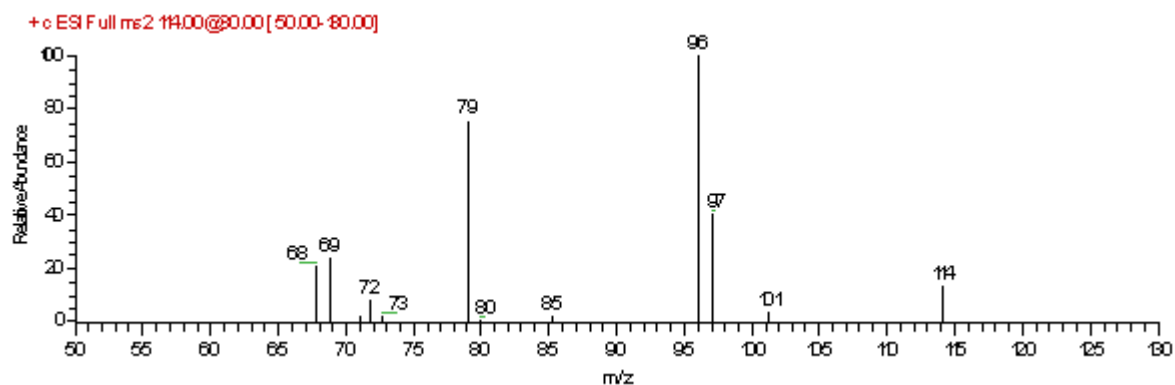
- poměr $m/z = 82$ dimer acetonitrilu
poměr $m/z = 154.7$ adukt kaprolaktamu a acetonitrilu
poměr $m/z = 227$ dimer kaprolaktamu

V režimu MS/MS při kolizní energii 32 % dochází k následující fragmentaci (obr. 22):

- poměr $m/z = 96$ ztráta 18 odštěpení H_2O
poměr $m/z = 79$ ztráta 35 odštěpení H_2O a $-NH_3$
poměr $m/z = 68$ ztráta 46 odštěpení H_2O a $-C_2H_2$



Obr. 21: Přímý nástřik kaprolaktamu $1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$.



Obr. 22: Záznam fragmentace Ca v módu MS/MS při kolizní energii 32 %.

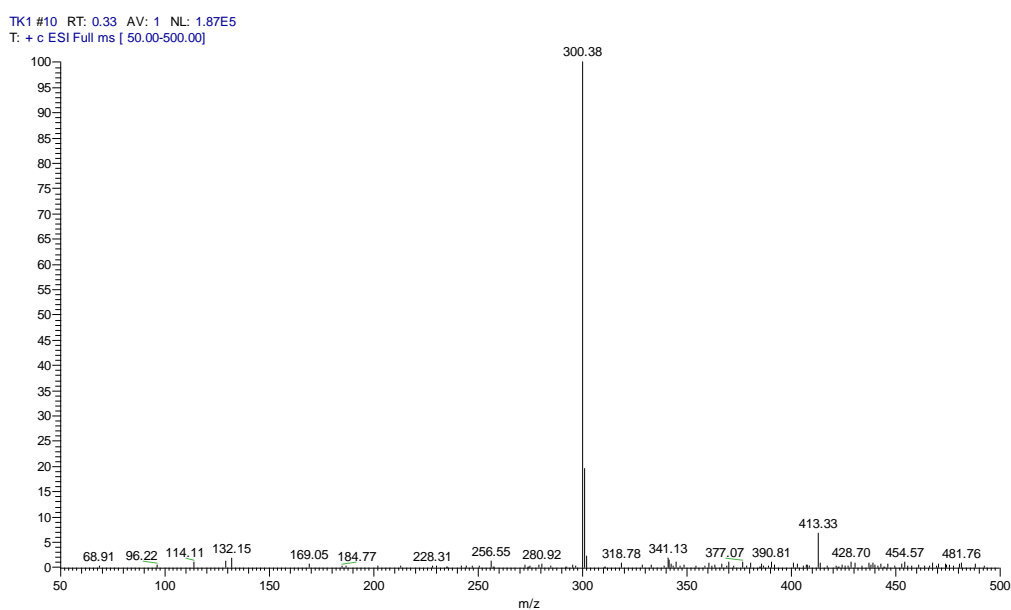
5.1.4. Transkarbam 12

Nástřikem T 12 o koncentraci $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ bylo zjištěno, že poměr m/z je 300.38 (obr. 23). Molekulová hmotnost T 12 je ovšem 643.0. Molekula T 12 velmi snadno podléhá dekarboxylaci za odštěpení CO_2 a vzniku dvou shodných řetězců

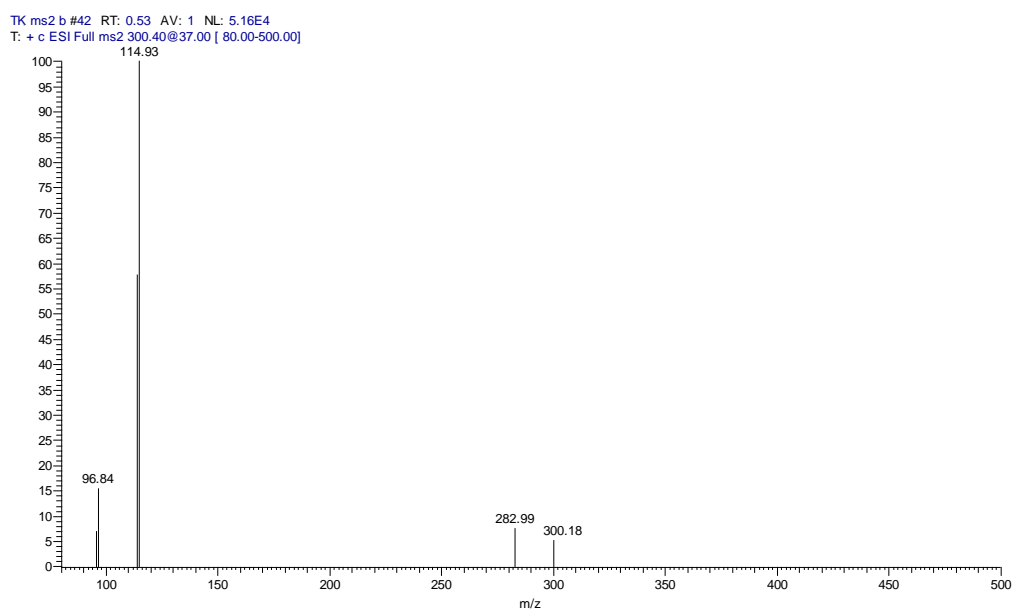
dodecylesteraminokapronové kyseliny (DDEAK). Molekulová hmotnost DDEAK je rovna 299.4, po ionizaci je tedy poměr m/z 300.4. Při hodnocení záznamů a výpočtech je ovšem třeba uvědomit si, že jedné molekule T 12 odpovídají dvě molekuly DDEAK.

V režimu MS/MS při kolizní energii 37 % dochází k následující fragmentaci (obr. 24):

poměr m/z = 283	ztráta 17	odštěpení $-NH_3$
poměr m/z = 115	ztráta 186	odštěpení $CH_3-(CH_2)_{11}-OH$
poměr m/z = 97	ztráta 204	odštěpení $CH_3-(CH_2)_{11}-OH$ a H_2O



Obr. 23: Přímý nástřík transkarbamu 12 o koncentraci $0.5 \mu g ml^{-1}$.

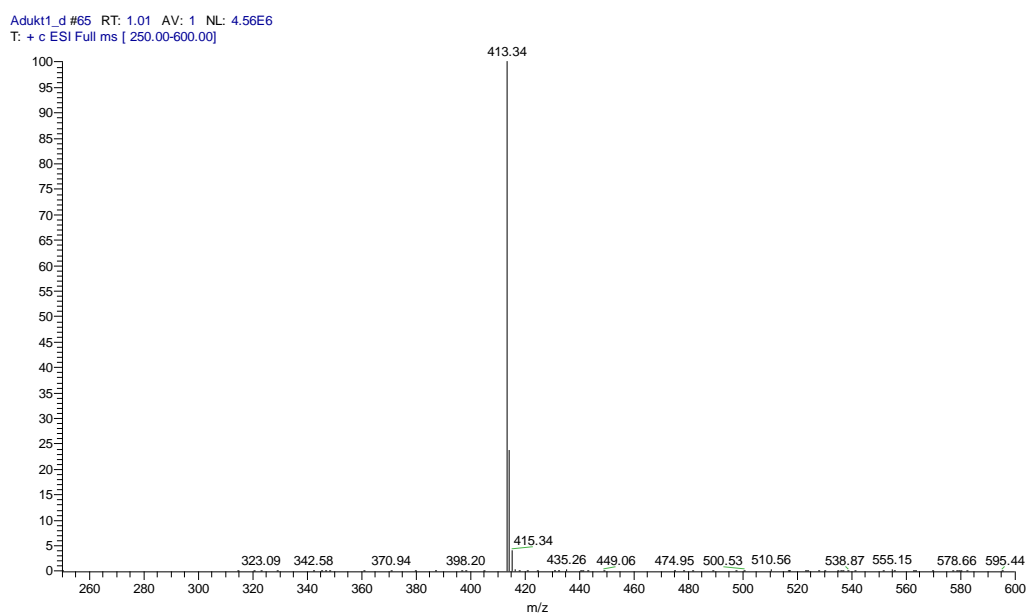


Obr. 24: Záznam fragmentace T 12 v módu MS/MS při kolizní energii 37 %.

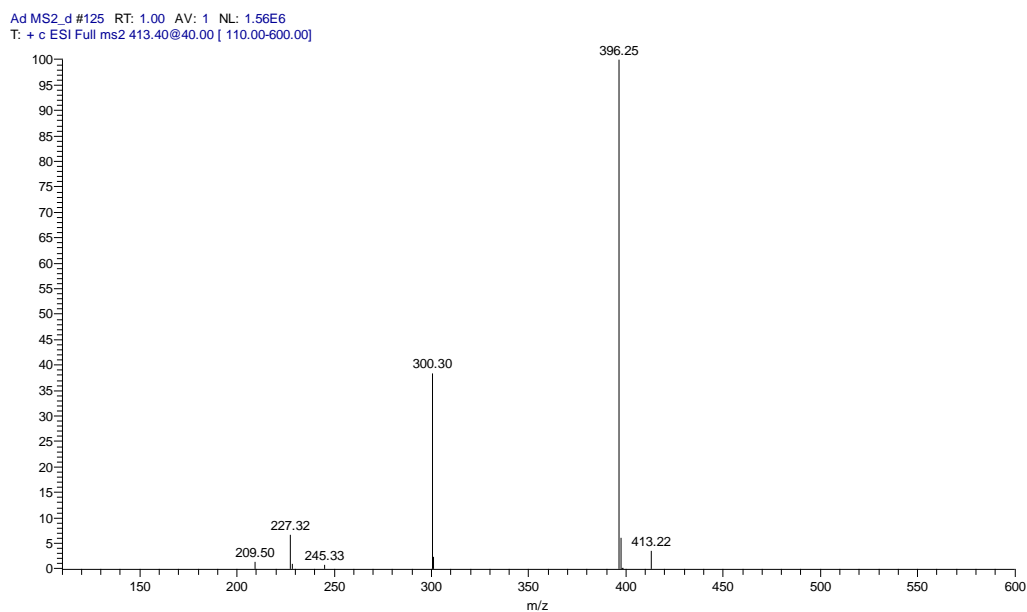
5.1.5. Adukt T 12 a Ak

Nástřikem aduktu o koncentraci $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ bylo zjištěno, že poměr m/z aduktu je 413.34 (obr. 25). V režimu MS/MS při kolizní energii 40 % dochází k následující fragmentaci (obr. 26):

poměr $m/z = 396$	ztráta 17	odštěpení $-\text{NH}_3$
poměr $m/z = 300$	ztráta 113	odštěpení $-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_3$
poměr $m/z = 227$	ztráta 186	odštěpení $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{OH}$



Obr. 25: Přímý nástřik aduktu o koncentraci $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$.



Obr. 26: Záznam fragmentace aduktu v módu MS/MS při kolizní energii 40 %.

5.2. Spojení HPLC/MS

Při spojení HPLC s MS detektorem bylo třeba optimalizovat podmínky analýzy: určit optimální složení mobilní fáze, množství přidávané kyseliny mravenčí, profil gradientu a optimalizovat parametry nastavení hmotnostního spektrometru.

5.2.1. Acidita mobilní fáze

Pro zjištění optimální acidity byly zkoušeny mobilní fáze voda/acetonitril s obsahem mravenčí kyseliny

0 %

0.01 %

0.025%

0.04 %

Mravenčí kyselina byla přidána pro zlepšení ionizace. Při použití mobilní fáze neobsahující kyselinu retenční čas T 12 výrazně kolísal a výsledné píky T 12 a aduktu nebyly hodnotitelné. Při postupném zvyšování obsahu kyseliny mravenčí až na 0.025 % se snižovala RSD u všech látek s výjimkou kaprolaktamu. Další zvýšení na 0.04 % mravenčí kyseliny vedlo ke zhoršení RSD kaprolaktamu i transkarbamu 12 (tab. 3).

Mezi jednotlivými koncentracemi kyseliny nebyly výrazné rozdíly ve tvarech píků. Co se týká vlivu na citlivost, vyšší koncentrace kyseliny mravenčí způsobovaly mírné snížení odezvy detektoru. Z těchto důvodů byl jako optimální zvolen obsah mravenčí kyseliny 0.025% a další měření byla prováděna s takto kyselou mobilní fází.

Tab. 3: RSD% jednotlivých látek v závislosti na obsahu mravenčí kyseliny.

Obsah HCOOH	RSD%	RSD%	RSD%	RSD%
	Ak/Ao	Ka/Ao	T 12/Ao	Adukt/Ao
0 %	2,94	6,69	nehodnotitelné	nehodnotitelné
0.01 %	3,65	4,09	17,91	21,37
0.025 %	2,26	7,15	4,18	9,00
0.04 %	1,63	8,06	5,79	5,38

5.2.2. Profil gradientu

K separaci všech pěti látek na základní linii bylo třeba použít gradientovou eluci, a to z několika důvodů a) vzhledem k podobné struktuře a tedy podobným retenčním časům Ak a Ao; b) obdobně u T 12 a jeho aduktu; c) vzhledem k výrazně odlišné lipofilitě Ak a Ao na jedné straně a T 12 a jeho aduktu na straně druhé.

Standardy byly proměřovány při koncentracích Ak, Ao, Ka, T 12 = 50 ng ml⁻¹, adukt = 100 ng ml⁻¹. Nejprve byl snímán full scan celého spektra, z něhož byly jednotlivé hmoty vyextrahovány v režimu reconstructed ion current (RIC). Tak byla zjištěna přibližná retence jednotlivých látek (tab. 4). Byly zkoušeny následující gradientové profily:

1:	0. - 8. min	20 → 80 % acetonitril
	8. - 10. min	80 % acetonitril
	10. - 15. min	ekvilibrace kolony 20 % acetonitrilem
2:	0. - 10. min	20 → 75 % acetonitril
	10. - 12. min	75 % acetonitril
	12. - 17. min	ekvilibrace kolony 20 % acetonitrilem
3:	0. - 10. min	20 → 65 % acetonitril
	10. - 14. min	65 % acetonitril
	14. - 17. min	ekvilibrace kolony 20 % acetonitrilem
4:	0. - 12. min	15 → 65 % acetonitril
	12. - 15. min	65 % acetonitril
	15. - 18. min	ekvilibrace kolony 15 % acetonitrilem
5:	0. - 1. min	4 % acetonitril
	1. - 12. min	4 → 65 % acetonitril
	12. - 14. min	65 % acetonitril
	14. - 20. min	ekvilibrace kolony 4 % acetonitrilem
6:	0. - 1. min	4 % acetonitril
	1. - 17. min	4 → 65 % acetonitril
	17. - 20. min	65 % acetonitril
	20. - 25. min	ekvilibrace kolony 4 % acetonitrilem

7:	0. - 1. min	4 % acetonitril
	1. - 22. min	4 → 65 % acetonitril
	22. - 25. min	65 % acetonitril
	25. - 30. min	ekvilibrace kolony 4 % acetonitrilem

Tab. 4: Retenční časy jednotlivých látek v závislosti na použitém gradientu. Záznam v módu full scan.

Gradient	Rt (min) Ak	Rt (min) Ao	Rt (min) Ka	Rt (min) T 12	Rt (min) adukt
1	1.68	1.73	4.23	7.21	7.31
2	1.66	1.73	4.21	8.35	8.48
3	1.65	1.72	4.24	9.22	9.41
4	1.66	1.72	5.02	10.81	11.00
5	1.83	2.82	8.04	12.12	12.26
6	1.83	2.85	8.71	15.19	15.42
7	1.84	2.86	9.25	18.13	18.47

Poté byl pro zvýšení citlivosti užíván režim SIM. Jednotlivé retenční časy uvádí tab. 5. Byly vyzkoušeny následující gradientové profily:

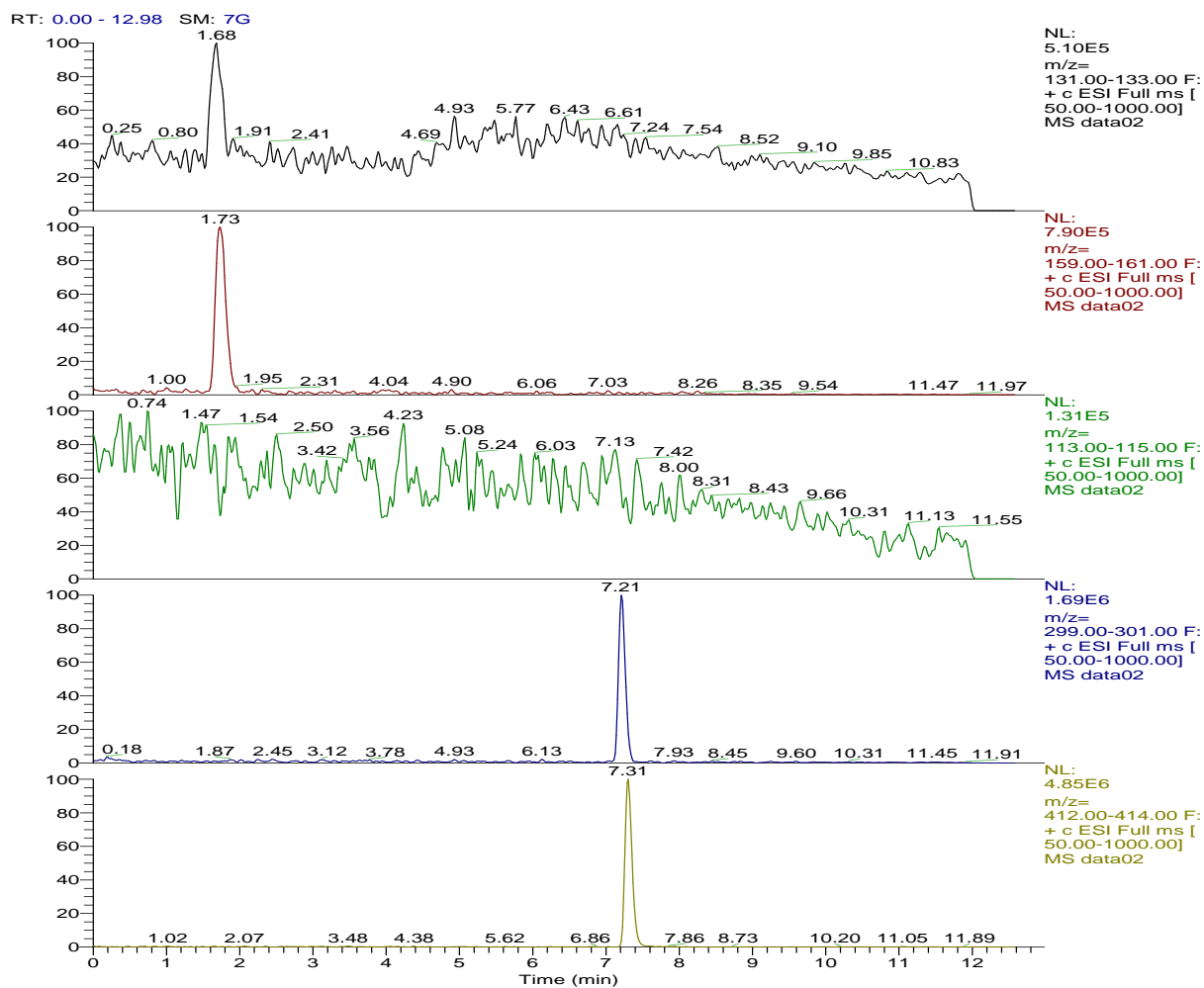
8:	0. - 1. min	4 % acetonitril
	1. - 22. min	4 → 65 % acetonitril
	22. - 25. min	65 % acetonitril
	25. - 30. min	ekvilibrace kolony 4 % acetonitrilem
9:	0. - 1. min	4 % acetonitril
	1. - 19. min	4 → 55 % acetonitril
	19. - 20. min	55 % acetonitril
	20. - 25. min	ekvilibrace kolony 4 % acetonitrilem

10:	0. - 1. min	4 % acetonitril
	1. - 22. min	4 → 65 % acetonitril
	22. - 27. min	ekvilibrace kolony 4 % acetonitrilem
11:	0. - 1. min	4 % acetonitril
	1. - 22,5. min	4 → 55 % acetonitril
	22,5. - 27,5. min	ekvilibrace kolony 4 % acetonitrilem
12:	0. - 1. min	4 % acetonitril
	1. - 25. min	4 → 55 % acetonitril
	25. - 30. min	ekvilibrace kolony 4 % acetonitrilem

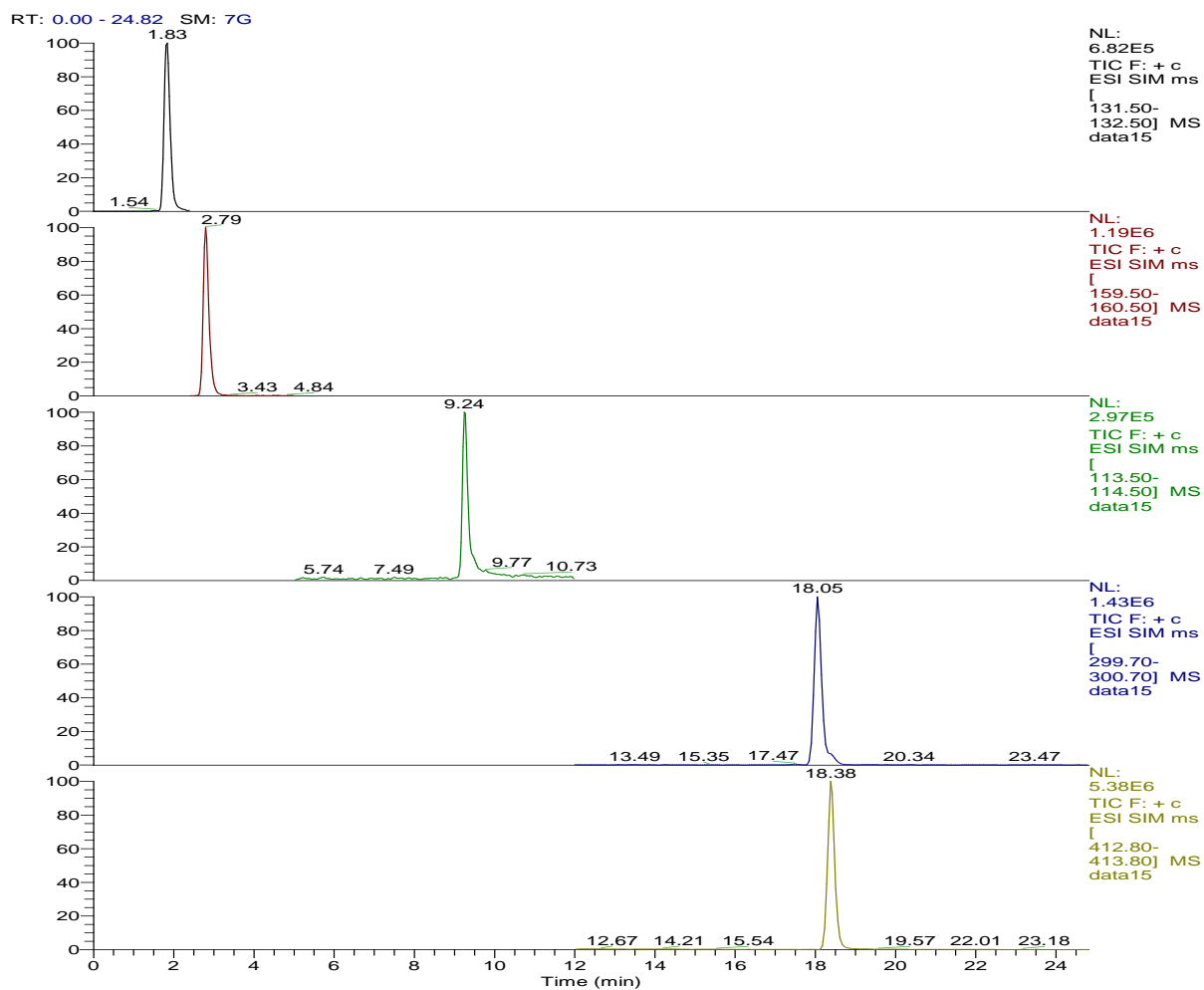
Tab. 5: Retenční časy jednotlivých látek v závislosti na použitém gradientu. Záznam v módu SIM.

Gradient	Rt (min) Ak	Rt (min) Ao	Rt (min) Ka	Rt (min) T 12	Rt (min) adukt
8	1.84	2.82	9.22	18.11	18.44
9	1.84	2.82	9.30	18.32	18.65
10	1.84	2.87	9.22	18.16	18.48
11	1.84	2.88	9.67	20.77	21.20
12	1.84	2.82	9.91	22.41	22.94

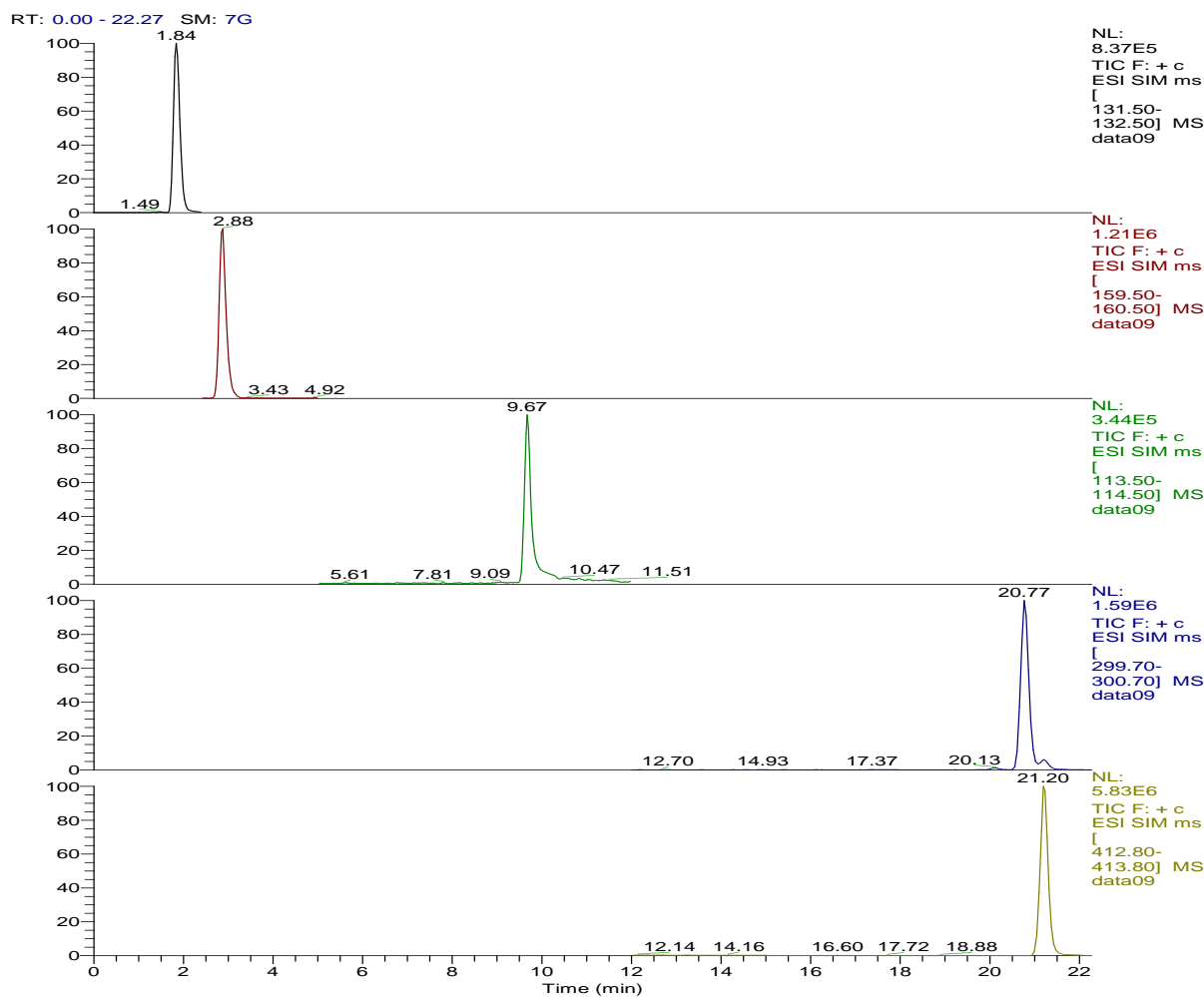
Při vývoji gradientu byl postupně prodlužován čas analýzy, což zlepšovalo separaci zejména T 12 a aduktu. Výsledná délka trvání jednoho nástřiku je 30 minut. Nejvyšší procentuální obsah acetonitrilu byl postupně snižován z 80 až na 55 %. Snižování obsahu acetonitrilu mělo také pozitivní vliv na separaci T 12 a aduktu. Pro umožnění separace Ak a Ao bylo nutné použít ze začátku izokratický 4 % acetonitril a začátek gradientu posunout až na 1. minutu. Vývoj gradientového profilu ilustrují obr. 27, 28 a 29.



Obr. 27: Chromatografický záznam ve full scan módu při použití gradientu č. 1: 0. - 8. min 20 → 80 % acetonitril, 8. - 10. min 80 % acetonitril, 10. - 15. min 20 % acetonitril.



Obr. 28: Chromatografický záznam v módu SIM při použití gradientu č. 8: 0. - 1. min 4 % acetonitril, 1. - 22. min 4 → 65 % acetonitril, 22. - 25. min 65 % acetonitril, 25. - 30. min 4 % acetonitril



Obr. 29: Chromatografický záznam v módu SIM při použití gradientu č. 11: 0. - 1. min 4 % acetonitril, 1. - 22,5. min 4 → 55 % acetonitril, 22,5. - 27,5. min 4 % acetonitril.

5.2.3. Parametry hmotnostní spektrometrie

Mobilní fáze obsahuje v počáteční fázi gradientu vysoké procento vody. Bylo třeba zajistit, aby došlo k úplnému vypaření mobilní fáze před vstupem do iontového zdroje. Z tohoto důvodu byla zkoušena následující nastavení proudu dusíku (sheet/auxilliary gas):

70/20 arb

70/25 arb

75/25 arb

75/35 arb

75/40 arb

80/40 arb,

byla zvyšována teplota kapiláry:

200 °C

220 °C

250 °C

a měněna D pozice sondy:

0

0.25

0.35

0.5.

Úplné odpaření mobilní fáze bylo dosaženo až při nastavení proudu dusíku 75/40 arb a teplotě kapiláry 250 °C. Při sledování vlivu, který má úhel vstupu přívodné kapiláry do detektoru, byla sonda nastavena až na pozici D, aby došlo k co nejúplnějšímu odpaření vodné části mobilní fáze. V rámci této pozice bylo optimální nastavení 0.5.

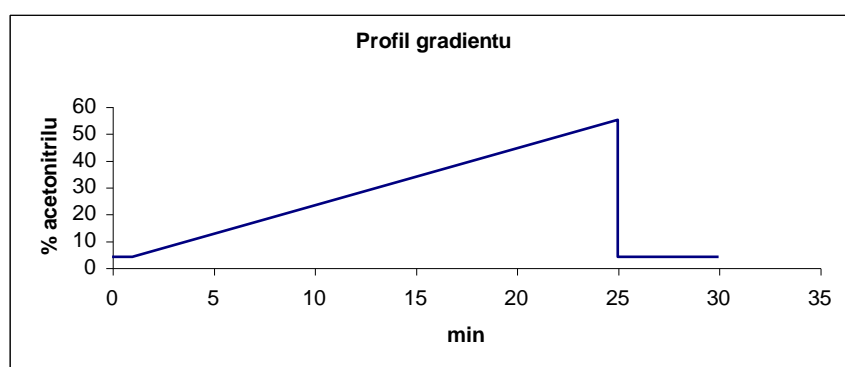
5.2.4. *Analýza vzorku*

Pro hodnocení transkarbamu 12, jeho tří nečistot a vnitřního standardu se jako nejvhodnější ukázalo přidání 0.025 % kyseliny mravenčí do mobilní fáze. Použití mobilní fáze bez přídavku kyseliny vedlo k výraznému kolísání retenčních časů zejména T 12 a aduktu. S postupným zvyšováním obsahu HCOOH až na 0.025 % se u většiny látek snižovala RSD. Vyšší procento HCOOH (0.04 %) způsobilo u Ka a T 12 zhoršení RSD a obecně vedlo ke snížení citlivosti. Z těchto důvodů byla pro všechna další měření používána mobilní fáze obsahující 0.025 % HCOOH.

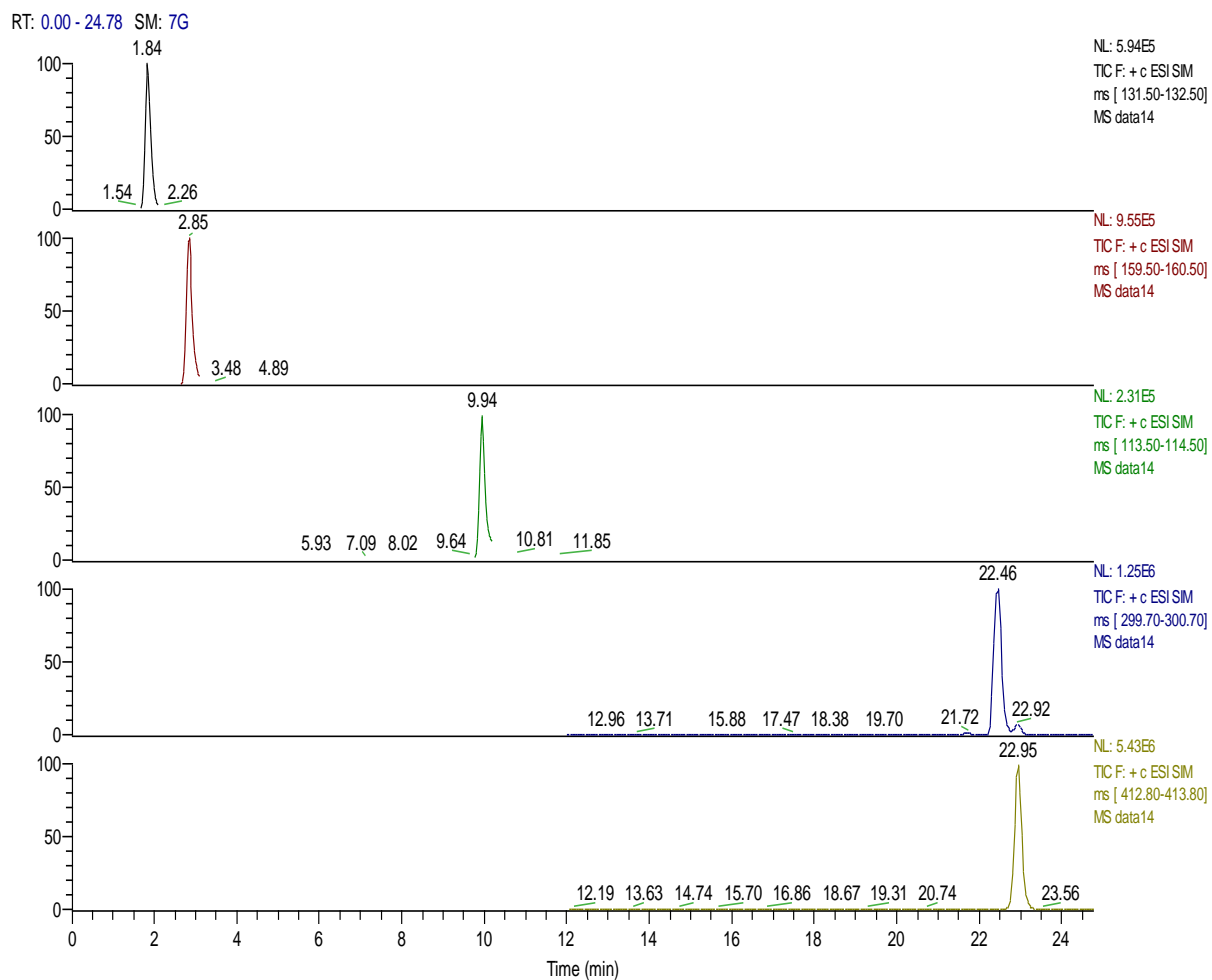
Při optimalizaci gradientového profilu bylo při pozvolnějším gradientu a snížení nejvyššího obsahu acetonitrilu z 80 na 55 % dosaženo nejlepší separace T 12 a aduktu. Pro separaci Ak a Ao bylo nezbytné zpočátku použít pouze izokratický 4 % acetonitril a nástup gradientu nastavit až na 1. minutu. Nejlepší separace látek bylo dosaženo při použití následujícího gradientového profilu: 0. - 1. min 4 % acetonitril; 1. - 25. min 4 → 55 % acetonitril; 25. – 30. min ekvilibrace kolony 4 % acetonitrem. Výsledný profil gradientu je zobrazen na obr. 30.

Nejvhodnějších podmínek pro ionizaci elektrosprejem bylo dosaženo při nastavení proudu dusíku 75/40 arb, teplotě kapiláry 250 °C a nastavení sondy na pozici D 0.5. Za těchto podmínek došlo k úplnému vypaření mobilní fáze před vstupem do detektoru.

Z analýzy modelových vzorků provedené za vybraných podmínek vyplývá, že bylo dosaženo výborné separace všech pěti píků, s následujícími retenčními časy: R_t (Ak) = 1.84 min; R_t (Ao) = 2.82 min; R_t (Ka) = 9.91 min; R_t (T 12) = 22.41 min; R_t (adukt) = 22.94 min. Záznam separace je uveden na obr. 31. Pozadí mobilní fáze zaznamenává obr. 32; objevuje se zde pík s poměrem $m/z = 300$, tedy stejným, jaký má molekula T12, a s retenčním časem 21.7 min. Retenční čas je tedy odlišný od T 12. Na základě MS/MS byla zjištěna jiná fragmentace než má T 12, což potvrzuje, že tato hmota není totožná s T 12.

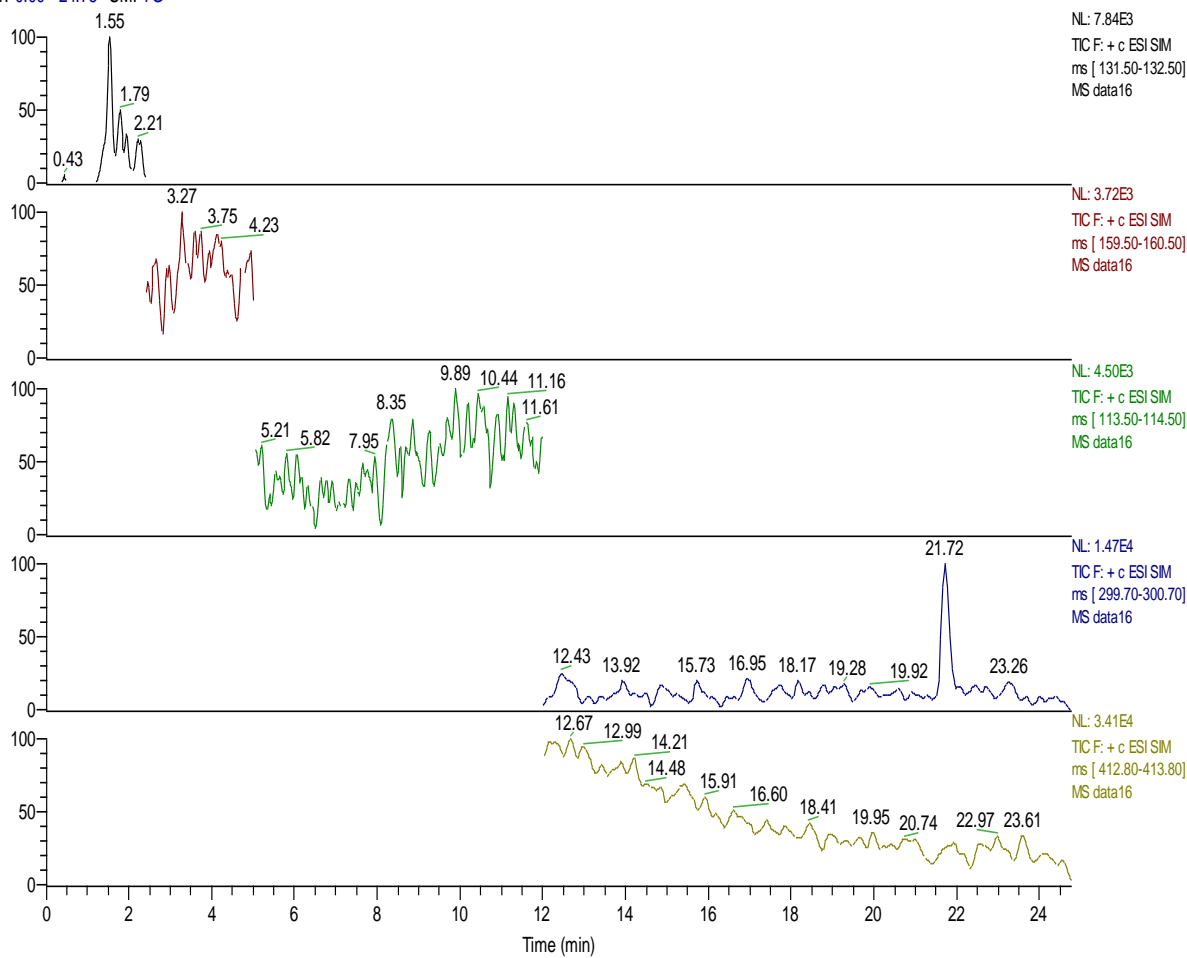


Obr. 30: Výsledný gradientový profil.



Obr. 31: Záznam konečné separace všech látek v režimu SIM, při použití gradientu č. 12: 0. - 1. min 4 % acetonitril; 1. - 25. min 4 → 55 % acetonitril; 25. - 30. min ekvilibrace kolony 4 % acetonitrilem.

RT: 0.00 - 24.78 SM: 7G



Obr. 32: Záznam mobilní fáze v režimu SIM, při použití gradientu č. 12: 0. - 1. min 4 % acetonitril; 1. - 25. min 4 → 55 % acetonitril; 25. - 30. min ekvibrace kolony 4 % acetonitrilem.

6. ZÁVĚR

V této práci byly optimalizovány podmínky pro separaci transkarbamu 12, jeho tři nečistot ϵ -aminokapronové kyseliny, ϵ -kaprolaktamu a dodecylesteru kyseliny 6-(6-aminohexanoylamino)hexanové a vnitřního standardu, což je kyselina 8-aminooktanová. Metoda je založená na spojení HPLC s MS detektorem.

Metodou přímého nástřiku byla proměřena MS spektra všech pěti látek a určena jejich molekulová hmotnost. Byly vyladěny optimální podmínky pro MS detekci. Byla zjištěna fragmentace látek v režimu MS/MS a zaznamenána výsledná fragmentační spektra.

V následujícím kroku byly látky analyzovány pomocí spojení HPLC/MS. Byla vyvinuta metoda účinné separace všech pěti látek a jejich co nejcitlivější detekce. Jako mobilní fáze byla použita směs voda/acetonitril s obsahem 0.025 % kyseliny mravenčí. Látky byly separovány užitím gradientové eluce s profilem: 0. - 1. min 4 % acetonitril; 1. - 25. min 4 \rightarrow 55 % acetonitril; 25. - 30. min ekvibrace kolony 4% acetonitrem. Pro dokonalé odstranění mobilní fáze před vstupem do detektoru hmotnostního spektrometru bylo potřeba nastavit proud dusíku na 75/40 arb a teplotu kapiláry na 250 °C. Výsledná spektra byla pro zvýšení citlivosti zaznamenávána v režimu SIM. Za těchto podmínek bylo dosaženo následujících retenčních časů: R_t (Ak) = 1.84 min; R_t (Ao) = 2.82 min; R_t (Ka) = 9.91 min; R_t (T 12) = 22.41 min; R_t (adukt) = 22.94 min.

7. LITERATURA

1. Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002
2. http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/ (Y.Kazachevich, H. McNair: Textbook on High Performance Liquid Chromatography) (1/2007)
3. Nováková L.: Disertační práce, FaF UK, Hradec Králové 2005
4. <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> (1/2007)
5. Český lékopis 2005, 1. vydání, Grada, Praha, ČR (2005)
6. J. Churáček, P. Jandera: Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie; SNTL, Praha (1984)
7. V. Pacáková, K. Štulík: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie; SPN, Praha (1986)
8. Churáček J., Jandera P.: Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academia, Praha 1993
9. N.C.Megoulas, M.A.Koupparis: Twenty years of evaporative light scattering detection; Critical Rev. Anal. Chem. 35 (2005) 301-316
10. Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2005
11. Holčapek M.: soubor přednášek 2006 (http://mail.upce.cz/~holcapek/teaching_CZ.htm) (11/2006)
12. R. E. Andrey: Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction; J. Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK (2003) 75-77
13. E. Bossù, A. Montinaro, R. Lecce, A. Farina, E. Suppa, G. Draisci, G. Hostili: LC–MS Determination of remifentanyl in maternal and neonatal plasma; J. Pharm. Biomed. Anal. 42 (2006) 367-371
14. K. de la Torre-Carbot, O. Jauregui, A. I. Castellote, R. M. Lamuela-Raventós, M.-I. Covas, I. Casals, M. C. López-Sabater: Rapid high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry method for qualitative and quantitative analysis of virgin olive oil phenolic metabolites in human low-density lipoproteins; J. Chromatogr. A 1116 (2006) 69-75

15. X. Zhang, S. Zhai, R. Zhao, J. Ouyang, X. Li, W.R.G. Baeyens: Determination of cilnidipine, a new calcium antagonist, in human plasma using high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection; *Anal. Chim. Acta* 2006 article in press
16. A. Maes, K. Baert, S. Croubels, D. De Clercq, G. van Loon, P. Deprez, P. De Backer: Determination of amiodarone and desethylamiodarone in horse plasma and urine by high-performance liquid chromatography combined with UV detection and electrospray ionization mass spectrometry; *J. Chromatogr. B* 836 (2006) 47-56
17. G. Hoizey, A. Goglin, J.-M. Malinovsky, A. Robinet, L. Binet, M. L. Kaltenbach, H. Millart, D. Lamiable: Specific and sensitive analysis of nefopam and its main metabolite desmethyl-nefopam in human plasma by liquid chromatography – ion trap tandem mass spectrometry; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 593-600
18. G. Hoizey, D. Lamiable, A. Robinet, H. Ludot, J.-M. Malinovsky, M. L. Kaltenbach, L. Binet, Ch. Boulanger, H. Millart: Sensitive bioassay of bupivacaine in human plasma by liquid-chromatography – ion trap mass spectrometry; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 587-592
19. P. Keski-Rahkonen, O. Parssinen, E. Leppanen, T. Mauriala, M. Lehtonen, S. Auriola: Determination of tamsulosin in human aqueous humor and serum by liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry; *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2006) article in press
20. S. Kemmo, V. Ollilainen, A.-M. Lampi, V. Piironen: Determination of stigmasterol and cholesterol oxides using atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectrometry; *Food Chem.* 101 (2007) 1455-1462
21. W. Wu, F. Song, C. Yan, Z. Liu, S. Liu: Structural analyses of protoberberine alkaloids in medicine herbs by using ESI–FT-ICR-MS and HPLC–ESI–MSⁿ; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 437-446
22. A.L. Huidobro, F.J. Rupérez, C. Barbar: Isolation, identification and determination of the major degradation product in alprazolam tablets during their stability assay; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006 article in press
23. J. Wang, X. Hu, Y. Tu, K. Ni: Determination of spectinomycin hydrochloride and its related substances by HPLC–ELSD and HPLC–MSⁿ; *J. Chromatogr. B* 834 (2006) 178-182

24. J. Fiori, G. Grassigli, P. Filippi, R. Gotti, V. Cavrini: HPLC-DAD and LC-ESI-MS analysis of doxycycline and related impurities in doxipan mix, a medicated premix for incorporation in medicated feedstuff; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 979-985
25. C. Atsriku, D. G. Watson, J. N. A. Tetley, M. H. Grant, G. G. Skellern: Determination of diminazene aceturate in pharmaceutical formulations by HPLC and identification of related substances by LC/MS; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 979-986
26. N. Barbarin, J. D. Henion, Y. Wu: Comparison between liquid chromatography–UV detection and liquid chromatography–mass spectrometry for the characterization of impurities and/or degradants present in trimethoprim tablets; *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 141-154
27. J. Fiori, M. Bragieri, M. C. Zanotti, A. Liverani, V. Borzatta, F. Mancini, V. Cavrini, V. Andrisano: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the identification of impurities in d-allethrin samples; *J. Chromatogr. A* 1099 (2005) 149-156
28. V. G. Dongre, P. P. Karmuse, P. D. Ghugare, M. Gupta, B. Nerurkar, Ch. Shaha, A. Kumar: Characterization and quantitative determination of impurities in piperazine phosphate by HPLC and LC/MS/MS; *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2006) article in press
29. T. Holas, K. Vávrová, J. Klimentová, A. Hrabálek: Synthesis and transdermal permeation-enhancing activity of ketone, amide, and alkane analogs of Transkarbam 12, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 2896-2903
30. A. Hrabálek, K. Vávrová, Lze překonat kožní bariéru?, *Praktické lékařství* 1 (2005)
31. A. Hrabálek, P. Doležal, Z. Škubalová, O. Farsa, A. Krebs, Akceleranty transdermální penetrace, *Chem. Listy* 93 (1999) 107 – 119
32. H. Herai, T. Gratieri, J. A. Thomazine, M. V. Lopes, B. Bentley, R. F. V. Polez: Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulations; *Int. J. Pharm.* 329 (2007) 88-93
33. P. F. Ch. Lim, X. Y. Liu, L. Kang, P. Ch. L. Ho, Y. W. Chan, S. Y. Chan: Limonene GP1/PG organogel as a vehicle in transdermal delivery of haloperidol; *Int. J. Pharm.* (2006) 157-164

34. M.-L. Leichtnam, H. Rolland, P. Wüthrich, R. H. Guy: Identification of penetration enhancers for testosterone transdermal delivery from spray formulations; *J. Controlled Release* 113 (2006) 57-62
35. A. Nokhodchi, K. Sharabiani, M.R. Rashidi, T. Ghafourian: The effect of terpene concentrations on the skin penetration of diclofenac sodium; *Int. J. Pharm.*, article in press
36. A. Hrabálek, P. Doležal, O. Farsa, A. Krebs, A. Kroutil, M. Roman, Z. Škubalová: ω -amino acids derivatives, processes of their preparation and their use; U.S. Pat. 6 187 938 (2001)
37. K. Vávrová, J. Zbytovská, A. Hrabálek; Amphiphilic Transdermal Permeation Enhancers, Structure Activity Relationships, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 2273-2291
38. T. Holas, K. Vávrová, M. Šíma, J. Klimentová, A. Hrabálek: Synthesis and transdermal permeation-enhancing activity of carbonate and carbamate analogs of Transkarbam 12, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 7671-7680
39. J. Zbytovská, S. Raudenkolb, S. Wartewig, W. Hübner, W. Rettig, P. Pissis, A. Hrabálek, P. Doležal, R. Neubert, Phase behaviour of transkarbam 12; *Chem. Phys. Lipids* 129 (2004) 97-109
40. J. Klimentová, A. Hrabálek, K. Vávrová, T. Holas, A. Kroutil: Synthesis and transdermal penetration-enhancing activity of carbonic and carbamic acid esters—Comparison with transkarbam 12, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2006) 1981-1984
41. T. Holas, J. Zbytovská, K. Vávrová, P. Berka, M. Mádlová, J. Klimentová, A. Hrabálek: Thermotropic phase behavior of long-chain alkylammonium-alkylcarbamates, *Thermochim. Acta* 441 (2006) 116-123
42. I. Pasáková, J. Sochor, J. Klimeš, A. Hrabálek: Preliminary pharmaceutico-analytical evaluation of Transkarbam 12 using liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1595-1599
43. I. Pasáková, J. Klimeš, J. Sochor, A. Hrabálek: Optimization of HPLC chromatographic conditions for determination of Transkarbam 12 and its degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 136-142

44. L. Bonifaci, D. Frezzotti, G. Cavalca, E. Malaguti, G. P. Ravanetti: Analysis of ϵ -caprolactam and its cyclic oligomers by high-performance liquid chromatography; *J. Chromatogr. A* 585 (1991) 333-336
45. J. Brodilová, J. Rotschová, J. Pospíšil: Determination of caprolactam and its oligomers by means of liquid chromatography; *J. Chromatogr. A* 168 (1979) 530-532
46. Z. Tocksteinová, M. Kopanica: Determination of caprolactam by adsorptive voltammetry after separation by thin-layer chromatography; *Anal. Chim. Acta* 199 (1987) 77-83
47. Y. Zhao, Z. Jing, H. Li, H. Zhang: The determination of impurities in caprolactam by capillary gas chromatography-mass spectrometry; *Microchem. J.* 69 (2001) 213-217
48. P. Pinto, M. Saraiva, J. Santos, J. Lima: Fluorimetric determination of aminocaproic acid in pharmaceutical formulations using a sequential injection analysis system; *Tal.* 68 (2006) 857-862
49. J. A. Shepherd, D. W. Nibbelink, L. D. Stegink: Rapid chromatographic technique for the determination of ϵ -aminocaproic acid in physiological fluids; *J. Chromatogr.* 86 (1973) 173-177
50. N. Wolosowicz, S. Niewiarowski: A simple method of determining ϵ -aminocaproic acid (EACA) in urine; *Clin. Chim. Acta* 12 (1965) 555-557
51. <http://www.chromservis.cz/hexyl.htm> (12/2006)