

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro stanovení skupiny statinů
a jejich metabolitů**

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

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

Hradec Králové 2013

Pavel Svoboda

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Pavel Svoboda

Školitel: Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce:

Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro stanovení skupiny statinů a jejich metabolitů

Tato diplomová práce se zabývá vývojem metody pro stanovení skupiny statinů a jejich metabolitů pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu. V rámci diplomové práce byly optimalizovány chromatografické podmínky a parametry hmotnostního spektrometru. Na závěr byla hodnocena citlivost, linearita a opakovatelnost metody.

Pro separaci byla zvolena kolona BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm). Výběr kolony byl proveden při použití UV spektrofotometrického detektoru. Mobilní fáze pro gradientovou eluci byla tvořena 0,1 mM octanem amonným o $\text{pH} = 4$ a acetonitrem v počátečním poměru 70:30.

Optimalizace parametrů hmotnostního spektrometru byla započata výběrem prekurzorových iontů po přímé infuzi standardů. Následně byly podrobeny optimalizaci parametry iontového zdroje. Po výběru produktových iontů byly optimalizovány iontové přechody. Optimalizace iontových přechodů byla doplněna hodnocením vlivu aditiv na ionizaci. Všechny zmíněné kroky byly hodnoceny jak v pozitivním, tak i v negativním ionizačním módu elektrospreje. Po srovnání citlivosti a linearity byl vybrán konečný mód ionizace pro každou zkoumanou sloučeninu zvlášť.

Po optimalizaci všech podmínek a výběru módu ionizace byla změřena citlivost ($\text{LOQ} = 1 \times 10^{-9} \text{ g/ml} - 1 \times 10^{-8} \text{ g/ml}$), linearita (15 analytů: $r^2 \geq 0,9990$; lovastatin kyselina a pravastatin lakton: $r^2 \geq 0,9900$) a opakovatelnost ($\text{RSD} < 1 \%$ pro retenční čas, $\text{RSD} < 10 \%$ pro plochu píků) výsledné metody.

Klíčová slova: atorvastatin, *o*-hydroxyatorvastatin, *p*-hydroxyatorvastatin, atorvastatin lakton, fluvastatin, fluvastatin lakton, lovastatin, lovastatin kyselina, pitavastatin, pitavastatin lakton, pravastatin, pravastatin lakton, rosuvastatin, rosuvastatin lakton, N-desmethylrosuvastatin, simvastatin, simvastatin kyselina, UHPLC-MS/MS, statiny

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Pavel Svoboda

Supervisor: Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Graduation Thesis:

Development of UHPLC-MS/MS method for the determination of statins and their metabolites

This graduation thesis deals with development of the method for the determination of statins and their metabolites by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. First, the chromatographic conditions were optimized. Next, the parameters of mass spectrometer were optimized. And finally, repeatability, linearity and sensitivity of the method were assessed.

Chromatographic column BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 μm) was used for the analysis. The choice of column was performed using UV spectrophotometric detector. The mobile phase of the gradient elution consisted of 0.1 mM ammonium acetate (A) and acetonitrile (B). The initial ratio of mobile phase A:B was set at 70:30.

The optimization of the mass spectrometry parameters started with the selection of precursor ions using direct infusion. Thereafter, the ion source parameters of the mass spectrometer were optimized. The ion transitions were optimized after the selection of product ions. The optimization of ion transitions was extended by the evaluation of the mobile phase additives influence on the ionization process. The above mentioned steps were measured in both positive and negative ionization modes. The resulting ionization mode for each compound was chosen after comparison of calibration curve linearity and sensitivity.

Finally after optimization of all important conditions, the sensitivity ($\text{LOQ} = 1 \times 10^{-9} \text{ g/ml} - 1 \times 10^{-8} \text{ g/ml}$), linearity (15 analytes: $r^2 \geq 0,9990$; lovastatin acid and pravastatin lactone: $r^2 > 0,9900$) and repeatability ($\text{RSD} < 1 \%$ for retention time, $\text{RSD} < 10 \%$ for peak areas) of the final method was measured.

The keywords: atorvastatin, *o*-hydroxyatorvastatin, *p*-hydroxyatorvastatin, atorvastatin lactone, fluvastatin, fluvastatin lactone, lovastatin, lovastatin acid, pitavastatin, pitavastatin lactone, pravastatin, pravastatin lactone, rosuvastatin, rosuvastatin lactone, N-desmethylrosuvastatin, simvastatin, simvastatin acid, UHPLC-MS/MS, statins

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2013

.....

Pavel Svoboda

Děkuji Doc. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, připomínky, cenné rady a čas, který mi věnovala. Poděkování patří také pracovníkům Katedry analytické chemie za pomoc, vstřícné jednání a příjemnou atmosféru.

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Cíl a zadání diplomové práce.....	12
3. Teoretická část	14
3.1 Statiny	15
3.1.1 Historie statinů.....	15
3.1.2 Farmakodynamika statinů.....	16
3.1.3 Farmakokinetika statinů.....	18
3.1.4 Indikace statinů	20
3.1.5 Spotřeba statinů.....	20
3.1.6 Struktura a vlastnosti stanovovaných statinů a jejich metabolitů	22
3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	26
3.2.1 Kolony pro HPLC	26
3.2.2 Detektory pro HPLC	27
3.3 Ultra – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC).....	29
3.3.1 Kolony pro UHPLC	29
3.3.2 Detektory pro UHPLC	29
3.4 Hmotnostní spektrometrie.....	30
3.4.1 Iontový zdroj.....	30
3.4.2 Hmotnostní analyzátor	34
3.4.3 Detektor hmotnostního spektrometru	37
3.5 Přehled metod pro současné stanovení statinů.....	38
4. Experimentální část.....	40
4.1 Použité chemikálie	41
4.2 Použité přístroje a materiály.....	42
4.3 Příprava standardů.....	43
4.4 Výběr stacionární fáze.....	43
4.5 Optimalizace gradientové eluce	44
4.6 Optimalizace podmínek pro MS detekci.....	44
4.6.1 Výběr prekurzorových iontů.....	44
4.6.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje.....	44
4.6.3 Výběr produktových iontů	45
4.6.4 Optimalizace iontových přechodů	45

4.7	Výběr aditiva mobilní fáze.....	45
4.8	Ověření citlivosti a linearity metody.....	46
4.9	Opakovatelnost metody.....	46
5.	Výsledky a diskuze	47
5.1	Optimalizace chromatografických podmínek	48
5.1.1	Výběr stacionární fáze	48
5.1.2	Optimalizace gradientové eluce.....	50
5.2	Výběr prekurzorových iontů	51
5.3	Optimalizace parametrů iontového zdroje hmotnostního spektrometru	52
5.3.1	Napětí na kapiláře	52
5.3.2	Desolvační teplota.....	53
5.3.3	Napětí na hexapólu	54
5.3.4	Napětí na extraktoru.....	55
5.3.5	Průtok desolvačního plynu.....	56
5.3.6	Průtok plynu na vstupním kuželu	57
5.3.7	Napětí na vstupním kuželu	58
5.4	Výběr produktových iontů	59
5.5	Optimalizace iontových přechodů.....	76
5.6	Výběr aditiva mobilní fáze.....	85
5.7	Výběr módu ionizace	92
6.	Závěr	93
6.1	Optimalizace chromatografických podmínek	94
6.2	Optimalizace parametrů iontového zdroje	94
6.3	Optimalizace iontových přechodů.....	94
6.4	Citlivost, linearita a opakovatelnost metody	95
7.	Použitá literatura	98
8.	Příloha.....	103
8.1	Seznam příloh.....	104

Seznam zkratek

AcAc – kyselina octová

AcF – kyselina mravenčí

AmAc – octan amonný

AmF – mravenčan amonný

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku

AT – atorvastatin

AT-d₅ – atorvastatin značený stabilními izotopy deuteria

ATL – atorvastatin lakton

CE – kolizní energie

CV – napětí na vstupním kuželu

CYP – cytochrom P450

EI – elektronová ionizace

ESI – ionizace elektrosprejem

F 1-4 – fragment, produktový iont

FLU – fluvastatin

FLVL – fluvastatin lakton

HMG-CoA – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A

LC-MS – spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

LDL – lipoprotein s nízkou hustotou

LDL-C – lipoprotein s nízkou hustotou typu C

LOQ – limit kvantifikace

LOD – limit detekce

LOV – lovastatin

LOVA – lovastatin kyselina

MeA - methylamin

MeOH – methanol

N-DM RV – N-desmethylrosuvastatin

o-OH AT – ortho-hydroxyatorvastatin

p-OH AT – para-hydroxyatorvastatin

PreI – prekurzorový iont

PV – pravastatin

PVL – pravastatin lakton

PTV – pitavastatin

PTVL – pitavastatin lakton

RSD – relativní směrodatná odchylka

RV – rosuvastatin

RV-d₆ – rosuvastatin značený stabilními izotopy deuteria

RVL – rosuvastatin lakton

RVL-d₆ – rosuvastatin lakton značený stabilními izotopy deuteria

SV – simvastatin

SV-d₆ – simvastatin značený stabilními izotopy deuteria

SVA – simvastatin kyselina

1. Úvod

Tato diplomová práce se zabývá stanovením statinů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu. Předkládaná práce doplňuje a rozšiřuje poznatky získané během několikaletého výzkumu dané problematiky na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Statiny patří mezi jedny z nejvíce předepisovaných léčivých látek v České republice. Řadí se mezi sloučeniny snižující hladinu lipidů v krvi. Jejich mechanismus účinku spočívá v bloádě enzymu 3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A reduktázy. Tento enzym je zodpovědný za syntézu cholesterolu. Statiny jsou metabolizovány systémem enzymů zvaným cytochrom P450. Tato skutečnost s sebou přináší velké množství více či méně závažných lékových interakcí v případě polyfarmakoterapie.

Statiny se v biologických materiálech vyskytují v nízkých koncentracích, proto je nutné pro jejich stanovení vyvíjet a následně používat citlivé a selektivní metody. Tyto metody nacházejí uplatnění například v preklinických a klinických studiích léčivých přípravků nebo v posledních letech při zkoumání nelipidových účinků statinů. Z důvodu lékových interakcí těchto hypolipidemik a jejich případných projevů je výhodné znát jejich přesnou plazmatickou koncentraci, díky níž je možné určit vhodnou dávku. Dalším oborem uplatnění je tedy monitorování lékových hladin.

Námi vyvíjená metoda se vyznačuje tím, že umožňuje stanovit větší počet různých molekul statinů najednou. Jedná se o 17 analytů, kdy tento počet zahrnuje jak léčivé látky, tak i jejich metabolity.

2. Cíl a zadání diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu pro stanovení všech klinicky významných statinů a jejich metabolitů pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem typu trojitého kvadrupólu (UHPLC-MS/MS).

Prvním krokem byl výběr chromatografických podmínek, tzn. zvolení stacionární fáze, mobilní fáze a optimalizace gradientové eluce.

Další krok zahrnoval především nastavení hmotnostního spektrometru a skládal se z několika fází. Nejprve byly vybrány prekurzorové ionty v pozitivním i v negativním ionizačním módu elektrospreje (ESI), a to po provedení přímé infuze jednotlivých standardů. Následovala optimalizace parametrů iontového zdroje hmotnostního spektrometru: napětí na kapiláře, desolvační teplota, napětí na hexapólu, napětí na extraktoru, průtok desolvačního plynu, průtok plynu na vstupním kuželu a napětí na vstupním kuželu. Poté byly vybrány produktové ionty v pozitivním a v negativním módu ESI. Tento výběr doprovodila optimalizace kolizní energie. Každý vybraný iontový přechod v pozitivním i v negativním módu byl doplněn o časové okno a pozorovací čas. Následně byla zvolena aditiva mobilní fáze. Tento krok byl zakončen posouzením citlivosti a linearitu v pozitivním a v negativním módu ESI a zvolením módu ionizace pro každý statin.

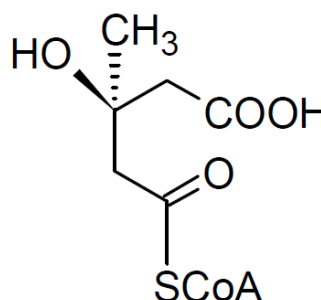
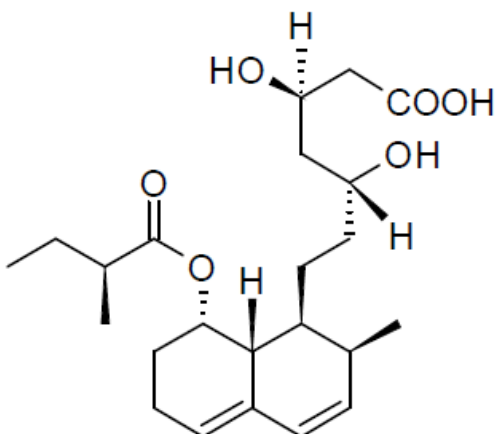
Posledním krokem bylo zhodnocení citlivosti, linearitu a opakovatelnosti finální zoptimalizované metody.

3. Teoretická část

3.1 Statiny

3.1.1 Historie statinů

První zmínka o statinech pochází z roku 1971, kdy byl při hledání antibiotik s novým mechanismem účinku objeven kompetitivní inhibitor 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reductázy zvaný mevastatin. Jedná se o produkt houby *Penicillium citrinum* – štětičkovec citronový z řádu *Eurotiales* – plesnivkotvaré a čeledi *Trichocomaceae* – plísňovkovité. Pro mevastatin se užívalo také označení compactin nebo ML-236B. Na konci roku 1973 byla popsána struktura výše zmíněné sloučeniny (Obr. 1). Část struktury mevastatinu se velmi podobá substrátu HMG-CoA reductázy (Obr. 2) [1][2][3][4].



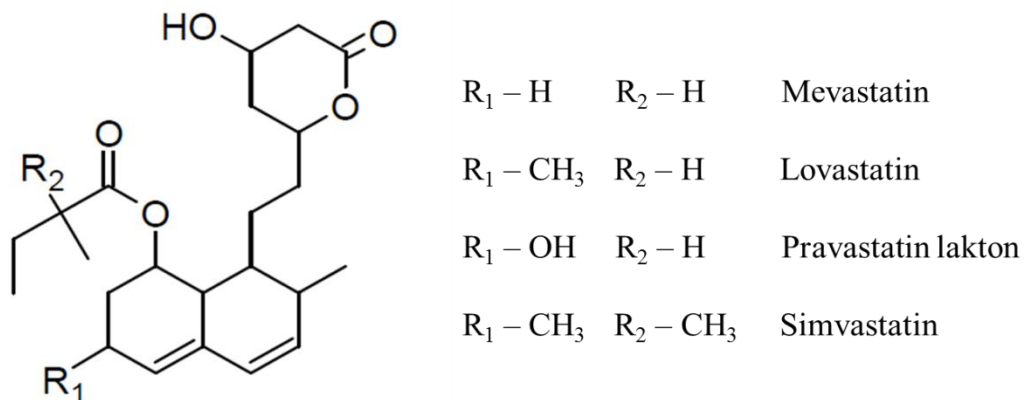
Obr. 1: Mevastatin ve formě kyseliny (upraveno podle [1])

Obr. 2: HMG-CoA (upraveno podle [1])

Mevastatin podstoupil klinické testování a z důvodu toxicity nebyl nikdy použit v praxi. Posloužil pouze jako prekurzorová molekula pro syntézu dalších derivátů. Prvním statinem uvedeným na trh byl lovastatin lišící se od mevastatinu pouze jednou methylovou skupinou nacházející se na hexahydronaftalenovém skeletu (Obr. 3). Tato sloučenina také patří mezi produkty hub, přesněji *Aspergillus terreus* – kropidlák zemní, jenž se řadí do stejného rodu a stejné čeledi jako štětičkovec citronový. Lovastatin byl schválen americkým Úřadem pro potraviny a léčiva (FDA) v roce 1987. Pocházel z laboratoří firmy Merck a je také znám pod obchodním názvem originálního léčiva Mevacor® [1][2][3][5].

Každý statin se vyznačuje výskytem substituentu 3,5-dihydroxyvalerové kyseliny, která také může vytvářet laktonový kruh. Tato skupina je navázána na hexahydronaftalenové jádro u mevastatinu, lovastatinu, pravastatinu a simvastatinu.

V molekule atorvastatinu je 3,5-dihydroxyvalerová kyselina připojena na jádro tvořené pyrrolem. V případě fluvastatinu se jedná o indol a u rosuvastatinu tvoří jádro pyrimidin. Pitavastatin obsahuje charakteristickou skupinu navázanou na chinolinu [3].

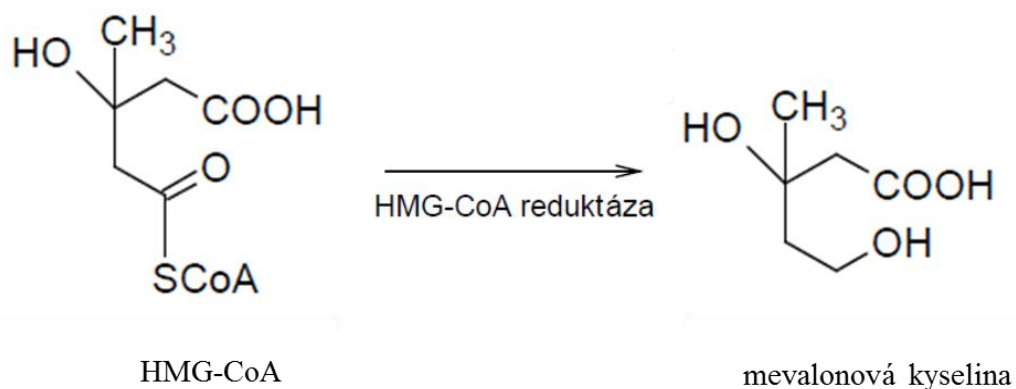


Obr. 3 : Srovnání struktury přírodních statinů a jejich syntetických analogů (upraveno podle [3])

Mezi statiny odvozené od přírodních struktur se řadí pravastatin a simvastatin. Pravastatin se liší od lovastatinu pouze záměnou methylové skupiny hexahydronaftalenového jádra za skupinu hydroxylovou (Obr. 3). Tato struktura také vzniká při metabolizaci mevastatinu. Simvastatin, na rozdíl od lovastatinu, obsahuje navíc methylovou skupinu na esterovém řetězci (Obr. 3). Další statiny atorvastatin, fluvastatin, pitavastatin a rosuvastatin mají až na 3,5-dihydroxyvalerovou skupinu strukturu prakticky zcela obměněnou [1][2][3].

3.1.2 Farmakodynamika statinů

Mechanismus účinku statinů spočívá v inhibici enzymu zodpovědného za syntézu cholesterolu. Enzym HMG-CoA reductáza přeměňuje 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A na mevalonovou kyselinu. Tato přeměna představuje hlavní kontrolní místo syntézy cholesterolu (Obr. 4). Z obrázku 1 a 2 lze vypožorovat strukturní podobnost mezi substrátem a inhibitorem daného enzymu. Při nedostatku cholesterolu začnou po něm lačnicí buňky syntetizovat větší množství receptorů, které vycytávají z krve lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL). LDL mají za úkol dodávat cholesterol periferním tkáním. Výsledkem působení statinů je tedy pokles koncentrace LDL v plazmě a tím pádem i cholesterolu. Mezi další lipidové účinky statinů patří pokles plazmatické koncentrace triacylglyceridů a zvýšení plazmatické koncentrace antiaterogenních lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL) [6][7][8].



Obr. 4: Kontrolní místo syntézy cholesterolu (upraveno podle [7])

Statiny mají i účinky nelipidové, mezi které se řadí např. ovlivnění proliferace buněk hladké svaloviny ve stěně tepen, stimulace tvorby NO-syntetázy, antiagregační a protizánětlivý účinek. Jak lipidové, tak i nelipidové účinky snižují kardiovaskulární mortalitu. Statiny mají vliv také na kostní formaci. V experimentech *in vitro* dosahují stejného účinku jako antiresorpčně působící bisfosfonáty. Oproti bisfosfonátům ale statinům chybí struktura, která by umožňovala jejich pevnou vazbu na mineralizovaný povrch kostní tkáně. Možný je také účinek některých statinů na novotvorbu kostní hmoty [6][8][9].

Mezi nejčastější nežádoucí účinky statinů patří obtíže gastrointestinálního traktu a bolesti hlavy. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem této skupiny léčiv je postižení kosterního svalstva projevující se myopatií nebo až rhabdomyolýzou. K postižení kosterního svalstva docházelo nejčastěji u pacientů léčených cerivastatinem, kde byla pravděpodobnost výskytu nejméně desetinásobně vyšší. Tento fakt tedy dokumentuje, že klinicky užívané statiny nejsou zaměnitelné z hlediska nežádoucích účinků. Zaměnitelnost neplatí ani z hlediska účinnosti, což znázorňuje tabulka 1, která popisuje dávky statinů vedoucí ke srovnatelnému snížení plazmatické hladiny lipoproteinů o nízké hustotě typu C (LDL-C). Klinicky nejúčinnějším a v České republice dostupným inhibitorem HMG-CoA reductázy je rosuvastatin, naopak nejméně účinným je fluvastatin [8][10][11][12][13].

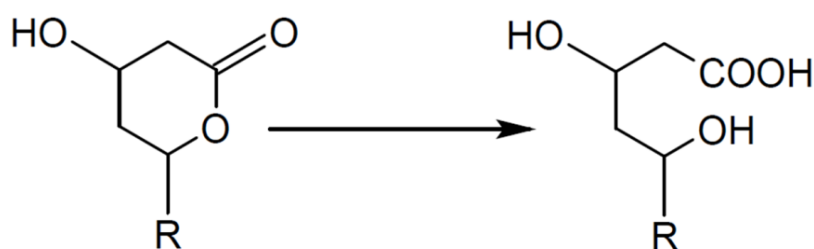
Simvastatin	Atorvastatin	Rosuvastatin	Fluvastatin	Lovastatin	Pravastatin
10 mg	-	-	40 mg	20 mg	20 mg
20 mg	10 mg	-	80 mg	40 – 80 mg	40 mg
40 mg	20 mg	5 – 10 mg	-	80 mg	80 mg
80 mg	40 mg	-	-	-	-
-	80 mg	20 mg	-	-	-
-	-	40 mg	-	-	-

Tab. 1: Ekvipotentní denní dávky statinů (podle [13])

Rhabdomyolýza, která byla zapříčiněná cerivastatinem a vedla k selhání ledvin, měla za následek 52 úmrtí celosvětově. Navíc ve Spojených státech amerických bylo u přibližného počtu 700 000 pacientů užívajících cerivastatin zaznamenáno 385 případů rhabdomyolýzy, které fatální následky neměly. Z těchto důvodů bylo toto léčivo v roce 2001 staženo z trhu [12].

3.1.3 Farmakokinetika statinů

Vstřebávání statinů není po perorálním podání kompletní, ale probíhá v dostatečné míře. Až na pravastatin se klinicky užívané statiny vážou na bílkoviny krevní plazmy z více než 90 %. Některé statiny se vyskytují ve formě proléčiv a aktivní látky se z nich stávají až po metabolizaci. Při aktivaci proléčiv (simvastatin, lovastatin) dochází k otevření laktonového kruhu (Obr. 5) [8][10].



Obr. 5 : Aktivace proléčiv

Metabolizace probíhá za účasti některých isoform cytochromu P450 (CYP). Atorvastatin, lovastatin a simvastatin jsou metabolizovány převážně isoformou 3A4 a fluvastatin převážně isoformou 2C9. U pravastatinu a rosuvastatinu hrají isoformy CYP méně významnou roli. Systém enzymů cytochromu P450 s sebou přináší velké množství lékových interakcí v případě polyfarmakoterapie [8][10].

Hladinu statinů v séru a tím pádem i množství nežádoucích účinků zvyšují inhibitory CYP. Hlavní představitelé inhibitorů cytochromu P450 isoformem 2C9 a 3A4 jsou uvedeni v tabulkách 2 a 3 [8][14].

Induktory cytochromu P450 zabraňují dosažení předpokládaného terapeutického účinku statinů. Důvodem je snížení plazmatické koncentrace tohoto léčiva. Hlavní představitelé induktorů CYP 2C9 a CYP 3A4 se nachází v tabulkách 2 a 3 [8][14].

Inhibitory CYP 2C9	Induktory CYP 2C9
azolová antimykotika, amiodaron	fenytoin, fenobarbital
cimetidin, fluvoxamin, omeprazol	karbamazepin
ritonavir, tolbutamid, zafirlukast	rifampicin

Tab. 2: Vybrané inhibitory a induktory cytochromu P450 isoformy 2C9 (upraveno podle [14])

Inhibitory CYP 3A4	Induktory CYP 3A4
flukonazol, itraconazol, ketokonazol	fenytoin, karbamazepin
erytromycin, klaritromycin, midazolam	barbituráty, primidon
tricyklická antidepresiva, nefazodon	rifampicin, rifabutin
fluoxetin, fluvoxamin, sertralin, venlafaxin	griseofulvin
cyklosporin, omeprazol, lansoprazol	cyklofosfamid
verapamil, diltiazem, grapefruitová šťáva	dexamethazon
kortikosteroidy, tamoxifen, ritonavir	troglitazon

Tab. 3: Vybrané inhibitory a induktory cytochromu P450 isoformy 3A4 (upraveno podle [14])

Biologický poločas lovastatinu, fluvastatinu, pravastatinu a simvastatinu není delší než 3 hodiny, proto je nutné podávat tyto statiny večer nebo na noc, kdy je aktivita HMG-CoA reductázy největší. Biologický poločas atorvastatinu je zhruba 14 hodin a rosuvastatin dosahuje poločasu přibližně 19 hodin. Oba tyto statiny mohou být podávány, z důvodu dlouhého poločasu, i během dne. Vybrané farmakokinetické parametry jednotlivých statinů popisuje tabulka 4. Statiny se vylučují převážně žlučí, k exkreci ledvinami dochází v nejvyšší míře u pravastatinu [6][8][10].

Název	Biologická dostupnost	Vazba na bílkoviny krevní plazmy	Biotransformace Cytochromem P450	Biologický poločas
Atorvastatin	12 %	98 %	CYP 3A4	14 hod
Lovastatin	5 %	> 95 %	CYP 3A4	3 hod
Fluvastatin	24 %	> 98 %	CYP 2C9	1,2 hod
Pravastatin	18 %	~ 50 %	malý význam	1,8 hod
Rosuvastatin	20 %	90 %	malý význam	19 hod
Simvastatin	5 %	95 – 98 %	CYP 3A4	2 hod

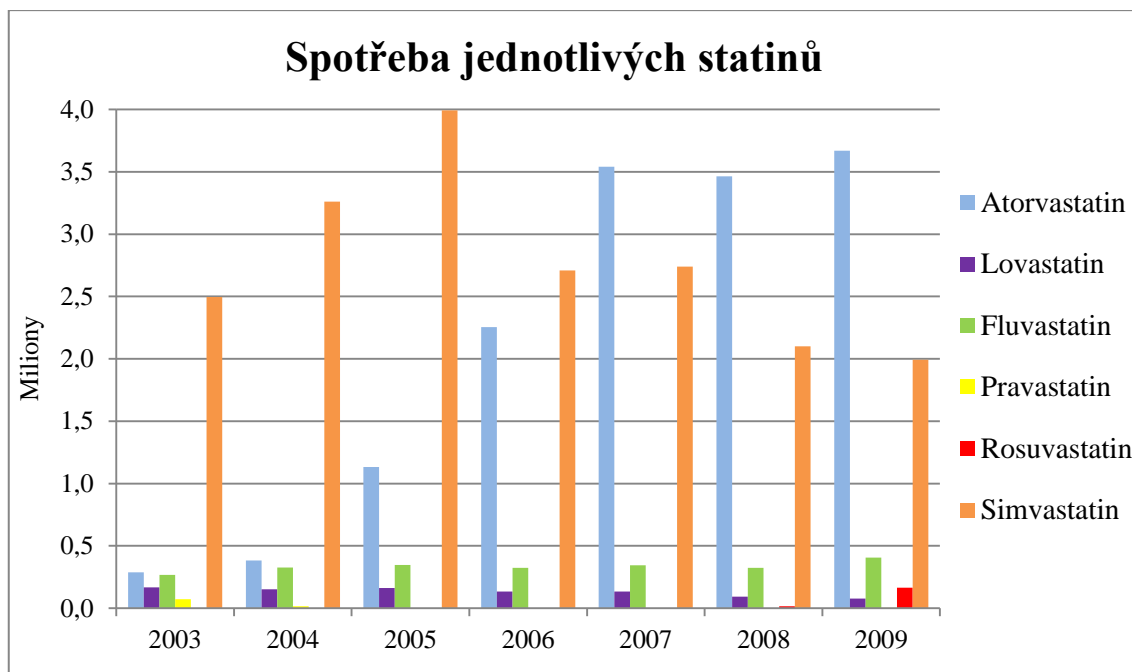
Tab. 4: Údaje popisující farmakokinetiku statinů (upraveno podle [10])

3.1.4 Indikace statinů

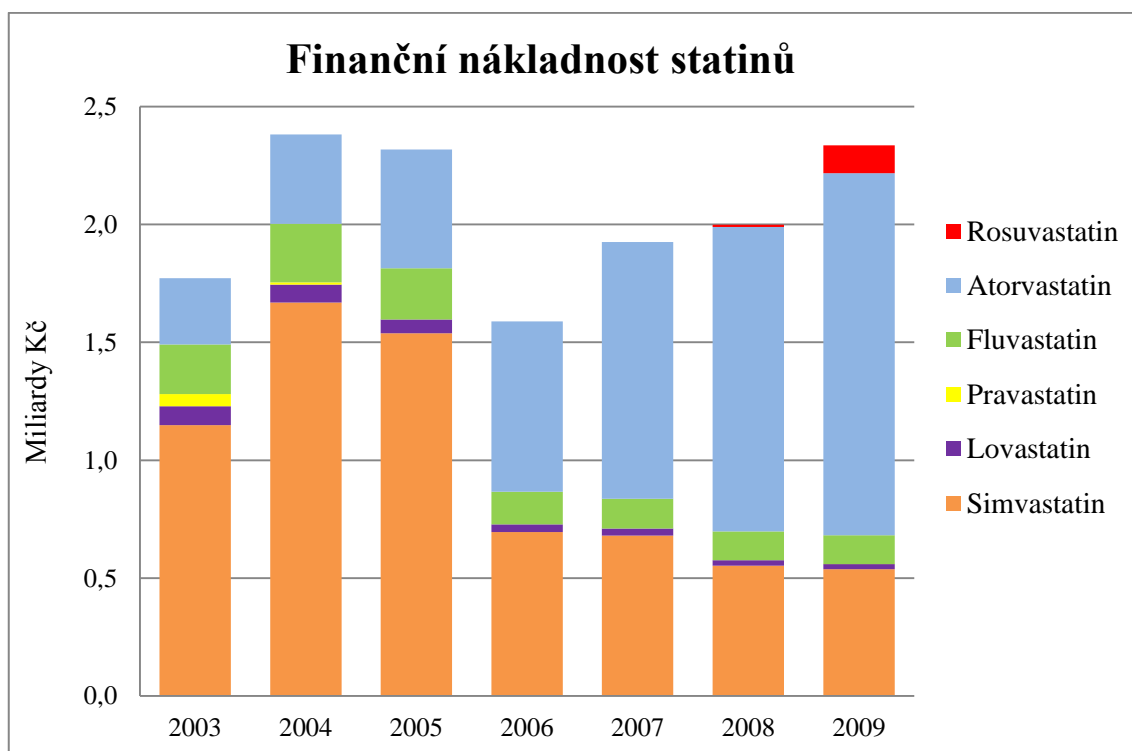
Pro předepsání statinů se lékař rozhodne z důvodu izolované hypercholesterolemie, smíšené dyslipidémie a nebo z důvodu kardiovaskulární prevence. Statiny se nevyskytují pouze ve formě jednosložkových léčivých přípravků, ale také ve formě fixních kombinací dvou léčivých látek. V České republice jsou dostupné fixní kombinace atorvastatinu s antihypertenzivně působícím blokátorem vápníkového kanálu (amlodipin) a simvastatinu s látkou selektivně inhibující absorpci cholesterolu (ezetimib) [8][13][15].

3.1.5 Spotřeba statinů

Spotřeba statinů v posledních letech stoupá, což je zapříčiněno zvyšující se průměrnou délkou života a životním stylem. Jeden z prvních statinů, simvastatin, je postupně nahrazován účinnějším a novějším atorvastatinem. Postupně se také zvyšuje spotřeba neúčinnějšího z klinicky užívaných a v České republice dostupných statinů – rosuvastatinu, který je již dostupný i jako generikum. Obrázky 6 a 7 znázorňují spotřebu a náklady na léčbu statiny v letech 2003 až 2009 [16-28].

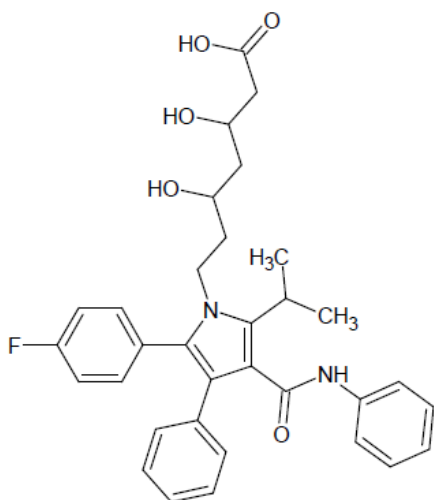


Obr. 6: Spotřeba jednotlivých statinů v závislosti počtu balení na kalendářním roce (podle [16-28])

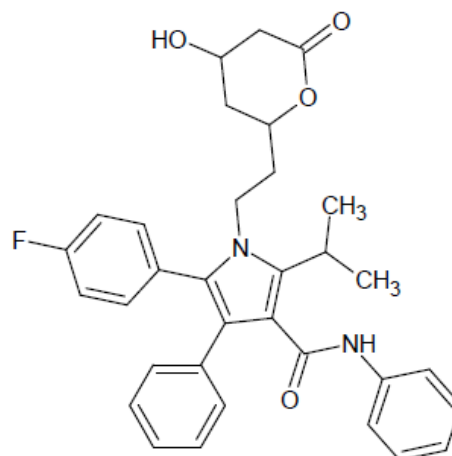


Obr. 7: Finanční nákladnost jednotlivých statinů v období 2003 – 2009 (podle [16-28])

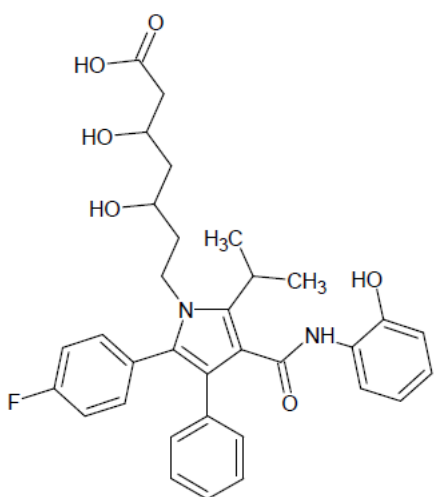
3.1.6 Struktura a vlastnosti stanovovaných statinů a jejich metabolitů



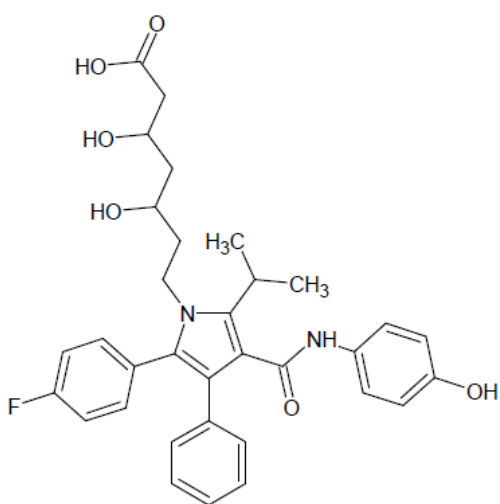
Obr. 8: Atorvastatin [29]



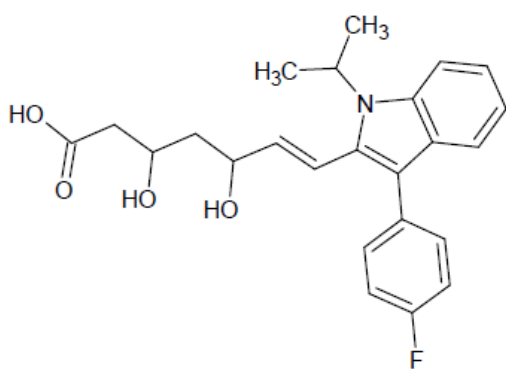
Obr. 9 : Atorvastatin lakton [29]



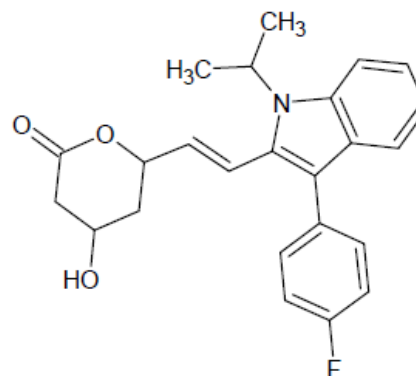
Obr. 10 : *o*-Hydroxyatorvastatin [29]



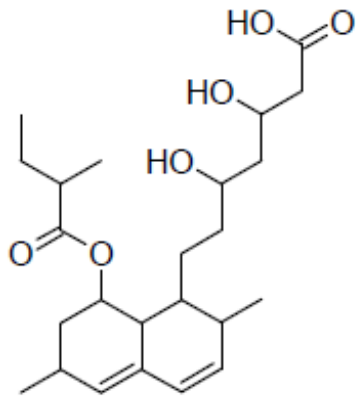
Obr. 11 : *p*-Hydroxyatorvastatin [29]



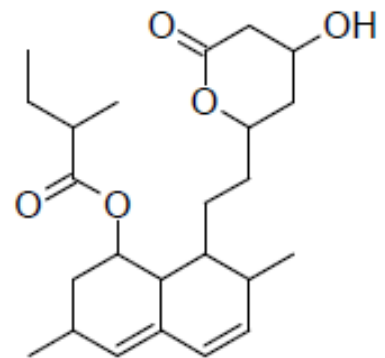
Obr. 12: Fluvastatin [29]



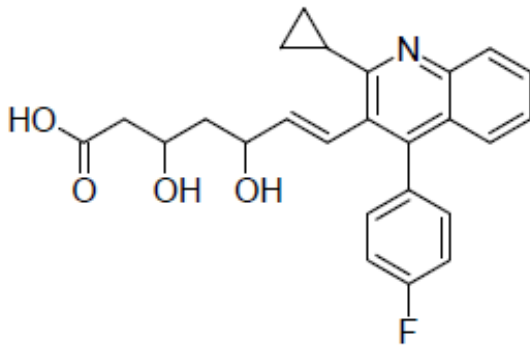
Obr. 13: Fluvastatin lakton [29]



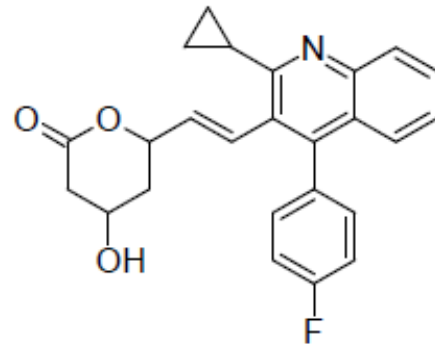
Obr. 14: Lovastatin kyselina [29]



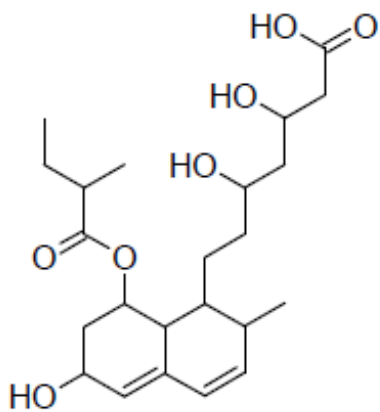
Obr. 15: Lovastatin [29]



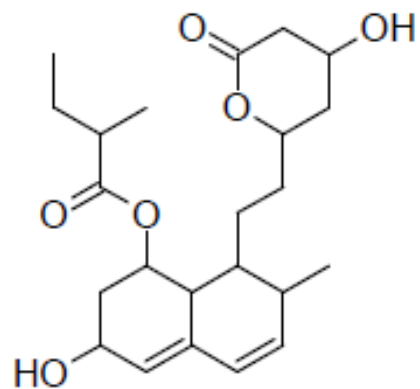
Obr. 16: Pitavastatin [29]



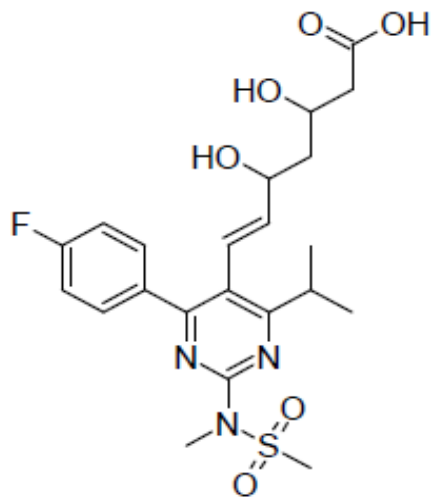
Obr. 17: Pitavastatin lakton [29]



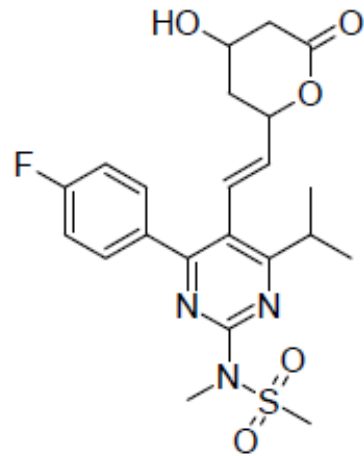
Obr. 18: Pravastatin [29]



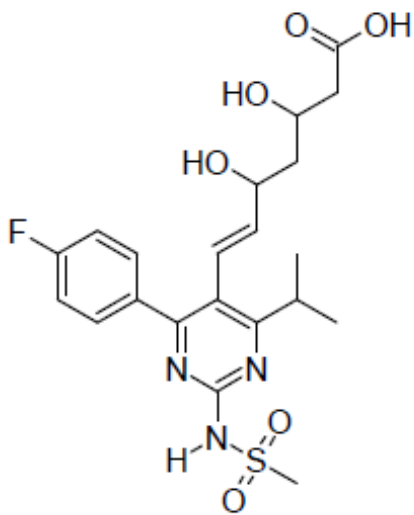
Obr. 19: Pravastatin lakton [29]



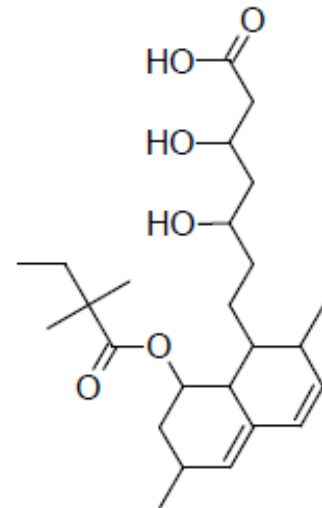
Obr. 20: Rosuvastatin [29]



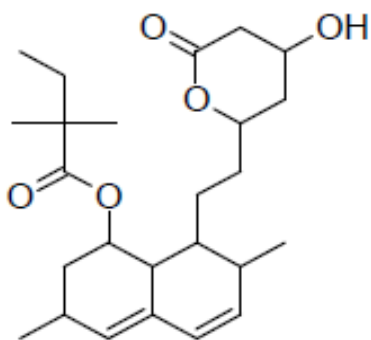
Obr. 21: Rosuvastatin lakton [29]



Obr. 22: N-Desmethylrosuvastatin [29]



Obr. 23: Simvastatin kyselina [29]



Obr. 24: Simvastatin [29]

Název	Sumární vzorec	Průměrná molekulová hmotnost	pKa	log P
Atorvastatin	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅	558,64	4,29 ± 0,10	3,85 ± 0,73
Atorvastatin lakton	C ₃₃ H ₃₃ FN ₂ O ₄	540,62	13,39 ± 0,40	3,90 ± 0,72
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₆	574,64	4,29 ± 0,10	4,10 ± 0,75
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₆	574,64	4,29 ± 0,10	3,21 ± 1,05
Fluvastatin	C ₂₄ H ₂₆ FNO ₄	411,47	4,27 ± 0,10	4,57 ± 0,70
Fluvastatin lakton	C ₂₄ H ₂₄ FNO ₃	393,45	13,32 ± 0,40	4,85 ± 0,66
Lovastatin kyselina	C ₂₄ H ₃₈ O ₆	422,55	4,31 ± 0,10	4,12 ± 0,53
Lovastatin	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	404,54	13,49 ± 0,40	4,31 ± 0,48
Pitavastatin	C ₂₅ H ₂₄ FNO ₄	421,46	4,24 ± 0,10	1,92 ± 0,76
Pitavastatin lakton	C ₂₅ H ₂₂ FNO ₃	403,45	13,25 ± 0,40	2,23 ± 0,71
Pravastatin	C ₂₃ H ₃₆ O ₇	424,53	4,31 ± 0,10	2,21 ± 0,53
Pravastatin lakton	C ₂₃ H ₃₄ O ₆	406,51	13,49 ± 0,40	2,40 ± 0,49
Rosuvastatin	C ₂₂ H ₂₈ FN ₃ O ₆ S	481,54	4,25 ± 0,10	0,89 ± 0,67
Rosuvastatin lakton	C ₂₂ H ₂₆ FN ₃ O ₅ S	463,52	13,22 ± 0,40	1,20 ± 0,65
N-Desmethylrosuvastatin	C ₂₁ H ₂₆ FN ₃ O ₆ S	467,51	4,25 ± 0,10	0,74 ± 0,67
Simvastatin kyselina	C ₂₅ H ₄₀ O ₆	436,58	4,31 ± 0,10	4,54 ± 0,53
Simvastatin	C ₂₅ H ₃₈ O ₅	418,57	13,49 ± 0,40	4,72 ± 0,49

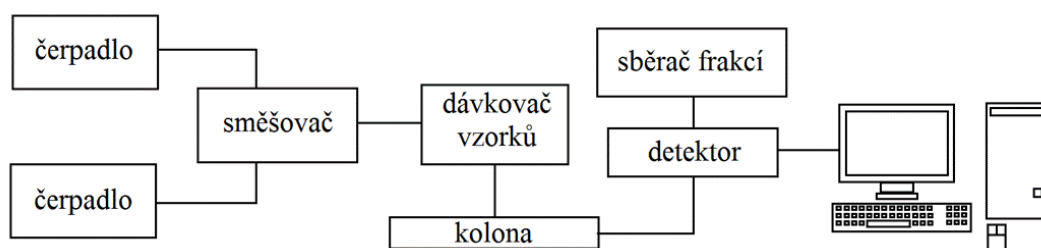
Tab. 5: Přehled a srovnání vlastností statinů (podle [29])

Průměrná molekulová hmotnost všech analytů (Obr. 8 – Obr. 24) se nachází v rozmezí 390 až 580 (Tab. 5). Hodnota pKa statinů či jejich metabolitů ve formě kyseliny se pohybuje v rozmezí 4,0 až 4,5. Jedná se tedy o slabé kyseliny. Analyty ve formě laktonu postrádají kyselý vodík karboxylové skupiny, jejich acidita je tedy výrazně nižší a pKa se nachází přibližně mezi hodnotami 13 a 14. Analyty ve formě laktonu i ve formě kyseliny byly vybrány pro vývoj metody z důvodu vzájemné interkonverze, ke které dochází jak *in vitro*, tak *in vivo*. Interkonverze je ovlivněna hodnotou pH. Prostředí o pH > 6 usnadňuje přeměnu laktonové formy na formu ionizované kyseliny. Naopak nižší pH ulehčuje nejen přeměnu statinu ve formě kyseliny na statin v laktonové formě, ale i přeměnu laktonu na neionizovanou kyselinu. Nejméně lipofilní z analyzovaných statinů je rosuvastatin a jeho metabolit N-desmethylrosuvastatin. Více než polovina analyzovaných molekul se blíží či přesahuje hodnotu log P 4, což vypovídá o tom, že jde o lipofilní látky [29][30].

3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC se řadí mezi fyzikálně-chemické separační techniky sloužící ke kvantitativnímu i kvalitativnímu hodnocení látek. Separace látek probíhá na základě mnohonásobně se opakujícího ustalování rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází [31].

Mezi nedílné součásti tohoto zařízení patří čerpadla, která čerpají roztoky mobilní fáze ze zásobníku přes filtry do směšovače. Další důležitou částí je dávkovač vzorků, který přivádí zkoumané látky do smísením vzniklé mobilní fáze. Takto vytvořená směs směřuje na kolonu, kde dochází k vlastní separaci analytů. Jednotlivé složky směsi analytů dále postupují do detektoru. Získaná data jsou nakonec interpretována pomocí připojeného počítače (Obr. 25) [31].



Obr. 25: Schéma HPLC (upraveno podle [31])

3.2.1 Kolony pro HPLC

Hnací silou vlastní separace při analýze HPLC je interakce mezi molekulami analytu a náplní kolony, tedy stacionární fází. Kolona je také označována jako srdce vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jedná se o trubici o délce 10 – 250 mm a průměru 1,0 – 4,6 mm naplněnou sorbentem s velikostí náplně 1 – 10 μm . Materiál použitý k výrobě obalu kolon musí být chemicky i mechanicky odolný. Používá se ocel, sklo a plast [31][32].

Nejpoužívanějším typem sorbentu je silikagel, který lze uplatnit v chromatografii na normálních i reverzních fázích. Mezi nevýhodné vlastnosti tohoto materiálu patří mechanická odolnost do 35 – 40 MPa, stabilita v rozmezí pH 2 až 7, a to při teplotě do 60 $^{\circ}\text{C}$. Při využití chromatografie na normálních fázích je mobilní fáze nepolární a stacionární fáze polární. Zlepšení vlastností sorbentu lze dosáhnout navázáním různých skupin, které přesto zachovají polaritu sorbentu. Jde např.

o aminopropylovou, kyanopropylovou, hydroxylovou nebo glycerylovou skupinu. Chromatografie na reverzních fázích je charakterizována polární mobilní fází a nepolární fází stacionární. Mezi skupiny, které obrací polaritu silikagelu, patří např. oktadecylsilyl (C18), oktylsilyl (C8), fenyl nebo arylfluorované a alkylfluorované řetězce [31][32].

Výhodnějších vlastností chromatografického sorbentu bylo dosaženo vytvořením hybridních stacionárních fází, které kombinují vlastnosti silikagelu a polymerní látky. Takto vytvořené sorbenty získaly větší mechanickou i tepelnou odolnost a také možnost použití v širším rozmezí pH, a to 1 – 12 [31][32].

3.2.2 Detektory pro HPLC

3.2.2.1 UV-VIS Spektrofotometrický detektor

Spektrofotometrické detektory patří mezi nejpoužívanější detektory pro HPLC analýzu léčiv. Analyzovaná látka musí obsahovat funkční skupinu absorbující elektromagnetické záření, a to v rozmezí 190 – 400 nm pro ultrafialovou oblast spektra nebo v rozmezí 400 – 800 nm pro viditelnou oblast spektra. Měření je založeno na interakci mezi látkou a procházejícím elektromagnetickým zářením, což má za následek změnu intenzity záření. Pomocí Lambert-Beerova zákona lze touto změnou vyjádřit koncentraci zkoumané látky. UV-VIS detektor má široké použití, značnou citlivost: 10^{-9} – 10^{-10} g/ml a lze ho použít při gradientové eluci [31][33].

3.2.2.2 Fluorescenční detektor

Tento typ detektoru lze použít u látek vykazujících fluorescenci nebo u látek, které fluoreskují až po derivatizaci vhodnými činidly. Molekula analytu je excitována elektromagnetickým zářením a dostane se do nestabilního stavu, ve kterém vydrží pouze několik nanosekund. Do stabilního stavu se molekula dostane vyzářením přebytečné energie, a to ve formě emisního záření. Detekce je umožněna změřením intenzity emisního záření, která je přímo úměrná koncentraci zkoumané látky. Fluorescenční detektor nepatří mezi detektory univerzální, ale vyznačuje se vysokou citlivostí: 10^{-9} – 10^{-12} g/ml a může být využit pro gradientovou eluci [31][33].

3.2.2.3 Elektrochemické detektory

Tato skupina detektorů je také velmi citlivá: $10^{-9} - 10^{-12}$ g/ml, ale každý elektrochemický detektor nemůže být využit pro gradientovou eluci. Nejběžnějším druhem elektrochemických detektorů je ampérometrický detektor, jehož mechanismus detekce je založen na schopnosti analytu zvyšovat či snižovat své oxidační číslo [31][33].

3.2.2.4 Refraktometrický detektor

Výhodou tohoto detektoru je univerzální použití. Detekce spočívá v měření indexu lomu čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Pro stanovování léčiv se ale často nevyužívá, a to především kvůli řadě nevýhod, mezi které patří nízká citlivost: 10^{-6} g/ml, nutnost termostatování z důvodu závislosti indexu lomu na teplotě a také nemožnost využití gradientové eluce [31][33].

3.2.2.5 Univerzální detektory na bázi aerosolu

Do této skupiny patří detektor založený na rozptylu světla (ELSD – evaporative light scattering detector), detektor nabitého aerosolu (CAD – charged aerosol detector) a detektor využívající nukleační technologii (NQAD – nano quantity analyte detector, nazývaný též CNLSD – condensation nucleation light scattering detector). Výše zmíněné detektory umožňují analyzovat jakoukoliv látku bez ohledu na její fyzikálně-chemické vlastnosti. Při analýze nejprve dochází ke zmlžení mobilní fáze, a to pomocí proudu dusíku. Následně vzniklý aerosol putuje do vyhřívané části, kde dochází k úplnému odpaření rozpouštědel. Nakonec se analyt podrobí vlastní detekci [31].

3.2.2.6 Hmotnostní spektrometr

Zájem o spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS) byl vyvolán velkým úspěchem spojení plynové chromatografie právě s tímto detektorem. LC-MS přináší vysokou citlivost a také možnost identifikovat neznámý analyt. Hmotnostní spektrometrii podrobněji popisuje kapitola 3.4 [31][33][34].

3.3 Ultra – vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Ve srovnání s technikou HPLC přináší UHPLC několik výhod. Tou nejdůležitější je zvýšení separační účinnosti. Mezi další výhody patří například zvýšení citlivosti, zlepšení rozlišení, zkrácení doby analýzy, snížení matricových efektů nebo snížení spotřeby rozpouštědel. Výše zmíněné přednosti techniky UHPLC umožňují její uplatnění například ve farmaceutickém výzkumu a vývoji, při monitorování lékových hladin, v proteomice, v chemii životního prostředí nebo v chemii potravin [35][36].

3.3.1 Kolony pro UHPLC

Velikost částic stacionární fáze představuje jeden z nejvýznamnějších rozdílů mezi kolonami UHPLC a HPLC. Stacionární fáze pro UHPLC využívají částice $< 2 \mu\text{m}$. Od 50. let 20. století se velikost částic zmenšila více než 20krát. Zmenšení velikosti částic představuje nejjednodušší způsob, kterým lze zkrátit dobu analýzy bez ztráty účinnosti a rozlišení. Stacionární fáze používané pro UHPLC separaci lze rozdělit na 2 základní typy, a to na hybridní a silikagelové. Příkladem hybridních stacionárních fází jsou sorbenty tvořené silikagelem, který je zesíťován pomocí ethylenových můstků. Takto vytvořená struktura vykazuje vyšší mechanickou i chemickou odolnost. Jde o tzv. BEH technologii (bridged ethyl hybrid). Tento typ sorbentu byl využit v prvním komerčně představeném systému UHPLC. Druhým typem jsou silikagelové sorbenty s velmi pevnými vazbami schopnými vydržet vysoký tlak UHPLC systému [37][38][39].

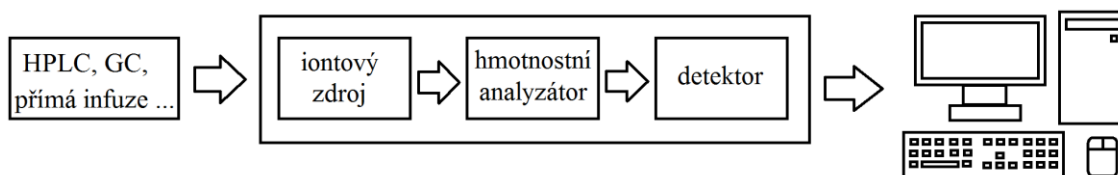
3.3.2 Detektory pro UHPLC

Pro techniku UHPLC lze použít detektory, které jsou principiálně shodné s běžně používanými HPLC detektory. Jedná se tedy o UV-VIS spektrofotometrický detektor, fluorescenční detektor, refraktometrický detektor, detektory na bázi aerosolu a také hmotnostní spektrometr [38].

3.4 Hmotnostní spektrometrie

Tato fyzikálně-chemická analytická metoda slouží k určení atomové nebo molekulové hmotnosti látek. Stanovovaná látka je nejprve převedena na ionty, vzniklé ionty jsou poté rozděleny v analyzátoru na základě poměru mezi hmotností a nábojem (m/z) a takto rozdělené ionty jsou nakonec zaznamenány pomocí detektoru [40][41].

Jednoduše lze tedy hmotnostní spektrometr popsat jako zařízení skládající se ze tří částí. Jedná se o iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (Obr. 26) [41].



Obr. 26: Schéma hmotnostního spektrometru (upraveno podle [41])

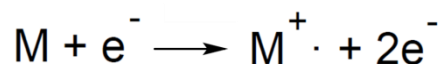
3.4.1 Iontový zdroj

Iontový zdroj vytváří nabitě částice, u kterých je možno měnit směr a rychlost pohybu. Těchto změn lze docílit působením elektrického nebo magnetického pole. Ionizační techniky je možné rozdělit na tvrdé a měkké. Tvrdé ionizační techniky mohou způsobit rozsáhlou fragmentaci látek. Měkké ionizační techniky jsou k látkám mírnější a tak rozsáhlou fragmentaci jako tvrdé ionizační techniky nezpůsobují. Možností, které převádí neutrální částice na částice nabitě, je několik, ale žádná z nich nemá univerzální použití [42][43].

3.4.1.1 Tvrdé ionizační techniky

- Elektronová ionizace (EI)

Elektronová ionizace patří mezi jeden z nejstarších způsobů, jak v hmotnostní spektrometrii převést nenabitě částice na částice nabitě. Principem elektronové ionizace je bombardování stanovované látky paprskem elektronů, a to za nízkého tlaku. Při tomto procesu je elektron ze stanovované látky vyražen a dochází ke vzniku kladně nabitě částice, která postrádá jeden elektron. Takto vzniklá částice se nazývá kation-radikál. Rovnici znázorňuje obrázek 27 [42][43][44].



Obr. 27 : Elektronová ionizace – rovnice vzniku kation-radikálu (upraveno podle [43])

Při EI dochází u analyzované molekuly k růstu vnitřní energie, což může způsobit její fragmentaci při příliš velkém nárůstu. Spektrum získané EI při standardních podmínkách je pro danou látku charakteristické. Je také označováno jako otisk prstu a lze ho nalézt ve většině případů v rozsáhlých knihovnách spekter [42][43][44].

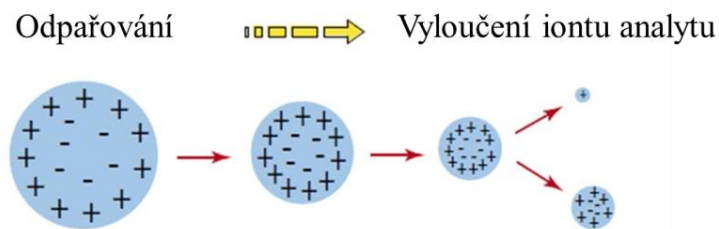
3.4.1.2 Měkké ionizační techniky

- ionizace elektrosprejem (ESI)
- chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
- fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

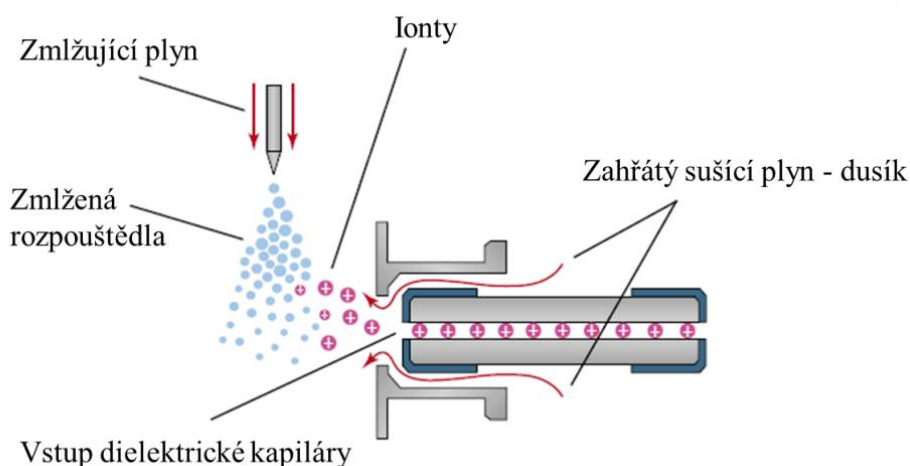
Výše zmíněné ionizační techniky nepředstavují všechny měkké ionizační techniky využitelné v praxi, jedná se o techniky běžně používané ve spojení LC-MS [45].

Ionizace elektrosprejem (ESI)

ESI slouží k analýze polárních látek o molekulové hmotnosti až do 100 kDa. Mimo LC-MS nachází tento způsob ionizace uplatnění také ve spojení MS s kapilární elektroforézou. Mechanismus ESI lze ve zkratce popsat třemi důležitými body. Jedná se o tvorbu nabitých kapiček, uvolnění iontů ze vzniklých nabitých kapiček a přesun iontů z iontového zdroje s atmosférickým tlakem do hmotnostního analyzátoru, kde je přítomno vakuum. Tvorba nabitých kapiček je umožněna vysokým napětím (3 – 5 kV), které je vloženo na kovovou kapiláru přivádějící analyt do zdroje a zmlžujícím plynem. Následně dochází k odpařování rozpouštědla ze vzniklých kapiček, a to pomocí sušícího plynu, a ke zvyšování povrchového náboje. Po dosažení kritické hodnoty hustoty povrchového náboje dojde k tzv. Coulombické explozi. Při tomto jevu dojde k uvolnění samostatných iontů, které nakonec putují do analyzátoru (Obr. 28, 29) [42][45].



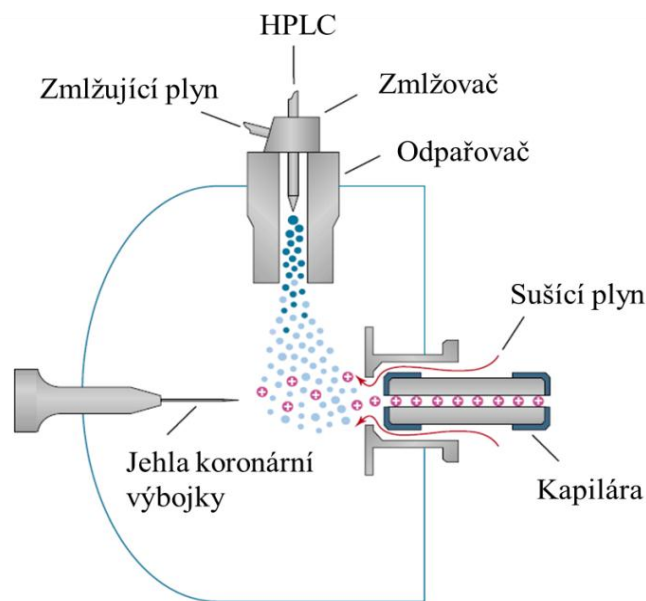
Obr. 28: Coulombická exploze (upraveno podle [45])



Obr. 29: Ionizace elektrosprejem (ESI) (upraveno podle [45])

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

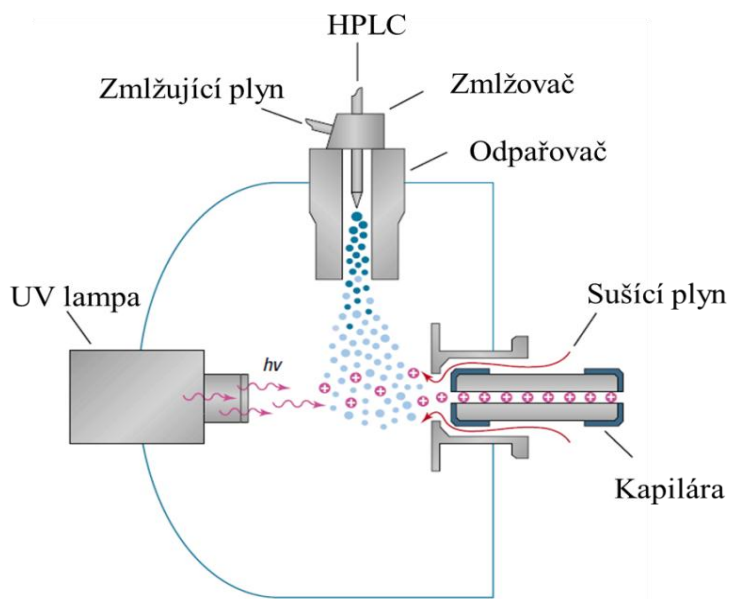
V porovnání s ionizační technikou ESI umožňuje APCI analyzovat látky méně polární s molekulovou hmotností nižší (1500 Da). Uspořádání iontového zdroje se podobá uspořádání ESI, je zde rozdíl v místě vložení napětí. Vysoké napětí (3 – 4 kV) je vloženo na výbojovou elektrodu nacházející se u vstupu analytu do zdroje (Obr. 30). Tato elektroda vyvolá koronární výboj, který nejprve způsobí ionizaci molekul mobilní fáze, a to z důvodu jejich nadbytku. Výbojem vzniklé ionty mobilní fáze ionizují molekuly analytu, které dále putují po urychlení elektrodami do hmotnostního analyzátoru [42][43][45].



Obr. 30: Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) (upraveno podle [45])

Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

Tato ionizační technika je využívána pro stanovení látek méně polárních až nepolárních. Uspořádání iontového zdroje (Obr. 31) se výrazně neodlišuje od uspořádání APCI. Techniky se liší způsobem ionizace, kterou u APPI obstarává UV záření pocházející z kryptonové výbojky. Fotony dosahují energie 10 eV a 10,6 eV. Tato energie je dostatečná pro ionizaci stanovovaných nepolárních organických molekul a zároveň neumožní ionizaci látek obsažených v mobilní fázi. Výsledkem je tedy selektivní ionizace molekul analytu [42][43][45].



Obr. 31: Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) (upraveno podle [45])

3.4.2 Hmotnostní analyzátor

Tato část hmotnostního spektrometru bývá také označována jako jeho srdce. Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů vzniklých v iontových zdrojích. Ionty jsou rozděleny podle poměru m/z následujícími mechanismy:

- a) Rozdělení je způsobeno zakřivením dráhy letu iontů (magnetické analyzátor).
- b) Separace je zapříčiněna různou stabilitou iontů v kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (kvadrupóly a iontové pasti).
- c) K rozdělení iontů dochází na základě různé doby letu (analyzátor doby letu).
- d) Ionty se navzájem odlišují různou absorpcí energie při cykloidálním pohybu v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací).
- e) Rozdělení iontů umožňuje různá frekvence harmonických oscilací (Orbitrap) [43][47].

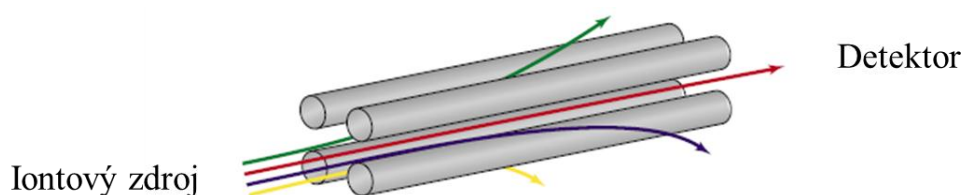
3.4.2.1 Magnetický analyzátor

Prvním komerčně dostupným hmotnostním analyzátozem byl magnetický analyzátor. Starší magnetické analyzátozy využívají k fokusaci iontů pouze magnetické pole. Novější analyzátozy se vyznačují systémem dvojí fokusace. K magnetickému poli bylo přidáno pole elektrické. Tato úprava výrazně zvyšuje rozlišovací schopnost magnetického analyzátozu. Při průchodu iontu magnetickým polem dochází k zakřivení jeho dráhy. Čím má částice větší hodnotu m/z , tím větší odstředivá síla na ni působí a tím nižší bude zakřivení dráhy. V elektrickém poli je zakřivení dráhy iontů závislé na jejich kinetické energii [43][44][46].

3.4.2.2 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupól je pravděpodobně nejpoužívanějším typem hmotnostního analyzátozu. Skládá se ze čtyř kovových tyčí, na které je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. Na dvě protilehlé tyče je navíc vloženo kladné stejnosměrné napětí a na dvě zbylé protilehlé tyče je vloženo záporné stejnosměrné napětí. Při analýze zkoumané látky jsou všechny vzniklé ionty přivedeny do středu analyzátozu. Tyto ionty oscilují. V jistém okamžiku při určitých hodnotách střídavého a stejnosměrného napětí jsou oscilace stabilní pouze pro jeden iont s určitým poměrem m/z (viz červená šipka na Obr. 32). Zbylé ionty jsou zadrženy na kovových tyčích. Nezadržený iont pokračuje do detektoru. Postupně jsou proměřeny různé hodnoty

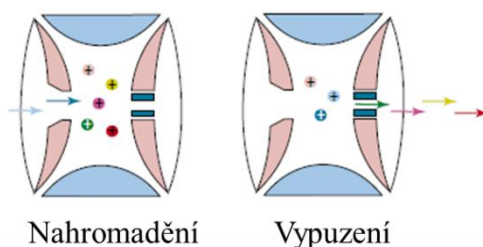
střídavého a stejnosměrného napětí a nakonec jsou všechny ionty propuštěny do detektoru [43][45][46].



Obr. 32 : Kvadrupól (upraveno podle [45])

3.4.2.3 Sférická iontová past

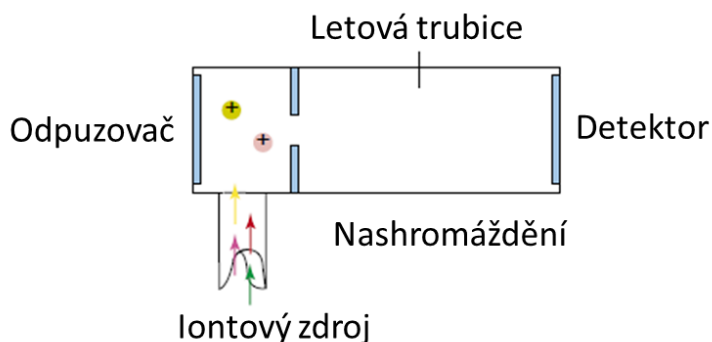
Sférická iontová past je složena z jedné kruhové a dvou koncových elektrod. Jedná se prakticky o trojrozměrný analog kvadrupólu. Za objev tohoto zařízení získal v roce 1989 Němec Wolfgang Paul Nobelovu cenu za fyziku. Rozlišení iontů podle m/z je umožněno změnami poměrů mezi stejnosměrným a střídavým napětím. Při stabilních oscilacích se ionty pohybují mezi elektrodami, při nestabilních oscilacích iont opouští iontovou past a postupuje k detektoru (Obr. 33) [43][45][46].



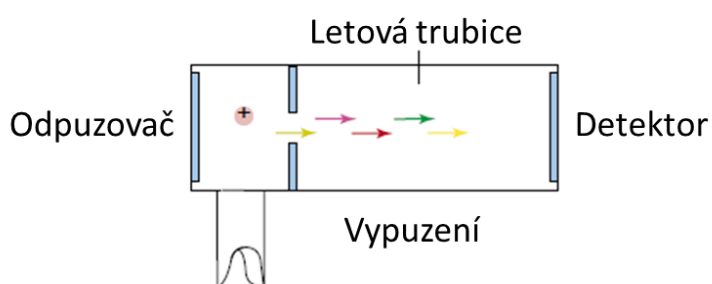
Obr. 33: Sférická iontová past (upraveno podle [45])

3.4.2.4 Analyzátor doby letu (TOF analyzátor)

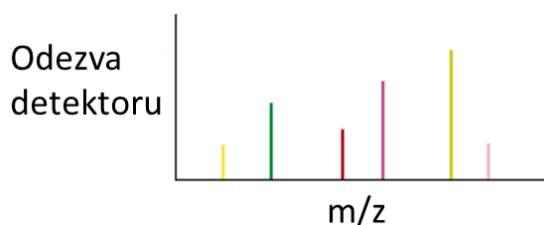
TOF zařízení analyzuje ionty na základě času, který je potřeba k překonání vzdálenosti mezi iontovým zdrojem a detektorem. Z iontového zdroje přicházejí nabitě částice, které jsou při vstupu do trubice TOF analyzátoru urychleny krátkým pulzem. Všem částicím je tedy přidělena stejná kinetická energie. Ionty s menší hodnotou poměru m/z dosáhnou detektoru dříve (Obr. 34, 35, 36) [45][46].



Obr. 34: TOF analyzátor – nashromáždění iontů (upraveno podle [45])



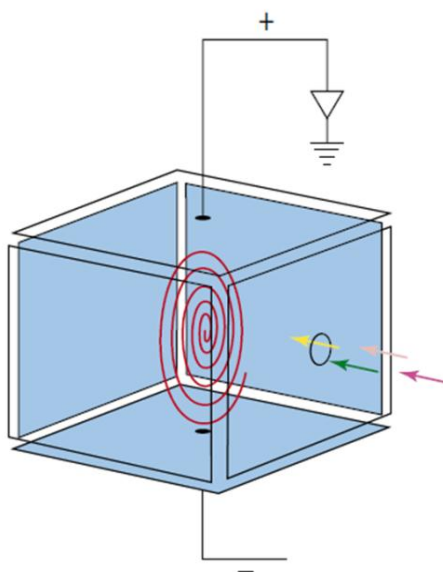
Obr. 35: TOF analyzátor – vypuzení iontů (upraveno podle [45])



Obr. 36: TOF analyzátor – výsledky (upraveno podle [45])

3.4.2.5 Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)

Srdcem tohoto zařízení je prostor, který je umístěn ve velmi silném magnetickém poli. Ionty jsou v tomto prostoru zachyceny působením magnetického a elektrického pole. Po excitaci radiofrekvenčním elektrickým polem se ionty začnou pohybovat po souvislé cykloidální trajektorii s cyklotronovou frekvencí (Obr. 37). Tyto frekvence se přepočtou Fourierovou transformací na hodnoty odpovídající poměru m/z [43][45][46].



Obr. 37: FT-ICR hmotnostní analyzátor (upraveno podle [45])

3.4.2.6 Orbitrap

Orbitrap je nejnovějším typem hmotnostního analyzátoru. Byl představen v roce 2005 a jeho objev je spojen se jménem ruského fyzika Alexandra Makarova. Tento hmotnostní analyzátor je složen ze dvou typů elektrod – vnější a středové. Z iontového zdroje přivedené nabitě částice vytváří svým pohybem v prostoru kolem středové elektrody rotující prstenec. Každý prstenec produkuje signál, který je zachycen vnějšími elektrodami. Získané signály jsou poté převedeny Fourierovou transformací na frekvence, které slouží k určení poměru m/z . Orbitrap se vyznačuje vysokou rozlišovací schopností. Z výše zmíněných hmotnostních analyzátorů ho předčí pouze FT-ICR [47][49][50][51].

3.4.3 Detektor hmotnostního spektrometru

Úkolem detektoru je převést paprsek iontů přivedený z hmotnostního analyzátoru na elektrický signál, který může být zesílen, uložen a zobrazen.

Detektory lze rozdělit do dvou skupin:

- a) Detektor pro přímé měření – přímo převádí přivedené ionty na elektrický signál.
- b) Detektor násobičový – před převedením na elektrický signál je paprsek iontů znásoben, příkladem je elektronový násobič. Dalším příkladem je fotonásobičový detektor, ve kterém je nejprve paprsek iontů přeměněn pomocí scintilačního materiálu na fotony, které jsou později znásobeny [43][48].

3.5 Přehled metod pro současné stanovení statinů

Analyt	Zdroj statinů	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Citlivost	zdroj
AT, AT-d ₅ , ATL, <i>p</i> -OH AT, <i>o</i> -OH AT, SV, SV-d ₆ , SVA	Lidské sérum, lipoproteinová frakce	BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μm)	A - ACN B - 0,5 mM AmAc, pH = 4 (30:70) gradientová eluce	MS/MS pozitivní mód ionizace	Limit kvantifikace/Limit detekce [nmol/l] AT – 0,15/0,05; AT-d – 0,26/0,08; ATL – 0,09/0,03; <i>p</i> -OH AT – 0,57/0,0,19; <i>o</i> -OH AT – 0,33/0,11; SV – 0,16/0,03; SV-d – 0,20/0,05; SVA – 4,38/1,46	[52]
AT, LOV, PV, SV, MEV	Povrchová a odpadní voda	Genesis C18 (50 x 2,1 mm; 3 μm)	A - ACN + 2 mM MeA + 0,1 % AcAc B - voda + 2 mM MeA + 0,1 % AcAc (60:40) gradientová eluce	MS/MS pozitivní mód ionizace	Limit detekce [ng/l] AT – 0,1-1,2; LOV – 0,1-1,2; PV – 1,0-15,4; SV – 0,1-1,0;	[53]
LOV, LOVA, PV, SV, SVA	Extrakt z Pu-Erh čaje	Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm)	ACN : deionizovaná voda : AcAc (70:30:0,5) izokratická eluce	UV-VIS detektor MS pozitivní mód ionizace	Neudáno	[54]
AT, LOV, PV, RV, SV	Lidské jaterní mikrosomy, léčivé přípravky	C18 Inertsil ODS 3V (250 x 4,6 mm; 5 μm)	A - 0,01 mM AmAc, pH = 5,0 : ACN; 90:10 B - 0,01 mM AmAc, pH = 5,0 : ACN; 5:95 C - 0,01 mM AmAc, pH = 5,0 : MeOH; 10:90 gradientová eluce	UV-VIS detektor	Spodní limit kvantifikace [μg/ml] AT, LOV, PV, RV, SV – 0,1	[55]
AT, FLV, LOV, PV, RV, SV	Odpadní voda, voda z řeky	Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 x 4,6 mm; 1,8 μm)	A - ACN + 0,1 % AcF B - 5mM AmF + 0,1 % AcF (30:70) gradientová eluce	MS/MS pozitivní mód ionizace	Limit detekce [ng/l] AT – 0,05-0,28; FLV – 3,73-17,0; LOV – 0,05-2,00; PV – 10,5-11,3; RV – 0,30-6,18; SV – 0,04-0,70	[56]
AT, AT-d ₅ , ATL, PTV, RV, RV-d ₆ , RVL, RVL-d ₆	Povrchová a odpadní voda	Luna Phenyl-Hexyl (150 x 2 mm; 3 μm)	A - 0,1 % AcF B - MeOH (25:75) izokratická eluce	MS/MS pozitivní mód ionizace	Limit detekce [ng/l] AT – 10; RV – 6; RVL – 8	[57]

Tab. 6: HPLC/UHPLC metody umožňující stanovit větší počet molekul statinů v jedné analýze

Metody vyvíjené pro současné stanovení většího počtu molekul statinů využívají ve většině případů (Tab. 6) stacionární fáze s navázanou oktadecylovou skupinou (C18). Mobilní fáze je nejčastěji tvořena acetonitrilem a octanem nebo mravenčanem amonným. V případě detekce převládá použití tandemové hmotnostní spektrometrie, která využívá pro ionizaci pozitivní mód ESI. Uplatnění nachází také spektrofotometrický detektor. Limit detekce nejcitlivějších metod dosahuje u některých statinů až setin ng/l [52-57].

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie

- Atorvastatin, vápenatá sůl (ZENTIVA, Česká republika)
- Atorvastatin lakton (ZENTIVA, Česká republika)
- 2-Hydroxyatorvastatin, monosodná sůl, dihydrát 95 % (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)
- 4-Hydroxyatorvastatin, disodná sůl 98 % (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)
- Pitavastatin, vápenatá sůl (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)
- Pitavastatin lakton (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)
- Lovastatin, hydroxy kyselina, sodná sůl 96 % (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)
- Mevinolin (Lovastatin) > 98 % (SIGMA ALDRICH, Česká republika)
- Pravastatin, sodná sůl > 98 % (SIGMA ALDRICH, Česká republika)
- Pravastatin lakton 98 % (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)
- Rosuvastatin, vápenatá sůl 98 % (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)
- Rosuvastatin lakton 95 % (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)
- N-Desmethylrosuvastatin, disodná sůl, monohydrát; 98 % (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)
- Fluvastatin, sodná sůl (USP ROCKVILLE, USA)
- Fluvastatin lakton 98 % (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)
- Simvastatin \geq 98 % (MERCK, Česká republika)
- Simvastatin, hydroxy kyselina, amonná sůl 98 % (TORONTO RESEARCH CHEMICALS, Kanada)

- Methanol LC-MS CHROMASOLV > 99,9% (SIGMA ALDRICH, Česká republika)
- Acetonitril LC-MS CHROMASOLV > 99,9% (SIGMA ALDRICH, Česká republika)
- Mravenčan amonný > 98% (SIGMA ALDRICH, Česká republika)
- Octan amonný > 99% (SIGMA ALDRICH, Česká republika)
- Kyselina octová > 99% (SIGMA ALDRICH, Česká republika)
- Kyselina mravenčí > 98% (SIGMA ALDRICH, Česká republika)

4.2 Použité přístroje a materiály

- Analytické váhy: Sartorius 2004 MP, SARTORIUS, Německo
- Ultrazvuková vodní lázeň: Sonorex Digitec, BANDELIN ELECTRONICS, Německo
- Vakuová pumpa: MEDIST s.r.o., Slovensko
- Automatické pipety: Biohit, FISHER SCIENTIFIC, Česká republika
- Minitřepačka: Ika MS 3 basic, IKA WORKS, USA
- ACQUITY Ultra Performance LC, WATERS, Česká republika
 - ACQ-binary solvent manager – čerpadlo
 - ACQ-sample manager – autosampler
 - ACQ-column manager – kolonový termostat
 - ACQ-PDA detektor – detektor s diodovým polem
- Hmotnostní spektrometr – Quatro Micro, WATERS, Česká republika
- Chromatografické kolony:
 - BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm), WATERS, Česká republika
 - BEH Shield RP 18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm), WATERS, Česká republika
 - BEH Phenyl (50 x 2,1 mm; 1,7 μm), WATERS, Česká republika
 - HSS T3 (50 x 2,1 mm; 1,8 μm), WATERS, Česká republika

4.3 Příprava standardů

Atorvastatin a statiny ve formě laktonu byly rozpouštěny v acetonitrilu. V případě statinů ve formě kyseliny byla pro rozpouštění použita směs acetonitrilu a 0,5 mM octanu amonného o pH = 4 (Tab. 7). Koncentrace vzniklých roztoků byla 1×10^{-3} g/ml.

Rozpouštědlo pro standardy statinů – AmAc : ACN, 70 : 30

Rozpouštědlo bylo vytvořeno smísením 70 ml 0,5 mM octanu amonného o pH = 4 s 30 ml acetonitrilu.

Název	Zkratka	Rozpouštědlo
Atorvastatin	AT	acetonitril
Atorvastatin lakton	ATL	acetonitril
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	<i>o</i> -OH AT	0,5 mM AmAc, pH = 4 : ACN, 70 : 30
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	<i>p</i> -OH AT	0,5 mM AmAc, pH = 4 : ACN, 70 : 30
Fluvastatin	FLU	0,5 mM AmAc, pH = 4 : ACN, 70 : 30
Fluvastatin lakton	FLVL	acetonitril
Lovastatin	LOV	acetonitril
Lovastatin kyselina	LOVA	0,5 mM AmAc, pH = 4 : ACN, 70 : 30
Simvastatin	SV	acetonitril
Simvastatin kyselina	SVA	0,5 mM AmAc, pH = 4 : ACN, 70 : 30
Pitavastatin	PTV	0,5 mM AmAc, pH = 4 : ACN, 70 : 30
Pitavastatin lakton	PTVL	acetonitril
Rosuvastatin	RV	0,5 mM AmAc, pH = 4 : ACN, 70 : 30
Rosuvastatin lakton	RVL	acetonitril
N-Desmethylrosuvastatin	N-DM RV	0,5 mM AmAc, pH = 4 : ACN, 70 : 30
Pravastatin	PV	0,5 mM AmAc, pH = 4 : ACN, 70 : 30
Pravastatin lakton	PVL	acetonitril

Tab. 7: Výběr rozpouštědla pro jednotlivé standardy statinů

4.4 Výběr stacionární fáze

Při výběru stacionární fáze s využitím systematického přístupu k vývoji metody byla hodnocena separace statinů při použití mobilní fáze tvořené acetonitrilem nebo methanolem a 10 mM pufrům o pH = 3 nebo pH = 9.

200 mM pufr, 200 ml, pH = 3

2,52 g mravenčanu amonného bylo rozpuštěno ve 180 ml vody, poté bylo přidáno 5 ml kyseliny mravenčí, 200 ml odměrná baňka obsahující vzniklý roztok byla nakonec doplněna vodou po rysku.

10 mM pufr, 200 ml, pH = 3

10 ml 200 mM pufru s pH = 3 bylo napipetováno do 200 ml odměrné baňky, která byla doplněna vodou po rysku.

200 mM pufr, 200 ml, pH = 9

3,08 g octanu amonného bylo rozpuštěno ve 180 ml vody, poté bylo přidáno 16 ml 25 % roztoku hydroxidu amonného a nakonec byla odměrná baňka doplněna vodou po rysku.

10 mM pufr, 200ml, pH = 9

10 ml 200 mM pufru s pH = 9 bylo napipetováno do 200 ml odměrné baňky, která byla doplněna vodou po rysku.

4.5 Optimalizace gradientové eluce

V průběhu optimalizace byla hodnocena separace, tvar píků a čas potřebný pro analýzu v závislosti na měnícím se nastavení podmínek gradientové eluce. Mobilní fáze byla tvořena acetonitrem a 0,1 mM roztokem octanu amonného o pH = 4.

4.6 Optimalizace podmínek pro MS detekci

4.6.1 Výběr prekurzorových iontů

Prekurzorové ionty byly vybírány na základě spekter získaných po přímé infuzi roztoků standardů o koncentraci 1×10^{-5} v pozitivním i v negativním módu ESI. Byly hodnoceny odezvy protonovaných molekul, deprotonovaných molekul a vznikajících aduktů.

4.6.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje

Mezi optimalizované parametry byly zařazeny: napětí na kapiláře, desolvační teplota, napětí na hexapólu, napětí na extraktoru, průtok desolvačního plynu, průtok plynu na vstupním kuželu a napětí na vstupním kuželu. Každý parametr byl optimalizován v pozitivním i v negativním módu ESI. Optimalizace probíhala v SIM módu (selektivní záznam vybraného iontu).

4.6.3 Výběr produktových iontů

Produktové ionty byly vybírány na základě spekter, ve kterých byly analyty podrobeny kolizní energii o hodnotě 10 V, 20 V a 30 V. Ve většině případů byly vybrány pro každý analyt 4 produktové ionty, a to v pozitivním i v negativním módu ESI.

4.6.4 Optimalizace iontových přechodů

Po výběru prekurzorových a produktových iontů byly hodnoceny iontové přechody v pozitivním i v negativním módu ESI. U většiny molekul byly hodnoceny 4 iontové přechody, které byly doplněny o nejvýhodnější hodnotu kolizní energie. Optimalizace probíhala v SRM módu (záznam vybrané reakce).

4.7 Výběr aditiva mobilní fáze

Při výběru aditiv mobilní fáze byly proměřovány 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM a 5,0 mM roztoky octanu amonného (AmAc) a mravenčanu amonného (AmF) při pH = 4 a pH = 4,5.

10 mM AmAc, 250 ml, pH = 4

142,57 μ l koncentrované kyseliny octové bylo napipetováno do 250 ml kádinky, která obsahovala přibližně 200 ml vody. Pomocí magnetického míchadla byla směs promíchána a pH = 4 bylo dosaženo pomocí zředěného roztoku NH₃. Vzniklá směs byla poté převedena do 250 ml odměrné baňky a doplněna vodou po rysku.

5 mM AmAc, 250 ml, pH = 4

71,3 μ l koncentrované kyseliny octové bylo napipetováno do 250 ml kádinky, která obsahovala přibližně 200 ml vody. Pomocí magnetického míchadla byla směs promíchána a pH = 4 bylo dosaženo pomocí zředěného roztoku NH₃. Vzniklá směs byla poté převedena do 250 ml odměrné baňky a doplněna vodou po rysku.

1 mM AmAc, 100 ml, pH = 4

10 ml 10 mM AmAc, pH = 4 bylo odpipetováno do 100 ml odměrné baňky, která byla poté doplněna vodou po rysku.

0,5 mM AmAc, 100 ml, pH = 4

10 ml 5 mM AmAc, pH = 4 bylo odpipetováno do 100 ml odměrné baňky, která byla poté doplněna vodou po rysku.

0,1 mM AmAc, 100 ml, pH = 4

10 ml 1 mM AmAc, pH = 4 bylo odpipetováno do 100 ml odměrné baňky, která byla poté doplněna vodou po rysku.

Postup byl obdobný v případě přípravy roztoků AmAc o pH = 4,5. Roztoky se lišily ve spotřebě NH₃. V případě přípravy roztoků mravenčanu amonného se postup lišil pouze množstvím koncentrované kyseliny mravenčí a spotřebou NH₃. K přípravě roztoku 10 mM AmF, 250 ml s pH = 4 bylo použito 94,32 µl kyseliny mravenčí.

4.8 Ověření citlivosti a linearity metody

Citlivost a linearita byla ověřena proměřením kalibračních křivek, které byly tvořeny 12 body. Tento počet byl zvolen z důvodu přesnějšího určení hodnoty limitu kvantifikace (LOQ). Nejnižší koncentrací byla hodnota 1×10^{-10} g/ml a nejvyšší 5×10^{-7} g/ml. Limit kvantifikace byl určen jako poměr signálu k šumu odpovídající minimálně hodnotě 10. Limit detekce (LOD) byl získán výpočtem z limitu kvantifikace ($LOD = LOQ/3,3$).

4.9 Opakovatelnost metody

Po optimalizaci všech podmínek byla zjišťována opakovatelnost metody, která byla popsána relativními směrodatnými odchylkami pro retenční čas a plochu píku hodnocených látek. Opakovatelnost metody byla získána změřením deseti stejných po sobě následujících vzorků, a to pomocí stejného přístroje, za stejných podmínek a v úzkém časovém rozmezí.

5. Výsledky a diskuze

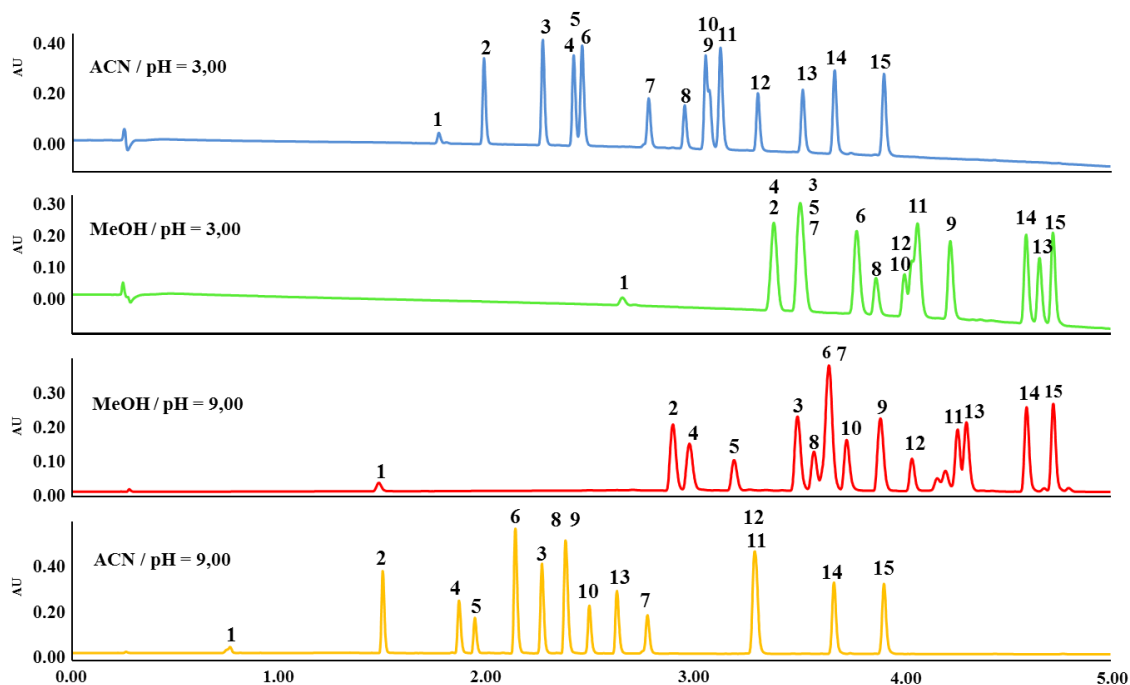
5.1 Optimalizace chromatografických podmínek

5.1.1 Výběr stacionární fáze

Kolona pro separaci byla vybrána pomocí systematického přístupu pro optimalizaci metody. Postupně byly zkoušeny kolony BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm), BEH Shield RP 18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm), BEH Phenyl (50 x 2,1 mm; 1,7 μm) a HSS T3 (50 x 2,1 mm; 1,8 μm). Při výběru kolony bylo k dispozici 15 z celkového počtu 17 statinů. V tomto kroku ještě nebyly k dispozici fluvastatin lakton a lovastatin kyselina.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při zapojení kolon BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm) a BEH Shield RP 18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm). Pro naše stanovení byla nakonec vybrána chromatografická kolona BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm). Dosažené výsledky jsou znázorněny na obrázcích 38 a 39. Velmi dobré výsledky byly pozorovány při nastavení pH na hodnotu 9. Ale tyto podmínky nejsou vhodné pro analýzu statinů, a to z důvodu jejich nestability (viz kapitola 3.1.6 pojednávající o vlastnostech statinů).

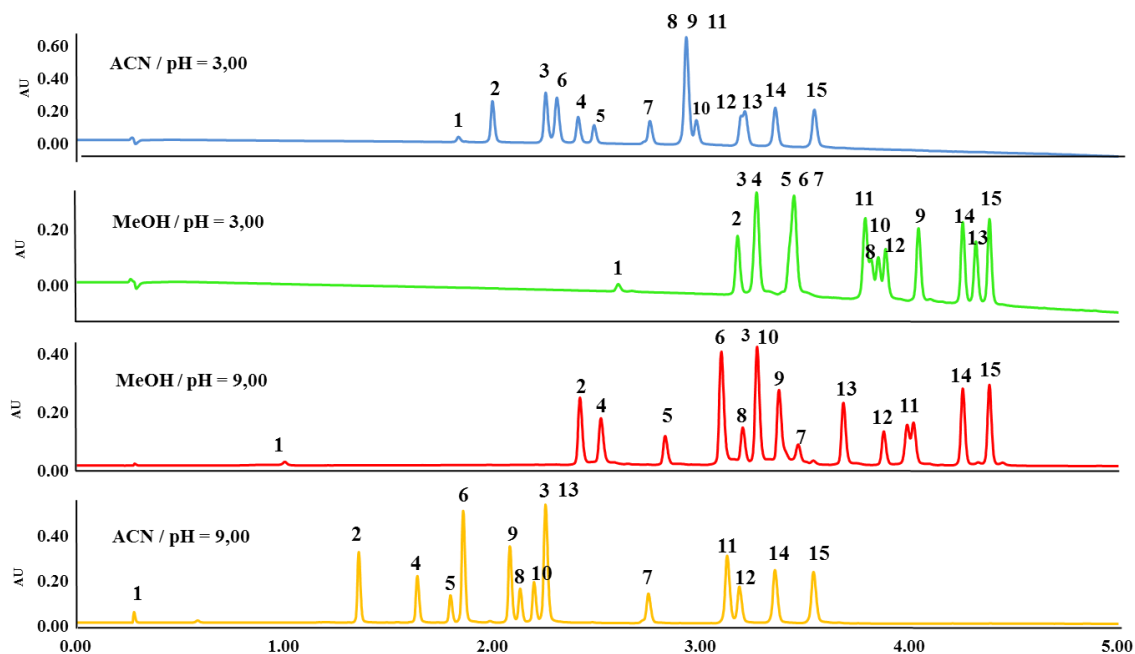
Separace na koloně BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm)



Obr. 38: Separace na koloně BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm):

1 – N-Desmethylosuvastatin, 2 – Pravastatin, 3 – Pravastatin lakton, 4 – Rosuvastatin, 5 – *p*-Hydroxyatorvastatin, 6 – Pitavastatin, 7 – Rosuvastatin lakton, 8 – *o*-Hydroxyatorvastatin, 9 – Fluvastatin, 10 – Atorvastatin, 11 – Pitavastatin lakton, 12 – Atorvastatin lakton, 13 – Simvastatin kyselina, 14 – Lovastatin, 15 – Simvastatin

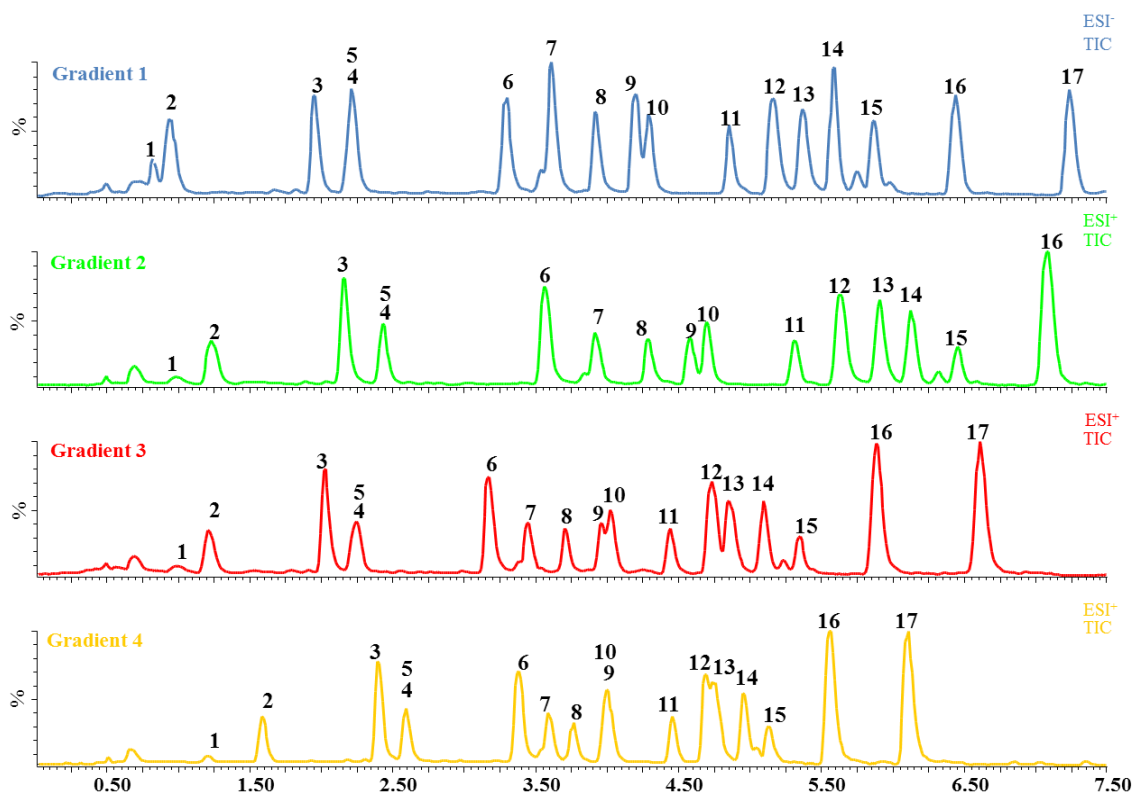
Separace na koloně BEH Shield RP 18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm)



Obr. 39 : Separace na koloně BEH Shield RP 18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm):

1 – N-Desmethylrosuvastatin, 2 – Pravastatin, 3 – Pravastatin lakton, 4 – Rosuvastatin, 5 – *p*-Hydroxyatorvastatin, 6 – Pitavastatin, 7 – Rosuvastatin lakton, 8 – *o*-Hydroxyatorvastatin, 9 – Fluvastatin, 10 – Atorvastatin, 11 – Pitavastatin lakton, 12 – Atorvastatin lakton, 13 – Simvastatin kyselina, 14 – Lovastatin, 15 – Simvastatin

5.1.2 Optimalizace gradientové eluce



Obr. 40: Optimalizace gradientové eluce:

1 – N-Desmethylosuvastatin, 2 – Pravastatin, 3 – Pravastatin lakton, 4 – Rosuvastatin, 5 – *p*-Hydroxyatorvastatin, 6 – Pitavastatin, 7 – Rosuvastatin lakton, 8 – *o*-Hydroxyatorvastatin, 9 – Fluvastatin, 10 – Atorvastatin, 11 – Lovastatin kyselina, 12 – Pitavastatin lakton, 13 – Atorvastatin lakton, 14 – Simvastatin kyselina, 15 – Fluvastatin lakton, 16 – Lovastatin, 17 – Simvastatin

Čas	Průtok [ml/min]	0,1 mM octan amonný; pH = 4 : acetonitril				Křivka
		Gradient 1	Gradient 2	Gradient 3	Gradient 4	
Počátek	0,300	70 : 30	70 : 30	70 : 30	75 : 25	Počátek
7,00	0,300	35 : 65	40 : 60	30 : 70	20 : 80	6
7,50	0,300	70 : 30	70 : 30	70 : 30	75 : 25	6
9,50	0,300	70 : 30	70 : 30	70 : 30	75 : 25	6

Tab. 8: Optimalizace gradientové eluce

V průběhu optimalizace gradientové eluce (Obr. 40) byla hodnocena separace, tvar pík a čas potřebný pro analýzu. V potaz bylo také bráno vzájemné rozložení analytů, což je důležité pro použitý hmotnostní analyzátor, a to z důvodu rychlosti skenování a nastavení časových oken. Nejlépe byla vyhodnocena gradientová eluce, která byla na počátku separace tvořena octanem amonným a acetonitrilem v poměru 70 : 30, v čase 7 minut 35 : 65 v čase 7,5 minuty 70 : 30 (Tab. 8).

5.2 Výběr prekurzorových iontů

Pro každou sloučeninu byl vybrán jako prekurzorový iont $[M+H]^+$ v pozitivním módu ESI a $[M-H]^-$ v negativním módu ESI (Tab. 9). Adukty s kationty sodíku nebo draslíku vytvořené v pozitivním módu ESI nebyly vybrány, protože je nelze použít ke kvantifikaci. Adukty s octanem nebyly vybrány z důvodu zachování dobré opakovatelnosti výsledné metody.

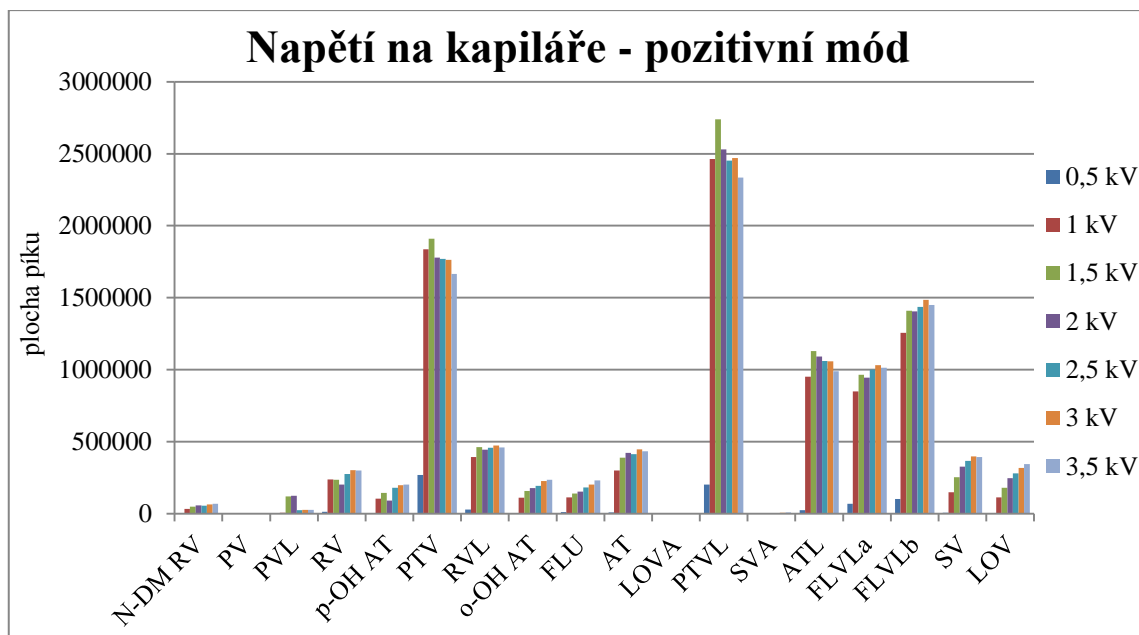
Název	Pozitivní mód ESI		Negativní mód ESI	
	Prekurzorový iont	Adukty	Prekurzorový iont	Adukty
Pravastatin	$[M+H]^+ = 424,9$	$[M+Na]^+ = 447,0$	$[M-H]^- = 422,9$	
N-Desmethylrosuvastatin	$[M+H]^+ = 467,9$	$[M+Na]^+ = 489,9$	$[M-H]^- = 465,8$	
Pravastatin lakton	$[M+H]^+ = 407,0$	$[M+Na]^+ = 429,0$ $[M+K]^+ = 444,9$	$[M-H]^- = 405,0$	$[M+CH_3COO]^- = 464,9$
Rosuvastatin	$[M+H]^+ = 481,9$	$[M+Na]^+ = 503,9$	$[M-H]^- = 479,8$	
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	$[M+H]^+ = 575,0$	$[M+Na]^+ = 597,0$	$[M-H]^- = 573,1$	
Pitavastatin	$[M+H]^+ = 421,9$	$[M+Na]^+ = 443,9$	$[M-H]^- = 419,8$	
Rosuvastatin lakton	$[M+H]^+ = 463,9$	$[M+Na]^+ = 485,9$ $[M+K]^+ = 501,9$	$[M-H]^- = 461,8$	$[M+CH_3COO]^- = 521,9$
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	$[M+H]^+ = 575,0$	$[M+Na]^+ = 597,0$	$[M-H]^- = 573,1$	
Fluvastatin	$[M+H]^+ = 411,9$	$[M+Na]^+ = 433,9$	$[M-H]^- = 410,1$	
Atorvastatin	$[M+H]^+ = 559,0$	$[M+Na]^+ = 581,0$ $[M+K]^+ = 597,0$	$[M-H]^- = 557,1$	
Lovastatin kyselina	$[M+H]^+ = 422,9$	$[M+Na]^+ = 445,0$	$[M-H]^- = 420,9$	
Pitavastatin lakton	$[M+H]^+ = 403,9$	$[M+Na]^+ = 425,9$ $[M+K]^+ = 441,9$	$[M-H]^- = 402,1$	$[M+CH_3COO]^- = 461,8$
Simvastatin kyselina	$[M+H]^+ = 437,0$	$[M+Na]^+ = 459,0$	$[M-H]^- = 434,9$	
Atorvastatin lakton	$[M+H]^+ = 541,0$	$[M+Na]^+ = 563,0$ $[M+K]^+ = 579,0$	$[M-H]^- = 539,2$	$[M+CH_3COO]^- = 598,9$
Fluvastatin lakton	$[M+H]^+ = 394,1$	$[M+Na]^+ = 415,9$ $[M+K]^+ = 431,9$	$[M-H]^- = 392,1$	$[M+CH_3COO]^- = 451,9$
Lovastatin	$[M+H]^+ = 405,0$	$[M+Na]^+ = 427,0$ $[M+K]^+ = 443,0$	$[M-H]^- = 403,0$	$[M+CH_3COO]^- = 463,2$
Simvastatin	$[M+H]^+ = 419,0$	$[M+Na]^+ = 441,0$ $[M+K]^+ = 457,0$	$[M-H]^- = 417,0$	$[M+CH_3COO]^- = 476,9$

Tab. 9: Výběr prekurzorových iontů v pozitivním a negativním módu.

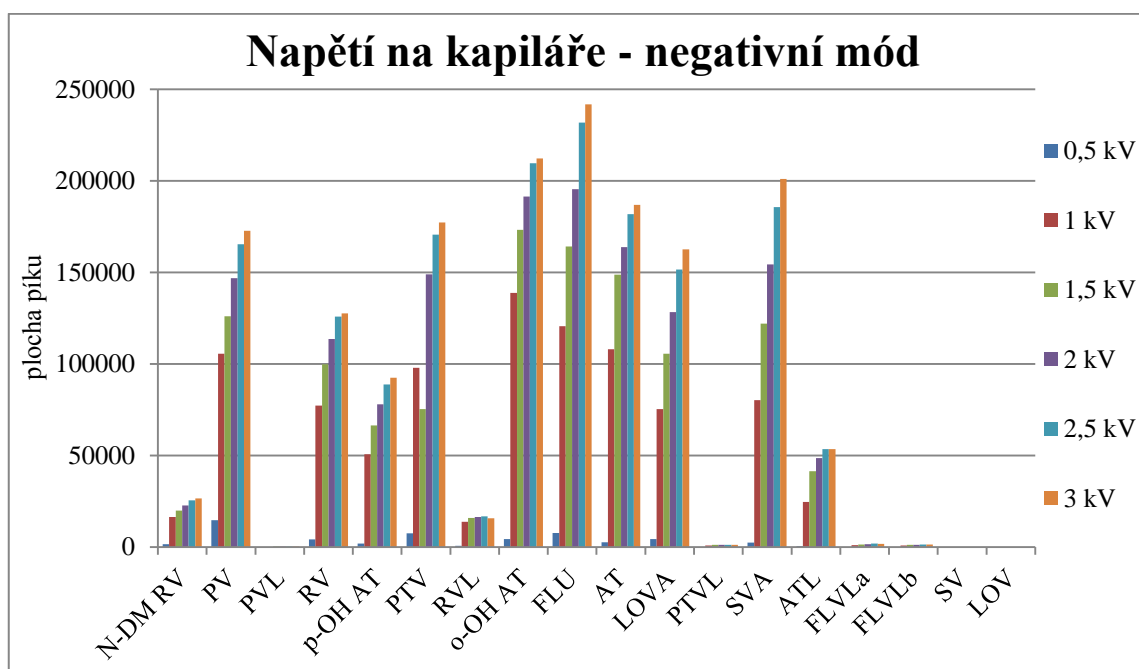
5.3 Optimalizace parametrů iontového zdroje hmotnostního spektrometru

5.3.1 Napětí na kapiláře

Parametr napětí na kapiláře byl proměřován od 0,5 kV do 3,5 kV v pozitivním módu a od 0,5 kV do 3 kV v negativním módu. Pro pozitivní mód byla vybrána hodnota 3,0 kV (Obr. 41) a pro mód negativní 2,5 kV (Obr. 42).



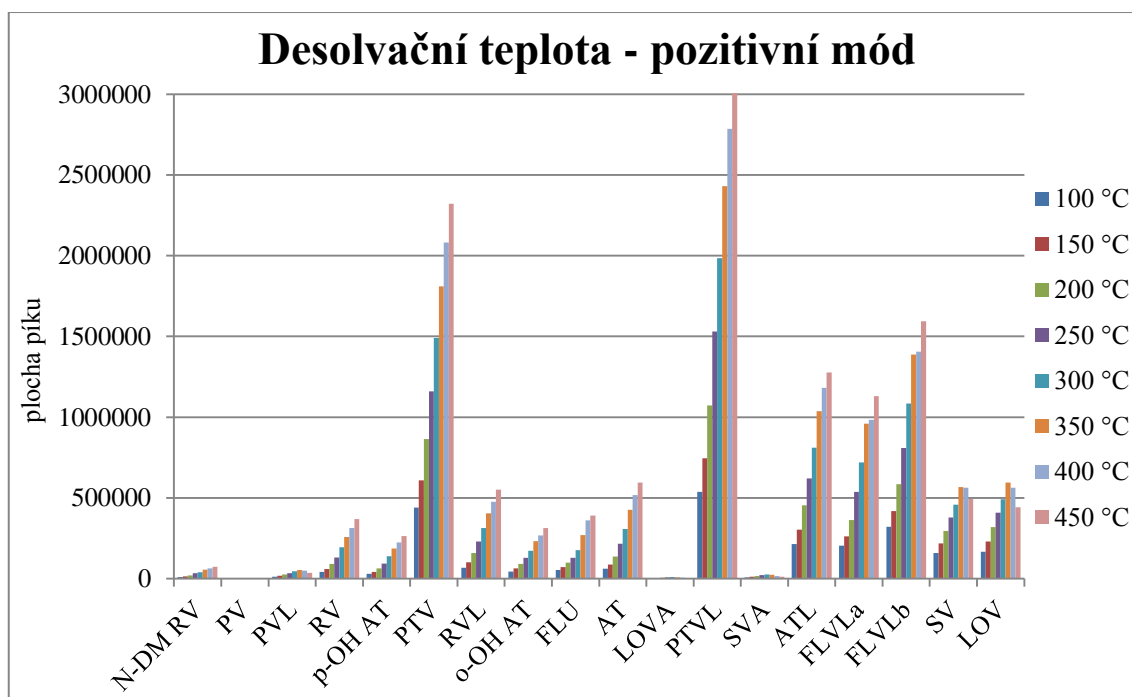
Obr. 41: Optimalizace parametru napětí na kapiláře v pozitivním módu ESI



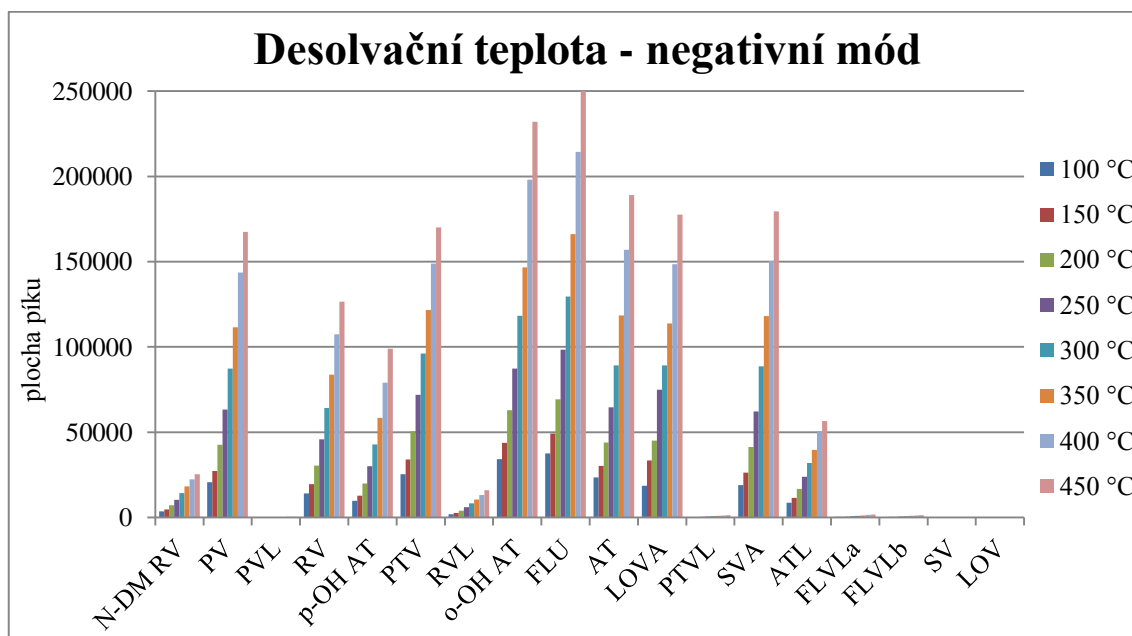
Obr. 42: Optimalizace parametru napětí na kapiláře v negativním módu ESI

5.3.2 Desolvační teplota

Vliv desolvační teploty byl hodnocen v rozmezí 100 °C – 450 °C. U většiny statinů byla v pozitivním módu naměřena nejvyšší odezva při teplotě 450 °C, ale u simvastatinu, lovastatinu a pravastatinu ve formě laktonu to bylo při teplotách nižších. Proto byla vybrána teplota mírně nižší, tedy 425 °C (Obr. 43). Pro negativní mód byla zvolena teplota 450 °C (Obr. 44).



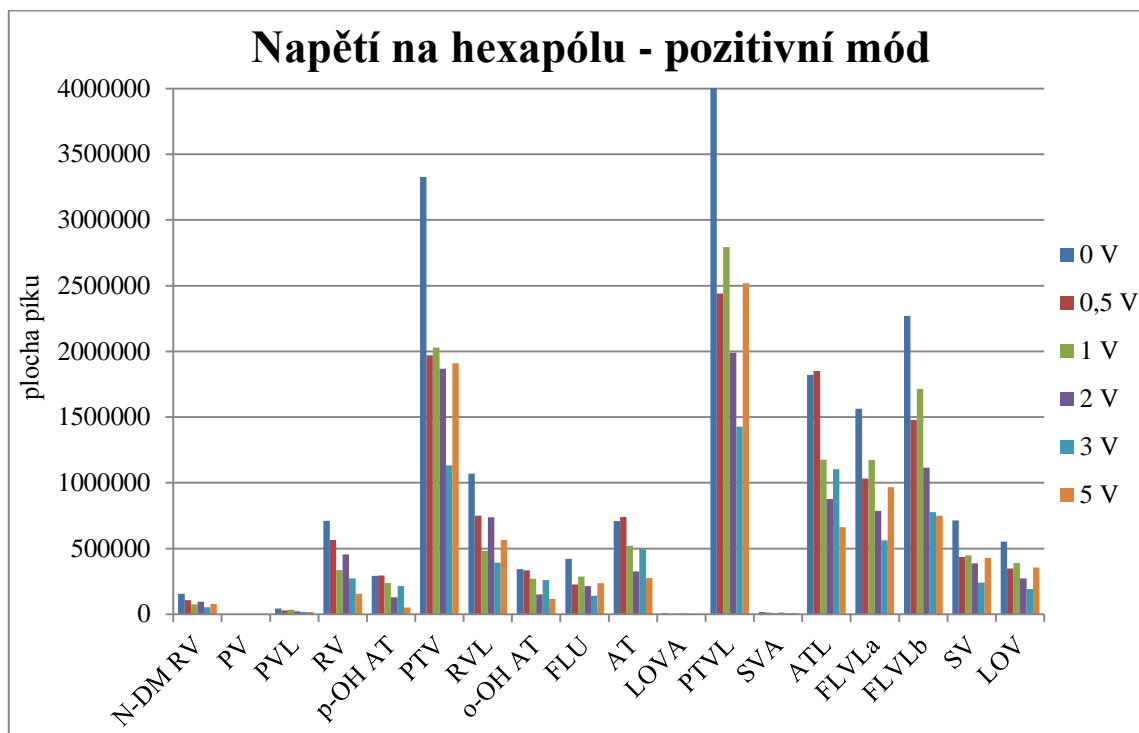
Obr. 43: Optimalizace parametru desolvační teplota v pozitivním módu ESI



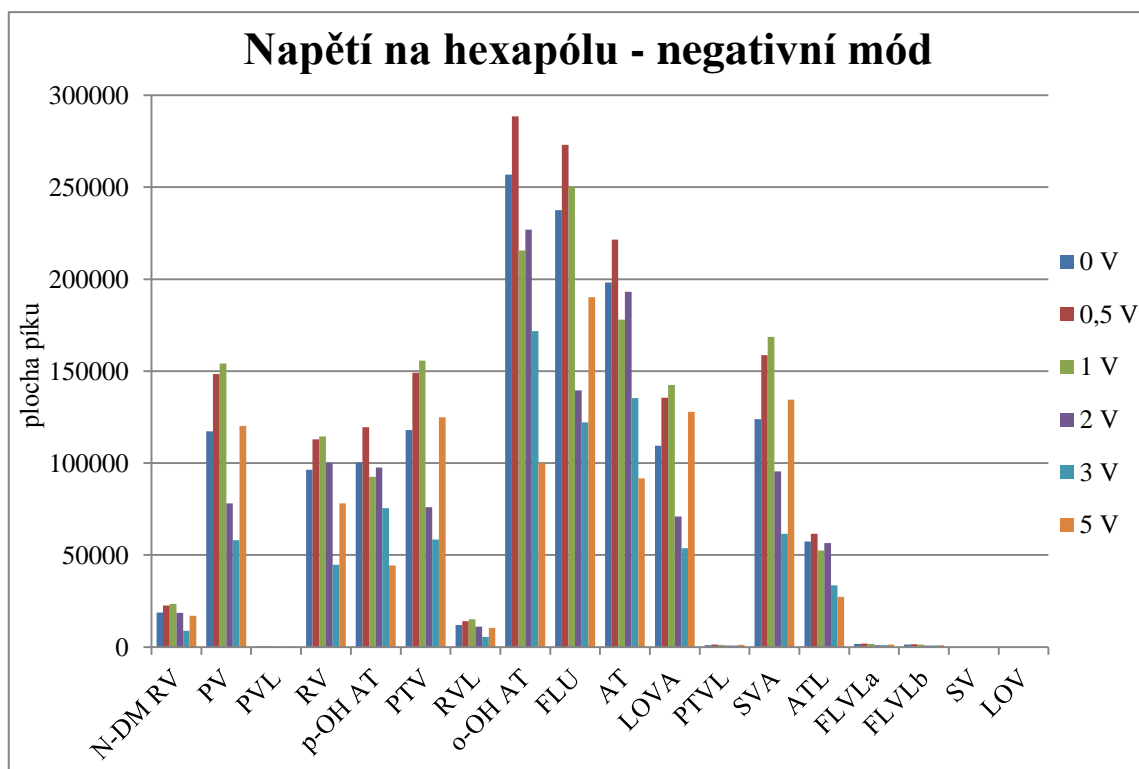
Obr. 44: Optimalizace parametru desolvační teplota v negativním módu ESI

5.3.3 Napětí na hexapólu

Tento parametr byl sledován v rozmezí 0 V – 5 V. Pro pozitivní mód byla zvolena hodnota 0 V (Obr. 45) a pro mód negativní 0,7 V (Obr. 46).



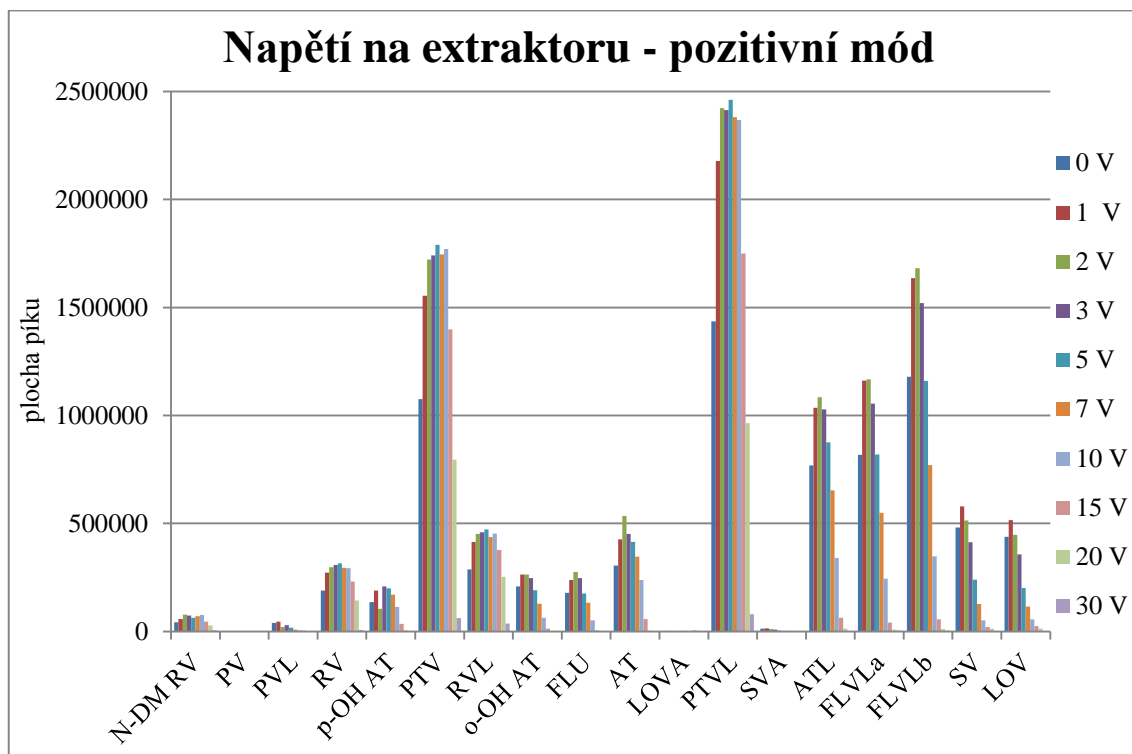
Obr. 45: Optimalizace parametru napětí na hexapólu v pozitivním módu ESI



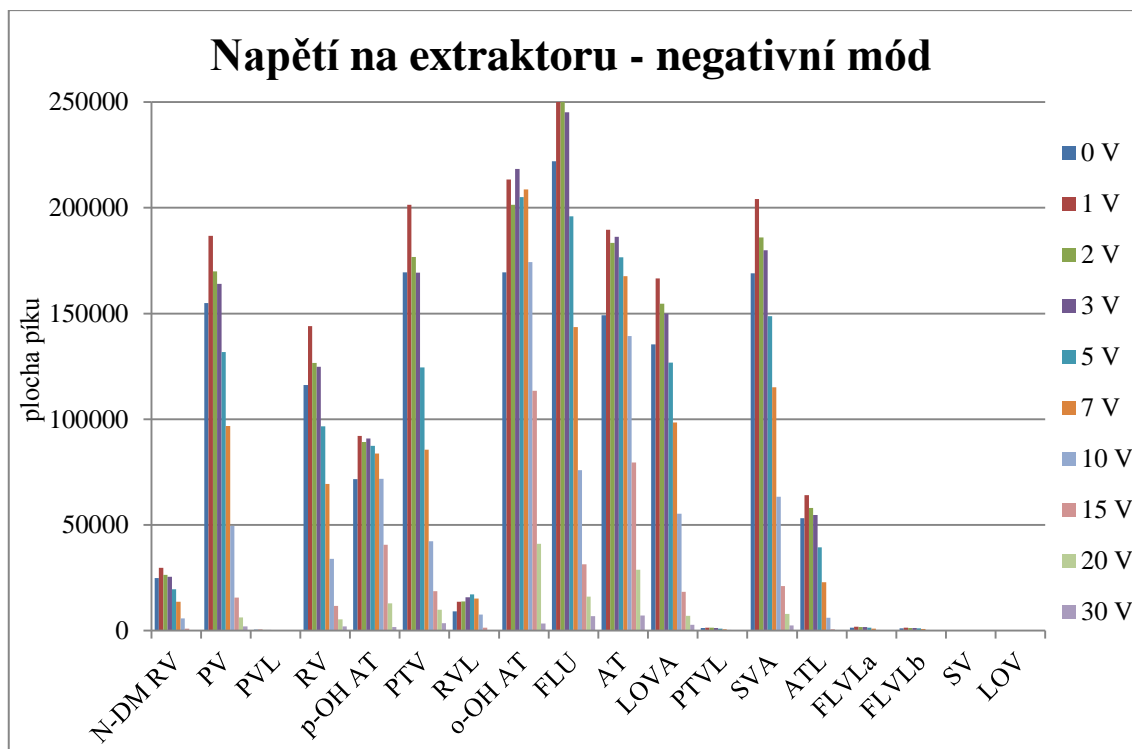
Obr. 46: Optimalizace parametru napětí na hexapólu v negativním módu ESI

5.3.4 Napětí na ekstraktoru

Tento parametr byl optimalizován v rozmezí hodnot 0 V – 30 V. Nejvýhodnější pro pozitivní mód byla hodnota 2 V (Obr. 47) a pro negativní mód 1 V (Obr. 48).



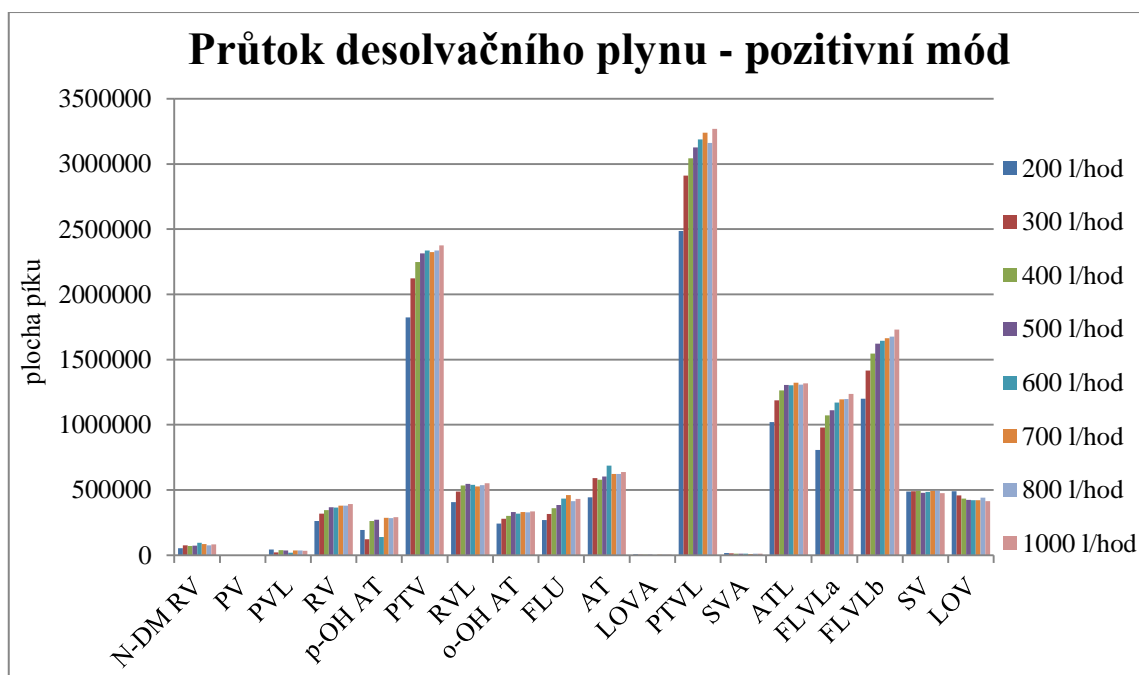
Obr. 47: Optimalizace parametru napětí na ekstraktoru v pozitivním módu ESI



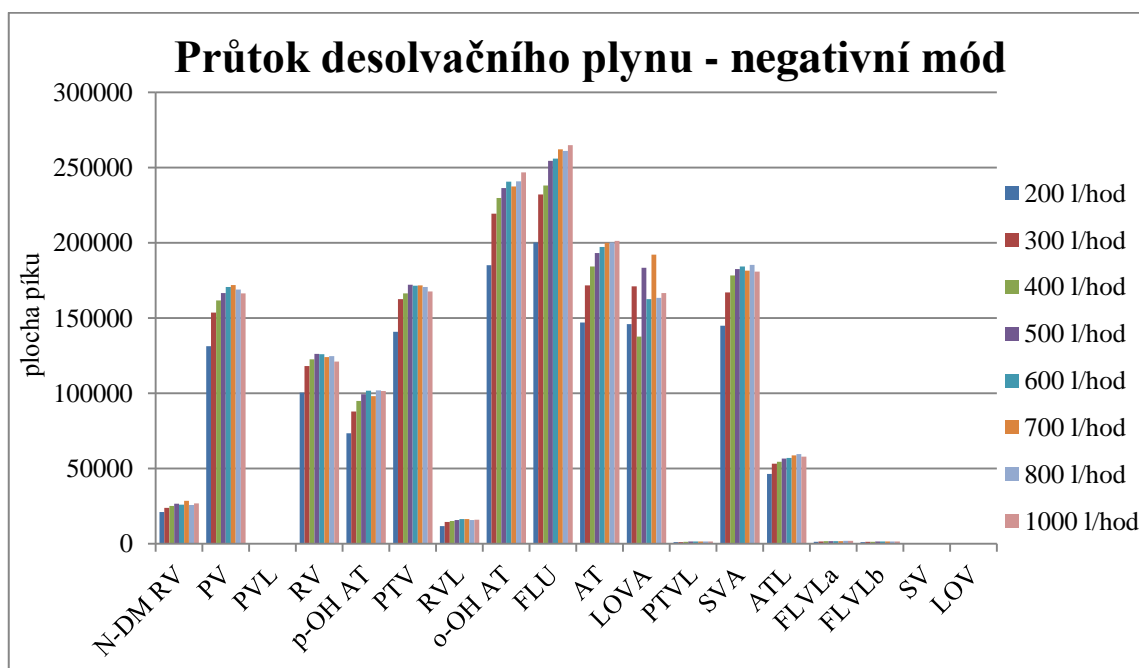
Obr. 48: Optimalizace parametru napětí na ekstraktoru v negativním módu ESI

5.3.5 Průtok desolvačního plynu

Parametr průtok desolvačního plynu byl postupně měřen v rozmezí 200 l/hod až 1000 l/hod. Výsledky nebyly zcela jednotné. Pro pozitivní mód byla vybrána hodnota 650 l/hod (Obr. 49) a pro negativní mód 600 l/hod (Obr. 50). Vyšší hodnoty tohoto parametru nebyly zvoleny, protože již nevedly k výraznějšímu zvýšení odezvy. Zvýšila by se pouze spotřeba desolvačního plynu.



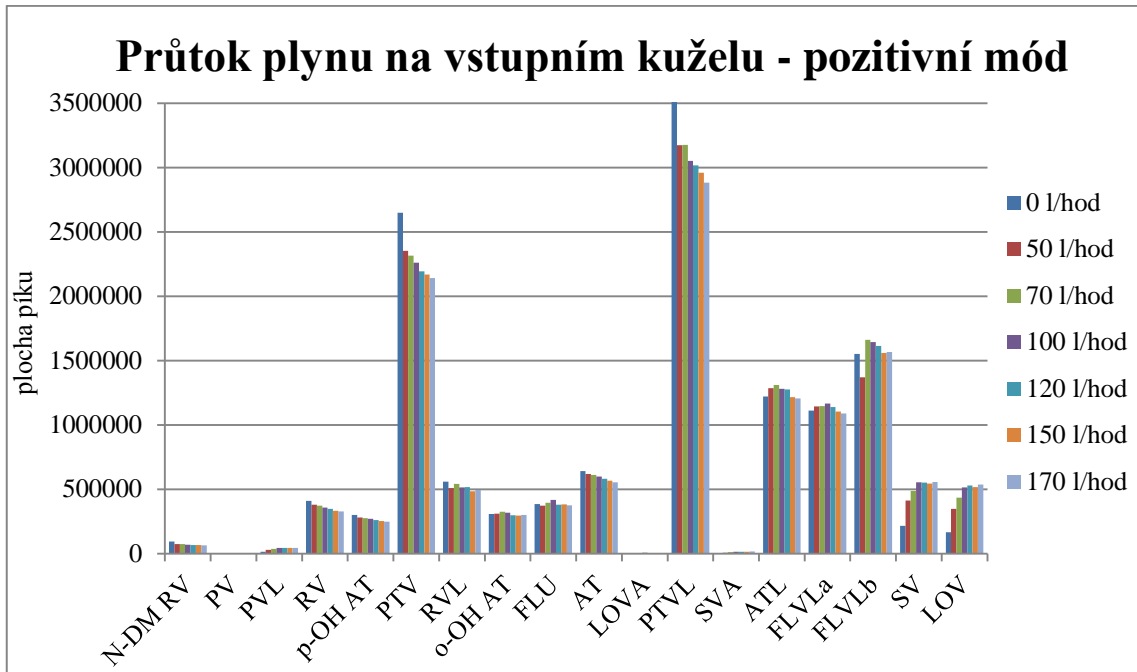
Obr. 49: Optimalizace parametru průtok desolvačního plynu v pozitivním módu ESI



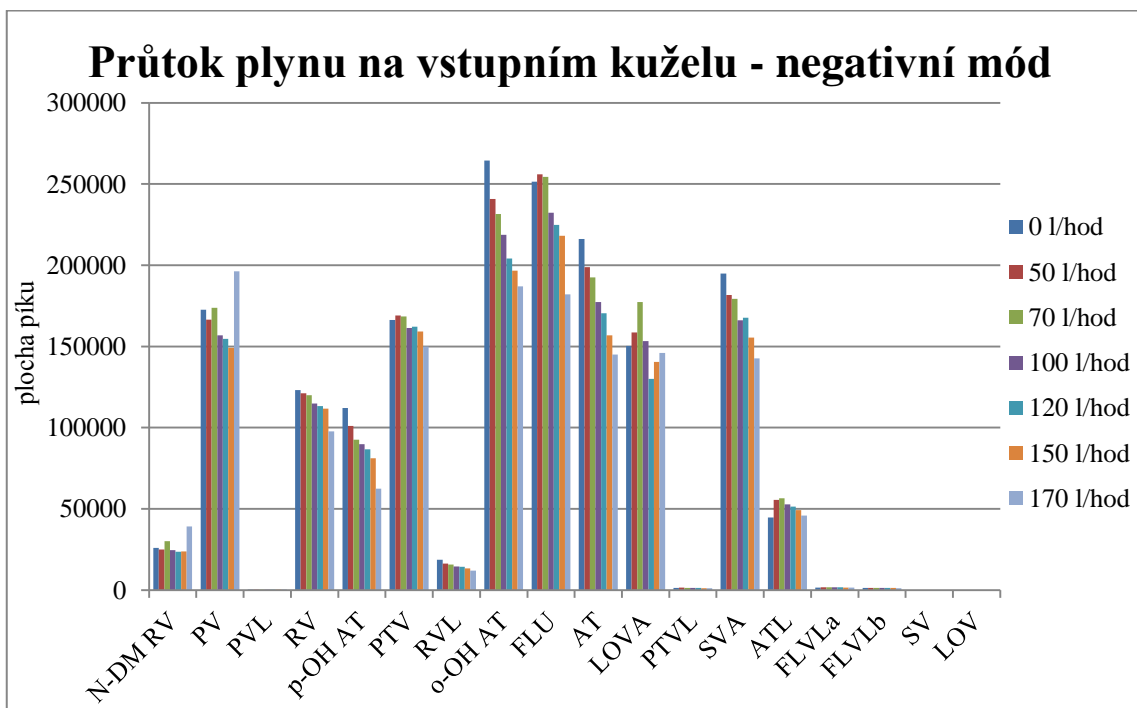
Obr. 50: Optimalizace parametru průtok desolvačního plynu v negativním módu ESI

5.3.6 Průtok plynu na vstupním kuželu

Tento parametr byl hodnocen v rozmezí od 0 l/hod do 170 l/hod. V pozitivním módu byl vyhodnocen jako nejlepší průtok 85 l/hod (Obr. 51) a v negativním módu 60 l/hod (Obr. 52). Nižší hodnoty nebyly vybrány z důvodu zachování čistoty iontové optiky.



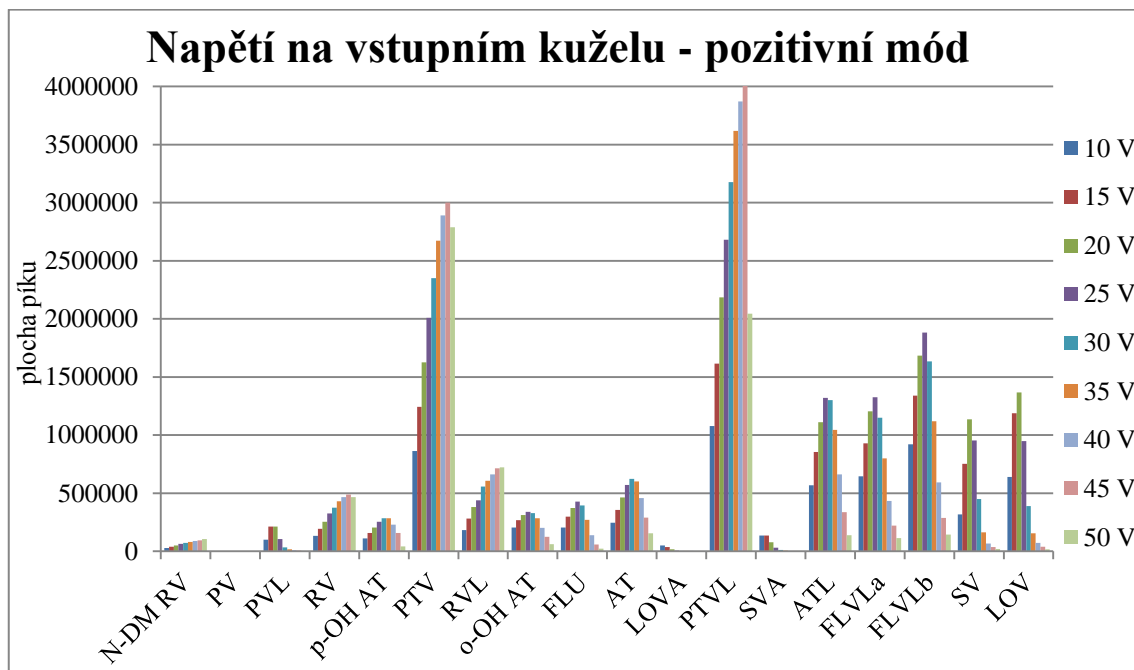
Obr. 51: Optimalizace parametru průtok plynu na vstupním kuželu v pozitivním módu ESI



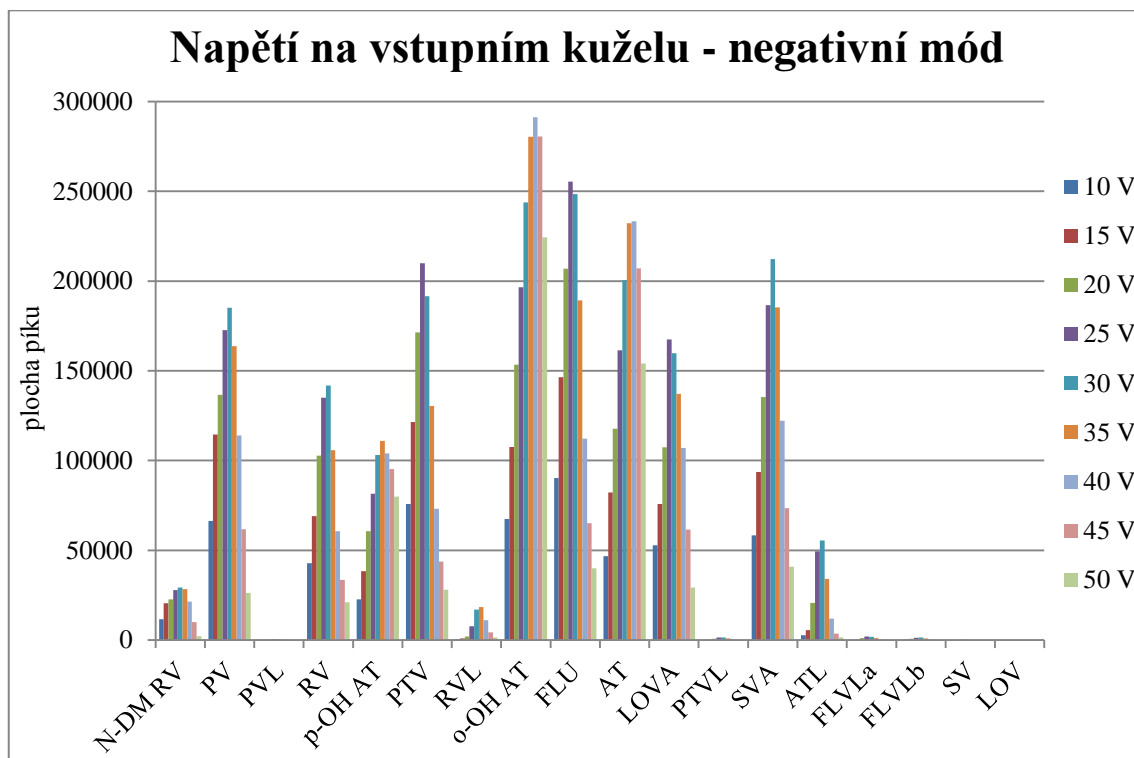
Obr. 52: Optimalizace parametru průtok plynu na vstupním kuželu v negativním módu ESI

5.3.7 Napětí na vstupním kuželu

Jedná se o parametr charakteristický svým maximem pro každou látku. Tento druh napětí byl proměřován v rozmezí hodnot 10 V až 50 V (Obr. 53 a 54). Pro každou látku je v tabulkách kapitoly 5.4 uvedeno napětí na vstupním kuželu pro oba módy ESI.



Obr. 53: Optimalizace parametru napětí na vstupním kuželu v pozitivním módu ESI

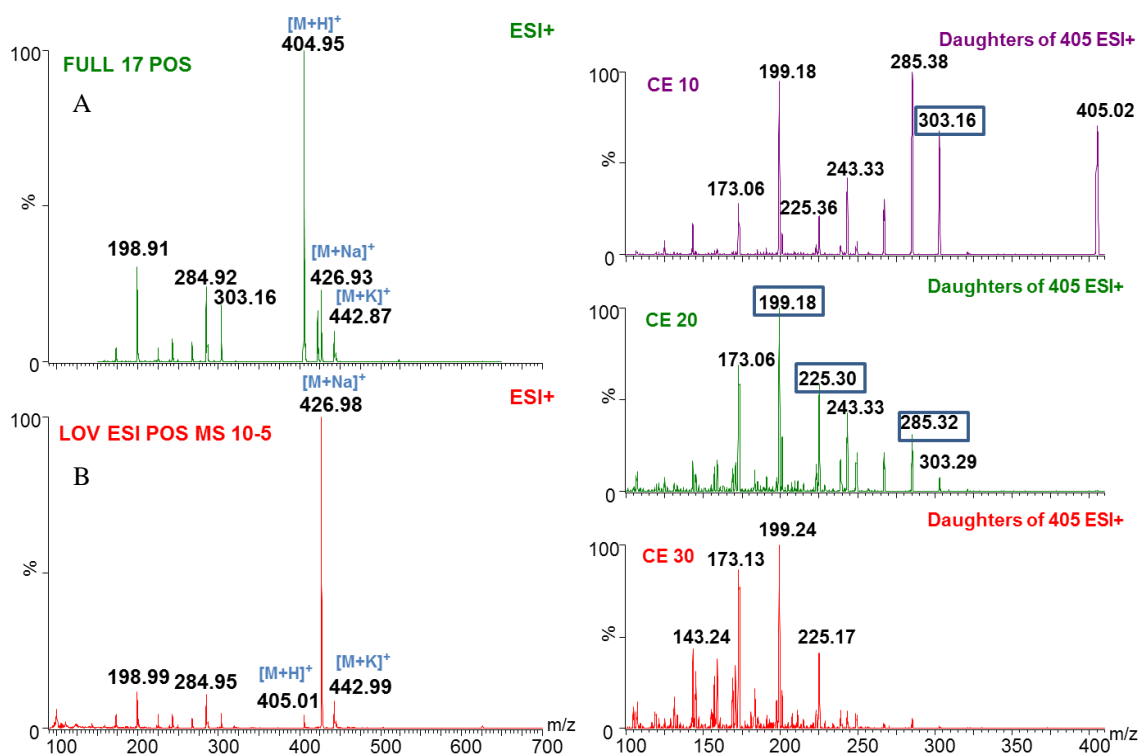


Obr. 54: Optimalizace parametru napětí na vstupním kuželu v negativním módu ESI

5.4 Výběr produktových iontů

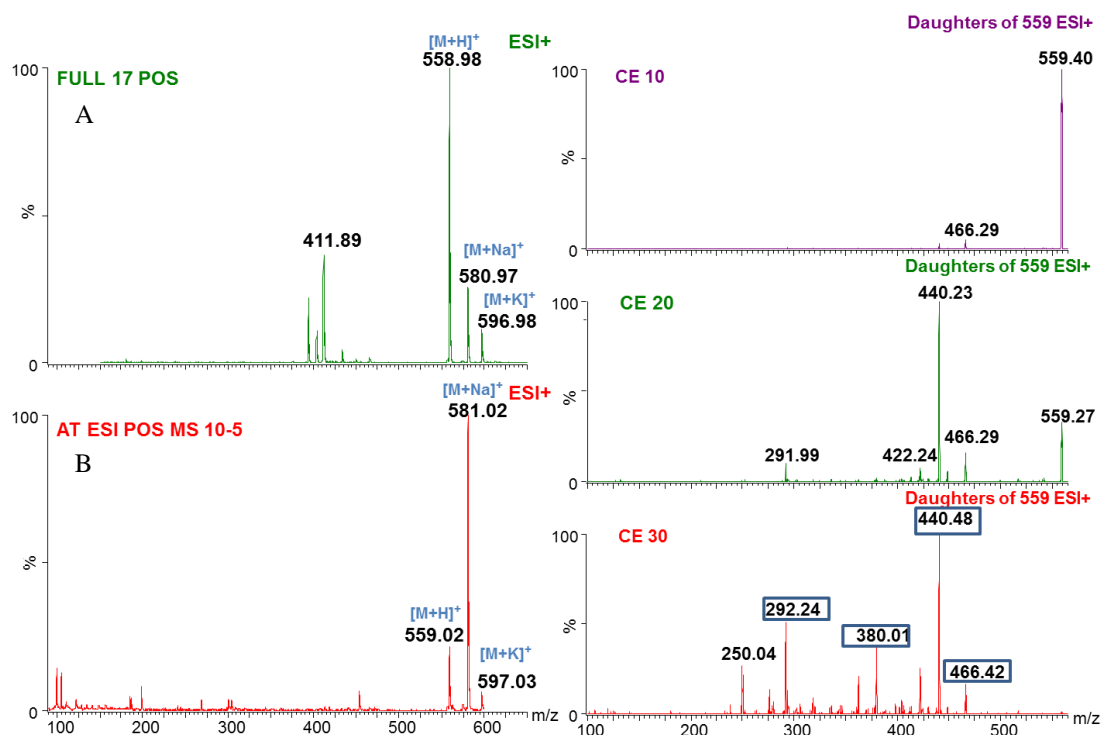
Při výběru produktových iontů byly již parametry iontového zdroje nastaveny na hodnoty, které byly zjištěny při předchozím měření. Výběr byl prováděn z jednotlivých MS/MS spekter, která jsou uvedena níže (Obr. 55 – Obr. 84). V negativním módu ESI poskytovaly některé statiny v laktonové formě (lovastatin, pravastatin lakton, simvastatin) nízké odezvy, a proto nejsou níže uvedeny. V pozitivním módu ESI poskytovala nízké odezvy molekula pravastatinu a také zde není uvedena. Kolizní energie hmotnostního spektrometru byla nastavena na 10 V, 20 V a 30 V. Byly vybrány čtyři nejintenzivnější produktové ionty pro každou sloučeninu v pozitivním i v negativním módu ESI.

Lovastatin



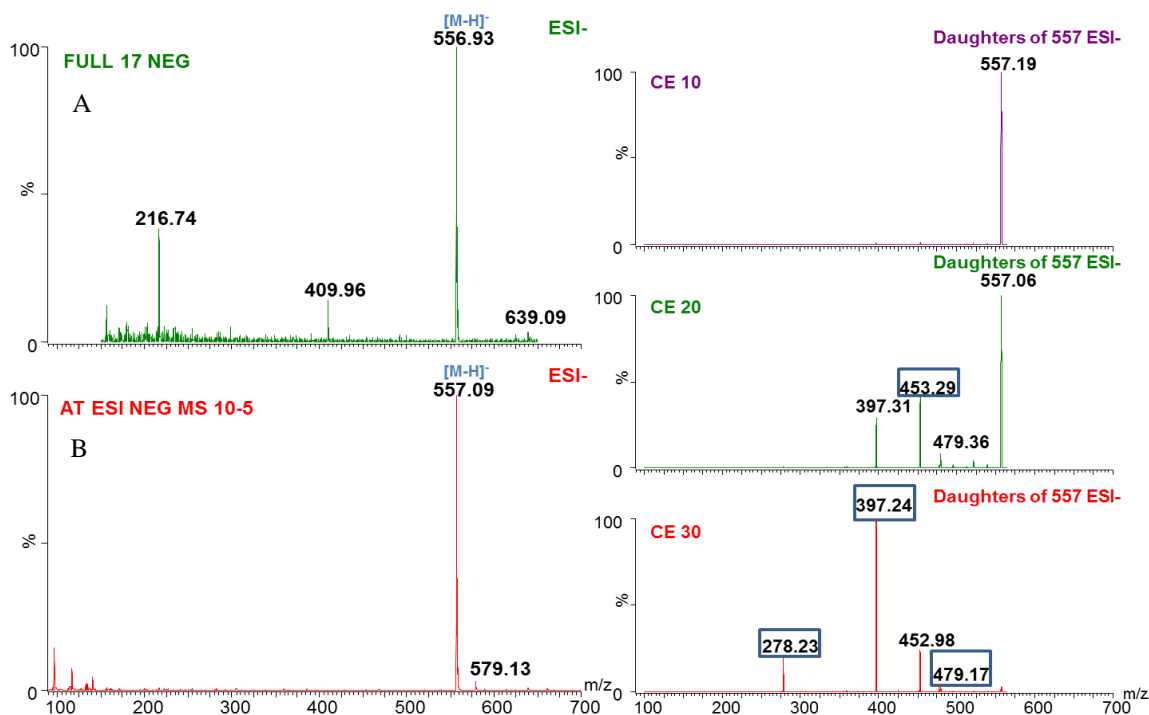
Obr. 55: Spektrum lovastatinu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Atorvastatin



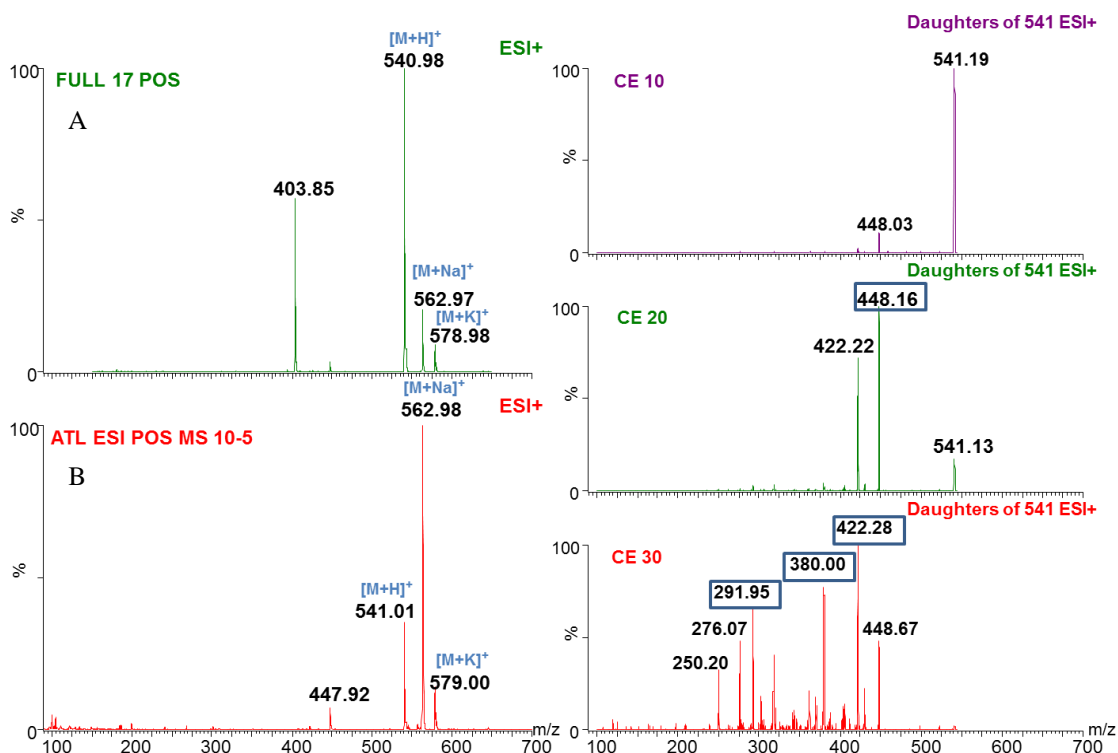
Obr. 56: Spektrum atorvastatinu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Atorvastatin



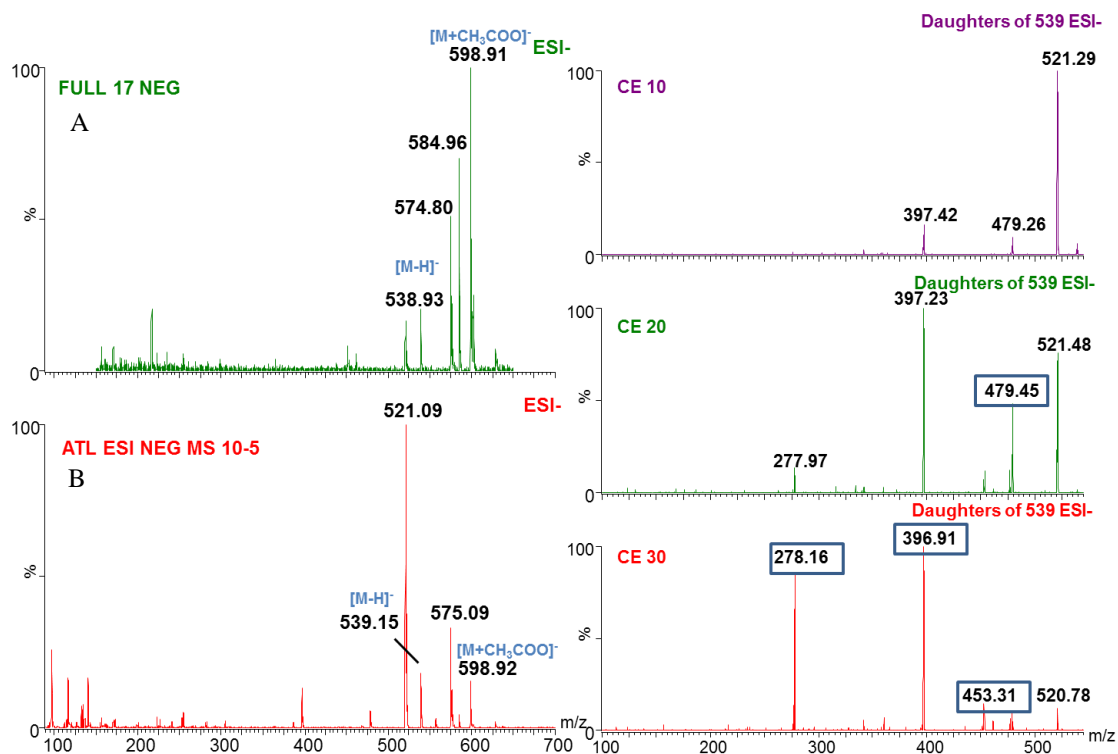
Obr. 57: Spektrum atorvastatinu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Atorvastatin lakton



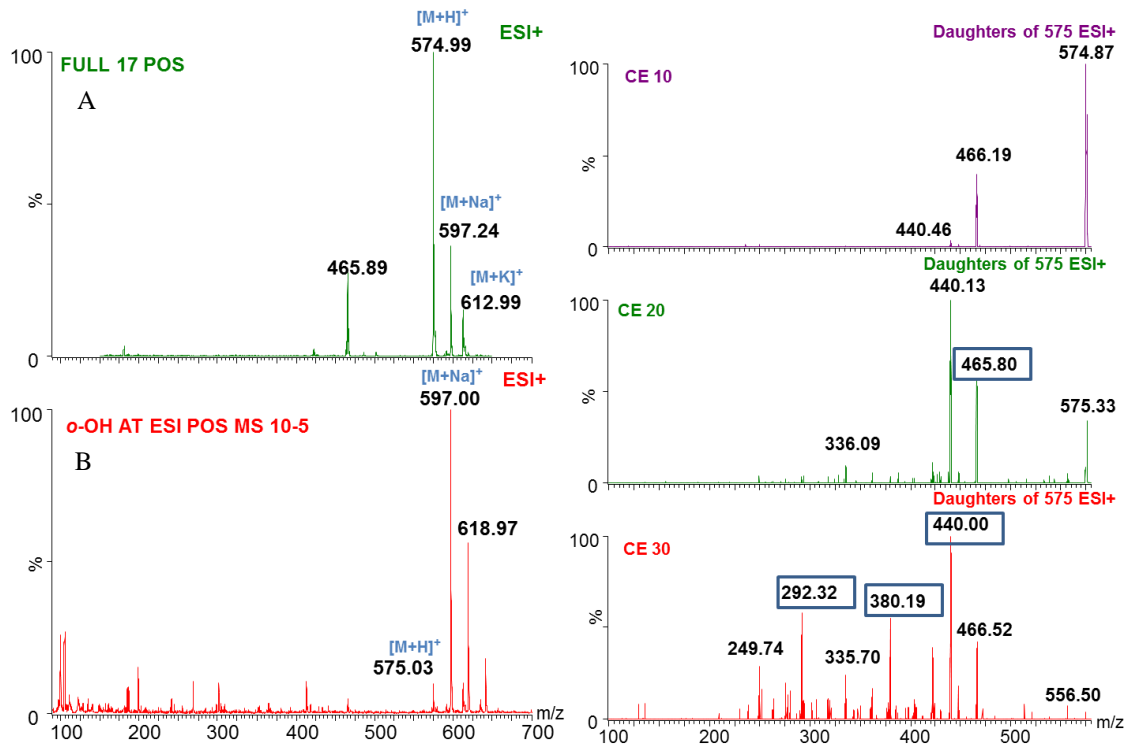
Obr. 58: Spektrum atorvastatinu laktonu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Atorvastatin lakton



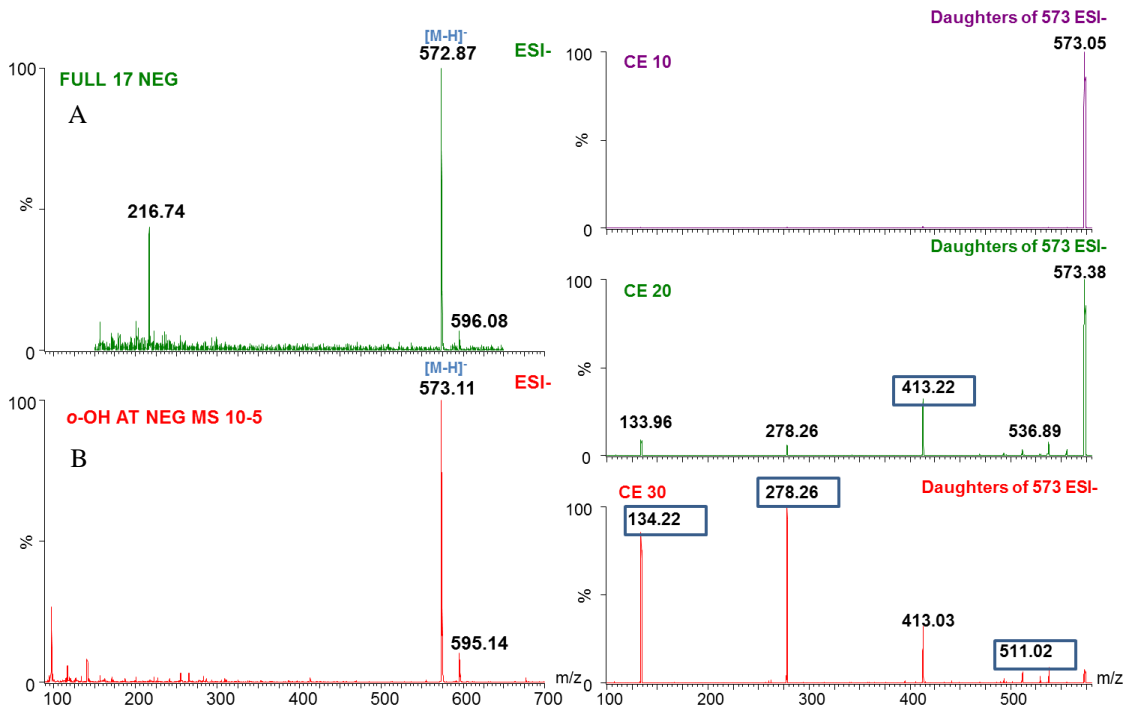
Obr. 59: Spektrum atorvastatinu laktonu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

o-Hydroxyatorvastatin



Obr. 60: Spektrum *o*-hydroxyatorvastatinu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

o-Hydroxyatorvastatin



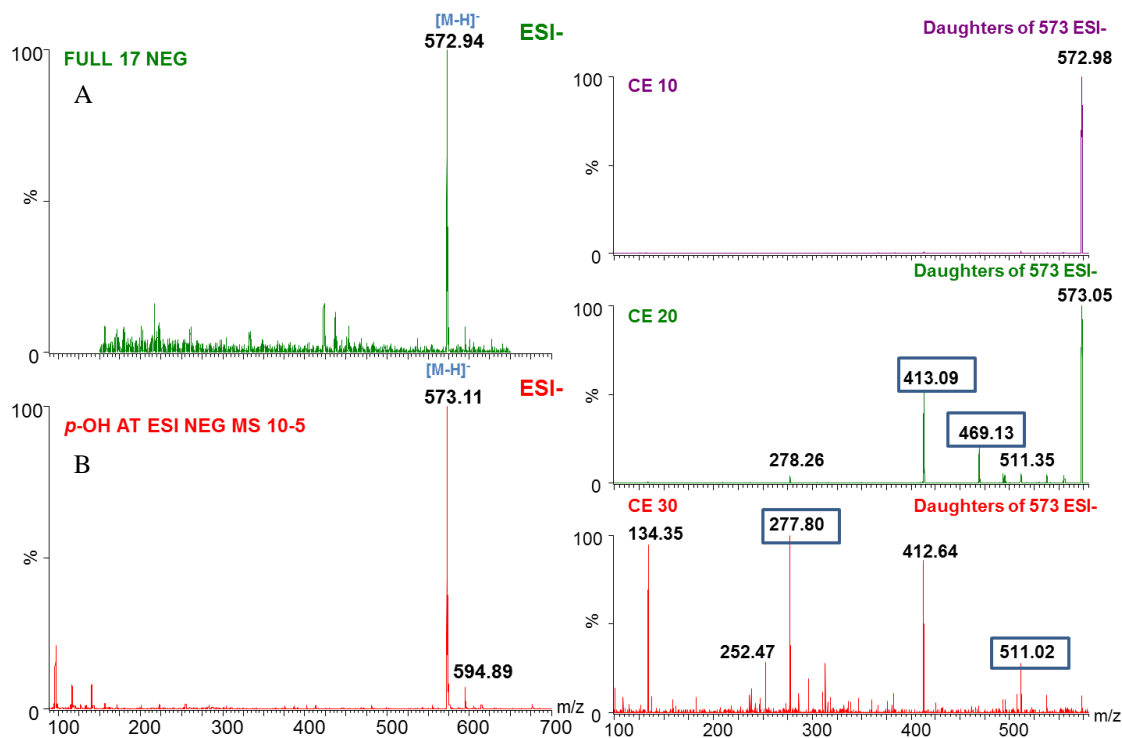
Obr. 61: Spektrum *o*-hydroxyatorvastatinu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

p-Hydroxyatorvastatin



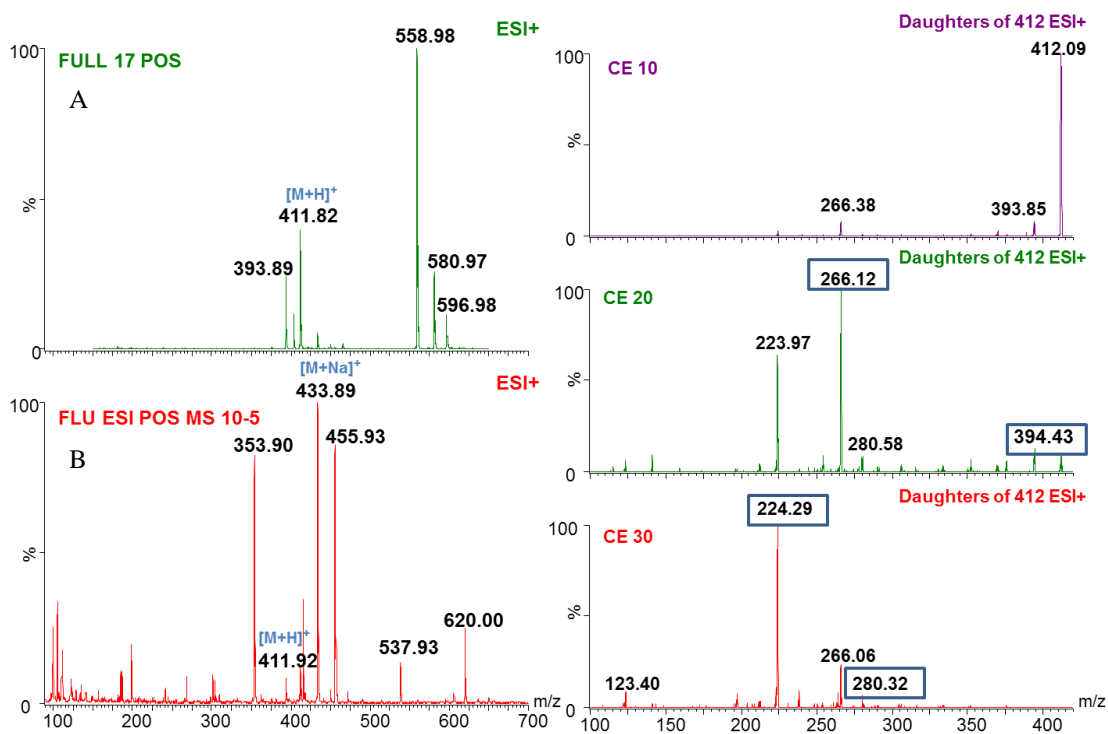
Obr. 62: Spektrum *p*-hydroxyatorvastatinu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

p-Hydroxyatorvastatin



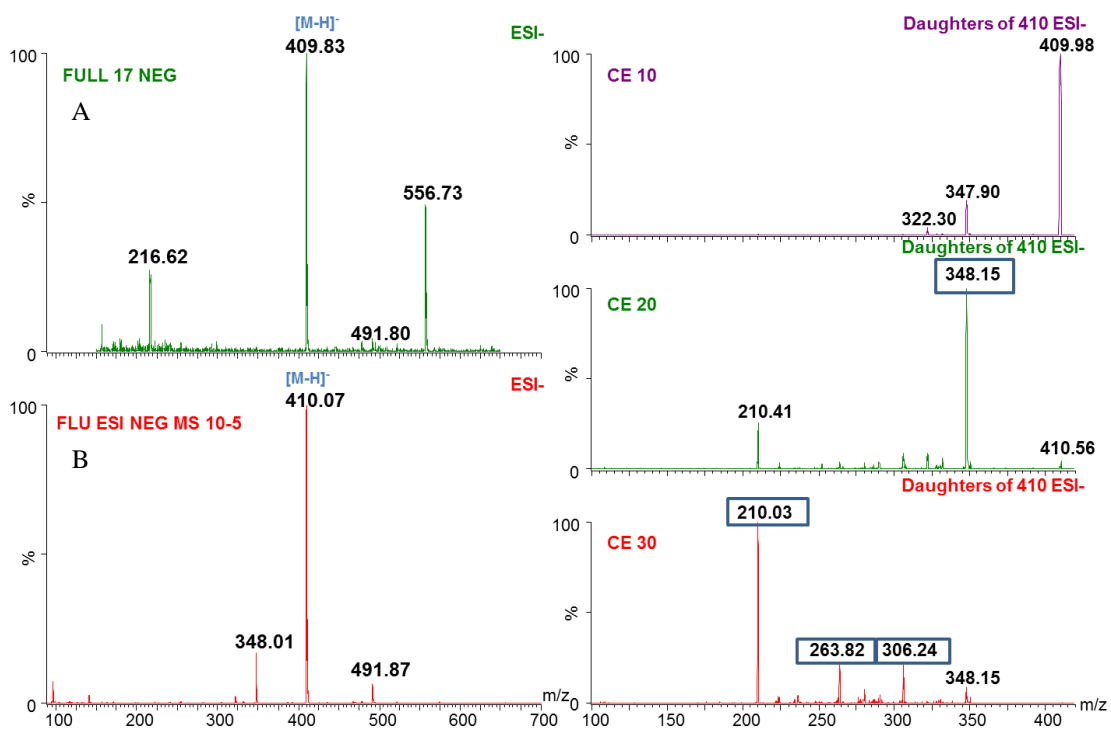
Obr. 63: Spektrum *p*-hydroxyatorvastatinu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Fluvastatin



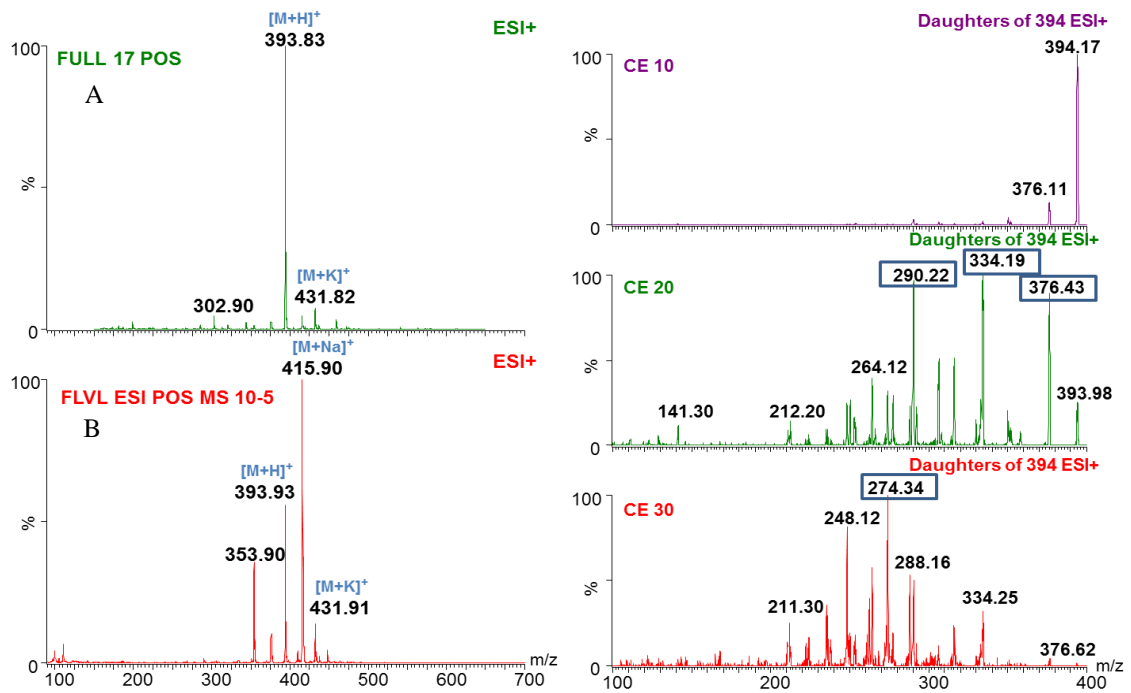
Obr. 64: Spektrum fluvastatinu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Fluvastatin



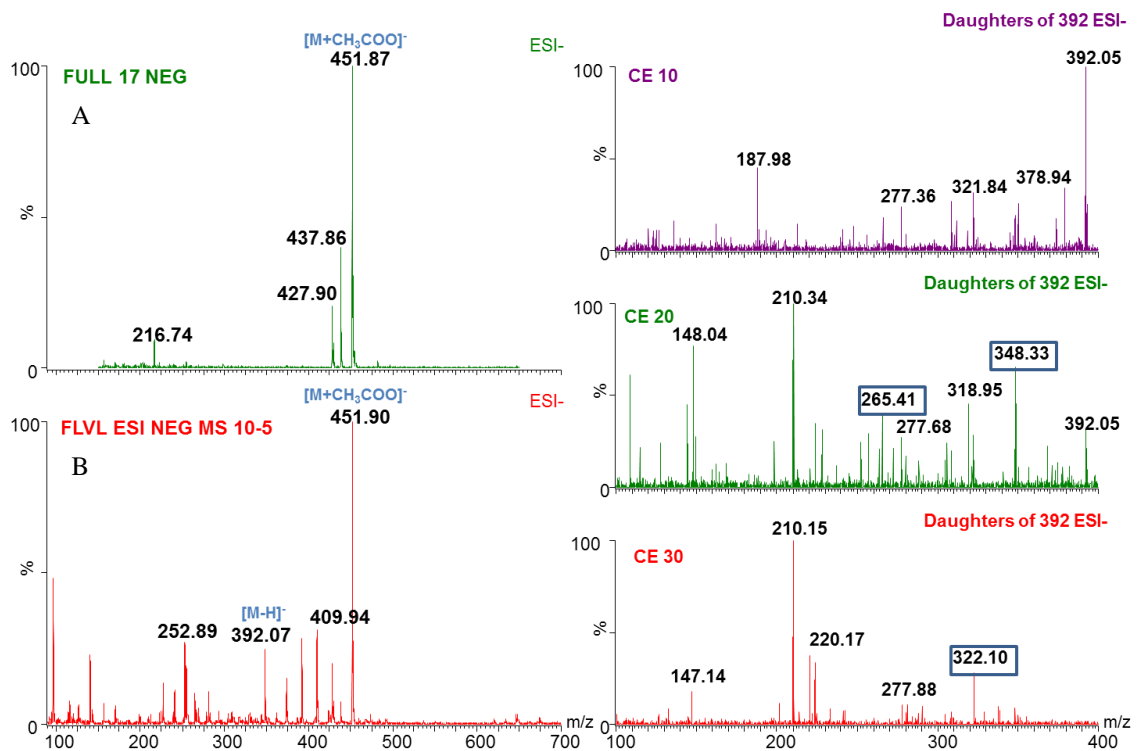
Obr. 65: Spektrum fluvastatinu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Fluvastatin lakton



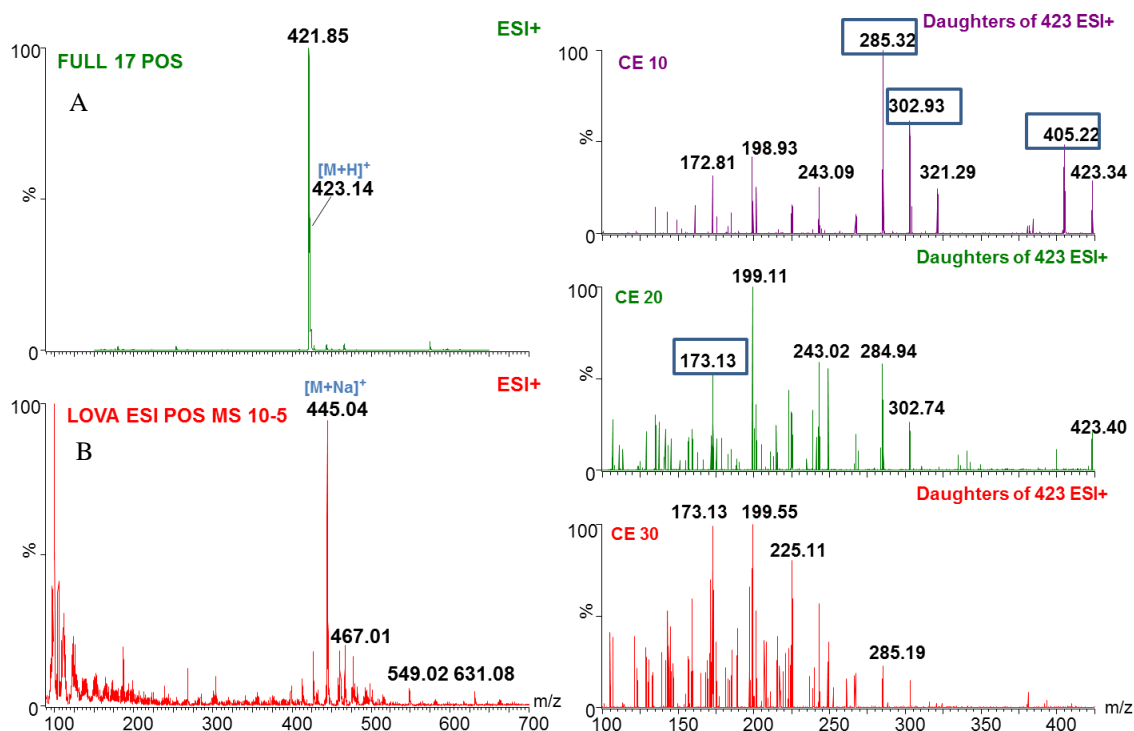
Obr. 66: Spektrum fluvastatinu laktonu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Fluvastatin lakton



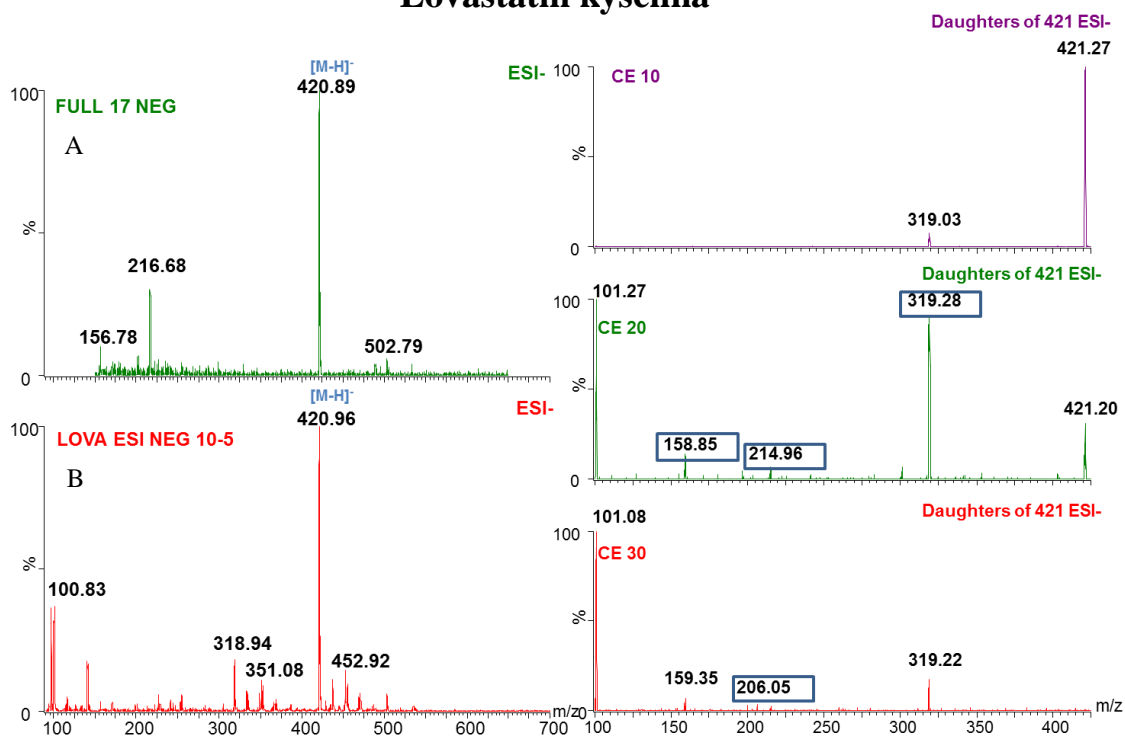
Obr. 67: Spektrum fluvastatinu laktonu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Lovastatin kyselina



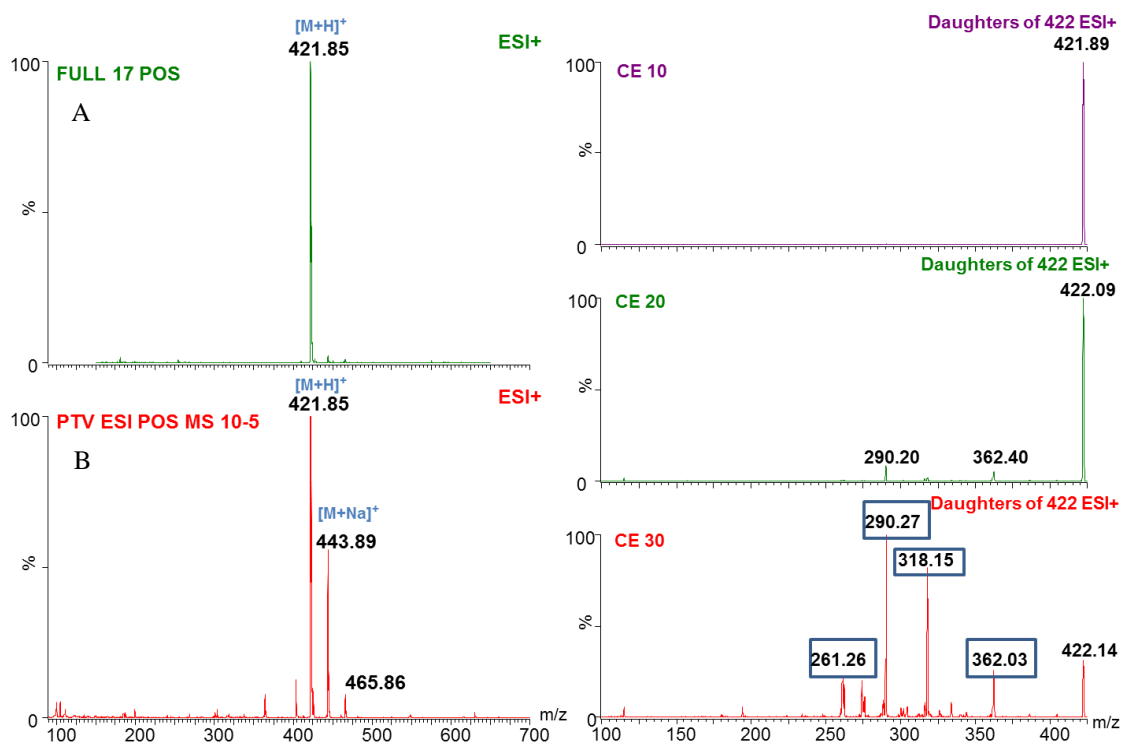
Obr. 68: Spektrum lovastatinu kyseliny v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Lovastatin kyselina



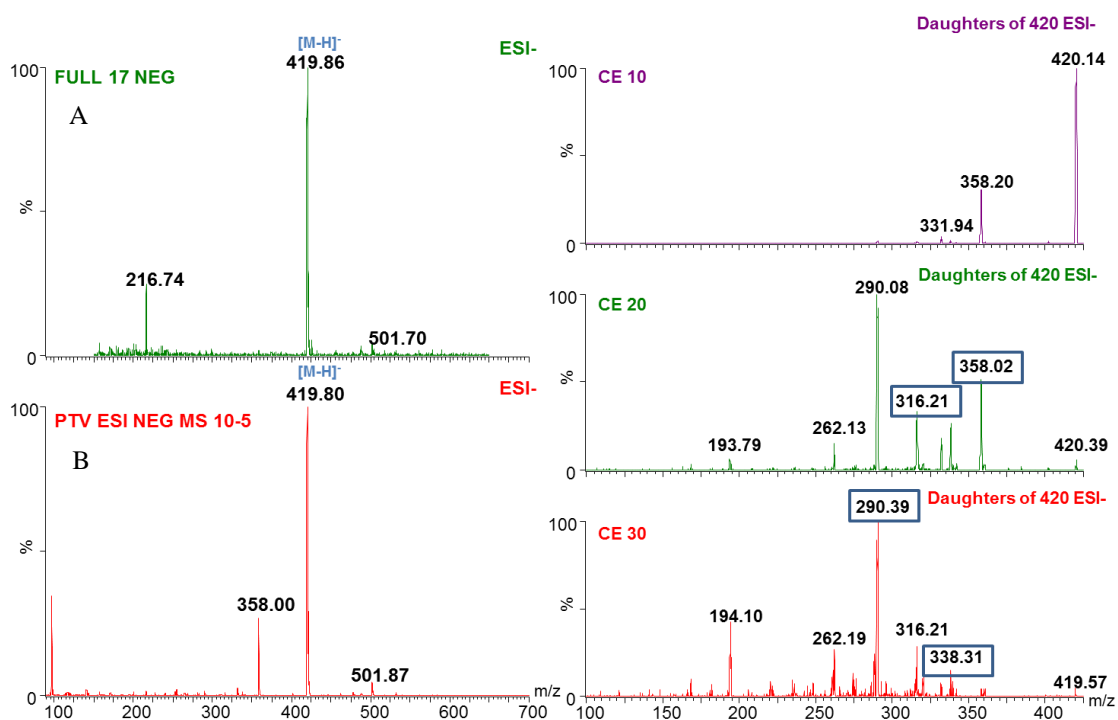
Obr. 69: Spektrum lovastatinu kyseliny v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Pitavastatin



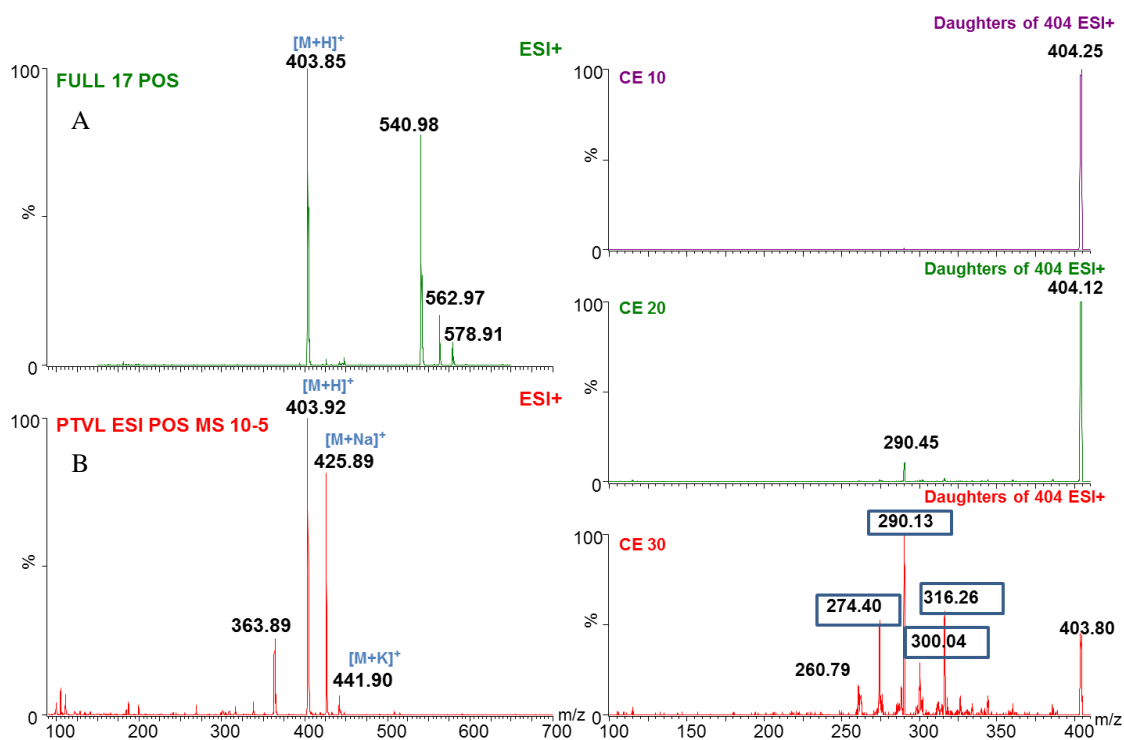
Obr. 70: Spektrum pitavastatinu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Pitavastatin



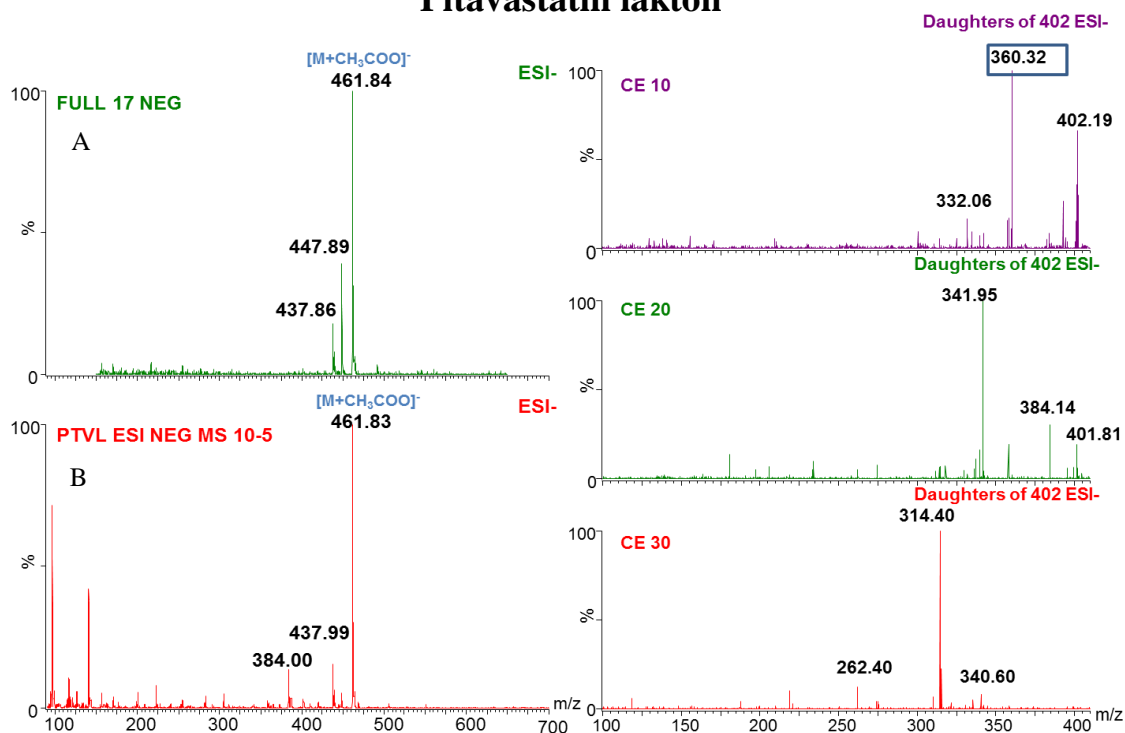
Obr. 71: Spektrum pitavastatinu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Pitavastatin lakton



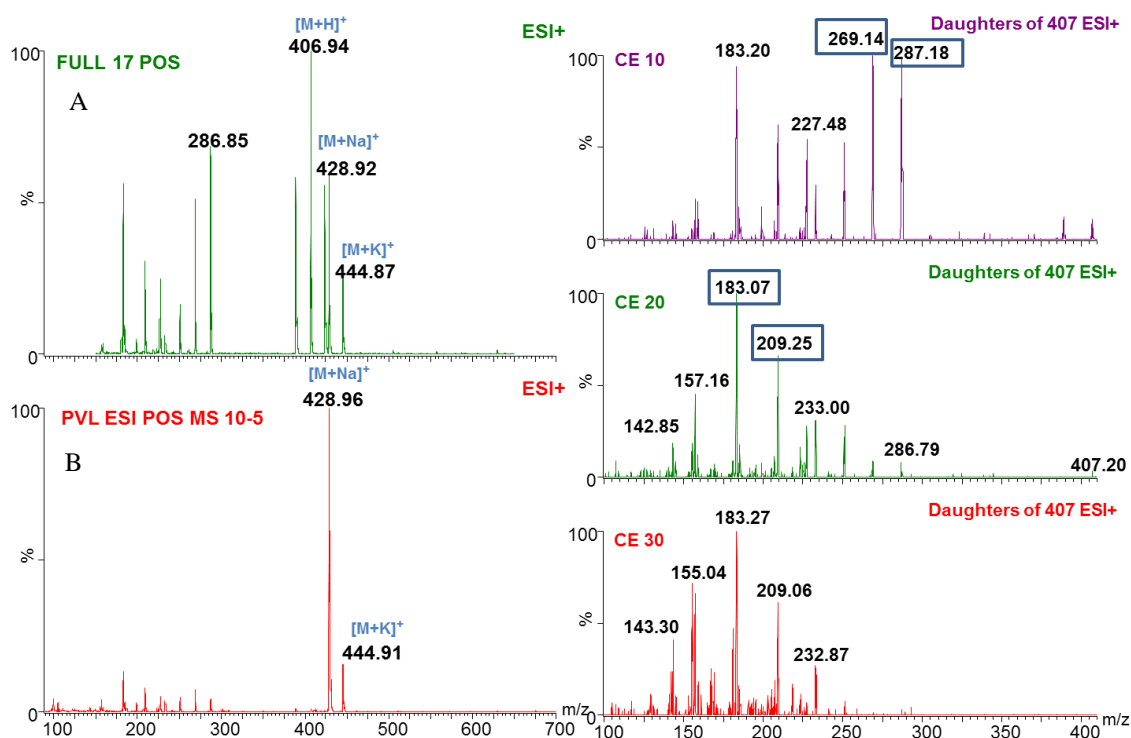
Obr. 72: Spektrum pitavastatinu laktonu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Pitavastatin lakton



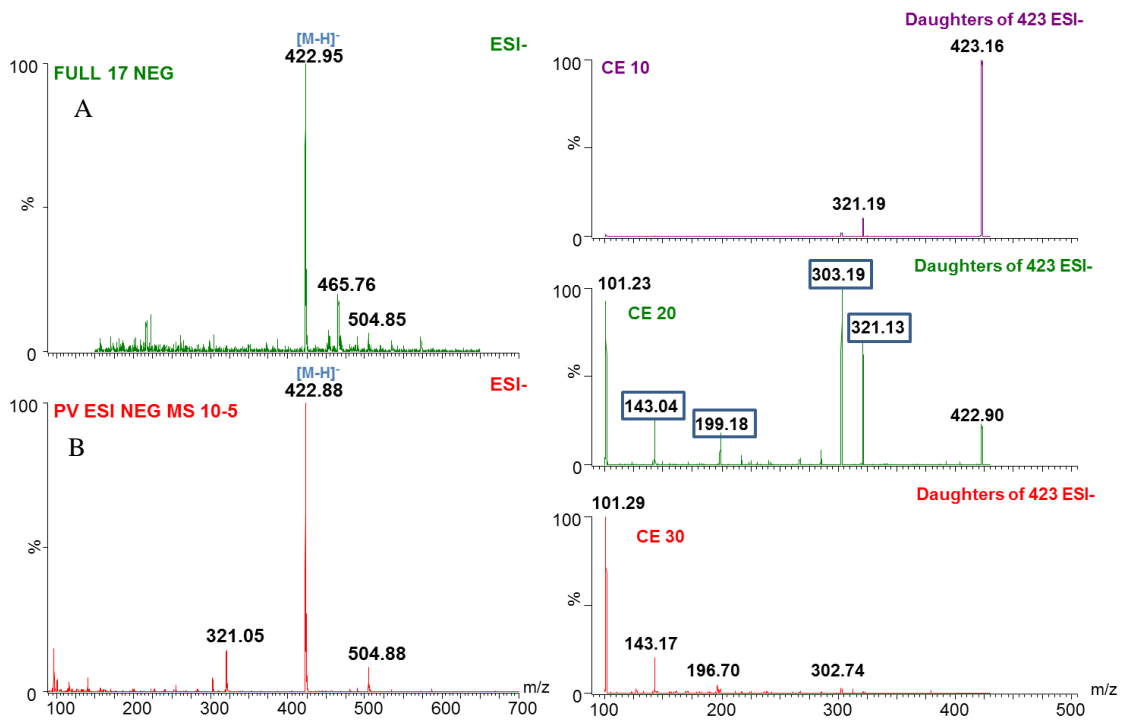
Obr. 73: Spektrum pitavastatinu laktonu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Pravastatin lakton



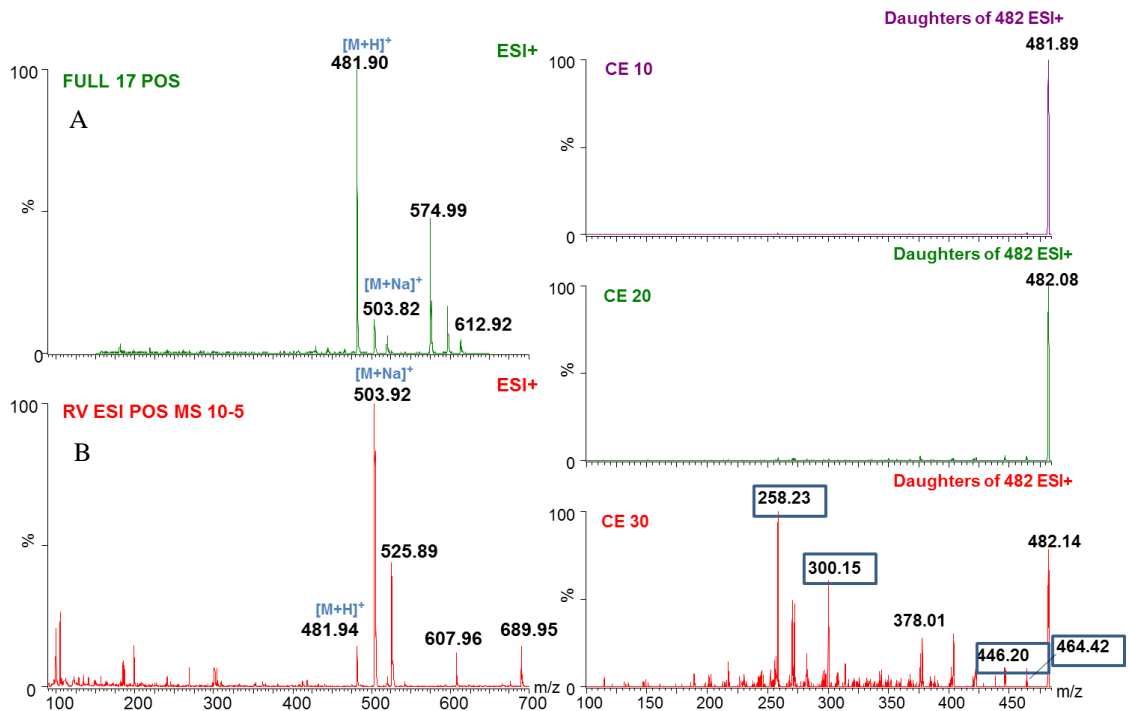
Obr. 74: Spektrum pravastatinu laktonu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Pravastatin



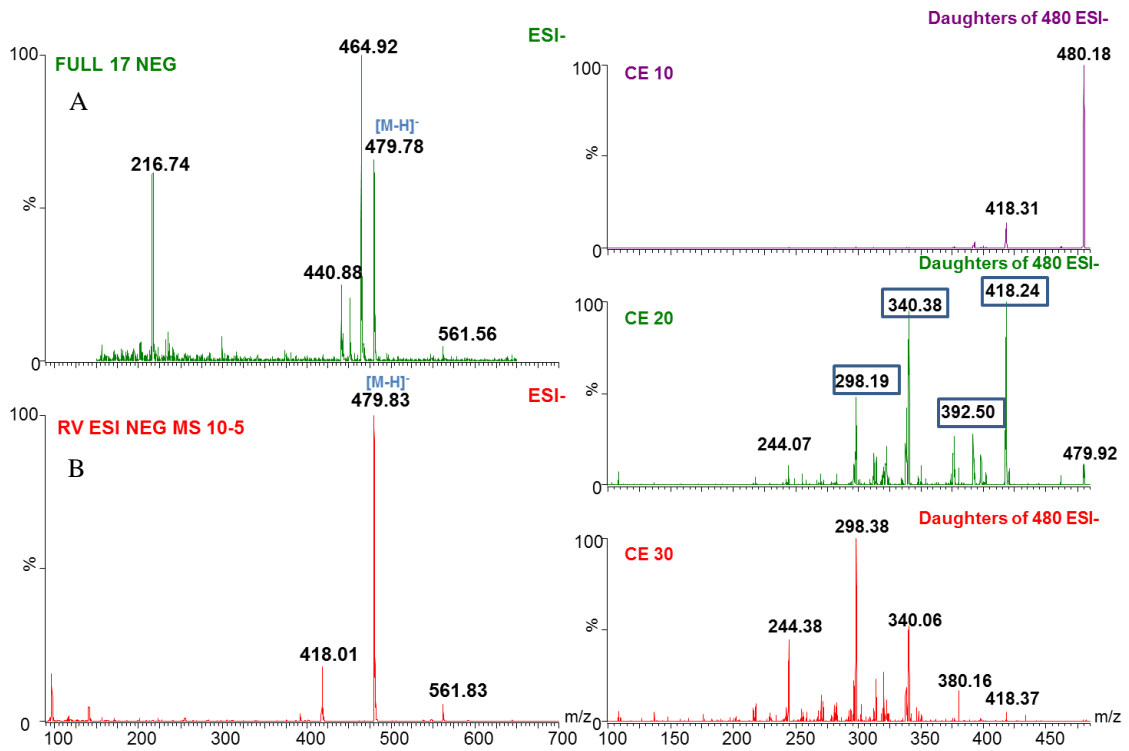
Obr. 75: Spektrum pravastatinu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Rosuvastatin



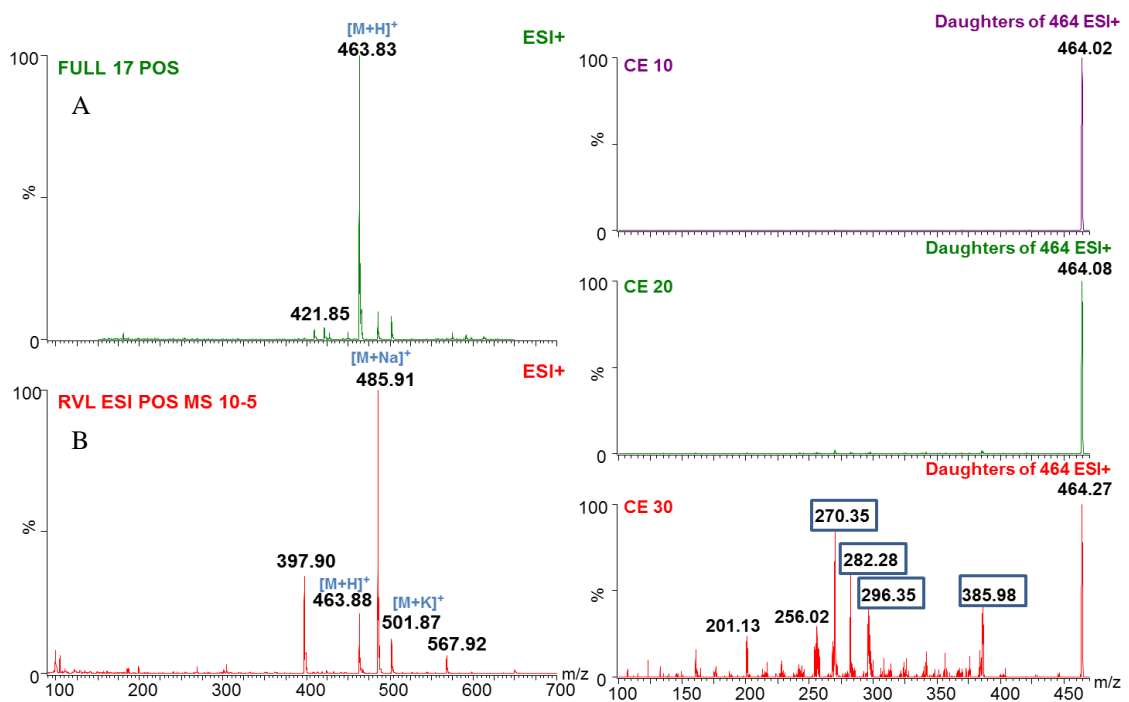
Obr. 76: Spektrum rosuvastatinu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Rosuvastatin



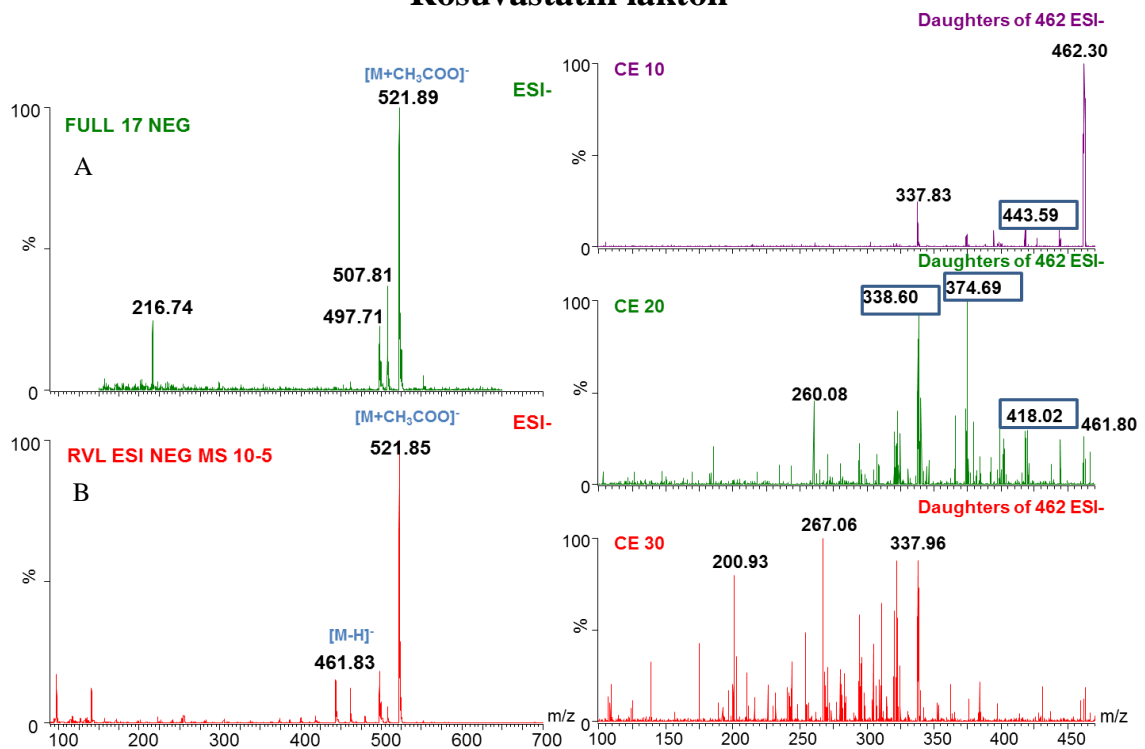
Obr. 77: Spektrum rosuvastatinu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Rosuvastatin lakton



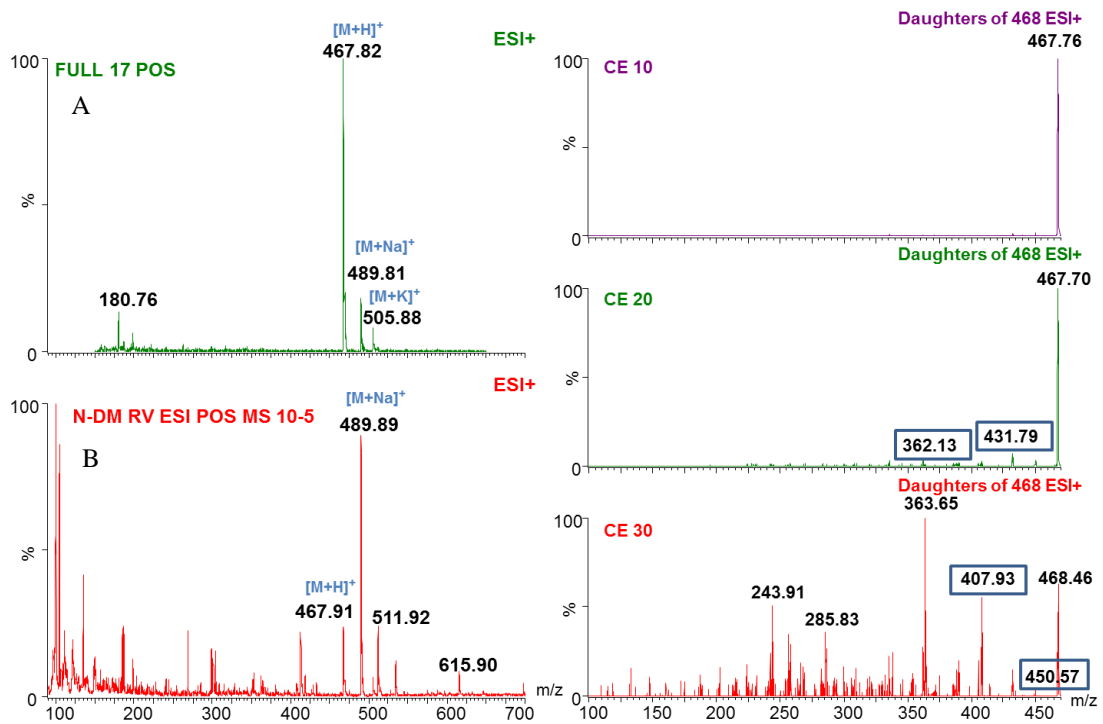
Obr. 78: Spektrum rosuvastatinu laktonu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Rosuvastatin lakton



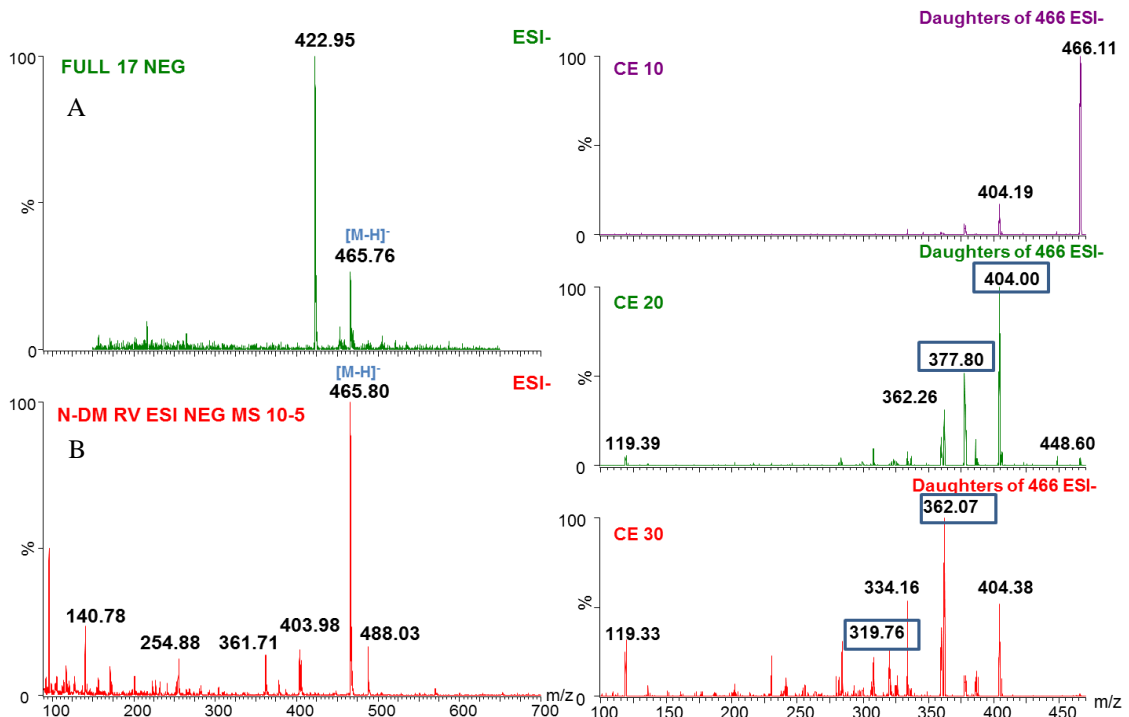
Obr. 79: Spektrum rosuvastatinu laktonu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

N-Desmethyrosuvastatin



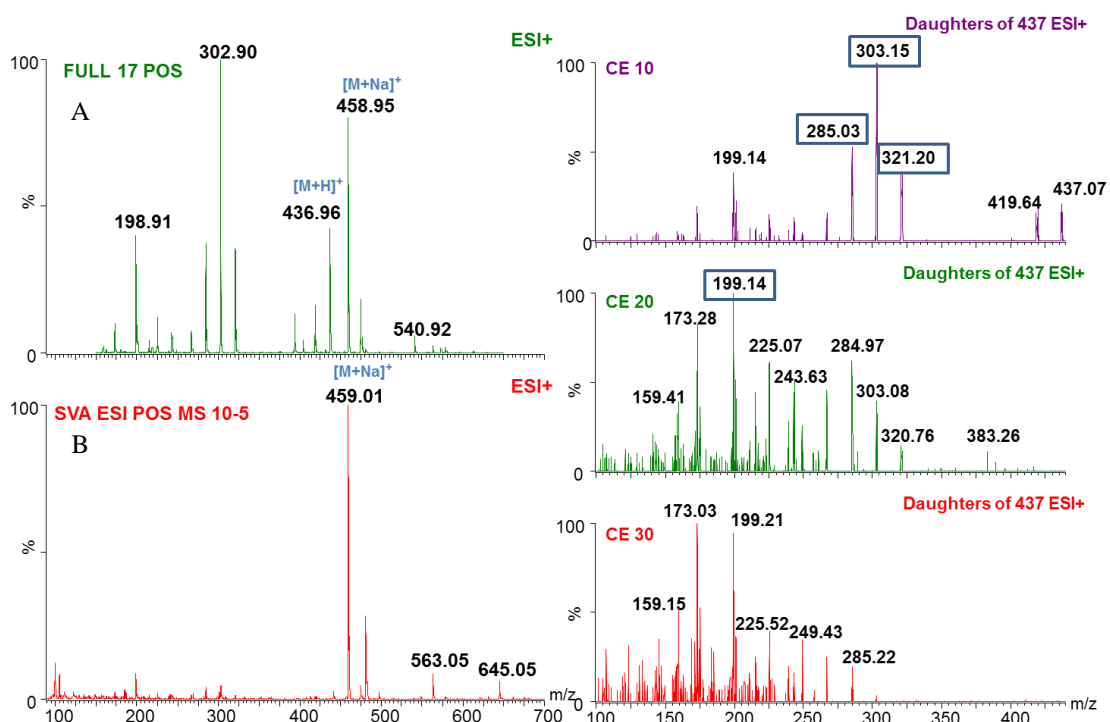
Obr. 80: Spektrum N-desmethyrosuvastatinu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

N-Desmethyrosuvastatin



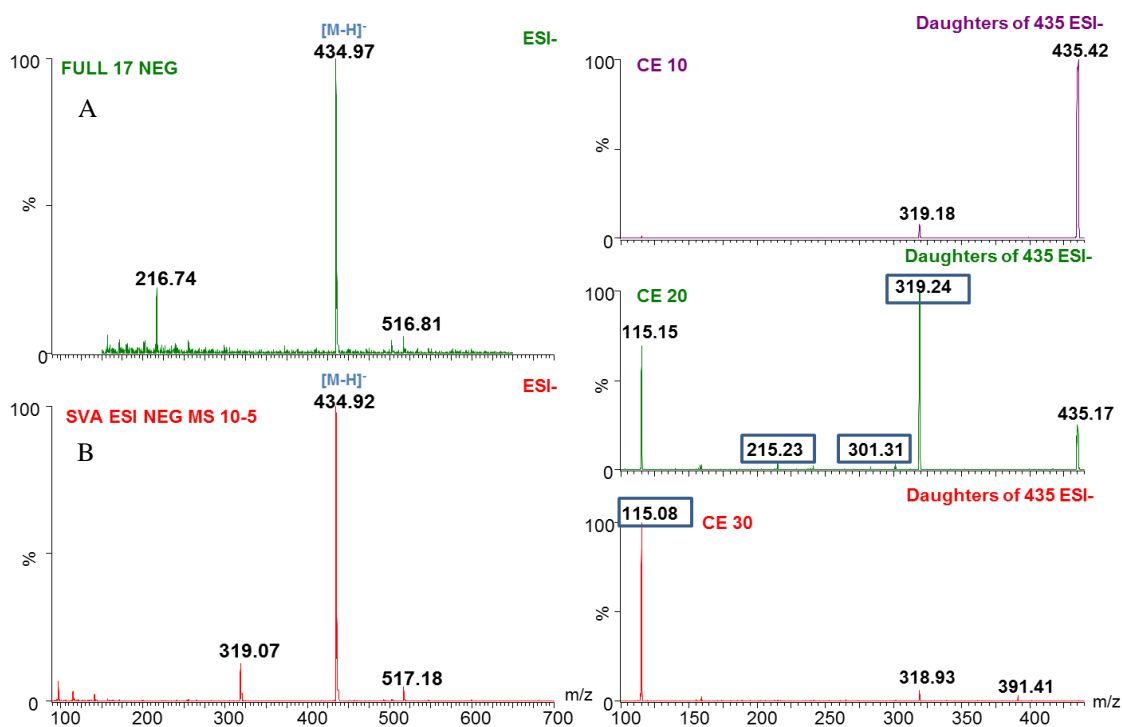
Obr. 81: Spektrum N-desmethyrosuvastatinu v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Simvastatin kyselina



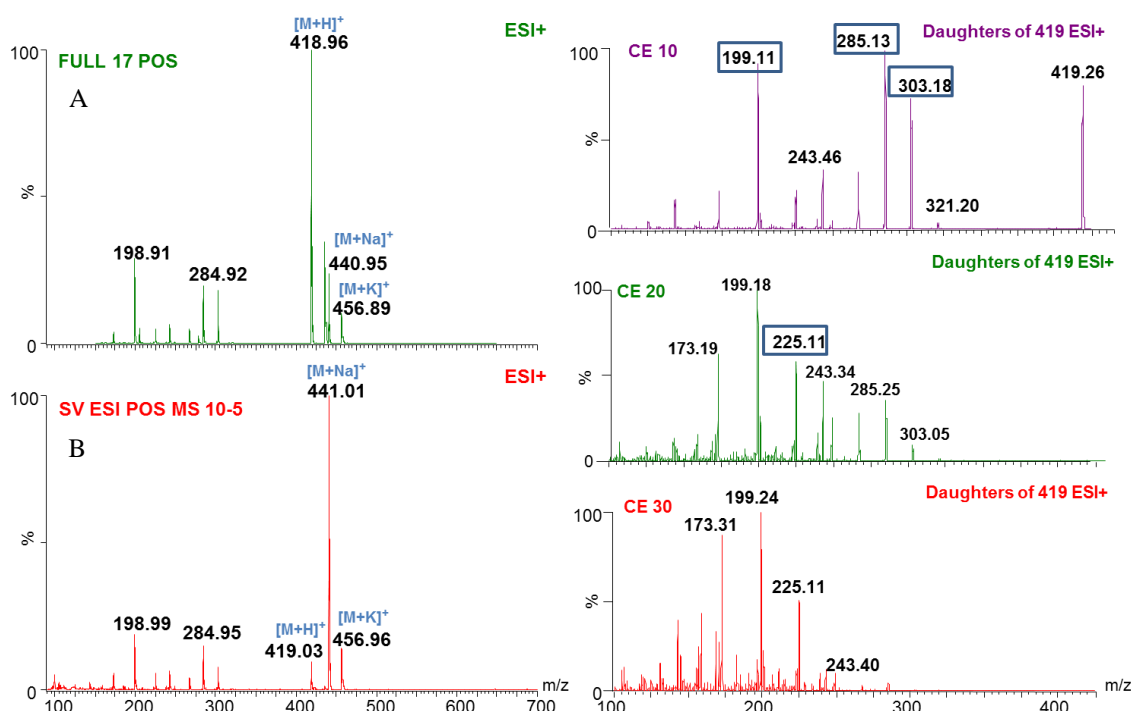
Obr. 82: Spektrum simvastatinu kyseliny v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Simvastatin kyselina



Obr. 83: Spektrum simvastatinu kyseliny v negativním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Simvastatin



Obr. 84: Spektrum simvastatinu v pozitivním módu ESI – základní sken (A), přímá infuze (B) a výběr produktových iontů (kolizní energie CE = 10 V, 20 V, 30 V)

Tabulky 10 a 11 shrnují výběr prekurzorových a produktových iontů (F1 – F4) v pozitivním i negativním módu elektrospreje hmotnostního spektrometru. Tabulky jsou také doplněny o napětí na vstupním kuželu (CV) a časové okno.

Název	PreI	F 1	F 2	F 3	F 4	CV	Okno
N-Desmethylosuvastatin	465,8	404,1	362,1	377,6	319,8	30	0 – 1,5
Pravastatin	422,9	303,2	321,3	143,2	199,2	30	0 – 1,5
Rosuvastatin	479,8	340,2	418,2	298,2	392,5	30	1,5 – 2,7
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	573,1	278,3	469,3	413,1	511,2	35	1,5 – 2,7
Pitavastatin	419,8	290,1	358,1	316,1	339,3	25	2,7 – 4,0
Rosuvastatin lakton	461,8	338,0	374,5	418,4	443,6	35	2,7 – 4,0
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	573,1	278,3	413,3	134,2	511,0	40	3,5 – 4,5
Fluvastatin	410,1	348,1	210,4	264,0	306,0	25	3,5 – 4,65
Atorvastatin	557,1	397,3	453,3	278,3	479,3	40	3,5 – 4,65
Lovastatin kyselina	420,9	319,2	158,9	215,0	206,0	25	4,5 – 5,3
Pitavastatin lakton	402,1	360,3	-	-	-	25	4,7 – 6,2
Simvastatin kyselina	434,9	319,2	215,1	115,1	301,3	30	4,7 – 6,2
Atorvastatin lakton	539,2	397,4	278,2	479,3	453,8	30	4,7 – 6,2
Fluvastatin lakton	392,1	348,4	266,1	322,4	-	25	4,7 – 6,2

Tab. 10 : Výběr produktových iontů (F1 – F4) v negativním módu ESI, napětí na vstupním kuželu (CV) a časové okno

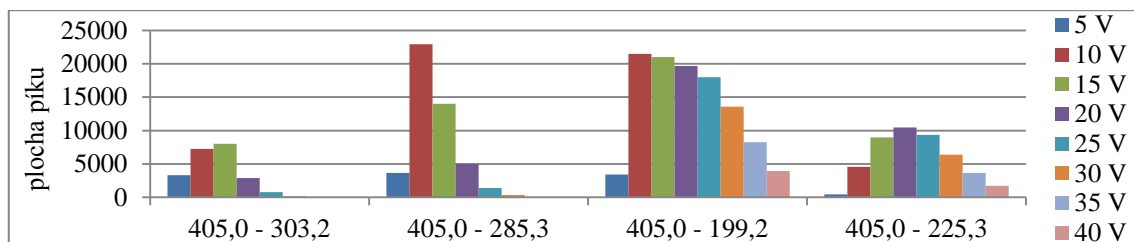
Název	PreI	F 1	F 2	F 3	F 4	CV	Okno
N-Desmethylrosuvastatin	467,9	362,1	408,0	432,1	450,6	50	0 – 1,5
Pravastatin	424,9	233,4	360,6	287,0	232,6	-	0 – 1,5
Pravastatin lakton	407,0	287,2	269,1	209,3	183,2	20	1,5 – 2,7
Rosuvastatin	481,9	446,3	464,4	258,2	300,2	45	1,5 – 2,7
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	575,0	440,2	466,2	292,5	357,4	35	1,5 – 2,7
Pitavastatin	421,9	290,2	362,2	318,2	261,3	45	2,7 – 4,0
Rosuvastatin lakton	463,9	270,3	386,0	296,4	282,2	50	2,7 – 4,0
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	575,0	466,4	440,2	380,2	292,2	25	3,5 – 4,5
Fluvastatin	411,9	266,3	224,4	394,2	280,3	25	3,5 – 4,65
Atorvastatin	559,0	440,2	466,4	292,2	380,1	30	3,5 – 4,65
Lovastatin kyselina	422,9	285,4	405,3	173,3	302,9	10	4,5 – 5,3
Pitavastatin lakton	403,9	290,2	316,0	274,3	300,0	45	4,7 – 6,2
Simvastatin kyselina	437,0	303,2	285,2	199,1	321,2	10	4,7 – 6,2
Atorvastatin lakton	541,0	448,1	422,2	380,1	292,0	25	4,7 – 6,2
Fluvastatin lakton	394,1	290,1	334,2	376,1	274,2	25	4,7 – 6,2
Lovastatin	405,0	303,2	285,3	199,2	225,3	20	6,0 – 7,0
Simvastatin	419,0	303,1	285,1	199,1	225,2	20	7,0 – 9,5

Tab. 11: Výběr produktových iontů (F1 – F4) v pozitivním módu ESI, napětí na vstupním kuželu (CV) a časové okno

5.5 Optimalizace iontových přechodů

Při optimalizaci byl sledován iontový přechod mezi prekurzorovým iontem $[M+H]^+$ v pozitivním módu nebo prekurzorovým iontem $[M-H]^-$ v negativním módu a postupně každým ze čtyř vybraných produktových iontů, které byly zvoleny z výše zobrazených spekter. V rámci optimalizace byla také zvolena nejvýhodnější hodnota kolizní energie pro každý iontový přechod.

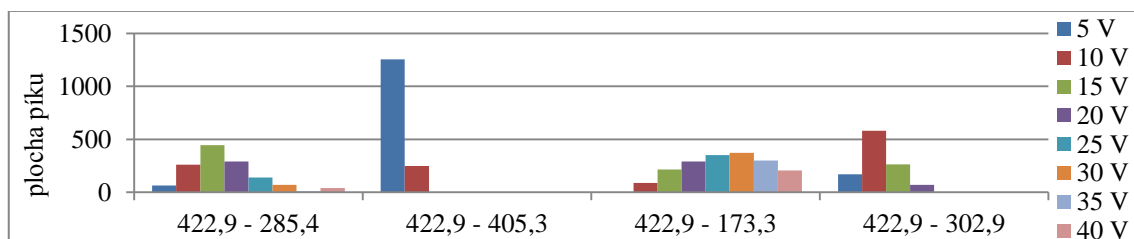
Lovastatin



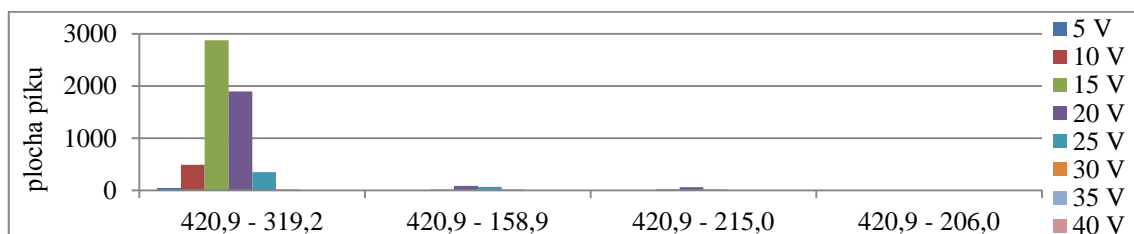
Obr. 85: Optimalizace iontového přechodu pro lovastatin v pozitivním módu ESI

U lovastatinu bylo dosaženo použitelných výsledků pouze v pozitivním módu, byl vybrán iontový přechod $405,0 \rightarrow 285,3$ a kolizní energie (CE) 10 V (Obr. 85). Lovastatin představující laktonovou formu neposkytuje dobrou odezvu v negativním módu, protože postrádá funkční skupinu odštěpující proton H^+ . Velmi nízkou odezvu poskytovaly i další analyty v laktonové formě: fluvastatin lakton, pitavastatin lakton, pravastatin lakton a simvastatin.

Lovastatin kyselina



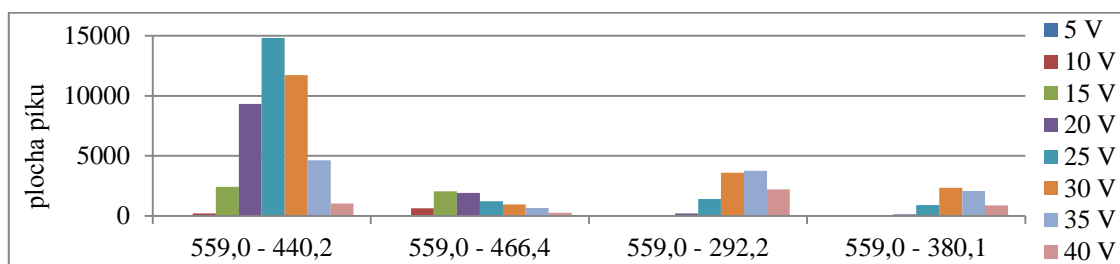
Obr. 86: Optimalizace iontového přechodu pro lovastatin kyselinu v pozitivním módu ESI



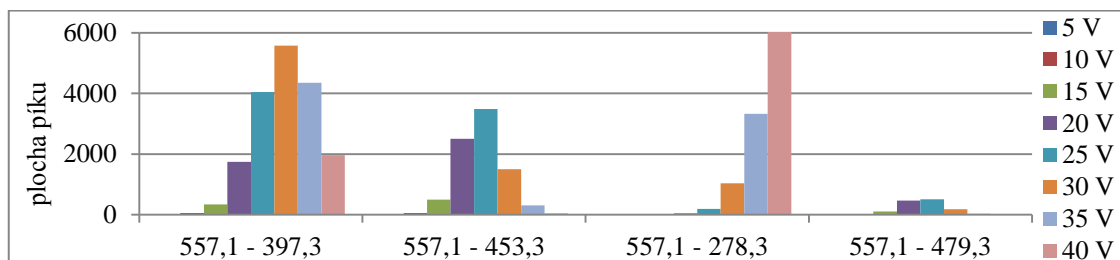
Obr. 87: Optimalizace iontového přechodu pro lovastatin kyselinu v negativním módu ESI

U tohoto statinu byl zvolen v pozitivním módu iontový přechod $422,9 \rightarrow 405,3$ při kolizní energii 5 V (Obr. 86), v negativním módu $420,9 \rightarrow 319,2$ při CE 15 V (Obr. 87).

Atorvastatin



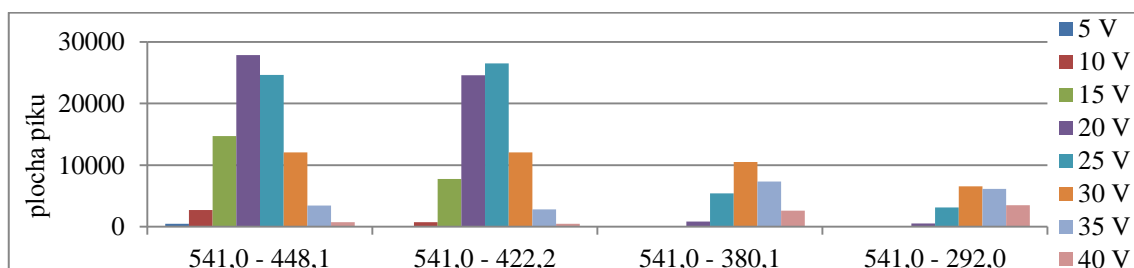
Obr. 88: Optimalizace iontového přechodu pro atorvastatin v pozitivním módu ESI



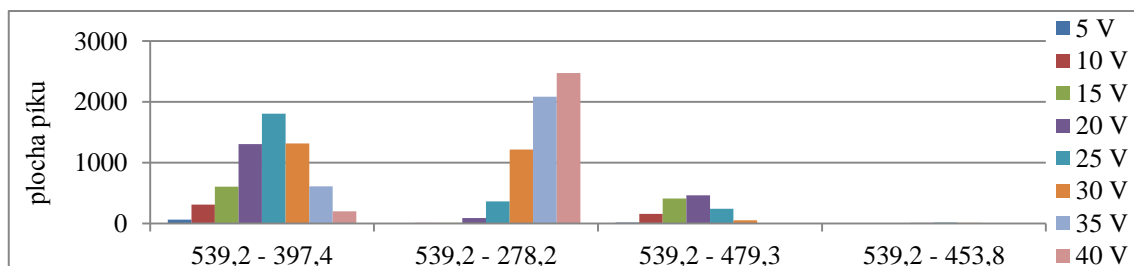
Obr. 89: Optimalizace iontového přechodu pro atorvastatin v negativním módu ESI

Při měření atorvastatinu v pozitivním módu bylo dosaženo největší odezvy u iontového přechodu 559,0 → 440,2 při kolizní energii 25 V (Obr. 88), v negativním módu to byl přechod 557,1 → 278,3 při kolizní energii 40 V (Obr. 89).

Atorvastatin lakton



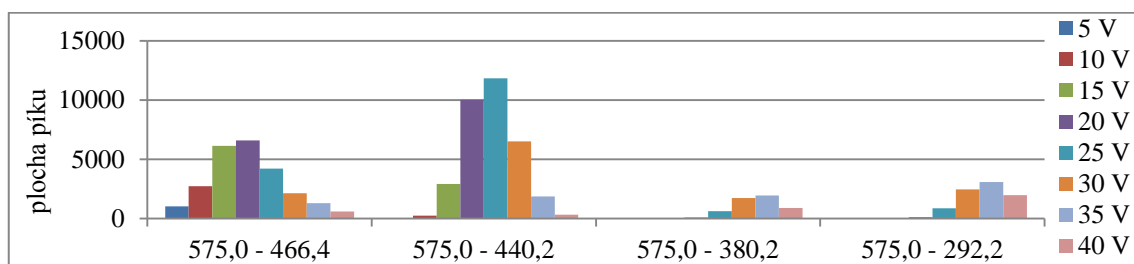
Obr. 90: Optimalizace iontového přechodu pro atorvastatin lakton v pozitivním módu ESI



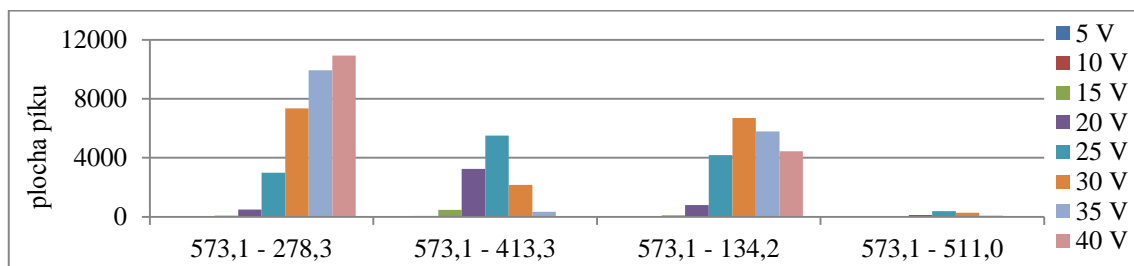
Obr. 91: Optimalizace iontového přechodu pro atorvastatin lakton v negativním módu ESI

Pro pozitivní mód atorvastatinu laktonu byl vybrán iontový přechod 541,0 → 448,1 při kolizní energii 20 V (Obr. 90), pro mód negativní 539,2 → 278,2 při kolizní energii 40 V (Obr. 91).

o-Hydroxyatorvastatin



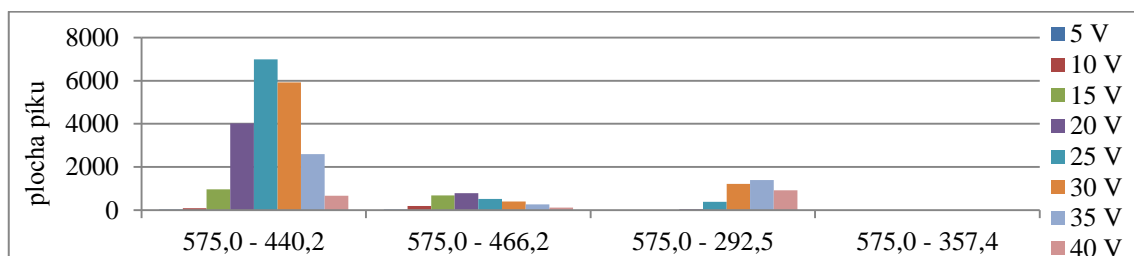
Obr. 92: Optimalizace iontového přechodu pro *o*-hydroxyatorvastatin v pozitivním módu ESI



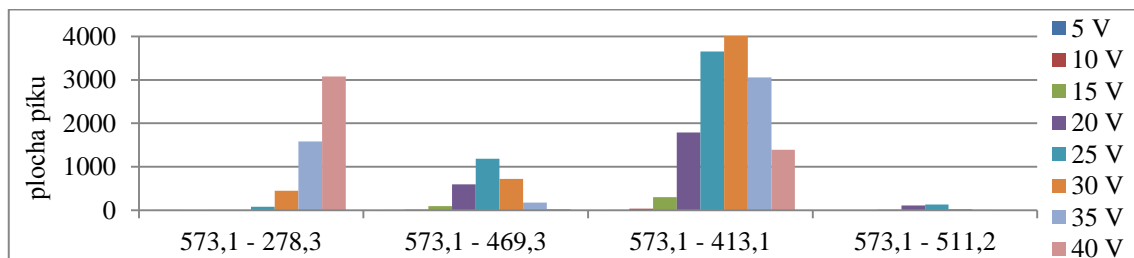
Obr. 93: Optimalizace iontového přechodu pro *o*-hydroxyatorvastatin v negativním módu ESI

Nejlepší hodnoty odezvy u *o*-hydroxylovaného atorvastatinu byly získány u iontového přechodu 575,0 → 440,2 při kolizní energii 25 V (Obr. 92). V negativním módu to byl přechod 573,1 → 278,3 při kolizní energii 40 V (Obr. 93).

p-Hydroxyatorvastatin



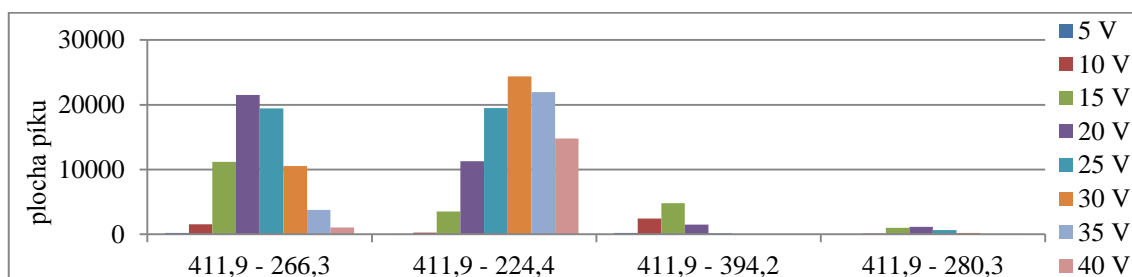
Obr. 94: Optimalizace iontového přechodu pro *p*-hydroxyatorvastatin v pozitivním módu ESI



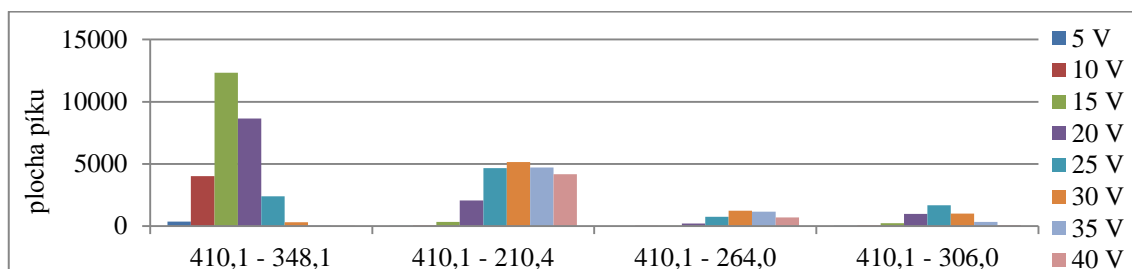
Obr. 95: Optimalizace iontového přechodu pro *p*-hydroxyatorvastatin v negativním módu ESI

Stejně jako u *o*-hydroxyatorvastatinu byl u *p*-hydroxyatorvastatinu v pozitivním módu zvolen iontový přechod 575,0 → 440,2 při stejné kolizní energii 25 V (Obr. 94). Negativní mód byl odlišný, 573,1 → 413,1 při CE 30 V (Obr. 95).

Fluvastatin



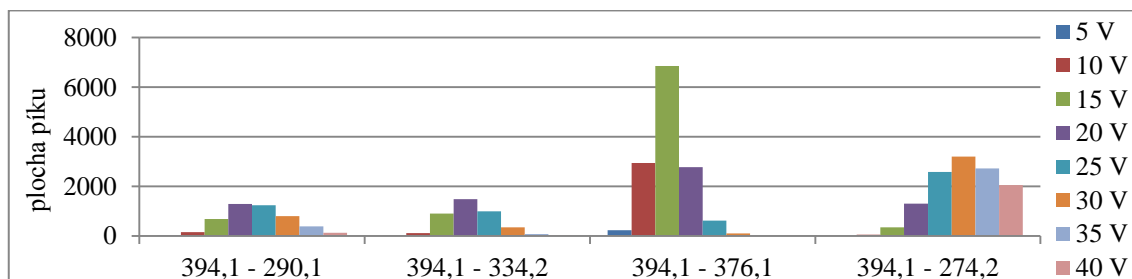
Obr. 96: Optimalizace iontového přechodu pro fluvastatin v pozitivním módu ESI



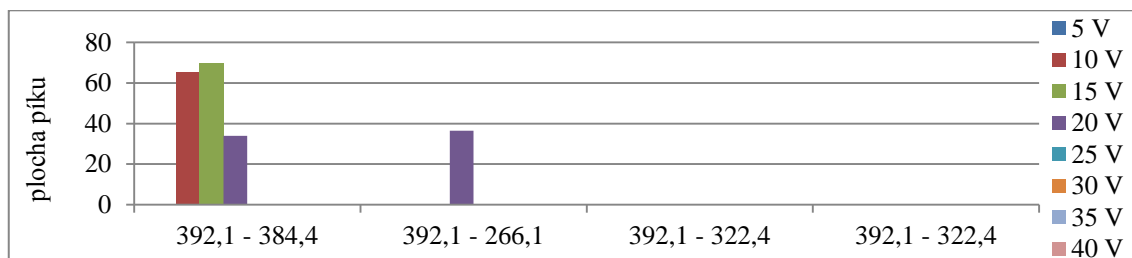
Obr. 97: Optimalizace iontového přechodu pro fluvastatin v negativním módu ESI

V pozitivním módu byl jako nejvýhodnější shledán iontový přechod 411,9 → 224,4 při CE 30 V (Obr. 96), v negativním módu 410,1 → 348,1 při CE 15 V (Obr. 97).

Fluvastatin lakton



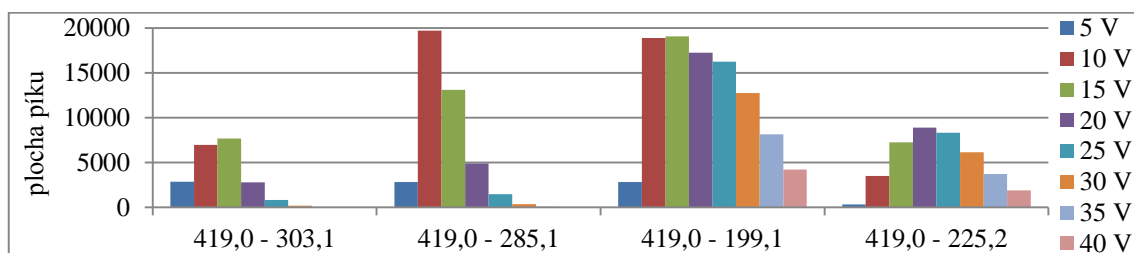
Obr. 98: Optimalizace iontového přechodu pro fluvastatin lakton v pozitivním módu ESI



Obr. 99: Optimalizace iontového přechodu pro fluvastatin lakton v negativním módu ESI

Pro pozitivní mód byl vybrán přechod 394,1 → 376,1 při kolizní energii 15 V (Obr. 98), v negativním módu byla odezva minimální (Obr. 99).

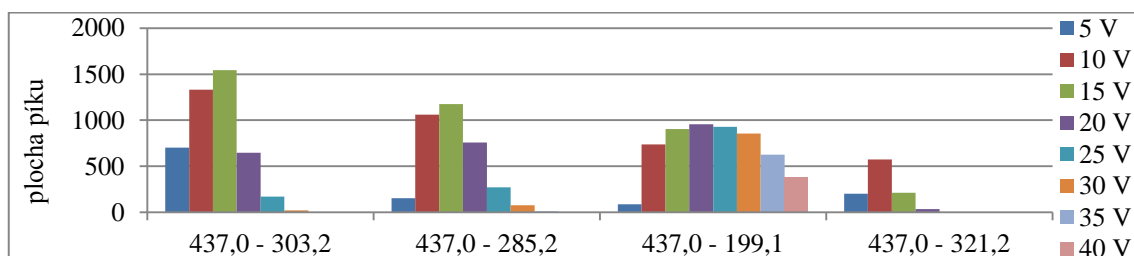
Simvastatin



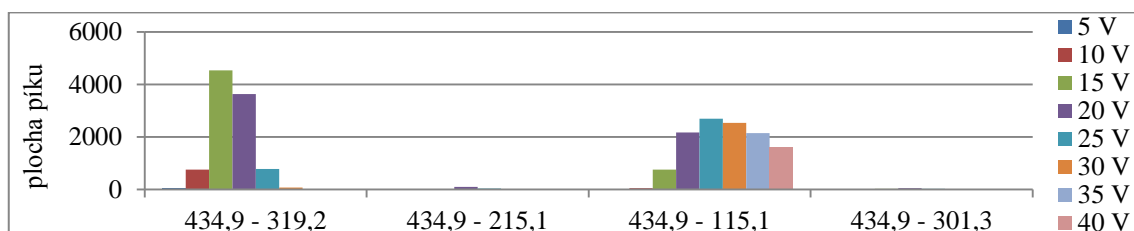
Obr. 100: Optimalizace iontového přechodu pro simvastatin v pozitivním módu ESI

Při měření simvastatinu bylo dosaženo dobrých výsledků jen v pozitivním módu, zvolen byl iontový přechod 419,0 → 285,1 a CE 10 V (Obr. 100).

Simvastatin kyselina



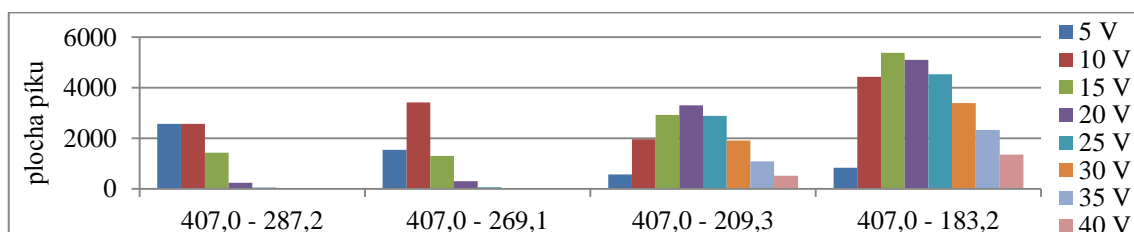
Obr. 101: Optimalizace iontového přechodu pro simvastatin kyselinu v pozitivním módu ESI



Obr. 102: Optimalizace iontového přechodu pro simvastatin kyselinu v negativním módu ESI

U simvastatinu kyseliny v pozitivním módu byla získána největší odezva u iontového přechodu 437,0 → 303,2 při CE 15 V (Obr. 101), v módu negativním 434,9 → 319,2 při CE 15 V (Obr. 102).

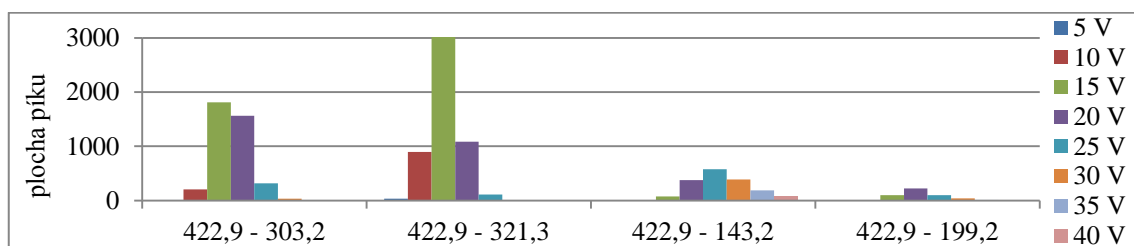
Pravastatin lakton



Obr. 103: Optimalizace iontového přechodu pro pravastatin lakton v pozitivním módu ESI

U pravastatinu ve formě laktonu byl zvolen iontový přechod pouze v pozitivním módu 407,0 → 183,2 při CE 15 V (Obr. 103).

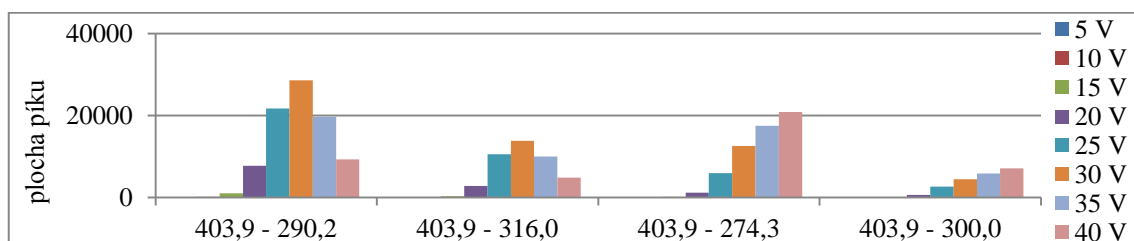
Pravastatin



Obr. 104: Optimalizace iontového přechodu pro pravastatin v negativním módu ESI

Pro molekulu pravastatinu byl vybrán iontový přechod pouze v negativním módu, a to 422,9 → 321,3 při kolizní energii 15 V (Obr. 104).

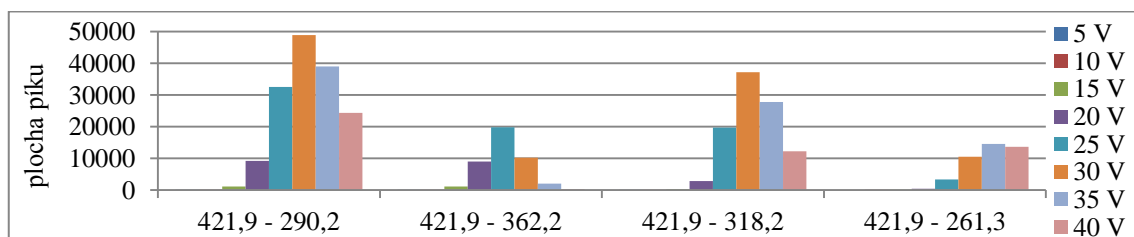
Pitavastatin lakton



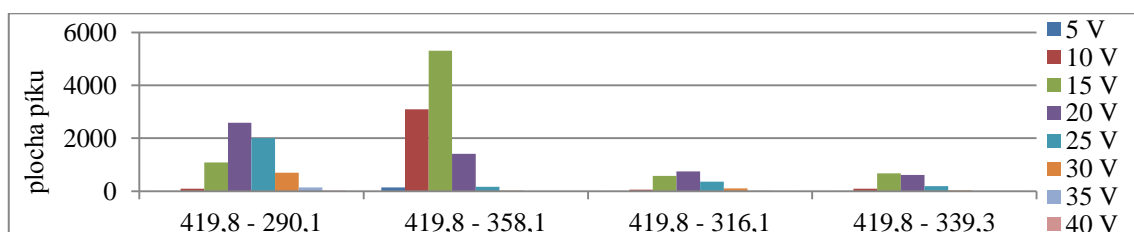
Obr. 105: Optimalizace iontového přechodu pro pitavastatin lakton v pozitivním módu ESI

U tohoto statinu ve formě laktonu nebyla naměřena dostatečná plocha píku u iontových přechodů v negativním módu. V pozitivním módu byly naměřeny nejlepší hodnoty odezvy u přechodu 403,9 → 290,2 při CE 30 V (Obr. 105).

Pitavastatin



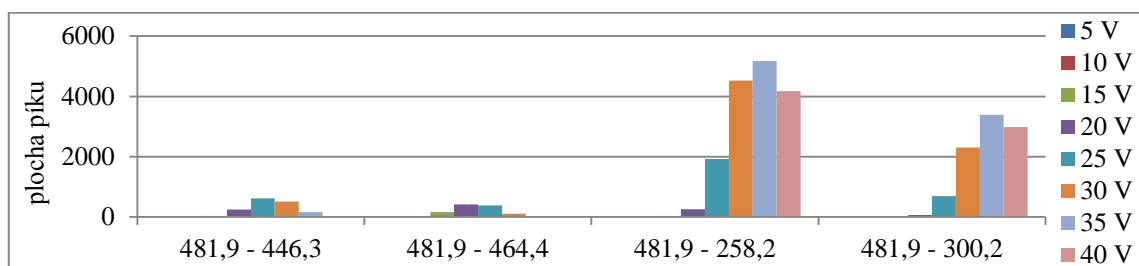
Obr. 106: Optimalizace iontového přechodu pro pitavastatin v pozitivním módu ESI



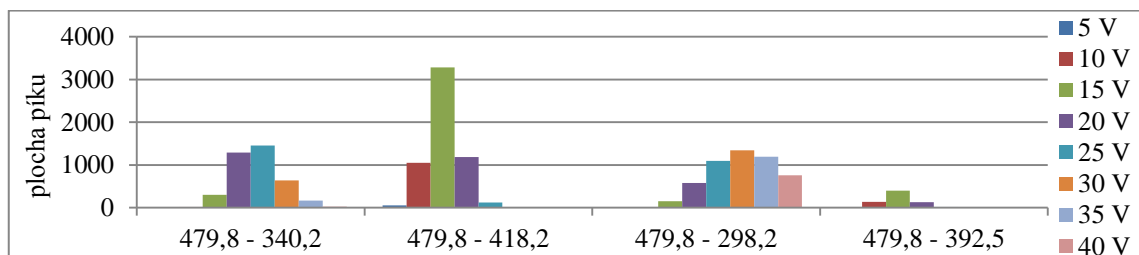
Obr. 107: Optimalizace iontového přechodu pro pitavastatin v negativním módu ESI

V pozitivním módu dosáhl největší odezvy iontový přechod 421,9 → 290,2 při CE 30 V (Obr. 106), v módu negativním to byl přechod 419,8 → 358,1 při CE 15 V (Obr. 107).

Rosuvastatin



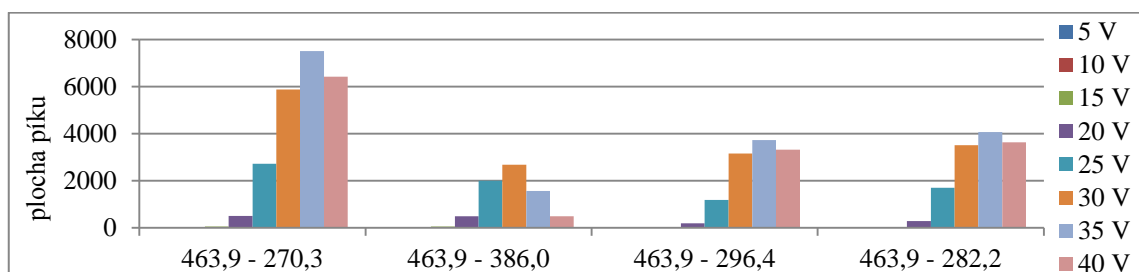
Obr. 108: Optimalizace iontového přechodu pro rosuvastatin v pozitivním módu ESI



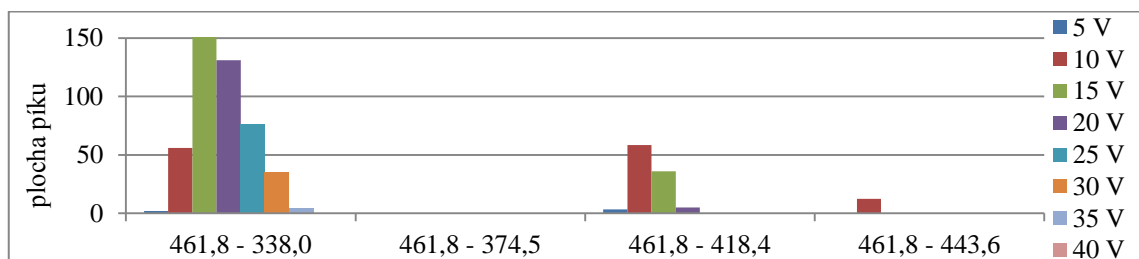
Obr. 109: Optimalizace iontového přechodu pro rosuvastatin v negativním módu ESI

V pozitivním módu byl u této molekuly nejlépe hodnocen iontový přechod 481,9 → 258,2 při CE 35 V (Obr. 108), v módu negativním 479,8 → 418,2 při CE 15 V (Obr. 109).

Rosuvastatin lakton



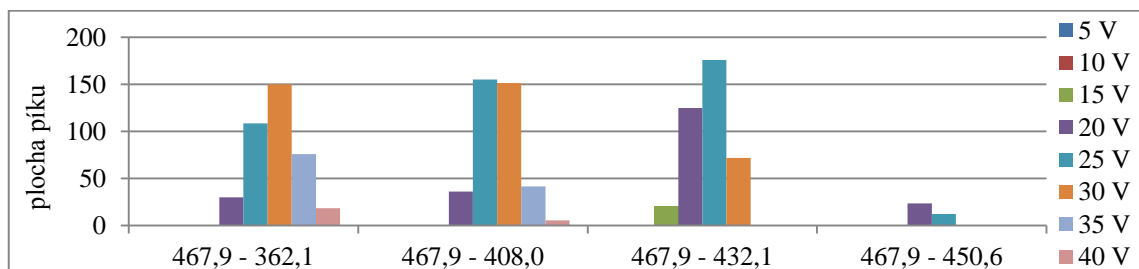
Obr. 110: Optimalizace iontového přechodu pro rosuvastatin lakton v pozitivním módu ESI



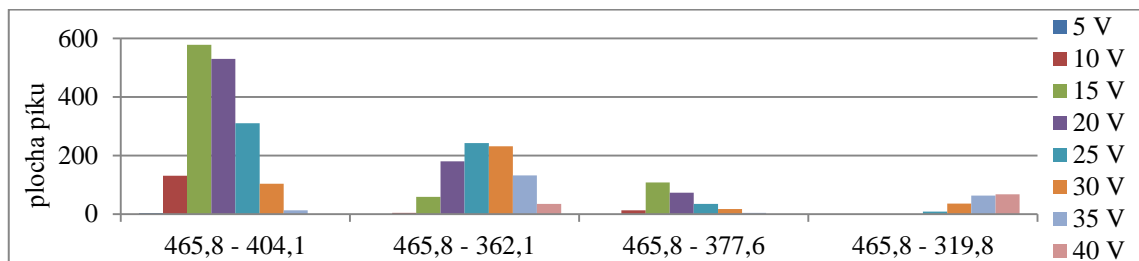
Obr. 111: Optimalizace iontového přechodu pro rosuvastatin lakton v negativním módu ESI

V pozitivním módu byly zjištěny nejlepší výsledky u iontového přechodu 463,9 → 270,3 při kolizní energii 35 V (Obr. 110), v negativním módu 461,8 → 338,0 při CE 15 V (Obr. 111).

N-Desmethylosuvastatin



Obr. 112: Optimalizace iontového přechodu pro N-desmethylosuvastatin v pozitivním módu



Obr. 113: Optimalizace iontového přechodu pro N-desmethylosuvastatin v negativním módu

U desmethylované molekuly rosuvastatinu byla naměřena největší plocha píku v pozitivním módu u iontového přechodu 467,9 → 432,1 při CE 25 V (Obr. 112), v negativním módu 465,8 → 404,1 při CE 15 V (Obr. 113).

Název	Iontový přechod	CV	CE
N-Desmethylosuvastatin	467,9 → 432,1	50	25
Pravastatin lakton	407,0 → 183,2	20	15
Rosuvastatin	481,9 → 258,2	45	35
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	575,0 → 440,2	35	25
Pitavastatin	421,9 → 290,2	45	30
Rosuvastatin lakton	463,9 → 270,3	50	35
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	575,0 → 440,2	25	25
Fluvastatin	411,9 → 224,4	25	30
Atorvastatin	559,0 → 440,2	30	25
Lovastatin kyselina	422,9 → 405,3	10	5
Pitavastatin lakton	403,9 → 290,2	45	30
Simvastatin kyselina	437,0 → 303,2	10	15
Atorvastatin lakton	541,0 → 448,1	25	20
Fluvastatin lakton	394,1 → 376,1	25	15
Lovastatin	405,0 → 285,3	20	10
Simvastatin	419,0 → 285,1	20	10

Tab. 12: Iontové přechody v pozitivním módu ESI, napětí na vstupním kuželu (CV) a kolizní energie (CE)

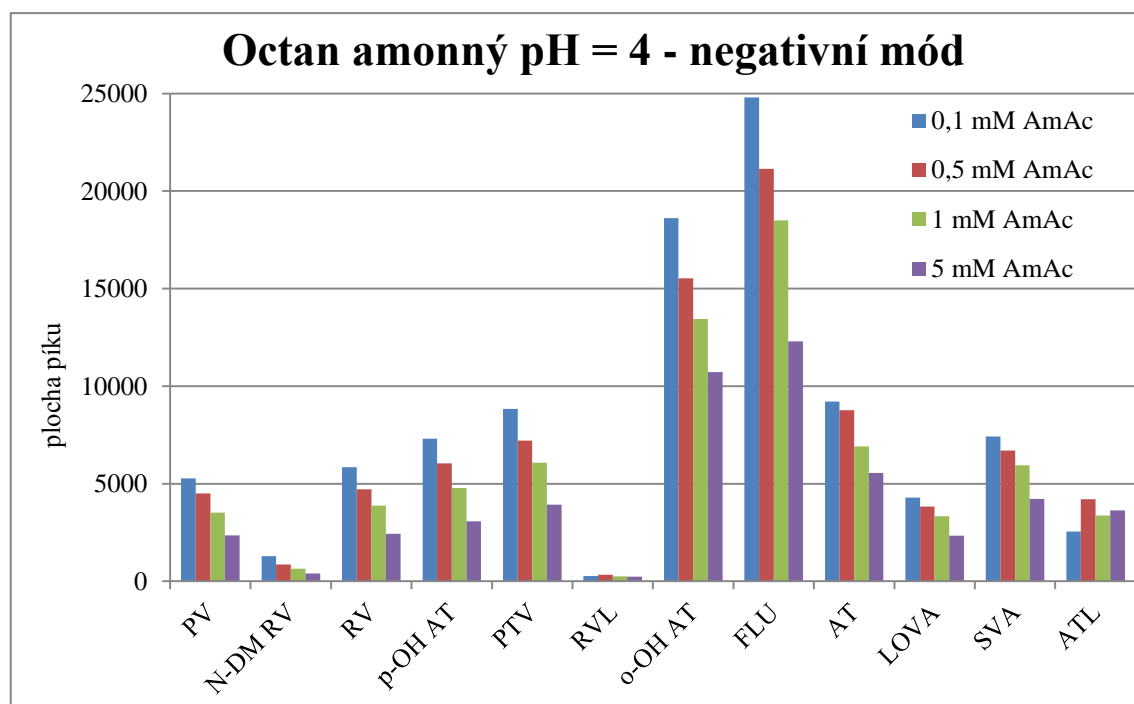
Název	Iontový přechod	CV	CE
Pravastatin	422,9 → 321,3	30	15
N-Desmethylrosuvastatin	465,8 → 404,1	30	15
Rosuvastatin	479,8 → 418,2	30	15
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	573,1 → 413,1	35	30
Pitavastatin	419,8 → 358,1	25	15
Rosuvastatin lakton	461,8 → 338,0	35	15
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	573,1 → 278,3	40	40
Fluvastatin	410,1 → 348,1	25	15
Atorvastatin	557,1 → 278,3	40	40
Lovastatin kyselina	420,9 → 319,2	25	15
Simvastatin kyselina	434,9 → 319,2	30	15
Atorvastatin lakton	539,2 → 278,2	30	40

Tab. 13 : Iontové přechody v pozitivním módu ESI, napětí na vstupním kuželu (CV) a kolizní energie (CE)

Tabulky 12 a 13 popisují výsledné iontové přechody s příslušnou kolizní energií zvolené pro pozitivní i negativní mód elektrospreje a napětí na vstupním kuželu. Minimální odezvu v pozitivním módu poskytla molekula pravastatinu a v negativním módu laktonové formy analyzovaných statinů: fluvastatin lakton, lovastatin, pitavastatin lakton, pravastatin lakton a simvastatin.

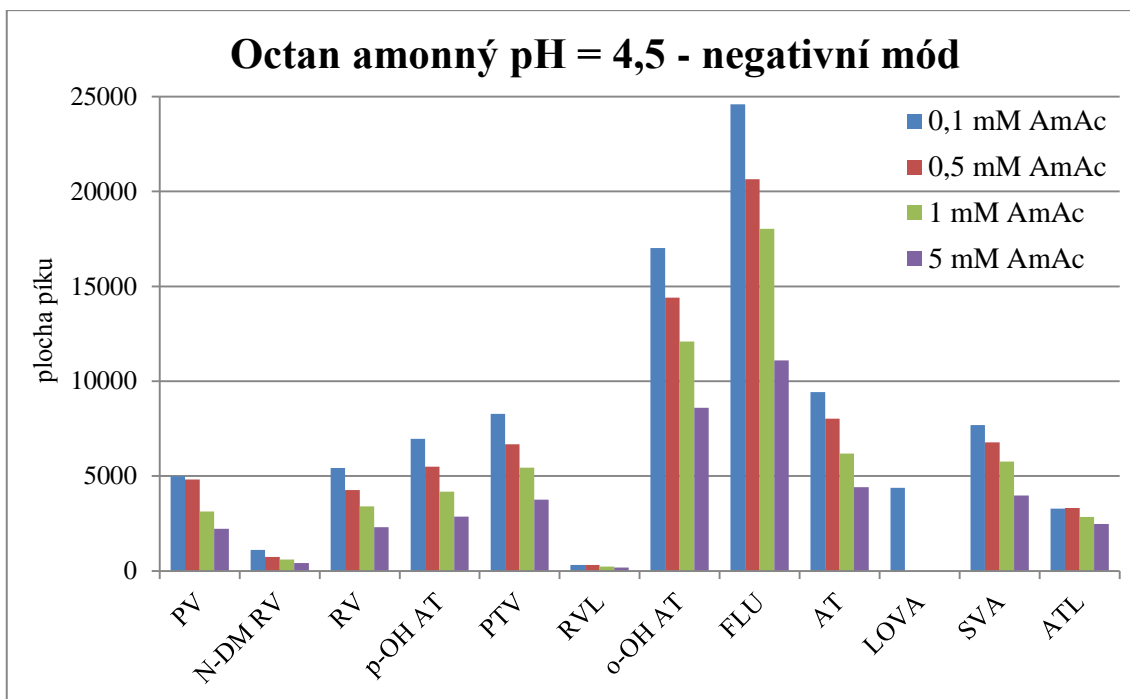
5.6 Výběr aditiva mobilní fáze

Při výběru aditiv byla sledována odezva jednotlivých statinů, jejich separace, retenční časy a tvar píků. Pro výběr byla použita aditiva octan amonný a mravenčan amonný, a to v koncentracích 0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM a 5,0 mM. Z důvodu stability zkoumaných sloučenin bylo vybráno pH = 4 a pH = 4,5. Použití nižších či vyšších hodnot pH by mohlo u zkoumaných látek způsobit interkonverzi mezi laktonovou formou a formou kyseliny (viz kapitola 3.1.6 pojednávající o vlastnostech statinů). Vše bylo měřeno jak v pozitivním, tak i v negativním módu ESI.



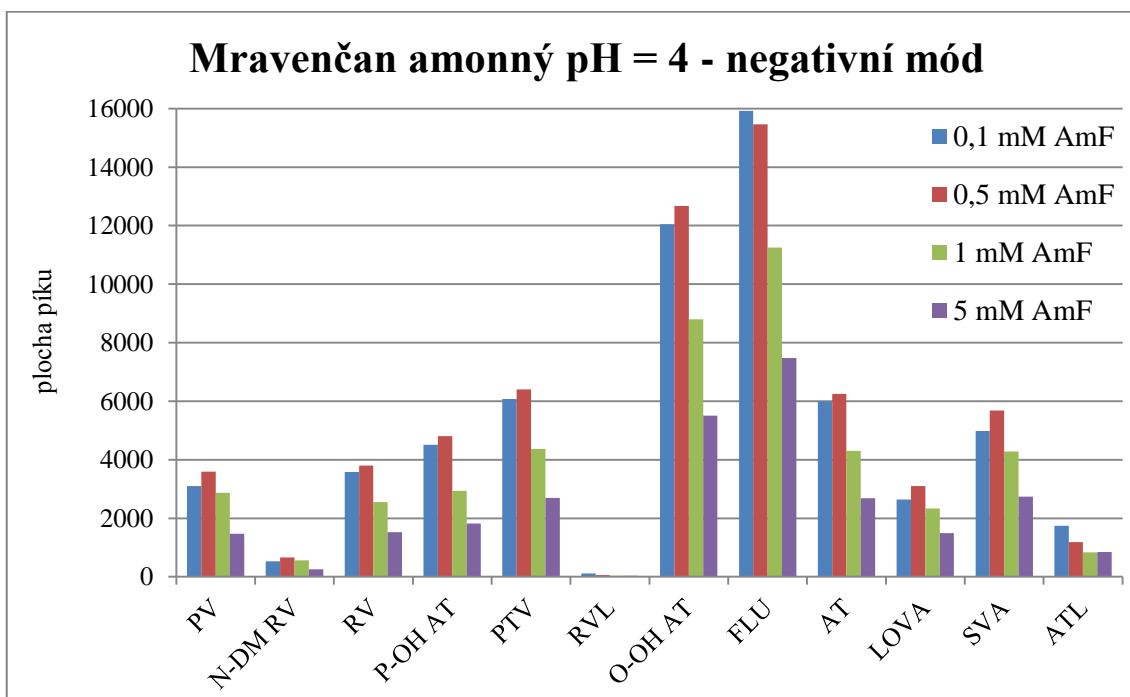
Obr. 114: Aditivum octan amonný při pH = 4 v negativním módu ESI

U octanu amonného při pH = 4 bylo dosaženo největší odezvy při koncentraci 0,1 mM (Obr. 114).



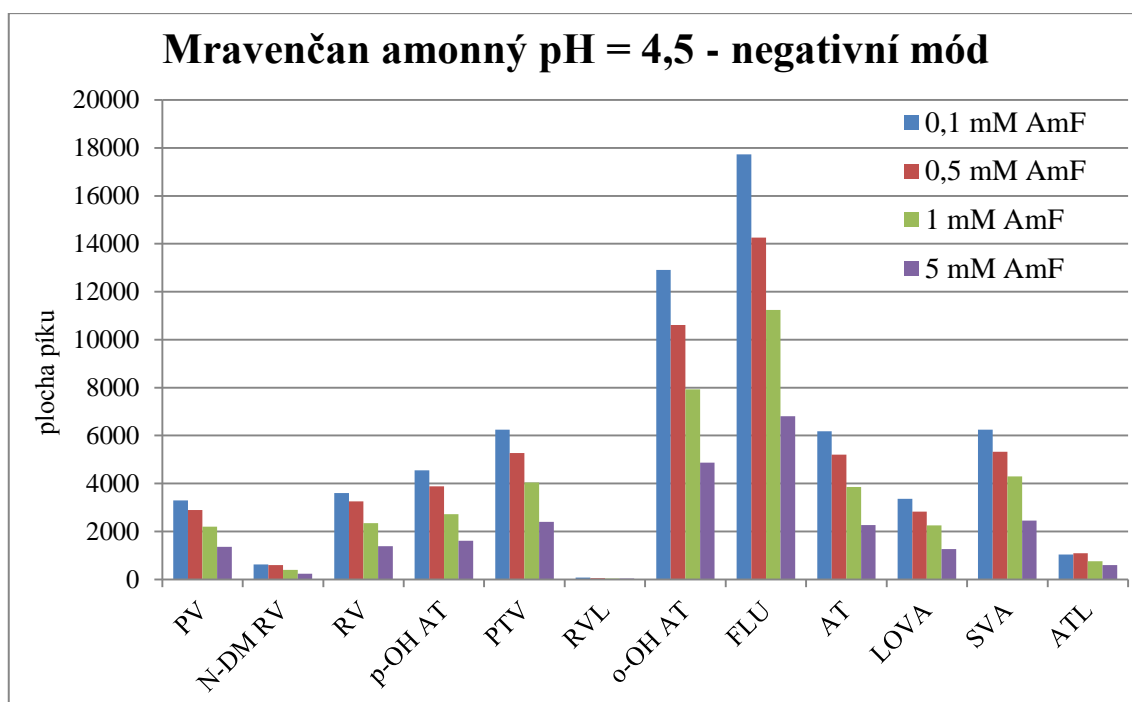
Obr. 115: Aditivum octan amonný při pH = 4,5 v negativním módu ESI

Koncentrace 0,1 mM octanu amonného byla nejvýhodnější i při pH = 4,5 (Obr. 115).



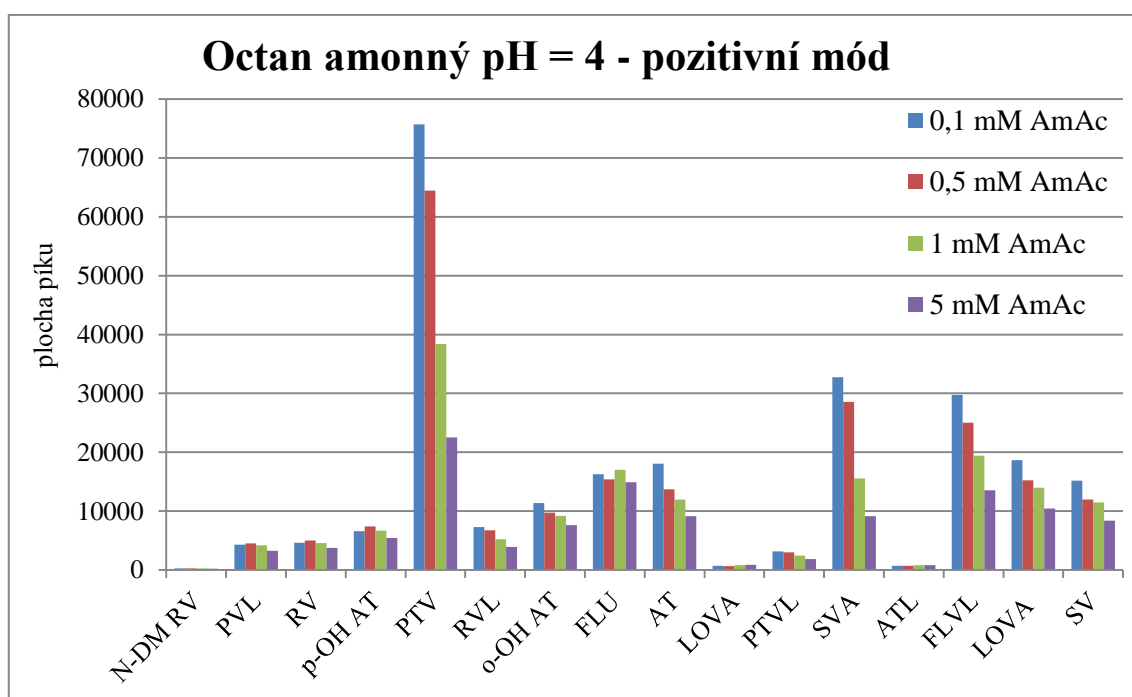
Obr. 116: Aditivum mravenčan amonný při pH = 4 v negativním módu ESI

Při hodnocení vlivu koncentrace mravenčanu amonného při pH = 4 na odezvu byly naměřeny největší plochy píků u většiny statinů při koncentraci 0,5 mM (Obr. 116).



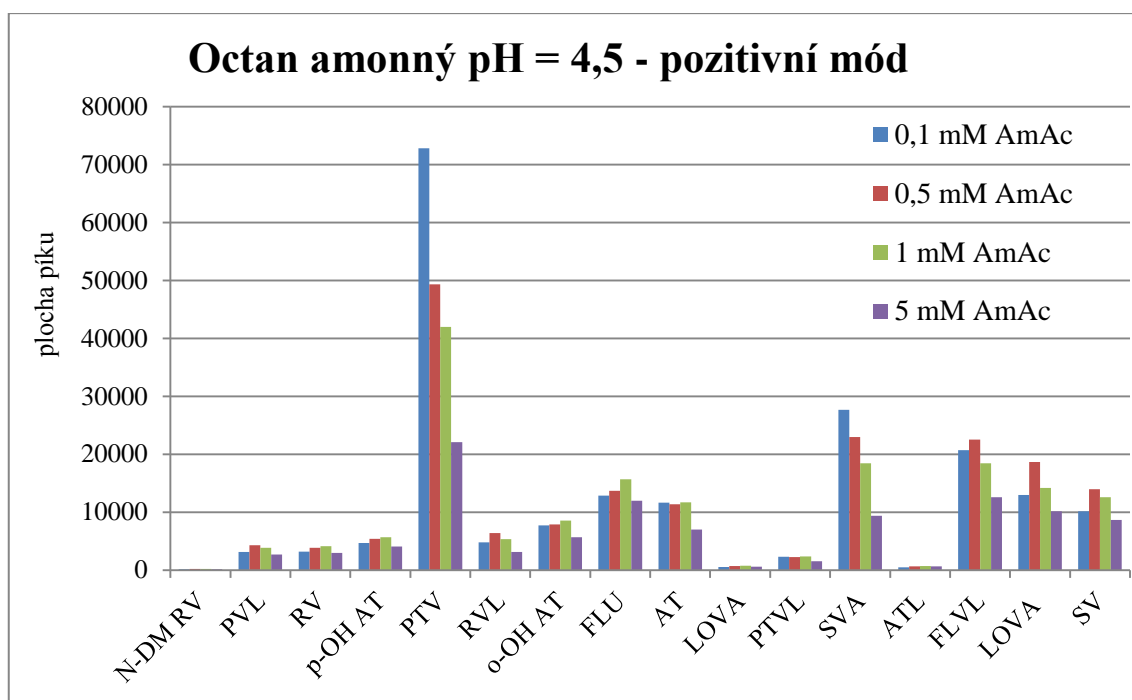
Obr. 117: Aditivum mravenčan amonný při pH = 4,5 v negativním módu ESI

Jako nejvýhodnější koncentrace mravenčanu amonného za podmínek pH = 4,5 v negativním módu byla zvolena hodnota 0,1 mM (Obr. 117).



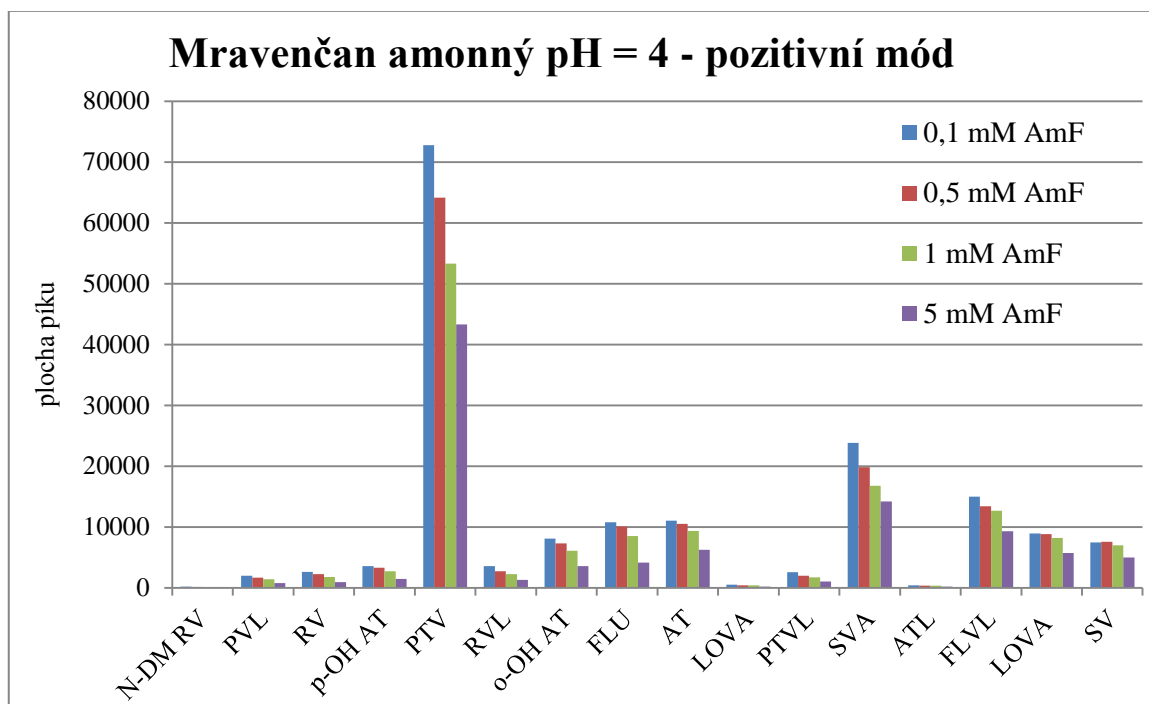
Obr. 118: Aditivum octan amonný při pH = 4 v pozitivním módu ESI

V případě většiny analytů byla při hodnocení octanu amonného v pozitivním módu pozorována největší odezva u koncentrace 0,1 mM (Obr. 118).



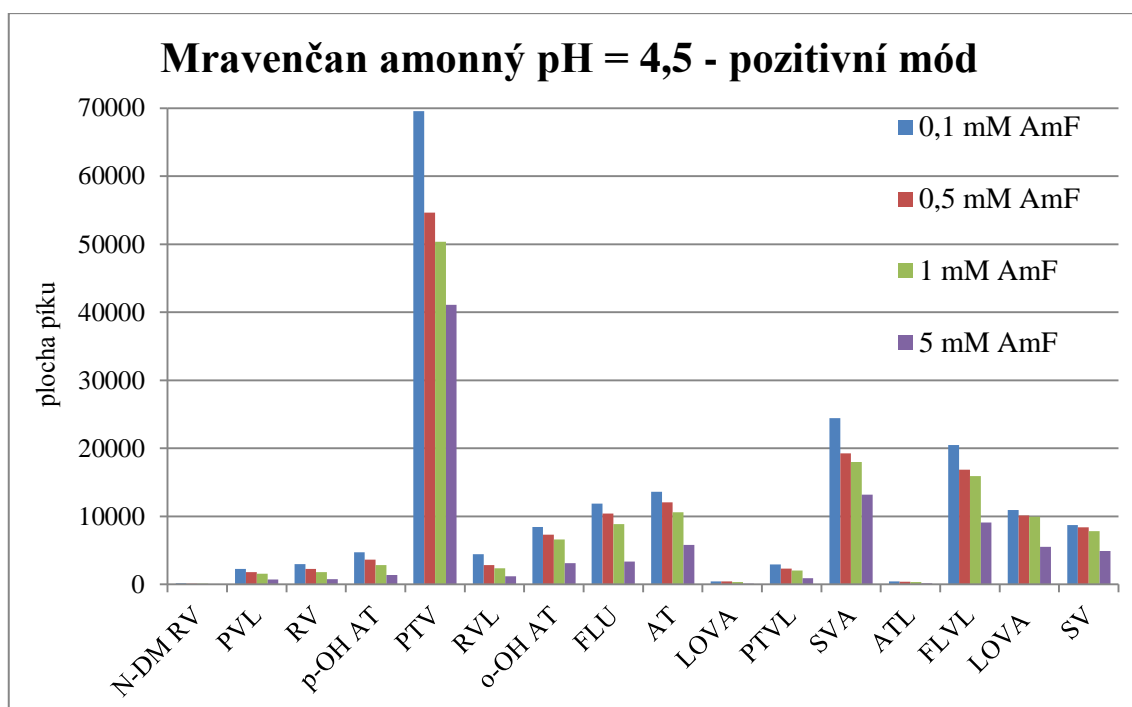
Obr. 119: Aditivum octan amonný při pH = 4,5 v pozitivním módu ESI

Výsledek hodnocení octanu amonného při pH = 4,5 nebyl zcela jednoznačný (obr. 119). Pro závěrečné srovnávání byla zvolena koncentrace 0,1 mM i koncentrace 0,5 mM.



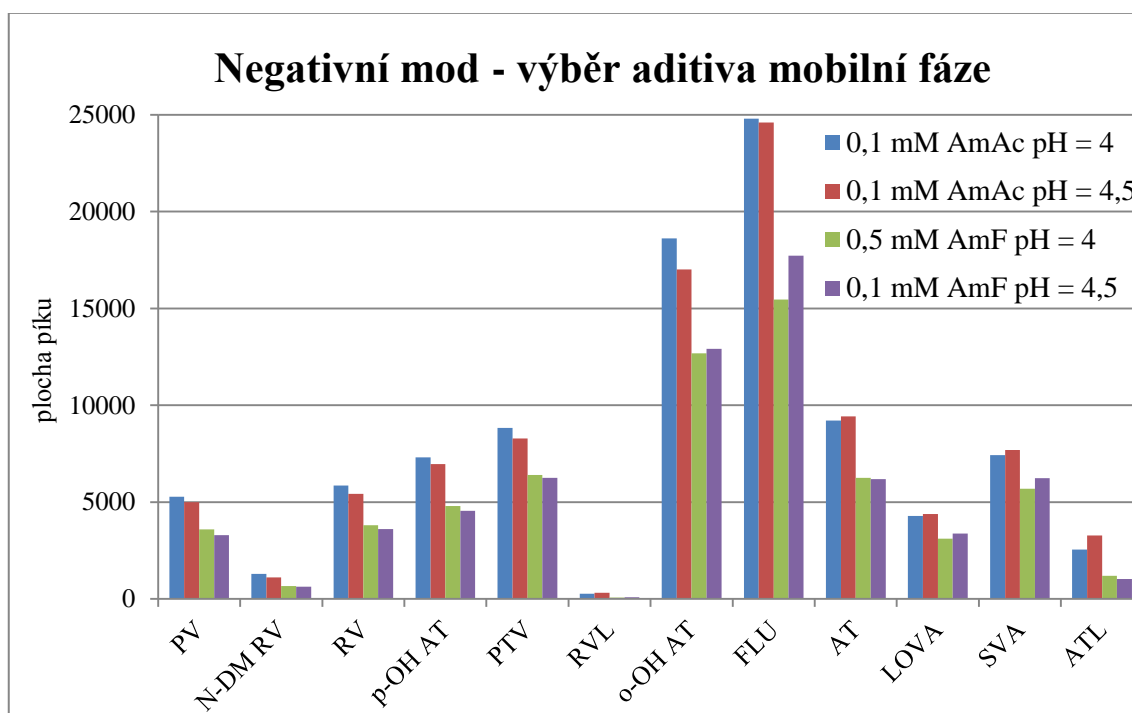
Obr. 120: Aditivum mravenčan amonný při pH = 4 v pozitivním módu ESI

Během hodnocení mravenčanu amonného v pozitivním módu za podmínek pH = 4 byla vybrána jako nejvýhodnější koncentrace 0,1 mM (Obr. 120).



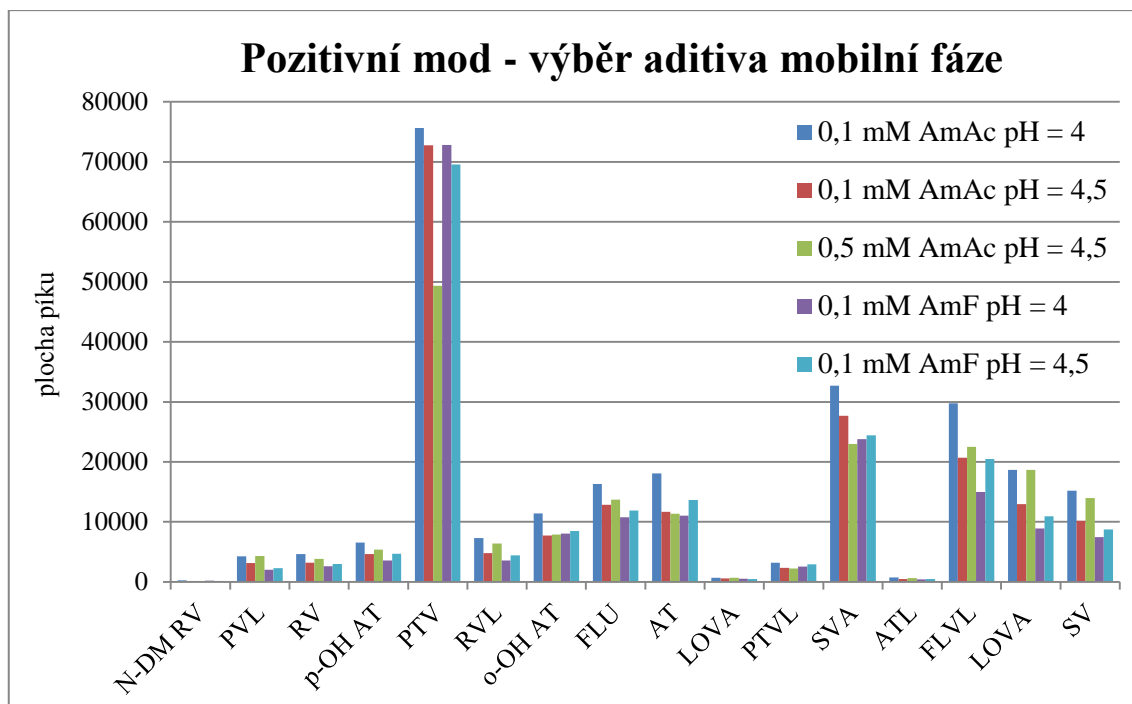
Obr. 121: Aditivum mravenčan amonný při pH = 4,5 v pozitivním módu ESI

Stejný výsledek byl získán i při hodnocení aditiva mravenčanu amonného o pH = 4,5. Největší odezva byla získána při koncentraci 0,1 mM (Obr. 121).



Obr. 122: Výběr aditiva mobilní fáze v negativním módu ESI

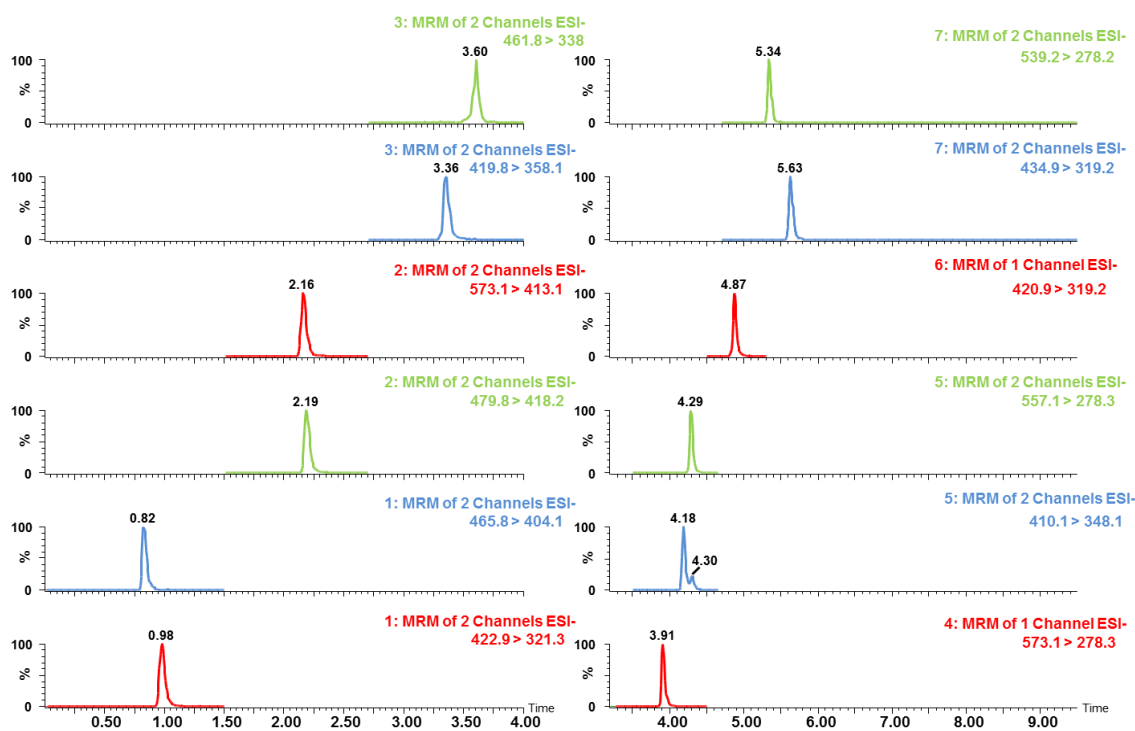
Aditiva octan amonný i mravenčan amonný s největší odezvou (pH = 4; pH = 4,5) byla znovu hodnocena a vzájemně posuzována v obou módech ESI (Obr. 122 a 123).



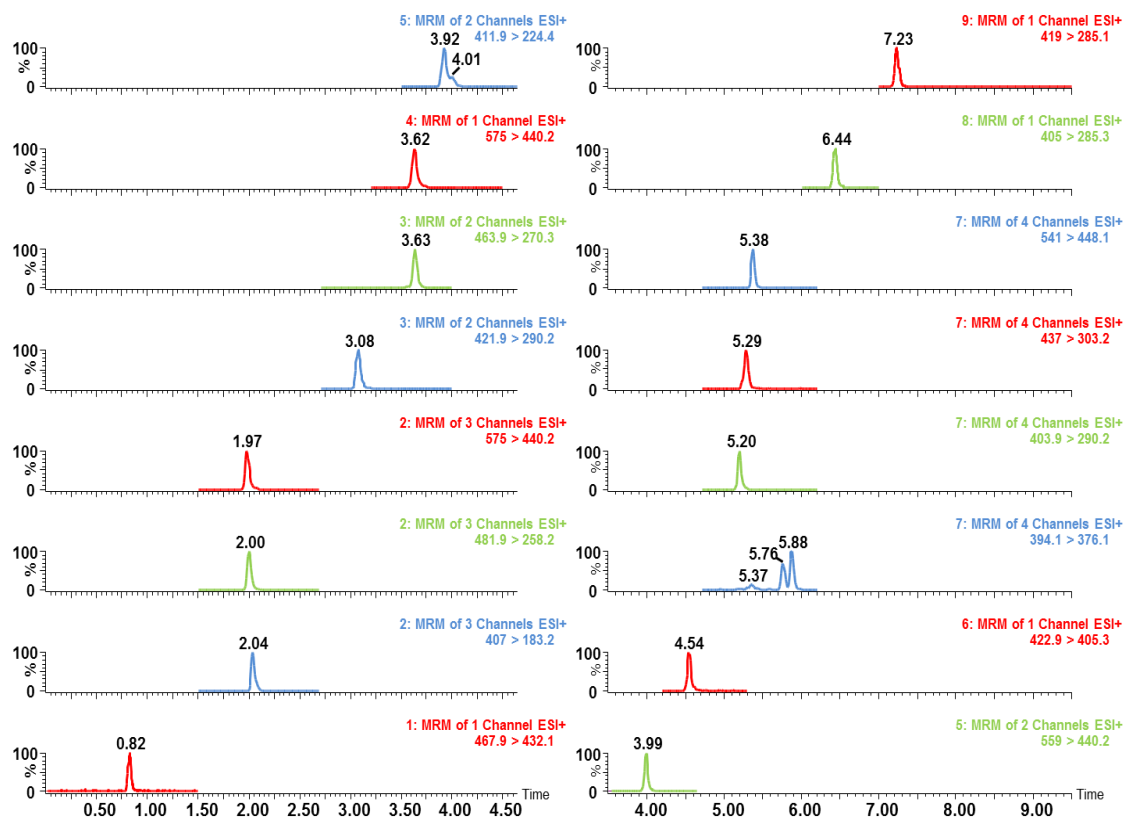
Obr. 123: Výběr aditiva mobilní fáze v pozitivním módu ESI

V pozitivním i negativním módu ESI bylo dosaženo největší odezvy při použití octanu amonného o koncentraci 0,1 mM s hodnotou pH = 4.

Obrázky 124 a 125 zachycují záznamy zvolených iontových přechodů po výběru aditiva mobilní fáze.



Obr. 124: Záznam iontových přechodů v negativním módu ESI po zvolení aditiva mobilní fáze



Obr. 125: Záznam iontových přechodů v pozitivním módu ESI po zvolení aditiva mobilní fáze

5.7 Výběr módu ionizace

Tabulka 14 porovnává hodnoty získané metodami vytvořenými pro pozitivní i negativní mód elektrospreje. Na základě linearit, limitu kvantifikace a plochy píku při koncentraci analytu 5×10^{-7} g/ml byl vybrán iontový mód pro každou zkoumanou molekulu. Negativní záznam iontů byl vybrán pro: atorvastatin, atorvastatin lakton, *o*-hydroxyatorvastatin, *p*-hydroxyatorvastatin, fluvastatin, lovastatin kyselinu, pitavastatin, pravastatin, rosuvastatin, N-desmethylrosuvastatin a simvastatin kyselinu. Pozitivní záznam iontů byl vybrán pro: fluvastatin lakton, lovastatin, pitavastatin lakton, pravastatin lakton, rosuvastatin lakton a simvastatin.

Analyt	ESI ⁺			ESI ⁻		
	r ²	LOQ (g/ml)	Plocha (5x10 ⁻⁷)	r ²	LOQ (g/ml)	Plocha (5x10 ⁻⁷)
N-Desmethylrosuvastatin	0,9969	10 ⁻⁸	925	0,9996	10 ⁻⁹	5442
Pravastatin	-	-	-	0,9993	2,5x10 ⁻⁹	4924
Pravastatin lakton	0,9986	10 ⁻⁸	3055	-	-	-
Rosuvastatin	0,9982	2,5x10 ⁻⁹	3454	0,9996	2,5x10 ⁻⁹	6614
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	0,9983	2,5x10 ⁻⁹	4834	0,9994	2,5x10 ⁻⁹	8940
Pitavastatin	0,9978	10 ⁻⁹	56031	0,9994	10 ⁻⁹	8524
Rosuvastatin lakton	0,9962	2,5x10 ⁻⁹	9242	0,9960	10 ⁻⁸	568
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	0,9991	5x10 ⁻⁹	5180	0,9997	2,5x10 ⁻⁹	18817
Fluvastatin	0,9991	5x10 ⁻⁹	3331	0,9996	2,5x10 ⁻⁹	8965
Atorvastatin	0,9988	10 ⁻⁹	10055	0,9997	2,5x10 ⁻⁹	14618
Lovastatin kyselina	0,9937	2,5x10 ⁻⁷	65	0,9974	10 ⁻⁸	985
Pitavastatin lakton	0,9961	2,5x10 ⁻⁹	31722	-	-	-
Simvastatin kyselina	0,9973	2,5x10 ⁻⁸	275	0,9996	10 ⁻⁹	8443
Atorvastatin lakton	0,9986	2,5x10 ⁻⁹	25429	0,9991	2,5x10 ⁻⁹	4845
Fluvastatin lakton	0,9995	2,5x10 ⁻⁹	8713	-	-	-
Lovastatin	0,9991	2,5x10 ⁻⁹	9583	-	-	-
Simvastatin	0,9994	2,5x10 ⁻⁹	9650	-	-	-

Tab. 14: Srovnání linearit (r²), citlivosti metody (LOQ) a plochy píku v pozitivním a v negativním módu ESI

6. Závěr

6.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Pro stanovení 17 statinů a jejich metabolitů byla zvolena kolona BEH C18 (50 x 2,1 mm; 1,7 μm). Gradientová eluce (Tab. 15) byla provedena mobilní fází tvořenou 0,1 mM octanem amonným s hodnotou $\text{pH} = 4$ a acetonitrilem v počátečním poměru 70:30.

Čas	Průtok [ml/min]	0,1 mM AmAc $\text{pH} = 4$ [%]	Acetonitril [%]	Křivka
Počátek	0,300	70,0	30,0	Počátek
7,00	0,300	35,0	65,0	6
7,50	0,300	70,0	30,0	6
10,50	0,300	70,0	30,0	6

Tab. 15: Optimalizace gradientové eluce

6.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje

Tabulka 16 znázorňuje optimalizované nastavení iontového zdroje hmotnostního spektrometru pro pozitivní i negativní mód ESI a výsledné nastavení iontového zdroje pro finální metodu s přepínáním $\text{ESI}^+/\text{ESI}^-$. Hodnoty byly získány postupným proměřováním a hodnocením odezvy u každé molekuly.

Iontový zdroj	ESI^+	ESI^-	Přepínání $\text{ESI}^+/\text{ESI}^-$
Napětí na kapiláře	3,0 kV	2,5 kV	2,5 kV
Napětí na extraktoru	2,0 V	1,0 V	1,0 V
Napětí na hexapólu	0,0 V	0,7 V	0,5 V
Teplota zdroje	130 °C	130 °C	130 °C
Desolvační teplota	425 °C	450 °C	450 °C
Průtok desolvačního plynu	650 l/hod	600 l/hod	650 l/hod
Průtok plynu na vstupním kuželu	85 l/hod	60 l/hod	70 l/hod

Tab. 16: Optimalizované nastavení parametrů iontového zdroje v pozitivním i v negativním módu ESI^+ a výsledné nastavení pro finální metodu s přepínáním $\text{ESI}^+/\text{ESI}^-$

6.3 Optimalizace iontových přechodů

Pro každou molekulu byl vybrán iontový přechod s příslušnou hodnotou kolizní energie (Tab. 17). Iontový přechod byl ve většině případů vybrán jak pro mód pozitivní, tak i pro mód negativní. Mód elektrospreje ve výsledné metodě byl zvolen na základě plochy píku při koncentraci látky 5×10^{-7} g/ml, limitu kvantifikace a linearity.

Název	Mód ionizace	Iontový přechod	Pozorovací čas	CV	CE	Časové okno
Pravastatin	ESI	422,9 → 321,3	0,120	30	15	0-1,5
N-Desmethylrosuvastatin	ESI	465,8 → 404,1	0,120	30	15	0-1,5
Pravastatin lakton	ESI ⁺	407,0 → 183,2	0,100	20	15	1,5-2,7
Rosuvastatin	ESI	479,8 → 418,2	0,100	30	15	1,5-2,7
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	ESI	573,1 → 413,1	0,100	35	30	1,5-2,7
Pitavastatin	ESI	419,8 → 358,1	0,050	25	15	2,7-4,0
Rosuvastatin lakton	ESI ⁺	463,9 → 270,3	0,050	50	35	2,7-4,0
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	ESI	573,1 → 278,3	0,050	40	40	3,2-4,5
Fluvastatin	ESI	410,1 → 348,1	0,070	25	15	3,5-4,65
Atorvastatin	ESI	557,0 → 278,3	0,070	40	40	3,5-4,65
Lovastatin kyselina	ESI	420,9 → 319,2	0,050	25	15	4,5-5,3
Pitavastatin lakton	ESI ⁺	403,9 → 290,2	0,050	45	30	4,7-6,2
Simvastatin kyselina	ESI	434,9 → 319,2	0,050	30	15	4,7-6,2
Atorvastatin lakton	ESI	539,2 → 278,2	0,050	30	40	4,7-6,2
Fluvastatin lakton	ESI ⁺	394,1 → 376,1	0,050	25	15	4,7-6,2
Lovastatin	ESI ⁺	405,0 → 285,3	0,200	20	10	6,0-7,0
Simvastatin	ESI ⁺	419,0 → 285,1	0,200	20	10	7,0-10,5

Tab. 17: Konečný výběr módu ionizace, iontového přechodu, pozorovacího času, napětí na vstupním kuželu (CV), kolizní energie (CE) a časového okna

6.4 Citlivost, linearita a opakovatelnost metody

Opakovatelnost byla proměřována zcela na závěr vývoje metody, tedy po optimalizaci chromatografických podmínek a parametrů iontového zdroje hmotnostního spektrometru, po výběru iontového přechodu, příslušné kolizní energie, časového okna a módu ionizace. Průměr retenčních časů a ploch píků s příslušnými relativními směrodatnými odchylkami zachycují tabulky 18 a 19. Tabulka 20 představuje limit kvantifikace (LOQ) a limit detekce (LOD) výsledné metody. Opakovatelnost byla měřena pro koncentraci 1×10^{-8} g/ml a 1×10^{-7} g/ml. Na koncentrační hladině 1×10^{-8} g/ml se relativní směrodatná odchylka (RSD) pro retenční čas pohybovala v rozmezí 0,00 – 0,72 a v případě plochy píků v rozmezí 1,53 – 8,52. Na koncentrační hladině 1×10^{-7} g/ml dosahovaly relativní směrodatné odchylky pro retenční čas hodnot 0,00 – 0,12 a pro plochy píků to byly hodnoty v rozmezí 0,91 – 4,10. Byl tedy splněn požadavek na opakovatelnost pro retenční čas (RSD < 1 %) a také pro plochu píku (RSD < 10 %). Limit kvantifikace se pro všechny hodnocené látky pohyboval v rozmezí

1×10^{-9} g/ml – 1×10^{-8} g/ml (Tab. 20). Linearita výsledné metody dosahovala hodnot $\geq 0,9990$ u 15 analytů. U dvou zbývajících (pravastatin lakton a lovastatin kyselina) byla $> 0,9900$.

Název	Mód ionizace	Retenční čas průměr	RSD %	Plocha píku průměr	RSD%
Pravastatin	ESI ⁻	1,12	0,42	576,04	2,38
N-Desmethylrosuvastatin	ESI	0,81	0,34	96,27	8,08
Pravastatin lakton	ESI ⁺	2,06	0,24	175,17	7,33
Rosuvastatin	ESI ⁻	2,19	0,13	610,30	3,75
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	ESI	2,18	0,00	613,83	3,17
Pitavastatin	ESI ⁻	3,28	0,00	874,14	2,85
Rosuvastatin lakton	ESI ⁺	3,63	0,00	730,46	3,27
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	ESI	3,84	0,00	1678,70	1,80
Fluvastatin	ESI ⁻	4,13	0,00	1831,61	1,53
Atorvastatin	ESI ⁻	4,21	0,10	1056,24	1,87
Lovastatin kyselina	ESI	4,79	0,00	485,45	3,12
Pitavastatin lakton	ESI ⁺	5,18	0,07	571,33	5,21
Simvastatin kyselina	ESI ⁻	5,52	0,09	563,45	3,67
Atorvastatin lakton	ESI	5,35	0,08	168,12	6,20
Fluvastatin lakton	ESI ⁺	5,82	0,72	68,15	8,52
Lovastatin	ESI ⁺	6,40	0,07	271,28	4,78
Simvastatin	ESI ⁺	7,20	0,08	167,87	3,01

Tab. 18: Retenční čas, plocha píku a relativní směrodatné (RSD) odchylky na koncentrační hladině 1×10^{-8}

Název	Mód ionizace	Retenční čas průměr	RSD %	Plocha píku průměr	RSD%
Pravastatin	ESI ⁻	1,13	0,00	5994,83	0,91
N-Desmethylrosuvastatin	ESI	0,85	0,00	1086,17	2,43
Pravastatin lakton	ESI ⁺	2,06	0,00	1789,15	4,10
Rosuvastatin	ESI	2,19	0,00	5703,84	1,36
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	ESI	2,18	0,00	5690,02	0,90
Pitavastatin	ESI ⁻	3,28	0,00	7908,96	0,83
Rosuvastatin lakton	ESI ⁺	3,63	0,00	6842,35	1,57
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	ESI	3,84	0,00	13006,75	1,38
Fluvastatin	ESI ⁻	4,13	0,12	13986,08	0,82
Atorvastatin	ESI	4,20	0,07	8730,58	0,62
Lovastatin kyselina	ESI ⁻	4,79	0,09	4287,71	1,24
Pitavastatin lakton	ESI ⁺	5,18	0,10	4975,15	2,75
Simvastatin kyselina	ESI	5,52	0,00	4826,58	1,81
Atorvastatin lakton	ESI	5,35	0,00	1318,76	3,35
Fluvastatin lakton	ESI ⁺	5,84	0,10	494,86	3,25
Lovastatin	ESI ⁺	6,41	0,08	2409,66	1,93
Simvastatin	ESI ⁺	7,20	0,07	1347,62	2,60

Tab. 19: Retenční čas, plocha píku a relativní směrodatné odchylky (RSD) na koncentrační hladině 1×10^{-7}

Název	Mód ionizace	LOQ (g/ml)	LOD (g/ml)
Pravastatin	ESI ⁻	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
N-Desmethylosuvastatin	ESI ⁻	1x10 ⁻⁹	3x10 ⁻¹⁰
Pravastatin lakton	ESI ⁺	1x10 ⁻⁸	3x10 ⁻⁹
Rosuvastatin	ESI ⁻	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
<i>p</i> -Hydroxyatorvastatin	ESI ⁻	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
Pitavastatin	ESI ⁻	1x10 ⁻⁹	3x10 ⁻¹⁰
Rosuvastatin lakton	ESI ⁺	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
<i>o</i> -Hydroxyatorvastatin	ESI ⁻	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
Fluvastatin	ESI ⁻	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
Atorvastatin	ESI ⁻	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
Lovastatin kyselina	ESI ⁻	1x10 ⁻⁸	3x10 ⁻⁹
Pitavastatin lakton	ESI ⁺	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
Simvastatin kyselina	ESI ⁻	1x10 ⁻⁹	3x10 ⁻¹⁰
Atorvastatin lakton	ESI ⁻	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
Fluvastatin lakton	ESI ⁺	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
Lovastatin	ESI ⁺	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰
Simvastatin	ESI ⁺	2,5x10 ⁻⁹	7,6x10 ⁻¹⁰

Tab. 20: Limit kvantifikace (LOQ) a limit detekce (LOD) výsledné metody

7. Použitá literatura

- [1] ENDO A.: J. Lipid Res. 33 (1992) 1569-1582.
- [2] BARTAS R., KOLÁŘ J.: Čes. slov. Farm. 57 (2008) 208-214.
- [3] HARTL J., DOLEŽAL M., KRINKOVÁ J., MILETÍN M., OPLETALOVÁ V.: *Farmaceutická chemie III.* Praha: Nakladatelství Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-0195-3.
- [4] <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id354937/> [cit. 10.10.2012]
- [5] <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id340137/> [cit. 10.10.2012]
- [6] VLČEK J., FIALOVÁ D. a kol.: *Klinická farmacie I.* Praha: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-3169-8.
- [7] LEDVINA M., STOKLASOVÁ A., CERMAN J.: *Biochemie pro studující medicíny I. díl.* Praha: Nakladatelství Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0849-9.
- [8] <https://docs.faf.cuni.cz/getmedia/d9bc86d8-828e-487a-8192-42b47e8c5f19/S-24-tilser-hypolipidemika-2012.aspx?disposition=attachment> [cit. 26.11.2012]
- [9] GÓRECKÁ K., TILŠER I., NACHTIGAL P., KOPECKÝ M., VLČEK J.: *Remedia* 14 (2004) 355-363.
- [10] SCHACHTER M.: *Fundam. Clin. Pharmacol.* 19 (2004) 117-125.
- [11] DOLEŽAL T.: *Remedia* 12 (2002) 144-145.
- [12] FURBERG C.D., PITT B.: *Curr. Control Trials Cardiovasc. Med.* 2 (2001) 205-207.
- [13] http://www.sukl.cz/uploads/Ceny_a_uhrady/Souvisejici_informace/posouzeni_skupiny_hy_polidemika_20122008.pdf [cit. 11.10.2012]
- [14] FIALOVÁ D., VLČEK J., PELÍŠKOVÁ D., TOPINKOVÁ E.: *Praktické lékárenství* 2 (2006) 76-80.
- [15] ČEŠKA R.: *Remedia* 16 (2006) 261-267.
- [16] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2003/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_2003.xls [cit. 13.10.2012]
- [17] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2004/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_2004.xls [cit. 13.10.2012]
- [18] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2005/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_2005.xls [cit. 13.10.2012]
- [19] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2006/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_2006.xls [cit. 13.10.2012]

- [20] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2007/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_2007.xls [cit. 13.10.2012]
- [21] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2008/1Q/Spotreby_podle_lecive_latky_a_cesty_podani.xls [cit. 13.10.2012]
- [22] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2008/2Q/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_2Q_2008.xls [cit. 13.10.2012]
- [23] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2008/3Q/Spotreby.xls [cit. 13.10.2012]
- [24] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2008/4Q/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_4Q_2008.xls [cit. 13.10.2012]
- [25] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2009/1Q/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_1Q_2009.xls [cit. 13.10.2012]
- [26] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2009/2Q/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_2Q_2009.xls [cit. 13.10.2012]
- [27] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2009/3Q/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_3Q_2009.xls [cit. 13.10.2012]
- [28] http://www.sukl.cz/uploads/Spotreby_LP/2009/4q/Spotreby_podle_LL_a_cesty_podani_4Q_2009.xls [cit. 13.10.2012]
- [29] <https://scifinder.cas.org/> [cit. 11.3.2013]
- [30] NOVÁKOVÁ L., ŠATÍNSKÝ D., SOLICH P.: Trends Anal. Chem. 27 (2008) 352-367.
- [31] <https://docs.faf.cuni.cz/getmedia/15c46161-768e-4095-b6cd-6f7ce53de0c4/HPLC-II.aspx?disposition=attachment> [cit. 23.11.2012]
- [32] <https://docs.faf.cuni.cz/getmedia/3c7cd241-0fe5-4cfb-978c-8411d8e9cf43/Pokroky-v-HPLC.aspx?disposition=attachment> [cit. 23.11.2012]
- [33] KLIMEŠ J. a kol.: *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1.
- [34] HOLČAPEK M., JANDERA P.: Chem. Listy 92 (1998) 278-286.
- [35] NOVÁKOVÁ L., MATYSOVÁ L., SOLICH P.: Talanta 68 (2006) 908-918.
- [36] NOVÁKOVÁ L., SPÁČIL Z., SEIFRTOVÁ M., OPLETAL L., SOLICH P.: Talanta 80 (2010) 1970-1979.
- [37] NOVÁKOVÁ L., VLČKOVÁ H.: Anal. Chim. Acta 656 (2009) 8-35.

- [38] GUILLARME D., VEUTHEY J.-L.: *UHPLC in Life Sciences*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 978-1-84973-388-5.
- [39] WU N., CLAUSEN A.M.: *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1167-1182.
- [40] VIDOVÁ V., LEMR K., HAVLÍČEK V.: *Chem. Listy* 102 (2008) 957-959.
- [41] http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS01_Uvod.pdf [cit. 20.11.2012]
- [42] http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS02_03_Ionizacni_techiky.pdf
[cit. 20.11.2012]
- [43] DASS Ch.: *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2007. ISBN 978-0-471-68229-5.
- [44] GROSS J. H.: *Mass Spectrometry*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2004. ISBN 3-540-40739-1.
- [45] AGILENT TECHNOLOGIES: *Basics of LC/MS Primer*. U. S. A., 2001 [online]. Dostupné na WWW: <http://ccc.chem.pitt.edu/wipf/Agilent%20LC-MS%20primer.pdf>
[cit. 21.11.2012]
- [46] http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS045_Hmotnostni_analyzatory.pdf
[cit. 21.11.2012]
- [47] http://holcapek.upce.cz/teaching/03_HmotnostniAnalyzatory.pdf [cit. 30.3.2013]
- [48] http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni_spektrometrie_08.pdf [cit. 21.11.2012]
- [49] VOLNÝ M.: *Chem. Listy* 105 (2011) 230-236.
- [50] HU Q., NOLL R.J., LI H., MAKAROV A., HARDMAN M., COOKS R.G.: *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 430-443.
- [51] HOLČAPEK M., JIRÁSKO R., LÍSA M.: *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 3-15.
- [52] NOVÁKOVÁ L., VLČKOVÁ H., ŠATÍNSKÝ D., SADÍLEK P., SOLICHOVÁ D., BLÁHA M., BLÁHA V., SOLICH P.: *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2093-2103.
- [53] MIAO X.-S., METCALFE C.D.: *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 133-141.
- [54] YANG D.-J., HWANG L.S.: *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 277-284.
- [55] PASHA K., MUZEEB S., BASHA S.J.S., SHASHIKUMAR D., MULLANGI R., SRINIVAS N.R.: *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 282-293.
- [56] MARTÍN J., BUCHBERGER W., ALONSO E., HIMMELSBACH M., APARICIO I.: *Talanta* 85 (2011) 607-615.

[57] LEE H.-B., PEART T.E., SVOBODA M.L., BACKUS S.: *Chemosphere* 77 (2009) 1285-1291.

8. Příloha

8.1 Seznam příloh

- Comparison of manual and semiautomatic approaches of MEPS as sample preparation technique in UHPLC-MS/MS methods for determination of statins in biological samples (*H. Vlčková, V. Pilařová, P. Svoboda, L. Nováková, P. Solich*)
Informal Meeting on Mass Spectrometry, Olomouc, Česká republika; 2012
- Development of multistatin method for determination of statins, their metabolites and interconversion products in human serum (*H. Vlčková, K. Škrášková, P. Svoboda, H. Tomšíková, P. Solich, L. Nováková*)
International Mass Spectrometry Conference, Kjóto, Japonsko; 2012
- Development of UHPLC-MS/MS method for the determination of statins and their metabolites (*P. Svoboda, H. Vlčková, L. Nováková*)
Česká chromatografická škola – HPLC 2013, Seč, Česká republika; 2013