

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

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**ANALYTICKÉ HODNOCENÍ BIOLOGICKY  
AKTIVNÍCH LÁTEK CHROMATOGRAFICKÝMI  
METODAMI**

Hradec Králové, 2009

Mgr. Ivana Pasáková

**PROHLÁŠENÍ**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Mgr. Ivana Pasáková

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří přispěli ke vzniku mé disertační práce:

Doc. RNDr. Jaroslavu Sochorovi, CSc., mému školiteli, za jeho odborné vedení, konzultace, vstřícný přístup a věnovaný čas,

Doc. RNDr. Jiřímu Klimešovi, CSc., za všestrannou podporu a možnost zabývat se tak zajímavou problematikou,

kolegům PharmDr. Petře Kovaříkové, Ph.D. a PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D., za jejich pomoc, cenné rady a věnovaný čas během celého doktorského studia,

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

dále Dr. rer. nat. Jürgen Burhennemu, z Ruprecht - Karls Universität Heidelberg, Medizinische Klinik, Analytisch - Chemisches Labor, za možnost spolupráce s jeho pracovní skupinou, odborné vedení i cenné rady během studijního pobytu v rámci programu Erasmus,

spolupracovníkům Anne-Kathrin Mattheé, Klaus-Dieter Riedlovi, Andree Deschlmayr, Monice Maurer a Magdaleně Longo, za jejich více než vřelé přijetí, pomoc i krásný čas strávený v Heidelbergu,

v neposlední řadě také mé skvělé rodině a přáteli, za jejich velkou podporu a trpělivost, po celou dobu studia.

**OBSAH**

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>6</b>
<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>11</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1 PŘEHLED A VYUŽITÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE</b> .....	<b>17</b>
3.2.1 INSTRUMENTACE HPLC.....	18
<b>3.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE</b> .....	<b>30</b>
3.3.1 IONTOVÉ ZDROJE.....	33
3.3.2 HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY.....	49
3.3.3 DETEKTORY.....	61
3.3.4 SPOJENÍ HPLC/MS.....	64
3.3.5 NOVÉ TRENDY V MS.....	69
3.3.6 ZÁKLADNÍ PRINCIPY INTERPRETACE SPEKTER.....	75
<b>3.4 CHARAKTERISTIKA STUDOVANÝCH LÁTEK</b> .....	<b>81</b>
3.4.1 TRANSDERMÁLNÍ PODÁNÍ LÉČIV.....	81
3.4.1.1 Akceleranty transdermální penetrace.....	85
3.4.1.2 Transkarbam 12.....	89
3.4.2 ANTIRETROVIROTIKA.....	91
3.4.2.1 Efavirenz.....	93
<b>4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>95</b>
<b>4.1 ANALYTICKÉ HODNOCENÍ TRANSKARBAMU 12</b> .....	<b>96</b>
4.1.1 PRELIMINARY PHARMACEUTICO-ANALYTICAL EVALUATION OF TRANSKARBAM 12 USING LIQUID CHROMATOGRAPHY.....	98
4.1.2 OPTIMIZATION OF HPLC CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS FOR DETERMINATION OF TRANSKARBAM 12 AND ITS DEGRADATION PRODUCTS...107	
4.1.3 DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LC-ESI-MS ION TRAP METHOD FOR IMPURITY ANALYSIS OF A NOVEL TRANSDERMAL ACCELERANT TRANSKARBAM 12.....	118

---

<b>4.2</b>	<b>ANALYTICKÉ HODNOCENÍ EFAVIRENZ V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU .....</b>	<b>129</b>
4.2.1	QUANTIFICATION OF EFAVIRENZ IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL, PLASMA AND ULTRAFILTRACE USING LIQUID CHROMATOGRAMY COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY .....	130
<b>4.3</b>	<b>PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ .....</b>	<b>168</b>
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>170</b>
<b>6</b>	<b>SOUHRN.....</b>	<b>172</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>176</b>
<b>8</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>180</b>

**SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

ACN	Acetonitril
AH	Kyselina 6-aminohexanová
AIDS	Syndrom získané imunitní nedostatečnosti
AO	Kyselina 8-aminooktanová
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
CA	Kaprolaktam
CI	Chemická ionizace
CID	Kolizně indukovaná disociace
D	Dodekanol
DAD	Detektor s diodovým polem
DAH	Dodecylester 6-(6-aminohexanamido) hexanové kyseliny
DAPCI	Desorpční chemická ionizace za atmosférického tlaku
DART	Přímá analýza v reálném čase
DDEAH	Dodecylester 6-aminohexanové kyseliny
DESI	Desorpční ionizace elektrosprejem
DNBC	3,5-dinitrobenzoyl chlorid
EFV	Efavirenz
EI	Elektronová ionizace
ELSD	Evaporative Light Scattering DeteKtor
ESI	Ionizace elektrosprejem
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC	Plynová chromatografie
HAART	Vysoce účinná antiretrovirová terapie
HILIC	Kapalinová chromatografie s hydrofilními interakcemi
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
ICR	Iontová cyklotronová rezonance
IČ	Infračervená oblast světla
IT	Iontová past
LIT	Lineární iontová past
LLOQ	Spodní limit kvantifikace
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
<i>m/z</i>	Poměr hmotnosti a náboje

---

MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NP-HPLC	Kapalinová chromatografie na normálních fázích
PBMC	Monocyty periferní krve
Q	Kvadrupólový analyzátor
QqQ	Trojité kvadrupól
RIF	Rifampicin
RP-HPLC	Kapalinová chromatografie na reverzních fázích
SIM	Selektivní záznam iontu/ů
SRM	Selektivní záznam reakce/í
T 12	Transkarbam 12
TIC	Celkový iontový proud
TOF	Analyzátor doby letu
TSI	Ionizace termosprejem
UV	Ultrafialová oblast světla
VIS	Viditelná oblast světla

# 1 ÚVOD



Chromatografické metody, jako velmi účinné separační metody, umožňují hodnotit jak kvalitativně, tak kvantitativně i velmi složité směsi látek, což je upřednostňuje před ostatními analytickými metodami. Od 70. let 20. století je nejpoužívanější chromatografickou metodou **vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**. V dnešní době je považována za tradiční a ve farmaceutické analýze nepostradatelnou metodu, která je také ve většině případů metodou volby. Je to především díky schopnosti analyzovat široké spektrum látek, bez limitace molekulovou hmotností, polaritou, ale ani tepelnou stálostí či těkavostí, jak je tomu u chromatografie plynové. HPLC našla své místo v mnoha vědních oborech, nicméně ve farmaceutické analýze je stěžejním nástrojem používaným ve všech fázích výzkumu, vývoje i výroby léčiv a léčivých přípravků. Je také nezbytným nástrojem používaným při monitorování lékových hladin v tělních tekutinách. Díky možnosti spojení s mnoha typy detektorů umožňuje HPLC docílit maximální citlivosti a selektivity analýzy. Přední místo mezi detektory dlouhou dobu zaujímal detektor spektrofotometrický, především díky jeho jednoduchosti a robustnosti. Nicméně v případě, kdy je potřeba během analýzy získat také strukturní informace o hodnoceném analytu, není tento typ detekce vhodný.

I z tohoto důvodu se v posledních letech dostala do popředí detekce využívající **hmotnostní spektrometrie (MS)**. Hmotnostní spektrometr, jako iontově-optické zařízení, umožňuje separovat ionty na základě hodnoty poměru jejich hmotnosti a náboje. Spojení HPLC/MS tak umožňuje během jedné analýzy dosáhnout nejen kvalitní separace hodnocených látek, ale zároveň získat informace o molekulové hmotnosti látky i o její struktuře. Mezi další nesporné výhody tohoto spojení patří především vysoká citlivost, rychlost analýzy a také široké spektrum možných aplikací.

Předkládaná disertační práce je koncipována jako komentovaný soubor čtyř původních vědeckých prací, publikovaných v zahraničních impaktovaných časopisech. Experimentální část je rozdělena do dvou tematických celků. **První celek se zabývá analytickým hodnocením nového akcelerantu transdermální penetrace – transkarbamu 12 (T 12)** a tvoří hlavní část experimentální práce. T 12 byl nasyntetizován na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, a v roce 2001 byl patentován. V době, kdy začala být tato problematika studována, nebyla k dispozici žádná chromatografická metoda, která by se hodnocením toto nového akcelerantu zabývala. Přitom právě popsání nové látky pomocí moderních analytických metod, je jednou z nezbytných podmínek pro její zavedení do farmaceutické praxe. Experimentální práce proto zahrnuje vývoj a validaci chromatografických metod vhodných pro hodnocení čistoty a stability substance T 12. Pilotní studie se zabývala vývojem metod TLC a HPLC/UV pro hodnocení T 12. Další práce byla zaměřena na vývoj HPLC/UV metody, která

by umožnila hodnocení T 12 a jeho dvou rozkladných hydrolytických produktů – kyseliny 6-aminohexanové (AH) a dodekanolu (D). Vzhledem k absenci chromoforu ve struktuře T 12, i jeho potenciálních rozkladných produktů, musela být před vlastní analýzou vzorku vždy provedena časově náročná derivatizace. Z tohoto důvodu byla použita metoda HPLC/MS, která umožnila tento krok přípravy vzorku eliminovat. Vyvinutá metoda byla validována a následně použita v průmyslové výrobě k hodnocení substance T 12.

**Druhý tematický celek se zabývá analytickým hodnocením antiretrovirotika efavirenz v biologickém materiálu.** Experimentální práce byla vypracována na Ruprecht – Karls – Universität, Heidelberg, Analytisch - Chemisches Labor (Německo), v rámci programu Erasmus. Jednalo se o spolupráci na rozsáhlém mezinárodním projektu, na kterém kooperuje Německo, Švédsko, Etiopie a Tanzanie. Tento projekt se zabývá hodnocením antiretrovirotika efavirenz a antituberkulotika rifampicin, vzhledem k jejich možným interakcím. Právě častá koinfekce HIV a TBC představuje velký problém zejména v rozvojových zemích, a proto byla vlastní klinická studie prováděna u afrických pacientů. Efavirenz je doporučen Světovou zdravotnickou organizací (WHO) k léčbě HIV právě v afrických zemích. Experimentální práce uvedená v této disertační práci byla součástí první fáze tohoto projektu. Jednalo se nejprve o vývoj metody HPLC/MS/MS vhodné pro hodnocení efavirenz v plazmě, jeho volné frakce v ultrafiltrátu, a také monocytech periferní krve. Vyvinutá metoda byla následně použita při hodnocení vzorků 14 zdravých dobrovolníků.

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem předkládané disertační práce bylo vyvinout a zvalidovat vhodné chromatografické metody, které by umožnily hodnocení vybraných biologicky aktivních látek. První tematický celek se zabýval analytickým hodnocením akcelarantu transdermální penetrace transkarmbamu 12 (T 12) a druhý, analytickým hodnocením antiretrovirotika efavirenz (EFV).

***Cíle prvního tematického celku:***

- V pilotní studii vyvinout chromatografické metody TLC a HPLC/UV, vhodné pro analytické hodnocení T 12.
- Vyvinout nový derivatizační postup a metodu HPLC/UV pro hodnocení T 12 a jeho dvou potenciálních hydrolytických rozkladných produktů AH a D.
- Vyvinout a zvalidovat metodu HPLC/MS vhodnou pro hodnocení tří možných nečistot v substanci T 12. Následně tuto metodu použít při kontrole čistoty substance T 12 u nově nasyntetizovaných vzorků během optimalizace syntetického postupu v průmyslové výrobě.

***Cíl druhého tematického celku:***

- Vyvinout vhodné postupy pro izolaci antiretrovirotika EFV z biologického materiálu. Následně vyvinout a zvalidovat HPLC/MS/MS metodu pro hodnocení tohoto léčiva v plasmě, jejím ultrafiltrátu a monocytech periferní krve. Tuto metodu následně použít při hodnocení reálných vzorků.

# **3 TEORETICKÁ ČÁST**

### **3.1 PŘEHLED A VYUŽITÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD**

Chromatografické metody hrají v současné době klíčovou roli nejen při analytickém hodnocení léčiv. **Jedná se o vysoce účinné separační metody, které umožňují separovat směsi látek a následně jednotlivé složky identifikovat i kvantifikovat.** Právě možnost hodnocení i velmi složitých směsí látek upřednostňuje chromatografické metody před ostatními analytickými metodami. Nachází proto uplatnění nejen v laboratořích analytických, ale i chemických, biochemických, toxikologických či biologických a v průmyslových odvětvích [1, 2, 3].

Za zakladatele chromatografie je považován ruský chemik a botanik **M. S. Cvět**, který v roce 1903 zveřejnil práci, popisující separaci listových barviv za použití sloupcové adsorpční chromatografie. Na tuto problematiku navázal rakouský chemik **R. Kuhn** a jeho kolegové, kteří v roce 1931 publikovali práci o separaci alfa a beta karotenu, která je považována za základ moderní chromatografie. Adsorpční chromatografie se tak stala běžně používanou a nepostradatelnou metodou chemických i biochemických laboratoří. Dalším významným obdobím vývoje chromatografie byl konec 40. let 20. století, kdy **A. Martin** a **R. Synge** objevili rozdělovací chromatografii. Jejich práce přispěla k rychlému vývoji dalších chromatografických metod, jako je papírová, plynová či později i vysokoúčinná kapalinová chromatografie [1, 4, 5, 6].

Jednotlivé typy chromatografických metod mají svá specifika, nicméně všechny **pracují na společném principu mnohonásobného ustanovování rovnováhy jednotlivých součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi.** První fáze - nepohyblivá neboli **stacionární** - je schopna různou měrou zadržovat jednotlivé složky analyzované směsi. Může se jednat o pevnou látku nebo kapalinu, nanesenou na tuhý nosič, gel nebo naplněnou do kolony. Druhá fáze, pohyblivá neboli **mobilní**, umožňuje eluci jednotlivých složek analyzované směsi ze stacionární fáze a různou rychlostí je unáší ve směru toku fáze. Mobilní fáze může být plynná, kapalná nebo kapalina v superkritickém stavu. K separaci látek tedy dochází během vzájemných interakcí dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. Na základě sorpční rovnováhy je určena rychlost postupu látky, tj. čím pevněji se látka sorbuje na stacionární fázi, tím pomaleji chromatografickým systémem postupuje [2, 3, 7].

Chromatografické metody lze v současné době dělit na základě různých kritérií [3, 8]:

- **povaha mobilní fáze:** chromatografie plynová (GC) a kapalinová (LC)
- **způsob provedení:** chromatografie sloupcová - kolonová, papírová, tenkovrstvá
- **způsobu vyvíjení:** chromatografie eluční, vytěšňovací, frontální analýza
- **typ skupenství mobilní a stacionární fáze:** chromatografie v systému kapalina-tuhá látka, kapalina-kapalina, plyn-kapalina, plyn-tuhá látka, viz tab. 1
- **typ separačního procesu:** chromatografie adsorpční, rozdělovací, iontovýměnná, gelová, afinitní
- **účel:** preparativní, analytická

**Tab. 1 Přehled možných kombinací mobilních a stacionárních fází a od nich odvozených chromatografických metod:**

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Chromatografická metoda	Zkratka
<i>plyn</i> (GC)	<i>kapalina</i>	plynová rozdělovací chromatografie	<b>GLC</b>
	<i>tuhá látka</i>	plynová adsorpční chromatografie	<b>GSC</b>
<i>kapalina</i> (LC)	<i>kapalina</i>	kapalinová rozdělovací chromatografie	<b>LLC</b>
		gelová permeační chromatografie	<b>GPC</b>
		papírová rozdělovací chromatografie	<b>PC</b>
		tenkovrstvá rozdělovací chromatografie	<b>TLC</b>
	<i>tuhá látka</i>	kapalinová adsorpční chromatografie	<b>LSC</b>
		iontovýměnná chromatografie	<b>IEC</b>
		tenkovrstvá adsorpční chromatografie	<b>TLC</b>

Z uvedených metod byly dlouhou dobu v popředí zájmu především chromatografie plynová a papírová resp. později tenkovrstvá. Klasická kolonová (sloupcová) chromatografie byla mnoho let na pokraji zájmu, vzhledem k nízkému tlaku na koloně, který znemožňoval rychlé analýzy s dostatečným rozlišením. **Na konci 70. let 20. století však nastal výrazný obrat díky zavedení vysokoúčinných kolon a rozvoji chromatografické instrumentace. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se tak stala jednou z klíčových moderních analytických metod.** V současné době se rozvoj chromatografických metod odehrává zejména v oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie a plynové chromatografie. Své uplatnění však stále nachází i chromatografie tenkovrstvá jako metoda, která není náročná na instrumentaci, je rychlá a zároveň levná [8, 9].



## **3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE**

Jak již bylo zmíněno, HPLC je v dnešní době jednou z nejpoužívanějších analytických metod, a ve farmaceutické analýze patří také ve většině případů k metodě první volby. Je to především díky širokému spektru analyzovatelných látek, které nejsou limitovány molekulovou hmotností, polaritou, ale ani teplotní stálostí či těkavostí, jak je tomu u chromatografie plynové. Díky kombinaci s mnoha typy detektorů umožňuje docílit maximální citlivosti a selektivity metody.

Další předností je relativně snadné kvalitativní i kvantitativní hodnocení analyzovaných látek i v poměrně složitých směsích. **Základní kvalitativní charakteristikou HPLC je retenční čas.** Na základě shody retenčních časů hodnocené látky a příslušného standardu, za přesně definovaných podmínek, lze potvrdit totožnost látky. Zároveň se však používá další, nezávislé, metody pro potvrzení - nejčastěji porovnáním naměřených UV/VIS spekter získaných pomocí detektoru diodového pole nebo na základě IČ či MS spekter. **Kvantitativní charakteristikou HPLC je plocha (popř. výška) chromatografického píku.** Nejčastěji se využívá metody vnitřního nebo vnějšího standardu, kalibrační závislosti popř. metody normalizace [3, 7, 10, 11].

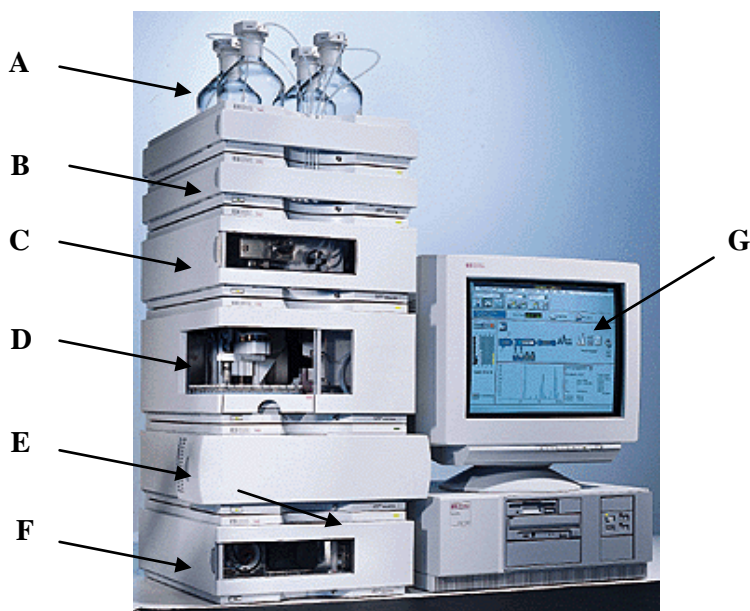
**HPLC představuje ve farmaceutické analýze stěžejní analytický nástroj používaný ve všech fázích výzkumu, vývoje i výroby.** Během výzkumu nových látek se využívá preparativní HPLC, která umožňuje látky izolovat a purifikovat, a poté je pomocí analytické HPLC identifikovat. K tomu se využívá nejčastěji spojení HPLC s moderními, vysoce citlivými, detekčními technikami MS a NMR. V rámci preklinického hodnocení léčiva je nezbytné vyvinout vhodné chromatografické metody, které umožní hodnotit čistotu a stabilitu substance, popsat její farmakokinetiku a metabolismus v organismu. V průběhu výrobního procesu pak HPLC zajišťuje nepřetržitou kontrolu kvality a jakosti léčivého přípravku, nejčastěji pomocí UV, DAD a MS detektoru. Nepostradatelná je také v rámci bioekvivalenčních studiích [11, 12, 13, 14].

**Zároveň je nedílnou součástí při monitorování lékových hladin v tělních tekutinách (TDM).** Po podání léčiva pacientovi umožní HPLC monitorovat hladiny těchto léčiv nebo jejich metabolitů nejčastěji v krevní plazmě, séru či moči. TDM je nutné zejména u léčiv s úzkým terapeutickým indexem a velkou inter a intra - individuální farmakokinetickou a farmakodynamickou variabilitou. Cílem je tedy zoptimalizovat dávkování léčiva u každého pacienta tak, aby bylo dosaženo odpovídajícího léčebného účinku a předešlo se výskytu nežádoucích účinků či dokonce toxického efektu. Na rozdíl

od imunochemických metod je HPLC selektivní metodou, která umožní kvantifikovat jak původní léčivo, tak jeho vzniklé metabolity [3, 15].

### 3.2.1 INSTRUMENTACE HPLC

HPLC systémy jsou v dnešní době nejčastěji tzv. stavebnicového typu a tvoří je následující základní části: *zásobníky mobilní fáze (A)*, *degasser (B)*, *pumpy (C)*, *dávkovací zařízení (D)*, *chromatografická kolona (E)*, *detektor (F)* a *počítač s příslušným softwarem pro sběr a vyhodnocení dat (G)*. Jednotlivé části jsou spojeny kapilárami o vnitřním průměru 0,05 až 0,32 mm, které jsou nejčastěji vyrobeny z nerezové oceli nebo polyether - ether - ketonu (tzv. PEEK kapiláry) popř. titanu. Všechny části chromatografu musí splňovat přísné parametry tak, aby bylo docíleno efektivní, vysoce citlivé a reprodukovatelné analýzy pro identifikaci i kvantifikaci látek. [16, 17]



Obr. 1 Schéma kapalinového chromatografu, převzato z ref.18.

### A) ZÁSOBNÍKY MOBILNÍ FÁZE

Nejčastěji používanými zásobníky mobilní fáze jsou skleněné láhve o různém objemu, většinou opatřené speciálními uzávěry, které mají zabránit odpařování mobilní fáze. Mobilní fáze, která prochází celým HPLC systémem, musí být připravena z vysoce čistých rozpouštědel a chemikálií, určených pro tyto účely. Počet zásobníků může být různý (1-4), nicméně vyšší počet zásobních lahví je nezbytnou nutností u **gradientových elucí**, kdy se poměr složek mobilní fáze během analýzy mění, a je tedy potřeba čerpat každou složku ze samostatné lahve. V případě **eluce isokratické**, zůstává poměr složek mobilní fáze po celou dobu analýzy stejný. [2, 17].

### B) DEGASSER

Před vstupem mobilní fáze do systému musí být zajištěno její dostatečné odplynění. Špatně odplyněná mobilní fáze zhoršuje reprodukovatelnost retenčních časů a objemů nástřiku, zhoršuje plynulost průtoku mobilní fáze, zvyšuje šum základní linie a snižuje citlivost. Dříve používané metody odplynění za pomoci ultrazvukové lázně, vývěvy či probublání heliem již ztratily na významu. Zavedení on-line degasserů, které jsou umístěny mezi zásobníky mobilní fáze a pumpu, znamenalo významný přínos pro kvalitu analýz. Základem je trubice, která je propustná pro plyny, nikoli však pro kapaliny a je umístěna ve vakuu. V tomto prostoru tak dojde k přechodu plynu z trubice s mobilní fází do okolního prostoru a do systému pokračuje odplyněná mobilní fáze [17, 19].

### C) PUMPY

Kvalitní pumpa je jednou z nejdůležitějších částí chromatografického systému, a jsou na ni z tohoto důvodu kladeny vysoké požadavky. **Ideální pumpa musí zajistit konstantní a reprodukovatelný průtok mobilní fáze celým systémem a umožnit použití průtoků v širokém rozmezí při zachování dostatečné přesnosti a správnosti.**

Moderní pumpy jsou schopny zajistit průtok mobilní fáze v rozmezí od 0,01 ml/min do 10 ml/min, při tlaku až do cca 50 MPa. Právě možnost dosáhnout vysokých tlaků je v současnosti nezbytná. Trendem při výrobě stacionárních fází je totiž zmenšování částic, což umožňuje dosáhnout vyššího rozlišení a rychlejší analýzy, avšak za zvýšení zpětného tlaku. Dalším důležitým parametrem je u pumpy také schopnost zajistit konstantní průtok mobilní fáze systémem. Nejčastěji se v dnešní době používají pumpy pístové. Jejich hlavní výhodou je malý vnitřní objem dávkovače, možnost dodávat mobilní fázi po neomezenou dobu a používat gradientovou eluci. Určitou nevýhodou jsou vznikající tlakové pulsy. Tento problém se však podařilo vyřešit zařazením dalšího čerpadla, které pracuje v opačné fázi, čímž pulsy kompenzuje. Může se použít také více čerpacích hlav s koordinovaným sáním a výtlakem a také čerpadla s programovaným pohybem pístu [6 10,] 20].

#### ***D) DÁVKOVACÍ ZAŘÍZENÍ***

**Tato část HPLC systému umožňuje dávkování kapalného vzorku do proudu mobilní fáze v prostředí vysokého tlaku.** Objem dávkovaného vzorku se obvykle pohybuje v rozmezí 0,1 - 100  $\mu$ l.

Dávkovací systém by měl být schopen pracovat s vysokou reprodukovatelností nástřiků. I v této oblasti vývoje je snaha dosáhnout automatizace, a proto se v podstatě upustilo od používání ručního nástřiku jednotlivých analýz pomocí šesticestného ventilu (Rheodyne). Moderní HPLC systémy jsou již vybaveny automatickým dávkovačem - autosamplerem, který umožňuje nastříknout řady vzorků bez přítomnosti analytika. Autosampler umožňuje naprogramovat dopředu pořadí i nástřikový objem jednotlivých vzorků, které jsou umístěny v zásobníku vzorků. Tento prostor umožňuje vzorky temperovat a zároveň je chrání před světlem. Aby nedošlo ke kontaminaci vzorku vzorkem předešlým, dochází k pravidelnému vnitřnímu i vnějšímu oplachu jehly, kterou je vzorek aplikován [10, 19].

#### ***E) CHROMATOGRAFICKÁ KOLONA***

Chromatografická kolona je jediná část systému, kde dochází ke kontaktu stacionární a mobilní fáze, a tím k vlastní separaci analytů. Vhodně vybraná stacionární fáze a optimální poměr a složení mobilní fáze je tedy rozhodující pro dosažení úspěšné separace látek. **Chromatografická kolona je v podstatě trubice o délce 5 až 30 cm, vyrobená z nerezavějící oceli (popř. plastu, skla) naplněná stacionární fází neboli sorbentem.**

Kolony musí být mechanicky stabilní, vzhledem k vysokým pracovním tlakům, dále chemicky odolné, vůči širokému rozsahu pH a polarit mobilních fází, měly by být také odolné vůči vysokým pracovním teplotám. Neméně podstatná je kvalita (tvar a velikost) jednotlivých částic sorbentu a velikost jejich pórů. **Na chromatografické kolony jsou v současnosti kladeny vysoké nároky, především z důvodu zajištění reprodukovatelnosti a robustnosti analytických metod.** Jistým problémem je variabilita při výrobě stejné stacionární fáze různými výrobci, nicméně rozdíly lze najít i mezi různými šaržemi vyrobenými stejným výrobcem. Z tohoto důvodu byly určeny parametry, ve kterých se musí jednotlivé kolony shodovat (retenční faktor, selektivita, počet teoretických pater či účinnost separace při analýze modelové směsi látek) [10, 21]

V současné době je komerčně vyráběno velké množství nejrůznějších částicových kolon, které se liší na základě jejich délky, vnitřního průměru, velikosti pórů, architektury kolony či dle polarity a typu stacionární fáze nebo navázaných funkčních skupin. Tyto parametry kolony pak ovlivňují kvalitu separace, rychlost a citlivost metody či tvar a rozlišení píků.

• **Délka kolony** je u komerčně dostupných kolon 5 - 30 cm. Se zkracující se délkou kolony se také zkracuje doba analýzy, snižuje se šířka píku a zvyšuje citlivost, nicméně klesá účinnost kolony, a tím i rozlišení píků [19].

• **Vnitřní průměr kolony** (nejčastěji 1 - 5 mm) je důležitým parametrem, který ovlivňuje citlivost detektoru, mez stanovitelnosti, tlakový spád na koloně, objemový průtok mobilní fáze či objem vzorku, který může být na kolonu aplikován. Kolony s větším vnitřním průměrem (nad 10 mm) tzv. semipreparativní či preparativní jsou vzhledem k možnému vysokému nástřiku vzorku obvykle využívány hlavně v industriálních aplikacích při purifikaci produktů. Zmenšením průměru kolony se zvyšuje citlivost a zároveň se snižuje spotřeba rozpouštědel i vzorku při nástřiku. Kolony s vnitřním průměrem 2 - 3 mm tzv. „narrow-bore“ se používají pro zvýšení citlivosti pro UV/VIS, fluorescenční detektory a ve spojení s hmotnostním detektorem, kde zlepšují schopnost ionizace látky elektrosprejem. Kolony o vnitřním průměru 1 mm, tzv. „micro-bore“ a pod 1 mm, tzv. „kapilární“ mají své uplatnění spíše u specifických případů [17, 19, 22].

• **Velikost částic** ovlivňuje především rychlost separace - čím menší částice jsou, tím je rychlost analýzy vyšší, zároveň se však zvyšuje tlak na koloně. Optimální velikost částic pro klasické HPLC separace s dostatečnou účinností, zpětným tlakem a životností je cca 5  $\mu\text{m}$ . Menší částice o velikosti 3  $\mu\text{m}$  se využívají pro rychlé separace a částice o velikosti 1,5  $\mu\text{m}$  jsou použitelné pouze pro extrémně rychlé separace makromolekul, jako např. proteinů [11].

• **Velikost pórů** ovlivňuje naopak separaci na základě velikosti molekul. Malé póry (7 - 12 nm) jsou typicky používány na malé molekuly, zatímco póry o velikosti nad 15 nm (15 - 100 nm) umožňují separaci velkých molekul s  $M_r$  nad 10 000 Da [11].

• **Architektura kolony** - klasické stacionární fáze, jak již bylo uvedeno výše, jsou naplněny jednotlivými částicemi sorbentu o definované velikosti. Tento typ kolon vykazuje sice dostatečnou separační účinnost, nicméně jejich nevýhodou je omezená maximální rychlost průtoku mobilní fáze (snižování velikosti částic sorbentu zvyšuje zpětný tlak na koloně). Tento problém překlenují tzv. **monolitické kolony**, které jsou tvořeny jediným kusem pórovitého materiálu a veškerá mobilní fáze tak musí protékat jeho póry. Monolitické kolony obsahují dva typy pórů – prvním typem jsou velké póry (makropóry), které zajišťují rychlý konvektivní tok mobilní fáze skrz monolit a významně zrychlují přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází. Druhým typem jsou středně velké póry (mesopóry), které poskytují monolitu dostatečně velký povrch, a tím vysokou separační

kapacitu. Tato struktura umožňuje zatížit kolonu i značně vysokými rychlostmi průtoků mobilních fází bez přílišného zvýšení tlaku a ztráty separační účinnosti. Monolity se díky těmto svým výhodám staly v určitých oblastech analýzy nezastupitelnými. Oproti klasickým kolonám například umožňují značné zrychlení separací zejména velkých molekul, jako jsou bílkoviny, nukleové kyseliny či syntetické polymery [19, 21, 23, 24, 25].

- **Dle polarity stacionární fáze** se chromatografie dělí na dvě základní skupiny: první je **chromatografie na normálních fázích (NP-HPLC)**, kde stacionární fáze je polární a mobilní fáze je nepolární. Mezi nejčastěji používané polární stacionární fáze patří anorganické sorbenty - především silikagel, dále pak oxid hlinitý nebo chemicky vázané polární stacionární fáze na povrchu silikagelu. NP-HPLC se využívá při separaci vysoce hydrofobních látek rozpustných v nepolárních organických rozpouštědlech, separaci isomerů či preparativní analýze [10, 11].

V opačném případě, kdy stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze polární, se jedná o **chromatografii na reverzních fázích (RP-HPLC)**. Nepolární stacionární fáze jsou nejčastěji vázané na povrch silikagelu. V dnešní době 80 % aplikací v HPLC využívá právě RP-HPLC, protože umožňuje aplikace pro analyty s širokým rozsahem polarit a zároveň používat vodou ředitelná rozpouštědla pro přípravu mobilních fází [10, 11].

**Jistou alternativou pro NP-HPLC a konkurentem pro RP-HPLC je relativně nová metoda – chromatografie s hydrofilními interakcemi (HILIC)**, poprvé publikována v roce 1990 A. J. Alpertem [26]. Jedná se v podstatě o chromatografii na normálních fázích za možnosti použití polárních mobilních fází. RP-HPLC má široké využití, nicméně jejím nedostatkem je analýza silně polárních a hydrofilních látek, které jsou na koloně nedostatečně zadržovány. V NP-HPLC jsou naopak tyto látky zadržovány dostatečně, nicméně je potřeba použít nepolární mobilní fáze, které jsou často toxické, drahé, mají nepříznivý vliv na životní prostředí a navíc polární a hydrofilní látky jsou v nich špatně rozpustné. Základním skeletem stacionární fáze pro HILIC je silikagel nebo polymer, které mohou být modifikovány navázanou polární (např. Diol, NH<sub>2</sub>) nebo zwitterionickou funkčních skupinou (sulfobetaine - ZIC-HILIC). Mobilní fáze pak musí obsahovat vysoké procento organického rozpouštědla a nižší procento vody (optimální obsah 60 – 97 % acetonitrilu). Vždy však musí obsahovat minimálně 3 % vody, které jsou potřebné pro dostatečnou hydrataci částic stacionární fáze. Při HILIC je stacionární fáze hydratována tenkou vrstvou vody, která způsobuje vyšší afinitu polárních analytů ke stacionární fázi (vysoké procento organického rozpouštědla), a tím zajišťuje jejich retenci na koloně. Výsledkem je zvýšená retence polárních látek a změna pořadí eluce v závislosti na jejich hydrofobitě. Vysoké procento organické fáze v mobilní fázi také výrazně přispívá ke zlepšení ionizace a tím i citlivosti při použití MS detektoru, zároveň se také dosahuje

lepšího tvaru a symetrie píků u látek středně až vysoce polárních. Nejčastější aplikací techniky HILIC je separace vysoce polárních látek, sacharidů, aminokyselin a peptidů [27, 28, 29, 30, 31].

- **Dle typu stacionární fáze:**

- **na bázi silikagelu**

Silikagel je nejrozšířenější a nejpoužívanější základ stacionárních fází chromatografických kolon. Je to především díky jeho výhodným vlastnostem, jakými jsou velká **mechanická odolnost** a z toho plynoucí dlouhá stabilita za vysokých pracovních tlaků; možnost **výroby různých velikostí částic i pórů**, a tím možnost využití při analytických i preparativních aplikacích a pro analýzu malých i velkých molekul; další výhodou je jeho **kompatibilita s vodou i s většinou organických rozpouštědel** a v neposlední řadě **snadná modifikace jeho povrchu**, a tím možnost připravit množství různých stacionárních fází použitelných pro NP i RP-HPLC. Nejčastější modifikací stacionární fáze je navázání alkylového řetězce C8 a C18, používanými jsou také krátké řetězce C4, C1 či řetězce s funkčními skupinami typu CN, NH<sub>2</sub>, fenolu, diolu či specifickými pentafluorofenylpropylovými a palmitamidopropyllovými řetězci. Silikagel může být také modifikován látkami typu katexů a anexů pro použití v iontovýměnné chromatografii. Po modifikaci stacionární fáze však nedojde ze sterických důvodů k obsazení všech původních silanolových skupin, což způsobuje asymetrii píků u bazických látek nebo, v některých případech, i jejich ireverzibilní absorpci. Tento problém výrazně řeší tzv. **endcapping**, kdy po příslušné modifikaci stacionární fáze dojde ještě k navázání malých molekul jako např. trimethylchlorsiloxan či dimethyldichlorsiloxan na volné SiOH skupiny, a tím k odblokování těchto zbytkových skupin. Hlavní nevýhodou při použití silikagelu je jeho nestálost v prostředí s pH < 2 a > 8, čímž dochází k limitaci při volbě pH mobilní fáze, dále je to jeho nestálost při vysokých teplotách a při použití mobilních fází s vysokým obsahem vody [11, 17, 19, 21].

- **na bázi oxidu zirkoničitého - ZrO<sub>2</sub>**

Stacionární fáze na bázi ZrO<sub>2</sub> byla vyvinuta především proto, aby překonala limitace pH stability fází silikagelových. Oxid zirkoničitý lze připravit ve formě monodisperzních porézních kulových částic, které v mnoha případech vykazují srovnatelnou účinnost jako částice silikagelové stejných rozměrů. **Na rozdíl od silikagelu však poskytuje vynikající stabilitu při pH do 14. Má vysokou tlakovou i tepelnou odolnost a lze ho tak využít především pro rychlé separace za vysokých teplot i nad 100 °C.**

Může být použit nemodifikovaný v NP-HPLC, především je však využíván v RP-HPLC, a to modifikovaný C18, polybutadienem nebo polystyrenem, popř. tenkou vrstvou pyrolyticky vyloučeného uhlíku. Oxid zirkoničitý má na svém povrchu adsorpční centra charakteru Lewisových kyselin, která tvoří silné interakce s hydroxylovými, fosfátovými nebo karboxylovými skupinami analyzovaných látek. Proto se doporučuje přidávat do mobilních fází pufrů, které tyto interakce kompenzují. Zirkoniové stacionární fáze často umožňují lepší separaci stereoisomerů, silně polárních látek (př. steroidy), i velmi podobných sloučenin, které se liší polaritou [11, 19].

Podobné vlastnosti má i stacionární fáze **na bázi  $\text{Al}_2\text{O}_3$** , která je stabilní do pH 12. Má velmi podobné adsorpční vlastnosti jako silikagel, nicméně její aplikace jsou omezené, vzhledem ke katalytickému štěpení a rozkladu nebo ireverzibilní adsorpci některých analyzovaných látek na jeho povrchu. Primární použití této fáze je v separaci nasycených a nenasycených alifatických uhlovodíků a separaci polyaromatických uhlovodíků [11, 19, 32].

➤ Dále se může využívat stacionární fáze na bázi **nederivatizovaného grafitizovaného uhlíku**, která umožňuje efektivní separaci geometrických izomerů (léčiv) a látek vysoce hydrofilních. Limitací těchto kolon je však nízká efektivita, vyšší fragilita oproti SiOH, nutnost pracovat s vysoce čistými mobilními fázemi a zatím stále vysoká cena. Jedná se o vysoce hydrofobní fázi, což znamená, že ji lze bez další modifikace využít v RP-HPLC. Využít lze také fáze **na bázi polymeru**, které se stávají vhodnou alternativou k iontovýměnné chromatografii bazických látek bez nutnosti přidávání ion-párového činidla do mobilní fáze. Hlavní výhodou polymerů je možnost jejich použití při pH 1-13. Nicméně i tato metoda má své nevýhody, kterými je především nižší účinnost (cca 1/2 až 1/3) oproti kolonám na bázi silikagelu [10, 11].

➤ Speciálním druhem sorbentů jsou **chirální stacionární fáze**. Jedná se většinou o inertní silikagelový nosič, který je modifikován přírodními nebo syntetickými selektory jako např. proteiny, cyklodextriny, polymerními uhlovodíky, Pirklovými fázemi nebo makrocyclickými antibiotiky. Alternativou může být přidání chirálního aditiva do mobilní fáze, které dočasně s enantiomery vytvoří diastereoizomerní komplexy. Chirální stacionární fáze umožňují separaci opticky aktivních izomerů (enantiomerů). Jedná se o látky, které mají stejné chemické i fyzikální vlastnosti (pokud na ně nepůsobí opticky aktivní látky nebo prostředí), ale jejich biologický účinek může být rozdílný. Nevýhodou těchto fází je velká spotřeba drahých chirálních selektorů, problémy s detekcí a nízká efektivita separace (nesymetrické píky, nízký počet teoretických pater). [10, 11, 19].



## F) DETEKTORY

Detektor umožňuje rozpoznat (detekovat) a kvantifikovat jednotlivé složky analyzované směsi, které jsou eluovány z kolony. „Ideální“ detektor by měl mít následující vlastnosti [17, 19, 33]:

- univerzálnost (možnost detekce všech přítomných komponent)
- vysoká citlivost a nízká úroveň šumu
- stabilita a reprodukovatelnost
- široký lineárně dynamický rozsah  
(okamžitá a lineární odezva detektoru v co nejširším koncentračním rozmezí)
- minimální objem detekční cely (minimalizace rozmývání píků)
- použitelnost pro široké spektrum rozpouštědel, průtoků a teplot
- možnost použití gradientové eluce
- snadná obsluha a spolehlivost

Všechny výše uvedené požadavky nespĺňuje žádný z dosud vyráběných detektorů. Každý detektor však má jisté předpoklady pro optimální detekci určité skupiny látek. Vhodný výběr detektoru významným způsobem ovlivňuje citlivost a selektivitu analýzy. Všechny typy dnes používaných detektorů jsou koncentrační a lze je rozdělit do dvou skupin: 1/ **selektivní**, kdy signál detektoru je úměrný pouze koncentraci detekované látky v eluentu a 2/ **univerzální**, kdy signál detektoru je úměrný celkovým vlastnostem eluentu, tj. mobilní fázi a detekované látky.

## SPEKTROFOTOMETRICKÝ DETEKTOR (UV/VIS)

**Spektrofotometrický detektor je založen na schopnosti analytu absorbovat záření v oblasti vlnových délek od 190 do 700 nm.** V rozmezí vlnových délek 190 - 400 nm se jedná o UV záření a jako zdroj se využívá deuteriová lampa, v oblasti 400 - 700 nm se jedná o viditelnou oblast (VIS) a zdrojem záření je wolframo-halogenová lampa.

Hlavním předpokladem pro použití UV-VIS detektoru je přítomnost chromoforu v molekule hodnocené látky. Citlivost u tohoto typu detektoru se pohybuje nejčastěji od  $10^{-9}$  do  $10^{-10}$  g/ml, je však ovlivněna molárním absorpčním koeficientem analyzovaných látek a také chromatografickými podmínkami. Jedná se o nejrozšířenější a nejčastěji používaný typ detektoru, především díky jeho jednoduchosti, přesnosti, správnosti, možnosti použití gradientové eluce a schopnosti analyzovat široké spektrum látek. Jiné typy detektorů se volí, především pokud analyty neabsorbují nebo jen minimálně absorbují

v UV oblasti, koncentrace analytu je příliš nízká pro UV detekci nebo pokud je třeba znát strukturní informace o analytu [11, 19, 33, 34].

UV-VIS detektory se mohou dle konstrukčního typu rozdělit do skupin:

**Detektory s fixní vlnovou délkou**, jako nejstarší typ UV-VIS detektorů, již zcela ztratil na významu a dnes se nepoužívá. Částečně ho nahradily **detektory s měnitelnou vlnovou délkou**, které umožňují zvolit libovolnou vlnovou délku (nejčastěji v celé šíři 190 - 700 nm), při které má příslušná látka své absorpční maximum, a tím docílit maximální citlivosti. Zdrojem tohoto záření je deuteriová a wolframo-halogenová lampa. Existují také tzv. „scanning“ **UV detektory** umožňují během několika sekund sejmout absorpční spektrum v maximu hodnoceného píku. Asi nejčastěji se však v praxi používají **detektory diodového pole** (photodiode-array, PDA, DAD), které umožňují snímat celé absorpční spektrum látky v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Výsledkem je trojrozměrný chromatogram jako závislost absorbance na vlnové délce a na čase. Zářivý tok, vzniklý spektrálním rozložením záření ze zdroje na holografické mřížce, dopadá na velké množství plošných fotodiod, které jsou spojeny s předem nabitým kondenzátorem. Ten se tak vybije a při následném nabíjení se měří proud, který je potřebný na jejich dobití. Tento typ detektoru ve spojení s počítačem umožňuje detekovat látky při jakékoliv zvolené vlnové délce, porovnávat snímaná spektra s knihovnou spekter a vypočítat čistotu píku. **Umožňuje tak splnit všechny požadavky farmaceutické analýzy - tedy identifikaci, kontrolu čistoty i stanovení obsahu látky v jednom kroku** [2, 11, 20, 33, 34, 35, 36].

## FLUORESCENČNÍ DETEKTOR (FL)

Fluorescenční detektory jsou přednostně využívány v případě, že hodnocený analyt vykazuje přirozenou fluorescenci. Vzhledem k tomu, že se to týká pouze poměrně malé skupiny analytů (cca 15 %), využívá se u fluorescenční detekce velmi často derivatizace, kdy je do molekuly analytu zaveden fluorofor. Fluorescenční detektory jsou proto méně univerzální než např. UV detektory, nicméně jsou výrazně citlivější ( $10^{-9}$  -  $10^{-12}$  g/ml) a selektivnější, díky čemuž jsou často využívány při stopové analýze [3, 11].

**Jsou založeny na principu měření intenzity sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního).** Toho se dosahuje kombinací interferenčních filtrů a násobiče, který je umístěn kolmo na zdroj excitačního záření. Fluorimetrické detektory moderní konstrukce umožňují nastavit délku excitačního i emitovaného záření použitím monochromátoru. Současně lze v průběhu eluce měnit tyto vlnové délky primárního i sekundárního záření tak, aby bylo dosaženo maximální citlivosti pro všechny separované látky. Jako zdroj pro excitaci může

být použita deuteriová, xenonová, xenon-rtuťová lampa. Nevýhodou tohoto typu detektoru je možná poměrně silná závislost signálu a optimální vlnové délky pro excitaci a emisi na separačních podmínkách jako je teplota, polarita a viskozita rozpouštědla či pH. Finální podmínky separace tak mohou vyžadovat jistý kompromis mezi kvalitní separací a detekcí [11, 17, 19, 35].

### ***DERIVATIZACE***

Derivatizace je proces, při kterém dochází k chemické reakci mezi analytem a činidlem, a následně ke změně fyzikálních a chemických vlastností analytu. Hlavními důvody použití derivatizace jsou především zvýšení citlivosti nebo umožnění detekce vůbec, zlepšení nebo modifikace parametrů chromatografické separace s cílem usnadnit hodnocení analytu (např. zamezení nežádoucí sorpce látek na koloně). Ideální derivatizační reakce by měla probíhat rychle, kvantitativně a za vzniku minimálního množství vedlejších produktů reakce [11, 19].

Existují 3 typy derivatizace dle místa, kde probíhá: derivatizace *předkolonová* (během přípravy vzorku), *postkolonová* (po výstupu analytu z kolony a před vstupem do detektoru) a derivatizace *kolonová* (přímo na koloně). Všechny způsoby derivatizace mají vliv na eluční charakteristiky separovaných látek (účinnost separace a dobu analýzy), ale požadavky na deriváty a derivatizační reakce jsou pro jednotlivé typy specifikované. Například při použití nadbytku derivatizačního činidla u předkolonové derivatizace je potřeba zajistit dostatečnou separaci činidla a vzniklého produktu. Co se týká experimentální náročnosti a nároků na zkušenost operátora, jsou největší požadavky kladeny právě na zmiňovanou derivatizaci předkolonovou, kde musí být zajištěna dostatečná reprodukovatelnost výsledků.

Nejčastěji se derivatizace využívá v případě absence chromoforu resp. fluoroforu ve struktuře analytu při využití UV resp. fluorimetrické detekce. Vhodnou alternativou může být i v případě, kdy analyt nemá ve své struktuře elektrochemicky aktivní skupinu pro hodnocení elektrochemickým detektorem. Před použitím derivatizace v HPLC analýze, je třeba nejprve rozhodnout, jaké derivatizační činidlo je pro analyt nejvhodnější a následně vybrat typ detekce. Derivatizováno může být široké spektrum látek jako např. kyseliny, alkaloidy, aminy, antibiotika, barbituráty a jim příbuzné látky, hydroxy-sloučeniny nebo steroidy. Stejně tak široká je i nabídka derivatizačních činidel a výběr nejvhodnějšího záleží především na funkční skupině analytu a na způsobu detekce [11, 19, 34, 37, 38].

## **ELEKTROCHEMICKÝ DETEKTOR (EC)**

**Elektrochemické detektory se uplatňují při hodnocení látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda - eluent.** Schopnosti látek se oxidovat či redukovat využívá voltametrický, amperometrický a polarografický detektor [3]. Množství aplikací pro elektrochemickou detekci není příliš velké, ale látky, na které se tento typ detekce aplikuje, reprezentují velké množství důležitých léčiv, polutantů a přírodních produktů. Citlivost tohoto typu detektoru je srovnatelná či spíše vyšší v porovnání s detektorem fluorescenčním ( $10^{-9} - 10^{-12}$  g/ml), nicméně mezi jisté limitace patří jeho nižší selektivita a nemožnost využití gradientové eluce [11, 19].

V případě tohoto typu detekce jsou vysoké požadavky kladeny na čistotu a odplynění mobilní fáze, protože jakékoli znečištění kovy, halogenidy či kyslíkem může způsobit výrazné zhoršení pozadí (šum a drift základní linie). Mobilní fáze musí být vodivá, což téměř vylučuje použití tohoto typu detektoru v systému normálních fází. V případě reverzních fází jsou kladeny požadavky na maximální možný obsah organické složky v mobilní fázi [17].

## **REFRAKTOMETRICKÝ DETEKTOR (RI)**

Princip refraktometrického detektoru je založen na měření rozdílného indexu lomu čisté mobilní fáze a eluentu s analytem, vytékajícím z kolony. Jedná se o nejstarší univerzální typ detektoru, který se však při analytickém hodnocení léčiv používá jen ojediněle. Jeho hlavními nevýhodami jsou malá citlivost ( $10^{-6}$  g/ml) a nutnost neustálého a pečlivého termostátování, vzhledem k značné závislosti odezvy detektoru na teplotě. Při tomto typu detekce také nelze využít gradientové eluce [3, 11].

## **EVAPORATIVE LIGHT SCATTERING DETEKTOR (ELSD)**

Druhým typem univerzálního detektoru je ELSD, u kterého, na rozdíl od RI detektoru, je možné využít gradientové eluce. Slouží především k detekci látek o vyšší molekulové hmotnosti, které neobsahují chromofor či fluorofor (např. fosfolipidy, lipidy, mastné kyseliny, aminokyseliny, dextriny, maltodextriny, cukry, oligo/polyethyleneglykoly, polyvinylchlorid či polymethylmethakrylát). Eluent vycházející z kolony je přiveden do detektoru, kde je pomocí inertního plynu zmlžen. Následně v evaporační komůrce dochází k odpaření mobilní fáze a vytvoření částic méně těkavého analytu. Z tohoto důvodu je použití detektoru omezeno pouze na těkavé mobilní fáze (podobně jako v technice HPLC/MS) a méně těkavé či netěkavé analyty. Vzniklé částičky analytu pak vstupují do optické komůrky, kde projdou světelným paprskem ze zdroje

záření, a dojde k rozptylu světla. Určité množství takto rozptýleného světla dopadne na fotodetektor (umístěn v úhlu 90° od původního směru paprsku) a odpovídá tak množství látky ve vzorku. V dnešní době existuje i tzv. **Liquid light scattering detektor (LLSD)**, u kterého již není třeba mobilní fázi odpařovat. Používá se především pro hodnocení polymerních látek a makromolekulární sloučenin [11, 17, 19, 27, 39].

## **HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)**

Vysoce citlivým a perspektivním typem detekce je hmotnostní spektrometrie, jejíž problematika je podrobně popsána v kapitole 3.3.

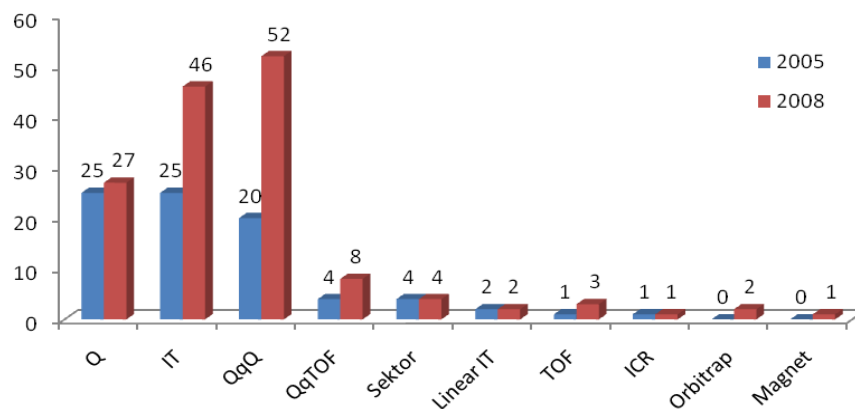
### ***G) SOFTWARE PRO SBĚR A VYHODNOCENÍ DAT***

Každý chromatografický systém je v dnešní době již plně automatizován a příslušný software umožňuje také sběr a vyhodnocení dat. Jednotlivé softwary se liší dle výrobce, nicméně základní parametry jsou identické.

### 3.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie se stala přední analytickou metodou především díky své vysoké citlivosti, detekčním limitům, rychlosti a různorodosti možných aplikací. Jedná se o nejcitlivější metodu molekulární analýzy, která umožňuje získat informace o molekulové hmotnosti látky i o její struktuře. **Hmotnostní spektrometrie umožňuje převést molekuly analytů na ionty, rozlišit je podle poměru  $m/z$  a následně zaznamenat relativní intenzity jednotlivých iontů.** Jedná se o metodu destruktivní, která však vyžaduje minimální množství vzorku [40, 41].

Největšího rozmachu MS dosáhla během posledních cca 20 let a v současné době je nepostradatelnou analytickou metodou užívanou v mnoha oblastech např. farmacie, medicína fyzika, chemie, biologie, forenzní toxikologie, antidopingové kontroly, monitorování kvality životního prostředí, archeologie (geochronologie), ale i kriminalistika, atomová fyzika, astronomie a mnoha dalších [40, 42]. I v rámci České republiky došlo během posledních let k výraznému nárůstu HPLC/MS systémů, jak dokládá níže uvedený obr. 2. Na základě dostupných informací [43, 44] můžeme vidět prudký nárůst z 82 systémů k srpnu 2005 na 146 systémů k září 2008 (kde navíc nejsou zahrnuty systémy firmy Shimadzu).



Obr. 2 Zastoupení jednotlivých typů analyzátorů v ČR. **Q** – Kvadrupól, **IT** – Iontová past, **QqQ** - Trojitý kvadrupól, **QqTOF** – kombinace QqQ a TOF, **LIT** – Lineární iontová past, **TOF** - Analyzátor doby letu, **ICR** – Iontová cyklotronová rezonance, převzato z ref. 43, 44.

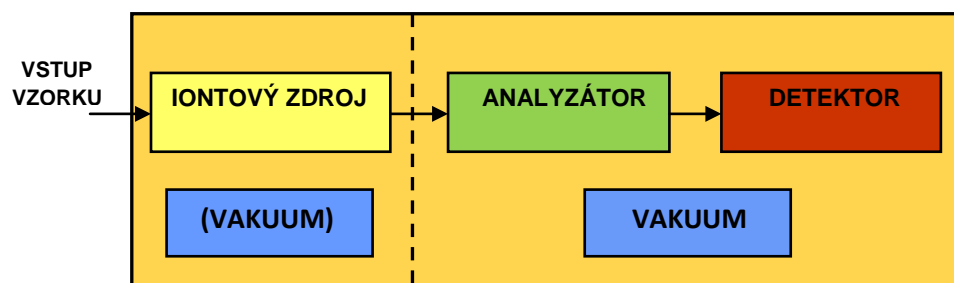
Za zakladatele MS je považován **J. J. Thomson**, objevitel elektronu, který v roce 1913 rozdělil izotopy neonu  $^{20}\text{Ne}$  a  $^{22}\text{Ne}$  pomocí tzv. parabolového spektrografu. Ještě před ním, v roce 1898 objevil W. Wien zakřivení dráhy letu urychlených iontů v elektrickém a magnetickém poli. V roce 1924 pak J. J. Thomson společně s **F. W. Astonem**

charakterizovali izotopické zastoupení asi 50-ti prvků. Oba získali Nobelovu cenu - J. J. Thomson za fyziku v r. 1906 a F. W. Aston za chemii v r. 1922. K většímu rozmachu MS došlo ve 40. letech 20. století, kdy se stala důležitou metodou v petrolejářském průmyslu, používanou k analýzám ropných produktů a analýze těkavých organických látek obecně. Následovalo období prvních pokusů o spojení MS se separačními metodami GC (Holmes, Belt, 1957) a HPLC (Baldwin, McLafferty, 1973) a objevů nových způsobů ionizace. Dalším významným milníkem v historii MS je rok 1984, kdy **J. B. Fenn** zavedl ionizaci elektrosprejem (ESI). Ta se stala vůbec nejrozšířenější ionizační technikou a umožnila významné rozšíření MS aplikací v oblasti biochemie a napomohla také rozluštění lidského genomu. V roce 1989 **K. Tanaka**, F. Hillenkamp a M. Karas objevili ionizační metodu MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), která umožnila analýzu biopolymerů. V roce 2002 pak byla udělena Nobelova cena za chemii právě J. B. Fennovi za vynález elektrospreje a K. Tanakovi za inspiraci MALDI [40, 41].

V případě České republiky byl první MS detektor sestaven v roce 1953 V. Čermákem, V. Hanušem, Č. Jechem a J. Cabicarem, na Ústavu fyzikální chemie ČSAV.

### Základní části hmotnostního spektrometru:

- 1) **IONTOVÝ ZDROJ** – převádí neutrální molekuly analytu na nabitě částice - ionty (př. EI, ESI, MALDI atd.), viz kap. 3.3.1.
- 2) **HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTOR** - slouží k separaci iontů v plynné fázi, za vysokého vakua, podle poměru hmotnosti a náboje -  $m/z$  (př. Q, IT, TOF atd.), viz kap. 3.3.2.
- 3) **DETEKTOR** - slouží k detekci iontů po jejich separaci dle  $m/z$  a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů (př. elektronový násobič, fotonásobič, Faradayova klec), viz kap. 3.3.3.



Obr. 3 Schéma hmotnostního spektrometru.

Nezbytnou součástí každého MS systému je také kvalitní **vakuový systém**, který musí zajistit dostatečné vakuum v analyzátoru a iontovém zdroji (pokud není použita ionizační technika pracující za atmosférického tlaku). Trajektorie letu iontu nesmí být ovlivněna kolizemi s neutrálními atomy, které by mohly způsobit změnu dráhy letu a následně vybití iontu na stěnách instrumentu. Hodnota potřebného vakua se liší dle typu analyzátoru, nejčastěji se pohybuje cca  $10^{-3}$  až  $10^{-6}$  Pa, ale např. u iontové cyklotronové rezonance se musí dosáhnout až cca  $10^{-7}$  –  $10^{-9}$  Pa. K docílení takovýchto hodnot vakua se obvykle využívá dvou i více stupňového čerpání velmi výkonnými vakuovými pumpami (rotační pumpy s výkonem 80 l/s, výkonnější turbomolekulární a difúzní pumpy s výkonem 250 l/s) [41, 40].

Další částí hmotnostního spektrometru je **zařízení pro zavádění vzorků**, které se volí dle charakteru hodnoceného vzorku. Pro vzorky těkavé se využívá *studených nebo vyhřívaných zásobníků*, pro vzory pevné a kapalné s nižší těkavostí je vhodná *sonda pro přímý vstup* a v případě spojení MS se separačními technikami se používají *speciální sondy dle použité ionizační techniky*. Součástí hmotnostního spektrometru je také **iontová optika**, která umožňuje urychlení a fokusaci iontů a **počítač s příslušným softwarem**, pomocí kterého dochází k ovládní a ladění přístroje, ke sběru a ukládání dat a případnému porovnání naměřených spekter s knihovnou spekter [41].



### 3.3.1 IONTOVÉ ZDROJE

Jak již bylo uvedeno, iontový zdroj slouží k převedení analyzovaných elektroneutrálních molekul do nabitě formy (na ionty). Vzhledem k tomu, že neexistuje univerzální ionizační technika, která by umožnila ionizovat všechny molekuly, jsou pro různé typy sloučenin vhodné různé typy ionizace. Největší význam mají v dnešní době techniky ESI, APCI a APPI při spojení HPLC/MS a dále ESI a MALDI jako nejšetrnější ionizační techniky pro analýzu biomolekul. Další významnou ionizační technikou je elektronová ionizace (EI), používaná ve spojení s GC, která vykazuje výraznou fragmentaci a podává tak nejvíce strukturních informací o analytu. Zároveň také umožňuje porovnání naměřených spekter s knihovnou spekter.

EI je často označována jako tzv. „**tvrdá**“ **ionizační technika**, právě díky výrazné fragmentaci molekul způsobené nadbytkem vnitřní energie, kterou molekula získá během ionizace. Mezi „tvrdé“ ionizační techniky částečně patří kromě EI také ionizace chemická (CI) a ionizace polem (FI). Pro „tvrdé“ techniky platí, že primárně vznikají radikalkationy  $M^+$  - ionty s lichým počtem elektronů, které podléhají další fragmentaci. Přibližně u 10 % organických látek pak může být fragmentace tak silná, že zcela chybí molekulový ion. Opakem tvrdých technik jsou tzv. „**měkké**“ **ionizační techniky**, u kterých molekula získá během ionizace mnohem menší energii, což se projeví značným zjednodušením hmotnostního spektra. Ve spektrech pak pozorujeme převážně (de)protonované molekuly analyzovaných látek  $[M-H]^-$  či  $[M+H]^+$  a minimum fragmentových iontů. Mohou však vznikat i adukty jako  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+Cl]^-$  popř. s kovovými ionty. V důsledku ion-molekulárních reakcí vznikají většinou ionty se sudým počtem elektronů. Mezi měkké ionizační techniky patří např. ESI, APCI, APPI či MALDI. Vzhledem k tomu, že při použití měkké ionizační techniky získáme pouze omezené strukturní informace, může být ion dále fragmentován kolizně indukovanou disociací (CID) v iontovém zdroji nebo použitím MS/MS či  $MS^n$  technik.

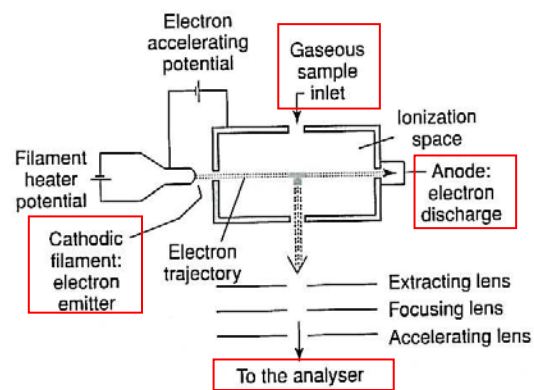
**Volba vhodné ionizační techniky** je ovlivněna těkavostí a tepelnou stabilitou látky, molekulovou hmotností, nebo povahou analytu (chemické individuum nebo směs více látek). Důležitým parametrem je také **volba polaritý ionizace** (kladná či záporná). U většiny analytů jsou hodnoceny kladné ionty, protože jsou snadno protonovatelné či kationizovatelné. Pro tento typ ionizace je vhodná přítomnost heteroatomu v molekule látky. Záporná polarita ionizace se volí v případě, kdy analyty snadno deprotonují (např. polyhydroxylované látky, sulfonové či karboxylové kyseliny atd.).

## ELEKTRONOVÁ IONIZACE (EI)

Elektronová ionizace je nejstarší a nejtvrdější ionizační technikou, která byla zavedena v roce 1918 A. J. Damsterem a později zdokonalena W. Bleakneym a A. O. Nierem. **Lze ji využít pouze v plynné fázi za vakua. Její použití je proto limitováno těkavostí a dostatečnou tepelnou stabilitou látek.** K ionizaci látek dochází při teplotě 150 – 400 °C a tlaku  $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  Pa. Vzhledem k tomu, že EI spektra mohou být měřena za standardních podmínek, existují rozsáhlé knihovny spekter, se kterými můžeme naměřená spektra porovnávat [40, 41].

Princip elektronové ionizace je založen na žhaveném vláknu z wolframu či rhenia, které funguje jako katoda a emituje elektrony, které prochází iontovým zdrojem a jsou následně zachyceny na anodě. Urychlující potenciál mezi katodou a anodou určuje energii elektronů a vyjadřuje se v elektronvoltech (eV). Kolmo na procházející svazek elektronů vstupuje do zdroje plynný vzorek látky. Přiblížením emitujícího elektronu k valenčním elektronům molekuly dojde k ovlivnění jejich magnetických polí a tak dochází k uvolnění valenčního elektronu, a tím ke vzniku radikálkationtu  $M^{\cdot+}$  ( $M + e^- \rightarrow M^{\cdot+} + 2e^-$ ). Za určitých podmínek může dojít také k záchytu elektronu, nicméně tento proces je málo pravděpodobný. Vzniklé ionty jsou vytěšňovací elektrodou vypuzeny z iontového zdroje, svazek iontů je dále fokusován a urychlen směrem do analyzátoru iontů. **Pokud je výsledný pík tohoto iontu viditelný ve spektru, udává molekulovou hmotnost látky.** Při rozsáhlé fragmentaci však dochází k rozpadu na menší nabitě a nenabitě částice, což se projeví výrazným poklesem či absencí molekulárního iontu.

Ionizační potenciály většiny organických látek se pohybují mezi 7 – 16 eV, nicméně lze zvolit potenciál v rozmezí až 6 - 100 eV. Zvýšením energie elektronů dojde ke zvýšení přebytku vnitřní energie ionizovaných molekul, což může vést ke snížení intenzity molekulárního iontu nebo jeho úplnému vymizení. Zvýšení energie elektronů však zároveň zlepšuje citlivost detekce. Právě proto byla zvolena **standardní hodnota potenciálů pro tvoření knihoven EI spekter 70 eV**, při které je dosaženo dostatečně vysoké citlivosti a spektra bohatého na fragmentové ionty. Informace získané z EI spektra, pak umožňují látky identifikovat a objasňovat strukturu i neznámých látek či směsí [40, 41, 45, 46].



Obr. 4 Schéma elektronové ionizace, převzato z ref. 40.

### **CHEMICKÁ IONIZACE (CI)**

V roce 1966 zavedl M. S. B. Munson a F. H. Field chemickou ionizaci jako měkkou alternativu k EI. CI produkuje ionty s menším nadbytkem energie a umožňuje tak získat spektra s menší fragmentací, která však stále podávají strukturní informace. I zde dochází k ionizaci pouze v plynné fázi, takže látky nesmí být termolabilní a netěkavé. Chemická ionizace je považována za první měkkou ionizační techniku [40, 41].

Konstrukce i princip CI jsou v podstatě analogické k EI. Hlavní odlišností je přítomnost kolizního plynu, který musí být oproti vzorku v nadbytku (až  $1 : 10^4$ ). Pro zajištění dostatečného počtu srážek mezi molekulami analytu a ionty reakčního plynu, je potřeba zajistit také tlak kolizního plynu cca 100 Pa. V iontovém zdroji tak dojde nejdříve k ionizaci molekul reakčního plynu emitovanými elektrony, a teprve poté ion-molekulárními reakcemi k ionizaci molekul analytu. Nejčastějšími reakčními plyny jsou methan, isobutan a amoniak. Mezi méně časté pak patří propan, methanol, voda, dusík či vzácné plyny jako argon a helium. Na základě protonové afinity plynu je určena selektivita ionizace (čím vyšší protonová afinita, tím vyšší selektivita, a tím pevněji se proton váže k molekule) [41].

Vzhledem k tomu, že CI je již považována za měkkou ionizační techniku, vznikají ve většině případů ionty se sudým počtem elektronů. Mezi **ion-molekulární reakce**, které se uplatňují v CI při pozitivním módu, patří *přenos protonu a atomu vodíku* (vznik  $MH^+$ ), *přenos „negativních iontů“* (vznik  $[M-H]^+$ ), *kondenzační reakce* nebo *asociační reakce a tvorba klastrů* (vznik protonem vázaných komplexů). Může docházet také k *přenosu elektronu*, což je jediný případ, kdy vznikají ionty s lichým počtem elektronů  $M^+$  (paralela s EI). Typ reakce, která ve zdroji proběhne, je závislá na použitém reakčním plynu. Při vzniku záporných iontů se uplatňují ion-molekulární reakce typu deprotonace, adice halogenidu, záchyt elektronu či výměna náboje. Z reakčních plynů se nejčastěji používá methan, isobutan, amoniak, tetrachlormethan nebo jiné halogenované látky [41, 47].

### **IONIZACE POLEM (FI)**

Aplikací intenzivního elektrického pole vznikají z analyzovaných molekul ionty. Stejně jako elektronová a chemická ionizace je i ionizace polem použitelná pouze pro molekuly v plynné fázi. FI pracuje na principu vložení vysokého napětí (5 – 20 kV) na anodu (emitor), kterým může být tenký drátek nebo ostrý břit z wolframu. Zde vznikne vysoký potenciálový gradient, který umožní „protunelování“ nejméně vázaného elektronu ven z molekuly a následně jeho záchyt na anodě. Katodou je výstupní štěrbin. Během

ionizace dochází ke vzniku jak radikalkationtů  $M^+$  s malým zbytkem vnitřní vibrační energie, tak i ion-molekulárními reakcemi ke vzniku (de)protonovaných molekul -  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$  nebo  $[M+Na]^+$  atd. Vzhledem k malé citlivosti metody, tvorbě el. oblouků a křehkosti anody se tato metoda používá jen výjimečně [40, 41].

Analogií FI je **desorpce polem (FD)**, kterou zavedl v roce 1969 H. D. Beckey. Oproti FI dochází k ionizaci analytu v kapalně fázi. FD byla vyvinuta jako první technika kombinující desorpci a ionizaci analytu, která umožňuje analýzu bioorganických molekul. Jedná se o šetrnou ionizační techniku, která produkuje ionty s velmi nízkou vnitřní energií (cca desetiny eV). V dnešní době je tato technika nahrazena jinými desorpčními technikami, především MALDI [40, 41, 48, 49].

### ***IONIZACE URYCHLENÝMI ATOMY (FAB) NEBO IONTY (FIB)***

Vzhledem k tomu, že ionizace FAB i FIB pracují na velice podobném principu, mají podobnou přípravu vzorků, použití, ale i získané výsledky, budou dále popsány společně. Při ionizaci **FAB** dochází k interakci vysokoenergetických neutrálních molekul vzácných plynů (nejčastěji **Xe**, někdy **Ar**) se vzorkem ve viskózní matrici. V případě **FIB** se místo neutrálních molekul k bombardování vzorku používají urychlené ionty (nejčastěji  $Cs^+$ ). Ionizace FIB je někdy označována také dříve používaným názvem - hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů – SIMS [41].

V případě FAB dochází ke vzniku urychlených atomů s definovanou energií za použití tzv. iontového děla. Ke vzniku urychlených iontů  $Cs^+$  s definovanou energií pro ionizaci FIB, dochází za použití tzv. zdroje iontů  $Cs^+$  s povrchovou ionizací. Vlastní průběh ionizace u FAB i FIB je složitý děj, při kterém se uskutečňuje celá řada reakcí při interakci bombardujících částic s kapalnou matricí, a také reakcí v plynné fázi v těsné blízkosti u povrchu matrice. Velmi důležitým parametrem při FAB/FIB ionizaci je **volba matrice**. Používá se viskózní prostředí, které umožňuje delší životnost vzniklých iontů. Nejčastěji používanou matricí je **glycerol**. Dalšími možnými matricemi jsou **m-nitrobenzylalkohol**, vhodný pro nepolární látky a **di- a triethanolamin**, které jsou díky své bazicitě vhodné k produkci negativních iontů. **Thioglycerol** a eutektická směs **dithiothreitolu** a **dithioerythritolu** (5:1, w/w) jsou používanou alternativou ke glycerolu. Do matrice se také často přidávají látky k podpoření ionizace (např. HCl,  $CF_3COOH$ , HCOOH k podpoření protonace) [40, 41, 49].

### ***DESORPCE PLAZMOU KALIFORNIA 252 (<sup>252</sup>Cf PD)***

Desorpci plasmou představil R. D. MacFarlane a D. F. Torgessone v roce 1976 [50]. Při tomto typu ionizace je hodnocená látka převedena do roztoku, nanесena na tenkou hliníkovou folii a odpařena. Následně je v iontovém zdroji vystavena fragmentům <sup>252</sup>Cf, kterými jsou radioaktivní izotopy (např. Cs, I a další) o vysoké energii až 80 MeV. Po jejich dopadu na folii se vzorkem dojde k desorbci molekulárních iontů např. [M+Na]<sup>+</sup>, [M+Cs]<sup>+</sup>, [M+H]<sup>+</sup> či v záznamu záporných iontů [M+Cl]<sup>-</sup>, M<sup>-</sup>. Tato metoda umožnila analýzu velkých molekul (cca 10 000 Da), nicméně v dnešní době je již její využití limitované a častěji se v těchto případech využívá ionizace MALDI [38, 40, 41].

### ***DESORPCE LASEREM (LD)***

Jedná se o pulzní techniku, která je založena na krátkém a intenzivním laserovém pulzu, který je fokusován na malou plochu pevného vzorku. Tím dojde k desorbci části vzorku z povrchu a vzniká mikroplasma iontů a neutrálních molekul, které mohou mezi sebou reagovat v plynné fázi povrchové vrstvy vzorku. Dochází k četným ion-molekulárním reakcím, nejčastěji (de)protonaci a kationizaci různými kovy z povrchu. Laserové pulzy tedy uskutečňují jak odpaření, tak ionizaci vzorku. LD však představuje složitý proces, při kterém je obtížné dosáhnout dostatečné reprodukovatelnosti. Spektra při použití LD jsou silně závislá na fyzikálních vlastnostech analytu a produkované ionty jsou převážně fragmenty analytu. Tato situace se však dramaticky změnila při objevení ionizace MALDI. I když LD již ztratila svůj význam, je stále považována za techniku, která byla zásadní pro objevení MALDI [40, 41].

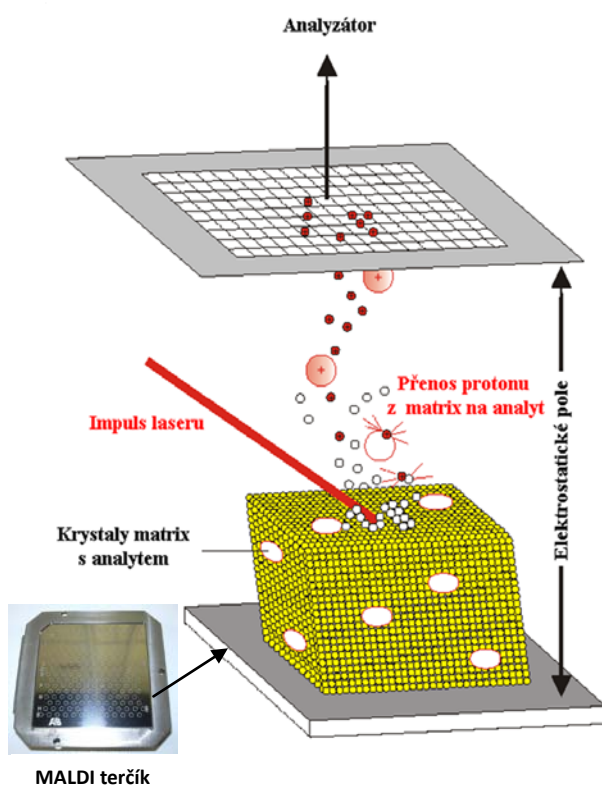
### ***IONIZACE LASEREM ZA ÚČASTI MATRICE (MALDI)***

Jak bylo uvedeno výše, MALDI byla vyvinuta z ionizační techniky LD, avšak jistý podíl při jejím vývoji měly také ostatní, dnes již výjimečně používané, techniky (FI, FAB, FIB či <sup>252</sup>Cf PD) [48]. MALDI byla představena v roce 1988 M. Karasem a F. Hillenkampem [51, 52, 53]. Do této doby bylo možné analyzovat pouze molekuly s molekulovou hmotností do 10 000 resp. 34 000 [54].

**MALDI, společně s ESI, patří mezi měkké ionizační techniky, které umožnily detekci velkých, netěkavých a termolabilních molekul pomocí MS s dostatečnou citlivostí.** Tato technika umožňuje hodnotit analyty s molekulovou hmotností v rozmezí několika tisíců až několika set-tisíců Daltonů (biopolymery, syntetické polymery,

ale i velké anorganické molekuly), což znamenalo obrovský přínos především pro biochemii. Mezi hlavní výhody MALDI patří především rychlá příprava a analýza vzorku, jednoduchá spektra a relativně velká tolerance ke kontaminaci vzorku solemi, pufrů, detergenty atd. [40, 41, 55].

Analyt se nejdříve rozpustí, smísí s vhodnou maticí a následně je nanesen na MALDI terčik, kde dojde k jeho vysušení. Alternativou pro nanášení vzorku je metoda „quick-and-dirty“, kdy dojde ke smísení analytu a matrice přímo na terčiku. Vlastní ionizace analytu probíhá v iontovém zdroji za vakua. Nejprve dojde k vyslání velmi krátkého pulsu laseru, trvajících nanosekundy, max. mikrosekundy, který je maticí absorbován, a který matici excituje. Matrice poté předá energii molekule analytu, která se desorbuje do plynné fáze v podobě molekulového iontu. Během tohoto procesu ion-molekulárními reakcemi vznikají nejčastěji kladné ionty  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^{2+}$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  nebo záporné ionty  $[M-H]^-$ . U nepolárních analytů se mohou tvořit adukty, např.  $[M+Ag]^+$ ,  $[M+Li]^+$ . Jedná se o pulzní ionizační techniku, která se používá zásadně ve spojení s analyzátozem doby letu [40, 41, 47].



Obr. 5 Schéma ionizace MALDI

**Kvalitu výsledků ovlivňuje především správná volba matrice, rozpouštědla, povrchu a metoda nanášení vzorku.** Zvolená matrice musí být dostatečně fotostabilní v přítomnosti laserového pulzu, inertní vůči analytu, stabilní ve vakuu, schopna ionizovat analyt a vytvořit s ním žádoucí krystal. Nezbytná je také schopnost absorbovat záření při vlnové délce použitého laseru [47].

Obvykle se používají UV lasery dusíkové (UV 337 nm) nebo Nd: YAG (355 nm). Je možné využít také IČ laserů, které sice poskytují méně fragmentových iontů, avšak nevýhodami jsou kratší životnost vzorku a větší finanční náročnost instrumentace [47].

Nejčastějšími matricemi pro UV lasery jsou aromatické karboxylové kyseliny, přičemž kyselina 2,5 – dihydroxybenzoová (DHB) je považována za „univerzální“ matrici. Jinak pro *peptidy* je vhodná kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová, pro *proteiny* kyselina 3,5-dimetoxy-4-hydroxyskořicová a DHB, pro *oligonukleotidy* kyselina 3-hydroxypikolinová, pro *syntetické polymery* dithranol a pro *polysacharidy* DBH [47]. Jako matrice pro IČ lasery může být použita jakákoli látka, která absorbuje IČ záření.

Pro zvýšení rozlišení u MALDI se často používá tzv. **zpožděná extrakce**, kdy jsou ionty extrahovány opožděně - až cca za 10 – 100 ns po aplikaci laserového pulsu, což vede k částečnému vyrovnání jejich kinetických energií. Další možností pro zlepšení rozlišení je použití **reflektronu (iontové zrcadlo)** v TOF analyzátoru. V něm dochází k fokusaci kinetických energií jednotlivých iontů, a tím ke zvýšení rozlišení [41].

V současné době se začínají jako alternativa k MALDI využívat nové ionizační metody které neobsahují matrici - **LDI – laser desorption ionization**. Jako matrice je zde použit přímo analyt, který intenzivně absorbuje záření při vlnové délce laseru (např. polyaromatické sloučeniny). Další možností je použití povrchů, které imitují matrici (např. porézní křemík, silikon, sol-gel, mikrostruktury na bázi uhlíku). Hlavní výhodou těchto metod je eliminace interferencí matrice v oblasti nižších  $m/z$ , což umožňuje dobře hodnotit i látky s nízkou molekulovou hmotností. [41, 56]. Takovou metodou je **DIOS – Desorption/Ionization on Porous Silicon**, u které je instrumentace stejná jako u MALDI, k desorpci však dochází z porézního křemíku. Ten imituje funkci MALDI matrice - absorbuje záření laseru a vibračním (tepelným) přenosem ji předá molekule analytu. Používané lasery i vlnové délky jsou shodné s MALDI. Při použití DIOS nedochází k žádné nebo jen minimální fragmentaci. Co se týká citlivosti, je DIOS srovnatelná s MALDI, nicméně hlavními výhodami DIOS jsou absence matrice, a tím malé pozadí v oblasti nízkých  $m/z$ , rovnoměrné nanášení vodných vzorků a zjednodušené zacházení se vzorkem. Použití DIOS je tedy výhodné především u vzorků s nízkou molekulovou hmotností, lze však použít i pro biomolekuly [47, 56].

### **IONIZACE TERMOSPŘEJEM (TSI)**

Ionizaci termosprejem popsali v roce 1983 C. R. Blakney a M. L. Vestal jako první sprejovou ionizační techniku vyvinutou speciálně pro spojení HPLC s MS [57]. Jedná se o šetrnou ionizační techniku, při které vznikají převážně ionty se sudým počtem elektronů. V dnešní době se TSI používá výjimečně, protože ji plně nahradily techniky využívající ionizaci za atmosféckého tlaku - API (především ESI, která z TSI vychází). Termosprej je považován za první ionizační techniku, která umožnila bez vážnějších

komplikací, a za běžných HPLC podmínek, rutinní spojení HPLC/MS. V systémech s obrácenými fázemi umožňuje použití běžných rozpouštědel i průtoků mobilní fáze do 1 ml/min. Jediným omezením je nezbytný přídavek elektrolytu (nejčastěji 10 – 100 mM octan amonný) a minimálně 10% vody v mobilní fázi pro podpoření a řádný průběh ionizace [40, 41].

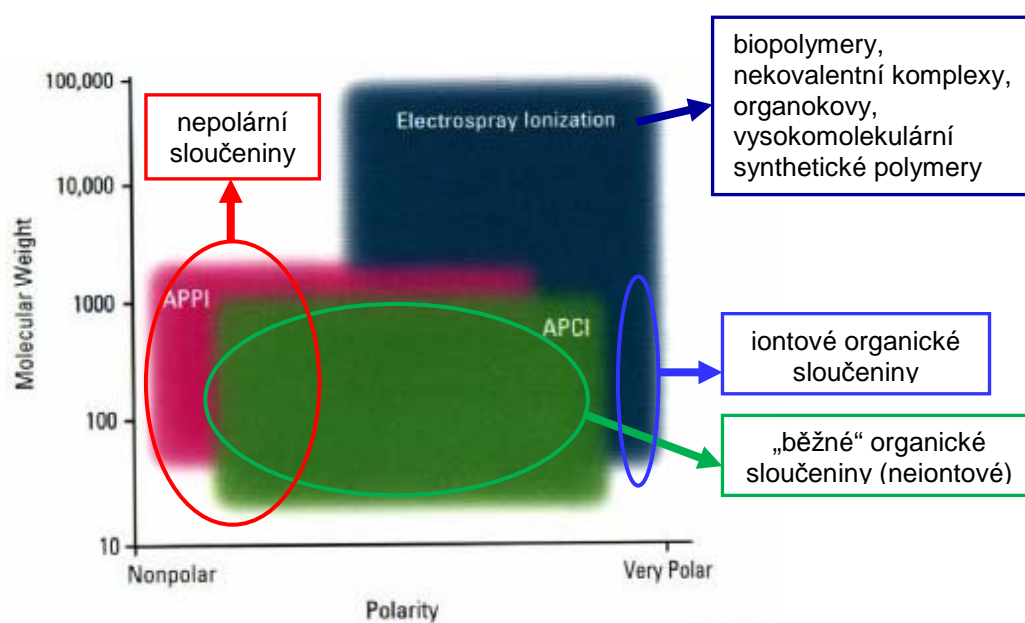
Kapalný vzorek je přiváděn do iontového zdroje kovovou kapilárou, která je na konci v termostatovaném, měděném bloku vyhřívána na teplotu 150 – 300 °C. Tím dochází k částečnému odpaření rozpouštědla již v kapiláře a vzniku nadzvukového proudu par částečně odpařeného rozpouštědla a zbylých malých kapiček obsahujících analyzovanou látku. Takto vzniklé kapičky nesou na svém povrchu náboj, který se zvyšuje úměrně se zmenšující se velikostí i povrchem kapičky – dochází k tzv. „vypařování iontů“. Povrchová hustota náboje tak neustále stoupá a při překročení určité kritické hodnoty dojde k tzv. Coulombické explozi, kdy dojde k rozpadu na menší kapičky. Tento proces odpařování a explozí z povrchu kapiček se opakuje do doby, kdy kapička dosáhne tak malé velikosti, že může dojít k uvolnění protonované či deprotonované molekuly z jejího povrchu. Probíhající ionizační proces lze podpořit použitím přídavné ionizace s urychlenými elektrony nebo elektrickým výbojem, což zvýší ionizační účinnost a umožní použití bezvodých mobilních fází. Vzhledem k tomu, že TSI patří mezi šetrné ionizační techniky, dochází jen výjimečně k fragmentacím. Stupeň fragmentace lze ovlivnit vložením různého napětí na vypuzovací elektrodu. Zvýšením napětí se podpoří fragmentace molekulárních aduktů kolizemi s přítomnými neutrálními molekulami ve zdroji. Jedná se o tzv. kolizně indukovanou disociaci ve zdroji neboli „in-source CID“ [41, 57].

Tlak v iontovém zdroji TSI je vyšší než u EI, nicméně stále není atmosferický jako u technik API, které jsou uvedeny níže.



## IONIZACE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU (API)

Nezbytnou podmínkou umožňující ionizaci u všech výše popsaných ionizačních technik bylo prostředí vakua. Tento požadavek však přinášel jisté limity především při snaze o spojení s HPLC. Zavedením ionizačních technik, které mohou pracovat za atmosférického tlaku, tak nastal průlom v řešení problematiky tohoto spojení. **Mezi API techniky se řadí ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).** Nejširšího uplatnění dosáhly techniky ESI a APCI, které jsou v současnosti také standardně dodávány ke komerčním HPLC/MS systémům. ESI umožňuje analýzu látek středně polární až iontové povahy s molekulovou hmotností od stovek do několika set tisíc Da. APCI se využívá pro látky méně polární až polární, ne však iontové povahy, s molekulovou hmotností nejčastěji do 1500 Da. APPI, jako nejnovější API technika, také našla své uplatnění a je vhodná především pro látky zcela nepolární i látky labilní, viz obr. 6. U všech tří ionizačních technik vznikají téměř výhradně ionty se sudým počtem elektronů s vysokou relativní intenzitou molekulárních aduktů. Někdy mohou vznikat také adukty s mobilní fází nebo molekulární adukty typu  $[2M+H]^+$ ,  $[3M+H]^+$  [41].



Obr. 6 Možnosti využití jednotlivých API technik v závislosti na molekulové hmotnosti a polaritě látky, převzato z ref. 41.

I když k ionizaci vzorku u API technik dochází za atmosférického tlaku, analyzátor musí stále pracovat v prostředí vysokého vakua. Dochází tak ke spojení dvou částí s výrazně rozdílnými tlaky. Pro udržení dostatečného vakua v analyzátoru se nejčastěji využívá dvou přechodných úseků, které jsou velmi malé, a tak umožňují pomocí vícestupňového čerpání vysokokapacitními pumpami dostatečné odčerpání vzduchu. Jednotlivé úseky jsou navzájem spojeny malými vstupními otvory (skimmery) a iontovou optikou. Tyto vstupní otvory pak musí být dostatečně široké, aby umožnily záchyt všech vzniklých iontů, a na druhou stranu musí být co nejužší, aby nedocházelo ke zbytečným ztrátám tlaku v analyzátoru.

V současnosti se staly API techniky prakticky univerzálním rozhraním pro spojení HPLC/MS i dalších separačních technik v kapalně fázi. Jedná se o velmi citlivé techniky, jejichž aplikace pokrývají prakticky celý rozsah organických, bioorganických a organokovových sloučenin [40, 47].

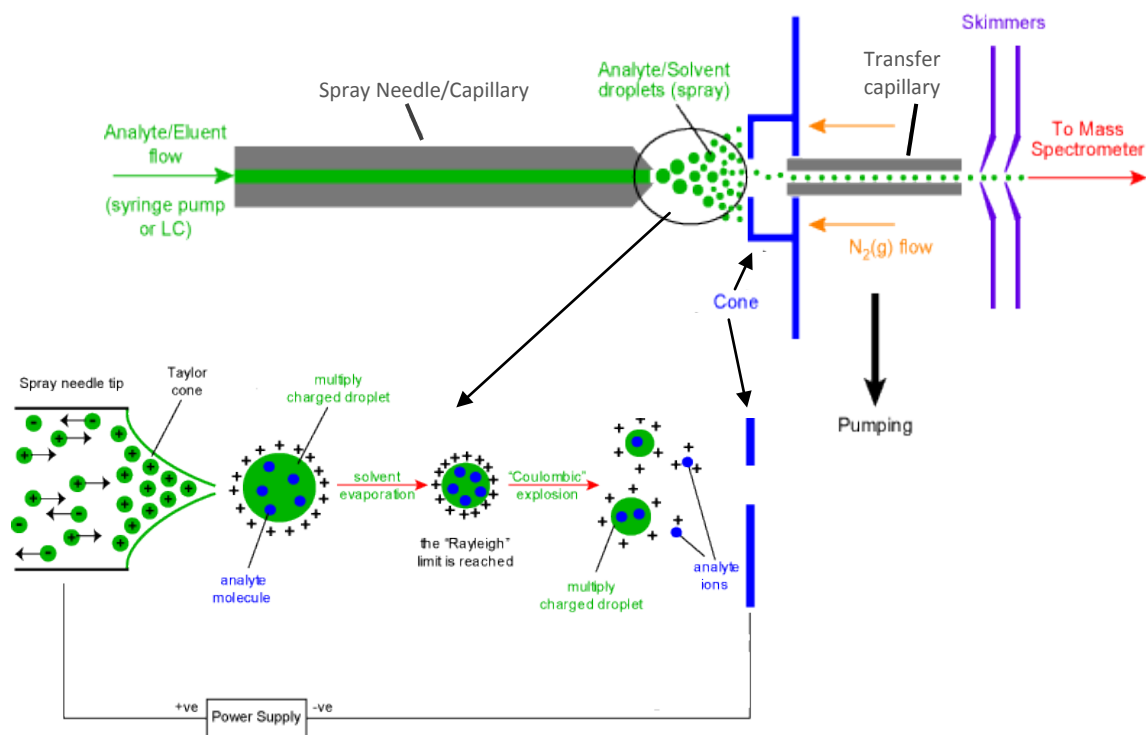
### ***IONIZACE ELEKTROSPREJEM (ESI)***

Poprvé představil ionizaci elektrosprejem v roce 1984 J. Fenn a v následujícím roce popsal použití ESI jako vhodného rozhraní pro HPLC/MS. Hned na počátku 90. let se díky objevení ESI výrazně rozšířily bioanalytické aplikace MS. Jeho hlavní přednost spočívá v možnosti mnohonásobného nabití iontů, což umožňuje hodnotit látky o vysoké molekulové hmotnosti. Stejně jako v případě MALDI i zavedení ESI znamenalo průlom především pro oblast biochemie. Na počátku byly aplikace ESI cíleny pouze na proteiny, později však bylo použití rozšířeno na další polymery, biopolymery, ale také na malé polární molekuly. ESI je považována za nejšetrnější ionizační techniku vůbec a v současné době je společně s APCI nejrozšířenějším iontovým zdrojem pro HPLC/MS. Používá se však i pro přímé zavádění kapalných vzorků do MS [43, 47, 58].

**Mechanismus ionizace ESI lze v podstatě shrnout do třech základních kroků: 1) zmlžení vzorku na malé, elektricky nabitě, kapičky, 2) uvolnění iontů z kapiček a 3) transport iontů z atmosférické oblasti zdroje do vakua a hmotnostního analyzátoru [47].**

Analyt tedy musí být nejprve rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle a pomocí kovové kapiláry následně přiveden do iontového zdroje. Na koncovou část této kapiláry je vloženo vysoké napětí (3 - 5 kV) a koaxiálně je přiváděn zmlžující plyn ( $N_2$ ). Právě v tomto místě tedy dochází ke zmlžení vzorku a vzniku kapiček, které nesou na svém povrchu velké množství nábojů. Zatímco jsou takto vzniklé kapičky vypuzeny z kapiláry a unášeny

směrem ke vstupu do analyzátoru, dochází k odpařování rozpouštědla z jejich povrchu, a tím ke zvyšování hustoty povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty (Rayleighův limit) dojde k tzv. Coulombické explozi, tedy rozpadu původní kapky na menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Tento proces se opakuje až do chvíle, kdy dojde k uvolnění kvazimolekulárních iontů, které následně postupují do analyzátoru, viz obr. [40, 41, 44].



Obr. 7 Schéma ESI a mechanismus vzniku iontů, převzato z ref. 59

Vzhledem k tomu, že ionizace elektrosprejem v podstatě vychází z ionizace termosprejem, je princip ESI v mnoha bodech analogický. Hlavní rozdíl je však v kovové kapiláře, která je v případě TSI vyhřívána na teplotu 150 – 300 °C, zatímco u ESI je na ni vkládáno vysoké napětí. Základní mechanismus vzniku iontů je v obou případech podobný, jde o tzv. postupné „vypařování iontů“, avšak způsob vzniku primárních nabitých kapiček je rozdílný. V ESI tak nesou kapičky na svém povrchu mnohonásobně více nábojů, a mohou zde proto vznikat mnohonásobně nabité ionty, což u TSI možné není [41].

**Při optimalizaci podmínek ESI má výrazný vliv na výslednou analýzu [43, 44]:**

- složení roztoku vzorku (použitá rozpouštědla, přítomnost aditiv) a jeho průtok
- vlastnosti analytu (koncentrace, struktura, počet protonovatelných míst v molekule)
- napětí vložené na sprejovací kapiláru
- průtok a teplota zmlžujícího plynu
- napětí na vstupu do části přístroje se sníženým tlakem (popř. využití kolizí indukované disociace ve zdroji)
- teplota vstupní kapiláry resp. teplota plynu proudícího proti spreji
- sprejovací režim (nutnost stabilního spreje bez pulzace – kuželová tryska – Taylorův kužel)
- geometrie iontového zdroje (má vliv na intenzitu odezvy)  
- neoptimálnější Z-sprej > ortogonální > lineární
- pH eluentu (přídavek kyselin – nejčastěji HCOOH, CH<sub>3</sub>COOH k podpoření protonace při záznamu kladných iontů, popř. přídavek NH<sub>3</sub> pro podpoření deprotonace při záznamu záporných iontů)

Kvalitu analýzy biologických vzorků pak může výrazně ovlivnit tzv. „*ion-suppression*“. Jedná se o potlačení signálu, které je způsobeno přítomností netěkavých nebo méně těkavých látek, které mění účinnost vzniku kapiček a jejich odpařování, což významně ovlivňuje počet nabitých iontů. Jedná se nejčastěji o vlivy z matrice, jako je přítomnost solí, endogenních látek, ale i léčiv či jejich metabolitů. V takovém případě je nutné zoptimalizovat retenční čas analytu tak, aby byl od efektu matrice separován. Vhodná je také úprava extrakčního postupu. Vzhledem k rozdílnému způsobu ionizace se tedy „*ion suppression*“ projevuje výrazněji u ESI než u APCI [60, 61, 62, 63].

V roce 1994 představili M. Wilm a M. Mann alternativu k elektrospreji – **NANOELEKTROSPREJ**. Hlavní odlišnosti jsou v rozměrech komponent a možných průtocích mobilní fáze. Pro dosažení stabilního spreje musí být použita speciální kovová špička kapiláry, která je vytažena do velmi úzkého konce (průměr cca 1 – 10 μm). Sprejovací napětí se pohybuje mezi 0,5 – 1 kV a průtoky okolo 20 – 50 nl/min (plně

kompatibilní s kapilární HPLC či CZE). Lze použít také uspořádání off-line, kdy dochází k přímému čerpání rozpuštěného vzorku infúzní pumpou. Oproti ESI se zde nepoužívá zmlžující plyn a je nastavena nižší teplota sušícího plynu. Při použití nanoelektrospreje je velmi nízká spotřeba vzorku a vysoká koncentrační citlivost (lze analyzovat attomoly až zeptomoly analytu). Výhodou je také vyšší tolerance vůči obsahu solí v roztoku, což je způsobeno menším průměrem primárně vzniklých nabitých kapiček, ve srovnání s elektrosprejem. Z tohoto důvodu je potřeba menší počet cyklů Coulombických explozí, a proto odpařováním rozpouštědla dojde k menšímu zakoncentrování solí v jednotlivých kapičkách. Tento fakt výrazně snižuje nároky na úpravu vzorků před analýzou. Ve srovnání s konvenčním ESI umožňuje nanoelektrosprej zlepšení desolvatace, ionizace i transferu iontů do vakuového systému. Je však experimentálně náročnější a méně robustní. [40, 44, 64].

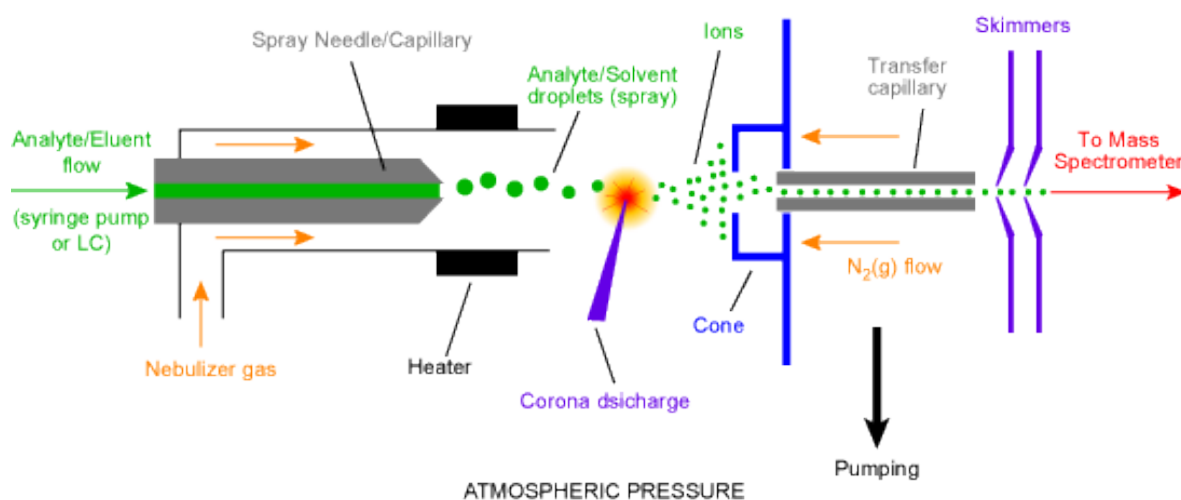
Další alternativou ESI je **Electrosonic Spray Ionization** (ESSI), což je relativně nová, měkká ionizační technika, pracující za atmosférického tlaku. Využívá proudy plynu o rychlosti blízké rychlosti zvuku. Eluent vycházející z kapiláry je tímto plynem koaxiálně nebulizován, čímž dochází k efektivnímu sprejování nabitých kapiček vzorku. Vložením různého elektrostatického potenciálu pak může být docíleno efektivní a jemné ionizace. Tato metoda byla použita u vodných roztoků různých proteinů při neutrálním pH. Výsledky citlivosti byly s nanoelektrosprejem srovnatelné, s ohledem na reprodukovatelnost a robustnost bylo dosaženo u ESSI lepších výsledků [65].

### ***CHEMICKÁ IONIZACE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU (APCI)***

APCI je v podstatě analogií chemické ionizace, která však probíhá za atmosférického tlaku. První informace o principu a aplikacích APCI publikoval již v roce 1974 E. C. Horning a kolektiv, nicméně komerčně dostupná a využívaná začala být až na začátku 90. let 20. století. Tento typ ionizace umožňuje hodnotit méně polární až polární látky s molekulovou hmotností do 1500 Da, není však zcela vhodná pro látky s velmi nízkou těkavostí. Stejně jako ESI, i APCI byla vyvinuta především pro spojení HPLC/MS. Jedná se o poměrně šetrnou ionizační techniku, při které je většinou pozorován intenzivní molekulární ion. Ve srovnání s ESI se při tomto typu ionizace tvoří méně aduktů s ionty alkalických kovů, tedy pro ESI typické  $[M+Na]^+$  či  $[M+K]^+$ , což usnadňuje interpretaci. Naopak častěji se objevují fragmentové ionty, jejichž intenzita silně závisí na typu analyzované látky [41, 43].

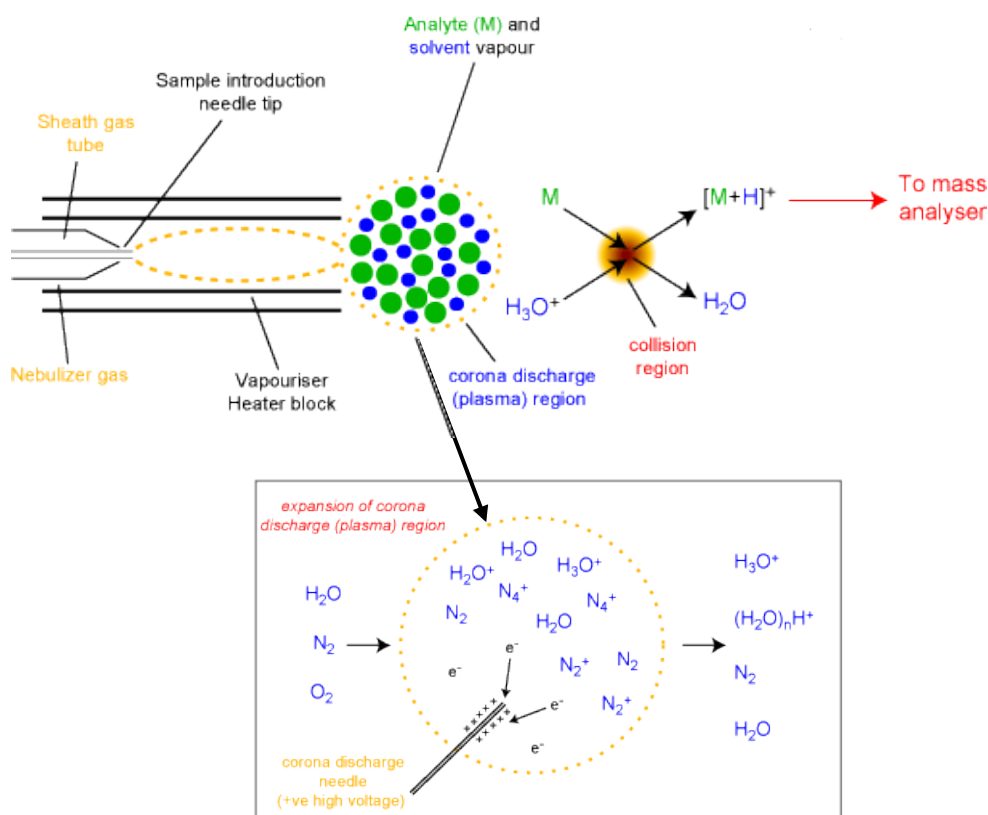
**I u APCI může být mechanismus ionizace shrnut, tentokrát do čtyř bodů: 1) odpaření roztoku, 2) ionizace reakčního plynu, 3) ionizace analytu a 4) transport iontů z atmosferické oblasti zdroje do vakua a hmotnostního analyzátoru.**

Roztok vzorku je buď přímo ze stříkačky nebo společně s mobilní fází z LC přiveden sprejovací kapilárou do rozprašovače, kde dojde pomocí proudu dusíku k jeho zmlžení. Vzniklé kapičky jsou poté unášeny proudem dusíku vyhříváným blokem, kde dochází k částečnému odpařování rozpouštědla, směrem k výbojové (jehlové) elektrodě. Na tuto elektrodu je vloženo vysoké napětí (3 – 4 kV) a vzniká koronový výboj. Vzhledem k tomu, že molekuly mobilní fáze a dusíku jsou v obrovském přebytku vůči analytu, jsou tímto výbojem ionizovány nejdříve tyto molekuly a teprve poté jsou ion-molekulárními reakcemi tohoto reakčního plynu ionizovány molekuly analytu. Takto vzniklé ionty jsou následně elektrodami usměrněny a urychleny do analyzátoru. Kolem vstupní kapiláry do analyzátoru je pak protiproud sušícího plynu (dusíku), který slouží k rozbití případných nekovalentních klastrů (viz obr. 8) [40, 43, 59].



Obr. 8 Schéma APCI, převzato z ref. 59.

Při tvorbě kladných iontů tedy dochází nejdříve ke vzniku *primárních iontů ze zmlžujícího plynu* ( $N_2^+$ ,  $N_4^+$ ), následně vznikají *reakční ionty z mobilní fáze a aditiv* ( $H_2O^+$ ,  $H_3O^+$ ,  $(H_2O)_nH^+$  atd.) a teprve poté probíhají *hlavní mechanismy ionizace analytu* jako je protonace, přenos (výměna) náboje, tvorba aduktů, adice rozpouštědla nebo tvorba polymerních klastrů. Analogicky vznikají ionty záporné, kde však nejčastějšími hlavní mechanismy ionizace analytu je přenos protonu z analytu, záchyt elektronu, výměna (přenos) náboje nebo tvorba duktů [43]. Mechanismus vzniku iontů je uveden na obr. 9.



Obr. 9 Detailní mechanismus ionizace APCI, převzato z ref.59.

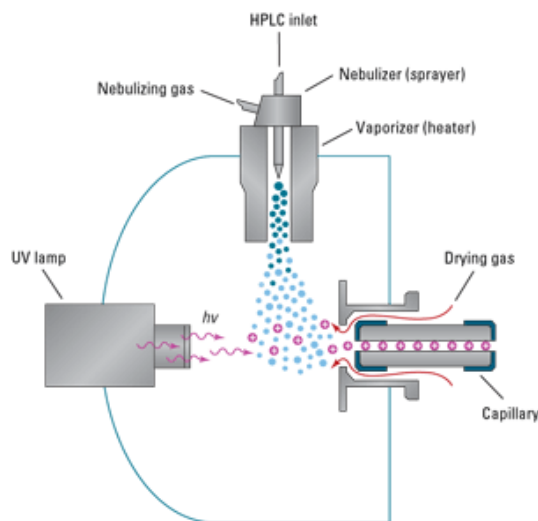
Stejně jako v případě ionizace ESI největší vliv na průběh ionizace mají vlastnosti analyzované látky, složení a vlastnosti roztoku (použitá rozpouštědla, aditiva, atd.), průtok vzorku, napětí na vstupu do části přístroje se sníženým tlakem (popř. využití kolizí indukované disociace ve zdroji), teplota vstupní kapiláry resp. teplota plynu proudícího proti spreji, průtoky pomocných plynů a geometrie iontového zdroje. U APCI navíc hraje významnou roli také napětí vložené na výbojovou elektrodu a teplota výhřevného bloku [43].

### FOTOIONIZACE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU (APPI)

APPI je nejnovější API technikou, kterou publikovali B. Robb, T. R. Covey a A. P. Bruins teprve v roce 2000 [66]. Umožnila vysoce citlivé analýzy širokého spektra látek, především ale látek nepolárních, které jsou pro ESI a APCI problematické. Rozšiřuje tak spektrum molekul, které mohou být hodnoceny pomocí HPLC/MS. Především v negativním módu pak produkuje jen velmi nízký šum pozadí a umožňuje tak ionizovat širší spektrum látek než obě zbývající API techniky v tomto módu [67, 68].

Mechanismus ionizace je velice podobný výše uvedené metodě APCI. Roztok vzorku je společně s mobilní fází přiveden kapilárou do vyhřívaného bloku s rozprašovačem, kde dojde k jeho zmlžení dusíkem. Místo koronárního výboje je však v případě APPI použito UV záření (viz obr. 10). Jeho nejběžnějším zdrojem je kryptonová výbojka, která emituje fotony při 10,0 a 10,6 eV. Tato energie je větší než ionizační energie většiny nepolárních organických molekul, které mívají 7 – 10 eV. Na druhé straně, je menší než ionizační energie běžných složek mobilní fáze (methanol, acetonitril, voda) nebo složek vzduchu (dusík, kyslík). **Jedná se tedy o selektivní ionizaci analytu, nikoli mobilní fáze** [41, 43].

Dochází tak k **přímé ionizaci** analytu, která je však často charakterizována nízkou efektivitou. To může být částečně vysvětleno schopností roztoku absorbovat vzniklé fotony bez ionizace, čímž dojde k redukci počtu fotonů schopných přímé ionizace analytu. Proto se využívá druhé varianty - **ionizace za použití „dopantu“**, tedy přísady vhodné látky, která zprostředkuje ionizaci. Nejběžněji se používá *toluen* a *aceton*, použit ale může být také benzen, anisol nebo tetrahydrofuran. Pro RP-HPLC nepolárních látek se doporučuje methoxybenzen. K ionizaci analytu tedy dochází ion-molekulárními reakcemi s dopantem, nikoliv s mobilní fází, jak se tomu u APCI. Na rozdíl od ESI a APCI mohou při tomto typu ionizace vznikat i ionty s lichým počtem elektronů, které mohou komplikovat interpretaci [41, 43, 67].



Obr. 10 Schéma APPI, převzato z ref. 41.

Základní faktory, které ovlivňují průběh APPI jsou v podstatě velmi podobné jako v případech ESI a APCI, které byly uvedeny výše a liší se pouze v **parametrech charakteristických pro tento typ ionizace, tj, intenzita záření výbojky a volba dopantu a jeho průtok** [43].



### 3.3.2 HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY

Hmotnostní analyzátor je zařízení, které využívá elektromagnetických polí k separaci iontů v plynné fázi podle jejich poměru hmotnost/náboj ( $m/z$ ). Je umístěn mezi iontový zdroj a detektor.

**MS analyzátor lze rozdělit na základě fyzikálních principů:** [40, 41, 43]

- zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém a/nebo elektrickém poli (magnetické analyzátor)
- různá stabilita oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí (Q, QqQ, IT)
- různá doba letu iontů v oblasti bez pole (TOF)
- různé absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (ICR)

Při srovnávání jednotlivých typů analyzátorů se nejčastěji hodnotí parametry: hmotnostní limit, rozlišení, přesnost a možnost tandemové analýzy (viz tab 2). Tyto parametry pak určují jak kvalitu získaných hmotnostních spekter, tak cenu daného analyzátoru.

**Rozlišovací schopnost (RP):** je to schopnost přístroje poskytnout zřetelné signály dvou iontů s malými rozdíly v  $m/z$ . Jedná se o číselnou hodnotu, jejíž převrácená hodnota se označuje jako rozlišení. Existují dva typy definice RP [40, 41]:

- *První definice je založená na šířce jednoho píku*

Jedná se poměr hmotnosti iontu ( $m$ ) a šířky jeho píku v polovině výšky ( $\Delta m$ ) - FWHM. Používá se pro kvadrupóly, iontové pasti nebo průletové analyzátor. **RP =  $m / \Delta m$ .**

- *Druhá definice je založena na překryvu dvou píků*

Jedná se o poměr hmotnosti iontu  $m_1$  a rozdílu hmotností iontů  $m_1$  a  $m_2$  s jednotkovým nábojem. Zároveň platí, že píky obou iontů jsou stejně vysoké a údolí mezi píky je 10%, tj. překrývají se z 10 %. Používají se pouze u magnetických analyzátorů, jinak ne příliš často. **RP =  $m_1 / (m_2 - m_1)$ .**

Důležitým parametrem je také **přesnost určení hodnoty  $m/z$** : jedná se o relativní rozdíl mezi experimentálně získanou hodnotou a teoreticky vypočtenou hmotností iontu vztáženou k teoretické hodnotě. Vyjadřuje se v ppm (parts per million).

Díky kombinaci vysokého rozlišení a přesného určení hmotnosti, je možné určit elementární složení iontu. Minimem, pro možnost určení elementárního složení, se uvádí přesnost 5 ppm s externí kalibrací hmotnostní stupnice. U spekter s vysokým RP (desítky až stovky tisíc) je možné určit elementární složení iontu nebo alespoň výběr nejpravděpodobnějších možností. Spektra s nízkým rozlišením (1 - 5000) pak umožňují rozlišit ionty lišící se pouze o jednotku  $m/z$  v hmotnostním rozsahu analyzátoru.

Dalším důležitým parametrem analyzátorů je také možnost provedení – **tandemové hmotnostní analýzy** -  $MS/MS = MS^2$  nebo  $MS^n = MS^3, MS^4$  atd. Do analyzátoru jsou přiváděny prekurzorové ionty, ze kterých kolizní reakcí vznikají ionty produktové. Může probíhat buď **v prostoru: analyzátor → kolizní cela → analyzátor** (jedná se o sériovou kombinaci stejných nebo různých hmotnostních analyzátorů, př. QqQ) nebo **v čase: primární analýza → kolize → sekundární analýza** (probíhá ve stejném prostoru za postupných změn parametrů, př. IT) [69].

	<i>HMOTNOST. LIMIT</i>	<i>ROZLIŠENÍ FWHM (<math>m/z</math> 1000)</i>	<i>PŘESNOST (ppm)</i>	<i>TLAK (Torr)</i>	<i>TANDEM MS</i>
<i>Q</i>	4 000	2 000	100	$10^{-5}$	pouze u QqQ MS/MS
<i>IT</i>	6 000	4 000	100	$10^{-3}$	$MS^n$
<i>TOF</i>	> 1 000 000	5 000	200	$10^{-6}$	-
<i>TOF + REFLEKTRON</i>	10 000	20 000	10	$10^{-6}$	TOF/TOF MS/MS
<i>MAGNET SEKTOR</i>	20 000	100 000	< 10	$10^{-6}$	sektor/sektor MS/MS
<i>FT-ICR</i>	30 000	500 000	< 2	$10^{-10}$	$MS^n$
<i>ORBITRAP</i>	50 000	100 000	< 2	$10^{-10}$	$MS^n$

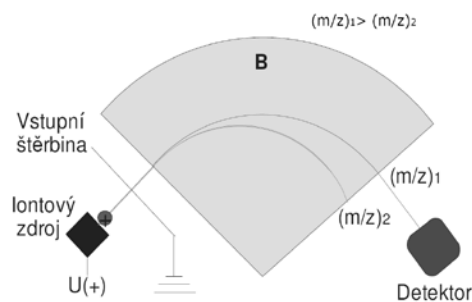
Tab. 2 Přehled základních parametrů jednotlivých analyzátorů, převzato z ref. 40

## MAGNETICKÝ ANALYZÁTOR S JEDNODUCHOU FOKUSACÍ IONTŮ

Při použití magnetického analyzátoru prochází ionty magnetickým polem, kde dojde k zakřivení jejich dráhy letu (viz obr. 11) Kladné ionty 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 ( $r$ ). Těžší ionty, na základě své větší odstředivé síly, dráhu letu tolik nezakříví, naopak u iontů s nižší  $m/z$  dochází k zakřivení výraznějším.

**Poloměr dráhy iontů**

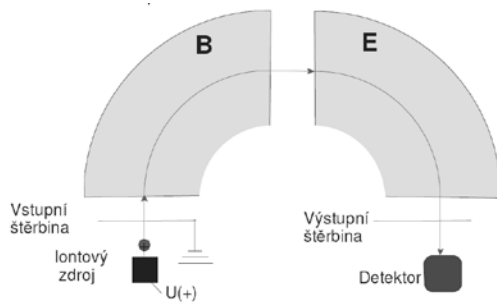
závisí na  $m/z$ ,  $B$  a  $V$ . Plynulou změnou  $B$  (tzv. magnetické skenování) nebo  $V$  (tzv. potenciálové skenování) při konstantním poloměru daného pro použitý přístroj, projdou postupně všechny ionty výstupní štěrbinou na detektor a zaznamenají se intenzity iontů pro jednotlivé  $m/z$ , čímž získáme hmotnostní spektrum. V tomto případě nelze provést MS/MS analýzu [41, 69].



Obr. 11 Schéma magnetického analyzátoru, převzato z ref. 69.

## SEKTOROVÝ ANALYZÁTOR S DVOJÍ FOKUSACÍ

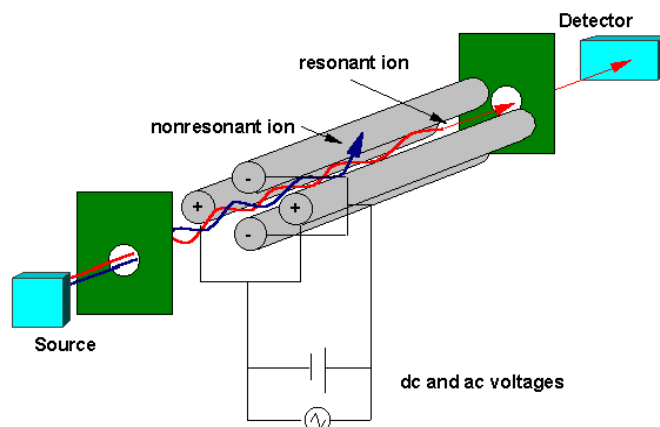
U tohoto typu analyzátoru je kromě magnetické fokusace iontů použita také elektrostatická fokusace, neboli zaostření iontů (viz obr. 12). Tím se docílí výrazného zvýšení RP z jednotek až na 30 000 - 100 000. Jestliže do elektrického pole vstoupí ionty s různou kinetickou energií ( $E_k$ ) a  $m/z$ , dojde k zakřivení jejich dráhy pouze v závislosti na jejich  $E_k$ , hodnota  $m/z$  vliv nemá. Ionty vznikající v iontovém zdroji mají určitou distribuci energií, což ovlivňuje šířku píků při detekci. Pro dosažení vyššího rozlišení je proto nutné ionty energeticky sjednotit do monoenergetického svazku iontů, k čemuž slouží elektrický analyzátor, kde dojde k fokusaci iontů. Tyto přístroje umožňují MS/MS analýzu. Při zapojení více než dvou sektorů je pak možné docílit i  $MS^n$ . Výhodou sektorových analyzátorů je možnost vysokoenergetické aktivace a především možnost měření i tzv. metastabilních iontů, což jsou ionty, jejichž doba života je asi  $10^{-4} - 10^{-6}$  s a rozpadají se tak na cestě mezi iontovým zdrojem a detektorem. Jejich detekce je důležitá především z hlediska možnosti studia fragmentačních cest [40, 41, 69].



Obr. 12 Schéma sektorového analyzátoru, převzato z ref. 69.

## KVADRPÓL ( $Q$ )

Princip kvadrupólu popsali jako první W. Paul a H. S. Steinweger v roce 1953. První komerčně dostupný kvadrupólový analyzátor pak v roce 1968 představila firma Finnigan. Jednalo se o velmi jednoduchý a relativně levný analyzátor, který se rozšířil především ve spojení MS a GC [40].



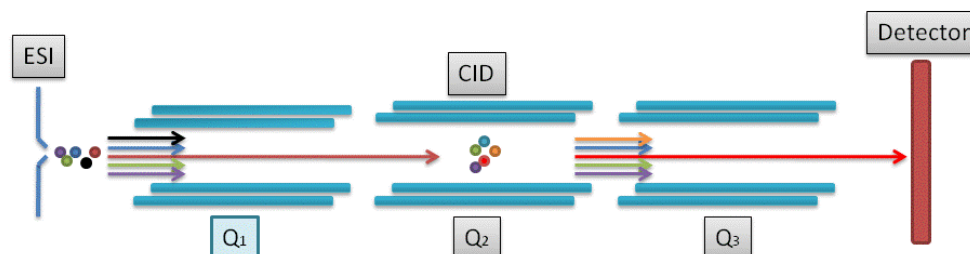
Obr. 13 Schéma kvadrupólu, převzato z ref. 70.

Konstrukčně se jedná o čtyři stejné kovové tyče kruhového průřezu o délce 20 - 30 cm, které jsou umístěny dokonale rovnoběžně. V ideálním případě, pro získání vyššího rozlišení, by měly mít průřez hyperbolický. Na dvě protilehlé je vždy vloženo kladné stejnosměrné napětí ( $U$ ), na zbývající dvě pak záporné stejnosměrné napětí ( $U$ ). Zároveň s tím, je na všechny čtyři superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí ( $V$ ).

Po ionizaci ve zdroji je ion přiveden do středu osy kvadrupólu, kde začne oscilovat. V daný časový okamžik, při určitém poměru  $U/V$ , jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou  $m/z$ , který projde kvadrupólem a dostane se až na detektor (viz obr. 13). Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou neboli skenováním hodnot stejnosměrného napětí  $U$  a amplitudy  $V$ , při zachování jejich poměru, jsou postupně propuštěny na detektor všechny ionty. Jedná se tak v podstatě o hmotnostní filtr, který je závislý pouze na  $m/z$  iontů, kinetická energie iontů při vstupu do analyzátoru nehraje roli. V současné době představuje kvadrupól nejlevnější verzi MS, která umožňuje citlivou detekce v relativně širokém rozsahu  $m/z$ . Hlavní nevýhodou je však absence možnosti MS/MS analýzy [40, 41, 71].

### TROJITÝ KVADRUPÓL (QqQ)

Alternativou Q, který řeší problém MS/MS analýzy, je trojitý kvadrupól, který sestavili R. A. Yost a C. G. Enke v roce 1978. Jedná se o hybridní analyzátor, který je v dnešní době jedním z nejčastěji používaných, především při kvantitativní analýze [40, 72, 73].



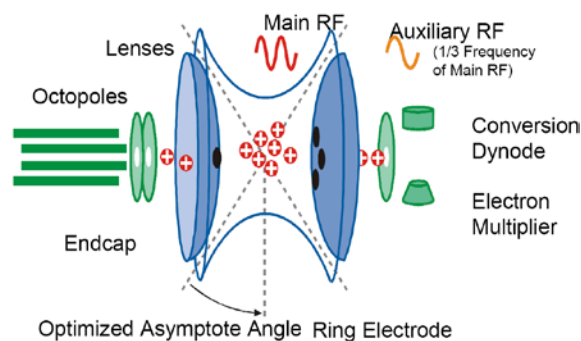
Obr. 14 Schéma trojitého kvadrupólu, převzato z ref. 74.

**V podstatě se jedná o tři kvadrupóly řazené za sebou,** které se označují QqQ. Velké Q znamená kvadrupólový analyzátor a malé q představuje kolizní celu, tedy kvadrupól, na který je vloženo pouze střídavé napětí a do něj zaveden kolizní plyn kvůli srážkám s přiváděnými ionty. **V prvním kvadrupólu dochází k izolaci iontů, ve druhém k jejich disociaci a třetí slouží k analýze vzniklých fragmentů** (viz obr. 14). Zavedením kolizního plynu do druhého kvadrupólu způsobíme kolizní aktivaci iontů vybraných prvním kvadrupólem a jejich následnou fragmentaci. Na rozdíl od iontové pasti může docházet k opakovaným kolizním aktivacím, což znamená, že pozorujeme více fragmentovaných iontů než u MS/MS měření prováděných iontovou pastí. Trojitý kvadrupól také umožňuje měření skenu prekursoru a skenu neutrálních ztrát. Pro měření  $MS^3$  by bylo nutné zapojit za sebe 5 kvadrupólů (QqQqQ), čehož se využívá spíše výjimečně. Pro MS měření do vyššího stupně je vhodnější zapojit iontovou past nebo iontovou cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací [40, 41].

### IONTOVÁ PAST – SFÉRICKÁ (IT)

Sférická neboli 3D iontová past představuje v podstatě trojrozměrný kvadrupól. V roce 1960 ji představili, stejně jako kvadrupól, W. Paul a H. S. Steinweger. Hlavní výhodou IT je možnost  $MS^n$  analýzy. Teoreticky lze provést až  $MS^{10}$ , ale prakticky, vzhledem k životnosti iontů a omezené citlivosti detekce, se běžně používá  $MS^3$  -  $MS^5$ . Oproti QqQ obsahuje MS/MS spektrum méně fragmentových iontů, čímž je jednodušší na interpretaci, zároveň je ale méně informativní, z čehož plyne častější potřeba  $MS^n$ .

Určitou nevýhodou může být absence fragmentových iontů v nízkomolekulární oblasti, tzv. „cut-off“ v  $1/3 m/z$  iontu prekursoru, a také paměťové efekty pasti [40].



Obr. 15 Schéma iontové pasti, převzato z ref. 75.

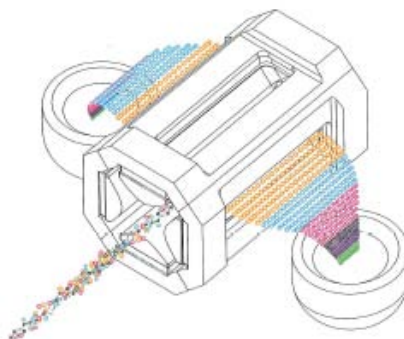
IT se skládá z jedné středové prstencové elektrody a dvou koncových kuželovitých elektrod. **Ionty jsou pulzně přivedeny do pasti, kde jsou vhodnými poměry stejnosměrného a střídavého napětí vložených na elektrody zadrženy a postupnou změnou těchto napětí jsou podle jejich  $m/z$  vypuzovány na detektor výstupním otvorem koncové elektrody** (viz obr. 15). Při MS/MS analýze jsou ionty nejdříve v pasti zachyceny, ale následně všechny ionty, krom iontů s požadovaným  $m/z$ , vypuzeny. Vybrané ionty jsou podrobeny excitaci a fragmentaci a následně detekovány fragmenty - produktové ionty. Pro výrazné zvýšení RP a zlepšení záchytu iontů se do pasti zavádí He jako tzv. tlumící plyn o tlaku asi  $5 \cdot 10^{-3}$  Pa, který tlumí oscilace v ose z. Akumulační časy pro záchyt iontů se pohybují v závislosti na množství přiváděných iontů mezi 0,01 - 200 ms a doba excitace a kolize v pasti je cca 20 – 60 ms. Efektivita záchytu iontů je do 5 % a efektivita detekce iontů cca 50 % [40, 41, 43].

Množství iontů přiváděných do pasti musí být regulováno, protože v případě přeplnění pasti může dojít ke **vzniku prostorového náboje**. To se projeví horším rozlišením a citlivostí, rozdílem mezi izotopickými píky mírně nižším než 1 (v krajním případě posun  $m/z$  k vyšším hodnotám) a dochází také k rozšíření píku (rezonance iontů každé hodnoty  $m/z$  přes širší rozsah frekvencí). Řešením tohoto problému je řízení intervalu napouštění iontů. Jedná se buď o velmi krátký předskan - podle množství nábojů v tomto předskenu se následně automaticky určí doba nadávkování iontů v hlavním skenu tak, aby nedošlo k jejímu přeplnění (řešení firmy Finnigan) nebo se doba dávkování do pasti automaticky upraví podle množství nábojů v předchozím skenu (řešení firmy Bruker) [41,40].

**K ionizaci hodnocených látek** může docházet za použití externí ionizace, kdy dojde k ionizaci mimo iontovou past a ionty jsou krátkým napěťovým pulzem přivedeny do pasti vstupním otvorem koncové elektrody. Tento způsob je obvyklý zejména při spojení HPLC/MS (ESI, APCI). Druhým způsobem je interní ionizace přímo v iontové pasti, což je běžné u GC/MS s EI, kdy dochází ke kolizní aktivaci srážkami s inertním plynem [43].

### ***LINEÁRNÍ IONTOVÁ PAST (LIT)***

Lineární neboli 2D iontová past v sobě spojuje výhody iontové pasti a kvadrupólu. V roce 2002 ji představili J. C. Schwartz, M. W. Senko a J. E. P. Syka [76]. Vzhledem k vysoké kapacitě pasti dochází k výraznému snížení problémů s prostorovým nábojem. LIT poskytuje širší lineární dynamický rozsah a vyšší reprodukovatelnost oproti IT i Q a umožňuje  $MS^n$  analýzu [40].



*Obr. 16 Schéma lineární iontové pasti, převzato z ref. 77.*

**Stejně jako v případě sférické iontové pasti i LIT tvoří dvě koncové kuželovité elektrody a středová elektroda, kterou však v tomto případě tvoří hyperbolické tyče kvadrupólu.** Ionty tak jsou uvnitř pasti udržovány v radiálním rozměru na základě kvadrupólového pole a podélně pomocí elektrického pole koncových elektrod iontové pasti. I zde dochází k pulznímu přivedení iontů do pasti vstupní kuželovitou elektrodou a následnému udržování v pasti na základě různých kombinací střídavých a stejnosměrných složek napětí na elektrodách. Nachází se ve stabilním stavu a kmitají po daných trajektoriích. Pokud se však začne jeden nebo více parametrů vkládaného napětí měnit, stabilní oblast iontů se posune a ty, které byly "na pomezí", ztrácí stabilitu a vylétávají ven z pasti. Existují dva způsoby detekce iontů - buď podélné vypuzení iontů z pasti, kdy ionty pokračují v dráze letu nebo druhým způsobem, radiálním vypuzením iontů z pasti. Druhý způsob byl zaveden v roce 2002 firmou Finnigan (viz obr. 16). Jedná se o dva detektory, které jsou umístěny po stranách středové elektrody a ionty tak vylétávají z pasti štěrbinami ve dvou kvadrupólech. Toto uspořádání vede k výraznému zvýšení citlivosti. Oproti 3D

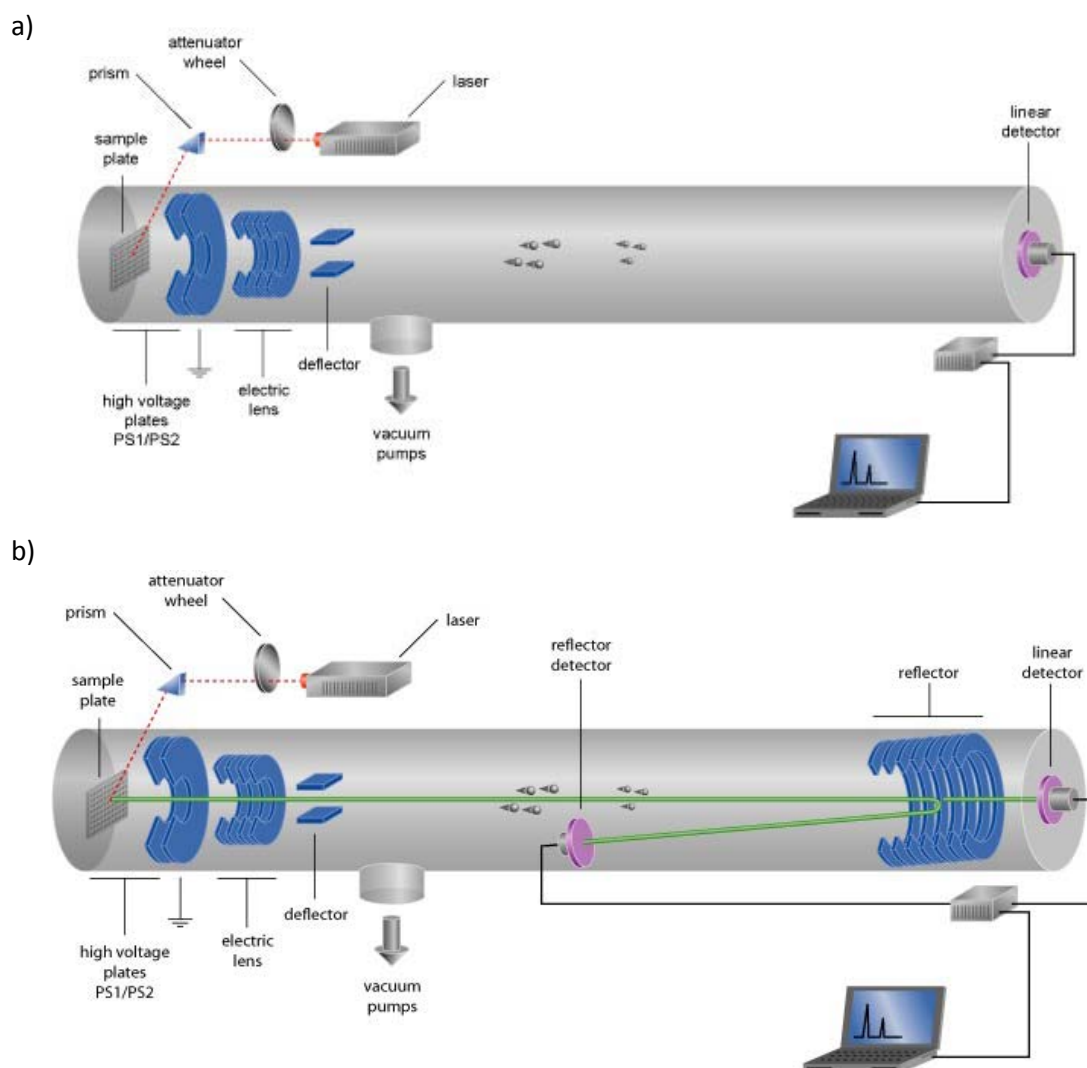
pasti se vyznačuje lepší efektivitou dávkování a záchytem iontů (30 - 90 %), naopak nižší efektivitou extrakce iontů (15 - 20 %). Právě vysoká účinnost záchytu, stabilizace a detekce iontů vede k vysoké citlivosti a možnosti naměřit kvalitní prekurzorová spektra i u málo intenzivních prekurzorů. Umožňuje také dostatečné rozlišení při vysoké rychlosti skenování [40, 41, 43].

**Alternativou LIT je její spojení s trojitým kvadrupólem – QTRAP**, kdy místo třetího kvadrupólu je zařazena LIT. Navíc je zaveden  $Q_0$ , který slouží k akumulaci iontů, následuje  $Q_1$ , kde dochází k výběru prekurzoru,  $Q_2$  (q) - kolizní cela, kde dochází k fragmentaci a poslední částí je  $Q_3$  - tomto případě tedy LIT, dochází k zachycení a skenování produktů fragmentace. Tato kombinace umožňuje v  $Q_2$  provést MS/MS analýzu a v LIT poté  $MS^3$ . Spojuje v sobě výhody QqQ a LIT, kterými jsou především vysoká citlivost, možnost tandemové analýzy, vysoké rozlišení a přesné určení hmot. Je tak účinným nástrojem pro výzkum a vývoj nových léčiv. Velmi často se používá pro analýzu a identifikaci metabolitů léčiv a v oblasti proteomiky [78, 79, 80].

### ***ANALYZÁTOR DOBY LETU (TOF)***

První koncept analyzátoru doby letu popsal již v roce 1946 W. Stephansen. V roce 1955 představili W. L. Wiley a I. H. McLaren lineární TOF analyzátor, který se i tři roky později stal prvním komerčně dostupným od firmy Bendix. TOF analyzátor s reflektorem pak představil v roce 1972 V. I. Karatev, B. A. Mamyrin a D. V. Smikk. Tento typ analyzátoru se výrazně rozšířil po zavedení ionizace MALDI, především díky, v podstatě neomezenému, hmotnostnímu rozsahu. Záleží pouze na době, po kterou se bude čekat (lze hodnotit i  $m/z$   $10^6$ ). Je proto vhodný právě pro hodnocení biomolekul nebo syntetických polymerů velkých molekulových hmotností ionizovaných často pomocí MALDI. Díky jeho vysoké citlivosti a přesnosti [40, 43, 81].





Obr. 17 Schéma analyzátoru doby letu – a) lineární, b) s reflektorem, převzato z ref. 82.

Princip TOF je založen na skutečnosti, že ionty s menší hodnotou  $m/z$  o stejné kinetické energii se pohybují rychleji v oblasti bez pole než ionty s vyšší  $m/z$  a rychleji se tak dostanou na detektor. Jedná se o typický pulzní hmotnostní analyzátor, protože nejdříve jsou velmi krátkým pulzem ionty urychleny ke vstupu do analyzátorové trubice, a potom se přesně měří čas (řádově ns – ms), za který ionty “doltnou” k detektoru, podle toho se stanoví jejich  $m/z$ . První TOF analyzátor byl konstruován **lineárně** - ionty prochází letovou trubicí, na jejímž konci je možné zaostřit ionty na detektor. Má vysokou citlivost a umožňuje hodnotit ionty s vysokou  $M_r$ , ale nízké rozlišení. Během ionizace totiž ionty získají kinetickou energii s určitou distribucí, což vede k rozšíření jejich píků, a tím ke zhoršení rozlišení (viz obr. 17a) [40, 41, 43].

**Problém malého rozlišení u TOF analyzátorů se podařilo překlenout použitím tzv. iontového zrcadla – reflektoru (rTOF).** Jedná se o soustavu kruhových elektrod se stoupajícím napětím, která slouží k vyrovnání různých kinetických energií ( $E_k$ ) u iontů se stejnou hodnotou  $m/z$ . Ionty s větší kinetickou energií proniknou hlouběji do odrazového elektrického pole reflektoru, čímž dojde k jejich opoždění oproti iontům s nižší  $E_k$ , a tím i k vyrovnání celkových drah iontů s různou  $E_k$  po odrazu. Hloubka průniku iontů do elektrického pole reflektoru je úměrná jejich  $E_k$  a nezávisí na  $m/z$  (viz obr. 17b). Analyzátor doby letu s reflektorem dosahuje mnohem vyššího rozlišení než lineární, má však nižší rozsah a neumožňuje analyzovat látky s tak vysokou  $M_r$ . Dalším způsobem, jak zvýšit rozlišení u TOF analyzátorů je **pulzní (zpožděná) extrakce iontů** – kdy k extrakci iontů ze zdroje dochází s malým zpožděním. Po laserovém pulsu v čase  $t = 0$  dojde k expanzi iontů při vypnutém extrakčním poli po dobu zpoždění, během kterého dojde díky vzájemným srážkám ke sjednocení jejich kinetických energií. Následně je zapnuto extrakční pole a ionty urychleny do analyzátoru [40, 41, 43, 83].

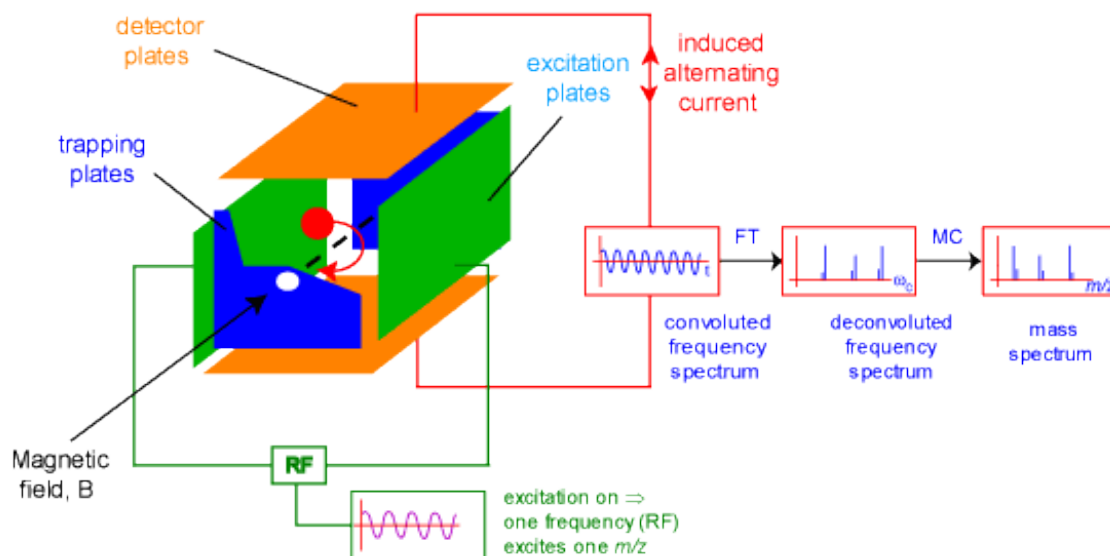
U TOF analyzátoru je možné provést pouze fragmentaci ve zdroji, a proto byly zavedeny nové, **tandemové analyzátoary**. Nejčastěji dochází ke spojení TOF s dalším TOF analyzátoarem nebo QqQ. Jedná se o hybridní analyzátoary, které umožňují MS/MS analýzu. Místa, kde dochází u jednotlivých typů k fragmentaci: 1) **přímo ve zdroji (ISD)** - lineární TOF, 2) **za zdrojem (PSD)** - rTOF nebo 3) **v kolizní komoře (CID)** - tandemový TOF (TOF/TOF), ortogonální TOF (QTOF) [43].

V případě **TOF/TOF** je možné provést díky kolizní cele MS/MS analýzu. Jako první analyzátoar je použit lineární TOF, který je spojen přes vychylovací vstup a kolizní celu s druhým analyzátoarem, kterým je rTOF. V roce 1993 byl zaveden rTOF/rTOF. Nevýhodou je nemožnost detekovat metastabilní fragmenty, které vzniknou v prvním analyzátoaru a zůstanou zachyceny na prvním reflektoru [43].

V případě **QqTOF** dochází ke spojení trojitého kvadrupólu s analyzátoarem doby letu, kde je poslední kvadrupól nahrazen analyzátoarem TOF. Ten je schopen, na rozdíl od ostatních analyzátoarů, které skenují postupně danou  $m/z$  oblast, analyzovat všechny ionty, které do analyzátoaru vstoupily v daný okamžik. Zaznamenává tak kompletní spektrum MS/MS produktů každého iontu, který vystoupil ze zdroje. Jeho kombinace s prvním kvadrupólem umožňuje MS/MS analýzu a druhý kvadrupól q slouží jako kolizní cela. QqTOF poskytuje analýzy s vysokým rozlišením a umožňuje přesné určení hmoty. Určitou nevýhodou je neschopnost poskytovat sken prekurzorů a sken neutrálních ztrát [43, 84].

## ***IONTOVÁ CYKLOTRONOVÁ REZONANCE S FOUIEROVOU TRANSFORMACÍ (FT-ICR)***

FT-ICR představili v roce 1974 M. D. Comisarov a A. G. Marshall [85]. Ve srovnání s ostatními typy analyzátorů vybočují parametry ICR výrazně především v rozlišení, potřebné kvalitě vakua, ale i ceně. FT-ICR představuje jednu z nejcitlivějších metod detekce iontů, která disponuje v podstatě neomezeným rozlišením (lze až  $>10^7$ ) a rozsahem  $10^5$  až  $10^6$  [41, 85].

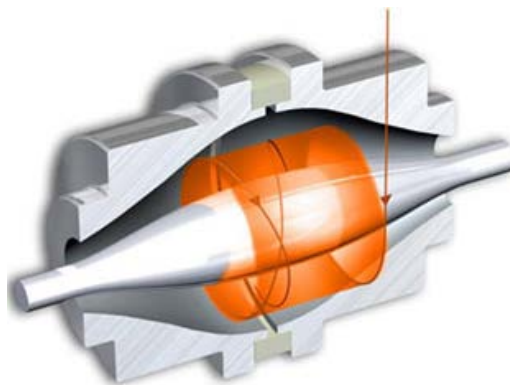


Obr. 18 Schéma iontové cyklotronové rezonance, převzato z ref. 86.

Jedná se o celu s poloměrem 1 - 3 cm, která se nachází v silném magnetickém poli v rozsahu 1-12 Tesla (nejběžněji 7 T). Jestliže se ion dostane do takto silného pole, začne se pohybovat po cykloidální trajektorii s cyklotronovou frekvencí. Následuje rychlý sken, trvající přibližně 1  $\mu$ s, přes velký rozsah frekvencí, kterým dojde k simultánní excitaci všech iontů v cyklotronu vysokofrekvenční energií. Původní poloměr dráhy iontů v cyklotronu je velmi malý (0,01 – 0,1 mm), není fázově koherentní a nebylo by tak použitelné pro měření. Zmíněnou excitací se však poloměr zvýší na cca 1 cm. Každá hodnota  $m/z$  má charakteristickou cyklotronovou frekvenci, která se pomocí Fourierovy transformace přepočte do škály  $m/z$  a získáme tak hmotnostní spektrum. Frekvence, resp. energie, udává hodnotu  $m/z$  a množství absorbované energie udává intenzitu (viz obr. 18). Vznik iontů, jejich MS i  $MS^n$  analýza může probíhat ve stejném místě nebo přivedením z externího zdroje (např. ESI), všechny ionty jsou detegovány zároveň [40, 41, 43].

## **ORBITRAP**

Orbitrap je nejnovějším typem hmotnostního analyzátoru, který popsal ruský fyzik A. A. Makarov v roce 2000, a v roce 2005 byl představen první komerčně vyrobený instrument [87]. Jedná se v podstatě o elektrostatickou past, která k získání hmotnostních spekter využívá Fourierovy transformace.



*Obr. 19 Schéma Orbitrapu, převzato z ref. 77.*

Skládá se ze dvou částí, které tvoří elektrody – vnější, o průměru asi 20 mm, má soudkovitý tvar a její dvě části jsou odděleny štěrbinou; vnitřní, o průměru asi 8 mm má vřetenovitý tvar. Ionty jsou přivedeny do pasti štěrbinou ve vnější elektrodě a jsou zachyceny ve statickém elektrickém poli. Ionty vstupující do Orbitrapu s kinetickou energií několika kiloelektronvoltů začnou obíhat po složitých trajektoriích okolo vnitřní elektrody a oscilují podél ní s frekvencí úměrnou  $(m/z)^{-1/2}$ . Pohyb iontů uvnitř je závislý na  $m/z$  nikoli na vstupní kinetické energii. Během oscilace iontů je indukován proud a pomocí Fourierovy transformace je signál převeden na jednotlivé frekvence a intenzity iontů, resp. hmotnostní spektrum (viz obr. 19). Pro měření je nezbytné velmi vysoké vakuum. Oproti FT-ICR dochází k pomalejšímu poklesu frekvence iontů s rostoucí hmotností, má větší kapacitu pasti a především, nepotřebuje supravodivý magnet [43, 87, 88].

Orbitrap vyniká především vysokou přesností určení hmoty a vysokým rozlišením. K fragmentaci iontů může docházet přímo v Orbitrapu, nicméně je výhodnější, a také rychlejší, provádět fragmentaci v jiném analyzátoru, a Orbitrap použít v podstatě jako detektor. Novinka firmy Thermo Scientific, LTQ Orbitrap, tak využila spojení vysoce citlivé LIT, která umožní MS a MS<sup>n</sup> analýzu, a Orbitrapu, který umožní hodnotit s vysokou přesností a rozlišením [89].

### 3.3.3 DETEKTORY

Po průchodu iontů analyzátozem, umožňuje detektor jejich detekci a následnou transformaci do podoby signálu, který je zaznamenán pomocí softwaru. Dochází k převedení proudu nabitých částic (iontů) na měřitelnou veličinu - elektrický proud. Princip detektoru je vždy založen na náboji, hmotnosti nebo rychlosti iontů. Požadavky jsou velmi podobné jako u běžných detektorů, nicméně MS detektor má určitá specifika [90]. Výběr vhodného typu detektoru pak závisí na designu instrumentu a na analytické aplikaci, která je vyžadována. Pouze přístroje s ICR celou a Orbitrap neobsahují detektor žádný, protože signálem je proud indukovaný na stěnách analyzátozem [40, 90].

Detektory se dají rozdělit na dvě základní skupiny [40, 41, 90]:

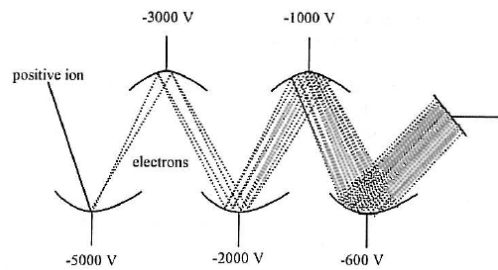
1) *Detektory pro přímá měření* – detekují el. proud vznikající přímým dopadem stanovovaných iontů. Tento typ hraje nezastupitelnou roli při určení přesného izotopového zastoupení prvků.

- **Fotografická deska** – je nejstarším a dnes již obsoletním typem detektoru používaným v MS. Ionty se stejným poměrem  $m/z$  dopadaly na stejné místo desky a podle síly zčernání se dala odhadovat i jejich intenzita.
- **Faradayova klec** – všechny dopadající ionty se vybijí na sběrné elektrodě a toto vybití kondenzátoru je úměrné počtu iontů. Jedná se o jednoduchý a robustní detektor, který umožňuje dosáhnout vysoce stabilního signálu, nicméně jeho nevýhodou je nižší citlivost a nízký čas odezvy. Jeho dnešní využití se proto omezilo na již zmíněná velmi přesná izotopická měření (přesné určení počtu iontů).

2) *Detekce po zesílení signálu - násobičové detektory* - využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů. Vzhledem k tomu, že jsou schopny poskytnout dostatečně měřitelný signál pro jednotlivé ionty, staly se nejčastěji používaným typem detektorů v hmotnostní spektrometrii. Jejich výhodou je také relativně nízký šum a relativně velký dynamický rozsah ( $10^4 - 10^6$ ).

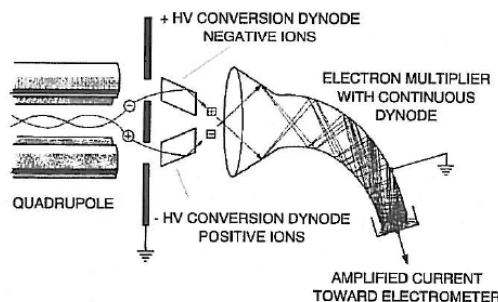
- **Násobič produkující měřitelný proud – elektronásobič** – jedná se o nejběžnější typ detektoru. Ionty dopadající na povrch elektrody z ní vyrazí  $e^-$ , které jsou dále zesíleny systémem dynod až  $10^6$  krát i více.

- *elektronásobiče s diskrétním dynodovým polem* - jde o sérii kovových, elektricky propojených, dynod. Mezi první a poslední dynodu se vkládá napětí. Dopadem iontu na první konverzní dynodu jsou z jejího materiálu vyraženy elektrony, které jsou následně urychlovány k následujícím dynodám, kde se jejich počet násobí, a nakonec jsou zachyceny kolektorem. Stupeň znásobení pak závisí na složení povrchu jednotlivé dynody, na celkovém počtu použitých dynod (6 - 20), akceleraci u jednotlivých částí (vzhledem k napětí) a s ohledem na daný obvod napětí. Umožňují zesílení až  $10^7 - 10^8$ .



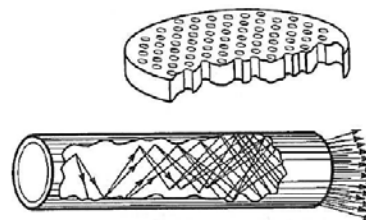
Obr. 20 Elektronásobič s diskrétním dynodovým polem, převzato z ref.40.

- *elektronásobiče s kontinuální dynodou* – tuto dynodu tvoří zakřivená trubice z olovnatého skla, která je na vnitřní straně pokryta filmem s vysokým elektrickým odporem. Tento povrch, většinou specifický pro jednotlivé firmy, má umožnit co nejvyšší sekundární emisi elektronů a zajistit co nejdelší životnost. Začátek i konec trubice je připojeny ke zdroji vysokého napětí a při dopadu iontů na povrch dynody dojde k vyražení elektronů, které jsou následně elektrickým polem urychlovány směrem ke kolektoru. Během toho dochází k mnoha nárazům elektronů na stěnu trubice, a tím k emisi obrovského počtu dalších elektronů. Velikost i geometrii tohoto násobiče lze optimalizovat. Účinnost je podobná jako u předchozího typu, nicméně u iontů s vyšší hmotností bývá citlivost i životnost nižší.



Obr. 21 Elektronásobič s kontinuální dynodou, převzato z ref.40.

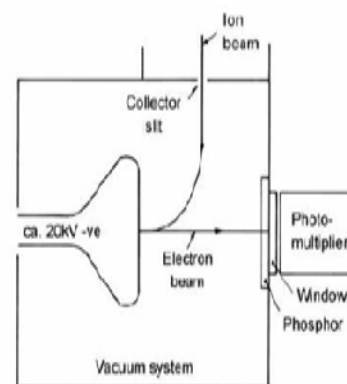
- *mikrokanálová destička* – u tohoto typu detektoru, dochází k zesílení v sérii mikrokanálek umístěných vedle sebe do tvaru disku. Jednotlivé kanálky mají průměr několik desítek mikrometrů a délku několik milimetrů. Ionty dopadají do blízkosti kanálek, kde dojde k vyražení elektronů z povrchu (vložené napětí), které následně prochází jednotlivými kanálky a pomocí elektrického pole jsou urychleny ke kolektoru. V kanálcích, které mají šikmý tvar, dochází k dalším



Obr. 22 Mikrokanálová destička, převzato z ref.40.

nárazům a emisi elektronů. Jednotlivé destičky, které umožňují zesílení  $10^2 - 10^4$ , se mohou vrstvit pro dosažení většího zesílení. Díky velmi krátké vzdálenosti, kterou elektrony urazí kanálkem, se získají velmi krátké elektronové šíře pulzu (cca 1 ns) s minimálním kolísáním. Z tohoto důvodu se samostatně nebo jako součást používá u hybridních systémů, především u TOF. Určitou nevýhodou je jeho křehkost a citlivost k okolním podmínkám.

- **Scintilační fotonásobič** – jedná se o zařízení, které kombinuje detekci pomocí iontů a fotonů. Ionty jsou nejprve urychleny pomocí vysokého napětí na konverzní dynodě, kde dojde k vyražení elektronů. Tyto elektrony jsou následně akcelerovány směrem k pokovenému scintilačnímu stínítku a po jejich dopadu dojde k uvolnění energie ve formě fotonu. Detekce již proběhne běžným fotonásobičem. Hlavní výhodou scintilačního fotonásobičového detektoru je možnost jeho umístění mimo oblast vysokého vakua a jeho delší životnost oproti elektronásobiči.



Obr. 23 Scintilační fotonásobič, převzato z ref.90.

### 3.3.4 SPOJENÍ HPLC/MS

Hlavní důvod, který vedl ke spojení chromatografických metod s hmotnostní spektrometrií, byl především v možnosti propojení ideálních vlastností obou těchto analytických technik. HPLC umožňuje separovat složité směsi látek, nicméně není schopna jednotlivé složky identifikovat. Hmotnostní spektrometrie naopak směsi separovat nedokáže, ale dokáže jednotlivé složky identifikovat. Díky své univerzálnosti, selektivitě a vysoké citlivosti, představuje MS v podstatě ideální detektor pro HPLC. On-line spojení těchto metod tak představovalo nové možnosti pro analytické hodnocení látek [41, 67].

Největší problém, při spojení těchto metod, spočíval v obrovských rozdílech mezi tlaky v hmotnostním analyzátoru (cca  $10^{-3} - 10^{-10}$  Pa) a iontovém zdroji (cca  $10^5$  Pa). Navíc v HPLC jsou analyzované látky unášeny tokem mobilní fáze, která je v iontovém zdroji v obrovském nadbytku, a je třeba ji před vstupem do analyzátoru odstranit. Z tohoto důvodu byla do praxe mnohem dříve, v roce 1957, zavedena metoda spojení GC/MS, kde mobilní fázi představuje plyn. Spojení HPLC/MS uskutečnili P. J. Arpino, M. A. Baldwin a F. W. McLafferty v roce 1974 [91], nicméně širšího uplatnění se tato metoda dočkala až po zavedení API technik na počátku 90. let. Hlavní problémy při spojení HPLC s MS tedy spočívaly v odstranění velkého nadbytku mobilní fáze a převedení analyzovaných látek do plynné fáze. Vyřešit tento problém, znamenalo vyvinout vhodný mezičlen pro redukci mobilní fáze a zavést nový typ iontového zdroje, který ionizaci takových látek umožní [41, 43].

Byly vyvinuty různé techniky pro toto spojení:

**Přímý vstup eluentu (DLI)** byl první z nich a využíval děličku toku mobilní fáze. Do MS se tak dostala jen malá část eluentu, čímž docházelo ke ztrátě citlivosti. Přímé spojení bez děličky toku bylo možné využít pouze pro kolony kapilární nebo s velmi malým průměrem. Mobilní fáze sloužila jako reakční plyn pro CI [92].

**Nekonečný pás (MB)** byl prvním komerčně dostupným rozhraním pro HPLC/MS. Na výstupu z kolony byl eluent rozprášen pod úhlem  $45^\circ$  na nekonečný polyimidový pás, mobilní fáze byla odpařena pod infračervenou lampou a páry poté odsáty. Analyty pak byly na páse dopraveny do iontového zdroje, kde došlo k jejich ionizaci popř. desorpci. Po výstupu pásu ze zdroje docházelo k jeho čištění v pyrolýzní pícce. MB byl využitelný v širokém rozsahu HPLC podmínek, průtokových rychlostí a mobilních fázích. Často se však projevovalo chemické pozadí z materiálu pásu, rozprašováním vzorku docházelo ke ztrátě rozlišení a projevovaly se výrazné paměťové efekty. Tato technika mohla být použita ve spojení s EI, CI nebo FAB, dnes se již nevyužívá [43, 92].



**Particle Beam (PB)** je založený na proudu helia, který nebulizuje eluent po výstupu z kolony a následně dochází k odpaření ve vyhřívané desolvatační komoře. K odstranění zbytku mobilní fáze dochází na základě rozdílných kinetických energií mobilní fáze a analytu ve dvoustupňovém tryskovém separátoru. K ionizaci je nejčastěji použita EI nebo CI. PB umožňuje ionizaci některých poměrně netěkavých sloučenin, nevýhodou je nízká citlivost a značná závislost odezvy na experimentálních parametrech. I přesto se dodnes používá ve spojení s EI, především jako vhodná alternativa pro méně polární látky s  $M_r$  200 – 800 [41, 43, 92].

**Termosprej** byl první ionizační technikou vyvinutou výhradně pro spojení HPLC/MS. Jak bylo uvedeno v přehledu ionizačních technik, TSI umožňoval spojení s minimálním omezením při volbě HPLC podmínek. Pro podpoření vzniku iontů je nutný přídavek iontové látky (obvykle octan amonný) a určitý obsah vody. Vzhledem k minimálnímu tepelnému namáhání, umožňuje TSI ionizovat termolabilní látky. Není vhodný pro vysokomolekulární látky [43, 92].

**Průtoková sonda pro ionizaci FAB (CF-FAB)** - přímé spojení FAB s HPLC bylo velmi výhodné, protože umožňovalo analýzu polárních, termolabilních nebo vysokomolekulárních látek. Klasická ionizace EI pro ně nebyla příliš vhodná. Při spojení HPLC/CF-FAB je nutné přidávat kapalnou matici do mobilní fáze před nebo za kolonou. Předkolonovým přídavkem matrice do mobilní fáze se ovlivní retence analyzovaných látek, přidává-li se matrice až za kolonou, může docházet k částečnému rozmývání píku separovaných látek a ke zhoršení jejich rozlišení. Výrazným omezením je také možnost použití pouze pro průtoky řádově v  $\mu\text{l}/\text{min}$  (kapilární HPLC nebo dělič toku). Zavedením API ionizačních technik ztratila CF-FAB na významu a téměř se nepoužívá [41, 43, 92].

Spojení **MALDI techniky** s HPLC není příliš časté, vzhledem k nutnosti smíchání vzorku s matricí. K přidání matrice může dojít po výstupu analytu z kolony externím přidáváním pomocí „sheath flow“ nebo nanesením eluentu na terčík, který je předem pokrytý matricí. Sběr eluentu pak může probíhat na základě diskretní frakce – komerčně dostupný je automatizovaný přístroj kompatibilní s HPLC, jeho nevýhodou je však nízká vzorkovací frekvence, a tím nízké chromatografické rozlišení. Druhou možností je sběr eluentu na základě spojitě stopy, která je však kompatibilní s nanoLC a kapilární elektroforézou. Vzorkovací frekvence je však mnohem vyšší, což umožňuje vysoké rozlišní separace. V posledních letech se jeví jako vhodnější pro spojení s HPLC využití metody LDI, která nevyžaduje přítomnost matrice. [41, 92, 93]

Až zavedení **API technik (ESI, APCI, APPI)** znamenalo naprostý průlom v řešení problematiky spojení HPLC/MS a do dnešní doby jsou stále nejprogresivnějšími ionizačními technikami používanými pro toto spojení vůbec. Jedná se o měkké ionizační techniky s velmi dobrou citlivostí a reprodukovatelností, které umožňují analyzovat nejrůznější látky včetně netěkavých a tepelně nestálých. Díky jejich zavedení se z HPLC/MS stala zcela rutinní a spolehlivá analytická metoda s obrovským významem pro strukturní analýzu organických látek ve směsích, identifikaci reakčních produktů a nečistot, stopovou analýzu a zejména díky ESI, zcela nové možnosti v oblasti biochemie. **Při použití API technik je možné v podstatě bez větších omezení zachovat běžné podmínky používané v HPLC.** ESI i APCI umožňují použití průtoků mobilní fáze až do 1 - 2 ml/min v systémech normálních i reverzních fází, a to i s použitím gradientové eluce. V případě APPI je průtok limitován na 50  $\mu$ l/min, a proto se používá ve spojení s kapilární LC nebo kapilární elektroforézou [41, 67].

**Existují však některá doporučení a omezení při použití API zdrojů [41, 43, 44, 67]:**

- **Rozpouštědla:** je nutné vždy používat jejich nejvyšší možnou čistotu, vodu používat vždy čerstvou a redestilovanou. Vyšší koncentrace organického rozpouštědla většinou způsobuje lepší odezvu, naopak vysoké procento vody odezvu snižuje. *Nejběžnějšími rozpouštědly* pro *ESI* je methanol, acetonitril, ethanol, nebo isopropanol. V případě *APCI* je to methanol, propanol, butanol, aceton. Acetonitril se používá omezeně, protože jeho vysoké procento způsobuje tvorbu grafitického uhlíku na výbojové elektrodě, kterou je pak nutné často čistit. Celkově je pak snaha vyhnout se halogenovaným rozpouštědlům, která zvyšují kontaminaci a zhoršují stabilitu signálu. U APPI je nejčastějším a nejvhodnějším rozpouštědlem methanol, dále lze použít acetonitril, který však oproti methanolu méně ionizuje (zřejmě vzhledem k jeho vyšší ionizační energii) nebo vodu.

- **Aditiva:** pokud je to možné, je třeba používat pouze těkavá aditiva, v co nejnižších koncentracích. Vyšší koncentrace všech aditiv výrazným způsobem snižují odezvu. Nejčastěji se používají: mravenčan nebo octan amonný (5 – 10 mmol/l) nebo kyselina octová, kyselina mravenčí případně amoniak, v koncentracích 0,05 – 1 %. U netěkavých pufrů může docházet k usazování netěkavých anorganických solí v iontovém zdroji, a tím k výraznému snížení citlivosti.

## Separáční systémy:

Chromatografie na reverzních fázích: pokud jsou analyty prmřen tkav, je mone použit ESI, APCI i APPI. Pro látky poskytující ionty v roztoku je vsak nejvyhodnj ESI. Mobilní fáze s vodnou a organickou složkou jsou dostaten kompatibilní.

Chromatografie na normálních fázích: lepší kompatibilita je s APCI a APPI. Nevodn mobilní fáze jsou neprzniv pro tvorbu iontů a tedy ionizaci ESI. Do mobilní fáze je třeba prdvat vtinu více než 5% proton-donornovho rozpouštědla (např. 2-propanol).

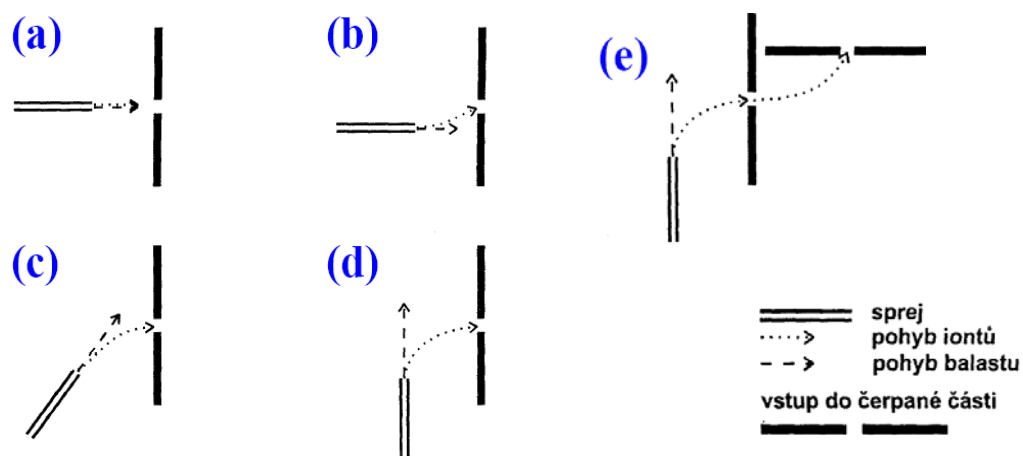
Ion-prov chromatografie na reverzních fázích: nevhodn jsou klasick netkav ion-prov činidla (tetraalkylamonn soli, sulfonov kyseliny). Namísto toho se používá 5 mmol/l octan amonn, kter m vsak omezen pouit a nižší separační uinnost. Dále lze použit 1 – 5 mmol/l di- nebo trialkylamonium acetáty pro aniony a 1 – 5 mmol/l perfluorovan karboxylov kyseliny pro kationty.

Gelov permeační chromatografie: se používá k separaci vtich biologicky aktivních látek za pouit vodn resp. vodn-organické mobilní fáze, kter je kompatibilní s ESI. Vzhledem k tepeln nestabilitě nebo nedostaten těkavosti analytu je APCI popř. APPI nevhodn.

Imunoafinitní chromatografie: i v tomto prpad jsou analyty vhodn spíše pro pouit ESI.

Chromatografie na měničích iontů a chromatografie zaloen na hydrofobních interakcích: jejich využití je problematick, protože obsahují v mobilních fázích vt obsah solí. Tento problém lze reit snenm koncentrace elektrolytů pomocí iontov výměny.

- **Geometrie zdroje:** pri vstupu eluentu do iontového zdroje, je kromě analytu pritomno obrovsk množství interferujících látek z mobilní fáze. Vhodnm uspordnm iontového zdroje může dojít k vyrazn eliminaci těchto látek od analytu. Jak je vidět na obr. 24, nejrobustnější a nejodolnější vci kontaminaci je geometrie orthogonln (resp. Z-sprej), naopak geometrie prm je nejmn robustní.

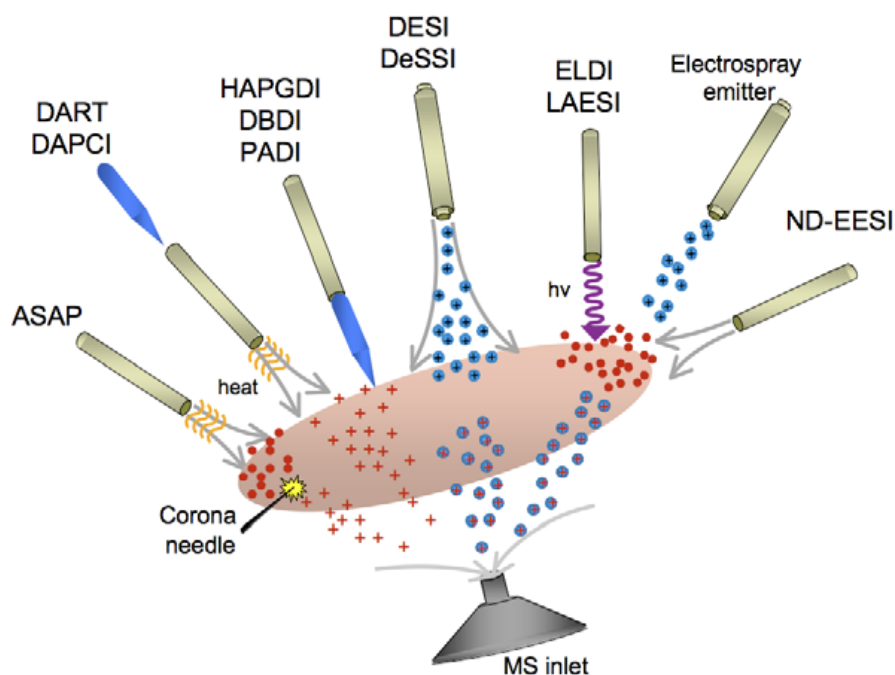


Obr. 24 Typy geometrie iontového zdroje: a) přímá - v ose, b) mimo osu, c) diagonální - pod úhlem  $45^\circ$ , d) orthogonální, e) Z-sprej – analogie orthogonální geometrie, převzato z ref. 41.

### 3.3.5 NOVÉ TRENDY V MS

Vývoj v oblasti MS přináší neustále nové možnosti, i přes to, že během své existence byla MS již dvakrát označena předními odborníky jako metoda, která již spěje k zániku. Právě naopak, především díky zavedení ionizačních technik ESI a MALDI, nastal v 90. letech obrovský rozvoj biologických věd, především proteomiky. Tyto ionizační techniky umožnily identifikovat jednotlivé bílkoviny, studovat jejich funkce, ale i interakce jejich s jinými biomolekulami. Díky schopnosti analyzovat i velice složité směsi látek umožňuje MS hodnotit i tak komplikované biologické matrice, jako je lidská tkáň nebo tělní tekutina. Nově vyvíjené techniky pak kladou důraz na maximální citlivost, robustnost, rozlišení, a především minimalizaci úpravy vzorků před vlastní analýzou.

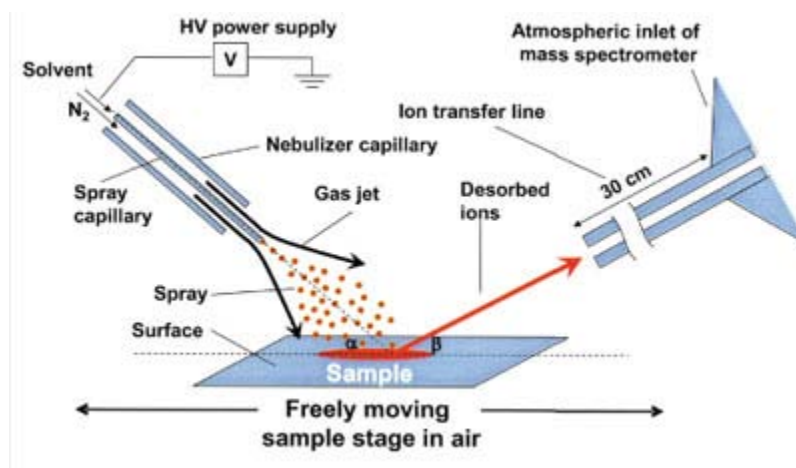
**Velká pozornost je v současné době věnována inovacím iontových zdrojů, které by umožnily práci za atmosférického tlaku a běžné teploty, bez předchozí úpravy vzorku (označovány též jako „ambient“ techniky).** V roce 2004 a 2005 byly představeny „ambient“ techniky DESI, DART a DAPCI, což znamenalo další významný zlom ve vývoji MS. Po jejich zavedení se tato nová oblast MS začala velmi rychle rozvíjet a během posledních 4 let tak na jejich základě vzniklo okolo 15 nových ionizačních technik. Využívají všech typů ionizace za atmosférického tlaku v kombinaci s různými typy desorpce vzorku z povrchu, jak dokládává obr. 25. Hlavními výhodami „ambient“ technik jsou rychlé a přímé analýzy za běžných podmínek, bez předchozí úpravy vzorku, umožňující analýzu širokého spektra látek [42, 94, 95].



Obr. 25 Přehled nových ionizačních technik a jejich princip, převzato z ref. 95

### *DESORPČNÍ IONIZACE ELEKTROSPREJEM (DESI)*

Jednou z nejprogresivnějších technik je DESI, kterou popsal v roce 2004 R. G. Cooks a kol., jako metodu založenou na kombinaci klasické ionizační (ESI) a desorpční (MALDI) techniky. Tato metoda otevřela nové možnosti v obecné povrchové analýze, a to i živých objektů, která může být použita v běžném prostředí bez jakékoli předchozí úpravy vzorku [96].



Obr. 26 Schéma DESI, převzato z ref. 97.

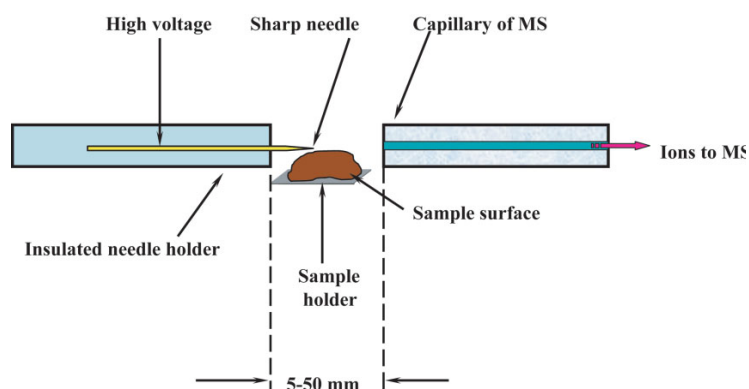
Základem pro DESI je vodný roztok organického rozpouštědla (často s přidavkem kyseliny nebo hydroxidu), který je napětím několika kilovoltů ionizován. Takto ionizovaný proud je pod vysokým tlakem nosného plynu klasicky sprejován z ESI zdroje přímo na povrch analyzovaného vzorku, kde dojde k desorpci iontů směrem ke vstupní kapiláře analyzátoru. **Analyzovaným povrchem může být v podstatě cokoli – kůže, tkáň, tableta, rostlina nebo oblečení.** Vhodným výběrem rozpouštědla pak může být ovlivněna intenzita odezvy nebo selektivita k dané směsi. Kapilárou spreje je možné snímat celou plochu vzorku a získat tak 2D distribuci [96, 95].

**DESI byla úspěšně použita u širokého spektra látek od malých nepolárních, až po velké polární molekuly, jako peptidy nebo proteiny.** Možnosti aplikací DESI jsou obrovské. Může se jednat o biomedicínkové aplikace (proteomika, lipidomika, mikrobiologické aplikace, diagnostika), farmaceutickou analýzu (umožňuje přímo sledovat podaná léčiva, která se vylučují na povrchu lidské kůže i jejich farmakokinetiku), velký význam má ale i pro oblast národní bezpečnosti, kde může napomáhat odhalovat výbušniny, chemické látky či biologická agens [98, 99, 100]. Další využití našla DESI také ve spojení s TLC [40].

Hlavní limitací DESI byla nutnost bezprostřední vzdálenosti vzorku od vstupu do analyzátoru. Výrazněji se proto DESI začala používat až v roce 2006, kdy Cooks a kol. přišli s inovací **nepřímé detekce pomocí DESI** a vzdálenost vzorku mohla být díky transportní trubici až 3 m. Prodloužení této vzdálenosti z původních cca 3 mm na vzdálenost až 3 m umožnilo získat vysoce kvalitní spektra, kde v podstatě nedochází k interferencím, a především dochází k výraznému zlepšení poměru signál/šum. Pro rychlejší a citlivější analýzy v případě velkých povrchů byly sestrojeny vícenásobné DESI zdroje. Jedná se o 3 nezávislé spreje, které jsou lineárně propojeny a usměrněny na analyzovaný povrch. Desorbované ionty jsou následně shromážděny v tzv. transportním trychtýři, který umožňuje zachycení iontů generovaných všemi třemi spreji a odtud již podtlakem dojde k přenosu do analyzátoru [94, 101]. **Ve srovnání s „klasickým“ ESI poskytuje DESI stejná spektra, umožňuje efektivní ionizaci látek v širším rozsahu polarit a i z pohledu citlivosti je v některých aplikacích výhodnější** [47, 102]. Dá se předpokládat, že tento nový analytický nástroj nalezne široké uplatnění v diagnostice, molekulární medicíně a obecně v klinické biochemii. DESI-MS by mohla být např. v budoucnu využita přímo v průběhu operace k *in vivo* analýze nádorové tkáně nebo k diagnostice kožního onemocnění [103].

### **DESORPČNÍ CHEMICKÁ IONIZACE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU (DAPCI)**

DAPCI byla vyvinuta v roce 2005 na základě APCI a jako vhodná alternativa k DESI. Stejně jako APCI dosahuje v některých aplikacích mnohem vyšších citlivostí oproti ESI, je tomu tak i v případě srovnání DAPCI a DESI. **Nejčastěji se DAPCI používá pro látky slabě až středně polární. K ionizaci molekul plynu dochází pomocí výbojové elektrody, na kterou je vneseno vysoké napětí (cca 5 kV).** V prvních aplikacích bylo k ionizaci používáno rozpouštědlo (nejčastěji toluen a methanol), jehož páry byly ionizovány pomocí výbojové elektrody. Tyto ionty v plynném stavu pak dopadají na vzorek a desorbují ho z povrchu, kterým může být opět v podstatě cokoli. Právě přítomnost toxických činidel jako toluen či methanol však původně limitovalo použití DAPCI, vzhledem k možné chemické kontaminaci vzorku [104, 105].

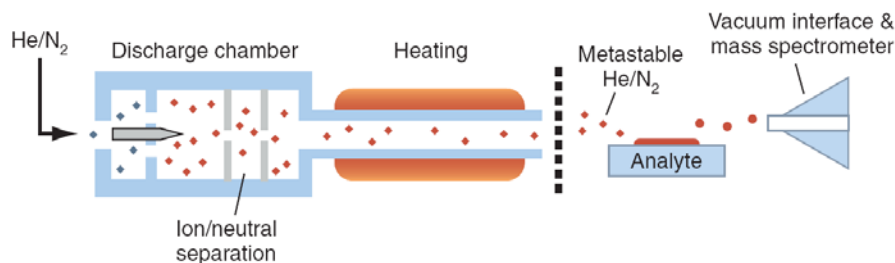


Obr. 27 Schéma DAPCI, převzato z ref. 104

V roce 2007 byla publikována alternativa k DAPCI, která nevyžaduje přítomnost plynu ani toxických solventů jako reakčních plynů [104]. Nedochozí tak k přímému kontaktu solventu s analyzovaným povrchem, čímž se eliminuje nebezpečí poškození citlivých povrchů (jemné povrchy nebo možnost rozfouknutí prachů či jemných částic farmaceutických substancí nebo aminokyselin). Reakčním plynem je v tomto případě vzduch, přičemž nejvyšší intenzity signálu je dosaženo při jeho 45 – 65% vlhkosti. Voda, přítomná ve vzduchu, je pak zodpovědná za vznik primárních iontů na výbojové elektrodě a vzniklé  $[H_3O]^+$  ionty desorbují analyt z povrchu. DAPCI byla zavedena jako metoda k analýze stopových množství výbušnin, nicméně nyní nachází své uplatnění i při hodnocení farmaceutických přípravků, *in vivo* lidské kůže, oblečení nebo potravin, bez předchozí úpravy vzorku. Do budoucna jsou potenciálně možnými aplikacemi diagnostika kožních nemocí a metabolické studie [101, 104, 105].

### **PŘÍMÁ ANALÝZA V REÁLNÉM ČASE (DART)**

Tato technika byla představena v roce 2005 a společně s DESI představovala první „ambient“ techniku, která umožnila analýzu vzorků bez jakékoli předchozí úpravy. Stejně jako u DAPCI k ionizaci dochází pomocí výbojové elektrody a proudu horkého plynu. Vložený elektrický potenciál je využit plynem s vysokým ionizačním potenciálem (dusík, helium) k tvorbě plasmy elektronů, iontů, atomů a metastabilních částic, které desorbují molekuly s nízkou molekulovou hmotností z povrchu vzorku. Pokud je použito helium, dochází během ionizace k reakci helia v excitovaném stavu se vzdušnou vlhkostí za vzniku protonovaných klastrů vody, který umožní přenos protonu na analyt. Jiným mechanismem ionizace může být Penningova ionizace, během které metastabilní částice ionizují neutrální za vzniku radikál kationu a elektronu. Oproti DAPCI je nutná přítomnost proudu plynu a k jeho ionizaci dochází na začátku zdroje. Vzorek může být v pevném, kapalném i plynném stavu. DART byla využita k analýze léčiv v léčivém přípravku, v tělních tekutinách nebo tkáních, jejich metabolitů, ale i syntetických organických a organokovových sloučenin, ovzduší, potravin atd. Umožňuje také přímou analýzu TLC desek [94, 95, 106, 107].



Obr. 28 Schéma DART, převzato z ref 94.



### **Přehled nově vyvinutých „ambient“ technik, které vznikly v průběhu let 2005 - 2008 a navazují na DESI, DAPCI a DART.**

Techniky, u kterých je ionizační fáze založena na DESI resp. ESI, a liší se způsobem desorpce [94, 95, 108]:

- **DeSSI (Desorption Sonic Spray Ionization)** [109] vychází z DESI, nicméně během ionizace se nekládá žádné napětí, čímž mají kapičky tvořené během sprejování menší hustotu náboje. Eluent vycházející z kapiláry je zmlžen koaxiálně přiváděným plynem o rychlosti blízké se rychlosti zvuku (resp. mírně podzvukovou). Celý proces probíhá bez přítomnosti silného elektrického pole nebo zahřívání, a proto vhodný pro termolabilní látky
- **ELDI (Electrospray Laser Desorption/Ionization)** [110] a **LAESI (Laser Ablation Electrospray Ionization)** [111], využívají k desorpci neutrálních molekul analytu z povrchu laser a následně k ionizaci těchto molekul po desorpci využívá nabitých kapiček z elektrospreje. V případě ELDI je použit UV laser, u LAESI laser IČ.
- Proud dusíku je naopak použit k desorpci u techniky **ND-EESI (Neutral Desorption Extractive Electrospray Ionization)** [112].
- V případě **MALDESI (MALDI Assisted Electrospray Ionization)** se jedná o spojení dvou již dříve popsanych technik. Tato technika však před vlastní analýzou vyžaduje přidání matrice do vzorku. [113].
- Při použití **SSP (Surface Sampling Probe)** [114] dochází mezi sondou a pevným povrchem ke spojení pomocí eluentu, který desorbuje rozpustné molekuly analytu a k ionizaci pak dochází pomocí elektrospreje.

Techniky založené na DAPCI, resp. APCI [94, 95, 105, 108]:

- **ASAP (Atmospheric Pressure Solids Analysis Probe)** [115] je určena pro rychlé analýzy mírně těkavých a těkavých pevných látek. Z vyhříváné trysky zdroje proudí horký dusík, který je zacílen na povrch vzorku a desorbované látky jsou následně v plynné fázi ionizovány pomocí výbojové elektrody. ASAP byla použita pro malé molekuly léčiv, monitorování životního prostředí stejně jako pro analýzu biologických tkání, steroidů nebo monitorování biosyntetických pochodů.
- **HAPGDI (Helium Atmospheric Pressure Glow Discharge Ionization)** [95] a **PADI (Plasma-Assisted Desorption/Ionization)** [116] využívají stabilního doutnavého výboje, kterého se dosáhne použitím stejnosměrného nebo střídavého proudu za atmosférického tlaku, resp. jeho vložení na elektrody za stabilního toku

plynu, nejčastěji helia. Vzorek je tak vystaven přímo plasmě, která obsahuje směs metastabilních atomů a/nebo molekul, iontů, radikálů a elektronů, včetně sekundárních iontů. Vzhledem k přímému působení plasmy na vzorek dochází k výraznější fragmentaci oproti DAPCI a DART.

- **DBDI (Dielectric Barrier Discharge Ionization)** [117] Mezi dvě elektrody, které jsou oddělené dielektrickou vrstvou je vloženo střídavé napětí, které produkuje stabilní, difúzní plazmu za atmosférického tlaku. Stejně jako u HAPGDI a PADI je vzorek vystaven přímo proudu plasmy a tím není možné přímo oddělit fázi ionizace a desorpce. Využití těchto metod je zatím limitováno.

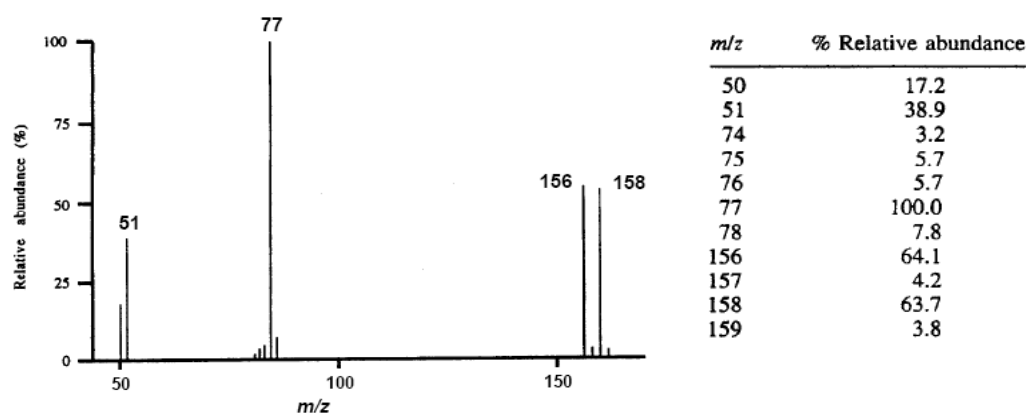
V roce 2007 byla zavedena technika **DAPPI – Desorpční fotoionizace za atmosférického tlaku** [118]. Je založena APPI ionizaci a využívá se k ionizaci neutrálních nepolárních látek, resp. látek s vysokou protonovou afinitou. Páry dopantu (toluen, aceton) jsou vystaveny UV záření za vzniku metastabilních molekul, které následně reagují s vodou a dalšími složkami vzduchu, za vzniku reaktivních iontů. Po jejich dopadu na povrch vzorku dojde k ionizaci a desorpci iontů analytu.

**Dalším trendem MS jsou v současné době také nové aplikace.** Jedná se především o **hmotnostní mikroskopii (tzv. „mass imaging“)**, která umožňuje snímání minimálně dvourozměrného obrazu povrchu. Ty jsou získány počítačovou rekonstrukcí iontových druhů, které jsou ze zobrazovaného objektu desorbovány. Podává tak kromě obrazu (molekulární distribuce) i přímou informaci o povaze zobrazených komponent včetně jejich modifikací. Hmotnostní spektrometrie tak představuje ideální nástroj pro identifikaci a charakterizaci tzv. biomarkerů a umožňuje tak např. identifikaci molekul charakterizujících patologický stav. Pomocí hmotnostní mikroskopie může být hodnocena i nádorová tkáň, případně subtypy tumorů na základě souboru bílkovin nebo jiných specifických molekul, které jsou ve zdravých tkáních zastoupeny jinak. Umožňuje také sledovat pohyb léčiva v organismu, jeho deponování do jednotlivých orgánů i následnou metabolizaci. Lze také určit, kde v tkáni specifické molekuly katalyzují biochemické reakce. To vše pro látky v širokém spektru polarit, u nízko- i vysokomolekulárních, které mohou být hodnoceny zároveň. V současnosti je metoda „mass imaging“ hodnocena agenturou FDA (Food and Drug Administration) a čeká se na její uznání za standardní zobrazovací techniku. Nicméně její možnosti jsou evidentní, a proto jsou hmotnostní mikroskopy již komerčně dostupné a experimentálně často využívané [42, 47, 103].

Samozřejmě, že **MS se týká i trendu miniaturizace.** Obzvláště u technik, které využívají přímé analýzy z povrchu, by miniaturizace znamenala přínos pro možné analýzy přímo v terénu.

### 3.3.6 ZÁKLADNÍ PRINCIPY INTERPRETACE SPEKTER

Hmotnostní spektrum je grafické znázornění závislosti relativní intenzity iontů (%) na ose  $y$  na jejich poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) na ose  $x$ . Kromě ESI je ve většině případů náboj roven jedné a hodnota na ose  $x$  pak odpovídá přímo hmotnosti. Hmotnostní spektra jsou vždy uváděna v normalizovaném tvaru, tzn., že nejintenzivnějšímu píku ve spektru je přiřazena relativní intenzita 100% a intenzity ostatních píků se dopočítají. Kromě grafické formy lze spektrum uvést i v tabelární formě, kde jsou přesně uvedené intenzity při dané  $m/z$  (viz obr. 29). Tato forma je však pro interpretaci málo přehledná [41, 43].



Obr. 29 Záznam hmotnostního spektra, převzato z ref 41.

Interpretace hmotnostního spektra je prováděna na základě určitých pravidel a postup interpretace odpovídá použité ionizační technice (EI nebo „měkké“ techniky).

*Následující body prezentují obecný postup při interpretaci [43, 44, 119]:*

#### 1. Získat co nejvíce informací o vzorku

Před začátkem měření je vhodné zjistit co nejvíce informací o vzorku, jako je jeho původ, rozpustnost, teplota tání, teplota varu, předpokládaná struktura, případně UV spektra nebo NMR spektra a další.

## 2. Určit molekulovou hmotnost

Prvním krokem při analýze vzorku je nalezení molekulového iontu, případně molekulového aduktu.

- V případě EI spekter se jedná o radikalkation  $M^+$  a jeho  $m/z$  odpovídá monoizotopické hmotnosti analytu. Ve spektru se jedná o ion s nejvyšší hodnotou  $m/z$ , lichým počtem elektronů ( $OE^+$ ), který poskytuje logické neutrální ztráty menších neutrálních molekul nebo radikálů (např. 15 - methyl, 18 - voda apod.). Nesmí se však vyskytovat tzv. “zakázané ztráty” z molekulového iontu (4-14 a 21-25) - tyto ztráty jsou vysoce nepravděpodobné a jejich přítomnost ukazuje na nesprávné určení molekulárního iontu. V některých případech však ve spektru molekulový pík může zcela chybět (např. alkoholy, nitrily).

- V případě spekter „měkkých“ ionizačních technik je jedná o molekulový adukt se sudým počtem elektronů, který nemusí být nejvyšším iontem ve spektru. V pozitivním módu se jedná o ionty  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  atd. U ionizačních technik ESI a MALDI mohou vznikat také ionty vícenásobně nabitě  $[M+2H]^{2+}$ , dimery  $[2M+H]^+$ , trimetry  $[3M+H]^+$ . Počet nábojů lze zjistit ze vzdálenosti mezi píky v izotopovém stavu. V negativním módu jsou to pak pro všechny techniky ionty  $[M-H]^-$ ,  $[M+HCOO]^-$  atd.

## 3. Určit prvky, které jsou přítomny

Existují dva způsoby zjišťování elementárního složení v MS. Je možné využít měření s vysokým rozlišením, které umožní poměrně snadno určit správné elementární složení. Čím přesněji je totiž určena hmotnost iontu, tím více lze omezit počet možných struktur. Pokud však takové zařízení není k dispozici, je možné elementární složení zjistit na základě zastoupení „izotopických píků“, viz níže.

- Na základě dusíkového pravidla lze určit lichý nebo sudý počet dusíků v molekule. Dusík je totiž jediný prvek, který má lichou vaznost při sudém atomovém čísle. Všechny ostatní mají obojí buď liché, nebo sudé.

Dusíkové pravidlo: Lichá hmotnost molekuly = lichý počet dusíků

Sudá hmotnost molekuly = sudý nebo nulový počet dusíků

V případě EI, kdy molekulové ionty mají lichý počet elektronů ( $OE^+$ ), platí toto pravidlo ve formě uvedené výše. Pro techniky ESI, APCI, APPI, FAB, které produkují ionty se sudým počtem elektronů ( $EE^+$ ), pak toto pravidlo platí opačně (tj. lichá hmotnost

molekuly = sudý (nulový) počet dusíků, resp. sudá molekulová hmotnost = lichý počet dusíků).

- Pokud jsou ve spektru izotopové klastry, je možné **potvrdit přítomnost některých prvků v molekule, tzv. M+2 prvky**. Jednoznačně lze dobře potvrdit přítomnost chlóru a bromu na základě jejich charakteristického zastoupení  $^{35}\text{Cl} : ^{37}\text{Cl} = \text{M}:\text{M}+2 = 100:32, 3:1$  a  $^{79}\text{Br} : ^{81}\text{Br} = \text{M}:\text{M}+2 = 100:97,3, 1:1$ . Pokud molekula obsahuje větší množství těchto atomů, lze zastoupení jejich izotopů spočítat dle koeficientů binomického rozvoje nebo pomocí počítačových programů, které ze zadaného sumárního vzorce umožní spočítat složení klastru. Po určení chlóru a bromu je možné zjišťovat přítomnost dalších M+2 prvků - S a Si. Přítomnost kyslíku lze pouze odhadnout a je nutné jeho přítomnost ověřit i jiným způsobem (charakteristické fragmentové ionty nebo IČ).

- **Počet atomů uhlíku** je možné vypočítat ze zastoupení  $^{12}\text{C} : ^{13}\text{C} = \text{M}:\text{M}+1 = 100:1,1$ . Po odečtení ostatních prvků přispívajících k intenzitě píku M+1 se vydělí intenzita tohoto píku číslem 1,1. Výsledkem je počet uhlíků v molekule s přesností  $\pm 1$  atom uhlíku.

- **Počet ekvivalentů nenasycenosti**, určuje počet dvojných vazeb a kruhů v molekule. Lze také vypočítat - pro molekulu se složením  $\text{C}_x\text{H}_y\text{N}_z\text{O}$  tento počet vyjadřuje vzorec:  $f = x - 1/2y + 1/2z + 1$ .

- **Určit, zda se jedná o alifatickou nebo aromatickou látku** umožňují charakteristické série iontů – v případě EI ionizace

- aromatická série: 26 a 27, 38 a 39, 50 - 52, 63 - 65, 75 - 78 (nemusí být přítomny všechny, obvykle alespoň jeden ion v sérii)
- alkanová série ( $\Delta m/z = 14$ ): 15, 29, 43, 57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, atd.

#### **4. Porovnat spektrum s knihovnou a pokusit se najít alespoň podobná spektra**

Pro EI spektra existují rozsáhlé knihovny, se kterými lze naměřená spektra porovnat. V případě „měkkých“ ionizačních technik je použití knihoven velmi omezené. Existují zatím pouze knihovny MS/MS spekter ESI, s úzkým spektrem látek.

## 5. Řešit fragmentaci a navrhnout strukturu

Pokud knihovna nenalezne shodné spektrum v databázi, je nutné začít řešit fragmentaci samostatně. K tomu je zapotřebí znát základní fragmentační mechanismy a empirická pravidla. **Níže uvedená pravidla se vztahují spíše k EI ionizaci.** Při ionizaci měkkými technikami spektra obsahují pouze (de)protonované molekuly a molekulové adukty s minimem nebo absencí fragmentových iontů. Pokud k fragmentaci dochází, pak ve srovnání s EI se štěpí menší počet labilních vazeb, a molekula tak fragmentuje po větších, logických částech. Pro získání většího množství fragmentů lze použít CID v iontovém zdroji nebo MS/MS uspořádání.

### A) *Základní typy fragmentace:*

**Fragmentace iontů se sudým počtem elektronů -  $EE^+$ :** ionizace ESI, APCI, APPI, FAB

Fragmentace  $EE^+$ :  $EE^+ \rightarrow EE^+ + M$

Vzniká ion se sudým počtem elektronů ( $EE^+$ ) a neutrální částice. Typickými neutrálními ztrátami je např.  $H_2O$ ,  $NH_3$ ,  $CH_3OH$ ,  $HCl$ ,  $CO$ ,  $CO_2$ ,  $NO$ ,  $NO_2$  atd.

**Fragmentace iontů s lichým počtem elektronů -  $OE^{+\bullet}$ :** ionizace EI

Fragmentace  $OE^{+\bullet}$ :  $OE^{+\bullet} \rightarrow EE^+ + R\cdot$  **nebo**  $OE^{+\bullet} \rightarrow OE^{+\bullet} + M$

Vzniká buď ion se sudým počtem elektronů a radikál **nebo** ion s lichým počtem elektronů a neutrální částice.

**Pořadí snadnosti ionizace při EI:**  $n$ -elektrony (volný elektronový pár - halogeny, O, N, S) >  $\pi$ -elektrony konjugované (aromáty) >  $\pi$ -elektrony nekonjugované (alkeny) >>  $\sigma$ -elektrony (alkany - vazba C-C) >  $\sigma$ -elektrony (alkany - vazba C-H)

**Přibližné pořadí stability molekulárních iontů  $M^{+\bullet}$ :** aromáty > konjugované olefiny > cyklické látky > sulfidy > nerozvětvené uhlovodíky > ketony > aminy > estery > étery > karboxylové kyseliny > rozvětvené uhlovodíky > alkoholy

**B) Základní způsoby štěpení vazeb:**

**Homolytické štěpení** - z dvouelektronové vazby získají oba vznikající fragmenty po jednom elektronu.

**Heterolytické štěpení** - z dvouelektronové vazby získá oba elektrony jeden fragmentový ion.

**Přesmykové reakce** – štěpení nejméně dvou vazeb a vytvoření nové vazby. Dochází k přenosu určité skupiny na jiné místo molekuly.

**C) Základní typy fragmentací:**

**Iniciace radikálovým centrem ( $\alpha$ -štěpení)** - hnací silou je snaha nepárového elektronu vytvořit elektronový pár. Elektron je donorem pro vytvoření nové vazby se sousedním atomem, což je doprovázeno štěpením jiné vazby na tomto atomu. Náboj zůstává na stejném místě, radikál migruje.

**Iniciace nábojovým centrem (i-štěpení)** - hnací silou je přitažlivost elektronového páru kladným nábojovým centrem. Jedná se o méně častý proces ve srovnání s  $\alpha$ -štěpením. Náboj při fragmentaci migruje, radikál zůstává zachován.

**Iniciace ztrátou  $\sigma$ -elektronu** - ztrátou jednoho elektronu z jednoduché vazby, dojde k jejímu výraznému oslabení, což často přímo vede k fragmentaci. Přednostně bude docházet ke štěpení v místech rozvětvení, protože stabilita vznikajících iontů je v pořadí: terciární > sekundární > primární, což nám umožní určit polohu rozvětvení.

**Přesmykové reakce** - dochází k vytvoření nové vazby na jiný atom a zániku jiné vazby a následnému uvolnění neutrálního fragmentu. Dochází k přesmyku části molekuly. Asi nejznámější je McLaffertyho přesmyk, kde dochází k  $\beta$ -štěpení s přesmykem vodíku.

**6. Definitivní potvrzení struktury**

Optimálním řešením pro jednoznačné potvrzení struktury je porovnání spektra identického standardu a analyzované látky za stejných podmínek. V praxi je to však často problematické, a proto se spektra alespoň porovnají s knihovnou spekter (EI spektra). Navržená struktura by měla být porovnána také s dalšími dostupnými technikami jako je NMR, IČ, UV nebo HPLC/MS/MS. V případě použití HPLC/MS je vhodné využít také chromatografické separace a při kontrole navržené struktury porovnat, zda struktura odpovídá i retenční chování.

## ZÁKLADNÍ TYPY SKENŮ POUŽÍVANÝCH K MĚŘENÍ HMOTNOSTNÍCH SPEKTER [41, 44]:

- **základní sken** změří hmotnostní spektrum v celém studovaném rozsahu  $m/z$
- **sken produktových iontů** měříme MS/MS nebo  $MS^n$  spektrum z vybraného prekurzoru
- **skenem prekurzorů** zjistíme pro vybraný fragmentový ion původní ion prekurzoru, ze kterého fragmentací vznikl
- **skenem neutrálních ztrát** zjistíme charakteristické dvojice iontů prekurzorů a produktů, u kterých dochází k odštěpení vybrané hmotnostní ztráty (např.  $\Delta m/z = 18$  pro odštěpení vody)

## ZÁZNAM INTENZITY IONTU(Ů) V PRŮBĚHU SEPARACE PŘI SPOJENÍ HPLC/MS: [41, 44]

- **celkový iontový proud (TIC)** monitoruje široký interval  $m/z$ , je vhodný pro celkový obraz o chromatografii a nalezení nových píků. Nevhodný je naopak při analýze komplexních směsí.

- **selektivním záznamem jednoho nebo více iontů (SIM)** se měří pouze závislost signálu vybraného iontu na čase. Tím, že je zvolen pouze jeden nebo pár iontů, dochází k výraznému zvýšení citlivosti. Záznam více iontů se označuje jako **peak switching**.

- při **selektivním záznamu jedné nebo více reakcí (SRM)** je v podstatě analogie SIM s využitím tandemové MS. Nejdříve je vybrán ion prekurzoru, který je podroben fragmentaci, a ve spektru následně sledujeme pouze vybraný charakteristický fragmentovaný ion – produktový ion. Vzhledem k tomu, že výsledné spektrum tedy obsahuje pouze produktové ionty vzniklé rozpadem iontu prekurzoru, eliminuje se jakákoli možnost kontaminace spektra. Lze sledovat i více reakcí najednou – **multiple reaction monitoring (MRM)**.

SRM a SIM jsou vhodné zejména pro kvantitativní a stopovou analýzu HPLC/MS nebo GC/MS, pokud známe strukturu sledované látky. Nejedná se již o měření hmotnostních spekter, ale pouze o záznam signálu odpovídající námi vybranému známému iontu nebo produktovému fragmentovému iontu(ů) při SRM resp., MRM.



## **3.4 CHARAKTERISTIKA STUDOVANÝCH LÁTEK**

### **3.4.1 TRANSDERMÁLNÍ PODÁNÍ LÉČIV**

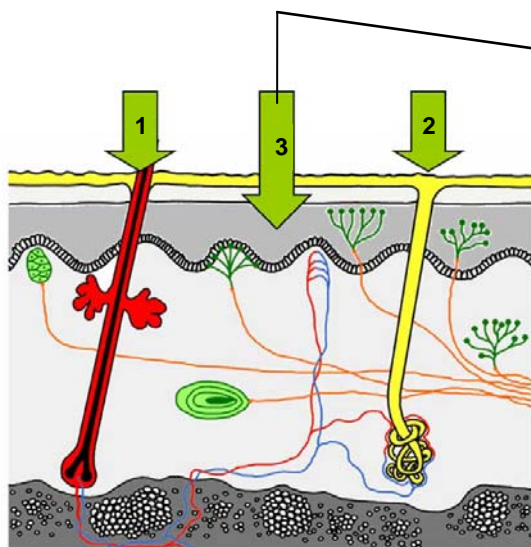
**Transdermální podání léčiv** znamená aplikaci léčivých přípravků přes kůži za účelem dosažení jejich systémových hladin v organismu, zatímco **aplikace dermální**, má za cíl pouze průnik léčiva do hlubších vrstev kůže. Lidská kůže, jako největší a snadno dostupný orgán lidského těla, k podávání léčiv přímo vybízí [120, 121, 122]. Dermální léčivé přípravky, jako masti, gely či krémy se k léčení lokálních kožních nemocí používají již několik století. Zatímco myšlenka použít tuto cestu i pro systémovou aplikaci léčiv se rozvinula relativně nedávno [123]. Přitom právě **transdermální aplikace léčiv nabízí mnoho výhod oproti ostatním formám podání léčiv**.

Při transdermální aplikaci je léčivo řízeně uvolňováno z transdermální lékové formy (nejčastěji ve formě náplasti), překonává kožní bariéru a vstupuje přímo do systémového řečiště. Tímto způsobem je pak možné dosáhnout stálých plazmatických koncentrací s minimální fluktuací, což vede k dobře predikovatelnému farmakologickému účinku s minimálním rizikem toxického působení. Výhodné je to především u léčiv s úzkým terapeutickým oknem a nízkým terapeutickým indexem. Díky vynechání trávicího traktu se efektivně zamezí také presystémové eliminaci léčiv v játrech, tzv. first-pass efektu, čímž se docílí vyšší a lépe predikovatelné biologické dostupnosti léčiv. Tímto způsobem lze dobře předcházet možným interakcím s jinými současně podávanými léčivy či potravou nebo ovlivnění absorpce léčiva vlivem změny pH v gastrointestinálním traktu (GIT). Jedná se zároveň o vhodnou alternativu pro pacienty, u kterých perorální aplikace léčiva není vhodná či možná a eliminují se tak i velice časté nežádoucí účinky při dráždění GIT léčivy. Snadná aplikace léčivých přípravků, dlouhodobý účinek po jednorázovém užití a možnost okamžitého ukončení podání při výskytu jakýchkoli nežádoucích účinků jsou další výhody, které výrazně zvyšují compliance pacientů. [120, 122, 124, 125].

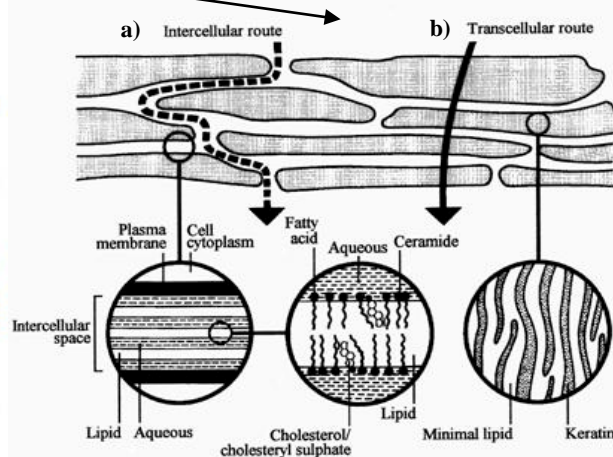
Samozřejmě i tento způsob podání léčiv má své nevýhody jako je podráždění kůže, možná alergizace některou složkou transdermálních léčivých přípravků či vznik ekzémů v místě aplikace při dlouhodobém užívání. Jistým nedostatkem je také maximální možná dávka léčiva, která je omezena velikostí náplasti či limitace fyzikálně-chemickými vlastnostmi léčiv. Nicméně v porovnání s možnými výhodami se oprávněně transdermální aplikace léčiv stává v poslední době velkým konkurentem ostatním „tradičním“ způsobům aplikace [126].

Hlavním limitujícím faktorem transdermálního podání léčiv je velmi nízká permeabilita kůže, kterou způsobuje struktura nejsvrchnější části epidermis – **stratum corneum (SC)**. Díky jejímu speciálnímu složení a uspořádání je tato vrstva mimořádně odolná vůči vnějším chemickým i fyzikálním vlivům a zároveň brání nadměrné ztrátě vody z organismu [120, 127]. Svou velmi nízkou propustností se tak stává výjimečnou v porovnání s jinými biologickými membránami. Jedná se o velmi tenkou vrstvu (cca 20  $\mu\text{m}$ ) složenou z 18 - 21 vrstev zploštělých odumřelých buněk bez jádra – tzv. **korneocytů** (tj. keratinocyty v konečném stádiu diference) obklopenými intercelulární hmotou složenou ze specifických lipidů - **matrix**. Důležitou součástí SC jsou také desmosomy, které zajišťují kompaktnost této vrstvy. Po uvolnění desmosomů pevná struktura povoluje a buňky mohou opustit pokožku, což je přirozený proces obměny buněk. Struktura SC, známá také jako „cihly a malta“, pak zajišťuje zmíněnou vysokou odolnost a umožňuje proniknutí pouze nízkomolekulárních látek [120, 121].

Ačkoli je kůže tak odolnou bariérou, je samozřejmé, že i zde se dají nalézt místa, která průnik léčiv (či ostatních látek) do organismu umožní. Každá látka má v podstatě tři základní možné cesty průniku do tkáně: **1)** pomocí vlasových folikulů spojených s mazovými žlázami, **2)** přes potní žlázy nebo **3)** prostřednictvím vrstvy stratum corneum, která umožňuje dvě cesty **a)** intercelulární – přes lipidové lamely a **b)** intracelulární neboli transcelulární – tedy skrz korneocyty (viz obr. 30, 31) [126, 128].



Obr. 30 Cesty průniku látek do tkáně: 1) vlasové folikuly spojené s mazovými žlázami, 2) potní žlázy, 3) přes stratum corneum, převzato z ref. 128.



Obr. 31 Detailní schéma průniku látek skrz stratum corneum, převzato z ref. 126.

Jak již bylo zmíněno, průnik léčiv kůží je výrazně limitován také jejich charakterem, a to u všech tří možných cest. Vlasovými folikuly se transportují zejména léčiva značně lipofilní (celá řada léčiv). Potními žlázami naopak procházejí léčiva značně hydrofilní, kterých není velké množství. Navíc tyto dvě zmíněné cesty tvoří pouze 0,1 % povrchu kůže. I proto se nejčastěji využívá cesty skrz stratum corneum, která poskytuje širší využití. Tímto způsobem penetrace je možné transportovat především látky s nízkou molekulovou hmotností (cca < 500 – 600 Da) a adekvátní lipofilitou (logP 1 - 3), u kterých potenciální denní dávka nepřesáhne 20 mg. Dále by se mělo jednat o látky nízkovroucí (cca do 200 °C), které nezpůsobí žádné podráždění ani imunitní reakce kůže [120, 126, 129].

Širší klinické využití je tedy omezeno spektrem léčiv, která by tato kritéria splňovala a samovolně, v dostatečném množství, procházela kožní bariérou. První komerčně dostupný transdermální přípravek byl uveden na trh počátkem osmdesátých let 20. století. Jednalo se o náplast Transderm Scop<sup>®</sup>, obsahující skopolamin, určenou k léčbě kinetóz a nevolností. Skopolamin svými vlastnostmi, jako jeden z mála, vyhovoval podmínkám pro přímou transdermální aplikaci. Dalšími látkami, které tyto parametry splňují, jsou například klonidin, nitroglycerin, fentanyl, lidokain, nikotin nebo steroidní hormony (např. estradiol, ethinyl-estradiol, norelgestromin, testosteron). Mnoho dalších léčiv pro transdermální podání je zatím ve fázi výzkumu a např. léčivá látka oxybutynin ve formě transdermální aplikace je nadějí při léčbě inkontinence. Perorální forma podání je kvůli častému výskytu nežádoucích účinků nevhodná. Mnoho dalších léčiv, u kterých by transdermální podání zvýšilo kvalitu léčby či zvýšilo compliance pacientů, však kůží takto samovolně procházet nemůže. Z tohoto důvodu se během posledních cca 20 let začaly intenzivně hledat způsoby, jak propustnost kožní bariéry dočasně zvýšit i pro ostatní léčiva. Vyzkoušeno bylo působení různých **fyzikálních metod** i **chemických sloučenin** [127, 130, 131].

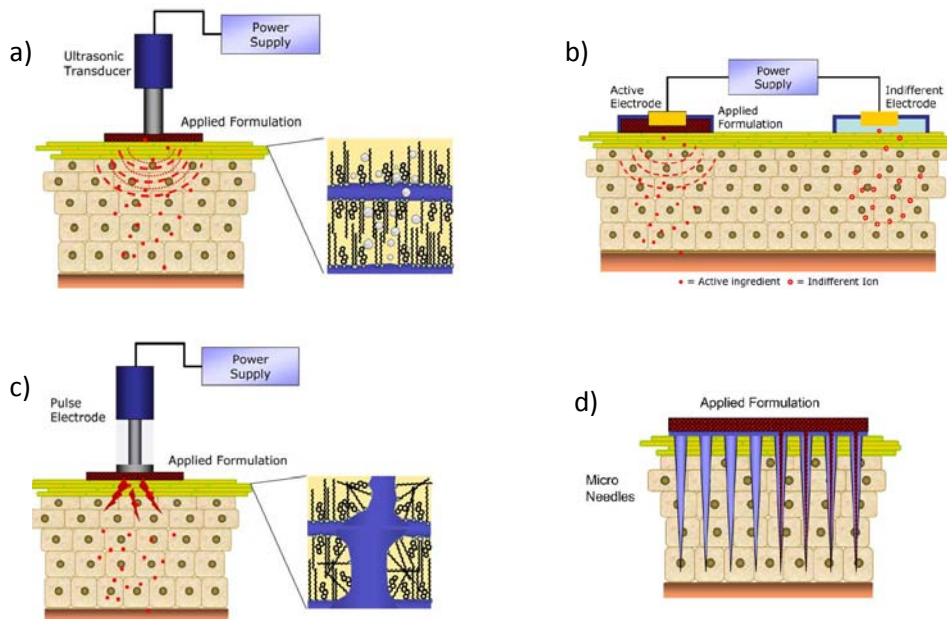
**Z fyzikálních metod** se pro zvýšení kožní permeace účinných látek používá **sonoforéza, která je založena na působení impulzů ultrazvuku o nízké frekvenci (nejúčinnější 20 – 100 kHz)**. Přesný mechanismus účinku zatím není znám, ale předpokládá se vznik akustické kavitace. Působením ultrazvuku dochází ke vzniku a rozpadu plynových mikrobublin, čímž se naruší intercelulární lipidová dvojvrstva (viz obr. 32a). Nejčastěji se sonoforézy využívá k průniku různých makromolekulárních látek (např. proteiny, oligonukleotidy, inzulin, imunogeny) [128, 132, 133, 134].

Další možné metody - **iontoforéza a elektroporace** - jsou založené na působení elektrických impulsů na kůži (viz obr. 32b, c). **U iontoforézy se jedná o proniknutí léčiva do tkáně pomocí malého elektrického proudu po určitou dobu**. Léčivo se rozpustí

ve vhodném vehikulu, aplikuje se na kůži a následně se přiloží elektroda se stejným nábojem, jako má léčivo. Při průchodu proudu obvodem začne léčivo migrovat k opačně nabitě elektrodě, která je umístěna tak, aby léčivo difundovalo směrem do kůže, a uzavřela obvod. **Elektroporace je naopak založena na působení vysokonapěťových impulzů (10 - 1000 V) po velmi krátkou dobu (10  $\mu$ s – 100 ms), kdy (při tom) dojde k chvilkovému přepólování lipidů, což způsobí vznik hydrofilních pórů v intercelulární dvojvrstvě.**

Iontoforéza je určena více pro lipofilní látky s nízkou molekulovou hmotností nebo pouze k lokální léčbě pohybového aparátu, zatímco elektroporace je vhodnější pro některé makromolekuly, peptidy a proteiny. Pro zvýšení účinnosti těchto tří metod se pak v některých případech používají různé kombinace těchto tří metod [128, 135].

V poslední době je asi nejstudovanější problematika **mikroskopických jehliček**, které mohou mechanicky proniknout vrstvou SC a přímo aplikovat léčivo do tkáně nebo umožnit vznik pórů a následný průnik léčiva. Jedná se v podstatě o náplast, obsahující cca 20 x 20 mikro-jehliček (viz obr. 32d). Za normálních okolností je použití jehly bolestivé, a pro pacienta stresující, což však v tomto případě odpadá, protože délka jehličky je cca 150  $\mu$ m a receptory bolesti se nachází až v hlubší vrstvě kůže. Výhodou této metody je tedy absence jakéhokoli omezení v polaritě či molekulové hmotnosti aplikované látky. Nevýhodou je naopak možnost zlomení některé z jehliček během odstraňování z kůže, mechanické poškození kůže či možnost mikrobiální kontaminace. [128, 130, 136, 137, 138].

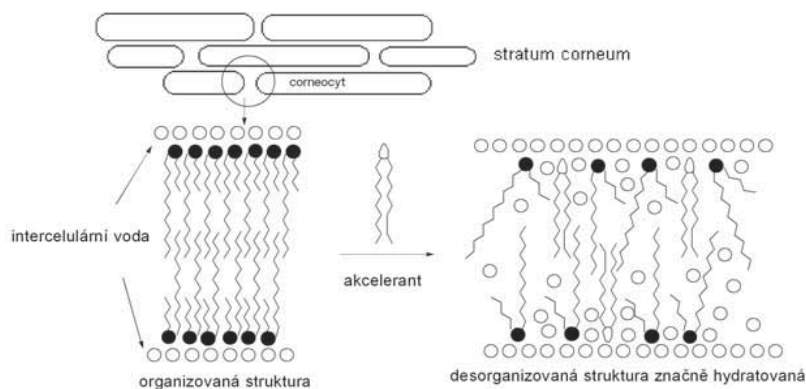


Obr. 32 Základní principy fyzikálních metod používaných pro zvýšení kožní permeace účinných látek: **a)** sonoforéza, **b)** iontoforéza, **c)** elektroporace, **d)** mikro-jehličky, převzato z ref.128.

### 3.4.1.1 AKCELERANTY TRANSDERMÁLNÍ PENETRACE

Všechny výše zmíněné fyzikální metody nachází své uplatnění. Nicméně vzhledem k potřebě relativně složitých zařízení k aplikaci, a tím i finanční náročnosti, se jejich použití limituje. Z tohoto hlediska se proto zdá být výhodnější využití druhého způsobu, tedy dočasného snížení bariérových vlastností kůže **působením chemických látek**, aplikovaných společně s daným léčivem. Tyto látky jsou nazývány **akceleranty transdermální penetrace**.

Dočasná změna bariérových vlastností kůže umožní výrazně urychlit průchod léčiv přes tuto bariéru. **Stejně jako na ostatní pomocné farmaceutické látky jsou i na akceleranty kladeny velmi přísné požadavky.** Především musí jít o látky nedráždivé, netoxické, hypoalergenní a kompatibilní s účinnou látkou i ostatními komponenty léčivého přípravku. Nesmí vyvolávat vlastní farmakologickou aktivitu a jejich účinek musí být okamžitý, předvídatelný a reverzibilní. Po odstranění z kůže musí dojít k rychlé a kompletní obnově bariérových vlastností kůže, které mohou během penetračního procesu klesat vždy pouze směrem do tkáně. I z tohoto důvodu by měl být znám také mechanismus účinku akcelerantu. Ne vždy je detailně popsán, nicméně na obr. 33 je znázorněn nejčastější z nich. Nejprve dochází k interakci akcelerantu s lipidovými součástmi stratum corneum, dočasnému rozrušení organizované struktury, a následně k možnosti proniknutí i větších molekul léčiv. Vhodný akcelerant musí být také chemicky a fyzikálně stabilní, s vhodnými organoleptickými vlastnostmi. V neposlední řadě by měl být také levný a snadno vyrobitelný, aby mohl být komerčně používán [139, 140, 141].



Obr. 33 Mechanismus účinku akcelerantů transdermální penetrace, převzato z ref. 120.

Kromě výše zmíněných požadavků by však ideální akcelerant měl mít také vysokou akcelerační aktivitu pro celou řadu léčiv různé chemické struktury. Je zřejmé, že nalézt látku, která by všechna tato kritéria splňovala, není jednoduché. Z tohoto důvodu také většina dosud vyráběných akceleračních látek vyhovuje těmto požadavkům jen částečně.

Jistou výjimku představuje první, oficiálně syntetizovaný, a do současnosti nejpoužívanější akcelerant transdermální penetrace, **Azon<sup>®</sup>** (1-dodecylazacykloheptan-2-on), který byl v roce 1976 patentován v USA. Jeho hlavními přednostmi jsou nízká dráždivost, velice nízká toxicita, nízký farmakologický účinek (někdy však přisuzován účinek antivirotický) a především jeho schopnost akcelerace širokého spektra látek (např. steroidy, antibiotika či antivirotika). V literatuře je popsána akcelerace jak látek lipofilních, tak hydrofilních [142] Stejně jako u většiny ostatních akceleračních látek, je i aktivita Azonu<sup>®</sup> výrazně závislá na jeho koncentraci. Největšího akceleračního účinku dosahuje v koncentraci 0,1 - 5 %, resp. 1 - 3 %. Na základě struktury Azonu<sup>®</sup> byla v následujících letech po jeho uveřejnění připravena řada analogů, nicméně Azon<sup>®</sup> vykazuje stále nejvyšší akcelerační aktivitu [142, 143].

Vzhledem k omezenému počtu dalších, takto účinných akceleračních látek, jsou v praxi zkoušeny také látky původně vyvinuté pro jiné účely. Jejich použití je omezené, nicméně pro určité skupiny léčiv mohou být jistou alternativou [120, 121, 139, 140, 144, 145, ]:

- Teoreticky by bezpečným a jednoduchým akceleračním prostředkem průchodu léčiv kůží mohla být i **voda**. Její obsah v lidské stratum corneum je za normálních podmínek okolo 15-20 % hmotnosti suché tkáně. Množství vody však za určitých podmínek může vzrůst až na 400 % této hmotnosti. Nicméně zde nelze zajistit kontinuální a definovaný přechod do systémového oběhu, protože mechanismus účinku není dobře znám.

- Akcelerační účinek byl prokázán u skupiny **sulfoxidů** a jejich analogů (dimethylsulfoxid, dimethylacetamid, dimethylformamid). Jako jeden z prvních a široce studovaných akceleračních látek této skupiny byl *dimethylsulfoxid* (DMSO), používaný ve farmaceutické praxi často jako „univerzální“ rozpouštědlo. Omezeně se používá při výrobě přípravků s idoxuridinem k léčbě herpetických infekcí kůže způsobených nejčastěji virem Herpes simplex. Na základě jeho vlastní farmakologické aktivity (protizánětlivý) se však od jeho používání ustupuje. Další nevýhodou je také fakt, že účinkuje pouze ve vysoké koncentraci (cca > 60 %), což vyvolává erytém a může způsobit denaturaci některých proteinů. Navíc je v organismu metabolizován na dimethylsulfid, který při vydechování nepříjemně zapáchá. V současnosti se proto používá pouze k léčbě zánětů ve veterinární léčbě. Ani další zmíněné analogy se v praxi neosvědčily pro podezření z poškozování struktury kůže.

- **Pyrolidony** a jejich deriváty byly studovány jako další nadějná skupina možných akcelerantů. Nejvíce se studie zaměřili na použití *1-methyl-2-pyrolidonu* a *2-pyrolidonu*. U obou zmíněných látek byla zjištěna zvýšená akcelerace látek hydrofilních, jako je mannitol, 5-fluorouracil, sulfaguanidin či lipofilních hydrokortisonu a progesteronu. Ačkoli pyrolidony dobře pronikají kůží a umožňují penetraci relativně širokého spektra účinných látek, jejich širší klinické užití je také výrazně limitováno jejich vedlejšími účinky.

- Klinického užití se dočkaly **mastné kyseliny**, které mohou být použity jako akceleranty například pro estradiol, progesteron, aciklovir, 5-fluorouracil či kyselinu salicylovou, tedy látky hydrofilní i lipofilní povahy. *Kyselina laurová* v propylenglykolu (PG) umožňuje penetraci i vysoce lipofilních antiestrogenů. *Kyselina olejová* vykazuje relativně široké spektrum účinku – např. salicylovou kyselinu, estradiol, tetrahydrokanabinol či 5-fluorouracil. Dobře prozkoumáno je její působení na základě jejího středového uspořádání Z, kterým narušuje organizované lipidové struktury, a tím zvyšuje jejich fluiditu. Stejně jako Azon<sup>®</sup>, i tato kyselina je účinnější při nižších koncentracích (nejčastěji < 10%). *Kyselina undecylenová* a *linolenová* jsou akceleranty analgetik-anodyn, *kyselina ikosapentaenová* se pak používá v přípravcích určených k léčbě bércových vředů.

- **Alkoholy, mastné alkoholy a glykoly** – *ethanol* jako zástupce alkoholů je běžně užíván v mnoha transdermálních přípravcích a je častým rozpouštědlem volby v případě náplastí. Ethanol rychle prostupuje lidskou kůží, ale jeho akcelerační schopnost se teprve zkoumá. Zatím je známo, že urychluje průnik levonorgestrelu, estradiolu, hydrokortisonu či 5-fluorouracilu potkaní kůží. Bylo zjištěno, že ethanol je nejúčinnější při koncentracích okolo 40 – 60 % a základem pro jeho akcelerační účinek je pravděpodobně delipidizace kůže. V případě mastných alkoholů (alkanolů) je potřebná jejich aplikace společně s PG v koncentračním rozmezí 1-10 %. Byl porovnán akcelerační účinek mastných alkoholů od oktanolu po myristylalkohol a nejvyšší aktivitu vykazoval *dekanol*. *Propylenglykol* je pak velmi často používán jako nosič pro akceleranty a vykazuje synergický účinek při jejich souběžném podání.

- Oba typy terpenů – **mono i seskviterpeny** umožňují zvýšení prostupnosti látek přes kůží a mohou narušovat nebo naopak zcelovat intercelulární lipidovou bariéru. Předpokládá se, že jejich mechanismus účinku je založen na zvýšení elektrické vodivosti tkání, čímž dojde k otevření polárních cest ve stratum corneum. Terpeny, potenciálně účinné jako akceleranty jsou např. *d-limonen*, *α-terpinol*, *karneol*, *karvon*, *menthol*, *menthol*, *askaridol* *1,8-cineol* či *limonen oxid*. Ze studií vyplývá, že monoterpeny vykazují vyšší akcelerační aktivitu než seskviterpeny. Také přítomnost polárních či nepolárních skupin ve struktuře terpenů má významný vliv pro spektrum penetrovatelných látek.

Terpeny obsahující pouze nepolární skupiny ve své struktuře (př. limonen) jsou lepšími akceleranty lipofilních látek, zatímco terpeny obsahující polární skupiny (př. menthol, 1,8-cineol) lépe penetrují látky hydrofilní povahy.

- Z dalších potenciálních akceleračních transdermální penetrace jsou studovány např. **surfaktanty**, které se často přidávají do přípravků kvůli zlepšení rozpustnosti jejich lipofilních součástí. Z tohoto lze usuzovat na pozitivní vliv pro akceleraci působením na lipidy stratum corneum. Další mohou být zástupci **L-aminokyselin**, zejména pro steroidní látky. Mechanismus účinku spočívá pravděpodobně v ovlivnění keratinové složky kůže. Jejich účinnost je však závislá na aktuální hodnotě pH vehikula, v němž jsou dispergovány. Také **deriváty ω-aminokyselin** jsou v současné době významně studovanou a účinnou skupinou akceleračních. Omezený vliv může mít také **močovina**, na základě jejich hydratačních schopností či spíše **její analogy** (cyklická močovina) studované pro akceleraci indometacinu. Existuje samozřejmě ještě mnoho dalších skupin látek, u kterých je akcelerační aktivita studována.

Jak vyplývá z výše uvedeného výčtu, v současné době je studováno velké množství látek, nicméně kromě univerzálního Azonu<sup>®</sup>, je jejich použití v praxi výrazně omezeno úzkým spektrem penetrovatelných látek, nežádoucími účinky či vlastní farmakologickou aktivitou. Z tohoto důvodu se na zavedení nového, univerzálního akceleračního čeká a výzkum i vývoj v této oblasti jde neustále kupředu. Tímto problémem se na začátku 90. let začala zabývat i Katedra anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, která připravila široké spektrum potenciálně účinných akceleračních, a byla objevena nová, nadějná skupina akceleračních, tzv. **transkarbamů** [146]. Jedná se o amoniové soli karbamových kyselin, vznikajících reakcí esterů kyseliny 6-aminohexanové s oxidem uhličitým. Nejnadějnějším a nejúčinnějším kandidátem této skupiny je transkarbam s 12-ti uhlíkovým postraním řetězcem – **transkarbam 12**, který byl v roce 2001 také patentován [147].



### 3.4.1.2 TRANSKARBAM 12

**Transkarbam 12** (T 12) - 5-(dodecyloxykarbonyl)pentylammonium-5-(dodecyloxykarbonyl) pentylkarbamát - je tedy nový a nadějný akcelerační transdermální penetrace. Jeho hlavní předností, oproti ostatním klinicky používaným akceleračním, je **schopnost penetrovat široké spektrum účinných látek** různých fyzikálně-chemických vlastností [148]. Dalším pozitivem je **nízká toxicita** a fakt, že v účinných koncentracích do 5% T 12 v PG **nevyvolává žádné podráždění pokožky**. Byla také **vyloučena jeho hepato- a nefrotoxicita**. Všem testům, které byly provedeny na základě patřičných směrnice OECD pro testování chemikálií, T12 vyhovoval [148, 149]. Nespornou výhodou T 12 je také jeho **metabolizace** na kyselinu ε-aminohexanovou a dodecylalkohol, což jsou látky se známou toxicitou a běžně používané v medicíně, resp. v kosmetice [120, 148].

Základem pro objevení T 12 byla syntéza dodecylesteru aminohexanové kyseliny (DDEAH), navržená jako acyklický analog nejúčinnějšího akceleračního, Azonu<sup>®</sup>. Nejprve byl akcelerační účinek přisuzován právě DDEAH, nicméně následně bylo zjištěno, že volné amino-skupiny v této molekule váží CO<sub>2</sub> a vzniká příslušná amoniová sůl karbamové kyseliny. Právě takto vzniklá polární část molekuly je pravděpodobně zodpovědná za vysokou akcelerační aktivitu, protože volné aminoestery, stejně jako CO<sub>2</sub> kovalentně vázané do polární části molekuly, jsou neaktivní. Pro akcelerační účinek je zřejmě klíčová i esterová vazba nepolárního řetězce [148, 150, 151, 152].

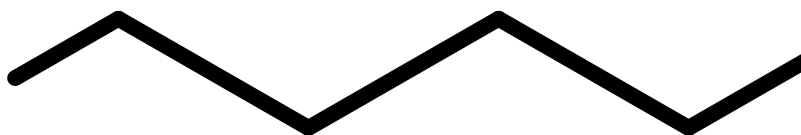
#### Fyzikálně-chemické vlastnosti T 12

- sumární vzorec:  $C_{37}H_{74}N_2O_6$
- molekulová hmotnost 642 g/mol
- teplota tání: 61 - 64 °C
- logP (Hyperchem): 9,2

*Obr. 34 Chemická struktura T 12*

- barva: bílá až slabě nažloutlá mikrokrytalická látka
- rozpustnost: beze změny struktury rozpustný v toluenu,  
špatně rozpustný v ethanolu a vyšších alkoholech,  
nerozpustný v étherech a uhlovodících

T 12 je velmi dobře rozpustný v chloroformu, kde však dochází k rozkladu soli karbamové kyseliny, uvolnění oxidu uhličitého a vzniku DDEAH (viz obr. 35). K tomuto rozkladu dochází také působením ultrazvuku, tepla či velmi slabých kyselin v bezvodém prostředí.



*Obr. 35 Schéma rozkladu T 12 na DDEAH.*

Předpokládá se, že právě tento proces je základem mechanismu účinku T 12. Přibližně 10% lipidů SC je tvořeno mastnými kyselinami a průměrná hodnota pH je cca 5,5. V tomto prostředí se tedy z polární části molekuly uvolní  $\text{CO}_2$  a molekula T 12 se ve SC rozloží. Uvolněný  $\text{CO}_2$  pak naruší vysoce organizovanou strukturu lipidových lamel SC na základě změny vodíkových vazeb mezi polárními částmi lipidů a konformačními změnami v molekule T 12. Výsledkem takového rozrušení lipidových lamel je následně snazší penetrace látek bariérou kůže [152].

T 12 byl popsán z hlediska fyzikálně-chemických vlastností, termodynamického chování i různými spektroskopickými metodami, nicméně jakákoli analytická metoda chyběla [147, 153, 154, 155]. Pro další hodnocení a především zavedení T 12 do praxe bylo tedy nutné vyvinout vhodnou chromatografickou metodu, která by umožnila hodnotit obsah a čistotu substance T 12. Popis analytického chování T 12, zjištění možných nečistot a následně vývoj a validace metod pro jejich hodnocení bylo hlavním cílem první části experimentální práce.

### 3.4.2 ANTIRETROVIROTIKA

V roce 1981 byly v USA poprvé popsány příznaky nového onemocnění, které později dostalo název **AIDS** - **Acquired Immune Deficiency Syndrome**. Dva roky poté byl vyizolován retrovirus, který je původcem nemoci a **způsobuje poškození imunitního systému s následnou ztrátou obranyschopnosti člověka** – podle toho byl také později nazván - **Human Immunodeficiency Virus (HIV)** [156].

Pro HIV, stejně jako pro ostatní retroviry, je charakteristická schopnost zabudovat svou genetickou informaci do genomu hostitelské buňky a vyvolat její chronickou, celoživotně přetrvávající infekci. Virová partikule HIV má průměr 110 nm a je tvořena fosfolipidovým obalem s glykoproteinovými výběžky a vnitřní strukturou – nukleoidem, který obsahuje genom HIV s dvěma identickými vlákny ribonukleové kyseliny (RNA). Kromě těchto základních struktur obsahuje také enzymy, především reverzní transkriptázu, která umožňuje replikaci viru v napadené hostitelské buňce. Virus HIV v organismu napadá především skupinu bílých krvinek, tzv.  $CD4^+$  T-lymfocyty, ve kterých se množí a později je zabíjí. Ztrátu těchto buněk, v důsledku trvalé replikace HIV, je organismus po určitou dobu schopen kompenzovat. Poté se ale jejich funkční rezerva vyčerpává a počet  $CD4^+$  T-lymfocytů začne klesat a dojde ke vzniku buněčného imunodeficitu. Bílé krvinky totiž hrají nezastupitelnou roli v obranyschopnosti lidského organismu a jejich výrazný pokles tak vede k selhání imunity a následnému rozvoji onemocnění AIDS. Lidský organismus tak začne být náchylný k řadě oportunních infekcí, tj. infekčních onemocnění, která postihují pouze pacienty s poruchou imunity, nebo nádorovým onemocněním (př. Kaposiho sarkom) [ , 157, 158].

V současné době jsou známy dva typy lidských virů způsobujících onemocnění AIDS, **HIV-1 a HIV-2**. Navzájem se liší nejen ve složení povrchových struktur, ale také geografickým výskytem, patogenitou, klinickým obrazem a některými epidemiologickými charakteristikami. **HIV-1** se vyskytuje převážně v Evropě a na americkém a asijském kontinentu, zatímco **HIV-2** zůstává lokalizován zejména v oblastech západního pobřeží Afriky a je zatím méně agresivní [156, 157].

Výzkumem a vývojem nových potenciálních antiretrovirotik se zabývá mnoho laboratoří po celém světě, nicméně zatím se nepodařilo nalézt účinné léčivo. Proto i přes veškeré snahy je AIDS i nadále na vzestupu a počet infikovaných i nemocných na celém světě roste. Vyplývá to z nejnovějších údajů Společného programu OSN pro AIDS (UNAIDS) a Světové zdravotnické organizace (WHO). Předpokládá se, že HIV pozitivních lidí je nyní na světě 39,5 milionu [159].

## Terapie HIV/AIDS

Prvním oficiálním antiretrovirotikem byl zidovudin, který byl objeven v roce 1985 a o dva roky později se začal rutinně užívat v klinické praxi. Zidovudin, označovaný též jako azidothymidin (AZT) tvoří nedílnou součást terapie dodnes.

Do klinické praxe bylo dosud zavedeno dalších 25 substancí, které mohou být použity při léčbě HIV infekce. Na základě mechanismu účinku byly rozděleny do následujících skupin [156, 160, 161]:

**Inhibitory reverzní transkriptázy** - reverzní transkripráza je jedním ze tří enzymů, který si tento virus nese ve své genetické výbavě a zajišťuje přepis virové RNA do DNA, která se následně integruje do lidské DNA. Tato skupina se na základě chemického složení dále dělí na tyto tři podskupiny:

- **Nukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NRTIs)** - zidovudin, didanosin, zalcitabin, stavudin, lamivudin, abacavir a emtricitabin.
- **Nenukleosidové inhibitory reverzní transkriptázy (NNRTIs)** - nevirapin, delavirdin, efavirenz, etravirin.
- **Nukleotidové inhibitory reverzní transkriptázy (NtRTIs)** – jediným zástupcem je tenofovir, který byl objeven v roce 1993 skupinou Prof. Holého.

Další skupinu tvoří **inhibitory protézy (PIs)** – saquinavir, ritonavir, indinavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir a darunavir.

V roce 2003 byl do praxe zaveden jediný zástupce tzv. **inhibitorů fúze (FIs)** – enfuvirtid, který znemožňuje průnik viru do T- lymfocytu. Jedná se o látku polymerní (polypeptidické) struktury, čímž nelze podávat perorálně, a proto musí být 2x denně aplikována parenterálně resp. subkutánně. Vzhledem k častému výskytu závažných vedlejších účinků a složité aplikaci se primárně používá až u pacientů, u kterých selhává ostatní farmakologická léčba.

Další skupinu tvoří **inhibitory integrázy (INIs)**, které inhibují včlenění virové DNA do buněčné nukleové kyseliny. Jediným zástupcem používaným v klinické praxi je raltegravir. Ve třetí fázi klinického zkoušení je v současné době elvitegravir. Poslední skupinou jsou **inhibitory ko-receptoru (CRIs)**, které mají v dnešní době také pouze jednoho zástupce – maraviroc. V klinické fázi zkoušení je také vicriviroc. Tyto poslední dvě zmíněné skupiny (INIs a CRIs) byly do klinické praxe uvedeny až v roce 2007.

**Velký přínos pro léčbu HIV infekce bylo v roce 1996 zavedení vysoce účinné antiretrovirové terapie (HAART) neboli kombinované terapie,** která je založená na užívání kombinace tří nebo více anitretrovirotik, které působí různými mechanismy účinku. V podstatě se jedná o analogii léčby tuberkulózy. Hlavním cílem takto zvolené terapie je potencovat efektivitu léčby, použitím různých léčiv, s různým mechanismem účinku. Tento přístup dovoluje redukovat u jednotlivých léčiv podanou dávku, což umožňuje snížit jejich toxický efekt i vedlejší účinky a v neposlední řadě také snížit riziko vzniku rezistence. Obecně je v HAART používáoa kombinace dvou nukleosidových inhibitorů reverzní transkriptázy a jednoho nenukleosidového inhibitoru reverzní transkriptázy popř. jednoho nebo dvou inhibitorů proteázy. Oproti roku 1996, kdy bylo nutné užívat až 20 tablet denně, v současné době existují kombinované léčivé přípravky, které umožňují užívání 1 tablety 1x denně. Došlo tak k výraznému zlepšení kompliance pacientů, a především k významnému snížení rizika vzniku rezistence. V současné době se proto antiretrovirotika podávají prakticky výhradně v režimu kombinované terapie [160, 162].

#### 3.4.2.1 EFAVIRENZ

Efavirenz (EFV) byl jako nový antiretrovirový přípravek pro dospělé a děti s HIV infekcí schválen FDA v roce 1998. Jedná se o (4S)-6-chlor-4-(2-cyclopropylethynyl)-4-(trifluormethyl)-1H-3,1-benzoxazin-2-on a působí jako NNRTI pouze na HIV-1. Je součástí kombinované terapie a dle „guidelines“ se nejčastěji používá v kombinaci s tenofovirem nebo zidovudinem a emtricitabinem nebo lamivudinem, především v počáteční antiretrovirové terapii. Kontrolované klinické studie s efavirenzem v kombinaci s inhibitory proteáz a nukleosidovými analogy inhibitorů reverzní transkriptázy po 24 týdnech léčby prokázaly snížení virové zátěže pod hranici zjistitelnosti testem, stejně jako zvýšení počtu CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů u nemocných, léčených jen nukleosidovými inhibitory reverzní transkriptázy [163, 164].

#### Fyzikálně-chemické vlastnosti [165, 166]:

- sumární vzorec:  $C_{14}H_9ClF_3NO_2$
- molekulová hmotnost: 315,7 g/mol
- teplota tání: 139-141°C

*Obr. 3 Chemická struktura EFV, převzato z ref. 165.*

- barva: bílý až narůžovělý krystalický prášek
- rozpustnost: prakticky nerozpustný ve vodě

Maximální plazmatické koncentrace dosahuje za 3 - 5 hodin a ustálená plazmatická koncentrace je dosažena během 6 - 7 dnů. Ve velké míře (99,5 - 99,75 %) se EFV váže na plazmatické proteiny (převážně albumin) lidské plazmy. Biotransformuje se převážně systémem cytochromu P450 na hydroxylované metabolity, které dále podléhají glukuronidaci. Tyto metabolity však proti HIV-1 nejsou účinné. Efavirenz má poločas vylučování 52 - 76 h po jednorázové dávce a 40 - 55 h po opakovaných dávkách. Efavirenz se dobře vstřebává ze zažívacího traktu. Mezi nejčastější vedlejší účinky patří vyrážka, závratě, nauzea, bolesti hlavy, únava. K vážným nežádoucím účinkům poté patří psychiatrické účinky (úzkost, deprese, sebevražedné sklony) a jeho teratogenita [163, 165].

K analytickému hodnocení EFV je nejčastěji užíváno metody HPLC s UV nebo MS detekcí. Vzhledem k tomu, že většina prací hodnotí EFV v biologickém materiálu, je upřednostněna metoda MS a MS/MS. Dostupné publikace se většinou zabývají analytickým hodnocením širší skupiny antiretrovirotik, vzhledem k časté terapii HAART, v určitém biologickém materiálu [167, 168, 169].

# **4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## **4.1 ANALYTICKÉ HODNOCENÍ TRANSKARBAMU 12**

Hlavní část experimentální práce byla věnována vývoji nových chromatografických metod pro hodnocení akcelerantu transdemální penetrace, transkarbamu 12 (T 12). Jedná se o zcela novou látku, která byla patentována v roce 2001. Vzhledem k tomu, že T 12 prošel všemi potřebnými testy předepsanými OECD pro testování chemikálií, „přiblížilo“ se také jeho možné zavedení do farmaceutické praxe, jako pomocné látky. K tomu však bylo nezbytné popsat T 12 také pomocí moderních analytických metod, a to především z hlediska čistoty a stability. Důležité je především detailně popsat profil nečistit, protože právě přítomnost nečistot (rozkladných produktů) znamená snížení kvality substance, a tím i snížení účinnosti.

Pro analytické hodnocení T 12 nebyla do roku 2004 dostupná žádná metoda. Vzhledem k jeho specifické struktuře i fyzikálně-chemickým vlastnostem, bylo potřebné vyvinout zcela nové chromatografické metody. Pro pilotní analytické hodnocení byla zvolena metoda TLC, která umožňuje rychlé a instrumentálně nenáročné hodnocení čistoty substance. Dále byla pozornost zaměřena na vývoj HPLC/UV, která je v takovýchto případech často metodou volby. Nicméně v případě T 12, který ve své struktuře neobsahuje chromofor a vykazuje pouze nevýraznou absorpenci v oblasti 210 nm, bylo nutné provést před vlastní analýzou derivatizaci. I když je podařilo vyvinout 2 derivatizační postupy (pomocí benzoyl chloridu a 3,5-dinitrobenzoyl chloridu), které umožnily T 12 detekovat v UV oblasti při 230 nm, metoda derivatizace často skýtá určité nevýhody. Jedná se především o časovou náročnost, zhoršenou reprodukovatelnost a nízkou citlivost.

Z tohoto důvodu bylo hlavním cílem další experimentální práce najít takový typ detekce, který by umožnil přímé hodnocení T 12. Jako vhodné alternativy se nabízely dvě detekční techniky, které nevyžadují přítomnost chromoforu v molekule analytu - Evaporating Light Scattering detektor a metoda hmotnostní spektrometrie (MS). Vzhledem k tomu, že MS detektor dosahuje vysokých citlivostí a umožňuje získat kromě standardních informací o analytu, také poznatky týkající se jeho struktury, byla pro další hodnocení zvolena metoda MS detekce. Další část experimentální práce proto byla zaměřena na vývoj a validaci HPLC/MS metody, vhodné pro hodnocení čistoty substance T 12. Vzhledem k tomu, že do té doby nebyly T 12, ani možné nečistoty, pomocí HPLC/MS popsány, jednalo se o kompletní vývoj nejen chromatografických podmínek pro spojení HPLC s MS detekcí, ale také popsání těchto látek pomocí MS a MS/MS spekter. V této části práce se podařilo pomocí MS objevit a charakterizovat novou nečistotu, která se v substanci objevila po inovaci syntetického postupu. Vyvinutá HPLC/MS metoda byla nakonec použita pro hodnocení T 12 a jeho případných nečistot, v průmyslové výrobě.



Problematika analytického hodnocení substance T 12 byla blíže popsána ve třech vědeckých publikacích, které jsou součástí této kapitoly. Na konci každé publikace je přiložen komentář, který blíže specifikuje postup a diskutuje dosažené výsledky.

**4.1.1 PRELIMINARY PHARMACEUTICO-ANALYTICAL  
EVALUATION OF TRANSKARBAM 12 USING LIQUID  
CHROMATOGRAPHY**

**Ivana Pasáková**, Jaroslav Sochor, Jiří Klimeš, Alexandr Hrabálek;

J. Sep. Sci., 29, (2006), 1695 - 1599

Ivana Pasáková<sup>1</sup>  
Jaroslav Sochor<sup>1</sup>  
Jiří Klimeš<sup>1</sup>  
Alexandr Hrabálek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Hradec Králové, Czech Republic

## Original Paper

### Preliminary pharmaceutico-analytical evaluation of Transkarbam 12 using liquid chromatography

This paper deals with the search for optimal conditions for the identification of Transkarbam 12 (T 12) as a substance used for acceleration of transdermal penetration. Such substances are used in cases when drugs do not pass through the skin barrier under normal conditions. Other advantages are that they do not irritate the digestive system, provide continuous administration to an organism, and reduce fluctuations of drug concentration in blood. TLC and HPLC were used for identification. In the case of TLC, Silufof UV<sub>254</sub> was used as stationary phase and the mobile phase consisted of chloroform, ethanol, and acetic acid. Detection was performed with iodine vapour. In the case of HPLC, the following three chromatographic columns were tested for the analysis of T 12: Silasorb SPH C 18, Silasorb SPH nitrile, and LiChrosorb Si-60. Because of the absence of any chromophore in the structure of T 12, work was performed on the derivatized compound. Detection was carried out at 230 nm. Quantification was studied on LiChrosorb Si-60 and the linearity, precision, and accuracy were evaluated.

**Keywords:** HPLC / TLC / Transdermal penetration / Transkarbam 12

Received: November 30, 2005; revised: March 28, 2006; accepted: March 30, 2006

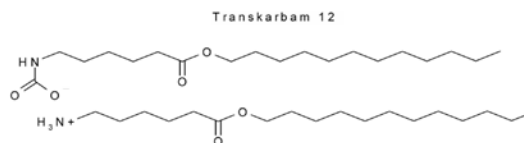
DOI 10.1002/jssc.200500468

## 1 Introduction

Transkarbam 12 is a new substance which belongs to the group of accelerants of transdermal penetration, also known as permeation enhancers. In recent years transdermal drug delivery has been increasingly used as a new approach for controlled drug administration [1]. Such enhancers are used in cases where drugs do not pass through the skin barrier under normal conditions. The effect is based on temporary modification of the skin barrier properties, thus permitting better penetration of drugs into an organism. Transdermal drug delivery (TDD) offers several advantages over traditional delivery methods, including injection and oral delivery [2]. For example, TDD avoids liver first-pass metabolism which can, in some cases, transform a high percentage of a drug into an inactive form.

**Correspondence:** Ivana Pasáková, Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.  
**E-mail:** ivana.pasakova@faf.cuni.cz  
**Fax:** +420-495-512-423

**Abbreviations:** Ak, ω-aminocaproic acid; BK, benzoic acid; D, dodecyl alcohol; D-T 12, derivatized T 12; T 12, Transkarbam 12; TDD, transdermal drug delivery.



**Figure 1.** Structure of Transkarbam 12.

This is also a problem addressed by Waiters *et al.* [3]. Reduction of fluctuations of drug concentration in blood is another advantage. Transdermal penetration can be also useful in reducing such systemic adverse actions in many cases (*e.g.*, in the case of piroxicam), as has been published in a paper by Doliwa *et al.* [4]. This can improve patient compliance.

T 12, the carbamic acid salt of ω-aminocaproic acid dodecyl ester (Fig. 1), was synthesized at our faculty as a white or yellowish microcrystalline substance which is slightly soluble in water and most organic solvents. The structure of the substance at room temperature was confirmed by IR and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra, as well as by elemental analysis and mass spectrometry [5]. Because T 12 is a new type of structure, only little is known about its properties and behaviour. Basic relationships between structure and activity of amphiphilic permeation enhancers with regard to their possible mechanisms of action

were described by Vávrová *et al.* [6]. The thermotropic phase behaviour of T 12 was elucidated by commonly used methods, such as differential scanning calorimetry (DSC), FT-Raman spectroscopy, FT-infrared spectroscopy (FTIR), X-ray powder diffraction, and dielectric relaxation spectroscopy [7].

Because there is a lack of any papers about the chromatographic behaviour of T 12, the aim of this preliminary study was to develop methods for its identification using liquid chromatography. The optimal conditions for TLC and HPLC methods were investigated. In TLC the separation of T 12 and its hydrolytic degradation products  $\omega$ -aminocaproic acid (Ak) and dodecylalcohol (D) was investigated. Because of the absence of any chromophore in the structure of T 12 and its indistinctive absorbance in the UV range, derivatization was needed for HPLC-UV determination. Identification of derivatized T 12 (D-T 12) was tested on three types of columns. Quantification of the benzoyl derivative of Transkarbam 12 was accomplished on the column with the best identification results.

## 2 Experimental

### 2.1 Chemicals

The T 12 standard was synthesized at our faculty, as well as the benzoyl derivative of T 12 and the benzoyl derivative of aminocaproic acid (D-Ak), and all structures were confirmed. Dodecyl alcohol (D) and  $\omega$ -aminocaproic acid (Ak) were obtained from Sigma Aldrich, Czech Republic. Methanol, ethanol, 2-propanol, chloroform, dioxane, dimethylformamide, isooctane, dichloromethane, hydrochloric acid, acetic acid, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and iodine were obtained from Lachema a.s. (Brno, Czech Republic). The derivatization reagent – benzoyl chloride – was purchased from Fluka (Sigma Aldrich, Czech Republic). 3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavone (Morin's agent) was also obtained from Lachema a.s. The water was purified by reverse osmosis.

### 2.2 TLC

Silufol UV<sub>254</sub> 15 × 15 cm TLC plates (Kavalier, Sázava, Czech Republic) were used for the separation of T 12, Ak, and D. A 10- $\mu$ L volume of each standard from the stock solution was spotted on the plate. The spots were dried and the plate was exposed to the mobile phase. The mixture of chloroform, ethanol, and acetic acid in a ratio 3:3:1, v/v/v was used as the mobile phase. The saturation time was 25 min and then the plate was placed in a glass chamber. The chromatogram was developed up to 12 cm and after exsiccation it was exposed to iodine vapours for detection of the spots.

### 2.3 UV spectra

A Specord UV-VIS (Carl Zeiss, Jena, Germany) was used for measuring the UV spectra of the substances. The solvent used for measuring UV spectra was 0.1 M hydrochloric acid and methanol.

### 2.4 HPLC

All the HPLC analyses were recorded on a system which consisted of a SP 8700 solvent delivery system (Spectra Physics, Santa Clara, CA, USA), a Spectra 100 UV detector (Thermo Separation Products, Santa Clara, CA, USA), and an SP 4100 integrator from Spectra Physics. The samples were injected onto an analytical column using a 10- $\mu$ L loop (Rheodyne, Cotati, CA, USA).

Separations were performed on the three following columns: Silasorb SPH C 18, 250 × 4 mm id, particle size 7.5  $\mu$ m (Lachema, Brno, Czech Republic), Silasorb SPH nitrile, 250 × 4 mm id, particle size 7.5  $\mu$ m (Lachema, Brno, Czech Republic), and LiChrosorb Si-60, 250 × 4.6 mm id, particle size 5  $\mu$ m (Spectra Physics, Santa Clara, CA, USA) and kept at 25 °C.

Phosphate buffer pH 7.0 which was used for analyses on two types of columns (SPH C 18 and SPH nitrile) was prepared: 41.3 mL of potassium dihydrogenphosphate 0.066 mol/L and 58.7 mL of disodium hydrogenphosphate 0.066 mol/L.

Samples for HPLC were prepared by dissolving an exact amount of pure substance in an appropriate volume of mobile phase.

## 3 Results and discussion

### 3.1 TLC

TLC was used as the first step for the identification of T 12. A suitable mobile phase for analysis on Silufol was sought. Because T 12 can generate two hydrolysis products, Ak and D, these two standards were also spotted on the TLC plates and analyzed.

The chromatographic behaviour of T 12 is atypical. The failure of T 12 on Silufol UV<sub>254</sub> to quench fluorescence made detection problematical. Thus the following two detection methods were used: (i) the TLC chromatogram was spattered with Morin's agent and detection performed under a UV lamp at 366 nm; (ii) detection with iodine vapours was also possible, giving rise to yellow or yellow-brown marks. The structural formula indicated a lipophilic character of T 12, as is also evident from its good solubility in chloroform and very low solubility in methanol. However, in TLC T 12 stays at the start on silica gel with chloroform/methanol 9:1 v/v as mobile phase. Many solvents – chloroform, methanol, dioxane, dimethylformamide, 2-propanol, *etc.* – in different ratios

were tested for optimal separation. A mobile phase consisting of chloroform/ethanol/acetic acid (3:3:1; v/v/v) was found to give optimal results. Under these conditions optimal identification of T 12 and simultaneously optimal separation of T 12 and its hydrolysis products Ak and D were attained.

After spotting on the Silufol UV<sub>254</sub> plate, development in the mobile phase, and detection with iodine vapours the following retention factors ( $R_F$ ) were found: T 12 -  $R_F = 0.45$ , Ak -  $R_F = 0.28$ , D -  $R_F = 0.88$ .

### 3.2 HPLC

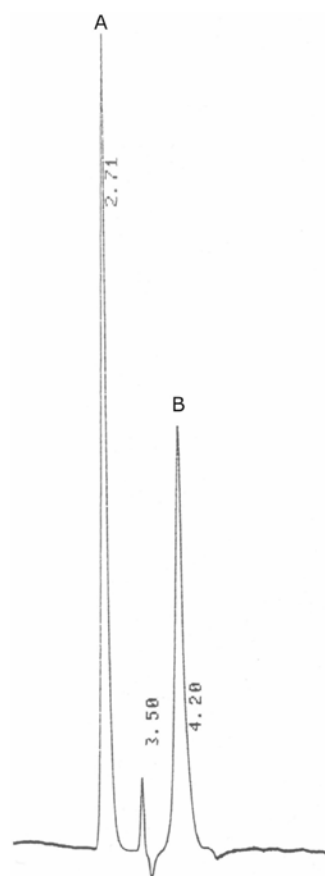
As can be seen in Fig. 1, T 12 itself is unsuitable for UV detection because of the absence of any chromophore in its structure. T 12 has its highest absorbance at 203 nm. Thus derivatization with benzoyl chloride was carried out to assure a better detection limit of T 12 in the UV region for HPLC analysis. The absorption maximum of derivatized T 12 shifted to 230 nm and measurement was performed at this wavelength.

During the preparation of the derivatization mixture an excess of benzoyl chloride had to be added because of quantitative reaction. Benzoic acid (BK) was therefore generated as a reaction by-product during derivatization. Thus the next aim of this study, besides HPLC chromatographic identification of D-T 12, was also the separation of D-T 12 and BK.

The three types of columns and their influence on the identification of D-T 12 and the separation of D-T 12 and BK were tested. Silasorb SPH C 18, Silasorb SPH nitrile, and LiChrosorb Si-60 were tried. Optimal chromatographic conditions were sought for all three column types. Various types of mobile phases, ratios, and values of pH of the aqueous component of the mobile phase were tested for the optimization and the results were compared.

Silasorb SPH C 18 (250 × 4 mm id; 7.5 μm) was tested first. A mobile phase containing methanol/phosphate buffer pH 7.0 in a ratio of 7:3 v/v was found to be the optimal one. The flow rate was 0.5 mL/min and 10 μL of the sample was injected into the chromatographic system. Measurement proceeded at 230 nm. Under these conditions, separation of D-T 12 and BK was sufficient. The retention time of BK was  $t_R = 2.7$  min and for D-T 12 it was  $t_R = 4.2$  min, see Fig. 2.

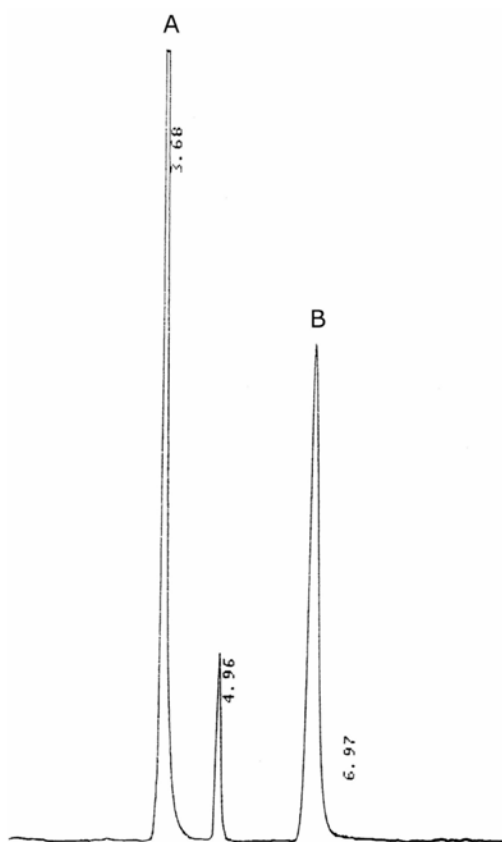
Silasorb SPH nitrile (250 × 4 mm id; 7.5 μm) was the second type of column tested. Mobile phase consisting of methanol and phosphate buffer pH 7.0 in a ratio of 1:4 v/v was used and the separation was also optimal. The flow rate was 0.5 mL/min and the chromatogram was detected at 230 nm. The ascertained retention times were:  $t_{R(BK)} = 3.7$  min and  $t_{R(D-T 12)} = 7.0$  min, see Fig. 3.



**Figure 2.** HPLC chromatogram of separation of (A) benzoic acid and (B) derivatized T 12 on the Silasorb SPH C 18 column. A mobile phase composed of methanol and phosphate buffer pH 7.0 in a ratio of 7:3 v/v was used and the flow rate was 0.5 mL/min. The chromatogram was detected at 230 nm.

Figure 4 shows the chromatogram of the third type of column, *i.e.*, LiChrosorb Si-60 (250 × 4.6 mm id; 5 μm). A mobile phase containing isooctane, dichloromethane, and methanol in a ratio of 120:100:10 v/v/v was chosen as the best. The flow rate was 1 mL/min and the detection wavelength was 230 nm. Optimal separation of both substances was obtained and these  $t_R$  values were measured:  $t_{R(D-T 12)} = 3.7$  min and  $t_{R(BK)} = 6.0$  min.

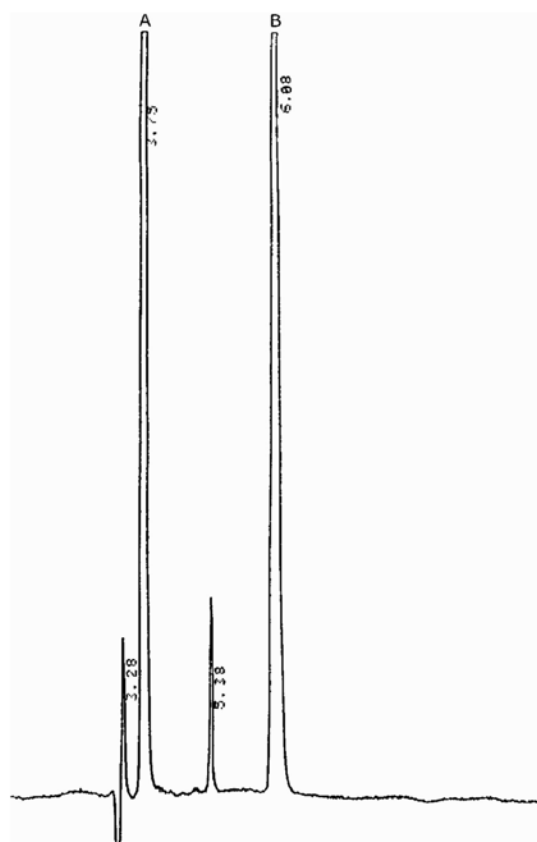
The first two columns – Silasorb SPH C 18 and Silasorb SPH nitrile – afforded very similar separation results. The only difference between these two columns was in the retention time. On the SPH C 18 the retention time of BK was about one minute shorter than on the SPH nitrile ( $t_{R(BK(1))} = 2.7$  min and  $t_{R(BK(2))} = 3.7$  min). The prolongation of the retention time of D-T 12 on the second column was more visible:  $t_{R(D-T 12(1))} = 4.2$  min and in the case of SPH



**Figure 3.** HPLC chromatogram of separation of (A) benzoic acid and (B) derivatized T 12 on the Silasorb SPH nitrile column. The mobile phase contained methanol/phosphate buffer pH 7.0 in a ratio of 1:4 v/v and the flow rate was 0.5 mL/min. The chromatogram was detected at 230 nm.

nitrile it was  $t_{R(D-T 12/2)} = 7.0$  min. The third type of column was LiChrosorb Si-60. The separation of D-T 12 and BK under the optimal conditions was also sufficient. There was reverse elution of the substances – D-T 12 was eluted first ( $t_{R(D-T 12)} = 3.7$  min) and then BK ( $t_{R(BK)} = 6.0$  min).

From this standpoint, all three columns can be used for the identification of D-T 12 and the separation from BK, because the separation was satisfactory under all conditions. In view of the fact that another study on the evaluation of degradation products of T 12 will very probably follow, separation of D-Ak was examined under the optimal conditions for each column. The first (C 18) and the second type (CN) of column were unsuitable because the elution of D-Ak proceeded at very low retention time and the separation between D-Ak and BK was therefore insufficient. However, on the third type of column (Si-60) separation of D-T 12, BK, and D-Ak was very good under optimal conditions with isooctane, dichloromethane, and



**Figure 4.** HPLC chromatogram of separation of (A) derivatized T 12 and (B) benzoic acid on the LiChrosorb Si-60 column. The mobile phase was composed of isooctane/dichloromethane/methanol in a ratio 120:100:10 v/v/v. The flow rate was 1.0 mL/min and the chromatogram was detected at 230 nm.

methanol. These conditions were efficient also for subsequent studies of this hydrolysis product of T 12. The retention times ( $t_R$ ) were: D-T 12 = 3.8 min, BK = 6.1 min, and D-Ak = 18.7 min. For this reason, quantification of D-T 12 was studied on the LiChrosorb Si-60 column.

### 3.3 Study of quantification

This study was performed under the chromatographic conditions described above (Fig. 4) and D-T 12 was determined. The linearity response for D-T 12 was studied using five working standards injected three times in the range of 0.8–1.5 mg/mL. The following regression equation was obtained:  $y = 1569x + 2869$  as the dependence of the ratio of the areas of the peak of substance ( $y$ ) on concentration ( $x$ ). The correlation coefficient was 0.9955. The LOD was determined as the sample concentration resulting in a peak three times higher than the background

**Table 1.** Results of parameters for linearity, precision, and accuracy.

Concentration added (mg/mL)	Concentration found (mg/mL) (mean $\pm$ SD)	Precision RSD (%)	Accuracy (%)
0.8	0.78 $\pm$ 0.025	3.21	97.5
1.0	1.01 $\pm$ 0.028	2.77	101.0
1.2	1.22 $\pm$ 0.032	2.66	101.7
1.4	1.39 $\pm$ 0.034	2.45	99.3
1.5	1.48 $\pm$ 0.036	2.46	98.7

and was determined by the analysis of background in 10 blank samples. An LOD of 7  $\mu$ g/mL was obtained. The LOQ was defined as a peak ten-times higher than the background. The LOQ was 25  $\mu$ g/mL.

The precision of an analytical procedure is usually expressed as the variance, standard deviation, or coefficient of variation of a series of measurements. RSD was not higher than 3.3% at all analyzed concentrations. According to the International Conference on Harmonization, the accuracy of an analytical procedure expresses the closeness of agreement between the value which is accepted either as a conventional true value or as an accepted reference value and the value found (<http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>, November 2005). All parameters are shown in Table 1.

#### 4 Concluding remarks

This preliminary study of Transkarbam 12, a new substance used as an accelerant of transdermal penetration, deals with the determination of the optimal conditions for identification of T 12 using TLC and HPLC. TLC is a fast and simple method which can be used both for the identification of T 12 and also for the purity and stability evaluation of the presence of its hydrolytic degradation products –  $\omega$ -aminocaproic acid and dodecyl alcohol. The optimal conditions were found for the separation of T 12, Ak, and D on Silufol UV<sub>254</sub>. In HPLC three types of columns – Silasorb SPH C 18, Silasorb SPH nitrile, and LiChrosorb Si-60 – were tested for optimal identification of T 12. Because T 12 shows only indistinct absorbance in the UV region, a derivative of T 12 had to be used for HPLC analysis. The optimal conditions for the identifica-

tion of the benzoyl derivative of T 12 and simultaneous separation from benzoic acid generated during the derivatization process were found for all the columns used. On LiChrosorb Si-60 it was also possible to accomplish qualitative separation of T 12, BK, and the hydrolysis product of D-T 12 – D-Ak. Finally, a quantitative study was performed on this column and under these conditions all the parameters were satisfactory.

This work was supported by the research project of the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic No. 0021620822.

#### 5 References

- [1] Büyükcimkin, N., Büyükcimkin, S., Rytting, J. H., in: Ghosh, T. K., Phister, W. R. (Eds.), *Transdermal and Topical Drug Delivery System*, Interpharm Press, Buffalo Grove, Illinois, 1997, pp. 357–367.
- [2] Zhang, H. Y., Yeo, S. H., *Sens. Actuators A* 2004, 115, 133–139.
- [3] Waiters, D. L., Strong, C. R., Green, S. V., Curtis, M. A., *J. Chromatogr. B* 1995, 670, 299–307.
- [4] Doliwa, A., Santoyo, S., Campanero, M. A., Ygartua, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 26, 531–537.
- [5] Hrabálek, A., Doležal, P., Farsa, O., Krebs, A., Kroutil, A., Roman, M., Škubalová, Z.,  *$\omega$ -Amino Acid Derivatives, Processes of Their Preparation and Their Use*, U.S. Pat. 6 187 938, 2001.
- [6] Vávrová, K., Zbytovská, J., Hrabálek, A., *Curr. Med. Chem.* 2005, 12, 2273–2291.
- [7] Zbytovská, J., Raudenkolb, S., Wartewig, S., Hubner, W., Rettig, W., Pissis, P., Hrabálek, A., Doležal, P., Neubert, R., *Chem. Phys. Lipids* 2004, 129, 97–109.

## **KOMENTÁŘ K PRÁCI**

Tato práce je pilotní studií zaměřenou na vývoj prvních chromatografických metod (TLC, HPLC) pro analytické hodnocení T 12. V době, kdy byla vypracována, nebyla publikována žádná analytická metoda, která by se hodnocením tohoto nového akcelerantu zabývala. Vzhledem k tomu, že molekula T 12, jakož i potenciální rozkladné produkty (AH a D), ve své struktuře neobsahují chromofor, který by umožňoval detekci v UV oblasti, bylo potřeba nejprve převést uvedené analyty na vhodné deriváty. Vlastní derivatizace pomocí benzoyl chloridu byla provedena již dříve na katedře Anorganické a organické chemie (Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové – FaF UK). Příslušné deriváty (D-T 12, D-AH a D-D) byly identifikovány pomocí NMR a dále použity jako standardy při vývoji analytických metod.

### **CÍL PRÁCE:**

- Vyvinout metodu TLC, která by umožnila identifikaci T 12 a jeho separaci od dvou hydrolytických rozkladných produktů - 6-aminohexanové kyseliny (AH) a dodekanolu (D)
- Vyvinout HPLC/UV metodu vhodnou pro analytické hodnocení T 12 a následně určit parametry linearitu, přesnosti a správnosti této metody

### **KOMENTÁŘ A DISKUZE K VÝSLEDKŮM:**

Pro první hodnocení byla zvolena metoda TLC, která umožňuje rychlou identifikaci D-T 12 (derivatizovaný T 12) a jeho separaci od dvou potenciálních hydrolytických rozkladných produktů – D-AH a D-D. Jako stacionární fáze byla zvolena TLC deska Silufol UV<sub>254</sub>. Složení mobilní fáze bylo optimalizováno tak, aby bylo dosaženo dostatečné separace všech analytů (T 12, D-AH a D-D.). Jako nejvhodnější byla vybrána mobilní fáze o složení - chloroform/ethanol/kyselina octová (3/3/1, v/v/v). Vzhledem k tomu, že T 12 ani AH a D na TLC desce nezháší fluorescenci, musel být vyvinut alternativní způsob, který by jejich detekci umožnil. Tento problém se podařilo překlenout nspecifickou detekcí parami jódu, při které dochází k žlutému až žluto-hnědému zbarvení skvrn všech hodnocených látek. Použitelná je také detekce postřikem TLC chromatogramu Morinovým činidlem (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon) s následnou detekcí pod UV lampou při 366 nm. Při tomto způsobu však byla obtížnější detekce D.



**Vyvinuté podmínky pro TLC:**

Stacionární fáze:	Silufol UV <sub>254</sub>
Mobilní fáze:	chloroform/ethanol/kyselina octová – 3/3/1 (v/v/v)
Detekce:	páry jódu
Retenční faktor:	D-AH = 0,28; D-T 12 = 0,45; D-D = 0,88

Další metodou, která byla vyvinuta pro analytické hodnocení T 12 (resp. D-T 12), byla metoda HPLC/UV. V této části práce byla věnována pozornost především vývoji chromatografických podmínek, jenž by umožnily separovat D-T 12 od vedlejších produktů derivatizační reakce. Byly vyzkoušeny 3 typy chromatografických kolon, se stacionární fází o různé polaritě: **Silasorb SPH C18** (250 x 4 mm I.D., 7,5 µm) byla vybrána jako zástupce reverzních fází s nepolární stacionární fází, **Silasorb SPH nitril** (250 x 4 mm I.D., 7,5 µm), jako středně polární stacionární fáze a nakonec **LiChrosorb Si-60** (250 x 4,6 mm I.D., 5 µm) - polární stacionární fáze pro analýzu v módu normálních fází. U všech tří testovaných kolon se podařilo nalézt chromatografické podmínky, které umožňují separaci D-T 12 a vedlejších produktů derivatizace.

Protože se však předpokládalo, že budou následovat studie zaměřené na hodnocení rozkladných produktů T 12, byla na každou z uvedených kolon za optimálních podmínek nastříknuta také nečistota D-AH. Jedná se o polární látku, čemuž odpovídaly také dosažené výsledky. V případě prvních dvou kolon (**Silasorb SPH C18**, **Silasorb SPH nitril**) byl retenční čas AH velmi krátký, popř. docházelo ke koeluci s vedlejšími produkty derivatizace. V případě kolony **LiChrosorb Si-60** bylo dosaženo dostatečné separace, protože se nečistota D-AH, vzhledem ke své polaritě a užitém módu separace, eluovala až za oběma píky (D-T 12 i vedlejších produktů derivatizace). Z tohoto důvodu byla pro následné analytické hodnocení T 12 vybrána právě kolona LiChrosorb Si-60. K optimální separaci D-T 12, vedlejších produktů derivatizace i nečistoty D-AH došlo za použití mobilní fáze isooktan/dichlormethan/methanol 120/100/10, (v/v/v), při průtoku 1 ml/min. Následně byla hodnocena linearita, přesnost a správnost metody. Linearita metody byla potvrzena v koncentračním rozmezí 0,8 – 1,5 mg/ml s korelačním koeficientem 0,9955. Přesnost metody, při nástřiku 5 nezávisle připravených vzorků, nepřesáhla RSD 3,3 % a správnost, resp. recovery metody byla v rozmezí 97,5 % -101,7 %. Dále byl určen limit detekce LOD = 7 µg/ml a limit kvantifikace LOQ = 25 µg/ml.

**Finální podmínky pro HPLC:**

Chromatogr. kolona: LiChrosorb Si-60 (250 x 4,6 mm I.D., 5 µm)

Mobilní fáze: isooktan/dichlormethan/methanol – 120/100/10 (v/v/v)

Průtok: 1 ml/min

Detekce: UV při 230 nm

Retenční čas: D-T 12 = 3,7 min; vedlejší produkty derivatizace = 6,1 min;

D-AH = 18,7 min

**ZÁVĚR:**

V této práci byly vyvinuty dvě chromatografické metody (TLC a HPLC) vhodné pro analytické hodnocení T 12 po jeho převedení na benzoyl derivát. Vyvinutá TLC metoda je vhodná pro rychlé a jednoduché hodnocení čistoty a stability T 12. Metoda HPLC/UV poté umožňuje separovat T 12 (resp. D-T 12) od vedlejších produktů derivatizace i hydrolytického rozkladného produktu (D-AH). Vyvinutá metoda vyhovuje požadavkům na linearitu, přesnost a správnost.

**4.1.2 OPTIMIZATION OF HPLC CHROMATOGRAPHIC  
CONDITIONS FOR DETERMINATION OF TRANSKARBAM  
12 AND ITS DEGRADATION PRODUCTS**

**Ivana Pasáková**, Jiří Klimeš, Jaroslav Sochor, Alexandr Hrabálek,

J. Pharm. Biomed. Anal. 42 (2006) 136 – 142

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 42 (2006) 136–142

JOURNAL OF  
PHARMACEUTICAL  
AND BIOMEDICAL  
ANALYSIS[www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)

Short communication

## Optimization of HPLC chromatographic conditions for determination of Transkarbam 12 and its degradation products

I. Pasáková<sup>a,\*</sup>, J. Klimeš<sup>a</sup>, J. Sochor<sup>a</sup>, A. Hrabálek<sup>b</sup><sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic<sup>b</sup> Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Received 25 October 2005; received in revised form 9 March 2006; accepted 14 March 2006

Available online 22 May 2006

### Abstract

This paper deals with searching of HPLC chromatographic conditions for determination and separation of Transkarbam 12 (T 12) and its two main degradation products ( $\omega$ -aminocaproic acid and dodecylalcohol). T 12 is a new substance which belongs to the group of accelerators of transdermal penetration. Chromatographic separation was achieved using Separon SGX C18 analytical column (150 mm  $\times$  3 mm i.d.; 5  $\mu$ m). Mobile phase contained acetonitrile and sodium acetate buffer pH 4.5 at the flow rate of 1 ml/min. Separation was carried out under the conditions of gradient elution. After the modification of the structure by derivatization reagent (3,5-dinitrobenzoyl chloride) detection at wavelength 230 nm was realized. The aim of this study was not only the optimization of the separation of derivatization reagent and derivatized T 12, Ak and D but also optimal derivatization processes for all three substances.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Transkarbam 12; Transdermal penetration; 6-aminocaproic acid; Dodecylalcohol; RP-HPLC; Derivatization

### 1. Introduction

Transkarbam 12 (T 12) is a new substance which was synthesized in our Faculty at the Department of Inorganic and Organic Chemistry. The structure of the substance at room temperature was confirmed by infrared, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra, as well as by elemental analysis and mass spectrometry [1]. T 12 is 5-(dodecyloxycarbonyl)pentylammonium-5-(dodecyloxycarbonyl)pentylcarbamate (see Fig. 1). It is a white or yellowish microcrystalline substance slightly dissolvable in water and most of organic solvents. The relationships between structure and activity of amphiphilic permeation enhancers with regard to their possible mechanisms of action were described by Vávrová et al. [2]. To elucidate the thermotropic phase behaviour of T 12, common methods were used, such as differential scanning calorimetry (DSC), FT-Raman spectroscopy, FT-infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray powder diffraction, and dielectric relaxation spectroscopy [3].

T 12 belongs to a group of accelerants of transdermal penetration or also called permeation enhancers. In recent years transdermal drug delivery is more using for new approach to controlled drug administration [4]. The effect of these substances is based on temporarily modification of the skin barrier properties and after it causes better penetration of drugs to an organism. So they are used in cases when drugs at normal conditions do not pass through the skin barrier.

There are some important advantages against the other types of applications as per-oral or injective. It is mainly avoidance of first-pass metabolism by the liver which can in some cases change a drug to an inactive form in a high percentage. Then the doses of the substances must be much higher and it is more encumbering for an organism. Another advantage is a reduction of side effects and reduction of fluctuations of drug concentration in blood [4]. They are widely used in cases of adverse effects to gastrointestinal tract.

The structure of T 12 shows that there is a possibility to generation of hydrolytic degradation products  $\rightarrow$   $\omega$ -aminocaproic acid and dodecylalcohol (Fig. 1). These two substances are also the starting substances for synthesis of Transkarbam 12 and therefore this study was aimed to these two. There exist no ana-

\* Corresponding author. Tel.: +420 495 067 236; fax: +420 495 512 423.  
E-mail address: [ivana.pasakova@faf.cuni.cz](mailto:ivana.pasakova@faf.cuni.cz) (I. Pasáková).

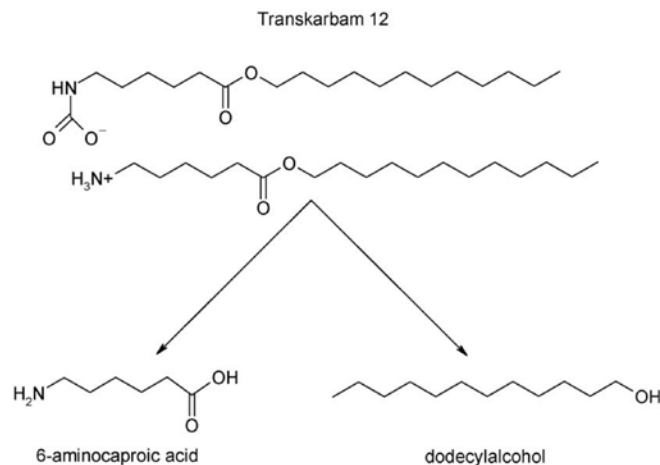


Fig. 1. Figures of the structure of Transkarbam 12 and its degradation products—dodecylalcohol and  $\omega$ -aminocaproic acid.

lytical study about T 12 and its degradation products. Because of absence of any chromophore in the structures of substances derivatization processes were needed [5,6]. Thus the aim of this study was to develop optimal HPLC chromatographic conditions in which all three substances and derivatization reagent would be separated. Also derivatization processes for all three substances had to be developed.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals

The standard of Transkarbam 12 (T 12) and standards derivatized by 3,5-dinitrobenzoyl chloride of T 12, Ak and D (D–T 12, D–Ak and D–D) were synthesized at the Department of Inorganic and Organic Chemistry at our Faculty and their structures were confirmed. Standards of  $\omega$ -aminocaproic acid (Ak) and dodecylalcohol (D) were obtained from Sigma-Aldrich (Czech Republic). Acetonitrile, methanol, acetic acid, sodium acetate buffer and chloroform were obtained from Lachema a.s. (Brno, Czech Republic). Derivatization reagent 3,5-dinitrobenzoyl chloride (3,5-DNBC) and triethylamine (TEA) were purchased from Fluka (Sigma-Aldrich, Czech Republic). The water was purified using reverse osmosis.

### 2.2. Chromatographic conditions

#### 2.2.1. Apparatus

The isocratic analyses were recorded on a chromatographic system (Thermo Separation Products Inc., Riviera Beach, USA) which consisted of an isocratic pump (Costametric 3500), an autosampler (AS 1000) and a UV–vis detector (UV 3000 HR). The HPLC data were processed with SpectraSystem Software-PC 1000 operated under the control of OS/2 Warp operation system.

The gradient analyses were recorded on a chromatographic system series HP 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) which consisted of a HP 1100 series binary pumping system, a vacuum degasser, a thermostated column compartment, a variable wavelength detector and an autosampler. The chromatographic data using HP Chemstation (Agilent technologies) were processed.

UV–vis Spectrophotometer UV-2401 PC (Shimadzu, Duisburg, Germany) was used for measuring UV spectra of the substances. The results on PC with UVPC-Personal Spectroscopy Software were compiled.

#### 2.2.2. HPLC conditions

Separations for isocratic and also for gradient elution were performed on a Separon SGX C18 analytical column (150 mm  $\times$  3 mm i.d.; 5  $\mu$ m particle size) and kept at 25  $^{\circ}$ C. The flow rate was 1 ml/min in all experiments and 20  $\mu$ l sample volumes into the chromatographic system were injected. Wavelength used for the detection was 230 nm.

*Isocratic elution:* Mobile phases for isocratic elution were composed of mixture of acetonitrile and water in various ratios. The mobile phase with acetonitrile and 1% aqueous acetic acid was also tried in different ratios.

*Gradient elution:* The final mobile phase for gradient elution contained acetonitrile and 20 mM sodium acetate buffer pH 4.5 (adjusted with 10% acetic acid).

Gradient scheme of the analysis

Time (min)	20 mM sodium acetate buffer, pH 4.5 (%)	Acetonitrile (%)
0–7	70	30
7–12	70 $\rightarrow$ 20	30 $\rightarrow$ 80
12–25	20	80
25–30	20 $\rightarrow$ 70	80 $\rightarrow$ 30
30–35	70	30

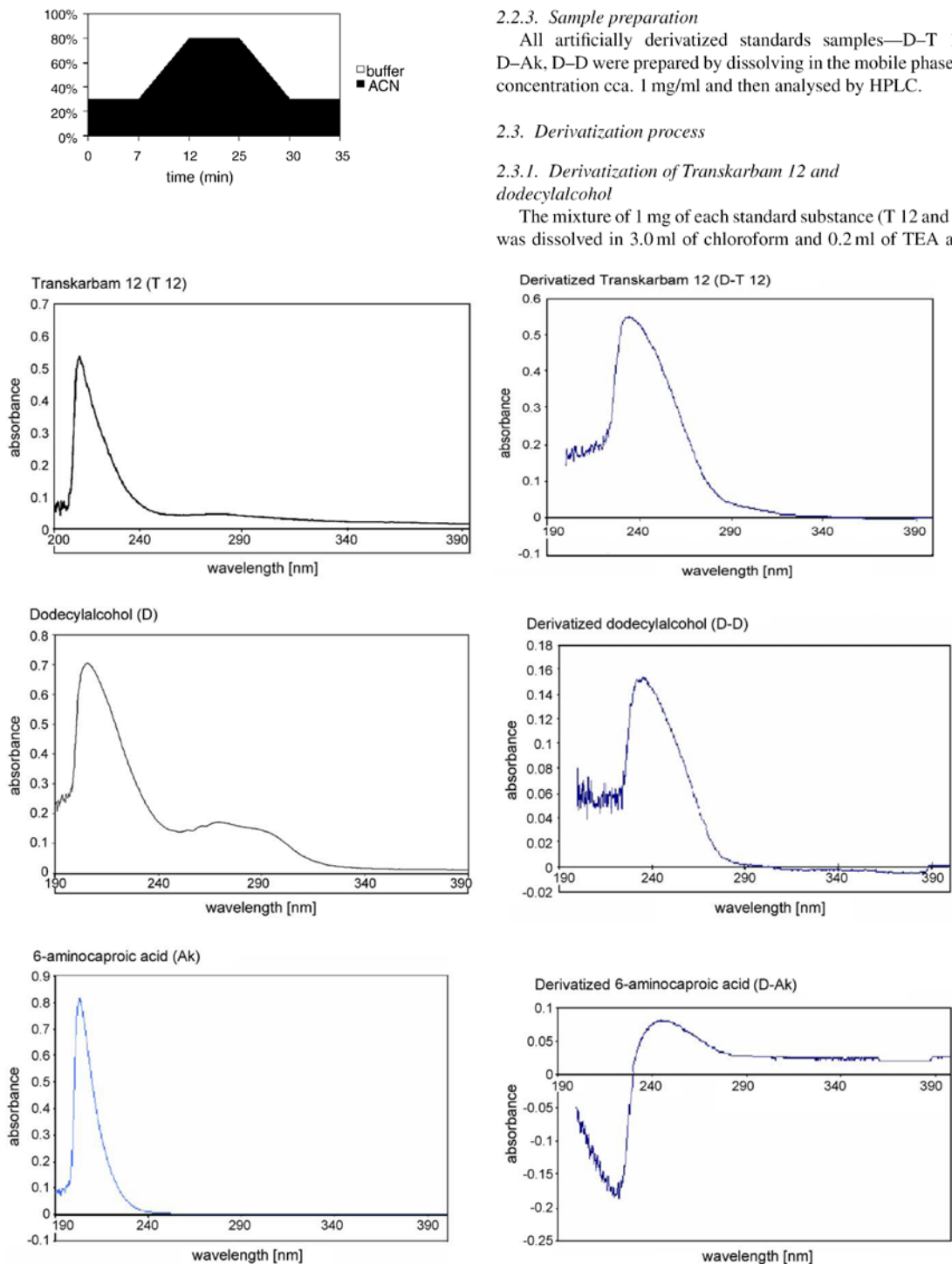


Fig. 2. Differences between UV-spectra of standards of Transkarbam 12,  $\omega$ -aminocaproic acid, dodecylalcohol and their standards of derivatized substances.

### 2.2.3. Sample preparation

All artificially derivatized standards samples—D-T 12, D-Ak, D-D were prepared by dissolving in the mobile phase in concentration cca. 1 mg/ml and then analysed by HPLC.

### 2.3. Derivatization process

#### 2.3.1. Derivatization of Transkarbam 12 and dodecylalcohol

The mixture of 1 mg of each standard substance (T 12 and D) was dissolved in 3.0 ml of chloroform and 0.2 ml of TEA and

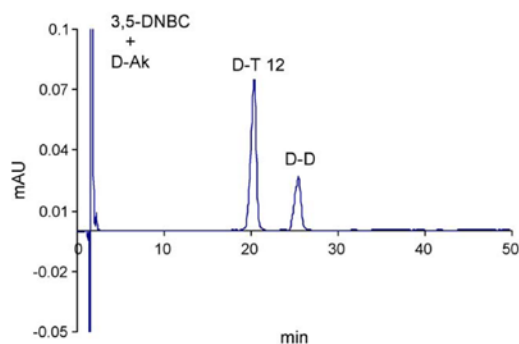


Fig. 3. Chromatogram of the separation of 3,5-DNBC; D-Ak; D-T 12 and D-D under isocratic conditions with mobile phase consisting of acetonitrile–water–acetic acid in a ratio 80:20:1 (v/v/v). The flow rate was 1 ml/min.

after that 20.0 mg of 3,5-DNBC were added. Heating in a water bath at 65 °C for 30 min followed. In the end the sample was evaporated to dryness by nitrogen stream and then dissolved in 1 ml of mobile phase and analysed by HPLC.

### 2.3.2. Derivatization of $\omega$ -aminocaproic acid

The principle of the derivatization of Ak was the same as for T 12 and D. One milligram of the substance was dissolved—the only difference was another used solvent. Methanol was used in place of chloroform.

## 3. Results and discussion

### 3.1. UV-spectra

HPLC analysis of Transkarbam 12 in itself was not possible because of absence of chromophore in its structure. Also its degradation products (Ak and D) have no chromophore. The absorbance of T 12, D and Ak were about 210 nm. The derivatization using 3,5-dinitrobenzoyl chloride (3,5-DNBC) was carried out for better detection limits of all three substances in the UV-area because at this wavelength absorb a lot of others substances. The absorption maximum for derivatized T 12 (D-T 12) was shifted to 230 nm. Absorbance of derivatized degradation products were also about 230 nm. At this wavelength all compounds studied show a sufficient absorption. All spectra of non-derivatized and derivatized substances are shown at Fig. 2.

### 3.2. Isocratic or gradient elution

As the first step of optimization of conditions for separation (3,5-DNBC, D-T 12, D-Ak and D-D) isocratic elution was chosen. Mobile phase containing acetonitrile and water or 1% aqueous acetic acid in the ratio 80:20 (v/v) was tried. Separation of D-T 12 and D-D was satisfactory under these conditions but the detection of D-Ak was not possible. 3,5-DNBC and D-Ak had the identical retention time and they co-eluted around second minute (Fig. 3). Therefore other ratios of the component of the mobile phase for better separation of these two substances were

tested. It was supposed that less amount of acetonitrile evoked stronger retention of D-Ak on the column. Thus more aqueous mobile phase 30:70 (v/v) was tried. Prolongation of the retention time of D-Ak and its separation from 3,5-DNBC was reached with this mobile phase but problem was with the detection of D-T 12 and D-D. Because these substances are hydrophobic there was problem with their elution. After 1 h there was no peak of these substances on the chromatogram. D-Ak needed for the separation more aqueous mobile phase but these conditions were not suitable for D-T 12 and D-D which needed more organic mobile phase. Because of these noticeable differences among substances isocratic elution was not possible and gradient elution was used. The ratio of 30% of acetonitrile (ACN) and 70% of water was better for the separation of the 3,5-DNBC and D-Ak. Mobile phase containing 80% ACN and 20% water was better for the detection of the D-T 12 and D-D. Therefore the separation of these substances was provided under the conditions of the gradient elution. More time schemata of the analysis were tried. As the final following one was chosen—0–7 min: 30% (ACN); 7–12 min: 30 → 80% (ACN); 12–25 min: 80% (ACN); 25–30 min: 80 → 30% (ACN); 30–35 min: 30% (ACN).

### 3.3. Mobile phase

Another step was to optimize the composition of the mobile phase for gradient elution. Various types of mobile phases, ratios and values of pH of the aqueous component for the optimization of the mobile phase were tested and the results were compared.

#### 3.3.1. ACN/water with acetic acid

As the first type of mobile phase for gradient elution acetonitrile and water with various volumes of acetic acid was tried. The test of influence five different concentrations of acetic acid in the water was accomplished. Aqueous solutions containing 1%; 0.5%; 0.1%; 0.05% and 0% of acetic acid were tested (Fig. 4).

The differences between retention times of 3,5-DNBC and D-Ak were marked with changes of volume of the acetic acid in the solution. At most the amount of acetic acid influenced the retention of 3,5-DNBC. The bigger volumes 1% or 0.5% in contrast to 0.1% acetic acid in aqueous part of mobile phase evoked prolongation of the retention time of 3,5-DNBC (from  $R_t = 1.7$  min at 0.1% acetic acid to  $R_t = 3.4$  min at 1% acetic acid). But the retention time of D-Ak was not affected so much (from  $R_t = 7.4$  min at 0.1% acetic acid to  $R_t = 7.1$  min at 1% acetic acid). The higher concentrations of the acetic acid caused approximation of the retention times of 3,5-DNBC and D-Ak. The influence on the retention times of the other substances was not so perceptible. Contrariwise the smaller volumes (0.05% or 0%) were appreciated for the separation of 3,5-DNBC and D-Ak which was relatively suitable. But the separation of the D-T 12 and D-D was insufficient.

The best results were achieved with mobile phase with content of 0.1% acetic acid. The separation of the derivatized standard of T 12 and its degradation products was optimal. But when the derivatization process in itself was tried an interference with blank of derivatization mixture was evident (see Fig. 5). Thus this type of the mobile phase was not suitable for analysis of

140

I. Pasáková et al. / Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 42 (2006) 136–142

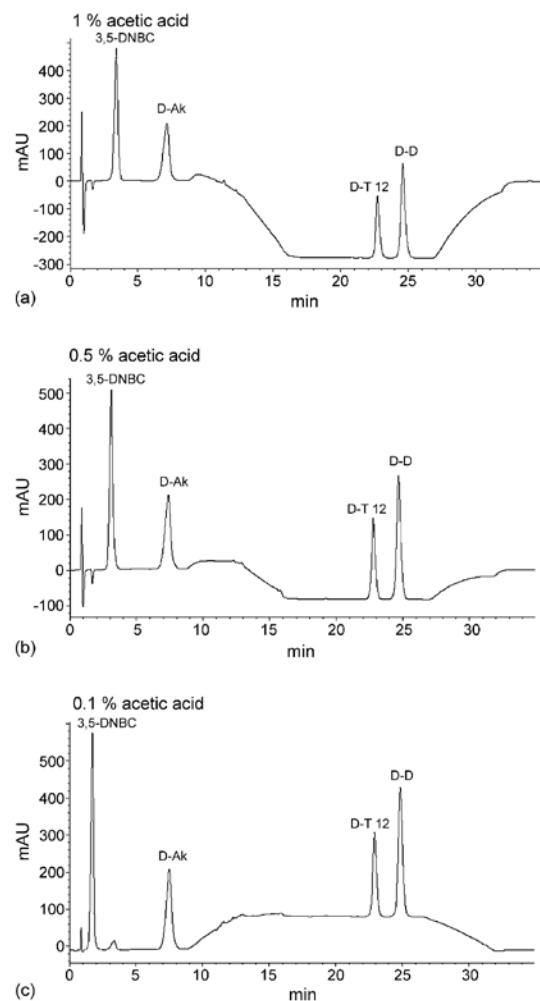


Fig. 4. Different concentrations of acetic acid in the aqueous part of mobile phase for separation of the standards of derivatized substances: (a) 1% acetic acid, (b) 0.5% acetic acid and (c) 0.1% acetic acid. This measurement proceeded under optimal conditions—gradient scheme was—0–7 min: 30% ACN; 7–12 min: 30 → 80% ACN; 12–25 min: 80% ACN; 25–30 min: 80 → 30% ACN; 30–35 min: 30% ACN. Separon SGX C18 analytical column (150 mm × 3 mm i.d.; 5 μm) was used and kept at 25 °C. The flow rate was 1 ml/min.

the real samples. Peaks between 10th and 13th minute which proceeded from the derivatization reagent were also visible on the chromatogram. They were situated in a suitable retention time—no peaks of studied substances are eluted at this time.

### 3.3.2. ACN/20 mM sodium acetate buffer

The second type of mobile phase containing sodium acetate buffer was tried. The changes of the values of pH were tested because it was supposed that it influenced retention time of D–Ak. Three pH values were examined—pH 4.5, 5.2 and 6.0 (Fig. 6).

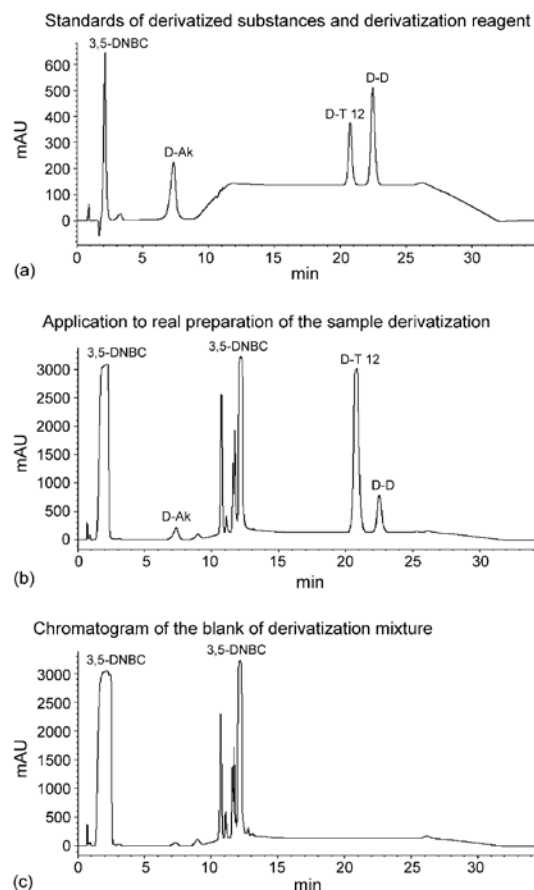


Fig. 5. Application of the first type of optimal mobile phase containing 0.1% acetic acid to: (a) the standards of derivatized substances and derivatization reagent (D–Ak, D–T 12 and D–D and 3,5-DNBC), (b) application to real preparative of derivatization of the sample, and (c) chromatogram of blank of derivatization mixture containing chloroform, TEA and derivatization reagent. Gradient scheme was—0–7 min: 30% ACN; 7–12 min: 30 → 80% ACN; 12–25 min: 80% ACN; 25–30 min: 80 → 30% ACN; 30–35 min: 30% ACN. Separon SGX C18 analytical column (150 mm × 3 mm i.d.; 5 μm) was used and kept at 25 °C. The flow rate was 1 ml/min.

The retention time of D–Ak decreased with increasing values of pH. Retention time of D–Ak at pH 6.0 was  $R_t = 1.5$  min and for 3,5-DNBC was  $R_t = 0.8$  min. At pH 5.2 was  $R_t$  (D–Ak) = 3.1 min and  $R_t$  (3,5-DNBC) = 0.9 min. Whence it follows that the separation of the 3,5-DNBC and D–Ak was not sufficient when pH 6.0 or 5.2 were tested. The optimal resolution of 3,5-DNBC, D–Ak and also D–T 12 and D–D with pH 4.5 was achieved. At pH 4.5 following retention times were measured:  $R_t$  (3,5-DNBC) = 0.9 min,  $R_t$  (D–Ak) = 5.4 min,  $R_t$  (D–T 12) = 20.0 min and  $R_t$  (D–D) = 21.5 min. Thus modifications of pH had the biggest influence to the retention time of D–Ak. The retention times of others three substances (3,5-DNBC, D–T 12 and D–D) were not influenced by different values of pH of the aqueous part of the mobile phase. Longer distance between peaks of D–Ak



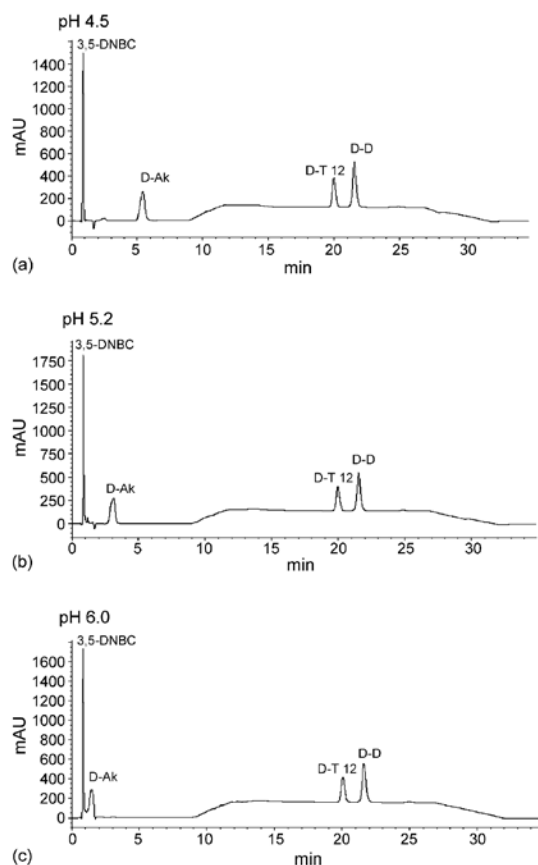


Fig. 6. Chromatograms of influence of three pH values of 20 mM sodium acetate buffer on the retention time of the standards of derivatized substances—3,5-DNBC, D-Ak, D-T 12 and D-D: (a) pH 4.5, (b) pH 5.2 and (c) pH 6.0. Gradient scheme was—0–7 min: 30% of acetonitrile; 7–12 min: 30→80% ACN; 12–25 min: 80% ACN; 25–30 min: 80→30% ACN; 30–35 min: 30% ACN. Separon SGX C18 analytical column (150 mm × 3 mm i.d.; 5 μm) was used and kept at 25 °C. The flow rate was 1 ml/min.

and 3,5-DNBC was also needed because of excess of derivatization reagent during the preparation real samples. The excess of derivatization reagent in reactive mixture was necessary because of quantitative reaction.

#### 3.4. Derivatization process

At first the derivatization process with 3 ml of chloroform, 0.2 ml of TEA and 20 mg of 3,5-DNBC was tried. This process was optimal for Transkarbam 12 and dodecylalcohol, but the derivatization of ω-aminocaproic acid was not sufficient.

Then influence of the amount of derivatization reagent was tested. An amount of 10, 20 and 40 mg of 3,5-DNBC were tried. But it had no influence on the quantity of the reaction and Ak was even with 40 mg of 3,5-DNBC still only slightly detectable. To find the optimal derivatization process for Ak was the next

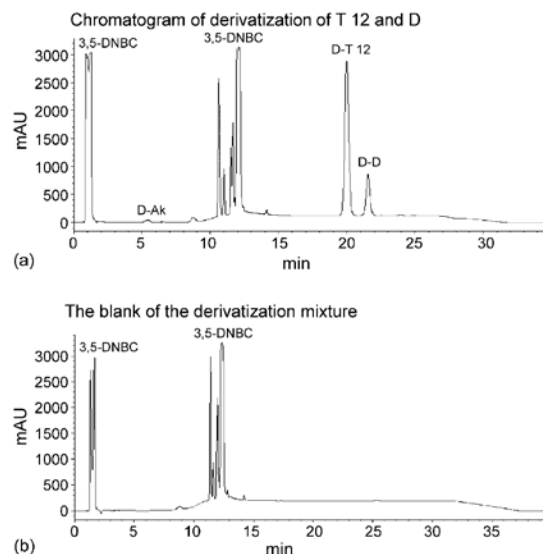


Fig. 7. Derivatization process of T 12 and D. (a) The ideal derivatization process for T 12 and D with chloroform, TEA and derivatization reagent. (b) The blank of the derivatization mixture containing chloroform, TEA and 3,5-DNBC. Chromatogram of D-T 12 and D-D proceeded under optimal conditions with mobile phase containing ACN and 20 mM sodium acetate buffer, pH 4.5. Gradient scheme—0–7 min: 30% ACN; 7–12 min: 30→80% ACN; 12–25 min: 80% ACN; 25–30 min: 80→30% ACN; 30–35 min: 30% ACN. Separon SGX C18 analytical column (150 mm × 3 mm i.d.; 5 μm) was used and kept at 25 °C. The flow rate was 1 ml/min.

step. Ak is bad soluble in most of solvents and it dissolves only in water and methanol. Water was not possible to use because of derivatization reagent which becomes inactive in water. The process with 3 ml of methanol, 0.2 ml of TEA and 20 mg of 3,5-DNBC was used and the reaction was acceptable. So there was an endeavour to develop one step derivatization. But a problem appeared with derivatization of dodecylalcohol which was not realized when methanol as a dissolving solution for Ak was used. This fact is illustrated at Fig. 8a. Some amount of derivatized T 12 is visible but there is no peak of D. Different derivatization procedures were tested. They varied in the order of adding of the solutions or in the number of steps of derivatization. But no derivatization for dodecylalcohol has been found under these conditions. Also adding of chloroform, TEA and derivatization reagent (for derivatization of T 12 and D) was tried, heating and evaporating to dryness by nitrogen stream followed and then methanol, TEA and 3,5-DNBC were added for derivatization of Ak. Thus the derivatization procedure passed twice (once for T 12 and D and for the second time for Ak) but also this process was unsuccessful.

The differences among the structures were so big that it was not possible to find any process which could be used for all these substances. So the two types of derivatization were used. The sample had to be divided in two parts. The first part was derivatized with 3 ml of chloroform, 0.2 ml of TEA and 20 mg of 3,5-DNBC for derivatization of T 12 and D (Fig. 7a). The same

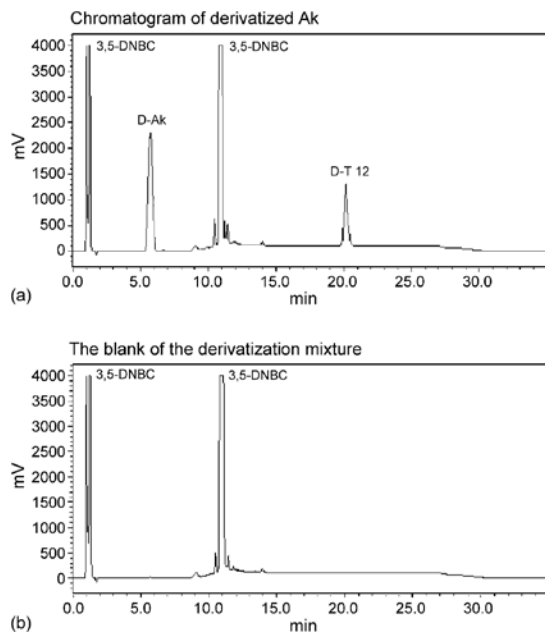


Fig. 8. Derivatization process of Ak. (a) The ideal derivatization process for Ak with methanol, TEA and 3,5-DNBC. (b) The blank of the derivatization mixture containing methanol, TEA and derivatization reagent. Chromatogram of derivatized Ak was proceeded under optimal conditions with mobile phase containing ACN and 20 mM sodium acetate buffer, pH 4.5. Gradient scheme and the flow rate were the same as at Fig. 7.

process of the sample preparation was tried with all solutions and derivatization reagent, only without the substances. This chromatogram of the blank is shown in Fig. 7b. And the second one containing 3 ml of methanol, 0.2 ml of TEA and 20 mg of 3,5-DNBC for derivatization of Ak.

To avoid these complicated two-procedure derivatizations of degradation products it would be possible to result from one theoretic solution relating to the symmetric structure of T 12.

This should be a way for using only the first type of derivatization where the amount of T 12 and D is measurable. Because

these two degradation products (Ak and D) are generated in an equimolar amount so the amount of D–Ak should be kept count of the amount of dodecylalcohol.

#### 4. Conclusions

Derivatization processes for all these substances had to be found for the determination of Transkarbam 12 and its two degradation products (dodecylalcohol and  $\omega$ -aminocaproic acid). Two types of derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride as a derivatization reagent were developed. First one for T 12 and D and the second one for Ak.

After that optimization of chromatographic conditions for the separation of derivatization reagent and D–Ak, D–T 12 and D–D followed. A lot of different types of mobile phases were tested. The best results were achieved under gradient elution with mobile phase containing acetonitrile and 20 mM sodium acetate buffer pH 4.5. Wavelength used for the detection was 230 nm. Under these conditions separation of derivatization reagent and all three substances was carried out.

#### Acknowledgement

This work was supported by the research project of Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic No. 0021620822.

#### References

- [1] A. Hrabálek, P. Doležal, O. Farsa, A. Krebs, A. Kroutil, M. Roman, Z. Škubalová, U.S. Patent 6,187,938 (2001).
- [2] K. Vávrová, J. Zbytovská, A. Hrabálek, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 2273–2291.
- [3] J. Zbytovská, S. Raudenkolb, S. Wartewig, W. Hübner, W. Rettig, P. Pissis, A. Hrabálek, P. Doležal, R. Neubert, *Chem. Phys. Lipids* 129 (2004) 97–109.
- [4] N. Büyükcimkin, S. Büyükcimkin, J.H. Rytting, in: T.K. Ghosh, W.R. Phister (Eds.), *Transdermal and Topical Drug Delivery System*, Interpharm Press, Buffalo Grove, IL, 1997, pp. 357–367.
- [5] E. Destandau, J. Vial, A. Jardy, M.C. Hennion, D. Bonnet, P. Lancelin, *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 49–56.
- [6] K. Lemr, J. Ševčík, J. Hlaváč, *J. Chromatogr. A* 1021 (2003) 19–24.

## **KOMENTÁŘ K PRÁCI**

Tato práce se zabývá vývojem metody HPLC/UV pro hodnocení T 12 a jeho dvou potenciálních hydrolytických rozkladných produktů – AH a D. Také v tomto případě bylo nezbytné před vlastní analýzou provést derivatizaci jednotlivých standardů tak, aby byla umožněna jejich detekce v UV oblasti. Díky tomu, že derivatizace a následná HPLC analýza benzoyl derivátů nedovolovala dosáhnout potřebných limitů detekce a kvantifikace, bylo potřeba změnit derivatizační činidlo. Jako vhodnější byl zvolen 3,5-dinitrobenzoyl chlorid. Standardy 3,5-dinitrobenzoyl derivátů příslušných analytů byly opět připraveny na katedře Anorganické a organické chemie (FaF UK). Tyto nové deriváty byly použity při vývoji chromatografické metody.

### **CÍL PRÁCE:**

- Optimalizovat chromatografické podmínky pro separaci D-T 12 a rozkladných produktů D-AH a D-D pomocí HPLC/UV
- Vyvinout nový derivatizační postup pro T 12, AH a D za použití 3,5-dinitrobenzoyl chloridu (DNBC)

### **KOMENTÁŘ A DISKUZE K VÝSLEDKŮM:**

V návaznosti na předchozí výsledky, byla tato část práce zacílena na problematiku degradačních produktů, které by se mohly v substanci T 12 vyskytnout. Esterová vazby v molekule T 12 je považována za nejlabilnější část, jenž by mohla snadno podléhat hydrolyze, za vzniku kyseliny 6-aminohexanové a dodekanolu. Tyto dvě substance jsou zároveň také hlavními výchozími látkami pro syntézu T 12. Z těchto důvodů bylo nezbytné vyvinout chromatografickou metodu, která by jejich hodnocení umožnila. Při vývoji podmínek separace bylo potřeba najít takové chromatografické podmínky, které by umožnily dostatečně separovat nejen analyzované látky (D-T 12, D-AH a D-D), ale také při kterých by nedocházelo k interferenci pík analytů s derivatizačním činidlem (DNBC) nebo vedlejšími produkty této reakce.

Optimalizace nové metody HPLC/UV obnášela především výběr vhodné chromatografické kolony a optimalizaci složení mobilní fáze. Ačkoli byla v předchozí práci použita kolona LiChrosorb Si-60, díky změně derivatizačního činidla byla nakonec zvolena i jiná chromatografická kolona Separon SGX C18 (150 x 3 mm I.D., 5 µm). Optimalizace

složení mobilní fáze poté zahrnovala vyzkoušení různých typů rozpouštědel, jejich poměrů nebo pH, s cílem dosáhnout dostatečnou separaci D-T 12, D-AH, D-D a DNBC. Vzhledem k výrazné odlišnosti polarit AH a DNBC na jedné straně, a T 12 a D na straně druhé, se nepodařilo vyvinout podmínky, které by umožnily isokratickou eluci. Buď nedošlo k eluci píku T 12 a D vůbec nebo docházelo ke koeluci AH a DNBC. Proto byl vyvinut gradientový profil analýzy, který umožnil dostatečně separovat všechny 4 hodnocené látky. První vyvinutá mobilní fáze, která umožnila separaci všech látek, obsahovala acetonitril (ACN) a 0,1% vodný roztok kyseliny octové. Po provedení vlastní derivatizace u vzorku směsi analytů však došlo ke koeluci jednoho z píků vedlejší derivatizační reakce s píkem D-AH, a složení mobilní fáze tak muselo být dále měněno. Jako optimální byla nakonec zvolena směs acetonitrilu a 20mM octanu sodného, pH 4,5. Za těchto podmínek bylo dosaženo dostatečné separace D-T 12, rozkladných produktů D-AH, D-D a derivatizačního činidla DNBC, resp. vedlejších produktů derivatizační reakce.

#### **Výsledné podmínky HPLC/UV metody:**

Chromatografická kolona:	Separon SGX C18 (150 x 3 mm I.D., 5 µm).
Gradientový profil:	0 - 7 min 30 % ACN; 7 - 12 min 30 % → 80 % ACN; 12 - 25 min 80 % ACN; 25 - 30 min 80 % → 30 % ACN; 30 - 35 min 30 % ACN
Mobilní fáze:	ACN / 20mM octan sodný, pH 4,5
Průtok:	1 ml/min
Detekce:	230 nm
Retenční čas:	3,5-DNBC = 0,9 min, D-AH = 5,4 min, D-T 12 = 20,0 min, D-D = 21,5 min

Další část této práce byla zaměřena na optimalizaci derivatizačního postupu pro hodnocené analyty. Jako nejvhodnější byl zvolen následující postup: vzorek byl rozpuštěn ve 3 ml chloroformu a 0,2 ml triethylaminu (TEA) a následně přidáno 20 mg derivatizačního činidla DNBC. Po dobu 30 min byla směs zahřívána na vodní lázni o teplotě 65 °C. Následně byl vzorek odpařen do sucha pomocí N<sub>2</sub> a nakonec rozpuštěn v mobilní fázi. Tento derivatizační postup však byl vhodný pouze pro derivatizaci T 12 a D, avšak pro AH, vzhledem ke špatné rozpustnosti látky v chloroformu, nevyhovoval. Proto byl vyvinut druhý postup, který obnášel změnu pouze ve zmiňovaném rozpouštědle.

Místo 3 ml chloroformu byly použity 3 ml methanolu. Tato drobná modifikace postupu již umožnila dosáhnout dostatečné výtěžnosti derivatizace pro AH. Při tomto postupu došlo i k částečné derivatizaci T 12, nicméně D se nepodařilo detekovat vůbec. Ani kombinací těchto metod se bohužel nepodařilo vyvinout jeden společný derivatizační postup pro všechny tři analyty. Řešením tohoto problému by mohlo být rozdělení vzorku na dvě části a provedení analýzy dvakrát. Jistým alternativním řešením by mohlo být i matematické dopočítání obsahu AH. Díky symetrické molekule T 12, by měl v ekvivalentním množství vznikat AH i D.

#### **Výsledný derivatizační postup pro T 12 a D, resp. AH:**

- vzorek rozpustit v 3 ml chloroformu, resp. methanolu + 0,2 ml TEA
- přidat 20 mg DNBC
- nechat 30 min ve vodní lázni temperované na teplotu 65 °C
- odpařit vzorek proudem N<sub>2</sub> dosucha
- rozpustit v mobilní fázi → nástříknout na kolonu

#### **ZÁVĚR:**

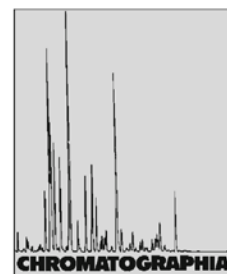
Byla vyvinuta chromatografická metoda HPLC/UV vhodná pro hodnocení T 12 a jeho rozkladných hydrolytických produktů. Tuto metodu lze použít při hodnocení čistoty a stability substance T 12. Kromě toho byl vyvinut nový postup pro derivatizaci T 12 a D, resp. AH pomocí 3,5-dinitrobenzoyl chloridu.

**4.1.3 DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LC-ESI-MS ION  
TRAP METHOD FOR IMPURITY ANALYSIS OF A NOVEL  
TRANSDERMAL ACCELERANT TRANSKARBAM 12**

**Ivana Pasáková**, Petra Kovaříková, Radim Kučera, Jiří Klimeš, Jaroslav  
Sochor, Alexandr Hrabálek

Chromatographia, 69 (9/10), 2009, 977 - 983

# Development and Validation of an LC-ESI-MS Ion-Trap Method for Analysis of Impurities in Transkarbam 12, a Novel Transdermal Accelerant



2009, 69, 977-983

Ivana Pasáková<sup>1,✉</sup>, Petra Kovaříková<sup>1</sup>, Radim Kučera<sup>1</sup>, Jiří Klimeš<sup>1</sup>, Jaroslav Sochor<sup>1</sup>, Alexandr Hrabálek<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic; E-Mail: ivana.pasakova@faf.cuni.cz

<sup>2</sup> Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

Received: 1 August 2008 / Revised: 27 December 2008 / Accepted: 6 January 2009  
Online publication: 8 February 2009

## Abstract

A new, sensitive LC-MS method for evaluation of the purity of Transkarbam 12 (T12), a novel and highly effective accelerant of transdermal penetration, has been developed and validated. T12 and its impurities (6-aminohexanoic acid, AH,  $\epsilon$ -caprolactam, CA, and dodecyl 6-(6-aminohexanamido)hexanoate, DAH) were characterized by MS and MS-MS analysis. Separation was achieved on a 150 mm  $\times$  3 mm, 5- $\mu$ m particle, phenyl-hexyl column. The mobile phase was a gradient prepared from water, formic acid, and acetonitrile. The method was validated within the concentration range 50–250 ng mL<sup>-1</sup>; correlation coefficients were > 0.998. The accuracy of the method was from 98.6–105.0% for AH, 102.6–104.8% for CA, and 97.9–100.9% for DAH. Precision was in the range 3.19–4.42% for AH, 3.22–5.81% for CA, and 4.8–8.78% for DAH. The selectivity of the method and sample stability were also confirmed. The practical applicability of the method was proven by analysis of T12 bulk substance.

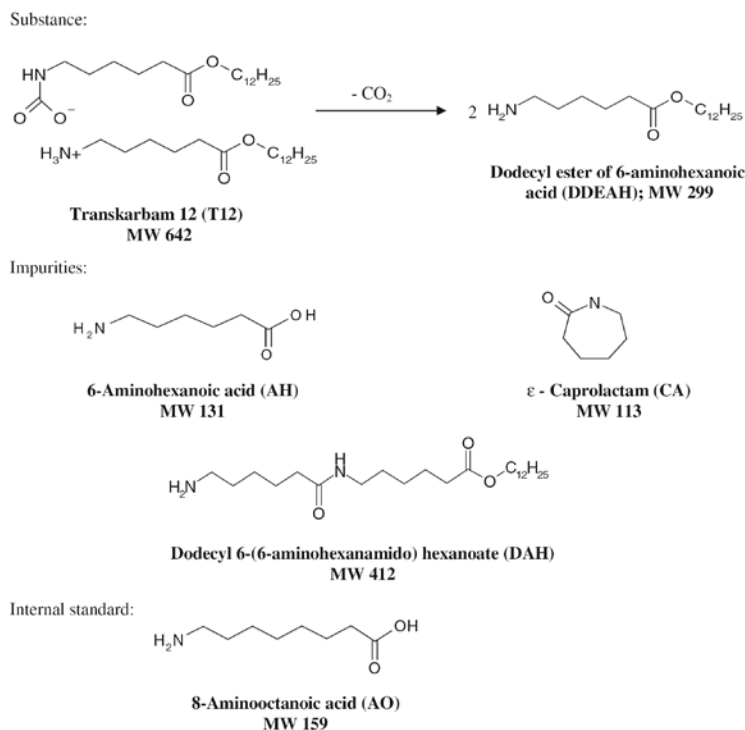
## Keywords

Column liquid chromatography-mass spectrometry  
Transkarbam 12  
Transdermal drug delivery  
Penetration enhancers  
Impurity analysis

## Introduction

Transdermal drug delivery (TDD) has several advantages over conventional routes used for drug administration [1–3]. It is an easy, non-invasive means of drug delivery that overcomes problems with poor oral bioavailability, side and/or toxic effects, and the poor patient compliance which results from frequent application [4–7]. Penetration of drugs through the skin is, however, largely limited by the barrier properties of the stratum corneum, so transdermal accelerants have been developed to enhance the penetrability of drugs through this barrier [8–10]. Although many of these have been introduced into pharmaceutical practice, none has been found to be optimum, so there is still a demand for a new and more versatile accelerant of transdermal penetration [9, 11, 12].

Transkarbam 12 (5-(dodecyloxycarbonyl)pentylammonium-5-(dodecyloxycarbonyl)pentylcarbamate; T12, Fig. 1) is a novel and effective accelerant of transdermal penetration. Exceptional



**Fig. 1.** The structures of the compounds analyzed

acceleration of penetration of a wide range of drugs, low toxicity, and no dermal irritation are the main advantages of T12. These properties make it superior to other commonly used transdermal enhancers [13, 14].

The activity of accelerants is usually explained in terms of interaction of their molecule with the lipidic part of the stratum corneum [11, 12]. Both the polar carbamate head and the ability to release CO<sub>2</sub> in the stratum corneum are essential for the penetration-enhancing activity of T12 [15, 16]. The release of CO<sub>2</sub> results in the production of two identical chains—the dodecyl ester of 6-aminohexanoic acid, DDEAH (Fig. 1). Hydrolysis of DDEAH leads to the formation of two degradation products, 6-aminohexanoic acid (AH) and dodecylalcohol (D) [13, 17]. Other impurities arise from the synthesis of T12. ε-Caprolactam (CA) is a synthetic precursor and dodecyl 6-(6-aminohexanamido) hexanoate (DAH), the amide of DDEAH and 6-aminohexanoic acid, is

a side product of the synthetic reaction (Fig. 1).

Despite the favourable properties of T12, further progress in its pharmaceutical development is restricted by the absence of modern and sensitive analytical methods. Only two chromatographic methods have been developed and published. Both overcome the lack of any chromophore by derivatization with benzoyl chloride and 3,5-dinitrobenzoyl chloride [18, 19]. Although they have been used for preliminary analysis of T12 (i.e. detection of hydrolytic degradation products) they are time and labour-consuming and not sufficiently sensitive. Because of these drawbacks, the methods could fail to detect trace amounts of the impurities present in real bulk samples. They also enable analysis of hydrolytic degradation products only. A novel, highly sensitive analytical method suitable for evaluation of the purity of T12 was, therefore, definitely needed, and LC–MS seemed a reasonable alternative to former methods.

The objective of this study was to characterize the MS and MS–MS behaviour of T12 and its three major impurities (AH, CA, and DAH), and then to develop and validate an LC–MS method for analysis of these impurities in the bulk substance [20]. Finally, this method was applied to analysis of T12 bulk substance.

## Experimental

### Chemicals, Reagents, and Solutions

6-Aminohexanoic acid (99.2%) was purchased from Merck (Hohenbrunn, Germany). 8-Aminoocetanoic acid (AO; 99.4%; used as internal standard) and ε-caprolactam (99.9%) were obtained from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). T12 (99.4%) and dodecyl 6-(6-aminohexanamido)hexanoate (99.5%) were synthesized in-house at the Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové (Czech Republic). The structures of the compounds were confirmed by IR, <sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy, and their purity was checked by elemental analysis [15]. Acetonitrile (gradient grade, LiChrosolv) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany), formic acid (98–100%, puriss, p.a., Reag. Ph. Eur.) was obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany), and HPLC-grade water was obtained from Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q reverse osmosis equipment.

Standard stock solutions of AH, CA, and DAH were prepared by weighing 10.0 mg of each standard into separate 100-mL volumetric flasks, adding 90 mL 1:1 (v/v) acetonitrile (ACN)–water (H<sub>2</sub>O), sonicating the flask for 10 min, and diluting the contents to volume with the same solvent mixture.

Internal standard stock solution was prepared by weighing 20.0 mg AO into a 100-mL volumetric flask, adding 90 mL 1:1 (v/v) ACN–H<sub>2</sub>O, sonicating the flask for 10 min, and diluting the contents to volume with the same solvent mixture.

Standard solutions were prepared by transferring 100 μL standard stock solution and 50 μL internal standard



stock solution to a 100-mL volumetric flask, adding 50 mL 1:1 (v/v) ACN–H<sub>2</sub>O and 500  $\mu$ L HCOOH, and diluting to volume with the same solvent mixture.

### Instrumentation and Methods

LC was performed with a Shimadzu (Duisburg, Germany) Prominence system comprising SIL-20AC autosampler, two LC-20AD pumps, DGU-20A<sub>3</sub> degasser, CTO-20AC column oven, SPD-20A UV detector, and CBM 20A communication bus module. This system was coupled with a Thermo Finnigan (San Jose, CA, USA) LCQ Advantage Max ion-trap mass spectrometer with ESI and APCI sources. All data were processed with Thermo Finnigan Xcalibur software.

Chromatographic separation was performed on a Phenomenex (Aschaffenburg, Germany) 150 mm  $\times$  3 mm, 5- $\mu$ m particle, Luna phenyl-hexyl column maintained at 30 °C. Gradient elution was used to achieve sufficient separation of all the analytes. The gradient was prepared from 4% acetonitrile in a 0.04% aqueous solution of formic acid (component A) and 0.04% formic acid in acetonitrile (component B). The gradient profile was: 0–4 min, 0% B; 4–28 min, 0→51% B; 28–30 min, 51% B; 30–30.1 min, 51→0% B; 30.1–35 min, 0% B. The flow rate was 300  $\mu$ L min<sup>-1</sup> and the injection volume 10  $\mu$ L. 8-Amino-octanoic acid (AO) was found to be the optimum internal standard.

The mass spectrometer ion-source settings were optimized by direct infusion of solutions of the analytes in acetonitrile–water 1:1 (v/v) via a syringe pump—either 0.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> for AH, T12, DAH, and AO or 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> for CA. The settings obtained by tuning to achieve maximum sensitivity were: sheath gas/auxiliary gas (N<sub>2</sub>); flow rate: 0–18 min, 75/40 arb (arbitrary) units; 18–32 min, 45/20 arb units; spray voltage 4.0 kV, capillary temperature 250 °C, capillary potential 4 kV. ESI in positive ionization mode was used for analysis of all the compounds. Helium 5.0 was used as damping and collision gas. The instrument was set to acquire three microscans per second.

Quantification was in SIM mode by use of [M+H]<sup>+</sup> ions.

### Validation

#### Linearity

Linearity was evaluated by analysis of calibration solutions containing five different concentrations (50, 100, 150, 200, and 250 ng mL<sup>-1</sup>) of each impurity (AH, CA, DAH) and 100 ng mL<sup>-1</sup> of the internal standard (AO). These calibration solutions were prepared by transferring appropriate volumes of the standard stock solutions, 50  $\mu$ L of the internal standard stock solution, and 500  $\mu$ L HCOOH to a 100-mL volumetric flask and diluting to volume with 1:1 (v/v) ACN–H<sub>2</sub>O. The calibration plot was constructed by plotting impurity-to-IS the peak-area ratio against concentration [20].

#### Accuracy and Precision

The accuracy and the precision of the method were evaluated by analysis of five independently prepared solutions of each impurity at three concentrations (50, 100, and 150 ng mL<sup>-1</sup>). Each sample was injected in triplicate. Precision is expressed as RSD (%) for five independently prepared samples, and accuracy is given as percentage recovery [20].

#### LOD and LOQ

Limits of detection (LOD) were determined experimentally as the lowest concentrations of the analytes for which the detector response was three times higher than the mobile phase background. Limits of quantification (LOQ) were assessed as the lowest concentrations of the analytes for which accuracy and precision were acceptable [20].

#### Selectivity

The selectivity of the method was confirmed by comparing independent injections of the blank sample (0.5% HCOOH in 1:1 (v/v) acetonitrile–water) and individual injections of each compound.

#### Stability

Sample stability was tested in the dark (autosampler, 20 °C) and in the light (room temperature) for 31 h.

### Analysis of T12 Bulk Substance

T12 (10.0 mg) was weighed into a 100-mL volumetric flask, 50 mL 1:1 (v/v) ACN–H<sub>2</sub>O and 1 mL HCOOH were added, and the mixture was sonicated for 10 min. Internal standard stock solution (100  $\mu$ L) was then added and the solution was diluted to volume with 1:1 (v/v) ACN–H<sub>2</sub>O. Finally, 5 mL of this solution was diluted to 10 mL with the same solvent mixture in a volumetric flask.

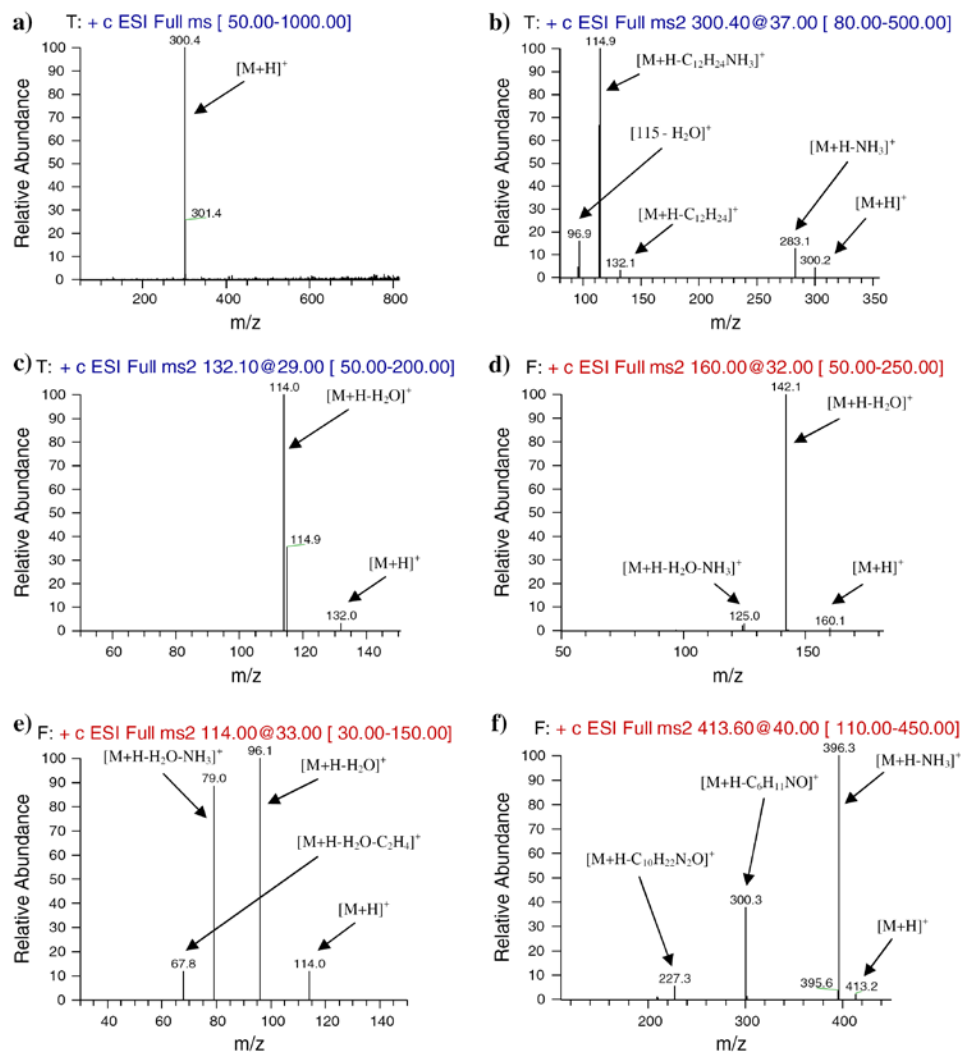
### Results and Discussion

#### MS and MS–MS Analysis

Mass spectra of T12, its impurities (AH, CA, and DAH), and the IS were obtained by direct infusion of each standard solution into the ESI source. Both available ionization modes (ESI and APCI) were tested and ESI was chosen because the sensitivity was higher. A satisfactory response was obtained for all the compounds in positive-ion mode only. The protonated molecule [M+H]<sup>+</sup> was found to be the most intense ion for all the compounds. The optimum collision energy (CE) was set up so the precursor ion intensity remained approximately 5%.

#### Transkarbam 12

Although the molecular weight of T12 is 642, no signal corresponding to *m/z* 643 was observed in the full-scan spectrum (Fig. 2a). A reasonable explanation of this can be found in the properties of T12. As was mentioned above, T12 decomposes into CO<sub>2</sub> and two identical chains of DDEAH (MW 299). This decomposition even occurs during sample preparation (dissolution in acidified 1:1 (v/v) ACN–H<sub>2</sub>O). The full-scan spectrum of T12 therefore contains [M+H]<sup>+</sup> at *m/z* 300 instead of the



**Fig. 2.** MS and MS–MS spectra of the compounds: **a** full-scan mass spectrum of T12, **b** MS–MS of protonated T12 ( $m/z$  300) using a normalized collision energy of 37%, **c** MS–MS of protonated AH ( $m/z$  132) using a normalized collision energy of 29%, **d** MS–MS of protonated AO ( $m/z$  160) using a normalized collision energy of 32%, **e** MS–MS of protonated CA ( $m/z$  114) using a normalized collision energy of 33%, **f** MS–MS of protonated DAH ( $m/z$  413) using a normalized collision energy of 40%

expected  $m/z$  643. This  $m/z$  ratio corresponds to DDEAH (Fig. 2a). This hypothesis was further supported by analysis of DDEAH, which was synthesized for this purpose. The same amounts of DDEAH and T12 were analyzed and the  $m/z$  300 peak areas were compared for both samples. It was found that the peak area of  $[M+H]^+$  at  $m/z$  300 from DDEAH was exactly half that of the same peak from T12. Frag-

mentation was, furthermore, identical in both cases. Hence,  $[M+H]^+$  at  $m/z$  300 was selected for monitoring of T12. The MS–MS fragmentation of this precursor ion ( $m/z$  300) is given in Fig. 2b.

#### Impurities AH, CA, and DAH

The full-scan spectra of all the impurities contained the protonated molecular ions. The  $[M+H]^+$  ions were detected at

$m/z$  132 (AH),  $m/z$  114 (CA), and  $m/z$  413 (DAH). Fragmentations of all the  $[M+H]^+$  ions are illustrated in Fig. 2c, e, f.

The presence of the product ion ( $m/z$  300) in the MS–MS spectrum of DAH confirmed that this impurity originates from T12 and AH. This was further supported by an MS<sup>3</sup> experiment with DAH. The ion at  $m/z$  300 follows the same fragmentation as the  $[M+H]^+$  ion at  $m/z$  300 from T12.

### Internal Standard AO

The full-scan spectrum of AO contains the protonated molecule  $[M + H]^+$  at  $m/z$  160. Fragmentation of the precursor ion is shown in Fig. 2d.

### LC-MS Method Development

Because of distinctly different lipophilicity of the analytes it was clear gradient elution would be necessary. Different types of mobile phase, column, and MS source conditions were tested and optimized during LC-MS method development. Initially, a  $C_{18}$  column was tested. Although retention of T12 and DAH was sufficient under all the conditions tested, elution of AH in the dead volume was a major problem. No improvement was observed even if the amount of organic solvent was reduced as low as possible. Results from these experiments indicated that a different type of stationary phase was necessary to increase the retention of AH, and a phenyl-hexyl column was therefore tested. Initially the initial amount of ACN was reduced to 4% and the gradient profile was then optimized. Finally, addition of a small amount of formic acid (0, 0.025, 0.04, 0.05, or 0.1%) was tested to promote ionization of the analytes. It was found that higher concentrations of HCOOH apparently improved the ionization of all the analytes, and the symmetry of their peaks. Increasing the amount of HCOOH caused poor reproducibility of peak areas and retention times, however, so 0.04% HCOOH was chosen as a compromise. The LC-MS method developed in this study provided high sensitivity, sufficient resolution, good reproducibility, and peak symmetry. The retention times obtained under the final chromatographic conditions ("Experimental") were: AH 2.0 min, AO 3.4 min, CA 12.9, T12 26.8 min, and DAH 27.4 min. A representative chromatogram is shown in Fig. 3a.

### Validation of the Method

The method was validated for analysis of the three impurities of T12 (AH, CA, DAH) in the bulk substance. The

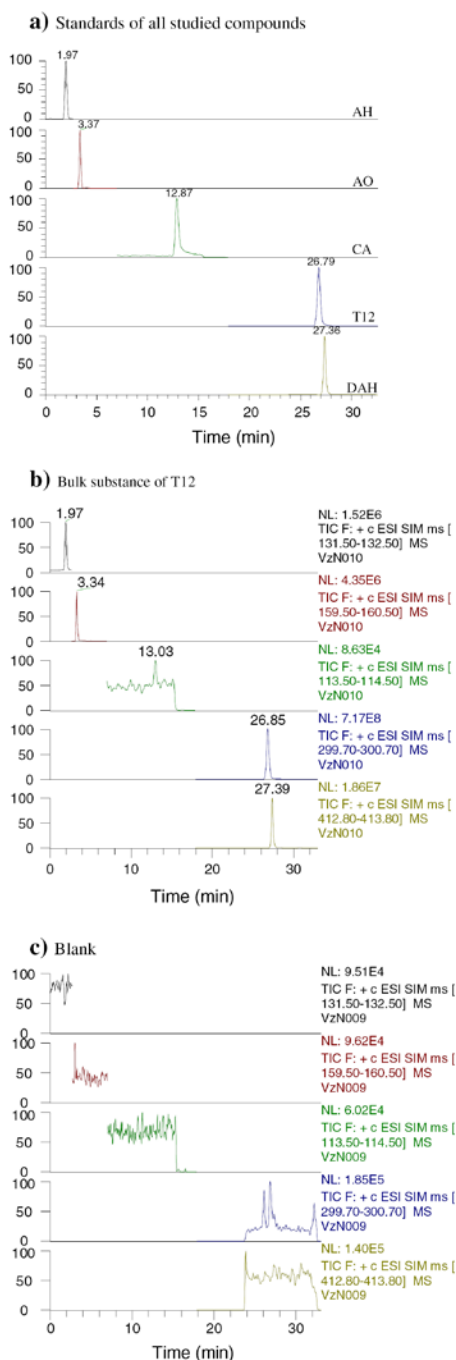


Fig. 3. a SIM chromatogram showing separation of standards ( $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ) of all the compounds studied. b SIM chromatogram from analysis of T12 bulk substance. c SIM chromatogram obtained from the corresponding blank (0.5% HCOOH in 1:1 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O

**Table 1.** Accuracy and precision data for impurities in T12 obtained from five independent measurements at three concentrations (50, 100 and 150 ng mL<sup>-1</sup>)

Average amount added (ng mL <sup>-1</sup> ; n = 5)	Average amount found (ng mL <sup>-1</sup> ; n = 5)	Accuracy (average recovery, R, %; n = 5)	Precision (RSD, %; n = 5)
AH			
54.5	53.8	98.6	3.2
109.0	110.5	101.3	4.4
163.5	171.9	105.0	3.4
CA			
55.3	58.0	104.8	5.6
110.6	113.8	102.8	3.2
165.9	169.7	102.6	5.8
DAH			
49.7	50.1	100.9	4.8
99.3	97.1	97.9	5.9
149.0	148.7	99.9	8.8

method characteristics validated were: linearity, accuracy, precision, selectivity, and sample stability.

#### Linearity

The linearity of the method was proved within the concentration range 50–250 ng mL<sup>-1</sup> (n = 5) for all three impurities. The linear regression equations and correlation coefficients obtained were:  $y = 0.0030x - 0.0035$ ,  $r = 0.9999$  for AH,  $y = 0.0015x + 0.0068$ ,  $r = 0.9984$  for CA, and  $y = 0.0105x + 0.0109$ ,  $r = 0.9992$  for DAH.

#### Accuracy and Precision

Results from determination of accuracy and precision are given in Table 1. Recoveries were 98.6–105.0% for AH, 102.6–104.8% for CA, and 97.9–100.9% for DAH. RSDs were in the range 3.19–4.42% for AH, 3.22–5.81% for CA, and 4.8–8.78% for DAH.

#### LOD and LOQ

The LOD was 3 ng mL<sup>-1</sup> for AH and DAH and 5 ng mL<sup>-1</sup> for CA. The LOQ was 50 ng mL<sup>-1</sup> for all three impurities.

#### Selectivity

Analysis of a blank sample (0.5% HCOOH in 1:1 (v/v) acetonitrile–water) revealed no significant interferences at the retention times of the impurities or the internal standard.

#### Stability

Stability data showed that all samples should be protected against light, because the concentrations of the analytes decreased to 89.1% (AH), 88.9% (CA), and 98.8% (DAH) of the initial values after exposure for 31 h. All the analytes were stable in the dark for the same time period—96.6% (AH), 97.1% (CA), and 101.7% (DAH) of the initial amounts were found.

#### Analysis of T12 Bulk Substance

Analysis of T12 bulk substance was performed to confirm the practical applicability of the method. All the expected impurities (AH, DAH, and CA) were detected in the sample of T12, but CA was below the LOQ. The amounts of AH and DAH were 0.12% (60 ng mL<sup>-1</sup>) and 0.14% (70 ng mL<sup>-1</sup>), respectively. The chromatograms obtained from the bulk substance and from the corresponding blank are illustrated in Fig. 3b and c.

#### Conclusions

In this study, Transkarbam 12 (T12) and its main impurities (6-aminohexanoic acid,  $\epsilon$ -caprolactam, and dodecyl 6-(6-aminohexanamido)hexanoate) were characterized by means of MS and MS–MS. All the compounds analyzed gave spectra in the positive-ion mode; in these

spectra  $[M+H]^+$  was the most intense ion. Mass spectrometer settings were optimized to achieve maximum detection sensitivity. All these data were subsequently used in the development of an LC–MS method for analysis of these impurities. Optimum separation was achieved on a Luna phenyl–hexyl column under gradient conditions. Quantification was performed in SIM mode. This method was validated for linearity, accuracy, precision, selectivity, and stability. Finally, the practical applicability of the method was confirmed by analysis of T12 bulk substance. This method is 36 times more sensitive than LC–UV methods and enables evaluation of a wider range of impurities. It is, therefore, a suitable tool for analysis of impurities in T12.

#### Acknowledgements

This work was supported by a research project of the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic, no. 0021620822.

#### References

1. Thomas BJ, Finin BC (2004) Drug Discov Today 9:697–703. doi:10.1016/S1359-6446(04)03180-0
2. Ammar HO, Ghorab SA, El-Nahas SA, Kamel R (2006) Int J Pharm 327:81–88. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.07.054
3. Sitruk-Ware R (1989) Contraception 39:1–20. doi:10.1016/0010-7824(89)90012-7
4. Friend DR (1990) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 7:149–186
5. Beetge E, du Plessis J, Muller DG, Goosen C, van Rensburg FJ (2000) Int J Pharm 193:261–264. doi:10.1016/S0378-5173(99)00340-3
6. Charoo NA, Ali Shamsheer AA, Kohli K, Pillai KK, Rahman Z (2005) Chromatographia 62:493–497. doi:10.1365/s10337-005-0634-4
7. Femenia-Font A, Balaguer-Fernandez C, Merino V, Lopéz-Castellano A (2006) Int J Pharm 323:125–130. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.05.049
8. Doliwa A, Santoyo S, Campanero MA, Ygartua P (2001) J Pharm Biomed Anal 26:531–537. doi:10.1016/S0731-7085(01)00455-1
9. Williams AC, Barry BW (2004) Adv Drug Deliv Rev 56:603–618. doi:10.1016/j.addr.2003.10.025

10. Walker RB, Smith EW (1996) *Adv Drug Deliv Rev* 18:295–301. doi:[10.1016/0169-409X\(95\)00078-L](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00078-L)
11. Hrabálek A, Doležal P, Škubalová Z, Farsa O, Krebs A (1999) *Chem Listy* 93:107–119
12. Büyüktimkin N, Büyüktimkin S, Rytting JH (1997) In: Ghosh TK, Phister WR (eds) *Transdermal and topical drug delivery system*. Interpharm Press, Buffalo Grove
13. Hrabálek A, Doležal P, Vávrová K, Zbytovská J, Holas T, Klimentová J, Novotný J (2006) *Pharm Res* 23:912–919. doi:[10.1007/s11095-006-9782-y](https://doi.org/10.1007/s11095-006-9782-y)
14. Vávrová K, Lorencová K, Klimentová J, Novotný J, Holý AN, Hrabálek A (2008) *Eur J Pharm Biopharm* 69:597–604. doi:[10.1016/j.ejpb.2007.12.005](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.12.005)
15. Hrabálek A, Doležal P, Farsa O, Krebs A, Kroutil A, Roman M, Škubalová Z (2001) *US Pat* 6187938
16. Holas T, Vávrová K, Šíma M, Klimentová J, Hrabálek A (2006) *Bioorg Med Chem* 14:7671–7680. doi:[10.1016/j.bmc.2006.08.014](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.014)
17. Zbytovská J, Raudenkolb S, Wartewig S, Hübner W, Rettig W, Pissis P, Hrabálek A, Doležal P, Neubert RH (2004) *Chem Phys Lipids* 129:97–109. doi:[10.1016/j.chemphyslip.2003.12.004](https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2003.12.004)
18. Pasáková I, Sochor J, Klimeš J, Hrabálek A (2006) *J Sep Sci* 29:1595–1599. doi:[10.1002/jssc.200500468](https://doi.org/10.1002/jssc.200500468)
19. Pasáková I, Klimeš J, Sochor J, Hrabálek A (2006) *J Pharm Biomed Anal* 42:136–142. doi:[10.1016/j.jpba.2006.03.014](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.014)
20. ICH (2005) *Harmonised tripartite guideline, validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. ICH, November 2005; <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>

## **KOMENTÁŘ K PRÁCI**

Uvedená práce se zabývá vývojem a validací nové HPLC/MS metody, která by umožnila hodnocení čistoty a stability substance T 12 v průmyslové výrobě. Použitím MS detektoru byla eliminována složitá a časově náročná úprava vzorku pomocí derivatizace.

### **CÍL PRÁCE:**

- Optimalizovat nastavení iontového zdroje a popsat MS a MS/MS spektra všech hodnocených analytů (T12, AH, DAH, CA a AO)
- Vyvinout a zvalidovat HPLC/MS metodu, která by umožnila hodnocení možných nečistot ve vzorku T 12
- Vyvinutou metodu aplikovat při hodnocení reálného vzorku (šarže průmyslově vyrobené substance T 12)

### **KOMENTÁŘ A DISKUZE K VÝSLEDKŮM:**

Jak bylo uvedeno dříve, hlavní nečistoty, které se vyskytují v substanci T 12, jsou hydrolytické rozkladné produkty AH a D. AH může být bez problému pomocí HPLC/MS hodnocena, nicméně hodnocení D pomocí této metody není možné. Pro jeho hodnocení proto byla zvolena alternativní metoda GC, která však byla vypracována na jiném pracovišti. Na základě inovace syntetického postupu přípravy substance T 12, byly ve vzorku objeveny další dvě nečistoty. Jednalo se o kaprolaktam (CA), novou vstupní surovinu pro výrobu T 12 a dodecylester 6-(6-aminohexanamido) hexanové kyseliny (DAH), vedlejší produkt syntézy. DAH byla objevena a identifikována právě díky využití MS detekce při analýze vzorků připravených inovovaným postupem. Tato práce byla zaměřena na vývoj vhodných HPLC/MS podmínek pro hodnocení všech těchto nečistot (AH, DAH, CA). Jako vhodný vnitřní standard byla vybrána kyselina 8-amimooktanová (AO).

**Vzhledem k tomu, že T 12, ani jeho nečistoty, nebyly do té doby pomocí MS hodnoceny, bylo nejdříve potřeba provést optimalizaci nastavení parametrů iontového zdroje pro jednotlivé analyty.** K tomu byla použita metoda přímého nástřiku. Vyšší citlivosti detekce v případě všech analytů bylo dosaženo s ESI iontovým zdrojem při snímání iontů v kladném módu. Optimalizace podmínek ESI detekce poté zahrnovala

nastavení např. vhodného napětí na spreji, teplotu kapiláry nebo průtok  $N_2$ . Pro jednotlivé analyty byly zvoleny takové podmínky, které zajišťovaly stabilní signál a maximální citlivost. Při těchto podmínkách pak byla naměřena MS spektra a zvolením vhodné kolizní energie také příslušná MS/MS spektra a jednotlivé fragmenty byly popsány.

Vzhledem k tomu, že v reálných vzorcích budou přítomny všechny analyty, bylo potřeba vybrat takové podmínky, které by umožnily citlivou detekci všech analytů. Kromě toho, bylo potřeba vzít v úvahu také následné spojení s HPLC. Optimalizace výsledné metody tak probíhala nástřikem vzorku z dávkovací smyčky do proudu mobilní fáze.

### **Optimální nastavení ESI zdroje:**

Sheath/Aux Gas: 0-18 min 75/45 arb (arbitrary units); 18-32 min 45/20 arb

Napětí na spreji: 4 kV

Teplota kapiláry: 250 °C

Napětí na kapiláře: -30 V

Tube Lens Offset: 0 V

**Po optimalizaci parametrů ESI zdroje, následoval vývoj HPLC podmínek, které by umožnily separaci všech analytů a byly kompatibilní s MS detekcí.** Šlo o výběr vhodné stacionární fáze, a především vývoj a optimalizaci složení fáze mobilní a jejího průtoku. Na základě předchozích výsledků, byla nejprve vyzkoušena kolona s náplní C18. Na této koloně však nebyly nalezeny podmínky, které by umožnily separaci analytů, a zároveň byly vhodné pro MS detekci. Mobilní fáze vyvinutá dříve pro HPLC/UV hodnocení totiž obsahovala octan sodný, který je s MS detekcí zcela nekompatibilní. Jako další byla testována stacionární fáze Phenyl-hexyl (150 x 3 mm I.D.; 5  $\mu$ m). Na této koloně se podařilo dostatečně separovat hodnocené analyty i za podmínek kompatibilních s MS. Nicméně bylo nezbytné výrazně snížit procento organické fáze, aby byla dosažena dostatečná retence AH. Vzhledem k rozdílné polaritě hodnocených látek, musel být i v tomto případě použit gradientový profil analýzy. Nakonec bylo do mobilní fáze přidáno 0,04 % HCOOH ke zlepšení ionizace. Protože ve spektru blanku se neobjevila žádná z analyzovaných hmot, mohl být použit SIM mód pro hodnocení nečistot.

**Výsledné podmínky HPLC/MS metody:**

Chromatografická kolona:	Luna Phenyl-hexyl (150 x 3 mm I.D.; 5 µm)
Gradientový profil:	A - 4% ACN v 0,04% vodném roztoku HCOOH B - 0,04% HCOOH v ACN  0 - 4 min 0 % B; 4 - 28 min 0 → 51 % B; 28 - 30 min 51 % B; 30 - 30,1 min 51 → 0 % B; 30,1 - 35 min 0% B
Průtok:	300 µl/min
Detekce:	viz nastavení ESI
Retenční čas:	AH = 2,0 min, AO = 3,4, CA = 12,9 min, T 12 = 26,8 min, D = 27,4 min

Následně byla tato metoda validována s ohledem na linearitu, přesnost, správnost, selektivitu a stabilitu. Byly určeny také parametry LOD a LOQ. Linearita byla prokázána v koncentračním rozmezí 50 - 250 ng/ml pro všechny analyty s korelačními koeficienty vyššími než 0,9984. Správnost (Recovery) metody byla pro AH 98,6 % - 105,0 %, pro CA 102,6 % - 104,8 % a pro DAH 97,9 % - 100,9 %. Přesnost metody (RSD) pak byla pro AH 3,19 % - 4,42 %, pro CA 3,22 % - 5,81 % a pro DAH 4,8 % - 8,78 %. Byla prokázána také selektivita metody a stabilita vzorků po dobu 31 h. LOD = 3 ng/ml a LOQ = 50 ng/ml byly shodné pro všechny tři hodnocené analyty.

Tato metoda byla na závěr použita pro analýzu reálného vzorku substance T 12 z průmyslové výroby, kde byly jednotlivé nečistoty kvantifikovány. V případě nečistoty AH bylo nalezeno 60 ng/ml, DAH 70 ng/ml a u nečistoty CA bylo nalezené množství pod limitem kvantifikace.

**ZÁVĚR:**

V této práci byla poprvé popsána MS a MS/MS spektra T 12 i jeho nečistot AH, CA a DAH. Následně byla vyvinuta metoda HPLC/MS, která umožňuje hodnotit čistotu a stabilitu substance T 12. Metoda byla zvalidována a použita pro stanovení obsahu nečistot v reálném vzorku nově nasyntetizované substance T 12. Tato metoda nyní slouží v průmyslové výrobě k hodnocení kvality substance T 12.



## **4.2 ANALYTICKÉ HODNOCENÍ EFAVIRENZ V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU**

Druhá část experimentální práce byla vypracována během zahraniční stáže na Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, v Německu, a byla zaměřena na analytické hodnocení poměrně nového antiretrovirovika efavirenz (EFV) v biologickém materiálu. Světovou zdravotnickou organizací byl EFV doporučen jako léčivo první volby pro antiretrovirální terapii v afrických zemích, kde pacienti velmi často trpí koinfekcí HIV a TBC. V případě TBC je léčivem volby rifampicin [170].

Určitou nevýhodou při užívání EFV je jeho velká inter-individuální variabilita plasmatických koncentrací. Hlavní část biotransformace EFV totiž probíhá pomocí cytochromu P-450 (CYP 2B6). EFV patří mezi induktory CYP-450, což dokládá také snižující se poločas eliminace léčiva při dlouhodobém užívání. Z tohoto důvodu patří EFV, i ostatní antiretrovirovika, do skupiny léčiv, která by měla být u pacientů monitorována, s cílem individuální úpravy podávané dávky. Nízké koncentrace totiž vedou ke snížení terapeutické účinnosti a zvýšení rizika vzniku rezistence, naopak vysoké plasmatické koncentrace jsou zodpovědné za výrazné vedlejší a toxické účinky léčiva. Rifampicin, jenž je také potenciálním induktorem CYP-450, může v případě současného podání s EFV způsobit výrazný pokles plasmatických koncentrací. Tato interakce pak vede k významnému snížení antiretrovirálního účinku a rozvoji rezistence. V literatuře se v tomto případě udává snížení plasmatické koncentrace u EFV až o 13 – 25 %. [161, 170, 171].

Karolinska Institut ve Švédsku společně s německou Ruprecht-Karls-Universität proto v roce 2007 zahájili rozsáhlou mezinárodní klinickou studii, která se těmito potenciálními interakcemi zabývá. Kromě Švédska a Německa se studie účastní také Etiopie a Tanzanie. Reálné vzorky jsou získávány právě od afrických pacientů, kteří touto koinfekcí TBC a HIV trpí. První část projektu probíhala v německých a švédských laboratořích, kde byly vyvíjeny dostatečně citlivé a selektivní metody pro hodnocení EFV v biologickém materiálu. Jeden z dílčích cílů této rozsáhlé studie byl vývoj a validace vhodných metod pro hodnocení EFV v plasmě, ultrafiltrátu a monocytech periferní krve. Nezbytné bylo také vyvinout vhodné postupy úpravy vzorků. Tato část probíhala v Německu, a jako vhodná analytická metoda byla zvolena HPLC/MS/MS s využitím trojitého kvadrupólu jako analyzátoru.

#### **4.2.1 QUANTIFICATION OF EFAVIRENZ IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELL, PLASMA AND ULTRAFILTRATE USING LIQUID CHROMATOGRAMY COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY**

Anne-Kathrin Matthée, **Ivana Pasáková**, Claudia Röder, Tilman Heinrich,  
Walter E. Haefeli, Gerd Mikus, Jürgen Burhenne

J. Chrom. B; under review

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Chromatography B  
Manuscript Draft

Manuscript Number: JCB-08-636

Title: Quantification of efavirenz in peripheral blood mononuclear cells, plasma, and ultrafiltrate using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Article Type: Full Length Article

Keywords: efavirenz; liquid chromatography; tandem mass spectrometry; LC/MS/MS; plasma; peripheral blood mononuclear cells; ultrafiltrate; protein binding.

Corresponding Author: Dr. Jürgen Burhenne, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Heidelberg, Clinical Pharmacology and Pharmacoepidem.

First Author: Anne-Kathrin Matthée

Order of Authors: Anne-Kathrin Matthée; Ivana Pasáková; Claudia Röder; Tilman Heinrich, PhD; Walter E Haefeli, MD; Gerd Mikus, MD; Jürgen Burhenne, PhD

## Manuscript

1                   **Quantification of efavirenz in peripheral blood mononuclear cells, plasma, and**  
2                   **ultrafiltrate using liquid chromatography coupled to tandem mass**  
3                   **spectrometry**  
4  
5  
6  
7  
8

9                   Anne-Kathrin Matthée, Ivana Pasáková, Claudia Röder, Tilman Heinrich, Walter E.  
10                  Haefeli, Gerd Mikus, Jürgen Burhenne  
11  
12  
13  
14

15                  Department of Internal Medicine VI, Clinical Pharmacology and  
16                  Pharmacoepidemiology, Im Neuenheimer Feld 410, University of Heidelberg  
17                  D-69120 Heidelberg, Germany.  
18  
19  
20  
21  
22

23  
24  
25  
26                  \* Author to whom the correspondence should be addressed  
27  
28  
29  
30

31                  **Address for correspondence and reprint requests**  
32

33                  Jürgen Burhenne, PhD  
34                  Department of Internal Medicine VI,  
35                  Clinical Pharmacology and Pharmacoepidemiology  
36                  University of Heidelberg  
37                  Im Neuenheimer Feld 410  
38                  D-69120 Heidelberg, Germany  
39                  Phone: +49 6221 56 36395, Fax: +49 6221 56 5832,  
40                  Email: juergen.burhenne@med.uni-heidelberg.de  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Abstract**

1  
2 A key site of action of antiretroviral drugs is the peripheral blood mononuclear cell  
3  
4 (PBMC) and the concentration within this compartment is an important determinant of  
5  
6 therapeutic success. For the quantification of the HIV non-nucleoside reverse  
7  
8 transcriptase inhibitor efavirenz in human plasma, plasma ultrafiltrate, and PBMCs a  
9  
10 highly sensitive and selective assay was developed, validated, and applied to  
11  
12 samples of a healthy volunteer. BD Vacutainer<sup>®</sup> CPT<sup>™</sup> were used for PBMC  
13  
14 separation and Millipore Centriplus<sup>®</sup> centrifugal filters for ultrafiltrate generation. The  
15  
16 PBMC isolation procedure was optimised to avoid platelet contamination in the  
17  
18 PBMC fraction. Protein precipitation with ice cold acetonitrile was used for sample  
19  
20 preparation. Extracts were chromatographed within 15 min on a Phenomenex<sup>®</sup>  
21  
22 Synergi Fusion RP column with a gradient consisting of acidified 5 mM ammonium  
23  
24 acetate buffer, acetonitrile, and methanol. Efavirenz was quantified using flecainide  
25  
26 as internal standard and electrospray tandem mass spectrometry in the selected  
27  
28 reaction monitoring mode. The lower limit of quantification was 5.0 ng/mL in plasma,  
29  
30 0.5 ng/mL in ultrafiltrate, and 0.2 ng/cell pellet ( $\sim 3 \times 10^6$  cells) in PBMCs. The  
31  
32 calibration range covered more than three logs with an overall accuracy varying  
33  
34 between -6.8% and +3.9% and an overall precision ranging from 4.1% to 10.4% (SD  
35  
36 batch-to-batch). After multiple oral doses of efavirenz (400 mg qd for 14 days)  
37  
38 analyte concentrations could be quantified over a full dosing interval in plasma,  
39  
40 ultrafiltrate, and PBMCs. The method is well suited for quantification of intracellular  
41  
42 efavirenz concentrations concurrently with free and total plasma concentrations after  
43  
44 administration of therapeutic doses.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

53 **Key Words:** efavirenz, liquid chromatography, tandem mass spectrometry, LC/MS/MS,  
54  
55 plasma, peripheral blood mononuclear cells, ultrafiltrate, protein binding  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 1. Introduction

1  
2 The non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) efavirenz is commonly  
3  
4 used in highly active antiretroviral therapy (HAART), which usually consists of two  
5  
6 nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) combined with one NNRTI or one  
7  
8 or two protease inhibitors [1]. Even though HAART has markedly improved the  
9  
10 clinical outcome of HIV-infected patients, virological treatment failure often occurs  
11  
12 already within the first year of therapy [2,3]. Evidence is growing that suboptimal drug  
13  
14 concentrations at the site of virus replication (e.g. within CD4<sup>+</sup> cells) will confer  
15  
16 selective pressure to the virus that ultimately results in the emergence of mutant viral  
17  
18 isolates with reduced susceptibility to antiviral drugs [2,4]. Conversely high drug  
19  
20 concentrations are linked to toxicity and increased rates of adverse events, which  
21  
22 may limit treatment adherence [5].  
23  
24  
25  
26  
27

28 Many HIV drugs including efavirenz are substrates, inhibitors, and/or inducers of  
29  
30 cytochrome P450 (CYP) isozymes and P-glycoprotein and have the potential to  
31  
32 mutually modify their pharmacokinetics. Additionally efavirenz is recommended by  
33  
34 the World Health Organisation (WHO) for antiretroviral therapy in Africa [6] where it  
35  
36 will be routinely co-administered with rifampicin, a potent CYP-inducer in patients  
37  
38 with tuberculosis and HIV co-infection. The resulting drug interaction may  
39  
40 substantially reduce efavirenz plasma concentrations [7,8]. For this and other  
41  
42 purposes therapeutic drug monitoring of HIV drug concentrations is a valuable tool to  
43  
44 improve efficacy in treatment-naïve patients [9] and is also well established in  
45  
46 patients to detect and consider factors limiting optimum therapeutic response like  
47  
48 non-adherence and large pharmacokinetic variability often caused by drug  
49  
50 interactions [3,10]. However, the value of (total) plasma concentration monitoring  
51  
52 may be limited due to the large interindividual differences in protein binding e.g.  
53  
54 leading to inter-patient variability of up to 48% in the free (active) fraction of protease  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 inhibitors [11] and possibly to other highly protein bound HIV drugs [12]. Moreover,  
2 because the membrane of PBMCs is an actively regulated barrier between plasma  
3 and target site, plasma concentration monitoring may not closely reflect drug  
4 concentrations reaching the site of action. Hence therapeutic drug monitoring of  
5 efavirenz within leukocytes or even their subfractions (e.g. CD4<sup>+</sup> cells) might have  
6 distinct advantages over the determination of plasma concentration [13]. For this  
7 purpose we developed and optimised analytical methods to quantify HIV drugs in  
8 plasma, plasma ultrafiltrate (determination of unbound drug concentration), and  
9 PBMCs and established cell isolation procedures [14-16]. Cell isolation protocols  
10 depending on density gradient separation using Vacutainer<sup>®</sup> CPT<sup>™</sup> from Becton  
11 Dickinson were also subject in several other studies [e.g. 14,17-21]. An often  
12 neglected problem in this procedure is the co-extraction of large amounts of platelets  
13 from whole blood samples that may contribute a significant volume to the extracted  
14 cell mass.

15 This paper describes development and validation of a highly sensitive method to  
16 quantify total and free efavirenz in plasma and the application of this method to  
17 largely platelet-depleted leukocyte fractions in samples of a healthy volunteer dosed  
18 to steady state.

## 19 **2. Participants, material, and methods**

### 20 **Clinical study**

21 The study protocol was approved by the Ethics Committee of Medical Faculty of  
22 Heidelberg and was conducted at the Department of Internal Medicine VI, Clinical  
23 Pharmacology and Pharmacoepidemiology in accordance with good clinical practice  
24 guidelines, the Declaration of Helsinki, and German legal requirements.

25 After obtaining written informed consent from all healthy volunteers, two capsules of  
26 efavirenz (400 mg qd) were orally administered over a period of 14 days and blood

1 samples were drawn for 24 hours after the last administration. The samples of one  
2 participant (male, 26 years, 77.4 kg) were used to test the applicability of the assay  
3 procedures.  
4  
5

### 6 **Materials**

7  
8  
9 Efavirenz reference standard was kindly provided by Bristol-Myers Squibb (New  
10 Brunswick, USA). Sustiva<sup>®</sup> was purchased from Bristol-Myers Squibb and flecainide  
11 reference substance as internal standard was purchased from Sigma-Aldrich  
12 (Steinheim, Germany). Drug free plasma and buffy coat were supplied by the local  
13 blood bank and were obtained from single healthy individuals. Vacutainer<sup>®</sup> CPT<sup>™</sup>  
14 tubes were obtained from Becton Dickinson (Heidelberg, Germany). Centriplus<sup>®</sup>  
15 centrifugal filter devices YM-30 (cut-off 30 kDa) were obtained from Millipore  
16 Corporation (Bedford, USA). Phosphate buffered saline (PBS) was purchased from  
17 Invitro GmbH (Karlsruhe, Germany), Casy<sup>®</sup> ton and Casy<sup>®</sup> clean from Schärfe  
18 System GmbH (Reutlingen, Germany), and Biocoll from Biochrom AG (Berlin,  
19 Germany). All other reagents and solvents used for chromatography, spectroscopy,  
20 and sample preparation were of analytical or higher quality and were purchased from  
21 Merck (Darmstadt, Germany) or from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany). Water  
22 was deionised and filtered by an HP 6 UV/UF TKA system (TKA GmbH, Niederelbert,  
23 Germany).  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

### 46 **Preparation of blood samples**

#### 47 **Plasma sampling**

48  
49  
50 On study day 14, two capsules of 200mg Sustiva<sup>®</sup> (400mg efavirenz) were  
51 administered two hours before breakfast. Blood samples (4.5 mL) were drawn and  
52 immediately centrifuged (3000 g for 15 min at 4°C) before and 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4,  
53 5, 6, 8, 10, 12, and 24 hours after oral dosing. The plasma was stored at -20°C until  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 analysis. For method development and validation drug free plasma from the blood  
2 bank was used.  
3

#### 4 **Free efavirenz fraction in plasma**

5  
6 Isolation of the unbound drug fraction from the individual's plasma (5 h after dosing)  
7 and separation of proteins from drug free plasma (for calibration and QC samples)  
8 was performed by ultrafiltration with Centriplus® YM-30 (regenerated cellulose).  
9  
10 Therefore, 2.0 mL plasma was centrifuged for 20 min (40°C, 1860 g) and 400 µL of  
11 the protein free plasma was used for quantification of the free efavirenz concentration  
12 in plasma.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20

#### 21 **PBMC isolation and buffy coat preparation**

22 For steady state efavirenz quantification in PBMCs whole blood samples (3 x 8 mL)  
23 were taken 5 and 24 h after administration of 400 mg Sustiva® in Vacutainer® CPT™  
24 and centrifuged for 20 min (1700 g, room temperature (RT)). The supernatant  
25 containing plasma, PBMCs, and residual platelets was decanted into 15 mL Falcon  
26 tubes and centrifuged for 10 min by 180 g to separate PBMCs from platelets.  
27  
28 Subsequently plasma and platelets were decanted and the PBMC pellet was re-  
29 suspended in ice cold PBS and centrifuged again (5 min, 180 g, 4°C). To remove  
30 remaining and weakly adsorbed drug from the cell surface this washing step with  
31 PBS was repeated twice. In contrast to earlier publications [14,20-22] the separation  
32 and washing steps were processed at low centrifugal speed to ensure platelet  
33 separation. During the last washing step 60 µL were taken for cell counting and cell  
34 size determination, to determine the volume of isolated cell pellets. Therefore a 50 µL  
35 aliquot was used for duplicate cell counting of the PBMCs and the platelets  
36 (Beckman® Coulter A<sup>c</sup>\*T diff™, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany) and  
37 10 µL were used for PBMC size determination (Casy Cell Counter Modell TTC  
38 Version 2.2D, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Germany). For calibration and  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

quality control (QC) samples, blank PBMCs were isolated from buffy coat and were diluted with PBS (1:1). Onto one part of Biocoll separating solution (1.077 g/mL) two parts of the mixture were carefully transferred and centrifuged for 20 min (700 g, RT). The upper layer containing the PBMC fraction, was pipetted into a Falcon tube, diluted with PBS and centrifuged for 15 min (180 g, RT). The supernatant was removed and the cell pellet was re-suspended in PBS and then centrifuged (180 g, 10 min) to remove plasma residues, Biocoll Separation Solution, and remaining platelets. After these washing steps the supernatant was removed and the cell density was adjusted to  $3 \times 10^6$  cells with PBS. 1 mL of the cell suspension was aliquoted into Eppendorf tubes. After a last centrifugation step (5 min, 180 g, RT) and removal of the supernatant, cell pellets were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### Standard Solutions

The internal standard flecainide (4.49 mg) was weighed into a volumetric flask (10 mL) and dissolved in methanol/water (1/1, v/v). The stock solution was further diluted to an appropriate concentration for the determination in plasma (1000 ng/mL), in PBMCs (75 ng/mL), and in protein free plasma (75 ng/mL).

For preparation of calibration stock solution for the NNRTI, efavirenz (5.46 mg) was weighed into a 10 mL volumetric flask and filled up with methanol/water (1/1, v/v).

The highest calibration point in plasma, ultrafiltrate, and PBMC was prepared by transferring 147  $\mu\text{L}$ , 73  $\mu\text{L}$ , and 29  $\mu\text{L}$  of efavirenz stock solution into 10 mL volumetric flasks and filling up with methanol/water. All other calibration solutions were prepared by diluting these solutions with methanol/water (1/1, v/v).

The QC stock solution was prepared from an independent weighing of efavirenz (5.15 mg/10 mL) as described for calibration stock solutions. From this stock solution three concentrations (plasma, protein free plasma, PBMCs) were prepared by dilution with methanol/water (1/1, v/v).

#### 2.4.1 Calibration samples

1  
2 Blank plasma (200  $\mu\text{L}$ ) was spiked with 25  $\mu\text{L}$  of the respective calibration solutions,  
3  
4 yielding plasma concentrations of 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000, and  
5  
6 10000 ng/mL. Blank ultrafiltrate (400  $\mu\text{L}$ ) was spiked with 50  $\mu\text{L}$  of calibration  
7  
8 solutions, yielding concentrations of 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 300, and 500 ng/mL. Blank  
9  
10 PBMCs were spiked with 25  $\mu\text{L}$  of calibration solutions resulting in total drug amounts  
11  
12 of 0.2, 0.6, 1.8, 4.8, 13.2, 26, and 40 ng /  $3 \times 10^6$  cells.  
13  
14  
15

#### 2.4.2 QC samples

16  
17 The QC samples were prepared as described for calibration samples. The plasma  
18  
19 concentrations were 18.87, 330.1, and 3773 ng/mL, the ultrafiltrate concentrations  
20  
21 3.773, 165.1, and 318.3 ng/mL, and the QC PBMC samples contained 0.755, 12.45,  
22  
23 and 24.52 ng /  $3 \times 10^6$  cells.  
24  
25  
26  
27

#### Protein precipitation procedures

28  
29 Calibration, QC, and study samples of plasma (200  $\mu\text{L}$ ), ultrafiltrate (400  $\mu\text{L}$ ), and  
30  
31 PBMCs ( $\sim 3 \times 10^6$  cells) were spiked with 25  $\mu\text{L}$  of internal standard solution.  
32  
33 Methanol/water (1/1, v/v) was added to study samples to adjust the respective  
34  
35 volume of calibration or QC solution in spiked samples. Subsequently plasma and  
36  
37 ultrafiltrate samples were shaken for 5 min, PBMCs for 15 min. For protein  
38  
39 precipitation ice cold acetonitrile was added to plasma (800  $\mu\text{L}$ ), ultrafiltrate (800  $\mu\text{L}$ ),  
40  
41 and PBMC pellets (400  $\mu\text{L}$ ). The samples were shaken again for 20 min. PBMCs  
42  
43 were additionally treated by ultrasonication for 15 min to ensure membrane lysis.  
44  
45 After centrifugation (15 min, 16100 g, 6°C) liquid phases were separated in glass  
46  
47 tubes and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 40°C. The extracts  
48  
49 were reconstituted by adding LC eluent to plasma (250  $\mu\text{L}$ ), ultrafiltrate (120  $\mu\text{L}$ ), and  
50  
51 PBMCs (150  $\mu\text{L}$ ). Complete dissolution of evaporated extracts was ensured by  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 treatment with ultrasonication (5 min). The extracts were transferred into autosampler  
2 vials and injected (25  $\mu$ L) into the LC/MS/MS system.  
3

#### 4 **Instrumental analysis parameters**

5  
6 The LC/MS/MS system (Thermo Fisher, Dreieich, Germany) consisted of a Surveyor  
7 Plus HPLC System (cooled autosampler with integrated column heater and  
8  
9 quaternary LC pump with degasser) and a triple stage quadrupole mass  
10 spectrometer (TSQ 7000 with API-2 ion source and performance kit). For  
11 chromatographic separation a Synergi Fusion RP column (4  $\mu$ , 80 A, 150 cm x 2 mm,  
12 Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) with integrated guard column was used. The  
13 eluent consisted of 0.1% (vol) aqueous acetic acid including 5 mM ammonium  
14 acetate (A), acetonitrile (B), and methanol (C). The gradient started with  
15  
16 74% A/12% B/14% C. Within a minute the ratio was changed to 42% A/26% B/32% C  
17  
18 and kept until 13 min. Within the next min the ratio was changed to 2% A/49% B/49%  
19  
20 C and kept until 15 min. The flow rate was 0.45 mL/min and was introduced without  
21  
22 splitting into the electrospray ion source (ESI) of the mass spectrometer. ESI  
23  
24 interface parameters were as follows: middle position, spray voltage 4.5 kV, sheath  
25  
26 gas ( $N_2$ ) 90 psi, aux gas ( $N_2$ ) 20 scales, capillary heater temperature 350°C. The  
27  
28 mass spectrometer was tuned automatically using myoglobin and Xcalibur 1.3  
29  
30 system software standard procedures. The voltages responsible for the ion beam  
31  
32 focus (e.g. heated capillary, skimmer lens, etc.) were optimised during continuous  
33  
34 delivery of standard solution into the LC eluent via a syringe pump and the intensity  
35  
36 of base peak was monitored and adjusted to maximum. Selected reaction monitoring  
37  
38 measurements were performed at 1.6 kV multiplier voltage. In-source collision  
39  
40 induced dissociation (CID) value (offset on Q0) was set to 15 V for dissociation of  
41  
42 analyte/solvent clusters. MS/MS transitions monitored in the negative ion mode were  
43  
44  $m/z$  313.9  $\rightarrow$   $m/z$  243.8 at 24 V for efavirenz and  $m/z$  413.0  $\rightarrow$   $m/z$  269.9 at 28 V for  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

flecainide. Additional parameters influencing the mass transitions were optimised:  
Argon pressure in the collision quadrupole was set to 2.0 mbar and the offset  
voltages were adjusted for each drug.

### **Ion suppression**

Despite sample preparation, extracts from biological samples may contain matrix, salts, and other biological residues. These co-eluting compounds may influence baseline stability of the chromatography and/or induce unexpected peaks, may alter the ionisation process by ion suppression, or may contaminate the ion source resulting in decreased accuracy and precision, particularly at the lower limit of quantification (LLOQ). The influence of ion suppression on ESI and the quantification of efavirenz were monitored using the post column infusion method [23,24]. Therefore efavirenz and internal standard (~750 ng/mL, each) were introduced by a syringe pump at a flow of 10  $\mu$ L/min post column into the eluent flow. Blank samples from plasma were prepared according to the sample preparation procedures and 25  $\mu$ L of the supernatant was injected under the described chromatographic and spectroscopic conditions to analyze a potential influence of eluting matrix compounds onto analyte responses.

### **Validation of the analytical methods**

Analytical method validation for plasma, plasma ultrafiltrate, and PBMCs was performed in three analytical batches according to the recommendations published by the US Food and Drug Administration (FDA) [25,26]. Accuracy was calculated as the ratio of measured mean concentrations from individual batches divided by the nominal value and expressed in percent. Precision was defined as the ratio of standard deviation (SD) and mean calculated concentration in percent. These values are reported within-batch and batch-to-batch. For this purpose validation batches (n=3) each containing at least seven calibration

1 samples and 18 QC samples at three different concentrations (QC A, B, and C) were  
2 analysed, and from these values accuracy and precision of the method were  
3  
4 calculated and expressed as mean values  $\pm$  SD. Additionally, accuracy and precision  
5  
6 at the LLOQ were determined from one validation batch.  
7

8  
9 Extraction recovery rates for efavirenz and the internal standard flecainide were  
10  
11 calculated for the matrices plasma and PBMCs within the validation procedure from  
12  
13 six-fold determinations at three concentrations. Therefore resulting peak areas of  
14  
15 efavirenz and internal standard after extraction from the respective matrices were  
16  
17 compared to the peak areas of pure solutions containing 100% amount. This FDA-  
18  
19 conform procedure accounts for all influences on recovery, e.g. extraction rate,  
20  
21 matrix, and suppression effects and is often addressed as process efficiency.  
22  
23

24  
25 Stability of the drug was tested using plasma, plasma ultrafiltrate, and PBMCs in  
26  
27 three freeze-and-thaw cycles and the accuracies were calculated. Selectivity for each  
28  
29 matrix was measured using blank matrix from six different individuals. These samples  
30  
31 were processed according to the method described without addition of analytes and  
32  
33 internal standard and the baseline at the analytes retention times were evaluated.  
34  
35 Finally adsorption of the drug to the Centriplus ultrafiltration device was tested with  
36  
37 efavirenz spiked protein free plasma in six-fold determinations at four concentrations.  
38  
39  
40  
41  
42  
43

#### 44 **2.9. Calculations and statistical methods**

45 Calibration curves were determined for efavirenz using the respective calibration  
46  
47 samples for each matrix. Peak area ratios of the analyte and internal standard were  
48  
49 calculated and weighted (1/x) quadratic regressions were performed for each  
50  
51 analytical batch using the procedures of Thermo Electron's software Xcalibur  
52  
53 LCQuan 1.3. Cellular volumes of PBMCs were calculated by multiplication of  
54  
55 measured cell volume with the number of isolated PBMCs. The intracellular  
56  
57 concentration was calculated by dividing the quantified amount of efavirenz by the  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 volume of the respective cell pellet in triplicate and reporting the mean value.

2 Pharmacokinetic parameters were calculated with WinNonlin Professional Version

3  
4 5.2 (Pharsight Corp., Mountain View, USA).

### 6 7 **3. Results and discussion**

#### 8 9 **3.1 Performance of the laboratory methods**

##### 10 11 **3.1.1 Mass spectrometric and chromatographical characteristics**

12 Positive ionisation by ESI adding  $H^+$  to the analyte did not occur with efavirenz but

13  
14 the drug was easily ionised in the negative mode, building intensive  $[M-H]^-$  ions ( $m/z$

15 314) related to the highly electronegative trifluoromethyl group in efavirenz. Because

16  
17 stable isotopically labelled efavirenz was not available flecainide containing two

18  
19 fluoromethyl groups was chosen as internal standard for the quantification of

20  
21 efavirenz. Flecainide was readily ionised with negative ESI and its chromatographical

22  
23 behaviour and extraction from biological matrices is similar to efavirenz.

24  
25 Fragmentation under MS/MS conditions in the product ion scan mode produced

26  
27 characteristic and intensive product ions for efavirenz ( $m/z$  314  $\rightarrow$   $m/z$  244 at 24V)

28  
29 and flecainide ( $m/z$  413  $\rightarrow$   $m/z$  270 at 28V CID energy). Figure 1 shows the

30  
31 respective mass spectra and the expected fragmentation reaction. These mass

32  
33 transitions were used for specific and sensitive quantification in the selected

34  
35 monitoring mode. Optimal coupling of LC to the ESI source was achieved using a

36  
37 Phenomenex Synergy Fusion RP column in combination with a stepwise gradient

38  
39 from 74% to 2% aqueous eluent and a parallel increase of the acetonitrile/methanol

40  
41 fraction from 26% to 98%. This resulted in short chromatograms (15 min) with good

42  
43 separation of efavirenz and internal standard (Fig. 2-4).

##### 44 45 **3.1.2 Performance and optimisation of the cell isolation procedure**

46  
47 PBMC collection and isolation using BD Vacutainer<sup>®</sup> CPT<sup>™</sup> is easy, fast, and with

48  
49 regard to the risk of infection a safe way compared to classical Ficoll isolation. One

50  
51 problem of this procedure is to wash off the drug being adsorbed to the PBMCs

1 surface. The threefold washing procedure with ice cold PBS is widely used  
2 [14,17,18,20] and has been validated using radioactively labelled HIV drugs [22].  
3  
4 Another neglected problem is the co-extraction of platelets with PBMCs from whole  
5 blood samples. Washing procedures with centrifugation steps higher than 300 g will  
6 enrich platelets in the PBMC fraction, which escapes detection when cell counting is  
7 performed with Neubauer chamber and microscope, but Casy counting directly  
8 proved PBMC contamination by platelets (Fig. 5 A). Reduced centrifugation power  
9 (180 g) allowed the sedimentation of PBMCs while keeping platelets almost  
10 completely suspended in the washing solution (Fig. 5 B). This procedure therefore  
11 also allows the quantitative separation of PBMCs and platelets for other purposes.  
12  
13 Exact quantification of PBMCs and platelets was performed by the Beckman Coulter  
14 A<sup>c</sup>\*T diff<sup>TM</sup>. When applied to the samples of our healthy volunteer exposed to  
15 efavirenz the extracted PBMC pellets contained a mean of  $2.6 \pm 0.2 \times 10^6$   
16 PBMCs/sample which corresponds to a cell volume of  $9.0 \pm 0.5 \times 10^8$  fL. This number  
17 of PBMCs was sufficient to quantify drug concentrations for efavirenz during a full 24-  
18 hour dosing interval. The separated platelet number accounted for  $1.3 \pm 0.1 \times 10^8$   
19 and accounted for a volume of  $1.0 \times 10^9$  fL.

### 3.1.3 Performance of the protein precipitation procedure

20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
Within HIV drug analysis, clean-up of biological samples is usually performed by  
more time-consuming liquid/liquid [18,27] or more expensive solid phase extraction  
procedures [19,28]. With these methods substances within a rather small polarity  
range can be extracted. In the case of co-extraction of efavirenz and flecainide,  
compounds with considerably differing polarity had to be separated. A method  
depending on protein precipitation therefore allowed the inclusion of the more polar  
flecainide in the procedure. During method development different precipitation  
reagents were tested to optimise protein separation. Organics (e.g. methanol), acids



1 (e.g. perchloric acid), and aqueous salt solutions (e.g. zinc sulphate) are often  
2 efficient in removing proteins from plasma [29]. However, sample preparation with  
3 these reagents was not successful, but pure ice cold acetonitrile was the most  
4 efficient precipitation reagent for efavirenz and flecainide and no degradation or peak  
5 broadening was observed. Drug recovery rates in plasma and PBMCs were  
6 assessed in duplicate determination at three concentration levels. From plasma the  
7 recoveries of efavirenz / internal standard were +10.4% / +3.6% (low), +1.3% / +9.5%  
8 (medium), and -9.3% / +1.3% (high). The respective values in PBMCs were +2.6% / -  
9 2.5% (low), -1.9% / -9.2% (medium), and +3.5% / -5.8% (high).  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

#### 22 **3.1.4 Ion suppression effects**

23 No matrix or drug interference resulting in unexpected peaks was observed in blank  
24 plasma, ultrafiltrate, and PBMCs from six different individuals as shown in blank  
25 chromatograms in the absence of analytes (Fig. 2-4, chromatograms A). Ion  
26 suppression was most intensive around the dead volume (0.5 – 2.0 min) and was  
27 likely caused by ionic or polar matrix compounds that remained in the sample extract  
28 after protein precipitation and eluted at the beginning of the aqueous reversed phase  
29 chromatography. Efavirenz and flecainide detection was not affected because of their  
30 delayed retention times (5-6 min flecainide and 12-13 min for efavirenz) and because  
31 the ion suppression effect overall was of only low intensity (Fig. 6).  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

#### 45 **3.1.5 Validation results**

46 The cell isolation and protein precipitation procedures combined with the LC/MS/MS  
47 quantification method entirely met FDA's requirements for bioanalytical method  
48 validation. The absence of interfering signals in blank matrices of six different  
49 individuals confirms the selectivity of the method. Drug concentrations in samples  
50 from clinical trials were measured within the calibration range of 5-10,000 ng/mL  
51 (plasma), 0.5-500 ng/mL (ultrafiltrate), and 0.2-40 ng /  $3 \times 10^6$  cells with correlation  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 coefficients of always  $r^2 \geq 0.9968$  (quadratic regression) and appropriate accuracy and  
2 precision. Over all matrices, the within-batch accuracies varied between -13.5% and  
3 +8.8% and the batch-to-batch accuracies ranged from -6.8% to +3.9%. Concurrent  
4 precision data for the different matrices is shown in Table 1. LLOQs (lowest  
5 calibration points) for efavirenz in plasma was 5 ng/mL (with accuracy / precision of  
6 -0.5% / +5.2%), in ultrafiltrate 0.5 ng/mL (accuracy / precision of -1.3% / +14.0%),  
7 and in PBMCs 0.2 ng /  $3 \times 10^6$  cells (accuracy / precision of -10.9% / 7.3%). Stability  
8 in plasma, ultrafiltrate, and PBMCs was tested by three freeze and thaw cycles at QC  
9 B levels, but no relevant concentration change was observed (accuracy ranged for all  
10 matrices between -12.0% and +10.4%). As already mentioned drug recovery rates of  
11 efavirenz and flecainide from plasma and PBMCs varied between -9.3% and +10.4%.  
12 Finally the ultrafiltration cartridges were tested six-fold at four concentrations (5, 25,  
13 100, and 1000 ng/mL plasma) for adsorption of efavirenz to the plastic and  
14 membrane. The recovery values were +0.8% (5 ng/mL), -21.4% (25 ng/mL), -17.8%  
15 (100 ng/mL), and -5.6% (1000 ng/mL).  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

### 36 **3.2 Intracellular and plasma concentrations and intracellular/plasma ratios**

37 Although triple drug combination decreased plasma HIV-1 RNA levels below the limit  
38 of detection in most cases, some patients become non-responsive to HAART  
39 because of rapid development of drug resistant variants of HIV-1 likely as a result of  
40 inadequate drug concentrations [30-34] probably as a consequence of too low  
41 intracellular drug concentrations [33]. Because HIV replicates within CD4<sup>+</sup> cells,  
42 antiviral agents must reach cytosolic concentrations sufficiently high to inhibit HIV's  
43 intracellular reproductive cycle. Monitoring of intracellular concentrations might thus  
44 be a useful tool to ensure effective drug concentrations at the site of virus replication.  
45 Several validated methods have been established to analyse intracellular drug  
46 amounts [18,19,21,28,35] and they all depend on LC/MS or LC/MS/MS to meet the  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 selectivity and sensitivity required in in-vivo studies. These methods differ with regard  
2 to application purpose, HIV drug, run times, limits of quantification, cell isolation  
3 procedures, and number and kind of biological matrix assessed. We established and  
4 validated an analytical method for the monitoring of the antiretroviral first-line drug  
5 efavirenz, an NNRTI often used in HAART that is subject to drug interactions and  
6 therefore intensively analysed in clinical drug trials. The assay should meet the  
7 specific demands of such a drug and include the three biological matrices between  
8 which the drug is directly exchanged. The quantification of intracellular  
9 concentrations will also allow assessing transport across leucocytes membranes to  
10 the site of action. Efavirenz is known to induce CYPs, P-glycoprotein, and other drug  
11 transporters [36-38]. While these expressional changes will most likely not influence  
12 the efficiency of efavirenz itself, they might change the effect of other co-administered  
13 drugs. The required excellent selectivity and sensitivity was achieved by tandem  
14 mass spectrometry, resulting in low LLOQs (0.2 ng /  $3 \times 10^6$  PBMCs, 5.0 ng/mL  
15 plasma, and 0.5 ng/mL ultrafiltrate) and the assay's performance was well suited to  
16 concurrently assess efavirenz concentration-time profiles after administration of low  
17 therapeutic doses. In our study a rather low dose was administered under fasting  
18 conditions which may both result in lower concentrations than those observed in HIV-  
19 positive patients [39]. Even under these conditions the good performance of the  
20 assay allowed quantifying pharmacokinetic profiles of efavirenz over the full dosing  
21 interval (Fig. 7) and the required blood sample volumes were small. In our volunteer,  
22 maximum plasma concentration (5050 ng/mL) was observed after 2.5 h, and the  
23 calculated total efavirenz plasma area under the curve was 46.3 h\*mg/L. We also  
24 evaluated the correlation between total and/or free efavirenz plasma concentration  
25 and the efavirenz concentration inside PBMCs. The free efavirenz plasma  
26 concentration was 11.7 ng/mL resulting in a free fraction of 0.40% quite similar to  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 earlier reports [39,40]. Interestingly, intracellular efavirenz concentrations exceeded  
2 concurrent plasma concentrations (intracellular/total plasma concentration ratio =  
3  
4 1.62) suggesting distinct mechanisms (e.g. active transport) controlling the access of  
5  
6 efavirenz to PBMCs. These findings are in accordance with published data [41,42].  
7

8  
9 To investigate these effects in-vivo and to quantify the pharmacokinetics of efavirenz  
10  
11 in the different body compartments of interest the described assay was developed.  
12  
13

#### 14 **4 Conclusion**

15  
16 The presented method for quantification of efavirenz in different biological  
17  
18 compartments was successfully applied to the samples of a healthy volunteer dosed  
19  
20 to steady state. It consists of an efficient protein precipitation procedure in  
21  
22 combination with LC/MS/MS and was sensitive enough to monitor intracellular, free,  
23  
24 and total plasma efavirenz concentrations throughout a 24 hour dosing interval.  
25  
26 Concurrently PBMC isolation was improved. The high selectivity and sensitivity of  
27  
28 LC/MS/MS and thus low sample volumes even for intracellular determinations allow  
29  
30 repeated blood sampling even in conditions, when large blood volumes are not  
31  
32 available.  
33  
34  
35  
36  
37

#### 38 **Acknowledgement**

39  
40 The authors like to thank Dr. V. Eckstein and K. Wörner for Coulter counting and A.  
41  
42 Deschlmayr, M. Maurer, Dr. C. Storch, and Dr. J. Weiss for their excellent support.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**References**

- 1  
2 [1] L. Waters, L. John, M. Nelson, *Int. J. Clin. Pract.* 61 (2006) 105.  
3  
4 [2] R.E. Aarnoutse, J.M. Schapiro, C.A.B. Boucher, Y.A. Hekster, D.M. Burger,  
5  
6 *Drugs* 63 (2003) 741.  
7  
8 [3] R.P.G. van Heeswijk, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 323.  
9  
10 [4] N.A. Roberts, J.C. Craig, J. Sheldon, *AIDS* 12 (1998) 453.  
11  
12 [5] C. Marzolini, A. Telenti, L.A. Decosterd, G. Greub, J. Biollaz, T. Buclin, *AIDS*  
13  
14 15 (2001) 71.  
15  
16 [6] R. Colebunders, M.R. Kamya, J. Laurence, A. Kambugu, H. Byakwaga, P.S.  
17  
18 Mwebaze, A.M. Muganga, M. Katwera, E. Katabira, *AIDS Rev.* 7 (2005) 148.  
19  
20 [7] S. Moreno, B. Hernandez, F. Drona, *AIDS Rev.* 8 (2006) 115.  
21  
22 [8] W. Anosuthi, W. Mankatitham, A. Lueangniyomkul, S. Chimsuntorn, S.  
23  
24 *Dungkanuparph*, *HIV Med.* 9 (2008) 294.  
25  
26 [9] D. Burger, P. Hugen, P. Reiss, I. Gyssens, M. Schneider, F. Kroon, G. Schreij,  
27  
28 K. Brinkman, C. Richter, J. Prins, R. Aarnoutse, J. Lange, *AIDS* 17 (2003)  
29  
30 1157.  
31  
32 [10] J.E. Ray, D. Marriott, M.T. Bloch, A.J. McLachlan, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 60  
33  
34 (2005) 291.  
35  
36 [11] M. Boffito, P.G. Hoggard, W.E Lindup, S. Bonora, A. Sinicco, S.H. Khoo, G.D.  
37  
38 Perri, D.J. Back, *Ther. Drug Monit.* 26 (2004) 35.  
39  
40 [12] M. Boffito, D.J. Back, T.F. Blaschke, M. Rowland, R.J. Bertz, J.G. Gerber, V.  
41  
42 Miller, *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 19 (2003) 825.  
43  
44 [13] J. Ford, S.H. Khoo, D.J. Back, *J. Antimicrob. Chemother.* 54 (2004) 982.  
45  
46 [14] M. Ehrhardt, M. Möck, W.E. Haefeli, G. Mikus, J. Burhenne, *J. Chromatogr. B*  
47  
48 850 (2007) 249.  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- [15] A.-K. Gehrig, G. Mikus, W.E. Haefeli, J. Burhenne, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2704.
- [16] J. Burhenne, K.D. Riedel, M. Martin-Facklam, G. Mikus, W.E. Haefeli, *J. Chromatogr. B* 784 (2003) 233.
- [17] M. Jemal, S. Rao, M. Gatz, D. Whigan, *J. Chromatogr. B* 795 (2003) 273.
- [18] A. Rouzes, K. Berthoin, F. Xuereb,, S. Djabarouti, I. Pellegrin, J.L. Pellegrin, A.C. Coupet, S. Augagneur, H. Budzinski, M.C. Saux, D. Breilh, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 209.
- [19] H. Pelerin, S. Compain, X. Duval, F. Gimenez, H. Benech, A. Mabondzo, *J. Chromatogr. B* 819 (2005) 47.
- [20] K.M.L. Crommentuyn, J.W. Mulder, A.T.A.Mairuhu, E.C. van Gorp, P.L. Meenhorst, A.D.R. Huitema, J.H. Beijnen, *Antivir. Ther.* 9 (2004) 779.
- [21] S. Colombo, A. Beguin, A. Telenti, J. Biollaz, T. Buclin, B. Rochat, L.A. Decosterd, *J. Chromatogr. B* 819 (2005) 259.
- [22] S.H. Khoo, P.G. Hoggard, I. Williams, E.R. Meaden, P. Newton, E.G. Wikins, A. Smith, J.F. Tjia, J. Lloyd, K. Jones, N. Beeching, P. Carey, B. Peters, D.J. Back, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 3228.
- [23] T.M. Annesley, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041.
- [24] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1175.
- [25] V.P. Shah, K.K. Midha, J.W. Findlay, H.M. Hill, J.D. Hulse, I.J. McGilveray, G. McKay, K.J. Miller, R.N. Patnaik, M.L. Powell, A. Tonelli, C.T. Viswanathan, A. Yacobi, *Pharm. Res.* 17 (2000) 1551.
- [26] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, May 2001,

available from: URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fml.htm> (accessed June 09, 2008).

- 1  
2  
3  
4  
5 [27] E. Dailly, F. Raffi, P. Jolliet, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 353.  
6  
7 [28] Y. Huang, E. Zurlinden, E. Lin, X. Li, J. Tokumoto, J. Golden, A. Murr, J.  
8  
9 Engstrom, J. Conte, *J. Chromatogr. B* 799 (2004) 51.  
10  
11 [29] C. Polson, P. Sarkar, B. Incledon, V. Raguvaran, R. Grant, *J. Chromatogr. B*  
12  
13 785 (2003) 263.  
14  
15 [30] N.A. Roberts, J.C. Craig, J. Sheldon, *AIDS* 12 (1998) 453.  
16  
17 [31] J.H. Condra, W.A. Schleif, O.M. Blahy, L.J. Gabryelski, D.J. Graham, J.C.  
18  
19 Quintero, A. Rhodes, H.L. Robbins, E. Roth, M. Shivaprakash, D. Titus, T.  
20  
21 Yang, H. Tepler, K.E. Squires, P.J. Deutsch, E.A. Emini, *Nature* 374 (1995)  
22  
23 569.  
24  
25 [32] P.G. Hoggard, A. Owen, *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (2003) 493.  
26  
27 [33] D. Breilh, I. Pellegrin, A. Rouzes, K. Berthoin, F. Xuereb, M. Munck, H.  
28  
29 Budzinski, H. Fleuery, M.C. Saux, J.L. Pellegrin, *AIDS* 18 (2004) 1305.  
30  
31 [34] M. Hennessy, S. Clarke, J.P. Spiers, F. Mulcahy, D. Kelleher, E. Meadon, B.  
32  
33 Maher, C. Bergin, S. Khoo, J. Tjia, P. Hoggard, D. Back, M. Barry, *Antivir.*  
34  
35 *Ther.* 8 (2003) 191.  
36  
37 [35] E.R. Meaden, P.G. Hoggard, P. Newton, J.F. Tjia, D. Adam, D. Cornforth, J.  
38  
39 Lloyd, I. Williams, D.J. Back, S.H. Khoo, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50  
40  
41 (2002) 583.  
42  
43 [36] B. Chandler, L. Almond, J. Ford, A. Owen, P. Hoggard, S. Khoo, D. Back, J.  
44  
45 Acquir. Immune Defic. Syndr. 33 (2003) 551.  
46  
47 [37] E. Störmer, L.L. Moltke, M.D. Perloff, D.J. Greenblatt, *Pharm. Res.* 19 (2002)  
48  
49 1038.  
50  
51  
52  
53  
54  
55

- 1  
2  
3  
4  
5 [38] J. Weiss, N. Weis, N. Ketabi-Kiyanvash, C.H. Storch, W.E. Haefeli, Eur. J.  
6 Pharmacol. 579 (2008) 104.  
7  
8 [39] P.F. Smith, R. DiCenzo, G. Morse, Clin. Pharmacokinet. 40 (2001) 893.  
9  
10 [40] J.C. Adkins, S. Noble, Drugs. 56 (1998) 1055.  
11  
12 [41] L.M. Almond, P.G. Hoggard, D. Edirisinghe, S.H. Khoo, D.J. Back, J.  
13 Antimicrob. Chemother. 56 (2005) 738.  
14  
15 [42] R. Tanaka, H. Hanabusa, E. Kinai, N. Hasegawa, M. Negishi, S. Kato,  
16 Antimicrob. Agents Chemother. 52 (2008) 782.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55



## Figure legends

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Figure 1:

Tandem mass spectra (product ion scan using ESI and CID) of efavirenz precursor ion  $m/z$  313.9 (top) and flecainide precursor ion  $m/z$  413.1 (bottom) and the main fragmentations to the respective base peaks ( $m/z$  243.9 for efavirenz and  $m/z$  269.9 for flecainide).

## Figure 2:

LC/MS/MS chromatograms of processed plasma samples. Upper traces efavirenz  $m/z$  313.9  $\rightarrow$   $m/z$  243.8, CID 24 V, Ar 2.0 mbar. Lower traces flecainide  $m/z$  413.0  $\rightarrow$   $m/z$  269.9, CID 28 V, Ar 2.0 mbar. A) blank plasma sample, B) plasma quality control sample at LLOQ (5 ng/mL), and C) plasma sample 5 hours after oral administration (calculated concentration 2898 ng/mL).

## Figure 3:

LC/MS/MS chromatograms of processed ultrafiltrate samples. Upper traces efavirenz  $m/z$  313.9  $\rightarrow$   $m/z$  243.8, CID 24 V, Ar 2.0 mbar. Lower traces flecainide  $m/z$  413.0  $\rightarrow$   $m/z$  269.9, CID 28 V, Ar 2.0 mbar. A) blank ultrafiltrate sample, B) ultrafiltrate quality control sample at LLOQ (0.5 ng/mL), and C) ultrafiltrate sample 5 hours after oral administration (calculated concentration 11.7 ng/mL).

## Figure 4:

LC/MS/MS chromatograms of processed PBMC samples. Upper traces efavirenz  $m/z$  313.9  $\rightarrow$   $m/z$  243.8, CID 24 V, Ar 2.0 mbar. Lower traces flecainide  $m/z$  413.0  $\rightarrow$   $m/z$  269.9, CID 28 V, Ar 2.0 mbar. A) blank PBMC sample, B) PBMC quality control sample at LLOQ (0.2 ng /  $3 \times 10^6$  cells), and C) PBMC sample 5 hours after oral

1 administration (calculated concentration  $4.855 \text{ ng}/2.75 \times 10^6$  cells corresponding to  
2 5014 ng/mL cytosol).  
3

4  
5  
6 Figure 5:  
7

8 Distribution of cell diameters of PBMC fractions isolated from human whole blood  
9 without optimisation of the separation procedure (A) and optimised to remove  
10 platelets (B).  
11  
12  
13

14  
15 Figure 6:  
16

17 LC/MS/MS chromatogram of processed blank plasma during post column infusion of  
18 efavirenz and flecainide for ion suppression determination. Arrows indicate the  
19 expected position of flecainide (~5 min) and efavirenz (~13 min). Upper trace  
20 efavirenz  $m/z$  313.9 →  $m/z$  243.8, CID 24 V, Ar 2.0 mbar. Lower trace flecainide  
21  $m/z$  413.0 →  $m/z$  269.9, CID 28 V, Ar 2.0 mbar. Eluate was introduced into ESI  
22 without splitting from 0-15 min.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 Figure 7:  
31

32 Steady state concentration-time curve of efavirenz in plasma (○), PBMCs (□), and  
33 corresponding concentration of unbound drug (●) after repeated oral doses of  
34 Sustiva<sup>®</sup> (400 mg efavirenz) in a healthy individual.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Tables

Table 1: Summary of validation results for efavirenz in different biological matrices

	Matrix	Plasma <sup>a</sup>			Ultrafiltrate <sup>a</sup>			PBM <sup>b</sup>		
		QC A	QC B	QC C	QC A	QC B	QC C	QC A	QC B	QC C
<b>Within-batch</b>										
1	Mean [ng/mL]	18.05	319.0	4104	3.662	163.3	314.7	0.735	12.44	23.20
	Accuracy [%]	-4.3	-3.4	+8.8	-2.9	-1.1	-1.1	-2.6	-0.1	-5.4
	Precision [%CV]	6.0	7.6	4.6	4.3	5.5	3.3	5.0	4.2	6.3
2	Mean [ng/mL]	18.71	352.4	3435	3.262	147.8	288.9	0.754	12.94	24.27
	Accuracy [%]	-0.8	+6.8	+1.1	-13.5	-10.5	-9.2	±0.0	+3.9	-1.0
	Precision [%CV]	2.6	7.7	4.0	1.0	6.5	6.2	4.4	1.6	3.6
3	Mean [ng/mL]	19.64	354.9	3327	3.563	158.3	314.4	0.737	13.41	26.43
	Accuracy [%]	+4.1	+7.5	-11.8	-5.6	-4.1	-1.2	-2.4	+7.7	+7.8
	Precision [%CV]	6.8	3.7	2.5	7.6	2.7	7.0	5.6	2.1	4.5
<b>Batch-to-batch</b>										
	Mean [ng/mL]	18.75	342.9	3604	3.516	155.6	306.6	0.742	12.93	24.63
	Accuracy [%]	-0.6	+3.9	-4.5	-6.8	-5.7	-3.7	-1.6	+3.9	+0.4
	Precision [%CV]	6.1	7.7	10.4	7.0	6.3	6.5	4.8	4.1	7.2

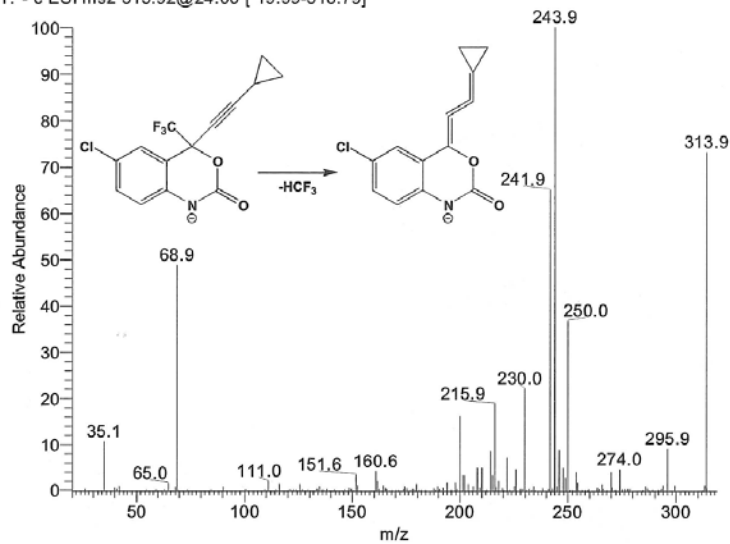
Nominal analyte concentrations <sup>a</sup>[ng/mL] and <sup>b</sup>[ng / 3 x 10<sup>6</sup> cells]

## Figure

Click here to download Figure: JCB-08-Matthee\_Figures\_1-7.doc

Figure 1

optce\_chneCID #23 RT: 0.77 AV: 1 NL: 3.85E4  
T: - c ESI ms2 313.92@24.00 [ 19.99-318.79]



optce #27 RT: 0.91 AV: 1 NL: 5.42E4  
T: - c ESI ms2 413.13@28.00 [ 19.99-417.79]

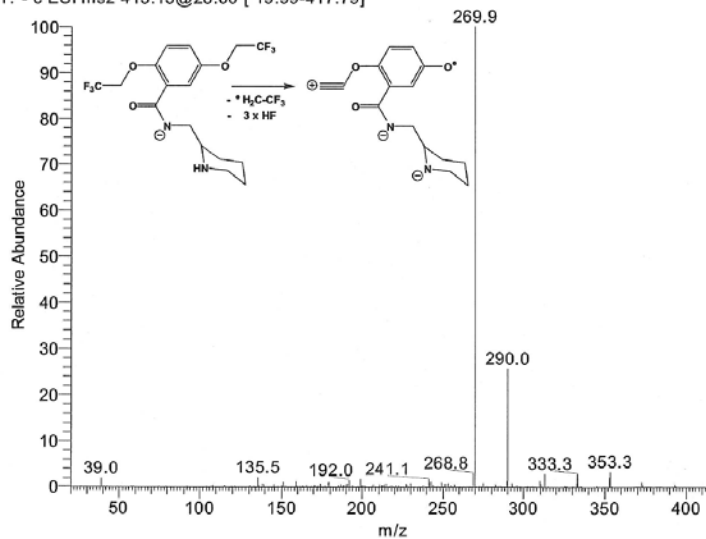


Figure 2

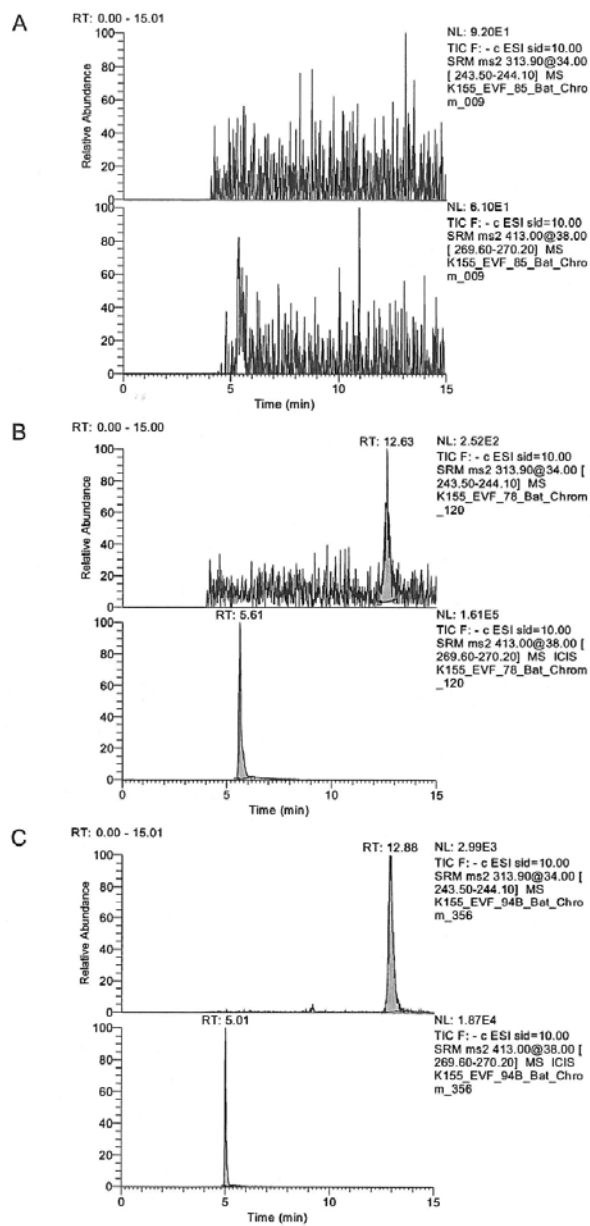


Figure 3

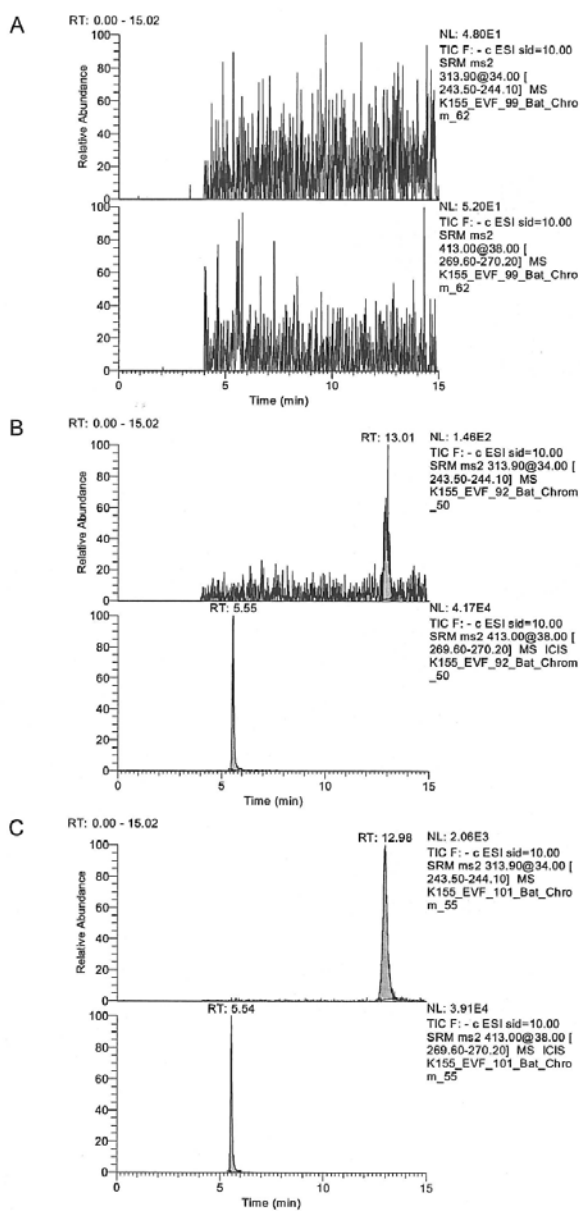


Figure 4

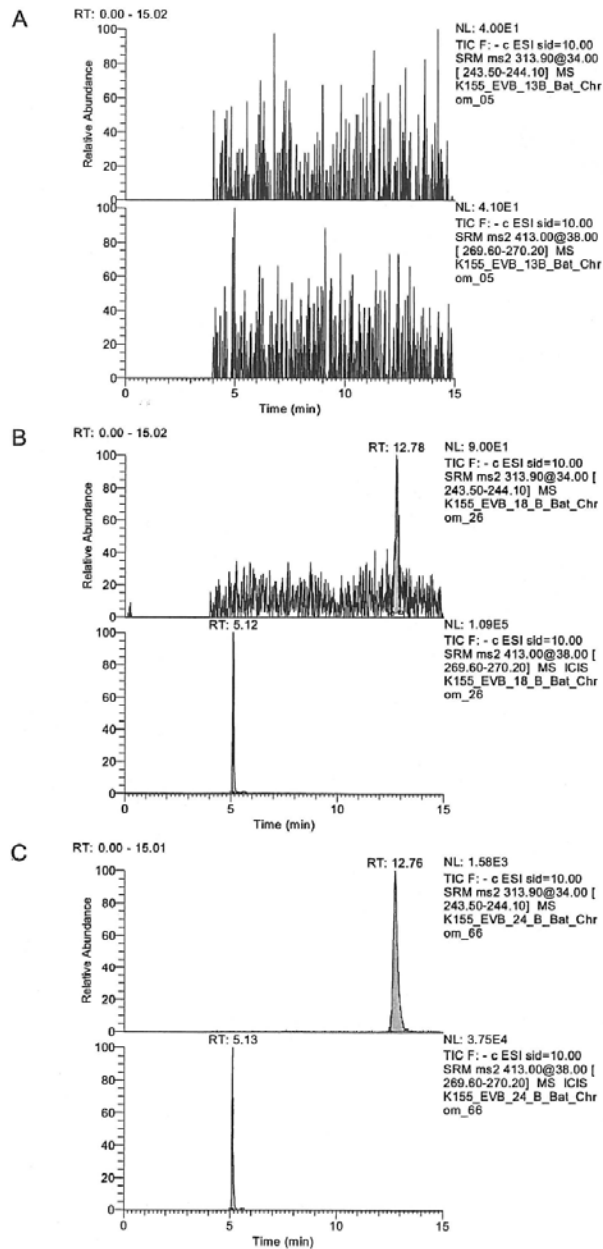
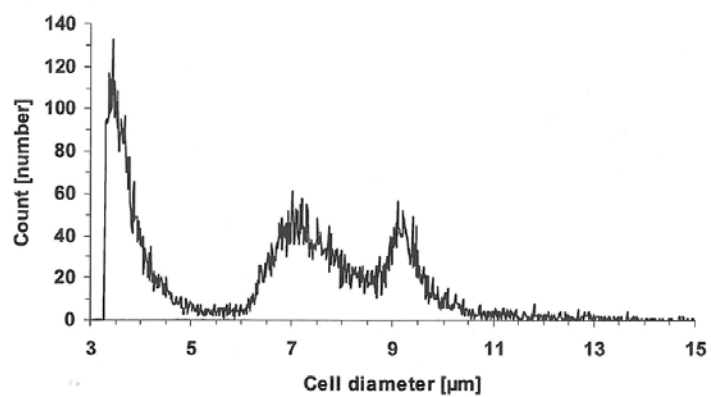


Figure 5

A



B

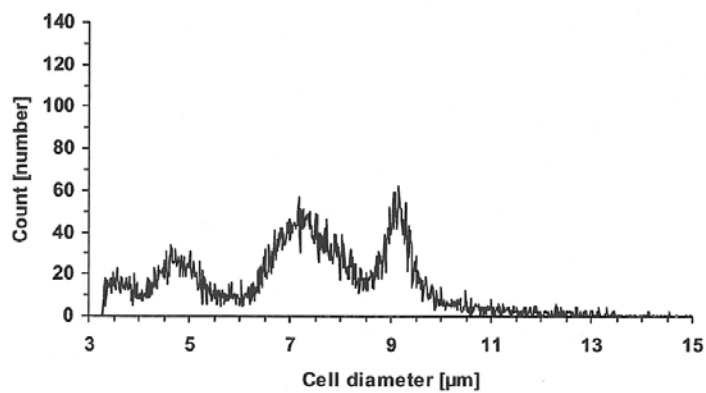




Figure 6

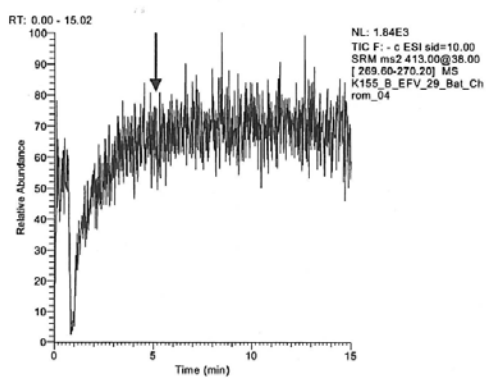
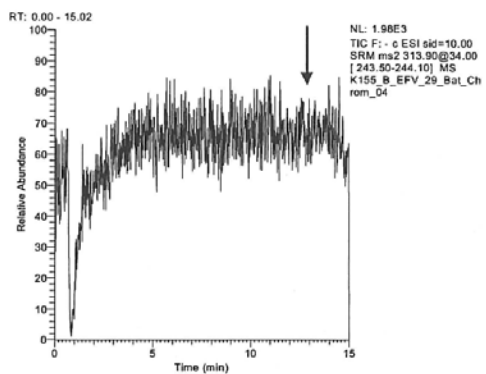
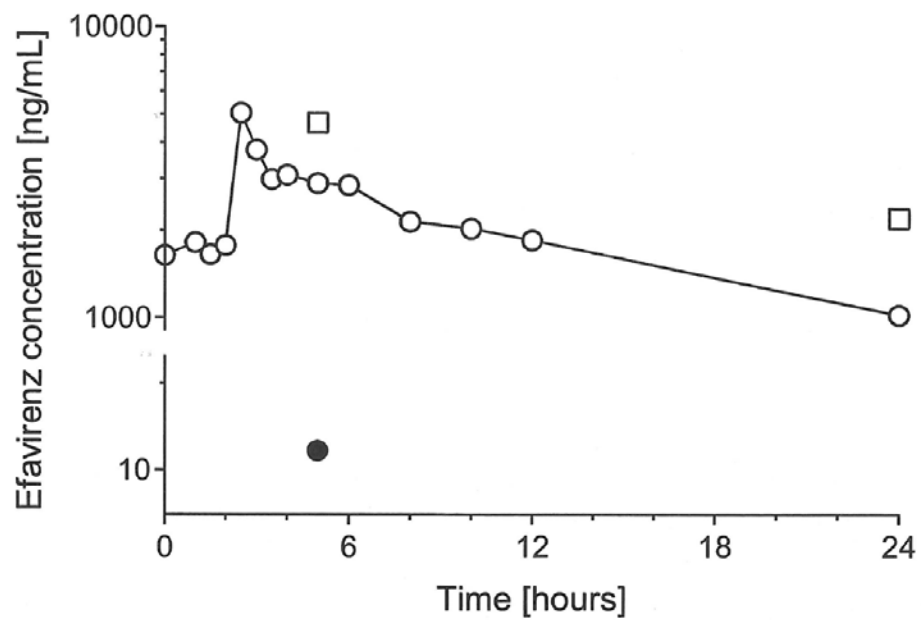


Figure 7



## **KOMENTÁŘ K ČLÁNKU**

Uvedená práce se zabývá vývojem a validací metody HPLC/MS/MS, vhodné pro stanovení koncentrace antiretrovirotika efavirenz v plazmě, jejím ultrafiltrátu a v monocytech periferní krve. Před vlastní analýzou bylo nezbytné provést izolaci léčiva z daného biologického materiálu. Vyvinutá metoda byla následně použita při stanovení koncentrace léčiva v reálných vzorcích odebraných 14 zdravým dobrovolníkům užívajícím EFV.

### **CÍL PRÁCE:**

- Vyvinout a zvalidovat HPLC/MS/MS metodu, vhodnou pro stanovení EFV v různém biologickém material
- Vyvinout vhodné postupy izolace EFV z plazmy, jejího ultrafiltrátu a z monocytů periferní krve
- Vyvinutou metodu použít pro stanovení koncentrací EFV v reálných vzorcích

### **KOMENTÁŘ A DISKUSE K VÝSLEDKŮM:**

Pro stanovení koncentrací EFV v biologickém materiálu bylo potřeba vyvinout velmi citlivou a selektivní analytickou metodu, která by dovolila kvantifikovat i velmi nízké koncentrace léčiva v poměrně složité matrici. Vysoká citlivost metody byla nezbytná především v případě stanovení volné frakce léčiva, kdy je díky vysoké vaznosti EFV na plasmatické bílkoviny, pouze cca 0,25 % - 0,5 % přítomno v ultrafiltrátu (tj. jako volná frakce). Díky těmto požadavkům byla jasnou volbou metoda HPLC/MS/MS. Pro ionizaci byla vybrána ESI s monitorováním iontů v záporném módu, díky silně elektronegativní trifluormethylové skupině v molekule EFV. Jako analyzátor byl zvolen trojitý kvadrupól a pro kvantifikaci použit mód SRM.

#### **1/ Vývoj analytické metody**

Nejprve byly pomocí přímého nástřiku zoptimalizovány podmínky nastavení iontového zdroje - ESI, které by umožnily dostatečnou citlivost a stabilitu signálu EFV. Jako vhodný vnitřní standard byl zvolen strukturně podobný flecainid (FCN). V SRM byly poté detekovány hlavní produktové ionty fragmentačních reakcí.

- EFV  $m/z$  314  $\rightarrow$   $m/z$  244
- FCN  $m/z$  413  $\rightarrow$   $m/z$  270

**Natavení ESI zdroje:**

Sheath/Aux gas:	90 psi/20 scales
Napětí na spreji:	4,5 kV
Teplota kapiláry:	350 °C

Poté byly optimalizovány chromatografické podmínky tak, aby bylo dosaženo dostatečné separace EFV a vnitřního standardu. Velká pozornost byla věnována také tomu, aby nedocházelo ke koeluci vzorku a složek matrice, a tím k „ion suppression“.

**Výsledné chromatografické podmínky:**

Chromatogr. kolona:	Phenomenex, Synergi Fusion (150 mm x 2 mm, 4µm) s integrovanou předkolumnou
Mobilní fáze:	A - 0,1 % kyseliny octové v 5mM octanu anonném, B - acetonitril, C - methanol
Profil gradient:	0 – 1 min 74 % A/12 % B/14 % C → 42 % A/26 % B/32 % C 1 - 13 min 42 % A/26 % B/32 % C 13 - 14 min 42 % A/26 % B/32 % C → 2 % A/49 % B/49 % C 14 - 15 min 2 % A/49 % B/49 % C
Průtok:	0,45 ml/min
Retenční časy:	FCN = 5,1 min a EFV = 12,8 min

**2/ Vývoj metody izolace EFV z biologického materialu**

V další části experimentální práce byla věnována pozornost vývoji metody izolace EFV z plasmy, jejího ultrafiltrátu a PBMC. Nejčastěji jsou v literatuře popsány izolace antiretrovirotik pomocí časově náročné liquid/liquid extrakce nebo dražší extrakce z pevné fáze. Snahou bylo vyvinout jednoduchý, rychlý a levný izolační postup pomocí precipitace. Během optimalizace jejího postupu byla zkoušena různá činidla i jejich objemy. Nejefektivnějším precipitačním činidlem byl nakonec ledově studený acetonitril (ACN).

Před vlastní izolací léčiva bylo ve všech případech potřeba upravit vzorek plné krve tak, aby byla získána plazma (pro stanovení EFV v plasmě a ultrafiltrátu) nebo PBMC.

### *Úprava vzorků plné krve pro stanovení EFV v plasmě a jejím ultrafiltrátu*

Odebrané vzorky plné krve byly po odběru ihned zcentrifugovány (15min, 3000 g, 4 °C) a byla oddělena vrstva plasmy. V případě **stanovení EFV z plasmy** (celková koncentrace léčiva) byl vzorek precipitován a poté nastříknut na kolonu.

Při **stanovení volné frakce léčiva** ve vzorku bylo nezbytné nejdříve pomocí vhodného ultrafiltračního zařízení oddělit volnou a vázanou frakci léčiva v plasmě. Při vývoji metody bylo vyzkoušeno množství různých ultrafiltračních zařízení, s cílem dosáhnout co nejdokonalejšího oddělení obou frakcí léčiva. Pomocí metody Western blott bylo také zjištěno, jaká velikost proteinů se v ultrafiltrátu nachází. Důležité bylo především efektivně izolovat albumin, na který se EFV přednostně váže. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pomocí ultrafiltračního zařízení **Millipore Centriplus YM - 30** (regenerovaná celulóza). Výsledný ultrafiltrát, který byl získán z 2 ml plasmy, centrifugací (20 min, 1860 g při 40 °C) byl dále precipitován a supernatant nastříkovan na kolonu.

### *Úprava vzorku plné krve pro stanovení intracelulární frakce EFV*

V případě hodnocení PBMC je úprava vzorku mnohem náročnější. Při získání PBMC z plné krve musí být zajištěna navíc velmi kvalitní separace PBMC od krevních destiček, ale také úplné vymytí léčiv z povrchu buňky, aby byla stanovena výhradně intracelulární koncentrace léčiva.

Vzorky plné krve byly odebrány do **BD Vacutainer® CPT™** a centrifugovány (20 min, 1700 g, laboratorní teplota). Supernatant, který obsahoval plasmu, PBMC a zbytek krevních destiček byl dekantován do zkumavky a znovu centrifugován (10 min, 180 g), aby se docílilo odseparování PBMC a krevních destiček. Oddělené PBMC byly suspendovány v ledovém PBS a znovu centrifugovány (5 min, 180 g, 4 °C). Tento krok byl ještě dvakrát zopakován, aby se docílilo dokonalého odstranění zbytkových a slabě vázaných látek z povrchu buněk. Na rozdíl od již publikovaných prací, zde bylo použito nízkých centrifugačních rychlostí, které umožnily kvalitnější separaci krevních destiček. Z výsledného roztoku bylo odebráno 60 µl (50 µl počítání buněk a 10 µl určení velikosti) k určení objemu izolovaných buněk.

### **Izolace EFV ze vzorků plasmy, ultrafiltrátu - UF a PBMC pomocí precipitace**

- vzorek: plasma (200  $\mu$ l), UF (400  $\mu$ l) a PBMC (cca  $3 \times 10^6$  buněk)
- přidat 25  $\mu$ l vnitřního standardu FCN
- třepačka – plasma + UF 5 min, PBMC 15 min
- přidat ledově studený ACN – plasma + UF 800  $\mu$ l, PBMC 400  $\mu$ l
- 20 min třepačka
- PBMC navíc 15 min v ultrazvukové lázni (rozdání membrány)
- centrifugace vzorku (15 min, 16 100 g, 6 °C)
- kapalnou vrstvu odebrat do skleněné zkumavky a ve vodní lázni (40 °C) vysušit proudem dusíku
- extrakt rozpustit v mobilní fázi – plasma 250  $\mu$ l, UF 120  $\mu$ l a PBMC 150  $\mu$ l
- 5 min ultrazvuk
- analyzovat pomocí HPLC/MS/MS

### **3/ Validace metody**

Vyvinutá metoda byla validována podle doporučení FDA, na třech nezávislých seriích vzorků („batch“) pro každý hodnocený biologický materiál.

Linearita metody pro EFV byla prokázána v následujících koncentračních rozmezech: plasma: 5 - 10 000 ng/ml; ultrafiltrát: 0,5 – 500 ng/ml; PBMC: 0,2 - 40 ng/ml/ $3 \times 10^6$  buněk. Přesnost metody se pohybovala v rozmezí 4,1 % až 10,4 % (SD „batch-to-batch“) a správnost metody byla v rozmezí od -6,8 % do +3,9 %. Byl určen také spodní limit kvantifikace – LLOQ: v plasmě 5 ng/ml EFV, v ultrafiltrátu 0,5 ng/ml a v PBMC 0,2 ng/( $3 \times 10^6$  buněk). Součástí každé série vzorků bylo také 6 QC vzorků, o třech různých koncentracích.

### **4/ Analýza reálných vzorků**

Do klinické studie bylo zapojeno 14 zdravých dobrovolníků, kteří po dobu 14 dnů užívaly 1x denně 400 mg EFV, ačkoli běžně užívaná dávka EFV je 600 mg. Záměrně byla v této studii zvolena nižší dávka EFV, aby bylo možné prokázat, že bude vyvinutá HPLC/MS/MS metoda dostatečně citlivá i při případném „poddávkování“ pacientů při interakcích EFV s jinými léčivy (potenciálně RIF). Poslední den klinické studie byly odebrány vzorky krve, nejdříve před podáním EFV, a poté v pravidelných časových intervalech (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10; 12 a 24 h) po podání léčiva. Vzorky plně

krve byly zcentrifugovány a před analýzou uchovávány při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Vzorky odebrané ve všech časových intervalech byly použity pro stanovení EFV v plasmě. V případě ultrafiltrátu bylo stanovení provedeno pouze v 5. h a z výsledků byla vypočítána míra vaznosti léčiva na plasmatické proteiny. Pro stanovení EFV v PBMC byly odebrány vzorky v čase 5 h a 24 h, přímo do BD Vacutainer<sup>®</sup> CPT<sup>™</sup>, byly zpracovány dle výše uvedeného postupu a taktéž zamrazeny na  $-20^{\circ}\text{C}$  do doby analýzy.

Na základě stanovení plasmatických koncentrací byl získán farmakokinetický profil po celý dávkovací interval (24 h). Nejvyšší koncentrace v plasmě (5050 ng/ml) bylo dosaženo po 2,5 h. Porovnáním stanovených koncentrací léčiva ve všech třech biologických materiálech v 5. h experimentu, byl získán vztah mezi celkovou koncentrací, koncentrací volné frakce a intracelulární koncentrací EFV.

**V plasmě bylo po 5 h dosaženo koncentrace 2898 ng/ml EFV. V ultrafiltrátu bylo ve stejný čas stanoveno 11,7 ng/ml (volné frakce EFV), což odpovídá 99,6% vaznosti na plasmatické proteiny a koresponduje s publikovanými hodnotami. V případě intracelulární koncentrace v PBMC byla v cytosolu nalezena koncentrace 5014 ng/ml.** I v případě vzorku po 24 h byly dosažené koncentrace EFV v PBMC vyšší než v plasmě.

## **ZÁVĚR:**

Byla vyvinuta a validována citlivá metoda HPLC/MS/MS, která umožňuje stanovit EFV v plasmě, jeho volnou frakci v ultrafiltrátu, a také intracelulární koncentraci v PBMC. Zároveň se podařilo vyvinout vhodné izolační postupy pro EFV z těchto tří biologických materiálů. Vyvinutá metoda byla úspěšně použita při kvantifikaci EFV u 14 zdravých dobrovolníků.

### 4.3 PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

- **PRÁCE PUBLIKOVANÉ FORMOU ČLÁNKU**

- 1) **I. Pasáková**, J. Sochor, J. Klimeš, A. Hrabálek; Preliminary pharmaceutico-analytical evaluation of transkarbam 12 using liquid chromatography, *J. Sep. Sci.*, **29**, (2006), 1695 - 1599
- 2) **I. Pasáková**, J. Klimeš, J. Sochor, A. Hrabálek; Optimization of HPLC chromatographic conditions for determination of transkarbam 12 and its degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **42**, (2006), 136 – 142
- 3) **I. Pasáková**, P. Kovaříková, R. Kučera, J. Klimeš, J. Sochor, A. Hrabálek; Development and validation of LC-ESI-MS ion trap method for impurity analysis of a novel transdermal accelerant Transkarbam 12, *Chromatographia*, **69 (9/10)**, (2009), 977 – 983
- 4) A. K. Matthée, **I. Pasáková**, C. Röder, T. Heinrich, W. E. Haefeli, G. Mikus, J. Burhenne; Quantification of efavirenz in peripheral blood mononuclear cells, plasma, and ultrafiltrate using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chrom. B*, under review

- **PRÁCE PUBLIKOVANÉ FORMOU POSTERŮ NA KONFERENCÍCH A FORMOU ABSTRAKTŮ V ODBORNÝCH ČASOPISECH**

- 1) **I. Pasáková**, J. Sochor, J. Klimeš and A. Hrabálek; Pharmaceutico-analytical study of modulator of transdermal penetration using liquid chromatography, *11th International Symposium on Separation Science*, 12. - 14. 9. 2005, Pardubice
- 2) **I. Pasáková**, J. Klimeš, J. Sochor and A. Hrabálek; Optimization of HPLC chromatographic conditions for determination of Transkarbam 12 and its degradation products, *11th International meeting on recent developments in pharmaceutical analysis (RDPA 2005)*, 25. - 28. 9. 2005, Rimini, Itálie
- 3) **I. Pasáková**, J. Klimeš, J. Sochor, A. Hrabálek; Determination of Transkarbam 12 by liquid chromatography-mass spectrometry, *Drug Analysis 2006*, 16. - 19. 5. 2006, Namur, Belgie



- 4) **I. Pasáková**, J. Klimeš, J. Sochor, A. Hrabálek; Pharmaceutico-analytical studies of new permeation enhancer, *International Symposium on Chemistry, Biology and Medicine*, 28. 5. - 1. 6. 2006, Paphos, Kypr
- 5) **I. Pasáková**, J. Klimeš, J. Sochor, A. Hrabálek; Analytické hodnocení transkarbamu 12 a jeho nečistot pomocí LC/MS, *35. konference Syntéza a analýza léčiv*, 12. -15. 9. 2006, Velké Karlovice
- 6) **I. Pasáková**, R. Kučera, P. Kovaříková, J. Klimeš, J. Sochor, A. Hrabálek; Development and validation of LC/MS ion trap method for determination of Transkarbam 12 impurities, *12th International meeting on recent developments in pharmaceutical analysis (RDPA 2007)*, 23. - 26. 9. 2007, Elba, Itálie
- 7) A. K. Gehrig, K.D. Riedel, **I. Pasáková**, G. Mikus, W.E. Haefeli, J. Burhenne; Isolation and analytical assay development of 8-hydroxy-efavirenz for the quantification in plasma, *9. Jahreskongress für Klinischen Pharmakologie*, 1. - 3. 11. 2007, Kiel, Německo
- 8) P. Kastner, P. Pilařová, **I. Pasáková**, L. Minaříková, J. Klimeš; Stabilita bromhexinu hydrochloridu v tekutém přípravku, *37. konference Syntéza a analýza léčiv*, 8. - 10. 9. 2008, Brno
- 9) **I. Pasáková**, J. Sochor, J. Klimeš; Vývoj LC/MS metody pro hodnocení akceleraantu transdermální penetrace transkarbamu 12 a jeho tří možných nečistot, *37. konference Syntéza a analýza léčiv*, 8. - 10. 9. 2008, Brno

## **5 ZÁVĚR**

Experimentální část disertační práce byla zaměřena na vývoj a validaci vhodných chromatografických metod pro hodnocení akcelorantu transdermální penetrace T 12 a antivirotika EFV.

**V prvním tematickém celku** se podařilo v rámci pilotní studie vyvinout dvě chromatografické metody pro hodnocení T 12. První z nich představuje instrumentálně nenáročnou metodu TLC, která umožnila rychlé a jednoduché hodnocení čistoty a stability T 12. Druhou metodou byla HPLC/UV, která umožnila separovat T 12 (resp. D-T 12) od vedlejších produktů derivatizace, i hydrolytického rozkladného produktu (D-AH).

Další práce umožnila analytické hodnocení T 12 a jeho dvou rozkladných hydrolytických produktů AH a D. Byla vyvinuta metoda HPLC/UV, která po předchozí derivatizaci analytů, umožnila jejich hodnocení. Podařilo se vyvinout také nový postup pro derivatizaci T 12 a D, resp. AH pomocí DNBC.

Díky použití MS detektoru se podařilo eliminovat časově náročnou derivatizaci vzorků, která byla nezbytná pro detekci analytů v UV oblasti. Podařilo se vyvinout a zvalidovat metodu HPLC/MS, která umožnila hodnocení čistoty a stability substance T 12. Pomocí MS a MS/MS spekter byl popsán T 12 i nečistoty AH, CA a DAH, které by se ve vzorku mohly vyskytnout. Vyvinutá metoda HPLC/MS byla použita při hodnocení reálného vzorku nově nasyntetizované šarže T 12, a v současnosti je používána k hodnocení substance T 12 v průmyslové výrobě.

**Druhý tematický celek** umožnil analytické hodnocení antivirotika efavirenz v biologickém materiálu. Podařilo se vyvinout a zvalidovat metodu HPLC/MS, která umožnila hodnocení EFV v plasmě, volné frakci a monocytech periferní krve. Byly také vyvinuty postupy izolace EFV z těchto biologických materiálů. Vyvinutá metoda byla použita pro analýzu vzorků 14 zdravých pacientů.

# 6 SOUHRN

Předkládaná disertační práce se zabývá vývojem a validací chromatografických metod vhodných pro hodnocení vybraných biologicky aktivních látek. Vzhledem k dominantnímu postavení metody HPLC ve farmaceutické analýze, byla pro hodnocení analytů zvolena právě tato metoda ve spojení s UV a MS detekcí.

**Teoretická část je zaměřena na použité chromatografické metody a problematiku řešenou v rámci experimentální práce.** Nejprve je uveden stručný přehled všech chromatografických metod a následně je detailněji popsána nejběžnější analytická metoda HPLC. Poté je věnována pozornost hmotnostní spektrometrii, která se v posledních letech stala nepostradatelnou metodou nejen ve farmaceutické analýze. To především díky její vysoké citlivosti a možnosti získat strukturní informace o analytech. Kromě teoretického úvodu a popisu MS instrumentace je pozornost věnována také jejím aplikacím i novým trendům. Další kapitoly se věnují problematice transdermálního podání léčiv, specifikům antiretrovirální terapie a především hodnoceným analytům.

**Experimentální část je zpracována jako komentovaný soubor publikovaných prací a je rozdělena do dvou tematických celků.** První celek tvoří tři práce zaměřené na analytické hodnocení nového akcelerantu transdermální penetrace - transkarbamu 12. Druhý celek je tvořen prací zabývající se analytickým hodnocením antiretrovirotika efavirenz v biologickém materiálu.

**První tematický celek se zabývá vývojem a validací vhodných chromatografických metod pro analytické hodnocení T 12.** Tento nový akcelerant transdermální penetrace se začal na FaF UK vyvíjet v 90. letech, a v roce 2001 byl patentován. Hlavním podnětem, jenž tento výzkum inicioval, bylo omezené množství v klinické praxi užívaných transdermálních akcelerantů. V podstatě jediným, široce používaným a účinným akcelerantem, je od roku 1976 Azon<sup>®</sup>. Zavedení nového, vysoce účinného, akcelerantu tak představuje možnost rozšíření aplikací pro transdermální podání léčiv, které je výhodnou alternativou oproti ostatním, běžně užívaným, formám podání léčiv.

Vzhledem k absenci jakékoli analytické metody pro hodnocení T 12, bylo pro jeho zavedení do farmaceutické praxe nezbytné vyvinout a zvalidovat chromatografické metody, které by umožnily hodnocení čistoty a stability této látky. V pilotní studii byla jako první vyvinuta rychlá, jednoduchá a finančně nenáročná metoda TLC, která umožnila separovat T 12 od jeho dvou hydrolytických rozkladných produktů 6-aminohexanové kyseliny (AH) a dodekanolu (D). Vzhledem k absenci chromoforu ve struktuře T 12, i jeho degradačních produktů AH a D, musela být před vlastní analýzou vždy provedena derivatizace pomocí

benzoyl chloridu. V rámci pilotní studie byla vyvinuta také metoda HPLC/UV, která umožnila separaci T 12 od derivatizačního činidla resp. vedlejších produktů derivatizace. Další experimentální práce byla zaměřena na vývoj nové HPLC/UV metody, která umožnila hodnocení T 12 i rozkladných produktů AH a D. Protože dříve vyvinutý postup derivatizace neumožnil dosáhnout dostatečné citlivosti analýzy, bylo vybráno nové derivatizační činidlo (3,5-dinitrobenzoyl chlorid). Celý postup derivatizace byl proto následně optimalizován. Nicméně bylo zřejmé, že pro rutinní využití metody v průmyslové výrobě není časově náročná derivatizace vhodná. Proto byla hledána alternativa, která by umožnila tento krok eliminovat. Takovou alternativu představuje detekce za využití hmotnostní spektrometrie, která umožňuje hodnocení látek na základě jejich poměru  $m/z$  a nevyžaduje tedy přítomnost chromoforu v molekule analytu. **Byla vyvinuta a validována metoda HPLC/MS, která umožnila hodnocení čistoty a stability substance T 12. Hodnocenými nečistotami byly: AH - hydrolytický rozkladný produkt, CA - vstupní surovina pro syntézu T 12 a nečistota DAH - vedlejší produkt syntézy. DAH byla objevena a identifikována právě díky využití MS detekce při analýze vzorků. Vyvinutá metoda HPLC/MS je v současnosti využívána pro hodnocení čistoty a stability substance T 12 v průmyslové výrobě.**

Vzhledem k nutnosti rychlého zavedení této metody do praxe, byl její vývoj časově omezený, a proto nemohlo dojít ke zcela ideálnímu zoptimalizování všech parametrů analýzy. Určitou slabinu tak představuje časová náročnost a gradientový profil analýzy. Další vývoj byl proto zaměřen právě tímto směrem a v současné době je připravována publikace, která se zabývá vývojem a validací nové, isokratické metody HPLC/MS s celkovou dobou analýzy 12 minut.

**Druhý tematický celek se věnuje analytickému hodnocení EFV v biologickém materiálu.** Práce byla vypracována na Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg v Německu, kde byla tato problematika řešena v rámci rozsáhlé klinické studie. EFV byl doporučen WHO k léčbě HIV infekce v afrických zemích. Stejně jako většina ostatních antiretrovirotik, je i EFV charakteristický velkou inter-individuální variabilitou plasmatických koncentrací. Z tohoto důvodu patří antiretrovirotika do skupiny léčiv, která by měla být u pacientů monitorována a podávané dávky individuálně upraveny. Hlavní část biotransformace EFV probíhá pomocí CYP-450. V případě koinfekce HIV a TBC je léčivem volby pro TBC rifampicin, induktor CYP-450, který může výrazným způsobem snižovat plasmatické koncentrace EFV. První část projektu byla zaměřena na vývoj a validaci vhodných chromatografických metod, které by umožnily analytické hodnocení EFV v plasmě, jeho volné frakce v ultrafiltrátu a intracelulární koncentrace v PBMC. **Byla**

**vyvinuta citlivá a selektivní metoda HPLC/MS/MS, která umožňuje kvantifikovat efavirenz ve všech třech biologických materiálech. Také byly vyvinuty jednoduché postupy izolace EFV z jednotlivých biologických materiálů. Vyvinutá metoda byla nakonec využita při hodnocení vzorků 14 zdravých dobrovolníků.**

# **7 SUMMARY**



Introduced dissertation thesis deals with the development and validation of the chromatographic methods for analytical evaluation of selected biologically active substances. HPLC coupled with UV and MS detection was chosen for determination of analytes, because of the dominant role of the HPLC in pharmaceutical analysis.

**The theoretical part is focused on the theory of chromatographic methods and topics of the experimental work.** At first, summary of all the chromatographic methods is briefly introduced and subsequently, the most common analytical method HPLC is described in details. The next part deals with the mass spectrometry. Thank to its high sensitivity and ability to provide structural information about the analytes, MS became an indispensable tool not only in modern pharmaceutical analysis. Besides MS theory and instrumentation, its applications and new trends are also mentioned. Last chapters deal with the transdermal application of drugs, specifications of antiretroviral therapy and especially they provide basic information about the physical - chemical and biological properties of analysed substances.

**The experimental part is consisted of the original research papers with appropriate comments divided into two thematic sections.** The first one is composed of three papers focused on analytical determination of the novel accelerant of transdermal penetration – transkarbam 12. The second section deals with the analytical determination of antiretroviral efavirenz in biological material.

**The first thematic section deals with the development and validation of the chromatographic methods suitable for analytical determination of Transkarbam 12 (T 12).** This new accelerant of transdermal penetration was developed at the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové in the nineties and it was patented in 2001. The limited availability of highly effective accelerants in clinical practise was the main reason which initiated this development. In fact, Azon<sup>®</sup> has been the only, clinically widely used accelerant since 1976. Introduction of a new and highly effective accelerant can significantly contributes into the widespread of transdermal drug delivery which is an advantageous alternative to another, commonly used drug delivery.

Because of the absence of any analytical method for determination of T 12, it was necessary for its introduction to pharmaceutical praxis, to develop and validate chromatographic methods, which allow impurity and stability determination of T 12. At first, fast, easy and inexpensive TLC method was developed for the evaluation of T 12 and its two hydrolytic degradation products 6-aminohexanoic acid (AH) and dodecanol (D). Derivatization of the sample using benzoyl chloride was needed before each analysis,

because of absence of the chromophore in the structure of T 12, as well as in degradation products. Beside TLC, in this pilot study HPLC/UV method was also developed to obtain sufficient separation of T 12 from the derevatization reagent and/or side products of the derivatization reaction. Further experimental work was focused on the development of a new HPLC/UV method, which enabled simultaneous determination of T 12 and its degradation products - AH a D. Due to the low sensitivity of the previously used derivatization, the new derivatization reagent (3,5-dinitrobenzoyl chloride) was chosen in these experiments and whole derivatization process was newly optimized. However, it was obvious that time-consuming derivatization is not suitable for routine use in pharmaceutical manufacturing. Therefore, further effort was focused on searching for an alternative for elimination of this time-consuming step. Thus, mass spectrometry was chosen as a proper method, which allows to determine the analytes according to their  $m/z$  ratio and therefore it requires no chromophore in the structure of the analytes. **Novel HPLC/MS method developed and validated in this study, allowed sensitive determination of purity and stability of the T 12 substance. Following impurities can be evaluated: AH – hydrolytic degradation product, CA – initial substance for T 12 synthesis and DAH – side product of the synthesis. DAH was discovered and identified as a novel T 12 impurity during HPLC/MS method development. Currently, this HPLC/MS method is used by T 12 manufacturer to determine impurity and stability of T 12 bulk substance.**

Considering the need to quickly introduce novel method for analytical evaluation of T 12 to pharmaceutical practice, the time available for the method development was limited. Therefore ideal optimization of all method parameters was not done. Total analysis time and gradient profile of the method are the main drawbacks. Hence, further work was concentrated to overcome these disadvantages. Currently, a new scientific paper describing the development and validation of the novel isocratic HPLC/MS method with 12 min of the total analysis time is prepared.

**The second thematic section is focused on analytical determination of efavirenz in biological material.** This work was a part of a wide clinical study proceeded in cooperation with other research laboratories worldwide at Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Germany. Efavirenz is recommended by WHO for medication of HIV infection in African countries. As well as most of other antiretrovirotics, efavirenz (EFV) is characterized by high inter-individual variability of plasmatic concentrations. Hence, antiretrovirotics belong to the drugs recommended for therapeutic drug monitoring in order to adjust dose for particular patient individually. CYP-450 is extensively involved in EFV

biotransformation. The high risk of drug-drug interaction can be expected in HIV/TBC co infection, where rifampicin, other potential CYP-450 inducer, is recommended as a first line drug. In this case the analytical method capable to determine the concentration profile of EFV in biological material is of particular importance. Presented part of the project was focused on the development and validation of chromatographic methods suitable to determine concentration of EFV in three biological materials plasma, ultrafiltrate and intracellular concentration in PBMC. **A new, highly sensitive method HPLC/MS/MS was developed for determination of EFV in these biological materials. Isolation processes of EFV from each biological material were developed as well. Finally this method was used for the determination of EFV in samples taken from 14 healthy volunteers receiving EFV.**

# **8 POUŽITÁ LITERATURA**

- [1] C.F. Poole, S.K. Poole, *Chromatography today*, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 1991
- [2] R. Karlíček a kol., *Analytická chemie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha, 1998
- [3] J. Klimeš a kol., *Kontrola léčiv I.*, Karolinum, Praha, 2002
- [4] Nobel prizes, Richard Kuhn and the Chemical Institute: Double Bonds and Biological Mechanisms, [online], [cit. 2009-01-10]. Dostupné z: <[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/articles/states/richard-kuhn.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/articles/states/richard-kuhn.html)>
- [5] Nobel prizes, The Nobel Prize in Chemistry 1952, [online], [cit. 2009-01-10]. Dostupné z: <[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1952/press.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1952/press.html)>
- [6] W. J. Lough, I. W. Wainer, *High Performance Liquid Chromatography: fundamental principles and practice*, CRC Press, London, 1995
- [7] *Český lékopis 2007*, Grada Publishing, a.s., Praha, 2007
- [8] Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, [online], [cit. 2009-01-10]. Dostupné z: <[http://www.natur.cuni.cz/~suchan/PC\\_TLC.pdf](http://www.natur.cuni.cz/~suchan/PC_TLC.pdf)>
- [9] Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, [online], [cit. 2009-01-10]. Dostupné z: <[http://fch.upol.cz/skripta/zfcm\\_pred/10\\_separacni.pdf](http://fch.upol.cz/skripta/zfcm_pred/10_separacni.pdf)>
- [10] Y. Kazakevich, R. LoBrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 2007
- [11] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development* 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 1997
- [12] S. Ahuja, S. Scypinski, *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, Academic Press, London, 2001
- [13] M. Holčapek, L. Kolářová, M. Nobilis, High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites, *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**(1), (2008), 59–78.
- [14] Ch. Pan, F. Liu, Q. Ji, W. Wang, D. Drinkwater, R. Vivilecchia, The use of LC/MS, GC/MS, and LC/NMR hyphenated techniques to identify a drug degradation product in pharmaceutical development, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **40**, (2006), 581-590
- [15] Sympozium klinické biochemie FONS 2008, Pardubice, K. Šafarčík, V. Bartoš, H. Brozmanová, Využití imunoanalytických metod pro potřeby terapeutického

- monitorování léků [online], [cit. 2009-01-12]. Dostupné z: <[http://www.stapro.cz/fons/prednasky/1\\_2.pdf](http://www.stapro.cz/fons/prednasky/1_2.pdf)>
- [16] Chemické listy, Technické informace a služby, [online], [cit. 2009-01-12]. Dostupné z: <<http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin272/clanek07.html>>
- [17] Basic Liquid Chromatography, Y. Kazakevich, H. M. McNair, [online], [cit. 2009-01-12]. Dostupné z: <<http://hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>>
- [18] Agilent Technologies, Instruments & Systems, [online], [cit. 2009-01-12]. Dostupné z: <<http://www.chem.agilent.com/cag/peak/peak3-95/graphics/introducing.gif>>
- [19] HPLC.CZ, M. Douša, Teorie HPLC, [online], [cit. 2009-01-12]. Dostupné z: <<http://www.hplc.cz/>>
- [20] E. Katz, Handbook of HPLC, CRC Press, London, 2002
- [21] Radanal s.r.o., P. Jandera, Pokroky ve vývoji kolon pro HPLC – současný stav a perspektivy, [online], [cit. 2009-01-17]. Dostupné z: <[http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC\\_01.doc](http://www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc)>
- [22] I. van den Broek, R. W. Sparidans, J. H. M. Schellens, J. H. Beijnen, Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **872**, (2008), 1–22
- [23] G. Guiochon, Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1168**, (2007), 101–168
- [24] F. Švec, Monolitické stacionární faze pro HPLC, *Chem. Listy* **98**, (2004), 232–238
- [25] M. R. Rouini, Y. H. Ardakani, K. A. Moghaddam, F. Solatani, An improved HPLC method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma, *Talanta*, **75**, (2008), 671–676
- [26] A. J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, *J. Chromatogr.* **499** (1990), 177–183.
- [27] LC/GC chromatography-online.com, Hydrophilic Interaction Chromatography, [online], [cit. 2009-01-17]. Dostupné z: <<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/Articles/Hydrophilic-Interaction-Chromatography/ArticleStandard/Article/detail/512613>>
- [28] B. Dejaegher, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, Method development for HILIC assays, *J. Sep. Sci.*, **31** (2008), 1438–1448

- [29] P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.*, **29**, (2006), 1784–1821
- [30] Chemagazin, ZIC-HILIC, aneb to nejlepší z HILIC, [online], [cit. 2009-01-17]. Dostupné z: <[www.chemagazin.cz/Texty/CHXVIII\\_6\\_cl6.pdf](http://www.chemagazin.cz/Texty/CHXVIII_6_cl6.pdf)>
- [31] Chromservis s.r.o., Nová kolona Luna HILIC, [online], [cit. 2009-01-17]. Dostupné z: <<http://chromservis.cz/item/new-hilic-luna-column?lang=CZ>>
- [32] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P.W. Carr, Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, *J. Chromatogr. A*, **1028**, (2004) 1–30
- [33] Library4Science, Chromatography-online, [online], [cit. 2009-02-02]. Dostupné z: <<http://www.chromatography-online.org/members/form.html>>
- [34] F.S. Rojas, C.B. Ojeda, Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008, A review, *Anal. Chim. Acta*, **635**, (2009), 22–44
- [35] M.G. Goe, Spectrophotometry & Spectrofluorimetry, Oxford University Press, Oxford, 2000
- [36] B.E. Lendi, V.R. Meyer, The UV Detector for HPLC-An Ongoing Success Story, *LC/GC Europe*, **18**, (2005), 156–163
- [37] Y.X. Jin, Y.H. Tang, S. Zeng, Analysis of flurbiprofen, ketoprofen and etodolac enantiomers by pre-column derivatization RP-HPLC and application to drug–protein binding in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **46** (2008), 953–958
- [38] X.E. Zhao, Y.R. Suo, Simultaneous determination of monoamine and amino acid neurotransmitters in rat endbrain tissues by pre-column derivatization with high-performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification, *Talanta*, **76**, (2008), 690–697
- [39] Labicom, s.r.o, Agilent 1200 Series Evaporative light scattering detector, [online], [cit. 2009-02-02]. Dostupné z: <<http://www.labicom.cz/default.aspx?server=1&article=372&section=96>>
- [40] E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry, Principles and Applications, 3<sup>rd</sup> Edition, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2007
- [41] M. Holčapek, Přednášky z předmětu „Hmotnostní spektrometrie v organické analýze“, [online], [cit. 2009-02-10]. Dostupné z: <[http://holcapek.upce.cz/teaching\\_CZ.htm](http://holcapek.upce.cz/teaching_CZ.htm)>
- [42] V. Vidová, K. Lemr, V. Havlíček, Současné trendy hmotnostní spektrometrie, *Chem. Listy*, **102**, (2008), 957-959

- [43] M. Holčapek, L. Kolářová (Eds.), Sborník přednášek, 3. ročník Školy HPLC/MS, Doubice, 29. 8. - 2. 9. 2005
- [44] M. Holčapek, M. Lísa, R. Jirásko (Eds.), Sborník přednášek, 9. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, Seč-Ústupy, 22. 9. - 26. 9. 2008
- [45] University of Bristol, Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS), [online], [cit. 2009-03-05]. Dostupné z: < <http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/gcms.html> >
- [46] W. M. A. Niessen, Liquid chromatography--mass spektrometry, 3rd Edition, CRC Press, New York, 2006
- [47] J. Čáslavský, R. Lána (Eds.), Sborník přednášek, 8. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, 10. - 14. 9. 2007, Lednice
- [48] F. Hillenkamp, J. P. Katalinic, MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications, Wiley-VCH, Weinheim, 2007
- [49] Ch. G. Herbert, R. A. W. Johnstone, Mass spectrometry basics, CRC Press, London, 2002
- [50] R. D. Macfarlane, D. F. Torgerson, Californium 252 plasma desorption mass spectroscopy. Nuclear particles are used to probe biomolecules, *Science*, **191**, (1976), 920-925
- [51] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **78**, (1987), 53-68
- [52] F. Hillenkamp, M. Karas, Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization, *Methods Enzymol.*, **193**, (1990), 280-295
- [53] M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat and F. Hillenkamp, Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spektrometry, *Anal. Chim. Acta*, **241**, (1990), 175-185
- [54] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons, *Anal. Chem.*, **60**, (1988), 2299-2301
- [55] F. Hillenkamp, M. Karas, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers, *Anal. Chem.*, **63**, (1991), 1193-1202
- [56] Scripps Center for Mass Spectrometry, Gary Siuzdak, Basics of Mass Spectrometry, [online], [cit. 2009-03-05]. Dostupné z: <[http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms\\_details.php#ionization](http://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_details.php#ionization)>
- [57] C. R. Blakley, M. L. Vestal, Thermospray Interface for Liquid chromatography/Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **55**, (1983), 750-754



- [58] R. Grandori, C. Santambrogio, S. Brocca, G. Invernizzi, M. Lotti, Electrospray-ionization mass spectrometry as a tool for fast screening of protein structural properties, *Biotechnol. J.*, **4**, (2009), 73–87
- [59] University of Bristol; Paul Gates, High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS), [online], [cit. 2009-05-05]. Dostupné z: <[http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/images/apci.gif&imgrefurl=http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html&usq=\\_\\_8PHZJSOQ8cV04UNXnYsz50fjPSk=&h=234&w=545&sz=13&hl=cs&start=4&tbnid=vkqm9JdfCXeHIM:&tbnh=57&tbnw=133&prev=/images%3Fq%3DAPCI%26gbv%3D2%26hl%3Dcs](http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/images/apci.gif&imgrefurl=http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html&usq=__8PHZJSOQ8cV04UNXnYsz50fjPSk=&h=234&w=545&sz=13&hl=cs&start=4&tbnid=vkqm9JdfCXeHIM:&tbnh=57&tbnw=133&prev=/images%3Fq%3DAPCI%26gbv%3D2%26hl%3Dcs)>
- [60] Y. Hsieh, HPLC-MS/MS in drug metabolism and pharmacokinetic screening, *Expert Opin. Drug Metabol. Toxicol.*, **4**, (2008), 93-101
- [61] T. M. Annesley, Ion suppression in mass spectrometry, *Clin. Chem.*, **49**, (2003), 1041-1044.
- [62] L. L. Jessome, D. A. Volmer, Ion suppression: A major concern in mass spectrometry, *LC-GC North America*, **24**, (2006), 83-89
- [63] C. R. Mallet, Z. Lu, J. R. Mazzeo, A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, (2004), 49-58
- [64] V. Ranc, V. Havlíček, P. Bednář, K. Lemr, Nanoelectrospray versus electrospray in chiral analysis by the kinetic method, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **74**, (2009), 313-322
- [65] Z. Takáts, J. M. Wiseman, B. Gologan, R. G. Cooks, Electrosonic Spray Ionization. A Gentle Technique for Generating Folded Proteins and Protein Complexes in the Gas Phase and for Studying Ion-Molecule Reactions at Atmospheric Pressure, *Anal. Chem.*, **76**, (2004), 4050-4058
- [66] D. B. Robb, T. R. Covey, A. P. Bruins, Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **72**, (2000), 3653-3659
- [67] I. Marchi, S. Rudaz, J. L. Veuthey, Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: A review, *Talanta*, **78**, (2009), 1-18
- [68] L. Song, A. D. Wellman, H. Yao, J. E. Bartmess, Negative Ion-Atmospheric Pressure Photoionization: Electron Capture, Dissociative Electron Capture, Proton Transfer, and Anion Attachment, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, (2007), 1789-1798

- [69] Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Analýza a detekce iontů: Hmotnostní analyzátoři a detektory, [online], [cit. 2009-05-11]. Dostupné z: <[http://www.uochb.cz/web/document/cms\\_library/451.pdf](http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/451.pdf)>
- [70] Science Hypermedia, Quadrupole Mass Spectrometry, [online], [cit. 2009-05-11]. Dostupné z: <<http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/ms/graphics/quad-sch.gif>>
- [71] J. Schappler, R. Nicoli, D. Nguyen, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with single quadrupole mass spectrometry for the analysis of a complex drug mixture, *Talanta*, **78**, (2009), 377-387
- [72] U. Bhaumik, A. Ghosh, A. K. Sarkar, A. Bose, P. S. Selvan, P. Sengupta, U. S. Chakraborty, D. Ghosh, T. K. Pal, Determination of ranolazine in human plasma by LC-MS/MS and its application in bioequivalence study, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **48**, (2008), 1404-1410
- [73] A. Haouala, B. Zanolari, B. Rochat, M. Montemurro, K. Zaman, M.A. Duchosal, H.B. Ris, S. Leyvraz, N. Widmer, L.A. Decosterd, Therapeutic Drug Monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry, *J. Chrom. B*, **877**, (2009), 1982-1996
- [74] Targeted-proteomics, [online], [cit. 2009-05-11]. Dostupné z: <<http://www.targeted-proteomics.com/images/SRM.gif>>
- [75] Masarykova univerzita, laboratoř funkční genomiky a proteomiky, Zbyněk Zdráhal, Charakterizace proteinů hmotnostní spektrometrií, [online], [cit. 2009-05-11]. Dostupné z: <[www.sci.muni.cz/proteom](http://www.sci.muni.cz/proteom)>
- [76] J. C. Schwartz, M. W. Senko, J. E. P. Syka, A Two-Dimensional Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **13**, (2002), 659–669
- [77] Thermo Fisher Scientific Inc, Systems, Mass spectrometry, [online], [cit. 2009-04-17]. Dostupné z: <<http://www.thermo.com/com/cda/product/detail/1,1055,22534,00.html>>
- [78] G. Hopfgartner, Ch. Husser, M. Zell, Rapid screening and characterization of drug metabolites using a new quadrupole–linear ion trap mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.*, **38**, (2003), 138–150
- [79] R. King, C. Fernandez-Metzler, The Use of Qtrap Technology in Drug Metabolism, *Curr. Drug Metab.*, **7**, (2006), 541-545
- [80] C. A. Mueller, W. Weinmann, S. Dresen, A. Schreiber, M. Gergov, Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid

- chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, (2005), 1332–1338
- [81] B. Fuchs, J. Schiller, Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **111**, (2009), 83–98
- [82] VŠCHT Praha, Ústav biochemie a mikrobiologie, M. Strohalm, MALDI-TOF MS, [online], [cit. 2009-05-05]. Dostupné z: <[http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/ms\\_basics.pdf](http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/ms_basics.pdf)>
- [83] E. Kalogeropoulou, W. Solbach, J. Knobloch, MALDI-TOF mass spectrometry, *Acta Microbiol. Hellenica*, **53**, (2008), 258-267
- [84] A. V. Loboda, A. N. Krutchinsky, M. Bromirski, W. Ens, K. G. Standing, A tandem quadrupole/time-of-flight mass spectrometer with a matrix-assisted laser desorption/ionization source: design and performance, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, (2000), 1047-1057
- [85] M. B. Comisarow, A. G. Marshall, Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, **25**, (1974), 282-283
- [86] University of Bristol, Fourier-transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR), [online], [cit. 2009-05-11]. Dostupné z: <<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/fticr-massspec.html>>
- [87] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. G. Cooks, The Orbitrap: a new mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.*, **40**, (2005), 430–443
- [88] R. H. Perry, R. G. Cooks, R. J. Noll, Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and Applications, *Mass Spectrom. Rev.*, **27**, (2008), 661–699
- [89] M. Scigelova, A. Makarov, Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics, *Pract. Proteom.*, **1-2**, (2006), 16-21
- [90] D. W. Koppenaal, C. J. Barinaga, M.B. Denton, R. P. Sperline, G. M. Hieftje, G. D. Schilling, F. J. Andrade, J. H. Barnes IV, MS detectors, *Anal. Chem.*, **77**, (2005), 418-427
- [91] P. J. Arpino, B. G. Dawkins, F. W. McLafferty, Liquid chromatography/mass spectrometry system providing continuous monitoring with nanogram sensitivity, *J. Chrom. Sci.*, **12**, (1974), 574-578
- [92] M. Holčápek, P. Jandera, Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS), *Chem. Listy*, **92**, (1998), 278-286
- [93] D. S. Peterson, Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, **26**, (2007), 19-34

- [94] R. G. Cooks, Z. Ouyang, Z. Takats, J. M. Wiseman, Ambient mass spektrometry, *Science*, **311**, (2006), 1566-1570
- [95] A. Venter, M. Nefliu, R. G. Cooks, Ambient desorption ionization mass spectrometry, *Trends in Anal. Chem.*, **27**, (2008), 284-290
- [96] Z. Takáts, J. M. Wiseman, B. Gologan, R. G. Cooks, Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization, *Science*, **306**, (2004) 471-473
- [97] Prosolia, Inc, Desorption Electrospray Ionization (DESI), [online], [cit. 2009-05-05]. Dostupné z: <[http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.prosolia.com/image/DESI.gif&imgrefurl=http://www.prosolia.com/DESI.html&usg=\\_\\_XX84GOWX6mYd2fkBLtGfnvr29yo=&h=312&w=523&sz=22&hl=cs&start=2&tbnid=ZgqrqH1-beqcMM:&tbnh=78&tbnw=131&prev=/images%3Fq%3DDesorption%2Belectrospray%26gbv%3D2%26hl%3Dcs](http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.prosolia.com/image/DESI.gif&imgrefurl=http://www.prosolia.com/DESI.html&usg=__XX84GOWX6mYd2fkBLtGfnvr29yo=&h=312&w=523&sz=22&hl=cs&start=2&tbnid=ZgqrqH1-beqcMM:&tbnh=78&tbnw=131&prev=/images%3Fq%3DDesorption%2Belectrospray%26gbv%3D2%26hl%3Dcs)>
- [98] T. J. Kauppila, J. M. Wiseman, R. A. Ketola, T. Kotiaho, R. G. Cooks, R. Kostainen, Desorption electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and metabolites, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, (2006), 387-392
- [99] I. Cotte-Rodríguez, Z. Takáts, N. Talaty, H. Chen, R. G. Cooks, Desorption electrospray ionization of explosives on surfaces: Sensitivity and selectivity enhancement by reactive desorption electrospray ionization, *Anal. Chem.*, **77**, (2005), 6755-6764
- [100] Z. Takáts, J. M. Wiseman, R. G. Cooks, Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology, *J. Mass Spectrom.*, **40**, (2005), 1261-1275
- [101] I. Cotte-Rodríguez, Ch. C. Mulligan, R. G. Cooks, Non-Proximate Detection of Small and Large Molecules by Desorption Electrospray Ionization and Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Forensics, Chemistry, and Biology, *Anal. Chem.*, **79**, (2007), 7069-7077
- [102] SpectroscopyNOW; T. Mallet, Atmospheric Pressure Ionisation of Small Molecules, [online], [cit. 2009-05-15]. Dostupné z: <<http://www.spectroscopynow.com/coi/cda/detail.cda?id=14874&type=EducationFeature&chId=4&page=1>>
- [103] J. Vacek, Hmotnostní spektrometrie intaktních tkání a jejich využití v diagnostice, *Klin. Biochem. Metab.*, **14**, (2006), 194-195
- [104] H. Chen, J. Zheng, X. Zhang, M. Luo, Z. Wang, X. Qiao, Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for direct ambient sample analysis without toxic chemical contamination, *J. Mass Spectrom.*, **42**, (2007), 1045-1056

- [105] J. P. Williams, V. J. Patel, R. Holland, J. H. Scrivens, The use of recently described ionisation techniques for the rapid analysis of some common drugs and samples of biological origin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, (2006), 1447-1456
- [106] R. B. Cody, J. A. Laramée, J. M. Nilles, H. D. Durst, Direct Analysis in Real Time (DART<sup>tm</sup>) Mass Spectrometry, *JEOL News*, **40**, (2005), 8-12
- [107] Ch. Petucci, J. Diffendal, D. Kaufman, B. Mekonnen, G. Terefenko, B. Musselman, Direct Analysis in Real Time for Reaction Monitoring in Drug Discovery, *Anal. Chem.*, **79**, (2007), 5064-5070
- [108] G. A. Harris, L. Nyadong, F. M. Fernandez, Recent developments in ambient ionization techniques for analytical mass spectrometry, *Analyst*, **133**, (2008), 1297–1301
- [109] R. Haddad, R. Sparrapan, M. N. Eberlin, Desorption sonic spray ionization for (high) voltage-free ambient mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, (2006), 2901-2905
- [110] J. Shiea, M.-Z. Huang, H.-J. Hsu, C.-Y. Lee., C.-H. Yuan, I. Beech, J. Sunner, Electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for direct ambient analysis of solids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, (2005), 3701-3704
- [111] P. Nemes, A. Vertes, Laser ablation electrospray ionization for atmospheric pressure, in vivo, and imaging mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **79**, (2007), 8098-8106
- [112] H. Chen, S. Yang, A. Wortmann, R. Zenobi, Neutral Desorption Sampling of Living Objects for Rapid Analysis by Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, (2007), 7591-7594
- [113] J. S. Sampson, A. M. Hawkrige, D. C. Muddiman, Generation and Detection of Multiply-Charged Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization (MALDESI) Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **17**, (2006), 1712-1716
- [114] M. J. Ford, G. J. Van Berkel, An improved thin-layer chromatography/mass spectrometry coupling using a surface sampling probe electrospray ion trap system, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, (2004), 1303-1309
- [115] C. N. McEwen, R. G. McKay, B. S. Larsen, Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments, *Anal. Chem.*, **77**, (2005), 7826-7831
- [116] L. V. Ratcliffe, F. J. M. Rutten, D. A. Barrett, T. Whitmore, D. Seymour, C. Greenwood, Y. Aranda-Gonzalvo, S. Robinson, M. McCoustra, Surface Analysis under Ambient

- Conditions Using Plasma-Assisted Desorption/Ionization Mass Spectrometry *Anal. Chem.*, **79**, (2007), 6094-6101
- [117] N. Na, M. Zhao, S. Zhang, C. Yang, X. Zhang, Development of a Dielectric Barrier Discharge Ion Source for Ambient Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, (2007), 1859-1862
- [118] M. Haapala, J. Pol, V. Saarela, V. Arvola, T. Kotiaho, R. A. Ketola, S. Franssila, T. J. Kauppila, R. Kostianen, Desorption atmospheric pressure photoionization, *Anal. Chem.*, **79**, (2007), 7867-7872
- [119] Ústav organické chemie a biochemie AV ČR; J. Cvačka, Miniškola hmotnostní spektrometrie, 19. - 21. 11. 2007, [online], [cit. 2009-03-05]. Dostupné z: <[http://www.uochb.cz/web/document/cms\\_library/453.pdf](http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/453.pdf)>
- [120] A. Hrabálek, K. Vávrová, Lze překonat kožní bariéru?, *Praktické lékařství*, **1**, (2005), 8-11
- [121] A. C. Williams, Transdermal and topical Drug Delivery, Pharmaceutical Press, London, 2003
- [122] B. J. Thomas, B. C. Fennin, The transdermal revolution, *Drug Discov. Today*, **9**, (2004), 697-703
- [123] J. Hadgraft, M. E. Lane, Skin permeation: The years of enlightenment, *Int. J. Pharm.*, **305**, (2005), 2-12
- [124] R. T. Burkman, Transdermal hormonal contraception: benefits and risks, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **197**, (2007), 134-134
- [125] M. Dostálek a kol., Farmakokinetika, Grada Publishing, Praha, 2006
- [126] B. W. Barry, Novel mechanisms and device to enable successful transdermal drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **14**, (2001), 101-114
- [127] K. Vávrová, J. Zbytovská, A. Hrabálek, Amphiphilic Transdermal Permeation Enhancers: Structure-Activity Relationships, *Curr. Med. Chem.*, **12**, (2005), 2273-2291
- [128] R. Daniels, Strategies for Skin Penetration Enhancement, *Skin Care Forum*, **37**, (2004), 58-65
- [129] B. C. Finnin, T. M. Morgan, Transdermal Penetration Enhancers: Applications, Limitations, and Potential, *J. Pharm. Sci.*, **88**, (1999), 955-958
- [130] S. Scheindlin, Transdermal Drug Delivery: Past, present, future, *Mol. Interv.*, **4**, (2004), 308-312

- [131] Novartis, TransdermScop, [online], [cit. 2008-11-24]. Dostupné z: <<http://www.transdermscop.com/index.htm>>
- [132] I. Lavon, J. Kost, Ultrasound and transdermal drug delivery, *Drug Discov. Today*, **9**, (2004), 670-676
- [133] S. Mitragotri, J. Kost, Low-frequency sonophoresis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, (2004) 589– 601
- [134] M. Ogura, S. Paliwal, S. Mitragotri, Low-frequency sonophoresis: Current status and future prospects, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, (2008) 1218–1223
- [135] Y. Wang, R. Thakur, Q. Fan, B. Michniak, Transdermal iontophoresis: combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **60**, (2005) 179–191
- [136] M. Karabiyikoglu, New Frontiers in Transdermal Drug Delivery System, [online], [cit. 2008-11-24]. Dostupné z: <[www.drugdeliveryreport.com/articles/ddr\\_ss07\\_article4.pdf](http://www.drugdeliveryreport.com/articles/ddr_ss07_article4.pdf)>
- [137] S. Mitragotri, Synergistic Effect of Enhancers for Transdermal Drug Delivery, *Pharm. Res.*, **17**, (2000), 1354-1359
- [138] M. M. Badran, J. Kuntsche, A. Fahr, Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller<sup>®</sup>) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **36**, (2009), 511-523
- [139] N. Büyüktimkin, S. Büyüktimkin, J. H. Rytting, Transdermal and Topical Drug Delivery System, Eds. T. K. Ghosh, W. R. Pfister; Interpharm Press: Buffalo Grove, Illinois, 1997
- [140] A. C. Williams, B. W. Barry, Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, (2004), 603-318
- [141] Kongres MEFA 96, Brno, Scripta medica, P. Doležal, A. Hrabálek, Transdermální léčivé formy, (1996), 92-96
- [142] R. R. Stoughton, W. O. McClure, Azone<sup>®</sup>: A New Non-Toxic Enhancer of Cutaneous Penetration, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **9**, (1983), 725 - 744
- [143] C. Balaguer-Fernández, A. Femenía-Font, S. Del Rio-Sancho, V. Merino, A. López-Castellano, Sumatriptan Succinate Transdermal Delivery Systems for the Treatment of Migraine, *J. Pharm. Sci.*, **97**, (2008), 2102-2109
- [144] R. B. Walker, E. W. Smith, The role of percutaneous penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **18**, (1996), 295-301

- [145] A. Hrabálek, P. Doležal, Z. Škubalová, O. Farsa, A. Krebs, Akceleranty transdermální penetrace, *Chem. Listy*, **93**, (1999), 107-119
- [146] P. Doležal, A. Hrabálek, J. Klimeš, K. Kosař, J. Lamka, Transant, Výzkumná zpráva řešení úkolu v r. 1993, FaF UK, Hradec Králové, 1993
- [147] A. Hrabálek, P. Doležal, O. Farsa, A. Krebs, A. Kroutil, M. Roman, Z. Škubalová,  $\omega$ -Amino acid derivatives, processes of their preparation and their use, *US Patent* 6, 187, 938, (2001)
- [148] A. Hrabálek, P. Doležal, K. Vávrová, J. Zbytovská, T. Holas, J. Klimentová, J. Novotný, Synthesis and Enhancing Effect of Transkarbam 12 on the Transdermal Delivery of Theophylline, Clotrimazole, Flobufen, and Griseofulvin, *Pharm. Res.*, **23**, (2006), 912-918
- [149] Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, [online], [cit. 2008-11-24]. Dostupné z: <[http://www.oecd.org/document/22/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_1916054\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/22/0,3343,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html)>
- [150] J. Klimentová, P. Kosák, K. Vávrová, T. Holas, J. Novotný, A. Hrabálek, Transkarbams with terminal branching as transdermal permeation enhancers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, (2008), 1712-1715
- [151] T. Holas, K. Vávrová, M. Šíma, J. Klimentová, A. Hrabálek, Synthesis and transdermal permeation-enhancing activity of carbonate and carbamate analogs of Transkarbam 12, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, (2006), 7671-7680
- [152] J. Klimentová, A. Hrabálek, K. Vávrová, T. Holas, A. Kroutil, Synthesis and transdermal penetration-enhancing activity of carbonic and carbamic acid esters-Comparison with transkarbam 12, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, (2006), 1981-1984
- [153] J. Zbytovská, S. Raudenkolb, S. Wartewig, W. Hübner, W. Rettig, P. Pissis, A. Hrabálek, P. Doležal, R. H. H. Neubert, Phase behaviour of transkarbam 12, *Chem. Phys. Lipids*, **129**, (2004), 97-109
- [154] P. Doležal, A. Hrabálek, V. Semecký,  $\epsilon$ -Aminocaproic Acid Esters as Transdermal Penetration Enhancing Agents, *Pharm. Res.*, **10**, (1993), 1015-1019
- [155] T. Holas, J. Zbytovská, K. Vávrová, P. Berka, M. Mádlová, J. Klimentová, A. Hrabálek, Thermotropic phase behaviour of long-chain alkylammonium-alkylcarbamates, *Thermochim. Acta*, **441**, (2006), 116-123
- [156] GlaxoSmithKline a Pears Health Cyber, Terapie HIV a AIDS, [online], [cit. 2009-04-10]. Dostupné z: <<http://www.hiv.cz/showpage.php?key=terapie-hiv-a-aids>>
- [157] P. Lewthwaite, E. Wilkins, Natural history of HIV/AIDS, *Medicine*, **37**, (2009), 333-337



- [158] D. Jilich, L. Machala, HIV infekce zůstává hrozbou, *Lékařské listy*, **8**, (2009), 25-27
- [159] Informační centrum OSN v Praze, AIDS nadále na vzestupu, [online], [cit. 2009-04-10]. Dostupné z: <<http://www.osn.cz/aids>>
- [160] E. DeClercq, Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **33**, (2009), 307-320
- [161] World Health Organization, HIV/AIDS Treatment and Care WHO protocols for CIS countries, [online], [cit. 2009-04-10]. Dostupné z: <<http://www.euro.who.int/document/e83863.pdf>>
- [162] H. Jablonowski, Antiretroviral therapy [Die aktuellen leitlinien der antiretroviralen therapie: HAART im jahr 2007], *MMW-Fortschr. Med.*, **149**, (2007), 16-18
- [163] Mikro-verze AISLP, ČR 2009.2, [online], [cit. 2009-04-10].
- [164] HIV InSite, University of California, [online], [cit. 2009-04-10]. Dostupné z: <<http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=ar-02-03>>
- [165] DrugBank Version: 2.5, Showing drug card for Efavirenz (DB00625), [online], [cit. 2009-04-12]. Dostupné z: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00625>>
- [166] AIDS info, U.S. Department of Health and Human Services (DHHS) project, [online], [cit. 2009-04-12]. Dostupné z: <[http://www.aidsinfo.nih.gov/DrugsNew/DrugDetailT.aspx?int\\_id=424](http://www.aidsinfo.nih.gov/DrugsNew/DrugDetailT.aspx?int_id=424)>
- [167] A. Rouzes, K. Berthoin, Fa. Xuereb, S. Djabarouti, I. Pellegrin, J. L. Pellegrin, A. C. Coupet, Simultaneous determination of the antiretroviral agents: amprenavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir and efavirenz in human peripheral blood mononuclear cells by high-performance liquid chromatography–mass spektrometry, *J. Chrom. B*, **813**, (2004), 209-216
- [168] A. Lakshmi Sailaja, K. Kishore Kumar, D. V. R. Ravi Kumar, C. Mohan Kumar, N. M. Yugandhar, G. Srinubabu, Development and Validation of a Liquid Chromatographic Method for Determination of Efavirenz in Human Plasma, *Chromatographia*, **65**, (2007), 359-361
- [169] R. Heine, M. Davids, H. Rosing, E. C. M. van Gorp, J. W. Mulder, Y. T. van der Heide, J. H. Beijnen, A. D. R. Huitema, Quantification of HIV protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in peripheral blood mononuclear cell lysate using liquid chromatography coupled with tandem mass spektrometry, *J. Chrom. B*, **877**, (2009), 575-580

- [170] R. Colebunders, M. R. Kanya, J. Laurence, A. Kambugu, H. Byakwaga, P. S. Mwebaze, A. M. Muganga, M. Katwere, E. Katabira, First-line Antiretroviral Therapy in Africa – How Evidence-based are our Recommendations?, *AIDS Rev.*, **7**, (2005), 148-154
- [171] G. Ramachandran,, A. K. H. Kumar, S. Swaminathan, P. Venkatesan, V. Kumaraswami, D. J. Greenblatt, Simple and rapid liquid chromatography method for determination of efavirenz in plasma, *J. Chrom. B*, **835**, (2006), 131-135