

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

---



DISERTAČNÍ PRÁCE

**Analytické studie biologicky aktivních látek  
s využitím kapalinové chromatografie**

Vědní obor: Kontrola chemických léčiv

**Mgr. Anna Zerzaňová**

**Hradec Králové 2003 - 2008**



## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala těm, kteří přispěli ke vzniku mé disertační práce:

Doc. RNDr. Jiřímu Klimešovi, CSc., mému školiteli, za jeho odborné vedení, konzultace, připomínky k práci a věnovaný čas,

PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D., mému školiteli specialistovi, za jeho vstřícný přístup a cenné rady především v počátcích mého postgraduálního studia,

Dr. Dolores Barrón Bueno a Dr. José Barbosa Torralbo, z Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona (Španělsko), za více než vřelé přijetí, nejen odbornou pomoc a možnost zapojení do jejich projektů během mého půlročního studijního pobytu v rámci Erasmus programu,

PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D., za cenné odborné rady, přátelský přístup a podporu,

spoluautorům publikací, především Mgr. Přemyslu Císařovi, Ph.D., Ariadně Garcés a Mgr. Václavu Žižkovskému, za spolupráci na publikovaných pracích,

všem pracovníkům Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za vytvoření příjemné pracovní atmosféry,

své rodině a přátelům za podporu během celého postgraduálního studia.

**OBSAH**

|  |            |
|--|------------|
| <b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>  | <b>5</b>   |
| <b>1. ÚVOD.....</b>  | <b>9</b>   |
| <b>2. CÍL PRÁCE.....</b>   | <b>11</b>  |
| <b>3. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>   | <b>13</b>  |
| 3.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....  | 14         |
| 3.1.1. Základní principy vysokoúčinné kapalinové chromatografie.....   | 14         |
| 3.1.2. Moderní HPLC instrumentace .....  | 14         |
| 3.2. Hmotnostní spektrometrie.....   | 21         |
| 3.2.1. Základní principy hmotnostní spektrometrie .....  | 21         |
| 3.2.2. Ionizační techniky .....  | 22         |
| 3.2.3. Hmotnostní analyzátory .....  | 33         |
| 3.2.4. Techniky detekce iontů.....   | 41         |
| 3.2.5. Identifikace sloučenin v hmotnostní spektrometrii.....  | 43         |
| 3.2.6. Specifika spojení HPLC-MS .....   | 45         |
| 3.3. Elektroanalytické metody .....  | 49         |
| 3.3.1. Základní elektroanalytické principy a metody.....   | 49         |
| 3.3.2. Elektrochemická měření v průtokových systémech .....  | 69         |
| 3.3.3. Senzory .....   | 83         |
| <b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>   | <b>94</b>  |
| 4.1. Comparison of different stationary phases for bioanalytical studies<br>of biologically active compounds .....   | 95         |
| 4.2. Determination of a series of quinolones in pig plasma using solid-phase<br>extraction and liquid chromatography coupled with mass spectrometric<br>detection Application to pharmacokinetic studies ..... | 108        |
| 4.3. Using of HPLC coupled with coulometric detector for the determination<br>of biotin in pharmaceuticals.....  | 119        |
| 4.4. Práce publikované formou posteru na konferencích a formou abstraktů<br>v odborných časopisech .....   | 128        |
| <b>5. SOUHRN .....</b>   | <b>129</b> |
| <b>6. SUMMARY .....</b>  | <b>132</b> |
| <b>7. POUŽITÁ LITERATURA.....</b>  | <b>135</b> |



**SEZNAM ZKRATEK**

| <b>Zkratka</b> | <b>Anglický plný název</b>               | <b>Český ekvivalent</b>                      |
|----------------|--|--|
| AdSV           | Adsorptive Stripping Voltammetry         | adsorptivní rozpouštěcí voltametrie          |
| APCI           | Atmospheric Pressure Chemical Ionization | chemická ionizace<br>za atmosférického tlaku |
| APPI           | Atmospheric Pressure Photoionization     | fotoionizace za atmosférického tlaku         |
| BAW            | Bulk Acoustic Wave                       |  |
| BDD            | Boron - Doped Diamond                    | borem dopovaný diamant                       |
| CA             | Chronoamperometry                        | chronoampérometrie                           |
| CFA            | Continuous Flow Analysis                 | kontinuální průtoková analýza                |
| CI             | Chemical Ionization                      | chemická ionizace                            |
| CID            | Collision Induced Dissociation           | kolizně indukovaná disociace                 |
| cps.           |  | kapsle                                       |
| CV             | Cyclic Voltammetry                       | cyklická voltametrie                         |
| C/V            | Current / Voltage                        | elektrický proud / elektrické napětí         |
| DAD            | Diode Array Detector                     | detektor s diodovým polem                    |
| DBP            | Dibutylphthalate                         | dibuthylftalát                               |
| DCV            | Direct Current Voltammetry               | stejnoseměrná voltametrie                    |
| DESI           | Electrospray Desorption Ionization       | desorpční elektrosprej ionizace              |
| DPV            | Differential Pulse Voltammetry           | diferenční pulsní voltametrie                |
| EAI            | Electrochemically Assisted Ionization    | elektrochemicky asistovaná ionizace          |
| EDTA           | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid        | ethylendiamin-tetraoctová kyselina           |
| EI             | Electron Ionization                      | elektronová ionizace                         |
| $E_k$          |  | kinetická energie                            |
| ELSD           | Evaporative Light Scattering Detector    |  |
| ENFET          | Enzyme Field - Effect Transistor         | senzor využívající enzymy                    |
| ESI            | Electrospray Ionization                  | ionizace elektrosprejem                      |
| FAB            | Fast Atom Bombardment                    | ionizace urychlenými atomy                   |
| FDA            | Food and Drug Administration             |  |
| FET            | Field - Effect Transistor                | tranzistor řízený polem                      |
| FFT            | Fast Fourier Transform                   | rychlá Fourierova transformace               |

|         |  |   |
|---------|--|---|
| FI      | Field Ionization   | ionizace polem  |
| FIA     | Flow Injection Analysis  | průtoková injekční analýza  |
| FIB     | Fast Ion Bombardment   | ionizace urychlenými ionty  |
| FT-ICR  | Fourier Transform - Ion Cyclotron<br>Resonance                   | iontová cyklotronová rezonance<br>s Fourierovou transformací              |
| GCE     | Glassy Carbon Electrode  | elektroda ze skelného uhlíku  |
| GC-MS   | Gas Chromatography – Mass<br>Spectrometry                        | spojení plynové chromatografie<br>s hmotnostní detekcí                    |
| HDV     | Hydrodynamic Voltammogram  | hydrodynamický voltamogram  |
| HILIC   | Hydrophilic Interaction Liquid<br>Chromatography                 | kapalinová chromatografie<br>s hydrofilními interakcemi                   |
| HMDE    | Hanging Mercury Drop Electrode                                   | visící rtuťová kapková elektroda  |
| HPLC    | High Performance Liquid<br>Chromatography                        | vysokoúčinná kapalinová<br>chromatografie                                 |
| HPLC-MS | High Performance Liquid<br>Chromatography – Mass<br>Spectrometry | spojení vysokoúčinné kapalinové<br>chromatografie s hmotnostní<br>detekcí |
| HR-MS   | High Resolution Mass Spectrometry                                | hmotnostní spektrometrie<br>s vysokým rozlišením                          |
| CHEMFET | Chemically - Sensitive Field-Effect<br>Transistors               | senzor citlivý na sloučeniny nebo<br>ionty                                |
| ICR     | Ion Cyclotron Resonance  | iontová cyklotronová rezonance  |
| inj.    |  | injekce   |
| IR      | Infrared   | infračervený  |
| ISE     | Ion Selective Electrode  | iontově-selektivní elektroda  |
| ISFET   | Ion-Sensitive Field-Effect Transistor                            | senzor pracující na principu iontově<br>selektivních elektrod             |
| IT      | Ion Trap   | iontová past  |
| ITO     | Indium Tin Oxide   | indium-cín oxid   |
| LC–EC   | Liquid Chromatography –<br>Electrochemical Detection             | spojení kapalinové chromatografie<br>s elektrochemickou detekcí           |
| LIT     | Linear Ion Trap  | lineární iontová past   |
| LLE     | Liquid Liquid Extraction   | extrakce kapalina - kapalina  |

|                             |  |   |
|-----------------------------|--|---|
| LOD                         | Limit of Detection   | detekční limit                                    |
| LSV                         | Linear Sweep Voltammetry                                   | lineární voltametrie                              |
| MALDI                       | Matrix-Assisted Laser<br>Desorption/Ionization             | laserová desorpce za účasti matrice               |
| MS                          | Mass Spectrometry  | hmotnostní spektrometrie                          |
| MS/MS<br>(MS <sup>n</sup> ) | Tandem Mass Spectrometry                                   | tandemová hmotnostní<br>spektrometrie             |
| MWCNT                       | Multi-Walled Carbon Nanotubes                              | mnohostěnné uhlíkové<br>nanotrubičky              |
| m/z                         |  | poměr hmotnosti a náboje                          |
| NMR                         | Nuclear Magnetic Resonance                                 | nukleární magnetická rezonance                    |
| NP-HPLC                     | Normal Phase - High performance<br>liquid chromatography   | kapalinová chromatografie<br>na normálních fázích |
| NPV                         | Normal Pulse Voltammetry                                   | normální pulsní voltametrie                       |
| ox.                         |  | oxidace   |
| PAD                         | Pulsed Amperometric Detection                              | pulsní ampérometrie                               |
| PDA                         | PhotoDiode Array   | fotodiodové pole                                  |
| PEDOT                       |  | polyethyldioxythiofen                             |
| PEEK                        |  | polyetheretherketon                               |
| PPy                         |  | polypyrrol  |
| PVC                         |  | polyvinylchlorid                                  |
| Q                           | Quadrupole   | kvadrupólový analyzátor                           |
| QCM                         | Quartz Crystal Microbalance                                | křemenné mikrováhy                                |
| QqQ                         | Triple Quadrupole  | trojitý kvadrupólový analyzátor                   |
| red.                        |  | redukce   |
| RP                          | Resolving Power  | rozlišovací schopnost                             |
| RP-HPLC                     | Reversed Phase – High Performance<br>Liquid Chromatography | kapalinová chromatografie<br>na reverzních fázích |
| r-TOF                       | Reflection Time of Flight                                  | reflexní průletový analyzátor                     |
| (s)                         | Solid  | pevná fáze  |
| (sat)                       |  | saturovaný  |
| SAW                         | Surface Acoustic Wave                                      | povrchová akustická vlna                          |

|          |   |   |
|----------|---|---|
| s-BLM    | Surface – Stabilized Bilayer Lipid Membrane           | povrchově stabilizovaná dvouvrstvá membrána               |
| SIM      | Selected Ion Monitoring                               | selektivní záznam iontu/ů                                 |
| SPE      | Solid Phase Extraction                                | extrakce na pevné fázi                                    |
| SRM      | Selected Reaction Monitoring                          | selektivní záznam reakce/í                                |
| SSI      | Sonic Spray Ionization                                |   |
| SW-AdASV | Square Wave Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry   | square wave adsorptivní anodická rozpouštěcí voltametrie  |
| SW-AdCSV | Square Wave Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry | square wave adsorptivní katodická rozpouštěcí voltametrie |
| SWV      | Square Wave Voltammetry                               | square wave voltametrie                                   |
| tbl.     |   | tableta   |
| TDACH    |   | tetrakisdecylammoniumcholát                               |
| TIC      | Total Ion Current                                     | iontový proud vyvolaný dopadem všech elektronů            |
| TOF      | Time of Flight  | analyzátor doby letu                                      |
| TSI      | Thermospray Ionization                                | ionizace termosprejem                                     |
| UV       | Ultraviolet   | ultrafialový  |
| VIS      | Visible   | viditelná oblast světla                                   |
| YAG      |   | Yttrium Aluminium granát<br>$Y_3Al_5O_{12}$               |

# **1. ÚVOD**

**Analýza biologicky aktivních látek** je neobyčejně rozsáhlé a složité pole. Zasahuje do mnoha oblastí lidského života. Bez spolehlivých analýz se neobejde výzkum ani rutinně prováděná měření v biologii, kontrole životního prostředí, lékařské či veterinární praxi. S rozšiřováním našich znalostí o zákonitostech života roste počet hodnot, které je třeba určit a zvyšují se nároky na kvalitu stanovení a jejich aplikační flexibilitu. To vše, spolu se specializovanými nároky zadavatelů analytických měření z nejrůznějších oborů lidské aktivity, vede ke stále většímu tlaku na zdokonalování analytických technik a na zjednodušování jejich aplikace [1]. Výjimkou není ani farmaceutická analýza, která také čelí výše zmiňovaným nárokům, to vše navíc pod drobnohledem regulujících autorit.

Nezastupitelné místo v analýze biologicky aktivních látek a tedy i ve farmaceutické analýze mají **chromatografické metody**. Největší aplikační šíři z nich pak má na tomto poli **vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**. Je to především z toho důvodu, že se svou podstatou jedná o separační metodu umožňující kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi [2]. Od svého vzniku až dodnes prošla HPLC mohutným rozvojem. Při vhodné volbě detekce, separační instrumentace a podmínek lze s jejím využitím dosáhnout vysoké separační účinnosti a citlivosti v rámci jedné, relativně rychlé, analýzy. Je to metoda první volby jak ve farmaceuticko-analytickém výzkumu a vývoji nových léčiv a léčivých přípravků, při kontrole a jistění jejich jakosti tak i v bioanalytických studiích léčiv a dalších biologicky aktivních látek. Ty se totiž obvykle nevyskytují samostatně jako chemická individua, ale často bývají součástí složitých směsí (přírodní surovina, léková forma, tělní tekutina či tkáň). Stanovení v takto komplikované matici obvykle není možné provést přímo pouze po převedení vzorku do roztoku. Většinou je nutné oddělit stanovovanou složku od ostatních, mnohdy interferujících, komponent, což je přesně prostor pro potenciál vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

## **2. CÍL PRÁCE**

Tato disertační práce je směřována do oblasti využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie v kombinaci se selektivními způsoby detekce při analytických studiích vybraných biologicky aktivních látek.

Disertační práce je rozčleněna do dvou základních celků - teoretické a experimentální části - a má níže uvedené dílčí cíle:

- v teoretické části disertační práce předložit stručný přehled informací o vysokoúčinné kapalinové chromatografii a dále věnovat pozornost oblastem instrumentální analýzy, které mají bezprostřední vztah k experimentální části této práce. Úkolem tedy bylo shrnout poznatky týkající se významu a postavení hmotnostní spektrometrie a elektrochemických analytických metod se zaměřením na elektrochemická měření v průtokových systémech a na měření coulometrická.

- porovnat chromatografické vlastnosti čtyř různých typů chromatografických kolon při jejich testování čtyřmi různými reálnými směsmi biologicky aktivních látek na základě chromatografických parametrů a následně vybrat nejlepší podmínky pro separaci jednotlivých testovaných skupin.

- vyvinout a validovat SPE a HPLC metodu vhodnou pro stanovení osmi chinolonů přítomných v prasečí plasmě. Vyvinutou a validovanou metodu aplikovat na stanovení enrofloxacinu a jeho majoritního metabolitu ciprofloxacinu v reálných vzorcích prasečí plasmy.

- vyvinout vhodné chromatografické podmínky pro separaci biotinu v přítomnosti vybraných vitamínů a současně vyvinout optimální podmínky pro coulometrickou detekci. Následně metodu validovat a aplikovat na stanovení biotinu v lékových přípravcích.



## **3. TEORETICKÁ ČÁST**

## 3.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

### 3.1.1. Základní principy vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současné době jednou z nejprogresivněji rozvíjejících se analytických technik. Díky svým četným výhodám, jako je např. rychlost, přesnost a citlivost analýzy, nízká spotřeba vzorku či možnost automatizace, má dominantní postavení i ve farmaceutické analýze. Navíc oproti plynové chromatografii není limitována teplotní nestálostí vzorků či nutností derivatizace netěkavých analytů, což jsou vlastnosti velkého množství léčiv. Další přednost spočívá v možnosti separace a následné identifikace a kvantifikace v rámci jedné analýzy [3, 4].

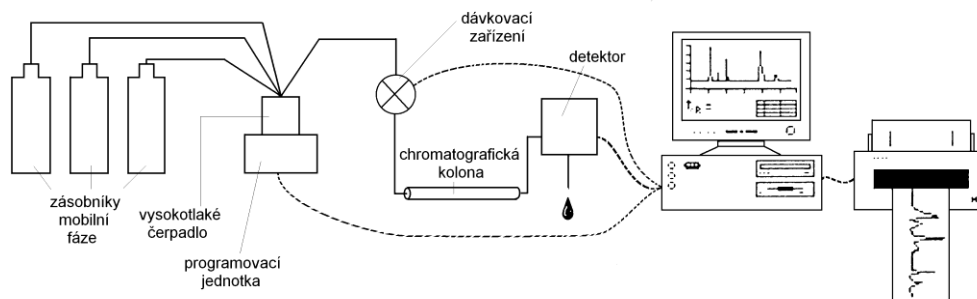
Chromatografický proces separace je založen na mnohonásobném ustavování dynamické rovnováhy částí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi, stacionární a mobilní. Interakce analytu s mobilní a stacionární fází jsou v HPLC systému založeny na mechanismech adsorpčních a rozdělovacích rovnováh, výměně iontů, vytěsňování nebo stereochemických interakcích [5]. Většinou se při separaci uplatňuje několik výše zmíněných dějů, nejčastěji se však jedná o adsorpčně - rozdělovací princip.

Identifikační charakteristikou látky je za přesně stanovených chromatografických podmínek její retenční čas. Ke spolehlivé identifikaci je však zapotřebí informace doplnit o specifitější data jako např. UV - DAD, IR či MS spektra či elektrochemické chování látky. Pro kvantifikaci látek slouží výška píku nebo plocha píku pod křivkou. Kvantifikace látek se provádí za použití vnitřního či vnějšího standardu, normalizací z plochy nebo kalibrační metodou [3, 4].

### 3.1.2. Moderní HPLC instrumentace

Základní sestava kapalinového chromatografu se skládá z pumpy, injektoru, chromatografické kolony, detektoru a zaznamenávacího zařízení (*obr. 1*). Vedle těchto částí obsahují dnešní chromatografické systémy ještě prvky usnadňující a zefektivňující

práci s nimi. Následující stat' bude věnována jednotlivým komponentám kapalinového chromatografu.



Obr. 1: Schéma kapalinového chromatografu [3]

**Zásobníky mobilní fáze** jsou nejčastěji skleněné láhve, výrobci většinou opatřené speciálními uzávěry, aby se zamezilo odparu mobilní fáze do okolí. V dnešní době není výjimkou chromatograf se čtyřmi zásobními láhvemi na složky mobilní fáze [4].

**Degassery** slouží k průběžnému odplynování mobilní fáze, čímž se minimalizuje nestálost jejího toku. Jedná se o tenké trubice z porézního materiálu umístěné ve vakuovém prostoru. Plyn obsažený v mobilní fázi prochází stěnami do vnějšího prostoru.

**Pumpy** jsou jedním z nejpotřebnějších zařízení v moderní HPLC instrumentaci, protože zajišťují kontinuální průtok mobilní fáze chromatografickým systémem. Jsou na ně kladeny vysoké nároky na udržení konstantního bezpulsního toku, který je klíčový pro reprodukovatelnost kvalitativních i kvantitativních měření. V dnešní době se používají především pístová čerpadla vyrobená z velice odolných materiálů, která jsou řízena elektronicky. Moderní pumpy umožňují průtoky od 0,01 do 10 ml/min s pulsací nižší než 1 % [4].

**Dávkovací zařízení** zajišťuje nástřik kapalného vzorku v rozsahu od 0,1 do 100  $\mu$ l s vysokou reprodukovatelností a v prostředí s vysokým tlakem. Dávkování vzorku může probíhat manuálně za použití rheodyne injektoru, moderněji však pomocí automatického dávkovače neboli autosampleru, který bývá termostatovaný

a programovatelný, a který umožňuje oplach dávkovacího zařízení, čímž minimalizuje nebezpečí kontaminace dalšího vzorku předchozím [4].

**Chromatografické kolony a sorbenty** jsou podstatou celého separačního procesu. HPLC kolony jsou obvykle nerezové trubice naplněné sorbentem představující stacionární fázi. Běžně komerčně dostupné analytické kolony jsou v délce od 5 do 25 cm, s vnitřním průměrem od 1 do 5 mm a s velikostí částic od 1,8 do 5  $\mu\text{m}$ . Vedle výše zmíněných rozměrů jsou vlastnosti chromatografických kolon dány především typem použitého sorbentu, způsobem navázání a druhem funkčních skupin, distribucí velikosti částic, velikostí pórů a povrchu sorbentu. Sorbenty lze následovně třídit [4]:

- **stacionární fáze na bázi silikagelu.** Silikagel je v současnosti nejpoužívanějším nosičem. Ve své nemodifikované podobě našel uplatnění v systému tzv. normálních fází a nověji také v tzv. kapalinové chromatografii s hydrofilními interakcemi (HILIC). HILIC je novým trendem v oblasti kapalinové chromatografie. Jedná se svým způsobem o verzi chromatografie na normálních fázích s tou výhodou, že se používají rozpouštědla mísitelná s vodou. Mobilní fáze pro HILIC je z více než z 80 % organická, zbytek je většinou vodný. HILIC je založena jednak na rozdělovacích principech, kdy se analyt rozděluje mezi vodnou vrstvičkou, která je naadsorbována při povrchu silikagelu, a mezi organickou fází. Dále se při HILIC uplatňuje i iontově výměnný princip. Výsledkem je mnohem silnější retence pro vysoce polární látky než při použití RP-HPLC. Jak bylo již naznačeno, metoda je vhodná pro vysoce polární látky, které nejsou na RP-HPLC dostatečně zadržovány a separovány [6]. V analýze léčiv je však dominantně používán silikagel modifikovaný, používaný při separacích v systému reverzních fází (RP-HPLC). Modifikace lze provádět fyzikálně (hydrotermálně) či chemickými reakcemi na volných silanolových skupinách. Nejčastějšími modifikacemi je navázání alkylového řetězce ( $\text{C}_8$  nebo  $\text{C}_{18}$ ). Existují ale také sorbenty modifikované řetězci či skupinami  $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_1$ , fenylovými, diolovými, CN, nebo  $\text{NH}_2$ . Pro speciální účely lze použít méně tradiční sorbenty s pentafluorofenylpropylovými a palmitamidopropylovými řetězci. Silikagel lze také modifikovat látkami s povahou katexů či anexů, které jsou následně používány při iontově výměnné chromatografii. Po chemické modifikaci zůstávají některé silanolové skupiny volné, což může způsobovat problémy při jejich používání, a to ve smyslu interakce s analytem. Tomuto fenoménu lze zabránit např. tzv. endcappingem neboli navázáním kratších řetězců

na volné silanolové skupiny. Nevýhodou především starších kolon na bázi silikagelu je jejich nestálost při  $\text{pH} < 2$  a  $\text{pH} > 8$ , při vysokých teplotách či při použití mobilních fází s vysokým obsahem vody [4].

- **stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého.** Oxid zirkoničitý lze připravit ve formě monodisperzních porézních kulových částic, které v mnoha případech vykazují srovnatelnou účinnost jako silikagelové částice stejných rozměrů. Materiály na bázi  $\text{ZrO}_2$  mají vynikající  $\text{pH}$  stabilitu v rozsahu 1 až 14 a vysokou tlakovou i tepelnou odolnost, takže je lze využít i pro rychlé separace při vysokých teplotách (i nad  $100^\circ\text{C}$ ). Na rozdíl od silikagelu nejsou na povrchu silanolové skupiny, ale je zde přítomnost center charakteru silných Lewisových kyselin. Nemodifikovaný  $\text{ZrO}_2$  lze použít pro separace v systémech s normálními fázemi, častěji se však používá  $\text{ZrO}_2$  s povrchem pokrytým polybutadienem nebo tenkou vrstvou pyrolyticky vyloučeného uhlíku, které lze případně modifikovat i zavedením  $\text{C}_{18}$  alkylů pro separace v systémech s obrácenými fázemi. Selektivita zirkoniových stacionárních fází je odlišná od alkylsilikagelových fází, často umožňuje lepší separace stereoisomerů a silně polárních látek [7].

- **další používané stacionární fáze** zahrnují **polymerní stacionární fáze**, které jsou nejčastěji na bázi styren-divinylbenzenových kopolymerů. Výhodou je jejich vynikající mechanická, teplotní i chemická stabilita a vzhledem k absenci silanolových skupin nulové interakce s bazickými látkami. Bohužel mají nižší, přibližně třetinovou, účinnost oproti kolonám na bázi silikagelu [7]. Dalšími zástupci jsou stacionární fáze tvořené **grafitizovaným uhlíkem** či **oxidem hlinitým**.

- vedle výše zmíněných klasických částicových kolon existují tzv. **monolitické kolony**, které disponují výhodnými hydrodynamickými vlastnostmi za vysokých průtoků, čímž lze dosáhnout urychlení analýzy.

- speciálním druhem sorbentů jsou **chirální stacionární fáze**. Jedná se o většinou inertní silikagelový nosič, který je modifikován přírodními nebo syntetickými selektory, jako polysacharidy (deriváty celulosy, amylosy, škrobu a cyklodextriny), proteiny (albumin, orosomukoid, ovomukoid, avidin), tzv. Pirklovými fázemi, makrocyclickými

antibiotiky (vankomycin, avoparcin, teicoplanin nebo ristocetin A) či makrocyklickými polyethery tzv. crown ethery (syntetické selektory) [8].

**Detektory** monitorují látky vycházející z kolony obsažené v mobilní fázi. Výstupem detektoru je elektrický signál, který je úměrný koncentraci látky přítomné v eluátu, a který je dále vyhodnocován. Výběr detektoru je klíčovým faktorem dosažitelné citlivosti a selektivity. Bez ohledu na druh by měl detektor splňovat následující požadavky: univerzálnost, linearitu a reprodukovatelnost odezvy v co nejširším rozsahu, vysokou citlivost, nezávislost odezvy detektoru na změně vnějších podmínek jako např. teplota, složení mobilní fáze atd., nízký šum základní linie, rychlou odezvu, nízký mrtvý objem, možnost použití gradientu, možnost poskytnutí strukturálních informací o analytu, nedestruktivnost, spolehlivost, jednoduchost manipulace a přiměřenou cenu. Je však zřejmé, že žádný existující detektor všechny tyto požadavky zcela nespĺňuje [4, 8].

- **UV/VIS detektory** patří mezi nejvíce používané HPLC detektory, registrují absorpci eluátu protékajícího kvyetou. Jedná se o detektor selektivní, detegující pouze látky absorbující v ultrafialové (UV) nebo ve viditelné (VIS) oblasti světelného záření, tedy látky obsahující chromofory. Vyhodnocení signálu probíhá na základě Lambert - Beerova zákona. Citlivost dosahuje  $10^{-9}$  -  $10^{-10}$  g/ml, je však ovlivněna molárním absorpčním koeficientem analyzovaných látek a také chromatografickými podmínkami. Podle konstrukce jsou detektory schopny měřit při jedné pevně nastavené nebo libovolně měnitelné vlnové délce. Přístroje označované jako detektory s diodovým polem (DAD, PDA) umožňují snímání celého spektra, což může posloužit k odhalení koeluce píků či jako podpůrná data při identifikaci látek [4].

- **Fluorimetrické detektory** jsou citlivé a selektivní detektory. Jejich citlivost se pohybuje v rozsahu  $10^{-9}$  -  $10^{-12}$  g/ml, proto jejich použití spadá především do oblasti stopových analýz. Jejich selektivita je způsobena faktem, že pouze malé množství látek přirozeně fluoreskuje. Látky s určitými funkčními skupinami (fluorofory) jsou schopny v cele detektoru absorbovat elektromagnetické záření, tzv. primární záření, čímž se molekuly látky dostávají do excitovaného stavu. Při přechodu do stabilnějšího stavu o nižší energii uvolňují energii ve formě emise záření, tzv. sekundární záření. Emitované záření má menší energii než záření primární. Fluorescenční detekci lze

při absenci fluoroforu také uskutečnit po předchozí derivatizaci např. dansylchloridem [4, 9].

- **Elektrochemické detektory** jsou detektory detegující elektrochemicky aktivní látky. Jejich citlivost je  $10^{-9}$  -  $10^{-12}$  g/ml. Elektrochemickým detektorům v průtokových systémech je věnována kapitola 3.2.2., elektroanalytickým metodám obecně pak kapitola 3.2.
- **Vodivostní detektory** jsou nejčastěji používány jako detektory při iontové výměnné chromatografii. Měří se vodivost eluátu a přítomnost analytu je zaznamenána jako změna vodivosti [4].
- **Refraktometrické detektory** registrují změny indexu lomu protékající mobilní fáze unášející analyt. Jedná se sice o univerzální detektory, ale jejich citlivost je pouze  $10^{-6}$  g/ml. Jejich další limitací je teplotní závislost odezvy a s tím související nutnost přesného termostátování [4].
- **Hmotnostní detektory** jsou vysoce citlivé a univerzální detektory, které vedle kvantifikace poskytují cenné strukturální informace o analytu. Hmotnostní detekci je věnována kapitola 3.1.
- **Evaporative Light Scattering detektory (ELSD)** jsou vhodné pro látky, které ve své molekule neobsahují chromofor, fluorofor či nejsou elektrochemicky aktivní. Při vstupu do ELSD je mobilní fáze nebulizována a následně odpařena. Analyt postupuje dále do detektoru a je detegován na principu rozptylu světla [4].
- Vedle výše zmiňovaných detektorů, se ve spojení s kapalinovou chromatografií používají např. i detektory využívající IR spektrofotometrii či nukleární magnetickou rezonanci (NMR).

**Vyhodnocovací zařízení**, které je v dnešní době součástí každé nové HPLC sestavy, zodpovídá za automatické řízení systému a také usnadňuje vyhodnocování

chromatografických dat. Softwary se mírně liší dle výrobce, nicméně všechny by měly umožňovat dodržování zásad správných praxí [4].

Mezi **další zařízení**, které lze v HPLC sestavách nalézt patří nerezové či PEEK kapiláry spojující jednotlivé moduly, různé filtry, kolonové termostaty, sběrače frakcí, přepínače kolon atd. [4].

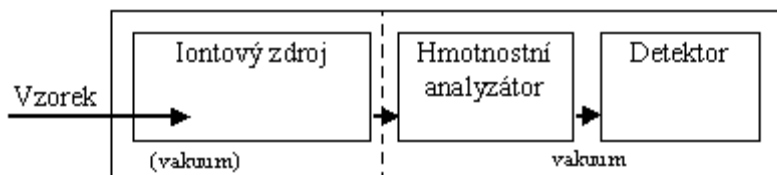


## 3.2. Hmotnostní spektrometrie

### 3.2.1. Základní principy hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická fyzikálně-chemická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Hlavní procesy probíhající v hmotnostním spektrometru jsou tedy ionizace vzorku, analýza vzniklých iontů a jejich následná detekce. Jedná se o destruktivní, ale vysoce citlivou metodu s velmi nízkou spotřebou vzorku. Metodu lze využít k mnoha účelům jako je identifikace neznámých sloučenin, kvantifikace známých sloučenin, objasňování iontů v plynné fázi, stanovení fyzikálních a chemických vlastností iontů a molekul. Metoda je formálně řazena mezi spektrální techniky, i když podle své definice do této kategorie nepatří. Spektrální techniky, jak je všeobecně známo, měří rozdíly energií mezi dvěma stavy. Technika MS je mezi ně řazena pouze pro svou podobnost získaných záznamů, tzv. hmotnostních spekter, s jinými spektry a podobné využití v podobě strukturní analýzy [10, 11].

Hmotnostní spektrometr je iontově-optické zařízení, které se skládá ze tří hlavních částí, kterými jsou **iontový zdroj**, **hmotnostní analyzátor** a **detektor** (obr. 2).



Obr. 2: Schéma hmotnostního spektrometru [11]

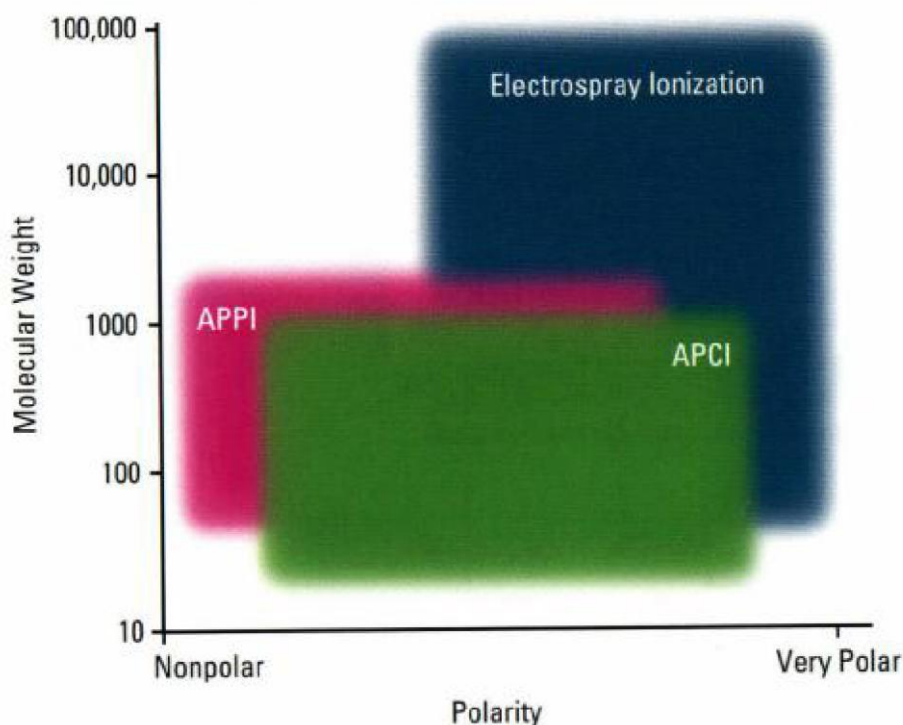
Vedle těchto základních částí, jsou pro chod spektrometru nutné ještě následující komponenty. V případě přímého měření, bez předcházející separační techniky, se jedná především o **vstupní systém** neboli sondu, zařízení pro zavádění vzorku do iontového zdroje. Používají se studené nebo vyhřívané zásobníky, vhodnější pro těkavější vzorky (plyny); sondy pro přímý vstup, určené pro pevné a kapalné vzorky s nižší těkavostí. Pro spojení se separačními technikami (GC-MS, HPLC-MS) se používají speciální sondy lišící se v závislosti na použité ionizační technice. Další velmi důležitou součástí je **vakuumový systém**. Separace iontů v plynné fázi podle poměru  $m/z$  totiž probíhá za vysokého vakua ( $10^{-3} - 10^{-6}$  Pa, v závislosti na druhu analyzátoru). Iontová

cyklotronová rezonance, jako nejnáročnější, dokonce ke svému provozu potřebuje vakuum cca  $10^{-7}$  -  $10^{-9}$  Pa. I některé, dnes již méně používané iontové zdroje, pracují za vysokého vakua. Vakuum, zabraňující kolizním srážkám s neutrálními atomy, tak zajišťuje iontům dostatečně dlouhou střední dráhu. Navíc při použití elektronové ionizace by v přítomnosti vzdušného kyslíku došlo k přepálení odporového drátku produkující elektrony. Novější ionizační techniky však již pracují za atmosférického tlaku (ESI, APCI, APPI). Vakuum se vytváří několikasupňovým čerpáním, k čemuž se používají různé druhy vývěv. Obecně lze používané vývěvy rozdělit na transportní a fixační. Mezi transportní lze zařadit vývěvy rotační olejové, membránové, spirálové a difúzní. Mezi fixační jsou řazeny vývěvy kondenzační, kryosorpční atd. Důležité je i přesné měření vakua s dostatečným rozsahem, citlivostí a minimálním vlivem měřidla na měřené prostředí (zvýšení teploty, tvorba chemických sloučenin např. ve výbojích). Jako zástupce vakuometrů lze jmenovat vakuometr odporový, ionizační nebo výbojový. Nepochybně je **iontová optika** pro urychlení a fokusaci iontů a konečně **výkonová elektronika a řídicí jednotka** [11 - 13].

### 3.2.2. Ionizační techniky

Iontový zdroj hmotnostního spektrometru slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (ionty), které jsou následně analyzovány hmotnostním analyzátozem. Ionizační techniky lze podle dodané energie rozdělit na **měkké** a **tvrdé**. Pro tvrdé techniky platí, že primárně vznikají radikalkationy  $M^{+\bullet}$ , které vlivem velkého přebytku vnitřní energie molekuly, získané při ionizaci, podléhají další fragmentaci. Jejím výsledkem může v některých případech být i chybějící molekulový ion. U měkkých ionizačních technik vznikají v důsledku ion-molekulárních reakcí pouze ionty se sudým počtem elektronů např.  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M-H]^-$  a řada dalších iontů podle použité ionizační techniky. Nedostatek strukturních informací bývá nahrazován kolizně indukovanou disociací v iontovém zdroji nebo s použitím  $MS^n$  technik. Jednotlivé ionizační techniky lze podle jejich „tvrdoosti“, tj. přebytku jejich vnitřní energie vedoucí k fragmentaci ionizované molekuly, orientačně seřadit: ESI < MALDI < TSI < FAB/FIB < APCI < CI < EI [10, 11].

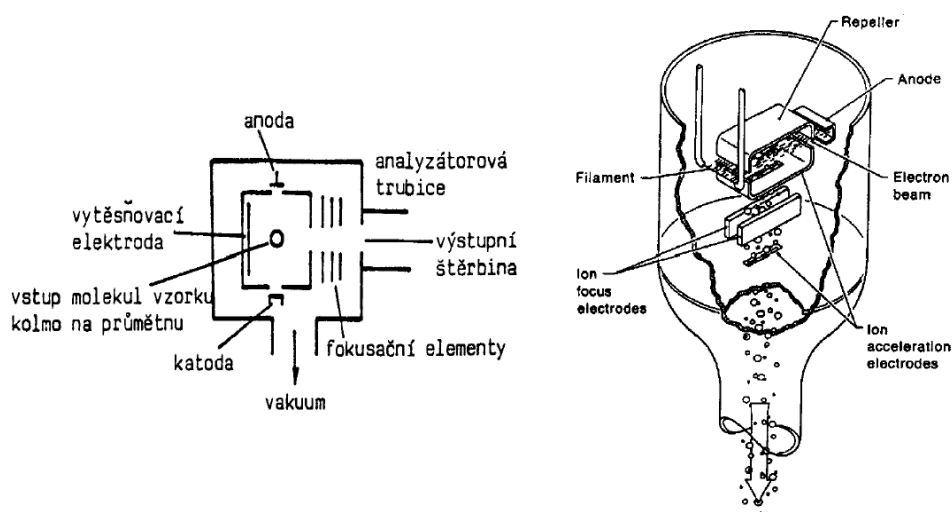
Volba ionizační techniky (*obr. 3*) je odvislá od vlastností vzorku jakými jsou těkavost, polarita, tepelná stabilita a molekulová hmotnost, která částečně souvisí s těkavostí. Důležitým hlediskem pro volbu ionizační techniky je i fakt, zda se jedná o chemické individuum nebo směs. Volit lze také polarita ionizace. Záporné ionty poskytují především sulfonové a karboxylové kyseliny, polyhydroxylované látky, zatímco kladné ionty jsou zaznamenávány pro většinu látek [11].



*Obr. 3: Možnost využití ionizačních technik ESI, APCI a APPI pro různé analyty [11]*

**Elektronová ionizace (EI)** je nejtvrděší a nejstarší ionizační technika. Podmínkou změření hmotnostních spekter pomocí elektronové ionizace je dostatečná těkavost, a protože k ionizaci dochází v plynné fázi běžně při teplotách 150 – 400 °C, zároveň i termostabilita látky. Urychlující potenciál mezi katodou a anodou určuje energii elektronů a vyjadřuje se v elektronvoltech. Pro možnost vytváření knihoven a srovnávání spekter bylo nutné zvolit jeho ustálenou a obecně platnou hodnotu. Urychlující energie byla zvolena 70 eV. Tím bylo dosaženo nejvyšší citlivosti, ale jelikož se energie potřebná k ionizaci většiny organických sloučenin nachází v rozmezí 7 - 16 eV, dochází přebytkem vnitřní energie k masivní fragmentaci, případně přetransformování molekuly a následné fragmentaci. Fragmenty vzniklé po transformaci molekuly nejsou při zběžném pohledu na strukturu molekuly

očekávány, ale mohou být významné pro identifikaci. Žhavená katoda (W nebo Re vlákno) emituje elektrony, které jsou po průchodu iontovým zdrojem zachyceny na anodě (obr. 4). Přiblížením emitujícího elektronu k valenčním elektronům molekuly dojde k ovlivnění jejich magnetických polí, což může vést k uvolnění valenčního elektronu, a tím vzniku radikalkationtu  $M^{\bullet+}$ . Vzniklé ionty jsou odpuzovány anodou vypuzeny z iontového zdroje, svazek iontů je dále fokusován a urychlen dalšími elektrodami směrem do analyzátoru. Ve výjimečných případech lze i v případě EI použít měření záporných iontů [11, 12].



Obr. 4: Schéma elektronového ionizátoru [11]

**Chemická ionizace (CI)** byla vyvinuta jako měkčí alternativa k EI, která jako příliš tvrdá technika způsobovala velmi silnou fragmentaci, následkem čehož nebylo u některých látek pozorováno žádné hmotnostní spektrum. Při CI je konstrukce iontového zdroje a princip analogický EI, analyt je opět převeden do plynné fáze. Pouze je ve zdroji navíc přítomen, a to v nadbytku oproti analytu přibližně 10 000:1, tzv. reakční plyn. Jeho tlak, asi 100 Pa, musí zaručit dostatečný počet srážek. Nejprve jsou ionizujícími elektrony ionizovány molekuly reakčního plynu, které potom ion-molekulárními reakcemi ionizují molekuly analytu. Jelikož se jedná o měkčí techniku než EI, ionty obsahují vždy sudý počet elektronů, nejedná se tedy o radikály. Reakčním plynem bývá methan, isobutan a nebo amoniak. Příkladem probíhajících reakcí může být protonace, abstrakce hydridu, kondenzace nebo výměna náboje. I CI lze použít v záporném modu [11, 12].

**Ionizace polem** (FI) patří spolu s EI a CI mezi tři ionizační techniky, kde analyzované molekuly musí být v plynném stavu. Anoda (tzv. emitör) je tenký drátek nebo ostrý břit (W, 10  $\mu\text{m}$ ), zatímco katoda tvoří výstupní štěrbinu. Vložení napětí 5 - 20 kV se na špičce drátku, respektive břitu, vytvoří vysoký potenciálový gradient, který umožní „protunelování“ nejméně vázaného elektronu pryč z molekuly a jeho zachycení anodou. Touto ionizací vznikají molekulární radikalkationty  $M^{+\bullet}$  s malým zbytkem vibrační energie, proto dochází pouze minimální fragmentaci. Dnes je již tato metoda překonána [11].

**Ionizace urychlenými atomy** nebo **ionty** (FAB, FIB) jsou dvě techniky mající velmi podobný princip, použití, přípravu vzorku i výsledky, liší se pouze v přítomnosti či absenci náboje bombardujících částic. V případě FAB se používají vysokoenergetické neutrální molekuly vzácných plynů, nejčastěji xenonu nebo argonu ve viskózní matrici, která prodlužuje životnost vzniklých iontů. Na matrici jsou kladeny specifické požadavky. Vzorek musí být v matrici rozpustný, matrice měla by mít nízkou těkavost a měla by být chemicky inertní k analyzovaným vzorkům. Důležité také je, aby ionty pocházející z matrice neměly stejné hodnoty  $m/z$  jako ionty analytu. Nejběžněji používanou matricí je glycerol, thioglycerol či triethylamin. Mohou se použít ale i speciální matrice jako kapalné kovy (Ga, In). Urychlené atomy se získávají pomocí tzv. iontového děla. Nejprve jsou atomy ionizovány elektronovou ionizací, následně jsou urychleny energií cca 8 – 10 kV. Urychlené ionty jsou pak zavedeny do komůrky se zvýšeným tlakem, kde dojde ke kolizím s neutrálními atomy. Při výměně náboje nedochází ke ztrátě kinetické energie, čímž vzniká proud vysokoenergetických urychlených atomů. Ty jsou vedeny na terčik se vzorkem v matrici. Nabité částice se do iontového zdroje nedostanou, neboť jsou vychýleny elektrodou. V případě FIB se používají urychlené ionty především  $\text{Cs}^+$ . Jejich vznik lze popsat následovně. Alkalické hlinitokřemičitany jsou zahřáty asi na 1000  $^{\circ}\text{C}$ , čímž dojde k tepelné desorpci iontů z povrchu. Vzniklé ionty jsou následně urychleny elektrickým polem a fokusovány na terčik se vzorkem v matrici. Vlastní průběh ionizace je velmi složitý děj, většinou vznikají obdobně jako u jiných šetrných technik ionty se sudým počtem elektronů. Mohou ale také vznikat adukty s matricí případně fragmentované ionty [11].

**Ionizace laserem za účasti matrice** (MALDI) je jedna z velmi šetrných ionizačních technik, která umožnila analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie i takové molekuly

jako jsou peptidy, proteiny, oligonukleotidy, nukleové kyseliny a biopolymery až do  $M_R \approx 10^6$ , což spustilo bouřlivý vývoj v oblasti biochemie. Vzorek je nejprve rozpuštěn, smísen s vhodnou matricí a nakonec zbaven rozpouštědla. Následuje velmi krátký puls laseru trvající řádově nanosekundy, maximálně mikrosekundy, který je matricí absorbován. Následně dochází k přenosu absorbované energie, ionizaci a desorpci iontů vzorku a jejich ion-molekulárním reakcím. Jedná se o tzv. pulsní ionizační techniku, která je nejčastěji spojována s analyzátozem doby letu. Jako zdroje laserového pulsu se používají nejčastěji UV lasery jako 337 nm dusíkový laser, 355 nm Nd:YAG; méně často IR 2,94  $\mu\text{m}$  Er:YAG. Pro dobrou funkčnost je velmi důležitá volba matrice. Matrice musí absorbovat při vlnové délce použitého laseru a musí vytvořit žádoucí krystal s analytem. Dále musí být matrice dostatečně stabilní, nereagující s analytem a nepříliš těkavá. Nejčastěji se používají organické aromatické karboxylové kyseliny, např. kyselina dihydroxybenzoová, kyselina skořicová atd. Klíčová je i příprava vzorku, pro kterou bylo vyvinuto několik metod. Pro zvýšení rozlišení se používá tzv. zpožděná extrakce, kdy se ionty extrahují asi až za 10 – 100 ns po aplikaci laserového pulsu, čímž dojde k vyrovnání jejich energií. Vzorky se připravují na terčíky, které lze i dlouhodobě skladovat [11, 12].

Další techniky, jelikož nejsou dnes již příliš často používány jsou zde zmíněny pouze jmenovitě. Jedná se o desorpci polem, desorpční chemickou ionizaci, desorpci plazmou kalifornia  $^{252}\text{Cf}$  a desorpci laserem.

Pro spojení HPLC-MS bylo nutno vyvinout techniky, které překonají rozdíl mezi atmosférickým tlakem analyzovaných látek vstupujících do iontového zdroje a tlakem přítomným v hmotnostním analyzátoru. Navíc analyzované látky jsou nesený tokem kapaliny o rychlosti v průměru 1 ml/min, která je navíc v obrovském nadbytku a musí být odstraněna před vstupem do vakuové části přístroje. Překonání těchto potíží bylo mnohem obtížnější než pro spojení GC-MS.

I techniky jako EI, CI nebo FAB mohou být spojeny s HPLC. V praxi se dnes používá pouze spojení s EI, a to kvůli možnosti srovnání naměřených spekter s knihovnamí hmotnostních spekter. Spojení lze uskutečnit [11, 14]:

- **nekonečným pásem** (Moving Belt). Mobilní fáze obsahující analyt je kontinuálně aplikována na pohybující se pás. Mobilní fáze je následně odpařována

pomocí infračerveného záření. Následuje desorpce/odpaření analytu do zdroje hmotnostního spektrometru. Poslední fází je očištění pohyblivého pásu omytím a/nebo hořákem v pyrolýzní píče, aby se pás zbavil všech reziduí včetně netěkavých materiálů. Tato metoda není dnes již používána. Zařízení vykazovalo paměťové efekty a pásek se díky mechanickému namáhání trhal. Také docházelo ke snížení citlivosti.

- **spojením s přímým vstupem eluátu** (Direct Liquid Introduction), což je sonda, na jejímž konci je malá dírka o průměru asi 5  $\mu\text{m}$ , která přiléhá na odpařovací komoru připojenou k iontovému zdroji hmotnostního spektrometru. Eluát z HPLC cirkuluje sondou a jak dosáhne dírky, vakuum hmotnostního spektrometru vtáhne porci do odpařovací komory a následně do iontového zdroje. Jelikož se ve své podstatě jedná o dělič toku, dochází zákonitě ke ztrátě citlivosti. Dnes je již tento způsob spojení nahrazen.

- **převodníkem Particle Beam.** Tento postup zahrnuje nebulizaci HPLC eluátu héliem, odpaření vzniklých kapiček a na základě kinetických energií odstranění par rozpouštědla a nebulizačního plynu. Tato metoda je vhodná i pro termolabilní látky a i přes své nedostatky v podobě ztrát analytů, nízké citlivosti či absenci molekulového iontu, se dodnes používá pro spojení s EI.

Jak je z předchozího textu patrné, varianta interface sloužícího ke sběru frakcí, odpaření mobilní fáze a s použitím vhodné sondy zavedení do hmotnostního spektrometru, přinášela řadu nevýhod. Dále vývoj vedl k vytvoření systému sloužícího k zavedení vzorku se současnou vlastní ionizací. U modernějších systému nelze již tyto dvě části prakticky oddělit.

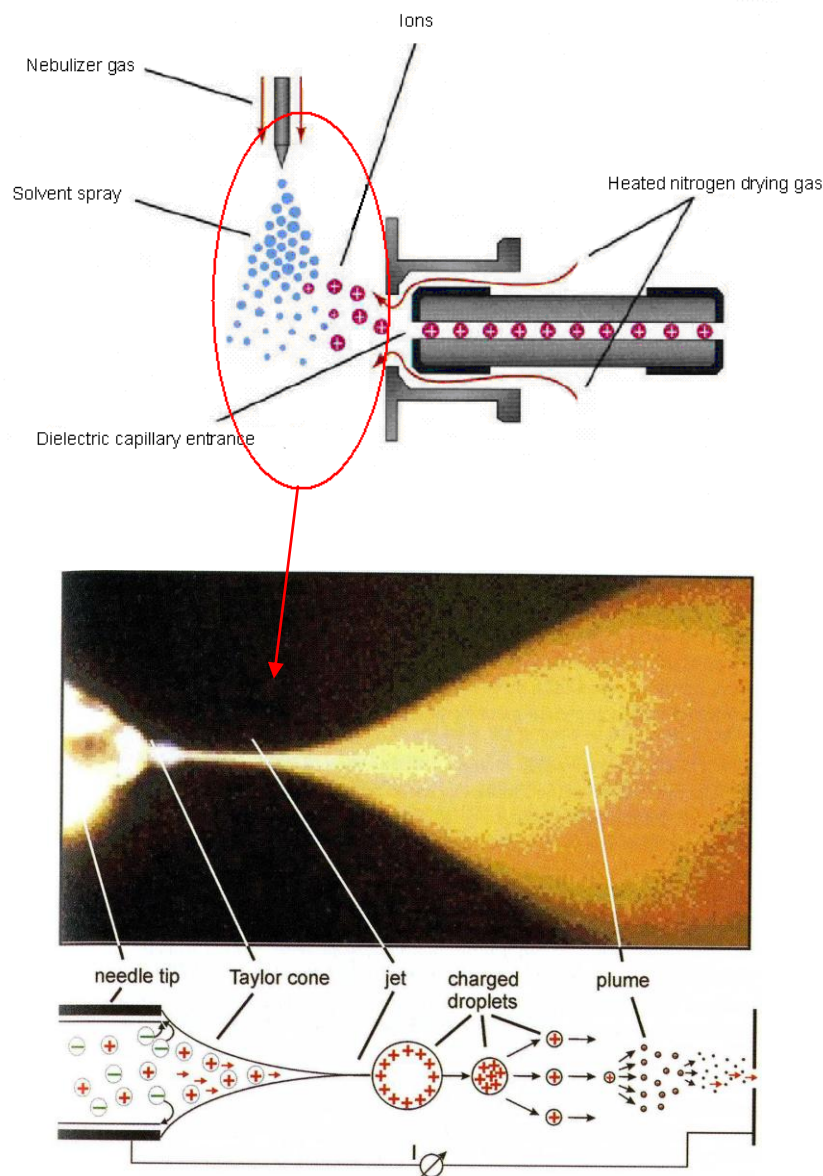
**Ionizace termosprejem** (TSI) byla první ionizační technika vyvinutá pro spojení HPLC-MS, ale dnes již ustoupila do pozadí. Lze ji použít až do průtoků 1 ml/min, i pro mobilní fáze obsahující vysoké procento vody. Jelikož se jedná se o velmi šetrnou techniku, dochází pouze výjimečně k fragmentaci a převažují ionty se sudým počtem elektronů. Analyt, rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle, je přiveden kovovou kapilárou do iontového zdroje. Konec této kapiláry je v termostatu vyhříván na 150 – 300  $^{\circ}\text{C}$ , čímž dojde k částečnému odpaření rozpouštědla již v kapiláře, a tím ke vzniku nadzvukového proudění par rozpouštědla a malých kapiček obsahující analyzované

látky. Odpařováním rozpouštědla z povrchu kapiček se zmenšuje jejich povrch a objem, čímž vzrůstá povrchová hustota náboje. Ta, jakmile dosáhne kritické meze, způsobí vznik tzv. **Coulombické exploze**, tj. rozpadu nabitě kapičky na řadu ještě menších kapiček nesoucích náboj. Toto se opakuje tak dlouho, až je kapička dostatečně malá a může dojít k desorpci protonované či deprotonované molekuly z jejího povrchu. Tento jev nazýváme vypařování iontů neboli ion evaporation. Teplota vyhřívání kapiláry závisí na těkavosti analyzovaných látek, průtoku mobilní fáze a použitých rozpouštědlech, přesněji, za zvýšeného obsahu vody je nutné použít vyšší teplotu. Nezbytná je celková optimalizace, ale teoreticky lze použít pro jakoukoliv molekulu, která je již v roztoku přítomná ve formě iontů nebo která může být ionizována jedním z uvedených tří principů ionizace (FD, CI a EI). Obecně TSI není příliš vhodná pro málo polární látky a pro velké molekuly. Ve skutečnosti, k nabití kapiček dochází pouze v přítomnosti pufru v mobilní fázi. Nicméně stále platnou podmínkou je odpařitelný pufr. Pozitivně i negativně nabitě kapičky vznikají díky statistické fluktuaci iontové hustoty probíhající při porušení proudění kapaliny. Pokud není pufr přítomen, např. při chromatografii na normálních fázích, není použití termospreje možné [11, 13, 14].

**Ionizace elektrosprejem** (ESI) je pro svou kompatibilitu se širokým spektrem chromatografických podmínek pravděpodobně momentálně nejrozšířenější ionizační technikou pro spojení HPLC-MS. Je vhodná pro středně polární až iontové, nízko- i vysokomolekulární sloučeniny. Je považována za nejšetrnější techniku, tudíž je s výhodou používána i pro analýzu termolabilních látek a biopolymerů. Analyt, rozpuštěný ve vhodném eluentu, je přiveden kovovou kapilárou do iontového zdroje, přičemž na kapiláru je vloženo vysoké napětí o hodnotě 3 - 5 kV. Následkem toho disponují vzniklé kapičky, po rozprášení na výstupu z kapiláry, velkým množstvím nábojů (*obr. 5*). K rozprášení přiváděného eluátu se používá koaxiálně přiváděný dusík, jako zmlžující plyn. Následně odpařováním rozpouštědla dochází, stejně jako u TSI, ke Coulombické explozi. Odpařování kapiček, a tedy i vznik iontů, je podporováno tvorbou iniciačních malých kapiček. Proto mobilní fáze s vysokým povrchovým napětím a/nebo s vysokou viskozitou nejsou vhodné. Jelikož kapičky, vzniklé touto metodou, nesou na svém povrchu mnohonásobně větší množství nábojů, je tak umožněn vznik vícenásobně nabitých iontů, čehož se využívá právě při analýzách biopolymerů. Počet nábojů je závislý na počtu bazických míst v molekule. Podle středního počtu



nábojů můžeme usuzovat na terciární strukturu, tedy na prostorovou konformaci. Mnohonásobné nabití kapiček lze podpořit i aplikací vyššího napětí.

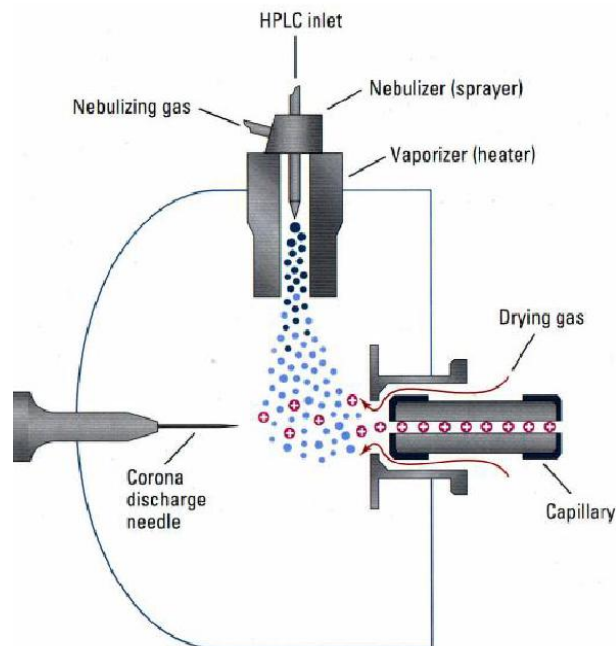


Obr. 5: Schéma elektrospreje [11, 16]

Ve spojení HPLC-MS lze ESI použít až do průtoku 1 ml/min. Při takto vysokých průtocích se, pro snížení množství eluátu vstupujícího do ionizátoru, používá dělič toku. Vstupující kapalina se v něm rozdělí do dvou větví podle poměru tlakových odporů obou větví. Ideální je proto pro využití ESI mikrokolonová nebo kapilární HPLC, jejichž průtoky jsou v souladu s optimálními průtoky pro ESI. Navíc tak nedochází ke snížení citlivosti, jako při použití děliče toku. Jejich experimentální provedení je však technicky náročné, je nutné minimalizovat mrtvé objemy systému, v opačném případě dochází k rozmývání píků. Speciální modifikací ESI bez zmlžujícího plynu

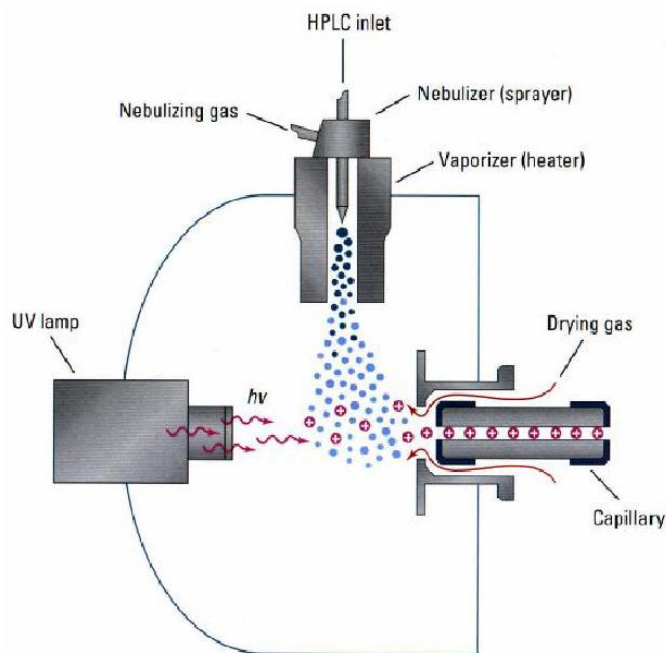
a s nižší teplotou sušícího plynu je tzv. **nanoelektrosprej**. Průtoky mobilní fáze se pohybují v rozsahu jednotek až stovek nl/min. Nanoelektrosprej využívá speciálně adjustovaný konec sprejovací kapiláry. Extrémně nízká spotřeba vzorku umožňuje provádění experimentů *in vivo*. Touto metodou lze dosáhnout velmi vysoké koncentrační citlivosti až v řádu attomolů až zeptomolů, tedy pouze stovek molekul. Nanoelektrosprej je tolerantnější vůči obsahu solí ve vzorku, čímž snižuje nároky na úpravu vzorků před analýzou. Jeho nevýhodou je experimentální náročnost a nízká robustnost [11, 14 - 16].

**Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)** se v současnosti řadí mezi standardní ionizační techniky pro spojení HPLC-MS. Jedná se o relativně šetrnou techniku. Pouze s výjimkou velmi labilních molekul, je viditelný molekulový ion. Vznikají téměř výhradně ionty se sudým počtem elektronů. Na výbojovou elektrodu je vloženo vysoké napětí 3 - 4 kV, čímž vzniká koronární výboj, kterým jsou nejprve ionizovány molekuly mobilní fáze, protože jsou v obrovském nadbytku. Následnými ion-molekulárními reakcemi jsou ionizovány molekuly analytu. Vzniklé ionty jsou urychleny elektrodami do analyzátoru (*obr. 6*). Protiproud sušícího plynu, většinou dusíku, slouží k rozbití případných nekovalentních klastrů a asociátů. Tato technika není vhodná pro iontové látky a látky s nízkou těkavostí. Dále se nehodí pro biopolymery a organokovové látky. Tím, že je tato metoda vhodná pro nepolární a mírně polární látky, jedná se *de facto* o techniku komplementární k ESI. Její použití je možné až do průtoku 2 ml/min, tedy přímo kompatibilní s běžnými HPLC kolonami. Je tolerantní k přítomnosti pufrů v mobilní fázi a ke změnám experimentálních podmínek, včetně gradientové eluce. Její omezení spočívá v nepoužitelnosti při velmi nízkých průtocích [11, 14].



Obr. 6: Schéma interface pro chemickou ionizaci za atmosférického tlaku [11]

**Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)** je analogií APCI, jen s tím rozdílem, že místo koronárního výboje se ionizace dosahuje ultrafialovým zářením (obr. 7). Jako zdroj zmíněného UV záření se používá kryptonová výbojka s energií fotonů 10 nebo 10,6 eV. Tato energie je větší než ionizační energie většiny organických molekul, ale menší než energie potřebná k ionizaci molekul mobilní fáze jako např. acetonitrilu, methanolu, vody nebo než vzdušného kyslíku. Tímto se tedy dosáhne selektivní ionizace analytu. Na rozdíl od APCI a ESI mohou vznikat i ionty s lichým počtem elektronů, které mohou komplikovat interpretaci. S výhodou se používá tzv. dopantu, kterým bývá nejčastěji toluen nebo benzen, pro RP-HPLC nepolárních látek se doporučuje methoxybenzen. Obecně je to látka s ionizační energií menší než 10 eV. Molekuly dopantu reagují ion-molekulárními reakcemi s analytem a nikoliv s mobilní fází, což zvyšuje citlivost. Nyní se běžně využívá kombinovaného iontového zdroje APCI/APPI, které lze jednoduše přepínat [11, 12].



Obr. 7: Schéma interface pro fotoionizaci za atmosférického tlaku [11]

**Desorpční elektrosprej ionizace (DESI)** je relativně nová ionizační technika, založená na kombinaci klasické ionizační (např. ESI) a desorpční (např. MALDI) techniky. Vzorek je vystaven ionizovanému spreji, který desorbuje ionty z jeho povrchu. V elektrospreji dochází k ionizaci vodného roztoku organické kyseliny nebo hydroxidu napětím několika kilovoltů (např. 5 kV). Desorbované ionty jsou následně přiváděny do analyzátoru. Kapilárou spreje je možné snímat celou plochu vzorku a získat 2-D distribuci. Předpokládá se, že DESI-MS nalezne uplatnění v molekulární medicíně a *in vivo* diagnostice [17].

**Sonic Spray Ionization (SSI)** je relativně nová technika pracující za atmosférického tlaku. Jedná se o měkkou techniku. Eluát vycházející z kapiláry je nebulizován koaxiálně přiváděným plynem o rychlosti blízké rychlosti zvuku, přesněji mírně podzvukovou. Jelikož celý proces probíhá bez přítomnosti silného elektrického pole či zahřívání, je vhodný pro termolabilní látky [18].

**Elektrochemicky asistovaná ionizace (EAI)**, někdy též nazývaná Condensed Phase Ionization, je *de facto* spojení elektrochemické instrumentace s hmotnostním spektrometrem. Princip spočívá v umístění elektrochemické cely před MS zařízení, čímž dochází k zvýšení signálu. Použití této metody je výhodné především pro látky,

kteřé jsou spíše neutrálního charakteru, a kteřé jsou těžko ionizovatelné tradičními ionizačními technikami jako např. ESI, APCI nebo MALDI. Pro dosažení co nejvyšší účinnosti se používají coulometrické cely [19].

### 3.2.3. Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů podle jejich poměru  $m/z$ . Je umístěn za iontovým zdrojem, tzn. že molekuly, které do něj přicházejí byly již převedeny na ionty. Současně je umístěn před detektorem. Ionty lze rozdělit dle  $m/z$  na základě několika fyzikálních principů [11, 12]:

- zakřivení dráhy letu v magnetickém nebo elektrickém poli
- různé stability oscilací iontů v dvojrozměrné nebo v trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí
- různé doby letu v oblasti bez pole
- různé absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli.

Velmi důležitou veličinou pro hodnocení vlastností analyzátorů je tzv. **rozlišovací schopnost** (RP), která se vyjadřuje jako poměr hmotnosti iontu  $m_1$  a rozdílů iontů  $m_1$  a  $m_2$  s jednotkovým nábojem, přičemž platí, že píky obou iontů jsou stejně vysoké a údolí mezi píky je 10%:

$$RP = m_1 / (m_1 - m_2).$$

Především pro kvadrupóly a iontové pasti platí alternativní definice RP, kterou je poměr hmotnosti iontu  $m$  a šířky tohoto iontu  $\Delta m$  v polovině jeho výšky [11]:

$$RP = m / \Delta m.$$

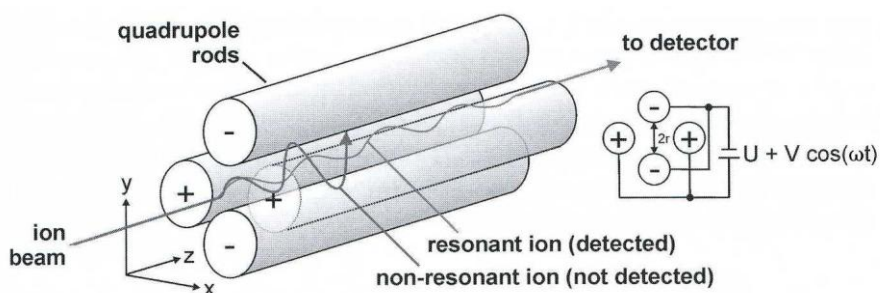
Typ analyzátoru zásadně ovlivňuje jak kvalitu získaných hmotnostních spekter tak i cenu hmotnostního spektrometru. Spektra s vysokým rozlišením získaná např. sektorovým analyzátořem s dvojí fokusací iontů nebo spektrometřem s iontovou

cyklotronovou rezonancí, umožňují určit elementární složení. Na druhou stranu spektra s nízkým rozlišením umožňují rozlišení iontů lišících se maximálně o jednotku  $m/z$ . Jak bylo již naznačeno, rozlišujeme několik druhů základních analyzátorů. Existují ale i hybridní přístroje, využívající kombinace různých typů analyzátorů [11].

**Magnetický analyzátor s jednoduchou fokusací iontů** pracuje na principu zakřivení dráhy letu iontů při průchodu magnetickým polem. Kladné ionty s určitou hodnotou  $m/z$  jsou urychleny záporným potenciálem ( $V$ ) a vstupují do magnetického pole s magnetickou indukcí ( $B$ ), čímž dojde k zakřivení pohybu iontů na trajektorii o určitém poloměru ( $r$ ). K většímu zakřivení dráhy dochází u iontů s nižší hodnotou  $m/z$ , protože těžší ionty mají větší odstředivou sílu a jejich dráha se tolik nezakříví. Plynulou změnou neboli skenováním  $B$  (magnetické skenování) nebo  $V$  (potenciálové skenování) při konstantním poloměru, daným pro použitý přístroj, projdou výstupní štěrbinou na detektor postupně všechny ionty a zaznamenají se intenzity iontů pro jednotlivé  $m/z$ , čímž získáme hmotnostní spektrum [11].

Na podobném principu pracuje i **sektorový analyzátor s dvojitou fokusací iontů**. Navíc k magnetické fokusaci iontů je zde ještě přidáno elektrostatické zaostření, čímž dojde k výraznému zvýšení RP. Jestliže do elektrického pole vstoupí ionty s různou  $E_k$  a  $m/z$ , dojde k zakřivení jejich dráhy v závislosti na jejich  $E_k$ , bez ohledu na jejich  $m/z$ . Jelikož ionty vznikající v iontovém zdroji mají určitou distribuci energií, což vysvětluje šířku získaných píků, pro dosažení většího rozlišení je nutné ionty energeticky sjednotit, k čemuž se využívá elektrický analyzátor. Jeho pomocí získáme monoenergetický svazek. Spojením magnetické a elektrické fokusace iontů lze dosáhnout RP až 100 000. Existují čtyři základní druhy geometrického uspořádání magnetické a elektrické fokusace sektorových analyzátorů: dle Mattaucha a Herzoga, dle Niera a Johnsona, podle Matsudy a inverzní uspořádání. Výhodou tohoto druhu analyzátorů je možnost vysokoenergetické aktivace a především možnost měření i tzv. metastabilních iontů. To jsou ionty, jejichž doba života je asi  $10^{-4} - 10^{-6}$  s, což znamená, že se rozpadají na cestě mezi iontovým zdrojem a detektorem. Díky jejich přítomnosti vznikají široké difúzní píky při necelých hodnotách  $m/z$ . Jejich detekce je důležitá z hlediska možnosti studia fragmentačních cest [11].

**Kvadrupólový analyzátor (Q)** sestává ze čtyř stejných kovových tyčí kruhového, nejlépe však hyperbolického, průřezu o délce 20 – 30 cm. Na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí ( $U$ ), na dvě zbývající záporné stejnosměrné napětí ( $U$ ). Na všechny čtyři je dále superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí ( $V$ ) (obr. 8). Ion je přiveden do středu osy kvadrupólu a začne oscilovat. V daný časový okamžik, kdy je vložen určitý poměr  $U/V$ , jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou  $m/z$ . Pouze tento ion projde kvadrupólem a dostane se na detektor. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou, skenováním, poměru stejnosměrného napětí a amplitudy napětí střídavého  $U/V$ , jsou postupně propuštěny na detektor všechny ionty. Jedná se tedy, ve své podstatě, o hmotnostní filtr. Pro maximální RP je ideální hyperbolický průběh tyčí. Zároveň platí, že vyšší citlivosti lze dosáhnout snížením rozsahu. Kvadrupól je velmi jednoduchý a relativně levný hmotnostní analyzátor, který se velice rozšířil, a to i pro spojení GC-MS a HPLC-MS [11, 13, 16, 20].

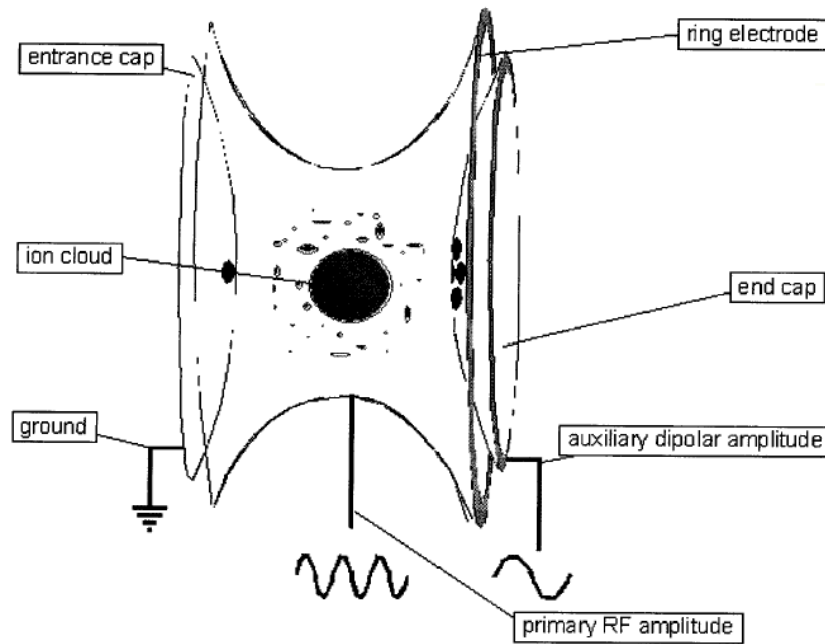


Obr. 8: Schéma kvadrupólového analyzátoru [16]

**Trojité kvadrupólový analyzátor (QqQ)** je pravděpodobně nejčastěji užívaný MS/MS instrument. Jedná se o tři kvadrupóly seřazené za sebou, přičemž prostřední z nich (q) slouží jako kolizní cela. V prvním kvadrupólu dochází k izolaci, ve druhém k disociaci a třetí slouží k analýze vzniklých fragmentů. Zavedením kolizního plynu do druhého kvadrupólu způsobíme kolizní aktivaci prvním kvadrupólem vybraných iontů a následnou fragmentaci. Na rozdíl od iontové pasti může docházet k opakovaným kolizním aktivacím, to znamená, že pozorujeme více fragmentovaných iontů než u MS/MS měření prováděných s iontovou pastí. Trojitý kvadrupól také umožňuje měření skenu prekursoru a skenu neutrálních ztrát. Pro měření  $MS^3$  by bylo nutné zapojit 5 kvadrupólů (QqQqQ), čehož se využívá velmi výjimečně. Pro MS měření do vyššího stupně je obvykle lepší zapojit iontovou past nebo cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací [11, 12].

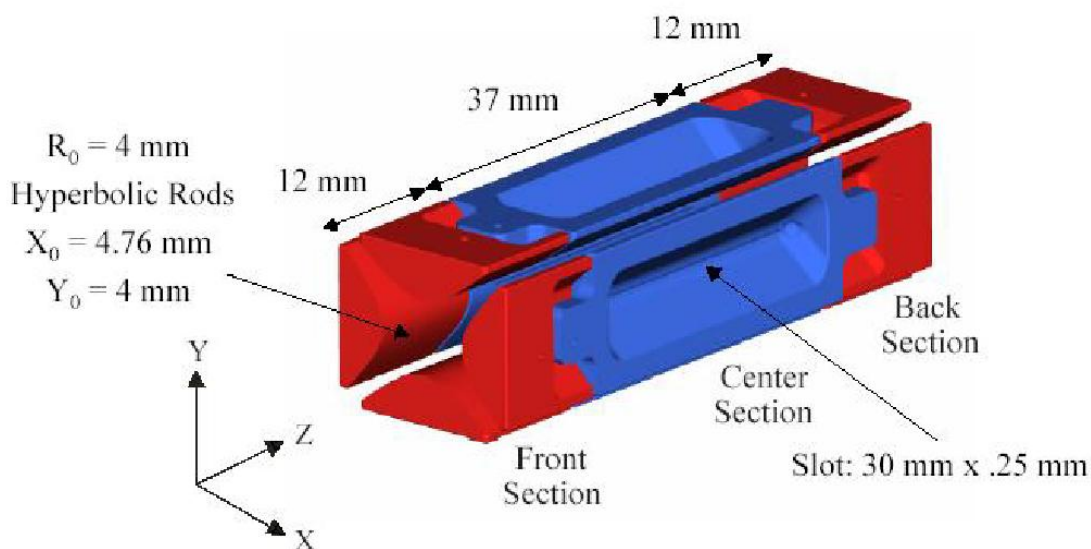
**(Sférická) iontová past (IT)** je složena ze dvou koncových elektrod kruhového průřezu a jedné prstencové elektrody (*obr. 9*). Ionty jsou krátkým napěťovým pulsem přivedeny do pasti vstupním otvorem koncové elektrody. Zde jsou zachyceny a poté jsou postupně vypuzovány na detektor podle jejich  $m/z$ . Lze použít jak externí ionizace (ESI, APCI), tak interní ionizaci v iontové pasti. Akumulační časy pro záchyt iontů jsou přibližně  $10\ \mu\text{s} - 200\ \text{ms}$ , v závislosti na množství přiváděných iontů. Doba excitace a kolize v pasti je cca  $20 - 60\ \text{ms}$ . Vhodnými poměry stejnosměrného a střídavého napětí vloženými na prstencovou a koncové elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti, s účinností záchytu asi  $5\ \%$ . Ionty jsou nuceny pohybovat se uvnitř iontové pasti po uzavřených kruhových drahách. S postupně zvyšující se amplitudou napětí, se ionty s rostoucím  $m/z$  dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor iontové pasti výstupním otvorem směrem do detektoru. Do pasti se zavádí helium jako tzv. tlumící plyn o tlaku asi  $5 \times 10^{-2}\ \text{Pa}$ , aby tlumil nežádoucí oscilace, čímž se dosáhne významného zvýšení RP a zlepšení záchytu iontů. Množství iontů dávkovaných do pasti musí být regulováno, protože, v případě přeplnění pasti, může dojít ke vzniku výboje, označovaného jako tzv. prostorový náboj. To se projeví horším rozlišením a citlivostí. Prostorový náboj způsobí ovlivnění harmonického pohybu a rezonance iontů. To se na výsledku projeví širším rozsahem frekvencí každé hodnoty  $m/z$ , což rozšíří pík. Existují dva hlavní přístupy, jak zbránit vzniku prostorového náboje. Buď proběhne velmi krátký tzv. předskan, dle kterého se následně určí doba nadávkování iontů. Druhá varianta spočívá v automatické úpravě doby dávkování na základě množství nábojů v předchozím skenu. Oba způsoby jsou dostatečně efektivní, takže je možné vedle sebe analyzovat hlavní pík a stopový kontaminant. Rozsah iontové pasti je uváděn až do  $20\ 000$ , rozlišení až  $30\ 000$ . S iontovou pastí lze provádět tandemovou hmotnostní spektrometrii bez jakéhokoliv dalšího přídatného analyzátoru. Vybraný ion prekurzoru je zadržen v pasti, všechny ostatní ionty jsou vypuzeny. Pak dojde ke kolizní aktivaci s atomy helia přítomnými v pasti, a tím i k fragmentaci iontu. Následně je zaznamenáno MS/MS spektrum. Stejným způsobem lze pokračovat mnohokrát, ve skutečnosti je to však omezeno životností iontů a citlivostí. Prakticky je využíváno do  $\text{MS}^5$ , což pro strukturní analýzu zcela postačuje. Samozřejmostí je plná automatizace. U iontové pasti dochází často pouze k jednostupňovým rozpadům, tzn. ve spektru je méně fragmentů, což usnadňuje interpretaci. Na druhou stranu mohou chybět fragmentové ionty v nízkomolekulární oblasti, tzv. „cut-off“ v  $1/3\ m/z$  iontu prekurzoru [11, 13, 20].





Obr. 9: Schéma iontové pasti [11]

**Lineární iontová past (LIT)** spojuje výhody kvadrupólu a iontové pasti. Princip je stejný jako u klasické iontové pasti, která se, jak bylo již řečeno, skládá ze dvou kuželovitých elektrod proti sobě a středové prstencové elektrody. U lineární pasti je prstencová elektroda protažená do válce (obr. 10). Ionty jsou do lineární pasti injektovány jednou kuželovitou elektrodou. Kombinací různě volených střídavých a stejnosměrných složek napětí na elektrodách se udržuje určitá skupinu iontů ve stabilním stavu, ionty uvnitř různě kmitají a zůstávají v pasti. Pokud se začne jeden nebo více parametrů vkládaného napětí měnit, stabilní oblast iontů se posune a ty, které byly "na pomezí", ztrácí stabilitu a vylétávají otvory v dlouhé středové elektrodě ven z pasti. Pro zvýšení citlivosti se vně umísťují dva detektory, které vylétávající ionty detegují. Pokud se nakalibruje změna hmotností iontů a na elektrody vkládaného napětí, přičemž lze měnit jak střídavou tak stejnosměrnou složku, lze při daných hodnotách napětí zjistit hmotu právě vylétávajících iontů. Rozdíl mezi 3-D iontovou pastí a lineární 2-D iontovou pastí je tedy jen ve zmiňovaném protažení středové elektrody. Lineární vyniká lepší, asi 70%, záchytností po injektování iontů. U 3-D je tato záchytnost jen 30 %, ostatní ionty se nestačí stabilizovat. Z toho vyplývá, že LIT je lepší jen ve výsledném signálu a rozlišení, ostatní parametry jsou totožné [21].

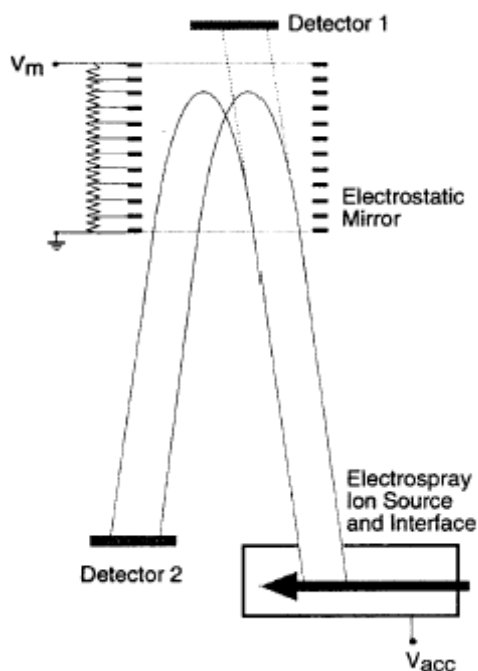


Obr. 10: Schéma lineární iontové pasti [11]

**Orbitrap** je typ analyzátoru na pomezí mezi iontovou pastí a iontovou cyklotronovou rezonancí. Ionty o různých hodnotách  $m/z$  rotují kolem středové asymetrické elektrody, která je umístěna do nehomogenního elektrického pole, což nutí tyto ionty nejen kroužit, ale také oscilovat. Frekvence této oscilace je úměrná poměru hmotnosti a náboje daného iontu. Oscilující ionty indukují na vnějších elektrodách střídavý proud, který je zesílen a digitalizován. Zaznamenává se tedy závislost průchodu iontů, v podobě elektrického proudu, levou a pravou částí orbitrapu na čas, tedy suma sinusoid. Po Fourierově transformaci se převede časová doména na frekvenční, čímž se spektrum stává mnohem přehlednější. Vzhledem k tomu, že měření proudu v čase lze dnes provádět velmi přesně a rychle, lze s pomocí FFT (Fast Fourier Transform) získat velmi přesně stanovenou hmotu iontů. Toto velmi přesné stanovení se nazývá **High Resolution Mass Spectrometry** (HR-MS). Oproti běžným MS analyzátorům s jednotkovým rozlišením piků se při takto přesném měření musí nesrovnatelně více vyčerpávat vnitřní prostor a vakuum dosahuje hodnot až  $10^{-7}$  Pa. Orbitrap sice nedosahuje přesnosti cyklotronu, který poskytuje ještě lepší rozlišení, ovšem jeho pořizovací cena je cca čtyřikrát nižší [22].

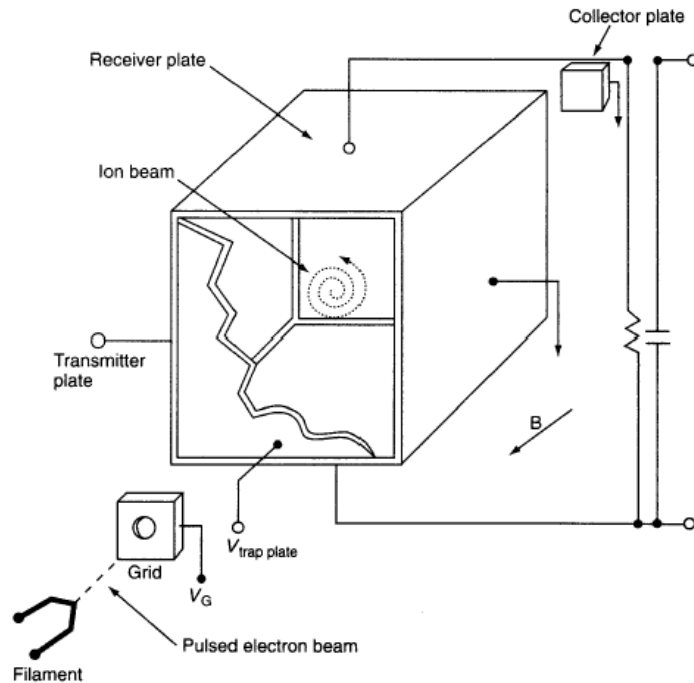
**Analyzátor doby letu** (TOF), starším názvem průletový analyzátor, je svým uspořádáním nejjednodušší hmotnostní analyzátor. Pracuje na jednoduchém principu, že ionty s menší hodnotou  $m/z$ , o stejné kinetické energii, se pohybují rychleji, proto se i rychleji dostanou na detektor. Jedná se o typický pulsní analyzátor. Nejprve jsou ionty

na vstupu do analyzátorové trubice urychleny velmi krátkým pulsem a následně se přesně měří čas, za který ionty doletí k detektoru, podle čehož se určí jejich  $m/z$ . Skenování je velmi rychlé a hmotnostní rozsah není teoreticky omezen, záleží pouze na době, po kterou budeme čekat na dopad iontu, což lze až do hodnot  $m/z$   $10^6$ . Pro zvýšení rozlišení se používá několik modifikací TOF. **Reflexní průletový analyzátor** (r-TOF) používá tzv. iontové zrcadlo neboli reflektron, které slouží k vyrovnání různých kinetických energií pro ionty se stejnou  $m/z$  (*obr. 11*). Jak bylo již zmiňováno výše, při ionizaci získají ionty kinetickou energii s určitou distribucí, což vede k rozšíření jejich píků, a tím i ke zhoršení RP. Princip iontového zrcadla, což je soustava kruhových elektrod se stoupajícím napětím, spočívá v úměrnosti hloubky průniku iontů do elektrického pole reflektronu na jejich  $E_k$  a nikoliv na  $m/z$ . Ionty s větší kinetickou energií proniknou, před svým odrazem, hlouběji do odrazového elektrického pole reflektronu, čímž dojde k jejich opoždění oproti iontům s nižší  $E_k$ , a tím i k vyrovnání celkových drah iontů s různou  $E_k$ . Dalším způsobem je **opožděná extrakce** (Delayed Extraction), která spočívá ve zpožděném zapnutí extrakčního napětí. Po laserovém pulsu v čase  $t = 0$ , následuje expanze iontů při vypnutém extrakčním poli po dobu zpoždění a konečně rychlé zapnutí extrakčního pole. I s analyzátozem doby letu lze provádět MS/MS analýzu. Odpuzovací elektrodou jsou všechny nežádoucí ionty vychýleny a zvolený ion prekurzoru je vybrán a následně podroben kolizně indukované fragmentaci. Ion může v průběhu letu fragmentovat, vznikají tak ionty, které mají stejnou rychlost, ale nižší kinetickou energii. V přístrojích bez reflektronu, dorazí všechny tyto ionty na detektor ve stejný okamžik, a tím pádem nejsou odděleny. Pokud je ale reflektron zařazen, ionty s různou energií jsou rozlišeny a mohou být separovány na základě svého  $m/z$ . Toto se nazývá post-source decay, neboli fragmenty vznikají až po extrakci iontů z iontového zdroje [11, 13, 20]. Výhodné je také spojení kvadrupólu s analyzátozem doby letu, tzv. QqTOF. Svým způsobem zařízení vychází z trojitého kvadrupólu, ale poslední kvadrupól je nahrazen analyzátozem doby letu. TOF analyzátor je schopen, na rozdíl od ostatních analyzátorů, které skenují postupně danou  $m/z$  oblast, analyzovat všechny ionty, které do analyzátoru vstoupily v daný okamžik. Tudíž tento instrument umožňuje provádět kontinuálně kompletní spektrum MS/MS produktů každého iontu, který vystoupil ze zdroje. Nevýhodou může být, že není schopen poskytovat sken prekurzorů a sken neutrálních ztrát [11, 13].



Obr. 11: Schéma analyzátoru doby letu [11]

**Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR)** je, stejně jako TOF, pulsní metoda. Svými parametry, cenou, rozlišením i použitým vakuem, zcela vybočuje z rámce ostatních analyzátorů. Stejně jako u iontové pasti lze ionty dodat z externího zdroje nebo mohou vznikat na místě. Všechny ionty jsou detegovány zároveň. Jestliže se ion dostane do silného magnetického pole, začne se pohybovat po cykloidální trajektorii s cyklotronovou frekvencí (obr. 12). Musí být splněna podmínka vysoké intenzity magnetického pole, asi 7 Tesla. Následuje rychlý sken, trvající přibližně 1  $\mu\text{s}$ , přes velký rozsah frekvencí, čímž dojde k simultánní excitaci všech iontů v cyklotronu. Jedná se tedy o široký puls v celém spektru hodnot  $m/z$ . Každá hodnota  $m/z$  má charakteristickou cyklotronovou frekvenci, při které ionty absorbují určitou energii. Fourierovou transformací se přepočtou tyto frekvence do škály  $m/z$ , a tím získáme hmotnostní spektrum. Frekvence, respektive energie, udává hodnotu  $m/z$ ; množství absorbované energie udává intenzitu [11 - 13].



Obr. 12: Schéma iontové cyklotronové rezonance [11]

### 3.2.4. Techniky detekce iontů

Detektor iontů slouží k detekci iontů po jejich separaci podle  $m/z$  a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů. Detektory pro hmotnostní spektrometrii se dělí do dvou skupin [10 - 12]:

- **detektory pro přímá měření** detegují elektrický proud vznikající přímým dopadem stanovovaných iontů. Tyto detektory jsou nezbytné pro určení přesného izotopového zastoupení prvků a bývají obvykle součástí specializovaných systémů.

- na **fotografické desce**, používané v minulosti, se podle síly zčernání odhadovala intenzita.

- ve **Faradayově kleci** se všechny ionty zachytí a vybijí, zaznamená a zesílí se úbytek proudu. Jedná se o velmi přesné měření, používané pro zmiňovaná izotopická měření.

- **násobičové detektory** využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů. Jsou nejčastěji používaným typem detektorů

hmotnostní spektrometrii, protože jsou schopny poskytnout dostatečně měřitelný signál pro jednotlivé ionty.

- **násobiče elektronů s diskretním dynodovým polem** se skládají ze série kovových, elektricky propojených, dynod. Po vložení napětí mezi první a poslední dynodu jsou elektrony postupně urychlovány k následujícím dynodám a nakonec jsou zachyceny kolektorem. Po dopadu iontu jsou z materiálu první konverzní dynody vyraženy elektrony, jejichž počet se dopadem na další dynody násobí. Násobiče s diskretními dynodami bývají konstruovány až jako dvacetistupňové a dosahují hodnot zesílení  $10^7 - 10^8$ .

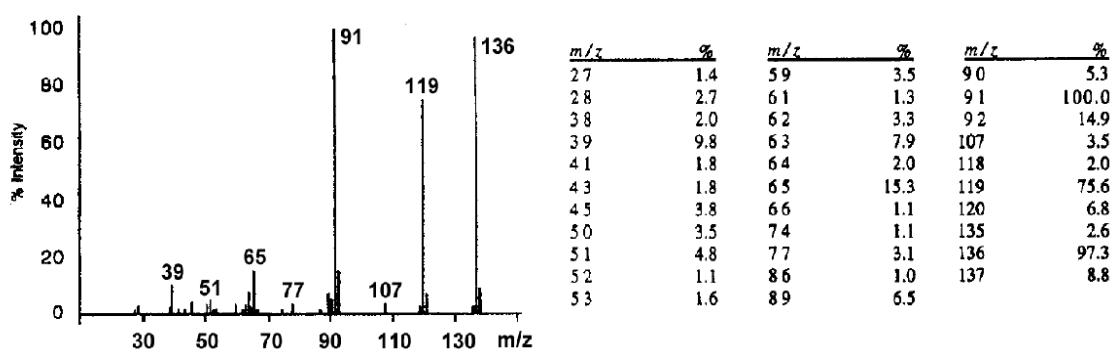
- **násobiče elektronů s kontinuální dynodou** jsou tvořeny zakřivenou trubicí z olovnatého skla s vysokým elektrickým odporem. Trubice je na vnitřní straně pokryta vrstvičkou oxidu berylnatého nebo hlinitého. Kontakty při ústí a na konci trubice jsou připojeny ke zdroji vysokého napětí. Po dopadu iontu jsou z materiálu trubice vyraženy elektrony, které jsou elektrickým polem urychlovány směrem ke kolektoru. Opakovanými nárazy elektronů na stěnu trubice spojenými s emisí dalších elektronů jejich počet lavinovitě roste. Rozměry násobiče s kontinuální dynodou lze výhodně zmenšovat. Účinnost těchto systémů je srovnatelná s diskretními systémy, jejich životnost a citlivost k iontům s vyšší hmotností bývá nižší.

- **elektronový násobič** je pravděpodobně momentálně nejpoužívanější. Jeho životnost je asi jeden až dva roky a existuje také v uspořádání s polem, který poskytuje větší zesílení.

- nespornou výhodou **scintilačních fotonásobičových detektorů** je možnost jejich umístění mimo oblast vysokého vakua. Dopadající ionty jsou nejprve na scintilačním stínítku konvertovány na fotony. Ty jsou následovně detegovány běžným fotonásobičem. Tenký film kovu na povrchu scintilačního stínítka zabraňuje růstu povrchového náboje bránícímu volnému dopadu iontů. Fotonásobič je také velmi často používaným detektorem a disponuje vyšší životností.

### 3.2.5. Identifikace sloučenin v hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní spektra (*obr. 13*) jsou vždy uváděna v normalizovaném tvaru, což znamená, že nejintenzivnějšímu píku ve spektru je přiřazena 100% relativní intenzita. Intenzity ostatních píků spektra se následně dopočítají. Tento normalizovaný tvar je používán jak pro grafickou tak pro tabelární formu. Na ose *x* je vynesena poměr hmotnosti a náboje (*m/z*). Náboj je až na výjimky, kterou je ionizace elektrosprejem, roven jedné, z čehož plyne, že hodnota na ose *x* odpovídá molární hmotnosti. Na ose *y* je vynesena relativní intenzita v %. Pro sektorové přístroje se uvádí chyba do  $\pm 0,2$  absolutních jednotek nebo do  $\pm 10$  % relativních, přičemž platná je větší chyba [11].



*Obr. 13: Záznam hmotnostního spektra p-methylbenzoové kyseliny získaného elektronovou ionizací [11]*

Obecný postup **interpretace** spekter získaných EI zahrnuje následující body [11, 12]:

- určení molekulové hmotnosti ( $M_R$ ), což spočívá v nalezení molekulového iontu. Tím zpravidla, ne však bezpodmínečně, bývá ion s nejvyšší hodnotou *m/z* ve spektru, pokud se neberou do úvahy izotopické píky. Při EI ionizaci musí mít molekulový ion lichý počet elektronů a obvykle poskytuje logické ztráty menších neutrálních molekul nebo radikálů.
- pokud je možnost použít měření s vysokým rozlišením, následuje odhad elementárního složení molekuly, počet dusíků, halogenidů, uhlíků, případně kyslíků a míst nenasycenosti.
- důležité je také rozpoznání aromatické, alifatické, příp. další charakteristické série.

- následně se shromáždí získané informace a na jejich základě se navrhuje potenciální struktury či podstruktury molekuly. Za jednoznačné potvrzení struktury lze považovat až porovnání spektra identického standardu a analyzované látky za stejných podmínek, což bývá v praxi často problematické, tak alespoň porovnání spektra s knihovnou spekter.

Pro smysluplnou interpretaci spekter je nutné znát základní způsoby štěpení vazeb [11, 12]:

- **homolytické štěpení**, kdy z dvouelektronové vazby získají oba vznikající fragmenty po jednom elektronu.

- **heterolytické štěpení**, kdy z dvouelektronové vazby získá oba elektrony jeden fragmentový ion.

- **přesmykové reakce**, kdy dochází k vytvoření nové vazby na jiný atom a zániku jiné vazby a následnému uvolnění neutrálního fragmentu. Nejznámější je asi McLaffertyho přesmyk.

V hmotnostní spektrometrii rozlišujeme několik typů skenů [11, 12]:

- **základní sken** je změření hmotnostního spektra v celém studovaném rozsahu  $m/z$ .

- **sken produktových iontů** se uskutečňuje změřením MS/MS spektra z vybraného prekurzoru.

- **skenem prekurzorů** zjistíme pro vybraný fragmentový ion původní ion prekurzoru, ze kterého fragmentací vznikl.

- **skenem neutrálních ztrát** zjišťujeme charakteristické dvojice iontů prekurzorů a produktů, u kterých dochází k odštěpení vybrané hmotnostní ztráty, např.  $\Delta m/z = 18$  je charakteristické pro odštěpení vody.



- **selektivním záznamem jednoho nebo více iontů** (SIM) měříme pouze závislost signálu vybraného iontu na čase. Tím, že je zvolen pouze jeden nebo pár iontů se velmi zvýší citlivost.

- při **selektivním záznamu jedné nebo více reakcí** (SRM) prvním analyzátozem vybereme ion prekurzoru, který následně v kolizní cele podrobíme fragmentaci a sledujeme pouze vybraný fragmentovaný ion. Spolu se SIM jsou vhodné zejména pro stopovou analýzu HPLC-MS nebo GC-MS. Nejedná se vlastně o měření hmotnostních spekter, ale pouze o záznam signálu odpovídající námi vybranému známému iontu nebo produktovému fragmentovému iontu při SRM.

### 3.2.6. Specifika spojení HPLC-MS

Spojení HPLC-MS přináší několik nesporných výhod. Lze takto analyzovat širokou paletu analytů od nízkomolekulárních po vysokomolekulární jako např. biopolymery, přes látky nepolární ke sloučeninám iontového charakteru. Hmotnostní detektor poskytuje nejúplnější identifikaci ze všech HPLC detektorů, a to jak informace o molární hmotnosti tak poskytnutí informací o struktuře. To souvisí s vysokou selektivitou, což umožňuje rozlišit i chromatograficky nerozdělené nebo pouze částečně rozdělené složky. Spolu s vysokou separační silou kapalinové chromatografie tvoří selektivita a citlivost hmotnostního detektoru velice efektivní spojení. Jedná se však o nejdražší z dostupných HPLC detektorů [11, 12].

Jak bylo již řečeno, některé typy analyzátorů umožňují provádět tzv. tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS nebo-li MS<sup>n</sup>). Je to zařízení, kde jedna z částí slouží k izolaci iontu, který nás zajímá, a druhá část poskytuje produktové ionty. Tandemová hmotnostní spektrometrie vznikla mimo jiné i proto, že ionizační techniky nejběžněji spojované s HPLC jsou takzvané měkké techniky, které většinou poskytují pouze molekulový ion s velmi minimální fragmentací.

Relativně odlišnou metodou pro zvýšení fragmentace při použití ESI nebo APCI je uskutečnění **kolizně indukované disociace** (CID) ještě v iontovém zdroji, tzv. in-source CID. Ionty přítomné v daný moment v iontovém zdroji jsou podrobeny

kolizní aktivaci bez možnosti výběru iontu prekursoru. Z toho vyplývá, že pokud jsou přítomny i nějaké nečistoty, jsou podrobeny kolizi také. Zatímco při běžné fragmentaci provedené v MS/MS uspořádání je podroben kolizní aktivaci pouze vybraný ion. Nejčastěji je kolize uskutečněna srážkami s inertním tzv. terčovým plynem. Srážkami dochází k rozpadu iontu na fragmentové ionty, jejichž hmotnostní spektrum změříme [11, 12].

Je samozřejmé, že spojení HPLC-MS má i své požadavky na systém kapalinového chromatografu. Z hlediska MS, musí pumpa poskytovat stabilní průtok v rozsahu od 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  do 2  $\text{ml}/\text{min}$ , v závislosti na použitém interface a průměru kolony. Dále musí pumpa poskytovat bezpulsní tok, protože případné pulsy zanechávají stopu na záznamu total ion current (TIC). Nejpoužívanější je, ve spojení s MS, pístová pumpa.

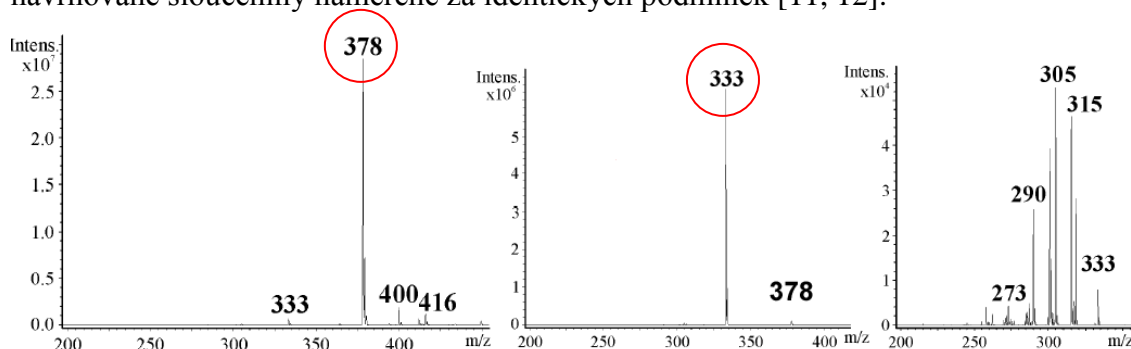
Injektor bývá nejčastěji v podobě dávkovací smyčky definovaného objemu. Z hlediska spojení s MS by bylo problematické vpravení vzduchové bubliny do systému, což by mohlo vyústit v nestabilní odezvu hmotnostního detektoru.

Co se týká stacionární fáze, jsou omezení minimální. Je jen nutné vyvarovat se poškození chromatografické kolony např. použitím nevhodného pH, kdy může dojít jak ke zvýšení šumu pozadí tak samozřejmě ke snížení chromatografické účinnosti.

Požadavky na mobilní fázi jsou již klíčové, protože až na výjimky se mobilní fáze přímo účastní ionizačního procesu. Složení mobilní fáze, přesněji, parametry jako bod varu, povrchové napětí či vodivost, mají velký efekt na účinnost interface. Je logické, že prvotní složení mobilní fáze určuje chromatografie. V případě nutnosti lze pro zlepšení odezvy použít postkolonový přídavek vhodného eluentu či aditiva T-kusem. Samozřejmostí by mělo být používání reagentů, vody a organických rozpouštědel v nejvyšší kvalitě. Pro RP-HPLC se jako organická rozpouštědla používají bez větších potíží methanol nebo acetonitril, ale lze použít i ethanol či 2-propanol. Nejlepší odezva obvykle bývá při vysoké koncentraci organického rozpouštědla cca 70 – 90 %. Při vysokém, až 100%, obsahu vody je nutné zvýšit průtok a teplotu sušícího a zmlžujícího plynu, což snižuje citlivost. Problémy mohou nastat při použití 100% acetonitrilu, kdy dochází k tvorbě grafického uhlíku na výbojové elektrodě a je nutné její časté čištění. Systémy NP-HPLC jsou většinou špatně kompatibilní s ESI, o něco

lépe s APCI. Do mobilní fáze se musí přidávat alespoň 5 % proton-donorního rozpouštědla, ve 100% hexanu nelze získat signál. Měla by zde být určitá snaha vyhnout se halogenovaným rozpouštědlům, která zhoršují stabilitu signálu. Jelikož v interface dochází k odstranění mobilní fáze, je vyžadováno, aby byly používány těkavé kyseliny (kyselina mravenčí, octová), baze (hydroxid amonný, triethylamin) i soli pro přípravu pufrů (octan amonný atd.). Je tedy nutné vyhnout se všem netěkavým či příliš koncentrovaným roztokům. Důležité je důkladné odplynění mobilní fáze. Některé LC-MS interface jsou designovány tak, že pouze malá část toku mobilní fáze je pumpována přímo do iontového zdroje. Jedním z takovýchto provedení je „Z-sprej“, kde je mobilní fáze sprejována ortogonálně k iontovému zdroji [11, 12].

**Interpretace spekter** získaných spojením HPLC-MS a měkkých technik je mírně odlišná od interpretace spekter získaných EI. Zásadní rozdíl spočívá ve vzniku iontů se sudým počtem elektronů a v téměř minimální fragmentaci iontů. Proto se k podrobnější strukturní analýze používá  $MS^n$ , jak již bylo zmíněno výše (obr. 14). Určení  $M_R$  lze podle přítomnosti charakteristických aduktů např.  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  nebo aduktů s mobilní fází, přičemž typ a relativní intenzita aduktových iontů velmi závisí na složení mobilní fáze a obsahu solí v eluentu či vzorku. U techniky HPLC-MS je nutné vždy ověřit, zda pozorované ionty patří do spektra daného píku a nepochází z šumu, paměťového efektu předchozích píků či vzorků atd. Důležité je konfrontovat retenční chování sloučeniny s navrhovanou strukturou. Jelikož, až na výjimku biomolekul, neexistují knihovny ESI/APCI, mělo by, pro jednoznačné potvrzení identity, dojít k porovnání získaného neznámého MS spektra s identickým standardem navrhované sloučeniny naměřené za identických podmínek [11, 12].



Obr. 14: Záznam hmotnostního spektra  $MS^1$  až  $MS^3$  dimefluronu získaného ionizací elektrosprejem v kladném módu [11]

Zcela obecně lze říci, že **kvantifikace** s využitím hmotnostní spektrometrie se neliší od kvantifikace za využití ostatních HPLC detektorů. Hmotnostní spektrum obsahuje velký počet  $m/z$  signálů a všechny z nich mohou sloužit ke kvantifikaci toho daného iontu. Pokud se ale použije úzké spektrum  $m/z$  hodnot, dojde ke zvýšení citlivosti, protože na monitorování daného iontu zbude delší časový úsek. Jak bylo již řečeno, MS disponuje vysokou selektivitou. Tato selektivita mimo jiné umožňuje použití izotopicky značených analytů jako vnitřních standardů a spolu s vysokou citlivostí poskytují velmi přesná a správná kvantitativní stanovení. Značené izotopy mají jinou  $m/z$  hodnotu, ale stejnou chemickou strukturu, tudíž mají stejné chemické vlastnosti. Toho se využívá např. při úpravě vzorku před analýzou, kdy jsou stejnou měrou extrahovány do rozpouštědla či adsorbovány na povrch kolonky [11, 12].

## 3.3. Elektroanalytické metody

### 3.3.1. Základní elektroanalytické principy a metody

Elektrochemické analytické metody jsou založeny na měření některé z elektrických veličin. Příkladem měřené veličiny může být napětí na elektrodách, procházející elektrický proud, spotřebovaný náboj, vodivost roztoku nebo relativní permitivita. Podmínkou je, aby měřená veličina byla jednoznačně závislá na koncentraci stanovované látky [23, 24].

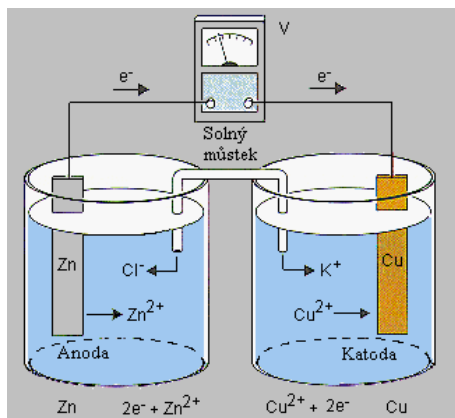
Elektrochemické analytické metody lze následovně rozdělit na:

- **metody založené na redoxní reakci**
  - **článkem neprochází elektrický proud**
  - **článkem prochází elektrický proud**
    - obsah analytu ve vzorku mění elektrolýzou pouze zanedbatelně
    - metody založené na kvantitativní přeměně analytu
- **metody založené na měření určité elektrické vlastnosti roztoku.**

Elektrochemicky je možné detegovat širokou paletu látek. V obecné rovině lze říci, že elektrochemická aktivita je závislá na přítomnosti elektroaktivní funkční skupiny. Sloučeniny, které snadno podléhají oxidaci, obsahují skupiny s volným elektronovým párem. Mezi sloučeniny, které lze elektrochemicky stanovit lze jmenovat látky ze skupin antioxidantů, sacharidů, biogenních aminů, návykových látek, pesticidů, léčiv, vitaminů či enkefalinů. Pokud látka sama o sobě není elektrochemicky aktivní lze případně použít derivatizaci [25].

Mnoho elektrochemických reakcí je reversibilních. Reversibilní redoxní pár se vyskytuje pouze pokud je oxidovaná a redukovaná forma sloučeniny v rovnováze. Na začátku elektrochemické reakce je přítomna pouze jedna z forem redoxního páru. S průběhem elektrochemické reakce začínají být přítomny obě dvě formy. Reverzibilita redoxního páru není nutnou podmínkou pro elektrochemickou detekci. Kritickým faktorem je fakt, že proud musí být proporcionální ke koncentraci [25].

Základním prvkem elektrochemických analytických metod **založených na redoxní reakci je elektrochemický článek (obr. 15).**



Obr. 15: Schéma elektrochemického článku [26]

Elektrochemický článek je tvořen nejméně dvěma elektrodami, které jsou charakterizovány elektrodovým potenciálem. Obě elektrody jsou zde fyzicky odděleny a přenos elektronů je mezi nimi umožněn vnějším vodičem. Elektrodový potenciál jednotlivých elektrod nelze měřit, měřitelný je pouze potenciálový rozdíl mezi dvěma elektrodami [26].

Obecně lze říci, že elektroda je kontakt dvou nebo více navzájem nemísitelných vodivých fází, na jejichž rozhraní dochází k redoxním reakcím nebo k výměně elektricky nabitých částic [27]. Výsledkem elektrodové reakce je elektrodový potenciál popsáný Nernstovou rovnicí:

$$E = E^0 + R \cdot T / (z \cdot F) \cdot \ln a_{M^{n+}}$$

kde  $E$  ..... elektrodový potenciál

$E^0$  ..... standardní elektrodový potenciál

$R$  ..... molární plynová konstanta (8,314 J/K·mol)

$T$  ..... termodynamická teplota

$z$  ..... počet elektronů zahrnutých v elektrodové reakci

$F$  ..... Faradayova konstanta (96 485 C/mol)

$a_{M^{n+}}$  ... aktivita iontů  $M^{n+}$  v roztoku.

Elektroda může být buď kladná – anoda, na které dochází k oxidaci (ztráta jednoho nebo více elektronů) nebo záporná – katoda, na které probíhá redukce (příjem jednoho nebo více elektronů). Elektrochemický článek se může chovat jako **galvanický článek**,

kde redoxní reakce probíhají spontánně, napětí  $\Delta E$  je větší než 0. Tímto článkem neprochází elektrický proud, a proto na elektrodách, na elektrické dvojvrstvě, dochází pouze k výměnným reakcím. Elektrochemický článek může také pracovat jako **elektrolyzér**. Reakce v tomto článku neprobíhají samovolně,  $\Delta E$  je menší než 0. Článku je tedy nutné dodávat energii z vnějšího zdroje a směr pohybu nabitých částic je opačný než u galvanického článku [23, 28].

V případě elektrochemického článku prochází elektrický proud jednak pevnou fází (elektronová vodivost) a dílem roztokem elektrolytu (iontová vodivost, která je, narozdíl od elektronové, spojena s transportem látky – iontů – z roztoku k povrchu tuhé fáze). Na jejich rozhraní dochází při průchodu k **elektrodovému procesu**, který je spojen s konverzními reakcemi, při nichž se mění složení článku. Elektrodový proces lze rozčlenit na několik základních fází. Transport látky z roztoku k povrchu tuhé fáze, tedy přesun hmoty, která podlehe elektrochemické reakci, což se děje difúzí, konvekcí či migrací. Dalším krokem je reakce přenosu náboje, čili transfer jednoho nebo více elektronů, což je podstatou vlastní elektrochemické reakce. Poslední etapou je odstranění produktů elektrochemické reakce z povrchu elektrody opět do roztoku. Jelikož tyto přesuny reaktantů či produktů k nebo od povrchu elektrody jsou mnohem pomalejší než vlastní elektrochemická reakce, jsou to limitující kroky ovlivňující efektivitu. Pokud tedy některý z kroků není dostatečně rychlý, prochází článkem nižší proud. Pokud na některé z elektrod nemůže elektrodový proces probíhat, článkem proud neprotéká. V obou případech dochází k polarizaci elektrod [26, 27].

Používané elektrody lze rozdělit dle následujícího schématu:

- **indikační elektrody**
  - **elektrody prvního druhu:** Jedná se o kov ponořený do roztoku svých iontů, např. stříbrná elektroda při argentometrických titracích. Její potenciál je závislý na aktivitě vlastních iontů dle Nernstovy rovnice (viz výše). Do této skupiny lze zařadit i vodíkovou elektrodu, což je platinový plíšek, elektrolyticky potažený platinovou černí, sycený plynným vodíkem a ponořený do roztoku obsahujícího vodíkové ionty. Vodíková elektroda je využívána pro měření pH [2].

○ **elektrody založené na rovnováze mezi oxidem kovu a kovem:** Tyto elektrody jsou mechanicky odolné a jednoduché. Jejich potenciál je závislý na pH roztoku, ale tato závislost nebývá lineární. Redoxní reakce se účastní velmi tenká vrstvička oxidu na povrchu elektrody. Příkladem mohou být elektrody antimonové, bismutové nebo telurové [26, 28].

○ **elektrody oxidačně – redukční:** Zprostředkovávají výměnu elektronů mezi oxidovanou a redukovanou formou. Tento druh elektrod slouží k měření redoxního potenciálu, který popisuje Petersova rovnice [2]:

$$E = E^0 - R \cdot T / (z \cdot F) \cdot \ln a_{\text{red}} / a_{\text{ox}}$$

kde E ..... redoxní potenciál

$E^0$  ..... standardní elektrodový potenciál

R ..... molární plynová konstanta (8,314 J/K·mol)

T ..... termodynamická teplota

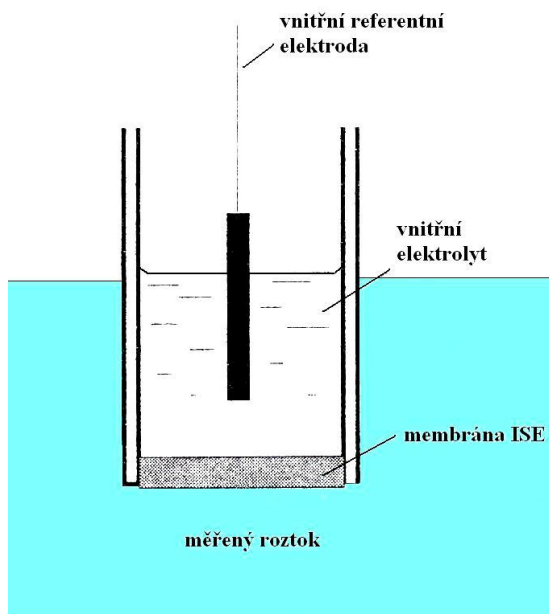
z ..... počet elektronů zahrnutých v elektrodové reakci

F ..... Faradayova konstanta (96 485 C/mol)

$a_{\text{red}}$  ( $a_{\text{ox}}$ ) ... aktivita redukované (oxidované) formy látky v systému.

○ **elektrody membránové:** Jsou tvořeny membránou, která zcela odděluje dva roztoky. Jak membrána tak roztoky obsahují určitý ion, který se může účastnit výměnné reakce mezi roztokem a membránou. Jejich potenciál je určován výměnou iontů mezi membránou a roztokem. Membránové elektrody jsou základem **iontově-selektivních elektrod (ISE)** (*obr. 16*).



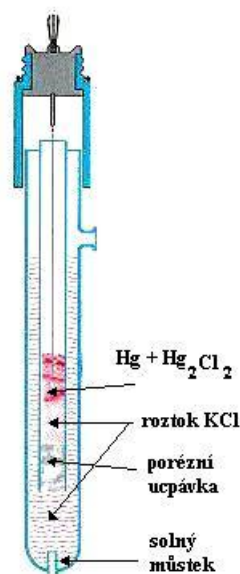


Obr. 16: Schéma iontově selektivní elektrody [26]

ISE lze rozdělit na elektrody s pevnou a kapalnou membránou a na krystalové iontově selektivní elektrody. Tuhé membrány tvoří halogenidy stříbrné, sulfidy dvojmocných kovů, fluoridy kovů vzácných zemin, šťavelan vápenatý, síran barnatý atd. Membrána obvykle jeví odezvu na oba ionty. Tuhá membrána má tvar kruhové destičky vybroušené z monokrystalu látky, z lité popř. slisované látky nebo z krystalické látky smíchané s pojivem. Vzniklý disk se dokonale zatmelí na konec skleněné trubice, do které se nalije vnitřní roztok a umístí vnitřní elektroda. Do této skupiny lze zařadit i skleněnou elektrodu pro měření pH. U tohoto druhu elektrod se lze setkat s tzv. kyselou nebo zásaditou chybou. Jedná se o odchylku od nernstovské odezvy při velmi nízkých, respektive vysokých hodnotách pH. Existují také elektrody založené na jiných druzích skel, která jsou citlivá na  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ . Obecně se ISE s tuhou membránou používají např. pro stanovení  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ . U elektrod s kapalnou membránou je aktivní komponenta rozpuštěna v hydrofobním viskózním rozpouštědle (dioktylfenylfosfát, dekanol, difenylether, nitrobenzen) a je imobilizována v polymerním nosiči (PVC). Aktivními komponentami bývají iontoměniče nebo neutrální nosiče iontů tvořící se stanovovaným iontem komplex (soli kyseliny dialkylfosforečné, tetrafenylboritan, kvartérní aminy, komplexy 1,10-fenantrolinu, valinomycin a jiná antibiotika). Tyto elektrody se používají ke stanovení iontů  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ . Pro stanovení močoviny se používají elektrody s imobilizovaným enzymem ureázou. Zvláštní skupinu tvoří plynové elektrody, které se používají

např. pro stanovení kyselých plynů ( $\text{CO}_2$ ). Krystalové iontově-selektivní elektrody lze rozdělit na monokrystalické (fluoridová  $\text{LaF}_3$ ), polykrystalické ( $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ) a směsné ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^-$ ). Zvláštní kategorií ISE jsou tzv. coated wire elektrody, které jsou tvořeny drátkem z inertního kovu (Pt, Au) pokrytého polymerem obsahující vazebná místa pro analyt. Vznikají polymerováním látky, která v molekule obsahuje jak polymerizovatelnou skupinu, tak citlivou receptorovou skupinu. Vzniklý povlak je pak citlivý na ionty, na které je citlivá receptorová skupina [9, 26].

- **referentní:** Někdy také nazývané jako **elektrody druhého druhu**, jsou kovové elektrody pokryté vrstvou málo rozpustné soli příslušného kovu, ponořené do elektrolytu, který má společný anion s málo rozpustnou solí. Potenciál elektrody druhého druhu je řízen koncentrací těchto anionů. Do této skupiny lze zařadit kalomelovou elektrodu ( $\text{KCl}$  (sat),  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  (s),  $\text{Hg}$ ) (obr. 17), argentchloridovou ( $\text{KCl}$  (sat),  $\text{AgCl}$ ,  $\text{Ag}$ ), merkurosulfátovou ( $\text{K}_2\text{SO}_4$  (sat),  $\text{Hg}_2\text{SO}_4$  (s),  $\text{Hg}$ ) [2, 26].



Obr. 17: Schéma kalomelové referentní elektrody [26]

- **pomocné:** Jsou to elektrody, které jsou obvykle tvořené platinovým nebo palladiovým plíškem, mají velký povrch, jsou téměř nepolarizovatelné a od analyzovaného roztoku jsou odděleny skleněnou fritou. Pomocné elektrody bývají umístěny co nejbližší k pracovní elektrodě. Jejich umístění, tvar a velikost hrají důležitou roli ve výsledném signálu a šumu, u průtokových metod v počtu a velikosti artefakt píků. Nabízejí jakýsi přenosový kanál pro elektrony, tedy dodávají nebo odvádí

ekvivalentní množství elektronů, které se účastní elektrodové reakce na pracovní elektrodě. Požadavky na pomocné elektrody jsou daleko menší než požadavky kladené na pracovní nebo na referentní elektrodu. Proud tedy protéká mezi pracovní a pomocnou elektrodou a skutečný potenciál pracovní elektrody se měří proti referentní elektrodě za bezproudového stavu [25].

Na několika následujících stránkách bych se ráda věnovala způsobům, metodám a instrumentaci elektrochemických analytických měření.

**Rovnovážná potenciometrie** se řadí mezi metody založené na redoxní reakci, při nichž článkem neprochází elektrický proud. Metoda byla objevena Nernstem na konci 19. století. Objev této metody měl velký význam pro fyzikální chemii (měření disociačních konstant, rovnovážných konstant, konstant stability) a dodnes se využívá pro měření potenciálového rozdílu mezi indikační a referentní elektrodou a sleduje se závislost napětí na aktivitě (koncentraci) určovaného iontu. Měření se provádí za rovnovážného, bezproudového stavu – tedy v galvanickém článku. Potenciál měrné elektrody závisí na aktivitě stanovovaného iontu, referentní elektroda je charakterizována konstantním potenciálem [26].

**Polarografie a voltametrie** patří mezi metody založené na redoxní reakci, při kterých elektrický proud vzorkem prochází, ale obsah analytu ve vzorku se mění elektrolýzou pouze zanedbatelně. Objev polarografie je spojen se jménem Jaroslava Heyrovského, který za to byl v roce 1959 oceněn Nobelovou cenou za chemii. Polarografie je *de facto* voltametrie používající, jako pracovní elektrodu, rtuťovou kapkovou elektrodu. Článek sestává z polarizovatelné pracovní elektrody a z nepolarizovatelné referentní elektrody. Metody jsou založeny na měření polarizačních křivek, což jsou závislosti proudu tekoucího pracovní elektrodou na jejím potenciálu. Pokud v roztoku není elektrochemicky aktivní látka (oxidovatelná nebo redukovatelná) je pracovní elektroda polarizována a proud jí neprochází. Naopak, pokud je takováto látka v roztoku přítomna, dochází k depolarizaci elektrody. Velikost katodického nebo anodického proudu je mírou koncentrace depolarizátoru. Měření lze provádět v dvuelektrodovém nebo tříelektrodovém zapojení. Nevýhodou prvního zmiňovaného je, že potenciál pracovní elektrody není přesně znám, protože při průchodu proudu se část vloženého napětí ztratí. Proto se v praxi používá většinou tříelektrodové zapojení, kdy je článek

doplňen o pomocnou elektrodu. Ve voltametrické se nejčastěji používají elektrody platinové, zlaté nebo uhlíkové ve tvarech disku, plíšku, vlákna nebo drátku, pro polarografii jsou typické rtuťové kapající elektrody. Měření jsou prováděna v klidném (analyt je dopravován difúzí) nebo míchaném roztoku (rotace elektrody, transport konvekci) [26, 29].

Polarografie (*obr. 18*), jak bylo již zmíněno, je metoda, která využívá, jako pracovní elektrodu, rtuťovou odkapávající elektrodu, která bývá ve většině případů zapojená jako katoda. Rtuť se přivádí ze zásobníku kapilárou ( $\varnothing = 0,05$  mm) do analyzovaného roztoku. Je nutné upravovat výšku rtuťového sloupce, aby se kapka odtrhávala v intervalu 2 – 5 sekund. Odkapáváním rtuti se povrch elektrody neustále obnovuje. Elektrodu lze polarizovat v intervalu od  $-2,6$  V do  $+0,4$  V. Na elektrodě se vylučuje velmi malé množství analytu, složení roztoku se tedy v průběhu analýzy prakticky nemění. Koncentrace stanovované v analytu se pohybují okolo  $10^{-4}$  mol/l. K roztoku se přidává základní elektrolyt (chlorid, dusičnan atd.) a pro maskování rušících iontů lze přidat komplexotvorné látky. Před vlastní analýzou je nutné nechat probublat inertním plynem za účelem odstranění kyslíku, který má rušivý vliv na analýzu. Vlastní polarografický proces lze rozdělit na několik fází. V první části dochází jen k pozvolnému zvýšení proudu při zvyšujícím se napětí. V této části je kapková rtuťová elektroda polarizována a elektrodový děj na ní neprobíhá. Velikost proudu je určena tzv. kapacitním (nabíjecím) proudem. Kapacitní proud se zvyšuje s narůstáním kapky a s jejím odkápnutím opět klesá. Druhá část polarografické vlny je charakterizována mocným narůstáním intenzity proudu, které nastává při určitém, pro každou elektroaktivní látku definovaném, napětí. Za přítomnosti depolarizátoru v roztoku dochází při tomto tzv. rozkladném napětí k elektrodové reakci, a tedy k depolarizaci rtuťové kapkové elektrody. Vlivem této reakce se v okolí elektrody snižuje koncentrace depolarizátoru, který se doplňuje pouze difúzí. Následující třetí část polarografického děje je charakterizována tím, že i při zvyšujícím se napětí se intenzita proudu téměř nemění. Je to způsobeno tím, že veškerý depolarizátor v bezprostřední blízkosti elektrody ihned podléhá elektrodovému ději. Z analytického hlediska je důležitý limitní difúzní proud depolarizátoru. Velikost tohoto proudu udávajícího výšku polarografické vlny, je dána rychlostí difúze depolarizátoru k elektrodě a dle Ilkovičovy rovnice je přímo úměrná koncentraci analytu v systému [2, 26]:

$$i_d = 605 \cdot z \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \cdot c$$

kde  $i_d$  ... limitní difúzní proud

$z$  ... počet elektronů vyměňovaných při elektrodové reakci

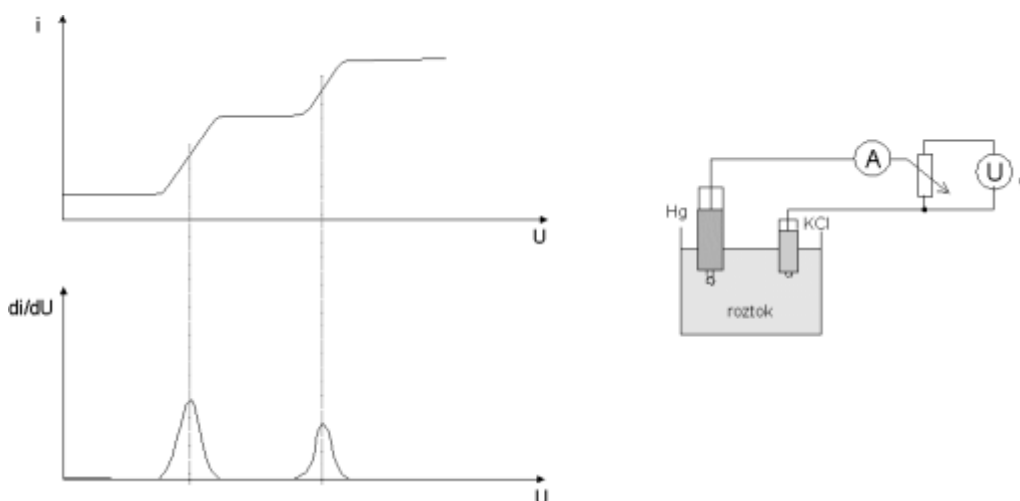
$D$  ... difúzní koeficient depolarizátoru ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )

$m$  ... průtoková rychlost rtuti ( $\text{mg}/\text{s}$ )

$t$  ..... doba trvání kapky (s)

$c$  ..... molární koncentrace ( $\text{mmol}/\text{l}$ ).

Je možné využít metodu standardního vzorku, metodu kalibrační křivky nebo standardního přídatku. Identifikace látky je umožněna půlvlnovým potenciálem, který je pro každou polarograficky aktivní látku konstantou. Polarograficky lze stanovit téměř všechny kovy, některé sloučeniny obsahující dusík či kyslík. Uplatnění polarografie se nachází v oblastech organické, farmaceutické, potravinářské či enviromentální analýzy.

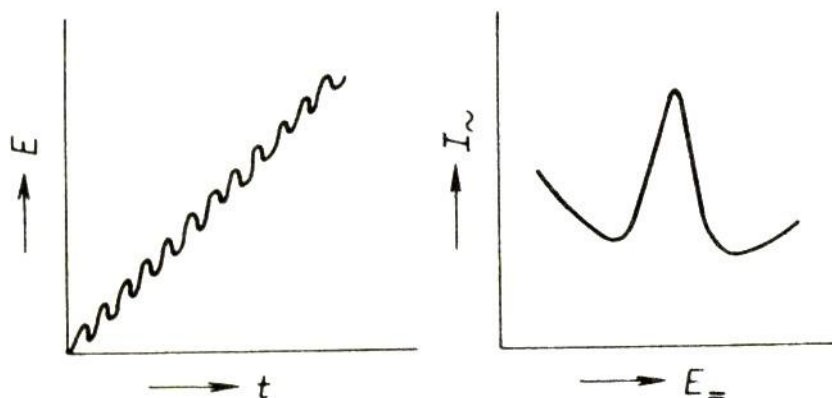


Obr. 18: Polarografický záznam a schéma zapojení polarografu [30]

Voltametrie je podobně jako polarografie založena na měření polarizačních křivek. Tato metoda využívá následující druhy elektrod. Visící rtuťová elektroda, se kterou lze pracovat v intervalu  $-2,6$  do  $+0,4$  V. Platinové či zlaté elektrody, které bývají buď ve formě plíšku nebo drátku, nejčastěji však ve formě rotující diskové elektrody s průměrem 1 - 10 mm. Tento typ elektrod může být v kyselém prostředí polarizován až k hodnotě  $+1,5$  V. Speciálním příkladem je rotující disková elektroda s prstencem, kdy okolo elektrodového disku je umístěn prstenec pracující při odlišném potenciálu. Na prstenci lze např. generovat sloučeninu, která se následně na disku deteguje. Dalším, velmi často používaným, typem elektrod je uhlíková pastová elektroda. Jedná se

o práškový uhlík rozptýlený v hydrofobní kapalině, které spolu vytváří elektricky vodivou pastu. Výhodou je obnovování čistého povrchu setřením části elektrody, což není možné u elektrod vyrobených ze skelného uhlíku [26, 29].

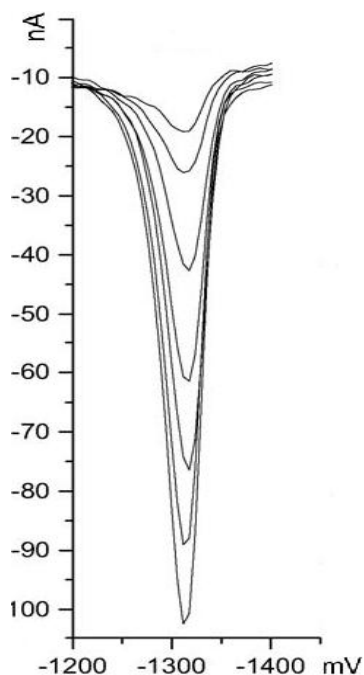
Mezi voltametrické metody lze zařadit i **voltametrické metody s eliminací nabíjecího proudu**, které se svým charakterem mohou řadit i mezi metody nestacionární. Při koncentracích depolarizátoru  $10^{-5}$  mol/l a nižších je hodnota limitního difúzního proudu srovnatelná s hodnotou kapacitního (interferujícího) proudu. Snížení detekční meze lze dosáhnout dvěma způsoby: zvýšením difúzního proudu, tedy provedením experimentu za nestacionárních podmínek nebo omezením vlivu kapacitního proudu, což se provádí elektronicky. Za krátkou zmínku stojí alespoň nejdůležitější zástupci těchto metod. Jedním z nich je „**tast**“ **polarografie**, u které se polarografický proud měří těsně před utržením kapky, kdy je difúzní proud maximální a nabíjecí proud minimální, čímž se dosáhne zvýšení citlivosti [26]. Dalším zástupcem je **A.C. polarografie** neboli polarografie se superponovaným sinusovým napětím (*obr. 19*).



*Obr. 19: Potenciálový program vkládaný na pracovní elektrodu a měřený signál v metodě A.C. polarografie [26]*

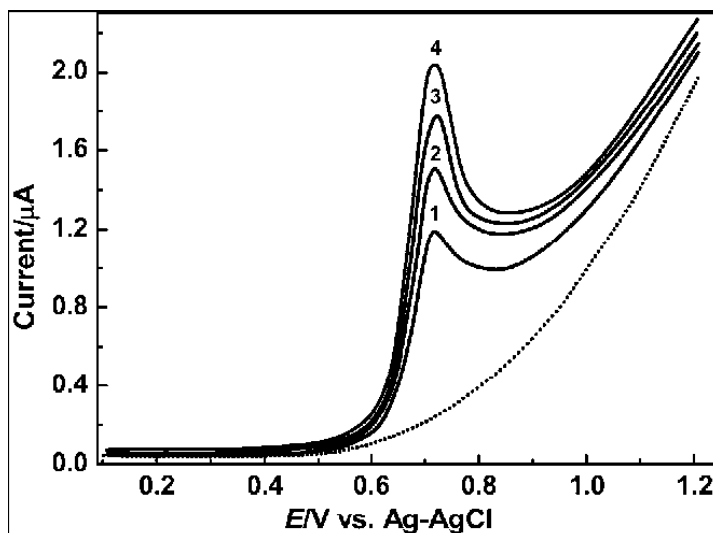
Elektroda je v tomto případě polarizována lineárně vzrůstajícím napětím, na které je superponováno střídavé napětí o frekvenci 50 - 60 Hz s konstantní nízkou amplitudou. Měřený signál se skládá z faradaických proudů a z nabíjecího proudu. Faradaické proudy se projeví jako maxima při vynášení závislosti proudu na stejnosměrném napětí. Stejně jako u běžné polarografie, poloha maxima definuje depolarizátor a jeho výška koncentraci [26]. Třetím významným zástupcem je **square wave voltametrie** (*obr. 20*). Jde o typ polarografie, kdy se na lineárně zvyšující se napětí vkládá pravoúhlý signál.

Proud se měří pouze těsně před změnou znaménka pravoúhlého signálu, kdy je nabíjecí složka proudu minimální [26, 29].



Obr. 20: Záznam měřeného signálu v metodě square wave voltametrie, odezvy různých koncentrací triprolidin hydrochloridu [69]

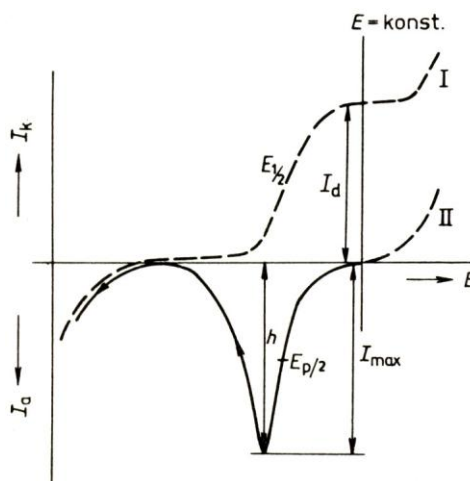
Tzv. **pulsní voltametrie** používá rtuťovou kapku. Na rozdíl od square wave voltametrie se před odkápnutím kapky na elektrodu vkládá jen jediný pravoúhlý potenciálový puls o trvání 40 – 50 ms. Velmi citlivou metodou je **diferenční pulsni voltametrie** (obr. 21). Principem této metody je měření rozdílů pulsů těsně před začátkem a koncem pulsu. Pokud se použije předchozí elektrolytická akumulace analytu na elektrodě, je možné stanovit koncentrace až  $10^{-12}$  mol/l [26, 29].



Obr. 21: Záznam měřeného signálu v metodě diferenční pulsní voltametrie, odezvy různých koncentrací domperidonu [50]

Jako poslední lze jmenovat **rozpuštěcí voltametrii** (obr. 22), také známou jako inverzní nebo stripping voltametrii. Průběh této metody lze rozdělit do dvou kroků. Prvním z nich je předběžné nahromadění analytu na povrchu elektrody, které se uskutečňuje v míchaném roztoku při konstantním potenciálu. Možností akumulace analytu je několik: akumulace kovů ve formě amalgámu nebo v podobě filmu, depozice v podobě málo rozpustné sloučeniny, adsorpce, extrakce nebo na základě iontové výměny. Jako druhý následuje rozpuštěcí krok, využívající polarografii nebo voltametrii s lineární změnou potenciálu. Měří se pak množství vyloučeného povlaku. Rozpuštěcí křivka má tvar píku, kdy potenciál poloviny vrcholu píku je charakteristikou analytu a výška či plocha píku odpovídá jeho množství. Nespornou výhodou je fakt, že často lze jediným měřením stanovit několik látek najednou, a to s velmi dobrou přesností a citlivostí [9, 26].

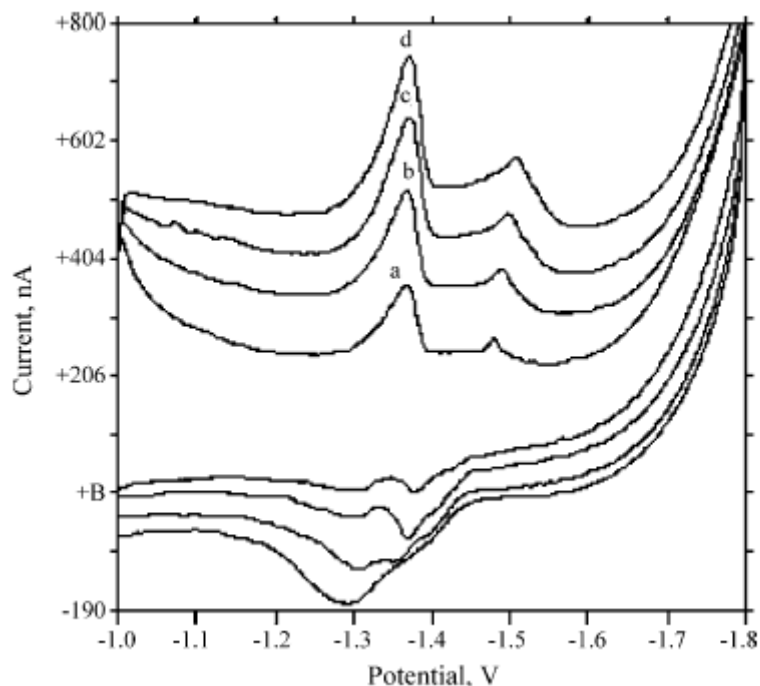




Obr. 22: Schématické znázornění postupu elektrochemické rozpouštěcí analýzy

(I - koncentrační fáze, II - rozpouštěcí fáze) [9]

**Nestacionární elektrochemické metody** jsou takové metody, kdy měřená veličina je funkcí času, tedy kdy se koncentrační gradient na povrchu elektrody mění s časem. Lze je rozdělit na dva základní druhy. U **potenciostatických** metod kontrolujeme potenciál a sledujeme časovou závislost proudu. Příkladem je **lineární voltametrie**. Jak název napovídá, u této metody potenciál lineárně narůstá, elektroda je polarizována rychlostí 10 – 1 000 mV/s, což způsobí vyčerpání depolarizátoru v okolí elektrody. Výsledným signálem je pík. Dalším příkladem je **cyklická voltametrie** (obr. 23). Tato metoda slouží především ke studiu reverzibility systému, protože sledujeme oxidaci i redukci analytu. Zredukovaný depolarizátor se následně reoxiduje nebo naopak. Výsledkem je katodicko-anodická křivka. Pokud je děj reverzibilní, získáme stejně vysoký katodický i anodický pík vzdálené o 57 mV. Se vzrůstající ireverzibilitou se píky vzdalují až jeden postupně vymizí [25, 26].



Obr. 23: Záznam měřeného signálu v metodě cyklická voltametrie, odezvy zafirlukastu při různých skenovacích rychlostech [72]

Druhým typem nestacionárních elektrochemických metod jsou metody **galvanostatické**, při kterých kontrolujeme proud a sledujeme závislost potenciálu na čase. Příkladem je tzv. **chronopotenciometrie**, neboli voltametrie s konstantním proudem. Na indikační a pomocnou elektrodu se vloží malý konstantní proud a sleduje se potenciál indikační elektrody proti elektrodě referentní jako funkce času. Elektroaktivní látka je transportována pouze difúzí. Zaznamenávají se tzv. E-t křivky, na nichž jsou patrné 3 intervaly: nabíjení elektrické dvojvrstvy, trvání elektrodové reakce, a s tím související přechodový čas, který je funkcí koncentrace analytu. Přechodový čas je doba, za kterou klesne koncentrace látky na povrchu elektrody z původní koncentrace na nulovou hodnotu. Poslední částí je úsek náležející nabíjení dvojvrstvy k potenciálu, kdy začne reagovat nový systém. Dalším příkladem galvanostatických metod je **oscilografická polarografie**. Na dvojici elektrod se aplikuje nízkofrekvenční střídavý proud a sledují se změny mezi nimi. Většinou je ještě navíc vkládán i stejnosměrný proud. Měřená závislost se sleduje na stínítku osciloskopu, poloha zářezu v grafu udává kvalitu depolarizátoru, hloubka zářezu naopak jeho množství [13, 26].

**Ampérometrie** je metoda odvozená od voltametrie, přičemž i instrumentace je shodná s voltametričkou. Stanovení analytu je založeno na velikosti proudu protékajícího pracovní elektrodou, na které je vložen konstantní potenciál. Ten je zvolen tak, aby elektrodou protékal limitní proud. Ampérometrie se často využívá jako způsobu detekce u separačních metod. Klíčovým požadavkem bývá malý vnitřní objem detektoru. Látky mohou být detegovány jak v plynném tak v kapalném stavu. Příkladem je Clarkův detektor, kde jsou elektrody odděleny semipermeabilní membránou, takže pouze plynné molekuly mohou projít k pracovní elektrodě, proto lze stanovit plyny i ve velmi složitých maticích, jako kyslík v krvi [13, 26].

**Titrace s polarizovatelnými elektrodami** jsou ve srovnání s vizuálními titracemi objektivnější a citlivější, navíc je lze úspěšně provádět jak v barevných tak v zakalených roztocích. Jejich relativní nevýhodou je složitější aparatura a delší doba provedení. **Ampérometrická titrace** je stanovení založené na měření limitního proudu, který je přímo úměrný koncentraci depolarizátoru. Po přidavku odměrného roztoku není nutné proměřovat celou polarizační křivku. Dostačující je registrace změn limitního proudu v závislosti na objemu přidaného odměrného roztoku při vhodně zvoleném potenciálu. Konec titrace se určuje jako průsečík přímek spojujících body, jež udávají hodnotu proudu před a po ekvivalenci. Tento druh indikace bodu ekvivalence se využívá u titrací vedoucích ke vzniku sraženiny nebo komplexu a titrací oxidačně - redukčních. **Potenciometrická titrace za konstantního proudu** je nepříliš rozšířená metoda. Nejčastěji používaná soustava je složená z platinové a kalomelové elektrody, přičemž na elektrody je vložen malý konstantní proud. Platí zásada, že je čím menší, tím přesněji lze odečíst konec titrace. Měří se potenciálový rozdíl mezi elektrodami. Při **biampérometrických titracích** se na polarizovatelné elektrody, nejčastěji platinové, vkládá napětí. Analytický signál je dán proudem, který protéká mezi elektrodami. Naopak při **bipotenciometrických titracích** se elektrody, také obvykle platinové, polarizují konstantním proudem a měří se potenciálový rozdíl mezi nimi. Všechny biampérometrické titrace lze provést i bipotenciometricky [2, 26].

Jak bylo již řečeno, výše zmíněné metody jsou metody, při kterých se obsah analytu ve vzorku mění pouze nepatrně. Na druhé straně existují elektrochemické metody založené na vyčerpávající elektrolýze, tedy metody založené na kvantitativní přeměně analytu. Sem lze zařadit **elektrogravimetrii** a **coulometrii**. Analyt v důsledku

elektrolýzy probíhající na pracovní elektrodě kvantitativně zreaguje na určitý produkt. Experimenty lze provádět buď za konstantního proudu nebo potenciálu. Tyto metody obecně vyžadují co největší plochu pracovní elektrody a co nejmenší objem vzorku. Elektrogravimetrie patří mezi nejstarší elektroanalytické metody. Při stanovení se elektrolýza využije k úplnému vyloučení analytu na pracovní elektrodě a určí se hmotnostní přírůstek této elektrody. Pracovní napětí je zvoleno tak, aby představovalo tzv. rozkladné napětí. Při hodnotě tohoto napětí dochází k rychlému nárůstu proudu a na elektrodách je možné sledovat vznik produktů elektrolýzy. **Elektrolýza za konstantního proudu** vyniká jednoduchým uspořádání experimentu. Potenciál pracovní elektrody postupně roste a náhle se prudce změní, jakmile limitní proud vylučovaného kovu klesne pod úroveň celkového elektrolytického proudu. Povlak vylučovaného kovu by měl být kompaktní a hladký a nesmí se odlupovat. Takto lze stanovit řadu kovů po elektrolýze na katodě, některé kovy lze stanovit ve formě oxidů oxidací na anodě. Při použití **elektrolýzy za konstantního potenciálu** lze dosáhnout elektrolytického oddělení stanovovaného kovu od jiných kovů, které se vylučují při negativnějším potenciálu. V průběhu elektrolýzy klesá exponenciálně elektrický proud. Elektrolýza se ukončí, když proud klesne na nepatrnou hodnotu [26, 29].

Coulometrická měření jsou založena na měření náboje, který je nutný k úplné přeměně stanovované látky. Podle Faradayova zákona je hmotnost látky vyloučené na elektrodě úměrná elektrickému náboji, který prošel článkem:

$$Q = z \cdot F \cdot m_a / M_a$$

kde Q ..... celkový přenesený náboj (C)

z ..... počet přenesených elektronů

F ..... Faradayova konstanta (96 485 C/mol)

$m_a$  .... hmotnost látky vyloučené na elektrodě

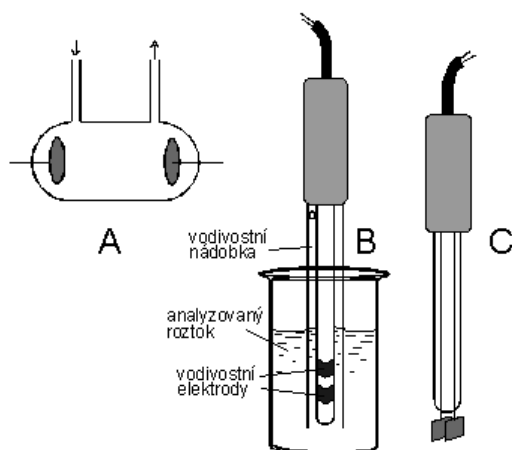
$M_a$  ... molární hmotnost látky.

Experiment lze uskutečnit za konstantního potenciálu pracovní elektrody nebo za konstantního proudu, pak hovoříme o coulometrické titraci. Podmínkou je, že elektrodová reakce na pracovní elektrodě musí vždy probíhat se 100% proudovým výtěžkem a vedle primární elektrodové reakce nesmějí probíhat žádné další elektrodové děje. Příkladem rušivé vedlejší reakce může být i rozklad rozpouštědla, tedy i vody. Konstantní napětí mezi pracovní a referentní elektrodou je v průběhu elektrolýzy

udržováno pomocí potenciostatu. Hodnota stabilizovaného proudu se v širokém rozmezí nastavuje na galvanostatu. Při uspořádání coulometrie za konstantního potenciálu lze elektrický náboj spotřebovaný při elektrolýze určit pomocí coulometrů. Příkladem může být coulometr na stříbro, kde se váží hmotnost stříbra vyloučeného na katodě, nebo coulometr na vodík a kyslík, kde se měří objem uvolněného kyslíku a vodíku atd. Moderní přístroje jsou řízeny elektronicky pomocí počítače. Obecně platí, že látky stanovitelné potenciometricky, voltametricky a elektrogravimetricky lze rovněž stanovit coulometricky. Ve srovnání s elektrogravimetrií, jsou výsledky získané potenciostatickou coulometrií stejně spolehlivé a navíc lze takto stanovit látky, které mají rozpustný produkt. Elektrolýza se obvykle provádí při potenciálu, při němž elektrodou prochází limitní proud elektrolyzované látky, který s časem exponenciálně klesá. Elektrolýza se ukončí ve chvíli, kdy je proud menší než 0,1 % počáteční hodnoty. Coulometricky lze rovněž sledovat reakční rychlost a mechanismus chemických reakcí souvisejících s elektrodovou reakcí. Jednou z aplikací coulometrie je stanovení počtu vyměňovaných elektronů. **Coulometrie za konstantního proudu** neboli coulometrické titrace lze rozdělit na **primární** a **sekundární**. Při primární coulometrické titraci reaguje látka elektrochemicky přímo na jedné z elektrod. V průběhu analýzy je analyt nejprve částečně elektrolyzován na pracovní elektrodě. Když odpovídající limitní proud klesne pod hodnotu proudu generačního, dojde ke změně potenciálu pracovní elektrody a z další látky se generuje činidlo, kterým se analyt dotitruje. Takto lze stanovit pouze několik málo látek. Při sekundární coulometrické titraci reaguje stanovovaná látka s činidlem vzniklým na jedné z elektrod z vhodného elektrolytu. Do roztoku s analytem se přidá nadbytek pomocné látky, jejíž elektrolýzou vzniká působením konstantního generačního proudu činidlo, které v roztoku chemicky reaguje s analytem. Generace činidla probíhá stále se 100% proudovou účinností a generuje se tak dlouho, dokud je v roztoku analyt, který s ním reaguje. V coulometrické nádobce se vedle pracovní a pomocné elektrody nachází ještě vhodný indikační systém. Z prošlého náboje se vypočítá množství vygenerovaného činidla a ze stechiometrie reakce se vypočítá množství analytu. Mezi výhody tohoto druhu titrací patří vedle možnosti titrovat málo stálými a těkavými činidly bez nutnosti standardizace činidel i snadná automatizace titrací a nižší meze detekce. Tento způsob titrace lze provést i jako nepřímou titrací nebo titrací s externě generovaným činidlem. Coulometrie se s výhodou využívá i při měření v průtokových systémech, kde ji lze využít k určování kinetiky reakcí a reakčních mechanismů. Významné je její využití jako způsobu detekce v průtokových

systemech např. v HPLC a ve FIA. Experiment lze uspořádat s jednou velkoplošnou elektrodou, kdy se referentní elektroda nachází v bočním rameni. Při pomalém průtoku je pak měřený proud úměrný koncentraci. Uspořádání se dvěma elektrodami je vlastně analogií elektrody s prstencem. Toto uspořádání disponuje vyšší citlivostí a selektivitou měření. Dalším způsobem je uspořádání v tenké vrstvě a může být buď statické nebo průtokové (HPLC, FIA) [13, 26]. Vzhledem ke zaměření této disertační práce bude coulometrii a následně pak elektrochemickým detektorům v průtokových systémech věnována zvláštní kapitola.

Vedle metod založených na redoxní reakci mají svůj opodstatněný význam i metody založené na měření určité elektrické vlastnosti roztoku. Jedná se především o dvě elektrické vlastnosti – konduktivitu a relativní permitivitu ( $\epsilon_r$ ). Jsou to veličiny tzv. aditivní. Měrná vodivost se jako veličina měří **konduktometrickými metodami**. Jelikož je nutné pracovat za podmínek nulové polarizace elektrod, používá se pro tato měření střídavý proud. Vodivost systému závisí především na počtu iontů v objemové jednotce, na jejich náboji a na jejich rychlosti pohybu směrem k elektrodám, přičemž analyticky nejvýznamnější je závislost koncentrační. Podle použité frekvence se konduktometrické metody dělí na **nízkofrekvenční**, pracující v rozsahu frekvencí  $10 - 10^4$  Hz. Hodnota vodivosti, při použití této metody, záleží na migraci iontů. Druhým typem jsou metody **vysokofrekvenční**, které pracují při frekvencích vyšších než  $10^6$  Hz. Při těchto frekvencích se migrační dráha iontů zkracuje, takže ionty nemohou dosáhnout své plné migrační rychlosti. Uplatňují se tedy pohyby nábojů související se vznikem, zánikem a orientací elektrických dipólů. Při frekvenci vyšší než  $10^{11}$  Hz nemohou trvalé dipóly sledovat změny pole a uplatňuje se pouze polarizace elektronová. Při vysokofrekvenčním měření systémů, které obsahují elektrolyty, se uplatňuje především ohmická vodivost, tedy konduktivita. Konduktometrické metody lze také dělit na metody **přímé** a na **konduktometrické titrace**. Měření se provádějí ve vodivostní nádobce (*obr. 24*).



Obr. 24: Příklady konstrukčních uspořádání vodivostních nádobek,  
 A – nádobka pro kontinuální měření v průtoku, B – nádobka ponorná  
 C – vodivostní elektroda [31]

Molární vodivost silného elektrolytu je nepřímo úměrná koncentraci, nejvyšší hodnoty dosahuje při koncentraci blízké nule. Tento stav nazýváme nekonečně zředění. Nejvyšší molární vodivosti mají vodíkové a hydroxidové ionty, což lze vysvětlit přenosem iontu na sousední molekulu vody prostřednictvím řetězce molekul vody. Měrná vodivost slabých elektrolytů je ovlivněna jejich disociačním stupněm, který roste se zředěním roztoku. S poklesem relativní permitivity rozpouštědla klesá disociace elektrolytu a vodivost se také zmenšuje. S rostoucí viskozitou klesá rychlost migrace iontů. Frakce proudu, kterou přenáší určitý ion se nazývá převodové číslo, jejich součet je pro složky roztoku roven jedné. Při **měření vodivosti střídavým proudem** se proud přivádí dvěma nepolarizovanými, nejčastěji platinovými elektrodami, které jsou pevně zataveny do vodivostní nádobky, aby se neměnila hodnota odporové konstanty nádobky. Hodnota odporové konstanty nádobky se určí pomocí čistého silného elektrolytu o známé měrné vodivosti, nejčastěji KCl. **Přímá konduktometrie** je metoda pro stanovení koncentrace elektrolytu měřením jeho vodivosti. Měřením vodivosti lze obvykle určit pouze celkovou koncentraci solí a iontů. Metoda je vysoce citlivá, lze jí určit i stopová množství elektrolytů ve vodě, což se využívá ke kontrole její čistoty. **Konduktometrická titrace** využívá změny vodivosti roztoku v závislosti na objemu přidávaného činidla v bodě ekvivalence. Pro neutralizační titrace platí, že molární vodivost  $H^+$  a  $OH^-$  je mnohem větší než vodivost jiných iontů. Analyticky se využívají především pro titraci velmi slabých kyselin a zásad. Lze je provádět i jako nevodné. Konduktometrické titrace lze provádět i jako srážecí. Při vzniku sraženiny se může

vodivost roztoku měnit natolik, že je možné určit bod ekvivalence konduktometricky. Reakce ale musí probíhat stechiometricky. Výhodou oproti potenciometrickému měření je menší ovlivnění hodnotou součinu rozpustnosti. Další variantou jsou titrace komplexometrické. Pokud titrovaný ion s iontem činidla vytváří málo disociovaný komplex, mění se vodivost roztoku po dosažení bodu ekvivalence jinak než před jeho dosažením. **Přímá vysokofrekvenční konduktometrie** využívá empirické kalibrační křivky pro stanovení koncentrace jednoduchých definovaných roztoků elektrolytů. Tato metoda je zvláště vhodná pro uzavřené soustavy. Příkladem využití je kontrola dialyzovaného krevního séra v zatavené ampuli. **Vysokofrekvenční titrace** se používají především u nevodných titrací a v případě vzniku sraženiny. Při vysokofrekvenčních měřeních nevodivých systémů, kdy je vliv konduktivity zanedbatelný, lze měření využít ke zjišťování relativní permitivity, případně jejích změn. Metoda pro její určování se nazývá **dielektrimetrie**. Jedná se o vysokofrekvenční měření při frekvencích  $10^6$  až  $10^7$  Hz. Relativní permitivita souvisí s molekulovou polarizací. Rozeznáváme dva druhy molekulové polarizace, oba jsou spojeny s pohybem elektrických nábojů. Při elektronové polarizaci dochází vlivem elektrického pole k posunu záporného náboje, zatímco molekuly s trvalými dipóly vykazují tzv. orientační molekulovou polarizaci. Hodnoty  $\epsilon_r$  jsou mimo jiné závislé na teplotě a na pracovní frekvenci. Při extrémně vysokých frekvencích (stovky MHz) dochází k jejímu poklesu, hovoříme o tzv. disperzní oblasti. Při dalším zvyšování frekvence orientační polarizace zaniká (tzv. anomální disperze) a dochází k absorpci vysokofrekvenční energie pole, která je kvantitativně charakterizována ztrátovým činitelem  $\text{tg } \delta$ . Hodnota  $\epsilon_r$  látek samozřejmě souvisí s jejich chemickou strukturou. Nesymetrické molekuly s polárními skupinami mají vysoké hodnoty relativní permitivity, pro organické sloučeniny jsou její hodnoty v rozsahu 2 – 100. Jelikož je relativní permitivita aditivní vlastností jednotlivých součástí roztoku, je tato metoda obvykle použitelná pouze ke kvantitativnímu hodnocení koncentrace jednoduchých binárních směsí, jejichž hodnoty  $\epsilon_r$  jsou značně odlišné. Závislost  $\epsilon_r$  je v ideálním případě lineární funkcí koncentrace složky, ale v praxi se obvykle pracuje s empirickou kalibrační křivkou. Článek pro měření relativní permitivity je zpravidla deskový kondenzátor, mezi jehož desky se vloží zkoumaná látka. Vztah mezi kapacitou kondenzátoru a relativní permitivitou je vždy lineární. DK-metry měří kapacitu kondenzátoru, relativní permitivita se přepočítává. Příkladem je dielektrické stanovení vody. Využívá se velkého rozdílu mezi vysokou hodnotou  $\epsilon_r$



vody a malou hodnotou  $\varepsilon_r$  suché matrice. Vodu lze takto stanovit jak olejích tak v pevných látkách jako je papír, tabák, obilí atd. [2, 26, 31].

### 3.3.2. Elektrochemická měření v průtokových systémech

Rostoucí požadavky na moderní analytiku často vyžadují kontinuální automatická stanovení. Zde tedy vzniká prostor pro elektrochemické detektory zapojené do průtokových systémů. Mezi nejčastější aplikace elektrochemických metod v průtoku patří sledování průmyslových výrob, dialytických procesu nebo míry znečištění životního prostředí. Důležitou aplikací je také sledování výstupu z chromatografické kolony případně elektroforetické kapiláry. Aplikace elektrochemických metod v průtokových systémech lze rozdělit na kontinuální monitorování, tzv. kontinuální analýzu (CFA), průtokovou injekční analýzu (FIA) a chromatografickou či elektroforetickou analýzu s elektrochemickou detekcí. Na průtokové analytické metody jsou kladeny následující požadavky: vysoká citlivost, související se směrnici kalibrace, zanedbatelný šum a drift základní linie, nízká mez detekce a kvantifikace, široký dynamický rozsah, rychlá odezva zařízení na změnu koncentrace a v neposlední řadě malý objem měřící cely. Obecně lze pro měření v průtokových systémech použít libovolnou elektrochemickou metodu. Měření je možné zacílit jak na selektivní vlastnosti analytu, kdy zapojujeme ampérometrii, coulometrii nebo potenciometrii, tak na celkové vlastnosti roztoku, kdy se využívá, a to především v iontově výměnné chromatografii, konduktometrie nebo vysokofrekvenční konduktometrie. Potenciometrie pracující s ISE se často využívá ve spojení s FIA. Jejich odezva je však často pomalá, proto se s výhodou používají senzory (viz dále). V chromatografii se mezi nejčastěji používané elektrochemické detektory řadí detektory ampérometrické a coulometrické. Eluát z chromatografické kolony, respektive zóny rozdělené na koloně, prochází nízkoobjemovou tenkovrstvou celou, kde je laminární proud hnán na tenký film s planární elektrodou, na které je udržován konstantní potenciál. Pokud je tento potenciál dostatečný k elektrochemické přeměně daného analytu, přechází z elektrody do analytu měřitelný náboj. Výsledný proud, který je následně převeden na napětí, je zaznamenáván a je přímo úměrný koncentraci analytu procházejícího kanálem. Detektory pro LC-EC bývají postaveny na principech ampérometrického stanovení. LC-EC využívá měření za konstantního proudu. Je třeba mít na paměti, že dochází

k heterogennímu přenosu elektronů a velmi záleží na druhu zvolených fází [32, 33].

Povaha pracovní elektrody, její složení a povrchová úprava jsou klíčové pro efektivitu detektoru. Mnoho organických sloučenin reaguje různě v závislosti na použitém typu elektrody. Obvykle je cílem, aby elektrodová reakce probíhala s co nejvyšší účinností, aby proud byl vymezen pouze přenosem hmoty a nikoliv její reakcí na povrchu. Tento přístup poskytuje největší citlivost bez ztráty selektivity.

Uhlíková pasta je, jak bylo již zmíněno, směs grafitového prachu s dielektrickým materiálem, jakým bývá minerální nebo silikonový olej. Díky svým vynikajícím vlastnostem pro elektrochemické reakce organických sloučenin byla používána pro prvotní LC-EC experimenty. Nevýhodou použití tohoto druhu elektrody je nutnost relativně často obnovovat její povrch. Pokud do systému zapojíme zcela novou uhlíkovou pastovou elektrodu získáme charakteristický záznam. Nejprve se spotřebuje jistý náboj na vytvoření potenciálového rozdílu na rozhraní mezi povrchem elektrody a roztokem. Další náboj se využije na oxidaci funkčních skupin v grafitu a konečně, nečistoty obsažené v mobilní fázi a mobilní fáze samotná se mohou oxidovat, případně redukovat. Výsledkem je proud pozadí v ustáleném stavu. Tento proud se elektronicky vyrovnává a získá se základní linie nastavená na nulovou hodnotu. Je vždy žádoucí pracovat za co nejnižšího proudu pozadí, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti. Vysoký proud pozadí zvyšuje náchylnost instrumentu k šumu, což může vést k vážným odchylkám při opakovaném měření především nízkých koncentrací analytů [32, 33].

Skelný uhlík téměř vyhovuje představě o universálním materiálu pro výrobu elektrod. Je to tvrdý, amorfni uhlíkový materiál, jehož povrch je možné dokonale vyleštit. Pokud je umístěn v bloku z PEEK, je tato cela dobře odolná vůči rozpouštědlům včetně mobilních fází obsahující vysoké procento acetonitrilu nebo methanolu. Tento druh cely byl s dobrými výsledky používán v nevodných systémech [33].

Úkolem referentních elektrod v jakékoliv elektrochemické cele je zajistit stabilní elektrodový potenciál. Pro LC-EC detekci je nejčastěji používaná argentchloridová elektroda. Aktivity stříbrného drátku a AgCl jsou jednotné a tedy jediným faktorem

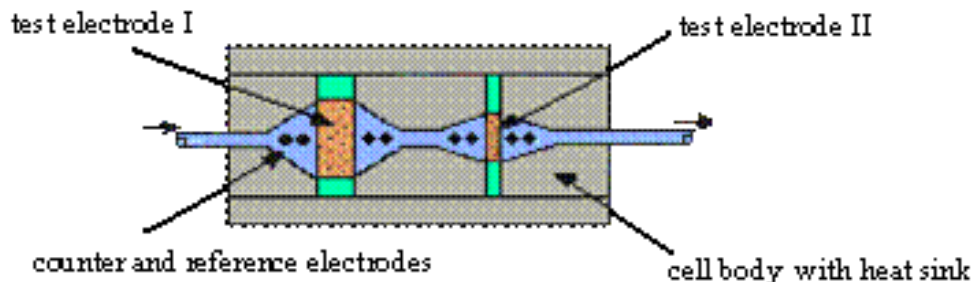
ovlivňující potenciál je koncentrace chloridových aniontů, která se může mírně měnit. Mechanismus je vysvětlován tak, že původní koncentrace chloridových iontů v elektrodě je asi 3M. Jelikož v mobilní fázi nejsou chloridové ionty obvykle přítomny, je zaznamenáván jejich mírný únik po gradientním spádu přes porózní fritu elektrody. V časovém horizontu několika týdnů se tento potenciál mění řádově o 50 mV, což vztaheno na jeden den je zanedbatelné. Aby se tento problém minimalizoval, je vhodné udržovat tuto celu stále v roztoku a pokud není momentálně používána, uchovávat ji v koncentrovaném roztoku chloridu sodného. Aby se zabránilo ucpání porózního konce elektrody, není dobré ponechávat kolonu v nevodných roztocích. Pokud se při chromatografii nevodná rozpouštědla používají, je nutné sledovat drift referenční elektrody a případně ji vyměnit [25, 33].

Je známo, že vzorky obsahující molekuly lipidů nebo proteinů poškozují při voltametričeských měření povrch elektrody již po několika málo měřeních. Mimo povahy látky je to také způsobeno relativně vysokou koncentrací vzorku. Látka je v průběhu elektrodové reakce polymerizována a vzniklý polymer pak pasivuje povrch elektrody, což následně zapříčiní nesolidní výsledky. U ampérometrické detekce v průtokových systémech, které ještě navíc předchází chromatografická separace je situace jiná. Protékající mobilní fáze neustále očišťuje povrch elektrody a koncentrace vzorku je o několik řádů nižší. Navíc díky úzkým separačním zónám je elektroda vystavována působení jednotlivých sloučenin méně než jednu minutu. Výsledkem je, že elektroda v LC-EC zapojení má mnohem delší životnost. Všechny tyto faktory dostávají LC-EC do popředí oproti přímým elektrochemickým měřením [25, 33].

V současné době se používají následující modifikace uspořádání elektrochemických detektorů: tenkovrstvý (thin-layer detector), který dovoľoval ampérometrická měření s účinností pouze asi 5 %. Zvýšení účinnosti se dosahuje zvětšením elektrody a snížením objemu detekční cely, k čemuž je nutné přizpůsobit, tedy snížit, rychlost průtoku. Dalším způsobem uspořádání elektrochemického detektoru je „tryska proti stěně“ (wall-jet detector), což je modifikace thin-layer. Eluát z kolony je směřován kolmo na plochu tenké vrstvy pracovní elektrody. Usměrněním toku eluátu na elektrodu se zvýší přesun hmoty, a tím dojde ke zvýšení účinnosti. Další možností je uspořádání tubulární (tubular detector). Velmi oblíbené je použití mikroelektrod v podobě vláken,

mikrodisků nebo mikrokapičky rtuti, kde v důsledku nelineárního transportu způsobeného okrajovou difúzí, dochází ke zvýšení signálu [25, 33].

Elektrochemická cela je tedy komponenta, kde probíhá elektrochemická reakce, a tím je generován elektrický proud. Tento proud je přeměněn potenciostatem na výstupní napětí. Výsledek je procesován a zaznamenáván. Speciálním typem elektrochemické cely je cela coulometrická (obr. 25) [23 - 25].



Obr. 25: Coulochem® III, Esa Inc., model 5011A High Sensitivity Analytical Cell [34]

Coulometrický detektor využívá uspořádání tzv. průtokové, nejčastěji grafitové, cely. Vysokou porózitou se dosáhne velmi vysokého povrchu a dojde k výraznému zvýšení poměru signálu k šumu. Jelikož se jedná se trojrozměrnou celu, je jedno, jakým směrem molekula analytu putuje k pracovní elektrodě. Zatímco u dvojrozměrného thin-layer detektoru může molekula přijít do styku pracovní elektrodu pouze pokud k ní přichází kolmo. Použitím tak velké aktivní plochy lze zvýšit i průtok na běžné průtoky používané v HPLC. Nespornou výhodou coulometrického detektoru je velmi stabilní signál. Je to způsobeno tím, že plocha této elektrody je tak velká, že i pokud je 95 % povrchu cely inaktivní z důvodu např. znečištění, elektroda stále pracuje s coulometrickou tedy 100% účinností [33, 35, 36].

Jak bylo již zmíněno, přesuny reaktantů či produktů k nebo od povrchu elektrody jsou mnohem pomalejší než vlastní elektrochemická reakce, jsou to tedy limitující kroky ovlivňující efektivitu HPLC-EC stanovení. Z tohoto důvodu v coulometrickém detektoru protéká eluát skrz porózní grafitovou elektrodu, což je rozdíl oproti běžnému elektrochemickému detektoru, kde eluát protéká spíše okolo elektrody. Díky velkému povrchu elektrody se zajistí dostatečně velká pracovní plocha, a tedy maximální kontakt proudící elektroaktivní látky s elektrodou a v podstatě všechna elektrochemicky aktivní

látku přítomná v eluátu podle elektrochemické reakce. Tím pádem není elektrochemický jev limitován difúzí, čímž je dosaženo maximální elektrochemické odpovědi. Omezení spočívá pouze ve vysokých koncentracích analytu, řádově větší než 100 µg/ml nebo ve velmi rychlém průtoku mobilní fáze. To může způsobit přesycení elektrody, čímž nedojde ke 100% elektrochemické reakci [25, 33, 35, 36].

Vyprodukovaný proud je přímo úměrný koncentraci analytu dle Faradayova zákona (viz výše). Pro většinu elektrochemických analýz platí, že potenciál zůstává konstantní a proud je měřen jako funkce času. Pokud je tedy proud zaznamenáván jako funkce času, pík je následně integrován podle rovnice:

$$Q = \int I dt = \text{plocha píku}$$

kde Q ... celkový přenesený náboj (C)

I ... elektrický proud (A)

t ... čas (s).

Při použití spojení LC-EC se setkáváme se dvěma hlavními jevy, které přispívají k výslednému proudu. Jedná se o nabíjecí proud, nutný k nabití dvojvrstvy na rozhraní roztok/elektroda. Pokud detektor pracuje za fixního potenciálu je nabíjecí proud bezpředmětný. To ale neplatí např. pro cyklickou voltametrii, kdy je potenciál v průběhu měření zvyšován. Dalším, již významnějším, je faradaický proud, vznikající redoxním procesem buď z analytu nebo z nečistot obsažených v solventu [25, 33, 35, 36].

Pokud detektor pracuje s coulometrickou účinností, pak proud v ustáleném stavu a za konstantních podmínek cely (viz dále), lze definovat reakcí:

$$I = z \cdot F \cdot c \cdot v_f$$

kde I ... elektrický proud (A)

z ... počet elektronů zahrnutých v elektrochemické reakci

F ... Faradayova konstanta (96 485 C/mol)

c ... molární koncentrace (mol/ml)

$v_f$  ... rychlost průtoku mobilní fáze (ml/s).

Kvantifikace s využitím coulometrického detektoru je prováděna nejčastěji v DC modu. To znamená, že systém pracuje s fixním potenciálem. Pak míra elektrolýzy, je proporcionální koncentraci analytu:

$$\text{rychlost elektrolýzy} = dc(t) / dt = -k \cdot c(t)$$

kde  $c(t)$  ... okamžitá koncentrace analytu v daném čase

$k$  ..... konstanta cely

$F$  ..... Faradayova konstanta (96 485 C/mol)

$c$  ..... molární koncentrace (mol/ml).

Čím vyšší je konstanta cely, tím je účinnost elektrolýzy vyšší. Konstanta cely zejména vypovídá o vlastnostech cely týkající se přesunu hmoty:

$$k = A \cdot D / V \cdot d$$

kde  $k$  .... konstanta cely

$A$  .... plocha elektrody ( $\text{cm}^2$ )

$D$  ... difúzní koeficient analytu ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )

$V$  .... objem detektoru ( $\text{cm}^3$ )

$d$  .... tloušťka difúzní vrstvičky (cm).

Tloušťka vrstvičky ( $d$ ) představuje maximální vzdálenost, ze které se může molekula dostat na povrch elektrody v daném čase. Tím, že se elektrody pro coulometrické detektory vyrábějí z velmi porézních materiálů, je šířka této vrstvičky minimální. Difúzní koeficient je, jak bylo již zmiňováno, vlastností analytu a pohybuje se v řádech  $10^{-5}$  až  $10^{-6}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , částečně je ale také závislý na složení mobilní fáze. Z výše zmíněných rovnic vyplývá, že pro kvantifikaci je lepší počítat s plochou pod píkem než s jeho výškou, protože plocha píku je přímo úměrná koncentraci analytu, zatímco výška píku se mění s rychlostí průtoku a s retenčním časem. Plocha pod křivkou je *de facto* integrovaná intenzita coulometrického signálu, zatímco výška píku vypovídá o okamžitém signálu indikující momentální proud [25, 33, 35, 36].

Spojení coulometrického detektoru s HPLC je technicky uskutečněno následovně. Za pumpou následuje in-line filtr, který zamezuje přístupu mechanických nečistot z mobilní fáze nebo z pumpy. Za tímto filtrem se nachází tlumič pulzů, který sestává z rezervoáru s methanolem nebo isopropanolem a chemicky odolnou membránou. Může následovat tzv. guard cela, která je obvykle nastavena na potenciál o 50 mV vyšší než je

potenciál analytické cely. Je umístěna mezi pumpou a injektorem, mobilní fáze jí tedy prochází ještě před vstupem vzorku. Jelikož pracuje za velmi vysokého potenciálu, rušivé elementy z mobilní fáze na této elektrodě podlehnou oxidaci (redukci), čímž se z mobilní fáze eliminují. Podmínkou je, že tato pomocná elektroda musí také pracovat s coulometrickou, tedy 100%, účinností a produkt této reakce nesmí reagovat s analytem. Dále následuje klasický injektor a chromatografická kolona. Za ní eluát protéká skrz další in-line filtr. Doplnkově může následovat upravující cela, která je potřebná při aplikaci screen nebo redoxního módu. Dalším prvkem je již vlastní analytická cela s detekční jednotkou a zaznamenávacím zařízením. Pokud je v systému zapojeno více detektorů (pracujících na různých principech), je elektrochemická cela umístěna jako první, i když se při elektrochemické reakci mění chemické složení analytu. Je to z důvodu, že průtoková cela coulometrického detektoru má menší objem než cely např. UV detektoru, což by následně způsobilo rozšiřování a rozmývání píků. Druhým důvodem je fakt, že průtoková cela coulometrického detektoru vytváří zpětný tlak, takže, pokud by byl neelektrochemický detektor umístěn jako první, mohlo by zpětným tlakem dojít k jeho poškození [35, 36].

Coulometrický detektor ve spojení s HPLC byl vytvořen pro detekci elektroaktivních látek obsažených v eluátu, který byl předtím separován pomocí HPLC. Kombinuje v sobě skvělou senzitivitu s vysokým stupněm selektivity. Coulometrický detektor může pracovat v několika módech [35, 36]:

- v **DC módu** je aplikovaný potenciál udržován konstantní po celou dobu analytického měření.

- v **pulse módu** se potenciál mění v předem definovaných časech v průběhu analýzy, aby se obnovoval povrch elektrody. Tento způsob se používá z toho důvodu, že pro správnou kvantifikaci je nutné, aby povrch elektrody byl stále konstantní. Většinou produkt elektrochemické reakce zůstává v roztoku a podmínky na elektrodách se nemění. V některých případech však, jako např. při analýzách alkoholů nebo sacharidů, oxidační produkt znečišťuje povrch elektrody a může způsobit snížení proudu vznikajícího elektrochemickou reakcí. V praxi se puls vytvoří zvýšením potenciálu na vysokou pozitivní a následně změnou na vysokou negativní hodnotu. Pulsy trvají řádově desítky milisekund. Pak je nutný krátký časový úsek, pohybující se okolo stovek milisekund, pro ustálení proudu.

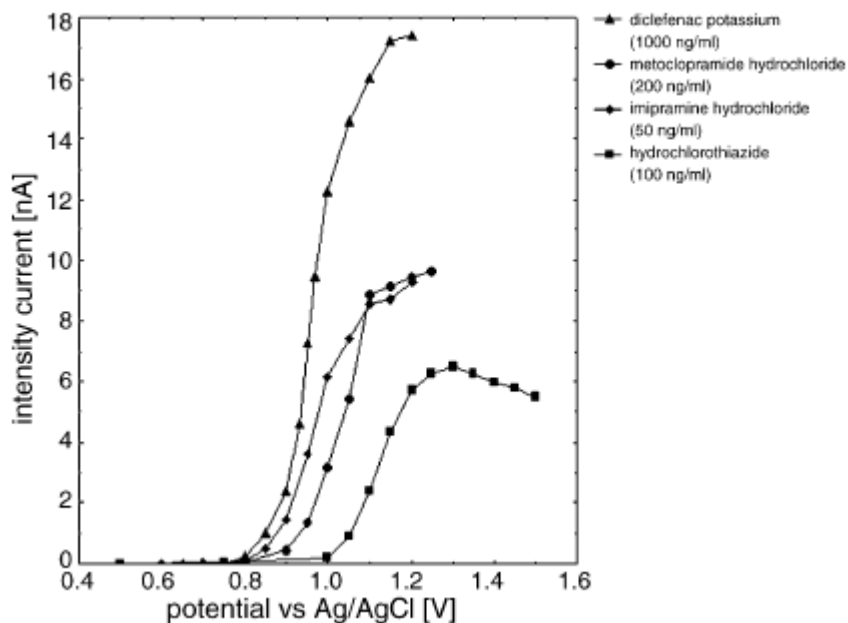
- ve **scan módu** je potenciál kontinuálně měněn jako funkce času, čímž se získá cyklický voltamogram. Ten poskytuje informaci o potenciálu, který je nutný pro následnou analýzu dané látky. Tohoto módu se tedy využívá pro stanovení optimálního potenciálu pro následná měření. Cyklický voltamogram poskytuje informace jak o oxidaci tak o redukcii a také o tom, zda je elektrochemický proces reverzibilní. Lze vytvořit i cyklický voltamogram směsi látek, samozřejmě pod podmínkou, že se jednotlivé látky dostatečně liší svými potenciály. Nevýhodou této metody je, že při změnách potenciálu se projevují kapacitní jevy.

- **screen módu** se využívá, pokud analýzu ruší nějaké látky z mobilní fáze, případně nějaká koeluující látka. Zvýšení selektivity se dosahuje zařazením ještě jedné elektrody před analytickou elektrodu. Lze zařadit tzv. guard celu (viz výše) nebo ještě jednu analytickou elektrodu umístěnou v analytické cele před vlastní elektrodou.

- **redoxní mód** lze použít u látek, které procházejí jak oxidací tak redukcí. To může platit např. pro některé biogenní aminy, výsledkem pak je vysoce selektivní analýza. Analyt je nejprve oxidován a oxidační produkt je redukován v druhém kroku. První cela funguje *de facto* jako „derivatizační činidlo“. Podmínkou je, že první reakce musí být striktně ekvimolární a reverzibilní s výtěžkem nejméně 99,9 %. Další důležitou podmínkou je, že nesmí být rušena mírnými výkyvy chromatografických podmínek a složením vzorku. Produkt první reakce musí být dostatečně stabilní (řádově alespoň milisekundy), aby se dostal až na druhou elektrodu. Produkt také musí být rozpustný v použité mobilní fázi.

Před vlastním stanovováním obsahu je nutné zjistit elektrochemické chování analytu. K tomu se při použití průtokových systémů využívá tzv. **hydrodynamický voltamogram (HDV)** (*obr. 26*).





Obr. 26: Ukázky hydrodynamických voltamogramů [59]

Jedná se v podstatě o křivku závislosti proudu na napětí (C/V curve). Hydrodynamický voltamogram se vytváří postupnými nástřiky při lineárně zvedajícím se potenciálu. Pokud analyzovaná látka disponuje elektroaktivními vlastnostmi, získáme charakteristickou křivku. Vedle chemické struktury analyzované látky je podoba hydrodynamického voltamogramu závislá na povrchu elektrody, pH a složení mobilní fáze. V průběhu křivky lze rozlišit tři zóny. Oblast s nulovým proudem, kdy dodaný potenciál není dostatečně silný, aby vyvolal oxidaci (redukci). Ve střední oblasti se výška píku zvyšuje se zvyšujícím se potenciálem. Hodnota potenciálu zde ovlivňuje kinetiku heterogenního přesunu elektronů z roztoku k povrchu elektrody. V poslední fázi, oblasti plató, není výška vlny závislá na potenciálu. Určujícím faktorem je zde pouze difúze k povrchu elektrody, tedy proud je přímo úměrný rychlosti transportu molekul na jednotku povrchu elektrody za časovou jednotku. Obvykle je nejlepší pracovat za potenciálu nacházejícího se v plató fázi, asi 50 – 100 mV za zlomem křivky. Takový výběr pracovního potenciálu zaručí nejvyšší selektivitu za dodržení nejvyšší možné citlivosti. Je to dáno tím, že proud pozadí je minimální a málo pravděpodobné jsou i jiné rušivé vlivy. To ale neplatí, pokud se pracuje za potenciálu vyššího než 1 V. Hydrodynamický voltamogram je vhodné použít pouze pokud je známo, zda stanovení bude probíhat v oxidačním či redukčním módu. Pokud toto není jasné, je vhodnější použít metodu cyklického voltamogramu. Na rozdíl od cyklického voltamogramu, se

u voltamogramu hydrodynamického, neprojevují žádné kapacitní jevy. Jedná se o rychlou a levnou metodu, která ukáže elektrochemické chování analytu v dané mobilní fázi. Jelikož mobilní fáze může posunout hodnoty potenciálu, je vhodné uskutečňovat experimenty za použití mobilní fáze, kterou chceme použít pro kapalinovou chromatografii [25, 35, 36].

Elektrochemický detektor poskytuje pro elektrochemicky aktivní látky některé nezanedbatelné výhody. Jednou z nich je citlivost, což je funkce poměru signálu k šumu. Limity detekce se pohybují pro látky, které jsou snadno oxidovatelné, příp. redukovatelné, v řádu pikogramů až femtogramů, což je výrazně lepší výsledek než při použití běžných, např. UV, HPLC detektorů. LOD závisí na sloučenině samotné, ale také na použitých analytických podmínkách. Široký lineární rozsah, tedy rozsah lineární odpovědi detektoru, může být až  $10^8$ , což je opět mnohem vyšší než při použití UV detektoru. Zvýšené selektivity lze využít např. v případě koeluce. Selektivita může být zvýšena zapojením další elektrochemické cely před analytickou celu. V této předstupní cele je možné zoxidovat nebo zredukovat látky, kterou mohou koeluovat s hlavním analytem. Toto lze uskutečnit za předpokladu, že potenciál potřebný k elektrochemické reakci nečistoty je dostatečně rozdílný od potenciálu hlavního analytu. I takto zvýšená selektivita je ale stále nesrovnatelná se selektivitou MS detektoru. Pro snížení šumu základní se používá tzv. guard cela, o které bylo již pojednáno dříve [25, 35, 36].

Použití spojení LC-EC má svá jistá praktická omezení. Pokud je v eluátu přítomná nějaká rušící látka, potenciál pracovní elektrody by měl být nejméně o 100 mV odlišný než je potenciál, při kterém nečistota podléhá elektrochemické reakci na elektrodě. Analýzy v redukčním módu může rušit rozpuštěný kyslík, který je přítomný v mobilní fázi a který se redukuje při potenciálu okolo -400 mV. Jako řešení obvykle postačí odplynit mobilní fázi pomocí dusíku. Rozsah potenciálů pro coulometrii používané ve spojení s HPLC je přibližně od +1 do -1 V. Nicméně pro rutinní měření se doporučuje pracovat v rozsahu potenciálů: +/- 900 mV. Samozřejmě by mělo být používání rozpouštědel, vody a reagentů pro přípravu pufrů té nejvyšší kvality a čistoty. Pozornost by také měla být věnována možnosti oxidaci rozpouštědel v načatých lahvích. Organická rozpouštědla by měla obsahovat co nejmenší množství organických peroxidů. Jak vodnou tak organickou složku mobilní fáze je vhodné filtrovat přes 0,22 $\mu$ m filtr, což je rozdíl od běžné HPLC, kdy obvykle stačí filtr

s rozměry póru 0,45  $\mu\text{m}$ . Jistá omezení se také vztahují na mobilní fáze. Jelikož je ampérometrická detekce závislá na přesunu elektronů mezi roztokem a povrchem elektrody, je důležité vybrat mobilní fázi, která dovolí průběh elektrochemické reakce. Obecně lze vyslovit následující zásady. K přenosu náboje v elektrochemické cele musí být v mobilní fázi přítomen elektrolyt, a to většinou v koncentraci 0,01 až 0,1 M. Solvent musí mít dostatečně vysokou dielektrickou konstantu, aby umožnil ionizaci elektrolytu. A konečně, mobilní fáze musí být elektrochemicky inertní vůči povrchu elektrody. To znamená, že proud pozadí je zanedbatelný a nedochází k poškození povrchu elektrody. I když je nutné dodržet tato omezení, rozsah LC-EC je široký, protože iontově výměnná chromatografie a většina chromatografií na reverzní fázi používají tyto druhy mobilních fází. A i když mobilní fáze pro chromatografii na normální fázi obsahují nepolární rozpouštědla s nízkou dielektrickou konstantou, jsou zde způsoby, jak i toto provedení na LC-EC uskutečnit [25, 35, 36].

Mobilní fáze, která může být ideální k chromatografickému rozdělení zdaleka nemusí být ideální pro elektrochemickou detekci. Proto se doporučuje provést vývoj metody jako integrovanou proceduru, než nejprve dokonale vyvinout separaci a pak vyvíjet podmínky pro detekci. Používané pufrů by měly být o koncentraci 50 – 100 mM. Komplikované je používání látek jako EDTA nebo triethylamin, které podléhají oxidaci a výrazně zvyšují šum základní linie. Diskutabilní je také stabilita používaných mobilních fází, případně tedy kritéria pro jejich uchovávání. Znečištění mobilní fáze může pocházet také z chromatografického systému. Může k němu dojít např. při krvácení kolony, při uvolnění naadsorbovaných látek z předchozích analýz, adsorpcí kyslíku (především u teflonových kapilár), případně uvolňování iontů kovů (z pumpy a nerezových částí, především při použití kyselých solventů) [25, 33, 35, 36].

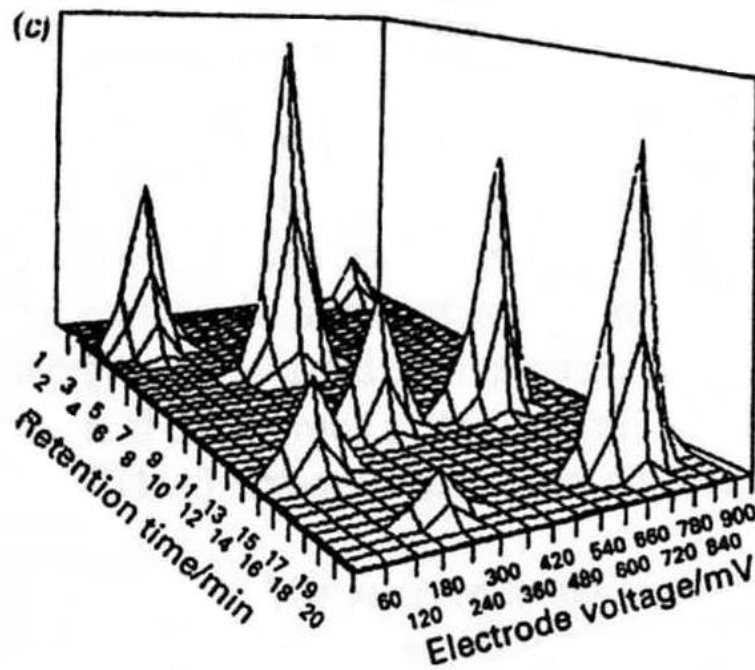
Proud pozadí je především faradický proud, který vzniká oxidací nebo redukcí elektroaktivních nečistot mobilní fáze, rozpouštědla, případně použitých pufrů, kyslíku, oxidů železa nebo jiných kovů, atd. Je to zcela analogické k absorbanci pozadí u UV detektoru. Dalším faktorem ovlivňující citlivost je šum. Je to náhodný nebo periodicky se opakující jev superponovaný na signál v ustáleném stavu. Obvykle se měří od píku k píku a představuje součet rušivých vlivů. Je zjevné, že je žádoucí tento šum minimalizovat. Šum logicky narůstá s rostoucím použitým potenciálem. Šum může být faradaické nebo non-faradaické povahy. Mobilní fáze sama o sobě musí mít povahu

elektrolytu, tudíž její oxidace respektive redukce vede k mírnému šumu základní linie. Faradický šum sestává z oxidace (redukce) složek mobilní fáze, proto je více než vhodné používat reagentie vysoké kvality a čistoty. Kritickým parametrem je nízký obsah kovů a jiných elektrochemicky aktivních kontaminantů. Non-faradaický šum zahrnuje nabíjecí proud, elektrický šum z potenciostatu, šum ze spojů, teplotní efekty, pulsace pumpy, hydrodynamiku průtokové cely, povrchové reakce, statickou elektřinou, výkyvy v elektrické síti, elektronické zesilování atd. Obecné postupy vedoucí ke snížení šumu jsou následující. Důležitou zásadou by měl být výběr takové pumpy, která je schopná relativně bezpulsní tok. Následně pak vzhledem k žádaným detekčním limitům, případné použití tlumičů pulsů. Další zásadou by mělo být pravidelné čištění chromatografu. Obvykle se k tomuto účelu používá kyselina dusičná. Samozřejmostí by měla být správná údržba a péče o pumpu, včetně důkladného promývání. Velmi vhodné je také zapojení všech komponent systému do jednoho elektrického obvodu. A konečně, vyhnout se rozpouštědlům, které mohou poškodit povrch elektrody. Toto omezení je relevantní především při použití uhlíkové pasty nebo chemicky modifikovaných povrchů. Jak je z předchozího textu patrné, proud pozadí a šum spolu velmi úzce souvisí. Obecně lze říci, že čím větší je proud pozadí, tím větší je i šum. Z tohoto důvodu je velmi nevhodné provádět např. stopové analýzy za velmi vysokých pozitivních, respektive za velmi nízkých negativních, potenciálů, kdy je proud pozadí, tedy i šum velmi vysoký. Poměr signálu k šumu je jedním z velmi významných analytických parametrů, který je vhodný ke srovnávání jednotlivých elektrod. V této souvislosti je nutné zmínit fakt, že odpověď detektoru vzrůstá se zvětšující se plochou relativně málo, zatímco šum stoupá lineárně. Z toho lze vyvodit závěr, že čím menší elektroda, tím větší poměr signálu k šumu. Dále, proud za nepřítomnosti analytu musí být za daného potenciálu nízký a stabilní. Toto umožňuje nízký šum základní linie, vysoký poměr signálu k šumu a vysokou citlivost [25, 35, 36].

Stejně jako měření UV/VIS detektorem, při použití pouze jedné vlnové délky, může být problematické, tak se i v případě elektrochemického detektoru postupujícím časem a stupňujícími se nároky vyskytly záměny při identifikaci. Identifikace může být velmi problematická pokud je k dispozici pouze oxidující příp. redukující potenciál, a to i pokud je v kombinaci s informací o retenčním čase. Cesta prošla stejně jako u UV přes duální mód. V případě duálních LC-EC systémů jsou zachovány stejné elektrochemické principy popsané na jednoduchých systémech. S touto instrumentací

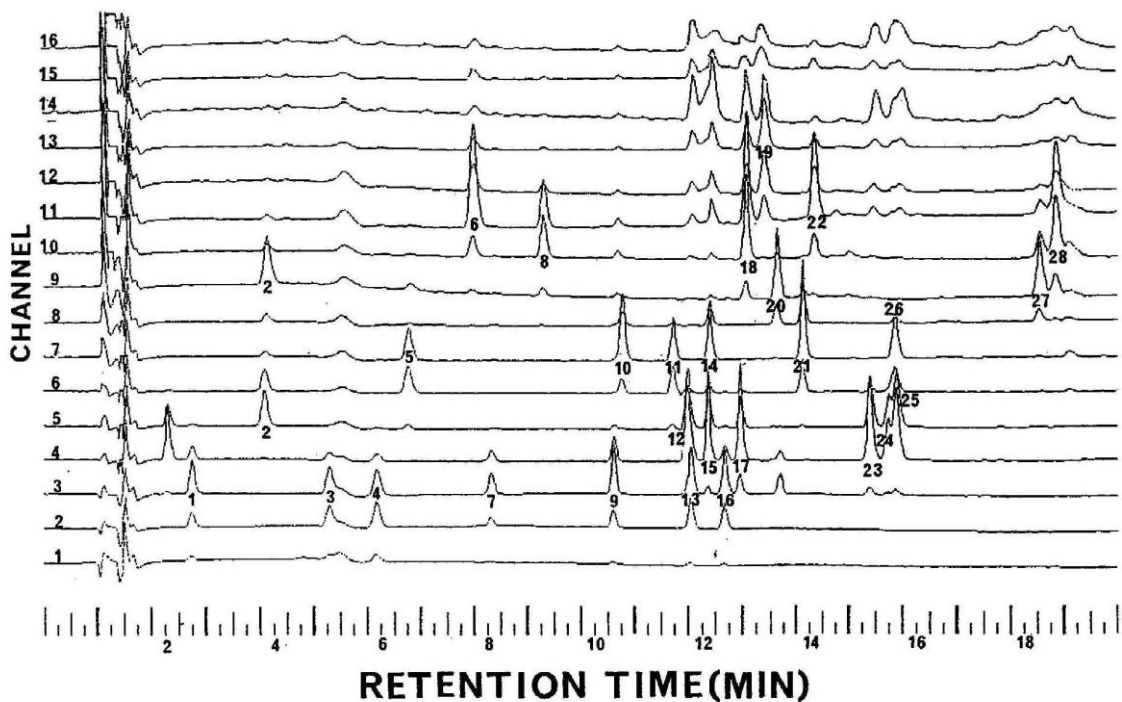
lze obecně dosáhnout vyšší selektivity, citlivosti a je možné rozšířit aplikace pro použití elektrochemického detektoru. Lze pracovat ve dvou uspořádání – paralelní a sériové. Paralelní uspořádání lze přirovnat k duálnímu UV spektrofotometru. Na každou elektrodu lze nastavit jiný potenciál, tedy eluát vycházející z LC je monitorován ve dvou potenciálech. Například, na první elektrodu je nastaven velmi nízký potenciál a na druhou potenciál, který je schopný oxidovat téměř jakoukoliv elektroaktivní látku. Tudíž na druhé elektrodě zaznamenáme všechny elektroaktivní látky přítomné ve vzorku a na první elektrodě pouze ty, které jsou schopny oxidace za námi daného potenciálu. Toto samozřejmě zvyšuje selektivitu měření. Další možnost aplikace tohoto druhu zapojení je diferenční chromatogram, kdy se vybere se takové potenciálové okno, ve kterém nastává výrazná změna v odpovědi detektoru na danou látku. Druhá možnost duálního zapojení je zapojení sériové. Toto zapojení je možné přirovnat k fluorometrickému detektoru. Na první elektrodě dojde k přeměně analytu na oxidovanou (respektive redukovanou formu), která se na další elektrodě zpětně redukuje (respektive oxiduje). Tento způsob zapojení může zvýšit jak selektivitu tak detekční limit. Ne všechny látky totiž poskytují redoxní pár, tyto tedy nebudou následně reagovat na druhé elektrodě. Tohoto lze využít ke snížení šumu a jiných rušivých vlivů, protože většina látek obsažených v mobilní fázi poskytují ireverzibilní elektrochemické reakce. Pokud použijeme dvě stejné elektrody do sériového zapojení a zaznamenáme diferenční chromatogram, odezvy detektoru, které budou stejné za stejných potenciálů, jako proud pozadí a jiné faktory přispívající k šumu, budou eliminovány [25].

Analogie s UV detektorem pokračuje i s paralelou vývoje PDA detektoru. V oblasti elektrochemické, lépe řečeno coulometrické detekce, vznikl **coulometrický array detektor**. Záznam získaný s použitím CoulArray detektoru je tedy analogický k výstupu z PDA detektoru (*obr. 27*).



Obr. 27: Trojrozměrný záznam z CoulArray detektoru [25]

Může se jednat až o sérii 16 coulometrických senzorů, které jsou zapojeny sériově a každý pracuje nezávisle při přesně definovaném potenciálu (obr. 28).



Obr. 28: Záznam 28 standardů monoaminů pořízený CoulArray detektorem [25]

Každý senzor obsahuje vedle pracovní elektrody také svou referentní a pomocnou elektrodu. Všechny cely pracují s coulometrickou účinností. Celkové uspořádání včetně

mrtvých objemů, tlakových poměrů atd. je takové, že není pozorováno žádné porušení chromatografické separace na poslední cele a rozdíl v časech mezi prvním a posledním senzorem je zanedbatelný. Analyty jsou měřeny s vyšší citlivostí, protože šum je odstraněn na předcházejících senzorech. Na rozdíl od PDA detektoru je schopen lépe rozlišit koeluuující píky. Látky, které absorbují při stejné vlnové délce mohou mít zcela jinou HDV charakteristiku, a tím být rozlišeny. Lépe řečeno, musí se lišit alespoň o 60 mV. Tohoto lze využít pouze na průtokových celách pracujících s coulometrickou účinností, protože jinak by analýzu rušil nezreagovaný zbytek z minulé cely. Další výhodou coulometrického array detektoru oproti běžnému coulochemickému detektoru je možnost použití gradientové eluce. Při použití jednoduchého elektrochemického detektoru se změny v mobilní fázi, jako např. v iontové síle, obsahu iontově párového činidla, pH nebo obsahu organického podílu, projeví jako strmý drift základní linie, který může převýšit samotnou citlivost měření. Při použití CoulArray detektoru je softwarovou cestou tento drift vyrovnán. Software obsahuje samonápravný algoritmus, který odstraňuje drift základní linie, zatímco integrita píku je zachována [25].

### 3.3.3. Senzory

Zcela obecně lze senzor definovat jako element, který snímá určitou informaci a převádí ji na číslo. Je to tedy základní součást měřicího zařízení, která převádí vstupní proměnnou vlastnost na signál vhodný k měření a interpretaci, popřípadě k řízení a kontrole. Jedná se o kompozitní zařízení, které se skládá z několika funkčních částí. Jednou z nich je aktivní vrstva, neboli sensorový element. Může to být vrstvička uměle vytvořená při prefabrikaci senzoru, ale také např. elektrodová dvojrstva, vytvořená automaticky na povrchu kovové elektrody při styku s elektrolytem. Přítomnost, pro daný senzor, specifické látky generuje chemickou či fyzikální změnu v aktivní vrstvě senzoru. Tato změna je následně zpracována, zesílena a převedena na číslicová data. Sensorová analýza tedy využívá tvorbu specifického komplexu receptorové vrstvy s analytem. Tento způsob analýzy je perspektivní především pro svoji rychlost a vysokou kapacitu. Umožňuje provést rutinní analýzu rychle a levně, což představuje velký potenciál v paletě analytických metod. Vedle určení přítomnosti, případně koncentrační úrovně, lze senzory použít pro sledování průběhu nejrůznějších procesů, jako např. monitorování průběhu průmyslové výroby, kontrolu složitých procesů

v živých organismech atd. Zcela zásadními parametry jsou pak rychlost a reprodukovatelnost odezvy [37, 38].

Jako u každého zařízení je nutné popsat parametry jednotlivých senzorů. Prvním z parametrů je selektivita. Koeficient selektivity udává, kolikrát poskytne senzor nižší signál při měření interferentní látky než při měření sledovaného analytu, mají-li oba stejné koncentrace. Jelikož lze v literatuře nalézt mnoho metod pro měření koeficientu selektivity, které se vzájemně liší vnějšími podmínkami, které mohou výsledek významně ovlivnit, je vhodné měřit za stále stejných podmínek. Dalším parametrem je mez detekce. Tato veličina udává nejmenší možnou koncentraci analytu, která je detegovatelná. Třetím parametrem je rozsah senzoru. Je to rozmezí koncentrací, mezi kterými lze stanovit koncentraci analytu. Koncentrační rozsah je také někdy nazýván jako rozsah linearity, a to i když odezva nemusí být striktně lineární. Obecně stačí, pokud je závislost monotónní a dostatečně strmá. Čtvrtou základní charakteristikou je citlivost, která je popisována jako změna výstupního signálu na jednotkovou změnu koncentrace. Dynamické vlastnosti senzoru charakterizuje časová konstanta. Dlouhodobá časová stálost je popisována poklesem citlivosti a udává se v procentech za jednotku času. Pro praktické použití hromadně vyráběných senzorů je důležitá i doba mezi recalibrací senzoru, která je obvykle udáváno výrobcem [37].

Senzory lze rozdělit dle několika kritérií:

- **dle základu nosiče informace:**
  - **elektrické**, poskytující elektrický výstupní signál
    - elektronické
    - polovodičové
    - mikroelektronické
  - **neelektrické**, např. mechanické
- **dle druhu snímače:**
  - **aktivní**, které jsou zdrojem energie
  - **pasivní**
- **dle způsobu interakce s měřeným prostředím:**
  - **dotykové**
  - **bezdotykové**



- **dle druhu snímané veličiny:**

- **mechanické**
- **tepelné**
- **elektrické**
- **magnetické**
- **radiační**
- **chemické**, které jsou z hlediska zaměření této disertační práce nejdůležitější. Schéma chemického senzoru je zde znázorněno (*obr. 29*).



*Obr. 29: Schéma chemického senzoru [37]*

- nejrychleji rozvíjející se elektrochemické jsou ve srovnání s ostatními druhy senzorů, jsou elektrochemické senzory pro svou mimořádnou detekční schopnost, experimentální jednoduchost a nízkou cenu velmi perspektivní. Zřejmě právě proto zaujímají první místo mezi komerčně dostupnými senzory. Elektrochemické senzory také reagují na potřebu analýz posledních let, užívat zařízení stále menších rozměrů. Lze se tedy setkat s mikro či nanoelektrodami. Elektrochemické senzory mohou být dvojího druhu - s kapalným nebo tuhým elektrolytem. Do kategorie elektrochemických senzorů lze zařadit senzory **potenciometrické**, využívající především ISE a senzory **ampérometrické**. Ty využívají zpravidla dvou elektrod, z nichž jedna, měřicí, polarizovatelná, je rozměrově malá a druhá je velkoplošná, nepolarizovatelná, referentní. Na elektrody se vkládá velké napětí, čímž je zaručeno, že sledovaná látka podlehne na pracovní elektrodě chemické přeměně, elektrolytický proud je pak přímo úměrný množství sledované látky. Řídícím dějem, který rozhoduje o velikosti proudu, bývá zpravidla difúzní transport elektroaktivní látky k elektrodě. Nejznámější aplikací je pravděpodobně klinická aplikace pro stanovení hladiny glukózy v krvi [37, 39]. Jako další příklad lze uvést Clarkovo kyslíkové čidlo nebo imunosenzory využívající specifické reakce antigenu a protilátky, kdy jak antigen tak protilátka může být imobilizován na senzoru. Lze využívat i začlenění DNA do aktivní vrstvy senzoru, čehož lze využít v diagnostice dědičných chorob, ve forenzních analýzách nebo při monitorování životního prostředí.

- senzory s mikroelektronickou strukturou. Jedná se o miniaturní potenciometrické senzory vycházející z tranzistorů řízených polem (FET), které mají na řídicí elektrodě umístěnou vrstvičku látky selektivně reagující s analytem. Používají se látky obdobné látkám z ISE s kapalnou membránou, ale jejich výhoda spočívá v absenci vnitřního elektrolytu, tudíž mohou pracovat i v nakloněné poloze. I v této kategorii lze rozlišit několik podtypů. **ISFET**, pracující na principu iontově selektivních elektrod, **CHEMFET**, někdy nazývané jako CSFET, které jsou citlivé na sloučeniny nebo ionty, **ENFET**, využívající biokatalyzátory neboli enzymy [37, 38, 40].

- senzory založené na měření elektronové vodivosti. Pro tento druh senzorů je charakteristická změna vodivosti citlivé vrstvičky v závislosti na koncentraci analytu. V případě chemirezistorů je citlivou vrstvou vodič prvního druhu, např. napařený kov (Au) na destičce z izolantu nebo senzor může být založený i na vodiči druhého druhu, tedy elektrolytu, kdy je destička opatřená platinovými elektrodami s naneseným polymerem obsahující hydrofobický LiCl. Toto uspořádání je vhodné pro měření relativní vlhkosti plynů. Třetí kategorií materiálů vhodných pro citlivou vrstvu mohou být polovodiče ( $\text{SnO}_2$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , NiO), hovoříme tedy o senzorech metaloxidových. Selektivita je pak značně odlišná v závislosti na použitém typu polovodiče [37].

- senzory založené na měření teploty. Ty nejčastěji pracují na principu vzniku tepelného efektu na fázovém rozhraní kapalina - tuhá fáze nebo plyn - tuhá fáze. Kapalina nebo plyn jsou analytem a pevná fáze senzorem, jehož povrch je upraven katalyzátorem. Katalyzátor umožňuje reakci analytu s reagentií, která se do vzorku v dostatečném množství přidává. Katalyzátorem může být i enzym, pak hovoříme o biochemických senzorech. Nevýhodou tohoto typu senzorů je potřeba velmi přesného termostátování. Do této kategorie lze řadit **pelistory**, **pyroelektrické senzory** a **tepelně vodivostní senzory**. Pelistory využívají platinového vlákna pokrytého vrstvou katalyzátoru vyhřívaného průchodem elektrického proudu. Při vloženém konstantním napětí jsou teplota a elektrický odpor vlákna rovněž konstantní, ale přijde-li katalytická vrstva do styku s analytem, dojde k uvolnění tepla. Vzniklá změna teploty platinového drátku způsobí změnu odporu, která se zaregistruje. Použití pelistorů se nabízí téměř samo – používají se jako protipožární čidla sloužící k detekci úniku hořlavých plynů a par. Jádrem pyroelektrického senzoru je vrstva pyroelektrika ( $\text{LiTaO}_3$ ), mezi jehož

konci je měřeno pyroelektrické napětí. Z jedné strany je na vrstvu pyroelektrika napařena tenká chemicky citlivá vrstvička umožňující interakci s analyzovanou látkou, zatímco druhá strana pyroelektrika je potažena filmem kovu sloužícím k vyhřívání senzoru. Není-li senzor ve styku s analytem, tok tepla je konstantní a na bočních stranách pyroelektrika je měřeno konstantní napětí. Interaguje-li chemicky citlivá vrstva s analytem, dojde ke změně toku tepla pyroelektrikem a je zaznamenána změna pyroelektrického napětí [37].

- hmotnostní senzory tvoří asi 6 % používaných chemických senzorů a jsou velice perspektivní. Přírůstek hmotnosti na aktivní ploše senzoru generuje změnu elektrického signálu. **Křemenné mikrováhy** (QCM) neboli bulk acoustic wave sensors (BAW) pracují na základě následujícího principu. Na povrchu piezokrystalu zapojeného v oscilátoru je nanese aktivní vrstva s receptorem, který je schopen selektivně komplexovat analyt v závislosti na jeho koncentraci ve stanovovaném médiu. Změna kmitočtu oscilátoru souvisí se změnou hmotnosti citlivé vrstvičky deponované na povrchu piezokrystalu. Tento způsob je citlivý na změny teploty a na nekonstantní průtok média. Jeho další nevýhodou je nelinearita odezvy. Tento způsob se používá pouze pro plyny a jako používané sorbenty lze zmínit například triethanolamin pro stanovení SO<sub>2</sub> nebo LiCl v želatině pro stanovení vlhkosti. Principem **surface acoustic wave sensors** (SAW) je vygenerování akustické vlny, která se šíří po povrchu podložky modifikované selektivně reagujícím sorbentem, přičemž změna hmotnosti tohoto povrchu způsobí změnu rezonanční frekvence senzoru vlivem absorbovaného analytu [37].

- optické senzory neboli optrody. Jejich dráha se začala rozvíjet po objevu optických vláken v roce 1966. Světlovody umožňují měření na dlouhé vzdálenosti. V chemických senzorech slouží světlo pouze jako nosič informace. Je vedeno optickým vláknem ze zdroje do citlivé vrstvy, která je v kontaktu se vzorkem, zde je absorbováno, odraženo nebo vyvolá emisi fluorescenčního záření. Takto změněné světlo je vedeno zpět do optického systému, kde je zaostřeno, filtrováno a převedeno na elektrický signál. Nevýhodou je nelinearita odezvy dána Lambert - Beerovým zákonem, mnohem menší dynamický rozsah a komplikovanější instrumentace. Příkladem může být optroda citlivá na pH, založená na fenolové červeni imobilizované na polyamidových částicích [37].

V multikomponentní analýze se využívají tzv. **elektronické nosy** a **jazyky**. Tato metoda je však použitelná pouze v případě, že se nevyžadují podrobné údaje, ale postačí informace o identitě vzorku a nanejvýše hrubé semikvantitativní ohodnocení. Výhodou, která znamená velkou perspektivu pro tuto metodu, je nepoměrně rychlejší a lacinější analýza. Elektronický jazyk je vícekanálový chemický analyzátor, jehož kanály poskytují omezeně selektivní odezvu na několik podstatných složek měřeného kapalného vzorku. Signál je zpracováván algoritmy rozpoznání vzoru a výsledkem je identifikace vzorku s určitou známou substancí, např. konkrétní druh vína a jeho vlastností jako stáří, stupeň kvality, případně včetně kvantitativního ohodnocení. Elektronický nos má stejné vlastnosti jako jazyk, rozdíl spočívá pouze reakci v plynném prostředí [37].

Lab-on-a-chip je koncept, který zahrnuje chemickou nebo biochemickou analýzu, kterou by bylo možné provést nejen v laboratoři, ale také v továrně nebo na poli. Systémy jsou miniaturizovány a jsou uzpůsobeny úplné automatizaci. Tato procedura obsahuje nástřík vzorku, transport, separaci, reakci a detekci na jednom čipu.

Příklady použití jednotlivých elektrochemických metod pro stanovení některých léčiv jsou shrnuty v následující tabulce (*tbl. 1*). V další tabulce jsou pak ukázány příklady využití coulometrie pro kvantifikaci léčiv v různých matricích (*tbl. 2*).

Tabulka 1: Použití jednotlivých elektrochemických metod pro stanovení některých léčiv

| Analyt  | Použitá elektrochemická metoda   | Pracovní elektroda / mód                         | Matrix          | Odkaz | Poznámka                        |
|---|--|--|-----------------|-------|---------------------------------|
| Amlorid   | SW-AdCSV – měření obsahu<br>dc-polarografie,<br>CV – elektrochemické chování | HMDE / red                                       | tbl             | [41]  |                                 |
| Amlodipin,<br>nifedipin, felodipin,<br>lacidipin, lerkandipin | ampérometrie – měření obsahu   | GCE / ox   | tbl             | [42]  | spojení s HPLC                  |
| Artesunat,<br>dihydroartemisinin                              | ampérometrie – měření obsahu   | tenkovrstvá duální GCE / red                     | plasma          | [43]  | SPE – úprava,<br>spojení s HPLC |
| Atenolol  | ampérometrie – měření obsahu   | coated wire Ag + s-BLM<br>s inkorporovanou ssDNA | tbl             | [44]  |                                 |
| Azitromycin   | ampérometrie – měření obsahu<br>CV - elektrochemické chování                 | GCE / ox   | tbl             | [45]  | spojení s FIA                   |
| Cefalosporiny (11)  | PAD – měření obsahu  | zlatá kruhová elektroda / ox                     | sérum, cps, tbl | [46]  | spojení s HPLC                  |
| Cefalotin   | AdSV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování                         | HMDE / red                                       | moč, serum      | [47]  |                                 |
| Cefazolin<br>sodná sůl  | SW-AdCSV – měření obsahu<br>dc-polarografie,<br>CV – elektrochemické chování | HMDE / red                                       | inj.            | [48]  |                                 |
| Danazol   | SW-AdCSV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování                     | HMDE / red                                       | cps.            | [49]  |                                 |

| Analyt                    | Použitá elektrochemická metoda                               | Pracovní elektroda / mód   | Matric  | Odkaz | Poznámka                    |
|---------------------------|--|--|---|-------|-----------------------------|
| Domperidon                | DPV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování          | GCE / ox   | tb1   | [50]  |                             |
| Fluvastatin,<br>sodná sůl | DPV, SWV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování     | BDD / ox   | sérum; cps  | [51]  |                             |
| Glipizid                  | SW-AdCSV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování     | HMDDE / red  | tb1   | [52]  |                             |
| Hydrazin,<br>hydroxylamin | DPV – měření obsahu<br>CV, CA – elektrochemické chování      | GCE<br>modifikovaná Au<br>nanočásticemi<br>na PPy nanovlákně / ox  | v přítomnosti<br>amoniaku, dusičnanů,<br>dusitanů | [53]  |                             |
| Hydroxyzin                | SW-AdASV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování     | GCE / ox   | sérum; tb1  | [54]  |                             |
| Cholové kyseliny          | potenciometrie – měření obsahu                               | ISE – PVC membrána,<br>iontoměnič – TDACh,<br>plastiifikátor - DBP | cps, tb1  | [55]  | spojení s FIA –<br>wall-jet |
| Karvediol                 | DPV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování          | GCE / ox   | tb1   | [56]  |                             |
| Levodopa                  | ampérometrie – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování | Au tištěné elektrody<br>(screen-printed electrode) / ox            | tb1   | [57]  | i ve spojení<br>s FIA       |

| Analyt  | Použitá elektrochemická metoda   | Pracovní elektroda / mód  | Matrix                | Odkaz | Poznámka                        |
|---|--|---|-----------------------|-------|---------------------------------|
| Methylprednison acetát  | voltametrie – měření obsahu<br>DPV, CA – elektrochemické chování             | nano Au/ITO / ox  | moč, plasma; inj, tbl | [58]  |                                 |
| Metoklopramid,<br>hydrochlorothiazid,<br>imipramin,<br>diklofenak | ampérometrie – měření obsahu   | GCE / ox  | plasma, sérum         | [59]  | LLE – úprava,<br>spojení s HPLC |
| Metronidazol  | DPV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování                          | MWCNT GCE / red   | inj, tbl              | [60]  |                                 |
| Morfin  | ampérometrie – měření obsahu<br>CV – depozice morfinu na elektrodu           | coated wire Pt + PEDOT<br>s imprintovaným morfinem /<br>ox.                 |                       | [61]  | mikrofluidní čip                |
| Nandrolon   | DPV, SWV - měření obsahu<br>CV, CA - elektrochemické chování                 | GCE<br>modifikovaná fullerenem C <sub>60</sub> /<br>ox.                     | moč, sérum            | [62]  |                                 |
| Nimesulid   | DPV – měření obsahu<br>CV – chování elektrody                                | GCE + CNT modifikované<br>cysteinovou kyselinou                             | sérum, tbl            | [63]  |                                 |
| Norethisteron   | SW-AdCSV – měření obsahu<br>dc-polarografie,<br>CV – elektrochemické chování | HMDE / red  | tbl                   | [64]  |                                 |
| Paracetamol   | DPV – měření obsahu<br>CV, CA – elektrochemické chování                      | uhlíková pasta modifikovaná<br>K <sub>2</sub> Co[Fe(CN) <sub>6</sub> ] / ox | tbl                   | [65]  |                                 |

| Analyt   | Použitá elektrochemická metoda  | Pracovní elektroda / mód                         | Matrix                          | Odkaz | Poznámka      |
|--|---|--|---------------------------------|-------|---------------|
| Piroxikam  | DPV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování                   | MWCNT uhlíková pasta / ox                        | cps, gel, tbl.                  | [66]  |               |
| Terazosin  | SW-AdCSV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování              | HMDE / red.                                      | plasma; tbl.                    | [67]  |               |
| Tetracyklin,<br>chlortetracyklin,<br>oxytetracyklin,<br>doxycyklin | ampérometrie – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování          | BDD, GCE / ox                                    | cps.                            | [68]  | spojení s FIA |
| Triprolidin<br>hydrochlorid  | DCV, NPV, SWV,<br>DP-AdSV - měření obsahu                             | HMDE / red.                                      | tbl.                            | [69]  |               |
| Valacyklovir   | DPV, SWV – měření obsahu<br>CV – elektrochemické chování              | GCE / ox   | sérum,<br>žaludeční šťáva; tbl. | [70]  |               |
| Valproát   | pulsní galvanometrie – měření obsahu                                  | coated wire Pt + PPy<br>s rozpuštěným valproátem | sirup; tbl.                     | [71]  |               |
| Zafirlukast  | SWV, SW-AdSV – měření obsahu<br>CV, LSV, CA – elektrochemické chování | HMDE, GCE (LSV) / red.                           | tbl.                            | [72]  |               |



Tabulka 2: Použití coulometrie pro stanovení některých léčiv

| Analyt   | Použitá elektrochemická metoda    | Mód | Matix                                   | Odkaz | Poznámka                         |
|--|-----------------------------------|-----|---|-------|----------------------------------|
| Buspiron   | coulometrie                       | ox  | plasma                                  | [73]  | spojení s HPLC, column-switching |
| Cidofovir, foskarnet                                       | coulometrie                       | ox  | plasma, moč                             | [74]  | spojení s HPLC                   |
| Klarithromycin + metabolity                                | coulometrie                       | ox  | plasma, žaludeční tkáň, žaludeční šťáva | [75]  | spojení s HPLC                   |
| Makrolidy (7)  | coulometrie                       | ox  | moč, plasma, sérum                      | [76]  | spojení s HPLC                   |
| Makrolidy (10)   | coulometrie, modifikace CoulArray | ox  | moč                                     | [77]  | LLE – úprava, spojení s HPLC     |
| Morfin + glukuronidy                                       | coulometrie                       | ox  | plasma                                  | [78]  | spojení s HPLC                   |
| Olanzapin  | coulometrie                       | red | mozková tkáň                            | [79]  | SPE – úprava, spojení s HPLC     |
| Olanzapin, desmethylolanzapin                              | coulometrie                       | red | plasma                                  | [80]  | SPE – úprava, spojení s HPLC     |
| Raloxifen hydrochlorid                                     | coulometrie, modifikace CoulArray | ox  | tbl                                     | [81]  | spojení s HPLC                   |
| Tetracykliny (5)   | coulometrie, modifikace CoulArray | ox  | mléko                                   | [82]  | spojení s HPLC                   |
| Vitaminy B <sub>1</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> | coulometrie                       | ox  | maso, ovocné šťávy                      | [83]  | spojení s HPLC                   |
| Zolmitriptan + metabolity                                  | coulometrie                       | ox  | plasma                                  | [84]  | SPE – úprava, spojení s HPLC     |

# **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

**(Komentovaný soubor publikovaných prací)**

#### **4.1. Comparison of different stationary phases for bioanalytical studies of biologically active compounds**

**ZERZAŇOVÁ, A.; CÍSAŘ, P.; KLIMEŠ, J.:**  
*Journal of Separation Science* **29** (2006) 2126 – 2135.

Anna Zeržanová  
Přemek Císař  
Jiří Klimeš

Charles University, Faculty of  
Pharmacy, Department of  
Pharmaceutical Chemistry and  
Drug Control, Hradec Králové,  
Czech Republic

## Original Paper

# Comparison of different stationary phases for bioanalytical studies of biologically active compounds

In this study, the chromatographic behaviour of four mixtures of compounds was tested on columns possessing various surface properties. Cocaine, dimefluron, nabumetone, and tramadol were chosen as the test compounds. Cocaine is a tropane alkaloid, which is relatively often abused as a drug. This is why many papers have already been written about its determination in human biological samples. Dimefluron, a derivative of benzo[*c*]fluorene, is a new perspective drug being investigated for its potential antineoplastic effects. Nabumetone is a non-steroidal anti-inflammatory prodrug used for treatment of inflammatory and degenerative rheumatic diseases. Tramadol, derived from an opioid structure is used as an anodyne for treatment of severe pain. As a medicament it is usually determined either in biological samples or in pharmaceuticals. The above-mentioned model drugs were separated using chromatographic columns with C18, C8, palmitamidopropyl, and pentafluorophenylpropyl chains. The best conditions for separation of the individual compounds and their metabolites were chosen on the basis of resolution, retention times, and peak symmetry.

**Keywords:** Cocaine / Comparison of columns / Dimefluron / Nabumetone / Tramadol

Received: November 30, 2005; revised: May 30, 2006; accepted: June 7, 2006

DOI 10.1002/jssc.200500469

## 1 Introduction

Numerous HPLC columns with different bonded stationary phases are nowadays available, and producers continue to expand the range of columns they offer. New trends lead to size minimization and to decreased flow resistance. However, HPLC of classical dimensions is still used for routine analyses in laboratories.

Interactions between molecules of predominantly neutral character and the classical types of bonded stationary phases (C18 and C8) can be described mainly in analogy to a lipophilicity distribution between *n*-octanol and water. The other interactions are asserted above all in the case of ionogenic compounds or in the case of different types of stationary phases in dependence on bonded chains. New column architectures permit reduction of analysis time by increasing the flow rate. Various analytical HPLC columns were tested in this study: two particle-packed and two monolithic columns. The monolithic columns

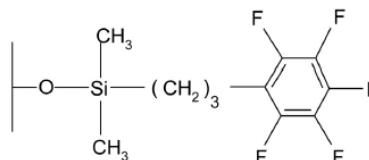
**Correspondence:** Anna Zeržanová, Charles University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Heyrovského 1203, CZ-500 05 Hradec Králové, Czech Republic.

**E-mail:** anna.zerzanova@faf.cuni.cz

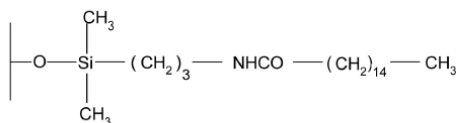
**Fax:** +420-495-512423

included bonded C18 or C8 chains. These are made from highly porous monolithic rods of high-purity polymeric silica gel with a revolutionary bimodal pore structure ([http://pronet-internet.merck.de/Attachment/18571.ProNet.pdf?file, 28/02/2006](http://pronet-internet.merck.de/Attachment/18571.ProNet.pdf?file,28/02/2006); [http://www.phenomenex.com/phen/products/onyx/t\\_bimodal\\_pore.htm, 28/02/2006](http://www.phenomenex.com/phen/products/onyx/t_bimodal_pore.htm,28/02/2006)).

The particle-packed columns included new stationary phases – pentafluorophenylpropyl (HS F5) and palmitamidopropyl (RP-Amide) chains. According to the manufacturer, HS F5 (Fig. 1) gives excellent retention and resolution of polar compounds, as well as better selectivity, peak shape, and efficiency. Generally, bases are retained longer on HS F5 than on a C18 phase.



**Figure 1.** Structure of the bonded chain of Discovery HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm (Supelco) column ([http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/HS\\_F5.html, 28/02/2006](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/HS_F5.html,28/02/2006)).

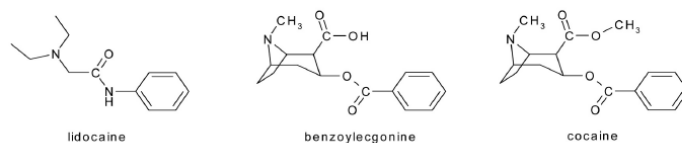


**Figure 2.** Structure of the bonded chain of Ascetis™ RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm Supelco) column ([http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco\\_Home/Spotlights/Discovery\\_HPLC/Discovery\\_RP\\_Amide\\_C16\\_HPLC\\_Columns.htm](http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Spotlights/Discovery_HPLC/Discovery_RP_Amide_C16_HPLC_Columns.htm), 28/02/2006).

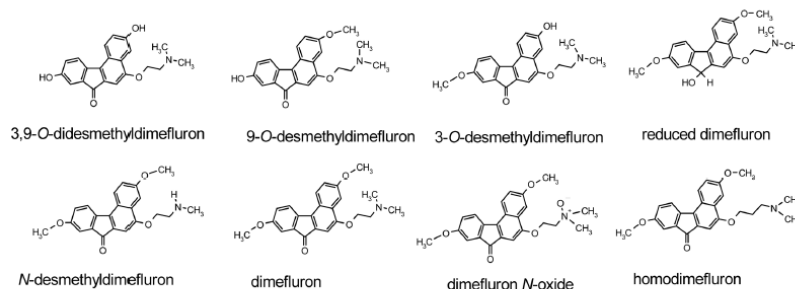
Ascetis RP-Amide (Fig. 2) is a polar embedded RP phase that provides unique selectivity and increased resolution for HPLC analyses of polar compounds.

Cocaine, dimefluron, nabumetone, and tramadol were chosen as test compounds. The two drugs (nabumetone and tramadol), the habit-forming substance (cocaine), and the potential drug (dimefluron) were studied after administration in a biological sample where they were determined together with their metabolites. These four mixtures of compounds were chosen for comparison of stationary phases.

Cocaine (Fig. 3), belonging to the group of tropane alkaloids, is a drug that is relatively often abused. It is metabolized in the human body to form benzoylecgonine as major metabolite, regardless of the mode of administration, and this compound is most commonly used for analytical determination of cocaine abuse. Immunochemical and TLC methods have been developed for proof of the presence of cocaine in biological systems. Many



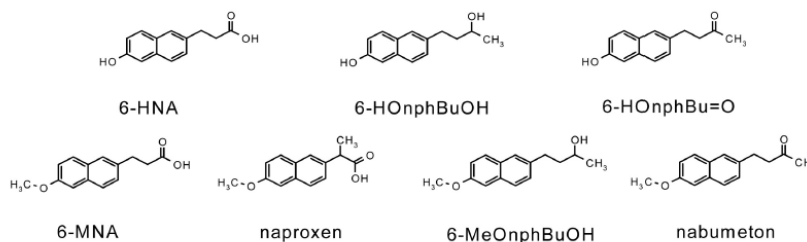
**Figure 3.** Structures of lidocaine (used as IS), benzoylecgonine, and cocaine.



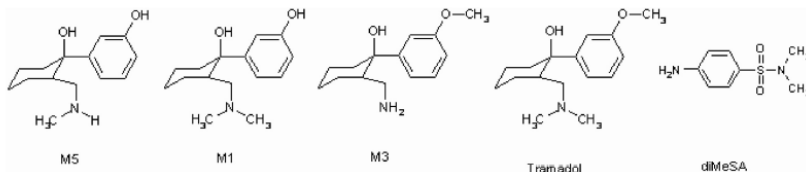
**Figure 4.** Structures of dimefluron, its studied metabolites, and homodimefluron (used as IS).

instrumental techniques such as HPLC, GC, CE, etc. (usually coupled with an MS detector) are used for its determination and determination of its metabolites [1, 2]. UV detection is commonly used in HPLC. Fluorescence and mass spectroscopy can also be used to increase sensitivity [3]. In HPLC, which is the focus of our interest, various chromatographic columns have been used, mostly classical C18 and C8 columns. A column with bonded cyanopropyl is an example of a phase at an interface between RP and NP. Use of an internal standard is widespread. Lidocaine, bupivacaine, higher esters of benzoylecgonine, or deuterated cocaine or benzoylecgonine serve this purpose (MS) [1, 4].

Dimefluron (Fig. 4) is one of a set of basic derivatives of benzo[*c*]fluorene which are being investigated for their potential antineoplastic effect. It is altered primarily to *O*-desmethyl, *N*-desmethyl, *N*-oxide, and in position *C*<sub>7</sub> reduced metabolites. These six principal metabolites were chosen with dimefluron for this study. Homodimefluron (the higher homologue of dimefluron) was used as internal standard. Three types of columns with different mobile phases were tested in previous papers where dimefluron was studied. A column with bonded pentafluorophenylpropyl chain was selected for its best properties. UV (at 317 nm for dimefluron and metabolites and at 367 nm for reduced dimefluron) [4] and fluorescence detection [5] were used. The HPLC–MS method was developed for identification of the other minority phase I metabolites and phase II metabolites [4].



**Figure 5.** Structures of nabumetone, its studied metabolites, and naproxen (used as IS).



**Figure 6.** Structures of tramadol, its studied metabolites, and diMeSA (used as IS).

Nabumetone (Fig. 5) is a relatively new nonsteroidal anti-inflammatory prodrug, which undergoes extensive first pass metabolism to 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA). Only nabumetone and 6-MNA are usually determined [6–8]. The other effective and non-effective metabolites are generated in the body. The determination of nabumetone and its five metabolites has also been described [9]. The same working group solved the determination of phase II metabolites. The structures of these phase II metabolites were solved by HPLC with MS detection [10]. Naproxen is generally used as internal standard. UV, fluorescence, or mass spectrometric detection are described in previous papers. Columns with bonded C18 chain were usually employed [7–10]. A C8 bonded chain column has been used once [6]. Mobile phases varied. The use of acetonitrile and an aqueous component of low pH value was the only common feature.

Tramadol (Fig. 6) is a centrally-acting analgesic agent used in the treatment of more severe pain. In an organism it is preferentially metabolized by *O*- and *N*-desmethylation to *O*-desmethyl- (M1) and *N,N*-didesmethyltramadol (M3). Also other metabolites of tramadol, which occur in rat and in dog, were elucidated with the aid of MS [11]. Three major metabolites M1, M3, M5 were chosen for our study. All three major separation techniques GC, CE, and HPLC have been used for determination of tramadol and its metabolites [12]. Many detection techniques have been coupled with HPLC for this purpose: UV, fluorescence, electrochemical, and MS [12]. *N*-Acetylprocainamide [13], diMeSA [12], the *O*-ethoxy derivative of tramadol [14–17], metoprolol [18], fluconazole [19],  $^2\text{H}_2$  and  $^{15}\text{N}$  tramadol (MS) [20] were used as internal

standards. Methods using C18 columns with diverse mobile phases were developed for determination of tramadol and its metabolites [18, 21, 22]. An RP select B column was also used [12]. A method for determination of tramadol and its two monodesmethyl metabolites on a column with a monolithic architecture [23] was also developed. In the majority of cases simple mixtures of the studied compounds, internal standard, and at most one or two metabolites were separated. Often the determination was performed only as a separation of *O*-desmethyltramadol and tramadol with internal standard.

These four groups of compounds have been chosen because each of them represents a different type of analyte. One of them (nabumetone) is neutral with acid and neutral metabolites. The others are basic. All of them contain a planar structure in their molecule. These are important properties for studying their behaviour on the various types of HPLC columns.

The aim of this study was to compare the behaviour of different compounds on various chromatographic columns. The following analytical columns were tested: Chromolith Performance RP-18e,  $100 \times 4.6$  mm, monolith; Onyx Monolithic C8,  $100 \times 4.6$  mm, monolith; Discovery HS F5,  $250 \times 4$  mm,  $5 \mu\text{m}$  and Ascentis RP-Amide,  $250 \times 4.6$  mm,  $5 \mu\text{m}$ .

## 2 Experimental

### 2.1 Chemicals and materials

Cocaine hydrochloride, (–)-methyl-[3β-benzoyloxy-2β(1*αH*,5*αH*)-tropanecarboxylate] hydrochloride ( $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ ,  $M_r = 303$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri,

USA); benzoylecgonine anhydrous, (-)-[3 $\beta$ -benzoxyloxy-2 $\beta$ -(1 $\alpha$ H,5 $\alpha$ H)-tropanecarboxylic acid] (C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>, M<sub>r</sub> = 289) (Alltech, Applied Science, Pennsylvania, USA) and lidocaine, 2-diethylamino-2',6'-dimethylacetanilide (C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O, M<sub>r</sub> = 234), used as IS, (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) were used in our study.

Dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride (C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>ClNO<sub>4</sub>, M<sub>r</sub> = 414); 9-O-desmethyl-dimefluron, 9-hydroxy-3-methoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub>, M<sub>r</sub> = 399.87); 3-O-desmethyl-dimefluron, 3-hydroxy-9-methoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub>, M<sub>r</sub> = 400); 3,9-O-didesmethyl-dimefluron, 3,9-dihydroxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[*c*]fluoren-7-one, base (C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>, M<sub>r</sub> = 349); N-desmethyl-dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-methylaminoethoxy)-7H-benzo[*c*]fluoren-7-one hydrochloride (C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>4</sub>, M<sub>r</sub> = 400); dimefluron N-oxide (C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>, M<sub>r</sub> = 393); C<sub>7</sub>-reduced dimefluron, 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminoethoxy)-7H-benzo[*c*]fluoren-7-ol (C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>, M<sub>r</sub> = 379) and homodimefluron (a higher homologue of dimefluron), 3,9-dimethoxy-5-(2-dimethylaminopropoxy)-7H-benzo[*c*]fluoren-7-one base (C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub>, M<sub>r</sub> = 391) were synthesized in our laboratories. Their structures were confirmed by NMR and MS. Their syntheses have been described in a previous paper [4].

Nabumetone, 4-(6-methoxy-2-naphthyl)-butan-2-one (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 228) was obtained from PRO.MED.CS Praha a.s., Czech Republic. Naproxen, (+)-6-methoxy- $\alpha$ -methyl-2-naphthaleneacetic acid (Sigma Aldrich, Prague, Czech Republic) was used as IS for HPLC determination. 6-Methoxy-2-naphthylacetic acid (C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>, M<sub>r</sub> = 216, 6-MNA); 6-hydroxy-2-naphthylacetic acid (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>, M<sub>r</sub> = 202, 6-HNA); 4-(6-methoxy-2-naphthyl)-butan-2-ol (C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 230, 6-MeOnphBuOH); 4-(6-hydroxy-2-naphthyl)-butan-2-one (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 214, 6-HOnphBu=O); 4-(6-hydroxy-2-naphthyl)-butan-2-ol (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 216.28, 6-HOnphBu-OH) were synthesized in the laboratories of the Institute of Experimental Biopharmaceutics and used as the standards of nabumetone metabolites. Their structures have been confirmed by HPLC and MS [9, 10].

Tramadol, (RS,RS)-2-(dimethylaminomethyl)-1-(3-methoxyphenyl)cyclohexanol (C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 267), was obtained from PRO.MED.CS Praha a.s. (Prague, Czech Republic). O-Desmethyltramadol, (RS,RS)-2-(dimethylaminomethyl)-1-(3-hydroxyphenyl)cyclohexanol (C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 249, M1); N,N-didesmethyltramadol, (RS,RS)-2-(aminomethyl)-1-(3-methoxyphenyl)cyclohexanol (C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 235, M3), and O-desmethyl-N-desmethyltramadol, (RS,RS)-2-(methylaminomethyl)-1-(3-hydroxyphenyl)cyclohexanol (C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 235, M5) were synthesized at

The R.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute (Spring House, Pennsylvania, USA) [11]; diMeSA, N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-dimethylsulfanilamide (C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S, M<sub>r</sub> = 204) was synthesized in the laboratory of The Institute of Experimental Biopharmaceutics [12].

Acetonitrile (HPLC gradient grade, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA), orthophosphoric acid (85% p.a.) and potassium dihydrogenphosphate (both analytical grade, Lachema Brno, Czech Republic), and ultra-high-quality (UHQ) water (prepared using an Elgastat UHQ PS apparatus, Elga, High Wycombe, England) were used.

Phosphate buffer pH 3 (50 mmol/L, pH = 3) was prepared by mixing 6.81 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with 990 mL of UHQ water, adjusting to pH = 3 with a solution of orthophosphoric acid (2 mol/L) and making up to 1000 mL with water.

Phosphate buffer pH 2.8 (50 mmol/L, pH = 2.8) was prepared by mixing 6.81 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with 990 mL of UHQ water, adjusting to pH = 2.8 with a solution of orthophosphoric acid (2 mol/L), and making up to 1000 mL with water.

Stock solutions of studied compounds were prepared at a concentration of 10<sup>-3</sup> mol/L from the appropriate standard. Sample solution, mixtures of cocaine, benzoylecgonine, and lidocaine, of tramadol, its three metabolites, and internal standard, respectively, were prepared at a concentration of 10<sup>-4</sup> mol/L. The same procedure was used for preparation of a mixture of seven nabumetone and a mixture of eight dimefluron standards.

## 2.2 Columns

Chromolith Performance RP-18e, 100  $\times$  4.6 mm, monolith (Merck KGaA, Darmstadt Germany); Onyx Monolithic C8, 100  $\times$  4.6 mm, monolith (Phenomenex, Torrance, California, USA); Discovery HS F5, 250  $\times$  4 mm, 5  $\mu$ m (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) and Ascentis RP-Amide, 250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA) were tested in this study.

## 2.3 Chromatographic system

An Agilent 1100 Series chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) consisting of vacuum degasser, binary pump, autosampler, thermostated column compartment, variable wavelength detector, and a data station ( $\times$  86 Family 6 Model 8 Stepping 3, RAM 128 MB) with the ChemStation for LC (Rev. A.08.03 (847)) analytical software (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) running under the Windows NT operating system (Microsoft Corporation) was employed for this research.

Mixture with cocaine was detected with the aid of a UV detector at a wavelength of 230 nm. The mobile phase consisted of phosphate buffer pH 3 and acetonitrile. Vari-

ous ratios were tested and then the mobile phase with 18% of acetonitrile was chosen as the best one for further analyses. The flow rate was 1 mL/min.

Dimefluron and its metabolites were detected with a UV detector at 317 nm. The flow rate was 1 mL/min for analyses on particle-packed columns. Experiments at higher flow rates (1, 2, 3, and 4 mL/min) were pursued on monolithic columns. The mobile phases used for separations of dimeflurons contained acetonitrile and phosphate buffer pH 3 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). A linear gradient mode was used. For particle-packed columns, the chromatographic analysis started with a mobile phase composed of acetonitrile–phosphate buffer pH 3 (25:75, v/v). The proportion of acetonitrile in the mobile phase was gradually increased up to 60% in 20 min, and an isocratic mobile phase composition of acetonitrile–phosphate buffer pH 3 (60:40, v/v) was used for analysis in the time interval from 20 to 28 min. After equilibration (time interval: 28–33 min) establishing the initial chromatographic conditions, the next sample could be analysed. The gradient time profile was reduced in analyses on monolithic columns.

The UV detection of nabumetone with its metabolites was performed at a wavelength of 325 nm. The mobile phases used for nabumetone separations contained acetonitrile and 1% aqueous solution of acetic acid in isocratic mode. The ratio of component varied from 25:75 to 55:45 (acetonitrile–acidified water, v/v). The flow rate was 1 mL/min.

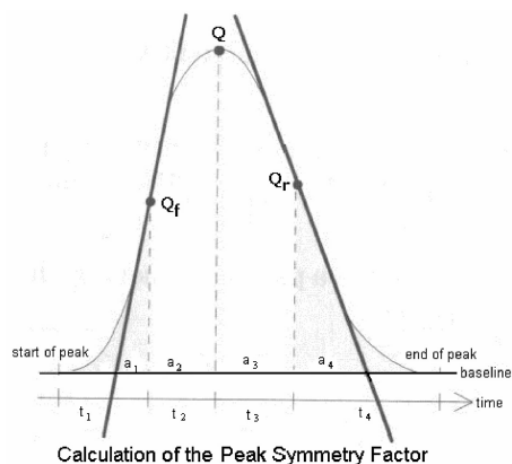
Tramadols were detected at 275 nm and the composition of the mobile phase was: acetonitrile and phosphate buffer pH 2.8 in a ratio of 30:70. The flow rate was 1 mL/min.

### 3 Results and discussion

Four groups of compounds with different properties were chosen: cocaine as a basic compound with amphoteric metabolite benzoylecgonine (carboxylic acid and tertiary amine), dimefluron and its derivatives are basic, nabumetone as a neutral drug with acid and neutral metabolites, and tramadol as a representative of basic compounds with basic (amine) or amphoteric metabolites (phenol and amine).

The chromatographic behaviour of these groups of compounds on different stationary phases was observed. Four types of stationary phases were chosen (two classical and two new ones). Compounds with a planar structure should be separated better on a Discovery HS F5 column. The Ascentis RP-Amide is claimed to reduce tailing of basic compounds.

Four parameters were monitored for numerical expression of elution properties – retention time ( $R_t$ ), theoretical plate number ( $N$ ) or height equivalent of theoretical



**Figure 7.** Calculation of peak symmetry factor.  $a$  = area of slice,  $t$  = time of slice,  $Q_f$  = height of front inflection point,  $Q_r$  = height of rear inflection point,  $Q$  = height at apex [24].

plate ( $H$ ), peak resolution ( $R_s$ ), and peak symmetry ( $S$ ) were calculated by ChemStation software. The peak symmetry obtained according to ChemStation (Agilent 1100 Series Chromatograph) was calculated as a pseudomoment by the integrator using the following moment equations (Fig. 7) [24]:

$$m_1 = a_1(t_2 + a_1/1.5 Q_f) \quad (1)$$

$$m_2 = a_2^2/0.5 Q_f + 1.5 Q \quad (2)$$

$$m_3 = a_3^2/0.5 Q_r + 1.5 Q \quad (3)$$

$$m_4 = a_4(t_3 + a_4/1.5 Q_r) \quad (4)$$

$$S = \sqrt{m_1 + m_2/m_3 + m_4} \quad (5)$$

The height equivalent of theoretical plate was calculated according to Eq. (6):

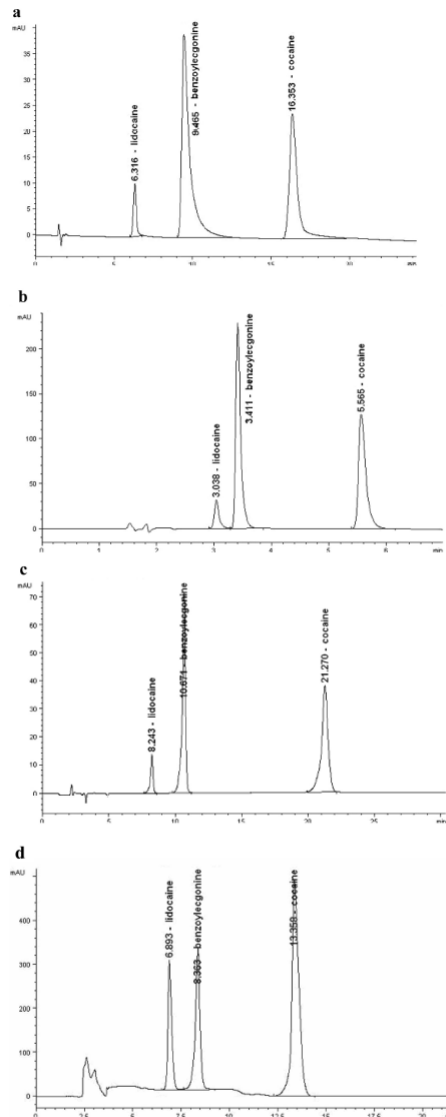
$$H = l/N \quad (6)$$

where  $H$  is the height equivalent of theoretical plate (mm),  $l$  is the column length (mm), and  $N$  is the theoretical plate number (counted by ChemStation Agilent 1100 Series Chromatograph).

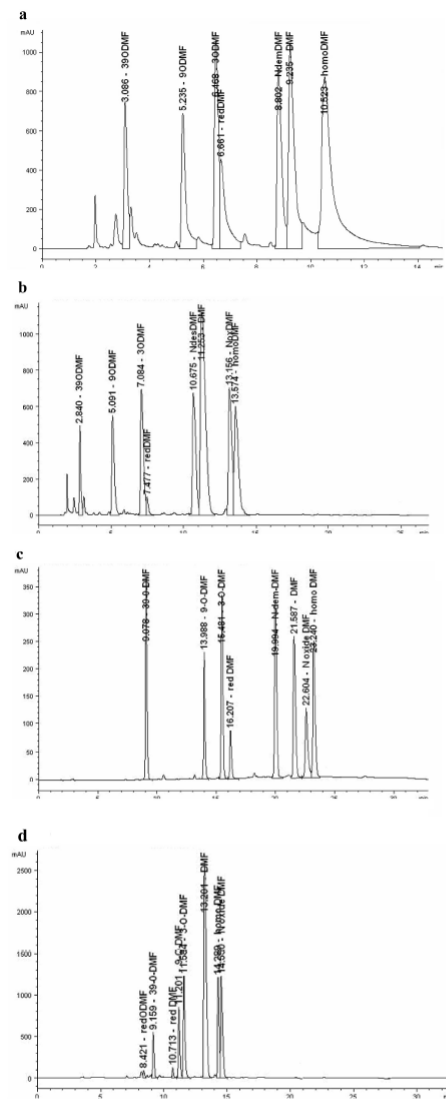
The values of the resolution for co-eluting peaks were calculated from values of peak width at half-height and the retention times acquired from two subsequent analyses of standard monocomponent solutions. The data obtained are presented in tabular form.

Experiments with cocaine started under the conditions developed for determination of cocaine and its metabolite (with IS) on an RP-Amide column. Besides the RP-





**Figure 8.** Chromatograms of the mixture of cocaine, its metabolite, and internal standard on various columns. UV detection 230 nm. Flow rate 1 mL/min. Mobile phase: 50 mmol/L phosphate buffer pH 3 and acetonitrile 82:18 (v/v). **8a:** Chromololith Performance RP-18e, 100 × 4.6 mm, monolith. **8b:** Onyx Monolithic C8, 100 × 4.6 mm, monolith. **8c:** Discovery1 HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm. **8d:** Ascentis RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm.



**Figure 9.** Chromatogram of the mixture of dimethylfluron, its metabolites and internal standard on various columns. UV detection 317 nm. Flow rate 1 mL/min. Mobile phase: **9a, 9b:** 50 mmol/L phosphate buffer pH 3 and acetonitrile 25:75 (v/v). **9c, 9d:** Gradient mode: 0–20 min: 75:25–40:60 (v/v), 21–28 min: 60:40 (v/v). **9a:** RP-18e, 100 × 4.6 mm, monolith. **9b:** Onyx Monolithic C8, 100 × 4.6 mm, monolith. **9c:** Discovery HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm. **9d:** Ascentis RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm.

**Table 1.** System suitability data for a mixture of cocaine, its metabolite and internal standard (average values from four analyses).

|                | Chromolith 18  |      |           |       |       | Onyx C8        |      |           |        |       | Discovery HS F5 |       |           |        |       | Ascentis RP-Amide |      |           |       |       |
|----------------|----------------|------|-----------|-------|-------|----------------|------|-----------|--------|-------|-----------------|-------|-----------|--------|-------|-------------------|------|-----------|-------|-------|
|                | $R_t$<br>(min) | N    | H<br>(mm) | $R_s$ | S     | $R_t$<br>(min) | N    | H<br>(mm) | $R_s$  | S     | $R_t$<br>(min)  | N     | H<br>(mm) | $R_s$  | S     | $R_t$<br>(min)    | N    | H<br>(mm) | $R_s$ | S     |
| Lidocaine      | 6.316          | 6013 | 0.0166    | -     | 0.878 | 3.038          | 8270 | 0.0121    | -      | 0.690 | 8.242           | 12327 | 0.0203    | -      | 1.382 | 6.893             | 6186 | 0.0404    | -     | 0.622 |
| Benzylecgonine | 9.465          | 2601 | 0.0384    | 5.886 | 0.402 | 3.411          | 9197 | 0.0109    | 2.702  | 0.622 | 10.657          | 12355 | 0.0202    | 7.089  | 1.379 | 8.363             | 7140 | 0.0350    | 3.933 | 1.142 |
| Cocaine        | 16.353         | 6685 | 0.0153    | 8.919 | 0.667 | 5.565          | 9990 | 0.0104    | 11.783 | 0.577 | 21.243          | 12677 | 0.0197    | 18.570 | 1.103 | 13.358            | 7461 | 0.0335    | 9.831 | 0.606 |

$R_t$  = retention time, N = theoretical plate number, H = height equivalent of theoretical plate,  $R_s$  = peak resolution, S = peak symmetry.

**Table 2.** System suitability data for a mixture of dimefluron, its metabolites and internal standard (average values from four analyses)

|                              | Chromolith 18  |       |           |       |       | Onyx C8        |       |           |       |       | Discovery HS F5 |       |           |        |       | Ascentis RP-Amide |       |           |       |       |
|------------------------------|----------------|-------|-----------|-------|-------|----------------|-------|-----------|-------|-------|-----------------|-------|-----------|--------|-------|-------------------|-------|-----------|-------|-------|
|                              | $R_t$<br>(min) | N     | H<br>(mm) | $R_s$ | S     | $R_t$<br>(min) | N     | H<br>(mm) | $R_s$ | S     | $R_t$<br>(min)  | N     | H<br>(mm) | $R_s$  | S     | $R_t$<br>(min)    | N     | H<br>(mm) | $R_s$ | S     |
| 3,9-O-Didesmethyl-dimefluron | 2.891          | 2376  | 0.0421    | -     | 0.397 | 2.876          | 4828  | 0.0207    | -     | 0.512 | 9.462           | 35633 | 0.0073    | -      | 0.663 | 9.189             | 35324 | 0.0071    | -     | 0.958 |
| 9-O-Desmethyl-dimefluron     | 5.182          | 7258  | 0.0138    | 8.469 | 0.367 | 5.122          | 5305  | 0.0188    | 9.509 | 0.377 | 14.474          | 60927 | 0.0041    | 22.452 | 0.679 | 11.226            | 47588 | 0.0053    | 2.637 | 0.625 |
| 3-O-Desmethyl-dimefluron     | 6.413          | 7007  | 0.0143    | 3.658 | 0.433 | 7.084          | 5019  | 0.0199    | 5.626 | 0.353 | 15.968          | 64882 | 0.0039    | 6.133  | 0.612 | 11.591            | 35308 | 0.0071    | 1.591 | 0.520 |
| Reduced dimefluron           | 6.593          | 9791  | 0.0102    | 0.529 | 0.241 | 7.443          | 11823 | 0.0085    | 1.051 | 0.425 | 16.718          | 66305 | 0.0038    | 2.930  | 0.638 | 10.707            | 57249 | 0.0044    | 7.413 | 0.626 |
| N-Desmethyl-dimefluron       | 8.795          | 13300 | 0.0075    | 7.001 | 0.418 | 10.683         | 9741  | 0.0103    | 8.975 | 0.369 | 20.576          | 80789 | 0.0031    | 13.981 | 0.623 | 13.339            | 43549 | 0.0057    | 0.017 | 0.524 |
| Dimefluron                   | 9.216          | 10039 | 0.0102    | 1.199 | 0.367 | 11.326         | 6732  | 0.0149    | 1.283 | 0.331 | 22.195          | 78603 | 0.0032    | 5.316  | 0.586 | 13.269            | 30658 | 0.0082    | 5.969 | 0.424 |
| Dimefluron N-oxide           | 10.637         | 9473  | 0.0106    | 0.275 | 0.252 | 13.191         | 12977 | 0.0077    | 3.568 | 0.353 | 23.21           | 49642 | 0.0051    | 2.757  | 0.578 | 14.577            | 52587 | 0.0048    | 1.006 | 0.548 |
| Homodimefluron               | 10.549         | 10434 | 0.0096    | 2.841 | 0.372 | 13.599         | 11861 | 0.0084    | 0.823 | 0.344 | 23.894          | 77600 | 0.0032    | 1.788  | 0.628 | 14.312            | 47174 | 0.0053    | 3.671 | 0.488 |

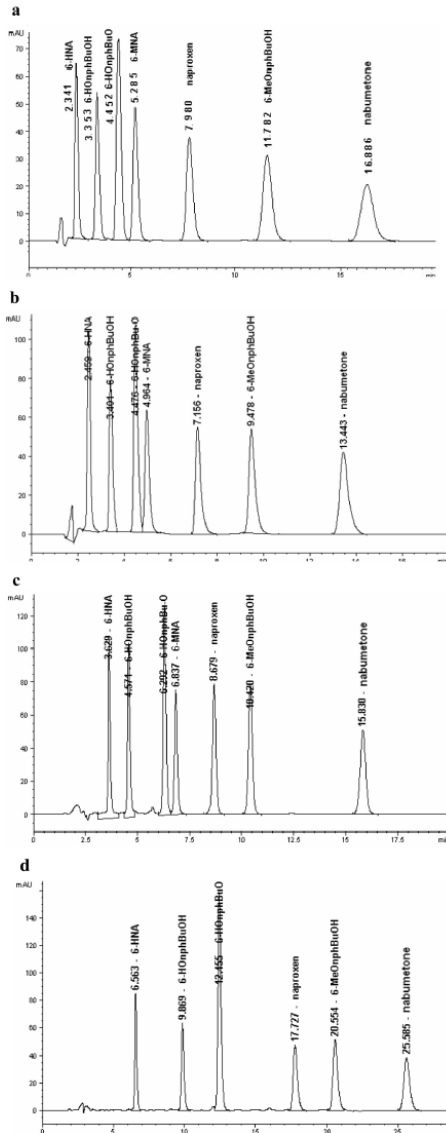
$R_t$  = retention time, N = theoretical plate number, H = height equivalent of theoretical plate,  $R_s$  = peak resolution, S = peak symmetry.

Amide column, which seemed to be the best column for separation of this mixture, the separation was also satisfactory on the C8 column (Fig. 8, Table 1).

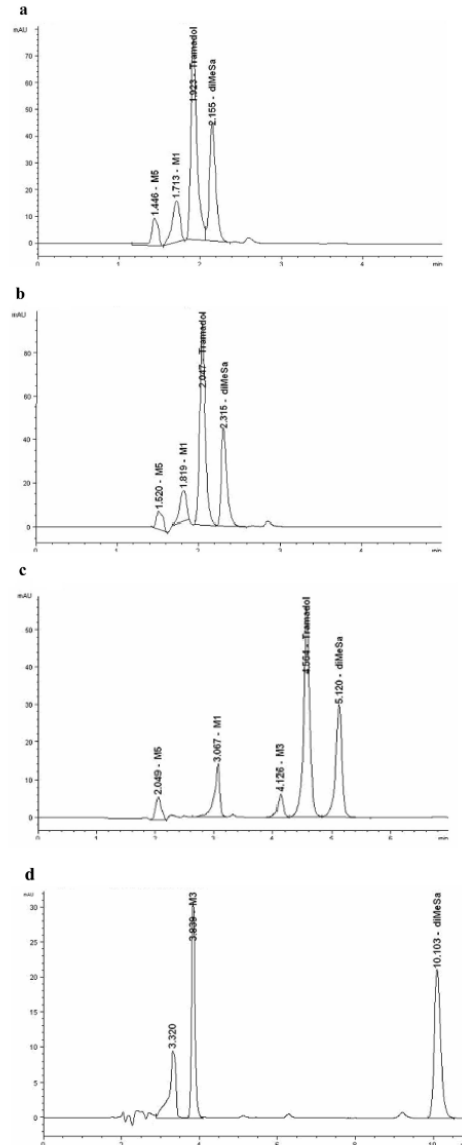
The experiments with dimefluron described in previous papers started on columns with bonded C18 stationary phase or with RP select B, which is a mixed stationary phase (C18 and C8). These experiments were carried out in isocratic mode. The final mobile phase used in gradient mode on an HS F5 column was adopted from the above-mentioned paper. The same mobile phase was tried on all the stationary phases. The values of the retention times were lower on the monolithic columns and also even on RP-Amide but the other parameters led to the choice of HS F5. The values of peak resolution were always unsuitable for at least one pair of peaks except in the case of the chosen HS F5 phase (tailing on C18, unsatisfactory peak resolution on C8 and RP-Amide). The values of symmetry decreased in the order HS F5, RP-Amide, C8, C18 bonded phases. The narrowest distribution of values of symmetry of all the studied compounds and their best separations were achieved on the HS F5 column. The order of peaks varied with the columns. While this order was the same on HS F5 and C8, the rank

of reduced dimefluron changed on RP-Amide. (It would be interesting to investigate this fact for the other reduced dimeflurons.) (Fig. 9, Table 2)

The experiments with nabumetone and its metabolites started under conditions described in reference [9]. The mobile phase contained acetonitrile, UHQ water, and acetic acid (45:55:1) on a column with a C18 bonded chain. These conditions were adjusted. UHQ water and acetic acid were combined into one component of the mobile phase – 1% acetic acid in water (acidified water). This step simplified experimentation with the composition of the mobile phase. The mobile phase contained acidified water and acetonitrile in the ratio 55:45 (v/v) on HS F5 and RP-Amide. The mobile phase containing acidified water and acetonitrile in the ratio 65:35 (v/v) was used for analyses on both monolithic columns. Because the separation of nabumetone and its metabolites was satisfactory on monolithic columns, an increase of flow rate was tested. In the case of dimefluron, the separation was unsuitable using a lower flow rate, thus experiments with a higher flow rate were pointless. In the case of nabumetone, the analyses were accelerated proportionally to the increase of flow rate. The symme-



**Figure 10.** Chromatogram of the mixture of nabumetone, its metabolites and internal standard on various columns. UV detection 325 nm. Flow rate 1 mL/min. Mobile phase: 1% aqueous solution of acetic acid and acetonitrile in the ratio: **10a, 10b:** 65:35 (v/v). **10c, 10d:** 55:45 (v/v). **10a:** Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4.6 mm, monolith. **10b:** Onyx Monolithic C8, 100 × 4.6 mm, monolith. **10c:** Discovery HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm. **10d:** Ascentis RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm.



**Figure 11.** Chromatogram of the mixture of tramadol, its metabolites and internal standard on various columns. UV detection 275 nm. Flow rate 1 mL/min. Mobile phase: 50 mmol/L phosphate buffer pH 2.8 and acetonitrile 70:30. **11a:** Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4.6 mm, monolith. **11b:** Onyx Monolithic C8, 100 × 4.6 mm, monolith. **11c:** Discovery HS F5, 250 × 4 mm, 5 μm. **11d:** Ascentis RP-Amide, 250 × 4.6 mm, 5 μm.

**Table 3.** System suitability data for a mixture of nabumetone, its metabolites and internal standard (average values from 4 analyses).

|              | Chromolith 18  |      |             |       |       | Onyx C8        |      |             |       |       | Discovery HS F5 |       |             |        |       | Ascentis RP-Amide |       |             |        |       |
|--------------|----------------|------|-------------|-------|-------|----------------|------|-------------|-------|-------|-----------------|-------|-------------|--------|-------|-------------------|-------|-------------|--------|-------|
|              | $R_t$<br>(min) | $N$  | $H$<br>(mm) | $R_s$ | $S$   | $R_t$<br>(min) | $N$  | $H$<br>(mm) | $R_s$ | $S$   | $R_t$<br>(min)  | $N$   | $H$<br>(mm) | $R_s$  | $S$   | $R_t$<br>(min)    | $N$   | $H$<br>(mm) | $R_s$  | $S$   |
| 6-HNA        | 2.338          | 1011 | 0.0989      | -     | 0.712 | 2.504          | 4350 | 0.0230      | -     | 0.664 | 3.593           | 7227  | 0.0346      | -      | 0.795 | 6.613             | 13461 | 0.0186      | -      | 0.769 |
| 6-HOnphBuOH  | 3.355          | 1399 | 0.0715      | 3.112 | 0.713 | 3.451          | 5801 | 0.0172      | 5.122 | 0.579 | 4.534           | 8056  | 0.0310      | 5.065  | 0.731 | 9.915             | 15784 | 0.0158      | 11.913 | 0.772 |
| 6-HOnphBuO   | 4.450          | 1568 | 0.0638      | 2.713 | 0.805 | 4.529          | 6709 | 0.0149      | 4.812 | 0.635 | 6.203           | 9834  | 0.0254      | 7.365  | 0.834 | 12.515            | 17329 | 0.0144      | 7.347  | 0.781 |
| 6-MNA        | 5.287          | 2254 | 0.0444      | 1.869 | 0.811 | 5.012          | 6950 | 0.0144      | 1.901 | 0.632 | 6.732           | 11848 | 0.0211      | 2.125  | 0.845 | 12.532            | 19080 | 0.0131      | 0.069  | 0.769 |
| Naproxen     | 7.982          | 3338 | 0.0300      | 5.391 | 0.771 | 7.200          | 7900 | 0.0127      | 7.165 | 0.584 | 8.544           | 13622 | 0.0184      | 6.724  | 0.935 | 18.521            | 18669 | 0.0134      | 11.628 | 0.777 |
| 6-MeOnphBuOH | 11.784         | 4741 | 0.0211      | 6.144 | 0.773 | 9.528          | 8579 | 0.0117      | 5.979 | 0.629 | 10.307          | 14862 | 0.0168      | 5.580  | 0.928 | 21.931            | 19625 | 0.0127      | 4.981  | 0.794 |
| Nabumetone   | 16.888         | 5072 | 0.0197      | 6.240 | 0.806 | 13.443         | 6810 | 0.0147      | 7.111 | 0.672 | 15.522          | 17145 | 0.0146      | 12.815 | 0.980 | 25.747            | 20262 | 0.0123      | 7.689  | 0.823 |

$R_t$  = retention time,  $N$  = theoretical plate number,  $H$  = height equivalent of theoretical plate,  $R_s$  = peak resolution,  $S$  = peak symmetry.

**Table 4.** System suitability data for a mixture of tramadol, its metabolites and internal standard (average values from four analyses).

|          | Chromolith 18  |      |             |       |       | Onyx C8        |      |             |       |       | Discovery HS F5 |       |             |       |       | Ascentis RP-Amide |       |             |        |       |
|----------|----------------|------|-------------|-------|-------|----------------|------|-------------|-------|-------|-----------------|-------|-------------|-------|-------|-------------------|-------|-------------|--------|-------|
|          | $R_t$<br>(min) | $N$  | $H$<br>(mm) | $R_s$ | $S$   | $R_t$<br>(min) | $N$  | $H$<br>(mm) | $R_s$ | $S$   | $R_t$<br>(min)  | $N$   | $H$<br>(mm) | $R_s$ | $S$   | $R_t$<br>(min)    | $N$   | $H$<br>(mm) | $R_s$  | $S$   |
| M5       | 1.445          | 1446 | 0.0692      | -     | 0.958 | 1.521          | 1386 | 0.0722      | -     | 0.640 | 2.047           | 2351  | 0.1063      | -     | 0.817 | 3.512             | 7501  | 0.0333      | -      | 2.488 |
| M1       | 1.718          | 1715 | 0.0583      | 1.683 | 1.323 | 1.820          | 2486 | 0.0402      | 1.897 | 1.084 | 3.064           | 7090  | 0.0353      | 6.456 | 2.002 | 3.515             | 6805  | 0.0367      | 0.501  | 2.534 |
| M3       | 1.892          | 4621 | 0.0216      | 1.221 | 0.624 | 2.007          | 4835 | 0.0207      | 1.335 | 0.758 | 4.123           | 12588 | 0.0199      | 7.219 | 1.011 | 3.846             | 9429  | 0.0265      | 3.387  | 0.771 |
| Tramadol | 1.923          | 3639 | 0.0275      | 0.967 | 0.648 | 2.048          | 5267 | 0.0190      | 1.014 | 0.733 | 4.561           | 10852 | 0.0232      | 2.718 | 0.959 | 3.781             | 4289  | 0.0583      | 2.584  | 0.509 |
| diMeSA   | 2.155          | 3854 | 0.0259      | 1.643 | 0.717 | 2.313          | 5906 | 0.0169      | 2.148 | 0.680 | 5.120           | 13132 | 0.0193      | 3.132 | 1.216 | 10.105            | 19244 | 0.0130      | 28.481 | 0.782 |

$R_t$  = retention time,  $N$  = theoretical plate number,  $H$  = height equivalent of theoretical plate,  $R_s$  = peak resolution,  $S$  = peak symmetry.

try improved. The values of resolution remained identical although it was possible that the further increase in flow rate could lead to changes of these values. The order of the peaks was the same for all the tested stationary phases. The duration of analysis was longest on RP-Amide. At a flow rate of 1 mL/min, the highest values of symmetry were noted in the case of the HS F5 column; however, the distribution of values was very wide. The narrowest distribution around the average value of symmetry was observed in the case of RP-Amide. The wide distribution of values of symmetries on HS F5 could be caused by an influence of interactions on uncovered polar phenolic group. The values of resolution were higher than 2 for all tested columns except RP-Amide, on which 6-HOnphBu=O and 6-MNA were not separated. The C18 column was shown to be the best for analysis of nabumetone and its five metabolites. The peak resolutions were satisfactory. The values of symmetry were relatively high and the distribution of values was not wide. The analysis time was short (only 17 min for separation of seven compounds, and 14 min, respectively, for C8) and it could be decreased by an increase of flow rate (only 4.2 min and 3.5 min, respectively) (Fig. 10, Table 3).

Experiments dealing with tramadol and its metabolites were begun with a mobile phase taken from the paper

[8]. This mobile phase was originally developed for the RP select B column which possesses both C18 and C8 chains. From the point of view of peak symmetry, the best column for tramadol and its metabolites was HS F5, where M1 was the only fronting compound. This could be caused by an uncovered OH group on an aromatic nucleus. This free polar group might intrude upon the  $\pi$ -interactions between the aromatic rings of analyte and stationary phase, which are probably one of the main mechanisms of separation on these types of columns. Values of peak symmetry also lay in a narrow range for columns with classical phases C8 and C18. In this case, peak co-elution happened and low values of resolution were obtained. The RP-Amide column was entirely unsuitable under the current conditions. Values of symmetry were widely distributed and very strong fronting of substances with uncovered phenolic group occurred. Separation expressed as a resolution value was also totally unsatisfactory and peaks M1 and M5, M3 and tramadol co-eluted (Fig. 11, Table 4).

#### 4 Concluding remarks

Columns for bioanalytical application were compared. Four real mixtures of compounds were used for testing of four columns. The best type of column was sought for each of them. The retention time, theoretical plate

number and height equivalent of theoretical plate, respectively; peak resolution and peak symmetry were used for the searching for the optimal stationary phase.

RP-Amide was chosen as the best column for analyses of cocaine with its major metabolite and internal standard. Compared to the other columns, the compounds were separated with satisfactory resolution on RP-Amide. The HS F5 column, having a stationary phase with planar structure, was chosen as the best column for analyses of dimefluron and its derivatives. It can be supposed that the better separation results from  $\pi$ -interactions between the aromatic rings. This hypothesis could be supported by the results obtained for nabumetone and its derivatives, which were eluted as symmetric peaks if they contained a phenolic group. The C18 bonded stationary phase was evaluated as the best column for separation of nabumetone and its derivatives. The best way to analyze tramadol with its metabolites and appropriate internal standard was on the HS F5 column with a stationary phase of planar structure. The experimental data led to this conclusion because peak symmetry was very good, with the slight exception of M1, and peaks were baseline separated with regular spacing. Peaks were more or less co-eluted on the other columns. The C18 and C8 bonded stationary phases were evaluated as unsatisfactory for the tested basic compounds; in other words, it was possible to attain better separation on modern types of columns where principles of separation other than those based only on lipophilicity prevail. The columns with the classical stationary phases (C8 and C18) are sufficient for the acid and neutral compounds. The HS F5 stationary phase is the best one for compounds with a large planar structure, especially for basic compounds, because it eliminates peak tailing, which is significant on classical stationary phases. The symmetry of peaks is influenced by polar group on this column. Certain restrictions of use were found for modern stationary phases. In some cases, HS F5 is useful but the relation between the number of carbons in aromatic rings and the number of polar groups should have been investigated.

The authors wish to thank W. N. Wu for providing standards of tramadol metabolites. This work was supported by the research project of the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic No. 002 162 0822 and by the grant project of GA UK 294/2005.

## 5 References

- [1] Dräger, B., *J. Chromatogr. A* 2002, 978, 1–35.
- [2] Anastos, N., Barnett, N. W., Lewis, S. W., *Talanta* 2005, 67, 269–279.
- [3] Sun, L., Hall, G., Lau, C. E., *J. Chromatogr. B* 2000, 745, 315–323.
- [4] Cisař, P., Nobilis, M., Vybiralová, Z., Holčapek, M., et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 1059–1071.
- [5] Kučera, R., Nobilis, M., Skálová, L., Szotáková, B., et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 1049–1058.
- [6] Jager, A. D., de, Hundt, H. K. L., Hundt, A. F., Swart, K. J., et al., *J. Chromatogr. B* 2000, 740, 247–251.
- [7] Kobylińska, K., Barlińska, M., Kobylińska, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 323–328.
- [8] Mikami, E., Goto, T., Ohno, T., Matsumoto, H., Nishida, M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 23, 917–925.
- [9] Nobilis, M., Kopecký, J., Květina, J., Svoboda, Z., Pour, M., et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 641–656.
- [10] Nobilis, M., Holčapek, M., Kolářová, L., Kopecký, J., et al., *J. Chromatogr. A* 2004, 1031, 229–236.
- [11] Wu, W. N., McKown, L. A., Gauthier, A. D., Jones, W. J., Raffa, R. B., *Xenobiotica* 2001, 31, 423–441.
- [12] Nobilis, M., Kopecký, J., Květina, J., Chládek, J., et al., *J. Chromatogr. A* 2002, 949, 11–22.
- [13] Chao, C. K., Yu, L. L., Su, L. L., Liu, C. M., Yang, T. H., et al., *Arzneim. Forsch.* 2000, 50, 636.
- [14] Becker, R., Lintz, W., *J. Chromatogr.* 1986, 377, 213.
- [15] Elsing, B., Blaschke, G., *J. Chromatogr.* 1993, 612, 223.
- [16] Valle, M., Pavon, J. M., Calvo, R., Campanero, M. A., Troconiz, I. F., *J. Chromatogr. B* 1999, 724, 83.
- [17] Ceccato, A., Vanderbist, F., Pabst, J.-Y., Streeb, B., *J. Chromatogr. B* 2000, 748, 65.
- [18] Kmetec, V., Roškar, R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 32, 1061–1066.
- [19] Campanero, M. A., Calahorra, B., Garcia-Quetglass, E., Escolar, M., Honorato, J., *Chromatographia* 1998, 48, 555.
- [20] Lintz, W., Uragg, H., *J. Chromatogr.* 1985, 341, 65.
- [21] Gan, S. H., Ismail, R., Wan Axman, W. A., Wan, Z., *J. Chromatogr. B* 2002, 772, 123–129.
- [22] Overback, P., Blaschke, G., *J. Chromatogr.* 1999, 732, 185–192.
- [23] Rouini, M.-R., Ardakani, Y. H., Soltani, F., Aboul-Enein, H. Y., Foroumadi, A., *J. Chromatogr. B* 2006, 830, 207–211.
- [24] *Understanding Your ChemStation*, Agilent Technologies, Germany, 2001.

## Komentář k článku

Tato práce je zaměřena na srovnání čtyř typů chromatografických kolon pro jejich použití v bioanalytických aplikacích.

### Cíl práce

Cílem této práce bylo porovnat chromatografické vlastnosti čtyř různých typů chromatografických kolon při jejich testování čtyřmi různými směsmi biologicky aktivních látek a následně vybrat nejlepší podmínky pro separaci jednotlivých testovaných skupin. Pro testování byly použity reálné směsi biologicky aktivních látek. Každá ze směsí obsahovala mateřskou účinnou látku (kokain, dimefluron, nabumeton a tramadol), jejich přirozené metabolity a vhodný vnitřní standard. Měření probíhala na dvou monolitických kolonách: Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm, monolith; Onyx Monolithic C8, 100 x 4.6 mm, monolith. Dále byly testovány dvě náplňové chromatografické kolony s relativně novými sorbenty: Discovery HS F5, 250 x 4 mm, 5 µm obsahující pentafluorofenylpropylové řetězce a Ascentis RP-Amide, 250 x 4.6 mm, 5 µm, disponující palmitamidopropylovými řetězci. Pro objektivní hodnocení chromatografických vlastností byly monitorovány následující parametry: retenční čas, počet teoretických pater respektive výškový ekvivalent teoretického patra, rozlišení a symetrie píku.

### Komentář a diskuse k výsledkům

Zmiňované čtyři skupiny látek byly vybrány proto, že každá z nich reprezentuje jiný typ analytu. Kokain je bazická sloučenina s amfoterním metabolitem (obsahuje karboxylovou skupinu a terciární amin), dimefluron i jeho metabolity jsou bazické. Nabumeton je neutrální molekula, která je biotransformována na kyselé a neutrální metabolity, zatímco tramadol reprezentuje bazickou sloučeninu s bazickými nebo amfoterními metabolity. Všechny skupiny obsahují ve svých molekulách planární struktury.

Výrobci deklarují následující vlastnosti jednotlivých kolon. Kolona Discovery HS F5 by měla lépe separovat sloučeniny s planární strukturou. Kolona Ascentis RP-Amide by měla redukovat chvostování bazických látek.

Kolona Ascentis RP-Amide byla vybrána jako nejlepší pro analýzu kokainu s jeho majoritním metabolitem a vnitřním standardem. Na rozdíl od ostatních kolon, byly tyto látky separovány s vhodným rozlišením a s uspokojivou symetrií píku. Kolona HS F5 byla vybrána jako nejlepší pro analýzu dimefluronu spolu s jeho metabolity a vnitřním standardem. Předpokládá se, že lepší separace je spojena s  $\pi$ -interakcemi mezi aromatickými kruhy. Podle předpokladů byla kolona s řetězcí C18 vyhodnocena jako nejlepší pro analýzu nabumetonu a jeho derivátů. Pro analýzu tramadolu spolu s metabolity a příslušným vnitřním standardem byla opět zvolena kolona HS F5, protože na ostatních testovaných kolonách docházelo ke koeluci píků.

Kolony s řetězcí C8 a C18 byly vyhodnoceny jako nedostačující pro separaci testovaných bazických látek. Na rozdíl od těchto kolon, na moderních typech sorbentů, kde principy separace jsou odlišné, bylo možné dosáhnout lepší separace. Lze tedy říci, že kolony s klasickými sorbenty jsou dostačující pro neutrální a kyselé sloučeniny. Kolona obsahující pentafluorofenylpropylové řetězce potvrdila deklarované vlastnosti, tedy lepší dispozice pro separace látek s velkou planární strukturou ve své molekule, a to především u bazických látek, kdy dochází k eliminaci chvostování, které je velmi výrazné u sorbentů s C8 a C18 řetězcí.

**Výsledkem této studie je srovnání chromatografických kolon pro jejich použití v bioanalytických aplikacích. Pro každou skupinu látek byly zvoleny nejlepší chromatografické podmínky a bylo také popsáno chování analytů s rozlišnou chemickou strukturou na sorbentech s různými navázanými řetězcí. Hlavním přínosem naší práce bylo, že vlastnosti kolon byly studovány na směsích příbuzných látek (léčivo – metabolity), což nebývá pravidlem při prezentaci vlastností kolon. Tím, že tedy byly kolony testovány směsí strukturně podobných látek, byla otestována i jejich selektivita.**

**4.2. Determination of a series of quinolones  
in pig plasma using solid-phase extraction  
and liquid chromatography coupled  
with mass spectrometric detection  
Application to pharmacokinetic studies**

GARCÉS, A.; ZERZAŇOVÁ, A.; KUČERA, R.; BARRÓN, D.;  
BARBOSA, J.:  
*Journal of Chromatography A* **1137** (2006) 22–29.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY A

Journal of Chromatography A, 1137 (2006) 22–29

[www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

## Determination of a series of quinolones in pig plasma using solid-phase extraction and liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection

### Application to pharmacokinetic studies

A. Garcés<sup>a</sup>, A. Zerzaňová<sup>b</sup>, R. Kučera<sup>b</sup>, D. Barrón<sup>a,\*</sup>, J. Barbosa<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Avda. Diagonal 647, E-08028 Barcelona, Spain<sup>b</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Received 21 June 2006; received in revised form 22 September 2006; accepted 27 September 2006

Available online 10 October 2006

#### Abstract

A simple and sensitive liquid chromatography (LC) method was developed for the simultaneous determination of eight quinolones in pig plasma samples. The following two methods of detection were used: ultraviolet (UV) and mass spectrometry with electrospray ionization (ESI/MS). Sample preparation consisted of solid-phase extraction (SPE) on Strata X cartridges prior to the analysis by LC/UV or LC/ESI/MS. The recovery, linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), precision and accuracy of the method were evaluated using spiked pig plasma samples. The suitability of the method for pharmacokinetic studies was evaluated by determining the concentrations of enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP) also in pig plasma, after administration of 200 mg of enrofloxacin per kilogram of fodder during 5 consecutive days. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Quinolones; Plasma analysis; Solid-phase extraction; Liquid chromatography; Mass spectrometry

#### 1. Introduction

Quinolones belong to a group of antibacterial agents which are widely used in both human and veterinary medicine. The mechanism of its effect consists in a specific inhibition of DNA gyrase, whereby synthesis of bacterial DNA and consequently, bacterial multiplication are blocked. It exhibits strong antimicrobial activity, especially against Gram-negative and some Gram-positive organisms [1–3]. Both quinolones and antibiotics are normally used not only to treat diseases but also to offer a prophylactic treatment in the veterinary field. These compounds are orally administered to various animal species that produce meat, eggs or milk. The residues of the compounds are accumulated in animal tissue after administration to livestock. Nevertheless, very low concentrations might be dangerous not

only for an individual but also for a big population. Individually, these substances may evoke an allergic hypersensitive reaction. The promotion of bacteria resistance is the next important impact for mankind [1,3]. To ensure safety, the European Union (EU) has established maximum residue limits (MRLs) legally permitted or accepted in food. [4]. There are no MRLs of quinolones in plasma or serum because blood is not a product of direct consumption, but MRLs of quinolones in pig tissues range between 50 and 1500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , depending on the target tissues and the quinolone. Nevertheless, it is very important to develop methods to analyze quinolones in biological fluids because they can show quality parameters in living animals. This is very significant since knowing the concentration in plasma (serum, blood) makes it possible to estimate the concentration in consumed tissue. Knowing the level of antibiotic remaining in an animal's body (making the analysis "in vivo"), the farmer can decide whether to kill the animal and sell the meat or the other products or to allow more time for the elimination of the drug without requiring the immediate slaughter of the animal.

\* Corresponding authors. Tel.: +34 93 402 12 77; fax: +34 93 402 12 33.

E-mail addresses: [dolores.barron@ub.edu](mailto:dolores.barron@ub.edu) (D. Barrón), [barbosa@apolo.qui.ub.es](mailto:barbosa@apolo.qui.ub.es) (J. Barbosa).

The use of various techniques to determine quinolones in biological and pharmaceutical materials is possible [5–8]. Liquid chromatography (LC) [9,10] or capillary electrophoresis (CE) [11–14] is mostly used when plasma is the aim of study. Some of these techniques only analyze one or a few substances at the same time [13,15–17], and some provide an analysis of a group of quinolones [18–20]. These separation techniques are normally coupled with an ultraviolet (UV) or fluorescence detector. Some techniques use mass spectrometry (MS) detection to determine one quinolone in dog, rat or human plasma [21–24] or a series of quinolones in animal tissues from pig, bovine or chicken [25–30].

In the work described here, a rapid and sensitive analytical method for the determination of eight quinolones in pig plasma [28] was developed. The quinolones studied are regulated in the Council Regulation of the EU for pig tissues [4]. The method has been evaluated according to the US Food and Drug Administration (FDA) guidelines for bioanalytical methods validation [31]. Sample preparation used a solid-phase extraction (SPE) procedure in order to obtain cleaner extracts to be injected into the LC system. This paper carries out a comparison of detection using UV and MS detectors as well. Much lower limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were achieved with the aid of a mass detector using electrospray ionization (ESI/MS). This developed method for determination of quinolones in pig plasma was consequently applied to determine quinolones in real samples obtained from pigs on enrofloxacin (ENR) medication. The main benefit of this work consists in the possibility of measuring not only enrofloxacin but also ciprofloxacin (CIP) as its major metabolite. This is very important because the MRL for enrofloxacin is established as a sum of enrofloxacin and ciprofloxacin.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

Quinolones were obtained from several pharmaceutical firms: ciprofloxacin (Lasa), danofloxacin (DAN) (Pfizer), enrofloxacin (Cenavisa), marbofloxacin (MAR) (Vetoquinol), difloxacin (DIF), sarafloxacin (SAR) and tosufloxacin (TOS) (Abbot), flumequine (FLU) and oxolinic acid (OXO) (Sigma). All the reagents were of analytical grade. Water was purified in a Milli-Q system (Millipore). Merck supplied ammonia, trifluoroacetic (TFA), acetic and formic acids, methanol and acetonitrile (MeCN). Citric acid was supplied by Fluka. Tested SPE cartridges were Oasis HLB (1 mL/30 mg) obtained from Waters, SDB-RPS (1 mL/2.2 mg) from 3 M Empore (Supelco) and Strata X (1 mL/30 mg) from Phenomenex.

### 2.2. Preparation of standard and stock solutions

Individual stock solutions of marbofloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin and difloxacin were prepared in concentration of  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , by dissolving the

quantity of each compound exactly weighted in 50 mM acetic acid aqueous solution. Stock solutions of oxolinic acid and flumequine were prepared by dissolving the proper quantity of each compound in MeCN at the concentration of  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Tosufloxacin, used as internal standard (I.S.), was prepared by dissolving the substance in 50 mM acetic acid–MeCN mixture (80:20; v/v) at the concentration of  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Working solutions were prepared by mixing individual stock solutions and diluting to the concentrations of 60, 10 and  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  with water and the solution of tosufloxacin to  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , and were used to spike the plasma samples.

A standard buffer of potassium hydrogenphthalate ( $0.05 \text{ mol kg}^{-1}$ ) prepared in a hydro-organic mixture (9% of MeCN) with pH of 4.25 [32,33] was used to calibrate the pH-meter.

### 2.3. Preparation of fortified samples

A fortified plasma sample was prepared by spiking 500  $\mu\text{L}$  of blank pig plasma and adding the adequate volume of working solutions of quinolones to obtain samples at the concentrations from 100 to  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$  of each quinolone and I.S. at the concentration of  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . For calibration, spiked samples of 500  $\mu\text{L}$  of blank plasma at 10 concentration levels ( $100\text{--}2400 \mu\text{g L}^{-1}$ ) of quinolones and  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  of I.S. were prepared. In order to evaluate recoveries of quinolones by using the optimized method, spiked samples at six concentration levels ( $100\text{--}2400 \mu\text{g L}^{-1}$ ) of quinolones and  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  of I.S. were prepared and compared with samples that were spiked after SPE procedure (considered as showing 100% recovery). All the samples were prepared in duplicate and analyzed twice.

### 2.4. Instrumentation

LC/UV measurements were performed using a HP Agilent Technologies 1100 series chromatograph equipped with an autosampler. System was controlled by software Chemstation for LC 3D Rev. A 08.03(847) (Agilent Technologies). Quinolones were separated on a 150 mm  $\times$  4.6 mm Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub> column (Agilent Technologies) using a Kromasil C<sub>8</sub> 20 mm  $\times$  4.5 mm pre-column (Aplicaciones Analíticas). Injection volume was 20  $\mu\text{L}$ .

LC/ESI/MS measurements were performed using a Shimadzu Class-VP5 coupled with API 150 EX single quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems) equipped with a turboionspray source. The same C<sub>8</sub> column that was in LC/UV measurements was used, with 50  $\mu\text{L}$  of injection volume and a post column split ratio of 1/3. Instrument control and data analysis were performed using Analyst v. 1.4 application software from Applied Biosystems.

The pH of mobile phase was measured with the Crison 2002 potentiometer ( $\pm 0.1 \text{ mV}$ ) using an Orion 8102 ROSS combination pH electrode. SPE was carried out on a Supelco vacuum manifold for 12 columns connected to a Supelco vacuum tank.

## 2.5. Procedures

### 2.5.1. Solid-phase extraction

Fifty microlitres of I.S. working solution ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was added to a  $500 \mu\text{L}$  aliquot of blank, calibration or unknown pig plasma sample, mixed well and applied to a Strata X cartridge which had been previously conditioned with  $1 \text{ mL}$  of methanol and  $1 \text{ mL}$  of water. SPE cartridge was washed with  $2 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}$  of water,  $1 \text{ mL}$  of  $0.5\%$  TFA in MeCN–water (10:90, v/v) and finally with  $1 \text{ mL}$  of water. It was dried by air and compounds were eluted with  $2 \text{ mL} \times 1 \text{ mL}$  of  $1\%$  TFA in MeCN–water (75:25, v/v). Compositions of washing and elution solvents were obtained as optimal in the studies with aqueous standard and plasma samples. Eluate was evaporated to dryness at  $45^\circ\text{C}$  under a stream of nitrogen and residue was redissolved in  $200 \mu\text{L}$  of mobile phase. This extracted sample was injected into LC/UV or LC/MS system.

### 2.5.2. Mobile phase

For LC/UV measurements, an initial mobile phase composed of  $0.01 \text{ mol L}^{-1}$  citric acid solution and MeCN (91:9, v/v) adjusted to pH 4.5 with ammonia was used [34]. The mobile phase for LC/MS system was changed in order to have more volatile mixture, more adequate for MS. Initial mobile phase was  $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  ammonium acetate solution and MeCN (86:14, v/v) was adjusted to pH 2.5 with formic acid [25]. Flow-rate was  $1.5$  and  $1 \text{ mL min}^{-1}$  for LC/UV and LC/MS systems, respectively. Table 1 shows the optimized linear gradient used for quinolones separation by LC/UV and LC/MS.

### 2.5.3. UV and MS conditions

Diode array detection (DAD) was used, and the following wavelengths were used:  $250 \text{ nm}$  for OXO and FLU,  $290 \text{ nm}$  for MAR and  $280 \text{ nm}$  for CIP, DAN, ENR, SAR, DIF and TOS. The LC/ESI/MS conditions were first optimized using direct infusion of each compound; all the experiments were carried out in positive ion mode. LC/MS interface was set at  $400^\circ\text{C}$ ; declustering potential (DP), focusing potential (FP), entrance potential (EP) and sprayer voltages were set at 30, 200, 10 and  $4500 \text{ V}$ , respectively. The spectrometer commonly worked with an auxiliary nitrogen gas flow rate of  $500 \text{ L h}^{-1}$ , a nebulizing and a curtain gas flow rate of  $12 \text{ L h}^{-1}$ . At this working voltage, molecular ions  $[\text{M}+\text{H}]^+$  were detected with the greatest sensitivity, and

Table 1  
Optimised linear gradients for the separation of quinolones by LC/UV and LC/MS

| LC/UV          |        | LC/MS          |        |
|----------------|--------|----------------|--------|
| <i>t</i> (min) | % MeCN | <i>t</i> (min) | % MeCN |
| 0              | 9      | 0              | 14     |
| 11.5           | 9      | 9              | 14     |
| 24             | 29     | 12             | 18     |
| 26             | 34     | 15             | 18     |
| 30             | 34     | 20             | 35     |
| 33             | 9      | 25             | 35     |
|                |        | 30             | 14     |

Table 2

Values of *m/z* chosen for the SIM mode detection of quinolones

| Substances | ( <i>m/z</i> ) |
|------------|----------------|
| MAR        | 363            |
| CIP        | 332            |
| DAN        | 358            |
| ENR        | 360            |
| SAR        | 386            |
| DIF        | 400            |
| TOS        | 405            |
| OXO        | 262            |
| FLU        | 262            |

these ions were chosen to quantify quinolones, as can be seen in Table 2.

### 2.5.4. Validation

Validations using UV and ESI/MS detection were performed according to FDA guidelines for bioanalytical assay procedure [31]. LODs were determined from calibration curve obtained from extracted plasma samples spiked with quinolones at six concentration levels from  $10$  to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  for LC/UV and at seven concentration levels from  $0.5$  to  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  for LC/MS using SIM mode (ions shown in Table 2). Each sample was prepared by triplicate and was injected twice. LOD values were calculated using a signal-to-noise ratio of 3 (the ratio between the peak intensity and the noise was used), while LOQ values were calculated using a signal-to-noise ratio of 10. For calibration, spiked samples at 10 concentration levels ( $\text{LOQ}$ – $2400 \mu\text{g L}^{-1}$ ) were prepared following the method previously explained. Each spiked sample was prepared in duplicate and was injected twice. Calibration curves were constructed using analyte/internal standard (I.S.) peak area ratio versus analyte/I.S. concentration ratio.

Recovery experiments were performed by comparing analytical results of extracted samples of pig plasma at the concentrations of  $30$ ,  $60$ ,  $360$ ,  $1900$ ,  $1560$  and  $2400 \mu\text{g L}^{-1}$  for the studied compounds and internal standard added before the extraction procedure. Plasma samples spiked after extraction procedure were considered as showing 100% recovery.

To assess intra-day precision, five spiked samples at three concentration levels each,  $60$ ,  $1200$  and  $2400 \mu\text{g L}^{-1}$ , were prepared and analyzed in duplicate using LC/UV. Procedure was repeated on 3 different days to determine inter-day precision. On each day, separate working solutions of analytes were prepared.

### 2.5.5. Pharmacokinetics

Plasma samples were obtained from eight pig specimens (A–H) orally medicated during 5 consecutive days with  $200 \text{ mg}$  of enrofloxacin per kg of fodder. The samples were from a study about the evaluation of plasmatic levels of ENR when animals were medicated with this quinolone for several days. The samples of individuals were collected on the 4th and the 5th day at morning and evening time [0 (first extraction), 6, 24 and 33 h]. Plasma was harvested by centrifugation and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. ENR and CIP concentrations were



quantified with a daily-prepared calibration curve in the range LOQ–2400  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of the extraction procedure

In this work, a comparative study of three sorbents was carried out to achieve maximum recoveries of quinolones and optimal clean up efficiency, which would provide methods with suitable limits of detection. A preliminary study concerning the recoveries of the quinolones using standard solutions was made in order to get an idea of the most advantageous sorbents for this family of substances. Three types of polymeric sorbents were tested: hydrophilic–lipophilic balanced sorbents (HLB and StrataX), mixed phases as polymeric with sulfonic acid groups, and cationic exchange (SDB-RPS), being of a disk cartridge type. For these three sorbents, the sample loading and elution conditions were optimized with aqueous standard samples, while for the conditioning and washing steps commercial specifications were used; 1 mL of methanol was followed by 1 mL of water for preparing the sorbent phase, and 2 mL of water was used for washing. Sample loading volumes were studied in order to assure that no losses of analyte would occur in the loading of sample on a SPE cartridge. Sample was collected and analyzed after being passed through the sorbent and no chromatographic peaks corresponding to quinolones were found. Five hundred microlitres of sample was found as optimal sample volume and was the same for the three tested sorbents. To achieve a complete analyte elution from the sorbent, volume and composition of the elution solution were also optimized. Different percentages of TFA were tested (1–3%) in a MeCN–water solution (75:25, v/v) and different solution volumes (1–3 mL) in order to obtain complete recovery of quinolones with the minimum elution volume and the lowest TFA percentage required. Conditions found as optimal were 2 mL of TFA 1% in MeCN–water (75:25, v/v) for HLB and Strata X cartridges and 3 mL of TFA 3% in the same MeCN–water proportion for SDB-RPS disk cartridge.

Recovery and selectivity provided by each particular sorbent were examined to select the most appropriate sorbent. A previously optimized SPE procedure was used, and blank plasma sample spiked with 1  $\text{mg L}^{-1}$  of each quinolone was always loaded to the cartridge. Recoveries were calculated by comparing analytical results of extracted samples with plasma spiked after the extraction procedure, representing 100% recovery. Comparable and good recoveries (>90%) were obtained with all the three tested sorbents (HLB, Strata X and SDB-RPS), excepting DAN and ENR, the recovery values of which were 85% and 89%, respectively when SDB-RPS cartridges were used. All the obtained recovery values for all quinolones are shown in Fig. 1. Strata X cartridges provided the best recoveries and RSD values. In addition, it was sometimes observed that SDB-RPS sorbent was blocked by precipitated plasma proteins, and this might have caused greater dispersion of recovery values when using this cartridge. For this reason, Strata X cartridges were chosen to make the detailed study with spiked samples.

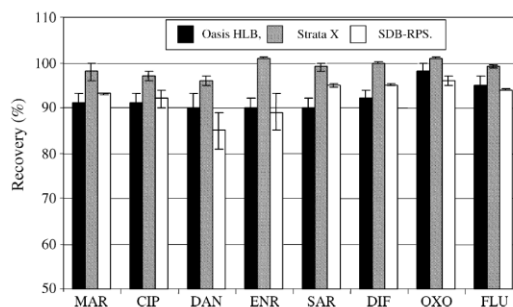


Fig. 1. Recoveries (%) of quinolones obtained using different sorbents.

None of the used cartridges removed all plasma endogenous components, which gave rise to the presence of several interfering peaks on chromatograms. To further improve the cleanliness of the sample extracts and thus obtain the best selectivity of the analytical method, an additional washing step was introduced after the water washing. To determine the best washing solvent, different percentages of MeCN (10–40%) or MeOH (10–40%) in a TFA (0.5–1%) were tested. By conducting series of experiments and comparing the corresponding chromatograms, it was found that 0.5% TFA in MeCN–water (10:90, v/v) solution was very effective in removing interferences. In spite of this clean up step, it was observed that some interference was still present which could constitute a problem for the LC/UV determination. This was solved by modifying the MeCN linear gradient elution.

#### 3.2. Chromatographic separation

Good chromatographic separation of quinolones and plasma interferences were obtained by using the optimized linear gradient elution shown in Table 1. Separation of series of eight quinolones and I.S. was achieved in 33 min for LC/UV system. Chromatograms showed no interferences at the retention times of the eight quinolones and I.S., as shown in Fig. 2. The C8 Zorbax column and the citric acid solution in mobile phase were chosen because adequate retention times with narrow and good resolved peaks [34] were obtained.

#### 3.3. Validation

##### 3.3.1. Validation of LC/UV

Calibration curves established from the samples spiked at 10 concentration levels are linear in the concentration range from LOQ to 2400  $\mu\text{g L}^{-1}$  for all compounds with correlation coefficients higher than 0.998. Values of quality parameters as LOD, LOQ, correlation coefficient and recoveries of all quinolones are shown in Table 3. Under optimal SPE procedure, the recoveries obtained are higher than 93% for all quinolones except CIP, which was 86%. LODs ranged between 7 and 12  $\mu\text{g L}^{-1}$  while LOQs ranged between 23  $\mu\text{g L}^{-1}$  for SAR and 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  for MAR, CIP, DIF and FLU. Intra-day and inter-day precision are shown in Table 4. Intra-day and inter-day precision have been evaluated at three concentration levels with a maximum RSD

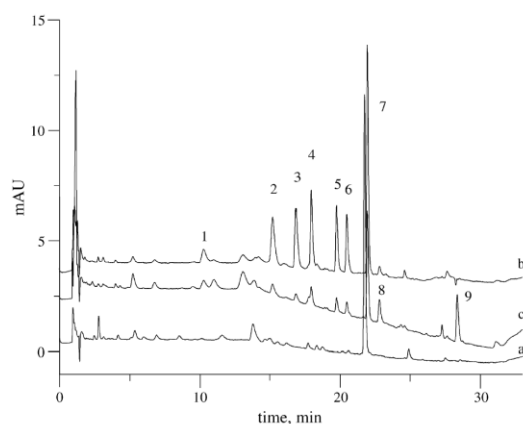


Fig. 2. Chromatogram of (a) blank plasma sample spiked with I.S. ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and (b and c) plasma sample spiked with  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  of quinolones and  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  of I.S. Blank plasma sample analyzed at 280 nm and spiked plasma sample analyzed at 280 (b) and 250 nm (c). Peaks: 1 = MAR; 2 = CIP; 3 = DAN; 4 = ENR; 5 = SAR; 6 = DIF; 7 = TOS (I.S.); 8 = OXO; 9 = FLU.

value of 8% that corresponds to CIP. These values were lower than 15% established by the FDA in its analysis of biological samples guidelines [31]. Freeze–thaw stability of quinolones was determined in plasma, SPE eluates and reconstituted samples. Plasma samples containing  $120 \mu\text{g L}^{-1}$  of each quinolone, eluted extract and reconstituted sample were stored at  $-20^\circ\text{C}$ . After three freeze–thaws (room temperature) cycles, quinolone recoveries were similar to those obtained from control samples without freezing. The stability of quinolones in the reconstituted plasma extract was observed and was determined to be at least 53 h. This was based on adequate precision and accuracy of the control results obtained during routine runs and results of an autosampler tray stability experiment. Storage stability (holding time) of quinolones in plasma was evaluated in samples spiked at  $1 \text{ mg L}^{-1}$  and stored at  $4^\circ\text{C}$ . Periodically, samples were removed from the refrigerator, equilibrated to room temperature and analyzed in duplicate using freshly prepared plasma calibration standards to determine recovery. Fig. 3 shows the recovery–time profile obtained for each quinolone. Recoveries of CIP and SAR decreased after 29 h. No differences in recoveries of the other

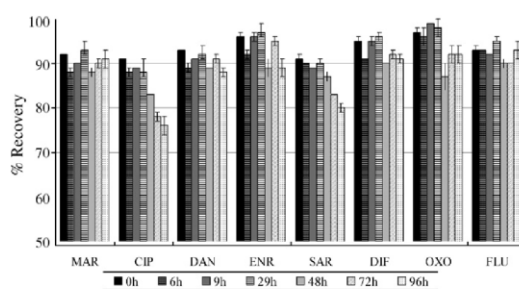


Fig. 3. Effect of storage time of plasma at  $4^\circ\text{C}$  on recoveries of quinolones (%).

quinolones were observed. We think that this decrease in recoveries of CIP and SAR could be a plasma protein-binding problem [35] because stock and working solutions of quinolones stored in dark glass bottles in a dark refrigerator did not show any stability problem.

### 3.3.2. Quality parameters of LC/ESI/MS

Calibration curves were generated from 10 concentration levels of spiked samples and are shown in Table 5. These curves are linear in the range from LOQ to  $2400 \mu\text{g L}^{-1}$  for all compounds with correlation coefficients higher than 0.998. LODs and LOQs are also shown in Table 5. LODs are around  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  for all quinolones. LOQs are at around  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  excluding FLU ( $4 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Selected ion monitoring (SIM) chromatogram of the studied fluoroquinolones is shown in Fig. 4. This chromatogram corresponds to a plasma sample spiked with  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  of each quinolone and  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  of I.S.

The precision was not evaluated with pig plasma by LC/ESI/MS, but in a similar matrix, cow plasma, the precisions obtained are between 2 and 5% higher than those obtained with LC/UV, and always are below of 15%.

### 3.4. Analysis of plasma samples

The proposed method was applied to determine ENR and its main metabolite, CIP, in pig plasma samples obtained from eight animal specimens (A–H) orally medicated with ENR. Fig. 5 depicts plasma concentration–time profiles of ENR and CIP obtained from the analyses performed by LC/UV and LC/MS.

Table 3  
Quality parameters for LC/UV measurements

|     | Recovery          | LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Calibration curve                            | <i>r</i> |
|-----|-------------------|------------------------------|------------------------------|--|----------|
| MAR | $96.3 \pm 0.5\%$  | 12                           | 40                           | $y = 1.633 (\pm 0.009)C - 0.041 (\pm 0.010)$ | 0.9995   |
| CIP | $86.2 \pm 0.5\%$  | 12                           | 40                           | $y = 2.150 (\pm 0.012)C - 0.037 (\pm 0.021)$ | 0.9993   |
| DAN | $96.4 \pm 0.5\%$  | 10                           | 31                           | $y = 2.124 (\pm 0.009)C - 0.078 (\pm 0.013)$ | 0.9994   |
| ENR | $98.7 \pm 0.5\%$  | 10                           | 31                           | $y = 2.356 (\pm 0.013)C - 0.097 (\pm 0.010)$ | 0.9992   |
| SAR | $93.3 \pm 0.5\%$  | 7                            | 23                           | $y = 1.679 (\pm 0.009)C - 0.020 (\pm 0.011)$ | 0.9980   |
| DIF | $101.4 \pm 0.5\%$ | 10                           | 40                           | $y = 1.620 (\pm 0.009)C - 0.018 (\pm 0.012)$ | 0.9995   |
| OXO | $101.7 \pm 0.9\%$ | 8                            | 25                           | $y = 1.209 (\pm 0.011)C - 0.032 (\pm 0.009)$ | 0.9980   |
| FLU | $94.3 \pm 0.5\%$  | 10                           | 40                           | $y = 1.504 (\pm 0.008)C - 0.033 (\pm 0.009)$ | 0.9995   |

Were *y* is analyte/I.S. peak area ratio and *C* is analyte/I.S. concentration ratio. The numbers in brackets are standard error of slope and intercept respectively obtained in the linear regression.

Table 4  
Intra-day and inter-day precision data

|                     | 60 $\mu\text{g L}^{-1}$                |         | 1200 $\mu\text{g L}^{-1}$              |         | 2400 $\mu\text{g L}^{-1}$              |         |
|---------------------|--|---------|--|---------|--|---------|
|                     | Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | RSD (%) | Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | RSD (%) | Concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | RSD (%) |
| Intra-day precision |  |         |  |         |  |         |
| MAR                 | 69                                     | 2       | 1179                                   | 1       | 2344                                   | 2       |
| CIP                 | 66                                     | 8       | 1230                                   | 1       | 2496                                   | 1       |
| DAN                 | 64                                     | 4       | 1124                                   | 1       | 2254                                   | 2       |
| ENR                 | 61                                     | 4       | 1075                                   | 1       | 2188                                   | 2       |
| SAR                 | 69                                     | 6       | 1238                                   | 1       | 2409                                   | 2       |
| DIF                 | 63                                     | 3       | 1110                                   | 1       | 2264                                   | 2       |
| OXO                 | 59                                     | 5       | 931                                    | 2       | 2235                                   | 2       |
| FLU                 | 66                                     | 5       | 1074                                   | 1       | 2185                                   | 2       |
| Inter-day precision |  |         |  |         |  |         |
| MAR                 | 69                                     | 3       | 1175                                   | 1       | 2320                                   | 2       |
| CIP                 | 71                                     | 8       | 1240                                   | 1       | 2514                                   | 2       |
| DAN                 | 63                                     | 5       | 1126                                   | 1       | 2272                                   | 2       |
| ENR                 | 61                                     | 5       | 1085                                   | 2       | 2212                                   | 2       |
| SAR                 | 68                                     | 7       | 1233                                   | 1       | 2471                                   | 2       |
| DIF                 | 63                                     | 4       | 1107                                   | 1       | 2244                                   | 2       |
| OXO                 | 60                                     | 4       | 901                                    | 3       | 1992                                   | 9       |
| FLU                 | 71                                     | 7       | 1070                                   | 2       | 2172                                   | 2       |

Table 5  
Quality parameters for LC/MS measurements

|     | LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) | Calibration curve                            | <i>r</i> |
|-----|------------------------------|------------------------------|--|----------|
| MAR | 0.8                          | 2.8                          | $y = 4.225 (\pm 0.028)C + 0.011 (\pm 0.027)$ | 0.9996   |
| CIP | 0.8                          | 2.7                          | $y = 1.267 (\pm 0.005)C + 0.008 (\pm 0.005)$ | 0.9998   |
| DAN | 0.7                          | 2.4                          | $y = 4.010 (\pm 0.049)C - 0.127 (\pm 0.047)$ | 0.9990   |
| ENR | 1.0                          | 3.2                          | $y = 4.865 (\pm 0.035)C - 0.040 (\pm 0.033)$ | 0.9995   |
| SAR | 0.8                          | 2.6                          | $y = 3.169 (\pm 0.019)C + 0.020 (\pm 0.018)$ | 0.9997   |
| DIF | 1.0                          | 3.3                          | $y = 4.482 (\pm 0.044)C - 0.052 (\pm 0.043)$ | 0.9991   |
| OXO | 0.9                          | 3.0                          | $y = 0.476 (\pm 0.006)C + 0.028 (\pm 0.006)$ | 0.9990   |
| FLU | 1.2                          | 4.0                          | $y = 0.270 (\pm 0.004)C + 0.002 (\pm 0.004)$ | 0.9990   |

Where *y* is analyte/IS peak area ratio and *C* is analyte/IS concentration ratio. The numbers in brackets are standard error of slope and intercept respectively obtained in the linear regression.

The plasma samples were collected when the animals were on medication with ENR. Because of this fact, all the samples show similar concentration of ENR, at around  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ , except for sample F (the animal probably was not treated with enrofloxacin or do not eat fodder with drug). As can be observed in Fig. 5a,

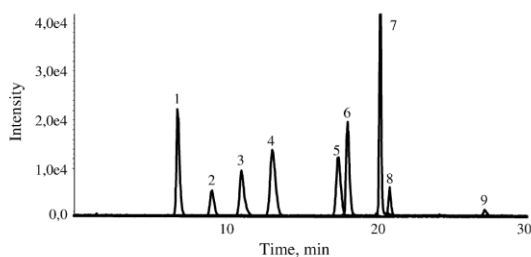


Fig. 4. LC/ESI/MS chromatograms of plasma samples spiked with  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  of each quinolone and  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  of IS. Peaks: 1 = MAR; 2 = CIP; 3 = DAN; 4 = ENR; 5 = SAR; 6 = DIF; 7 = TOS (I.S.); 8 = OXO; 9 = FLU.

there are no significant differences in the results of ENR concentration obtained using LC/UV and LC/MS techniques. In Fig. 5b, the results illustrating the levels of CIP, the major metabolite of ENR, are presented. Thanks to the high sensitivity of LC/MS technique, it was also possible to detect the residues of very low concentration, which could not be detected by LC/UV. Thus, a presence of CIP could also be proved in samples A, B and G. The presence or absence of CIP in the samples depends on the metabolism of each particular pig but the concentration levels of CIP, in the range between  $20$  and  $80 \mu\text{g L}^{-1}$ , were found in the plasma samples, excepting sample F (as has already been explained above). In Fig. 5a, there are some samples that could not be analyzed because there was not enough volume to be analyzed by LC/UV or LC/MS. These samples appear for Fig. 5 as “no available sample”. The same is true in Fig. 5b. Differences in measured concentrations can be caused by many factors, such as different metabolism speed, different weight of animals and, consequently, different distribution volume, etc. Another factor might be a different amount of ingested enrofloxacin because the same food intake had not been ensured—only the concentration

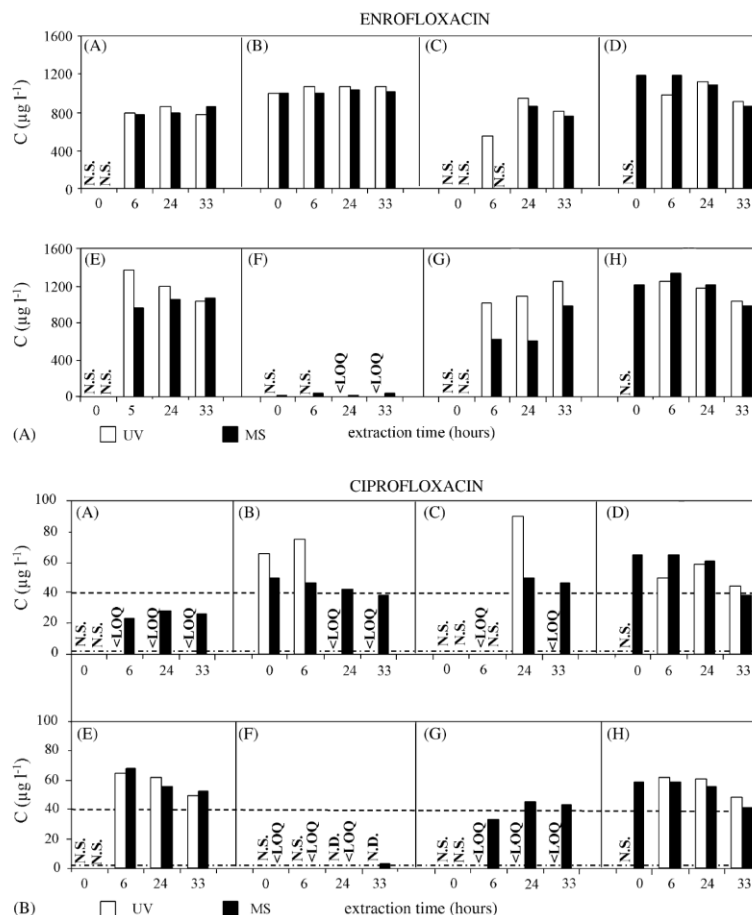


Fig. 5. Concentration–time profile of (a) ENR and (b) CIP in plasma samples obtained from pig animals on medication with ENR. LOQ of CIP by LC/UV (---) and LC/MS (---). N.S.: sample not available; N.D.: analyte not detected; <LOQ: under the limit of quantification.

of enrofloxacin in fodder was known (200 mg of enrofloxacin per kg of fodder). The CIP/ENR ratio was also observed and was measured at about 5.2%.

#### 4. Conclusions

In this work a LC method for determining and quantifying a series of 8 quinolones in pig plasma is described. A simple and rapid extraction and clean-up method was developed. Strata X cartridges (polymeric phase) were found to be the best choice for sample pre-treatment. The SPE clean-up procedure used for the plasma samples gave a very clean chromatogram in which peaks of all 8 quinolones and internal standard were well resolved. Two detectors (UV and MS) were used and the obtained results were compared. The developed method was validated by LC/UV using the FDA guidelines. Quality parameters

obtained by LC/UV and LC/MS were proven to be adequate. Samples taken from pigs on medication with ENR were analyzed. In those samples, when LC/MS was used, not only the ENR, but also the CIP, as its major metabolite, was determined. The described method is able to quantify the ENR and CIP concentrations in real plasma samples after the administration in therapeutic doses. The ESI/MS detection allows the determination of CIP even in concentrations which could not be quantified using UV detection.

#### Acknowledgements

The financial support of DIGYCIT of the Spanish Government (Project BQU 2003-00348) is gratefully acknowledged. We also wish to acknowledge the plasma supplying and technical assistance of Mr. Joan Freixes (Cenavisa S.A., Reus, Spain).

## References

- [1] A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15.
- [2] I. Kemp, M. Gesbert, M. Guiltel, G. Bennejean, *Res. Vet. Sci.* 53 (1992) 257.
- [3] D.C. Hooper, J.S. Wolfson, *Quinolones Antimicrobial Agents*, second ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1993.
- [4] Commission of the European Communities, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE)* 2377/90 L224, 991, 2608, 18 August 1990.
- [5] F. Belal, A.A. Al-Majed, A.M. Al-Obaid, *Talanta* 50 (1999) 765.
- [6] J.A. Hernández-Arteseros, J. Barbosa, R. Compañó, M.D. Prat, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 1.
- [7] J.I. Alós, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21 (2003) 261.
- [8] G. Carlucci, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 343.
- [9] V.F. Samanidou, C.E. Demetriou, I.N. Papadoyannis, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 623.
- [10] H. Liang, M.B. Kays, K.M. Sowinski, *J. Chromatogr. B* 772 (2002) 53.
- [11] C.L. Flurer, *Electrophoresis* 24 (2003) 4116.
- [12] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia* 55 (2002) 585.
- [13] M. Hernández, C. Aguilar, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. B* 772 (2002) 163.
- [14] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 416.
- [15] M.A. García, C. Solans, J.J. Aramayona, S. Rueda, M.A. Bregante, *Chromatographia* 51 (2000) 487.
- [16] M.T. Maya, N.J. Gonçalves, N.B. Silva, J.A. Morais, *J. Chromatogr. B* 755 (2001) 305.
- [17] Z. Vybiralová, M. Nobilis, J. Zoulová, J. Květina, P. Petr, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 851.
- [18] Z. Zeng, A. Dong, G. Yang, Z. Chen, X. Huang, *J. Chromatogr. B* 821 (2005) 202.
- [19] C. Ho, D.W.M. Sin, H.P.O. Tang, L.P.K. Chung, S.M.P. Siu, *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) 123.
- [20] I. Pecorelli, R. Galarini, R. Bibi, A.I. Floridi, E. Casciarri, A. Floridi, *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 81.
- [21] P.H. Zoutendam, J.F. Canty, M.J. Martin, M.K. Dirr, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 1.
- [22] P.H. Zoutendam, M. Gavin, M.J. Martin, M.K. Dirr, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 1073.
- [23] K. Vishwanathan, M.G. Barlett, J.T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 961.
- [24] K. Vishwanathan, M.G. Barlett, J.T. Stewart, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 915.
- [25] S. Bailac, D. Barrón, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 131.
- [26] B. Toussaint, M. Chedin, G. Bordin, A.R. Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 32.
- [27] G. van Vyncht, A. János, G. Bordin, B. Toussaint, G. Maghuin-Registerb, E. De Pauw, A.R. Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 121.
- [28] B. Toussaint, G. Bordin, A. János, A.R. Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 195.
- [29] N. Van Hoof, K. De Wasch, L. Okerman, W. Reybroeck, S. Poelmans, H. Noppe, H. De Brabander, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 265.
- [30] M.P. Hermo, D. Barrón, J. Barbosa, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 132.
- [31] Guidance for Industry, *Bioanalytical Method Validation*. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001; [www.fda.gov/cder/guidance/index.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm).
- [32] J. Barbosa, I. Marqués, D. Barrón, V. Sanz-Nebot, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 543.
- [33] J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *Fresenius J. Anal. Chem.* 353 (1995) 148.
- [34] S. Bailac, O. Ballesteros, E. Jiménez-Lozano, D. Barrón, V. Sanz-Nebot, A. Navalón, J.L. Vilchez, J. Barbosa, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 145.
- [35] G. Zlotos, A. Bucker, M. Kinzig-Schippers, F. Sorgel, U. Holzgrabe, *J. Pharm. Sci.* 87 (1998) 215.



## **Komentář k článku**

Ve výše předložené práci je popsána rychlá a citlivá metoda pro analytické stanovení osmi chinolonů v prasečí plasmě. Vyvinutá a validovaná metoda byla následně použita k stanovení chinolonů v reálných vzorcích.

### **Cíl práce**

Cílem předkládané práce bylo vyvinout SPE a HPLC metodu vhodnou pro stanovení osmi chinolonů přítomných v prasečí plasmě, používaných ve veterinární praxi a kontrolovaných Regulační komisí Evropské unie. Následně vyvinutou metodu validovat podle směrnic FDA pro validaci bioanalytických metod. Vyvinutou a validovanou metodu aplikovat na stanovení enrofloxacinu a jeho majoritního metabolitu ciprofloxacinu v reálných vzorcích prasečí plasmy.

### **Komentář a diskuze k výsledkům**

Po předchozí předběžné studii byly v rámci vývoje SPE metody porovnávány tři druhy polymerních sorbentů s cílem dosáhnout co nejlepší výtěžnosti spojené s vysokou čistotou vzorku, klíčovou pro dosažení nízkých detekčních limitů. Všechny tři typy sorbentů poskytovaly s výjimkou danofloxacinu a enrofloxacinu více jak 90% výtěžnosti. Nejlepší výtěžnost i RSD hodnoty byly dosaženy na náplni Strata X, jež byla proto vybrána do dalších studií. Nicméně jelikož dosažený stupeň čistoty nebyl dostačující, byl vyvinut a zařazen ještě jeden čistící (promývací) krok.

Při vývoji chromatografické separace byla vyvinuta gradientová eluce. Pro kvantifikaci byla použita metoda vnitřního standardu. Následně byla provedena validace metody, včetně stability při 4 °C a freeze–thaws stability. Byly použity dva způsoby detekce: UV, respektive DAD, vyhodnocený ve dvou vlnových délkách a MS s elektrosprejovou ionizací, pracující v SIM módu. Jak lze předpokládat, dosažené detekční i kvantifikační limity byly při použití hmotnostní detekce řádově nižší.

Jak bylo již zmiňováno, metoda byla následně použita ke stanovení chinolonů v osmi reálných vzorcích. Vzorky byly sbírány od zvířat, které byly léčeny enrofloxacinem. Výsledky týkající se koncentrace enrofloxacinu získané UV a MS detekcí byly srovnatelné. Znatelný rozdíl byl zaznamenán při stanovení majoritního metabolitu

ciprofloxacinu, kde citlivost UV detektoru nebyla pro velmi nízké koncentrace dostatečná.

**Výsledkem této studie je validovaná SPE a HPLC metoda, vhodná pro stanovení plasmatických koncentrací osmi chinolonů používaných ve veterinární praxi. Práce přináší také srovnání UV a MS detekce. Přínos této práce lze shrnout do dvou bodů. Prvním z nich je možnost stanovení v plasmě. Jelikož nejsou stanoveny žádné limity pro obsah chinolonů v plasmě či krvi, nejsou metody pro stanovení v tělních tekutinách, na rozdíl od metod pro stanovení v živočišných produktech, obvyklé. Nicméně, je velmi důležité mít takové metody k dispozici. Na jejich podkladě lze totiž odhadnout koncentraci chemoterapeutika v mase, která je již autoritou regulována, případně odhadnout čas nutný k eliminaci chemoterapeutika, s cílem vyrobit nezávadný produkt. Druhý přínos metody spočívá v možnosti kvantifikace ciprofloxacinu, majoritního metabolitu enrofloxacinu. Ciprofloxacin není možné metodou UV kvantifikovat, přičemž limity pro obsah enrofloxacinu zahrnují sumu obsahů enrofloxacinu s ciprofloxacinem.**

### **4.3. Using of HPLC coupled with coulometric detector for the determination of biotin in pharmaceuticals**

**ZERZAŇOVÁ, A.; ŽIŽKOVSKÝ, V.; KUČERA, R.; KLIMEŠ, J.;  
JESENSKÝ, I.; DOHNAL, J.; BARRÓN, D.:**  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **45** (2007) 730-735.



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 45 (2007) 730–735

JOURNAL OF  
PHARMACEUTICAL  
AND BIOMEDICAL  
ANALYSIS

www.elsevier.com/locate/jpba

## Using of HPLC coupled with coulometric detector for the determination of biotin in pharmaceuticals

A. Zerzaňová<sup>a</sup>, V. Žižkovský<sup>a</sup>, R. Kučera<sup>a,\*</sup>, J. Klimeš<sup>a</sup>,  
I. Jesenský<sup>a</sup>, J. Dohnal<sup>b</sup>, D. Barrón<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>b</sup> Zentiva, a.s., U kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Dolní Měcholupy, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Avda. Diagonal 647, E-08028 Barcelona, Spain

Received 20 April 2007; received in revised form 8 August 2007; accepted 9 August 2007  
Available online 15 August 2007

### Abstract

The method for the determination of biotin by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with coulometric detector is presented here. Chromatographic and detection conditions were tested. A LiChrospher 60RP-select B column (250 mm × 4 mm; 5 μm) and the mobile phase containing 0.24 mol/L aqueous solution of acetic acid and acetonitrile in the ratio 85:15 (v/v) were found as the most suitable. The flow rate was 1 mL/min and the injected volume of the sample was 20 μL. The hydrodynamic voltammogram of biotin was measured and according to obtained data the detection parameters were set – channel I 600 mV, channel II 900 mV, sensitivity 1 μA. The developed method has been validated. The calibration curve is linear in the range 15–3600 ng/mL, correlation coefficient is 0.9998, limits of detection and quantification are 5 and 15 ng/mL, respectively. Recovery of the spiked samples was 98.67% with R.S.D. 0.255% on average. The developed method has been successfully applied for determination of biotin in pharmaceutical preparations.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Biotin; Coulometry; Electrochemical detection; HPLC; Pharmaceutical preparations

### 1. Introduction

In the last approximately 30 years, the connection of high performance liquid chromatography and electrochemical detection (HPLC–ED) has seen many improvements. Even though questions of HPLC detectors have been widely discussed and developed, electrochemical detection still has some interesting advantages over other detectors used with HPLC. One of the biggest advantages of electrochemical detection is its high selectivity. This is caused by the property of an electrochemical detector to respond only to substances showing electrochemical activity. Seeing that many substances do not readily react electrochemically, the electrochemical detector is

employed to advantage when a complex matrix is analyzed. Furthermore, electrochemically active compounds can be detected with much higher sensitivity. Coulometry, a specialized form of amperometry, based on an electrochemical principle, uses measuring of total current as a function of time – that is, the charge needed to the total chemical change of an analyte measured in coulombs [1]. Many applications of the utilization of coulometric detection have been described: application in analytical food chemistry [2,3], determination of antioxidants [4], determination of biogenic amines [5,6]. In addition, owing to the simple instrumentation the determination of biogenic amines was also carried out *in vivo* [7]. A coulometric detector has also been used for determination of illicit drugs [8] and enantioseparations [9]. For its superior selectivity and sensitivity, this technique is usually chosen when compounds of interest are present only at trace concentrations in comparison with other sample components. This is also the case in

\* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 446; fax: +420 495 067 167.  
E-mail address: radim.kucera@faf.cuni.cz (R. Kučera).

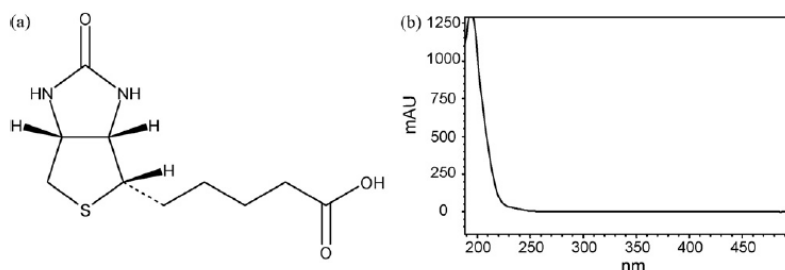


Fig. 1. Structural formula of biotin (a) and its UV-spectrum (b).

the determination of biotin in pharmaceuticals described in this paper.

Biotin (Fig. 1a) 5-[(3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydrothieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]pentanoic acid, also known as vitamin H or B<sub>8</sub>, is a water-soluble vitamin belonging to the B-complex. It acts as a cofactor responsible for the carbon dioxide transfer in several carboxylase enzymes. It is involved in the biosynthesis of fatty acids, gluconeogenesis, energy production, the metabolism of the branched-chain amino acids and the *de novo* synthesis of purine nucleotides. Recent research indicates that biotin plays a role in gene expression and that it may also act in DNA replication. A sufficient intake is necessary for healthy hair, skin, sweat glands, nerve tissue, bone marrow and it also assists with muscle pain [10,11].

The analytical techniques for biotin determination can be divided into four main categories:

- (1) Microbiological methods, based on growth of microorganisms in presence of biotin, are very sensitive but they lack specificity and they are very time-consuming [12].
- (2) Biological techniques are based on the animal development curve. These are used mainly for the determination of biotin in food [12].
- (3) Binding assays make use of formation of a specific avidin (or streptavidin)–biotin complex [12].
- (4) The last group of methods includes all physicochemical methods such as spectrophotometry, polarography, thin layer chromatography, gas chromatography, high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis [12,13].

HPLC was coupled with UV/VIS [14–17], fluorescence [12] or MS detection [18,19]. There have also been some experiments employing electrochemical detectors. The amperometric detection of biotin was published in 1986 but the detection limit was very similar to limits usually reached with UV detection [20]. A voltammetric detector was also tested for determination of biotin; the experiment was based on avidin–biotin interaction [21]. A coulometric detection was used for determination of two B-group vitamins (pyridoxine and cyanocobalamin) [22].

In our paper, a very sensitive and advantageous analytical method for determination of biotin in pharmaceutical preparations using HPLC coupled with a coulometric detector is

described. The defined daily dose of biotin is about 30 µg/day, and thus its content is proportional in pharmaceuticals unlike the amount of other water-soluble vitamins (e.g. vitamin C), in which the content is much higher. This fact together with its non-specific UV-spectrum – maximum at 190 nm (Fig. 1b) causes problems when UV/VIS detection for determination of biotin is used. Therefore, the employment of the coulometric detector is more than suitable. A procedure for extraction of biotin from the pharmaceuticals has been developed, conditions for chromatography with regard to usage of coulometric detection have been optimized and the method has been validated. This developed method was consequently applied to determine the amount of biotin in some pharmaceuticals available on the Czech market.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents

All reagents were of analytical or gradient grade. Water was purified in a Milli-Q system (Millipore). Acetonitrile, methanol, propan-2-ol, formic acid and phosphoric acid were supplied by Sigma–Aldrich. Citric acid, acetic acid, potassium phosphate monobasic anhydrous and potassium phosphate dibasic anhydrous were obtained from Fluka. Sodium acetate trihydrate was supplied by Lach-Ner. Biotin and placebo were obtained from Zentiva, a.s. Prague, Czech Republic.

### 2.2. Materials

Pharmaceuticals or dietary supplements, which were investigated during the experiment, are commercially available in pharmacies in the Czech Republic.

### 2.3. Instrumentation

Analyses were performed using an Esa Solvent Delivery System (model 582) coupled with Coulochem<sup>®</sup> III, Esa Inc. (model 5011A High Sensitivity Analytical Cell) working in an oxidation mode. Column temperature was set to 35 °C. Chromatographic software CSW 1.7 was used for data collection and processing. The following chromatographic columns were used – Zorbax SB-Aq 150 mm × 4.6 mm 3.5 µm (Agilent); Symmetry C18 150 mm × 3.9 mm 5 µm (Waters) Pathfinder 150 mm × 4.6 mm 3.5 µm (Shimadzu); BDS HYPERSIL C18

100 mm × 4.6 mm 3  $\mu$ m (Thermo) and LiChrospher 60RP-select B 250 mm × 4 mm 5  $\mu$ m (Merck).

#### 2.4. Preparation of mobile phases and extraction buffer

Various mobile phases were tested during searching for the optimal separation and detection conditions. In general, aqueous and organic parts were prepared separately and mixed together in the desired ratio. Acetonitrile and methanol were used as organic solvents. The following aqueous solutions were used (in parentheses there is a way of its preparation): phosphate buffer 0.05 mol/L (3.40 g of potassium phosphate monobasic anhydrous were dissolved in 500 mL of water and then pH was adjusted with phosphoric acid to 3.0; for testing of robustness pH was also adjusted to 2.6 and 3.2), acetate buffer 0.05 mol/L (5.64 g of sodium acetate trihydrate were dissolved in 500 mL of water and then pH was adjusted with formic acid to 3.0), solution of acetic acid 0.24 mol/L pH 3 (7.0 mL of 98% acetic acid were diluted to 500 mL with water), solution of phosphoric acid 0.003 mol/L pH 3 (0.09 mL was diluted to 500 mL with water), solution of citric acid 0.001 mol/L pH 3 (0.096 g was dissolved in 500 mL of water) and solution of formic acid 0.0015 mol/L pH 3 (0.03 mL was diluted to 500 mL with water). All aqueous parts were filtered through a 0.22  $\mu$ m filter before being mixed with an organic part. The following mobile phase was chosen as the most convenient for a determination of biotin in pharmaceuticals: 0.24 mol/L aqueous solution of acetic acid and acetonitrile in the ratio 85:15 (v/v) (7.0 mL of 98% acetic acid were diluted to 500 mL with water, 75 mL of acetonitrile were put into a 500 mL volumetric flask and it was filled up to the mark with acetic acid solution). The flow rate of the mobile phase 1 mL/min was constant during all analyses. The extraction buffer was prepared by dissolving 1.74 g of potassium phosphate dibasic in 100 mL of water and adjusting pH to 8.0 with phosphoric acid [21]. The use of this buffer was found as suitable because this buffer did not influence coulometric detection.

#### 2.5. Preparation of stock solution, standard solution and solutions for linearity

Stock solution of biotin was prepared in the concentration of 600  $\mu$ g/mL. The exactly weighed quantity of the compound was dissolved in water. Standard solution was prepared by diluting the stock solution with water to the concentration of 2  $\mu$ g/mL. Linearity solutions were prepared in the following 12 concentration levels of 15, 30, 50, 100, 200, 400, 600, 1200, 1800, 2400, 3000 and 3600 ng/mL by diluting the stock solution with water.

#### 2.6. Preparation of samples

Fortified samples for accuracy and precision evaluation were prepared as follows. Placebo was spiked with the stock solution to the absolute concentration of 2  $\mu$ g/mL, this was considered to be 100% of the average content of biotin in tablets. Samples with an 80% and a 120% content of biotin were also prepared: 80% (1.6  $\mu$ g/mL), 100% (2  $\mu$ g/mL) and 120% (2.4  $\mu$ g/mL). These fortified samples and real samples underwent the fol-

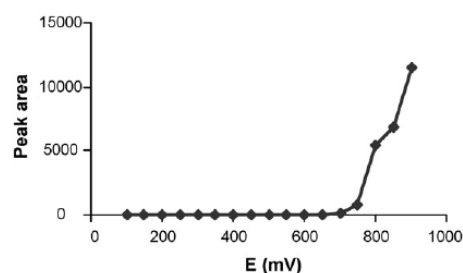


Fig. 2. The hydrodynamic voltammogram of biotin. Mobile phase: acetonitrile–0.24 mol/L acetic acid 15:85 (v/v), flow rate: 1 mL/min, guard cell 1000 mV, channel I 0 mV, channel II from 100 to 900 mV, sensitivity 5  $\mu$ A.

lowing procedure. Tablets were powdered and an appropriate amount corresponding to 150  $\mu$ g of biotin in the sample (approximately 0.4 g) were weighed into a volumetric flask. Then 1 mL of acetonitrile and 10 mL of extraction buffer were added and the sample was placed into an ultrasonic bath for 15 min. After sonication the samples were centrifuged at 3600 rpm for 5 min. Then 1 mL of supernatant was diluted with water to 10 mL. All solutions were filtered through a 0.22  $\mu$ m filter before the injection to the HPLC. The injected volume of all samples was 20  $\mu$ L.

#### 2.7. Conditions of coulometric detection

The following potentials were set for testing of separation conditions: guard cell 1000 mV, channel I 400 mV, channel II 750 mV, sensitivity 1  $\mu$ A. The hydrodynamic voltammogram of biotin was measured under the following potentials set to the cells: guard cell 1000 mV, channel I 0 mV, channel II from 100 to 900 mV, sensitivity 5  $\mu$ A. Validation of the method and determination of biotin in real samples was performed under the following detection conditions: guard cell 1000 mV, channel I 600 mV, channel II 900 mV, sensitivity 1  $\mu$ A.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Chromatography and coulometric detection

The optimization procedure was performed with regard to the best possible separation as well as detection of biotin among other water-soluble vitamins commonly present in multivitamin preparations. The experiment started with Waters Symmetry C18 column. The mobile phase contained phosphate buffer and acetonitrile. The percentage of acetonitrile decreased from 25% to 10%, but the separation was either unsatisfactory or the retention times were too long. The next tested column was Agilent Zorbax SB-Aq. Binary and also ternary mobile phases were tested. Binary phases were composed of phosphate buffer and acetonitrile (from 6% to 15%). Ternary mobile phases contained methanol (methanol: acetonitrile:phosphate buffer—26:104:870) or propan-2-ol (propan-2-ol:acetonitrile:phosphate buffer—48:95:857 or 48:124:828). All mentioned ratios were v/v/v. None of the used

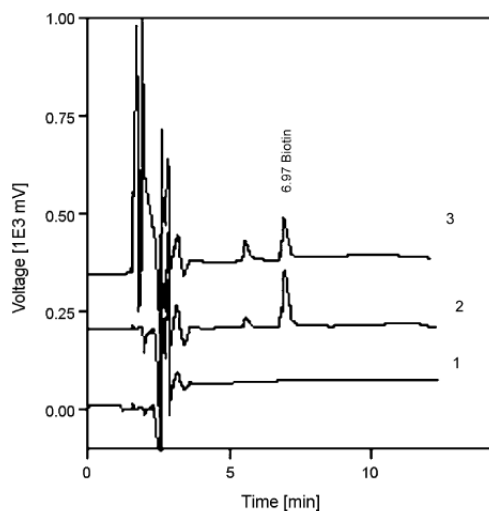


Fig. 3. Chromatograms: placebo (1), standard of biotin (2), sample of Pharmaceutical 3 (3). Column: LiChrospher 60RP-select B 250 mm  $\times$  4 mm 5  $\mu$ m (Merck), mobile phase: acetonitrile–0.24 mol/L acetic acid 15:85 (v/v), flow rate: 1 mL/min, injected volume: 20  $\mu$ L, guard cell: 1000 mV, channel I: 600 mV, channel II: 900 mV, sensitivity: 1  $\mu$ A.

combinations provided satisfactory results. Similar results were also obtained on BDS HYPERSIL C18. The fourth employed column was Pathfinder, but the retention was too strong on this sorbent, even with 40% of acetonitrile in the mobile phase. A higher percentage of an organic solvent is not suitable for coulometric detection. The last tested column was LiChrospher 60RP-select B. Its combination with the mobile phase containing phosphate buffer and acetonitrile in the ratio 87:13 (v/v), proved to be the best. When the separation conditions were optimized, robustness was tested. Percentage of acetonitrile (9%, 11% and 15%) and pH of phosphate buffer (2.6 and 3.2) were tested. The results are tabled (Table 1). From these results, it is obvious that the percentage of acetonitrile has a much higher impact on retention time of biotin than pH of the aqueous part.

Table 1

Influence of changes in composition of the mobile phase (the percentage of acetonitrile and pH of phosphate buffer) on retention time of biotin, tailing factor and theoretical plate number ( $N$ )

| Conditions                 | RT of biotin (min) | Tailing factor | $N$    |
|----------------------------|--------------------|----------------|--------|
| Percentage of acetonitrile |                    |                |        |
| 13% (standard condition)   | 11.2               | 1.172          | 9,954  |
| 9%                         | 23.0               | 1.155          | 10,652 |
| 11%                        | 15.8               | 1.175          | 10,204 |
| 15%                        | 7.0                | 1.108          | 9,411  |
| pH of phosphate buffer     |                    |                |        |
| 3.0 (standard condition)   | 11.22              | 1.172          | 9,954  |
| 2.6                        | 11.23              | 1.119          | 10,135 |
| 3.2                        | 11.21              | 1.141          | 6,844  |

Table 2a

Linearity parameters in the whole concentration range

| Linearity parameter             | Biotin                 |
|---------------------------------|------------------------|
| Concentration range (ng/mL)     | 15–3600                |
| Regression line                 | $y = 11.380x + 25.104$ |
| Slope ( $k$ )                   | $11.380 \pm 0.071$     |
| Intercept ( $q$ )               | $25.104 \pm 11.711$    |
| Residual sum of squares ( $s$ ) | 29.991                 |
| Correlation coefficient ( $r$ ) | 0.9998                 |
| Limit of detection (ng/mL)      | 5                      |
| Limit of quantification (ng/mL) | 15                     |

Table 2b

Linearity parameters of curve of the working range

| Linearity parameter             | Biotin                |
|---------------------------------|-----------------------|
| Concentration range (ng/mL)     | 15–400                |
| Regression line                 | $y = 12.956x + 5.974$ |
| Slope ( $k$ )                   | $12.956 \pm 0.188$    |
| Intercept ( $q$ )               | $15.974 \pm 3.549$    |
| Residual sum of squares ( $s$ ) | 6.189                 |
| Correlation coefficient ( $r$ ) | 0.9996                |

Table 3a

Accuracy and precision data

| Sample         | %   | Recovery (%) | S.D.  | R.S.D. (%) |
|----------------|-----|--------------|-------|------------|
| Spiked placebo | 80  | 97.1         | 5.436 | 0.376      |
|                | 100 | 98.4         | 3.535 | 0.192      |
|                | 120 | 100.5        | 4.431 | 0.197      |

As has already been mentioned, the composition of the mobile phase influences not only separation but in case of electrochemical detector also the sensitivity of detection. With regard to this fact, various aqueous solutions were tested but pH (3.0) and the percentage of acetonitrile (13%) were kept constant to preserve separation already developed. Except for the phosphate buffer used in separation experiments, the following aqueous solutions were tested to optimize the sensitivity of the assay: acetate buffer, acetic acid solution, phosphoric acid solution, citric acid solution and formic acid solution. The most sensitive detection was observed using acetic acid solution. The change of the aqueous part shifted the retention time of biotin a little. Therefore, the percentage of acetonitrile was increased to 15%. The separation of biotin from the other vitamins possibly present in multivitamin preparations was not influenced. Under the chosen conditions other B-group vitamins had, due to their positive charge, much shorter retention times than biotin thus the determination of biotin was not interfered with. The only exception was folic acid (possessing negative charge) but

Table 3b

Inter-day precision data

| Pharmaceutical 1    | Day 1 | Day 2 |
|---------------------|-------|-------|
| Obtained amount (%) | 91.16 | 92.84 |
| S.D.                | 1.190 |       |
| R.S.D. (%)          | 1.294 |       |



Table 4  
Quantification of biotin in pharmaceuticals

| Sample           | Declared amount | Determined amount | Obtained amount (%) | S.D.  | R.S.D. (%) |
|------------------|-----------------|-------------------|---------------------|-------|------------|
| Pharmaceutical 1 | 300 µg/tbl      | 273.48 µg/tbl     | 91.16               | 0.432 | 0.474      |
| Pharmaceutical 2 | 75 µg/tbl       | 73.49 µg/tbl      | 97.72               | 0.391 | 0.400      |
| Pharmaceutical 3 | 150 µg/tbl      | 146.66 µg/tbl     | 98.04               | 0.373 | 0.381      |
| Pharmaceutical 4 | 322 µg/g        | 335.52 µg/g       | 103.90              | 0.426 | 0.410      |

its electrochemical properties (high oxidation rate at 600 mV) provided its oxidation at the first channel and thereby its signal was eliminated at the second channel.

When having these conditions developed, the hydrodynamic voltammogram was measured to acquire working potentials of the detection cells for the best possible sensitivity of the method. The hydrodynamic voltammogram was measured from 100 to 900 mV set to the channel II (see Fig. 2). Even though the maximum of the voltammogram was not reached, the experiment was finished, because long duration measuring above 900 mV, which would be necessary for a validation, is not recommended on this instrument. Seeing the behaviour of the hydrodynamic voltammogram the following potentials were set on coulometric cells: guard cell 1000 mV – the highest possible potential to eliminate oxidizable compounds present in the mobile phase, channel I 600 mV – the highest possible potential to eliminate oxidizable impurities in a sample but not so high to oxidize biotin yet, channel II 900 mV – the potential suitable to oxidation of biotin. Fig. 3 shows coulometric chromatograms measured under the optimal conditions.

### 3.2. Validation

Linearity, accuracy, precision and robustness were tested as validation parameters. The calibration curve was constructed by quadruple injection of 12 concentration levels of linearity solutions. Table 2a summarizes linearity parameters in the whole concentration range such as equation of regression line, slope, intercept, residual sum of squares, correlation coefficient, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). The LOD and LOQ were calculated as three and ten times a signal-to-noise ratio, respectively. Table 2b shows linearity parameters of the curve of the working range from 15 to 400 ng/mL. Sensitivity of 200 nA was adjusted for trying to reach a lower detection limit. Setting this sensitivity LOD of 0.25 ng/mL was reached. Accuracy was measured at three concentration levels (80%, 100% and 120%) of spiked placebo samples. Every concentration level was made in triplicate and every sample was injected three times. Using these samples, precision was tested too. Table 3a presents accuracy and precision results. Precision was also proved on real samples of Pharmaceutical 1. Inter-day precision data was measured also using Pharmaceutical 1 and the obtained data is tabled in Table 3b. Six samples of Pharmaceutical 1 were prepared and each was injected in triplicate (Table 4). Robustness was tested during optimization of separation, see Section 3.1 and Table 1.

### 3.3. Quantification of biotin in pharmaceutical formulations

The proposed and validated method was applied to determine biotin in pharmaceutical preparations. Two samples of each preparation were prepared and injected in triplicate. The results are summarized in Table 4. As has been mentioned above, Pharmaceutical 1 was also used to prove the precision. The obtained results agree with the labeled amounts of biotin in particular pharmaceutical preparations (Pharmaceutical 1 might be mentioned like the only exception, tablets contained only 91.2% of declared amount). No interferences were found during analyses of the pharmaceutical preparations. The results demonstrate the ability of the proposed method for quantitative determination of biotin in pharmaceuticals and dietary supplements.

## 4. Conclusion

A novel method for the determination of biotin using HPLC coupled with a coulometric detector has been described in this article. Such a type of detection had not been reported previously for the determination of biotin. The chromatographic and detection conditions have been optimized for this purpose. The developed method has been validated and very good linearity, sensitivity, accuracy, precision and selectivity have been proven. The validated method has been applied for determination of biotin in pharmaceutical preparations.

Using this presented method much lower detection and quantification limits were reached in comparison to previously developed methods using UV and amperometric detection.

## Acknowledgement

The financial support of research project MSM No. 002 162 0822 is gratefully acknowledged.

## References

- [1] I.N. Acworth, M. Naoi, H. Parvez, S. Parvez, Progress in HPLC-HPCE 6 Coulometric Electrode Array Detectors for HPLC, VSP, Utrecht, The Netherlands, 1997.
- [2] U. Gerbl, M. Cichna, M. Zsivkovits, S. Knasmüller, G. Sontag, J. Chromatogr. B 802 (2004) 107–113.
- [3] B. Klejdus, J. Vacek, V. Adam, J. Zehnálek, R. Kizek, L. Trnková, V. Kubáň, J. Chromatogr. B 806 (2004) 101–111.
- [4] G.K. Ziyatdinova, H.C. Budnikova, V.I. Pogorel'tzev, T.S. Ganeev, Talanta 68 (2006) 800–805.
- [5] H. Takeda, T. Matsumiya, T. Shibuya, J. Chromatogr. 515 (1990) 265–278.
- [6] A. Vaarmann, A. Kaska, U. Mäeorg, J. Chromatogr. B 769 (2002) 145–153.



- [7] M. Naoi, W. Maruyama, D. Nakahara, H. Parvez, in: I.N. Ackworth (Ed.), *Progress in HPLC-HPCE 6*, VSP, Utrecht, The Netherlands, 1997, pp. 227–246.
- [8] G. Achillia, G.P. Cellarino, G.V. Melzi d'Eril, F. Tagliaro, *J. Chromatogr. A* 729 (1996) 273–277.
- [9] Y. Deng, W. Maruyama, M. Kawai, P. Dostert, M. Naoi, in: I.N. Ackworth (Ed.), *Progress in HPLC-HPCE 6*, VSP, Utrecht, The Netherlands, 1997, pp. 301–338.
- [10] PDRhealth [online] (2006) [cit. 2006-07-13]. Available at [http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/bio\\_0035.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/bio_0035.shtml).
- [11] D. Voet, J.G. Voet, *Biochemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1995, pp. 337–338, 601–603, 741.
- [12] E. Livaniou, D. Costopoulou, I. Vassiliadou, L. Leondiadis, J.O. Nyalala, D.S. Ithakissios, G.P. Evangelatos, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 331–343.
- [13] J. Schiewe, S. Göbel, M. Schwarz, R. Neubert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) 435–439.
- [14] O. Heudi, T. Kiliç, P. Fontannaz, *J. Chromatogr. A* 1070 (2005) 49–56.
- [15] A.E. Kepe, Ch. Hazen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1998) 1311–1315.
- [16] H.Y. Aboul-Enein, R.F. Hussein, M.A. Radwan, S. Al-Rawithi, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27 (2004) 511–519.
- [17] R. Gadzala-Kopciuch, M. Szumski, B. Buszewski, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26 (2003) 195–205.
- [18] Z. Chen, B. Chen, S. Yao, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 169–175.
- [19] U. Höller, F. Wachter, Ch. Wehrli, *Ch. Fizez, J. Chromatogr. B* 831 (2006) 8–16.
- [20] K. Kamata, T. Hagiwara, M. Takahashi, S. Uehara, K. Nakayama, K. Akiyama, *J. Chromatogr.* 356 (1986) 326–330.
- [21] R. Kizek, M. Masarik, K.J. Kramer, D. Potesil, M. Bailey, J.A. Howard, B. Klejdus, R. Mikelova, V. Adam, L. Trnkova, F. Jelen, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1167–1178.
- [22] M.L. Marszall, A. Lebedzinska, W. Czarnowski, P. Szefer, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 91–98.

## **Komentář k článku**

Tato práce je zaměřena na vývoj a validaci analytické metody pro stanovení biotinu v lékových přípravcích s využitím kapalinové chromatografie spojené s coulometrickým detektorem. Vyvinutá a validovaná metoda byla následně použita pro stanovení biotinu ve vybraných přípravcích dostupných na českém trhu.

### **Cíl práce**

Cílem této práce bylo vyvinout vhodné chromatografické podmínky pro separaci biotinu v přítomnosti ostatních vitamínů, které mohou být obsaženy ve vitamínových přípravcích a doplňcích stravy. Současně s chromatografickými podmínkami vyvinout optimální podmínky pro elektrochemickou detekci, a to jak složení mobilní fáze tak hodnoty potenciálů na jednotlivých celách. Následně vyvinutou metodu validovat, a konečně vyvinutou a validovanou metodu aplikovat na stanovení biotinu v lékových přípravcích dostupných na českém trhu.

### **Komentář a diskuze k výsledkům**

Jelikož byla vybrána instrumentace s coulochemickým detektorem, procedura optimalizace podmínek nezahrnovala pouze volbu stacionární a mobilní fáze, ale bylo také nutné vybrat vhodné podmínky pro coulometrickou detekci. I výběr mobilní fáze se musel podřídit tomuto způsobu detekce. Jelikož složení mobilní fáze ovlivňuje vedle separace také citlivost, byly zkoušeny různé vodné roztoky jako složky potenciální mobilní fáze. Když byly zvoleny optimální chromatografické podmínky, byl naměřen tzv. hydrodynamický voltamogram, který poskytuje informace o elektrochemickém chování dané látky. Podle výsledků tohoto měření byly nastaveny potenciály na jednotlivých coulometrických celách. Také bylo nutné zvolit vhodnou pracovní citlivost detektoru. Následně byla metoda validována, čímž byla prokázána její linearita, selektivita, velmi dobrá přesnost a správnost. Validovaná metoda byla poté aplikována na stanovení obsahu biotinu ve čtyřech vybraných přípravcích obsahující biotin. Pro extrakci biotinu z matrice tablety, případně z tabletoviny, byla použita metoda s fosfátovým pufrům pH 8. Jeho použití bylo vhodné jak pro svou vysokou extrakční účinnost tak pro svou inertnost vůči coulometrickému stanovení.

Výsledkem této publikované práce je citlivá analytická metoda pro stanovení biotinu v lékových přípravcích, využívající kapalinovou chromatografii spřaženou s coulometrickým detektorem. Definovaná denní dávka biotinu je přibližně pouze 30 µg/den. Této nízké dávce je přizpůsoben i jeho obsah v lékových přípravcích. Na rozdíl od ostatních ve vodě rozpustných vitamínů, např. vitamínu C, je obsah biotinu v přípravcích řádově nižší. To spolu s nespecifickým UV spektrem s jediným maximem okolo 190 nm způsobuje potíže při jeho stanovování UV detekcí. Jelikož je ale molekula biotinu elektrochemicky aktivní a relativně snadno podléhá oxidaci, použitím coulometrického detektoru bylo dosaženo mnohem nižšího detekčního a kvantifikačního limitu.

#### 4.4. Práce publikované formou posteru na konferencích a formou abstraktů v odborných časopisech

- ZERZAŇOVÁ, A.; KASTNER, P.; KLIMEŠ, J.: Analýza kokainu a jeho majoritního metabolitu ve vzorcích moče s využitím HPLC. XXXIII. konference Syntéza a analýza léčiv, Nitra, Slovensko, 9. - 10. 9. 2004, *Farmaceutický obzor LXXIII* 9-10/2004, ISSN 0014-8172, 259.
- GARCÉS, A.; ZERZAŇOVÁ, A.; BARRÓN, D.; BARBOSA, J.: Simultaneous determination of eight quinolones in pig plasma by solid phase extraction with LC-UV and LC-MS application in pharmacokinetic studies. 29<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 26. - 30. 6. 2005, Stockholm, Sweden, Abstract book P13:55, 483.
- ZERZAŇOVÁ, A.; KASTNER, P.; KLIMEŠ, J.: Novel Approach to Drug Detection Using HPLC Coupled with Electrochemical Detector. 11<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences, 12. - 14. 9. 2005 Pardubice, Czech Republic, Book of Abstracts P81-Tu, 304.
- ZERZAŇOVÁ, A.; ŽIŽKOVSKÝ, V.; KUČERA, R.; JESENSKÝ, I.; KLIMEŠ, J.: Determination of Biotin in Pharmaceutical Preparations Using HPLC Coupled with Coulochemic Detector. International Symposium on Chromatography, 21. - 25. 8. 2006, Kopenhagen, Denmark, Abstract book Pr 30.
- ZERZAŇOVÁ, A.; ŽIŽKOVSKÝ, V.; KUČERA, R.; KLIMEŠ, J.: Předběžná studie pro využití HPLC-ED ve farmaceutické analýze. 35. konference Syntéza a analýza léčiv, 12. - 15. 09. 2006, Velké Karlovice, Sborník ISBN 80-7305-566-X, P-80, 150.
- ZERZAŇOVÁ, A.; CÍSAŘ, P.; KLIMEŠ, J.: Comparison of different stationary phases for bioanalytical studies of biologically active compounds. 12<sup>th</sup> International Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis, 23. - 26. 9. 2007, Island of Elba, Italy, Abstract book p. 100.

## **5. SOUHRN**

Tato disertační práce je zaměřena do oblasti analytického hodnocení biologicky aktivních látek s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie s důrazem na selektivní a citlivou detekci pomocí hmotnostního a coulometrického detektoru.

V **teoretické části** disertační práce je největší pozornost věnována významu a postavení hmotnostní spektrometrie jako moderní analytické metody detekce. Dále je v teoretické části předložen přehled a aplikace elektrochemických analytických metod, s důrazem na coulometrická měření v průtokových systémech.

Výsledky **experimentální práce** jsou shrnuty a presentovány formou tří prací publikovaných ve vědeckých impaktovaných časopisech.

Přehled dosažených výsledků:

- **První publikovaný článek** se zabývá **srovnáním čtyř chromatografických kolon pro jejich použití v bioanalytických aplikacích**. V dnešní době je na trhu k dispozici velké množství chromatografických kolon s různými sorbenty. Pro naše testování byly vybrány dvě monolitické a dvě náplňové chromatografické kolony s relativně novými sorbenty. Pro měření byly použity reálné směsi biologicky aktivních látek. Každá ze směsí obsahovala parentní účinnou látku, její přirozené metabolity a vhodný vnitřní standard. Na základě chromatografických parametrů (retenční čas, počet teoretických pater respektive výškový ekvivalent teoretického patra, rozlišení a symetrie píku) byly pro každou skupinu látek zvoleny nejlepší chromatografické podmínky. Bylo také popsáno chování analytů s rozličnou chemickou strukturou na sorbentech s různými navázanými řetězci, včetně srovnání s deklaracemi výrobců o jednotlivých kolonách. Přínos naší práce mimo jiné spočíval v testování kolon na směsích příbuzných látek, léčivo s reálnými metabolity, čímž byla otestována i selektivita jednotlivých kolon, což nebývá pravidlem při prezentaci vlastností kolon.

- Výsledkem **druhé publikace** je rychlá a citlivá validovaná **SPE a HPLC metoda pro analytické stanovení plasmatických koncentrací osmi chinolonů používaných ve veterinární praxi**. Vyvinutá a validovaná metoda byla následně použita k stanovení chinolonů v reálných vzorcích. Chinolony, stejně jako některá další chemoterapeutika či antibiotika, se ve veterinární praxi nepoužívají pouze k léčbě konkrétních onemocnění, ale také k profylaktické terapii. Rezidua těchto látek se mohou

následně vyskytovat v produktech získaných z ošetřovaných zvířat a způsobovat tak alergické reakce či bakteriální rezistenci. Přínosem této práce je mimo jiné možnost detekce ciprofloxacinu, majoritního metabolitu enrofloxacinu, který se k terapii rutinně používá. Obvyklé UV metody nebyly pro stanovení ciprofloxacinu dostatečně citlivé. Použití hmotnostní spektrometrie tento problém vyřešilo.

- **Třetí článek** předkládá citlivou analytickou **metodu pro stanovení biotinu v lékových přípravcích, využívající kapalinovou chromatografii spojenou s coulometrickým detektorem**. Vyvinutá a validovaná metoda byla následně použita pro stanovení biotinu ve vybraných přípravcích. Biotin je ve vodě rozpustný vitamín, patřící do skupiny vitamínů B. Účastní se mnoha biochemických procesů a jeho dostatečný příjem je důležitý pro dobře fungující nervovou tkáň, potní žlázy a pro zdravé vlasy, nehty, kůži. Jeho definovaná denní dávka je pouze 30 µg/den a této nízké dávce je přizpůsoben i jeho obsah v lékových přípravcích. Nespecifické UV spektrum a jeho nízký obsah v přípravcích způsobuje potíže při jeho stanovování UV detekcí. Díky coulometrické detekci, jejíž použití umožnila elektrochemická aktivita biotinu, bylo dosaženo mnohem nižšího detekčního a kvantifikačního limitu i v přítomnosti ostatních vitamínů.

## **6. SUMMARY**



This dissertation thesis is focused on the analytical evaluation of biologically active compounds with the aid of High Performance Liquid Chromatography, especially with selective and sensitive detection performed by mass and coulometric detector.

- In **the theoretical part** of this dissertation thesis, there is attention paid to the importance and status of mass spectrometry as a tool of the modern analytical method of the detection. In this dissertation thesis, there is also a view of electrochemical methods and applications, focusing on coulometric measurements in flow systems.

The results of **the experimental work** have been compiled and presented in three articles published in scientific impact journals.

The list of reached results is following:

- **The first article** deals with a **comparison of four chromatographic columns for their use in bioanalytical studies**. Numerous HPLC columns with different bonded stationary phases are nowadays available, and producers continue to expand the range of columns they offer. Four real mixtures of biologically active compounds were used for the testing. Every mixture contained a parent active compound, its real metabolites and proper internal standard. Measurements were performed on two monolithic and two particle-packed columns with quite new stationary phases. On the basis of chromatographic parameters (retention time, theoretical plate number, height equivalent of theoretical plate (respectively), peak resolution and peak symmetry) the best chromatographic conditions were chosen for each group of compounds. The behaviour of the compounds with a different chemical structure, on sorbents with various bonded chains was also described. The main benefit of our work was that column properties were studied on the mixtures of related compounds - a drug with its real metabolites - which is not usual when properties of columns are presented. Hence, the selectivity of the columns was also tested.

- The result of **the second paper** is a fast and sensitive **validated SPE and HPLC method for analytical determination of plasmatic concentrations of eight quinolones used in veterinary practise**. This developed and validated method has been consequently used for the determination of quinolones in real samples.

Quinolones, as well as some other chemotherapeutics or antibiotics, are normally used not only to treat diseases but also in the prophylactic treatment in the veterinary field. The residues of the compounds are accumulated in animal tissue after administration to livestock. Nevertheless, very low concentrations might be dangerous not only for an individual but also for a big population. Individually, these substances may provoke an allergic hypersensitive reaction. The promotion of bacteria resistance is the next important impact for mankind. This work has enabled the determination of ciprofloxacin, the major metabolite of enrofloxacin, which is routinely used in therapy. Commonly used UV techniques were not sensitive enough for its determination. This problem has been solved by the use of mass spectrometry.

- **The third scientific article** shows a sensitive analytical **method for the determination of biotin in pharmaceutical preparations using high performance liquid chromatography coupled with a coulometric detector.** The developed and validated method was then successfully applied for the determination of biotin in chosen pharmaceutical preparations. Biotin is a water-soluble vitamin belonging to the B-complex. It is involved in many biochemical processes and a sufficient intake is necessary for healthy nerve tissue, sweat glands, hair and skin. The defined daily dose of biotin is about 30 µg/day, and thus its content is proportional in pharmaceuticals unlike the amount of other water-soluble vitamins (e.g. vitamin C), in which the content is much higher. This fact together with its nonspecific UV-spectrum causes problems when UV/VIS detection for the determination of biotin is used. Due to the coulometric detection, which was established thanks to electrochemical activity of biotin, much lower detection and quantification limits were reached also in the presence of other vitamins.

## **7. POUŽITÁ LITERATURA**

- [1] Vysokoúčinné analytické separace biologicky aktivních látek (9. 4. 2008),  
[www.gacr.cz/PAC/prezentace/separace.pdf](http://www.gacr.cz/PAC/prezentace/separace.pdf).
- [2] KARLÍČEK, R. et al.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha, 1995, 250 – 291.
- [3] KLIMEŠ, J. et al.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha, 2002.
- [4] Basic Liquid Chromatography (8. 4. 2008),  
<http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>.
- [5] Kolektiv autorů: European Pharmacopoeia 6, Strasbourg, France, 2007.
- [6] What is HILIC? (8. 4. 2008),  
[www.cienytech.com/tablas/HILIC%20-%20What%20is%20Hydrophilic%20Interaction%20Chromatography%20II.pdf](http://www.cienytech.com/tablas/HILIC%20-%20What%20is%20Hydrophilic%20Interaction%20Chromatography%20II.pdf).
- [7] Pokroky ve vývoji kolon pro HPLC - současný stav a perspektivy (8. 4. 2008),  
[www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC\\_01.doc](http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc).
- [8] ŠTULÍK, K.; BOSÁKOVÁ, Z.; COUFAL, P.; JELÍNEK, I.; PACÁKOVÁ, V.; ŠEVČÍK, J.: Analytické separační metody, Karolinum, Praha, 2004.
- [9] Kolektiv autorů: Studijní materiály k předmětu Speciální metody instrumentální analýzy, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2000/2001.
- [10] Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích (7. 12. 2007),  
[http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/vybranemet.htm](http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm).
- [11] Michal Holčapek, Univerzita Pardubice (7. 1. 2008),  
[http://holcapek.upce.cz/teaching\\_CZ.htm](http://holcapek.upce.cz/teaching_CZ.htm).
- [12] Kolektiv autorů: Sborník přednášek 3. ročníku školy HPLC-MS, Doubice, 2005.
- [13] ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A.: Chemical Analysis – Modern Instrumentation Methods and Techniques, John Wiley & Sons, Chichester, England, 2007, 369 – 418 a 453 – 486.

- [14] ARDREY, R. E.: Liquid chromatography – Mass spectrometry: An introduction, Analytical Techniques in the Science, John Wiley & Sons, Chichester, England, 2003.
- [15] COLE, R. B.: Electrospray ionization mass spectrometry, fundamentals, instrumentation and applications, John Wiley & Sons, New York, USA, 1997.
- [16] SCHALLEY, C. A. et al.: Analytical Methods in Supramolecular Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2007, 104 – 162.
- [17] VACEK, J.: Hmotnostní spektrometrie intaktních tkání a její využití v diagnostice, *Klin. Biochem. Metab.* **14 (35)** No. 4 (2006) 194 – 195.
- [18] DAMS, R.; BENIJTS, T.; GÜNTHER, W.; LAMBERT, W.; De LEENHEER, A.: Sonic Spray Ionization Technology: Performance Study and Application to a LC/MS Analysis on a Monolithic Silica Column for Heroin Impurity Profiling, *Anal. Chem.* **74** (2002) 3206 – 3212.
- [19] ESA\_Assisted Ionization (8. 4. 2008),  
[www.analis.be/files/files/applications/ESA%20APPLICATIONS/ESA\\_Assisted%20Ionization04.pdf](http://www.analis.be/files/files/applications/ESA%20APPLICATIONS/ESA_Assisted%20Ionization04.pdf).
- [20] DEAN, J. R.: Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy, Analytical Techniques in the Science, John Wiley & Sons, Chichester, England, 2007, 89 - 122.
- [21] Thermo scientific (2. 1. 2008),  
<http://www.thermo.com/com/cda/product/detail/1,,22534,00.html>.
- [22] Thermo scientific (2. 1. 2008),  
<http://www.thermo.com/com/cda/product/detail/1,,10131071,00.html>.
- [23] DVOŘÁK, J.; KORYTA, J.: Elektrochemie, Academia, Praha, 1983, 160 - 248.
- [24] GARAJ, J. et al.: Fyzikálne a fyzikálnochemické analytické metódy, Alfa, Bratislava, 1977, 21 - 180.

- [25] ACWORTH, I. N.; NAOI, M.; PARVEZ, H.; PARVEZ, S.: Progress in HPLC-HPCE 6, Coulometric electrode array detectors for HPLC, VSP, Utrecht, The Netherlands, 1997.
- [26] Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích (7. 12. 2007), [http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/elektroa.htm](http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/elektroa.htm).
- [27] HOLZBECHER, Z.; CHURÁČEK, J. et al.: Analytická chemie, SNTL a Alfa, Praha, 1987, 163 – 254.
- [28] KALOUS, V.: Základy fyzikálně chemických metod, 2. vydání, SNTL, Praha, 1975, 122 - 273.
- [29] Kolektiv autorů: Instrumentální analýza, SNTL a Alfa, Praha, 1986, 9 – 66.
- [30] České vysoké učení technické (7. 12. 2007), [http://aldebaran.feld.cvut.cz/vyuka/ekologie\\_a\\_ekotechnika/lab/pol/](http://aldebaran.feld.cvut.cz/vyuka/ekologie_a_ekotechnika/lab/pol/).
- [31] Eurochem (7. 12. 2007), <http://www.eurochem.cz/polavolt/obecne/index.htm>.
- [32] ŠTULÍK, K.; PACÁKOVÁ, V.: Elektroanalytické měření v proudících kapalinách, SNTL, Praha, 1989.
- [33] Epsilon (7. 12. 2007), <http://www.epsilon-web.net/Lc/manuals/Principles/Basic/basic.html>.
- [34] Esa (1. 12. 2007), <http://www.esainc.com/>.
- [35] 1-1 Esa, Coulochem<sup>®</sup> III – Reference Manual, ESA, Inc., Chelmsford, MA, USA, 2002.
- [36] 1-2 Esa, Coulochem<sup>®</sup> III – User's Guide, ESA, Inc., Chelmsford, MA, USA, 2002.
- [37] Kolektiv autorů: Sborník – Senzory, esf a VŠCHT, Praha, 2007.
- [38] LASCHI, S.; MASCINI, M.: Planar electrochemical sensors for biomedical applications, *Medical Engineering & Physics* **28** (2006) 934 – 943.

- [39] KEUSGEN, M.: Biosensors: new approaches in drug discovery, *Naturwissenschaften* **89** (2002) 433 – 444.
- [40] DOMÍNGUEZ RENEDO, O.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; ARCOS MARTÍNEZ, M. J.: Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta* **73** (2007) 202 – 219.
- [41] EI-HEFNAWY, G. B.; EL-HALLAG, I. S.; GHONEIM, E. M.; GHONEIM, M. M.: Electrochemical behavior and determination of amiloride drug in bulk form and pharmaceutical formulation at mercury electrodes, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **34** (2004) 899 – 907.
- [42] BARANDA, A. B.; JIMENÉZ, R. M.; ALFONSO, R. M.: Simultaneous determination of five 1,4-dihydropyridines in pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography – amperometric detection, *J. Chromatogr. A* **1031** (2004) 275 – 280.
- [43] LAI, C.-S.; NAIR, N. K.; MANSOR, S. M.; OLLIARO, P. L.; NAVARATNAM, V.: An analytical method with a single extraction procedure and two separate high performance liquid chromatographic systems for the determination of artesunate, dihydroartemisinin and mefloquine in human plasma for application in clinical pharmacological studies of the drug combination, *J. Chromatogr. B* **857** (2007) 308 – 314.
- [44] NIKOLELIS, D. P.; PETRPOULOU, S.-S. E.; MITROKOTSA, M. V.: A minisensor for the rapid screening of atenolol in pharmaceutical preparations based on surface-stabilized bilayer lipid membranes with incorporated DNA, *Bioelectrochemistry* **58** (2002) 107 – 112.
- [45] PALOMEQUE, M. E.; ORTÍZ, P. I.: New automatized method with amperometric detection for the determination of azithromycin, *Talanta* **72** (2007) 101 – 105.
- [46] YUN, E. K.; PRINCE, A. J.; McMILLIN, J. E.; WELCH, L. E.: High-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of cephalosporins, *J. Chromatogr. B* **712** (1998) 145 – 152.

- [47] AL-GHAMDI, A. H.; AL-SHADOKHY, M. A.; AL-WARTHAN, A. A.: Electrochemical determination of Cephalothin antibiotic by adsorptive stripping voltammetric technique, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **35** (2004) 1001 – 1009.
- [48] EL-DESOKY, H. S.; GHONEIM, E. M.; GHONEIM, M. M.: Voltammetric behavior and assay of the antibiotic drug cefazolin sodium in bulk form and pharmaceutical formulation at a mercury electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39** (2005) 1051 – 1056.
- [49] ALGHAMDI, A. H.; BELAL, F. F.; AL-OMARC, M. A.: Square-wave adsorptive stripping voltammetric determination of danazol in capsules, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (2006) 989 – 993.
- [50] WAHDAN, T.; EL-GHANY, N. A.: Determination of domperidone in tablet dosage form by anodic differential pulse voltammetry, *Il Farmaco* **60** (2005) 830 – 833.
- [51] DOGAN, B.; TUNCEL, S.; USLU, B.; ÖZKAN, S. A.: Selective electrochemical behavior of highly conductive boron-doped diamond electrodes for fluvastatin sodium oxidation, *Diamond & Related Materials* **16** (2007) 1695 – 1704.
- [52] GHONEIM, E. M.; EL-ATTAR, M. A.; HAMMAM, E.; KHASHABA, P. Y.: Stripping voltammetric quantification of the anti-diabetic drug glipizide in bulk form and pharmaceutical formulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43** (2007) 1465 – 1469.
- [53] LI, J.; LIN, X.: Electrocatalytic oxidation of hydrazine and hydroxylamine at gold nanoparticle — polypyrrole nanowire modified glassy carbon electrode, *Sensors and Actuators B* **126** (2007) 527 – 535.
- [54] BELTAGI, A. M.; ABDALLAH, O. M.; GHONEIM, M. M.: Development of a voltammetric procedure for assay of the antihistamine drug hydroxyzine at a glassy carbon electrode: Quantification and pharmacokinetic studies, *Talanta* **74** (2008) 851 - 859.



- [55] De FUENTES, O. A.; CAMPANELLA, L.; CRESCENTINI, G.; FALCIONI, A.; SAMMARTINO, M. P.; TOMASSETI, M.: Flow injection analysis of cholic acids in pharmaceutical preparations using a polymeric membrane ISE as detector, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **23** (2000) 89 – 98.
- [56] RADI, A.; ELMOGY, T.: Differential pulse voltammetric determination of carvedilol in tablets dosage form using glassy carbon electrode, *Il Farmaco* **60** (2005) 43–46.
- [57] BERGAMINI, M. F.; SANTOS, A. L.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B.: A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39** (2005) 54 – 59.
- [58] GOYAL, R. N.; OYAMA, M.; UMAR, A. A.; TYAGI, A.; BACHHETI, N.: Determination of methylprednisolone acetate in biological fluids at gold nanoparticles modified ITO electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44** (2007) 1147 – 1153.
- [59] CHMIELEWSKA, A.; KONIECZNA, L.; PLENIS, A.; LAMPARCZYK, H.: Sensitive quantification of chosen drugs by reversed-phase chromatography with electrochemical detection at a glassy carbon electrode, *J. Chromatogr. B* **839** (2006) 102 – 111.
- [60] LŮ, S.; WU, K.; DANGA, X.; HUA, S.: Electrochemical reduction and voltammetric determination of metronidazole at a nanomaterial thin film coated glassy carbon electrode, *Talanta* **63** (2004) 653 – 657.
- [61] WENG, C.-H.; YEH, W.-M.; HOB, K.-C.; LEE, G.-B.: A microfluidic system utilizing molecularly imprinted polymer films for amperometric detection of morphine, *Sensors and Actuators B* **121** (2007) 576 – 582.
- [62] GOYAL, R. N.; GUPTA, V. K.; BACHHLETI, N.: Fullerene-C<sub>60</sub>-modified electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of nandrolone — An anabolic steroid used in doping, *Anal. Chim. Acta* **597** (2007) 82 – 89.

- [63] WANG, C.; SHAO, X.; LIU, Q.; QU, Q.; YANG, G.; HU, X.: Differential pulse voltammetric determination of nimesulide in pharmaceutical formulation and human serum at glassy carbon electrode modified by cysteic acid/CNTs based on electrochemical oxidation of l-cysteine, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42** (2006) 237 – 244.
- [64] GHONEIM, M. M.; ABUSHOFFA, A. M.; MOHARRAM, Y. I.; EL-DESOKY, H. S.: Voltammetry and quantification of the contraceptive drug norethisterone in bulk form and pharmaceutical formulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43** (2007) 499 – 505.
- [65] PRABAKAR, S. J. R.; NARAYANAN, S. S.: Amperometric determination of paracetamol by a surface modified cobalt hexacyanoferrate graphite wax composite electrode, *Talanta* **72** (2007) 1818 – 1827.
- [66] ABBASPOUR, A.; MIRZAJANI, R.: Electrochemical monitoring of piroxicam in different pharmaceutical forms with multi-walled carbon nanotubes paste electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44** (2007) 41 – 48.
- [67] GHONEIM, M. M.; RIES, M. A. E.; HAMMAM, E.; BELTAGI, A. M.: A validated stripping voltammetric procedure for quantification of the anti-hypertensive and benign prostatic hyperplasia drug terazosin in tablets and human serum, *Talanta* **64** (2004) 703 – 710.
- [68] WANGFUENGNAGUL, N.; SIANGHPROH, W.; CHAILPAKUL, O.: A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode, *Talanta* **64** (2004) 1183 – 1188.
- [69] ZAYED, S. I. M.; HABIB, I. H. I.: Adsorptive stripping voltammetric determination of triprolidine hydrochloride in pharmaceutical tablets, *Il Farmaco* **60** (2005) 621 – 625.

- [70] USLU, B.; ÖZKAN, S. A.; ŞENTÜRK, Z.: Electrooxidation of the antiviral drug valacyclovir and its square-wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human biological fluids, *Anal. Chim. Acta* **555** (2006) 341 – 347.
- [71] SABAH, S.; AGHAMOHAMMADI, M.; ALIZADEH, N.: Solid-State valproate ion selective sensor based on conducting polypyrrole films for determination of valproate in pharmaceutical preparations, *Sensors and Actuators B* **114** (2006) 489 – 496.
- [72] SÜSLÜ, İ.; ALTİNÖZ, S.: Electrochemical characteristics of zafirlukast and its determination in pharmaceutical formulations by voltammetric methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39** (2005) 535 – 542.
- [73] ARY, K.; RÓNA, K.; ONDI, S.; GACHÁLYI, B.: High-performance liquid chromatographic method with coulometric detection for the determination of buspirone in human plasma by means of a column-switching technique, *J. Chromatogr. A* **797** (1998) 221 – 226.
- [74] BA, B. B.; SAUX, M.-C.: Separation methods for antiviral phosphorus-containing drugs, *J. Chromatogr. B* **764** (2001) 349 – 362.
- [75] WIBAWA, J. I. D.; SHAW, P. N.; BARRETT, D. A.: Quantification of clarithromycin, its 14-hydroxy and decladinose metabolites in rat plasma, gastric juice and gastric tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B* **783** (2003) 359 – 366.
- [76] KIM, Y.-H.; POTHULURI, J. V.; CERNIGLIA, C. E.: Voltammetric investigation of macrolides by an HPLC-coulometric assay, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38** (2005) 390 – 396.
- [77] GONZÁLES de la HUEBRA, M. J.; BORDIN, G.; RODRÍGUEZ, A. R.: A multiresidue method for the simultaneous determination of ten macrolide antibiotics in human urine based on gradient elution liquid chromatography coupled to coulometric detection (HPLC–ECD), *Anal. Chim. Acta* **517** (2004) 53 – 63.

- [78] ARY, K.; RÓNA, K.: LC determination of morphine and morphine glucuronides in human plasma by coulometric and UV detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26** (2001) 179 – 187.
- [79] SARACINO, M. A.; GANDOLFI, O.; Dall'OLIO, R.; ALBERS, L.; KENNDLER, E.; RAGGI, M. A.: Determination of Olanzapine in rat brain using liquid chromatography with coulometric detection and a rapid solid-phase extraction procedure, *J. Chromatogr. A* **1122** (2006) 21 – 27.
- [80] SABBIONI, C.; SARACINO, M. A.; MANDRIOLI, R.; ALBERS, L.; BONCOMPAGNI, G.; RAGGI, M. A.: Rapid analysis of olanzapine and desmethylolanzapine in human plasma using high-performance liquid chromatography with coulometric detection, *Anal. Chim. Acta* **516** (2004) 111 – 117.
- [81] TRONTELJ, J.; VOVK, T.; BOGATAJ, M.; MRHAR, A.: HPLC analysis of raloxifene hydrochloride and its application to drug quality control studies, *Pharmacological Research* **52** (2005) 334 – 339.
- [82] ZHAOA, F.; ZHANGH, X.; GANA, Y.: Determination of tetracyclines in ovine milk by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system, *J. Chromatogr. A* **1055** (2004) 109 – 114.
- [83] LEBIEDIŃSKA, A.; MARSZAŁŁ, M. L.; KUTA, J.; SZEFER, P.: Reversed-phase high-performance liquid chromatography method with coulometric electrochemical and ultraviolet detection for the quantification of vitamins B<sub>1</sub> (thiamine), B<sub>6</sub> (pyridoxamine, pyridoxal and pyridoxine) and B<sub>12</sub> in animal and plant foods, *J. Chromatogr. A* **1173** (2007) 71 – 80.
- [84] CLEMENT, E. M.; FRANKLIN, M.: Simultaneous measurement of zolmitriptan and its major metabolites *N*-desmethylzolmitriptan and zolmitriptan *N*-oxide in human plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection, *J. Chromatogr. B* **766** (2002) 339 – 343.