

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

## DIPLOMOVÁ PRÁCE



### **Vliv jednotlivých módů TOF analyzátoru na linearitu a citlivost UHPLC-HRMS metody**

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

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

HRADEC KRÁLOVÉ 2017

Jakub Halad

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Jakub Halad

Školitel: RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

Název diplomové práce: **Vliv jednotlivých módů TOF analyzátoru na linearitu a citlivost UHPLC-HRMS metody**

Tato diplomová práce se zabývá porovnáním čtyř módů (senzitivní mód, rozlišovací mód, mód s vysokým rozlišením a rozšířeným rozlišením) hybridního analyzátoru Q-TOF ve spojení s UHPLC systémem. Pro danou studii bylo zvoleno celkem 10 analytů. Jednalo se o 5 statinů a jejich interkonverzní produkty. UHPLC metoda byla převzata z dříve vyvinuté multistatinové metody, nicméně podmínky iontového zdroje byly znovu optimalizovány. Vyvinutá metoda byla použita pro měření standardní a matricové kalibrační křivky ve čtyřech rozlišovacích módech analyzátoru (senzitivní a rozlišovací mód, mód s vysokým rozlišením a rozšířeným rozlišením). Obohacené lyofilizované sérum upravené pomocí proteinové precipitace bylo použito pro matricovou kalibrační křivku. Na závěr byly jednotlivé módy porovnány na základě linearit a citlivosti.

Vliv jednotlivých rozlišovacích módů na korelační koeficient nebyl pozorován. Naopak použití jednotlivých rozlišovacích módů mělo vliv na citlivost metody. V pozitivním módu bylo dosaženo nižších hodnot LOQ u standardní kalibrační křivky než u matricové kalibrační křivky. Zároveň senzitivní a rozlišovací mód poskytovaly nižší LOQ než mód s vysokým rozlišením a mód s rozšířeným rozlišením. Rozdíly mezi senzitivním a rozlišovacím módem (mód s vysokým rozlišením, mód s rozšířeným rozlišením) byly nevýrazné. V negativním módu byl obecně pozorován podobný trend, nicméně hodnoty LOQ mezi jednotlivými módy byly podstatně nižší.

**Klíčová slova:** UHPLC, HRMS, TOF, ESI, reflektrom, rozlišení

## **Abstract**

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Jakub Halad

Supervisor: RNDr. Hana Vlčková, Ph.D.

Title of thesis: **An influence of individual modes of TOF analyzer on linearity and sensitivity of UHPLC-HRMS methods**

This diploma thesis deals with the comparison of four modes (sensitive mode, resolution mode, high resolution mode, enhanced resolution mode) of the hybrid analyser Q-TOF connected with UHPLC system. Totally, ten analytes were selected for this study. It was a group of 5 statins and their interconversion products. UHPLC method was borrowed from previous developed multistatin method however, ESI conditions were optimized. Developed method was used to measure standard calibration curves and matrix calibration curves in four analyser modes (sensitive, resolution, high resolution and enhanced mode). Spiked lyophilized serum treated by the protein precipitation was used for matrix calibration curve. Finally, the individual analyser modes were compared due to the linearity and sensitivity

The effect of individual analyser modes on the correlation coefficient was not observed. On the other hand, analyser modes influenced the method sensitivity. In positive mode, lower LOQ values were obtained for the standard calibration curves than for the matrix calibration curves. The sensitive and resolution mode provided a lower LOQ than high resolution and enhanced resolution mode. The differences between sensitive and resolution mode (high resolution mode, enhanced resolution mode) were insignificant. In a negative mode a similar trend was generally observed however, the LOQ values between the different modes were considerably lower.

**Keywords:** UHPLC, HRMS, TOF, ESI, reflectron , resolution

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 2017

.....

Jakub Halad

Děkuji RNDr. Haně Vlčkové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, cenné rady a připomínky, dále pak za neskonalou trpělivost a čas, který mi věnovala při vypracování diplomové práce. Poděkování patří také všem pracovníkům Katedry analytické chemie. V neposlední řadě bych rád poděkoval svojí rodině a příteli za podporu.

# Obsah

1. ÚVOD .....	11
2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE .....	13
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	14
3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	15
3.1.1 HPLC detektory .....	16
3.2 Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC).....	17
3.2.1 Instrumentace UHPLC .....	19
3.2.2 Kolony pro UHPLC .....	20
3.3 Hmotnostní spektrometrie (MS) .....	21
3.3.1 Ionizační techniky .....	22
3.3.2 Hmotnostní analyzátory .....	26
3.3.3 Detektory.....	32
3.4 Tandemová spektrometrie (MS/MS).....	33
3.4.1 Trojitý kvadrupól (QqQ).....	34
3.5 Hybridní analyzátory.....	35
3.6 Typy skenů v hmotnostní spektrometrii.....	36
3.7 Specifikace Synapt G2-Si s ESI iontovým zdrojem.....	37
3.8 Statiny .....	40
3.8.1 Mechanismus účinku.....	41
3.8.2 Farmakokinetika statinů.....	41
3.8.3 Chemická struktura statinů.....	43
3.8.4 Chemické vlastnosti statinů.....	45
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	46
4.1 Chemikálie .....	47
4.1.1 Standardní látky .....	47
4.1.2 Rozpouštědla .....	47
4.2 Přístroje .....	47
4.3 Příprava roztoků.....	48
4.3.1 Příprava roztoku mobilní fáze .....	48
4.4 Příprava standardních roztoků.....	48

4.4.1	Příprava zásobních roztoků standardů.....	48
4.4.2	Příprava pracovních roztoků standardů.....	49
4.4.3	Příprava obohaceného séra.....	49
4.5	Postup metody přípravy vzorků .....	50
4.6	UHPLC-MS/MS podmínky .....	50
4.6.1	Chromatografické podmínky .....	50
4.6.2	Podmínky hmotnostní spektrometrie .....	50
4.7	Hodnocení linearity a citlivosti metody .....	51
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	52
5.1	Výběr sledovaných prekurzorových iontů .....	52
5.2	Optimalizace podmínek MS detekce .....	55
5.2.1	Napětí na kapiláře (CAP).....	55
5.2.2	Průtok plynu na vstupním kuželu (ConeG).....	56
5.2.3	Průtok desolvačního plynu (DesolvG) .....	57
5.2.4	Tlak nebulizačního plynu (Nebb).....	58
5.2.5	Napětí na StepWave (OffSet).....	59
5.2.6	Napětí na vstupním kuželu (SC) .....	60
5.3	Porovnání čtyř módů analyzátoru .....	62
5.3.1	Plocha píku na horní mezi stanovitelnosti.....	62
5.3.2	Plocha píku na limitu kvantifikace.....	63
5.3.3	Linearita kalibračních křivek .....	64
5.3.4	Limit kvantifikace .....	65
6.	ZÁVĚR.....	70
7.	POUŽITÁ LITERATURA.....	73

## Seznam zkratek

A	Absorbance
ACN	Acetonitril
AmAc	Octan amonný
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	Ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
AUC	Plocha píku
B	Magnetický sektor/pole
BEH	Hybridní stacionární fáze (Bridge Ethyl Hybride)
c	Koncentrace
CAP	Napětí na kapiláře
CID	Kolizně indukovaná disociace
ConeG	Průtok plynu na vstupním kuželu
CYP450	Rodina enzymů Cytchrom P 450
DAD	Detektor diodového pole
DesolvG	Průtok desolvačního plynu
E	Elektrické pole
EI	Elektronová ionizace
ENHR	Mód s rozšířeným rozlišení
ESI	Ionizace elektrosprejem
Fast LC	Rychlá kapalinová chromatografie
FD	Fluorescenční detektory
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
FWHM	Šířka píku v polovině výšky
GC	Plynová chromatografie
HDL-C	Lipoprotein vysokou hustotou cholesterolu



HETP	Výškový ekvivalent teoretického patra
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HMG-CoA	Hydroxymethyl koenzym A
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRES	Mód s vysokým rozlišením
HRMS	Spektrometry s vysokým rozlišením
IMS	Iontově mobilní spektrometrie
$l$	Tloušťka absorpční vrstvy
LDL-C	Lipoprotein s nízkou hustotou cholesterolu
LDL	Lipoprotein s nízkou hustotou
LIT	Lineární iontová past
LOQ	Limit kvantifikace
LRMS	Spektrometry s nízkým rozlišením
MALDI	Ionizace za účasti matrice
$m_f^+$	Produktový iont
$m_n$	Neutrální fragment
$m_p^+$	Prekurzorové ionty
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová spektrometrie
MS <sup>n</sup>	Víceúrovňová hmotnostní analýza
Nebb	Tlak nebulizačního plynu
NIST	Národní institut (National Institute of Standards and Technology)
Offset	Napětí na StepWave
Q-TOF	Kombinace kvadrupólového analyzátoru a analyzátoru doby letu
Q	Kvadrupól
QIT	Iontová past
QqQ	Trojité kvadrupól

RES	Rozlišovací mód
SC	Napětí na vstupním kuželu
SENS	Senzitivní mód
SFC	Superkritickou fluidní chromatografií
SIM	Záznam vybraného iontu
SRM	Záznam vybrané reakce
TOF	Analyzátor doby letu
t <sub>R</sub>	Retenční čas
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$\epsilon$	Absorpční koeficient

## **1. ÚVOD**

Kvantitativní analýza biologicky aktivních látek ve složitých matricích se velmi často provádí pomocí LC-MS, zejména z důvodu její vysoké selektivity a citlivosti. Nejčastěji používaným analyzátozem pro kvantitativní analýzu je trojitý kvadrupól (QQQ) s využitím módu monitorování vybrané reakce (SRM). Nicméně v posledních několika letech se začala pro kvantitativní analýzu využívat také vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS), která umožňuje na základě vysokého rozlišení využít neselektivního MS skenu. Na rozdíl od selektivního SRM módu tedy nedojde ke ztrátě podrobnějších informací o dalších látkách obsažených v komplexních vzorcích. MS sken navíc umožňuje dodatečné vyhodnocení látek, které nebyly primárně sledovány.

Tato diplomová práce se zabývá kvantitativní analýzou s využitím ultra vysokoúčinné chromatografie (UHPLC) ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (HRMS) a sledováním vlivu jednotlivých módů TOF analyzátoru na citlivost a linearitu. Jednotlivé módy analyzátoru se technicky liší nastavením iontové optiky a počtem využitých reflektorů, což vede k odlišné rozlišovací schopnosti jednotlivých módů. Pro odlišení balastních látek v komplexních matricích je vhodnější aplikace módu s nejvyšší rozlišovací schopností. Nicméně z důvodu předpokládaného vlivu na citlivost metody, byl v této diplomové práci testován vliv jednotlivých módů analyzátoru na citlivost a linearitu.

## 2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo porovnání čtyř módů hybridního analyzátoru Q-TOF s ohledem na citlivost a linearitu metody. Pro porovnání byla vybrána skupina léčiv statiny. Celkem bylo analyzováno 10 analytů. Porovnání bylo provedeno na standardních roztocích a obohaceném lyofilizovaném séru.

V první fázi se experimentální práce zabývala vývojem UHPLC-MS metody pro stanovení vybraných analytů. Chromatografické podmínky byly převzaty z dříve vyvinuté metody a byla optimalizována MS metoda, tedy zejména parametry iontového zdroje: napětí na kapiláře, průtok plynu na vstupním kuželu, průtok desolvačního plynu, tlak nebulizačního plynu, napětí na StepWave a napětí na vstupním kuželu. Vyvinutá metoda byla použita pro měření dvou typů kalibračních křivek – standardní a matricové kalibrační křivky – ve čtyřech módech analyzátoru (senzitivní mód, rozlišovací mód, mód s vysokým rozlišením, mód s rozšířeným rozlišením) v pozitivním a negativním módu. Porovnávána byla zejména citlivost a linearita. Pro úpravu obohaceného séra byla využita proteinová precipitace.

### **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### 3.1 *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)*

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří společně s plynovou chromatografií (GC) a superkritickou fluidní chromatografií (SFC) k současným trendům v oblasti chromatografických metod, které umožňují jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu [1, 2].

Principem těchto metod je separace na základě rozdílné distribuce dělených látek mezi dvě nemísitelné fáze, a to mobilní a stacionární fázi. Na rozhraní fází dochází k rozdělení složek analytu v závislosti na rozdílné době setrvávání těchto složek v jednotlivých fázích. Ve finálním procesu dojde k ustálení rozdělovací rovnováhy, kdy se množství látek ve všech součástech soustavy nemění. Rozdělovací rovnováhu můžeme charakterizovat rozdělovací konstantou  $K_D$ , pro kterou platí vztah  $K_D = [A]_s / [A]_m$ , kde  $[A]_s$  je ustálená koncentrace složky  $A$  ve stacionární fázi a  $[A]_m$  je ustálená koncentrace složky  $A$  v mobilní fázi [2, 3, 4].

HPLC se řadí mezi kapalinovou chromatografií, což znamená, že mobilní fázi je kapalina a stacionární fázi je tuhá látka, nebo kapalina zakotvená na tuhém nosiči. Základní stacionární fáze pro HPLC jsou anorganické oxidy, chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní, hybridní či na bázi grafitového uhlíku. HPLC chromatografií je možno provádět v mnoha módech, jako jsou například reverzní, normální, hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), chirální, iontově výměnný mód. Tyto módy jsou vybírány v závislosti na vlastnostech zkoumaných látek. Nejvíce využívaným módem pro HPLC je mód reverzní [1].

Hlavními faktory, kterými můžeme ovlivnit separaci a eluci jednotlivých složek zkoumaného vzorku, jsou volba stacionární fáze, volba složení mobilní fáze a výběr elučního módu. Rozeznáváme dva eluční módy: isokratický a gradientový. Jedná-li se o isokratickou eluci, pak poměr složek mobilní fáze v průběhu analýzy zůstává stejný. Isokratická eluce je vhodná zejména pro látky s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Druhou možností je gradientová eluce, kde dochází v průběhu analýzy ke změně složení mobilní fáze. Ta je výhodná u látek, které mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti [1].

Výstupem analýzy je chromatogram, ten nás informuje o intenzitě veličiny zachycené detektorem, která je závislá na čase. Chromatogram poskytuje nejen

kvalitativní informaci (retenční čas – tR), ale také kvantitativní informaci (plocha píku – AUC) [1, 5].

### 3.1.1 HPLC detektory

Spektrofotometrické detektory patří mezi nejhojněji používané detektory a fungují na principu absorbance záření v rozmezí 190 až 800 nm. Velikost odezvy je závislá na Lambert-Beerově zákonu.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

*Rovnice 1: Lambert-Beerův zákon (A – absorbance,  $\varepsilon$  – absorpční koeficient, c – koncentrace, l – tloušťka absorpční vrstvy) [1]*

Z výše uvedeného vzorce vyplývá, že absorbance (A) dané látky je závislá na tloušťce absorbující vrstvy (l) a koncentraci absorbující složky (c). Absorpční koeficient ( $\varepsilon$ ) udávaný v l/mol/cm je zde konstantou charakteristickou pro každou látku. Vlastní detektory pak mohou mít fixní nebo nastavitelnou vlnovou délku. Modernějším typem takového detektoru může být DAD (diode-array detector), který umožňuje změření absorpčního spektra v reálném čase, tedy závislost absorbance na vlnové délce. Spektrofotometrické detektory dosahují citlivosti okolo 0,1–1 ng/ml a jsou selektivní [1, 3, 6].

Fluorescenční detektory (FD) pracují na principu měření sekundárního záření, které vytváří analyt po absorpci primárního záření. Absorpcí primárního elektromagnetického záření přecházejí molekuly do vyšších vibračních hladin a jednou z možností, jak se zbaví získané energie, je právě fluorescence. Molekuly emitují buď záření o podobné vlnové délce, jakou absorbovaly, nebo v častějším případě emitují záření o vyšší vlnové délce. Tyto detektory jsou selektivní, protože ne všechny látky fluoreskují. Látky schopné fluorescence musí obsahovat fluorofor, což je část molekuly schopná emitovat záření. U organických látek je to přítomnost konjugovaných dvojných vazeb nebo benzenových jader. FD detektory dosahují citlivosti 0,001–1 ng/ml [1, 3, 6].

Elektrochemické detektory měří proud, který vzniká v měrné cele při průchodu oxidovatelné nebo redukovatelné látky. Jejich využití je vhodné zejména pro jejich citlivost (0,001–1 ng/ml) a vysokou rychlost odezvy. Nevýhodou těchto detektorů je



zanášení povrchu elektrod produkty oxidace a redukce a nutnost užití pouze vodivých mobilních fází, což je výrazně limituje. Příkladem elektrochemických detektorů jsou amperometrický a coulometrický detektor [1, 3, 6].

Refraktometrické detektory používají k identifikaci změnu indexu lomu v eluátu. Citlivost detektorů tohoto typu je malá, řádově okolo 1000 ng/ml a nejsou selektivní. Své uplatnění nachází zejména v měření cukrů, polymerů a lipidů [1, 3, 6].

Vodivostní detektory se řadí do univerzálních detektorů, které měří vodivost mobilní fáze. V průtokové cele detektoru je mezi dvě elektrody vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci elektrod. Mobilní fáze musí být při těchto měřeních nevodivá. Proto se užívá jako mobilní fáze redestilovaná voda, která může obsahovat polární rozpouštědla. Citlivost těchto detektorů se pohybuje okolo 1 ng/ml [1, 6].

Hmotnostní spektrometry mají v porovnání s ostatními chromatografickými detektory vyšší citlivost a selektivitu. Jsou vhodné k analýze komplexních vzorků. V devadesátých letech 20. století se spojení těchto technik zařadilo do běžné praxe biochemických laboratoří, kde se prvně uplatnily při zjišťování vrozených metabolických poruch. Hmotnostní spektrometry jsou blíže popsány v kapitole Hmotnostní spektrometry [1, 7].

### ***3.2 Ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC)***

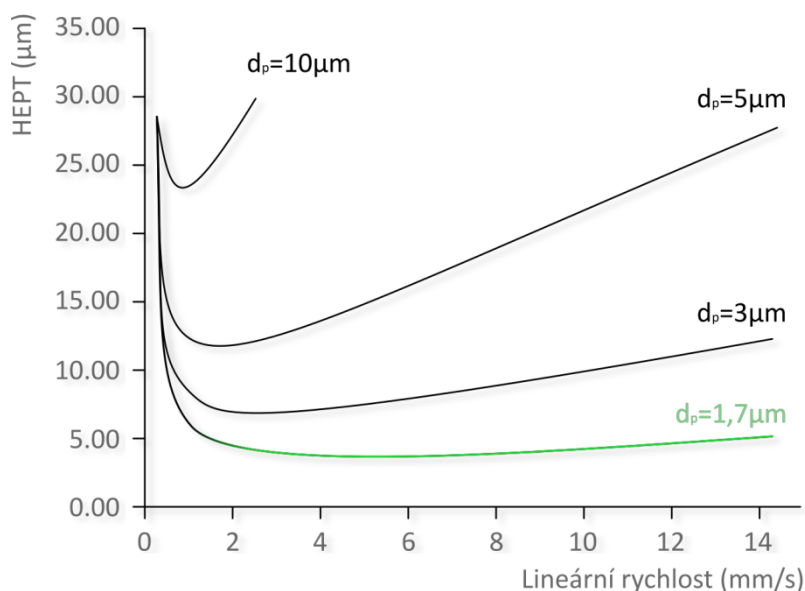
UHPLC se v moderních trendech chromatografie řadí ke směrům rychlé chromatografie nazývané jako Fast LC (Fast liquid chromatography). Je to technika vyvinutá na základě HPLC. Důvodem jejího vzniku byl nátlak na zvýšení rychlosti chromatografických technik. Roku 1997 byl spuštěn prototyp prvního UHPLC přístroje pod vedením J. W. Jorgensona a jeho skupiny. Ti jako první popsali použití kolony s neporézními částicemi o velikosti 1,0–1,5  $\mu\text{m}$  při tlaku 410 MPa. První komerčně dostupný přístroj byl uveden na trh v roce 2004 společností Waters [8].

UHPLC využívá analytické kolony s částicemi sorbentu pod 2  $\mu\text{m}$ . Základní princip této metody se stejně jako u HPLC řídí vztahem daným Van Deemterovou rovnicí, která je empirickou rovnicí popisující vztah lineární rychlosti mobilní fáze a výškového ekvivalentu teoretického patra (HETP).

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C u$$

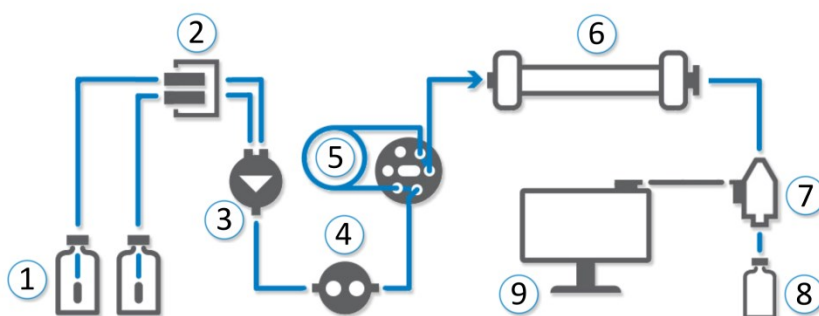
Rovnice 2: Van Deemterova rovnice ( $A$  – Eddiho difúze,  $B$  – podélná difúze v mobilní fázi,  $C$  – odpor proti převodu hmoty,  $u$  – lineární rychlost mobilní fáze) [9]

HETP je veličina udávající účinnost analytické kolony, čím nižší je hodnota HETP, tím vyšší je i účinnost kolony. Vyšší účinnost kolon s částicemi pod 2  $\mu\text{m}$  je patrná také z grafu Van Deemterových křivek pro kolony s různou velikostí částic (Obrázek 1). Nízká hodnota HETP je dána nízkým odporem proti převodu hmoty malých částic při vyšších lineárních rychlostech mobilní fáze [1, 9, 10, 11].



**Obrázek 1:** Van Deemterovy křivky pro kolony s různou velikostí částic ( $d_p$  – velikost částic sorbentu) (upraveno podle [11])

### 3.2.1 Instrumentace UHPLC



**Obrázek 2:** Blokové schéma UHPLC – (1) zásobníky mobilních fází, (2) odplyňovač, (3) směšovač mobilních fází, (4) vysokotlaké čerpadlo, (5) dávkovač vzorku, (6) chromatografická kolona, (7) detektor, (8) sběrač frakcí nebo odpad, (9) datová stanice (upraveno podle [1])

Instrumentace UHPLC přístrojů je podobná instrumentaci HPLC přístrojů. Oba typy těchto přístrojů jsou tvořeny zásobníky mobilní fáze, ze kterých je mobilní fáze vedena přes odplyňovač ke směšovacímu zařízení, které má v případě gradientové eluce na starost mísení mobilních fází. Dále v přístroji najdeme vysokotlaké čerpadlo, jež uvádí mobilní fázi do pohybu. Vzorky jsou v dnešní době do mobilní fáze přiváděny pomocí automatických dávkovačů. Srdcem UHPLC je pak chromatografická kolona jakožto nejdůležitější část přístroje, kde dochází k separaci. Další důležitou částí je detektor [1].

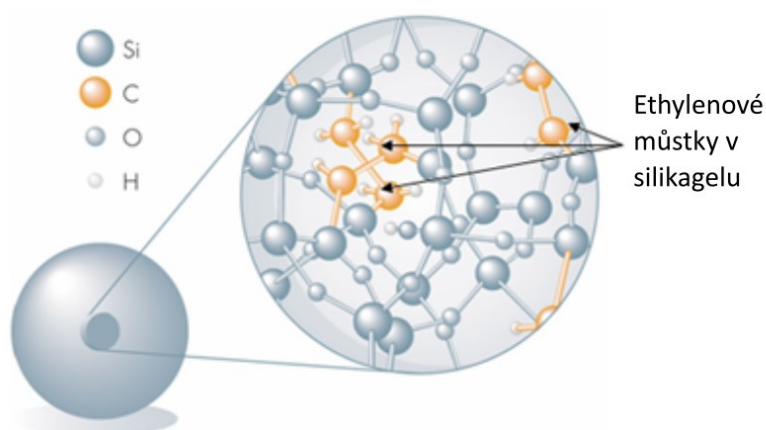
UHPLC přístroje vyžadují oproti HPLC některé specifické úpravy jejich technického vybavení. Jedná se zejména o úpravy související s nárůstem tlaku v systému v důsledku malé velikosti částic sorbentu. Robustní čerpadla UHPLC pracují v rozmezích tlaku 120 MPa až 140 MPa a dosahují průtoku mobilní fáze 2–5 ml/min. Takto vysoký tlak v systému vyžaduje pevné spoje v přístroji. Z důvodu snížení objemového příspěvku ke zpoždění gradientu byly vyvinuty mikrofluidní směšovače s objemem 20–35  $\mu\text{l}$  pro mísení fází za vysokého tlaku a s objemem 300–900  $\mu\text{l}$  pro mísení fází za nízkého tlaku. Důležitou roli hraje i mrtvý objem systému, který má vliv na rozmývání píku. Zmenšením kolon a mimokolonových objemů se tak zmenšil i vliv mrtvého objemu na rozmývání elučních zón. Automatické dávkovače pro UHPLC musí splňovat též určité požadavky, mezi které patří zejména rychlé a opakovatelné nástřiky

malých objemů vzorku okolo 0,1–0,2  $\mu\text{l}$ . Z důvodů rychlé UHPLC separace je také vyžadována vysoká frekvence sběru dat [1, 8, 10].

Využití UHPLC přináší mnoho výhod, jako je lepší rozlišení, vyšší citlivost, nízká spotřeba rozpouštědel a zejména zkrácení času analýzy i vývoje metody oproti HPLC. Uplatnění nacházejí ve všech aplikačních oblastech farmaceutického průmyslu, ale používají se také pro forenzní a environmentální analýzy [10, 11].

### 3.2.2 Kolony pro UHPLC

Částice sorbentu mají velikost pod 2  $\mu\text{m}$  a jsou plněny do kolon o velikosti 50 mm až 150 mm s vnitřním průměrem nejčastěji 2,1 mm. Sorbent může tvořit jak silikagel, tak polymer. Silikagel vykazuje velkou odolnost vůči mechanickému namáhání, nicméně je omezen chemickou odolností vůči pH mobilní fáze a také způsobuje rozmývání píku pro bazické analyty. Kolony s polymerními sorbenty mají tu výhodu, že mohou pracovat v široké oblasti pH, ale mají nižší odolnost vůči mechanickému namáhání a nižší účinnost. ACQUITY BEH (Bridge Ethyl Hybrid) je druhá generace hybridního sorbentu s velikostí částic 1,7  $\mu\text{m}$ , která kombinuje vlastnosti obou předešlých sorbentů. Částice tvořené hybridním sorbentem se vyznačují vysokou mechanickou stabilitou a chemickou odolností díky inkorporovaným ethylenovým můstkům v silikagelu (Obrázek 3).



**Obrázek 3:** Ethylenové můstky v silikagelu (upraveno podle [4])

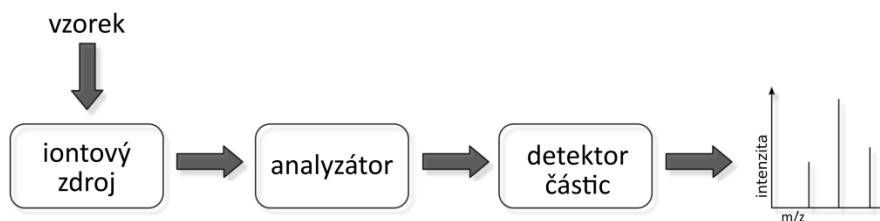
ACQUITY UPLC™ BEH kolony jsou dostupné v mnoha chemických modifikacích ve formách ACQUITY UPLC™ BEH C8, C18, Shield C18, fenyl, HILIC a dalších. Ačkoli v roce 2004 představila první UHPLC kolonu firma Waters, v současné době

UHPLC kolony vyrábí mnoho dalších firem a spektrum nabízených kolon je značně široké [1, 4, 8, 10].

### 3.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Koncem 19. století byl započat výzkum hmotnostní spektrometrie, kterému předcházela objev radioaktivity. Zakladatelem byl J. J. Thomson z Univerzity Cambridge. Ten roku 1913 dokázal na prvním parabolickém spektrometru oddělit směs izotopů neonu. Odstartoval tak vývoj nové techniky, která si našla nezastupitelné místo v analytické chemii. Vědci jako F. W. Aston, A. Nier či A. J. Dempster pokračovali ve výzkumu a zdokonalovali tuto techniku. Přestože měly první hmotnostní spektrometry malé rozlišení a senzitivitu, byly schopné identifikovat všechny přirozeně se vyskytující izotopy lehkých prvků a jejich zastoupení ve vzorku. Tato technika tedy pomohla v objevování nových stabilních izotopů, určování jejich přesné atomové hmotnosti a na poli biochemie pomohla při studiu metabolismu. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie se dočkala technika v šedesátých letech 20. století. Tím se otevřel prostor pro výzkum analýzy multikomponentních organických látek do podoby, jak ho známe dnes [12, 13].

Principem hmotnostní spektrometrie je identifikace iontů podle poměru hmotnosti iontu a jeho náboje, tj.  $m/z$  ( $m$  – relativní molekulová hmotnost,  $z$  – náboj). Hmotnostní spektrometry se skládají ze tří základních částí: iontový zdroj, analyzátor, detektor (Obrázek 4). V iontovém zdroji dochází k převedení molekul na ionty, tyto ionty jsou následně akcelerovány a usměrněny do rovného paprsku, který vede do analyzátoru, v němž dochází k rozdělení iontu v poměru  $m/z$ . Vzniklé signály pak zpracuje detektor [12, 13].



**Obrázek 4:** Instrumentace hmotnostního spektrometru (upraveno podle [14])

Pro hmotnostní spektrometrii najdeme dnes široké uplatnění například ve farmaceutickém průmyslu, potravinářství, zemědělství nebo vodárenství. Výhodné je i

její použití v laboratorní diagnostice pro obory toxikologie, monitorování terapeutických hladin léků, metabolomika, proteomika, lipidomika či odhalování dědičných metabolických poruch [12, 13, 15].

### 3.3.1 Ionizační techniky

Ionizace analytu je nezbytnou součástí procesu probíhajícího v hmotnostních spektrometrech. Je to proces, při kterém jsou vytvářeny v plynné fázi ionty za pomoci iontového zdroje. Iontové zdroje je možno rozdělit do čtyř základních kategorií [15]:

- **Elektronové** – přímá elektronová ionizace (EI) nebo fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)
- **Sprejové** – využívající sprejového efektu – ionizace elektrosprejem (ESI)
- **Chemické** – založené na reakci nebo interakci s jinou chemickou látkou – chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
- **Desorpční** – ionizace z povrchu – desorpční ionizace elektrosprejem (DESI)

Pro zjednodušení a lepší přehled můžeme techniky rozdělit také na základě dodané energie při ionizaci na tvrdé a měkké.

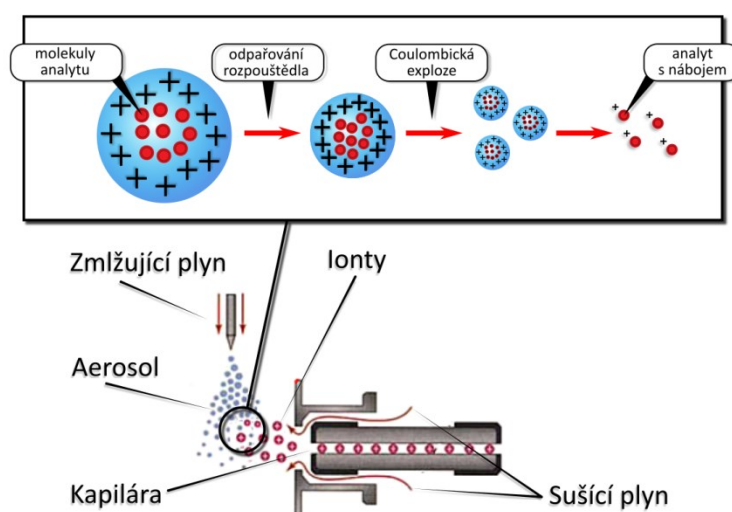
Mezi **tvrdé techniky** je řazena elektronová ionizace (EI), během níž dochází vlivem dodání velké energie k rozpadu molekulárního iontu. Díky tomu vznikají bohatě fragmentovaná spektra. Tato spektra jsou například součástí knihovny NIST (National Institute of Standards and Technology) a slouží k vyhodnocování a interpretaci výsledků. Elektronová ionizace je používána v GC/MS přístrojích a je vhodná zejména pro analýzu těkavých látek [13, 15, 16].

K **měkkým technikám** patří ESI, APCI, APPI, a ionizace za účasti matrice (MALDI). ESI, APCI, APPI se označují jako ionizace za atmosférického tlaku (API), protože jsou uloženy před vstupem do vakua hmotnostního analyzátoru a ionizace probíhá za atmosférického tlaku. Měkkou ionizací získáme lepší přehled o molekulové hmotnosti sledované látky, jelikož při ionizaci vznikají molekulární ionty, popřípadě jejich adukty, a dochází k menší fragmentaci analyzované látky. To se projeví na

spektru tím, že vykazuje méně fragmentací. K technikám, které jsou nejčastěji využívány v LC/MS patří právě ESI, APCI, APPI [13, 15, 17].

### 3.3.1.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)

V elektrospreji je rozpuštěný vzorek přiváděn do ionizační komory přes sprejovací kapiláru. Na špičku této kapiláry je vkládáno vysoké napětí (2–6kV). Takto silné elektrické pole vytvoří disperzi roztoku vzorku a vytvoří vysoce nabitý aerosol. U rozprašovací kapiláry je koaxiálně vstříkován zmlžující plyn ( $N_2$ ) napomáhající nebulizaci. Odpařování rozpouštědla z kapek napomáhá sušící plyn o zvýšené teplotě. S odpařováním rozpouštědla roste hustota náboje na povrchu kapky a po překročení Rayleighova limitu, kdy převládnu repulzní síly mezi náboji nad povrchovým napětím kapky, dojde ke Coulombické explozi. Tímto principem se kapky zmenšují, až dojde k přenosu náboje na analyt za vzniku jednotkového náboje. Ten vstupuje do hmotnostního spektrometru. Ionizace ESI je vhodná pro polární až velmi polární látky v širokém rozmezí  $m/z$  (Obrázek 5) [14, 17].

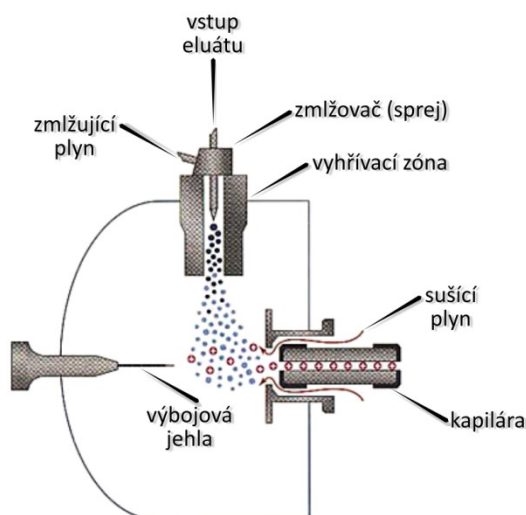


**Obrázek 5:** Instrumentace ESI a vznik náboje na analytu (upraveno podle [18])

### 3.3.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

Jedná se o metodu využívající ion-molekulární reakce s ionizovanými molekulami mobilní fáze. V iontovém zdroji je roztok vzorku rozprašován za pomoci zmlžujícího plynu ( $N_2$ ) do vyhřívané zóny, která má teplotu přibližně okolo  $400^{\circ}C$ , a je převeden s rozpouštědlem do plynné fáze. V komoře, kam je unášena plynná fáze, je

uložena výbojová jehla, na kterou je vkládané napětí (3–4kV). Ta koronovým výbojem ionizuje molekuly rozpouštědla, které následně ionizují vzorek. Před vstupem do analyzátoru je vstříkovan sušící plyn ( $N_2$ ), aby rozbil zbývající klastry analytu tvořené nekovalentními vazbami. APCI slouží hlavně k detekci méně polárních a nepolárních látek (Obrázek 6) [18, 19].

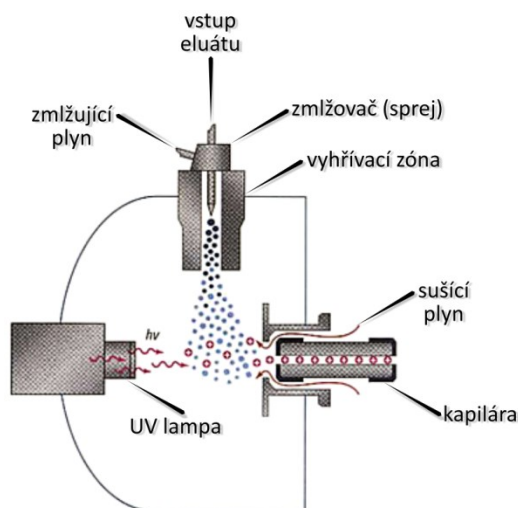


**Obrázek 6:** Instrumentace APCI (upraveno podle [18])

### 3.3.1.3 Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

Principem této ionizační techniky je interakce UV záření s analytem. Analyt je vstříkovan přes vyhřívanou zónu spolu se zmlžujícím plynem do místa, kde je kryptonová nebo argonová lampa. Fotony emitované těmito lampami ionizují molekuly v případě, že je ionizační energie cílové molekuly nižší než energie fotonu. V případě, kdy je energie fotonu menší než ionizační energie molekuly, dochází k fotoexcitačním reakcím, jako je fotodisociace, opětovné vyzáření energie v podobě fotonu nebo předání energie jiné molekule. Ionizované molekuly jsou unášeny do hmotnostního analyzátoru. S analytem je zároveň v nadbytku přidávána i látka s nízkou ionizační energií neboli dopant. Ten zvyšuje výtěžnost ionizovaných molekul analytu, protože je fotony ionizován jako první. Ionizovaný dopant pak s molekulou náboj vymění nebo mu předá proton. To ale záleží na elektronové afinitě či protonové afinitě interagujících molekul. Jako dopant se používá například toluen, aceton, chlorbenzen. APPI se využívá k ionizaci nepolárních a méně polárních látek (Obrázek 7) [17, 18].

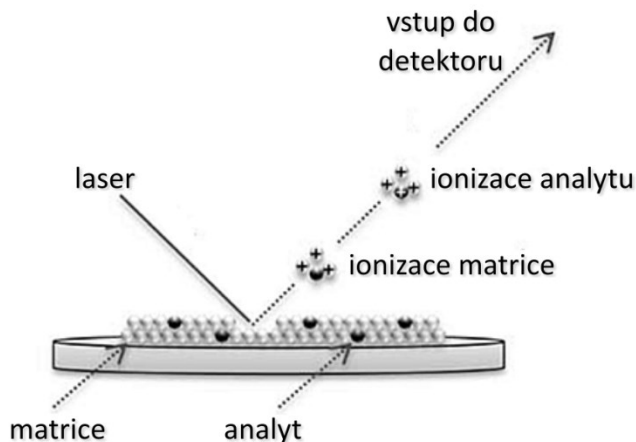




**Obrázek 7:** Instrumentace APPI (upraveno podle [18])

### 3.3.1.4 Ionizace za účasti matrice (MALDI)

MALDI je měkká technika, při níž je vzorek ukotven na destičce v matrici, na destičku je pulzně vystřelen paprsek laseru, který způsobí desorpci. Desorbovaná matrice je ionizována jako první a molekulárními interakcemi dochází k ionizaci analytu. Tato technika se využívá zejména při analýze proteinů a jiných makromolekul o hmotnosti až stovek tisíc Da (Obrázek 8) [15, 18].



**Obrázek 8:** Ionizace za účasti matrice (upraveno podle [13])

### 3.3.2 Hmotnostní analyzátory

Analyzátor je hlavní částí hmotnostních spektrometrů, protože zde dochází za vysokého vakua k rozdělení iontů dle poměru  $m/z$ .

**Dle fyzikálního principu separace iontů podle  $m/z$  jsou hmotnostní analyzátory rozděleny do pěti kategorií:**

- „1) zakřivení dráhy letu v magnetickém nebo elektrickém poli či jejich kombinaci
- 2) různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí ( $Q$ ,  $QqQ$ ,  $LIT$ ,  $QIT$ )
- 3) různá doba letu v oblasti bez pole ( $TOF$ )
- 4) různá absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli ( $FT-ICR$ )
- 5) rozdělení iontů na základě různé frekvence harmonických oscilací (*orbitrap*) [20].“

**Charakteristiky hmotnostních analyzátorů [21, 22]:**

- **Rozlišovací schopnost** – je definována jako FWHM (Šířka píku v polovině výšky), neboli poměr  $m/z$  ku celé šířce píku v polovině jeho výšky, a nese informaci, jak dobře jsou schopny analyzátory poměr  $m/z$  rozlišit
- **Hmotnostní rozsah** – tento parametr udává, jakou maximální hodnotu  $m/z$  jsme s daným analyzátozem schopni naměřit
- **Správnost měření  $m/z$**  – správnost  $m/z$  je definována jako odchylka naměřené  $m/z$  od teoreticky spočítané hodnoty  $m/z$  z elementárního složení a udává se v ppm
- **Lineární dynamický rozsah** – Udává limit pro rozsah množství iontů, které můžeme v daném čase ionizovat a pak detegovat s lineární odezvou
- **Rychlost frekvence sběru dat**

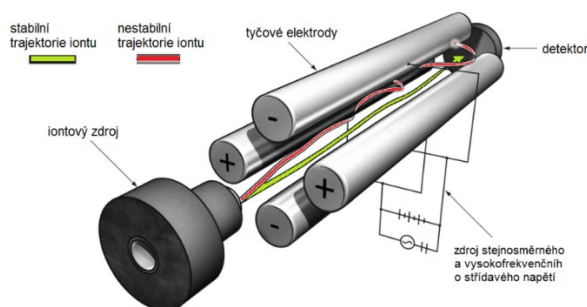
**Analyzátory lze také rozdělit na základě jejich rozlišovací schopnosti do dvou skupin:**

- **Spektrometry s nízkým rozlišením (LRMS)** – rozlišovací schopnost těchto analyzátorů je v rozmezí  $10^2$ – $10^4$  a měří  $m/z$  s přesností na jedno až dvě desetinná místa [21, 22]. Zástupci jsou kvadrupól, 3D iontová past, lineární iontová past
- **Spektrometry s vysokým rozlišením (HRMS)** – rozlišovací schopnost je v rozmezí

od  $10^4$  až  $10^6$  a měří  $m/z$  poměr s přesností většinou na čtyři desetinná místa [21, 22]. Zástupci jsou průletové analyzátoři, sektorové, orbitrap, iontová cyklotronová rezonance.

### 3.3.2.1 Kvadrupól (Q)

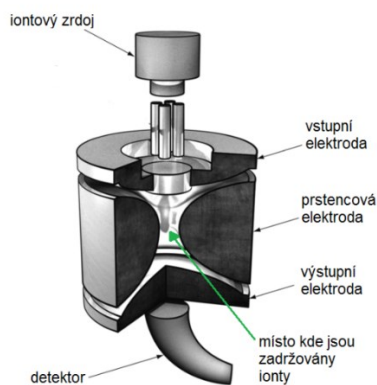
Kvadrupólové analyzátoři tvoří čtyři tyčové elektrody, na které je vkládána kombinace stejnosměrného napětí a vysokofrekvenčního napětí (Obrázek 9). Naproti sobě paralelně uložené elektrody mají vždy stejnou polaritu. Ionty procházející mezi elektrodami v tomto elektrickém poli během letu oscilují a při stabilních oscilacích dorazí až k detektoru. Pokud je trajektorie iontu nestabilní, jsou ionty neutralizovány srážkou s elektrodami. Stabilní oscilace iontu o určité hodnotě  $m/z$  jsou vytvářeny poměrem vkládaného stejnosměrného a vysokofrekvenčního napětí. Schopnosti kvadrupólu jsou s porovnáním ostatních analyzátorů průměrné v rozlišovací schopnosti, správnosti měření  $m/z$  a hmotnostním rozsahu, ale vynikají v lineárním rozsahu, citlivosti a robustnosti [1, 13, 22].



**Obrázek 9:** Instrumentace kvadrupólu (upraveno podle [22])

### 3.3.2.2 3D Iontová past (QIT)

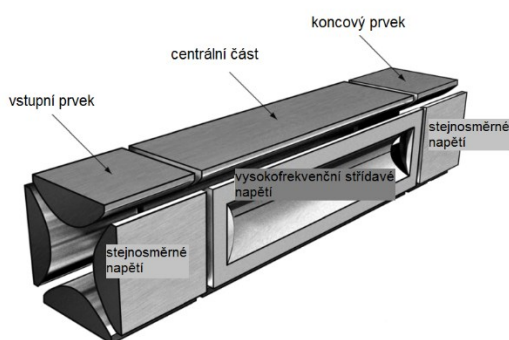
Iontová past je v principu podobná kvadrupólovému analyzátoru. Skládá se ze vstupní elektrody, prstencové elektrody a výstupní elektrody (Obrázek 10). Na ionty je v prostoru mezi těmito elektrodami aplikováno třidimenzionální elektrické pole, které umožní jejich zachycení. Potom je měněn poměr elektrického napětí na elektrodách a při určitém poměru jsou ionty o určitém poměru  $m/z$  vypuzovány směrem k detektoru. Iontové pasti patří v parametrech rozlišovací schopnosti, správnosti měření  $m/z$ , a hmotnostního rozsahu k průměru, oproti tomu mají vysokou robustnost, nízké pořizovací náklady a dají se využít v tandemových hmotnostních spektrometrech [22].



**Obrázek 10:** Instrumentace iontové pasti (upraveno podle [22])

### 3.3.2.3 Lineární iontová past (LIT)

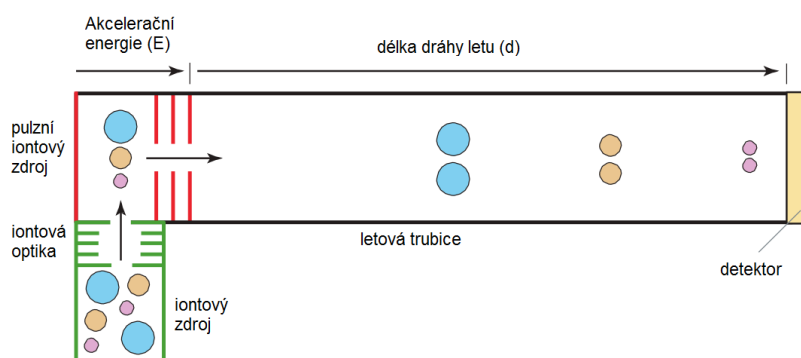
V lineární iontové pasti jsou ionty radiálně zadržovány v centrální části analyzátoru, na kterou je vkládáno vysokofrekvenční střídavé napětí (Obrázek 11). Ve směru osy jsou ionty uvězněny díky vstupnímu a koncovému prvku analyzátoru, na které je vkládáno stejnosměrné napětí. V závislosti na typu přístroje jsou ionty vypuzovány buď radiálně, nebo ve směru osy. Ve srovnání s iontovou 3D pastí dosahují lineární pasti lepšího lineárního rozsahu, protože mají větší prostor pro udržení iontů. Další předností analyzátoru je zapojení v hybridních analyzátoch, jako je iontová cyklotronová rezonance. V tomto spojení dosahují přístroje přesnějšího měření poměru  $m/s$  a vysokého rozlišení [22].



**Obrázek 11:** Instrumentace lineární pasti (upraveno podle [22])

### 3.3.2.4 Analyzátor doby letu (TOF)

Analyzátoři doby letu pracují na relativně jednoduchém principu. Po ionizaci analytu je iontům elektrickým pulzem dodána stejná kinetická energie a jsou vypuzeny do průletové trubice, kde dochází k jejich rozdělení na základě rychlosti pohybu. Ionty o menší hodnotě  $m/z$  mají větší rychlost, a tudíž dopadají na detektor v kratším čase. Ionty s větší hodnotou  $m/z$  letí déle a na detektor dopadnou později. Při známé délce dráhy letu iontu jsme schopni zjistit jeho rychlost změřením času, který urazí od pulzního iontového zdroje k detektoru, a tím určit jeho  $m/z$ . (Obrázek 12) Průletové analyzátoři mají úžasnou rozlišovací schopnost a teoreticky neomezený rozsah v měření hodnoty  $m/z$ . Výhodné je tandemové zapojení TOF analyzátoři s kvadrupólem, zlepšuje se tak parametr senzitivity a rozlišení [21, 22, 23, 24].



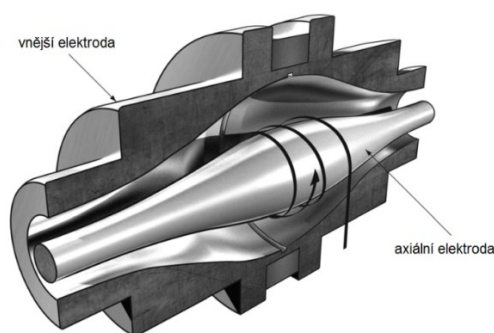
**Obrázek 12:** Analyzátor doby letu (upraveno podle [23])

Běžnou součástí moderních průletových analyzátoři jsou reflektory, které zvyšují jejich rozlišení a mohou být také označovány jako iontová zrcadla. Jejich účelem je srovnat rozdíly kinetické energie iontů se stejným poměrem  $m/z$ . Elektrické pole reflektoru je většinou vytvořeno soustavou kruhových elektrod uložených mimo osu pulzního iontového zdroje a odráží ionty do detektoru. Ionty penetrují do elektrického pole v závislosti na své kinetické energii, z čehož vyplývá, že ionty s větší kinetickou energií jsou rychlejší a penetrují do reflektoru hlouběji než ionty s menší kinetickou energií. Tento efekt způsobí, že ionty se stejným poměrem  $m/z$  o větší kinetické energii jsou v reflektoru zdrženy a pak dorazí na detektor ve stejný čas jako pomalejší ionty se stejným poměrem  $m/z$ . Zvýšení rozlišení není jedinou výhodou reflektorů, protože svým zapojením prodlužují letovou trubici analyzátoři bez nároků na zvětšení přístroje. V některých přístrojích můžeme změnou počtu použitých

reflektronů v iontové optice zvýšit rozlišení až několikanásobně. Bohužel reflektory si vybírají i svou daň v podobě snížení citlivosti a omezení rozsahu měření poměru  $m/z$  v průletových analyzátoch [22, 25, 26].

### 3.3.2.5 Orbitrap

Orbitrap se od ostatních analyzátorů liší tím, že nevyužívá k zachycení iontů vysokofrekvenční pole ani magnetické pole, nýbrž je zadržuje v čistě elektrickém poli. Ionty jsou tangenciálně vpraveny do tohoto pole, které vytváří centrální vřetenovitá a vnější elektroda. Vnitřní vřetenovitou elektrodu ionty obíhají a je měřen indukovaný proud vznikající díky obíhajícímu náboji. Tyto harmonické oscilace jsou následně detekovány vnější elektrodou (Obrázek 13). Harmonické oscilace se převedou Fourierovou transformací k získání poměru  $m/z$ . Pro orbitrap analyzátoch je typické, že dosahují vysoké rozlišovací schopnosti a správnosti měření, ale zaostávají v parametrech senzitivity a lineárního rozsahu [15, 22].

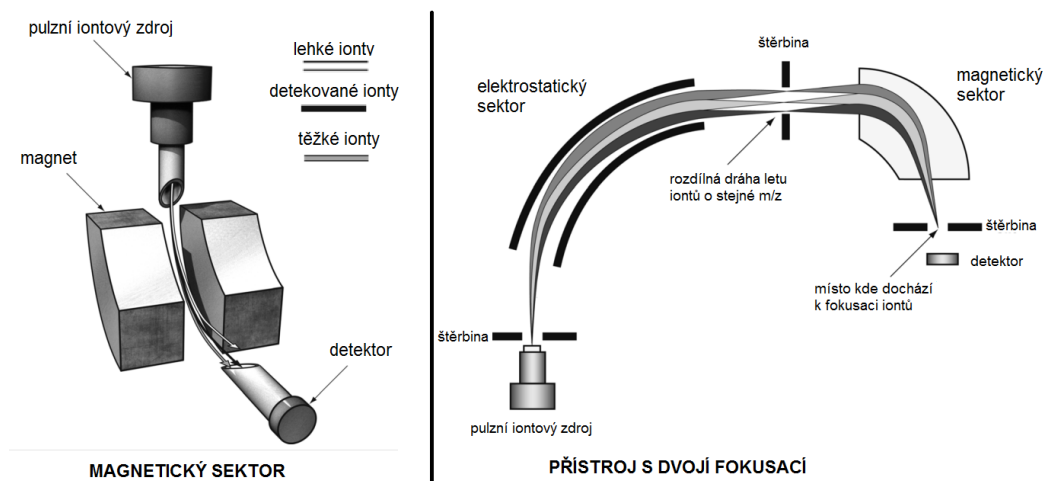


**Obrázek 13:** Instrumentace orbitrapu (upraveno podle [22])

### 3.3.2.6 Magnetický sektor (B)

Magnetické sektorové analyzátoch patří ke starším typům analyzátorů. Získání hodnoty  $m/z$  je založeno na průletu iontu magnetickým polem. Akcelerované ionty jsou vpuštěny do magnetického pole (B) elektromagnetu ve tvaru kruhové výseče, kde dojde k zakřivení jejich dráhy letu podle poměru  $m/z$  (Obrázek 14). Záznam spektra je dán plynulou změnou indukce. Na obrázku můžeme vidět, že ionty jiné hodnoty  $m/z$ , než je hodnota  $m/z$  detekovaného iontu v daný moment, jsou rozptýleny v prostoru a na detektor nedopadnou. Současné přístroje využívají dvojitou fokusaci, což v praxi znamená přidání elektrického pole (E), které srovná počáteční rozdílné dráhy iontů o

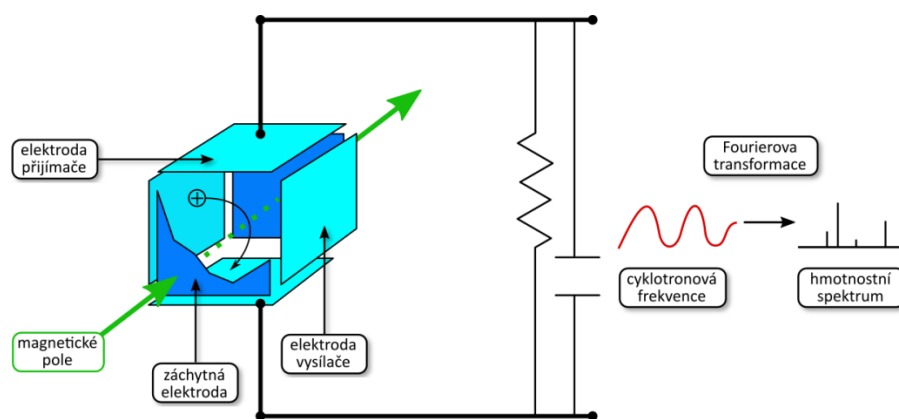
stejně hodnotě  $m/z$  a rapidně tím zvýší rozlišovací schopnost přístroje (Obrázek 14). Magnetické sektorové analyzátoři vynikají v parametrech lineárního rozsahu a senzitivity, ve kterých jim ostatní přístroje těžce konkurují. Vynikající je i jejich správnost měření [22].



**Obrázek 14:** Magnetický sektor vlevo a přístroj s dvojí fokusací vpravo (upraveno podle [22])

### 3.3.2.7 Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)

FT-ICR je analyzátor s nejvyšší rozlišovací schopností a vysokou správností měření. V analyzátoru jsou ionty umístěny do silného magnetického pole, což způsobí jejich krouživý pohyb (Obrázek 15). V tomto krouživém pohybu má ion o určitém poměru  $m/z$  specifickou cyklotronovou frekvenci, která je získána a přepočtena Fourierovou transformací na hodnoty  $m/z$ . FT-ICR disponují nejlepší rozlišovací schopností ze všech hmotnostních analyzátorů a mají velmi dobrou správnost měření. Mají však malé lineární rozmezí, protože je limituje prostor, kde jsou zadržovány ionty [15, 22].



Obrázek 15: FT-ICR instrumentace (upraveno podle [27])

	Rozlišovací schopnost	Správnost měření m/z	Hmotnostní rozsah m/z	Lineární dynamický rozsah	Rychlost frekvence sběru dat (Hz)	Cena
Q	100–1000	100 ppm	4000	$10^7$	2–10	nízká
QIT	1000–10 000	50–100 ppm	4000	$10^2$ – $10^3$	2–10	průměrná
LIT	1000–10 000	50–100 ppm	4000	$10^3$ – $10^4$	10	nízká
TOF	1000–40 000	5–50 ppm	>100 000	$10^6$	10–50	průměrná
Orbitrap	10 000–150 000	2–5 ppm	6000	$10^3$ – $10^4$	1–5	vysoká
Sektorový analyzátor s dvojitou fokusací	100 000	< 1 ppm	10 000	$10^9$	-	vysoká
FT-ICR	10 000–1000 000	1–5 ppm	>10 000	$10^3$ – $10^4$	0,5–2	nejvyšší

Tabulka 1: Parametry jednotlivých MS analyzátorů (upraveno podle [22, 28])

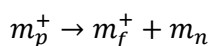
### 3.3.3 Detektory

Detektory vytváří digitální formát získaných signálů z hmotnostního analyzátoru. První skupinou jsou detektory, které zaznamenají všechny ionty bez ohledu na jejich m/z. Pracují na principu přímého měření elektrického proudu, který vznikne po dopadu iontu na dynodu a je zesílen elektronovými násobiči. Druhou skupinou jsou analyzátoři FT-ICR a orbitrap, které samy o sobě fungují jako detektor a jejich signál je zpracováván Fourierovou transformací [21].



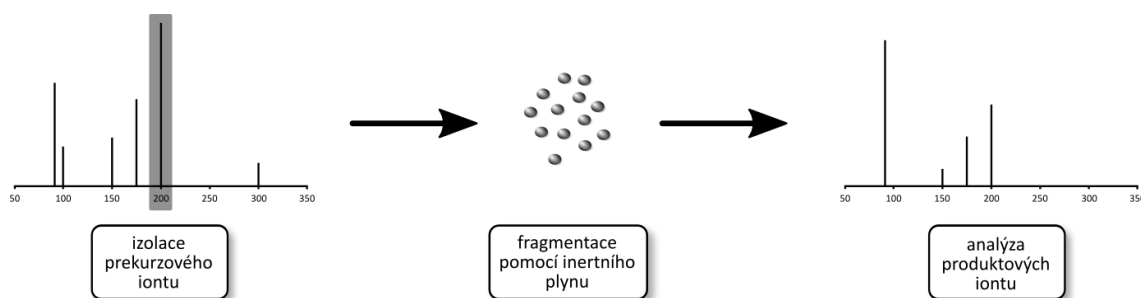
### 3.4 Tandemová spektrometrie (MS/MS)

Na tandemovou spektrometrii můžeme obecně nahlížet jako na metodu využívající dvě (MS/MS) a více ( $MS^n$ ) úrovní hmotnostní analýzy. V první MS-I úrovni jsou izolovány prekurzorové ionty ( $m_p^+$ ), které podléhají fragmentaci a vedou ke vzniku produktových iontů ( $m_f^+$ ) a neutrálních fragmentů ( $m_n$ ) a jsou analyzovány druhým stupněm MS-II.



Rovnice 3: Fragmentační reakce v tandemovém spektrometru [29]

Fragmentace iontů je nejčastěji prováděna kolizně indukovanou disociací (CID), kde prekurzorové ionty podléhají energetické kolizi s inertním plynem (např.  $N_2$ , Ar, He), to má za následek jejich fragmentaci. MS/MS a  $MS^n$  otevřela cestu k objasnění struktury molekul pomocí MS. Nejvíce patrné to je v proteomice, kde se tento přístup využívá k odhalování peptidových biopolymerů [22, 29].



Obrázek 16: Princip tandemové spektrometrie (upraveno podle [29])

#### Tandemovou hmotnostní spektrometrii můžeme rozdělit na:

- **Tandemová spektrometrie v prostoru** – Do této skupiny patří sektorové, TOF a kvadrupólové analyzátoři. Souhrnně se označují jako paprskové technologie, protože ionty přecházejí do analyzátoru v podobě nepřetržitého nebo pulzního paprsku. U paprskových technologií je každá úroveň hmotnostní analýzy prováděna v samostatném analyzátoru tak, aby se dvě a více úrovní analýzy oddělily v prostoru. Přístroje spadající do této kategorie jsou QqQ, multisektorové magnetické analyzátoři, TOF/TOF [1, 22, 30].

- **Tandemová spektrometrie v čase** – Do této kategorie spadají analyzátoři na principu pasti, které jsou schopny zadržovat ionty. Patří sem QIT, LIT, orbitrap, FT-ICR. Tyto analyzátoři detekují zadržené ionty na základě frekvence jejich pohybu v definovaném prostoru. Jednotlivé úrovně hmotnostní analýzy jsou odděleny časem. Tyto přístroje bohužel neumí provádět sken prekurzorových iontů a sken neutrálních ztrát. Dlouhý je i čas potřebný k analýze. Jejich výhodou je v  $MS^n$  experimentech, které probíhají v rámci jednoho analyzátoři a poskytují tak výborný nástroj pro objasnění strukturálních informací zkoumaného iontu [22, 30].

### 3.4.1 Trojitý kvadrupól (QqQ)

Trojitý kvadrupól skládající se ze tří kvadrupólů patří mezi tandemové spektrometry. Dva kvadrupóly v těchto přístrojích slouží jako hmotnostní analyzátoři, mezi které je umístěn kvadrupól fungující jako kolizní cela (q). Trojité kvadrupóly jsou využívány ke kvantitativní analýze biologických materiálů, environmentální analýze atd. Dosahují totiž vysoké citlivosti, selektivity a robustnosti analýz. Analyzátoři QqQ je schopen měřit ve dvou základních skenech: v MS skenu a v selektivním záznamu jednoho nebo více iontů (SIM). Při MS skenu jsou zjištěny všechny naměřené hodnoty  $m/z$  a výstupní informace má kvalitativní charakter. Výhodou tohoto módu je zjištění všech vzniklých iontů ve zdroji, ale za cenu ztráty citlivosti. Pro vyšší citlivost a kvantifikaci se více hodí SIM sken, kde už jsou sledovány předem určené ionty. V případě těchto dvou skenů fungují první dva kvadrupóly jako iontová optika a ionty pouze propouští do třetího kvadrupólu. Dále QqQ umí měřit ve všech čtyřech typech skenů uvedených v kapitole Tandemová spektrometrie. Jejich největší předností je SRM sken, díky němuž se hojně používají pro kvantifikaci v hmotnostní spektrometrii [13, 22, 28].

### 3.5 Hybridní analyzátory

Hmotnostní spektrometry skládající se z dvou a více různých analyzátorů se označují jako hybridní. Výhodou hybridních analyzátorů je kombinace více různých typů analyzátorů, čímž je možné využít výhody a potlačit nevýhody. Tím pádem dosahují hybridní přístroje lepších výsledků než jednotlivé analyzátory. Různé kombinace analyzátorů jsou uvedeny v Tabulce 2 [25, 30].

		MS-II <sup>(n)</sup>					
		Q	TOF	LIT	QIT	Orbitrap	FT-ICR
MS-I	Q	QqQ	Q-TOF	Q-LIT		Q-Orbitrap	Q-FT-ICR
	TOF		TOF/TOF				
	LIT			MS <sup>n</sup> v LIT		LIT-Orbitrap	LIT-FT-ICR
	QIT		QIT-TOF		MS <sup>n</sup> v QIT		
	FT-ICR						MS <sup>n</sup> v FT-ICR
			Tandemová spektrometrie v prostoru			Tandemová spektrometrie v čase	

**Tabulka 2:** Přehled analyzátorů a kombinací analyzátorů používaných pro MS/MS a MS<sup>n</sup> (upraveno podle [28, 30, 31])

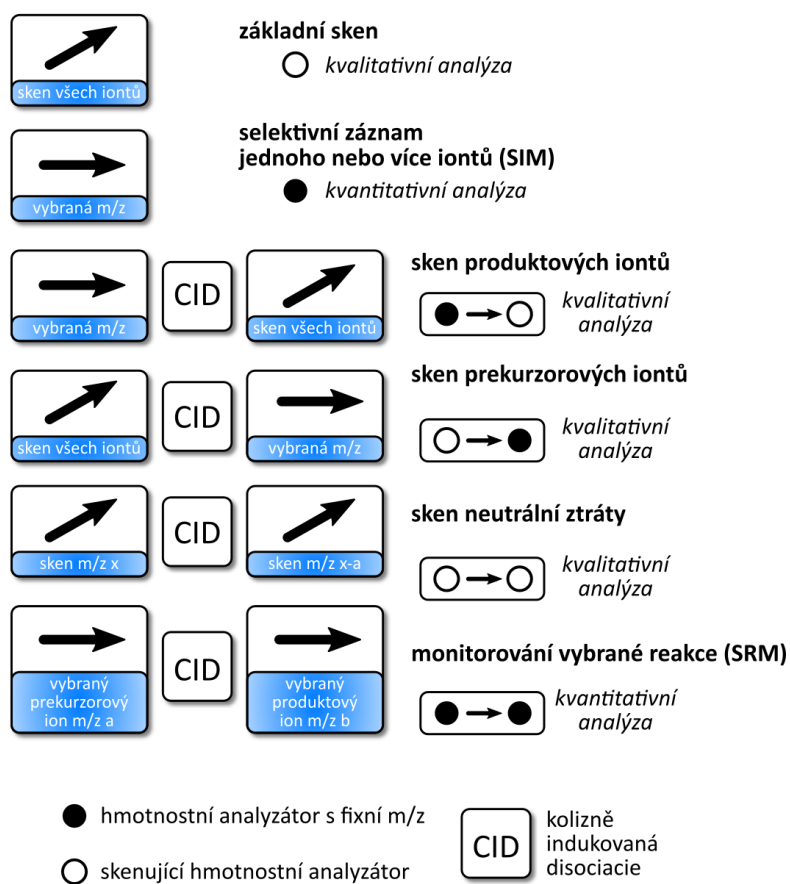
#### Q-TOF analyzátory

Jedná se o kombinaci kvadrupólového analyzátoru a analyzátoru doby letu, který je umístěn za kolizní celou. Jedná se o nejběžněji používané hybridní analyzátory s vysokým rozlišením. Své využití nacházejí v identifikaci látek na základě přesné hmoty a v proteomické a metabolické analýze. Velkou předností tohoto typu analyzátorů je rychlá frekvence sběru dat, proto je vhodný zejména v kombinaci s technikami UHPLC [25, 28, 32].

### 3.6 Typy skenů v hmotnostní spektrometrii

V hmotnostní spektrometrii můžeme provádět různé typy skenů v závislosti na informaci, kterou chceme ze vzorku získat. Jejich výčet je uveden dále.

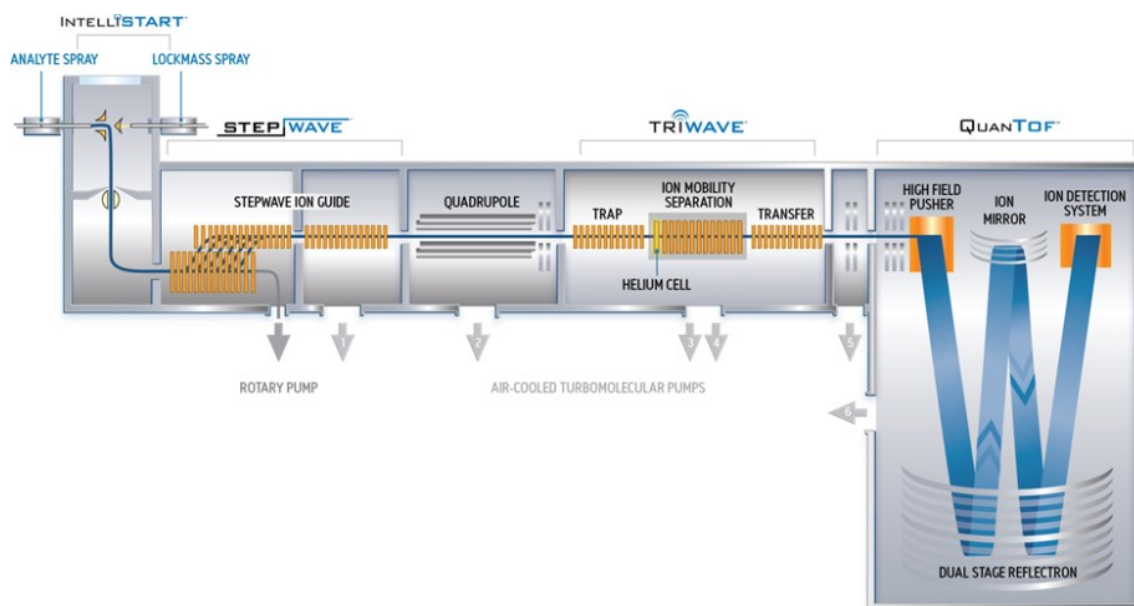
- a) **Základní sken, MS sken** – V základním skenu analyzátor změří celé spektrum  $m/z$  v daném rozsahu, tento záznam se používá ke zjištění všech zaznamenaných  $m/z$  hodnot a slouží ke kvalitativní analýze [1].
- b) **Selektivní záznam jednoho nebo více iontů (SIM)** – Analyzátor v SIM skenu měří intenzitu signálu vybraného iontu či více iontů v závislosti na čase. Tento sken se využívá pro kvantifikaci iontů [1].
- c) **Sken produktových iontů** – MS-I propouští ion s definovanou  $m/z$  a po fragmentaci jsou MS-II úrovní zaznamenány všechny produktové ionty. Tento mód se používá pro kvalitativní analýzu a ke zjištění informací o struktuře iontu, dále i k určení nejintenzivnějších přechodů, které se využijí v SRM módu [13, 22].
- d) **Sken prekurzorových iontů** – MS-I postupně propouští ionty se zvyšující se  $m/z$ , pracuje tedy ve skenujícím modu. MS-II má nastavenou fixní hodnotu  $m/z$  a sleduje specifický fragment. Využívá se k identifikaci strukturně podobných látek ve vzorku [1, 13, 22].
- e) **Sken neutrální ztráty** – MS-I a MS-II pracují ve skenovacím módu a monitorují vybranou neutrální ztrátu mezi prekurzorovými a produktovými ionty. Používá se k selektivní identifikaci strukturně podobných látek [1, 13].
- f) **Monitorování vybrané reakce (SRM)** – V tomto módu prochází přes MS-I známý prekurzor a přes MS-II známý produktový ion. SRM je velmi selektivní a citlivý mód používaný pro kvantifikaci sledované látky. Tato analýza se například používá pro kvantifikaci farmaceutických látek v lidské plazmě ve spojení LC-MS/MS [22].



**Obrázek 17:** Typy skenů v hmotnostní spektrometrii (upraveno podle [29])

### 3.7 Specifikace Synapt G2-Si s ESI iontovým zdrojem

Synapt G2-Si (Obrázek 18) je hmotnostní spektrometr s hybridním analyzátozem typu Q-TOF. Tento typ přístroje obsahuje dva velmi zajímavé technologické prvky. Prvním je technologie **StepWave**, která je uložena před vstupem do kvadrupólu. Jedná se o iontovou optiku, přes kterou jsou nasávány ionty z iontového zdroje. Tato technologie brání vstupu neutrálních látek dále do analyzátoru a maximalizuje jeho robustnost, zvyšuje citlivost a odezvu analytů. Druhým technologickým prvkem je technologie **TriWave** skládající se ze tří hlavních částí: TRAP, iontově mobilní spektrometrie (IMS) a TRANSFER částí. Části TRAP a TRANSFER mohou sloužit jako kolizní cela, tudíž k fragmentaci může dojít na dvou úrovních. IMS umožňuje diferenciaci iontů na základě velikosti, tvaru, hodnoty náboje a hmotnosti. Využívá rozdílu pohybu iontů v oblasti s elektrickým polem v inertním plynu. Ve spojení s LC a MS poskytuje skvělý nástroj pro lepší rozlišení a selektivitu v identifikaci komplexních vzorků a doplňuje chromatografickou separaci a separaci podle m/z [28, 33, 34].



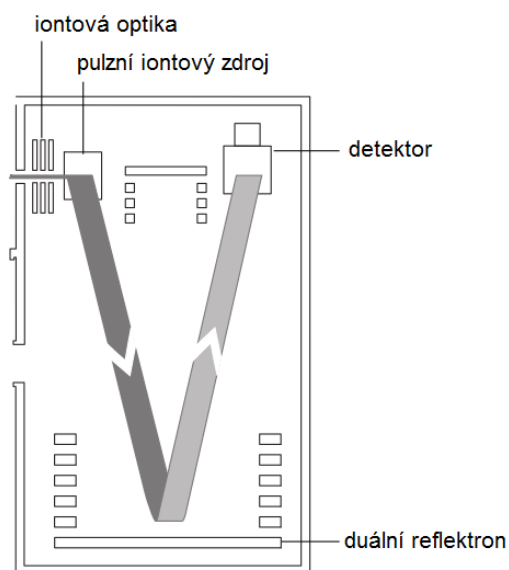
**Obrázek 18:** Synapt G2-Si HDMS (převzato z [34])

	Rozlišovací schopnost	Správnost měření m/z	Hmotnostní rozsah m/z	Rychlost frekvence sběru dat (Hz)
Q-IMS-TOF Synapt G2-Si HDMS	40 000	< 1 ppm	20–100 000	30

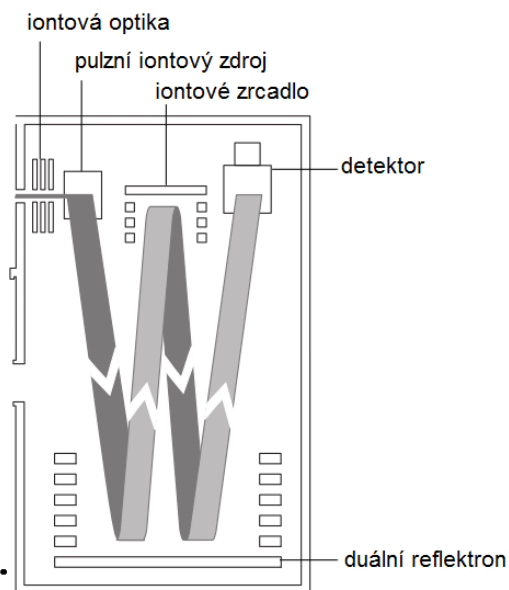
**Tabulka 3:** Parametry přístroje Synapt G2-Si HDMS (upraveno podle [28])

Synapt G2-Si měří ve čtyřech základních rozlišovacích módech: senzitivním módu, rozlišovacím módu, módu s vysokým rozlišením a módu s rozšířeným rozlišením (Tabulka 4). Módy analyzátoru se liší v počtu odrazů na reflektoru a nastavením iontové optiky. U senzitivního a rozlišovacího módu je aktivní pouze duální reflektoru, který ionty rovnou odklání do detektoru (dráha letu ve tvaru „V“). Pro mód s vysokým rozlišením a rozšířeným rozlišením je aktivováno navíc iontové zrcadlo. V tomto zapojení jsou ionty prvně odkloněny z duálního reflektoru do iontového zrcadla, které je odkloní zpět do reflektoru, a následně jsou vyslány do detektoru (dráha letu ve tvaru „W“). Ionty tedy projdou reflektorem dvakrát a dosáhne se tak vyššího rozlišení u těchto dvou módů za cenu snížení citlivosti (Obrázek 19) [35].

Průchod iontů analyzátelem TOF v senzitivním a rozlišovacím módu:



Průchod iontů analyzátelem TOF v módu s vysokým rozlišením a módu s rozšířeným rozlišením:



**Obrázek 19:** Zobrazení průchodu iontů analyzátelem TOF v základních rozlišovacích módech (upraveno podle [35])

módy analyzátoru	Rozlišovací schopnost jednotlivých módu analyzátorů
senzitivní mód	10 000
rozlišovací mód	20 000
mód s vysokým rozlišením	40 000
Mód s rozšířeným rozlišením	50 000

**Tabulka 4:** Rozlišovací schopnost základních módů přístroje Synapt 2G-Si HDMS (rozlišovací schopnost zde citovaná byla stanovena pro hovězí inzulin, převzato z [34])

### Důležité ESI parametry pro Synapt G2-Si

Parametry vhodné pro optimalizaci MS metody k dosažení nejlepší odezvy a citlivosti:

- **Napětí na kapiláře** – Jedná se o napětí vložené na špičku kapiláry a slouží k ionizaci analytu. Při standardním průtoku UHPLC nabývá nejčastěji hodnot 0,5–0,7 kV [34].
- **Napětí na vstupním kuželu** – Napětí na vstupním kuželu je vkládáno mezi StepWave a první segment TriWave. Slouží k usměrnění iontů, oddělení klastrů a odstraňování aduktů. Při nastavení vysokých hodnot může způsobovat nechtěnou fragmentaci [34].

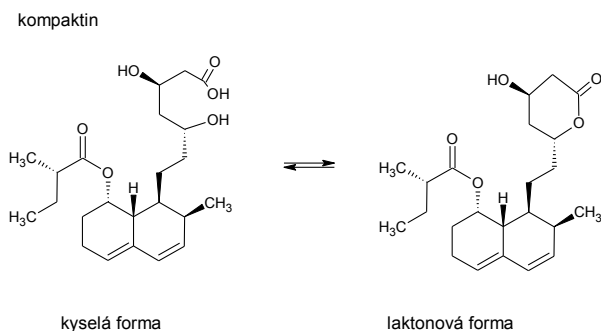
- **Napětí na StepWave** – Je optimalizováno většinou na hodnotu okolo 80 V. Tím se maximalizuje odezva  $[M+H]^+$  iontů [34].
- **Průtok plynu na vstupním kuželu** – Průtok dusíku na vstupním kuželu snižuje formování klastrů rozpouštědla [34].
- **Průtok desolvačního plynu** – Tento proud dusíku je vháněn do cely iontového zdroje za účelem odpaření rozpouštědla [34].
- **Tlak nebulizačního plynu** – Ten je obvykle nastaven na hodnotu 6,0 Bar a slouží k nebulizaci rozpouštědla a vzorku [34].

### 3.8 Statiny

Statiny jsou léčiva používaná k léčbě dislipidémie, což je metabolické onemocnění doprovázené změnami hladin plazmatických lipoproteinů. Metabolickými onemocněními trpí přibližně 50 % populace České republiky, mezi nejčastější patří dislipidemie diagnostikovaná při diabetu mellitu II. typu, kterým trpí 7 % populace, a metabolický syndrom, jehož prevalence v populaci činí 30 %. Dislipidemie je jedním z rizikových faktorů aterosklerózy, která je hlavní příčinou kardiovaskulárních onemocnění vedoucích k mortalitě a morbiditě přibližně 50 % populace. Právě statiny jsou jednou z nejčastěji dlouhodobě užívaných skupin léků v České republice. V roce 2010 bylo dokonce vydáno více než 350 milionů denních dávek statinů. V důsledku stále stoupajícího trendu zvyšující se spotřeby statinů je tato skupina atraktivní pro další výzkum [36, 37, 38].

Statiny jsou výstupem mikrobiologického výzkumu zaměřeného na antibakteriální aktivitu. V průběhu osmdesátých let 20. století se objevilo značné množství literatury popisující jejich inhibiční účinek na hydroxymethyl coenzym A reductázu (HMG-CoA). Roku 1973 byl izolován kompaktin z *Penicillium citrinum*, který byl první látkou tohoto druhu (Obrázek 20). Bohužel výzkum této látky byl zastaven z důvodů jejího rakovinotvorného účinku, který se projevil v testech na zvířatech. Novou nadějí se stal lovastatin, původním jménem mevinolin, izolovaný z *Aspergillus terreus*. U lovastatinu se obavy z karcinogenity nepotvrdily, a byl tudíž jako první v září roku 1987 uveden na trh. A zrodila se tak zcela nová skupina léčiv [39, 40].





**Obrázek 20:** Kompaktin (upraveno podle [39])

### 3.8.1 Mechanismus účinku

Statiny zasahují do syntézy cholesterolu v jaterních buňkách. Cílovou strukturou je pro statiny enzym HMG-CoA reductáza, který limituje rychlost syntézy cholesterolu *de novo*. Snížení intracelulárního cholesterolu indukuje expresi receptorů pro lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL). Receptory ve výsledku zvýší extrakci LDL cholesterolu (LDL-C) z krve a sníží koncentraci cirkulujícího LDL-C v krvi. Pozitivní účinek statinů netkví jen ve snížení koncentrace LDL-C, ale i ve zvýšení koncentrace lipoproteinů s vysokou hustotou cholesterolu (HDL-C) a snížení koncentrace triglyceridů [38, 41].

### 3.8.2 Farmakokinetika statinů

Lovastatin a simvastatin mají formu laktonu a jsou to proléčiva podléhající v těle enzymatické hydrolyze na aktivní formu hydroxy kyseliny. Ostatní statiny jsou v těle distribuovány také jako hydroxy kyseliny. Všechny statiny jsou velmi rychle absorbovány a maximální koncentrace dosahují už po 4 hodinách. Rozsah a rychlost absorpce u atorvastatinu je ovlivněna dobou podání během dne, zatímco farmakokinetické vlastnosti u rosuvastatinu ovlivněny nejsou. Nicméně obě dvě léčiva snižují plazmatické lipidy podobně, ať už jsou podávána ráno či večer. To je zdůvodněno jejich dlouhým eliminačním poločasem v porovnání s ostatními statiny, které mají eliminační poločas krátký, a to přibližně okolo 3 hodin. Proto je výhodné jejich podávání večer, kdy je rychlost syntézy endogenního cholesterolu nejvyšší, nebo úpravou lékové formy na lékovou formu s prodlouženým uvolňováním. Eliminační poločas atorvastatinu je přibližně 14 hodin, což je vlastnost předurčující toto léčivo

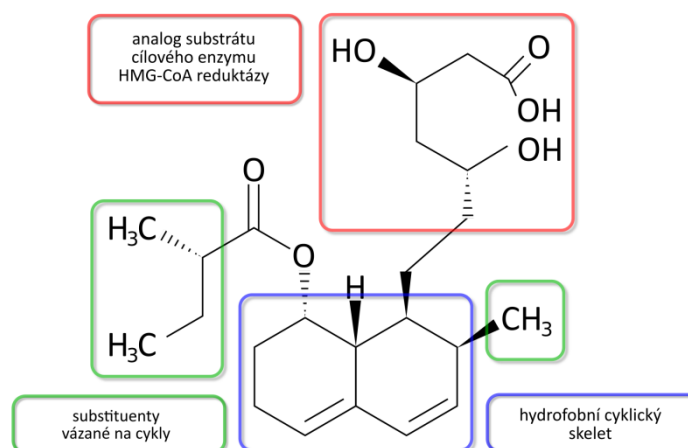
k větší účinnosti ve snížení LDL-C v porovnání se staršími statiny. Aktivní metabolity mateřské molekuly atorvastatinu totiž prodlužují účinek na HMG-CoA reduktázu a ve výsledku prodlužují eliminační poločas na 20–30 hodin [36, 41].

Dnes běžně dostupné statiny mají nízkou biodostupnost, což je významným ukazatelem toho, že z velké části podléhají first-pass efektu. Vzhledem k tomu, že játra jsou cílovým orgánem pro statiny, je možná pro statiny vysoký first-pass efekt výhodnější než vysoká biodostupnost léčiva. Všechny statiny se rozsáhle váží na plazmatické proteiny, výjimkou je pravastatin, ten se váže jen z 50 % [36, 41].

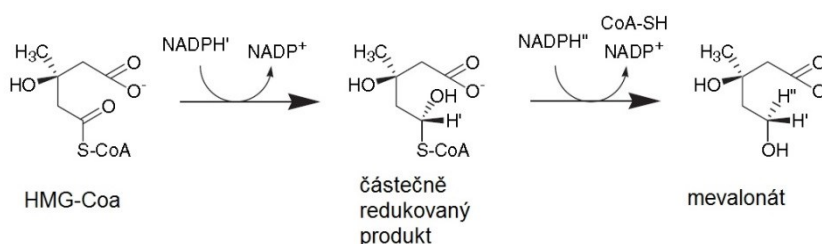
Důležité je rozdělení statinů na látky hydrofilní a lipofilní povahy. Lipofilní látky jsou v průběhu absorpce enterocyty a průchodu játry transformovány rodinou enzymů Cytchrom P 450 (CYP450), která je tvořena více než třiceti izoenzymy. Statiny s vysokou lipofilitou jsou u lidí metabolizovány izoenzymem CYP3A4, spadají sem látky lovastatin, simvastatin a atorvastatin. Jak již bylo zmíněno výše, atorvastatin je metabolizován na aktivní metabolity, dva hlavní jsou kyselina 2-hydroxy a 4-hydroxy atorvastatinová. Pro simvastatin to jsou  $\beta$ -hydroxy kyseliny, 6'-hydroxy či 6'-hydroxymethyl. Fluvastatin zase podléhá metabolizaci na CYP2C9 izoenzymu. Proto u lipofilních statinů dochází k většímu riziku lékových interakcí a častějšímu projevu nežádoucích účinků. Hydrofilní statiny, jako jsou rosuvastatin, pravastatin a pitavastatin, nejsou významnými substráty metabolických systémů a z těla jsou eliminovány z 95 % jako mateřská látka. Proto je jejich interakční potenciál menší [36, 41].

### 3.8.3 Chemická struktura statinů

Chemická struktura statinů se dá ve své podstatě rozdělit do tří částí (Obrázek 21). Červeně znázorněná část je analog substrátu pro cílovou část enzymu HMG-CoA reduktázy, modře zvýrazněná část je tvořena hydrofobním cyklem napojeným kovalentně na analog substrátu. Červená a modrá část molekuly je odpovědná za vazbu do aktivního místa enzymu. Zeleně znázorněné substituenty definují rozpustnost molekuly a tím pádem i její farmakokinetické vlastnosti.



**Obrázek 21:** Chemická struktura statinů znázorněná na molekule kompaktinu [39]

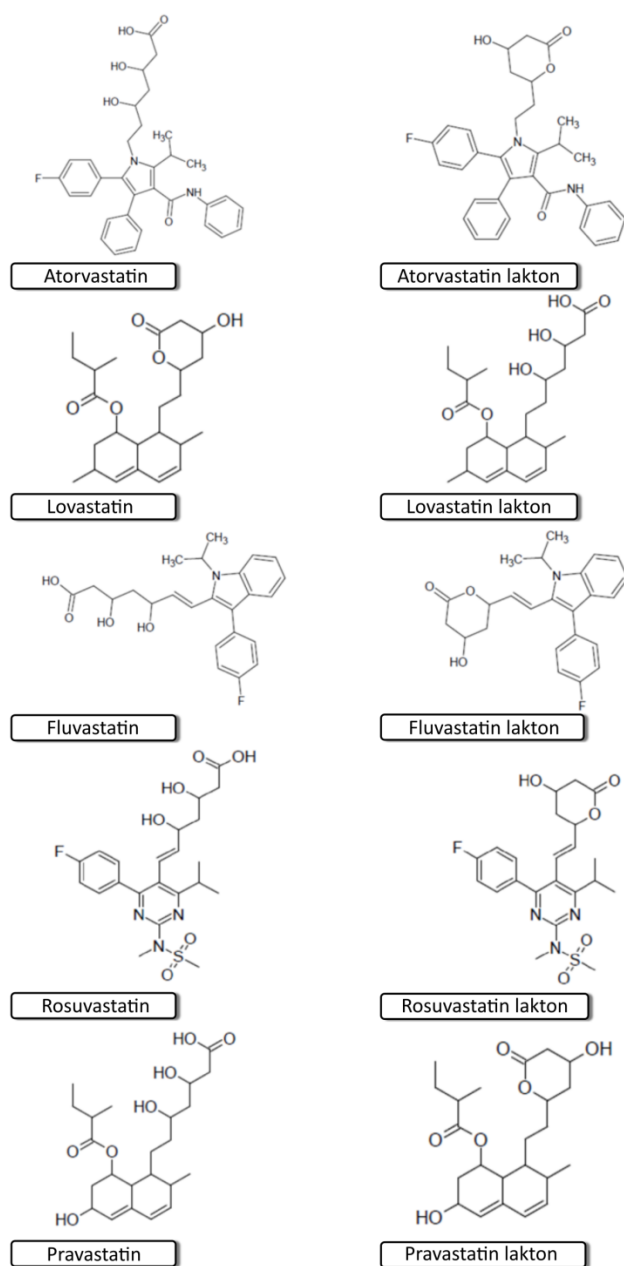


**Obrázek 22:** Reakce znázorňující redukcí HMG-CoA (upraveno podle [39])

Analog v červené části (Obrázek 21) je podobný HMG-CoA (Obrázek 22) a účastní se reakce limitující syntézu cholesterolu *de novo* a je u všech statinů relativně stejný. Tato část má u starších statinů jako lovastatin či simvastatin podobu laktonů. Novější generace statinů (pravastatin, fluvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, pitavastatin) má tento kruh otevřený.

Cyklický skelet v modré části (Obrázek 21) je tvořen částečně hydrogenovaným naftalenem u molekul pravastatinu, simvastatinu a lovastatinu a váže se do hydrofobní části enzymu. Ostatní molekuly prošly radikálnějšími změnami, například u fluvastatinu je částečně hydrogenované jádro nahrazeno indolovým skeletem. Atorvastatin má centrální skelet nahrazen bohatě substituovaným pyrrolovým jádrem.

Zelená část (Obrázek 21) má podobu 2-methylbutanoylového zbytku v případě molekuly lovastatinu a 2, 2-dimethylbutanoylového zbytku u simvastatinu. U dalších sloučenin došlo k náhradě těchto substituentů za 4-fluorofenyl [36, 41, 42, 46].



**Obrázek 23:** Chemické strukturální vzorce statinů (získáno ze zdroje [43])

### 3.8.4 Chemické vlastnosti statinů

Statiny tvoří skupinu léčiv v rozmezí molekulové hmotnosti 400–600. Hodnoty logP vypovídající o jejich hydrofilite jsou v rozmezí 1–5, což znamená, že zahrnují jak látky hydrofilní, tak látky lipofilní. Obecně se jedná o látky slabě kyselé (viz. pKa v Tabulce 5) s výjimkou laktonových forem [43].

Při analýze statinů je důležité udržet stálé pH prostředí, v němž se látky statinů nachází, obvykle v rozmezí pH 5–4, protože jsou to látky, které mohou podléhat interkonverzi a přecházet tak z kyselé formy na laktonovou formu a naopak. Zvýšením pH nad 6 přechází látky ze své laktonové formy na ionizovanou formu kyseliny a při snížení pH pod 4 dochází k přechodu kyselých forem statinů na laktonovou formu. Nejvhodnější pH pro testování látek statinů je pH 4,5 [44].

Název	Průměrná molekulová hmotnost	Log P	pKa
Atorvastatin	558,64	3,85 ± 0,73	4,29 ± 0,10
Atorvastatin lakton	540,62	3,90 ± 0,72	13,39 ± 0,40
Lovastatin	404,54	4,31 ± 0,48	13,49 ± 0,40
Lovastatin kyselina	422,55	4,12 ± 0,53	4,31 ± 0,10
Fluvastatin	411,47	4,57 ± 0,70	4,27 ± 0,10
Fluvastatin lakton	393,45	4,85 ± 0,66	13,32 ± 0,40
Rosuvastatin	481,54	0,89 ± 0,67	4,25 ± 0,10
Rosuvastatin Lakton	463,52	1,20 ± 0,65	13,22 ± 0,40
Pravastatin	424,53	2,21 ± 0,53	4,31 ± 0,10
Pravastatin lakton	406,51	2,40 ± 0,49	13,49 ± 0,40

**Tabulka 5:** Tabulka chemických vlastností statinů (upraveno podle [43])

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 4.1 Chemikálie

### 4.1.1 Standardní látky

- Atorvastatin, vápenatá sůl (ZENTIVA, ČR)
- Atorvastatin lakton (ZENTIVA, ČR)
- Lovastatin, sodná sůl,  $\geq 98$  % (Sigma Aldrich, ČR)
- Lovastatin hydroxy kyselina,  $\geq 96$  % (Toronto Research Chemistry, Kanada)
- Fluvastatin, sodná sůl (USP Rocville, USA)
- Fluvastatin lakton 98 % (Toronto Research Chemistry, Kanada)
- Rosuvastatin, vápenatá sůl 98 % (Toronto Research Chemistry, Kanada)
- Rosuvastatin lakton 95 % (Toronto Research Chemistry, Kanada)
- Pravastatin, sodná sůl  $\geq 98$  % (Sigma Aldrich, ČR)
- Pravastatin lakton 98 % (Toronto Research Chemistry, Kanada)

### 4.1.2 Rozpouštědla

- Ultra čistá voda, vyrobená na Farmaceutické fakultě v HK zařízením MILLI-Q, Millipore
- Acetonitril, LC-MS chromasolv®  $\geq 99$  % (Fluka Analytical, Česká republika)
- Kyselina octová, LC-MS  $\geq 99$  % (Fluka Analytical, Česká republika)
- Kyselina mravenčí, LC-MS  $\geq 99$  % (Fluka Analytical, Česká republika)
- Hydroxid amonný, LC-MS  $\geq 25$  % (Fluka Analytical, Česká republika)
- Sérum: LYO HUMAN, (Erba Lachema s.r.o., Česká republika)

## 4.2 Přístroje

- Acquity UPLC systém, Waters, Česká republika
  - Acquity – Sample Manager – FTN
  - Acquity – Binary Solvent Manager
- Analytická kolona – Acquity UPLC® BEH C 18 (1,7  $\mu$ m, 2,1 x 50 mm), WATERS, Česká republika
- Hmotnostní spektrometr – Synapt G2-Si HDMS, WATERS, Česká republika
- Analytické váhy – Sartorius 2004 MP, SARTORIUS, Německo
- Automatické pipety – BIOHIT, Fisher Scientific, Česká republika
- Ultrazvuková vodní lázeň – Sonorex Digitec, BANDELIN electronic, Německo

- pH metr – HANNA instruments pH 212, Fisher Science, Česká republika
- Sušení dusíkem – SUPLECO VISIPREP 24<sup>TM</sup>DL
- Centrifuga – Benchmark My Fuge<sup>TM</sup> Mini, Čína
- Magnetická míchačka – IKA MS 3 basic, USA

### ***4.3 Příprava roztoků***

#### **4.3.1 Příprava roztoku mobilní fáze**

##### **0,5 mM octan amonný o pH = 4**

Kyselina octová o objemu 71,3  $\mu$ l byla napipetována do kádinky, která obsahoval 200 ml ultračisté vody. Za stálého míchání pomocí magnetického míchadla byl přidáván zředěný roztok amoniaku, dokud nebylo dosaženo hodnoty pH roztoku 4. Obsah kádinky byl kvantitativně převeden do 250 ml odměrné baňky a doplněn po rysku. Tímto způsobem připravený roztok 5 mM octan amonný (AmAc) pH 4 byl 10 x zředěn ultračistou vodou. Výsledný roztok použitý jako součást mobilní fáze byl tedy 0,5 mM AmAc pH 4. Roztok byl připravován každý den čerstvý.

##### **Mobilní fáze pro přípravu pracovních roztoků**

Směs 0,5 mM AmAc pH 4 a acetonitrilu (ACN) v poměru 70 : 30 použitá pro přípravu některých zásobních roztoků a pracovních roztoků odpovídala počátečnímu složení mobilní fáze. Byla připravena smísením 70 ml 0,5 mM AmAc pH 4 a 30 ml ACN.

### ***4.4 Příprava standardních roztoků***

#### **4.4.1 Příprava zásobních roztoků standardů**

Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny navážením 0,5 mg dané látky a následným rozpuštěním ve vhodném rozpouštědle (Tabulka 6). Pro atorvastatin a všechny statiny ve formě laktonu byl ACN použit jako rozpouštědlo. Statiny ve formě kyseliny byly rozpuštěny v mobilní fázi, tedy 0,5 mM AmAc pH 4: ACN, 70:30. Výsledná koncentrace zásobních roztoků standardů byla 1 mg/ml.



Název sloučeniny	Zkratka	Rozpouštědlo
Atorvastatin	AT	ACN
Atorvastatin lakton	ATL	ACN
Lovastatin	LV	ACN
Lovastatin kyselina	LVA	0,5 mM AmAc pH = 4 : ACN, 70 : 30
Fluvastatin	FV	0,5 mM AmAc pH = 4 : ACN, 70 : 30
Fluvastatin lakton	FVL	ACN
Rosuvastatin	RV	0,5 mM AmAc pH = 4 : ACN, 70 : 30
Rosuvastatin Lakton	RVL	ACN
Pravastatin	PV	0,5 mM AmAc pH = 4 : ACN, 70 : 30
Pravastatin lakton	PVL	ACN

*Tabulka 6: Přehled testovaných látek a vhodných rozpouštědel pro přípravu zásobních roztoků.*

#### 4.4.2 Příprava pracovních roztoků standardů

Směsné roztoky standardů byly připraveny smísením zásobních roztoků standardů. Z každého zásobního roztoku bylo napipetováno 100  $\mu$ l, čímž došlo k vytvoření objemu 1 ml a vzniku koncentrace 0,1 mg/ml. Další pracovní roztoky 10  $\mu$ g/ml – 0,01 ng/ml byly získány postupným ředěním mobilní fáze. Pracovní roztok o koncentraci 10  $\mu$ g/ml pro přípravu obohaceného séra byl naředěn roztokem 0,5 mM AmAc pH 4.

#### 4.4.3 Příprava obohaceného séra

Lyofilizát lidského séra byl rozpuštěn v 5 ml ultračisté vody a homogenizován. Pro přípravu obohaceného séra o koncentraci 1  $\mu$ g/ml bylo použito 450  $\mu$ l roztoku lyofilizovaného séra a 50  $\mu$ l směsného roztoku standardu o koncentraci 10  $\mu$ g/ml. Postupným ředěním byly následně získány jednotlivé roztoky obohaceného séra pro matricovou kalibrační křivku.

## **4.5 Postup metody přípravy vzorků**

Pro úpravu obohaceného séra byla zvolena proteinová precipitace jako technika úpravy vzorků. Proteinová precipitace byla provedena pomocí ACN. K 500 µl vzorku byl přidán 1 ml ACN. Tato směs byla důkladně promíchána na vortexu a následně inkubována 10 minut v klidu. Po inkubaci byla směs 10 minut centrifugována a poté byl odebrán supernatant. Supernatant byl odpařen do sucha a potom rekonstituován v 500 µl mobilní fáze.

## **4.6 UHPLC-MS/MS podmínky**

Chromatografické podmínky byly převzaty z dříve publikované metody pro stanovení statinů a jejich metabolitů pomocí UHPLC/MS [45], nicméně podmínky pro hmotnostní spektrometrii byly znovu optimalizovány z důvodu užití jiné MS instrumentace.

### **4.6.1 Chromatografické podmínky**

Pro separaci statinů byla použita chromatografická kolona Acquity UPLC® BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 50 mm). Separace byla provedena s využitím gradientové eluce a jako mobilní fáze byla použita směs 0,5 mM AmAc pH 4 a ACN v počátečním poměru 70:30. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Další informace o chromatografických podmínkách jsou k nalezení v publikaci [45].

### **4.6.2 Podmínky hmotnostní spektrometrie**

Synapt G2-Si HDMS byl zvolen jako hmotnostní spektrometr využívající ionizaci elektrosprejem (ESI) a hybridní analyzátor Q-TOF. Byla využita ionizace v pozitivním i negativním módu. Nastavení iontového zdroje bylo následovné: napětí na kapiláře bylo pro pozitivní mód 0,75 kV a pro negativní mód 1,25 kV, napětí na vstupním kuželu v pozitivním módu bylo 10 V a v negativním módu 20 V, napětí na StepWave bylo pro pozitivní i negativní mód 50 V, tlak nebulizačního plynu byl pro pozitivní i negativní mód 4,5 Bar, průtok plynu na vstupním kuželu byl v pozitivním módu 50 l/hod a pro negativní mód 70 l/hod, průtok desolvačního plynu byl v pozitivním i negativním módu 800 l/hod, desolvační teplota 650 °C a teplota ve zdroji 140 °C byla pro pozitivní i negativní mód stejná.

Pro analýzu byly užity MS skeny a rekonstruované iontové proudy přesných hmot jednotlivých analytů (Tabulka 7).

Název	Pozitivní mód ESI	Negativní mód ESI
	Ionty a adukty	Ionty
Atorvastatin	$[M+H]^+ = 559,2608$	$[M-H]^- = 557,2452$
Atorvastatin lakton	$[M+H]^+ = 541,2503$	X
Lovastatin	$[M+Na]^+ = 427,2460$	X
Lovastatin kyselina	X	$[M-H]^- = 421,2590$
Fluvastatin	$[M+H]^+ = 412,1924$	$[M-H]^- = 410,1768$
Fluvastatin lakton	$[M+H]^+ = 394,1818$	X
Rosuvastatin	$[M+H]^+ = 482,1761$	$[M-H]^- = 480,1605$
Rosuvastatin Lakton	$[M+H]^+ = 464,1655$	X
Pravastatin	X	$[M-H]^- = 423,2383$
Pravastatin lakton	$[M+Na]^+ = 447,2359$	X

*Tabulka 7: Přehled sledovaných prekurzorových iontů*

#### **4.7 Hodnocení linearity a citlivosti metody**

Linearita byla hodnocena pomocí dvou typů kalibračních křivek: standardní a matricové kalibrační křivky. Hodnocení bylo provedeno na základě korelačního koeficientu v rozsahu 100–0,01 ng/ml. Citlivost byla stanovena na základě limitu kvantifikace (LOQ), který byl stanoven na základě poměru signálu k šumu, jehož minimální hodnota odpovídala 10.

Oba parametry (linearita a citlivost) byly hodnoceny pro 4 módy analyzátoru: senzitivní mód (sensitive – SENS), rozlišovací mód (resolution – RES), mód s vysokým rozlišením (high resolution – HRES), mód s rozšířeným rozlišením (Enhanced resolution – ENHR) a v pozitivním i negativním módu.

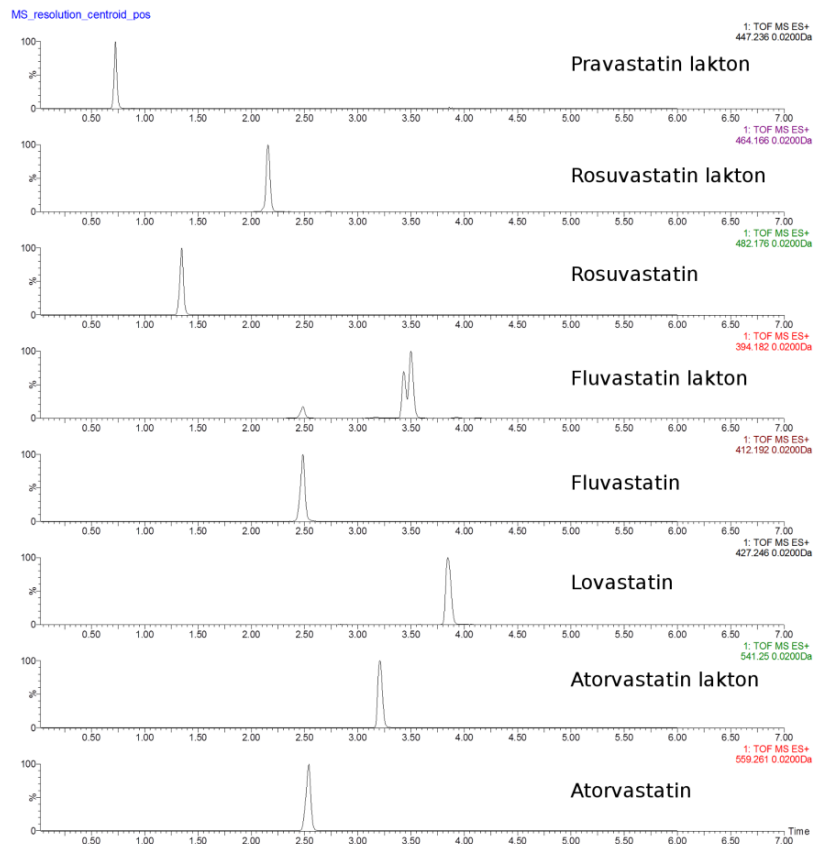
## 5. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 5.1 Výběr sledovaných prekurzorových iontů

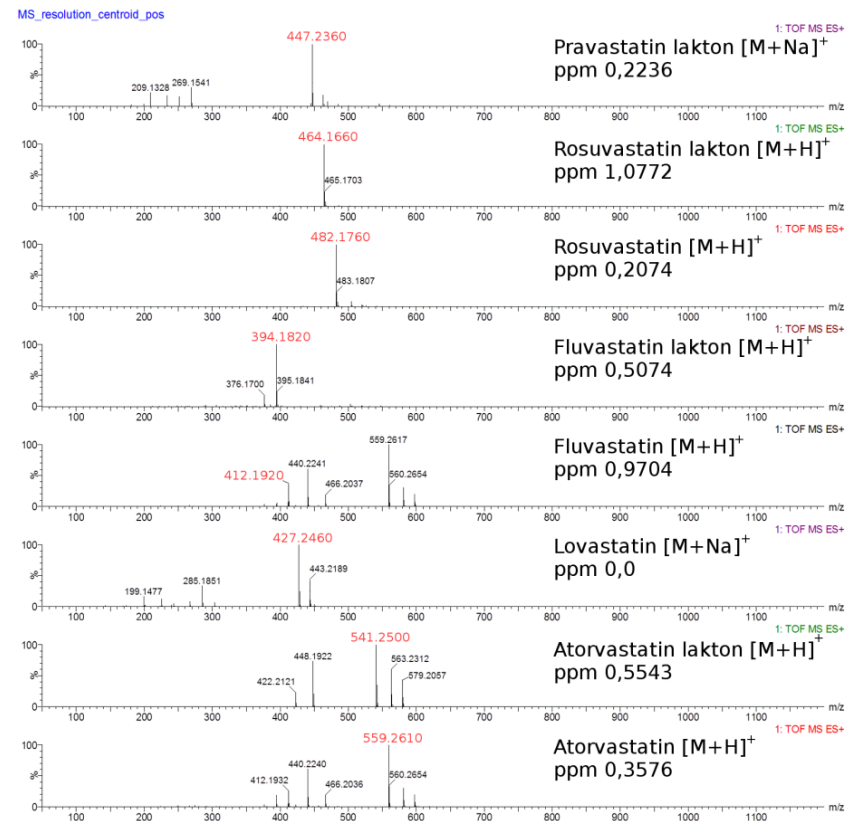
Na základě ionizačních schopností jednotlivých analytů byl vybrán prekurzorový ion v negativním módu a v pozitivním módu. V pozitivním módu byly testovány následující analyty: atorvastatin, atorvastatin lakton, fluvastatin, fluvastatin lakton, rosuvastatin, rosuvastatin lakton, lovastatin a pravastatin lakton. Pro většinu analytů byla sledována protonovaná molekula  $[M+H]^+$ , nicméně lovastatin a pravastatin lakton protonovanou molekulu neposkytovaly, a proto musel být vybrán velmi intenzivní sodíkový adukt  $[M+Na]^+$ . Adukty se sodíkem byly pozorovány také u atorvastatinu a lovastatinu kyseliny. V negativním módu byly jako deprotonované molekuly analyzovány následující látky: atorvastatin, lovastatin kyselina, fluvastatin, rosuvastatin, pravastatin. V tomto módu nebyly zaznamenány žádné adukty. Jednotlivé sledované ionty pro testované analyty a jejich molekulová hmotnost jsou znázorněny v Tabulce 8. Jednotlivé rekonstruované iontové proudy a spektra jsou znázorněny na Obrázku 24–27.

Název	Pozitivní mód ESI	Negativní mód ESI
	Ionty a adukty	Ionty
Atorvastatin	$[M+H]^+ = 559,2608$	$[M-H]^- = 557,2452$
Atorvastatin lakton	$[M+H]^+ = 541,2503$	X
Lovastatin	$[M+Na]^+ = 427,2460$	X
Lovastatin kyselina	X	$[M-H]^- = 421,2590$
Fluvastatin	$[M+H]^+ = 412,1924$	$[M-H]^- = 410,1768$
Fluvastatin lakton	$[M+H]^+ = 394,1818$	X
Rosuvastatin	$[M+H]^+ = 482,1761$	$[M-H]^- = 480,1605$
Rosuvastatin Lakton	$[M+H]^+ = 464,1655$	X
Pravastatin	X	$[M-H]^- = 423,2383$
Pravastatin lakton	$[M+Na]^+ = 447,2359$	X

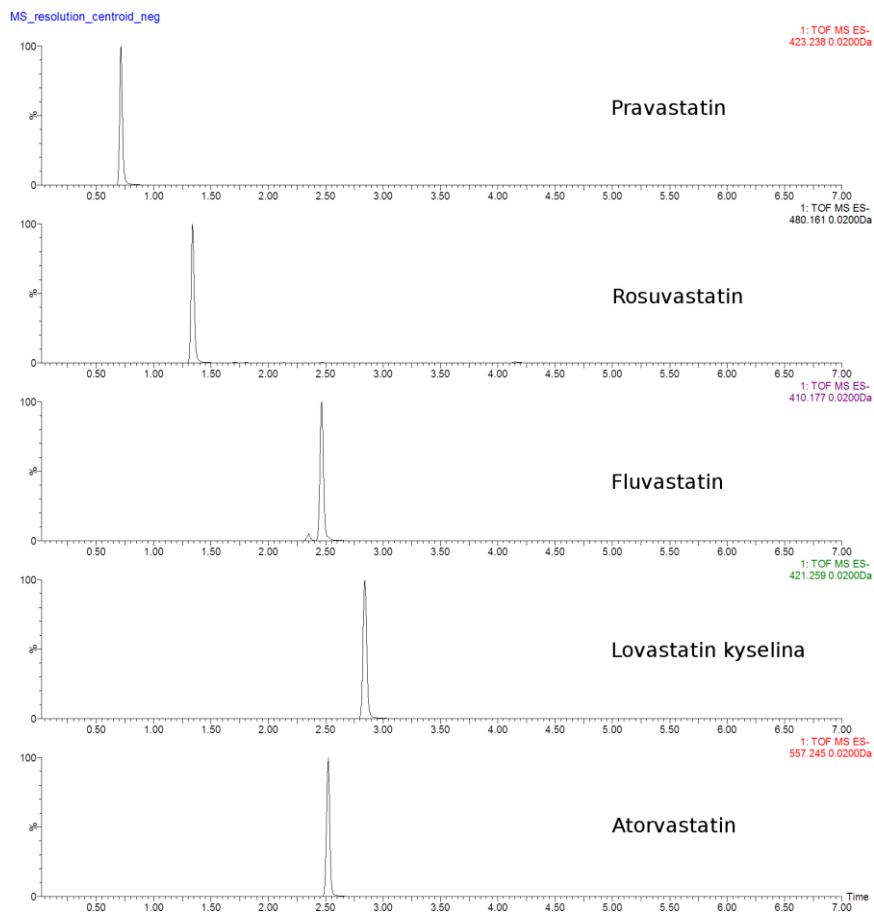
**Tabulka 8:** Přehled vybraných prekurzorových iontů a jejich molekulové hmotnosti.



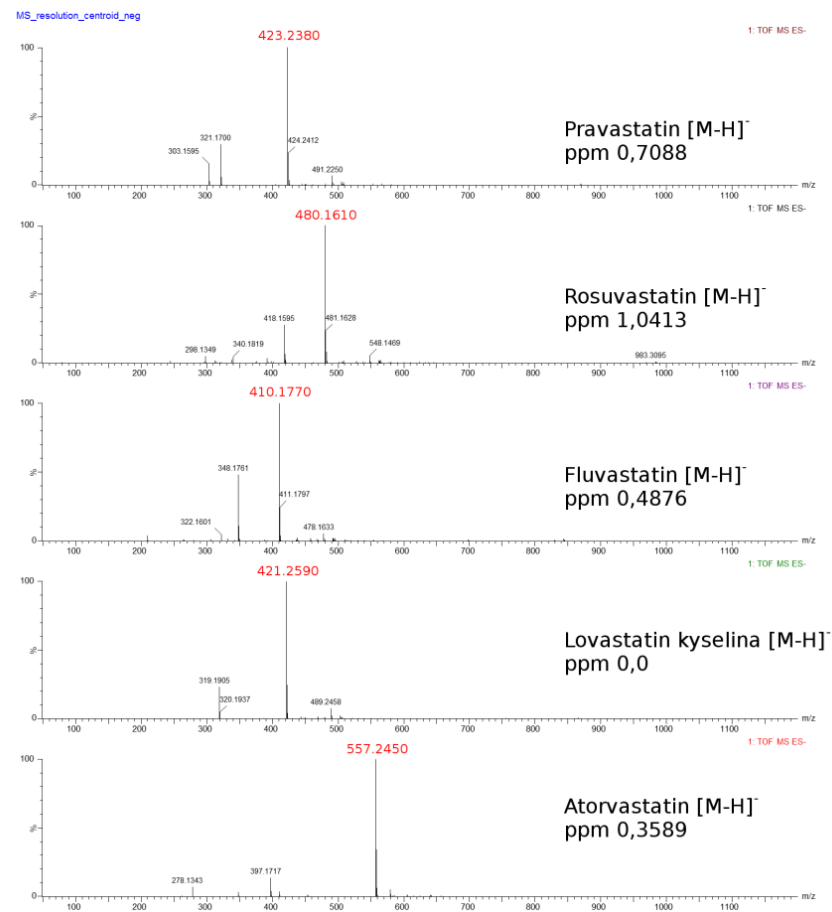
**Obrázek 24:** Záznam rekonstituovaného iontového proudu pro pozitivní mód



**Obrázek 25:** Záznam hmotnostního spektra v pozitivním módu



**Obrázek 26:** Záznam rekonstituovaného iontového proudu pro negativní mód



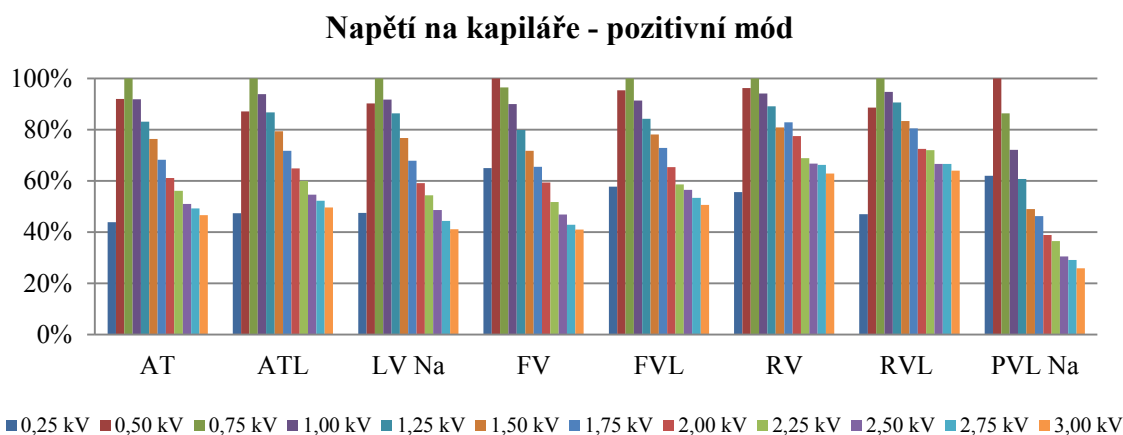
**Obrázek 27:** Záznam hmotnostního spektra v negativním módu

## 5.2 Optimalizace podmínek MS detekce

Ionizační technikou byla zvolena ionizace elektrosprejem, a to pro pozitivní i negativní mód. Jako hmotnostní analyzátor byl použit hybridní analyzátor Q-TOF. Optimalizace jednotlivých parametrů iontového zdroje byla provedena pomocí MS skenu na koncentrační hladině 0,1 µg/ml pracovního roztoku statinů. Byly optimalizovány následující parametry: napětí na kapiláře (CAP), průtok plynu na vstupním kuželu (ConeG), průtok desolvačního plynu (DesolvG), tlak nebulizačního plynu (Nebb), napětí na StepWave (Offset) a napětí na vstupním kuželu (SC). Optimální hodnota pro každý parametr byla vybrána na základě nejvyšší intenzity a tato hodnota byla také v grafech zvolena za 100 %.

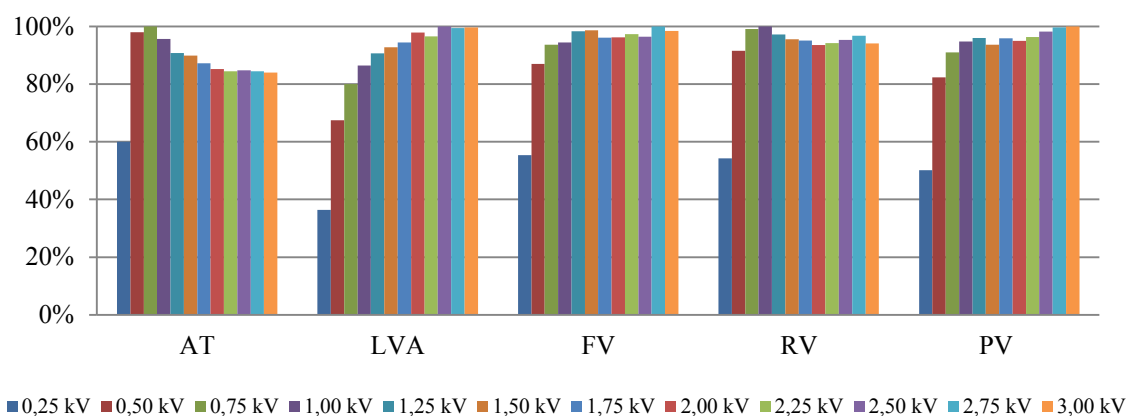
### 5.2.1 Napětí na kapiláře (CAP)

Parametr napětí na kapiláře byl testován v rozsahu hodnot 0,25–3,00 kV v pozitivním i negativním módu. Pro pozitivní mód byla vybrána hodnota 0,75 kV, při níž dosahovaly ionty nejvyšší odezvy. V pozitivním módu měl tento parametr velmi vysoký vliv na odezvu (Obrázek 28). V negativním módu měl tento parametr menší vliv. Výraznější rozdíl byl pozorován zejména pro hodnotu napětí 0,25 kV. Jako optimální hodnota byla zvolena 1,25 kV (Obrázek 29).



**Obrázek 28:** Optimalizace parametru napětí na kapiláře v pozitivním módu

### Napětí na kapiláře - negativní mód

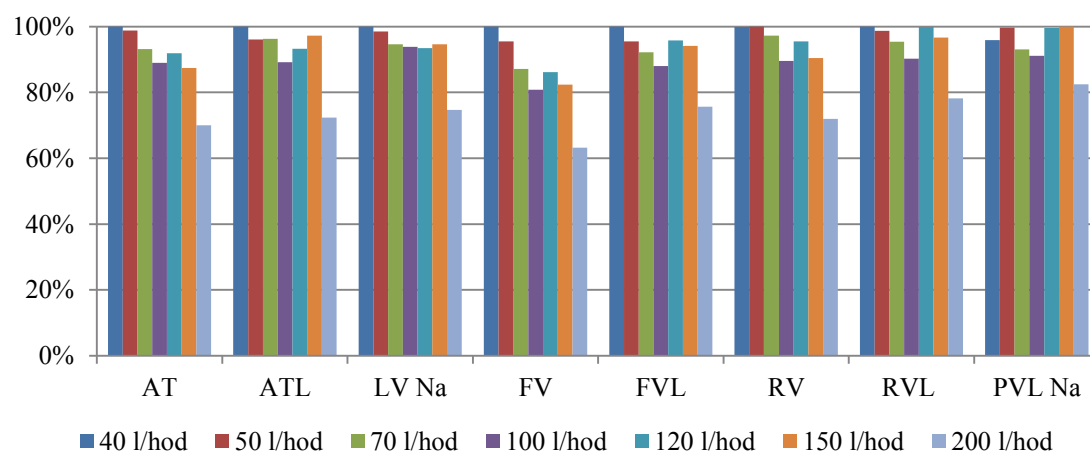


**Obrázek 29:** Optimalizace parametru napětí na kapiláře v negativním módu

### 5.2.2 Průtok plynu na vstupním kuželu (ConeG)

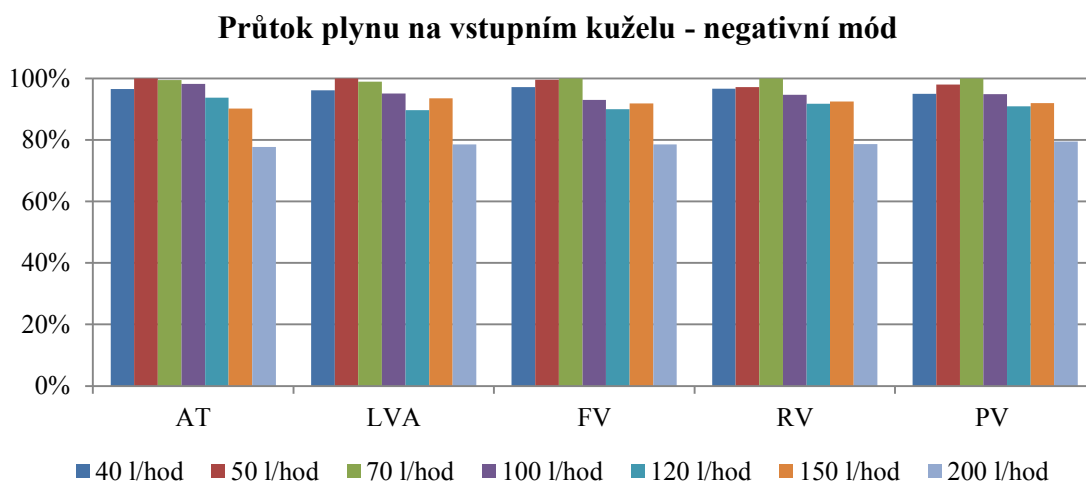
Parametr průtok plynu na vstupním kuželu byl hodnocen v rozsahu 40–200 l/h v pozitivním i negativním módu. Při průtoku plynu na vstupním kuželu v pozitivním módu dosahovala odezva nejhorších výsledků při hodnotě 200 l/h. Při nižších průtocích plynu byla pozorována vyšší odezva (Obrázek 30). Z tohoto důvodu byla vybrána hodnota 50 l/h. Pro negativní mód byla vybrána hodnota průtoku plynu 70 l/h, protože poskytovala obdobný trend jako v pozitivním módu (Obrázek 31). K mírnému poklesu odezvy dochází však i při menším průtoku plynu.

### Průtok plynu na vstupním kuželu - pozitivní mód



**Obrázek 30:** Optimalizace parametru průtok plynu na vstupním kuželu v pozitivním módu

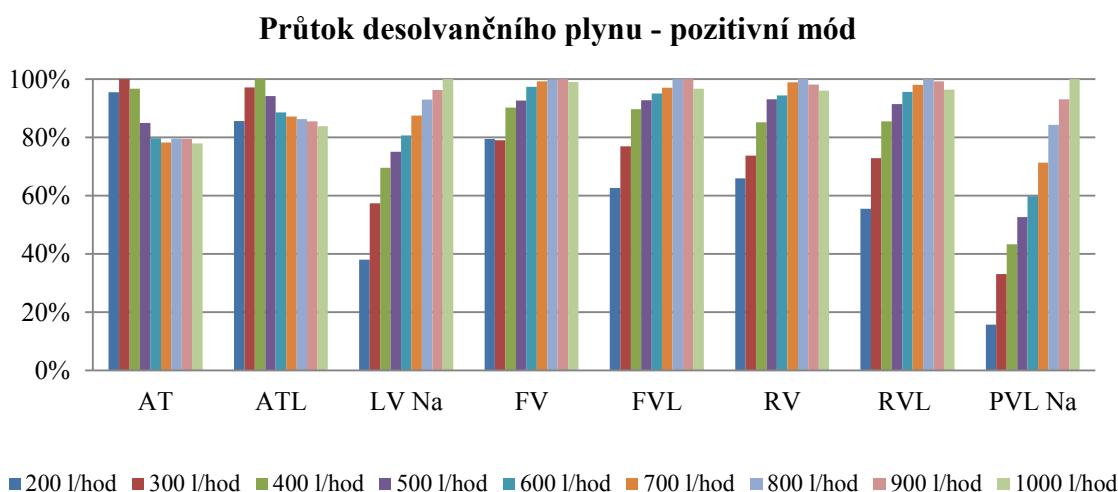




**Obrázek 31:** Optimalizace parametru průtok plynu na vstupním kuželu v negativním módu

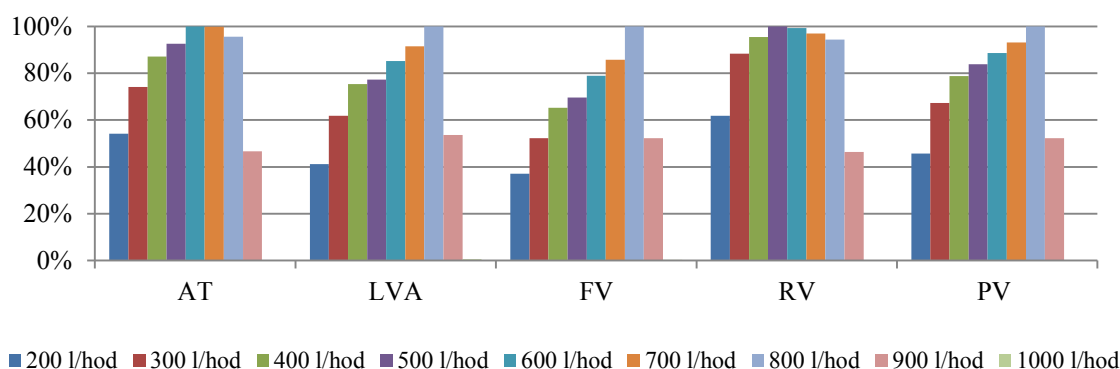
### 5.2.3 Průtok desolvačního plynu (DesolvG)

Tento parametr byl hodnocen v rozsahu hodnot 200–1000 l/h v pozitivním i negativním módu. Průtok desolvačního plynu měl na odezvu analytů velký vliv, zejména v negativním módu (Obrázek 33). Při hodnotách 900 a 1000 l/hod klesla odezva pod 50 % nejvyšší odezvy. V pozitivním módu byl sledován nižší vliv. Výraznější pokles odezvy byl u některých analytů sledován zejména při nižších průtocích plynů (Obrázek 32). Pro pozitivní i negativní mód byla vybrána stejná hodnota, a to 800 l/h.



**Obrázek 32:** Optimalizace parametru průtok desolvačního plynu v pozitivním módu

### Průtok desolvačního plynu - negativní mód

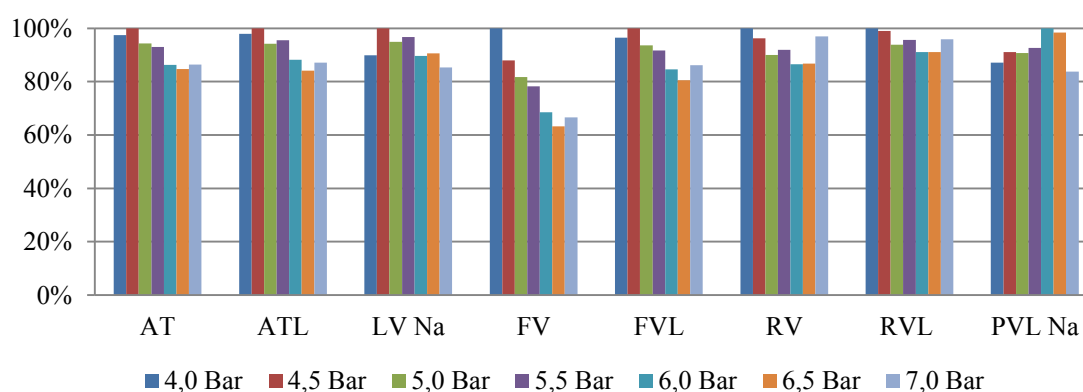


**Obrázek 33:** Optimalizace parametru průtok desolvačního plynu v negativním módu

### 5.2.4 Tlak nebulizačního plynu (Nebb)

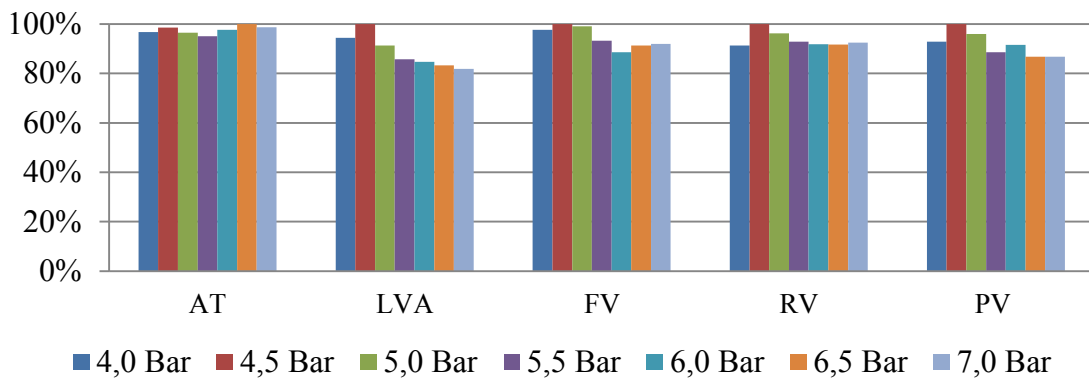
Pro tento parametr byl testován rozsah hodnot 4–7 Bar v pozitivním i negativním módu. Vliv tohoto parametru byl pro všechny analyty u obou módů nízký (Obrázek 34, 35). Výjimkou byl pouze fluvastatin, jehož intenzita v pozitivním módu klesala se zvyšujícím se tlakem. Z tohoto důvodu byla zvolena hodnota 4,5 Bar pro pozitivní i negativní mód.

### Tlak nebulizačního plynu - pozitivní mód



**Obrázek 34:** Optimalizace parametru tlak nebulizačního plynu v pozitivním módu

### Tlak nebulizačního plynu - negativní mód

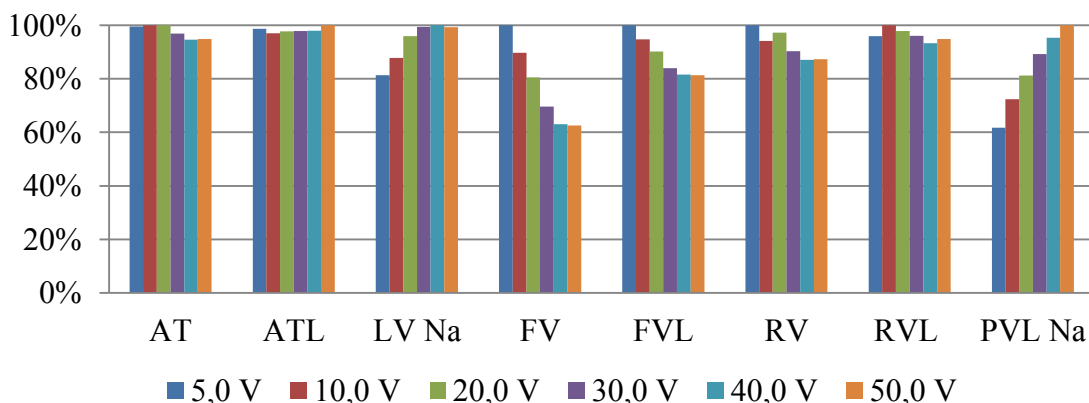


**Obrázek 35:** Optimalizace parametru tlak nebulizačního plynu v negativním módu

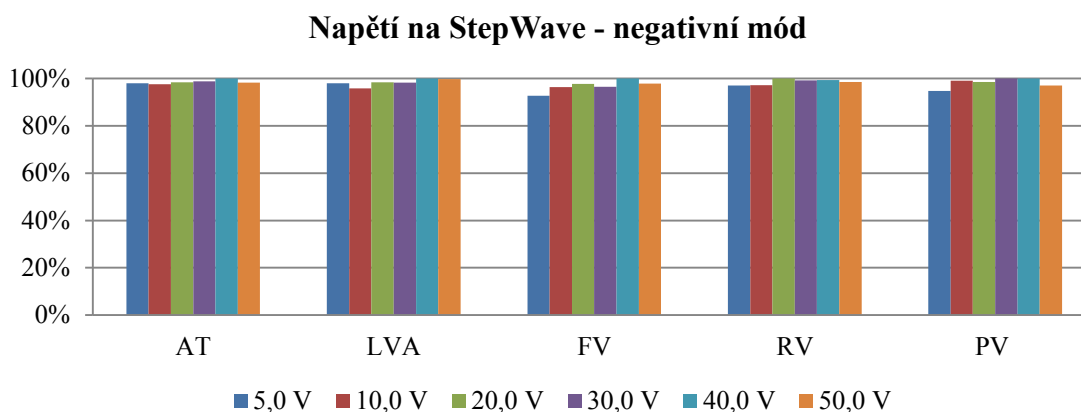
### 5.2.5 Napětí na StepWave (Offset)

Pro tento parametr se hodnoty optimalizovaly v rozsahu 5–50 V v pozitivním a negativním módu. V pozitivním módu měl tento parametr nejvyšší vliv na fluvastatin a sodíkový adukt pravastatinu (Obrázek 36). Pro pravastatin byla optimální hodnota 50 V a pro fluvastatin 5 V. Protože fluvastatin byl analyzován i v negativním módu, byla zvolena hodnota 50 V pro pozitivní mód. V negativním módu byl vliv tohoto parametru zanedbatelný (Obrázek 37). Zvolena byla tedy hodnota 50 V pro pozitivní i negativní mód.

### Napětí na StepWave - pozitivní mód



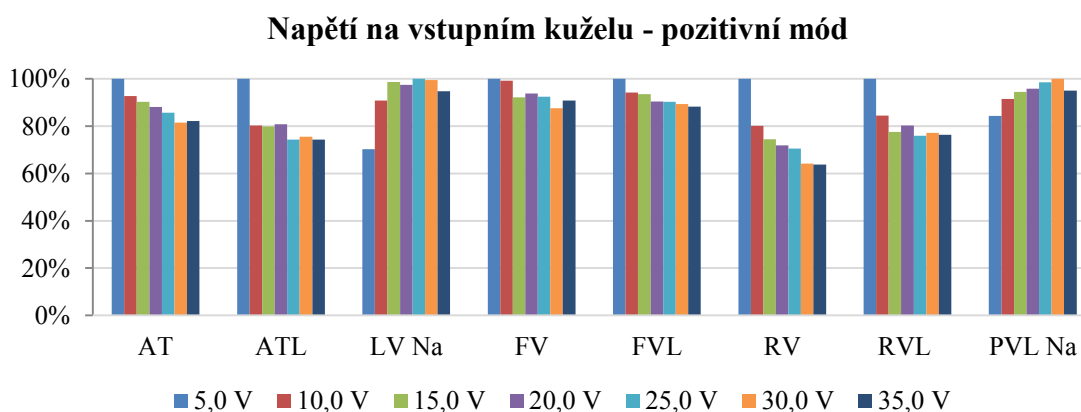
**Obrázek 36:** Optimalizace parametru napětí na StepWave v pozitivním módu



**Obrázek 37:** Optimalizace parametru napětí na StepWave v negativním módu

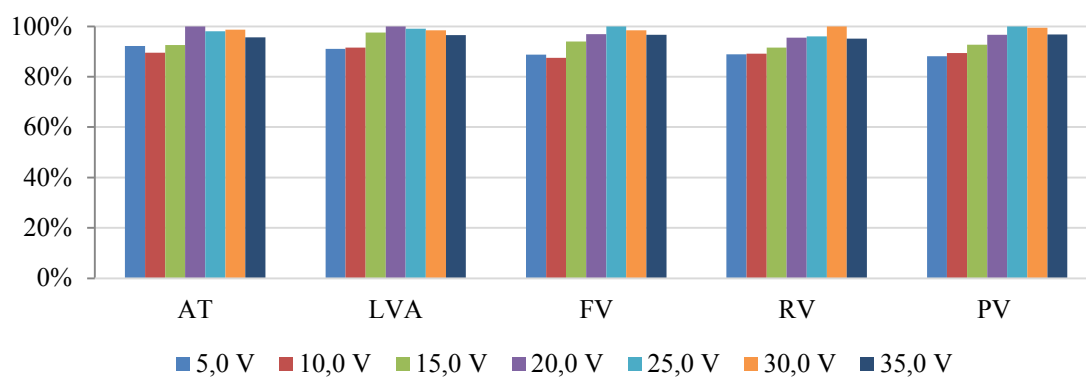
### 5.2.6 Napětí na vstupním kuželu (SC)

Napětí na vstupním kuželu bylo testováno v rozsahu 5–35 V v pozitivním i v negativním módu. Pro pozitivní mód byla zvolena hodnota 5 V, zejména kvůli výrazně vyšší odezvě pro atorvastatin lakton, rosuvastatin a arosuvastatin lakton (Obrázek 38). V negativním módu nemělo napětí na vstupním kuželu na odezvu velký vliv a byla vybrána hodnota 20 V (Obrázek 39).



**Obrázek 38:** Optimalizace parametru napětí na vstupním kuželu v pozitivním módu

### Napětí navstupním kuželu - negativní mód



**Obrázek 39:** Optimalizace parametru napětí na vstupním kuželu v negativním módu

### 5.3 Porovnání čtyř módů analyzátoru

Čtyři módy analyzátoru: senzitivní mód (SENS), rozlišovací mód (RES), mód s vysokým rozlišením (HRES), mód s rozšířeným rozlišením (ENHR) byly porovnány v pozitivním a negativním módu na základě dvou typů kalibračních křivek. Kalibrační křivky standardů a obohaceného séra byly měřeny v koncentračním rozsahu 100–0,01 ng/ml s využitím 10, 5 a 2 řady. Každá koncentrační hladina byla měřena dvakrát. Byly hodnoceny následující parametry: plocha píku na horní mezi stanovitelnosti (ULOQ), plocha píku na limitu kvantifikace (LOQ), linearita, limit kvantifikace.

#### 5.3.1 Plocha píku na horní mezi stanovitelnosti

Z ploch píků (AUC) získaných z hodnot nejvyšší koncentrace v pozitivním i negativním módu u standardů a obohaceného séra vyplývá, že plocha píku klesala se zvyšujícím se rozlišením jednotlivých módů. Protože zároveň dochází ke snížení odezvy šumu, nemusí to nutně znamenat tak výrazné ovlivnění citlivosti u všech módů analyzátorů (Tabulka 9, 10).

Zkratka	AUC standardů - pozitivní mód				AUC obohaceného séra - pozitivní mód			
	SENS	RES	HRES	ENHR	SENS	RES	HRES	ENHR
AT	39729	21680	1313	206	81225	42988	2168	999
ATL	95568	44778	2773	443	184708	83447	7346	2872
LV Na	119360	53838	3703	652	119688	29868	5753	1689
FV	9158	4037	302	55	13781	9084	208	199
FVL	32618	14748	1041	185	38387	19918	2183	871
RV	13994	6842	456	72	48678	35208	1299	607
RVL	44058	20003	1310	220	103232	71733	4063	1724
PVL Na	61447	24156	1721	296	278360	204515	9808	4345

**Tabulka 9:** AUC píku na horní mezi stanovitelnosti v pozitivním módu

Zkratka	AUC standardů - negativní mód				AUC obohaceného séra – negativní mód			
	SENS	RES	HRES	ENHR	SENS	RES	HRES	ENHR
AT	160608	54987	7141	3840	172526	98681	8646	5546
LVA	73305	24912	3397	1855	427256	257528	25591	16541
FV	118462	41391	5625	3096	112562	59678	5188	3362
RV	78138	26066	4250	2459	62321	37631	8572	5580
PV	53908	18246	2818	1603	3252	1647	134	96

*Tabulka 10: AUC píku na horní mezi stanovitelnosti v negativním módu*

### 5.3.2 Plocha píku na limitu kvantifikace

Plocha píků na limitu kvantifikace v pozitivním i negativním módu pro standardní i matricovou kalibrační křivku vykazovala stejný trend jako AUC na horním limitu stanovitelnosti (Tabulka 11, 12).

Zkratka	AUC standardů - pozitivní mód				AUC obohaceného séra - pozitivní mód			
	SENS	RES	HRES	ENHR	SENS	RES	HRES	ENHR
AT	2539	757	97	17	584	230	84	52
ATL	1404	493	39	13	647	1078	445	177
LV Na	1424	577	37	16	381	274	305	16
FV	668	111	16	12	212	489	34	18
FVL	475	109	22	7	188	191	111	47
RV	186	71	8	9	189	156	92	28
RVL	120	48	13	9	206	348	176	15
PVL Na	1486	142	21	17	373	436	47	31

*Tabulka 11: AUC na limitu kvantifikace v pozitivním módu*

Zkratka	AUC na LOQ standardů - negativní mód				AUC obohaceného séra – negativní mód			
	SENS	RES	HRES	ENHR	SENS	RES	HRES	ENHR
AT	109	33	12	14	402	201	154	112
LVA	146	38	20	13	1072	425	88	56
FV	210	55	27	13	125	82	56	61
RV	53	21	16	9	107	87	40	21
PV	241	28	13	14	87	45	21	22

*Tabulka 12: AUC na limitu kvantifikace v negativním módu*

### 5.3.3 Linearita kalibračních křivek

Hodnoty korelačních koeficientů byly různorodé v rozmezí 0,9900–0,9989. Pouze u velmi málo analytů jsme získali hodnoty nad 0,9990. Na základě výsledků nebyl prokázán vliv módu analyzátoru na hodnotu korelačního koeficientu.

Korelační koeficienty standardních kalibračních křivek v pozitivním módu celkově dosahovaly průměrné hodnoty 0,9978 bez započítání pravastatinu v SENS módu a fluvastatinu v módu HRES, které poskytovaly výrazně horší výsledky (Tabulka 13). Horší hodnoty pro pravastatin a fluvastatin mohly být způsobeny chybným měřením a z časového důvodu nebylo možné měření zopakovat.

Pro korelační koeficient pro matricovou kalibrační křivku v pozitivním módu byla průměrná hodnota 0,9959 (Tabulka 13).

Zkratka	Korelační koeficienty standardů - pozitivní mód				Korelační koeficienty obohaceného séra - pozitivní mód			
	SENS	RES	HRES	ENHR	SENS	RES	HRES	ENHR
AT	0,9982	0,9966	0,9938	0,9953	0,9968	0,9977	0,9906	0,9939
ATL	0,9992	0,9994	0,9973	0,9989	0,9945	0,9930	0,9956	0,9990
LV Na	0,9996	0,9990	0,9981	0,9991	0,9957	0,9979	0,9977	0,9995
FV	0,9987	0,9986	0,9970	0,9739	0,9905	0,9986	0,9988	0,9953
FVL	0,9983	0,9988	0,9982	0,9984	0,9910	0,9986	0,9992	0,9976
RV	0,9977	0,9989	0,9987	0,9907	0,9925	0,9961	0,9931	0,9940
RVL	0,9980	0,9964	0,9984	0,9945	0,9920	0,9966	0,9962	0,9976
PVL Na	0,9176	0,9988	0,9975	0,9980	0,9961	0,9978	0,9975	0,9981

*Tabulka 13: Korelační koeficienty kalibračních křivek v pozitivním módu*



V negativním módu standardů byla průměrná hodnota korelačního koeficientu 0,9984 a u všech jsme dosáhli hodnoty nad 0,9970 (Tabulka 14).

V negativním módu obohaceného séra byla průměrná hodnota korelačního koeficientu 0,9949 (Tabulka 14).

Zkratka	Korelační koeficienty standardů - negativní mód				Korelační koeficienty obohaceného séra – negativní mód			
	SENS	RES	HRES	ENHR	SENS	RES	HRES	ENHR
AT	0,9989	0,9971	0,9984	0,9981	0,9980	0,9964	0,9981	0,9902
LVA	0,9986	0,9983	0,9986	0,9985	0,9827	0,9827	0,9987	0,9988
FV	0,9983	0,9970	0,9979	0,9984	0,9927	0,9975	0,9982	0,9963
RV	0,9988	0,9981	0,9985	0,9997	0,9935	0,9982	0,9955	0,9959
PV	0,9993	0,9972	0,9989	0,9993	0,9975	0,9991	0,9922	0,9949

*Tabulka 14: Korelační koeficienty kalibračních křivek v negativním módu*

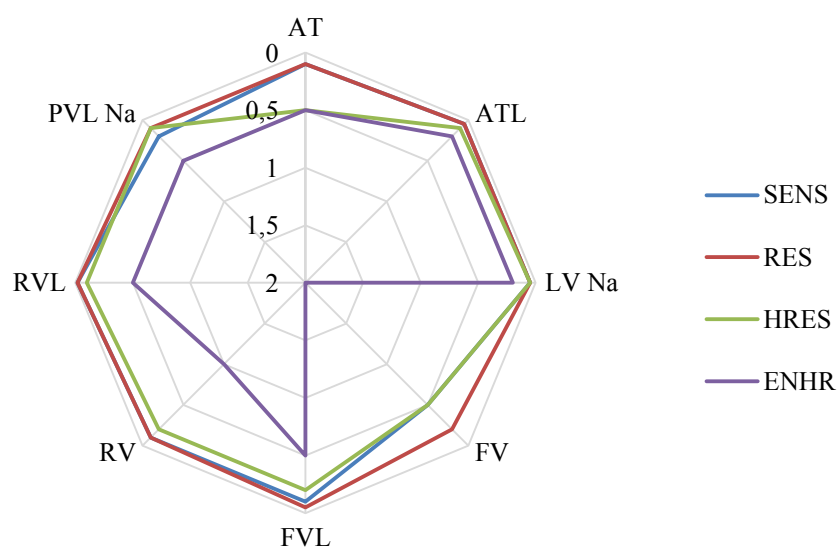
### 5.3.4 Limit kvantifikace

Na základě výsledků bylo potvrzeno, že použitý mód analyzátoru výrazně ovlivňuje citlivost, tedy LOQ jednotlivých analytů, a to jak pro standardní kalibrační křivku, tak pro maticovou kalibrační křivku.

V pozitivním módu pro standardní kalibrační křivku byl nejnižší limit kvantifikace pozorován pro SENS a RES mód, naopak podstatně vyšší limit kvantifikace byl stanoven pro ENHR. Nicméně rozdíly mezi SENS, RES a HRES módy nebyly tak výrazné, naopak mód ENHR poskytoval podstatně nižší citlivost. LOQ byly pro jednotlivé analyty dost rozdílné, a to v rozmezí 1–0,02 ng/ml. Konkrétně v pozitivním módu byla nejnižší LOQ stanovena pro atorvastatin lakton a sodíkový adukt lovastatinu a nejvyšší LOQ pro sodíkový adukt pravastatin laktonu. Hodnoty LOQ pro všechny analyty a módy analyzátoru jsou znázorněny v Tabulce 15 a na Obrázku 40.

LOQ [ng/ml]				
	SENS	RES	HRES	ENHR
AT	0,10	0,10	0,50	0,50
ATL	0,05	0,05	0,10	0,20
LV Na	0,05	0,05	0,05	0,20
FV	0,50	0,20	0,50	2,00
FVL	0,10	0,05	0,20	0,50
RV	0,10	0,10	0,20	1,00
RVL	0,02	0,02	0,10	0,50
PVL Na	0,20	0,10	0,10	0,50

**Tabulka 15:** Limit kvantifikace standardů v ng/ml v pozitivním módu

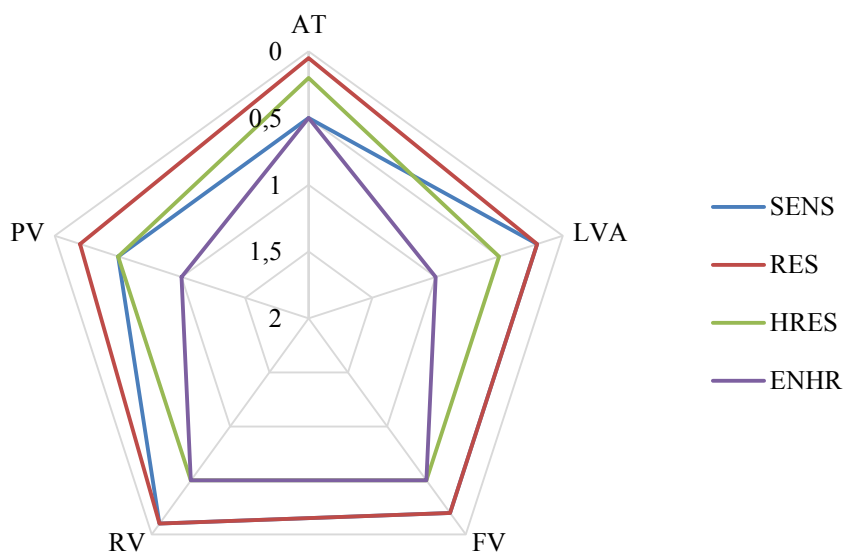


**Obrázek 40:** Limit kvantifikace standardů v ng/ml v pozitivním módu

V negativním módu pro standardní kalibrační křivku byla situace velmi podobná jako v pozitivním módu. Nejvyšší citlivosti bylo dosaženo v RES nebo SENS módu a nejnižší citlivosti v módu HRES nebo ENHR. Obecně lze však konstatovat, že vliv módu analyzátoru na citlivost byl v negativním módu podstatně nižší, citlivost se pohybovala v rozmezí 0,1–1 ng/ml. Citlivost jednotlivých analytů je velmi podobná. Hodnoty LOQ pro všechny analyty a módy analyzátoru jsou znázorněny v Tabulce 16 a na Obrázku 41.

LOQ [ng/ml]				
	SENS	RES	HRES	ENHR
AT	0,50	0,05	0,20	0,50
LVA	0,20	0,20	0,50	1,00
FV	0,20	0,20	0,50	0,50
RV	0,10	0,10	0,50	0,50
PV	0,50	0,20	0,50	1,00

**Tabulka 16:** Limit kvantifikace standardů v ng/ml v negativním módu

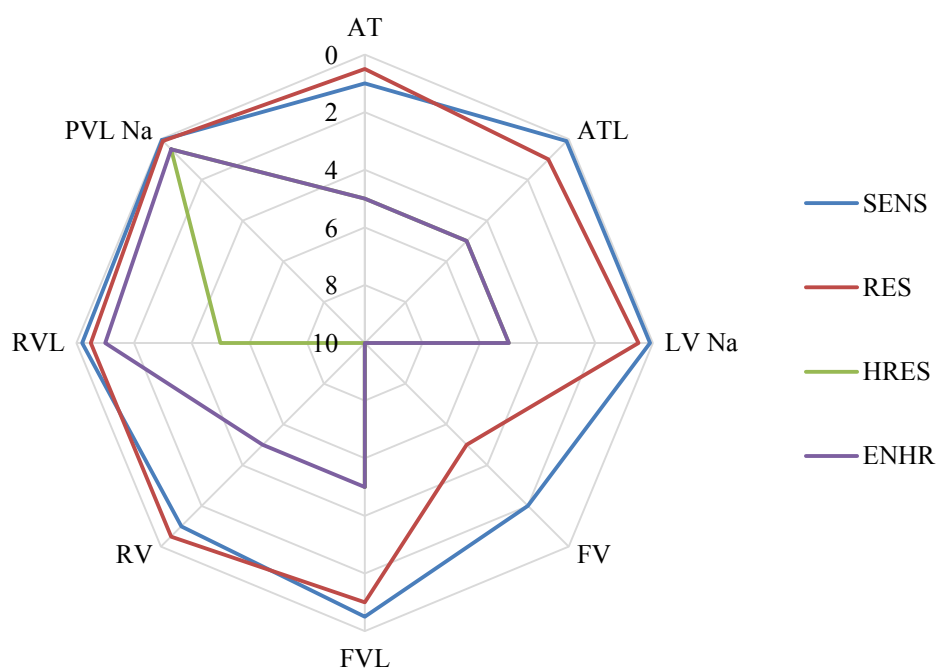


**Obrázek 41:** Limit kvantifikace standardů v ng/ml v negativním módu

V pozitivním módu byla pro maticovou kalibrační křivku sledována nižší citlivost oproti standardní kalibrační křivce. Tento efekt byl způsoben vlivem matrice. Vliv jednotlivých módů na citlivost byl srovnatelný s vlivem pro standardní kalibrační křivku. Rozdíly mezi SENS a RES módem (módem HRES a ENHR) byl podstatně nižší než mezi módy SENS, RES a módy HRES, ENHR. Pro rosuvastatin lakton a pravastatin lakton nebyly pozorovány výrazné rozdíly v citlivosti v jednotlivých módech analyzátoru (Tabulka 17, Obrázek 42).

LOQ [ng/ml]				
	SENS	RES	HRES	ENHR
AT	1,00	0,50	5,00	5,00
ATL	0,10	1,00	5,00	5,00
LV Na	0,10	0,50	5,00	5,00
FV	2,00	5,00	10,00	10,00
FVL	0,50	1,00	5,00	5,00
RV	1,00	0,50	10,00	5,00
RVL	0,20	0,50	5,00	1,00
PVL Na	0,05	0,10	0,50	0,50

*Tabulka 17: Limit kvantifikace obohaceného séra v ng/ml v pozitivním módu*

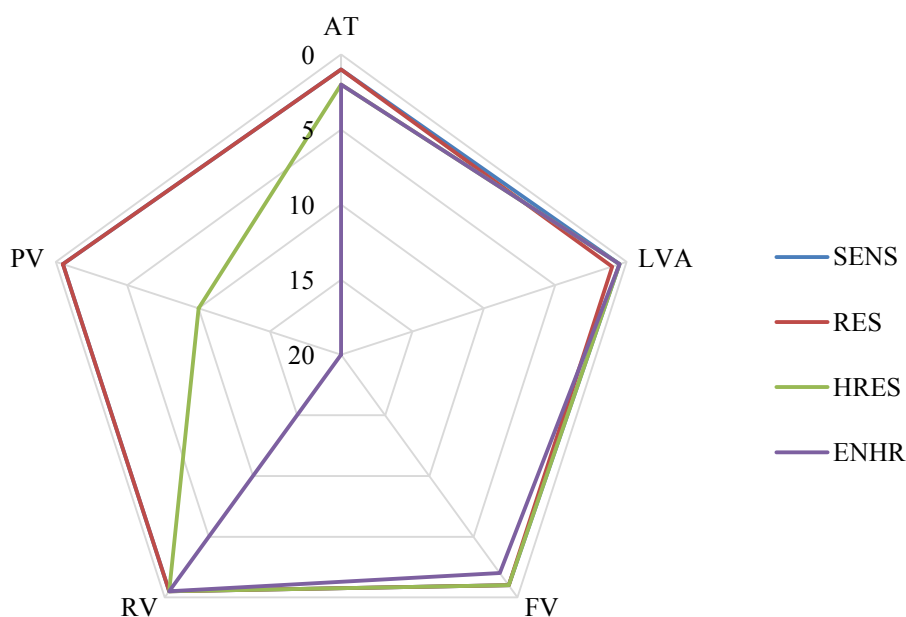


*Obrázek 42: Limit kvantifikace obohaceného séra v ng/ml v pozitivním módu*

V negativním módu pro maticovou kalibrační křivku jsou výsledky podobné. Výjimkou je lovastatin kyselina, která nejvyšší citlivost poskytuje v HRES a ENHR módu, což mohlo být způsobeno maticovými efekty. (Tabulka 18, Obrázek 43).

LOQ [ng/ml]				
	SENS	RES	HRES	ENHR
AT	1,00	1,00	2,00	2,00
LVA	0,50	1,00	0,50	0,50
FV	1,00	1,00	1,00	2,00
RV	0,50	0,50	0,50	0,50
PV	0,50	0,50	10,00	20,00

**Tabulka 18:** Limit kvantifikace obohaceného séra v ng/ml v negativním módu



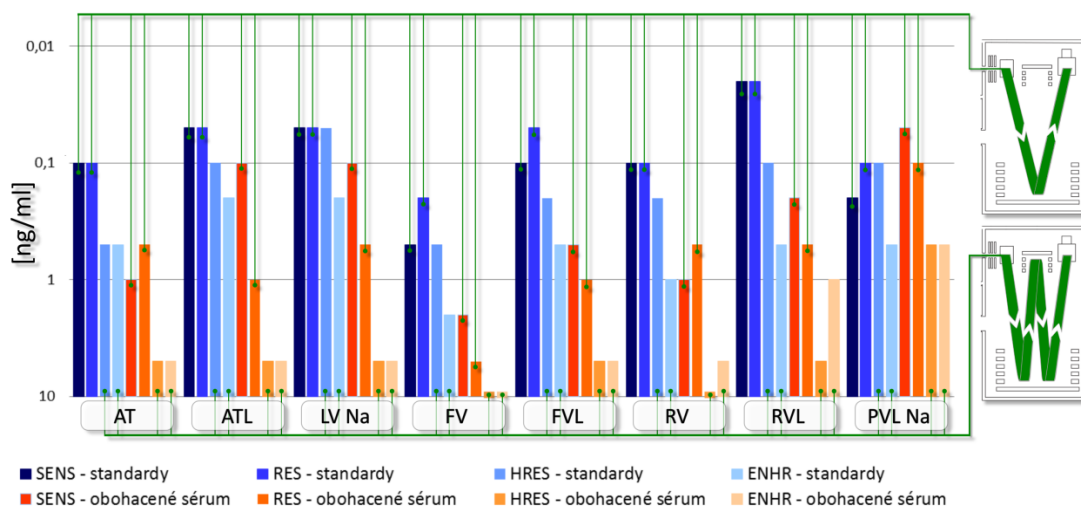
**Obrázek 43:** Limit kvantifikace obohaceného séra v ng/ml v negativní módu

Obecně lze konstatovat, že podstatně nižší citlivost poskytly HRES a ENHR módy v porovnání se SENS a RES. Tento efekt byl způsoben konstrukcí TOF analyzátoru, který v případě SENS a RES módu využívá pouze dráhu letu iontů ve tvaru „V“, naopak v případě HRES a ENHR využívá dráhu letu iontů ve tvaru „W“ – vysvětleno podrobněji viz teoretická část str. 38. S tím pravděpodobně souvisí podstatně nižší rozdíly v citlivosti mezi SENS a RES (HRES a ENHR) módem, které se vzájemně liší pouze nastavením iontové optiky. Obecně lze tedy konstatovat, že nejnižší citlivost byla pozorována pro ENHR mód a nejvyšší citlivost pro SENS mód. Nicméně SENS mód nemusí poskytovat dostatečnou rozlišovací schopnost pro složitější matrice, z tohoto důvodu je obecně nejčastěji používaným módem analyzátoru RES mód.

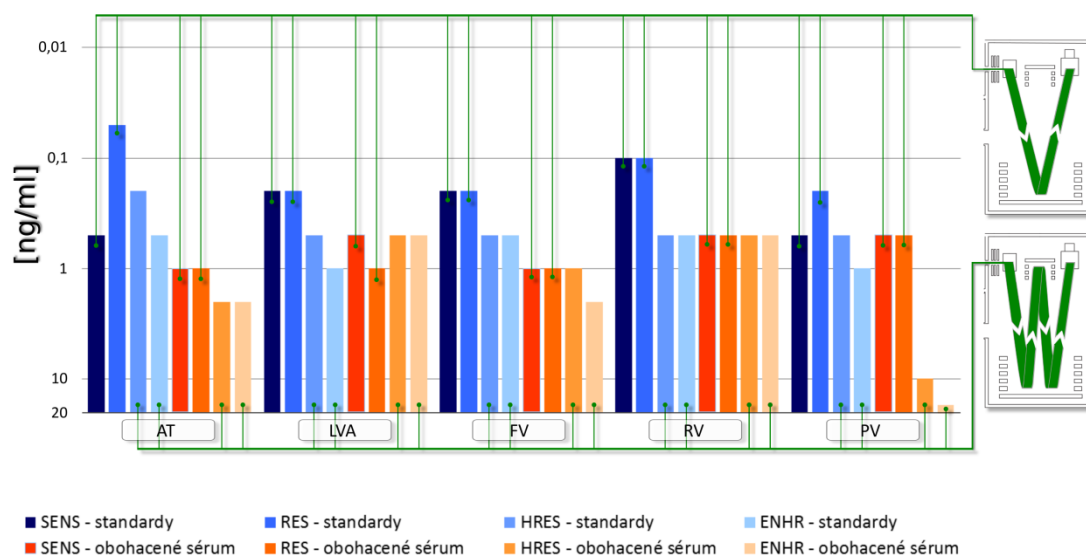
## **6. ZÁVĚR**

Byla vyvinuta UHPLC-HRMS metoda pro stanovení statinů. Chromatografické podmínky byly převzaty z dříve publikované práce a MS metoda byla znovu optimalizována v pozitivním i negativním módu. Optimální podmínky MS metody jsou v kapitole 4.6.2, str. 50-51.

Vyvinutá UHPLC-HRMS metoda byla využita pro hodnocení jednotlivých módů analyzátorů, které bylo provedeno s ohledem na citlivost a linearitu, a to pomocí standardní a matricové kalibrační křivky. Pro linearitu nebyl zaznamenán žádný vliv korelačního koeficientu a použitého módu analyzátoru jak pro standardní, tak i matricovou kalibrační křivku. V případě hodnocení citlivosti byly patrné velmi výrazné rozdíly při užití jednotlivých módů analyzátorů. V pozitivním módu bylo dosaženo nižší citlivosti pro matricovou kalibrační křivku než standardní kalibrační křivku a zároveň SENS a RES módy poskytovaly výrazně vyšší citlivost než HRES a ENHR módy. Naopak rozdíly mezi SENS a RES byly ve většině případů nevýrazné, stejně jako pro HRES a ENHR. V negativním módu byl obecně pozorován podobný trend jako v pozitivním módu, nicméně rozdíly citlivosti mezi jednotlivými módy byly podstatně nižší.



**Obrázek 44:** Porovnání citlivosti rozlišovacích módů v pozitivním módu (graf upraven v logaritmickém měřítku se základem deset [ $\log_{10}$ ])



**Obrázek 45:** Porovnání citlivosti rozlišovacích módů v negativním módu (graf upraven v logaritmickém měřítku se základem deset [ $\log_{10}$ ])

Obecně lze konstatovat, že pro měření je vhodné využívat zejména RES mód, jehož rozlišovací schopnost je ve většině případů dostačující i pro složité matrice a zároveň u něj nedochází k tak výraznému snížení citlivosti.



## **7. POUŽITÁ LITERATURA**

1. L. Nováková M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vydání. Praha: L. Nováková, M. Douša, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3
2. Dostupné na: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/> [cit. 24.11. 2016]
3. J. Klimeš a kol., *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 2. vydání. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2015, ISBN 978-80-260-8175-3
4. Dostupné na: <http://www.hplc.cz/> [cit. 2016 24.11.]
5. *Český lékopis 2009*. Praha: Grada 2009, ISBN 978-80-247-2994-7
6. Dostupné na: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf> [cit. 2017 4.1.]
7. J. J. Pitt, *Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry*, The Clinical Biochemist Reviews, 1 (2009) str. 19–34
8. S. Fekete, J. Schappler, J. L. Veuthey a kol., *Current and future trends in UHPLC*, Trends in Analytical Chemistry, 63 (2014) str. 2–13
9. Dostupné na: <https://www.chromatographytoday.com/news/gc-mdgc/32/breaking-news/what-is-the-van-deemter-equation/31273> [cit. 2017 10.3.]
10. K. Naresh, S. Bhawani, T. M. Kumar, *Ultra Performance Liquid Chromatography*, International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences, 3 (2014) str. 84–94
11. J. Cielecka-Piontek, A. Jelińska, P. Garbacki, *UHPLC: The greening face of liquid chromatography*, Chromatographia, 76 (2013) str. 1429–1437
12. J. W. Thompson, W. J. Rink, *Encyclopedia of scientific Dating Methods* 2015, ISBN 978-94-007-6303-6

13. D. Friedecký, K. Lemr, *Úvod do hmotnostní spektrometrie*, Klinická biochemie a metabolismus, 3 (2012) str. 152–157
14. S. Banerjee, S. Mazumdar, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*, International Journal of Analytical Chemistry, 2012 (2012) str. 1–40
15. M. Volný, *Hmotnostní spektrometrie: Přehled zajímavých oblastí aktuálního vývoje*, Chemické listy, 105 (2011) str. 230–236
16. K. Vékey, *Internal Energy Effects in Mass Spectrometry*, Journal Of Mass Spectrometry, 31 (1996) str. 445–464
17. C. Wang, *The Ionization Technology of LC-MS, Advantages of APPI on Detection of PPCPs and Hormones*, Austin Chromatography, 2 (2015) str. 1–3
18. Dostupné na: [http://holcapek.upce.cz/teaching/02\\_Ionizacni\\_techniky.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techniky.pdf)  
[cit. 2017 10.1.]
19. Shimadzu: *Principles and Components of APPI and APCI Ionization Methods*  
Dostupné na: <https://www.shimadzu.eu.com/ionization-options-appi-apci>.  
[cit. 2017 10.1.]
20. L. Nováková M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. Vydání. Praha  
L. Nováková, M. Douša, 2013, ISBN 978-80-260-4243-3, str. 83
21. D. Friedecký, K. Lemr, *Hmotnostní spektrometrie – zdroj analytických informací*, Klinická biochemie a metabolismus, 4 (2012) str. 210–215
22. G. Hart-Smith, S. J. Blanksby, *Mass Analysis, in Mass Spectrometry in Polymer Chemistry*, Německo, 2011, ISBN 978-3-527-64182-6
23. AGILENT TECHNOLOGIES: *Time of flight mass spectrometry* Dostupné na:  
<http://cn.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/5990-9207EN.pdf>  
[cit. 2017 20.2.]

24. I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, B. A. Thomson, *An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry*, Journal Of Mass Spectrometry, 36 (2001) str. 849–865
25. E. d. Hoffmann, *Mass spectrometry : principles and applications*. 3. vydání John Wiley & Sons, 2007, ISBN 978-0-470-03311-1
26. Waters: *LCT Premier™ - enhanced spectral resolution for improved analytical specificity* Dostupné na: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000872en.pdf> [cit. 2017 2.3.]
27. Dostupné na: <http://www.research.uky.edu/core/massspec/jeolanalyzers.pdf> [cit. 2017 3.2.]
28. M. Holčapek, R. Jirásko, M. Lísa, *Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques*, Journal of Chromatography A, 1259 (2012) str. 3–15
29. J. K. Prasain, *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*, InTech, 2012, ISBN 978-953-51-0141-3
30. G. L. Glish, D. J. Burinsky, *Hybrid Mass Spectrometers for Tandem Mass Spectrometry*, Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2 (2008) str. 161–172
31. JEOL: *Tandem mass spectrometry* Dostupné na: <http://www.jeolusa.com/DesktopModules/Bring2mind/DMX/Download.aspx?EntryId=78> [cit. 2017 10.3.]
32. Dostupné na: <http://hpst.cz/analyticka-chemie/kvadrupol-time-flight-q-tof>. [cit. 2017 14.4.]
33. Waters: *Synapt G2-Si Brochure* Dostupné na: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004681en.pdf> [cit. 2017 10.4.]
34. Waters: *Post installation documentation for standard flow applications* Dostupné na: <http://www.waters.com> [cit. 2017 10.4.]

35. Waters: *Synapt G2-Si - Overview and Maintenance Guide* Dostupné na: [www.waters.com](http://www.waters.com) [cit. 2017 28.4.]
36. J. Bultas, *Vzájemné srovnání statinů z pohledu farmakologa*, Remedica, 2 (2013). str. 143–150
37. Dostupné na: <http://www.ceva-edu.cz/mod/data/view.php?d=13&rid=442> [cit. 2016 14.6.]
38. D. Fialová, J. Vlček, *Klinická Farmacie I*. Praha: Grada, 2010, ISBN 978-80-247-3169-8
39. A. Endo, *A historical perspective on the discovery of statins*, Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences, 5 (2010). str. 484–493
40. C. R. Sirtori, *The pharmacology of statins*, Pharmacological Research, 88 (2014) str. 3–11
41. M. Schachter, *Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update*, Fundamental & Clinical Pharmacology, 1 (2005) str. 117–125
42. J. Hartl a kol., *Farmaceutická chemie III.*, Praha: Karolinum, 2012, ISBN 978-80-246-2131-9
43. Dostupné na: <https://scifinder.cas.org/> [cit. 2017 29.4.]
44. L. Nováková, D. Šatínský, P. Solich, *HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin*, Trends in Analytical Chemistry, 4 (2008) str. 352–367
45. H. Vlčková, P. Svoboda, O. Novák a kol., *Development of MEPS-UHPLC-MS/MS multistatin methods for clinical analysis*, Bioanalysis, 4 (2016) str. 333–349
46. E. S. Istvan, J. Deisenhofer, *Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase*, 5519 (2001) str. 1160–1164