

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Petra Vaňkátová

IDENTIFIKACE ROPINIROLU A JEHO NEČISTOT HMOTNOSTNÍ  
SPEKTROMETRIÍ

Identification of ropinirole and its impurities by mass spectrometry

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Pavel Coufal, Ph.D.

Praha 2015

## **Prohlášení**

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

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

V Praze dne 25.5.2015

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala profesoru RNDr. Pavlu Coufalovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a vstřícnost při vypracování této bakalářské práce. Děkuji také docentu RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D. a RNDr. Martinu Štíchovi za cenné konzultace a RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D. za pomoc při seznámení se s použitou technikou.

## **Abstrakt**

Tato práce se zabývá analýzou ropinirolu a jeho nečistot z procesu syntézy pomocí hmotnostní spektrometrie. V teoretickém úvodu je shrnuta metoda hmotnostní spektrometrie. V experimentální práci se věnuji především interpretaci hmotnostních spekter vzorků naměřených jak bez fragmentace, tak s CID fragmentací. Měření bylo prováděno na trojitém kvadrupólu s elektrosprejovou ionizací. V části práce jsou také shrnuty vlastnosti vzorků z hlediska kvantifikace v módu SRM. Hlavním přínosem této práce je objasnění fragmentace ropinirolu a jeho nečistot, které může posloužit pro další studie těchto látek.

## **Abstract**

This thesis is focused on the analysis of ropinirole and its impurities related to the synthesis process using mass spectrometry. The theoretical introduction summarizes method of mass spectrometry. The experimental part is devoted to interpretation of mass spectra of samples measured both without fragmentation and using the CID fragmentation. Measurements were performed on a triple quadrupole with electrospray ionization. Properties of samples with respect to the quantification using SRM mode are also summarized in the paper. The main contribution of this work is clarification of the fragmentation of ropinirole and its impurities, which may serve for further studies of these substances.

**Klíčová slova:** ropinirol, hmotnostní spektrometrie, nečistoty

**Key words:** ropinirole, mass spectrometry, impurities

# Obsah

Seznam zkratek a symbolů.....	6
1. Úvod.....	8
1.1 Instrumentace.....	8
1.1.1 Iontové zdroje.....	8
1.1.2 Analyzátoři.....	12
1.1.3 Detektory.....	14
1.1.4 Vakuum, iontová optika a zavedení vzorku.....	15
1.1.5 Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	16
1.2 Hmotnostní spektrum.....	18
1.2.2 Hmotnost iontu.....	19
1.2.3 Interpretace hmotnostního spektra.....	20
1.3 Mez stanovitelnosti.....	22
1.4 Cíl práce.....	23
2. Experimentální část.....	24
2.1 Použité chemikálie.....	24
2.2 Vzorky.....	24
2.3 Instrumentace.....	25
2.4 Postup.....	25
3. Výsledky a diskuze.....	26
3.1 Vzorek 1.....	26
3.2 Vzorek 2.....	28
3.3 Vzorek 3.....	30
3.4 Vzorek 4.....	32
3.5 Vzorek 5.....	34
3.6 Vzorek 6.....	36
4. Závěr.....	38
Seznam použité literatury.....	39
Přílohy.....	42

## Seznam zkratek a symbolů

- API – atmospheric pressure ionization (ionizace za atmosférického tlaku)
- CID – collision induced dissociation (disociace vyvolaná srážkou)
- CZE – capillary zone electrophoresis (kapilární zónová elektroforéza)
- Da – Dalton, jednotka relativní molekulové hmotnosti
- ECD – electron capture dissociation (disociace záchytem elektronu)
- EI – electron ionization (elektronová ionizace)
- ESI – electrospray ionization (elektrosprejová ionizace)
- ETD – electron transfer dissociation (disociace přenosem elektronu)
- eV – elektronvolt, jednotka práce
- FT-ICR – iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
- GC – gas chromatography (plynová chromatografie)
- HCD – higher-energy collisional dissociation (vysokoenergetická disociace)
- HPLC – high-performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
- Hz – Hertz, jednotka frekvence
- IR – infrared (infračervený)
- IRMPD – infrared multiphoton dissociation (multifotonová disociace infračerveným zářením)
- LC – liquid chromatography (kapalinová chromatografie)
- LOQ – limit of quantitation (mez stanovitelnosti)
- $m/z$  – poměr hmotnosti iontu a jeho elementárního náboje, jednotka je Th
- ml – mililitr, jednotka objemu
- MRM – multiple reaction monitoring (sledování vybraných reakcí)
- MS – mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
- ng – nanogram, jednotka hmotnosti
- nl – nanolitr, jednotka objemu
- Pa – Pascal, jednotka tlaku
- PSD – post-source decay (fragmentace za iontovým zdrojem)
- psi – pounds per square inch, jednotka tlaku
- Q – quadrupole (kvadrupól)
- QC – quality coefficient (koeficient kvality)

R – korelační koeficient

RIC – reconstructed ion chromatogram (rekonstruovaný chromatografický záznam iontu)

RSD – relativní směrodatné odchylna

SIM – selected ion monitoring (skenování vybraného iontu)

SRM – single reaction monitoring (sledování vybrané reakce)

Th – Thomson, jednotka  $m/z$

TIC – total ion current (celkový iontový proud)

UV – ultra violet (ultrafialový)

V – Volt, jednotka napětí

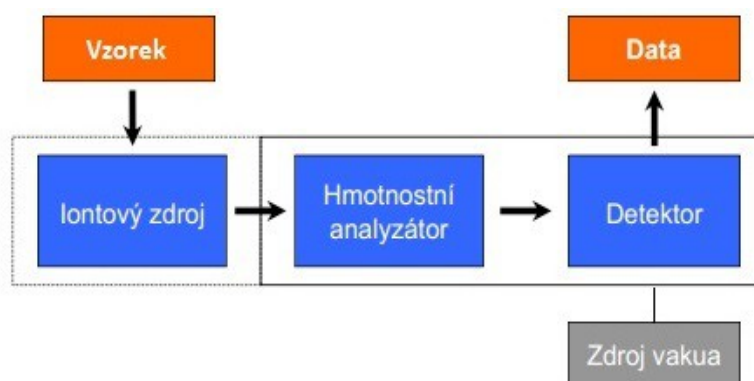
$\mu\text{g}$  – mikrogram, jednotka hmotnosti

# 1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie (zkr. MS) je analytická instrumentální metoda umožňující objasnění struktury látky a její kvantifikaci. Principem měření je převedení neutrálních molekul analytu (v libovolném skupenství) na ionty v plynné fázi a jejich následná analýza interakcí s elektromagnetickým polem<sup>1</sup>. Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum – záznam závislosti četnosti iontů na jejich  $m/z$  (poměr hmotnosti iontu a jeho elementárního náboje). Výhodami metody jsou malá spotřeba vzorku a velká citlivost, nevýhody jsou především vysoká pořizovací cena a destrukce měřeného vzorku. MS se používá ke kvalitativní i kvantitativní analýze a nalézá uplatnění v mnoha oborech.

## 1.1 Instrumentace

Zařízení pro hmotnostní spektrometrii se nazývá hmotnostní spektrometr a sestává se ze tří hlavních modulů: iontového zdroje, analyzátoru a detektoru, které jsou seřazeny v logickém pořadí, viz obrázek 1. Dalšími nepostradatelnými částmi spektrometru jsou vakuový systém, vstup pro zavedení vzorku a iontová optika.



**Obrázek 1** Schéma hmotnostního spektrometru. Přerušovaná linka značí možnost ionizace za atmosférického tlaku. Převzato z [1].

### 1.1.1 Iontové zdroje

V iontovém zdroji probíhá přeměna neutrálních molekul na ionty a převedení vzorku do plynné fáze (pokud vzorek již nebyl plynný). Pro ionizaci molekuly musí být dodaná energie větší než ionizační energie dané molekuly. Ionizační techniky se dělí

<sup>1</sup> Výjimkou je analyzátor doby letu, u kterého při analýze nedochází k interakci s elmag. polem.



podle energie dodané vzorku na měkké a tvrdé. U měkkých ionizačních technik stačí energie pouze na vytvoření iontu z neutrální molekuly vzorku, případně může dojít k malé fragmentaci. Tvrdé ionizační techniky dodají molekule přebytek energie, který vede k velké fragmentaci vzniklého iontu. Běžně se používají tvrdé ionizační techniky u GC-MS a měkké u LC-MS.

V současnosti nalézají největší uplatnění API techniky (atmospheric pressure ionization – ionizace za atmosférického tlaku), které umožňují snadné použití hmotnostní detekce ve spojení s kapalinovými separačními technikami, a elektronová ionizace umožňující práci s rozsáhlými databázemi spekter.

### ***Tvrdé ionizační techniky***

U tvrdých ionizačních technik je analytu dodán velký nadbytek energie a dochází vždy k fragmentaci výchozí molekuly. Místa fragmentace jsou daná vazebnou energií a výsledná hmotnostní spektra tedy budou pro chemické individuum při stejné dodané energii totožná. Tato skutečnost umožňuje existenci databází hmotnostních spekter. Databáze obsahují tisíce ověřených spekter látek a umožňují urychlit identifikaci neznámé látky pouhým porovnáním naměřeného spektra se spektrem z databáze.

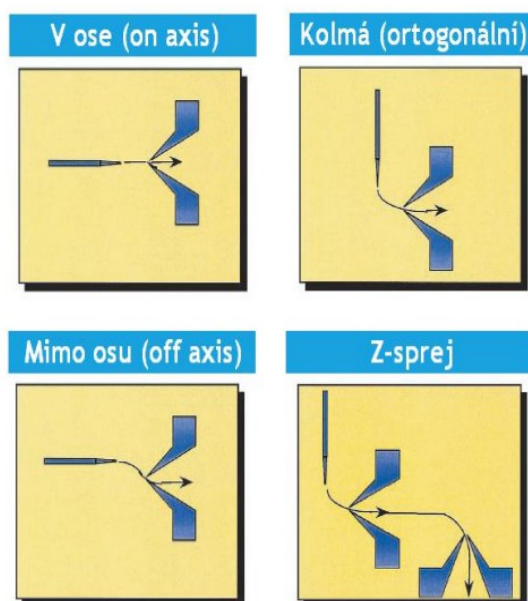
### ***Měkké ionizační techniky***

U měkkých ionizačních technik nedochází k silné fragmentaci a ve spektru se vždy nachází pík molekulového aduktu. K ionizaci je používán velký rozsah energií a i spektra jednoho analytu naměřená na stejném typu přístroje mohou být odlišná. Z těchto důvodů neexistují pro měkké ionizační techniky databáze hmotnostních spekter.

### ***Elektrosprej (ESI – „electrospray ionization“)***

Elektrosprej patří mezi API techniky a je nejrozšířenější ionizační technikou pro HPLC-MS [2]. Techniky ionizace za atmosférického tlaku jsou nejpoužívanější iontové zdroje pro spojení hmotnostního spektrometru s kapalinovou chromatografií. Všechny tyto techniky využívají sprejování jako způsob převedení vzorku do plynného stavu. Sprejování probíhá pomocí elektrického pole (pouze elektrosprej), pneumaticky pomocí plynu nebo vyhříváním kapiláry.

Pro citlivost analýzy je zásadní nejen způsob sprejování ale i geometrie spreje oproti vstupu do analyzátoru. Existuje několik základních geometrických uspořádání elektrospreje, viz obrázek 2.



**Obrázek 2** Geometrická uspořádání elektrospreje. Převzato z [3].

Uspořádání v ose je nejstarší, ale dnes se již nepoužívá, protože spolu s proudem iontů vstupuje do analyzátoru i příliš mnoho neutrálních částic. Uspořádání mimo osu a kolmé uspořádání propouští mnohem méně neutrálních částic. Zahnutí proudu iontů je umožněno napětím vloženým na vstupní šterbinu, které proud elektrostaticky urychluje a zaostřuje, zatímco neutrální částice pokračují po nezměněné dráze a oddělují se od iontů. Nejpoužívanějším uspořádáním je Z-sprej, který je tvořen dvěma kolmými vstupy.

Vzorek je přiváděn vyhřívanou kapilárou s vloženým napětím a do prostoru elektrospreje může vstupovat ve třech podobách:

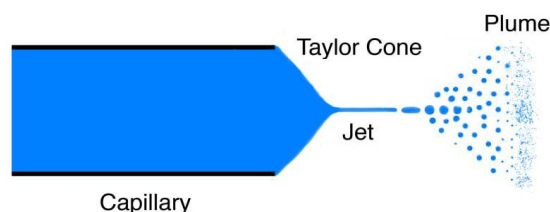
- a) elektrosprej samotného roztoku vzorku – vhodný pouze pro malé průtoky, používá se u nanoelektrospreje (nanoESI – nanoelektrosprej);
- b) elektrosprej s přídatným tokem kapaliny – přidaná kapalina podporuje ionizaci (používá se u spojení CZE-MS);
- c) elektrosprej s podporou zmlžovacího plynu – plyn pneumaticky usnadňuje zmlžování (nejběžnější typ elektrospreje u HPLC-MS).

Elektrosprej je používán v uspořádání tryskajícího kuželu („cone-jet“), při kterém je vzorek sprejován za konstantního průtoku. Vysoké napětí na konci kapiláry (obvykle 5 kV) umožňuje elektrostatické rozprašování kapaliny. Povrch kapaliny na konci kapiláry se vloženým napětím protahuje směrem k protilehlé elektrodě, tvoří se Taylorův kužel, viz obrázek 3 str. 11. Utržením z konce Taylorova kuželu vznikají kapky rozpouštědla s analytem nesoucí na povrchu náboj. Během odpařování rozpouštědla z kapek se zvyšuje hustota povrchového náboje [4]. Při dostatečném zmenšení kapky se repulzní síly vyrovnají povrchovému napětí, tento stav se nazývá Rayleighův limit. Po dalším zmenšení kapky repulzní síly převládnu a dojde ke Coulombické explozi. Kapka se rozpadne na menší kapičky také nesoucí na povrchu náboj. Celý proces se opakuje, dokud vznikající kapičky nejsou tak malé, že obsahují pouze několik iontů analytu. Jednotlivé ionty analytu se poté mohou uvolnit dvěma způsoby:

a) zbytkový náboj („charge residue“) – po Coulombické explozi se uvolní nabitá kapička obsahující jediný iont vzorku s malým množstvím rozpouštědla - všechno rozpouštědlo se poté odpaří, až zůstane samotný iont;

b) vypaření iontů („ion evaporation“) – po Coulombické explozi zůstává analyt ve větší kapičce - při přiblížení k Rayleighovu limitu dojde k vytržení samotného iontu analytu z kapky [5].

Se zvyšujícím se počtem iontů a kapiček nesoucích náboj se stejným znaménkem dochází k jejich elektrostatickému odpuzování a tvoří se chvost, viz obrázek 3.



**Obrázek 3** Profil kapaliny v elektrospreji. "Taylor Cone" Taylorův kužel, "Jet" proud, "Plume" chvost, "Capillary" kapilára s vloženým napětím. Převzato z [6].

Vznik nabitých kapek závisí na vlastnostech přívodní kapiláry, průtoku vzorku a zmlžovacího plynu nebo přídavné kapaliny, přítomnosti aditiv ve vzorku a typu analytu. Elektrosprej je jedinou používanou ionizační technikou, kde je vzorek zmlžován elektrostaticky a ne pouze mechanicky. Z tohoto důvodu není vhodný pro

nepolární analyty a rozpouštědla. Analyt ionizovaný elektrosprejem má nejčastěji podobu protonizované molekuly nebo aduktu s alkalickými kovy.

### 1.1.2 Analyzátořy

Analyzátoř je vakuovaný prostor, ve kterém dochází k interakci iontů s elektromagnetickým polem. Na základě této interakce se ionty pohybují různou rychlostí nebo po různých drahách a tím dochází k jejich disperzi podle hodnoty  $m/z$ . Ovládací systém přístroje umožňuje analýzu ve třech různých nastaveních:

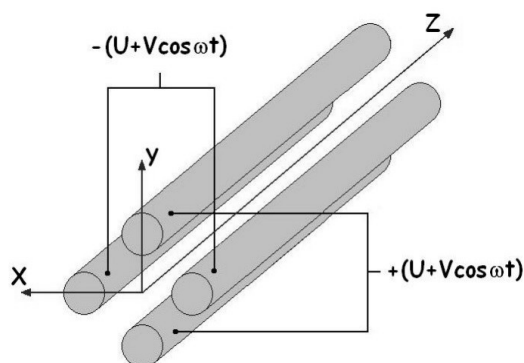
a) Full SCAN / TIC („total ion current“) - v čase je průběžně cyklicky snímáno celé spektrum v předem zadaném rozmezí  $m/z$ , nejčastěji se toto nastavení používá při použití MS jako detektoru v separačních metodách;

b) RIC („reconstructed ion chromatogram“) - po ukončení analýzy se ze získaných dat dodatečně extrahuje chromatografický záznam konkrétního iontu;

c) SIM („selected ion monitoring“) - je detekován pouze ion o zvoleném  $m/z$ . Tato možnost se používá, pokud ve vzorku hledáme známou látku nebo provádíme její kvantifikaci.

### Kvadrupól

Kvadrupól je tvořen čtyřmi kovovými tyčemi o délce cca 20-30 cm s kruhovým nebo hyperbolickým průřezem. Tyče jsou uspořádané do vrcholů čtverce a k analýze iontů dochází v prostoru mezi nimi. Na tyče je vloženo stejnosměrné a střídavé napětí tak, aby protilehlé tyče měly vždy souhlasný náboj, viz obrázek 4 str. 13. V prostoru uvnitř analyzátořu vzniká proměnlivé elektrické pole, ve kterém začnou letící ionty oscilovat s různou amplitudou podle svého  $m/z$  [8]. Pokud se iont při oscilaci příliš přiblíží ke stěně kvadrupólu, je zachycen a analyzátořem neprojde. Pouze ionty o určitém  $m/z$  při daném nastavení napětí projdou do detektoru. Kvadrupól tedy pracuje jako filtr, který propouští pouze některé ionty. Pohyb iontů uvnitř kvadrupólu je závislý na vložném napětí a lze ho vyjádřit rovnicemi pro pohyb po ose  $x$  a po ose  $y$  (rovnice 1 a 2 str. 13), kde  $V$  je střídavé napětí,  $U$  stejnosměrné napětí,  $e$  náboj,  $m_i$  hmotnost iontu,  $r_0$  poloměr kružnice vepsané tyčím kvadrupólu,  $\omega$  frekvence střídavého napětí a  $t$  čas [9].



**Obrázek 4** Schéma kvadrupólu. Napětí na tyčích se skládá ze stejnosměrné ( $U$ ) a střídavé složky ( $V \cdot \cos \omega t$ ). Převzato z [7].

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \frac{e}{m_i r_0^2} (U + V \cos \omega t) x = 0 \quad (1)$$

$$\frac{d^2 y}{dt^2} - \frac{e}{m_i r_0^2} (U + V \cos \omega t) y = 0 \quad (2)$$

Řešení těchto rovnic našel francouzský matematik Mathieu pomocí zavedení nových parametrů  $a$  (pro časově neměnné pole, vyvolané stejnosměrnou složkou napětí) a  $q$  (pro časově proměnné pole, vyvolané střídavou složkou napětí), viz rovnice 3 a 4, kde  $V$  je střídavé napětí,  $U$  stejnosměrné napětí,  $e$  náboj,  $m_i$  hmotnost iontu,  $r_0$  poloměr kružnice vepsané tyčím kvadrupólu a  $\omega$  frekvence radiofrekvenčního napětí. Grafickým znázorněním závislosti parametru  $a$  na parametru  $q$  pro iont o daném  $m/z$  je stabilitní diagram, viz obrázek 5 str. 14.

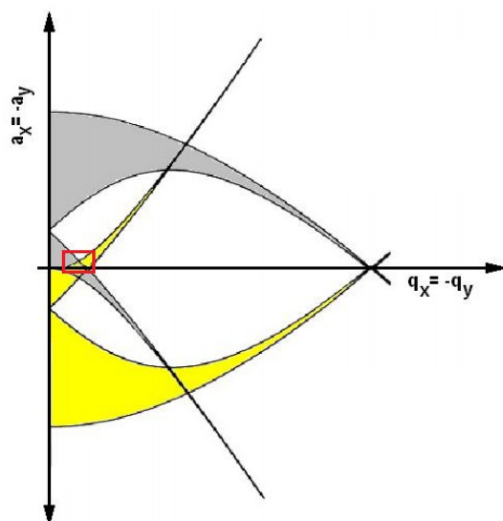
$$q_x = -q_y = \frac{2eV}{m_i r_0^2 \omega^2} \quad (3)$$

$$a_x = -a_y = \frac{4eU}{m_i r_0^2 \omega^2} \quad (4)$$

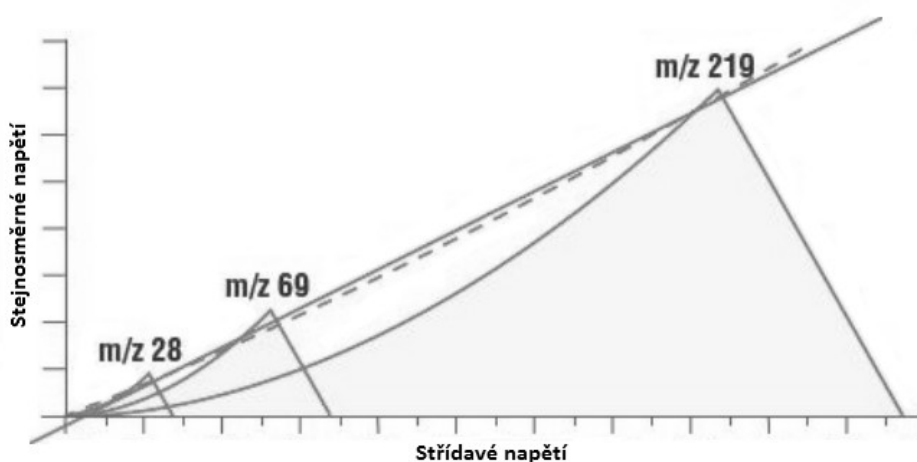
Stejnoseměrné i střídavé napětí se u kvadrupólu mění obvykle tak, že zůstává zachován jejich poměr. Přímka zobrazující tento poměr se nazývá „scan line“ a je nastavena tak, aby protínala oblasti stability iontů pod vrcholem (ne ve vrcholu) a zároveň vytínala v oblasti vždy stejný úsek (nemění se rozlišení), viz obrázek 6 str. 14.

Při snímání spektra TIC v průtoku je nutné, aby se vkládané napětí mnohokrát změnilo - tak je postupně možné detekovat ionty v celém zadaném rozsahu  $m/z$  (kvadrupól je tzv. skenující analyzátor). Pro efektivní analýzu je nutné, aby byla

frekvence změn napětí co nejvyšší. Pro lepší rozlišení je tedy třeba zadávat co nejmenší rozsah  $m/z$ , který bude skenován.



**Obrázek 5** Stabilitní diagram iontu v kvadrupólu. Barevné oblasti značí stabilitu iontu v ose  $x$  (žlutě) a v ose  $y$  (šedě), červeně je označena oblast poměru  $a$  ku  $q$  používaná v MS. Překresleno z [7].



**Obrázek 6** "Scan line" - přímka představující poměr stejnosměrného a střídavého napětí při analýze. Prerušovaná je vykreslena ideální křivka závislosti obou napětí (nepoužívá se kvůli náročnosti na kalibraci přístroje). Překresleno z [10].

Hlavní nevýhodou kvadrupólu je jeho malé rozlišení neumožňující snadné určení sumárního vzorce a přesnou izotopickou analýzu. Na rozdíl od ostatních analyzátorů je ale kvadrupól velmi robustní, méně náročný na údržbu a jeho pořizovací cena je nízká.

### 1.1.3 Detektory

V detektoru dochází k detekci přilétajících iontů a jejich převedení na elektronický signál, který je zpracováván v počítači. Detektory jsou součástí všech hmotnostních spektrometrů kromě těch s analyzátory Orbitrap a FT-ICR<sup>2</sup>.

Nejpoužívanějším typem detektoru u hmotnostních spektrometrů je elektronásobič. Ionty z analyzátoru dopadají na povrch konverzní dynody, kde dochází k emisi elektronů, které jsou usměrněny do násobiče. V násobiči se elektrony odráží soustavou dynod se zvyšujícím se vloženým napětím a proud letících elektronů se tak násobí při každém dalším odrazu od povrchu dynod (lavinový jev). Výsledný signál je oproti počtu přiváděných iontů zesílen až  $10^7$ krát a signál je měřen jako celkový vzniklý proud. Elektronásobiče jsou vyráběny ve dvou podobách jako elektronásobič s diskrétními dynodami nebo elektronásobič s jedinou kontinuální dynodou (channeltron).

Dalším typem detektoru je fotonásobič. Ionty z analyzátoru dopadají na povrch konverzní dynody, ze které vyráží elektrony. Elektrony poté dopadají na fosforovou destičku a dochází k emisi fotonů. Proud fotonů se zesiluje ve fotonásobiči a nakonec dopadá na fotokatodu, odkud se uvolňují elektrony. Signál je měřen jako vzniklý proud na fotokatodě. Fotonásobič je téměř neopotřebitelný, ale je zároveň méně citlivý než elektronásobič.

Zbylé typy detektorů jsou méně časté a patří mezi ně například Faradayova klec nebo mikrokanálová destička.

### 1.1.4 Vakuum, iontová optika a zavedení vzorku

Vakuum je pro hmotnostní spektrometr zcela zásadní. Zatímco existují iontové zdroje pracující za atmosférického tlaku i vakua, u všech spektrometrů je vakuum nepostradatelné v prostoru analyzátoru a detektoru. Umožňuje průlet iontů bez srážek a je tak zachována jejich dráha a rychlost. Vývoj výkonných vakuových pump umožnil vznik ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku a použití hmotnostního spektrometru jako detektoru pro kapalinové separační metody<sup>3</sup>.

---

2 Tyto analyzátory provádí zároveň detekci.

3 Tato použití kladou na vakuové pumpy vysoké nároky kvůli množství odčerpávaných atomů/molekul.

Vakuum je definováno jako stav plynné fáze o tlaku menším než atmosférický a dělí se na vakuum hrubé, jemné, vysoké a ultravakuum. Vakuový systém u hmotnostních spektrometrů je vždy dvoustupňový, protože současná vakuová technika pro dosažení vysokého vakua není schopna pracovat oproti atmosférickému tlaku. Prvním stupněm je dosaženo jemného vakua použitím rotačních olejových a spirálových pump. Ve druhém stupni je tlak snižen na  $10^{-3} - 10^{-8}$  Pa použitím difúzních a turbomolekulárních pump, které vždy pracují pouze oproti jemnému vakuu.

Iontová optika je část optiky zabývající se vedením proudu iontů. V souvislosti s MS se iontovou optikou nazývají součástky spojující jednotlivé moduly hmotnostního spektrometru, jejichž úlohou je zaostřovat a případně urychlovat proud iontů.

První součástí iontové optiky je přechod mezi iontovým zdrojem a analyzátozem. Ionty ze zdroje musí být usměrněny a jejich ztráty by měly být minimální. Zároveň by mělo dále projít minimální množství neutrálních částic<sup>4</sup>. Tento přechod je u současných přístrojů tvořen nejčastěji vyhřívanou kapilárou. Vyhřívání brání prudkému ochlazení iontů při vstupu do vakua, při kterém by mohlo docházet ke tvorbě klastrů. Pro dosažení většího proudu iontů a tím i většího signálu se užívá šestikanálové kapiláry. Více kapilár umožňuje vyšší průtok iontů a zároveň nedochází ke změně laminárního proudění na turbulentní jako při použití většího vnitřního průměru kapiláry.

Další přechody mezi různými stupni vakua a jednotlivými moduly jsou tvořeny iontovými nálevkami, skimmery nebo také multipóly. Multipóly (hexapóly a oktapóly) jsou konstrukčně obdobou analyzátoru kvadrupólu, ale na tyčovité elektrody se vkládá pouze střídavé napětí. Díky tomu jimi prochází všechny ionty a dochází pouze k jejich zaostření a ne ke vzniku nestabilních oscilací.

Zavedení vzorku do iontového zdroje je možné třemi způsoby:

- a) napojení hmotnostního spektrometru na výstup z chromatografické kolony (u GC obvykle ve vakuu, u LC za atmosférického tlaku);
- b) přímé zavedení vzorku pomocí evakuované sondy;
- c) kombinace zavedení vzorku a ionizace u desorpčních iontových zdrojů (je možné provádět za atmosférického tlaku i ve vakuu).

---

<sup>4</sup> Tato podmínka je zvláště důležitá u API technik, kde přechod odděluje prostor s atmosférickým tlakem od vakua.



### 1.1.5 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Analyzátory umožňující dvou a vícestupňovou analýzu iontů se nazývají tandemové, značí se MS/MS nebo MS<sup>n</sup>. Tandemové MS přístroje jsou zařízení schopná selektivní separace vybraného iontu a jeho další fragmentace. Tento proces se u některých tandemů může opakovat až desetkrát. Díky tomu lze detailně analyzovat strukturu analytu. Proces fragmentace v tandemu probíhá několika možnými mechanismy:

a) fragmentace za zdrojem (PSD – „Post Source Decay“) – ionty vzniklé v iontovém zdroji mají přebytek vnitřní energie, ale k jejich rozpadu dochází až v prostoru analyzátoru [10];

b) disociace záchytem elektronu (ECD – „Electron Capture Dissociation“) – vícenásobně kladně nabitě ionty zachycené v ICR cele interagují s nízkoenergetickými elektrony uvolňovanými ze žhaveného vlákna - energie vzniklá částečnou neutralizací poté způsobí přebytek vnitřní energie a dojde k fragmentaci [11];

c) disociace přenosem elektronů (ETD – „Electron Transfer Dissociation“) – zdrojem elektronů jsou radikál-anionty s malou elektronovou afinitou; při interakci s vícenásobně kladně nabitými ionty dochází k přenosu elektronu a k fragmentaci obdobně jako u ECD [12];

d) multifotonová disociace infračerveným zářením (IRMPD – „InfraRed MultiPhoton Dissociation“) – paprsek infračerveného záření je zaměřen přímo do prostoru iontové pasti nebo ICR cely - interakcí záření s ionty se zvyšuje jejich vibrační energie, až dojde k fragmentaci;

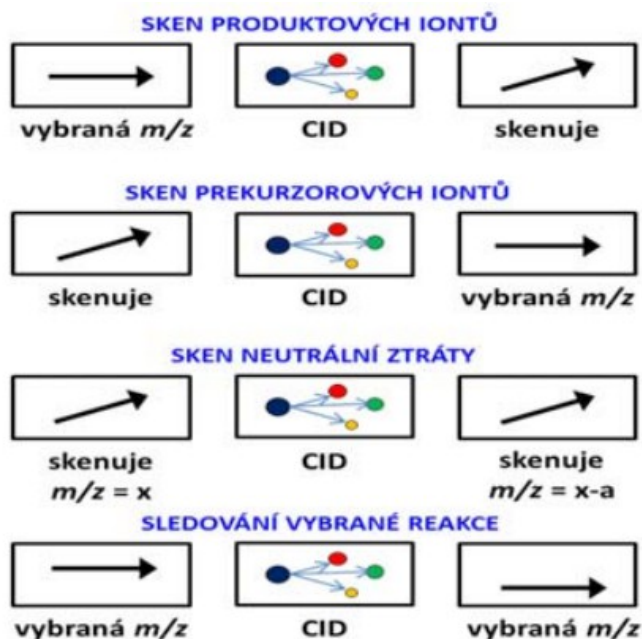
e) disociace vyvolaná srážkou (CID – „Collision Induced Dissociation“) – proud iontů prochází kolizní celou, tj. prostorem s tlakem vyšším než je vakuum v hmotnostním spektrometru (až 10<sup>-4</sup> Pa) naplněným kolizním plynem (dusík, argon, helium). Zde dochází ke srážkám iontů s neutrálními molekulami plynu [13]. Energie srážky se u iontu mění na vibrační a rozšiřuje se do všech vazeb molekuly. Nejslabší vazby zanikají a dochází k fragmentaci. Tento typ fragmentace je u běžných tandemů nejčastější. Pokud je fragmentace prováděna v hmotnostním spektrometru s analyzátozem Orbitrap, nazývá se HCD („higher-energy collisional dissociation“)<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> V Orbitrapu nedochází k fragmentaci v prostoru analyzátoru, ale v multipólu připojeném na C-trap.

## Trojité kvadrupól

Trojité kvadrupól (QqQ nebo také TripleQuad) je tandemový hmotnostní spektrometr složený ze tří kvadrupólů (nebo dvou kvadrupólů a jednoho multipólu). Tento tandemový hmotnostní spektrometr může pracovat v několika módech, viz obrázek 7.



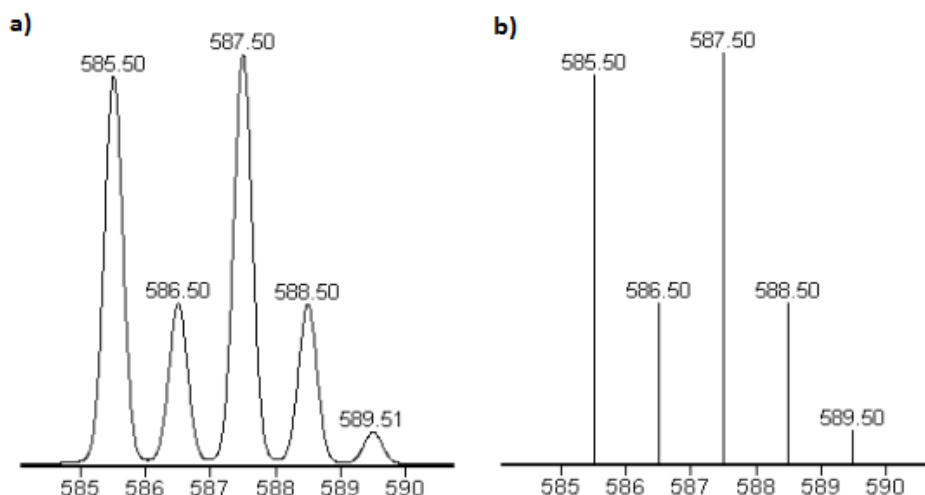
**Obrázek 7** Pracovní módy trojitého kvadrupolu. Sledování vybrané reakce se zkracuje SRM nebo MRM. Převzato z [7].

Využití prvního a třetího kvadrupólu závisí na použitém nastavení, prostřední multipól je vždy místem, kde probíhá fragmentace. U trojitého kvadrupólu je fragmentace uskutečňována procesem CID, proto se vřazený multipól nazývá kolizní celou [14]. Trojitý kvadrupól lze používat i jako jednoduchý hmotnostní spektrometr. V takovém případě pracuje pouze první kvadrupól a zbylé moduly fungují jako iontová optika – ionty jimi procházejí bez interakce.

## 1.2 Hmotnostní spektrum

Hmotnostní spektrum je grafické znázornění závislosti četnosti iontů na  $m/z$ . Na ose x je hmotnost iontu dělená jeho elementárním nábojem a tato veličina je konvenčně bezrozměrná. V současnosti se stále častěji používá pro  $m/z$  nová jednotka Thomson, která byla navržena v roce 1991.

Spektrum může mít dvě podoby, viz obrázek 8.



**Obrázek 8** Hmotnostní spektrum a) profilové - spektrum jak je zaznamenáno detektorem; b) centroidové - píky redukovány na sloupce v těžišti původního píku.

Intenzita neboli četnost iontů se vynáší na osu y jako absolutní nebo relativní vůči píku s největší intenzitou. Ten se nazývá základní pík a jeho intenzita je z definice vždy rovná 100 %. U měkkých ionizačních technik bývá základní pík záznamem molekulového iontu. Naopak u tvrdých ionizačních technik je molekula fragmentována a molekulový pík ve spektru chybí nebo je jeho intenzita velmi malá. Ionty vzniklé fragmentací se nazývají fragmentové ionty a jejich  $m/z$  je vždy menší než  $m/z$  molekulového iontu. Pokud se ve spektru objevují ionty s  $m/z$  větším než u molekulového iontu, jedná se o aduktové ionty vzorku s rozpouštědlem nebo prostředím.

### 1.2.2 Hmotnost iontu

Na ose x hmotnostního spektra odečítáme hodnoty  $m/z$  detekovaných iontů. Pokud se jedná o jednonásobně nabité ionty, odpovídá  $m/z$  číselně hmotnosti iontu v jednotkách amu. Pro účely hmotnostní spektrometrie se používají tři způsoby vyjádření hmotnosti iontů:

a) monoizotopická hmotnost – počítá se pouze z relativních atomových hmotností nejstabilnějších izotopů. V hmotnostních spektrech odpovídá zpravidla vrcholu píku daného iontu;

b) průměrná hmotnost zahrnuje do výpočtu váženou hmotnost všech známých izotopů prvků. Tato hmotnost odpovídá ve spektru středu píku daného iontu;

c) nominální hmotnost je vypočítaná z celočíselných hmotností prvků; v současnosti se nepoužívá, protože vzhledem k přesným hodnotám  $m/z$  získaných analýzou se příliš liší. Rozdíl mezi přesnou a nominální hmotností se nazývá hmotnostní nadbytek/úbytek a u iontů s  $m/z$  nad 500 Th dosahuje až 0,5 Th.

### 1.2.3 Interpretace hmotnostního spektra

#### Určení hmotnosti

Zjištění molární hmotnosti je základním krokem pro identifikaci neznámé molekuly. Odečítání hmotnosti z hmotnostního spektra zásadně závisí na použité ionizační technice a zjištěná hmotnost je pouze monoizotopická. U tvrdých ionizačních technik může pík iontu původní molekuly úplně chybět. Pokud je přítomen, jedná se o pík molekulového iontu a lze přímo odečíst monoizotopickou hmotnost molekuly, která je číselně shodná s hodnotou  $m/z^6$ . Při použití měkkých ionizačních technik je pík iontu původní molekuly ve spektru vždy přítomný a zpravidla bývá i základním píkem. Jedná se vždy o molekulový adukt, nejčastěji s vodíkovým, někdy se sodným nebo draselným kationtem. Molární hmotnost molekuly musí být tedy z  $m/z$  vybraného píku vypočítána.

#### Dusíkové pravidlo

Pokud provádíme analýzu organických látek tvořených běžnými prvky (uhlík, vodík, kyslík, síra, chlór, fosfor, fluor, atd.), platí pro tyto prvky, že pokud mají lichý (resp. sudý) počet valenčních elektronů, je lichá (resp. sudá) i jejich relativní atomová hmotnost. Jedinou výjimkou je dusík, který má pět valenčních elektronů a jeho relativní atomová hmotnost je sudá. Z toho vyplývá dusíkové pravidlo - pokud sloučenina obsahuje sudý počet dusíkových atomů její monoizotopický molekulový iont bude detekován se sudým  $m/z$ . Stejně tak molekulový iont s lichým počtem atomů dusíků bude mít lichý  $m/z$ . Pro iontové adukty, nebo ionty se sudým počtem elektronů platí dusíkové pravidlo obráceně.

---

6 U přístrojů s dostatečným rozlišením je třeba uvažovat i hmotnostní úbytek způsobený odtrženým elektronem.

## Přírodní izotopové směsi

Kvůli různému zastoupení izotopů v molekulách analytu může být pík iontu obklopen mnoha menšími píky, které lze odlišit na přístroji s dostatečně velkým rozlišením. Tyto píky jsou izotopology – odpovídají iontům se stejným sumárním vzorcem lišícím se pouze izotopovým složením. Pro snadnou orientaci v izotopickém klastru se izotopology zpravidla značí jako  $A+n$  ( $m/z$  větší o  $n$  Th), kde  $A$  představuje monoizotopický pík.

Většina prvků má více než jeden přirozený izotop. V přírodě se izotopy jednoho prvku vyskytují vždy ve stejném poměru typickém pro daný prvek. Tento poměr se promítá i do hmotnostních spekter sloučenin. Zastoupení jednotlivých izotopologů několika nejběžnějších prvků je shrnuto v tabulce 1. Uhlík se rovněž vyskytuje v přírodě v izotopické směsi. Zastoupení uhlíku  $^{14}\text{C}$  je tak nízké (stopové), že není uvažován. Uhlík  $^{13}\text{C}$  naopak tvoří přibližně 1,1 % veškerého uhlíku a pomocí intenzity izotopologů analyzované látky lze odhadnout počet uhlíků ve vzorku, viz tabulka 2 str. 22.

**Tabulka 1** Přírodní izotopové zastoupení běžných prvků. RČ relativní intenzita píku; převzato z literatury [15].

Prvek	A		A+1		A+2		„Typ prvku“
	Ar	RČ (%)	Ar	RČ (%)	Ar	RČ (%)	
<b>H</b>	1	100	2	0,015			A
<b>C</b>	12	100	13	1,1			A+1
<b>N</b>	14	100	15	0,37			A+1
<b>O</b>	16	100	17	0,04	18	0,2	A+2
<b>F</b>	19	100					A
<b>Si</b>	28	100	29	5,1	30	3,4	A+2
<b>P</b>	31	100					A
<b>S</b>	32	100	33	0,79	34	4,4	A+2
<b>Cl</b>	35	100			37	32	A+2
<b>Br</b>	79	100			81	97,3	A+2
<b>I</b>	127	100					A

## Neutrální ztráty

Při fragmentaci iontů se sudým počtem elektronů (u měkkých ionizačních technik) dochází nejčastěji ke vzniku fragmentů ztrátou stabilní neutrální molekuly. Protože neutrální molekuly nelze detekovat, lze tyto ztráty pozorovat pouze jako rozdíl ve hmotnosti dvou iontů. Znalost neutrálních ztrát pomáhá objasnit strukturu analytu. Rozdíly v  $m/z$  porovnávaných píků v rozmezí 4-14 Th a 21-25 Th patří do tzv.

zakázaných ztrát. Tyto rozdíly nemohou být vysvětleny ztrátou stabilní neutrální molekuly a jejich přítomnost znamená, že porovnávané píky nejsou prekurzorový a produktový iont, nebo došlo k vzácnému jevu odštěpení radikálu.

**Tabulka 2** Izotopové příspěvky uhlíku - relativní intenzita oproti základnímu píku A. Převzato z literatury [15].

	A+1	A+2		A+1	A+2	A+3
<b>C<sub>1</sub></b>	1,1	0	<b>C<sub>16</sub></b>	18	1,5	0,1
<b>C<sub>2</sub></b>	2,2	0,01	<b>C<sub>17</sub></b>	19	1,7	0,1
<b>C<sub>3</sub></b>	3,3	0,04	<b>C<sub>18</sub></b>	20	1,9	0,1
<b>C<sub>4</sub></b>	4,4	0,07	<b>C<sub>19</sub></b>	21	2,1	0,1
<b>C<sub>5</sub></b>	5,5	0,12	<b>C<sub>20</sub></b>	22	2,3	0,2
<b>C<sub>6</sub></b>	6,6	0,18	<b>C<sub>22</sub></b>	24	2,8	0,2
<b>C<sub>7</sub></b>	7,7	0,25	<b>C<sub>24</sub></b>	26	3,3	0,3
<b>C<sub>8</sub></b>	8,8	0,34	<b>C<sub>26</sub></b>	29	3,9	0,3
<b>C<sub>9</sub></b>	9,9	0,44	<b>C<sub>28</sub></b>	31	4,5	0,4
<b>C<sub>10</sub></b>	11	0,54	<b>C<sub>30</sub></b>	33	5,2	0,5
<b>C<sub>11</sub></b>	12,1	0,67	<b>C<sub>35</sub></b>	39	7,2	0,9
<b>C<sub>12</sub></b>	13,2	0,8	<b>C<sub>40</sub></b>	44	9,4	1,3
<b>C<sub>13</sub></b>	14,3	0,94	<b>C<sub>50</sub></b>	55	15	2,6
<b>C<sub>14</sub></b>	15,4	1,1	<b>C<sub>60</sub></b>	66	21	4,6
<b>C<sub>15</sub></b>	16,5	1,3	<b>C<sub>100</sub></b>	110	60	22

### 1.3 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší koncentrace analytu, při které je přesnost stanovení taková, že lze provést kvantifikaci. Určení LOQ při užití hmotnostního spektrometru lze provést dvěma způsoby: empirickou metodou - proměření ředící řady a statistickou metodou - výpočtem ze šumu z opakovaného měření blanku [16]. Obecně se u MS považuje za vhodnější metoda empirická.

Mez stanovitelnosti je tedy koncentrace v takovém ředění, které je krajním bodem lineárního dynamického rozsahu. Lineární dynamický rozsah se z naměřených hodnot ředící řady určí pomocí QC a R koeficientů. QC koeficient se počítá podle rovnice 5 str. 23, kde  $y_i$  naměřená hodnota,  $\hat{y}$  teoretická hodnota  $y_i$  vypočtená z regresní rovnice přímky,  $\bar{y}$  průměr hodnot  $y_i$ .

$$QC = 100 \cdot \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-1}} \quad (5)$$

Korelační koeficient R se počítá podle rovnice 6, kde  $X_i$  je odchylka hodnoty  $x_i$  od průměru hodnot  $x_i$ ,  $Y_i$  odchylka hodnoty  $y_i$  od průměru hodnot  $y_i$ . Linearita se obecně považuje za prokázanou, když R je větší než 0,99 a QC je menší než 5 %. Měření je vhodné provádět alespoň v tripletu a platí, že relativní směrodatná odchylka pro jednotlivé koncentrace nesmí přesáhnout 20 %.

$$R = \frac{\sum (X_i \cdot Y_i)}{\sqrt{(\sum (X_i)^2) \cdot (\sum (Y_i)^2)}} \quad (6)$$

#### **1.4 Cíl práce**

Cílem této práce je identifikovat ropinirol a jeho nečistoty pomocí hmotnostní spektrometrie, přiřadit každé látce strukturní vzorec a objasnit jejich fragmentaci měření na trojitém kvadrupólu. Dalším cílem je určit mez stanovitelnosti jednotlivých látek měření v SRM módu trojitého kvadrupólu.

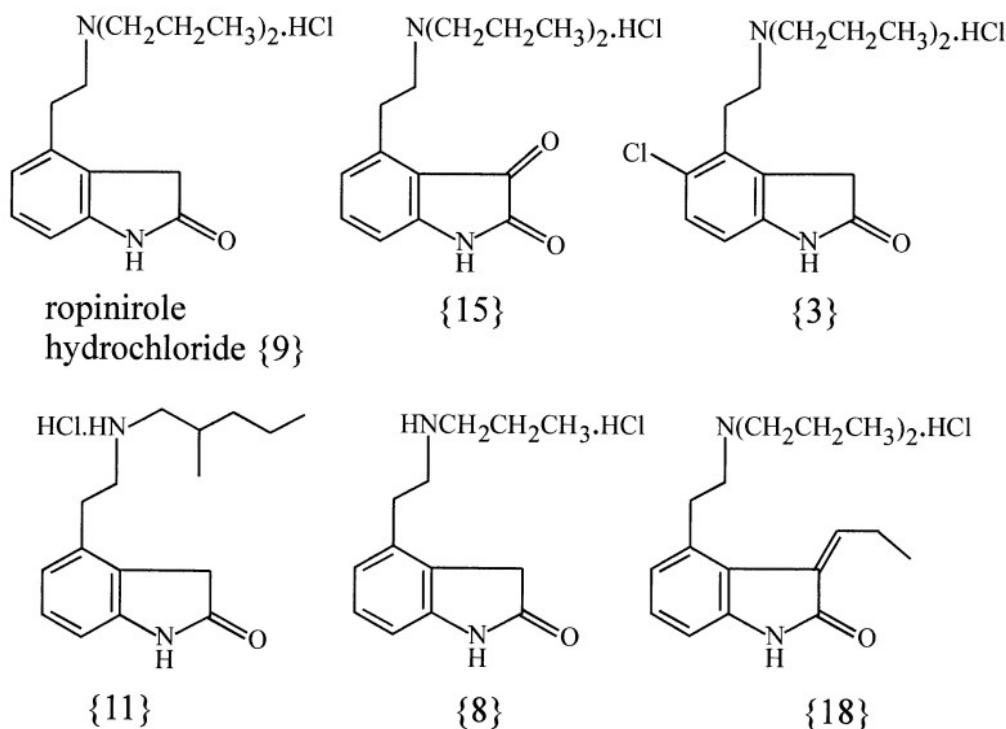
## 2. Experimentální část

### 2.1 Použité chemikálie

Rozpouštědlo pro přípravu vzorků byl 50% acetonitril připravený smísením stejného objemu 100% acetonitrilu a deionizované vody. Mobilní fáze A byl čistý acetonitril, mobilní fáze B byl roztok 0,1% kyseliny mravenčí v deionizované vodě připravený smísením obou čistých rozpouštědel v poměru 1:1000. Čistý acetonitril byl acetonitril s čistotou  $\geq 99,9\%$  LC-MS Chromasolv od firmy Fluka Analytical. Kyselina mravenčí byla pro analýzu ACS s čistotou 98-100 % od firmy Merck. Deionizovaná voda byla přečištěna na Milli-Q Water Purification System.

### 2.2 Vzorky

Vzorky jsou ropinirol a pět jeho nečistot. Látky byly syntetizovány a dodány firmou SmithKline Beecham Pharmaceuticals (Tonbridge, UK) v roce 1998 včetně nákresu jejich struktur bez legendy, viz obrázek 9.



**Obrázek 9** Struktury látek. Převzato z článku [17].



Všechny látky byly v práškovém stavu uloženy v uzavřených skleněných vialkách s označením specifickými kódy farmaceutické firmy. Vzorky byly získány pro účely výzkumu jejich vlastností z hlediska separace kapalinovou chromatografií [17] a kapilární zónovou elektroforézou [18].

### ***2.3 Instrumentace***

Hmotnostní spektra byla měřena na sestavě kapalinového chromatografu Agilent 1290 Infinity UHPLC s pumpou QuatPump G4204A a hmotnostního spektrometru Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS. Měření byla prováděna při průtoku mobilní fáze 0,200 ml/min za laboratorní teploty 21°C bez zapojené kolony. Mobilní fáze byly roztoky A a B v poměru 50:50. Nástřik byl 0,10 µl s oplachem jehly po dobu 3 s při teplotě 15°C. Kapilára v elektrospreji byla vyhřívána na 320°C a bylo na ní vloženo napětí 5 kV. Tlak zmlžujícího plynu byl 40 psi.

### ***2.4 Postup***

Vzorky pro měření o koncentraci 0,5 mg/ml jsem připravila rozpuštěním práškových vzorků v 50% acetonitrilu v celkovém objemu 2 ml. Každý vzorek jsem nejdříve změřila jako TIC spektrum a poté proměřila jejich spektra s CID fragmentací s rozsahem fragmentačních energií 5-25. Při porovnání naměřených spekter jsem pro každý vzorek zvolila takovou fragmentační energii, při které byl ve spektru ještě patrný prekurzorový iont. Poté jsem při této fragmentační energii v módu skenování produktových iontů změřila spektra fragmentace izotopického klastru každého vzorku.

Pro měření LOQ vzorků v módu MRM jsem z naměřených spekter CID fragmentace vybrala produktové ionty, které byly v daných spektrech nejčtetnější a fragmentační energii, při které byl vybraný pík zvoleného iontu nejintenzivnější. Z rozpuštěných vzorků v koncentraci 0,5 mg/ml jsem připravila ředící řadu s ředěním: 8x, 8x, 8x, 4x, 4x, 4x, 2x, 2x, 2x, 2x, 2x. Každý vzorek jsem měřila třikrát a poté změřila čisté rozpouštědlo jako blank. Do určení lineárního dynamického rozsahu a meze stanovitelnosti jsem započítala pouze ředění, u kterých je relativní směrodatná odchylka menší než 20 %.

### 3. Výsledky a diskuze

#### 3.1 Vzorek 1

Základním píkem TIC spektra, viz tabulka 3, je pík 261,2, který odpovídá protonované molekule látky. Z toho vyplývá, že monoizotopická hmotnost molekuly vzorku 1 je 260,2. Tato hmotnost odpovídá ropinirolu nebo jeho izomerní nečistotě. Píky 262,2 a 263,2 jsou izotopology píku 261,2. Zbývajících píky TIC spektra jsou píky 114,1 a 160,1.

**Tabulka 3** Záznam TIC hmotnostního spektra vzorku 1. Pro grafické zobrazení spektra viz obrázek 10 str. 42.

<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)
114,1	3,38
160,1	1,35
261,2	100,00
262,2	18,76
263,2	1,74

Ve spektru CID fragmentace s kolizní energií 20 jsou oba ionty stále přítomné a pík iontu 114,1 je velmi intenzivní, viz tabulka 4. To znamená, že tento iont je poměrně stabilní. V dostupných člancích o ropinirolu je tento iont často zmiňován jako ideální pro kvantifikaci ropinirolu v matici pomocí MRM módu [20, 21]. To je umožněno právě jeho velkou intenzitou, díky které je při fragmentaci ropinirolu vždy základním píkem fragmentačního spektra.

**Tabulka 4** Záznam hmotnostního spektra produktových iontů prekurzoru 261,2 vzorku 1. Měřeno při fragmentační energii 20, pro grafické zobrazení spektra viz obrázek 11 str. 42.

<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)	<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)
43,1	1,41	105,1	0,67
44,0	1,12	114,1	100,00
58,0	0,50	117,1	1,03
72,1	5,15	132,1	8,99
86,1	17,45	160,1	17,64
102,1	0,50	261,2	3,05

Iont s  $m/z$  114,1 je v literatuře popisován jako alkylimoniový kationt vzniklý fragmentací terciárních aminů [22, 23]. Relativní intenzity izotopologů 115,1 a 116,1 a dusíkové pravidlo potvrzují, že iont má sumární vzorec  $C_7H_{14}N$ . Protože tento iont má u vzorku 2 mnohem menší intenzitu a není ani základním píkem fragmentačního spektra vzorku 2, mohu potvrdit, že vzorek 1 je ropinirol (struktura {9}) neboli 4-[2-(dipropylamino)ethyl]-2H-indol-2-on.

Z těchto faktů a strukturního vzorce ropinirolu vyplývá, že iont 114,1 je N,N-dipropylmethaniminium. Ionty 86,1 a 72,1 odpovídají neutrální ztrátě ethenu (resp. propenu) z iontu 114,1 a jedná se o N-methyl-N-propylmethaniminium a N-propylmethaniminium. Další významné píky patří iontům 160,1 a 132,1. Vzhledem ke struktuře ropinirolu jsem sumární vzorec iontu 160,1 s pomocí izotopologů, viz tabulka 5 a dusíkového pravidla odhadla jako  $C_{10}H_{10}NO$  odpovídající fragmentovému iontu vznikajícímu neutrální ztrátou dipropylaminu z 2-(N,N-dipropylamino)ethylového zbytku. Jedná se pravděpodobně o 4-ethenyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indolium. Pík 132,1 má hodnotu  $m/z$  přesně o 28 Th menší než pík 160,1 a proto předpokládám, že vznikl neutrální ztrátou oxidu uhelnatého z oxindolového jádra [19] iontu 160,1.

**Tabulka 5** Hmotnostní spektrum produktových iontů prekurzorů z izotopického klastru iontu 261,2 vzorku 1. Měřeno při fragmentační energii 20, pro grafické zobrazení spektra viz obrázek 12 str. 42.

$m/z$ (Th)	Relativní intenzita (%)	$m/z$ (Th)	Relativní intenzita (%)
43,1	1,53	116,1	0,29
44,0	1,26	117,1	1,02
58,0	0,52	118,1	0,09
72,1	5,31	132,1	8,83
73,1	0,22	133,1	0,87
86,1	17,74	160,1	16,91
87,1	1,01	161,1	1,95
102,1	0,50	162,1	0,14
105,1	0,67	261,2	2,74
106,1	0,10	262,2	0,51
114,1	100,00	263,2	0,06
115,1	8,49		

Zbylé píky přesahující 1 % relativní intenzity jsou píky 43,1, 44 a 117,1. Iont 43,1 neobsahuje dusík a jeho hmotnost odpovídá propylovému karbokationtu. Iont 44

obsahuje jeden atom dusíku a domnívám se, že se jedná o methylmethaniminium. Oba tyto ionty vznikají odštěpením stabilní molekuly z iontu 72,1. V prvním případě jde o ztrátu ethylaminu a ve druhém o ztrátu propenu. Ion 117,1 vzniká fragmentací iontu 132,1. Rozdíl v  $m/z$  tedy činí 15 Th, z čehož vyplývá, že se nejedná o ztrátu neutrální molekuly, protože úbytek 15 Da patří do tzv. zakázaných ztrát. Zároveň má tento iont lichou hodnotu  $m/z$ , přestože ztráta 15 Da nemohla být způsobena odštěpením jakékoli formy dusíku. Z těchto faktů soudím, že se nejpravděpodobněji jedná o kation-radikál vznikající odtržením methylového radikálu.

Všechny uvedené reakce jsem shrnula ve schéma fragmentace, viz obrázek 24 str. 47.

Z naměřených spekter vyplývá, že pro stanovení vzorku 1 v módu SRM je ideální přechod 261,2→114,1 při fragmentační energii 15. Touto metodou jsem z naměřených údajů, viz tabulka 17 str. 53, určila mez stanovitelnosti na 0,954 ng/ml a horní mez lineárního dynamického rozsahu na 7,81 µg/ml s korelačním koeficientem 1,0000 a QC koeficientem 0,7855.

### 3.2 Vzorek 2

Hmotnostní TIC spektrum vzorku 2 je prakticky shodné s TIC spektrem vzorku 1, viz tabulka 6. Základní pík a jeho izotopology mají téměř stejné poměry jako u vzorku 1 a mají totožné hodnoty  $m/z$ , což potvrzuje, že oba vzorky mají stejný sumární vzorec  $C_{16}H_{25}N_2O$  a monoizotopickou hmotnost 260,1. Proto se domnívám, že se jedná o strukturální izomer vzorku 1.

**Tabulka 6** Záznam TIC hmotnostního spektra vzorku 2. Pro grafické zobrazení viz obrázek 13 str. 43.

$m/z$ (Th)	Relativní intenzita (%)
114,1	0,70
132,1	0,58
160,1	4,56
161,1	0,53
261,2	100,00
262,2	18,73
263,2	1,73

Ve spektru vzorku 2 je ale pík 114,1 podstatně méně intenzivní. To znamená, že iont 114,1 je u vzorku 2 mnohem méně stabilní než u vzorku 1. Tento rozdíl je způsoben změnou ve struktuře (alkylamino)alkylového zbytku navázaného na oxindol. Jak už jsem zmínila v diskuzi u vzorku 1 právě skutečnost, že pík 114,1 je u vzorku 2 tak málo intenzivní považují za jeden z důkazů, že vzorek 1 je ropinirol a vzorek 2 jeho izomerní nečistota {11}, tj. 4-{2-[(2-methylpentyl)dipropylamino]ethyl}-2H-indol-2-on. Tomu odpovídá i předpoklad, že pík 114,1 je zde tak málo intenzivní, protože se jedná o méně stabilní N-(2-methylpentyl)methaniminium vzniklé ze sekundárního aminu.

Pík 160,1 je základním píkem fragmentačního spektra, viz tabulka 7. Z něho odštěpením molekuly oxidu uhelnatého vzniká iont 132,1 (rozdíl 28 Th). Ten dále podléhá ztrátě kyanovodíku, jak potvrzuje rozdíl 27 Th a dusíkové pravidlo za vzniku iontu 105,1.

Prvním zásadním rozdílem oproti fragmentačnímu spektru vzorku 1 je přítomnost píků 148,1, 57,1 a 85,1. Pík 148,1 značí iont 4-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indolium vzniklý ztrátou propylmethaniminu. Tato ztráta je možná, protože ve zbytku je sekundární amin namísto terciárního. Přítomnost píku 148,1 považují za další z důkazů, že vzorek 2 není ropinirol. Další významné píky patří iontům 57,1 a 85,1. Protože se nevyskytují ve spektru fragmentace vzorku 1, lze odvodit, že jsou to ionty vzniklé fragmentací alkylového zbytku typického pro vzorek 2. Iont 85,1 odpovídá karbokationtu 2-methylpent-2-ylia vzniklému ztrátou methyliminu z iontu 114,1. Iont 57,1 s úbytkem 28 Da odpovídá ztrátě ethenu z iontu 85,1.

**Tabulka 7** Záznam hmotnostního spektra produktových iontů prekurzoru 261,2 vzorku 2. Měřeno při fragmentační energii 20, pro grafické zobrazení spektra viz obrázek 14 str. 43.

<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)	<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)
41,0	0,90	115,1	0,84
43,1	18,21	117,1	2,53
44,0	32,22	132,1	26,96
57,1	5,98	148,1	3,08
85,1	3,43	160,1	100,00
105,1	1,44	177,1	0,76
114,1	20,57	261,2	4,01

Vzhledem k absenci píku 72,1 a strukturnímu vzorci vzorku 2 se domnívám, že iont 43,1 vzniká z iontu 85,1 ztrátou propenu a iont 44 vzniká z iontu 114,1 ztrátou pentenu. Tyto píky značící propylový karbokationt (43,1 Th) a methylnmethaniminium (44 Th) jsou u vzorku 2 mnohem více intenzivní oproti vzorku 1. To je způsobeno menší stabilitou jejich prekurzorů.

Zbývajícimi píky jsou pík 105,1 a 117,1. Oba ionty mají původ v iontu 132,1. Iont 105,1 s úbytkem 27 Da vzniká ztrátou kyanovodíku a iont 117,1 odštěpením methylového radikálu. Pro grafické zobrazení fragmentace vzorku 2 viz obrázek 25 str. 48.

Z naměřených spekter jsem určila, že pro stanovení vzorku 2 v módu SRM je ideální přechod 261,2→160,1 při fragmentační energii 17. Touto metodou jsem z naměřených údajů, viz tabulka 18 str. 54, určila mez stanovitelnosti na 0,954 ng/ml a horní mez lineárního dynamického rozsahu na 62,5 µg/ml s korelačním koeficientem 0,9999 a QC koeficientem 4,3359.

### 3.3 Vzorek 3

Základní pík TIC spektra je 301,2 a píky 302,2 a 303,2 jsou jeho izotopology, viz tabulka 8 str. 31. Pík 301,2 označuje adukt molekuly s vodíkovým kationtem, z toho vyplývá, že monoizotopická hmotnost vzorku je 300,2. Ta se od hmotnosti ropinirolu liší přesně o 40 Da. Dále jsou v TIC spektru přítomny píky 114,1 a 200,1. Iont 114,1 byl již diskutován a značí N,N-dipropylmethaniminium. Iont 200,1 má  $m/z$  vyšší přesně o 40 Th oproti iontu 160,1, který se vyskytoval ve spektru ropinirolu. Z toho vyvozují, že se jedná o iont vzniklý stejnou fragmentací, tj. ztrátou dipropylaminu. Jeho přítomnost potvrzuje, že hmotnostní nadbytek vzorku 3 oproti ropinirolu je způsoben substituentem na oxindolu. Z těchto faktů vyplývá, že vzorek 3 je nečistota {18}, tj. 3-propyliden-4-[2-(dipropylamino)ethyl]-2H-indol-2-on. Zbylé píky TIC spektra jsou nečistoty vzorku 3.

Základním píkem fragmentačního spektra je 114,1 a ve spektru jsou i píky 72,1 a 86,1, které vznikají jeho další fragmentací, viz tabulka 9 str. 31. Poměrně intenzivní je pík 172,1, který má  $m/z$  o 28 Th nižší oproti píku 200,1 a jedná se o jeho produktový iont vzniklý ztrátou oxidu uhelnatého. Ten dále odštěpuje methylový radikál (15 Da)

**Tabulka 8** Záznam TIC hmotnostního spektra vzorku 3. Pro grafické zobrazení spektra viz obrázek 15 str. 43.

<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)	<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)
114,1	4,45	291,4	0,61
200,1	2,30	300,1	0,54
261,2	4,26	301,2	100,00
275,2	2,90	302,2	22,18
276,2	1,07	303,2	2,40

z propenylového zbytku za vzniku iontu 157,1. Produktem fragmentace iontu 200,1 je také iont 158,1 se ztrátou 42 Th odpovídající propenu, který se odštěpil z oxindolového jádra.

Iont 202,1 je 4-ethyl-2-oxo-3-propyliden-2,3-dihydro-1H-indolium, jehož vznik je umožněn neutrální ztrátou N-propylpropan-1-iminu. Tato ztráta je možná v důsledku zvýšení elektronové hustoty na oxindolu vlivem kladného indukčního efektu propylidenu.

**Tabulka 9** Záznam hmotnostního spektra produktových iontů prekursoru 301,2 vzorku 3. Měřeno při fragmentační energii 20, pro grafické zobrazení viz obrázek 16 str. 44.

<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)	<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)
43,0	0,77	160,2	0,79
72,1	2,74	170,0	0,82
86,1	10,27	171,0	0,89
100,1	1,80	172,1	7,50
102,1	1,48	173,1	0,93
114,1	100,00	182,1	0,80
143,1	0,82	185,1	0,66
144,1	0,93	200,1	22,54
157,1	3,47	202,1	5,10
158,1	3,99	301,2	4,13

Zbývající dvojice píků 100,1 a 102,1 má dle mého názoru původ v molekule vzorku 3 protonizované na dusíku 2-(N,N-dipropylamino)ethylového zbytku namísto na dusíku oxindolu. Iont 102,1 je N-propylpropan-1-aminium a iont 100,1 je N-propylpropan-1-iminium. Zatímco iont 102,1 vznikl i u vzorku 1<sup>7</sup> a u vzorku 2 ne (což potvrzuje, že se jedná o další iont typický pro 2-(N,N-dipropylamino)ethylový zbytek),

<sup>7</sup> U vzorku 1 nebyl diskutován, protože jeho intenzita byla menší než 1 %.

iont 100,1 je unikátní pro spektrum vzorku 3 a pravděpodobně je jeho vznik umožněn indukčním efektem, stejně jako u iontu 202,1.

Uvedené reakce jsou shrnuty ve schéma fragmentace, viz obrázek 26 str. 49.

Z naměřených spekter jsem určila, že pro stanovení vzorku 3 v módu SRM je ideální přechod 301,2→114,1 při fragmentační energii 15. Touto metodou jsem z naměřených údajů, viz tabulka 19 str. 55, určila mez stanovitelnosti na 0,477 ng/ml a horní mez lineárního dynamického rozsahu na 62,5 µg/ml s korelačním koeficientem 0,9999 a QC koeficientem 3,1777.

### 3.4 Vzorek 4

Vzorek 4 se od ostatních sloučenin liší i svým vzhledem. Vzorek v pevném stavu byl sytě oranžovo-červený a zbarvení si uchoval i po rozpuštění. Tato vlastnost naznačuje přítomnost konjugovaných dvojných vazeb.

V TIC spektru je základní pík 275,2 s  $m/z$  větší o 14 Th oproti základnímu píku ropinirolu (261,2), viz tabulka 10. Z toho vyplývá, že tato sloučenina má oproti ropinirolu molární hmotnost o 14 Da vyšší, tj. 274,2 Da.

**Tabulka 10** Záznam TIC hmotnostního spektra vzorku 4. Pro grafické zobrazení viz obrázek 17 str. 44.

$m/z$ (Th)	Relativní intenzita (%)
114,1	1,46
174,1	1,35
261,2	0,95
275,2	100,00
276,2	18,82
277,2	2,01

Další významné píky jsou 174,1 a 114,1. Domnívám se, že pík 174,1 je obměnou píku 160,1 (vzniká z původní molekuly protonované na dusíku indolu ztrátou dipropylaminu) u vzorku 1, z čehož vyplývá, že hmotnostní nadbytek 14 Da oproti ropinirolu je způsoben substituentem navázaným přímo na oxindolu. Ze srovnání relativních intenzit základního píku a jeho izotopologů s jejich ekvivalenty u vzorku 1 plyne, že rozdíl ve struktuře oproti ropinirolu způsobil pouze malé zvýšení příspěvku M+1 píku (262,2 vs. 276,2) a velké zvýšení příspěvku M+2 píku (263,2 vs. 277,2).



Jediný běžný prvek, který může takové změny způsobit je kyslík. Z těchto faktů a přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb vyplývá, že vzorek 4 je nečistota {15}, tj. 4-[2-(dipropylamino)ethyl]-1H-indolo-2,3-dion. Pík 114,1 je pík typický pro 2-(N,N-dipropylamino)ethylový zbytek a byl už diskutován. Zbývající pík 261,2 je nečistota vzorku 4.

Základním píkem spektra CID fragmentace s fragmentační energií 20 je již zmíněný pík 114,1, viz tabulka 11, což je 2-(N,N-dipropylamino)methylion. To je potvrzeno přítomností iontů 86,1 a 72,1, které vznikají jeho další fragmentací. Z iontu 72,1 poté vznikají ještě ionty 43,1 (ztrátou methyliminu) a 44 (ztrátou ethenu).

**Tabulka 11** Záznam hmotnostního spektra produktových iontů prekurzoru 275,2 vzorku 4. Měřeno při fragmentační energii 20, pro grafické zobrazení spektra viz obrázek 18 str. 44.

<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)	<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)
43,1	1,47	103,1	11,56
44,0	1,40	114,1	100,00
58,0	0,52	118,1	1,92
60,0	0,51	119,0	2,91
72,1	10,07	146,1	8,84
77,0	0,59	156,1	0,53
86,1	17,40	174,1	88,35
91,0	0,51	275,2	10,40
102,1	4,87		

Druhým nejintenzivnějším píkem je už zmíněný pík 174,1. Ten značí 4-ethenyl-2,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-indolium. Jeho další fragmentací, konkrétně ztrátou oxidu uhelnatého vzniká iont 146,1. Iont 146,1 je prekurzorem pro tři další ionty - 103,1, 118,1 a 119. Iont 103,1 odpovídá ztrátě kyseliny isokyanaté (43 Da), iont 118,1 ztrátě druhé molekuly oxidu uhelnatého (28 Da) a pík 119 ztrátě kyanovodíku (27 Da).

Zbývajícím píkem je iont 102,1 vznikající při fragmentaci molekuly vzorku protonizované na dusíku 2-(N,N-dipropylamino)ethylového zbytku. Všechny uvedené reakce jsem shrnula do schématu fragmentace, viz obrázek 27 str. 50.

Z naměřených spekter jsem určila, že pro stanovení vzorku 4 v módu SRM je ideální přechod 275,2→114,1 při fragmentační energii 17. Touto metodou jsem z naměřených údajů, viz tabulka 20 str. 56, určila mez stanovitelnosti na 0,954 ng/ml a horní mez

lineárního dynamického rozsahu na 62,5 µg/ml s korelačním koeficientem 1,0000 a QC koeficientem 2,6686.

### 3.5 Vzorek 5

V TIC spektru je zřejmý izotopický klastr naznačující výskyt chlóru, viz tabulka 12 str. 34. Základní pík patřící protonizované molekule a jeho M+2 pík jsou v poměru přibližně 3:1, což je charakteristické pro přítomnost právě jednoho atomu chlóru. Zároveň je molární hmotnost vzorku 5 o 34 Da vyšší oproti molární hmotnosti ropinirolu. Z těchto faktů vyplývá, že vzorek 5 se od ropinirolu liší substitucí jednoho atomu chlóru namísto jednoho atomu vodíku<sup>8</sup> a jedná se o nečistotu {3}, tj. 5-chloro-4-[2-(dipropylamino)ethyl]-2H-indol-2-on.

**Tabulka 12** Záznam TIC hmotnostního spektra vzorku 5. Pro grafické zobrazení viz obrázek 19 str. 45.

<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)	<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)
114,1	0,54	296,2	17,67
194,0	1,25	297,2	32,68
261,2	1,49	298,2	5,70
275,2	1,74	299,2	0,58
295,2	100,00	301,2	0,83

Další významné píky v TIC spektru jsou pík 194,1, který odpovídá píku 160,1 s hmotnostním nadbytkem způsobeným přítomností chlóru, a pík 114,1 charakteristický pro 2-(N,N-dipropylamino)ethylový zbytek.

Základním pikem fragmentačního spektra s fragmentační energií 25 je pík 194, viz tabulka 13 str. 35. Jedná se o 5-chloro-4-ethenyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indolium. Přítomnost chlóru potvrzuje pík 196, který má relativní intenzitu 30 %, viz tabulka 14 str. 36. Z iontu 194 vznikají ionty 158,1 a 159,1, které nemají M+2 píky v poměru 3:1 a vznikly tedy ztrátou chlóru. V případě píku 158,1 jde o neutrální ztrátu chlorovodíku, která odpovídá snížení monoizotopické hmotnosti iontu o 36 Da. Z tohoto iontu dále vzniká ztrátou oxidu uhelnatého iont 130,1. U iontu 159,1 došlo k radikálovému odštěpení chlóru (35 Da), tomu odpovídá i lichá hodnota *m/z*, která vzhledem k zachování dusíku ve struktuře ukazuje na radikálový charakter fragmentu.

<sup>8</sup> Monoizotopická hmotnost atomu chlóru je 35 Da.

Jediný další pík s izotopickým klastrem odpovídajícím iontu s chlórem je pík 166<sup>9</sup>. Ten má hodnotu  $m/z$  o 28 Th nižší oproti základnímu píku 194 - to značí, že vznikl neutrální ztrátou oxidu uhelnatého. Z tohoto iontu další fragmentací vznikají ionty s  $m/z$  130,1 a 131,1. Oba tyto píky nemají izotopický klastr 3:1, vznikly tedy odštěpením chlóru. Tyto ionty jsou obdobou iontů 158,1 a 159,1 - iont 130,1 má původ ve ztrátě chlorovodíku a iont 131,1 v odštěpení chlorového radikálu. Oba ionty podléhají další fragmentaci. Z iontu 130,1 se uvolňuje molekula kyanovodíku a vzniká iont 103,1. Iont 131,1 ztrácí methanimin za vzniku iontu 102. Ve spektru fragmentace jsou přítomny také píky 43,1 a 44 značící propylový karbokation a N-methylmethaniminium.

**Tabulka 13** Záznam hmotnostního spektra produktových iontů prekursoru 295,2 vzorku 5. Pro grafické zobrazení spektra viz obrázek 20 str. 45.

$m/z$ (Th)	Relativní intenzita (%)	$m/z$ (Th)	Relativní intenzita (%)
43,1	3,12	131,1	12,86
44,0	1,47	149,0	0,80
60,1	0,88	151,0	0,90
72,1	10,78	158,1	16,75
86,1	15,39	159,1	74,66
102,0	1,80	166,0	35,71
102,1	4,54	194,0	100,00
103,1	3,25	253,1	1,00
114,1	64,99	295,2	10,48
130,1	15,82		

Posledním píkem je pík 102,1 vznikající při fragmentaci molekuly vzorku protonizované na dusíku 2-(N,N-dipropylamino)ethylového zbytku. Pro schéma fragmentace vzorku 5 viz obrázek 28 str. 51.

Z naměřených spekter vyplývá, že pro stanovení vzorku 5 v módu SRM je ideální přechod 295,2→194 při fragmentační energii 20. Touto metodou jsem z naměřených údajů, viz tabulka 21 str. 57, určila mez stanovitelnosti na 7,63 ng/ml a horní mez lineárního dynamického rozsahu na 62,5 µg/ml s korelačním koeficientem 0,9999 a QC koeficientem 3,8555.

<sup>9</sup> Píky 166 a 168 v poměru cca 3:1.

**Tabulka 14** Hmotnostní spektrum produktových iontů izotopického klastru iontu 295,2. Měřeno při fragmentační energii 25. Pro grafické zobrazení spektra viz obrázek 21 str. 45.

<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)	<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)
43,1	3,75	151,0	1,10
44,0	1,82	152,9	0,41
60,1	0,80	158,1	21,12
72,1	13,60	159,1	88,22
73,1	0,66	160,1	10,48
86,1	19,84	161,1	0,55
87,1	1,20	166,0	36,25
102,0	1,84	167,0	3,44
102,1	4,27	168,0	10,77
103,1	4,95	169,0	0,94
114,1	85,65	194,0	100,00
115,1	9,62	195,0	10,04
130,1	19,50	196,0	30,04
131,1	18,59	197,0	2,92
132,1	1,50	295,1	10,02
139,0	0,82	296,2	1,95
146,0	0,95	297,2	3,86
148,9	1,04	298,2	0,54

### 3.6 Vzorek 6

Základním píkem TIC spektra je pík 219,1 odpovídající molekulovému aduktu s vodíkovým kationtem, viz tabulka 15. Píky 220,1 a 221,1 jsou jeho izotopology. Monoizotopická hmotnost vzorku 6 je tedy 218,1 Da. Hmotnostní úbytek oproti molekule ropinirolu je 42 Da.

**Tabulka 15** Záznam hmotnostního TIC spektra vzorku 6. Pro grafické zobrazení viz obrázek 22 str. 46.

<i>m/z</i> (Th)	Relativní intenzita (%)
132,1	2,39
148,1	1,49
160,1	19,88
161,1	2,35
219,1	100,00
220,1	15,36
221,1	1,32

Další píky v TIC spektru jsou 132,1 a 160,1 typické pro oxindolové jádro ropinirolu. Na rozdíl od ropinirolu je zde iont o  $m/z$  148,1. Tento iont obsahuje podle dusíkového pravidla jeden atom dusíku a pravděpodobně značí 4-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indolium, jehož vznik neutrální ztrátou propylmethaniminu je umožněn přítomností sekundárního aminu v (alkylamino)alkylovém zbytku. Zároveň zde chybí pík 114,1 a není ani ve fragmentačním spektru. Z toho vyplývá, že molekula neobsahuje 2-(N,N-dipropylamino)ethylový zbytek. Spolu s hmotnostním úbytkem z těchto faktů vyplývá, že vzorek 6 je nečistota {8}, tj. 4-[2-(propylamino)ethyl]-2H-indol-2-on.

Základním píkem fragmentačního spektra měřeného s fragmentační energií 15 je pík 160,1 (diskutovaný už dříve), viz tabulka 16. Z něj neutrální ztrátou oxidu uhelnatého vzniká iont 132,1. Druhým nejintenzivnějším píkem je 72,1 odpovídající N-propylmethaniminiovému kationtu odštěpenému z protonované původní molekuly.

Píky 105,1 a 117,1 označují ionty vznikající další fragmentací iontu s  $m/z$  132,1 a píky 43,1 a 44 označují ionty vznikající fragmentací iontu 72,1. Všechny tyto ionty byly již dříve diskutovány.

**Tabulka 16** Záznam hmotnostního spektra produktových iontů prekursoru 219,1 vzorku 6. Měřeno při fragmentační energii 15, pro grafické zobrazení spektra viz obrázek 23 str. 46.

$m/z$ (Th)	Relativní intenzita (%)	$m/z$ (Th)	Relativní intenzita (%)
43,1	2,30	120,1	1,10
44,0	4,05	130,9	0,60
72,1	76,30	132,1	35,10
105,1	2,24	148,1	7,90
115,1	1,11	160,1	100,00
117,1	3,20	219,1	7,89

Posledním píkem ve fragmentačním spektru je pík 115,1. Domnívám se, že vzniká ztrátou molekuly amoniaku z iontu 132,1. Všechny uvedené reakce jsou shrnuty ve schématu fragmentace, viz obrázek 29 str. 52.

Z naměřených spekter jsem určila, že pro stanovení vzorku 6 v módu SRM je ideální reakce 219,1→160,1 při fragmentační energii 12. Touto metodou jsem z naměřených údajů, viz tabulka 22 str. 58, určila mez stanovitelnosti na 3,81 ng/ml a horní mez lineárního dynamického rozsahu na 7,81 µg/ml s korelačním koeficientem 0,9998 a QC koeficientem 4,0165.

## **4. Závěr**

V této práci se podařilo objasnit všechna naměřená hmotnostní spektra a navrhnout schéma fragmentace pro ropinirol a jeho pět nečistot. Empirickou metodou jsem určila meze stanovitelnosti a lineární dynamický rozsah pro stanovení všech analyzovaných látek hmotnostní spektrometrií v módu SRM.

## Seznam použité literatury

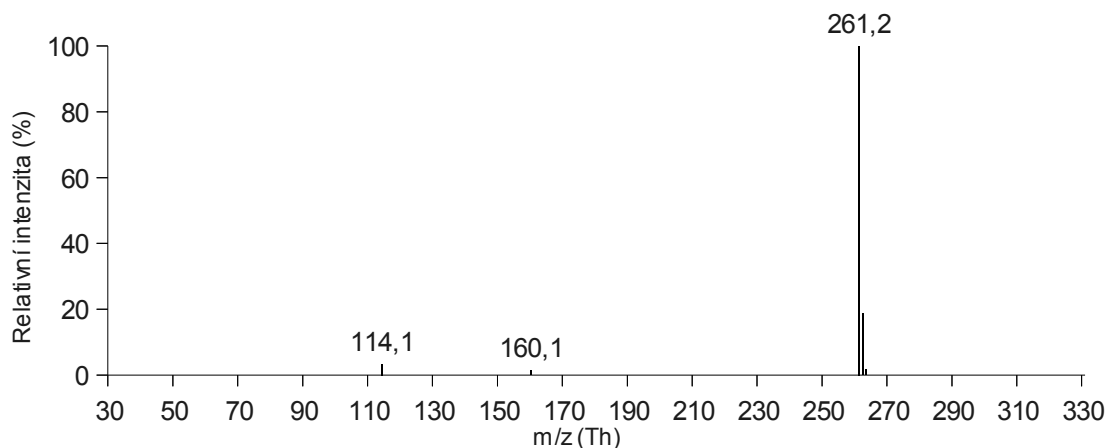
1. Cvačka, J.: *Úvod, základní pojmy*. Dostupné z URL: <<http://www.muji-web.cz/MC230P43/kestazeni.htm>> [cit. 20.2.2015]
2. Fenn, J.B.: Electrospray Ionization Mass Spectrometry: How It All Began. *Journal of Biomolecular Techniques* **13**:3, 101-118 (2002)
3. Cvačka, J.: *Iontové zdroje I*. Dostupné z URL: <<http://www.muji-web.cz/MC230P43/kestazeni.htm>> [cit. 25.2.2015]
4. Mobley, R.C.; Ferguson, L.D.; Alice, M.B.: Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics* **49**:5, 2240-2249 (1968)
5. Hirabayashi, A: Evaporation of charged fine droplets. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **175**:3, 241-245 (1998)
6. Wikipedia: *Taylor Cone*. Dostupné z URL: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Taylor\\_cone](http://en.wikipedia.org/wiki/Taylor_cone)> [cit. 7.5.2015]
7. Cvačka, J.: *Hmotnostní analyzátoři I*. Dostupné z URL: <<http://www.muji-web.cz/MC230P43/kestazeni.htm>> [cit. 13.3.2015]
8. Paul, W.; Steinwedel, H.: A new mass spectrometer without a magnetic field. *Zeitschrift fur Naturforschung* **8**:a, 448-450 (1953)
9. Miller, P.E.; Bonner Denton, M.: The Quadrupole Mass Filter. *Journal of Chemical Education* **63**:7, 617-622 (1986)
10. AZoM: *Using Graphical Tools to Understand Quadrupole Theory*. Dostupné z URL: <<http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=10996>> [cit. 10.5.2015]
11. Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.: Metastable Decay of Peptides and Proteins in Matrix-assisted Laser-desorption Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **5**:4, 198-202 (1991)
12. Zubarev, R.A.; Kelleher, N.L.; McLafferty, F.W.: Electron Capture Dissociation of Multiple Charged Protein Cations. A Nonergodic Process. *Journal of the American Chemical Society* **120**:13, 3265-3266 (1998)
13. Syka, J.E.P.; Coon, J.J.; Schroeder, M.J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F.: Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:26, 9528-9533 (2004)
14. McLafferty, F.W.; Bente, P.F.; Kornfeld, R.; Tsai, S.C.; Howe, Ian: Collisional Activation Spectra of Organic Ions. *Journal of the American Chemical Society* **95**:7, 2120-2129 (1973)
15. Yost, R.A.; Enke, C.G.: Selected Ion Fragmentation with a Tandem Quadrupole Mass Spectrometer. *Journal of the American Chemical Society* **100**:7, 2274-2275 (1978)
16. McLafferty, F. W.; Tureček F.: *Interpretation of Mass Spectra*. 4. vydání, Sausalito, University Science Books 1993.
17. Armbruster, D.A.; Tillman, M.D.; Hubbs, L.M.: Limit of Detection (LOD)/Limit of Quantification (LOQ): Comparison of the Empirical and the Statistical Methods Exemplified with GC-MS Assays of Abused Drugs. *Clinical Chemistry* **40**:7, 1233-1238 (1994)
18. Coufal, P.; Štulík, K.; Claessens, H.A.; Hardy, M.J.; Webb, M.: Separation and quantification of ropinirole and some impurities using capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* **732**:2, 437-444 (1999)
19. Coufal, P.; Štulík, K.; Claessens, H.A.; Hardy, M.J.; Webb, M.: Determination of the dissociation constants of ropinirole and some impurities and their quantification using capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography B* **720**:1-2, 197-204 (1998)
20. Bharati, D.V.; Jagadeesh, B.; Sirish Kumar, S.; Naga Lakshmi, R.; Hotha, K.K.; Naidu, A.; Mullangi, R.: Highly sensitive method for the determination of ropinirole with a lower limit of quantitation of 3,45 pg/mL in human plasma by LC-ESI-MS/MS: application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* **23**:5, 557-562 (2009)
21. Bhatt, J.; Jangid, A.; Shetty, R.; Shah, B.; Kambli, S.; Subbaiah, G.; Singh, S.: Rapid and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for determination of ropinirole in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis* **40**:5, 1202-1208 (2006)

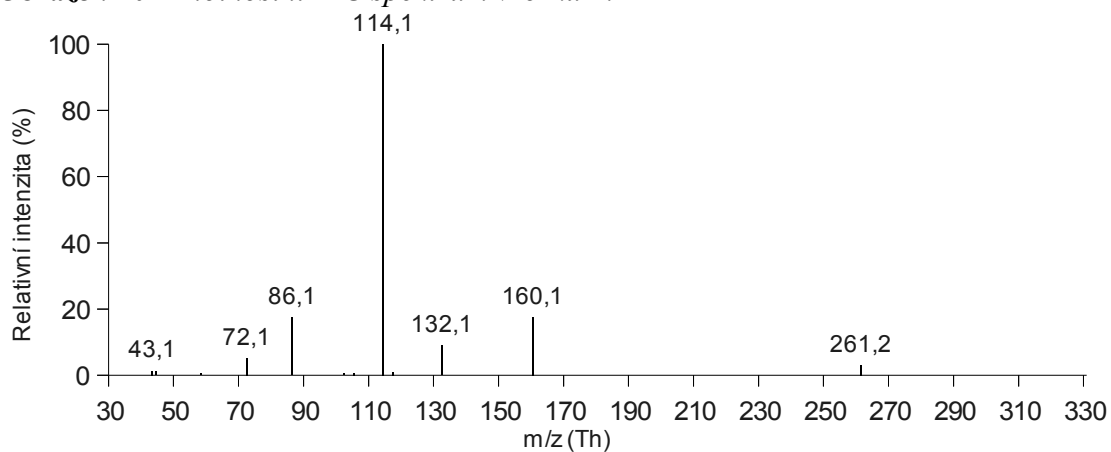


22. Williamson, B.L.; Creaser, C.S.: Letter: Ion-molecule reactions of the benzoyl ion with compounds containing the amine functional group in a quadrupole ion trap. *European Journal of Mass Spectrometry* **4**:2, 103-106 (1998)
23. Gross, Jurgen H.: *Mass Spectrometry*. 2. vydání, Berlin, Springer 2004.
24. Rodriguez, J.G.; Urrutia, A.; Canoira, L.: Electron impact mass spectrometry of oxindole, pseudoindoxyle and indolenine derivatives. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **161**:1-3, 116-122 (1997)

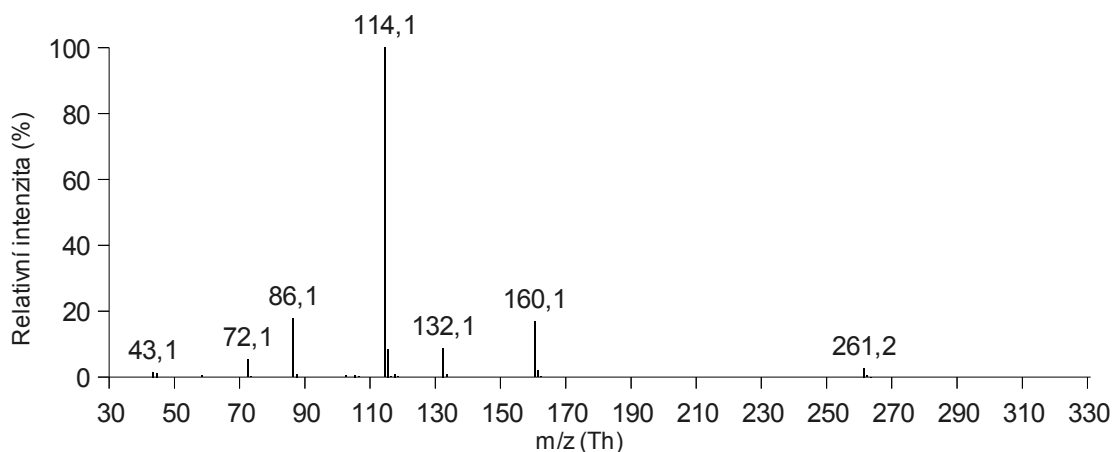
## Přílohy



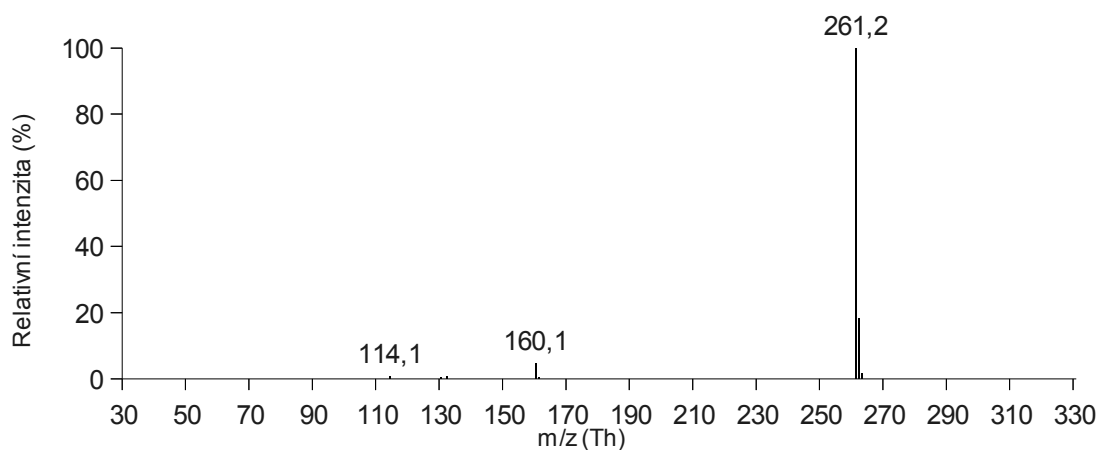
**Obrázek 10** Hmotnostní TIC spektrum vzorku 1.



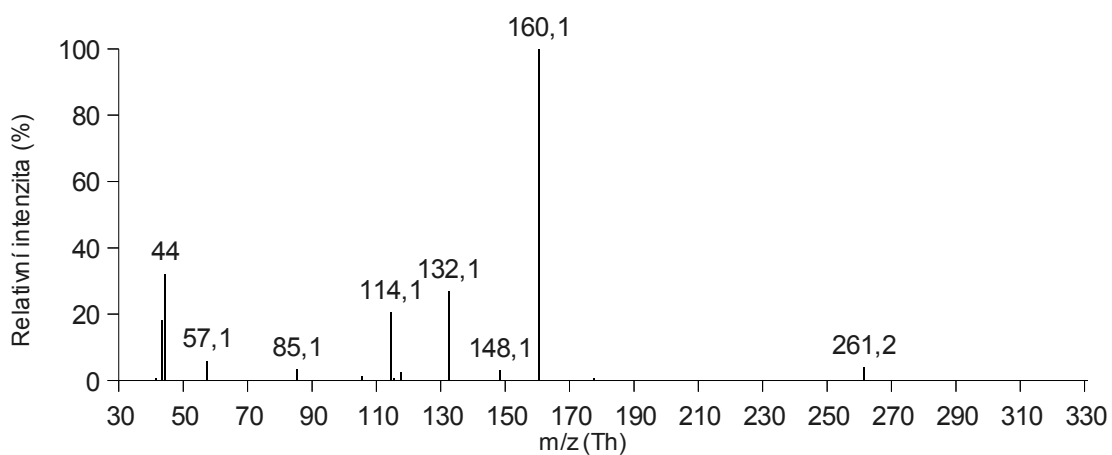
**Obrázek 11** Hmotnostní spektrum produktových iontů prekurzoru 261,2 vzorku 1. Fragmentační energie 20.



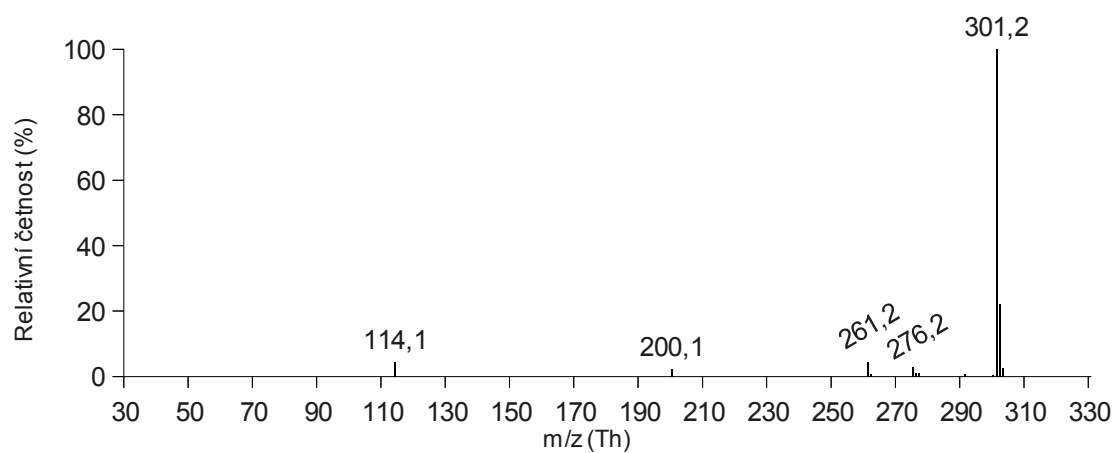
**Obrázek 12** Hmotnostní spektrum produktových iontů prekurzorů izotopického klastru iontu 261,2 vzorku 1. Fragmentační energie 20.



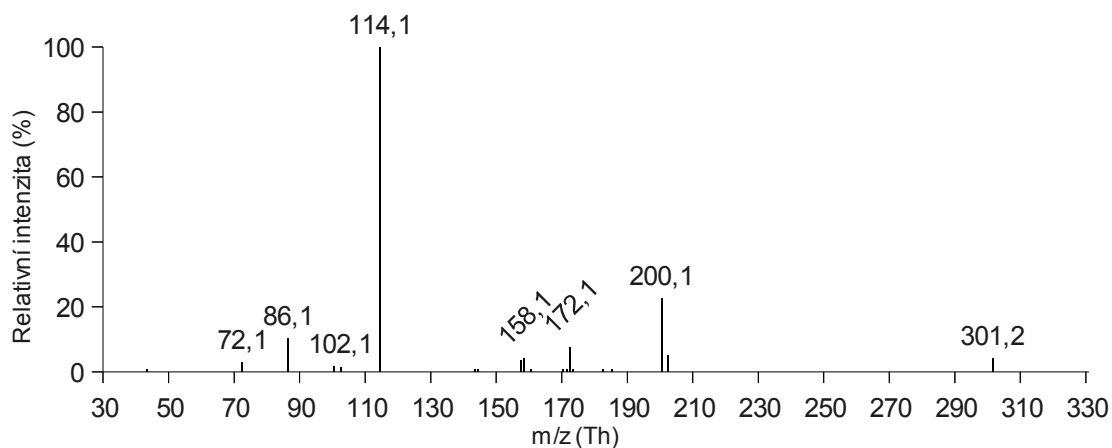
**Obrázek 13** Hmotnostní TIC spektrum vzorku 2.



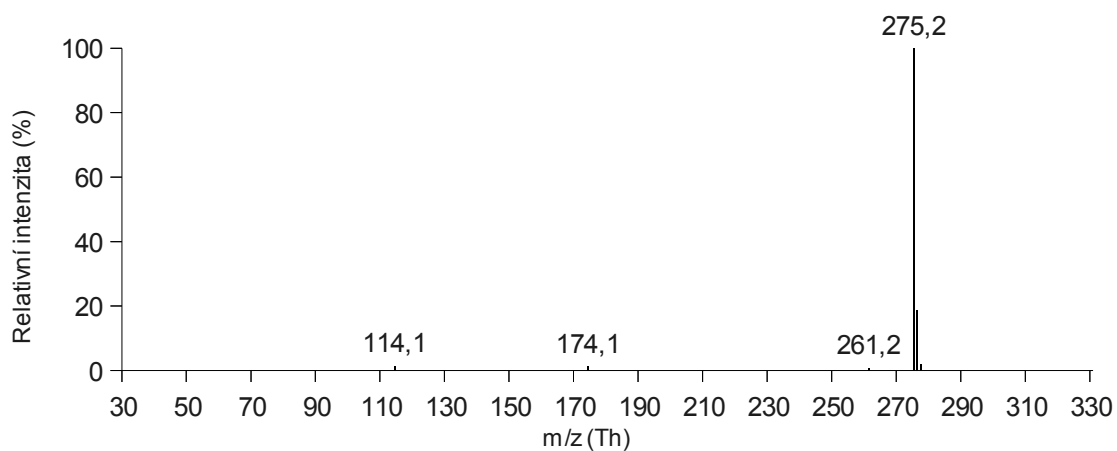
**Obrázek 14** Hmotnostní spektrum produktových iontů prekurzoru 261,2 vzorku 2. Fragmentační energie 20.



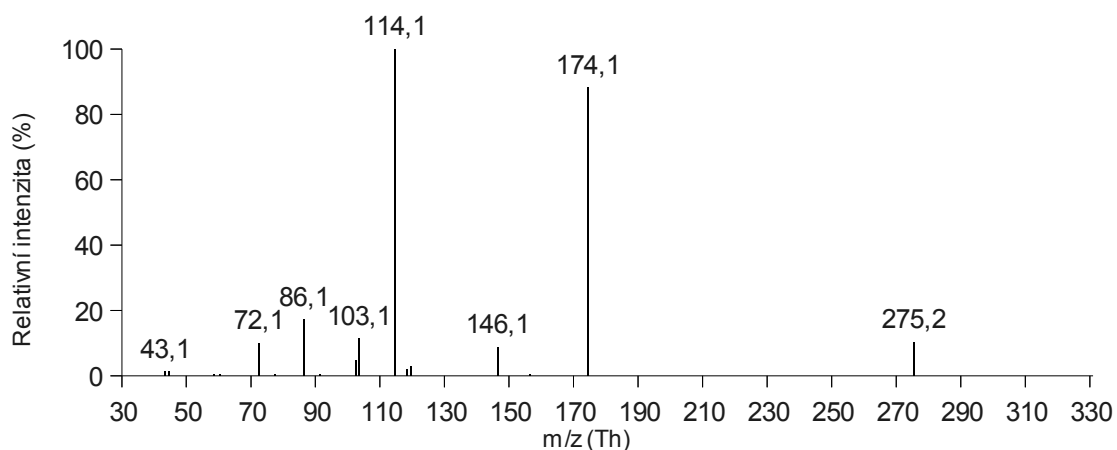
**Obrázek 15** Hmotnostní TIC spektrum vzorku 3.



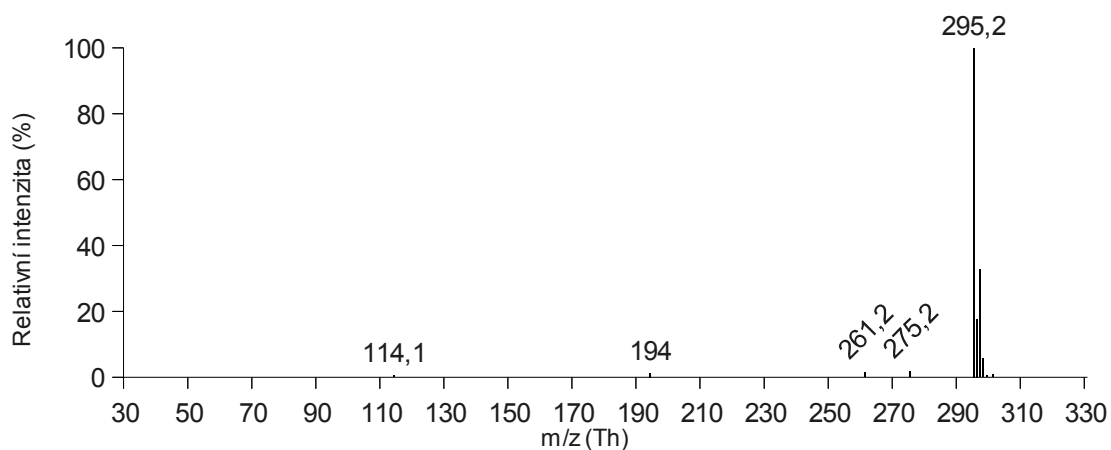
**Obrázek 16** Hmotnostní spektrum produktových iontů prekursoru 301,2 vzorku 3. Fragmentační energie 20.



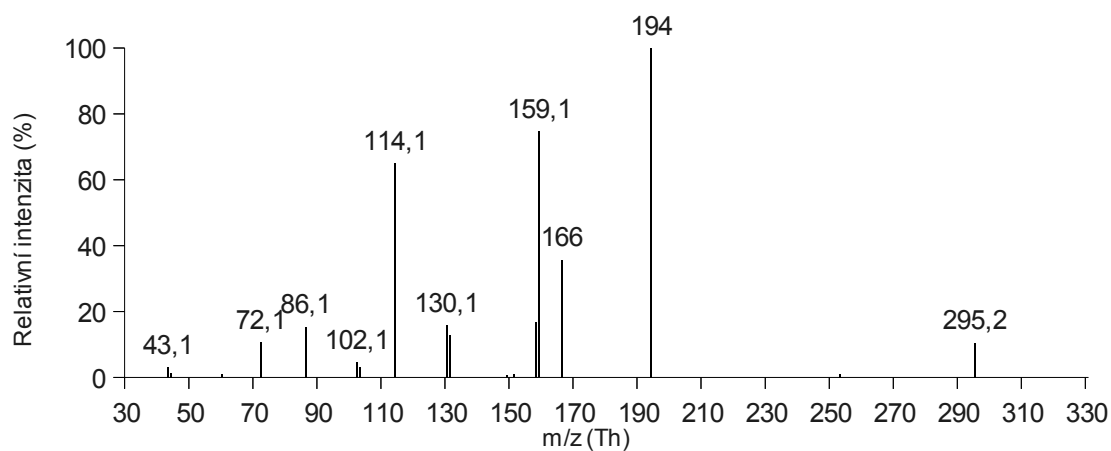
**Obrázek 17** Hmotnostní TIC spektrum vzorku 4.



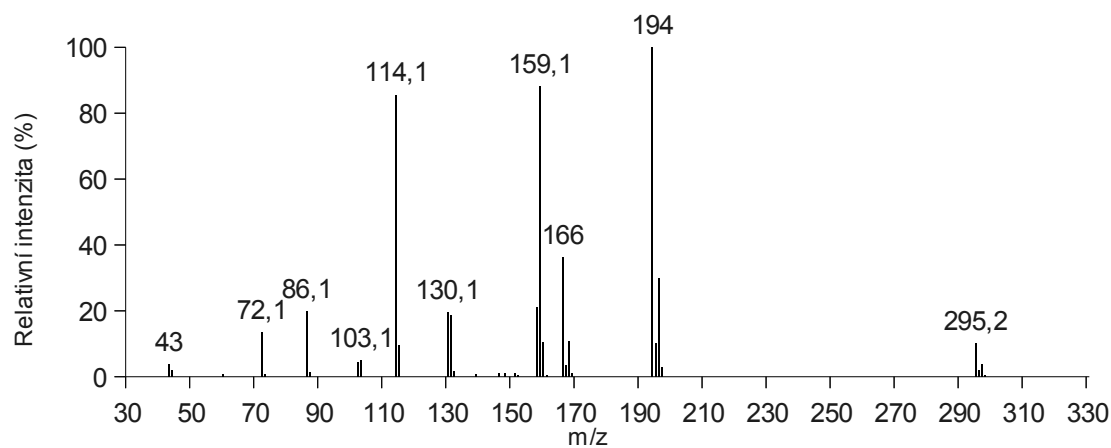
**Obrázek 18** Hmotnostní spektrum produktových iontů prekursoru 275,2 vzorku 4. Fragmentační energie 20.



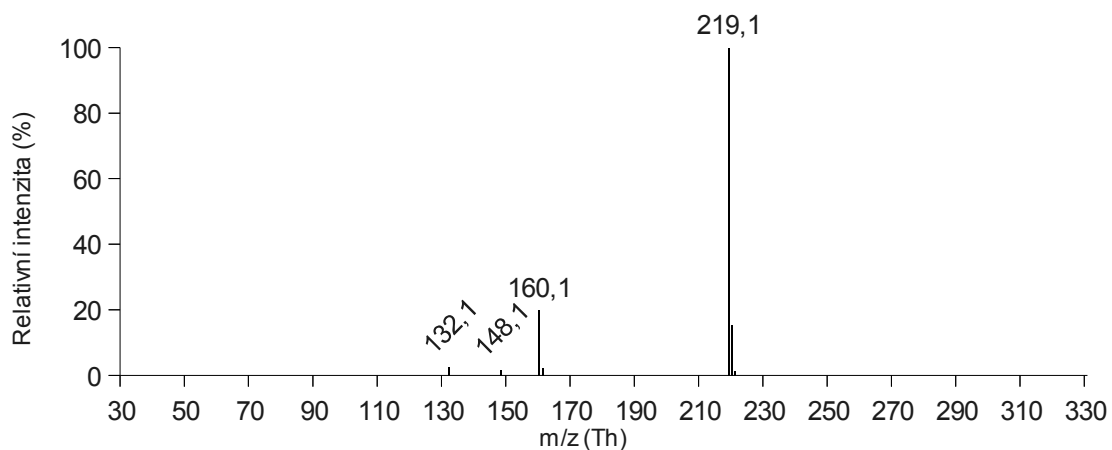
**Obrázek 19** Hmotnostní TIC spektrum vzorku 5.



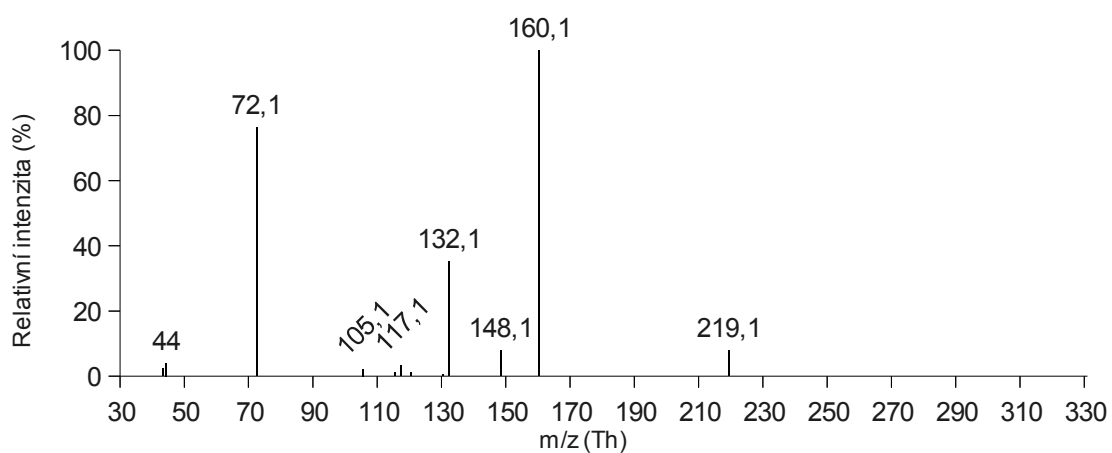
**Obrázek 20** Hmotnostní spektrum produktových iontů prekursoru 295,2 vzorku 5. Fragmentační energie 25.



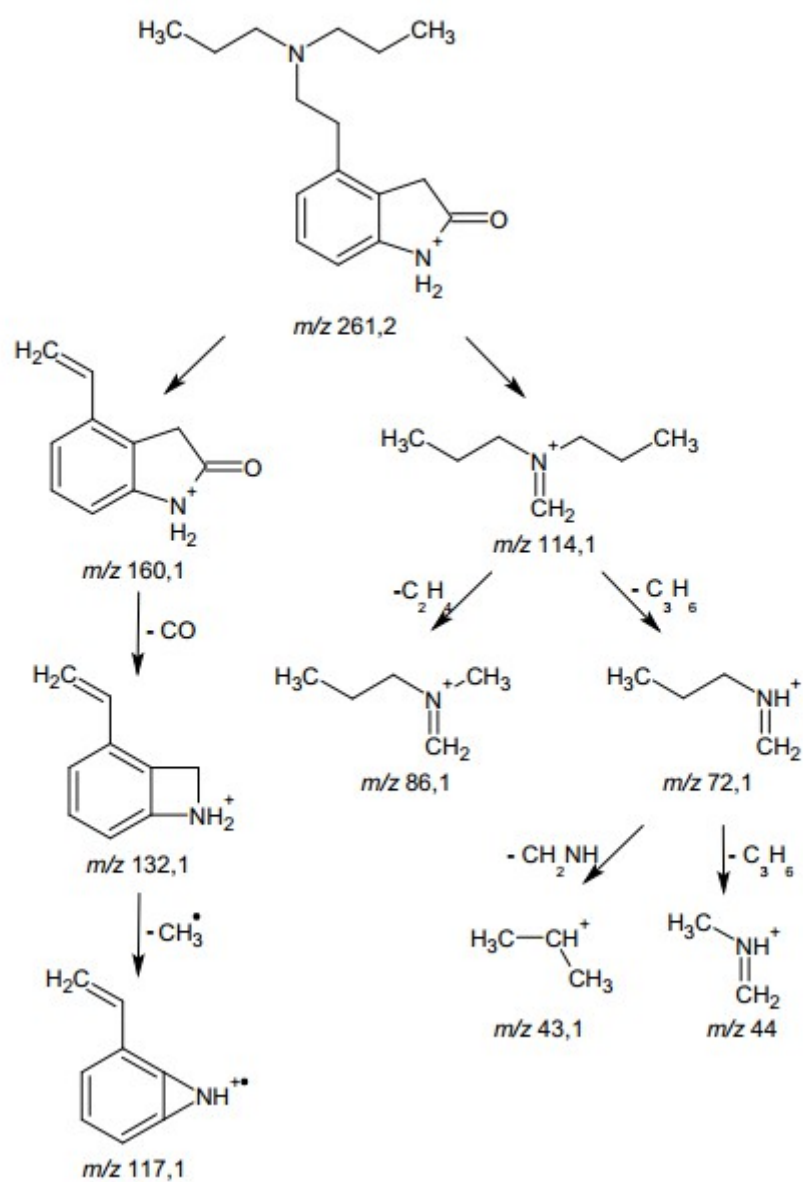
**Obrázek 21** Hmotnostní spektrum produktových iontů prekursorů izotopického klastru iontu 295,2 vzorku 5. Fragmentační energie 25.



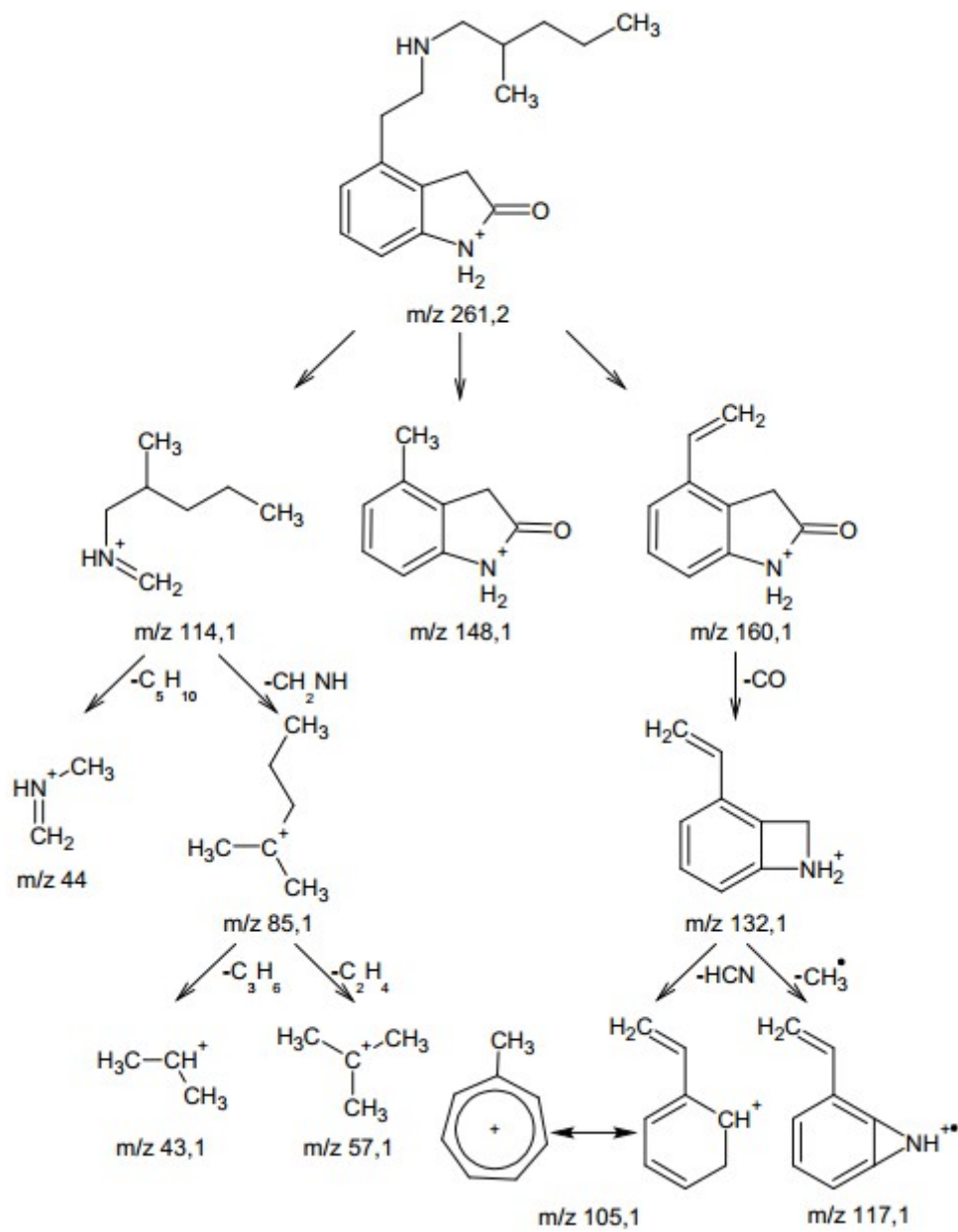
**Obrázek 22** Hmotnostní TIC spektrum vzorku 6.



**Obrázek 23** Hmotnostní spektrum produktových iontů prekurzoru 219,1 vzorku 6. Fragmentační energie 15.

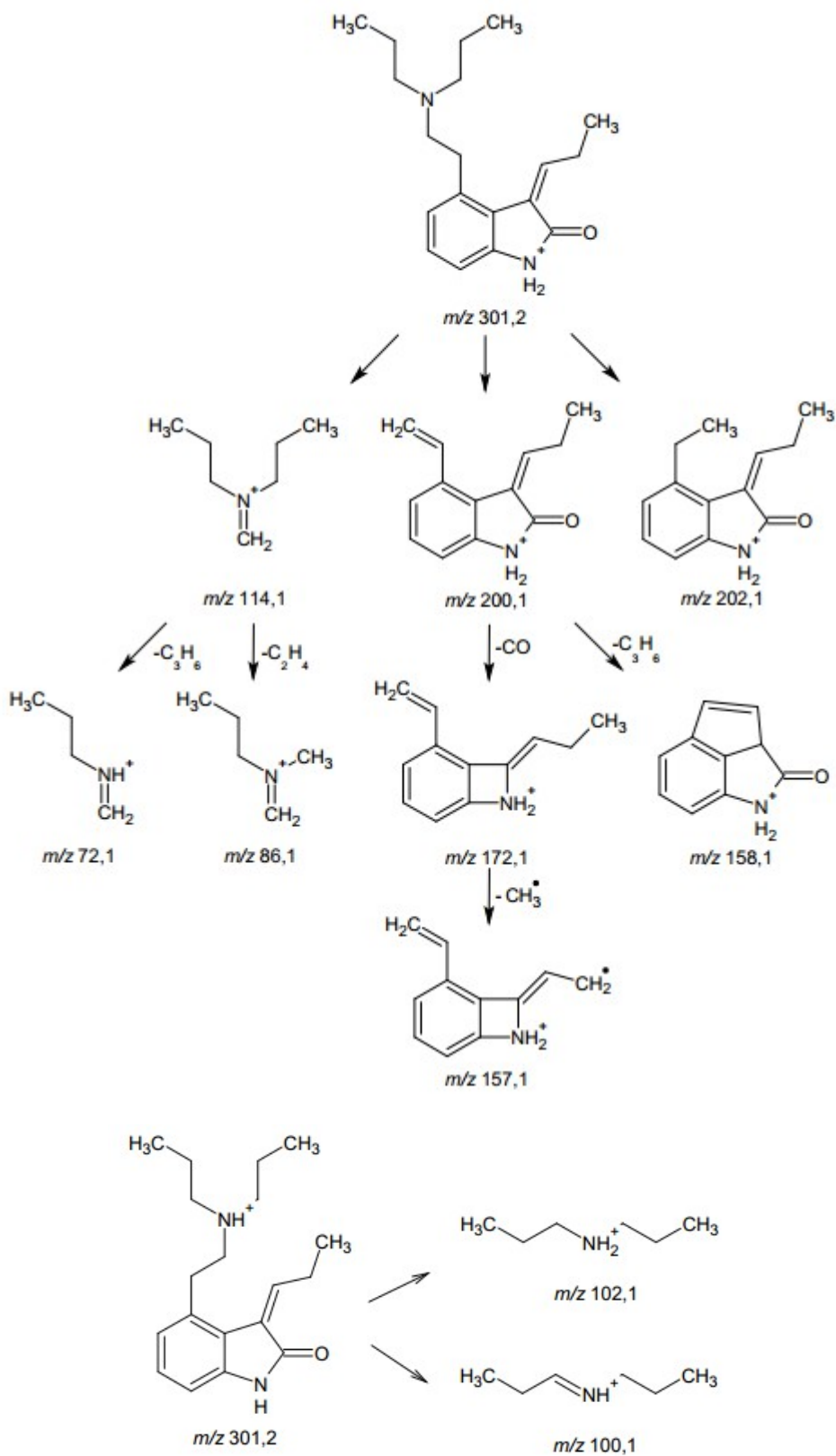


**Obrázek 24** Fragmentační schéma vzorku 1.

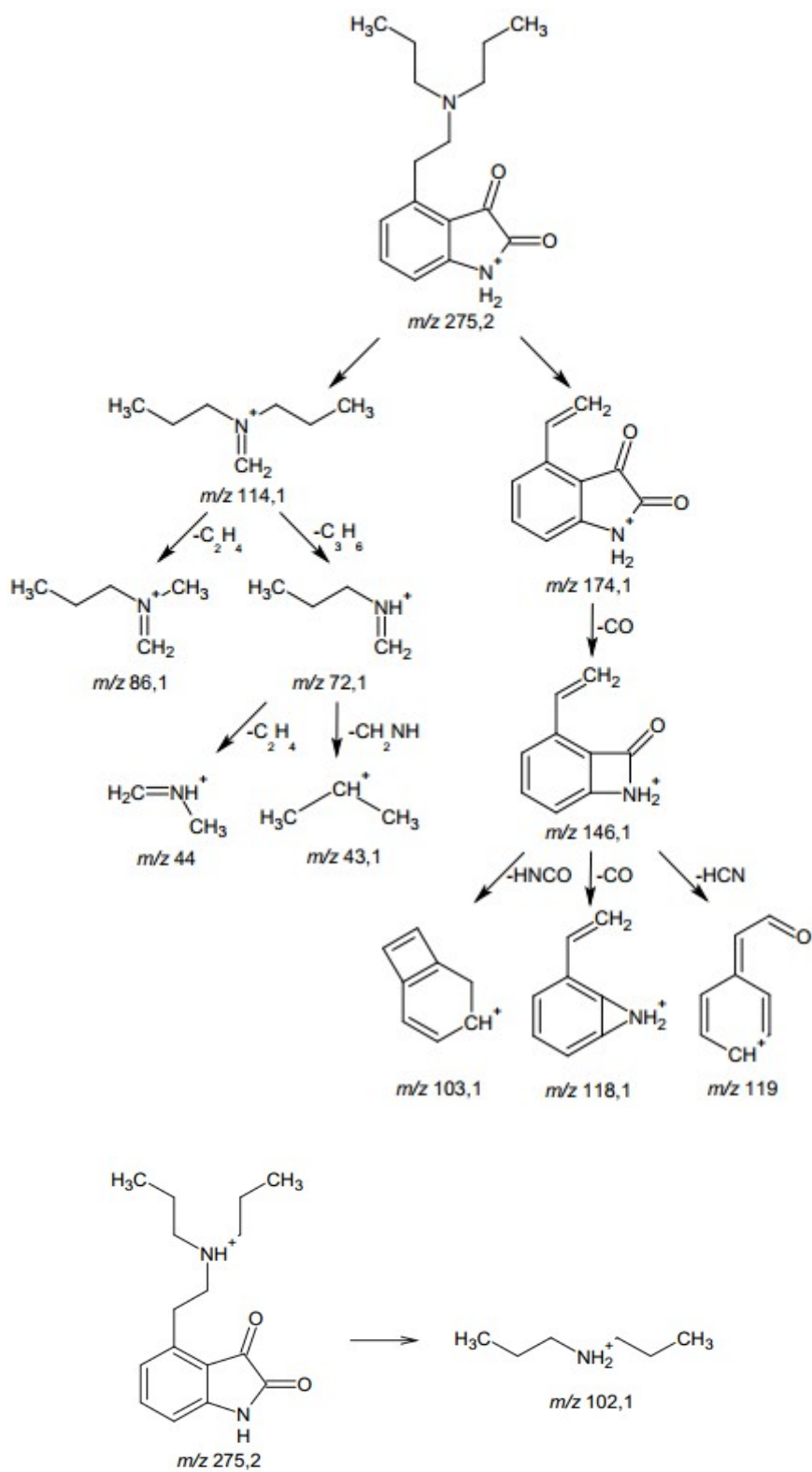


Obrázek 25 Fragmentační schéma vzorku 2.

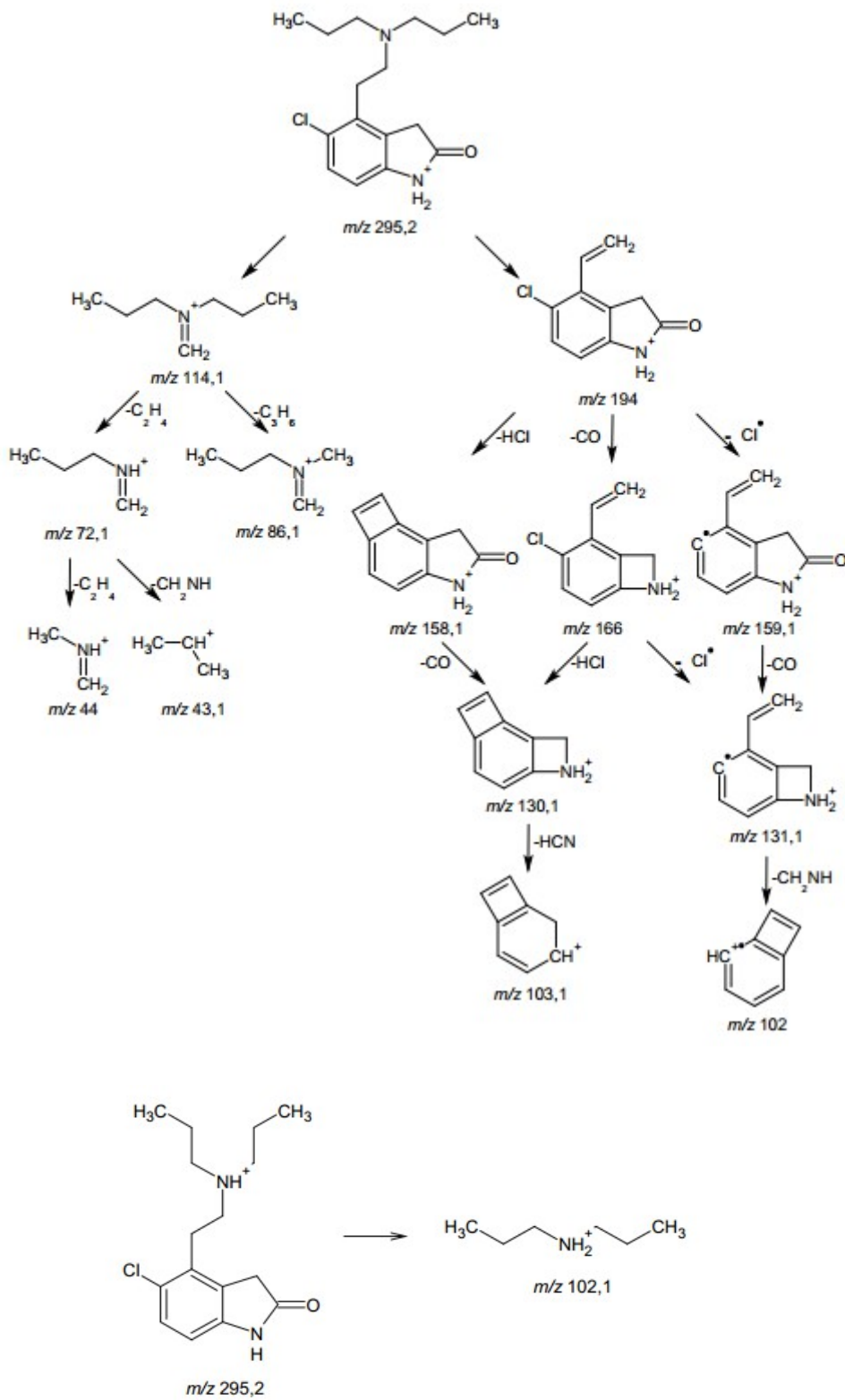




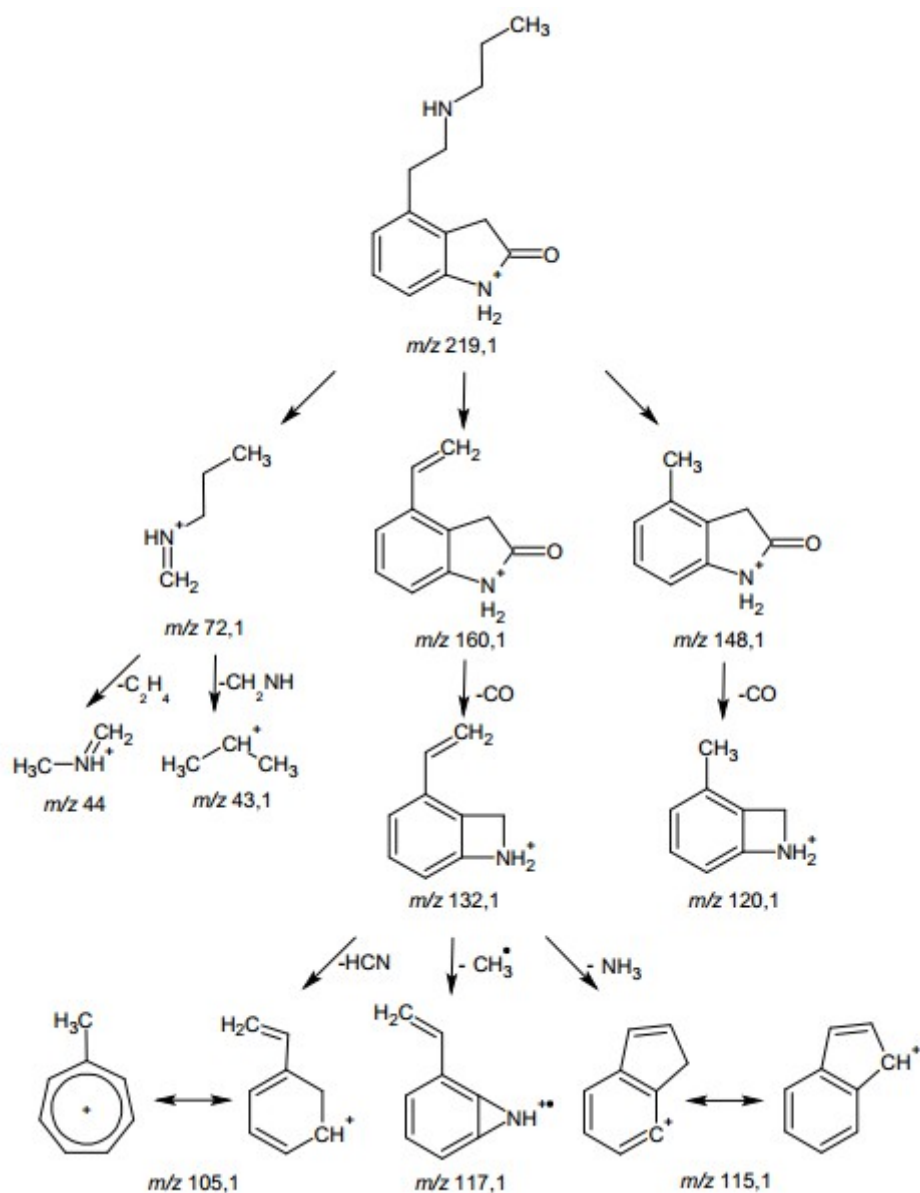
Obrázek 26 Fragmentační schéma vzorku 3



Obrázek 27 Fragmentační schéma vzorku 4.



Obrázek 28 Fragmentační schéma vzorku 5.



Obrázek 29 Fragmentační schéma vzorku 6.

**Tabulka 17** Ředící řada vzorku 1. RSD relativní směrodatná odchylka, teoretická plocha je vypočtena z regresní rovnice přímky.

ředění	koncentrace (µg/ml)	plocha píku	plocha průměr	směrodatná odchylka	RSD (%)	teoretická plocha
8	62,5	1418385	1446149,7	56993,48	3,9	1521438
		1511705				
		1408359				
8	7,81	190120	190141,3	862,20	0,5	190180
		191014				
		189290				
8	0,977	23916	24189,0	632,36	2,6	23772
		24912				
		23739				
4	0,244	5827	5545,3	248,71	4,5	5943
		5356				
		5453				
4	0,0610	1435	1425,3	13,43	0,9	1486
		1410				
		1431				
4	0,0153	353	343,7	8,62	2,5	371
		336				
		342				
2	0,00763	179	177,3	3,79	2,1	186
		180				
		173				
2	0,00381	85	85,7	6,03	7,0	93
		92				
		80				
2	0,00191	46	44,0	3,46	7,9	46
		46				
		40				
2	0,000954	22	22,7	1,15	5,1	23
		24				
		22				

**Tabulka 18** Ředící řada vzorku 2. RSD relativní směrodatná odchylka, teoretická plocha je vypočtena z regresní rovnice přímky.

ředění	koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	plocha píku	plocha průměr	směrodatná odchylka	RSD (%)	teoretická plocha
8	62,5	889431 906362 883356	893049,7	11922,25	1,3	894813
8	7,81	124422 127280 125699	125800,3	1431,69	1,1	111852
8	0,977	15545 16720 16857	16374,0	721,20	4,4	13981
4	0,244	3894 3968 3842	3901,3	63,32	1,6	3495
4	0,0610	1008 1013 1011	1010,7	2,52	0,2	874
4	0,0153	250 248 252	250,0	2,00	0,8	218
2	0,00763	118 121 122	120,3	2,08	1,7	109
2	0,00381	60 69 60	63,0	5,20	8,2	55
2	0,00191	34 31 32	32,3	1,53	4,7	27
2	0,000954	17 18 14	16,3	2,08	12,7	14
2	0,000477	7 11 9	9,0	2,00	22,2	7

**Tabulka 19** Ředící řada vzorku 3. RSD relativní směrodatná odchylka, teoretická plocha je vypočtena z regresní rovnice přímky.

ředění	koncentrace (µg/ml)	plocha píku	plocha průměr	směrodatná odchylka	RSD (%)	teoretická plocha
8	62,5	653275 661677 665614	660188,7	6302,70	1,0	661063
8	7,81	86044 90984 91456	89494,7	2997,67	3,3	82633
8	0,977	11094 11541 11239	11291,3	228,05	2,0	10329
4	0,244	2721 2742 2788	2750,3	34,27	1,2	2582
4	0,0610	688 717 672	692,3	22,81	3,3	646
4	0,0153	348 339 356	347,7	8,50	2,4	161
2	0,00763	173 174 178	175,0	2,65	1,5	81
2	0,00381	95 82 90	89,0	6,56	7,4	40
2	0,00191	43 48 53	48,0	5,00	10,4	20
2	0,000954	25 24 21	23,3	2,08	8,9	10
2	0,000477	14 11 12	12,3	1,53	12,4	5

**Tabulka 20** Ředící řada vzorku 4. RSD relativní směrodatná odchylka, teoretická plocha je vypočtena z regresní rovnice přímky.

ředění	koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	plocha píku	plocha průměr	směrodatná odchylka	RSD (%)	teoretická plocha
8	62,5	522393	538733,0	19030,83	3,5	539350
		534178				
		559628				
8	7,81	72576	72189,3	358,85	0,5	67419
		71867				
		72125				
8	0,977	9782	9681,0	307,21	3,2	8427
		9925				
		9336				
4	0,244	2485	2573,7	81,40	3,2	2107
		2591				
		2645				
4	0,0610	661	638,3	24,11	3,8	527
		641				
		613				
4	0,0153	332	328,7	9,45	2,9	132
		318				
		336				
2	0,00763	153	157,0	4,00	2,5	66
		161				
		157				
2	0,00381	86	79,3	5,86	7,4	33
		75				
		77				
2	0,00191	37	36,7	1,53	4,2	16
		38				
		35				
2	0,000954	18	16,3	1,53	9,4	8
		16				
		15				



**Tabulka 21** Ředící řada vzorku 5. RSD relativní směrodatná odchylka, teoretická plocha je vypočtena z regresní rovnice přímky.

ředění	koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	plocha píku	plocha průměr	směrodatná odchylka	RSD (%)	teoretická plocha
8	62,5	104289 107244 100280	103937,7	3495,27	3,4	104144
8	7,81	15849 14159 13788	14598,7	1098,59	7,5	13018
8	0,977	1983 1833 2119	1978,3	143,06	7,2	1627
4	0,244	536 489 463	496,0	37,00	7,5	407
4	0,0610	126 130 128	128,0	2,00	1,6	102
4	0,0153	29 32 28	29,7	2,08	7,0	25
2	0,00763	14 13 15	14,0	1,00	7,1	13

**Tabulka 22** Ředící řada vzorku 6. RSD relativní směrodatná odchylka, teoretická plocha je vypočtena z regresní rovnice přímky.

ředění	koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	plocha píku	plocha průměr	směrodatná odchylka	RSD (%)	teoretická plocha
8	62,5	235068	239311,0	4600,75	1,9	296600
		238664				
		244201				
8	7,81	38269	36989,7	1901,20	5,1	37075
		37895				
		34805				
8	0,977	5191	5288,3	86,87	1,6	4634
		5358				
		5316				
4	0,244	1224	1259,3	53,59	4,3	1159
		1321				
		1233				
4	0,0610	324	321,3	3,06	1,0	290
		322				
		318				
4	0,0153	83	80,7	4,04	5,0	72
		76				
		83				
2	0,00763	40	42,3	3,21	7,6	36
		46				
		41				
2	0,00381	22	19,3	2,52	13,0	18
		17				
		19				