

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI**  
**KRÁLOVÉ**

**KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE**

**VYUŽITÍ SPOJENÍ UPLC – MS PRO ANALÝZU**  
**BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Hradec Králové 2007**

**David Rejman**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za její odborné a obětavé vedení. Děkuji jí za důležité rady a návrhy, které mi velmi pomohly při tvoření této práce. Zároveň chci poděkovat všem lidem, kteří mi byli během mé práce cennou oporou.

# **Obsah**

OBSAH.....	4
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE.....	8
1.1. Úvod.....	9
1.2. Cíl práce .....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1. Van Deemterova a Giddingsova teorie pro účinnost chromatografického systému.....	12
2.1.1. Van Deemterova teorie.....	12
2.1.2. Giddingsova teorie .....	16
2.2. Chromatografické metody.....	17
2.2.1. Historie a stručný vývoj chromatografických metod .....	17
2.2.2. Historie UPLC.....	18
2.2.3. Ultra Performance Liquid Chromatography.....	20
2.2.4. Hmotnostní spektrometrie .....	27
2.2.5. Porovnání HPLC a UPLC technik .....	33
2.3. Vyhledávání informací o UPLC, UPLC-MS v internetových databázích.....	35
2.4. Farmaceutická analýza a analýza biologicky aktivních látek v biologickém materiálu pomocí UPLC-MS .....	38
2.4.1. Informace k tabulkovému přehledu.....	38
2.4.2. Analýza biologicky aktivních látek v biologickém materiálu.....	39
2.4.3. Farmaceutická analýza .....	43
2.5. Analýza vybraných biologicky aktivních látek a porovnání HPLC s UPLC .....	45
2.5.1. Analýza acetaminofenu pomocí UPLC-TOF-MS.....	45
2.5.2. Identifikace $\beta$ -blokátorů pomocí UPLC-MS.....	47
2.5.3. Stanovení amlodipinu v lidské plazmě pomocí UPLC-ESI-MS-MS .....	49
2.5.4. Stanovení epirubicinu v lidské plazmě pomocí UPLC-MS-MS ..	51
2.5.5. Analýza atypických psychofarmak za využití UPLC-MS-MS ve vzorcích <i>in vitro</i> .....	53

2.5.6 Analýza Triamcinolového a Hydrokortisonového krému a Indomethacinového a Estrogelového gelu pomocí UPLC a HPLC.....	55
3. ZÁVĚR .....	61
3.1. Závěrečné shrnutí .....	62
4. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	64
4.1. Použitá literatura .....	65

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- API – Atmospheric pressure ionization – ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku
- BEH – Bridged ethylsiloxane/silica hybrid – hybridní technologie silikagelu a polymeru
- BSM – Binary solvent manager – binární pumpa
- CI – Chemical ionization – chemická ionizace
- CID – Collision-induced dissociation – kolizně indukovaná disociace
- CNS – Centrální nervová soustava
- DAD – Diode array detector – detektor s diodovým polem
- EI – Electron ionization – elektronová ionizace
- ELSD – Evaporative light scattering detector
- ESI – Electrospray ionization – ionizace elektrosprejem
- FAB – Fast atom bombardment – ionizace urychlenými atomy
- FD – Field desorption – desorpce polem
- GC – Gas chromatography – plynová chromatografie
- HETP – Height equivalent of theoretical plate – výškový ekvivalent teoretického patra
- HILIC – Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
- HPLC – High Performance Liquid Chromatography – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- LC – Liquid chromatography – kapalinová chromatografie
- LLOQ – Low limit of quantitation – limit kvantifikace
- MALDI – Matrix assisted laser desorption ionization – laserem indukovaná ionizace za účasti matrice
- MS – Mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie
- MS-MS – Tandem mass spectrometry – tandemové spojení hmotnostních analyzátorů
- PDA – Photo-diode array – fotodiodové pole
- RSD – Relative standard deviation – relativní směrodatná odchylka
- SIMS - Secondary-ion bombardment mass spectrometry
- SO – Sample organizer – organizér vzorků
- TFA – Trifluoroacetic acid – kyselina trifluoroctová

TIC – Total ion current – celkový iontový proud

TOF – Time of flight – analyzátor doby letu

TS – Thermospray ionization – ionizace termosprejem

UHPLC – Ultra High Pressure Liquid Chromatography – Ultra vysokotlaká kapilární kapalinová chromatografie

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography – Ultra vysoko účinná kapalinová chromatografie

UV – Ultra-violet – ultrafialový/á

UV-VIS – Ultra-violet/visible – ultrafialová–viditelná oblast světla

# **1. Úvod a cíl práce**



## 1.1. Úvod

UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography představuje relativně nový trend týkající se kapalinové chromatografie. Metodika UPLC je velmi vhodnou alternativou HPLC – High Performance Liquid Chromatography, a to hlavně v těch analytických laboratořích, které jsou vysoce produktivní. Takové laboratoře s největší mírou využijí nesporných výhod, které jim již zmíněná UPLC technika přináší v porovnání s HPLC. Tento trend se týká zejména farmaceutických pracovišť, která se zabývají hodnocením klinických studií léčivých přípravků nebo laboratoře pracující v oblasti monitorování lékových hladin.

Protože UPLC je založena na zcela stejných mechanismech separace jako jí předcházející HPLC, není velkým problémem přenos analytických metod mezi těmito technikami. Vysoký nárůst zpětného tlaku, který může být velkým a špatně řešitelným problémem v klasické HPLC, je tolerován využitím speciálních analytických kolon na základě tlaku – odolného speciálního X – Bridge hybridního sorbentu a speciálními úpravami instrumentace.

Technika UPLC s možností několika typů detekce má také možnosti ve využití na různých typech pracovišť zabývajících se analýzou látek ať již v oblasti životního prostředí, potravinové či farmaceutické analýzy nebo v oblasti klinických a toxikologických analýz. Spojení UPLC s hmotnostní spektrometrií, využívající mimo jiné i ionizace elektrosprejem, přináší nesporné výhody v oblasti jejího uplatnění.

Technika UPLC se nejen v České republice komerčně objevila teprve před několika lety, a proto zde zatím není rozvinuta v takovém měřítku jako HPLC. Přináší s sebou mnoho nových výhod, poznatků a možností uplatnění, které jsou nebo teprve budou velmi zásadní pro celou řadu analytických pracovišť ve smyslu urychlení a zefektivnění jejich činnosti. O těchto aspektech bych mimo jiné rád pojednal v této práci.

## 1.2. Cíl práce

Hlavním cílem této práce je přiblížit UPLC instrumentaci, která vnáší do oblasti analýzy a separace látek nové možnosti a je nejen v naší republice poměrně novou technikou. Bude zde pojednáno o základních principech separace, na kterých je tato chromatografická metoda založena. Cílem práce je také stručné pojednání o historických souvislostech, jež neodmyslitelně patří k vývoji každé techniky. Jedním z důležitých aspektů, které si dává tato práce za cíl, je popis jednotlivých přístrojových součástí. Práce se zmiňuje samozřejmě i o spojení UPLC s hmotnostní spektrometrií využívající různé ionizační techniky. Pro zřetelné objasnění výhod, které UPLC poskytuje, je zde zařazena kapitola, která se zabývá porovnáním HPLC a UPLC instrumentací.

V případě této rešeršní práce, je zpracování odborných článků, které se týkají výše zmíněné instrumentace, považováno za jeden z hlavních cílů. Budou zde v grafickém přehledu přiblíženy jednotlivé skupiny článků, které řeší tuto problematiku z různého pohledu. Dalším významným aspektem, který tato práce zmíní, bude pojednání o využití spojení UPLC-MS v analýze vybraných biologicky aktivních látek v biologickém materiálu a ve farmaceutických přípravcích.

## **2. Teoretická část**

## 2.1. Van Deemterova a Giddingsova teorie pro účinnost chromatografického systému

### 2.1.1. Van Deemterova teorie<sup>1</sup>

V případě ideální chromatografie by chromatografické píky po nadávkování vzorku do chromatografického systému měly být ostré ohraničené zóny. Existují ale kinetické děje, které ovlivňují separaci a způsobují tzv. rozmývání zón a tím typicky známý Gaussovský tvar chromatografického píku.

Studie, která umožňuje popsat děje, které přispívají k rozmývání zón separovaných látek, je nazývána Dynamická van Deemterova teorie. V roce 1956 představil J. J. van Deemter rovnice popisující vztahy pro jednotlivé procesy ovlivňující rozšiřování chromatografických zón. Původně byly tyto zákonitosti vztaženy pouze na plynovou chromatografii, ale později se ukázalo, že jsou platné i pro chromatografii kapalinovou. To tedy znamená, že rovnice odvozené pro plynovou chromatografii jsou vhodné i pro aplikaci v kapalinové chromatografii. Giddings později také popsal tyto vztahy a ještě přesněji je specifikoval pro kapalinovou chromatografii. V původní interpretaci je rozšiřování chromatografické zóny dáno třemi nezávislými aditivními procesy:

**A. vřívou difúzí analytu v mobilní fázi**

**B. molekulární difúzí v mobilní fázi**

**C. odporem proti převodu hmoty v mobilní a ve stacionární fázi**

Tato interpretace dobře vystihuje podmínky plynové i kapalinové chromatografie s použitím náplňových kolon. Výšku tzv. teoretického patra lze vyjádřit jako součet dílčích příspěvků:

$$H = H_F + H_L + H_M$$

---

<sup>1</sup> Kapitola 2.1.1. byla vypracována ze zdrojů [1], [6].

H ... výška teoretického patra

H<sub>F</sub> ... příspěvek vířivé difúze k výšce teoretického patra

H<sub>L</sub> ... příspěvek molekulární difúze k výšce teoretického patra

H<sub>M</sub> ... příspěvek odporu proti převodu hmoty k výšce teoretického patra

### **A. Vířivá difúze analytu v mobilní fázi**

Tento příspěvek souvisí s nehomogenitou stacionární fáze. Mobilní fáze proudí v užších kanálcích pomaleji a naopak v kanálcích širších proudí rychleji. Molekuly procházející různými kanálky postupují různou rychlostí. Příspěvek vířivé difúze k rozmytí zón je závislý pouze na pravidelnosti uspořádání náplně kolony a na rozměrech částic. Příspěvek lze vyjádřit výrazem:

$$H_F = A = 2\lambda \cdot d_p$$

A ... konstantní člen van Deemterovy rovnice

$\lambda$  ... koeficient nerovnoměrného plnění chromatografické kolony

$d_p$  ... velikost částic náplně kolony

Se zmenšováním částic náplně klesá hodnota  $d_p$ , avšak vzrůstá hodnota  $\lambda$ . Koeficient  $\lambda$  závisí na distribuci velikosti částic. Čím užší je tato distribuce, tím menší je  $\lambda$  a také nárůst zpětného tlaku na koloně. U kapilárních kolon člen A odpadá, ale u náplňových kolon není možné člen A van Deemterovy rovnice vypustit. Účinnost analytické kolony vzrůstá se zmenšujícím se průměrem částic, což jasně vyplývá z výše uvedeného vztahu.

### **B. Molekulární difúze v mobilní fázi**

Molekuly látky difundují z místa s vyšší koncentrací do místa s nižší koncentrací. Molekuly se takto pohybují ve směru toku mobilní fáze i proti toku mobilní fáze. Molekulová difúze je popsána podle Fickových zákonů. Difúzi ovlivňuje zejména

difúzní koeficient  $D_m$ . Molekulová difúze se uplatňuje zejména při malých průtokových rychlostech. Příspěvek molekulové difúze k rozmytí zón je dán vztahem:

$$H_L = 2\gamma \cdot D_m / u = B / u$$

$\gamma$  ... korekční faktor charakterizující tvar kanálků v náplni kolony

$u$  ... průtoková rychlost mobilní fáze

$D_m$  ... difúzní koeficient

Je zřejmé, že s vyššími průtoky mobilní fáze se vliv difúze snižuje tak, jak to vyplývá z výše uvedené rovnice. Příspěvek molekulové difúze k rozmytí zón je velký v plynové chromatografii při malém průtoku nosného plynu. V případě kapalinové chromatografie je příspěvek molekulární difúze zanedbatelný, a to při běžných hodnotách průtoku mobilní fáze.

### **C. odpor proti převodu hmoty v mobilní a ve stacionární fázi**

Přenos hmoty je nejspornějším parametrem. Je v podstatě kombinací dvou vlivů: přenosu hmoty uvnitř částice a adsorpční kinetiky. Rychlost přenosu hmoty mezi fázemi je určována zejména difúzí analytu ve stacionární fázi nebo ve stagnující mobilní fázi v pórech nosiče a v proudící mobilní fázi. Rychlost, kterou se hmota přenáší, je také závislá na tloušťce vrstvy stacionární fáze a na velikosti a tvaru zrn náplně. Adsorpční kinetika je v podstatě zanedbatelná.

Příspěvek odporu proti přenosu hmoty k rozmytí zón lze popsat vztahem:

$$H_M = \omega \cdot d_p^2 / D_m \cdot u = C \cdot u$$

$\omega$  ... koeficient závislý na distribuci tvaru částic, velikosti částic a také distribuci pórů

$d_p$  ... velikost částic náplně kolony

$D_m$  ... difúzní koeficient analytu v mobilní fázi

$u$  ... průtoková rychlost mobilní fáze

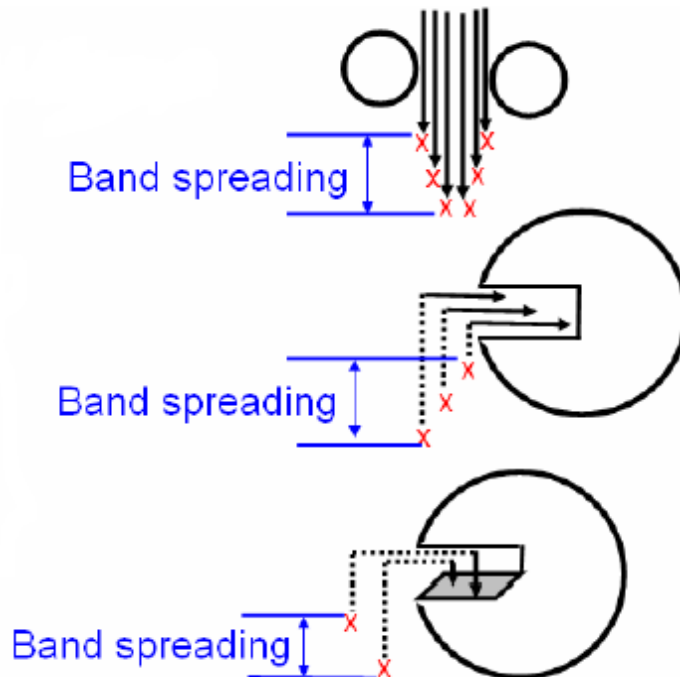
Další možný způsob vyjádření tohoto příspěvku:

$$\mathbf{H_M} = (\mathbf{C_M} + \mathbf{C_S}) \cdot \mathbf{u}$$

$C_M$  ... konstanta závislá na difúzním koeficientu analytu v mobilní fázi

$C_S$  ... konstanta závislá na difúzním koeficientu analytu ve stacionární fázi

$u$  ... průtoková rychlost mobilní fáze



Obr. 1: Odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi (nahore), odpor proti převodu hmoty ve stagnující mobilní fázi (uprostřed), odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi (dole), [6].

Celkové rozmytí zón lze tedy vyjádřit souhrnnou rovnicí:

$$\mathbf{H} = 2\lambda \cdot \mathbf{d_p} + 2\gamma \cdot \mathbf{D_m} / \mathbf{u} + \omega \cdot \mathbf{d_p}^2 / \mathbf{D_m} \cdot \mathbf{u} = \mathbf{A} + \mathbf{B/u} + \mathbf{C \cdot u}$$

## 2.1.2. Giddingsova teorie<sup>2</sup>

Giddingsova teorie na rozdíl od van Deemterovy teorie popisuje lépe zákonitosti v kapalinové chromatografii. Rozmývání chromatografických zón je ovlivněno stejnými kinetickými ději. Tyto děje jsou tedy následující:

vířivá difúze

molekulární difúze

odpor proti převodu hmoty ve stacionární fázi

odpor proti převodu hmoty v mobilní fázi

odpor proti převodu hmoty ve stagnující mobilní fázi

Účinnost chromatografického systému podle Giddingsovy rovnice lze vypočítat následovně. Jednotlivé veličiny a jejich popis odpovídá van Deemterovým rovnicím.

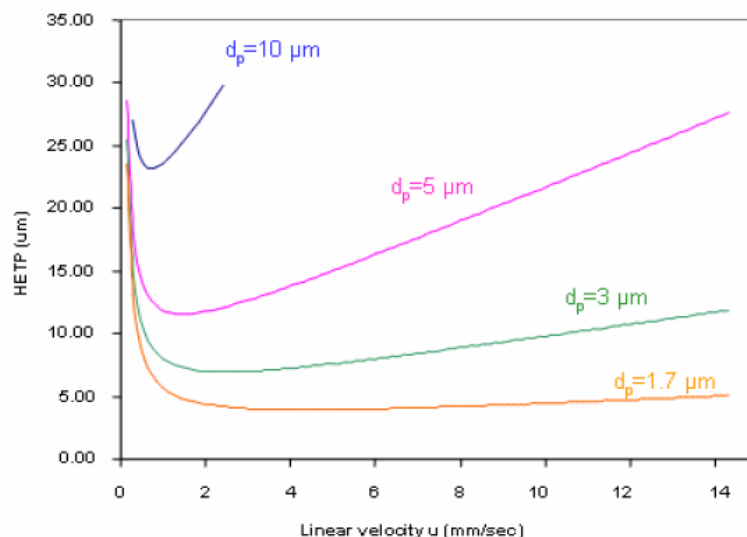
$$H = 1/[(\lambda \cdot d_p) + D_m / (\omega \cdot d_p^2 \cdot u)] + \gamma \cdot D_m / u + (\omega_s \cdot d_p^2 / D_m + \omega_{sm} \cdot d_p^2 / D_m) \cdot u$$

vířivá difúze

odpor proti převodu  
hmoty v mobil. fázi

molekulární  
difúze

odpor proti převodu hmoty ve  
stacionární a stagnující mobilní f.



Obr. 2: Vliv velikosti částic na účinnost chromatografického systému. Van Deemterovy křivky – závislost účinnosti (HETP) na lineárním průtoku [4].

<sup>2</sup> Kapitola 2.1.2. byla vypracována ze zdroje [4].



## 2.2. Chromatografické metody

### 2.2.1. Historie a stručný vývoj chromatografických metod<sup>3</sup>

Ruský botanik Michail Semjonovič Cvět popsal první chromatografickou techniku, a to sloupcovou adsorpční chromatografii na přelomu 19. a 20. století během svého studia rostlin. Použil adsorpční kolony, které obsahovaly křídovou, aluminovou a sacharozovou náplň. Pomocí těchto kolon separoval rostlinné pigmenty. Jeho metoda byla poprvé prezentována 30. 12. 1901 na 11. Kongresu přírodovědců a doktorů v Saint Petersburgu. M. S. Cvět poprvé užil termínu **chromatografie** v roce 1906 v jeho dvou článcích o chlorofylu v „German botanical journal“. Pojem chromatografie tedy pochází od názvu rostlinného barviva – chlorofylu.

V sedmdesátých letech začal velmi významný rozvoj vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatography - HPLC), která umožňovala analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek a polymerů. Byly tak kompenzovány nedostatky GC – plynové chromatografie. Rychlý rozvoj HPLC byl umožněn objevem vhodných citlivých detektorů a účinných stacionárních fází. Lze jmenovat například vysokotlaké techniky používané k naplňování kolon, a v neposlední řadě se zde také vyskytuje velmi malá velikost částic, které tvoří náplň kolony, a tedy i stacionární fázi a tím umožňují vysokou účinnost separace. HPLC je možno považovat za předchůdce UPLC techniky, protože princip separace látek na koloně je totožný s HPLC, přičemž separace za využití UPLC je rychlejší a zároveň účinnější díky možnosti využití výhod malých částic o velikosti 1,7  $\mu\text{m}$ . Malé částice umožňují aplikaci vyšších tlaků v UPLC.

---

<sup>3</sup> Kapitola 2.2.1. byla vypracována ze zdrojů [1], [2], [3].

## 2.2.2. Historie UPLC<sup>4</sup>

V roce 1975 Halász a skupina jeho pracovníků ukázali, že použitím velmi malých částic v koloně lze docílit ještě kratšího času potřebného pro analýzu. Také bylo ukázáno, že minimální čas pro analýzu, kterého bylo dosaženo, je omezen tlakem v koloně v závislosti na jejím průměru. Většina konvenčních čerpadel měla horní tlakové limity kolem 40 MPa, čímž kolony naplněné částicemi omezovaly na délku zhruba 25 cm. Kolony, které užívaly částice o velikosti 1,5  $\mu\text{m}$  měly délku pouhých 3 – 4 cm.

V devadesátých letech MacNair představil techniku Ultravysokotlaké kapilární kapalinové chromatografie (UHPLC), aby překonal tlaková omezení, která malé částice vytvářely na čerpací pumpy. V UHPLC byla dokázána jak vysoká účinnost, tak vysoká rychlost za využití neporézních  $C_6$  – modifikovaných silikonových částic. Aby bylo možné využít tuto metodu v laboratořích, bylo nutné zlepšit některé její praktické aspekty jako např. dávkování vzorků do systému, opakovatelnost a citlivost detekce.

V UHPLC dochází k obzvláštním problémům při dávkování vzorků spočívající v obtížnosti při konstruování dávkovacího ventilu, který by vyhovoval nárokům na spolehlivost při vysokém tlaku v systému. Konvenční dávkovací ventily vyhovovaly požadavkům systému, avšak mohly vydržet pouze tlak od 28 do 40 MPa, což je o hodně nižší tlak, než jaký je vyžadován pro UHPLC metodu. Nicméně MacNair a jeho skupina dosáhli vysoké účinnosti díky použití speciálního dávkovače vzorků. S těmito dávkovacími systémy mohly být aplikovány vzorky při velmi vysokém tlaku 275 – 500 MPa. Přesto je zřejmé, že tato technika měla také své nedostatky. Tyto dávkovací systémy vyžadovaly příliš velké množství dávkovaného vzorku, množství právě vstříkovaného vzorku nebylo možné efektivně kontrolovat, čímž se tyto dávkovače stávaly příliš nevěrohodné pro kvantifikaci. Celkový proces dávkování trval několik minut a tudíž pro praktické použití byl nevhodný. Bylo tedy žádoucí vyvinout více opakovatelné a použitelnější dávkovací systémy.

---

<sup>4</sup> Kapitola 2.2.2. byla vypracována ze zdrojů [5], [14].

Další praktickou otázkou týkající se UHPLC byla volba kolony včetně jejího vnitřního průměru a náplňového materiálu. Při UHPLC mohly být používány pouze kapilární kolony např. 30 – 150  $\mu\text{m}$  vnitřního průměru, protože malé kolonové průměry umožňovaly lepší rozptyl tepla vznikajícího třením. Bylo zjištěno, že účinnost kolon se zlepšuje se snížením jejich průměru. Nicméně se zvýšením průměru se mohou objevit některé praktické problémy. Například s vyšším průměrem kolony poklesne i její citlivost a proces plnění probíhá daleko obtížněji. Výše uvedené aspekty byly předpokladem pro pozdější vznik UPLC techniky jakožto nástupce UHPLC.

V roce 1997 MacNair představil UHPLC metodu, ve které bylo dosaženo ještě větší účinnosti, jež byla potencována velmi malými částicemi v koloně. Pozdější studie pak dále demonstrovaly tuto vysokou účinnost a také vysokou rychlost v UHPLC metodě. Konvenční vzduchové zesilovací pumpy, které byly použity v těchto studiích umožňovaly dosažení tlaků o hodnotách vyšších než 500 MPa. Tyto pumpy byly použity pro plnění kolon.

UHPLC metoda vyžadovala některé dílčí úpravy použitých konvenčních komponent tak, aby systém odolal vysokým tlakům. Například byly použity speciálně upravené dávkovací ventily pro nástřik vzorku, které byly schopny odolat daleko vyšším tlakům, než konvenční ventily, které byly konstruovány pro tlaky od 28 do 40 MPa. Z bezpečnostních důvodů, vzhledem k do té doby dostatečně neprozkoumaným vysokým tlakům v koloně, MacNair a kol. zkonstruovali pevný ocelový box, do kterého umístili UHPLC systém. Tento box ochraňoval jednotlivé součásti systému před poškozením následkem případného prasknutí kolony.

### 2.2.3. Ultra Performance Liquid Chromatography<sup>5</sup>

Ultra Performance Liquid Chromatography je nově zaváděná technika, která poskytuje nejrůznější možnosti v oblasti kapalinové chromatografie. UPLC chromatografický systém je speciálně konstruován tak, aby odolal vysokým zpětným tlakům, které v něm vznikají.

Ve spojení s tímto analytickým systémem jsou používány speciální kolony UPLC Acquity BEH o malém vnitřním průměru (1,0 - 2,1mm), které jsou plněny částicemi s průměrem 1,7  $\mu\text{m}$ . Parametry kolon a částic v nich pozitivně ovlivňují účinnost chromatografického procesu a výrazně zkracují dobu, po kterou analýza probíhá. Jednou z důležitých podmínek je užití speciálních, odolných a pevných kapilárních spojů, které z důvodu ultra vysokého tlaku v systému hrají nezastupitelnou roli. Separace látek zde probíhá za ultra vysokého tlaku pohybujícího se v hodnotách až do 100 MPa, což podporuje maximální využití sorbentů s velmi malým zrněním.

Vzhledem k vysokým tlakům, které v systému vznikají, musela být v zařízení UPLC provedena celá řada technických úprav. Můžeme zmínit například vysokotlakou binární pumpu, která je schopna dokonale a reprodukovatelně pracovat za velmi vysokých tlaků až do hodnoty 100 MPa stejně jako autosampler. Injekování vzorku je zde charakterizováno rychlými dávkovacími cykly a nízkým objemem vzorku. Všechny tyto atributy pozitivně přispívají ke zvýšení rychlosti a citlivosti UPLC analýzy. Jako další úpravy můžeme zmínit nutnost použití nízkoobjemové detekční cely s dlouhou dráhou pro světelný paprsek či minimalizování systémových objemů. Nutné je též zvýšit rychlost sběru dat tak, abychom získali co největší množství bodů k zaznamenání chromatografického píku.

Nově vyvinutý přístroj pro LC analýzu Acquity UPLC pracující pod ultra-vysokým tlakem je příkladem takového systému. Další výrobci HPLC tento nový trend záhy následovali. Waters Acquity UPLC (2004) byl první nově vyvinutý UPLC přístroj.

---

<sup>5</sup> Kapitola 2.2.3. byla vypracována ze zdrojů [1], [4], [7], [8], [9], [50].

Jasco X-LC (2005) byla instrumentace, která byla doplněna pouze UV/VIS detekcí. Agilent 1200 RRLC (2006) systém pracoval pouze do hodnoty tlaku okolo 60 MPa. Další typ přístroje byl Thermo Accela (2006).

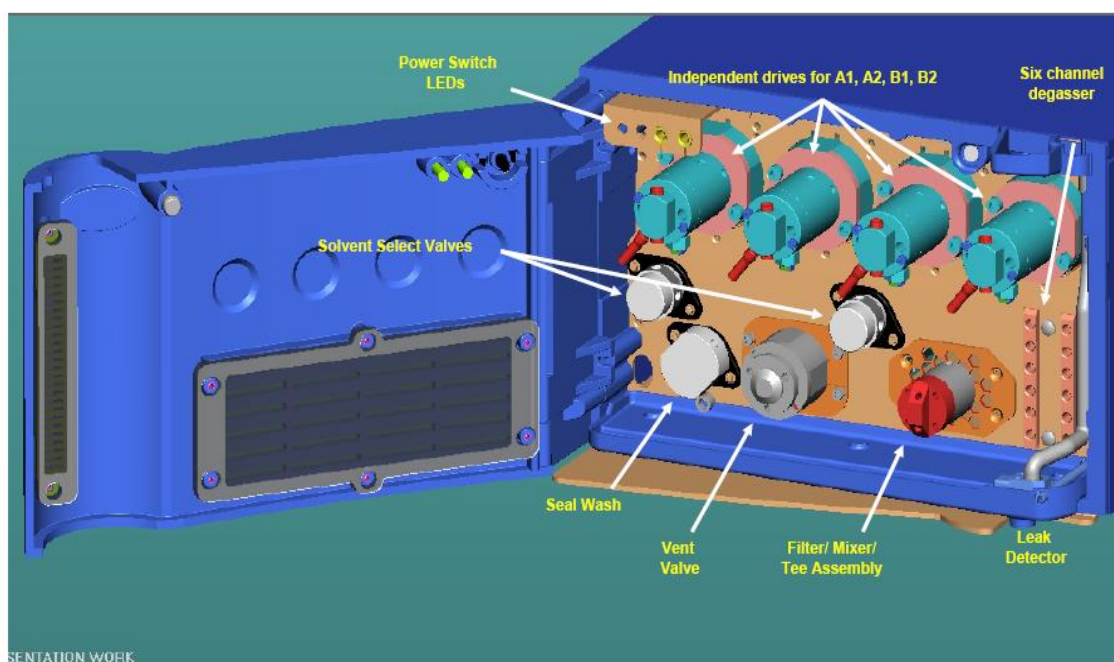
Stejně jako konvenční HPLC instrumentace je UPLC systém složen ze čtyř hlavních modulů. Vzhledem k použití ultra-vysokého tlaku a značného urychlení analýzy musely však být do konstrukce systému vneseny určité změny optimalizující jeho účinnost. Jako příklad UPLC instrumentace bude podrobně popsán UPLC systém Acquity firmy Waters.



Obr. 3: UPLC analytický systém firmy Waters složený ze čtyř modulů – směrem od spodní části přístroje: binární pumpa (BSM), autosampler-sample manager (SM), kolonový termostat, detektor, sample organizer (boční část) [4].

Binary solvent manager (BSM) je binární pumpa umožňující nastavení průtoků v rozmezí od 0,01 – 2,00 ml/min (s přesností < 0,075% RSD). Objem fluidické dráhy je minimalizován, mrtvý objem je menší než 150  $\mu$ l. Pumpa umožňuje výběr ze čtyř

solventů, což je velmi výhodné při tvorbě gradientů a také při automatizaci výměny různých metod. Maximální pracovní tlak je přibližně 100 MPa (15 000 psi, 1000 bar), což podporuje maximální využití sorbentů s velmi malým zrněním plněných do kolon s úzkým průměrem. Pozitivním důsledkem je zvýšení účinnosti separace, zlepšení rozlišení a zkrácení doby analýzy, přičemž je však generován velmi vysoký zpětný tlak, který by konvenčními HPLC systémy nemohl být akceptován. Pro odplynění vcházejících rozpouštědel je vložen šesti-komůrkový degasser.



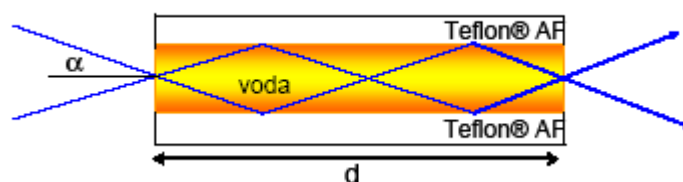
Obr. 4: Binární pumpa – binary solvent manager (BSM) [7].

Sample manager (SM) je automatický dávkovač, umožňující dávkování v rozsahu 0,1 – 50,0  $\mu\text{l}$ . Pro oplach jehly používá dvě kapaliny, tzv. silnou a slabou, volitelné podle povahy analyzovaných vzorků a pro eliminaci přenosu vzorků mezi jednotlivými dávkováními. Doba mezi nástřiky je velmi krátká – 25 s bez oplachu a do 60 s se dvěma oplachy. Tímto se velmi urychlil dávkovací cyklus. Nástřik je tlakově regulován s využitím designu jehla v jehle, a tím je omezen přenos vzorku na méně než 0,005%. Dále je také eliminována možnost ucpání jehly částicemi septa a zmenšeno rozmytí zóny vzorku v dávkovací jehle. SM umožňuje tři způsoby nástřiku, tzv. „full loop injection“ s vyšší přesností dávkování (0,3% RSD), tzv. „partial loop injection“

s poněkud nižší přesností (0,5% RSD) a tzv. „partial loop with needle overfill“. Způsob nástřiku je vybírán s ohledem na dávkované množství vzorku a velmi ovlivňuje reprodukovatelnost metody. Temperování prostoru SM v rozmezí 4 °C až 40 °C je naprostou samozřejmostí.

Do SM je integrován kolonový termostat. Umožňuje teplotu až do 65 °C a má dvě nastavitelné pozice. Pro spojení s MS detektory je nutné jej vytočit ven, aby bylo možné zavést eluent do iontového zdroje. Při spojení s UV-VIS detektorem zůstává neotočen.

UV-VIS detektor vyžaduje naprosto speciální konstrukci, protože brzy eluující píky, které jsou při UPLC eluovány vyžadují vyšší rychlost sběru dat a menší objem fotocely. Menší objemy píků pak vyžadují maximální prostupnost světla (S/N). UPLC fotocela musí udržet optimální tvar píku umožněný použitím 1,7  $\mu\text{m}$  sorbentů a negenerovat další zpětný tlak. Délka optické dráhy paprsku uvnitř teflonové kapiláry činí 10 mm při jejím objemu pouze 500 nl.



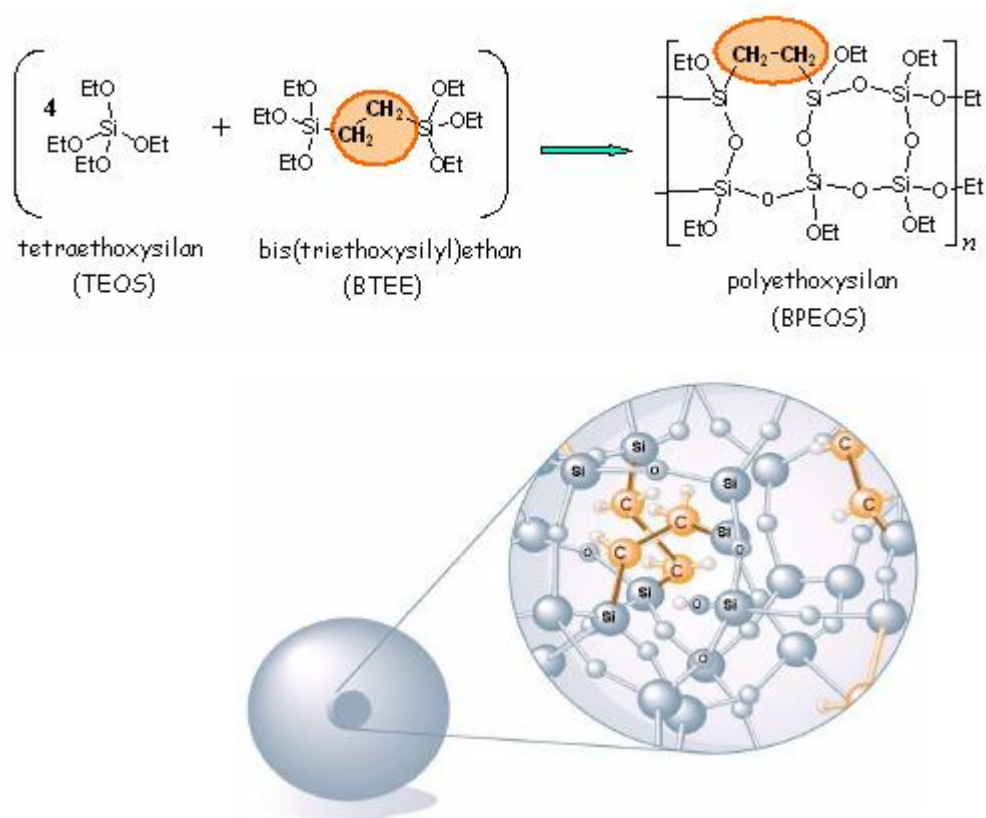
Obr. 5: Schéma detekční cely v UPLC systému [4].

Nezbytným parametrem je zvýšení rychlosti sběru dat umožňující získání dostatečného počtu bodů pro integraci rychle eluujících píků. UPLC umožňuje nastavení rychlosti sběru dat do 20 bodů/s nebo až do 80 bodů/s podle typu detektoru. Kromě DAD lze bez problému připojit hmotnostní spektrometr, FD nebo ELSD. Volitelný sample organizer (SO) umožňuje zvýšení kapacity UPLC analýzy a možnost zpracování více vzorků pro využití ve vysoce produktivních laboratořích.

UPLC analytické kolony, které byly vyvinuty speciálně pro tento systém, obsahují speciální sorbent X – Terra 2. generace odolný vůči působení ultra-vysokých tlaků díky BEH technologii. Kolony jsou plněny sub-2-micronovými částicemi, které

optimalizují účinnost systému a umožňují zkrácení délky analytické kolony při zachování potřebných rozlišení a účinností. Dojde také k významnému urychlení analýzy. Příspěvajícím faktorem vysoké účinnosti jsou samozřejmě i malé vnitřní průměry kolon (1,0 nebo 2,1 mm), které jsou pro BEH analytické kolony používány.

Zatímco první generace X – Terra hybridních částic neměla dostatečnou mechanickou odolnost ani účinnost potřebnou pro rychlou a citlivou analýzu s vysokým rozlišením v UPLC, druhá generace hybridního materiálu X – Terra vykazuje právě tyto vlastnosti. Výroba X – Terra sorbentu druhé generace využívá „bridged ethyl/siloxane silica hybrid“ (BEH) technologii, která má právě velmi vysokou účinnost a velkou odolnost v širokém rozmezí pH (1-12). Analytické kolony jsou vyráběné s vázanou C<sub>8</sub> a C<sub>18</sub> stacionární fází, kdy je využito včlenění trifunkčního ligandu pro lepší stabilitu při nízkém pH. Pro dosažení lepšího tvaru píku je použita nová technologie endcappingu.



Obr. 6: Struktura sorbentu X – Terra 2. generace [4].

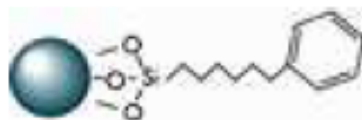


Existují následující modifikace stacionárních fází: stacionární fáze Shield obsahuje vložené polární skupiny. Je kombinací hydrofilní vložené polární skupiny a hydrofobního alkylového ligandu. Tato fáze může být alternativou RP stacionárních fází, je kompatibilní s vodnými mobilními fázemi a poskytuje dobrý tvar píku i pro bazické látky. Díky polární skupině této stacionární fáze se chová jako akceptor vodíkové vazby, takže selektivita se stává unikátní hlavně pro polyfenolické látky.



Obr. 7: Stacionární fáze Shield [4].

Dalším typem UPLC stacionární fáze, která poskytuje doplňující selektivitu zejména pro analyty s aromatickým jádrem, je reverzní fáze s fenylovým ligandem. Fenylová fáze využívá speciální trifunkční C<sub>6</sub> alkyl mezi fenylovým jádrem a silylovou skupinou.



Obr. 8: Reverzní fáze s fenylovým ligandem [4].

Posledním typem UPLC stacionární fáze je HILIC BEH stacionární fáze, která obsahuje pouze nemodifikované BEH částice a je vhodná pro separaci velmi polárních bazických látek při analýze za HILIC podmínek.



Obr. 9: HILIC BEH stacionární fáze [4].

BEH technologie využívá 1,7  $\mu\text{m}$  částice pro zvýšení účinnosti chromatografické separace. Podle základních chromatografických principů, van Deemterovy a Giddingsovy rovnice je účinnost vyjádřená jako HETP přímo úměrná velikosti částic. Jak tedy vyplývá z teorie, 1,7  $\mu\text{m}$  částice by měly poskytovat jak vyšší účinnost (menší hodnoty HETP), tak lepší rozlišení než konvenční 5  $\mu\text{m}$  částice.

Pro redukci jevu rozšiřování chromatografických zón, pro zajištění těsných spojení a také dlouhé životnosti byl vylepšen i kolonový hardware. Byla použita speciální fritra, která zajišťuje udržení částic v koloně, a tím pádem mimo detektor nebo MS zdroj. Životnost BEH analytických kolon za UPLC podmínek je podobná jako životnost konvenčních analytických kolon za běžných HPLC podmínek.

Acquity UPLC kolony jsou vyráběny také pomocí tzv. eCord technologie. Kromě toho, že pomocí čipové technologie je uchováván Analytický certifikát kolony, jsou zaznamenávána také data o používání kolony jako je počet sekvencí vzorků, nástřiků, maximální tlak, maximální teplota a data o posledním použití kolony. Všechny tyto údaje je možno počítačově zpracovávat. eCord je však stále připevněn k analytické koloně a tudíž nemůže dojít k přepisu nebo odstranění dat.



Obr. 10: Analytická kolona Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> s eCord technologií [4].

## 2.2.4. Hmotnostní spektrometrie<sup>6</sup>

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která využívá separace urychlených ionizovaných částic (iontů) ve vakuu, a to podle poměru jejich hmotnosti a náboje při jejich průchodu magnetickými a elektrickými poli. Podstatou hmotnostní spektrometrie je studium iontů v plynném stavu. Tato metoda v sobě zahrnuje tři hlavní části: generování iontů sledovaných atomů nebo molekul, separace iontů podle poměru jejich hmotnosti k náboji ( $m/z$ ), měření zastoupení jednotlivých druhů separovaných iontů. Technika byla vyvinuta počátkem 20. století a původně byla využívána zvláště ve fyzice a chemii, mj. byly pomocí této metody objeveny stabilní izotopy prvků. Po dlouhou dobu pak hmotnostní spektrometrie byla hlavní metodou analýzy ropných produktů a analýzy těkavých organických látek obecně.

Na rozdíl od jiných analytických přístupů tato metoda vyžaduje opravdu nepatrné – homeopatické množství měřené látky. Je to nepředstavitelně malé množství, a proto se hmotnostní spektrometrie často používá ve stopové analýze. Další důležitá vlastnost této techniky tkví v její schopnosti analyzovat i velmi komplikované směsi látek a strukturní informaci poskytnout rychle.

Hmotnostní spektrometrie je využívána především ve strukturní analýze. U nízkomolekulárních látek je studována jejich ionizace měkkými ionizačními technikami (elektrosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku) a kolizí indukovaná disociace v iontové pasti. Získané poznatky jsou využívány například při popisu fragmentace komplexů kovů s azolátkami, při identifikaci metabolitů farmakologicky zajímavých látek, při identifikaci produktů a meziproductů elektrochemických přeměn herbicidů, při vývoji metody pro diagnostiku poruch purinového a pyrimidinového metabolismu. Hmotnostní spektrometrie je rovněž používána při charakterizaci peptidů a proteinů.

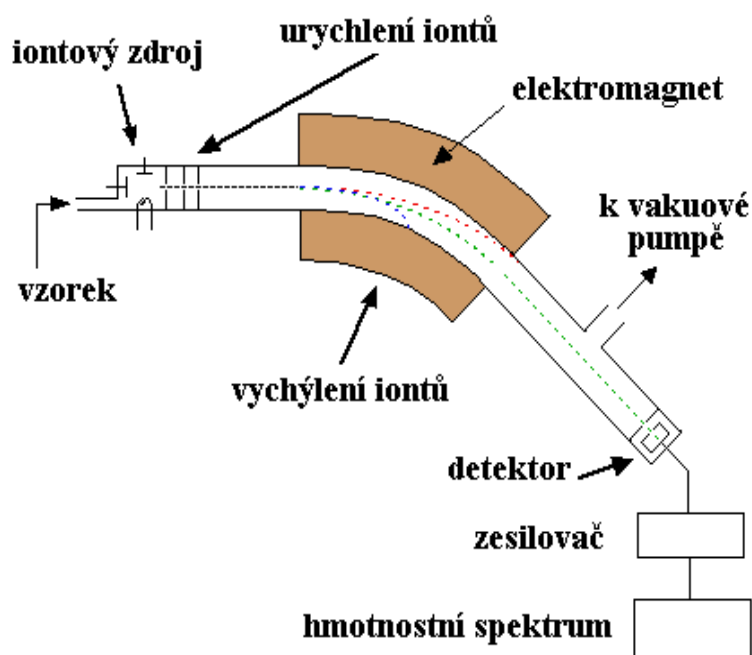
---

<sup>6</sup> Kapitola 2.2.4. byla vypracována ze zdrojů [10], [11], [12], [13], [51].

K řešení uvedené problematiky je využívána samotná hmotnostní spektrometrie nebo její spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií resp. kapilární elektroforézou a někdy i s plynovou chromatografií.

Výsledkem analýzy je tzv. hmotnostní spektrum. Je to závislost intenzity iontového proudu na hodnotě  $m/z$ . Hodnota 100 % odpovídá nejintenzivnějšímu píku ve spektru. Nacházíme zde píky odpovídající molekulovému iontu a píky, které charakterizují tzv. fragmentové ionty.

Při použití techniky UPLC-MS v analýze biologicky aktivních látek můžeme dosáhnout ještě lepších výsledků, než při užití HPLC-MS metodiky či samotné metody UPLC. UPLC-MS technika ve srovnání s HPLC-MS vyniká výraznější citlivostí. Nespornou výhodou je i zkrácení doby analýzy v porovnání s HPLC-MS.



Obr. 11: Schéma hmotnostního spektrometru [10].

## Rozdělení ionizačních technik

Podle množství dodané energie dělíme ionizační techniky na měkké a tvrdé. U měkkých technik je energetický přebytek dodaný molekule malý a pravděpodobnost fragmentace primárně vzniklého iontu je nízká. U tvrdých technik dodaná energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu. Nejběžnější jsou techniky ionizace z plynné fáze, kdy je analyzovaná látka předem odpařena do vakua. Techniky ionizace z kondenzované fáze jsou vhodné pro analýzu netěkavých látek.

Příkladem tvrdé ionizační techniky z plynné fáze je **elektronová ionizace (EI)**. Je to nejběžnější a nejlépe propracovaný způsob ionizace. Analyzovaná látka interaguje s proudem urychlených elektronů za vzniku radikalkationtu. Jako zdroj elektronů se zde používá elektricky žhavené rheniové nebo wolframové vlákno a proud elektronů je směřován prostorem iontového zdroje směrem k anodě. Vznikající ionty jsou z prostoru iontového zdroje vytlačovány elektrickým polem pomocné elektrody. Tato technika se používá zejména pro zjištění strukturních informací o malých molekulách.

**Chemická ionizace (CI)** je měkká ionizační technika z plynné fáze. Jako primární zdroj energie se zde uplatňuje proud urychlených elektronů. Energie elektronů je přenášena na analyzovanou látku zprostředkovaně přes reakční médium (methan, propan, vodík, voda, amoniak, vodík/helium). Reakční médium je v ionizační komůrce pod tlakem. Nejčastěji používané médium je methan. Reakční kationy interagují s molekulou analytu M za vzniku molekulárního iontu  $MH^+$ . Konstrukce iontového zdroje pro CI je prakticky totožná s konstrukcí EI zdroje.

Příkladem techniky ionizace z kondenzované fáze je **ionizace desorpcí polem (FD)**. Analyzovaná látka je zde nanášena přímo na povrch pracovní elektrody. Technika umožňuje ionizaci látek netěkavých, které není možné odpařit do vakua.

**Ionizace bombardováním vzorku urychlenými atomy (FAB)** využívá k ionizaci urychlených atomů vzácných plynů (Ar, Xe). Jedná se o měkkou ionizační techniku z kondenzované fáze. Dopad atomů způsobí desorpci a ionizaci. Technika se využívá při analýzách tepelně nestálých netěkavých látek.

V **ionizaci urychlenými ionty – Secondary-ion bombardment mass spectrometry (SIMS)** se k ionizaci používá ostřelování analytu urychlenými ionty Cs<sup>+</sup>. Jedná se opět o měkkou ionizační techniku z kondenzované fáze. Technika se opět využívá při analýzách tepelně nestálých netěkavých látek.

**Desorpce laserem za účasti matrice (MALDI)** je ionizační technika z kondenzované fáze využívající záření o vhodné vlnové délce a dostatečné intenzitě. Jako zdroje záření se používají lasery pracující v infračervené nebo viditelné části spektra. Technika se nejčastěji užívá v kombinaci s průletovým hmotnostním analyzátozem (TOF). Desorpční fotoionizace se používá pro analýzy biopolymerů.

**Sprejové ionizace** jsou měkké ionizační techniky z kapalně fáze. Mezi sprejové ionizace se řadí **termosprej (TS) a elektrosprej (ES)**. Převodu iontů z kapalně fáze do vakua je dosaženo rychlým odpařením mikrokapiček. Je-li proces odpaření dostatečně rychlý, povrchový náboj kapének postačí k převodu iontů z roztoku do vakua bez nutnosti dodání vnější energie. Sprejové ionizační techniky se dobře uplatňují při spojení MS s průtokovými analytickými technikami (HPLC-MS, UPLC-MS).

**Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)** je v principu podobná jako konvenční CI, ale ionizace probíhá za atmosférického tlaku a konstrukce iontového zdroje musí být přizpůsobena velkému množství vstupujícího eluentu na výstupu z HPLC (0,2 – 2 ml/min pro konvenční kolony).

Nejpoužívanějšími způsoby ionizace ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a v off-line spojení ionizace laserem za účasti matrice (MALDI).

## Hmotnostní analyzátory

**Magnetický hmotnostní analyzátor** je nejstarší disperzní analyzátor. Umožňuje prostorové rozdělení monoenergetického svazku iontů podle hodnoty  $m/z$ . Konstrukčně se jedná o elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci procházejí ionty. Ionty urychlené v iontovém zdroji mají kinetickou energii danou vztahem:

$$E_k = m \cdot v^2/2 = z \cdot V$$

$m$  ... hmotnost iontu

$v$  ... rychlost pohybu iontu

$z$  ... náboj iontu

$V$  ... akcelerační napětí iontového zdroje

V homogenním magnetickém poli působí na ionty radiální Lorentsova síla, která je v rovnováze se silou odstředivou:

$$B \cdot z \cdot v = m \cdot v^2/r$$

$B$  ... magnetická indukce

$r$  ... poloměr dráhy iontu

Řešením uvedených rovnic se získá vztah pro hmotnostní spektrometr ve tvaru:

$$m/z = B^2 \cdot r^2/(2V)$$

Ionty o rozdílném poměru  $m/z$  opisují dráhy o různých poloměrech a dochází k prostorové disperzi iontů podle jejich hmotnosti.

**Kvadrupólový analyzátor (filtr)** bývá součástí hmotnostních spektrometrů s nízkým rozlišením vhodných pro spojení s plynovou chromatografií a s HPLC. Konstrukčně se jedná o 4 kovové tyče hyperbolického nebo kruhového průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům stejnosměrného a střídavého napětí. Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyčemi, se dostanou do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat.

Při vhodném poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí a dané hodnotě těchto napětí projdou kvadrupólem pouze ionty o určitém poměru  $m/z$ .

**Iontová past** je zařízení umožňující účinkem elektrického pole uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Skládá se ze vstupní a výstupní elektrody kruhového průřezu a z prstencové středové elektrody. Krajiní elektrody jsou uzemněny a na středovou elektrodu je vkládáno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Ionty jsou nuceny pohybovat se uvnitř iontové pasti po uzavřených kruhových drahách. S rostoucí amplitudou napětí se ionty s rostoucím  $m/z$  dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor iontové pasti směrem do detektoru.

**Průletový analyzátor (TOF)** je nejjednodušší hmotnostní analyzátor, který je v podstatě tvořen pouze prázdnou trubicí. K časovému rozdělení iontů podle  $m/z$  dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Hmotnější ionty se pohybují nižší rychlostí než ionty lehčí a dorazí do detektoru později. Dosažené rozlišení závisí na délce dráhy, kterou ionty v průletovém analyzátoru urazí. Průletový analyzátor vyžaduje použití iontového zdroje pracujícího v pulsním režimu.

V detektorové části hmotnostní spektrometrie se používají detektory pro přímá měření, detekující elektrický proud vznikající přímým dopadem stanovovaných iontů. Násobičové detektory využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů. Detektory pro přímá měření jsou nezbytné pro určení přesného zastoupení prvků. Detektory pro přímá měření jsou obvykle součástí specializovaných zakázkových systémů. Násobičové detektory jsou nejčastěji používaným typem detektorů v metodě MS. Násobičové detektory jsou schopny poskytnout měřitelný signál pro jednotlivé ionty.



## 2.2.5. Porovnání HPLC a UPLC technik<sup>7</sup>

UPLC metodika je právem považována za plnohodnotného a dokonalejšího nástupce HPLC techniky. Vůči HPLC vyniká například významnou úsporou času, který je nutný pro průběh analýzy, či nižší spotřebou rozpouštědel, které jsou nutné k provedení analýzy. To jsou jen některé z mnoha výhod, které budou zcela jistě podporovat používání UPLC ve stále větším počtu analytických laboratoří.

UPLC systém, který používá jako náplň kolony částice o velikosti 1,7  $\mu\text{m}$ , umožňuje až devětkrát zkrátit čas analýzy ve srovnání s konvenčním HPLC systémem, který standardně užívá 5  $\mu\text{m}$  částice v koloně. V porovnání s 3  $\mu\text{m}$  částicemi umístěnými v HPLC koloně může být analýza zkrácena zhruba trojnásobně. Snížením velikosti částic v UPLC koloně dochází asi k devítinásobnému zvýšení zpětného tlaku v systému v porovnání s 5  $\mu\text{m}$  částicemi. Ve vztahu k 3  $\mu\text{m}$  HPLC částicím je zvýšení tlaku trojnásobné.

Separáčnı́ proces v UPLC technice je vykonáván pod ultra vysokým tlakem, který zde může dosahovat až 100 MPa, ale tento vysoký tlak nemá negativní vliv na analytickou kolonu ani na jiné součásti obsažené v systému. V HPLC se můžeme setkat s tlaky okolo 35-40 MPa a tedy i s nižší separáčnı́ účinností systému, protože při těchto tlacích nelze plně využít výhody sub-2-micronových částic.

Nı́že uvedená tabulka obsahuje názornı́ přehled týkající se porovnání částic užívaných v UPLC a v HPLC. Za použití menších částic v UPLC metodě dosáhneme vyšší účinnosti separace, rychlosti analýzy a lepšího limitu detekce za působení vyššího tlaku.

---

<sup>7</sup> Kapitola 2.2.5. byla vypracována ze zdrojů [1], [9], [50].

	Účinnost separace	Rychlost analýzy	Zlepšení limitu detekce	Operační tlak
1.7 vs. 5 $\mu\text{m}$ sorbent	<b>1x</b>	<b>9x</b>	<b>3x</b>	<b>9x</b>
1.7 vs. 3 $\mu\text{m}$ sorbent	<b>1x</b>	<b>3.1x</b>	<b>1.75x</b>	<b>3x</b>

Tab. 1: Porovnání částic užívaných v UPLC a v HPLC [50].

Při postupném vývoji UPLC metody, který vycházel i z HPLC metodiky, se plynule zkracovala délka kolony, snižovala se velikost částic, zvyšovala se rychlost průtoku mobilní fáze a postupně se přecházelo k vyšším tlakům v systému, což mělo pozitivní vliv na účinnost, rychlost a selektivitu analýzy. Výše uvedená fakta dokumentuje přiložená tabulka.

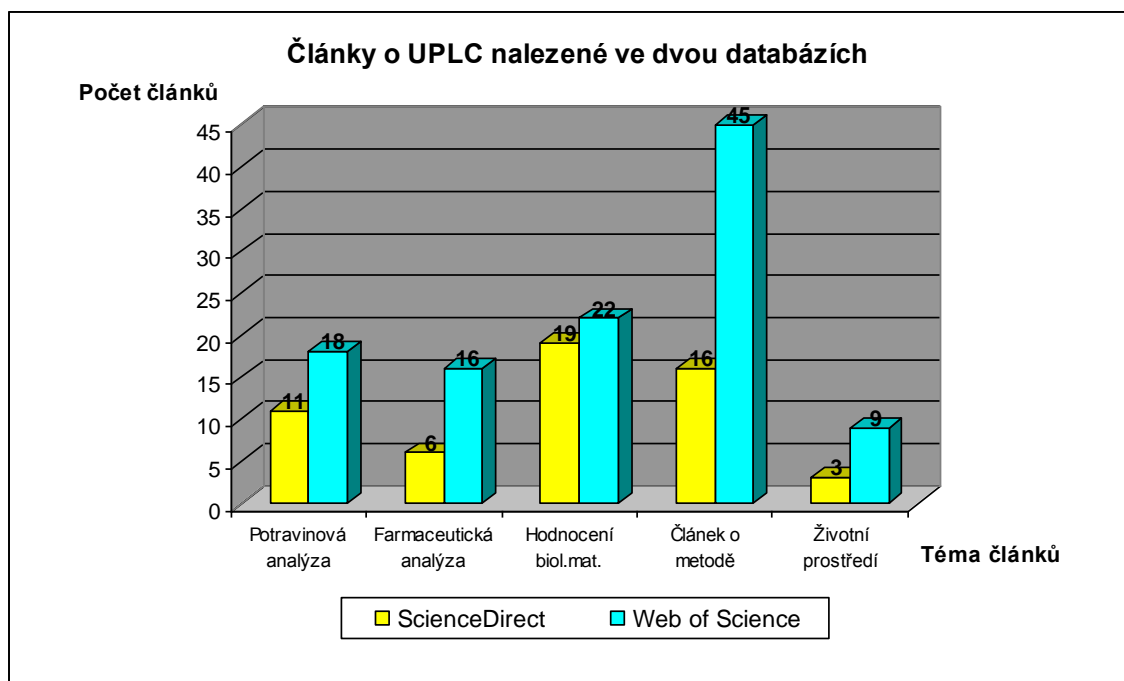
L (mm)	$d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	F (ml/min)	P (MPa)
300	10	0,5	1,8
150	5	1,0	7,4
90	3	1,7	20,5
<b>50</b>	<b>1,67</b>	<b>3</b>	<b>66,1</b>

Tab. 2: Dokumentace vývoje UPLC instrumentace [50].

## 2.3. Vyhledávání informací o UPLC, UPLC-MS v internetových databázích

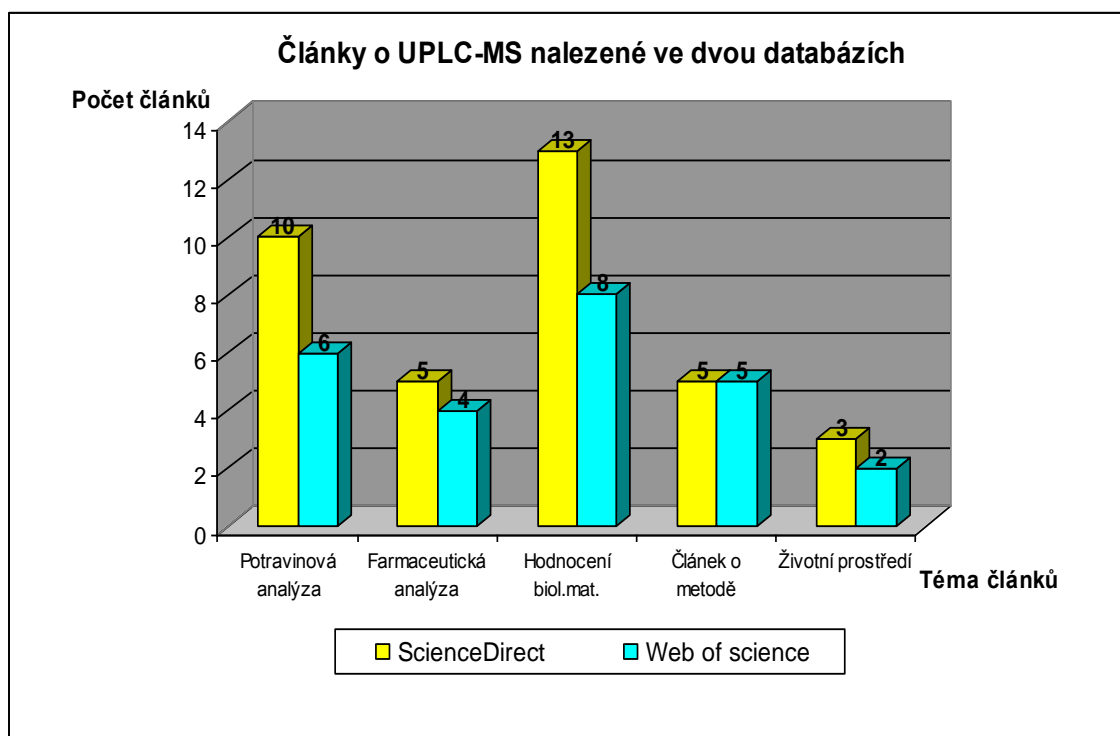
Pro vyhledávání odborných článků lze používat různé internetové vyhledávače či databáze. Vždy, když využíváme pro vyhledávání internet, musíme si uvědomit, že ne všechny údaje, které nám internet poskytuje jsou zcela věrohodné a objektivní. Z tohoto důvodu je nejvhodnější využívat databáze, které obsahují pouze informace založené na vědeckém podkladě. Jedná se o světově uznávané databáze různých vědeckých společností, odborných pracovišť, vysokých škol atd. Ve zde obsažených člancích je možno vyhledat nejvíce věrohodných informací týkajících se různých témat.

Pro vyhledání článků týkajících se UPLC, UPLC-MS byly použity dvě databáze, a to ScienceDirect a Web of Science. ScienceDirect poskytuje přístup k časopisům z nakladatelství Elsevier. Web of Science umožňuje pomocí vyspělých vyhledávacích metod rychlý a efektivní přístup k informacím z přibližně 8 500 uznávaných vědeckých časopisů. Databáze Web of Science obsahuje především tzv. abstrakty článků. Články o UPLC, UPLC-MS, které byly nalezeny na těchto databázích se týkají různých oblastí, ve kterých se tyto techniky uplatňují. V následujícím grafu je zobrazeno porovnání těchto dvou databází a počty článků o UPLC v nich nalezených. Jednotlivá témata článků jsou popsána v grafu:



Z výše uvedeného grafu vyplývá, že tyto dvě databáze obsahují různé počty článků týkajících se daných témat. I celkové počty se liší. Můžeme také pozorovat, že většina článků v databázi ScienceDirect pojednává o využití metody v oblasti analýzy biologického materiálu. Nejvíce článků vyhledaných v databázi Web of Science se věnuje technickým parametrům metody a metodě jako takové. Větší množství článků ve formě abstraktů o UPLC metodě bylo vyhledáno na databázi Web of Science.

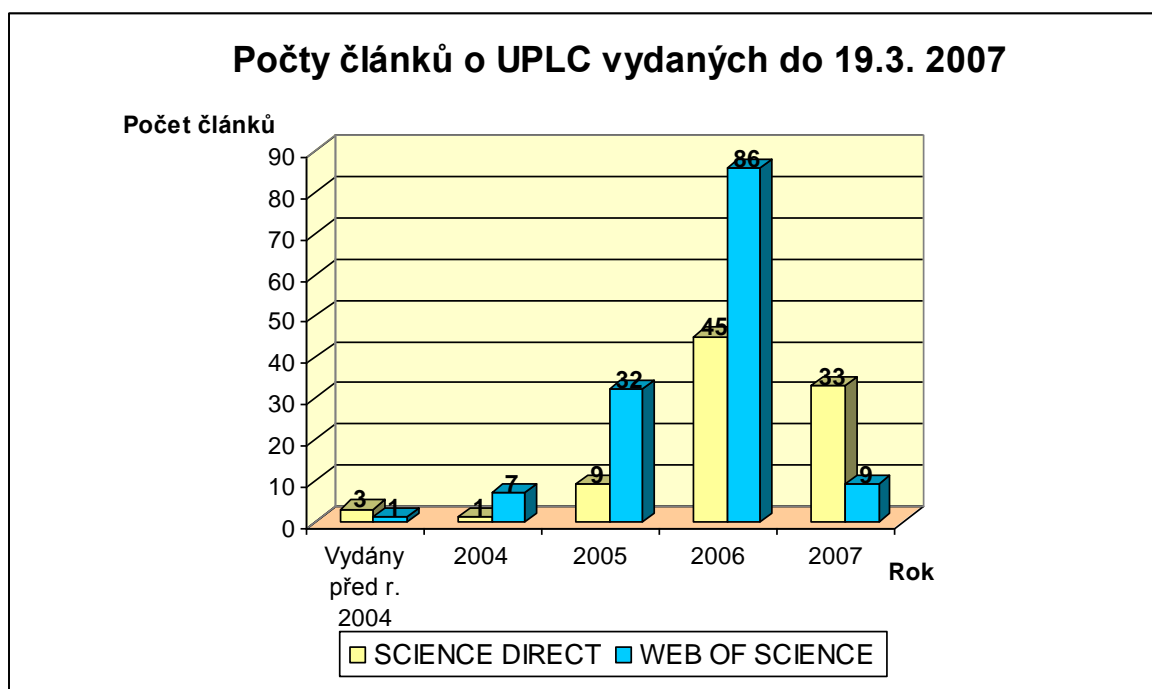
Následující grafické znázornění se týká spojení UPLC-MS. Opět byly použity stejné databáze, tedy ScienceDirect a Web of Science. Počty článků o UPLC-MS jsou v porovnání se články týkajících se UPLC rozdílné. Témata článků jsou však shodná.



Z předchozího grafu je patrné, že nejvíce článků v databázi ScienceDirect se věnuje hodnocení biologického materiálu. Několik článků se týkalo také monitorování životního prostředí. Poměrně velké množství článků řešilo problematiku UPLC-MS v rámci technických parametrů a různých modifikací této metody. Větší počet článků

byl poskytnut databázi ScienceDirect. Je také nutno uvést, že tyto data platí pro články vydané do 19.3. 2007.

Dalším velmi důležitým aspektem je aktuálnost vyhledaných článků. V dnešní době je nezbytné čerpat informace, které jsou co nejaktuálnější vzhledem k velice rychlému technickému pokroku. V příloženém grafu jsou vyznačeny jednotlivé roky a jim odpovídající počty článků pojednávajících o UPLC, jejím využití, technických parametrech atd., které byly vyhledány na databázích ScienceDirect a Web of Science k 19.3. 2007.



Protože UPLC je metoda relativně nová, naprostá většina článků je vydána od roku 2004. V jednotlivých letech můžeme pozorovat nárůst počtu článků v souvislosti s tím, jak se metoda vyvíjela a uplatňovala v praxi. V roce 2006 databáze Web of Science poskytla téměř 90 článků, kdežto ScienceDirect pouze polovinu. K 19.3. 2007 poskytl Web of Science pouze 9 článků a oproti tomu ScienceDirect již 33 článků.

## **2.4. Farmaceutická analýza a analýza biologicky aktivních látek v biologickém materiálu pomocí UPLC-MS**

### **2.4.1. Informace k tabulkovému přehledu**

V tabulkovém přehledu, který je obsahem následující kapitoly, jsou uvedeny základní informace týkající se analýzy biologicky aktivních látek v rámci UPLC techniky. Přehled je rozdělen na část analýzy látek v biologickém materiálu a na část farmaceutické analýzy. Přehled byl vypracován z dostupných odborných článků, které byly vyhledány na databázích ScienceDirect a Web of Science. Poměrně velké množství článků bylo obsaženo v obou databázích současně, a proto se počet článků uvedených v následujícím tabulkovém přehledu snížil.

V rámci každého článku použitého v tabulkovém přehledu jsem se zaměřil na následující informace:

jaké látky byly stanovovány

v jakém materiálu

jaký byl typ použité stacionární fáze

jaká byla použita mobilní fáze

jaký byl typ detekce stanovovaných látek

Ve farmaceutické analýze byly stanovovány látky nejčastěji v tabletách, gelu či byly analyzovány vzorky připravené *in vitro*. Při analýze látek v biologickém materiálu se nejvíce pracovalo s močí, sérem nebo s plazmou. Prakticky ve všech případech byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18, 1,7 $\mu$ m. Převládajícím typem detekce byla hmotnostní spektrometrie. U všech informací z jednotlivých článků jsou uvedeny citace.

## 2.4.2. Analýza biologicky aktivních látek v biologickém materiálu

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
sulfonamidy chinolony nitroimidazoly peniciliny	moč	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/kys. mravenčí/ /acetonitril	TOF	[15]
amlodipin	lidská plazma	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/acetonitril (grd.)	MS-MS	[16]
kladribin klofarabin	myší plazma	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/octan amonný/ /kys. mravenčí acetonitril/octan amonný/ /kys. mravenčí	API-MS-MS	[17]
vitexin-2''-O-rhamnosid	krysí plazma	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril/voda/ /kys. mravenčí	ESI-MS-MS	[18]
ethinyl estradiol 19-norethindron	lidská plazma	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/ /acetonitril  acetonitril/voda	MS-MS	[19]
epirubicin	lidská plazma	Acquity UPLC BEH C18 50 x 1mm, 1,7µm	voda/kys. mravenčí/ /acetonitril	MS-MS	[20]

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
benzyl alkohol ethanolamin valin izoleucin atd.	moč	Acquity UPLC BEH shield RP18, 150 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril/octan amonný/ /kys. octová	MS	[21]
arekolin-1-oxid	moč	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/ /acetonitril	TOF-MS	[22]
naftalen-1,2-aren oxid naftalen-1,2-dihydrodiol atd.	plazma	Acquity UPLC BEH C18 100 x 1mm, 1,7µm	acetonitril/voda/ /kys. mravenčí	MS-MS	[23]
linkomycin	<i>Streptomyces spp.</i>	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	mravenčan amonný/ /acetonitril	UV	[24]
histamin a metabolity	myší srst	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	mravenčan amonný/ /acetonitril	ESI-TOF-MS	[25]



LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
acetaminofen	moč	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/ /acetonitril grd.	TOF-MS	[26]
diastereomery SCH 503034	plazma z opice	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	methanol/voda  methanol/voda/ /octan amonný	MS-MS	[27]
17 glukokortikosteroidy tetrahydrogestrinon formoterol atd.	moč	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/ /acetonitril/voda kys. octová/acetonitril/ /voda	TOF-MS	[28]
histamin 1-methylhistamin imidazol-4-octová kys. 1-methyl-4-imidazol-oct. k.	myší srst	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	kys. mravenčí/ /acetonitril kys.octová/acetonitril mravenčan amonný/acetonit.	TOF-MS	[29]
kofein S-mephenytoin chlorzoxazon tolbutamid	moč plazma atd.	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7µm	octan amonný/ /methanol/acetonitril	TOP COUNT	[30]
metabolity verapamilu	vzorky in vitro	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	voda/acetonitril/ /kys. mravenčí	MS-MS	[31]
testosteron a jeho metabolity	vzorky in vitro	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril	MS-MS	[32]

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
-------	---------------	------------------	--------------	-------------	--------

isosorbid-5-mononitrát	lidská plazma	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm 1,7µm	acetonitril/voda	ESI-MS	[33]
skupina lipidů	komplexní biologická matrice	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	neuveďeno*	TOF-MS	[34]
lercanidipin	lidská plazma	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7µm	acetonitril/voda/ /kys. mravenčí	ESI-MS-MS	[35]
glykogendeoxycholová kys. taurodeoxycholová kys. lysofosfatidylcholin fenilalanin, tryptofan, atd.	sérum	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	neuveďeno*	TOF-MS	[36]
doxazosin	lidská plazma	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	neuveďeno*	MS-MS	[37]
5-ti složková směs drog	krysí plazma	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	neuveďeno*	MS-MS	[38]
endogenní a exogenní metabolity	lidské sérum	neuveďeno*	neuveďeno*	MS	[39]

\* čerpáno z abstraktu

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
-------	---------------	------------------	--------------	-------------	--------

β-blokátory	tablety	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7μm	trifluoroctová kys./ /voda trifluoroctová kys./ /acetonitril	MS	[40]
O-diglykosyl flavony	Fructus aurantii	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7μm	voda/kys. mravenčí acetonitril/kys. mravenčí	ESI-CID-MS	[41]
quetiapin perospiron aripirazol quetiapin sulfoxid	vzorky připravené <i>in vitro</i>	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7μm	acetonitril/octan amonný	ESI-MS-MS	[42]
akrylamid	vzorky <i>in vitro</i>	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7μm	methanol/kys. mravenčí ve vodě	MS-MS	[43]
N-acylhomoserinové laktony	gram-negativní bakterie	Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1mm, 1,7μm	voda/acetonitril (grd.)	DAD	[44]
hydrokortison acetát propylparaben indometacin 4-chlorbenzoová kys. methylparaben, atd.	krém gel	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1,7μm	acetonitril/voda methanol/acetonitril/ /voda	PDA	[9]

### 2.4.3. Farmaceutická analýza

LÁTKA	TYP MATERIÁLU	STACIONÁRNÍ FÁZE	MOBILNÍ FÁZE	TYP DETEKCE	CITACE
sulfanilamid sulfadimethoxin atd.	vodné roztoky pevné vzorky	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	voda/kys. mravenčí/ /methanol	ESI-MS-MS	[45]
kofein karbamazepin griseofulvin acykloguanisin atenolol	vzorky <i>in vitro</i>	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	kys. mravenčí/voda kys. mravenčí/acetonitril	MS-MS	[46]
diklofenak methylparaben propylparaben	gel	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	neuvedeno*	neuvedeno	[47]
desloratadin 3-hydroxydesloratadin atd.	vzorky <i>in vitro</i>	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	mravenčan amonný/kys. mravenčí mravenčan amonný/ /methanol/kys. mravenčí	MS-MS	[48]
2"-O-β-pyranosylorientiny orientin vitexin	<i>Trollius ledibourii</i>	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm*	kys. octová/ /acetonitril	ESI-MS-MS	[49]

\* čerpáno z abstraktu

## 2.5. Analýza vybraných biologicky aktivních látek a porovnání HPLC s UPLC

### 2.5.1. Analýza acetaminofenu pomocí UPLC-TOF-MS<sup>8</sup>

Acetaminofen je mírné analgetikum a antipyretikum používané k léčbě horečnatých stavů, bolestí hlavy atd. Lidské tělo eliminuje acetaminofen dvojitým hlavním způsobem: sulfatací a glukuronidací v játrech. Malé množství látky je eliminováno oxidací na molekulu *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneiminu. Tento metabolit je toxický, ale jeho efekt je běžně zmírňován reakcí s glutathionem za vzniku merkapturové kyseliny. Léčivo je bezpečné při dávkách v rozmezí od 500 do 1000 mg. Při předávkování je systém sulfatace a glukuronidace plně saturován a nastává intenzivní oxidativní tvorba již zmíněného toxického metabolitu, který může výrazně poškodit funkci jater.

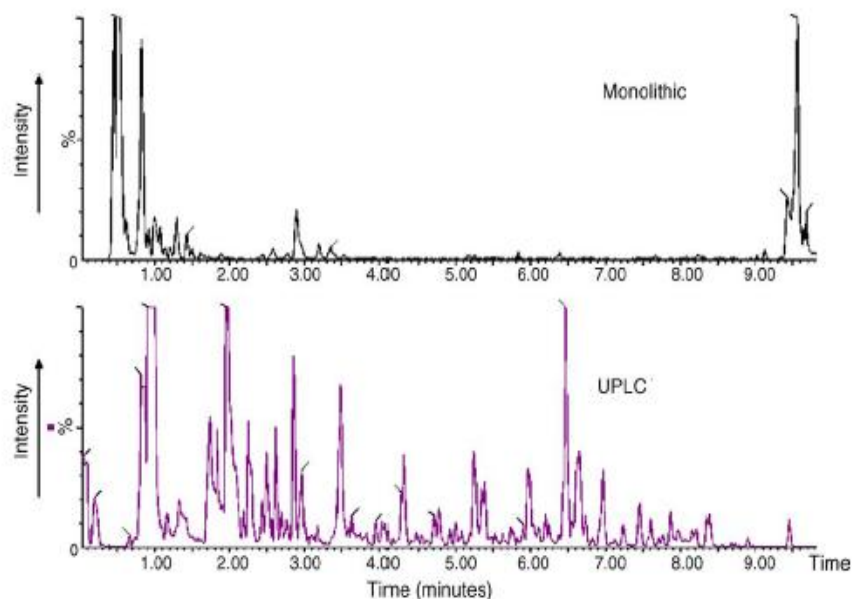
Chromatografická separace acetaminofenu byla provedena pomocí 5 cm x 2,1 mm ACQUITY UPLC 1,7 μm kolony. Kolona byla stabilně temperována na teplotu 40 °C. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril a 0,1 % kyselina mravenčí při lineárním gradientu. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla 500 μl/min. Stanovení acetaminofenu probíhalo v moči, která byla ředěna v poměru 1:5 s destilovanou vodou a vzorek byl injikován na kolonu v objemu 10 μl. Celý tento chromatografický systém byl porovnáván s konvenční HPLC metodou užívající monolitické kolony 5 cm x 4,6 mm ChromSpeed. Cílem práce bylo stanovení acetaminofenu a porovnání účinnosti UPLC a HPLC kolon.

Ukázalo se, že UPLC je vhodnější technika pro separaci látek v komplexní biologické matici než HPLC. Metodika UPLC-MS byla průměrně třikrát citlivější než monolitická kolona užitá u HPLC a identifikovala více metabolitů.

V následujících chromatogramech je uvedeno názorné porovnání citlivosti, rychlosti a zároveň i vhodné použitelnosti dvou testovaných systémů pro analýzu biologicky aktivních látek v lidské moči.

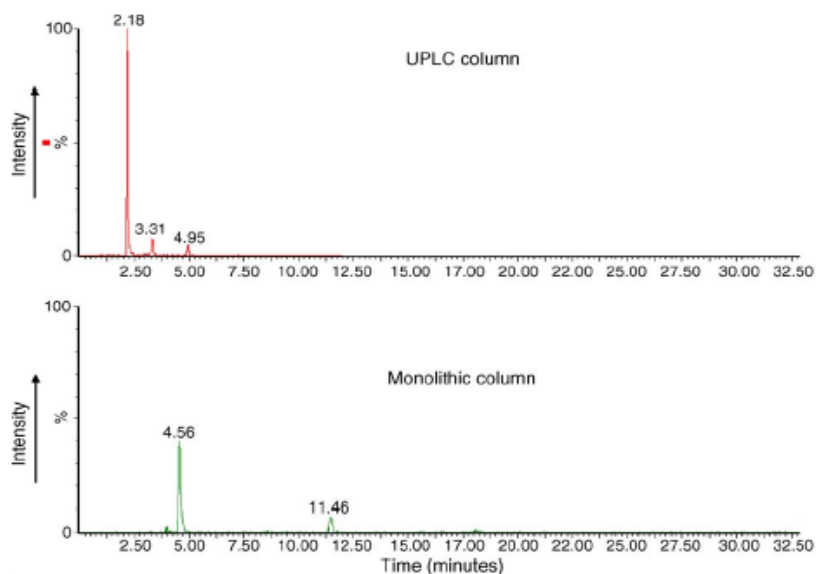
---

<sup>8</sup> Kapitola 2.5.1. byla vypracována ze zdroje [26].



Obr. 3: Chromatogramy porovnávající citlivost analýzy. Nahoře: chromatogram HPLC analýzy s monolitickou kolonou. Dole: chromatogram UPLC vynikající vyšší citlivostí díky využití vyšších tlaků a menších částic v koloně. Jde o TIC záznam [26].

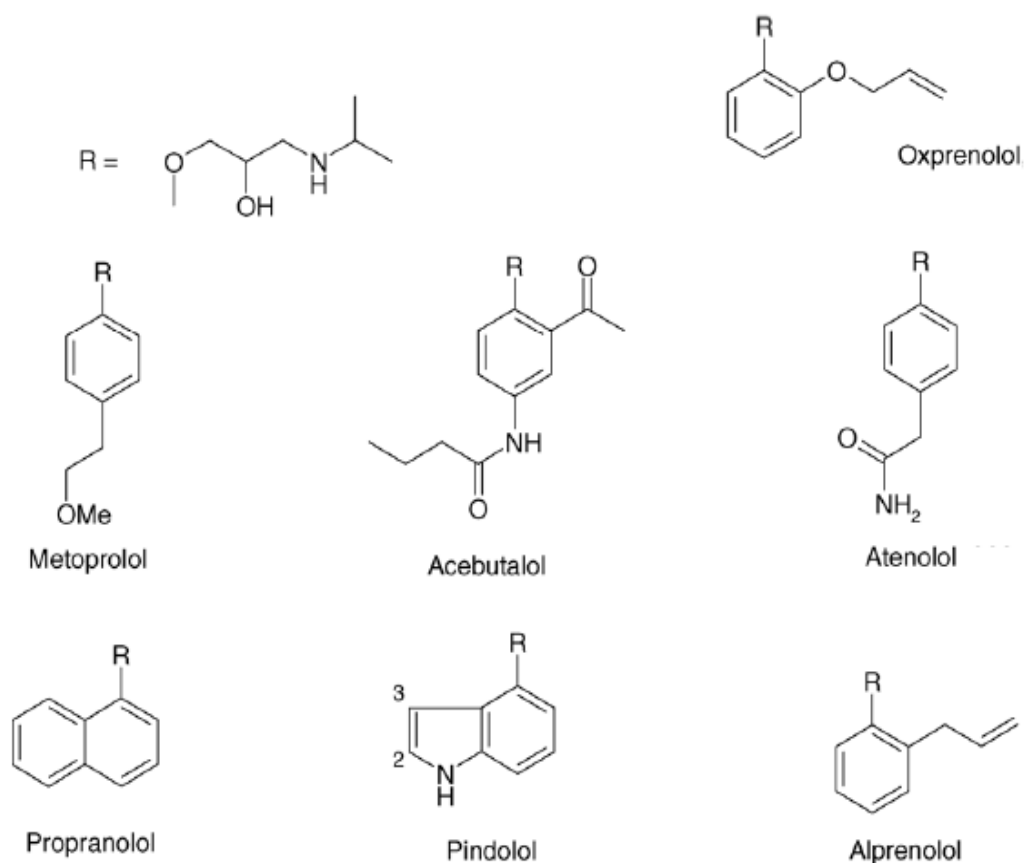
Obr. 4: Chromatogramy dokazující vyšší citlivost a rychlost UPLC analýzy acetaminofenu, jemuž odpovídají první píky v jednotlivých chromatogramech. Čas analýzy znázorňuje osa x [26].



## 2.5.2. Identifikace $\beta$ -blokátorů pomocí UPLC-MS<sup>9</sup>

$\beta$ -blokátoři oxprenolol, metoprolol, acebutolol, atenolol, propranolol, pindolol a alprenolol byly analyzovány systémem UPLC-MS a také systémem HPLC-MS za použití mobilní fáze obsahující acetonitril, vodu a trifluoroctovou kyselinu (TFA). UPLC technika se opět ukázala jako výhodnější, citlivější, rychlejší a tedy i lépe využitelná pro analýzu těchto látek.

Obr. 5: Strukturální vzorce analyzovaných  $\beta$ -blokátorů [40].

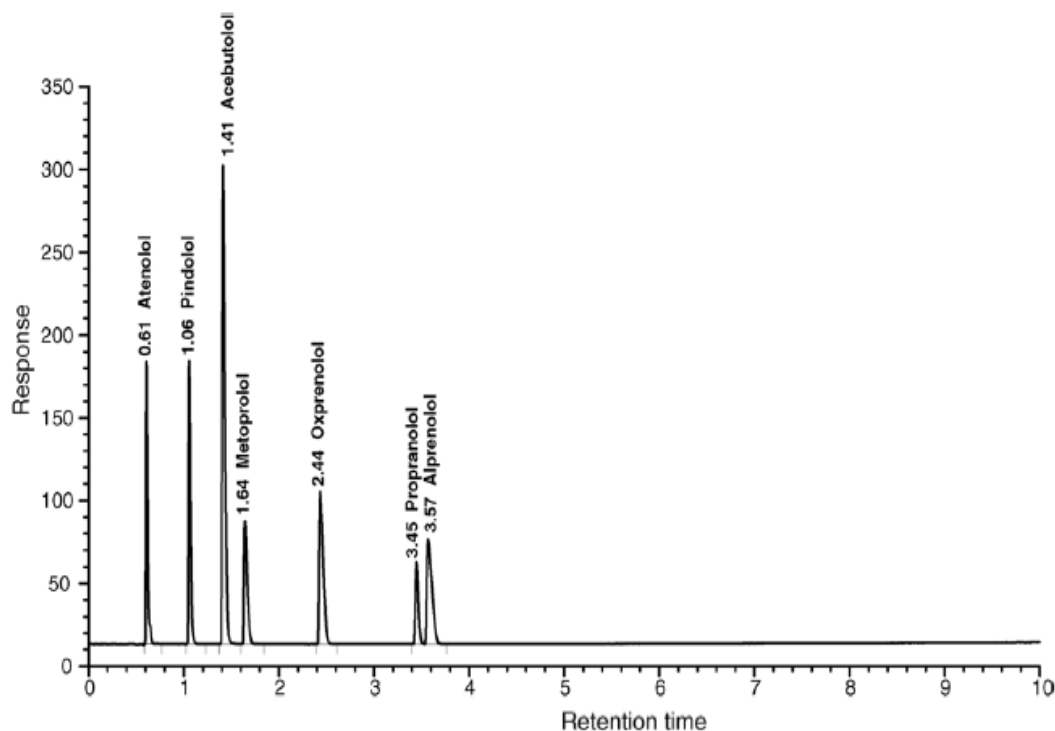


Všechny zásobní roztoky každého  $\beta$ -blokátoru byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml za použití 40% acetonitrilu/60% vody. Tyto zásobní roztoky byly použity k přípravě roztoku vzorků obsahujícího všechny uvedené  $\beta$ -blokátoři. UPLC analýza

<sup>9</sup> Kapitola 2.5.2. byla vypracována ze zdroje [40].

byla provedena pomocí 1,7  $\mu\text{m}$  ACQUITY C<sub>18</sub> BEH kolony. Používaná voda byla deionizována. Mobilní fáze A byla tvořena 0,1% TFA ve vodě a mobilní fáze B obsahovala 0,1% TFA v acetonitrilu. Rychlost toku mobilní fáze byla 0,5 ml/min. Kolona byla temperována na 35 °C. Injekovaný objem roztoku vzorku činil 5  $\mu\text{l}$ . HPLC technika pracovala se 150 mm kolonou s vnitřním průměrem 3,0 mm naplněnou 3,5  $\mu\text{m}$  X-Terra MS C<sub>18</sub> částicemi. Složení mobilní fáze a operační podmínky byly naprosto shodné s UPLC analýzou. Detekce probíhala pomocí hmotnostního spektrometru Micromass ZQ s kvadrupólovým mechanismem. Cílem práce byla analýza  $\beta$ -blokátorů a porovnání UPLC vs. HPLC metodiky.

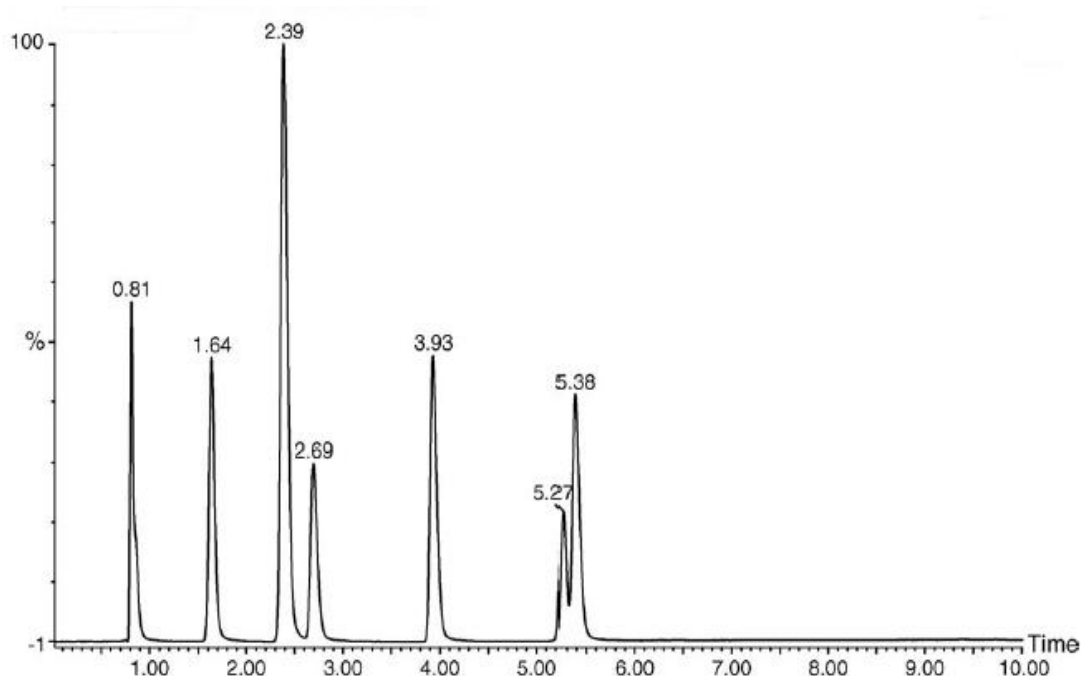
Z níže přiložených chromatogramů lze usuzovat, že UPLC poskytuje podobnou separační selektivitu jako HPLC, ale s poněkud ostřejšími píky a s lepším rozlišením propranololu a alprenololu.



Obr. 6: UPLC chromatogram s ostřejšími píky a lepším rozlišením propranololu a alprenololu [40].



Obr. 7: HPLC chromatogram s nedokonalým rozlišením propranololu a alprenololu [40].



### 2.5.3. Stanovení amlodipinu v lidské plazmě pomocí UPLC-ESI-MS-MS<sup>10</sup>

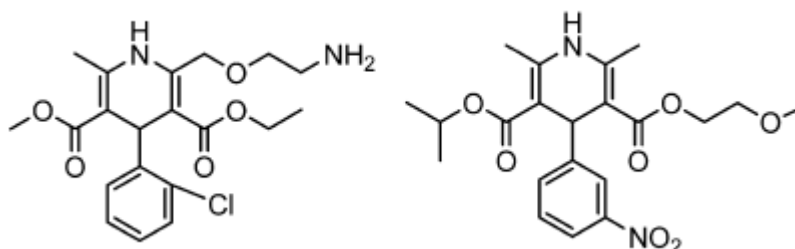
Amlodipin je blokátor kalciových kanálů, který se používá jako antihypertenzivum. Má dlouhý biologický poločas a velký objem distribuce. Bylo zjištěno, že nízké plazmatické koncentrace amlodipinu je dosaženo po orálním podání. Vzhledem k nízkým plazmatickým koncentracím je třeba pro jeho stanovení použít citlivou a specifickou analytickou metodu. Několik analytických metod pro stanovení amlodipinu v biologických vzorcích bylo v minulosti již použito. Například citlivost dříve užívané HPLC-UV metody je neadekvátní pro farmakokinetické studie a terapeutické monitorování hladin amlodipinu a jiných biologicky aktivních látek kvůli jejich nízké absorpenci. Jako vhodná metoda pro analýzu takovýchto látek byla použita UPLC-ESI-MS-MS.

<sup>10</sup> Kapitola 2.5.3. byla vypracována ze zdroje [16].

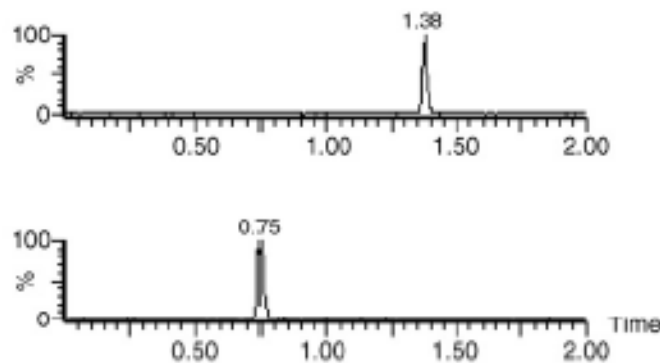
Příprava vzorku lidské plazmy probíhala tak, že k 0,5 ml plazmy v 10 ml zkumavce bylo přidáno 50  $\mu$ l nimodipinu jako vnitřního standardu a 200  $\mu$ l 1 mol/l roztoku hydroxidu sodného. Vzorky byly promíchávány po dobu 60 sekund a poté byly přidány 3 ml diethyl etheru. Následovně byla směs míchána po dalších 60 sekund. Poté byl vzorek protřepáván na mechanickém protřepávači 10 minut. Po desetiminutové centrifugami při 3500g byla horní organická vrstva přepipetována do nové sady zkumavek a následně odpařena do sucha při 40 °C pod mírným proudem dusíku. Usazenina byla rozpuštěna ve 100  $\mu$ l acetonitrilu a poté byl roztok přepipetován do 700  $\mu$ l skleněných vialek. Do systému bylo injikováno 5  $\mu$ l roztoku vzorku.

Chromatografická analýza byla provedena na koloně ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>, 1,7  $\mu$ m o rozměrech 50 mm x 2,1 mm gradientovou elucí. Rychlost průtoku mobilní fáze činila 0,35 ml/min. Kolona byla temperována na teplotu 45 °C. Mobilní fázi tvořila voda a acetonitril a v obou složkách bylo obsaženo 0,3% kyseliny mravenčí. Nimodipin byl zde uplatněn jako vnitřní standard. Detekce byla provedena na tandemovém kvadrupólovém hmotnostním spektrometru.

UPLC technika v porovnání s dříve užívanými metodami poskytuje nespornou výhodu v podobě ostřejších píků, vyšší citlivosti, krátkého času analýzy a nižších limitů detekce (LLOQ) obzvláště při jejím spojení s ESI-MS-MS. V tomto případě byla metoda úspěšně aplikována v oblasti farmakokinetické studie amlodipinu obsaženého v tabletách, podaných několika zdravým dobrovolníkům.



Obr. 8: Struktura amlodipinu (vlevo), struktura nimodipinu (vpravo) [16].



Obr. 9: UPLC chromatografický záznam vnitřního standardu nimodipinu s retenčním časem 1,38 min. (nahore) a UPLC chromatografický záznam amlodipinu s retenčním časem 0,75 min. [16].

#### 2.5.4. Stanovení epirubicinu v lidské plazmě pomocí UPLC-MS-MS<sup>11</sup>

Antracykliny, zajímavá skupina antibiotik, byly používány jako chemoterapeutika po více než 30 let a byly považovány za jedny z neúčinnějších antineoplastik. Toxické účinky antracyklinů způsobují myelosupresi, záněty dásní, nebo nauseu. Mnohé antracykliny jsou také kardiotoxické. Vzhledem k velmi snadnému dosažení toxických hladin antracyklinů je nezbytné používat rychlé a citlivé metody pro monitorování aktuálních koncentrací těchto látek v biologických vzorcích.

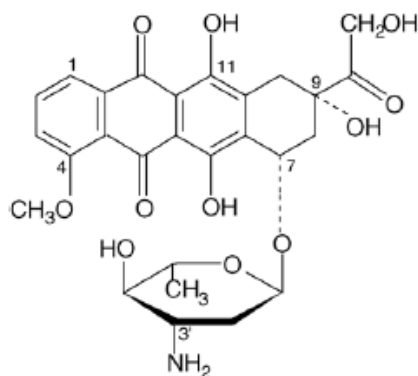
Mezi mnoha sty antracyklinů má epirubicin velký význam. Je to jeden z nejpoužívanějších antracyklinů v klinické praxi díky jeho dobré terapeutické účinnosti a nízké kardiotoxicitě. Jedna ze zajímavých cest jeho metabolické přeměny v lidském těle je redukce jeho karbonylového postranního řetězce za vzniku sekundárního alkoholu epirubicinolu.

Do nedávné doby bylo vyvinuto několik analytických metod pro stanovení epirubicinu a jeho metabolitů. Je to například kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí nebo HPLC s elektrochemickou či

<sup>11</sup> Kapitola 2.5.4. byla vypracována ze zdroje [20].

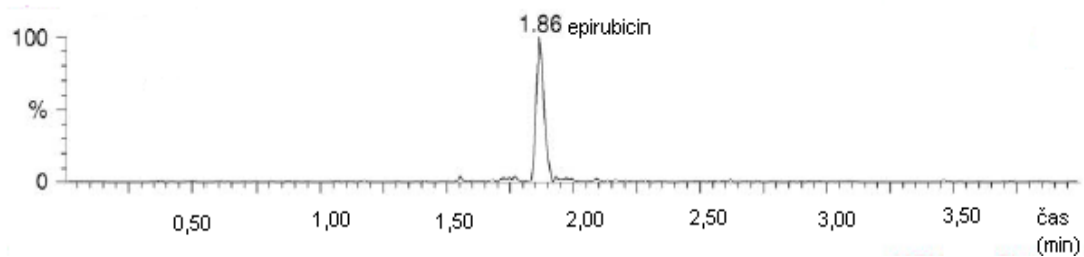
fluorometrickou detekcí. Tyto metody, které nepoužívají k detekci hmotnostní spektrometrie nemohou mít za žádných podmínek požadovanou selektivitu a citlivost jako UPLC-MS-MS. Metoda založená na kombinaci kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je lépe využitelná pro stanovení látek o velmi nízké koncentraci jako je tomu i v případě již zmíněných antracyklinů v lidské plazmě.

Vzorky plazmy byly zpracovávány pomocí Solid-phase extrakce. Kolonka Oasis HLB, která byla plněna vzorky plazmy, byla promyta 1 ml methanolu a 1 ml deionizované vody. Následně byla kolonka promyta znovu 1 ml 5% methanolu a 1 ml 40% methanolu obsahujícího 2% hydroxidu amonného. Analyty byly vymyty z kolonky pomocí 0,5 ml 0,5% kyseliny mravenčí v methanolu. Eluáty byly vysušeny při teplotě 30 °C pod mírným proudem dusíku. Usazenina byla rozpuštěna ve 200 µl 15% acetonitrilu ve vodě a protřepávána po dobu 20 minut. Do systému UPLC-MS-MS bylo injikováno 10 µl roztoku vzorku.



Obr. 10: Struktura epirubicinu [20].

Chromatografická analýza probíhala na ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> koloně (1,7 µm, 50 mm x 1 mm) za využití gradientové eluce. Mobilní fáze byla tvořena 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě a acetonitrem. Analyty byly detekovány za použití elektrosprej ionizující hmotnostní spektrometrie. Tato metoda kombinovala výhody UPLC a MS-MS v rámci skvělé spolehlivosti, citlivosti a přesnosti.



Obr. 11: UPLC chromatografický záznam epirubicinu [20].

Jednoduchá, velmi rychlá a přesná metoda se ukázala vhodnou alternativou pro analýzu vzorků plazmy o malém objemu a nízké koncentraci stanovovaného analytu. Limity detekce a kvantifikace pro epirubicin byly 0,10 a 0,50 ng/ml. Citlivost této metody může být ještě zvýšena injikováním většího objemu vzorku. Navíc interval injikování vzorků do systému může být výrazně omezen díky krátké době, která je pro analýzu nutná.

Metoda byla úspěšně využita k analyzování vzorků plazmy, která pocházela od pacientů léčených epirubicinem při chemoterapii. UPLC-MS-MS se stala velmi užitečnou metodou pro terapeutické monitorování drog a pro klinické a farmakokinetické studie epirubicinu.

### 2.5.5. Analýza atypických psychofarmak za využití UPLC-ESI-MS-MS ve vzorcích *in vitro*<sup>12</sup>

UPLC-ESI-MS-MS metoda byla použita pro určení některých psychofarmak jako jsou například quetiapin, perospiron, aripiprazol a quetiapin sulfoxid ve vzorcích *in vitro*.

Quetiapin, perospiron a aripiprazol jsou nová atypická psychofarmaka, která jsou využívána pro léčbu schizofrenie a jiných psychických poruch. Proto, aby byla tato léčiva účinná, musejí nejdříve projít hematoencefalickou bariérou, aby se dostala

<sup>12</sup> Kapitola 2.5.5. byla vypracována ze zdroje [42].

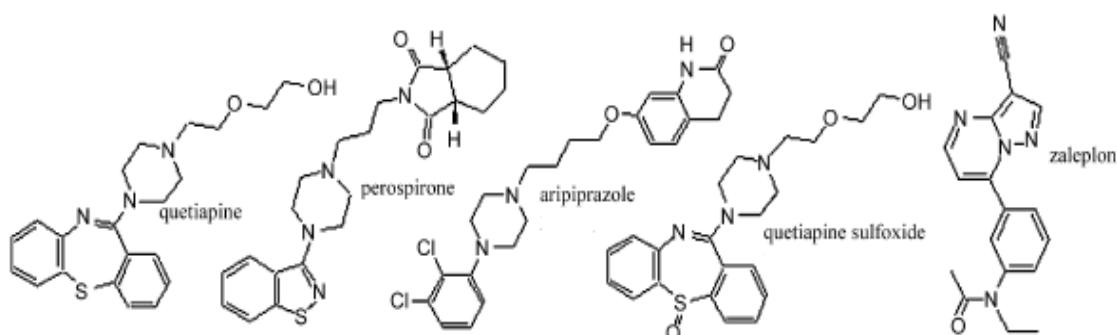
na místo svého účinku v centrálním nervovém systému (CNS). Hematoencefalická bariéra byla vždy považována za překážku, která brání v transportu těchto látek do CNS. Nedávno některé studie prokázaly, že v luminální membráně endoteliálních buněk, které se nacházejí v mozkových kapilárách, existují transportní molekuly, které omezují přístup těchto látek do CNS. Jeden ze zajímavých transportérů, který byl prokázán, je tzv. P-glykoprotein. Není ale zcela jasné, zda P-glykoprotein opravdu ovlivňuje přestup quetiapinu, perospironu a aripiprazolu přes hematoencefalickou bariéru a zda quetiapin interaguje s jeho metabolitem quetiapin sulfoxidem na molekule P-glykoproteinu. K vyřešení těchto otázek byla použita metoda pro určení těchto látek ve vzorcích *in vitro*. Bylo zjištěno, že úloha P-glykoproteinu při transportu těchto psychofarmak by mohla mít své opodstatnění.

V minulosti se pro určování těchto látek užívaly pouze metody na bázi HPLC. Byly to například metody HPLC-UV, HPLC-MS nebo HPLC-MS-MS. Tyto techniky však nebyly dostatečně citlivé. V porovnání s HPLC je UPLC nedávno vyvinutá technika, která poskytuje větší rozlišení, vyšší citlivost a umožňuje zredukovat časovou náročnost na prováděnou analýzu, a proto je pro provedení této analýzy nejvhodnější. Cílem práce byla snaha o zavedení této metody pro analýzu již zmíněných psychofarmak.

Chromatografická analýza probíhala na ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> koloně (1,7 µm, 100 mm x 2,1 mm) při teplotě 40 °C. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,3 ml/min. Mobilní fáze o celkové koncentraci 30 mmol/l obsahovala 62% acetonitrilu a 38% octanu amonného. Čas, po který probíhala analýza, činil 3 minuty. Objem injikovaného vzorku byl 4 µl. Detekce analytů byla provedena za použití Waters Micromass Quattro Premier XE tandemového kvadrupólového hmotnostního spektrometru. Přístroj pracoval za použití elektrosprejového zdroje v pozitivním módu. Parametry ionizačního zdroje byly následující: kapilární napětí 3,1 kV, teplota zdroje 120 °C a teplota desolvatačního plynu 400 °C.

Příprava vzorku probíhala tak, že 0,5 ml vzorku, který obsahoval quetiapin, perospiron, aripiprazol a quetiapin sulfoxid, byl napipetován do zkumavky č. 1. Poté bylo přidáno 25 µl vnitřního standardu zaleplonu. Vzorek byl sušen za přítomnosti

dusíku ve 40 °C vodní lázni. Po vysušení byl vzorek rozpuštěn v 1,5 ml 1-chlorbutantriethylaminu a promícháván po dobu 2 minut. Poté byl roztok přemístěn do zkumavky č. 2. Dalších 1,5 ml 1-chlorbutantriethylaminu bylo vloženo do první zkumavky, aby se extrakce mohla opakovat. Po extrakci byl roztok znovu přemístěn do druhé zkumavky a smíchán s roztokem, který sem byl předtím napipetován. Roztok z druhé zkumavky byl centrifugován při 3000g po dobu 5 minut a 2,5 ml vzniklého supernatantu bylo přepipetováno do zkumavky č. 3 a vysušeno za přítomnosti dusíku při teplotě 40 °C ve vodní lázni. Vzorek byl po vysušení rozpuštěn v 50 µl mobilní fáze.



Obr. 12: Struktura quetiapinu, perospironu, aripiprazolu, quetiapin sulfoxidu a zaleplonu [42].

## 2.5.6. Analýza Triamcinolového a Hydrokortisonového krému a Indomethacinového a Estrogelového gelu pomocí UPLC a HPLC<sup>13</sup>

Analýza čtyř výše uvedených farmaceutických přípravků byla prováděna za využití UPLC instrumentace. Výsledky této analýzy byly poté porovnány s výslednými hodnotami konvenční HPLC analýzy. Během analýzy se prokázala celá řada výhod, které UPLC poskytuje. Jedná se zejména o výrazné zkrácení doby analýzy, což také znamená i snížení spotřeby rozpouštědel. Provedené experimenty

<sup>13</sup> Kapitola 2.2.6. byla vypracována ze zdroje [9].

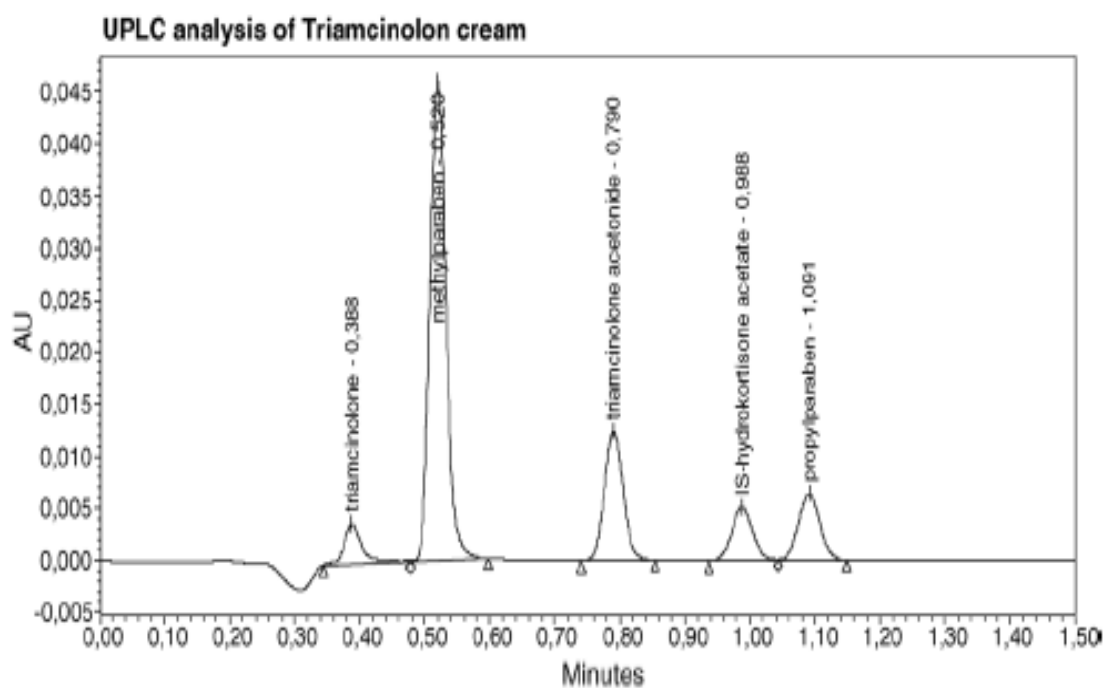
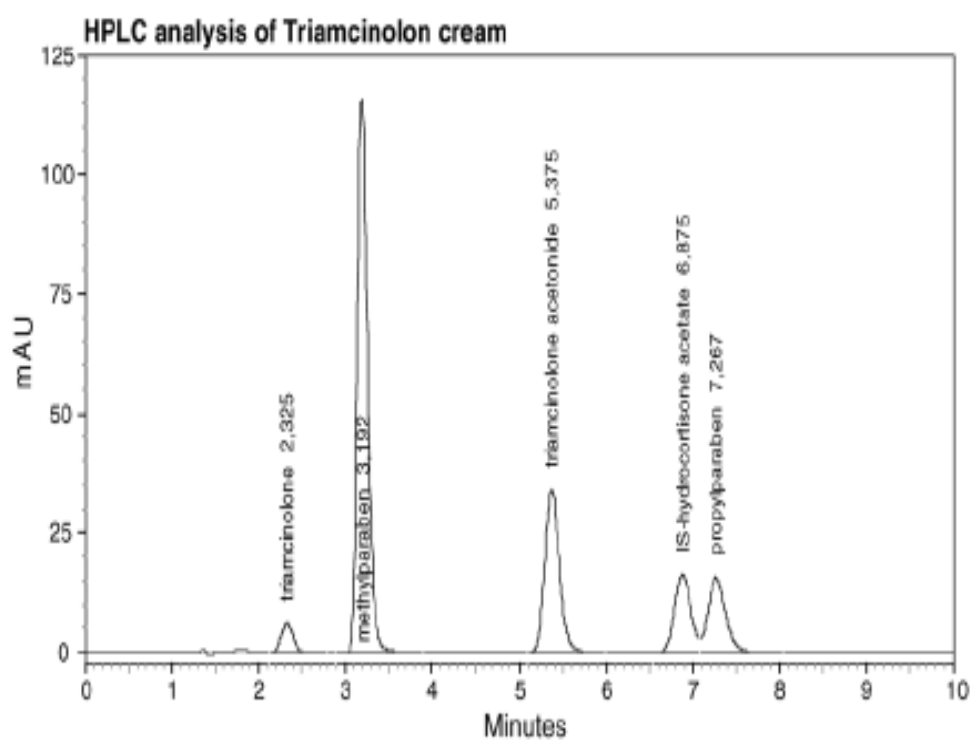
dokázaly, že se doba analýzy v porovnání s HPLC zkrátila 4,7 až 6,9 krát. Zároveň spotřeba rozpouštědel klesla 5,6 až 8,5 krát. Z tohoto pohledu se UPLC instrumentace ukázala jako vhodnější pro analytické stanovení těchto farmaceutických přípravků. Další prokazatelnou výhodou jsou i stejné chromatografické principy, které umožňují snadný přechod z HPLC na UPLC. Z jiného pohledu jedním z negativních aspektů UPLC instrumentace může být přítomnost vysokých pracovních tlaků, které se zde běžně používají. V konvenční HPLC se pracuje s tlaky 35 – 40 MPa, které nemají zdaleka tak negativní vliv na životnost kolony, jako tlaky dosahující hodnot až 100 MPa v UPLC.

Analyzované látky v Triamcinolovém krému byly triamcinolon acetonid, methylparaben, propylparaben a triamcinolon jako degradační produkt. V Hydrokortisonovém krému to byl hydrokortison acetát, methylparaben, propylparaben a hydrokortison jako degradační produkt. V Indomethacinovém gelu se jednalo o analýzu indomethacinu a jeho degradačních produktů 4-chlorbenzoové kyseliny a 5-methoxy-2-methylindolové kyseliny. V Estrogelovém přípravku byl analyzován estradiol, methylparaben, propylparaben a estron jako degradační produkt.

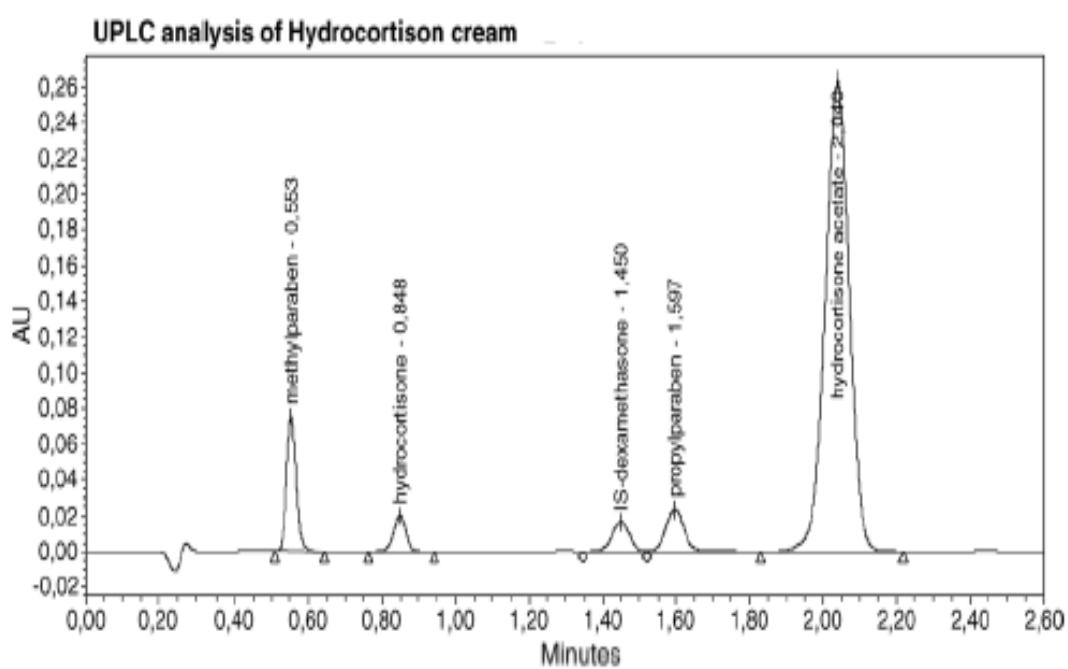
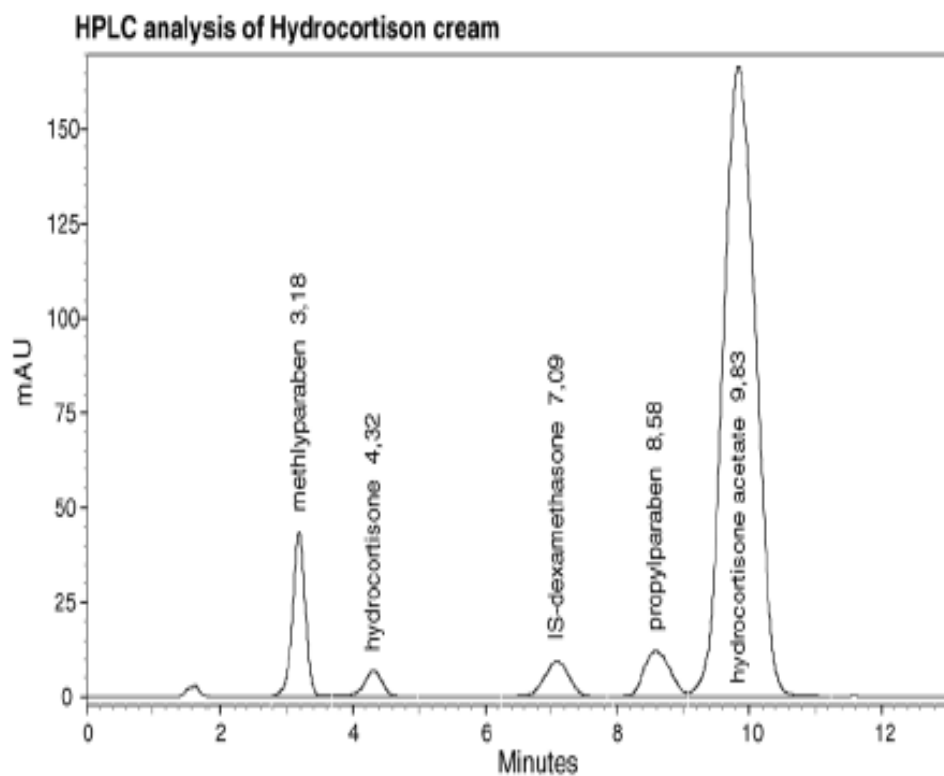
UPLC analýzy byly provedeny na Waters Acquity UPLC systému s PDA detektorem. Data byla vyhodnocována chromatografickým softwarem Empower. S tímto systémem byla spojena speciální kolona Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (50 x 2,1mm, 1,7 µm) naplněná X-Terra sorbetem druhé generace. Rychlosti průtoků mobilních fází při jednotlivých analýzách se pohybovaly v rozmezí od 0,50 do 0,60 ml/min. Analýzy probíhaly za laboratorní teploty 25 °C. Za využití „partial loop“ módu byly injikovány vždy 2 µl vzorku.

HPLC analýzy byly provedeny na přístroji Shimadzu LC-2010 s UV-VIS detektorem. Autosampler pracoval za teploty 25 °C. Použitý chromatografický software byl Class VP 6.13. Látky v Triamcinolovém a Hydrokortisonovém krému byly separovány na Supelco Discovery C<sub>18</sub> koloně (125 x 4,0mm, 5 µm). Pro analýzu Indomethacinového gelu byla použita kolona Zorbax-Phenyl SB (75 x 4,6mm, 3,5 µm). Separace látek obsažených v Estrogelovém přípravku byla provedena na koloně Supelco Discovery C<sub>18</sub> (250 x 3,0mm, 5 µm).

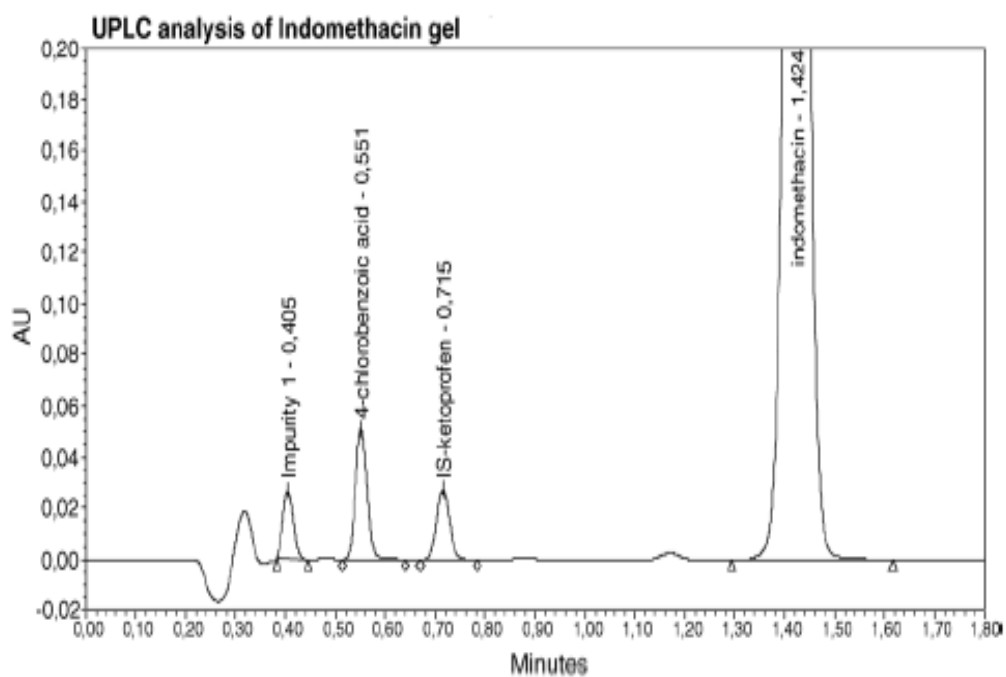
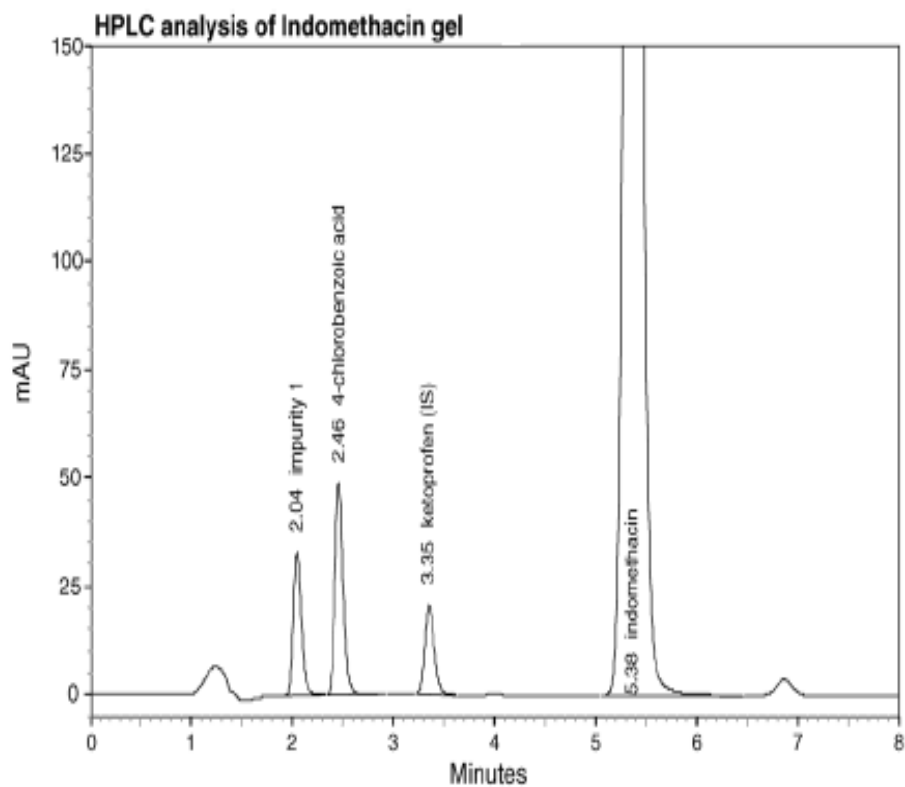




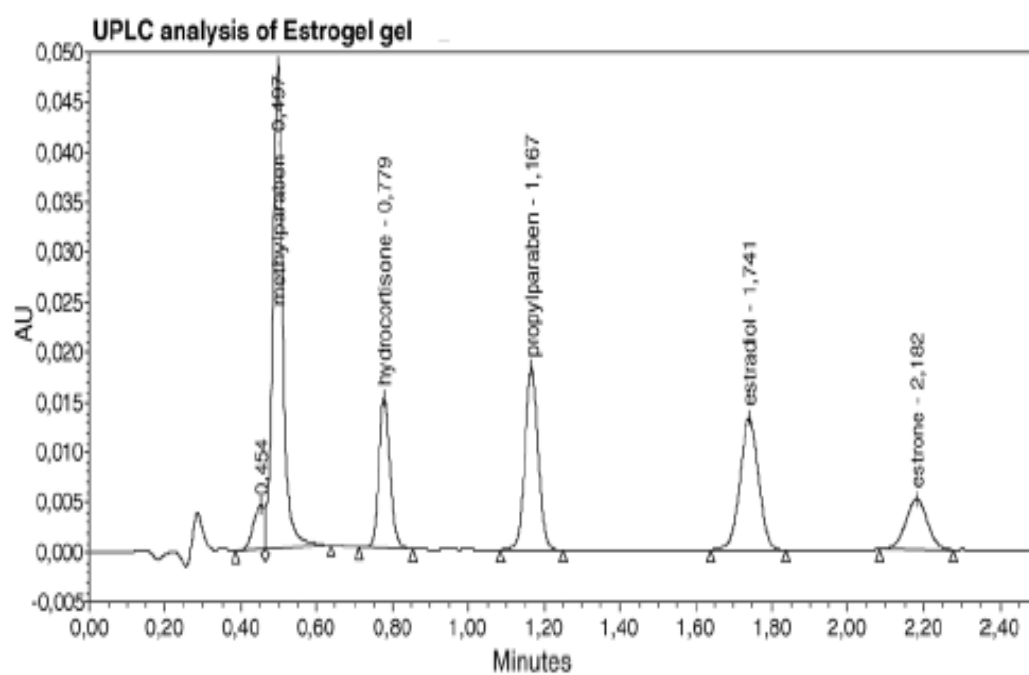
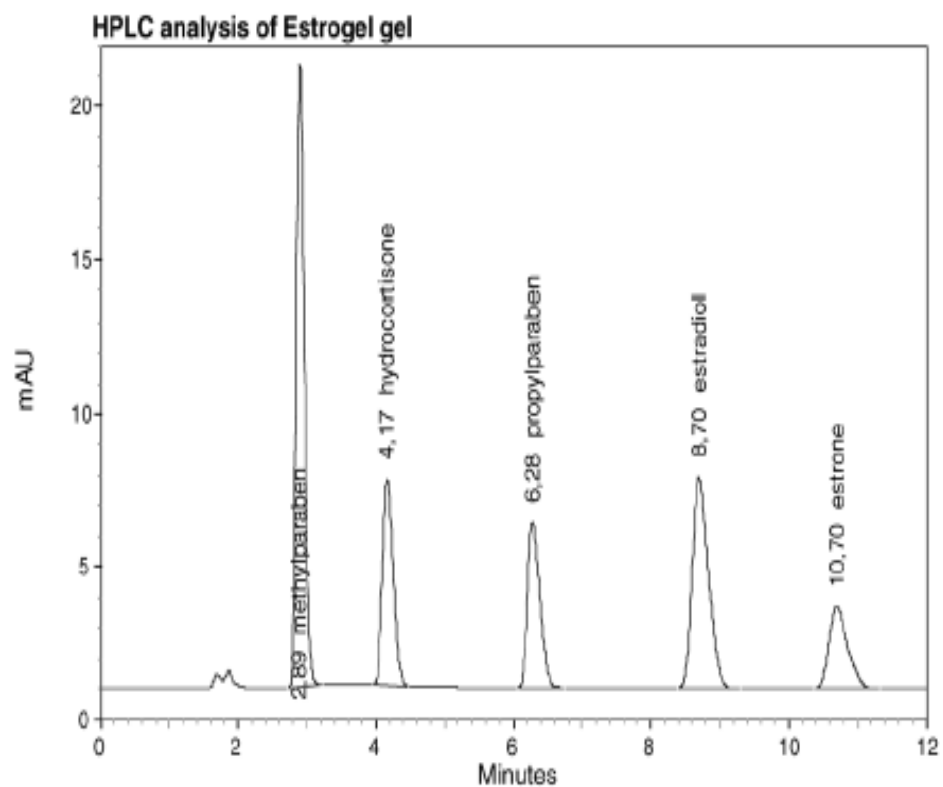
Obr. 13: Porovnání HPLC a UPLC chromatogramů v analýze Triamcinolového krému [9].



Obr. 14: Porovnání HPLC a UPLC chromatogramů v analýze Hydrokortisonového krému [9].



Obr.15: Porovnání HPLC a UPLC chromatogramů v analýze Indomethacinového gelu [9].



Obr. 16: Porovnání HPLC a UPLC chromatogramů v analýze Estrogelového gelu [9].

### **3. Závěr**

### 3.1. Závěrečné shrnutí

V úvodu teoretické části práce byl řešen problém, který se týkal účinnosti chromatografického systému. Byly zde zmíněny van Deemterova a Giddingsova teorie, které jsou velmi podstatné pro pochopení principu chromatografické separace látek. Kapitola byla záměrně zařazena na úvod teoretické části, protože v ní obsažené informace jsou základem pro následující kapitoly.

V další části práce bylo pojednáno o historii a stručném vývoji chromatografických metod a o historii UPLC. Vznik dnešní UPLC instrumentace byl umožněn díky postupnému rozvoji UHPLC. V oblasti rozvoje UHPLC byly řešeny problémy týkající se například dávkování vzorků a tlaků v kolonách. Historické souvislosti nám poskytly informace o tom, jak byl vývoj UPLC náročný a složitý.

Práce se také věnovala problematice popisu jednotlivých přístrojových součástí, jejichž technické parametry musejí splňovat velmi přísná kritéria. Velmi zásadní postavení v UPLC instrumentaci mají speciální kolony, na kterých jsou prakticky všechny výhody tohoto systému založeny. Jsou zde používány speciální kolony UPLC Acquity BEH C<sub>18</sub> o malém vnitřním průměru (1,0 - 2,1mm), které jsou plněny částicemi s průměrem 1,7 μm. Parametry kolon a částic v nich pozitivně ovlivňují účinnost chromatografického procesu a výrazně zkracují dobu, po kterou analýza probíhá. Možnost spojení UPLC s různými typy ionizačních technik umožňuje širší uplatnění UPLC v praxi.

Zajímavým aspektem bylo porovnávání konvenční HPLC a UPLC instrumentace. V tomto smyslu se jeví UPLC vhodnější pro analýzu biologicky aktivních látek. Vyniká totiž již zmíněnou úsporou času, po který analýza probíhá a nižší je i spotřeba rozpouštědel. V konvenční HPLC se analýza uskutečňuje za tlaků 35-40 MPa, kdežto v UPLC je dosahováno tlaků až 100 MPa. Pozitivní vliv na účinnost systému mají i malé částice (1,7 μm), které tvoří stacionární fázi v UPLC.

Další část práce byla věnována odborným článkům, které se týkaly daného problému. Pro vyhledávání byly využity dvě databáze ScienceDirect a Web of Science. Z poměrně vysokého počtu nalezených článků byly vypracovány grafické přehledy, které názorně dokumentovaly jejich počty a témata, kterých se týkaly. Grafy vystihovaly vždy každou databázi zvlášť. Šlo tedy také o porovnání těchto dvou databází. Další grafický přehled znázorňoval přehled dat, kdy byly články zveřejněny. Díky databázi ScienceDirect bylo vyhledáno více článků o spojení UPLC-MS. Databáze Web of Science umožnila vyhledání většího počtu článků týkajících se UPLC instrumentace bez spojení s MS, a to především ve formě abstraktů.

Příložený tabulkový přehled dokumentuje základní informace, které byly v jednotlivých článcích vyhledány. Tabulky byly rozděleny do dvou skupin podle toho, zda obsahovaly informace o analýzách biologicky aktivních látek v biologickém materiálu nebo ve farmaceutických přípravcích. Větší počet analýz byl prováděn v biologickém materiálu a převládajícím typem detekce byla hmotnostní spektrometrie často doplněná o různé typy ionizačních technik, nejčastěji však ESI nebo MALDI.

Závěr teoretické části se týkal analýzy vybraných biologicky aktivních látek. V jednotlivých kapitolách byly popsány postupy přípravy vzorků, chromatografický systém a účel dané analýzy. Často šlo i o porovnání HPLC s UPLC, což je dokumentováno příloženými chromatografickými záznamy. UPLC instrumentace při těchto analýzách výrazně převyšovala konvenční HPLC techniku ve směrech týkajících se například účinnosti, rychlosti a citlivosti prováděné analýzy.

## **4. Seznam použité literatury**



## 4.1. Použitá literatura

- [1] Nováková Lucie, Využití nových trendů při vývoji a validaci HPLC metod pro analýzu biologicky aktivních látek (disertační práce), Hradec Králové 2005
- [2] <http://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography#History> 3/2007
- [3] prof. RNDr. Rolf Karlíček a kol., Analytická chemie pro farmaceuty(2005), 276 - 277
- [4] Nováková Lucie, Ultra Performance Liquid Chromatography (seminární práce), Hradec Králové
- [5] Yanqiao Xiang, Daniel R. Matjes, Milton L. Lee, Safety concerns in ultrahigh pressure capillary liquid chromatography using air-driven pumps, Department of Chemistry and Biochemistry, Brigham Young University, UT 84602-5700, on-line
- [6] [http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/separa.htm](http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm) 3/2007
- [7] Marek Exner, Hardware a software pro UPLC s UV/VIS detekcí (prezentační práce), Brno/Praha 2004
- [8] <http://www.laboratoryequipment.com/images/0605/Image-1.jpg> 3/2007
- [9] L. Nováková, L. Matysová, P. Solich, Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, Talanta 68, 908 – 918, 2006
- [10] <http://www.veda.cz/article.do?articleId=13256> 3/2007
- [11] [http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/vybranemet.htm](http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm) 3/2007
- [12] [http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem\\_sekce/predmety/C7300/MS/ms.pdf](http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/MS/ms.pdf) 3/2007
- [13] <http://ach.upol.cz/ms.php> 3/2007
- [14] Naijun Wu, J. Andreas Lippert, Milton L. Lee, Practical aspects of ultrahigh pressure capillary liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 911, 2001
- [15] Anton Kaufmann, Patrick Butcher, Kathryn Maden and Mirjam Widmer, Ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (UPLC–TOF): A novel tool for multiresidue screening of veterinary drugs in urine, Analytica Chimica Acta, 586, 13-21, 2007
- [16] Yuanyuan Ma, Feng Qin, Xiaohong Sun, Xiumei Lu and Famei Li, Determination and pharmacokinetic study of amlodipine in human plasma by ultra

performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 1540-1545, 2007

[17] Yunsheng Hsieh, Christine J. G. Duncan, Suining Lee, Ming Liu, Comparison of fast liquid chromatography/tandem mass spectrometric methods for simultaneous determination of cladribine and clofarabine in mouse plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, on-line

[18] Xixiang Ming, Xiumei Lu, Xiaohong Sun, Xiaoqin Li, Famei Li, Determination of vitexin-2<sup>o</sup>-O-rhamnoside in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography electrospray ionisation tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study, *Talanta* 2007, on-line

[19] Hermes Licea-Perez, Sherry Wang, Chester L. Bowen and Eric Yang, A semi-automated 96-well plate method for the simultaneous determination of oral contraceptives concentrations in human plasma using ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2007, on-line

[20] Ruiping Li, Lili Dong and Junxiong Juany, Ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of epirubicin in human plasma, *Analytica Chimica Acta*, 546, 167-173, 2005

[21] Tobias Kind, Vladimir Tolstikov, Oliver Fiehn and Robert H. Weiss, A comprehensive urinary metabolomic approach for identifying kidney cancer, *Analytical Biochemistry*, 2007, on-line

[22] Sarbani Giri, Kristopher W. Krausz, Jeffrey R. Idle and Frank J. Gonzalez, The metabolomics of (±)-arecoline 1-oxide in the mouse and its formation by human flavin-containing monooxygenases, *Biochemical Pharmacology*, 73, 561-573, 2007

[23] Muhammad Saeed, Sheila Higginbotham, Eleanor Rogan and Ercole Cavalieri, Formation of depurinating N3adenine and N7guanine adducts after reaction of 1,2-naphthoquinone or enzyme-activated 1,2-dihydroxynaphthalene with DNA: Implications for the mechanism of tumor initiation by naphthalene, *Chemico-Biological Interactions*, 165, 175-188, 2007

[24] Jana Olšovská, Markéta Jelínková, Petr Man, Markéta Koběřská, Jiří Janata and Miroslav Flieger, High-throughput quantification of lincomycin traces in fermentation broth of genetically modified *Streptomyces* spp.: Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography with UV detection, *Journal of Chromatography A*, 1139, 214-220, 2007

[25] Hiroki Kawanishi, Toshimasa Toyooka, Kenichi Ito, Munenori Maeda, Tomoji Hamada, Takeshi Fukushima, Masaru Kato and Shinsuke Inagaki, Hair analysis of histamine and several metabolites in C3H/HeNCrj mice by ultra performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry

(UPLC-ESI-TOF-MS): Influence of hair cycle and age, *Clinica Chimica Acta*, 378, 122-127, 2007

[26] Kelly A. Johnson and Robert Plomb, Investigating the human metabolism of acetaminophen using UPLC and exact mass oa-TOF MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 805-810, 2005

[27] Ganfeng Wang, Yunsheng Hsieh, Kuo-Chi Cheng, Richard A. Morrison, Srikanth Venkatraman, F. George Njoroge, Larry Heimark and Walter A. Korfmacher, Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of diastereomers of SCH 503034 in monkey plasma, *Journal of Chromatography B*, 2007, on-line

[28] M.E. Touber, M.C. van Engelen, C. Georgakopoulos, J.A. van Rhijn and M.W.F. Nielen, Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 586, 137-146, 2007

[29] Hiroki Kawanishi, Toshimasa Toyooka, Kenichi Ito, Munenori Maeda, Tomoji Hamada, Takeshi Fukushima, Masaru Kato and Shinsuke Inagaki, Rapid determination of histamine and its metabolites in mice hair by ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1132, 148-156, 2006

[30] G.J. Dear, N. Patel, P.J. Kelly, L. Webber and M. Yung, TopCount coupled to ultra-performance liquid chromatography for the profiling of radiolabeled drug metabolites in complex biological samples, *Journal of Chromatography B*, 844, 96-103, 2006

[31] Samuele Pedraglio, Marco Giulio Rozio, Paola Misiano, Veronica Reali, Giulio Dondio and Chiara Bigotni, New perspectives in bio-analytical techniques for preclinical characterization of a drug candidate: UPLC-MS/MS in in vitro metabolism and pharmacokinetic studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, on-line

[32] Wang GF, Hsieh Y, Cui XM, et al., Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of testosterone and its metabolites in in vitro samples, *Rapid communications in mass spectrometry* 20, 2215-2221, 2006

[33] Sun XH, Li XQ, Cai SA, et al., High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination of isosorbide 5-mononitrate in human plasma, *Journal of Chromatography B -Analytical technologies in the biomedical and life science*, 846, 323-328, 2007

[34] Rainville PD, Stumpf CL, Shockcor JP, et al., Novel application of reversed-phase UPLC-oaTOF-MS for lipid analysis in complex biological mixtures: A new tool for lipidomics, *Journal of Proteome research* 6, 552-558, 2007

- [35] Kalovidouris M, Michalea S, Robola N, et al., Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of lercanidipine in human plasma, *Rapid communications in mass spectrometry* 20, 2939-2946, 2006
- [36] Yin PY, Zhao XJ, Li QR, et al., Metabonomics study of intestinal fistulas based on ultraperformance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS), *Journal of Proteome research* 5, 2135-2143, 2006
- [37] Al-Dirbashi OY, Aboul-Enein HY, Jacob M, et al., UPLC-MS/MS determination of doxazosin in human plasma, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385, 1439-1443, 2006
- [38] Yu K, Little D, Plumb R, et al., High-throughput quantification for a drug mixture in rat plasma - a comparison of Ultra Performance(TM) liquid chromatography/tandem mass spectrometry with high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid communications in mass spectrometry* 20, 544-552, 2006
- [39] Nordstrom A, O'Maille G, Qin C, et al., Nonlinear data alignment for UPLC-MS and HPLC-MS based metabolomics: Quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum, *Analytical Chemistry* 78, 3289-3295, 2006
- [40] Stephen A.C. Wren and Pierre Tchelitcheff, UPLC/MS for the identification of  $\beta$ -blockers, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 571-580, 2006
- [41] Da-yong Zhou, Qing Xu, Xin-ya Xue, Fei-fang Zhang and Xin-miao Liang, Identification of O-diglycosyl flavanones in *Fructus aurantii* by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42, 441-448, 2006
- [42] Kun-Yan Li, Yan-Gang Zhou, Hua-Yi Ren, Feng Wang, Bi-Kui Zhang and Huan-De Li, Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of atypical antipsychotics and some metabolites in vitro, *Journal of Chromatography B*, 2007, on-line
- [43] Yu Zhang, Jun Wang, Ying Zhang, Study on formation of acrylamide under low-moisture asparagine-sugar reaction system, *Food chemistry*, 2007, on-line
- [44] Xiaojing Li, Agnes Fekete, Matthias Englmann, Christine Götz, Michael Rothballer, Moritz Frommberger, Katharina Buddrus, Jenoe Fekete, Chunping Cai, Peter Schröder, et al., Development and application of a method for the analysis of N-acetylhomoserine lactones by solid-phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1134, 186-193, 2006
- [45] Zhitao Liu, Huayi Zhang, Bing Shao and Rong Zhao, Electron-irradiation-induced decomposition of sulfonamides, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 252, 285-289, 2006

[46] Jurgen Mensch, Mark Noppe, Jef Adriaensen, Anouche Melis, Claire Mackie, Patrick Augustijns and Marcus E Brewster, Novel generic UPLC/MS/MS method for high throughput analysis applied to permeability assessment in early Drug Discovery, *Journal of Chromatography B*, 847, 182-187, 2007

[47] Novakova L, Solichova D, Solich P, Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical 2 approaches during analysis of diclofenac gel, *Journal of Separation Science* 29, 2433-2443, 2006

[48] Jim X. Shen, Haiping Wang, Samy Tadros, Roger N. Hayes, Orthogonal extraction/chromatography and UPLC, two powerful new techniques for bioanalytical quantitation of desloratadine and 3-hydroxydesloratadine at 25 pg/mL, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40, 689-706, 2006

[49] Xiaoqin Li, Zhili Xiong, Xixiang Ying, Lanchong Cui, Wenliang Zhu and Famei Li, A rapid ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the qualitative and quantitative analysis of the constituents of the flower of *Trollius ledibouri* Reichb, *Analytica Chimica Acta*, 580, 170-180, 2006

[50] Martin Gilar, Van Deemterovy křivky a sorbent pro UPLC (prezentační práce), Brno/Praha 2004

[51] <http://faf.vfu.cz/fytochem/Hmotnostn%C3%AD%20spektroskopie.pdf> 4/2007