

Univerzita Palackého Olomouc

Přírodovědecká fakulta

Katedra Analytické chemie



Diplomová práce

VÝVOJ ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ A
IDENTIFIKACI VYBRANÝCH NOVÝCH SYNTETICKÝCH
BENZODIAZEPINŮ S VYUŽITÍM ELEKTROMIGRAČNÍCH
TECHNIK

Bc. Barbora Boráňová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Olomouc 2017

Palacký University Olomouc

Faculty of Science

Department of Analytical Chemistry



Master thesis

DEVELOPMENT OF THE ANALYTICAL METHOD FOR THE
DETERMINATION AND IDENTIFICATION OF SELECTED
NEW DESIGNER BENZODIAZEPINES USING
ELECTROMIGRATION TECHNIQUES

Bc. Barbora Boráňová

Supervisor: doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Olomouc 2017

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením doc. RNDr. Vítězslava Maiera, Ph.D. Veškeré literární prameny a zdroje, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu literatury.

V Olomouci dne

.....

Bc. Barbora Boráňová

Touto cestou bych chtěla srdečně poděkovat doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D. za jeho cenné rady a provedení celou mou diplomovou prací. Ústavu soudního lékařství a medicínského práva Univerzity Palackého v Olomouci, Fakultní nemocnice za poskytnutí standardů syntetických benzodiazepinů.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole a mému příteli za podporu během celého studia.

Práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2016_016, IGA_PfF_2017_020).

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Barbora Boráňová
Název práce:	Vývoj analytické metody pro stanovení a identifikaci vybraných nových syntetických benzodiazepinů s využitím elektromigračních technik.
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	Nová metoda separace, identifikace a kvantifikace syntetických benzodiazepinů byla vyvinuta za použití nevodné kapilární elektroforézy ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (NACE-ESI-MS/MS). Separace byla provedena ve 20 mM octanu amonném v acetonitrilu s přídavkem 100 mM kyseliny trifluoroctové s využitím postupného vícenásobného pokrytí kapiláry iontovými polymery vytvářejícího obrácený elektroosmotický tok. Vyvinutá metoda byla validována pro účely forenzní a klinicko-toxikologické analýzy syntetických benzodiazepinů v lidském séru po jednoduché extrakci z kapaliny do kapaliny. Získané meze stanovitelnosti pro metodu NACE-ESI-MS/MS se pohybují v rozmezí 1,5 ng/ml až 15 ng/ml. Pro stanovení hodnot rozdělovacích koeficientů syntetických benzodiazepinů byla vyvinuta a optimalizována metoda micelární elektrokinetické chromatografie se spektrofotometrickou detekcí (MEKC-DAD).
Klíčová slova:	nové syntetické benzodiazepiny, kapilární elektroforéza, hmotnostní spektrometrie, toxikologická analýza, forenzní analýza
Počet stran:	80
Jazyk:	Český

Bibliographic identification:

First name and surname: Bc. Barbora Boráňová

Title: Development of the analytical method for the determination and identification of selected new designer benzodiazepines using electromigration techniques.

Type of thesis: Master thesis

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervision: doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.

Year of presentation: 2017

Abstract: A new method for the separation, identification and quantification of synthetic benzodiazepines was developed using non-aqueous capillary electrophoresis with tandem mass spectrometry (NACE-ESI-MS/MS). The separation was carried out in 20 mM ammonium acetate in acetonitrile with an addition of 100 mM trifluoroacetic acid, using a multiply surface modified capillary with ionic polymers, creating a reverse electroosmotic flow. The developed method was validated for the use in forensic and clinical toxicology analyses of synthetic benzodiazepines in human serum, following a simple liquid-liquid extraction. The acquired limits of detection for the NACE-ESI-MS/MS method range from 1.5 ng/ml to 15 ng/ml. A micellar electrokinetic chromatography with spectrophotometric detection (MEKC-DAD) method was developed and optimized for the determination of the partition coefficients of synthetic benzodiazepines.

Key words: new designer benzodiazepines, capillary electrophoresis, mass spectrometry, toxicological analysis, forensic analysis

Number of pages: 80

Language: Czech

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	Octan amonný
ACD	Advanced Chemistry Development
ACN	Acetonitril
AN	Agregační číslo
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	Ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
BGE	Základní elektrolyt
BZD	Benzodiazepiny
CE	Kapilární elektroforéza
CEC	Kapilární elektrochromatografie
CGE	Kapilární gelová elektroforéza
CID	Kolizí indukovaná disociace
CITP	Kapilární izotachoforéza
CMC	Kritická micelární koncentrace
CM- β -CD	Carboxymethyl- β -cyclodextrin
CNS	Centrální nervová soustava
CS	Chirální selektor
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DAD	Detektor diodového pole
DART	Přímá analýza v reálném čase
DBZD	Syntetické benzodiazepiny
DESI	Desorpční analýza elektrosprejem
DS	Dextran sulfát
EKC	Elektrokinetická chromatografie
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Ionizace elektrosprejem
FA	Kyselina mravenčí
GABA	Kyselina γ -aminomáselná (receptor)
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie

ICR	Iontová cyklotronová rezonance
IT	Iontová past
LC	Kapalinová chromatografie
LIF	Laserem indukovaná fluorescence
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	Limit detekce
Log P	Rozdělovací koeficient
LOQ	Limit kvantifikace
m/z	Poměr hmotnosti k náboji
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	Methanol
Mr	Relativní molekulová hmotnost
MRM	Skenování více fragmentačních přechodů
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NACE	Kapilární elektroforéza v nevodném prostředí
NaOH	Hydroxid sodný
NLS	Skenování neutrálních ztrát
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PB	Polybren
Q	Kvadrupól
QQQ	Trojité kvadrupól
RF	Radiofrekvenční
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SDS	Dodecylsulfát sodný
SF	Stacionární fáze
SIM	Skenování vybraného iontu
SMIL	Postupné vícenásobné iontově polymerní vrstvy
SRM	Skenování jednoho fragmentačního přechodu
STA	Systematická toxikologická analýza

TBME	Terc-butylmethylether
TFA	Trifluoroctová kyselina
TIC	Celkový iontový proud
TOF	Detektor doby letu
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

OBSAH

1. ÚVOD.....	12
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	14
2.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA	15
2.1.1 TEORETICKÉ ASPEKTY KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY	16
2.1.1.1 Elektroforetická mobilita	16
2.1.1.2 Migrační čas.....	17
2.1.1.3 Elektroosmotický tok	18
2.1.2 MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRÁFIE.....	21
2.1.2.1 Druhy tenzidů	23
2.1.3 POKRYTÍ KAPILÁR IONTOVÝMI POLYMERY	24
2.1.4 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .	26
2.1.4.1 Ionizační techniky pro spojení CE-MS.....	26
2.1.4.2 Rozhraní spojení CE-ESI-MS.....	28
2.1.4.3 Trojitý kvadrupól	35
2.2 BENZODIAZEPINY	38
2.2.1 NOVÉ SYNTETICKÉ BENZODIAZEPINY	39
2.2.2 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT	42
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
3.1 MATERIÁL A METODY	44
3.1.1 CHEMIKÁLIE A STANDARDY	44
3.1.2 INSTRUMENTACE.....	44
3.1.3 STANDARTNÍ ROZTOKY A PUFRY	45
3.1.4 PŘÍPRAVA SMIL POKRYTÉ KAPILÁRY	45
3.1.5 PODMÍNKY CE-DAD (MEKC) ANALÝZ	46
3.1.6 PODMÍNKY NACE-ESI-MS A NACE-DAD ANALÝZ	47
3.1.7 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	47

4. VÝSLEDKY A DISKUZE	48
4.1. NACE-ESI-MS/MS	48
4.1.1 VOLBA SEPARAČNÍHO ELEKTROLYTU PRO SEPARACI DBZD.....	48
4.1.2 OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK CE-ESI-MS/MS.....	54
4.1.3. VALIDACE.....	60
4.1.1 APLIKACE VYVINUTÉ METODY NA MODELOVÝ VZOREK SÉRA....	64
4.2 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENTY DBZD.....	65
5. ZÁVĚR.....	68
6. SUMMARY	69
7. SEZNAM LITERATURY	70

1. ÚVOD

V posledních deseti letech roste počet intoxikací substancemi, které jsou souhrnně označovány jako nové syntetické drogy (*new designer drug*). Tyto substance jsou svou strukturou a účinkem velmi podobné již známým nelegálním drogám. Nové syntetické drogy nejsou uvedeny na seznamu omamných a psychotropních látek na rozdíl od kontrolovaných drog. Jsou popsány dvě velké třídy syntetických drog, a to syntetické kanabinoidy a syntetické katinony. V roce 2014 do této skupiny látek přibyly nové syntetické benzodiazepiny, o kterých pojednává tato diplomová práce.

Syntetické benzodiazepiny mají podobné účinky a strukturu jako klasické benzodiazepiny, avšak nejsou využívány k terapeutickým účelům. Syntetické benzodiazepiny jsou naopak distribuovány jako náhražky běžně zneužívaných drog, či jako nové drogy. Intoxikace DBZD je spojena s vážnými zdravotními komplikacemi a následky, protože dodnes nebyly zcela popsány jejich toxikologické a farmakologické vlastnosti.

Analýza nových syntetických benzodiazepinů pro forenzní a toxikologické laboratoře je velmi obtížná. Laboratoře využívají zavedené rutinní postupy a analýzy, které jsou zaměřené pouze na látky uvedené na seznamu nelegálních látek. Analýza klasických BZD zahrnuje systematickou toxikologickou analýzu (STA), kdy první screeningová metoda je založena na imunochemickém testu pro potvrzení a kvantifikaci koncentrační hladiny v biologických materiálech (nejčastěji moč a krev). Může tak docházet k falešně pozitivním výsledkům kdy mohou být zaměněny metabolity klasických BZD s metabolity DBZD.

V posledních letech byly publikovány práce, které se zabývají pouze charakteristikou jednoho DBZD či skupiny DBZD (popřípadě jejich metabolitů) pomocí několika analytických metod (NMR spektra, MS spektra a IR spektra). Doposud se pouze jediná práce zabývala simultánní toxikologickou analýzou skupiny jedenácti DBZD v moči s využitím LC-MS/MS instrumentací.

Kapilární elektroforéza s tandemovou hmotnostní spektrometrií (CE-MS) je známá jako komplementární technika k dnes již zavedeným chromatografickým metodám. CE disponuje několika výhodami, které mohou být využity v klinicko-toxikologické a forenzní analýze. Hlavními výhodami využití CE instrumentace je malé množství vzorku a spotřeby činidla, vysoká účinnost či dostupnost různých separačních módů. Aby byl překonán hlavní

nedostatek CE instrumentace, jež je nízká citlivost při použití spektrofotometrického detektoru, je zde využito spojení s MS detekcí využívající ionizaci elektrosprejem (ESI).

Diplomová práce popisuje vývoj a optimalizaci NACE-ESI-MS/MS metody pro simultánní analýzu směsi devíti vybraných DBZD v séru. Vyvinutá metoda byla validována a poté aplikována na obohacený vzorek v séru.

Z důvodu bližší charakterizace směsi jedenácti DBZD byla vyvinuta a optimalizována metoda MEKC-DAD. Diplomová práce pojednává o využití této metody ke stanovení hodnot rozdělovacích koeficientů DBZD jakožto jejich charakterizaci biologické aktivity studovaných látek.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

Stále se zvyšující nárok na citlivost, rychlost, přesnost a schopnost identifikace jednotlivých analýz vede k vývoji nových analytických metod a inovaci metod stávajících. Proto, vedle dnes již velmi hojně používaných separačních metod, jako plynová chromatografie (GC) nebo kapalinová chromatografie (LC), se prudce rozvíjí a zdokonaluje také kapilární elektroforéza (CE)¹. Mezi hlavní výhody CE bezesporu patří malá spotřeba vzorku a rozpouštědel, také krátká doba analýzy a velmi vysoká separační účinnost. Je však třeba neopomenout, že účinnost separace je silně závislá na samotném charakteru separovaného analytu, neboť k jednotlivým separacím dochází na základě odlišných mechanismů².

Obecný princip analytických separačních technik nesoucí souhrnný název kapilární elektromigrační techniky je založen na separaci nabitých částic na základě rozdílných rychlostí v elektricky vodivém prostředí ve stejnosměrném elektrickém poli. Moderní elektromigrační techniky lze dále rozdělit podle jejich odlišného separačního mechanismu. Takto lze zmínit kapilární elektrochromatografii (CEC), micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC), kapilární izotachoforézu (CITP), kapilární gelovou elektroforézu (CGE) a nesmíme opomenout kapilární zónovou elektroforézu (CZE), která je jednou z nejpoužívanějších kapilárních elektromigračních technik.

CE metody jsou pro svůj široký záběr separačních mechanismů využívány pro analýzu mnoha skupin látek, mezi něž patří např. peptidy³, proteiny⁴, či nízkomolekulární látky⁵ ve farmaceutických analýzách. CE může být také využita ke stanovení některých fyzikálně-chemických konstant, jako např. disociační konstanty kyselin⁶. Všestrannost CE může být ilustrována typickými aplikacemi v oblastech klinických, forenzních a farmakologických. Mezi klinické a forenzní aplikace typicky s využitím CE patří stanovení hemoglobinů v hemolyzátu, keto-metabolitů v séru, či opiátů ve vlasech. S pomocí CE můžeme v kosmetickém průmyslu analyzovat alkaloidy, xanthony, terpeny a fenolové sloučeniny. V analýzách rostlinných extraktů a esenciálních olejů je využíváno elektroforetických profilů. Ve farmacii je CE využívána pro analýzu anti-HIV léčiv. Nemalé zastoupení má také využití CE v životním prostředí (aldehydy v leteckém a automobilovém průmyslu) či nutriční hodnoty (karboxylové kyseliny ve víně)⁷.

2.1.1 TEORETICKÉ ASPEKTY KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

2.1.1.1 Elektroforetická mobilita

Pohyb nabité částice ve stejnosměrném elektrickém poli je charakterizován elektroforetickou mobilitou, resp. pohyblivostí μ_{ep} . Tato veličina charakterizuje rychlost pohybu nabitých částic v_{ep} ve stejnosměrném elektrickém poli, mající určitou intenzitu E (1).

$$v_{ep} = \mu_{ep}E \quad (1)$$

Intenzita elektrického pole E , které vzniká mezi oběma konci kapiláry po aplikaci elektrického napětí, je definována jako podíl vloženého napětí U a celkové délky separačního lože (kapiláry) L (2).

$$E = \frac{U}{L} \quad (2)$$

V elektroforetickém systému je pohyb nabitých částic určen výslednicí působení dvou opačných sil. Výslednice je tedy dána elektrickou a frikční silou. Elektrická síla F_{el} (3) má za následek pohyb nabité částice ve vodivém kapalném prostředí směrem k elektrodám s opačnou polaritou. Velikost elektrické síly je definována jako součet náboje dané částice q a intenzity vloženého elektrického pole E .

$$F_{el} = qE \quad (3)$$

Pohyb iontů je brzděn opačnou frikční silou, která je dána Stokesovým zákonem podle vztahu (4). Frikční síla F_{fr} je přímo úměrná velikosti náboje částice q , viskozitou prostředí η ve které se částice pohybuje a samotná velikostí částice r .

$$F_{fr} = 6\pi\eta r v_{ep} \quad (4)$$

V rovnovážném stavu si budou tyto opačně orientované síly rovny ($F_{el} = -F_{fr}$) a vzniká tak ustálený stav. V tomto rovnovážném stavu migruje nabitá částice v elektrickém poli danou rychlostí podle vztahu (1). Elektroforetická mobilita μ_{ep} tedy může být definována podle vztahu (5) který zahrnuje fyzikální vlastnosti částice, jako je velikost náboje iontů q , a velikosti částice (iontů) r a okolním prostředím η .

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

Velikost a tvar částic se může značně lišit v důsledku solvatace v daném kapalném prostředí. Pro základní teoretické výpočty se však tato skutečnost zjednodušuje a uvažuje se tedy, že iont má kulovitý tvar o efektivním poloměru r . Ze vztahu (5) plynou jisté obecné

předpoklady, neboť elektroforetická mobilita μ_{ep} je přímo závislá na velikosti náboje částice q a nepřímo závislá na prostředí η ve kterém se částice pohybuje. Můžeme tedy předpokládat, že částice s velkým nábojem a malým poloměrem budou mít elektroforetickou mobilitu značně větší. Naproti tomu částice, jejichž náboj je malý, ale poloměr je větší budou mít mnohem menší pohyblivost v daném prostředí. Také je známo, že viskozita prostředí η je závislá na teplotě T , můžeme tedy předpokládat, že s nárůstem teploty se bude elektroforetická mobilita zvyšovat, a tedy bude větší pohyblivost částic⁸.

Z experimentálních výsledků bylo zjištěno, že na pohyblivost částice má vliv také elektroosmotický tok (EOF) a zavádí se tak tzv. zdánlivá elektroforetická mobilita μ_{av} (6), která je vektorovým součtem elektroforetické mobility μ_{ep} a elektroosmotické mobility μ_{eof} (vzniká v důsledku právě zmiňovaného elektroosmotického toku)⁹.

$$\mu_{av} = \mu_{ep} + \mu_{eof} \quad (6)$$

Elektroforetická mobilita jako taková však není z fyzikálně-chemického hlediska konstantou, a proto ji není možno využít pro kvalitativní analýzu. Je tak zapříčiněno závislostí elektroforetické mobility na mnoha parametrech separačního systému. Jedná se však o veličinu, která umožňuje popsat selektivitu separace α studovaných látek, a kterou můžeme vyjádřit jako podíl elektroforetických mobilit dvojice studovaných látek μ_a a μ_b podle vztahu (7).

$$\alpha = \frac{\mu_a}{\mu_b} \quad (7)$$

2.1.1.2 Migrační čas

Základním kvalitativním parametrem elektromigračních technik je migrační čas t_m , který udává závislost odezvy daného detektoru na čase. Jedná se tedy o dobu, kterou daný analyt setrvává v separačním loži (kapiláře) od jeho nadávkování až po jeho detekci. Migrační čas t_m je dán vztahem (8):

$$t_m = \frac{lL}{\mu_{av}U} \quad (8)$$

Vztah pro migrační čas t_m můžeme dále rozšířit a zahrnout do něj již dříve zmiňované veličiny (9):

$$t_m = \frac{l}{(\mu_{ep} + \mu_{eof})E} = \frac{lL}{(\mu_{ep} + \mu_{eof})U} \quad (9)$$

Ze vztahu (8) a (9) vyplývá, že migrační čas t_m je nepřímo závislý na již definovaných veličinách a přímo závislá na celkové délce separačního lože (kapiláry) L a její efektivní délce l (délka, od místa nadávkování po detektor). Efektivní délka kapiláry l se shoduje s celkovou délkou kapiláry L například tehdy, je-li detekce amperometrická nebo je kapilární elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií (MS).

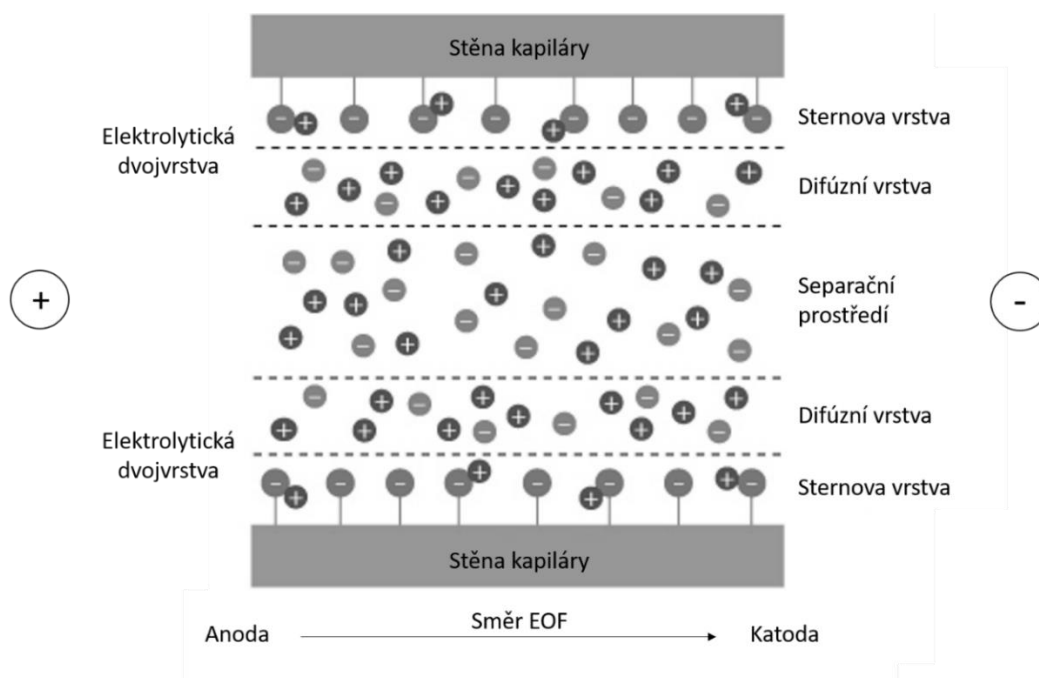
Z výše uvedených vztahů (8) a (9) je patrné, že separaci lze ovlivnit délkou kapiláry a vloženým separačním napětím U . Separace jednotlivých látek bude tím rychlejší, čím budeme vkládat vyšší separační napětí a zkracovat délku separačního lože. Ze vztahu (9) můžeme pozorovat, že migrační čas závisí také na elektroosmotické mobilitě (μ_{eof}), tedy na EOF vznikajícímu přirozeně v kapiláře. Pokud dojde ke zvýšení elektroosmotické mobility, dojde ke zkrácení doby analýzy. Zvýšení elektroosmotické mobility má však za následek současné snížení selektivity nebo rozlišení.

2.1.1.3 Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok, také označován jako EOF (*Electroosmotic Flow*) je dalším velmi důležitým transportním jevem v elektromigračních technikách. Vzniká působením stejnosměrného elektrického pole a to na tzv. difuzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní kapalně a pevné fáze na vnitřní stěně kapiláry. Jedná se o fyzický tok kapaliny v separační kapiláře, který vzniká po vložení stejnosměrného elektrického pole⁸. Elektrická dvojvrstva vzniká v důsledku selektivní disociace ionizovatelných skupin nebo/a adsorpce jednoho druhu iontů na vnitřní stěnu kapiláry. Disociací nebo adsorpcí jednotlivých iontů na vnitřní stěně kapiláry vzniká imobilizovaná část elektrické dvojvrstvy, tzv. Sternova vrstva. Imobilizace je výsledkem elektrostatických interakcí mezi povrchovým nábojem kapiláry (např. v případě nejčastěji používané křemenné kapiláry jsou to silanolové skupiny) a ionty s opačným nábojem. Naopak v difuzní vrstvě zůstává přebytek volného náboje a tato část je díky slabším interakcím pohyblivá.

Na rozhraní Sternovy vrstvy a difuzní vrstvy vzniká potenciálový rozdíl, jehož část vyskytující se v difuzní oblasti se nazývá zeta potenciál ζ . Elektroosmotický tok tedy vzniká po vložení elektrického pole, kdy se pohybuje difuzní vrstva, a také díky silné solvataci iontů v roztoku uvnitř kapiláry dojde k pohybu celého roztoku uvnitř kapiláry. Na obrázku 1 je zobrazen pohyb kladně nabitých solvatovaných kationtů směrem ke katodě, čímž je vyvolán elektroosmotický tok za normálních podmínek. Elektroosmotický tok z hlediska separace

působí jako neselektivní síla a unáší stejnou rychlostí všechny přítomné ionty. Můžeme tedy říci, že významně ovlivňuje dobu analýzy a účinnost separace z hlediska výsledné migrační rychlosti sledovaných analytů.



Obrázek 1: Grafické schéma elektroosmotického toku v křemenné kapiláře. Převzato a upraveno¹⁰.

Rychlost pohybu částice analytu neboli mobilita, jak již bylo uvedeno ve vztahu (6) je vektorovým součinem elektroforetické mobility μ_{ep} a elektroosmotické mobility μ_{eof} . Pro rychlost EOF (v_{eof}) a její velikost platí vztah (10). V tomto vztahu rychlost EOF je přímo úměrná elektroosmotické mobilitě μ_{eof} vztažené na jednotkovou intenzitu elektrického pole E .

$$v_{eof} = \mu_{eof} E \quad (10)$$

Elektroosmotická mobilita je poté podle vztahu (11) přímo úměrná zeta potenciálu ζ , relativní permitivitě rozpouštědla (probíhající separace) ϵ_r a nepřímo úměrná viskozitě prostředí η .

$$\mu_{eof} = \frac{\epsilon_r \zeta}{4\pi\eta} \quad (11)$$

Zeta potenciál je určen nábojem na vnitřní straně stěny kapiláry. EOF v klasické křemenné kapiláře je silně závislý na pH roztoku, ve kterém je uskutečněná separace. Tato skutečnost

je způsobena přítomností ionogenních zejména silanolových (-Si-OH) a siloxanových (-Si-O-Si-) skupin s $pK_a \sim 3$ na vnitřní stěně křemenné kapiláry, které jsou silně závislé na pH roztoku¹¹.

Rychlost EOF může být ovlivněna několika způsoby, mezi něž také patří výše zmíněné hodnoty pH separačního roztoku. Obecně lze říci, že s rostoucí hodnotou pH se zvyšuje i rychlost EOF. Při hodnotách pH v rozmezí 3-8 rychlost EOF roste. Při hodnotách $pH < 2$ se rychlost EOF limitně blíží nule, neboť pouhé nepatrné množství silanolových skupin je disociováno¹².

Mezi další možnosti ovlivnění rychlosti EOF patří iontová síla elektrolytu. Iontovou sílu lze zjednodušeně vyjádřit vztahem (12), jako sumu součinu čtverce náboje iontu a jeho koncentrací. Obecně lze opět říci, že rychlost EOF roste se snižující se hodnotou iontové síly. Nízká hodnota iontové síly, tedy nízká koncentrace iontů elektrolytu má za následek rozšíření elektrické dvojvrstvy, a tedy také dochází ke zvýšení zeta potenciálu¹³.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=0}^n c_i z_i^2 \quad (12)$$

Rychlost EOF a tím také rychlost separace může být dále ovlivněna elektrickým polem, teplotou a s ní spojenou viskozitou. Organická rozpouštědla mohou také ovlivnit EOF, prostřednictvím změny permitivity prostředí a změny zeta potenciálu. Mezi typická organická rozpouštědla používaná v CE patří methanol a acetonitril¹⁴.

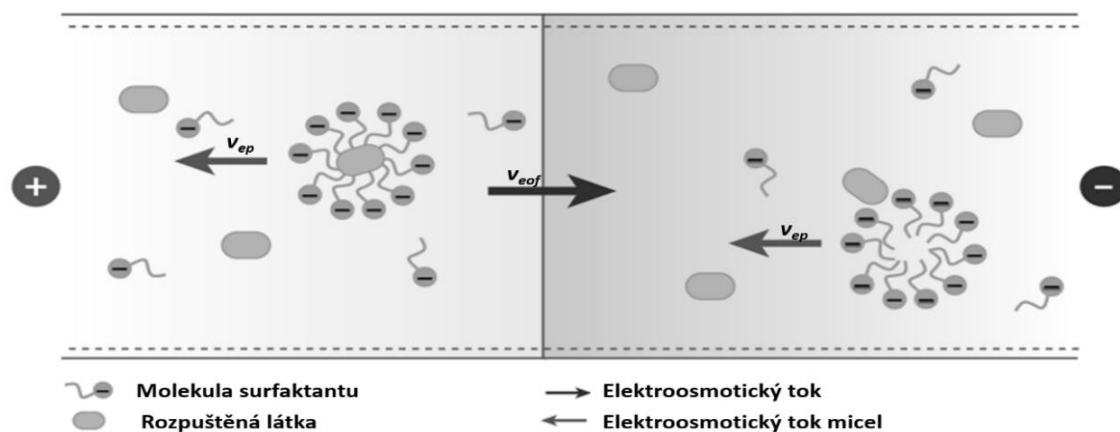
Dynamické pokrytí kapiláry, tedy úprava vnitřního povrchu kapiláry je velmi častou možností pro ovlivnění EOF. Na vnitřní povrch kapiláry mohou být adsorbovány nebo navázány nejrůznější skupiny, např. hydrofilní polymery, čímž dochází k eliminaci povrchového náboje^{15,16}. Přídavkem tenzidu adsorbujících se na vnitřní povrch stěny kapiláry se mění náboj vnitřní stěny kapiláry. Rychlost EOF tak může být zvýšena s pomocí aniontových tenzidů, naopak zpomalení EOF eventuálně jeho obrácení může dojít přidáním kationtových tenzidů do separačního elektrolytu¹⁷.

Velkou výhodou EOF je téměř pravoúhlý rychlostní profil, a to v celém průřezu kapiláry. V tomto případě je při elektromigrační separaci příspěvek k disperzi zón analytů zanedbatelný. Téměř nulový příspěvek k disperzi zón je patrný tam, kde je elektroosmotický tok využíván jako hybná síla mobilních fází, zejména u metody elektrochromatografické a elektrokinetické chromatografie^{8,18,19}.

2.1.2 MICELÁRNÍ ELEKTROKINETICKÁ CHROMATOGRRAFIE

Mezi nejmladší elektromigrační techniky patří elektrokinetická chromatografie (EKC), která byla objasněna Terabem a spol. v roce 1984²⁰. V případě EKC jde o kombinaci principu chromatografického, který zahrnuje distribuci analyzovaných látek mezi micelární a vodnou fází v elektrolytu, spolu s pohybem daných fází vůči sobě a principu elektroforetické migrace nabitých analytů. Obecný princip EKC je založen na různé distribuci sledovaných látek mezi tzv. separační nosič (*separation carrier*) také nazývaný jako (pseudo)fáze a elektrolyt (vodná fáze), ve které je homogenně rozptýlená (pseudo)fáze²¹. Mezi separační nosiče můžeme zahrnout ty látky, které nějakým způsobem interagují s analyty, např. mikroemulze (olej ve vodě, v/v)²², chirální selektor (CS), nejčastěji využívané deriváty nemodifikovaný/modifikovaný polymer²³, β -cyklodextrinů (CM- β -CD)²⁴, či protein²⁵ a v neposlední řadě nanočástice²⁶.

Nejčastěji využívanými separačními nosiči využívanými v EKC jsou tenzidy a metoda související s využitím této (pseudo)fáze je označována jako micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Mechanismus separace pomocí MEKC je založen na rozdělování sledované látky (analytu) mezi okolní prostředí pufru a micelární fázi dispergovanou v pufru²⁷. Schéma separačního mechanismu MEKC znázorňuje Obrázek 2.



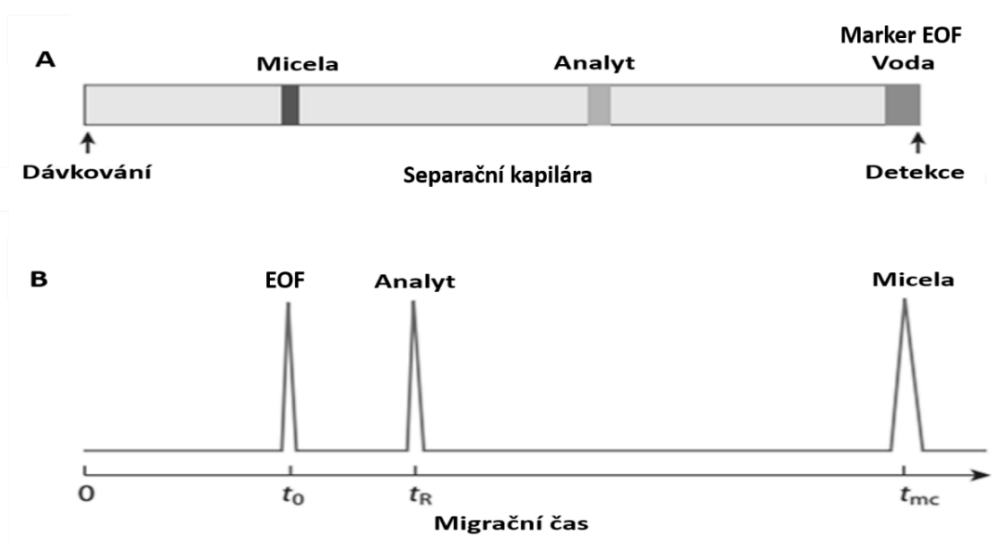
Obrázek 2: Schéma znázorňující mechanismus separace MEKC. Převzato a upraveno²⁸.

Nejčastěji využívaným tenzidem pro MEKC separace je dodecylsulfát sodný (SDS), který ve vodném prostředí tvoří negativně nabitě micely. Podmínkou kontinuálního separačního procesu je relativní pohyb (pseudo)fází, který je vyvolán elektroosmotickým tokem, definovaný rychlostí v_{eof} . V opačném směru se elektroforeticky pohybují micely SDS, a to rychlostí v_{ep} . Ve výsledku je směr pohybu obou fází shodný, avšak s různými rychlostmi

pohybu, neboť elektroforetická mobilita micely v_{ep} je nižší než absolutní hodnota rychlosti elektroosmotického toku v_{eof} . Tyto skutečnosti jsou také schematicky znázorněny na Obrázku 2.

V MEKC analýze je retence látek limitována tzv. elučním oknem. Elučním oknem můžeme rozumět rozdíl mezi retenčním časem markeru migrace micel (t_{mc}) a neutrálním markerem EOF (t_0). Markerem pro samotné micely jsou využívány silně hydrofobní látky. Tyto látky jsou zcela inkorporovány do micel a nemůže tak nastat situace, že by jeden ze sledovaných analytů měl větší retenční čas. Nejčastěji využívané markery micel jsou dodekafenon, dodecylbenzen či Sudan III²⁸.

Pro vyjádření času, který analyt stráví v separační kapiláře se v MEKC využívá retenčního času t_R , aby byla lépe vystižena kombinace chromatografického a elektroforetického separačního mechanismu. Separací mechanismus MEKC je ovlivňován vlastní rychlostí micel a směrem či velikostí EOF působícího na migraci micel (separačního nosiče). Jak již bylo zmíněno, retence látek je limitována elučním oknem, ohraničeným markerem EOF (t_0) a markerem micel (t_{mc}). Retenční časy všech stanovovaných látek, analytů musí tedy náležet do tohoto elučního okna ($t_0 < t_R < t_{mc}$) jak můžeme vidět na Obrázku 3.

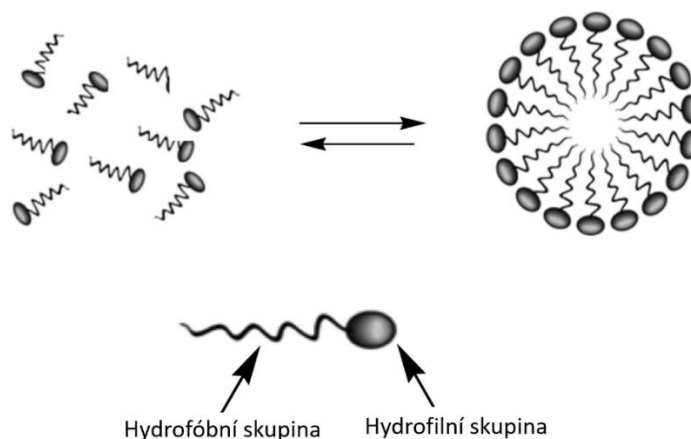


Obrázek 3: Schématické zobrazení elučního okna normálního módu MEKC. Převzato a upraveno²⁸.

K rozdílné rychlosti analytů vede rozdílná afinita sledovaných látek vůči micelární (pseudo)fázi. Analyty jsou zpomalovány rozdílnými zpětnými pohyby micel. Obecně lze říci, že se snižující se afinitou k micelární (pseudo)fázi je retence analyzovaných látek nižší⁸.

2.1.2.1 Druhy tenzidů

Tenzid je látka, která je schopná za daných podmínek v daném prostředí schopná vytvářet supramolekulární útvary, tzv. micely po překročení kritické micelární koncentrace (CMC, mol/l). Micela je charakterizována již zmíněnou CMC, ale také agregačním číslem (AN). Agregační číslo vyjadřuje, jaký počet monomerních jednotek (tenzidů) vytváří micelu. Monomerní jednotky, tedy tenzidy jsou ve své podstatě látky složeny z hydrofilní a hydrofobní části, jak je jednoduše vyobrazeno na Obrázku 4²⁹.



Obrázek 4: Schématické vyobrazení micely ve vodném prostředí a jejich vznik z tenzidů²⁹.

K tvorbě a agregaci micel dochází, pokud se koncentrace tenzidu ve vodném prostředí blíží nebo je vyšší než hodnota CMC. Fyzikálně-chemické vlastnosti silně ovlivňují tvorbu micel v roztocích. Mezi tyto fyzikálně-chemické vlastnosti patří např. viskozita, iontová síla, permitivita prostředí, pH nebo teplota. Hodnoty CMC micel mohou být ovlivňovány několika parametry. Jako příklad může být uveden přídavek organického rozpouštědla, který hodnotu CMC zvyšuje, popřípadě může dojít k rozpadu micel³⁰.

Tenzidy mohou být obecně rozděleny do čtyř základních skupin, mezi něž patří kationtové, aniontové, neiontové a zwitteriontové tenzidy. Zcela nejvíce používaným tenzidem ve vodném prostředí je SDS, který se zařazuje mezi aniontové tenzidy. Jeho hodnota CMC je $8,1 \cdot 10^{-3}$ mol/l a agregační číslo má hodnotu 62 pro deionizovanou vodu při teplotě 25 °C²⁸.

2.1.3 POKRYTÍ KAPILÁR IONTOVÝMI POLYMERY

Kapilární elektroforéza (CE) se stala mocným nástrojem k analýze biologických vzorků jako proteinů a peptidů^{31,32}. Nicméně v analýze proteinů (séra) pomocí CE byla pozorována významná ireverzibilní adsorpce proteinů na vnitřní straně nepokryté křemenné kapiláry. Mezi vnitřní stranou kapiláry a proteinem existují Coulombické a/nebo hydrofobní interakce. Je tedy třeba minimalizovat adsorpci proteinu na vnitřní stěnu kapiláry modifikací vnitřní stěny křemenné kapiláry.

Obecně můžeme modifikace vnitřní stěny křemenné kapiláry rozdělit na následující:

- 1) Dynamické pokrytí přidavkem kationtového/neutrálního modifikátoru do BGE³³⁻³⁵.
- 2) Adsorpce kationtového modifikátoru na stěnu kapiláry trvale fyzickou adsorpcí³⁶⁻³⁸.
- 3) Zafixování hydrofilní vrstvy trvale kovalentní vazbou a/nebo zesíťováním³⁹⁻⁴¹.

Dynamické pokrytí za pomoci modifikátoru je nevhodnou metodou hlavně při využití kombinace CE-MS jelikož přítomnost nevodivých složek v pufru může zhoršit ionizaci analytů⁴².

Z tohoto důvodu by byla vhodnější trvalá modifikace, avšak ani fyzikální adsorpce ani kovalentní vazba nejsou ideálními postupy. Fyzická adsorpce má krátkou životnost, zatímco postup pokrývání je velmi snadný a vykazuje velmi dobrou reprodukovatelnost⁴³. Některé z kovalentních vazeb a/nebo zesíťování naopak vyžaduje relativně komplikovaný postup pokrytí vycházejícího z rozmanitosti povrchu křemenných kapilár. Využití kovalentních vazeb a/nebo zesíťování má za následek dlouhou životnost díky např. zesíťovanému dvouvrstvému pokrytí.

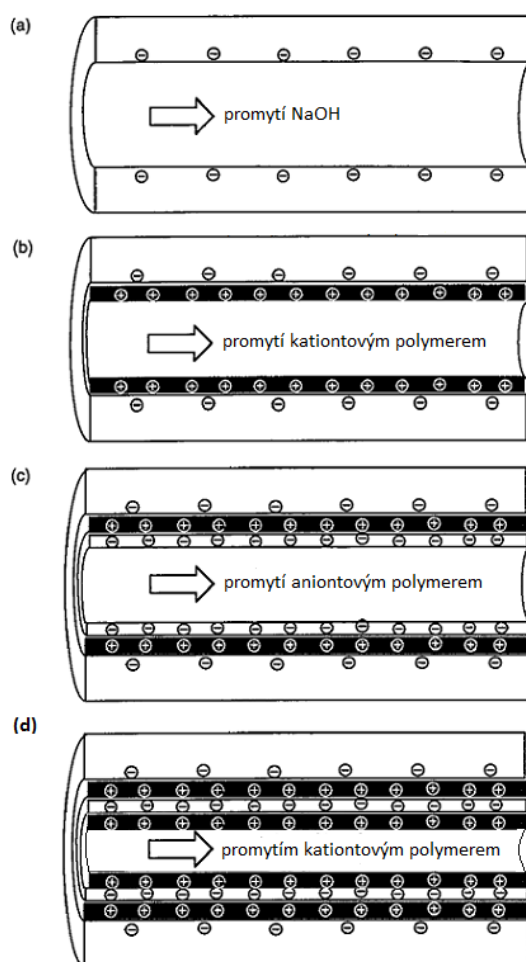
Jednou z možných stabilních modifikací je tzv. SMIL pokrytí (SMIL – *successive multiple ionic-polymer layer*), založené na jednoduchém procesu postupného vícenásobného pokrytí iontovými polymerem⁴⁴. SMIL pokrytí vzniká postupným pokrytím vnitřní stěny křemenné kapiláry kationtovým polymerem, následované aniontovým polymerem, který se váže na již navázaný kationtový polymer a na závěr opět pokrytím kationtovým polymerem, jak je schematicky znázorněno na Obrázek 5. Pro SMIL modifikaci byl v našem případě využit dextran sulfát (DS) jako aniontový polymer a Polybren (PB) jako polymer kationtový. K aktivaci silanolových skupin pak byl využit hydroxid sodný (NaOH).

SMIL pokrytí křemenné kapiláry je tak velmi vhodným způsobem modifikace kapiláry, a to z důvodu velmi jednoduchého postupu pokrývání, který tak můžeme očekávat jako alternativní postup pokrytí pro kovalentní vazby.

Účinnost pokrytí pomocí SMIL postupu je velmi závislá na silanolových skupinách, které jsou na stěně křemenné kapiláry. Navázání PB vrstvy je hluboce ovlivněno rozdílem v tavení oxidu křemičitého. Avšak díky velmi snadnému postupu pokrytí kapiláry je opakovatelnost pokrytí velmi dobré.

Stabilita SMIL pokryté kapiláry je výrazně lepší ve srovnání s konvenčními PB – modifikovanými kapilárami. SMIL kapilára je tolerantní k organickým rozpouštědlům, 1M NaOH, 0,1M HCl i aktivním látkám. Vykazuje velikou životnost (až 600 analýz) díky silnější interakci mezi PB a aniontovým polymerem než interakci mezi PB a kapilární stěnou⁴⁵.

SMIL pokryté kapiláry vykazují vhodné vlastnosti pro CZE a MEKC analýzy. Kromě proteinů byla prokázána pomocí CE-MS i efektivní analýza kationtových látek.



Obrázek 5: Schéma postupu SMIL pokrytí. (a) aktivace silanolových skupin, (b) první vrstva pokrytí kationtovým polymerem, (c) druhá vrstva pokrytí aniontovým polymerem, (d) třetí (konečná) vrstva pokrytí opět kationtovým polymerem. Převzato a upraveno z ^{44,45}.

2.1.4 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Detekce v CE je často řešena *on-column* prostřednictvím optických spektroskopických technik, jako je např. UV detekce, nebo laserem indukovaná fluorescence (LIF). UV detekce je nejčastější detekční technikou používanou ve spojení s CE, protože je jednoduchá a široce použitelná, ale postrádá selektivitu a poskytuje pouze omezenou citlivost. LIF je mnohem citlivější, avšak její použitelnost je omezená přítomností fluoroforu v molekule detekované látky. Detekce hmotnostní spektrometrií (MS), která je v současné době jednou z nejsilnějších detektorů pro separační techniky kapalné fáze, je zřejmou atraktivní alternativou k uvedeným detektorům i v CE.

V roce 1987 bylo poprvé prezentováno spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem⁴⁶. Vznikla tak zajímavá kombinace dvou vysoce výkonných analytických technik. CE, jak již bylo zmíněno, poskytuje vynikající separační účinnost. Nicméně díky krátké optické dráze, kvůli malým kapilárním průměrům, je citlivost detekce nižší, než mohou dosáhnout jiné separační techniky. Na druhé straně, hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS), jak již bylo prokázáno, poskytují nízké limity detekce a rychlé odezvy jako detektor pro kapalinovou chromatografii. Spojení CE-MS tak umožňuje separovat a detekovat látky i s relativně nízkými detekčními limity, a navíc umožňuje jejich identifikaci. Toto spojení nabízí široké uplatnění při analýze analytů nejrůznější povahy od organických molekul, anorganických iontů, až po makromolekulární systémy⁴⁷.

Spojení CE-MS je specifické a je tedy potřeba zvolit robustní a efektivní rozhraní. Pro toto spojení je tedy nutné, aby rozhraní a ionizační technika, které byly použity nesnižovaly separační účinnost CE a přesto zcela využili citlivost MS⁴⁸.

2.1.4.1 Ionizační techniky pro spojení CE-MS

Ionizační techniky, které jsou využity pro spojení CE-MS jsou shodné s ionizačními technikami pro spojení LC-MS. Tato skutečnost je dána díky skupenstvím studovaných látek, neboť ionizace samotných analytů probíhá z kapalné fáze⁴⁹. Oproti spojení LC-MS, ionizace spojení CE-MS výrazně závisí na použitém separačním mechanismu, jako je např. micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) nebo kapilární zónová elektroforéza (CZE).

Dnes nejběžnějším používaným rozhraním pro ionizaci výše zmíněných spojení jsou chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a ionizace elektrosprejem (ESI), která jsou souhrnně označována jako ionizace za atmosférického tlaku (*Atmospheric Pressure Ionization – API*)⁵⁰. Výsledkem tzv. měkkého způsobu ionizace je molekulární iont, který díky nízké fragmentaci studovaných iontů nese hlavně informaci o molekulové hmotnosti detekovaného analytu. Malá nebo žádná fragmentace studovaných iontů má za následek neúplnou strukturní analýzu. Tuto skutečnost však můžeme vyřešit pomocí kolizí indukované disociace (CID) molekulárního iontu. Takto získané fragmentační spektrum umožňuje objasnit strukturu analyzovaných látek⁵¹.

Mezi další ionizační techniky, které je možno využít pro spojení CE-MS jsou fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)⁵², desorpční analýza elektrosprejem (DESI)⁵³, přímá analýza v reálném čase (DART)⁵⁴ a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)⁵⁵.

Chemická ionizace za atmosférického tlaku

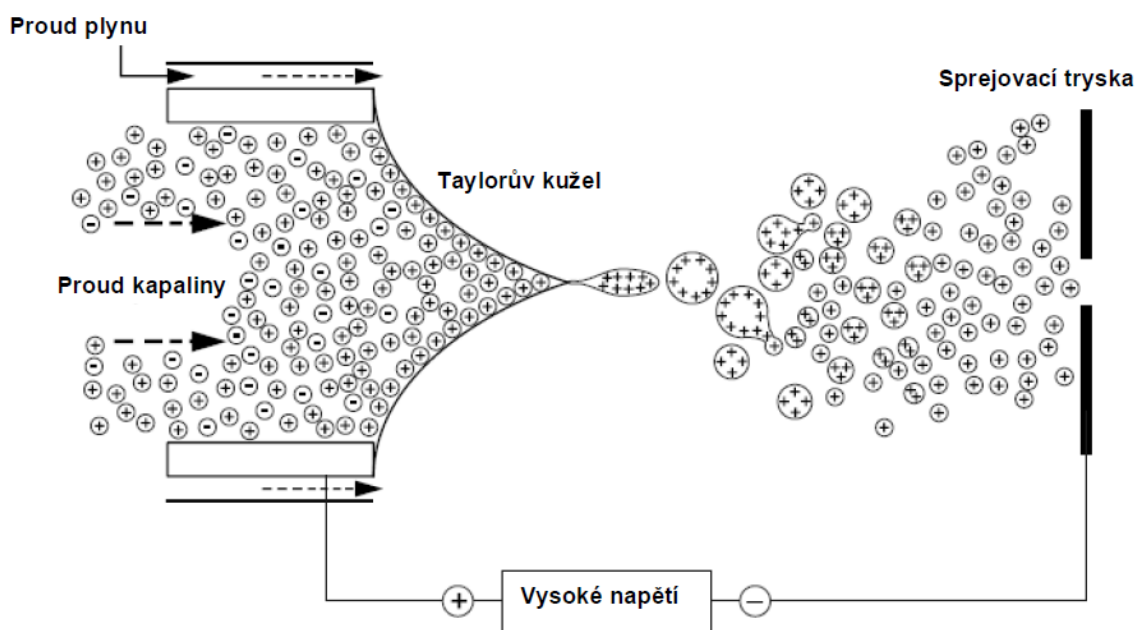
Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)⁵⁶ je vhodným nástrojem pro ionizaci i méně polárních látek a povrchově aktivních látek. APCI je vhodná pro spojení s CZE-MS⁵⁷ a MEKC-MS⁵⁸. Mezi další výhodu APCI bezesporu patří možnost použití běžných málo těkavých pufrů pro CE separace.

Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem byla poprvé navržena jako iontový zdroj pro hromadnou analýzu Dolem a spol.⁵⁹. Ionizace elektrosprejem (ESI) je bezesporu nejvyužívanější ionizační technika pro spojení CE-MS⁵⁹. Proto lze aplikace CE-ESI-MS najít ve většině současně publikovaných prací^{47,60,61}. ESI se řadí opět mezi měkké ionizační techniky, při nichž téměř nedochází k fragmentaci. Toto spojení je omezeno pouze na ionogenní a nabitě molekuly, avšak v této skupině umožňuje ionizovat molekuly od velmi malých molekulových hmotností až po vysokomolekulární polypeptidy a bílkoviny⁵⁹.

Spojení CE-ESI-MS je založeno na principu ESI ionizace využívající sprejování kapaliny vytékající z křemenné kapiláry přes kovovou sprejovací špičku. Na konec sprejovací špičky je vkládáno vysoké napětí, zároveň je do této části přiváděn pomocný inertní plyn (nejčastěji dusík). V první fázi ESI dochází k odpařování rozpouštědla a na konci sprejovací špičky tak dochází k tvorbě nabitých kapiček s vysokou hustotou náboje. Díky přivádějícímu pomocnému, sušícímu plynu jsou takto vzniklé kapičky zmenšovány. Ionty v kapičce

na sebe navzájem působí tzv. elektrostatickou repulzí. Postupným zmenšováním nabitých kapiček narůstá povrchové napětí. Pokud působení repulzních sil přesáhne kritické hodnoty povrchového náboje (tzv. Rayleighův limit) dojde k expanzi nabitých částic, což má za následek vznik menších kapiček a v ideálním případě až k jednotlivým iontům v plynné fázi⁶². Ionty v plynné fázi vnikají díky tzv. Coulombické explozi. Schéma vzniku elektrospreje je znázorněno na Obrázku 6.



Obrázek 6: Schéma tvorby iontů v plynné fázi pomocí ionizace elektrosprejem⁶³.

Spojení CE-MS je však komplikováno nekompatibilitou běžně používaných základních elektrolytů CE a jejich průtoků. V ESI není možno využívat poměrně koncentrované roztoky pufrů využívajících v CE, neboť by docházelo ke snížení nebo dokonce potlačení ionizace a také kontaminace samotného iontového zdroje. Pro spojení CE-ESI-MS jsou využívány roztoky těkavých kyselin a jejich amonných solí⁶⁴.

2.1.4.2 Rozhraní spojení CE-ESI-MS

Spojení CE-ESI-MS disponuje několika problémy, mezi něž patří velmi nízký průtok vycházející kapaliny z CE křemenné kapiláry (nl/min) a nutností vytvoření uzavřeného elektrického obvodu (separační okruh).

Spojení obou konců kapiláry se zdrojem vysokého napětí je v CE zajištěno separačním okruhem. Separační okruh je velmi snadno uskutečnitelný v případě tzv. *on-column* detekce,

při nichž jsou oba její konce kapiláry ponořeny v elektrodoých nádobkách naplněných vodivým roztokem elektrolytu. Přívod napětí je zabezpečen platinovými elektrodami, taktéž v elektrodoých nádobkách. Značně komplikovanější řešení má tzv. *post-column* detekce, kdy je detektor zařazen až za konec kapilárního lože. Tímto typem detekce je například MS ve spojení s ESI, jak již bylo zmíněno výše. V případě spojení CE-ESI-MS je zapotřebí uzavřít separační okruh a dovolit tak na konci kapiláry aplikaci napětí ke správné funkci elektrospreje. Uzavření separačního okruhu může být zajištěno vhodným rozhraním⁶⁵.

Mezi další komplikace tohoto spojení patří nekompatibilita objemového průtoku kapaliny vycházející z křemenné kapiláry CE do MS části. Při spojení CE-ESI-MS musí být zajištěna stabilita elektrospreje, aby tak mohlo docházet na konci kapiláry na tzv. sprejovací kapiláře k ionizaci sledovaného analytu. Typickým průtokem kapalin přes sprejovací kapiláru v případě ESI jsou desítky až stovky $\mu\text{l}/\text{min}$. Při CE separaci je průtok pracovního elektrolytu v křemenné kapiláře zajištěn využitím tlaku, který je aplikován na vstupní konec kapiláry nebo využitím EOF. V křemenné kapiláře je rychlost EOF řádově jednotky až stovky nl/min .

Pro řešení problémů doprovázející spojení CE-ESI-MS jsou nejvíce využívány tři druhy rozhraní: (a) kapalinový spoj (*liquid-junction interface*), (b) bez přídavné kapaliny (*sheathless*), a (c) s přídavnou kapalinou (*sheath-flow*)^{65,60,49,48}.

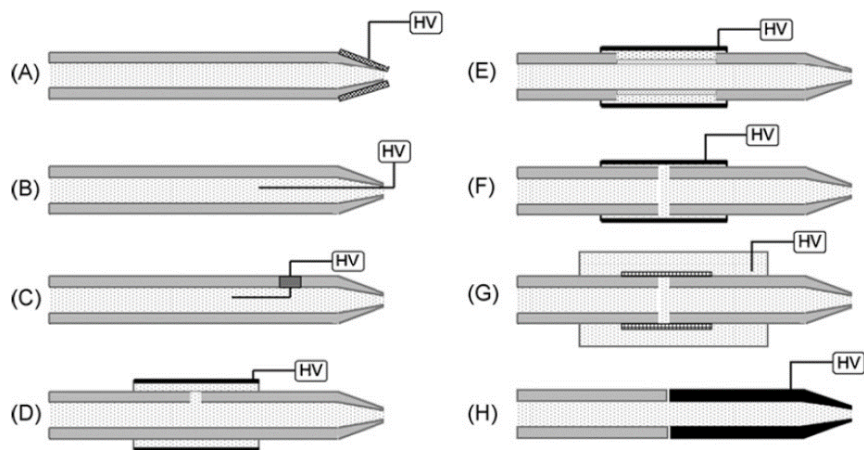
Rozhraní využívající kapalinový spoj

V posledních čtyřech letech málo vyvinuté a málo používané rozhraní využívající kapalinový spoj (*liquid-junction interface*) bylo navrženo E. D. Lee⁶⁶. Princip kapalinového spoje pro spojení CE-ESI-MS je velmi jednoduchý. Je zde komůrka naplněná sprejovací kapalinou a do této komůrky je vsunuta separační kapilára, která je zde přerušena. Sprejovací kapalina je pod tlakem vhaněna právě přes přerušeni do kapiláry. Zpětnému toku kapaliny zabraňuje zvýšení vstupního tlaku při vstupu do separačního prostředí. V konečném důsledku je optimální konstrukce dosaženo pouze za předpokladu, že je tlak v komůrce se sprejovací kapalinou a vstupní tlak shodný⁶⁷. T-spoj mezi ESI emitorem a kapilární CE je však velmi konstrukčně náročný. Rozhraní kapalinového spoje je využíváno převážně v mikro-CE-ESI-MS metodách, a to pro analýzy vzorků v nejrůznějších matricích, nejčastěji poté v klinických analýzách⁶⁸. Rozhraní kapalinového spoje je výhodné hlavně pro svou robustnost a relativně vysoký poměr signálu k šumu⁶⁵.

Rozhraní bez přídavné kapaliny

Prvním rozhraním pro spojení CE-ESI-MS bylo rozhraní bez přídavné kapaliny (*sheathless interface*) bylo publikováno Olivaresem a spol.⁴⁶ v roce 1987. V tomto případě separační kapilára ústí přímo do sprejovací kapiláry iontového zdroje. K vytvoření separačního okruhu není zapotřebí dalších elektrolytů, nedochází tak k zředování separovaných zón. Zředování separačních zón je však nevýhoda při využití dalších dvou druhů rozhraní *liquid-junction* a *sheath-flow*. Mezi další výhody rozhraní bez přídavné kapaliny bezesporu patří opakovatelnost migračních časů stanovovaných analytů a vysoká citlivost. Toto rozhraní však disponuje i značnou nevýhodou, což je nízký průtok elektrolytu křemennou kapilárou (řádově nl/min). Hrozí tak, že vzniklý elektrosprej bude nestabilní a bude tak docházet k neúplné ionizaci⁶⁹. Rozhraní bez přídavné kapaliny je velmi vhodné ve spojení s mikro a nano-ESI, neboť dovoluje využití i méně těkavých či dokonce netěkavých složek BGE k separaci a průtok křemennou kapilárou způsobený EOF je pro danou aplikaci dostačující⁷⁰.

Existuje široká škála různých typů rozhraní bez přídavné kapaliny, vylepšení se téměř vždy vztahuje k základním charakteristikám jako je tvar sprejovací špičky, vytvoření elektrického kontaktu, materiál zabezpečující elektrický kontakt. Průměr sprejovací špičky je snižován, aby bylo dosaženo stabilnějšího elektrospreje a vyšší citlivosti. Zkosení sprejovací špičky je získáváno zahříváním a poté tvarováním terminálního konce kapiláry CE. Elektrické kontakty pak mohou být vytvořeny několika způsoby, které jsou shrnuty na Obrázku 7.



Obrázek 7: Schéma vytvoření elektrického kontaktu CE-ESI-MS bez přídavné kapaliny. (A) nátěrové hmoty na emitoru špičky, (B) drátek vložený do špičky, (C) drátek vložený skrz otvor v kapiláře, (D) rozhraní s rozděleným tokem a kovovým povlakem, (E) pórovitá, vrytá kapilární stěna v kovovém obalu, (F) spojení s kovovým obalem, (G) mikrodializační spojení a (H) spojení s vodivým emitorem špičky. Obrázek je převzat ⁴⁸.

Snad nejvíce rozšířeným typem pro vytvoření elektrického kontaktu je potažení vnějšího povrchu (nevodivého) emitoru špičky vodivým materiálem, jako je zlato⁷¹, stříbro⁷², měď⁷³, nikl⁷⁴ nebo grafit⁷⁵, jak je znázorněno na obrázku 7A. Vodivý materiál na konci separační kapiláry je ponořen do BGE a je tak uzavřen separační okruh. Zároveň je tím i vloženo napětí na sprejovací špičku. Bohužel, potažené hroty separační kapiláry mají krátkou životnost, a to z důvodu vysokých elektrických polí aplikovaných na kovový povlak na špičce. Toto provedení je možno využívat maximálně několik dní (1 h – 5 dní). Stabilita se může zlepšit předběžným opracováním povrchu kapiláry nebo mícháním různých materiálů do povlaku⁷⁵.

Alternativou k potažení špičky kovovým materiálem je vložení elektrody (zlatý nebo platinový drátek) do kapilárního kanálku a vytvoření elektrického kontaktu. Je třeba použít větší vnitřní průměr kapiláry a tenká drátková elektroda může být vložena do konce kapilárního kanálku⁷⁶, jak je znázorněno na obrázku 7B, nebo do malého otvoru vyvrtaného v blízkosti konce kapiláry⁷⁷, jak je znázorněno na obrázku 7C. Při těchto dvou konstrukcích elektrického kontaktu však dochází ke vzniku turbulence, která snižuje rozlišení separace CE. Také díky elektrolyze BGE může docházet ke vzniku bublin uvnitř kapilárního kanálku a tím k destabilizaci elektrospreje.

Další možnou konstrukcí pro vytvoření elektrického kontaktu je rozdělení toku kapaliny z kapiláry, část proudu kapaliny je tak v kontaktu s vnějším povrchem kapiláry. Touto frakcí BGE je pak přiváděno napětí elektrospreje. Toto uspořádání je známo jako rozhraní rozděleným tokem (*split-flow*) a je znázorněno na obrázku 7D. Dělení toku kapaliny z kapiláry je dosaženo díky vyvrtanému otvoru nebo trhlince. Tato konstrukce je jediná kapilára, která slouží jednak jako separační komora, tak jako špička elektrospreje⁷⁸. Výhody této konstrukce elektrického kontaktu jsou jednoduchost a robustnost a také bezesporu fakt, že nedochází vlivem elektrolyzy BGE ke tvorbě bublinek na elektrodě. Mezi hlavní nevýhodu této konstrukce patří vytvoření reprodukovatelného otvoru nebo trhliny, které poskytují požadovaný poměr pro vytvoření průtokové cesty pro dělení kapaliny.

Pro jinou konstrukci může být také využita kyselina fluorovodíková k vyleptání části vnějšího povrchu křemenného skla kapiláry do okamžiku, kdy se kapilární stěna stane porézní. Přes tuto porézní část kapiláry mohou poté procházet malé ionty elektrolytu. Elektrický kontakt této konstrukce je poté zajištěn přes kapilární stěnu, a to ponořením leptané části kapiláry ve vyrovnávacím zásobníku⁷⁹, nebo vložení do kovového obalu naplněném tenkou vrstvou kapaliny⁸⁰, jak je znázorněno na obrázku 7E. Opět nedochází k elektrolyze BGE v separačním prostředí. Rozhraní tohoto typu je docela úspěšné, avšak

využití koncentrované kyseliny fluorovodíkové má za následek křehkost naleptané části kapiláry a také možnost interakcí některých látek např. peptidů se stěnou kapiláry.

V případě rozdělené konstrukce je kapilára rozdělena na dvě části, separační část a emitér. Kapilára a špička emitoru jsou úzce připojeny dohromady, takže není potřeba zavádět další proud. Elektrický kontakt je získán spojením dvou částí kapiláry svorkou s kovovou elektrodou. Takto vytvořené kovové pouzdro je připojeno ke zdroji energie a uzavírá tak separační okruh. Na obrázku 7F je zobrazeno toto spojení pomocí kovového obalu⁸¹. Takto vzniklé spojení je robustní a stabilní, avšak nevýhodou je malá reprodukovatelnost otvoru mezi úseky kapiláry, které může mít za následek rozmývání zón.

Velmi obdobnou konstrukcí je mikrodialyzační spojení⁸² uvedené na obrázku 7G. Za pomoci koncentrované kyseliny fluorovodíkové je oblast emitéru leptána a tato část kapiláry se stává porézní. Díky tomu mohou přes tuto část kapilární stěny procházet malé ionty, které tak zajišťují uzavření separačního okruhu. Opět mohou být zdůrazněny výhody spojení s touto konstrukcí, jež jsou: jednoduchost výroby a reprodukovatelnost výroby, v separačním prostředí nedochází k elektrolýze BGE, a tak tvorbě bublinek a není třeba další úpravy emitéru. V důsledku využití koncentrované kyseliny fluorovodíkové v oblasti emitoru je naleptaná část křehká⁸³.

Zatím nejnovější konstrukce a také jediná konstrukce rozhraní bez přídavné kapaliny, která je vyráběna komerčně je zobrazena na obrázku 7H. Jedná se o konstrukci kdy je kapilára rozdělena na dvě části, separační část a emitér. Emitér je vyroben z vodivého materiálu a jedná se tedy o kovovou kapiláru. Tato konstrukce disponuje jistou stabilitou a robustností. Z důvodu nestejných průměrů kapilár, na spoji kovové a křemenné kapiláry může nastat rozmývání zón. Navíc může docházet k elektrolýze BGE na rozhraní kapalina-kov⁸⁴.

Avšak design rozhraní bez přídavné kapaliny, je rychle opouštěn ve prospěch koaxiálního rozhraní pomocné kapaliny, aby se zvýšila stabilita a slučitelnost párových technik CE a MS.

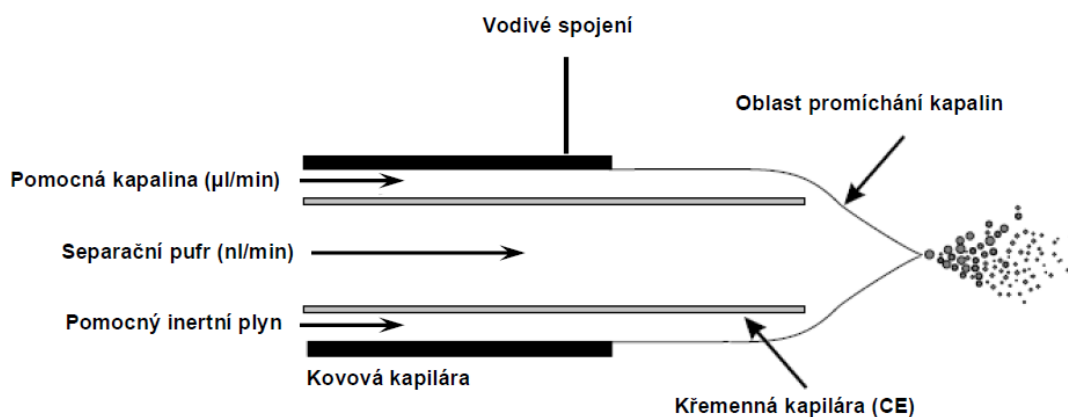
Rozhraní s přídavnou kapalinou

Rozhraní s přídavnou kapalinou tzv. *sheath-flow* bylo poprvé představeno Smithem a spol.⁶⁹ a představuje nejběžnější přístup ve spojení CE s ESI-MS. Tato konstrukce rozhraní využívá dalšího toku kapaliny známé jako přídavná nebo pomocná, která se mísí s pufrem CE při jeho výstupu ze separační kapiláry. Přídavná kapalina má v této konstrukci několik úloh. Prvním z nich je vytvoření elektrického kontaktu (vodivého spojení) mezi elektrodou a BGE

uvnitř kapiláry, aby byly propojeny CE a ESI-MS procesy. Další úlohou přídavné kapaliny je upravení kompozice elektrolytu CE a vytvoření stabilního elektrospreje. Kromě toho v raných stádiích CE-MS vývoje byla většina rozhraní upravena tak, aby se vešli do stávajícího LC-MS zařízení, které vyžaduje mnohem vyšší průtoky než CE. Proto můžeme říci, že přídavná kapalina slouží k navýšení průtoku kapaliny na úrovni srovnatelné s těmi v LC.

Nejběžnější konstrukcí tohoto rozhraní je koaxiální (souosé) uspořádání s přídavnou kapalinou schematicky znázorněného na Obrázku 8. Aktuálně dostupné komerční CE-MS rozhraní zaměstnává hned 3 trubice koaxiálně uspořádané. Trubice nejvíce ve středu je separační kapilárou, která mírně vyčnívá před druhou trubicí, kam ústí přídavná kapalina. Třetí, vnější trubice dodává přívod pomocného plynu, který přispívá ke zlepšení sprejovací stability a odpaření rozpouštědla z generované mikrokapky.

Směšovací objem musí být snížen na minimum, aby se zabránilo rozšiřování zón působením difúze. To znamená, že vzdálenost mezi kapilárou CE a kapilárou přídavné kapaliny by měla být co nejkratší.



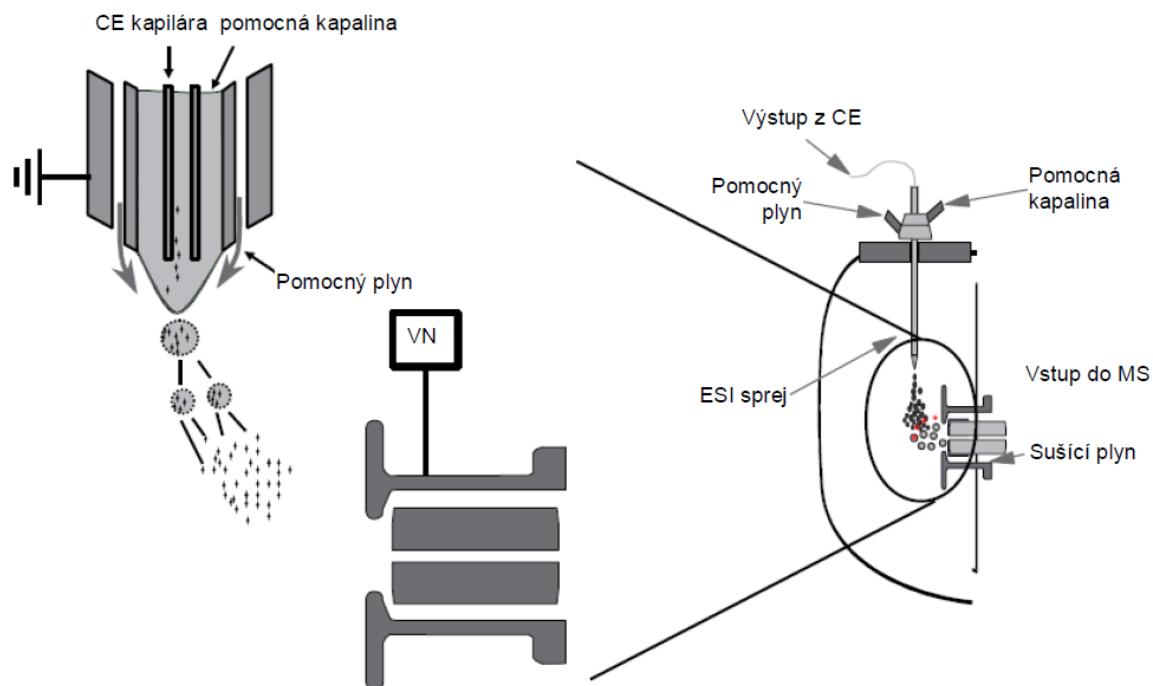
Obrázek 8: Schéma rozhraní s přídavnou kapalinou ve spojení CE-ESI-MS. Převzato a upraveno⁶³.

V tomto nejběžnějším uspořádání neexistuje mrtvý objem, proto separace v samotné kapiláře není ovlivněna dalšími toky. Nicméně významné průtoky přídavné kapaliny, které jsou potřebné ke stabilnímu provozu, vedou k významnému ředění analytů. Také může být vytvořen podtlak v důsledku toku tekutiny kolem konce pláště kapiláry, tzv. sacího efektu přídavné kapaliny, který může vést k parabolickému profilu průtoku a tím snížení rozlišení^{85,48}.

Pufry s vysokou koncentrací solí mají negativní dopady na účinnost elektrospreje a ředěním pufry přídatnou kapalinou se stabilita spreje zlepšuje. Nicméně v důsledku zachování účinné elektroforetické separace, přídatná kapalina, která působí jako vyrovnávací, musí také obsahovat elektrolyt. Volba koncentrace tohoto elektrolytu je kompromis mezi účinností separace (vysoce koncentrovaný solný roztok) a účinností rozprašování (nízká koncentrace solí)⁶⁰.

Rozhraní s přídatnou kapalinou vykazuje méně příznivé detekční limity než rozhraní bez přídatné kapaliny (*sheathless*)^(cit.86), nicméně velkou výhodou tohoto rozhraní je jednoduchost a reprodukovatelnost konstrukce za účelem časté aplikace tohoto rozhraní v CE-MS.

Komerčně dostupné rozhraní je v tzv. ortogonálním uspořádání, kdy sprejovací špička ESI se vstupem do hmotnostního spektrometru zaujímá určitý uhel, zpravidla 90°, jak je schematicky znázorněno na Obrázku 9. Využití ortogonálního zapojení má výhodu na rozdíl od lineární geometrie spoje CE-ESI-MS, a to hlavně v zabránění kontaminace iontového zdroje jak přídatnou kapalinou, tak také složkami separačního pufry.



Obrázek 9: Schéma pro ortogonální uspořádání CE-ESI-MS. Převzato a upraveno⁹.

2.1.4.3 Trojitý kvadrupól

Hmotnostní analyzátory je hlavní část samotné instrumentace hmotnostní spektrometrie, která zde vystupuje jako disperzní prvek. V hmotnostním analyzátoru dochází k dělení iontů podle jejich hodnot m/z v závislosti na čase a prostoru. Tyto ionty jsou přiváděny z iontového zdroje, kde dochází k jejich samotnému vzniku. Můžeme zmínit několik druhů hmotnostních analyzátorů, které jsou vybírány pro účely experimentu v závislosti na jejich cenových parametrech, ale hlavně pro jejich různé principy mechanismu separace iontů.

Mezi zástupce hmotnostních analyzátorů můžeme zařadit magnetický/elektrický sektorový analyzátor, který je nejstarším typem analyzátoru. Dnes již se prakticky s tímto hmotnostním analyzátozem nesetkáme i přes jeho možnost pracovat v relativně vysokém rozlišení. Mezi další analyzátory patří detektor doby letu (TOF). Základní princip detekce s využitím TOF analyzátoru byl objasněn již roku 1946⁸⁷. Iontová past (IT) je analyzátor založen na principu téměř shodným s kvadrupólovým filtrem. Dochází zde však k uchování analyzovaných iontů v RF kvadrupólovém poli. Mezi nejmladší typ hmotnostních analyzátorů patří orbitrap. Princip orbitrapu byl patentován až v roce 2004 i přesto, že objasněn byl již v roce 1996⁸⁸. Iontová cyklotronová rezonance (ICR) je považován za nejcitlivější hmotnostní analyzátor. Principem hmotnostního analyzátoru ICP je pohyb iontů v homogenním magnetickém poli cyklotronové cely⁸⁹.

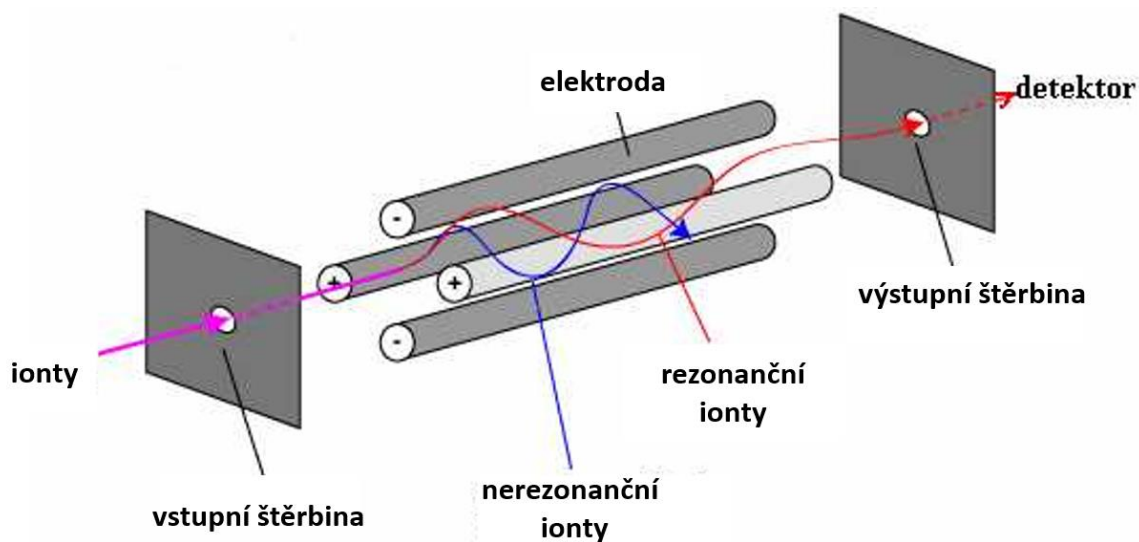
Princip kvadrupólového filtru je založen na oscilaci iontu, jež je přiveden do středu kvadrupólu. Tyto principy byly objasněny už roku 1953⁹⁰. Kvadrupólový filtr je složen ze čtyř shodných paralelních tyčí kruhového průřezu. Na dvě protilehlé kovové tyče je vkládáno záporné/kladné stejnosměrné napětí a zároveň je na všechny kovové tyče superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí, které je fázově posunuto dle rovnice (13)⁹¹.

$$\Phi_0 = (U + V \cos \omega t) \quad (13)$$

V této rovnici vystupuje angulární frekvence ω [rad/s] ($\omega = 2\pi\nu$, kde ν vystupuje jako frekvence RF napětí), U jako stejnosměrné napětí ($\sim 500\text{--}2000$), V vystupuje jako amplituda radiofrekvenčního (RF) napětí (-3000 až $+3000$ V) a t jako čas.

Ionty analytů o určité hodnotě m/z vznikající v iontovém zdroji, jsou za pomoci iontové optiky přiváděny do kvadrupólového filtru. Ionty v kvadrupólovém filtru jsou poté ovlivňovány elektrickým polem a dochází tak k samotné oscilaci sledovaných iontů. Aby bylo dosaženo pohybu oscilujících iontů až k samotnému detektoru, je třeba dosáhnout stabilní dráhy, a to pomocí dvou parametrů – amplituda V a vložené napětí U . Hodnoty

U a V jsou měněny během skenovacího módu analyzátoru, a to vždy tak, aby mezi nimi byl udržován konstantním poměr ($U/V = \text{konst.}$). Obecně to znamená, že pomocí změn hodnot U a V mohou kvadrupólovým filtrem projít pouze ionty o určité hodnotě m/z a zbylé ionty, které nevyhovují stabilní dráze, a nemůže tedy docházet k jejich průchodu, až k detektoru jsou tzv. vybity na kovových tyčích kvadrupólu. Schematicky můžeme vidět na Obrázku 10 obě situace.

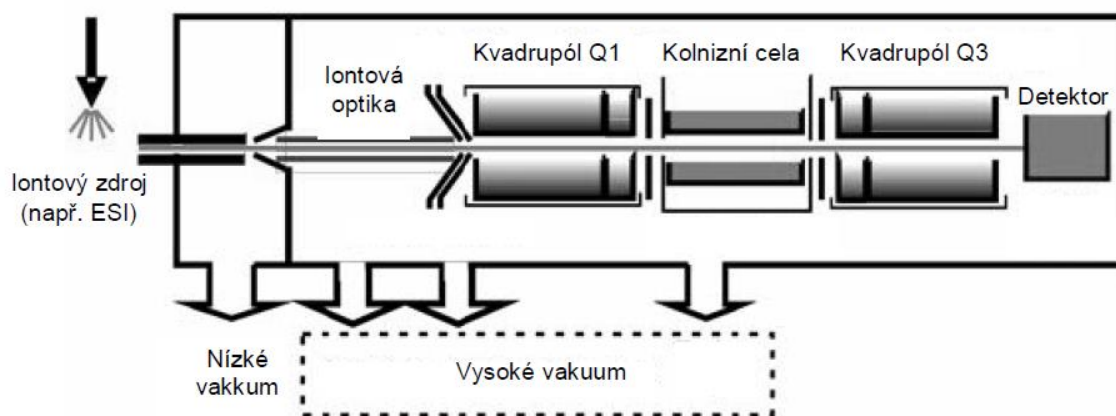


Obrázek 10: Schématické znázornění kvadrupólového filtru a jeho mechanismu. Červená trajektorie znázorňuje iont s vhodnými hodnotami m/z , který je schopen projít až samotnému detektoru. Modrá trajektorie znázorňuje iont, který nevyhovuje stabilní dráze, nemá vhodné hodnoty m/z a je tedy vybit na kovových tyčích kvadrupólového filtru. Obrázek převzat a upraven⁹².

Kvadrupólový analyzátor je v praxi velmi hojně využívaný hmotnostní analyzátor, a to zejména ve spojení se separačními metodami. Zde je využita jedna z hlavních výhod kvadrupólu jako takového, a to je skenovací rychlost. Kvadrupól nedisponuje velkou rozlišovací schopností, není dostatečná pro stanovení elementárního složení, ani pro zjištění přesné hmoty. Rozlišovací schopnost se pohybuje v řádech jednotek až desetin m/z které jsou dostačující pro běžné aplikace.

Tandemová hmotnostní spektrometrie

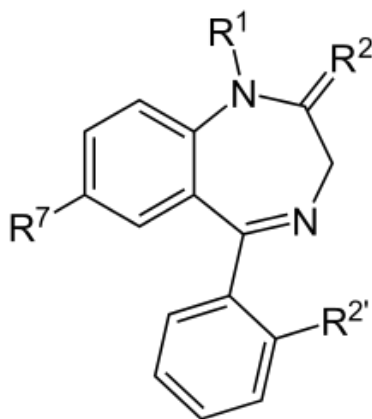
Tandemová analýza zahrnující alespoň dva stupně hmotnostní analýzy byla velmi hojně využívána pro strukturní analýzu. Můžeme se setkat také s označením MS/MS nebo MSⁿ. Nejčastěji využívaný, a pro naši práci zcela postačující je tzv. trojitý kvadrupól (QqQ). Jedná se o tři za sebou jdoucí kvadrupólové analyzátoři, které nám umožňují využití tandemové analýzy v čase. Principem QqQ jsou nejméně dva stupně hmotnostní analýzy. Nejprve v prvním stupni, tedy v prvním kvadrupólu (Q₁) dochází k selekci daného iontu (prekurzoru), poté ve druhém stupni dochází k fragmentaci daného prekurzoru a jeho pozdější hmotnostní analýze. Prostřední kvadrupól (q₂), naplněn inertním kolizním plynem (např. He), slouží jako kolizní cela, zde dochází k fragmentaci daného prekurzoru, a to pomocí kolizí indukované disociaci (CID – *collision-induced dissociation*). CID je typ fragmentačního mechanismu, kdy je zapotřebí srážek s molekulami plynu či neutrálními atomy přítomnými v kolizní cele (q₂), aby vznikla potřebná energie a docházelo tak ke vzniku produktů (fragmentů). Výsledné fragmenty putují do třetího kvadrupólu (Q₃) a zde jsou analyzovány jako vzniklé produkty dle zvoleného skenu. Schéma trojitého kvadrupólu je zobrazeno na Obrázku 11. Další velmi častou možností tandemové hmotnostní spektrometrie je kombinace zapojení kvadrupólu a TOF detektoru, které nese označení qTOF.



Obrázek 11. Schéma uspořádání hmotnostního spektrometru, v tomto případě s využitím trojitého kvadrupólu. Převzato a upraveno⁹³.

2.2 BENZODIAZEPINY

Benzodiazepiny (BZD) jsou psychoaktivní látky (drogy), které jsou běžně a široce využívány pro léčbu mnoha onemocnění a poruch. Chemická struktura je založena na diazepinovém a benzenovém kruhu. Obecná struktura benzodiazepinů je uvedena na Obrázek 12.



Obrázek 12: Obecná struktura benzodiazepinů založena na diazepinovém a benzenovém kruhu.

BZD zesilují působení neurotransmiteru GABA a využívají se tak zejména jako anestetika, hypnotika, sedativa, antikonvulziva, a svalové relaxanty. Pro tyto vlastnosti jsou tyto látky využívány k léčbě úzkosti, agitace, křečí, úzkostí, abstinčních příznaků a akutní epileptické záchvaty. BZD se řadí mezi skupinu psychofarmak, která jsou velmi často předepisována hlavně pro své rychlé a specifické účinky. Možná i z tohoto důvodu se setkáváme s čím dál častějším zneužíváním a nadužíváním klasických BZD a může tak vést k závislosti, toleranci nebo různým otravám⁹⁴.

BZD tak mohou být dělena do tří kategorií, na krátkodobé, střednědobé a dlouhodobě působící. Dlouhodobě působící BZD jsou používány k léčbě úzkosti, střednědobé a krátkodobě působící BZD se upřednostňují při léčbě nespavosti.

BZD jsou nebezpečné i svými vedlejšími účinky, které jsou spjaty s jejich myorelaxačními a sedativními účinky. Mezi vedlejší účinky patří hlavně nespavost a závratě, může se také vyvinout deprese a ztráta kontroly. Méně často se pak vyskytují rozostření vidění, změny chuti, depersonalizace a noční můry⁹⁵. Pokud se však BZD zkombinují s opiáty, alkoholem nebo tricyklickými antidepresivy jejich toxicita se výrazně zvětší⁹⁶.

2.2.1 NOVÉ SYNTETICKÉ BENZODIAZEPINY

V posledních několika letech dochází k nárůstu počtu intoxikací pomocí nových syntetických drog (*new designer drug*)⁹⁷. Po rozšíření postupů pro syntézu nových léků a lékových skupin se tyto látky velmi rozšířily. V rané fázi vývoje nových syntetických drog jsou již popsány dvě velké třídy látek, a to syntetické katinony a syntetické kanabinoidy.

Syntetické katinony patří do skupiny látek podobných amfetaminu prodávány jako „*bathsalts*“^{98,99}. Zatímco syntetické kanabinoidy patří do skupiny kanabinoidních antagonistů receptorů, jejichž struktury jsou různé od přírodních kanabinoidů. Syntetické kanabinoidy jsou prodávány jako tzv. bylinné směsi „*herbal mixtures*“¹⁰⁰⁻¹⁰².

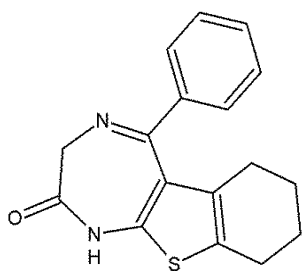
Během posledních 5 let se na drogové scéně objevili také psychoaktivní látky – syntetické benzodiazepiny (*New Designer Benzodiazepine*)^{103,104}. DBZD mají velmi podobnou strukturu jako běžně používané BZD, ale nejsou využívány k terapeutickým účelům. Jedním z prvních neterapeuticky zneužitých BZD byl pyrazolam¹⁰⁵. Zneužívání DBZD sebou nese značné riziko nejen k vzniku závislosti na těchto látkách, ale také ke vzniku vážných zdravotních komplikací a následků, protože toxikologie a farmakologie DBZD, na rozdíl od daných BZD používaných k terapeutickým účelům, hluboce popsány a prozkoumány. Je třeba také poznamenat, že DBZD mohou být stejně jako BZD zneužity spolu s jinými látky, jako např. etanol, CNS tlumící marihuanou a jinými psychoaktivními látkami, které mohou zesílit jejich nepříznivý vliv na lidský organismus.

Analýza klasických BZD je zahrnuta v systematické toxikologické analýze (STA). První screeningová metoda je založena na imunochemických testech a poté následuje analýza pomocí instrumentálních metod (kapalinová chromatografie a plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, LC-MS, GC-MS) pro potvrzení a kvantifikaci BZD v biologických tekutinách (sérum a moči). Díky strukturální podobnosti klasických BZD a nových syntetických DBZD, imunochemický screeningový test může vést k falešně pozitivním výsledkům. Může se tak stát, např. pokud jsou přítomny DBZD ve formě metabolitů (např. glukuronidů), které jsou přítomny ve vzorku moči¹⁰⁶. Imunochemické stanovení nedisponuje potenciálem pro odlišení klasických BZD a DBZD, a proto je potřebné pro toxikologické a forenzní účely, jakožto i pro toxikokinetické a toxikodynamické studie selektivní separační metody spojené s identifikací a kvantifikací DBZD jako cílových analytů¹⁰⁷.

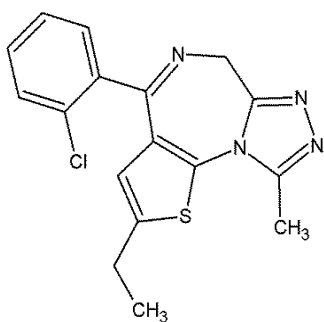
Několik metod popisující charakteristiku vybraných metabolitů studovaných DBZD byly publikovány již dříve. LC-MS/MS a GC-MS metody spolu s nukleární magnetickou resonancí (NMR) byly využity pro studium metabolismu flubromazepamu¹⁰⁸. Výsledky ukazují, že flubromazepam má extrémně dlouhý poločas eliminace (více než 100 hodin). Monohydroxylované, debromidované a monohydroxy-debromidované látky byly identifikovány jako hlavní fáze metabolitu I a odpovídající glukuronidy hydroxylovaných látek jsou detekovány v moči jako fáze metabolitu II. Podobné charakterizace metabolitů jiných studovaných DBZD *in vitro* (clonazepam, deschloroetizolam, flubromazepam, meclomazepam) pomocí LC-MS/MS, GC-MS, NMR a infračervené spektroskopie byly publikovány Hupertzem a spol.¹⁰⁹. Typická biotransformace uvedených DBZD vede k produkci mono- nebo dihydroxy- metabolitů. Další práce zabývající se zneužíváním phenazepamu byla popsána Kriikkem a spol.¹¹⁰. Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) umožňuje stanovit phenazepam v odebíraných vzorcích moči v průběhu jednoho roku studia.

První LC-MS/MS metoda pro simultánní toxikologickou analýzu jedenácti DBZD v moči bylo publikováno Bergstrandem a spol.¹¹¹. Separace pyrazolamu, declazepamu, flubromazepamu, meclomazepamu, etizolamu, phenazepamu, nifoxipamu, deschloroetizolamu, clonazepamu, flubromazolamu a flutazolamu byla provedena na UPLC stroji s BEH fenylovou kolonou za použití elučního gradientu. Celková doba analýzy byla pouhé 3 minuty. Hodnoty LOD studovaných DBZD byla od 1 do 10 ng/ml. Vyvinutá metoda LC-MS/MS byla využita na stanovení zvolených DBZD v moči po enzymatické hydrolyze bez jakýchkoliv dalších extrakčních kroků a kroků pro zakoncentrování.

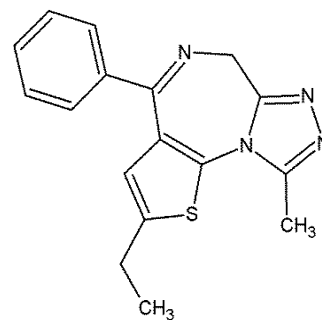
Mimo výše uvedené práce publikované Bergstrandem a spol. dosud nebyla publikovaná práce zabývající se simultánní analýzou DBZD s pomocí elektromigračních metod. Tato diplomová práce pojednává o vývoji analytické metody pro stanovení a identifikaci vybraných nových syntetických benzodiazepinů (Obrázek 13) s využitím právě zmiňovaných elektromigračních technik.



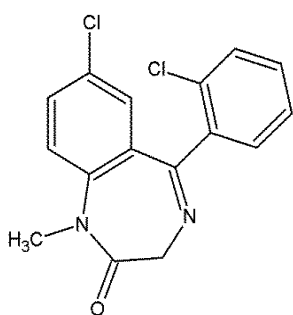
Bentazepam



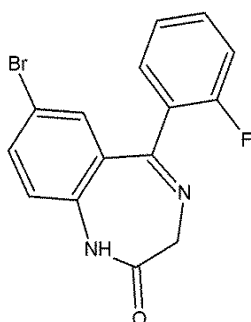
Etizolam



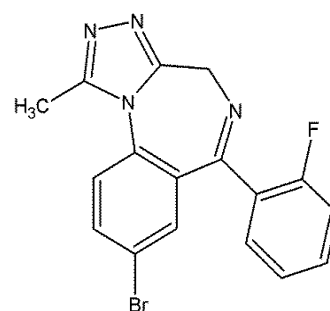
Deschloroetizolam



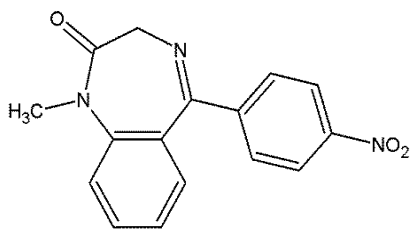
Diclazepam



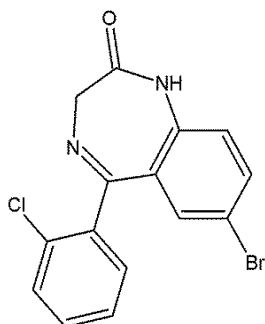
Flubromazepam



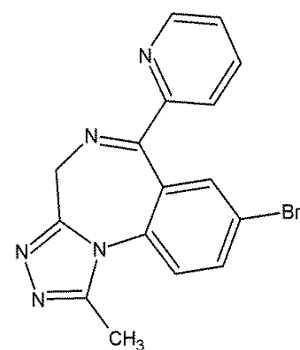
Flubromazolam



Nimetazepam



Phenazepam



Pyrazolam

Obrázek 13: Struktury studovaných nových syntetických benzodiazepinů

2.2.2 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT

Biologická aktivita každého léčiva obecně souvisí s jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako jsou distribuční koeficienty (P , v logaritmickém měřítku $\log P$) mezi vodou a nepolární fází. $\log P$ se využívá pro kvantitativní vyhodnocení schopnosti-propustnosti buněčné membrány, toxicity a dalším fyziologickým aktivitám chemických sloučenin¹¹². Čím vyšší je hodnota rozdělovacího koeficientu, tím vyšší je propustnost jednotlivých látek přes buněčnou membránu. Hodnoty $\log P$ pro studované DBZD jsou stále nedostupné, a proto je odhad těchto fyzikálně-chemických hodnot vhodný nejen pro studium farmakologických a toxikologických vlastností, ale také pro vyhodnocení chromatografického chování DBZD s obrácenými fázemi ve stacionární fázi (SF). Stanovení hodnot $\log P$ lze provést několika způsoby a to konvenční metodou (v dělicí nálevce s následným spektrofotometrickým měřením) nebo separační metodou¹¹³. Konvenční metoda v dělicí nálevce je velmi časově náročná a vyžaduje velké množství a čistotu studovaných látek. Vhodná metoda pro rychlý, jednoduchý odhad hodnoty $\log P$ využívající malé množství studované látky je micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Mezi kapacitním faktorem látky (k) získaného z experimentu MEKC můžeme snadno vztahovat hodnotu $\log P$ ¹¹⁴.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL A METODY

3.1.1 CHEMIKÁLIE A STANDARDY

Standardy syntetických benzodiazepinů: bentazepam, deschloretizolam, diclazepam, etizolam, flubromazepam, flubromazlam, meclozepam, nifoxizepam, nimetazepam, phenazepam a pyrazolam byly zakoupeny od firmy Chiron AS (Trondheim, Norsko). Methanol (MeOH), acetonitril (ACN) a voda (všechny kvality LC-MS) byly zakoupeny u Firmy Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Kyselina fosforečná ($\geq 95\%$, w/v), dodecylsulfát sodný (SDS, $\geq 99\%$), trifluoroctová kyselina (TFA, 99% , w/v), 1-chlorbutan (99%), kyselina mravenčí ($\geq 95\%$, w/v), hydroxid sodný, terc-butylmethylether (TBMA), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), octan amonný (AA, $99, 99\% + metals\ basis$), hexadimethrin bromid (Polybren, PB), dextran sulfát ($M_r \sim 500,000$, *Leuconostop spp.*), benzen, toluen, ethylbenzen, propylbenzen, butylbenzen, 1-fenyl-1-dodekanon (dodekanofenon) byly také pořízeny u firmy Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Butylacetát (pro HPLC, $99,7\%$) byl zakoupen u firmy Lachner (Neratovice, Česká Republika). Deuterované certifikované referenční standardy: diazepam-D5, etizolam-D3, phenazepam-D4 byli pořízeny u firmy Sigma-Aldrich. Deionizovaná voda ($18\ M\Omega\ cm^{-1}$) byla připravována pomocí purifikačního systému Millipore (Millipore, Molsheim, Francie). Pokud není jinak uvedeno, všechny chemikálie byly analytické čistoty a vyšší.

3.1.2 INSTRUMENTACE

MEKC analýzy byly prováděny využitím kapilárního elektroforetického systému Agilent 7100 s DAD detektorem, pracujícím v rozsahu vlnových délek 190–600 nm (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). CE-MS (NACE-MS) analýzy byly prováděny taktéž na kapilárním elektroforetickém systému Agilent 7100 s DAD detektorem, avšak systém byl navíc spojen s trojitým kvadrupólem (QqQ) Agilent 6460 s ionizací elektrosprejem (ESI). Při analýzách CE-MS (NACE-MS) byla pomocná kapalina přiváděna do nebulizéru elektrospreje pomocí LC pumpy Agilent 1260 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) vybavená děličem toku (1:100). Pro MEKC analýzy byly použité nepokryté křemenné kapiláry (MicroSolve, NJ, USA), pro CE-MS analýzy byly křemenné kapiláry pokryty tzv. SMIL (*Successive multiple ionic-polymer layer*)⁴⁵ pokrytím za pomoci mikropumpy (New Era Pump System, Inc., Farmingdale, NY, USA). Při extrakci biologického materiálu byla použita centrifuga (MiniSpinPlus, 12x4g), prekoncentrátor LabEva (model VISIBLE) a ultrazvuk Elmasonic S 60 H (Elmasonic, Německo).

3.1.3 STANDARTNÍ ROZTOKY A PUFRY

Zásobní roztoky standardů studovaných syntetických benzodiazepinů a deuterovaných referenčních standardů benzodiazepinů (etizolam-D3, diazepam-D5) byly připraveny rozpuštěním stanoveného množství každého standardu zvlášť v methanolu, phenazepam-D4 v ACN, na finální koncentraci 1 mg/ml a uchovávány při -18 °C v chladicím boxu. Vzorky určené k analýzám byly připraveny smícháním standardů a následným ředěním vodou (v případě MEKC), nebo ACN (v případě NACE-ESI-MS a NACE-DAD).

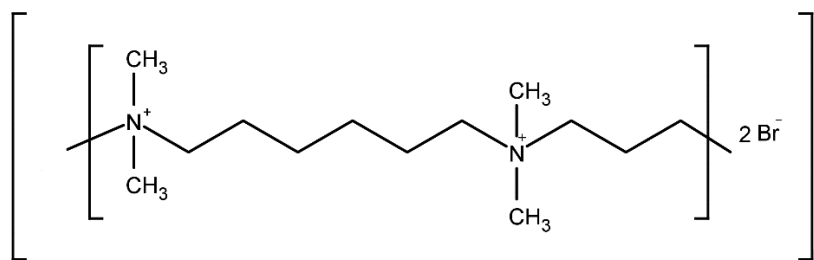
Pro MEKC analýzy, které měli za úkol stanovit rozdělovací koeficienty ($\log P$), byl základní elektrolyt (BGE) připraven rozpuštěním daného množství kyseliny fosforečné ve vodě a následným titrováním bylo pH pomocí 50% (m/v) hydroxidu sodného upraveno na stanovenou hodnotu. Na závěr byly přidány SDS a 1-butanol do základního elektrolytu.

Pro NACE-DAD analýzy byl základní elektrolyt (BGE) připraven rozpuštěním určitého množství octanu amonného v ACN. Před započítáním analýzy byla do základního elektrolytu přidána kyselina trifluoroctová (TFA). Pro NACE-ESI-MS analýzy, byl BGE připraven shodným způsobem jako pro NACE-DAD.

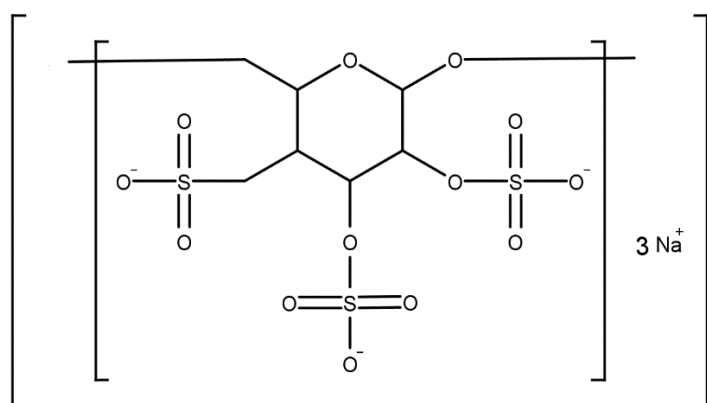
3.1.4 PŘÍPRAVA SMIL POKRYTÉ KAPILÁRY

Pro NACE-DAD a NACE-ESI-MS analýzy byla použita pokrytá kapilára využívající postupného pokrytí vrstvami iontových polymerů (*Successive multiple ionic-polymer layer* – SMIL) podle následujícího postupu^{44,45}:

- 1) Nejprve byla kapilára promyta 0,1 M NaOH po dobu 30 min, poté byla promyta po dobu 15 min deionizovanou vodou a 30 minut se nechala stát.
- 2) Následně byla promyta roztokem 5% (m/v) Polybrenu 30 minut, a opět se nechala 15 minut stát. Chemická struktura Polybrenu je na Obrázku 14.
- 3) Poté byla po dobu 15 minut promývána roztokem 3% (m/v) Dextran sulfátu, a opět se nechala 15 minut stát. Chemická struktura Dextran sulfátu je na Obrázku 15.
- 4) Následně byla opět promyta roztokem 5% (m/v) Polybrenu, po dobu 30 min,
- 5) Nakonec byla promyta po dobu 30 minut deionizovanou vodou.



Obrázek 14: Chemická struktura Polybrenu (hexadimetrin bromid).



Obrázek 15: Chemická struktura sodné soli dextran sulfátu.

3.1.5 PODMÍNKY CE-DAD (MEKC) ANALÝZ

V případě použití DAD detektoru, měla křemenná kapilára délku 48,5 cm (efektivní délka byla 40 cm) a vnitřní průměr 50 μm (Microsolv Technology, Eatontown, NJ, USA). Kapilára byla termostatována na 25 $^{\circ}\text{C}$ a separační napětí bylo +20 kV (rampa napětí 0,2 min). Dávkování vzorku bylo provedeno hydrodynamicky tlakem 100 mbar po dobu 5 s. Vlnová délka pro detekci byla nastavena na 200 nm. Před prvním použitím byla kapilára promyta 0,1 M NaOH po dobu 30 minut, poté byla promývána 30 minut deionizovanou vodou a nakonec 30 minut základním pufrem (BGE). Mezi každou analýzou byla kapilára promyta 0,1 M NaOH 2 minuty, deionizovanou vodou po dobu 2 minut a poté 2 minut pomocí BGE. Na začátku každého dne byla kapilára promyta 0,1 M NaOH, deionizovanou vodou a čerstvě připraveným elektrolytem, vždy po dobu 15 minut. Všechna měření byla provedena třikrát, pokud není uvedeno jinak.

3.1.6 PODMÍNKY NACE-ESI-MS A NACE-DAD ANALÝZ

Pro NACE-ESI-MS experiment byla použita kapilára o celkové délce 60 cm s vnitřním průměrem 50 μm . Část kapiláry (cca 75% celkové délky) byla v kapilární kazetě termostatovaná na 25 °C. Zbylá část kapiláry nebyla termostatována a konec kapiláry byl vložen do ESI nebulizéru. Dávkování vzorku bylo provedeno hydrodynamicky při tlaku 100 mbar po dobu 5 s. Separální napětí bylo -20 kV (rampa napětí 1 min).

Optimální ESI-MS podmínky byly následující: pomocná kapalina se skládala z 50:49,8:0,2 (v/v/v) směsi methanolu, vody a kyseliny mravenčí. Průtok pomocné kapaliny byl nastaven na 6 $\mu\text{l}/\text{min}$. Sprejovací napětí bylo +4 kV, průtok pomocného plynu (N_2) byl 10 l/min, tlak pomocného plynu byl 6 psi. Teplota v iontovém zdroji byla 250 °C.

Před prvním použitím byla SMIL kapilára pro NACE-ESI-MS a NACE-DAD kondicionována, 10 minut deionizovanou vodou a 10 min základním elektrolytem. Mezi každou analýzou byla kapilára promyta 2 minuty pomocí BGE. Na začátku každého dne byla kapilára promyta deionizovanou vodou a čerstvě přichystaným elektrolytem, každým po dobu 10 minut. Všechna měření byla provedena třikrát, pokud není uvedeno jinak.

3.1.7 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

Plná krev byla centrifugována při 5000 ot./min a takto získané sérum bylo obohaceno přídatkem DBZD a deuterovaných IS. Extrakce analytů ze séra byla provedena následně: ke 100 μl séra bylo přidáno 900 μl 50 mM Tris/Cl pufru (pH 9.0) a 1000 μl 1-chlorbutanu. Celá směs byla promíchána v plastové mikrozkuhavce. Rozdělení vodné a organické vrstvy bylo podpořeno centrifugací při 12 000 ot./min. Vzorky po centrifugaci byly uloženy do mrazicího boxu na -80 °C po dobu 10 min, kde došlo ke zmrznutí vodné fáze. Nezamrznutá vrchní organická fáze byla odebrána a odpařena při laboratorní teplotě pod proudem dusíku. Poté byl odparek rekonstituován ve 100 μl ACN a dávkován do kapiláry.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. NACE-ESI-MS/MS

Byla vyvinuta, optimalizována a validována nová simultánní metoda pro separaci, identifikaci a kvantifikaci skupiny devíti syntetických benzodiazepinů s využitím NACE-ESI-MS/MS. Separace probíhá v 20 mM octanu amonném v acetonitrilu s přídavkem 100 mM trifluoroctové kyseliny za použití SMIL kapiláry s opačným elektroosmotickým tokem. Níže jsou uvedeny jednotlivé kroky vývoje, optimalizace a validace nové metody a závěrem její využití na obohacený vzorek séra.

4.1.1 VOLBA SEPARAČNÍHO ELEKTROLYTU PRO SEPARACI DBZD

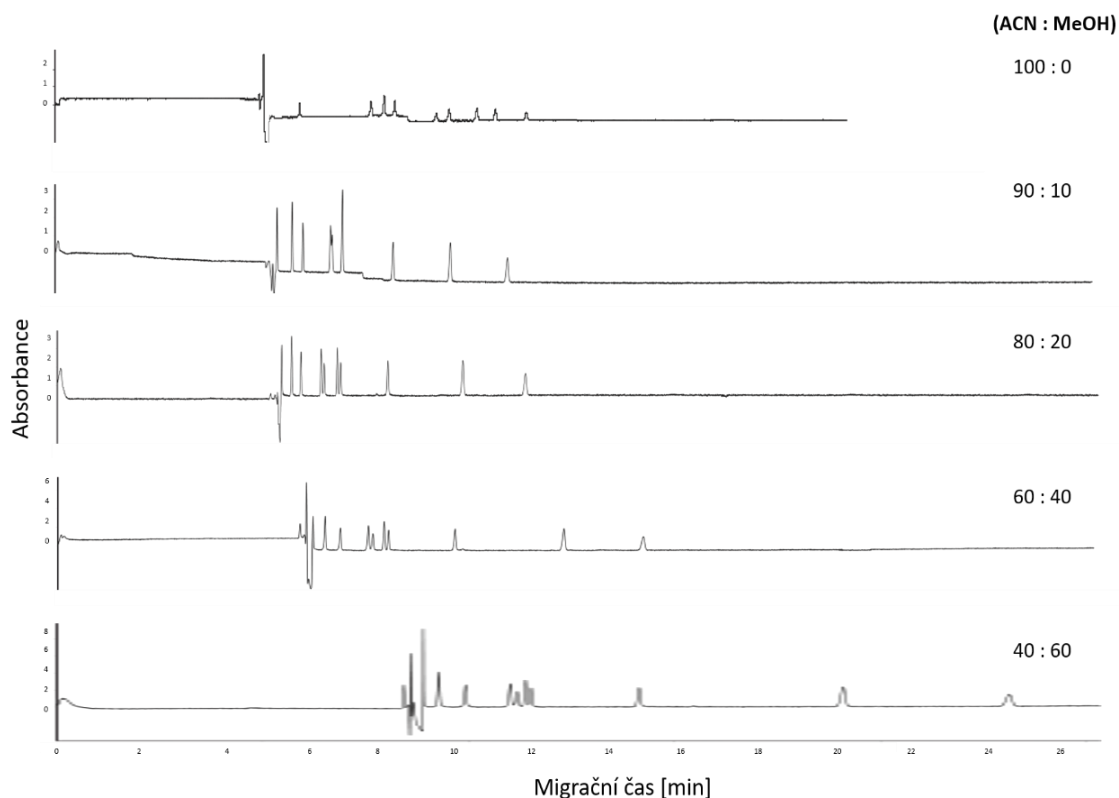
Optimalizace složení pracovního elektrolytu a separačních podmínek byla nejprve provedena s využitím systému CE-DAD. Tento přístup byl zvolen pro rychlejší optimalizaci hlavních parametrů separace před přenosem (transferem) vyvinuté metody na CE-ESI-MS/MS. Bylo možno využít instrumentaci s DAD detekcí, díky skutečnosti, že všechny studované DBZD absorbují UV záření. Studované separační parametry zahrnují rozlišení a selektivitu separačního systému s přihlédnutím k přiměřené době analýzy. Při optimalizaci složení pracovního elektrolytu bylo přihlédnuto ke skutečnosti, že pro spojení CE s ESI-MS je nutno využívat těkavé složky elektrolytu, což umožňuje ionizaci analytů elektrosprejem bez významného snížení signálu analytu při detekci hmotnostním spektrometrem.

Vzhledem k strukturální podobnosti DBZD s klasickými BZD, lze vyvodit, že základní acidobazické vlastnosti DBZD budou obdobné jako u klasických BZD. Ve vodném prostředí se DBZD chovají jako velmi slabé kyseliny. Separace s dostatečným rozlišením ve vodném prostředí, tedy za použití vodných elektrolytů je bez použití aditiv nemožná. Alternativou může být využito mechanismu MEKC, kdy se jako aditivum využívá nejčastěji SDS, které vytváří tzv. micelární fázi. SDS je však málo těkavý tenzid, který není vhodný pro spojení CE s ESI-MS. Je zde možná kontaminace a znečištění iontového zdroje netěkavými micelami tenzidu, a také dochází k potlačení signálu měřených analytů. Z tohoto hlediska byla optimalizace separace studovaných DBZD prováděna v nevodném prostředí, s využitím nevodných elektrolytů (NACE-DAD).

Pro optimalizaci separace studovaných DBZD byly jako rozpouštědla vybrány ACN a směs ACN/MeOH pro pracovní elektrolyty obsahující octan amonný (AA) a trifluoroctovou kyselinu (TFA). Takto vytvořený základní elektrolyt je těkavý a optimalizované složení pracovního elektrolytu je vhodné pro transfer podmínek na NACE-ESI-MS metodu. Jak již

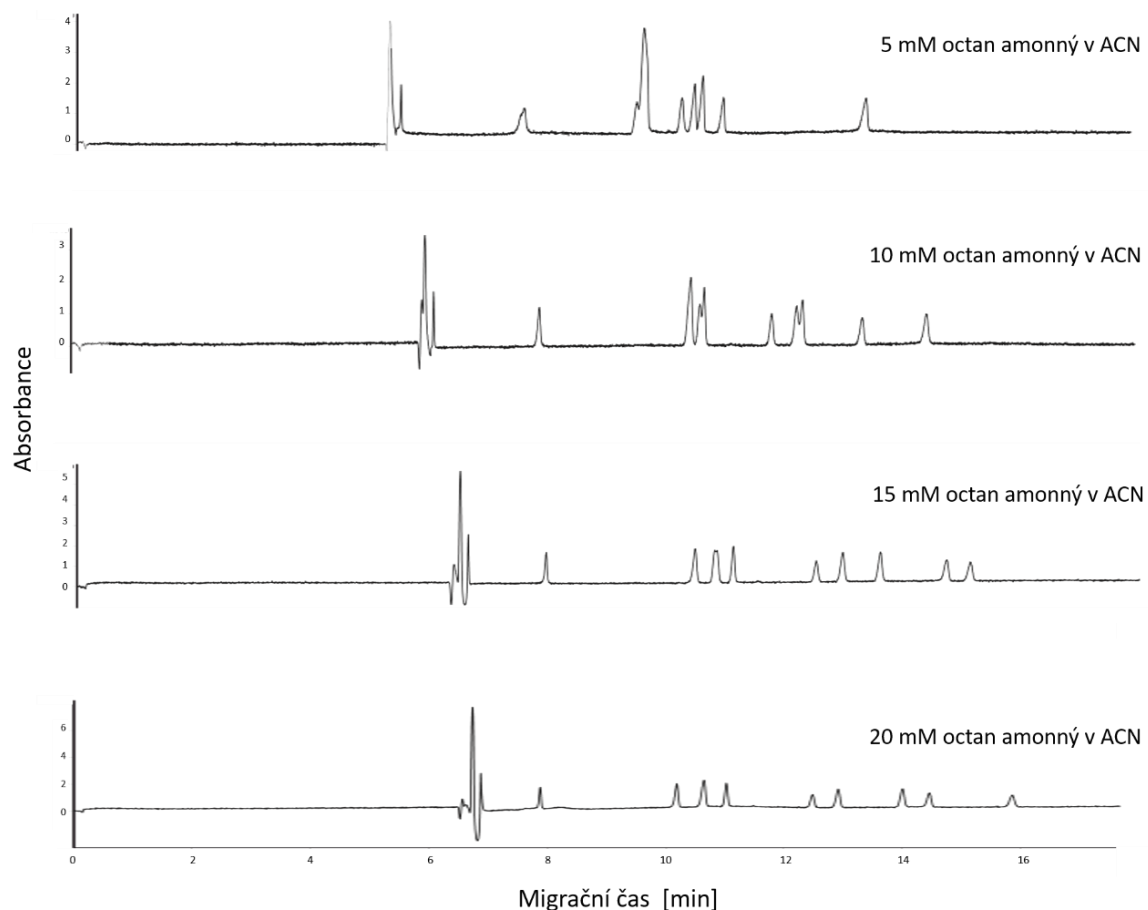
bylo uvedeno výše, DBZD se ve vodném prostředí chovají jako slabé kyseliny. ACN je aprotické rozpouštědlo, zatímco MeOH je polární protické organické rozpouštědlo, díky tomu se může vliv samotného ACN nebo směsi ACN/MeOH (9:1, 8:2, 6:4, 4:6, v/v) na separaci značně lišit. Nejenže rozpouštědlo ovlivňuje acidobazické vlastnosti separovaných DBZD, ale také solvataci analytů a elektroosmotickou mobilitu. Separace studovaných DBZD v nevodných pracovních elektrolytech, kde jsou využity ACN, MeOH, případně různé poměry koncentrací ACN a MeOH v nepokryté křemenné kapiláře, jsou velmi dlouhé. Separční kapilára využívána při analýze DBZD za pomoci CE-DAD je příliš krátká pro on-line spojení s MS a doba analýzy by se tedy při transferu metody ještě prodloužila. Zkrácení doby analýzy může být dosaženo změnou velikosti a směru EOF. Změnou EOF není negativně ovlivněna separace DBZD a nedochází ke snížení rozlišení. Pro ovlivnění EOF bylo využito nekovalentního pokrytí s využitím iontových polymerů – SMIL pokrytí. SMIL pokrytí, využívá tři iontových vrstev nabitých polymerů (Polybren – Dextran sulfát – Polybren), a má charakter permanentního, avšak nekovalentního pokrytí. Postup pokrytí vrstvami iontových polymerů (SMIL pokrytí) je podrobněji popsána v kapitole 3.1.4. SMIL pokrytí generuje anodický EOF i v nevodných pracovních elektrolytech. DBZD migrují jako kationty v opačném směru, proti směru EOF, ale absolutní efektivní mobilita je nižší než anodická elektroosmotická mobilita za negativního napětí. Doba analýzy s využitím SMIL pokryté křemenné kapiláry byla výrazně kratší oproti nepokryté křemenné kapiláře. Následující optimalizace byly prováděny již s využitím SMIL pokrytých kapilár.

Na Obrázku 16 je zobrazen elektroferogram separace DBZD v 20 mM AA s přídavkem 100 mM TFA, kde byl využit samotný ACN nebo směs ACN/MeOH (9:1, 8:2, 6:4, 4:6, v/v) jako rozpouštědlo pracovního elektrolytu. Nejlepší separace, pokud bychom brali v potaz pouze rozlišení a selektivitu separace, bylo docíleno ve směsi ACN/MeOH (4:6, v/v) jakožto rozpouštědla pro základní elektrolyt. S rostoucím množstvím MeOH (v/v) jakožto rozpouštědla se značně prodlužuje doba analýzy. Pro naše účely separace byl vybrán ACN, jež disponuje dostačujícím rozlišením a selektivitou a na rozdíl od samotného MeOH, respektive směsi ACN/MeOH poskytuje příznivější doby analýzy pro klinické a toxikologické účely.



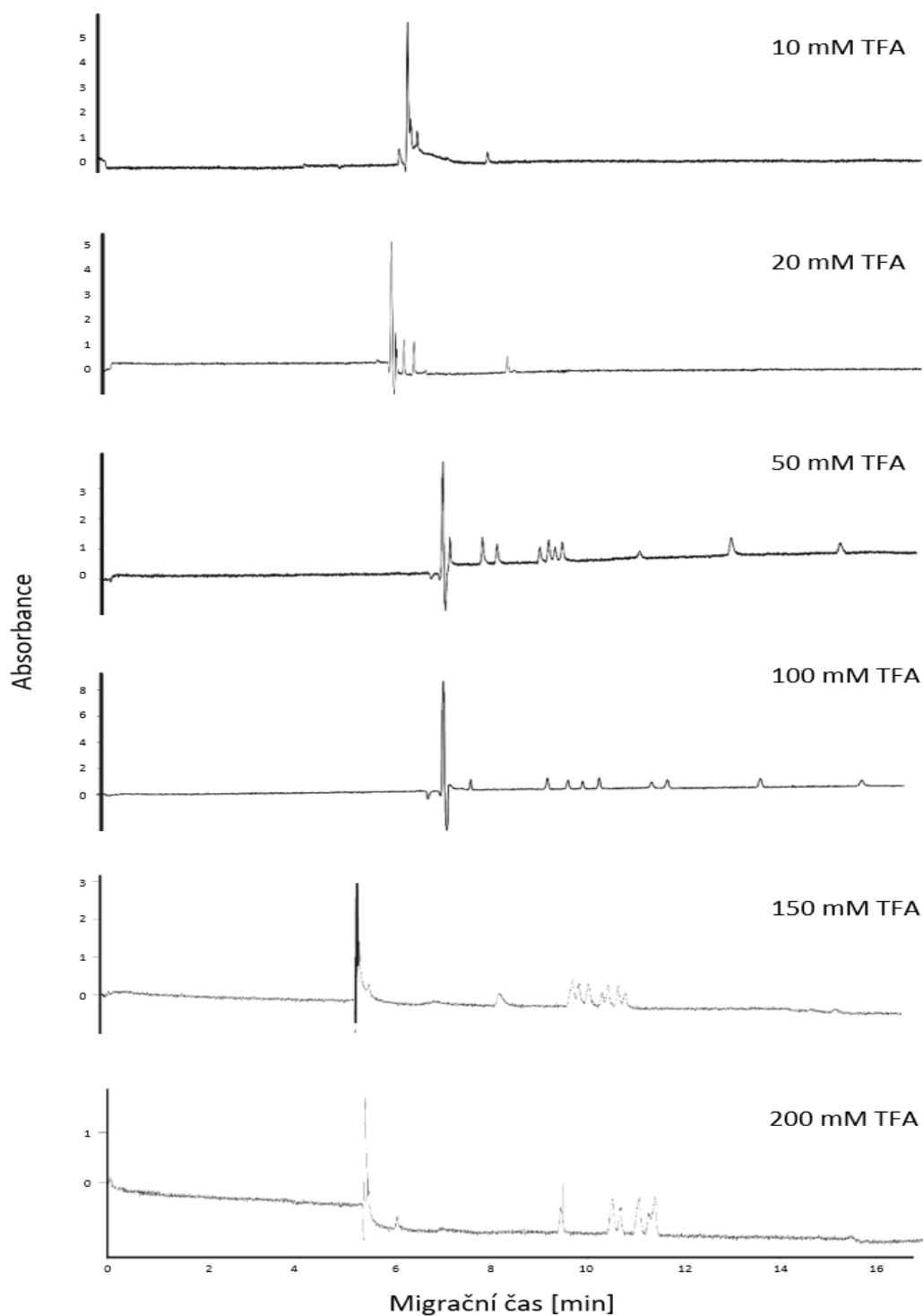
Obrázek 16: Elektroferogram NACE-DAD separace DBZD (10 mg/l) v pracovních elektrolytech s různým poměr koncentrací ACN/MeOH (v/v). Podmínky: separační elektrolyt 20 mM octan amonný s přidavkem 100 mM trifluoroctové kyseliny, $U = -20$ kV, dávkování 50 mbar/5 s, detekční vlnová délka 200 nm, SMIL pokrytá kapilára.

V dalším kroku byl sledován vliv koncentrace AA v pracovním elektrolytu připraveném v ACN. Studované koncentrace AA byly v rozmezí 5 až 20 mM. Vyšší koncentrace AA nemohla být studována, z důvodu omezené rozpustnosti AA v ACN. Byl sledován vliv koncentrace AA v ACN za konstantní koncentrace 100 mM TFA. Obecně lze říci, že množství AA v připravovaném pufru má značný vliv na samotnou separaci DBZD. Na Obrázku 17 můžeme pozorovat, že s rostoucí koncentrací AA v pracovním elektrolytu dochází ke značnému zlepšení rozlišení separovaných analytů. Tento děj však nastává na úkor prodloužení doby analýzy. Nejlepší separaci poskytoval pracovní elektrolyt o složení 20 mM AA v ACN s přidavkem 100 mM TFA.



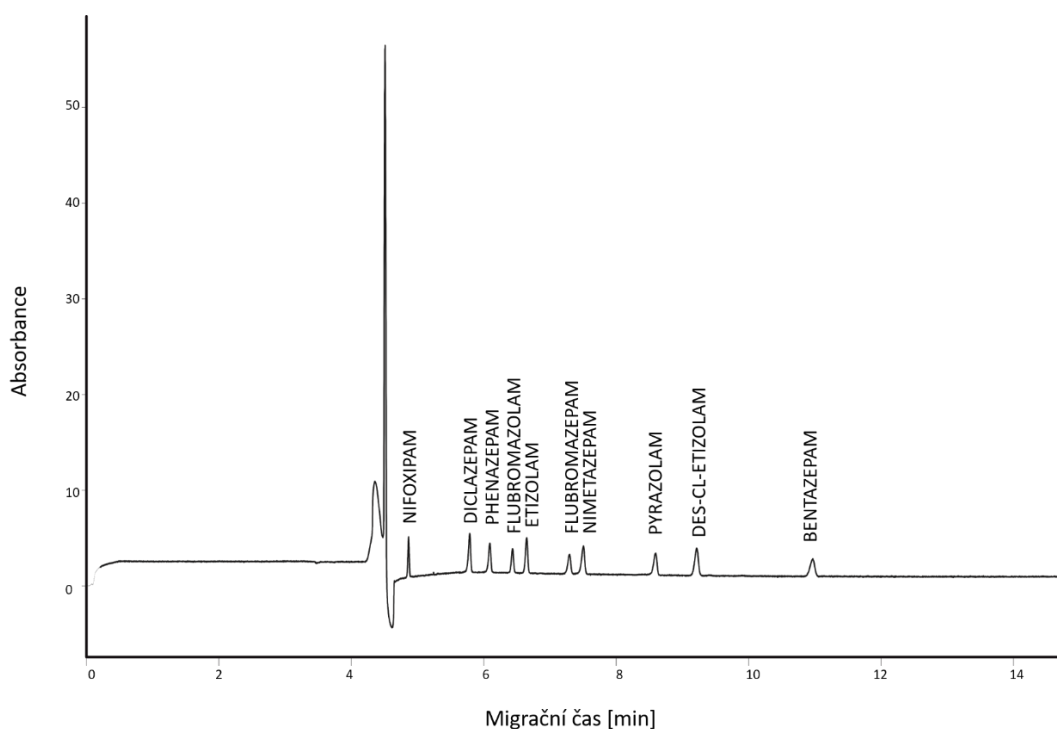
Obrázek 17: Elektroferogram NACE-DAD separace DBZD (10 mg/l) s různými koncentracemi octanu amonného v separačním elektrolytu. Podmínky: separační elektrolyt 5-20 mM octan amonný v ACN s přidavkem 100 mM trifluoroctové kyseliny, $U = -20$ kV, dávkování 50 mbar/5 s, detekční vlnová délka 200 nm, SMIL pokrytá kapilára.

Kyselina trifluoroctová v základním elektrolytu hraje roli kyselé komponenty pro protonizaci studovaných DBZD. Nižší koncentrace TFA nevedou ke zlepšení rozlišení separovaných DBZD, jak můžeme vidět na Obrázku 18. Díky malému množství kyselých komponent v základním elektrolytu nedochází k výrazné protonizaci studovaných analytů a nemůže tedy docházet k dostatečné separaci. Vyšší množství přidavku TFA do základního elektrolytu vede ke zkrácení času doby analýzy, což by bylo výhodné, pokud by zároveň nedocházelo také ke snížení účinnosti píků pro všechny studované DBZD.



Obrázek 18: Elektroferogram NACE-DAD separace DBZD (10 mg/l) s různými koncentracemi přídavku trifluoroctové kyseliny. Podmínky: separační elektrolyt 20 mM octan amonný v ACN s přídavkem 10-200 mM trifluoroctové kyseliny, $U = -20$ kV, dávkování 50 mbar/5 s, detekční vlnová délka 200 nm, SMIL pokrytá kapilára.

Elektroferogram separace studovaných DBZD za optimalizovaných separačních podmínek ve 20 mM octanu amonném v ACN s přidavkem 100 mM TFA a aplikovaném separačním napětí je vyobrazeno na Obrázku 19.



Obrázek 19: Elektroforegram NACE-DAD separace DBZD (10 mg/l) s různými koncentracemi přidavku trifluoroctové kyseliny. Podmínky: separační elektrolyt 20 mM octan amonný v ACN s přidavkem 10-200 mM trifluoroctové kyseliny, $U = -20$ kV, dávkování 50 mbar/5 s, detekční vlnová délka 200 nm, SMIL pokrytí kapiláry.

Vyvinutá separační metoda využívající DAD detektor může být potenciálně využita pro další ověření a screening přítomnosti DBZD v různých materiálech distribuovaných v nelegální drogové scéně. Významné omezení NACE-DAD metody pro separaci a stanovení DBZD v biologickém materiálu je nízká koncentrační citlivost DAD detektoru.

Pro identifikaci a kvantifikaci DBZD v biologických materiálech na koncentrační úrovni ng/ml je nejvíce využívaným detektorem MS, který je velmi přesný při identifikaci a citlivé kvantifikaci. Transformovaná metoda CE-ESI-MS/MS může být do jisté míry alternativou k dnes již velmi využívané LC-ESI-MS metodě. Pokud je získáno pouze malé množství biologického materiálu jako vzorku je dokonce vyvinutá metoda CE-ESI-MS/MS výhodnější volbou.

4.1.2 OPTIMALIZACE SEPARAČNÍCH PODMÍNEK CE-ESI-MS/MS

Pomocí metody NACE-DAD byly získány optimální podmínky separačního elektrolytu, které byly transferovány a použity pro separaci studovaných DBZD v SMIL pokryté kapiláře pomocí CE-ESI-MS/MS metody. Dále bylo potřeba upravit a optimalizovat některé další parametry z důvodu charakteru spojení CE metody s ESI-MS/MS instrumentací. Pro spojení CE-ESI-MS/MS je nezbytná delší kapilára, která v tomto případě byla 60 cm dlouhá. Jak bylo uvedeno výše, SMIL kapilára generuje v nevodném prostředí silný anodický EOF. Stabilita elektrospreje je rozhodující pro dosažení vysoké citlivosti a reprodukovatelnosti MS detekce. Byla testována vhodnost použití SMIL kapiláry pro CE-ESI-MS/MS za použití nevodného BGE. V obou ionizačních módech, kladném i záporném, stejně jako v rozsahu poměru m/z 50-3000 nebyla pozorována žádná kontaminace iontového zdroje, neboť nebyly detekovány žádné píky pocházející ze SMIL pokrytí.

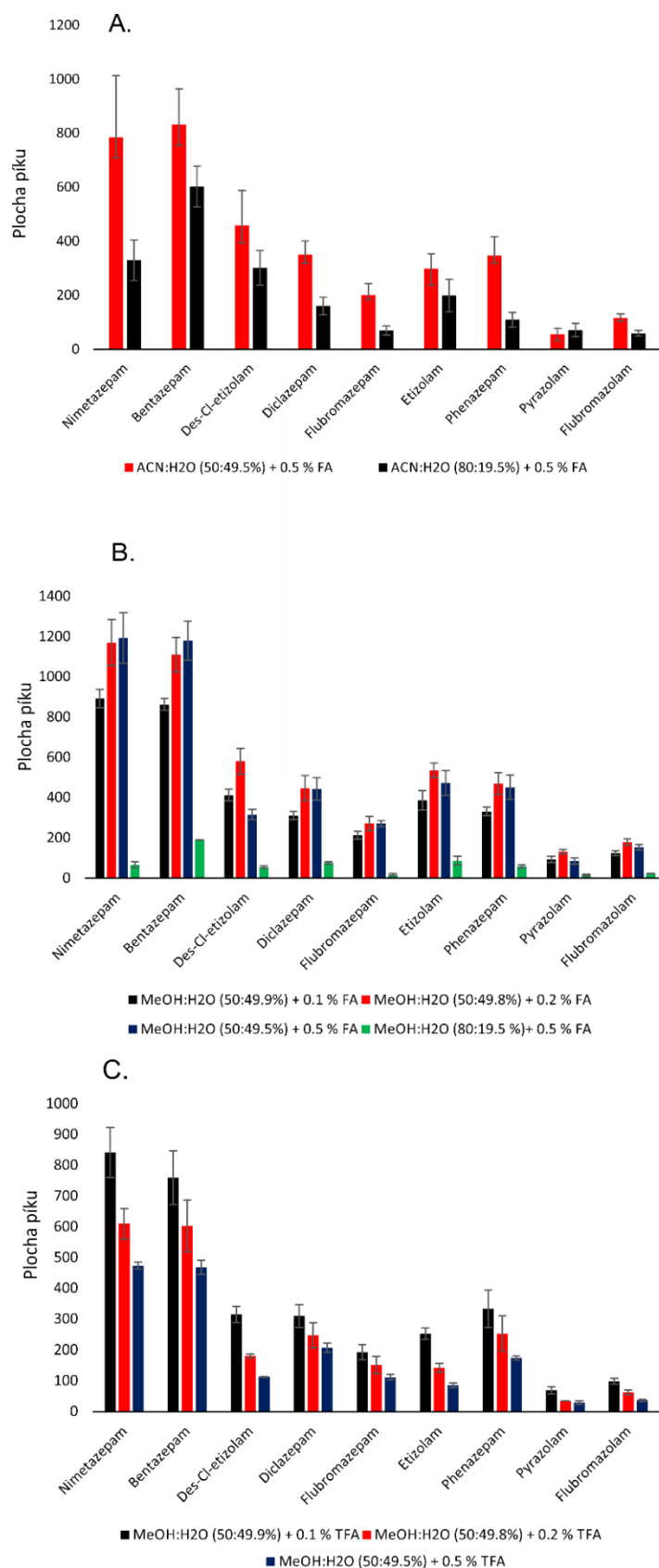
Na straně ESI-MS/MS detekce bylo studováno hned několik parametrů. Vliv sprejovacího napětí, teploty, průtoku a tlaku pomocného sprejovacího plynu optimalizována velikost ploch píků studovaných DBZD, stejně jako vliv průtoku a složení pomocné sprejovací kapaliny na odezvu jednotlivých separovaných DBZD. Cílem optimalizace vybraných hlavních parametrů bylo dosažení co nejvyšší citlivosti. Souhrn optimalizovaných parametrů ESI-MS detekce je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Souhrn optimalizovaných parametrů MS detekce.

Složení pomocné sprejovací kapaliny	MeOH/voda/HCOOH (50:49,8:0,2, v/v/v)
Průtok pomocné sprejovací kapaliny	6 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
Sprejovací napětí	+4,0 kV
Tlak nebulizačního plynu	6 psi (1psi = 6894,76 Pa)
Průtok nebulizačního plynu	10 $\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
Teplota sušícího plynu	250 °C
Detekční mód	MRM

Při použití 20 mM AA v ACN s přídavkem 100 mM TFA nebyly pozorovány žádné adukty studovaných analytů. Studované DBZD byly detekovány jako protonované ionty $[M+H]^+$ v kladném ionizačním módu. V dalším kroku byly optimalizovány MS parametry a to tak, abychom získaly nejvyšší odezvu všech možných studovaných DBZD. Vliv optimalizovaných parametrů byly posuzovány pomocí ploch píků jednotlivých DBZD.

Složení pomocné sprejovací kapaliny má přímý vliv na účinnost a stabilitu sprejování. Pomocná sprejovací kapalina také hraje roli elektricky vodivé kapaliny pro elektroforetickou separaci. Byly studovány pomocné sprejovací kapaliny založeny na MeOH či ACN a vody, a to v různých poměrech s přidavkem kyseliny mravenčí (FA) nebo TFA. Vliv složení pomocné sprejovací kapaliny na plochu píku separovaných DBZD jsou znázorněny na Obrázku 20. Obě studované pomocné sprejovací kapaliny založeny na ACN v poměru s vodou 50/50 a 80/20 (v/v) s přidavkem 0,5 % FA poskytují nižší plochy píků a zhoršenou opakovatelnost. Pomocná sprejovací kapalina založena na směsi MeOH a vody v poměru 50:50 (v/v) s přidavkem TFA o koncentraci 0,1; 0,2 a 0,5 % (v/v) poskytuje nižší hodnoty ploch píků studovaných DBZD. Při vzrůstající koncentraci přidavku TFA můžeme pozorovat snížení ploch píků. TFA musí splňovat nutnou podmínku elektrické vodivosti a také přispívá k procesu protonizace (ionizace) analytů v ESI. Byla studována pomocná sprejovací kapalina založená na MeOH v poměru s vodou 50:50 a 80:20 (v/v) s přidavkem kyseliny mravenčí o koncentraci 0,1; 0,2 a 0,5 % (v/v). Obecně lze říci, že pomocná sprejovací kapalina o složení MeOH a vody s přidavkem kyseliny mravenčí má o něco větší plochy píku než totožné složení pomocné sprejovací kapaliny s přidavkem kyseliny trifluoroctové. Nejlepší složení v závislosti na největších plochách píku byla pomocná sprejovací kapalina ve složení MeOH:H₂O:FA (50:49,8:0,2, v/v/v).



Obrázek 20: Vliv složení pomocné sprejovací kapaliny na plochu píku separovaných DBZD. Složení pomocné sprejovací kapaliny A.: ACN:H₂O s přidavkem FA, B.: MeOH:H₂O s přidavkem FA a C.: MeOH:H₂O s přidavkem TFA.

Jako jeden z hlavních parametrů MS detekce byl také sledován vliv rychlosti průtoku pomocné sprejovací kapaliny na plochu píku a intenzitu signálu v rozsahu 2–10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (přírůstek rychlosti byl vždy 2 $\mu\text{l}/\text{min}$). Nárůst rychlosti průtoku, který byl studován, byl navyšován o 2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Rychlost průtoku v rozmezí 2 a 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ nebyla dostačující, docházelo k nestabilitě proudu během analýzy, a s tím spojenou nestabilitou elektrospreje. Vyšší průtoky pomocné sprejovací kapaliny 8 a 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ způsobují zhoršení opakovatelnosti a snížení ploch jednotlivých studovaných DBZD. Rychlost průtok pomocné sprejovací kapaliny s nejlepšími odezvami byl 6 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Mezi dále studované parametry patří vlivy průtoku, tlaku a teploty nebulizačního (zmlžujícího) plynu. Rychlost průtoku nebulizačního plynu byla studovaná v rozsahu 5-15 l/min a tlak nebulizačního plynu v rozmezí 5-15 psi. Obě hodnoty byly studovány v závislosti na intenzitě signálu studovaných analytů. Nejvyšší plocha pík byla za optimalizovaných podmínek rychlosti průtoku zmlžovacího plynu 10 l/min s využitím tlaku plynu 6 psi. Teplota sušícího plynu, parametru ovlivňujícího desolvaci analytů v iontovém zdroji, byla testována v rozmezí 100-300 °C s nárůstem po 50 °C. Plochy pík studovaných DBZD se zvyšují s rostoucí teplotou sušícího plynu od 100 °C do 250 °C. Nejvyšší intenzity signálu bylo dosaženo při teplotě sušícího plynu 250 °C. Posledním studovaným parametrem bylo sprejovací napětí, jehož optimální hodnota je +4,0 kV.

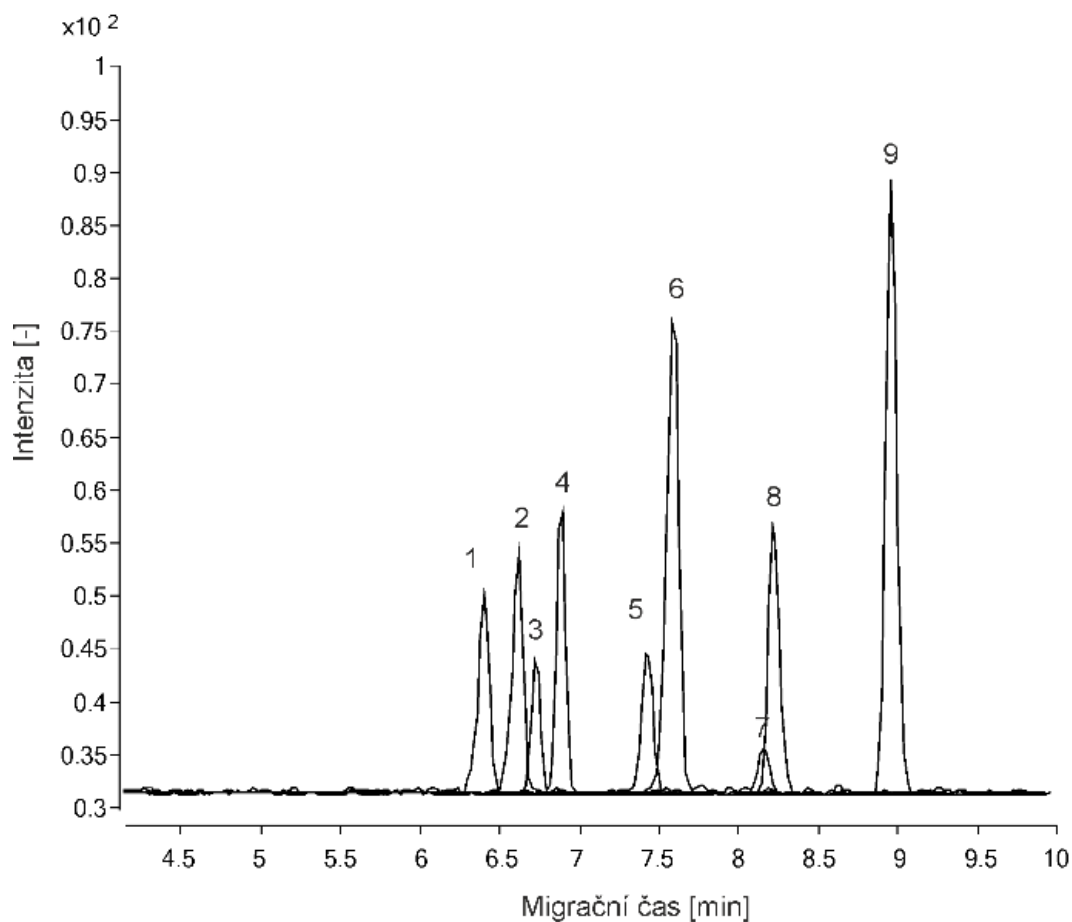
Separované analyty byly detekovány za pomoci tandemové hmotnostní spektrometrie. Před samotnou separací pomocí MS detekce bylo tedy nejdříve nutné získat fragmentační spektra jednotlivých studovaných DBZD. Pro nalezení optimálních hodnot kolizní energie studovaných DBZD, deuterovaných IS a pro nalezení hlavních produktových iontů, které mohou být použity pro kvantitativní a kvalitativní analýzu, bylo využito přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru. K citlivé kvantifikaci a pro přesnou identifikaci NACE-ESI-MS/MS analýzy byl použit MRM (*multiple reaction mode*) mód. Kolizní energie byla studována v rozmezí 0-40 eV s nárůstem 5 eV následujícím způsobem: pro jednotlivé kolizní energie byly vybrány spektra produktových iontů s nejintenzivnějšími fragmentačními přechody. Nejvyšší intenzita produktových iontů byla pozorována pro kolizní energie v rozmezí 20-35 eV. Fragmentace standardů získané z těchto měření byly řádně vyhodnoceny a fragmentační ionty nejvyšší intenzity byly použity pro účely kvantifikace. Další fragmentační ionty s nižší intenzitou byly využity k identifikaci jednotlivých DBZD. V Tabulce 2 je shrnuta fragmentace DBZD, stejně jako fragmentační ionty jako kvantifikátory a kvalifikátory a dále optimalizovaná kolizní energie a fragmentační napětí.

Tabulka 2: Parametry tandemové hmotnostní spektrometrie pro všechny studované DBZD ($n = 5$).

DBZD	Prekurzorový iont [M+H] ⁺	Produktový iont * (m/z)	Kolizní energie [eV]	Fragmentační napětí [V]	Interní standard
Nimetazepam	296,0	<u>250,1</u> ; 221,1	25	135	IS1
Bentazepam	297,0	<u>166,2</u> ; 241,1; 139,2	30	135	IS1
Deschloroetizolam	309,0	<u>255,1</u> ; 280,0; 225,0	25	135	IS1
Diclazepam	318,9	<u>227,0</u> ; 154,0; 220,1	30	135	IS3
Flubromazepam	332,9	<u>226,0</u> ; 183,9	30	135	IS1
Etizolam	343,0	<u>313,9</u> ; 289,0; 259,1	20	110	IS2
Phenazepam	350,9	<u>206,1</u> ; 185,9; 242,0	35	110	IS3
Pyrazolam	353,9	<u>167,0</u> ; 206,0; 246,2	35	110	IS3
Flubromazolam	370,9	<u>343,0</u> ; 292,1; 223,0	30	135	IS3
Diazepam-d5 (IS1)	290,0	<u>154,0</u> ; 198,1; 227,1	35	135	-
Etizolam-d3 (IS2)	346,0	<u>317,0</u> ; 292,1	20	110	-
Phenazepam-d4 (IS3)	355,0	<u>210,0</u> ; 246,1; 186,0	35	110	-

* Produktové ionty s nejvyšší intenzitou jsou potrženy a byly využity pro účely kvantitativní analýzy. Ostatní produktové ionty jsou využity pro identifikaci.

Rekonstruovaný MRM chromatogram NACE-ESI-MS/MS separace standardní směsi studovaných syntetických benzodiazepinů za optimálních podmínek, které jsou shrnuty pod Obrázkem 21. Vyvinutá metoda byla poté použita pro účely separace, identifikace a také kvantifikace DBZD v séru pro účely objektivní intoxikace studovaných benzodiazepinů.



Obrázek 21: Rekonstruované MRM chromatogramy NACE-ESI-MS/MS separace standardů (50 ng/ml) syntetických benzodiazepinů. Podmínky: separační elektrolyt 20 mM octan amonný v ACN s přidavkem 100 mM trifluoroctová kyselina, $U = -20$ kV, $U_{ESI} = +4,0$ kV, dávkování 50 mbar/5s, $T = 250$ °C, průtok nebulizačního plynu 10 l/min, tlak nebulizačního plynu 6 psi, pomocná sprejovací kapalina MeOH/voda/HCOOH (50:49,8:0,2, v/v/v), průtok sprejovací kapaliny 6 μ l/min. 1 – diclazepam, 2 – phenazepam, 3 – flubromazolam, 4 – etizolam, 5 – flubromazepam, 6 – nimetazepam, 7 – pyrazolam, 8 – deschloroetizolam, 9 – bentazepam.

4.1.3. VALIDACE

Optimalizovaná NACE-ESI-MS/MS metoda byla dále validována z důvodu potenciální aplikace v klinické či forenzní toxikologii. Validace proběhla v oblastech selektivity, citlivosti, přesnosti, lineární kalibrační křivky, limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ), maticové efekty a extrakční výtěžnosti podle standardů pro forenzní a toxikologické analytické metody^{115,116}.

Selektivita byla testována analýzou pěti slepých vzorků séra (bez drogy). V slepých vzorcích séra nebyly pozorovány žádné interference v podobě endogenních analytů. Kalibrační závislost a lineární dynamický rozsah byly testovány v obohacených vzorcích séra po LLE úpravě na koncentračních hladinách 10-600 ng/ml (s výjimkou pyrazolam, kde byla kalibrace a linearita studována v rozmezí 50 až 600 ng/ml). Byla použita šestibodová kalibrační metoda, přičemž každý bod kalibrační křivky byl měřen pětkrát. Příslušné rovnice kalibračních křivek a jejich korelační koeficienty byly vypočítány pomocí metody nejmenších čtverců. Linearita byla hodnocena pomocí koeficientu determinace (akceptační kritérium bylo 0,990) a pomocí F-testů. Odpovídající regresní křivky, koeficienty determinace, hodnoty LOD a LOQ jsou shrnuty v tabulce 3. LOD a LOQ hodnoty byly získány jako poměry signálu k šumu S/N = 3, respektive S/N = 10.

Tabulka 3: Parametry linearity, LOQ a LOD hodnoty pro NACE-ESI-MS/MS metodu pro obohacené vzorky séra bentazepamem, diclazepamem, etizolamem, deschloroetizolamem, flubromazepamem, flubromazolamem, nimetazepamem, phenazepamem a pyrazolamem.

Látka	Lineární dynamický rozsah (µg/ml)	Regresní rovnice ^a ($y = ax + b$)		Korelační koeficient	LOD ^b (µg/ml)	LOQ ^c (µg/ml)
		Směrnice (± SD)	Posunutí (± SD)			
Nimetazepam	5–600	0,04508 ± 0,0007	0,03211 ± 0,1865	0,9995	1,5	5,0
Bentazepam	5–600	0,03866 ± 0,0002	0,27067 ± 0,06648	0,9999	1,5	5,0
Deschloroetizolam	5–600	0,02524 ± 0,2797	-0,03178 ± 0,07942	0,9998	1,5	5,0
Diclazepam	5–600	0,01889 ± 0,00064	0,25379 ± 0,1817	0,9977	1,5	5,0
Flubromazepam	10–600	0,00926 ± 0,00027	0,13168 ± 0,07568	0,9983	3,0	10,0
Etizolam	5–600	0,00959 ± 0,00073	0,36642 ± 0,20606	0,9992	1,5	5,0
Phenazepam	10–600	0,01703 ± 0,00121	0,2961 ± 0,34451	0,9999	3,0	10,0
Pyrazolam	50–600	0,00531 ± 0,00103	0,1853 ± 0,4579	0,9962	15,0	50,0
Flubromazolam	10–600	0,00384 ± 0,00017	0,09222 ± 0,04954	0,9959	1,5	5,0

^a šestibodová kalibrační metoda, každý bod kalibrační křivky byl měřen 5

^b LOD bylo odhadnuto v poměru signál-šum = 3

^c LOQ bylo odhadnuto v poměru signál-šum = 10

Správnost (*intra-day a inter-day*) je vyjádřena jako hodnota opakovatelnosti migračních časů a ploch píků pro pět opakovaných měření koncentračních hladin v jednom dni (*intra-day, INAD*) a opakovaná měření v 5 po sobě jdoucích dnech (*inter-day, INED*). Správnost (*intra-day*) byla studována pomocí analýzy šesti různými obohacenými vzorky séra obsahující nízkou a vysokou koncentraci studovaných DBZD. Správnost (*inter-day*) byla studována za pomoci 3 obohacených vzorků séra obsahující opět nízkou a vysokou koncentraci DBZD. *Intra-day a inter-day* správnosti migračních časů a ploch píků jsou shrnuty v Tabulce 4.

Tabulka 4: Hodnoty správnosti *intra-day a inter-day* migračních časů a ploch píků studovaných DBZD v obohacených vzorcích séra vyjádřené jako procento RSD hodnoty.

Látka	Koncentrace (ng/ml)	INAD ^a		INED ^b	
		RSD migrační čas	RSD area	RSD migrační čas	RSD area
Nimetazepam	20	0,3	3,5	0,6	12,3
	200	0,8	7,5	6,4	8,7
Bentazepam	20	0,9	7,1	2,9	18,3
	200	1,6	6,8	8,2	0,6
Deschloroetizolam	20	0,8	7,5	1,2	2,3
	200	1,3	7,9	7,6	5,7
Diclazepam	20	0,3	9,8	0,3	11,8
	200	0,7	4,4	2,1	6,7
Flubromazepam	20	0,5	3,7	0,7	13,6
	200	0,9	5,3	6,3	7,4
Etizolam	20	0,5	6,0	0,8	12,8
	200	0,8	5,9	5,9	10,8
Phenazepam	20	0,3	6,1	0,6	9,4
	200	0,7	5,7	5,6	5,4
Pyrazolam	20	0,6	6,2	0,9	5,6
	200	0,7	5,8	3,4	9,2
Flubromazolam	20	0,5	6,9	0,7	14,8
	200	0,9	9,6	5,9	13,9

^a Správnost *Intra-day* byla měřena analýzou šesti různými obohacenými vzorky séra pro každou koncentrační úroveň.

^b Správnost *Inter-day* byla měřena analýzou dvou obohacených vzorků séra (obsahující 20 a 200 ng/ml DBZD) dávkované šestkrát každý den po dobu pěti dnů.

Správnost *inter-day a intra-day* byly studovány ve dvou koncentračních úrovních (20 a 200 ng/ml) v obohacených vzorcích séra. Získané hodnoty RSD migračních časů jsou v rozmezí

0,3– 1,6 pro správnost *intra-day* a v rozmezí 0,3-8,2 pro správnost *inter-day*. RSD hodnoty pro plochy píků jsou v rozmezí 3,5-9,8 pro správnost *intra-day* a v rozmezí 0,6-18,3 pro správnost *inter-day*.

Ve shodných koncentračních úrovních byly studovány také výtěžky, matriční efekty a účinnost. Stanovení matričních efektů umožňuje posouzení spolehlivosti, citlivosti a selektivity při vývoji a validaci dané metody. Výsledky mohou být nepříznivě ovlivněny nedostatkem selektivity, pro tandemovou hmotnostní detekci při ionizaci elektrosprejem, způsobené interferencí dalších komigrujících látek vyskytující se v měřených vzorcích, „cross-talk“ efekty nebo právě zmíněnými matričními efekty. Postup a výpočet pro vyhodnocení těchto validačních parametrů byly přijaty z práce publikované Matuszewski a spol.¹¹⁶. Byly připraveny tři sady pěti standardních vzorků a postup podle Matuszewskiho byl aplikován následovně:

- 1) Byla provedena LLE extrakce vzorků séra obohacených standardy DBZD na koncentračních hladinách 20 a 200 ng/ml po extrakci (B)
- 2) Byla provedena LLE extrakce vzorků séra obohacených standardy DBZD na koncentračních hladinách 20 a 200 ng/ml před extrakci (C)

Následně byly porovnány výsledné plochy píků (B a C) s plochami píků za použití čistých standardů o shodných koncentračních hladinách (A). Výsledky získány tímto způsobem, jakožto matriční efekty (ME), výtěžnost (RE) či účinnost (PE) jsou získány díky následujícím vzorcům (14,15,16)¹¹⁶:

$$ME (\%) = B/A \cdot 100 \quad (14)$$

$$RE (\%) = C/B \cdot 100 \quad (15)$$

$$PE (\%) = C/A \cdot 100 = (ME \cdot RE)/100 \quad (16)$$

Vyhodnocení matričních efektů na výsledky kvantitativního stanovení látek či metabolitů v biologických tekutinách je důležitý, avšak často přehlížený prvek validace metody. Matriční efekt je rozhodující pro spolehlivé stanovení farmakokinetických dat (PK). Rozsah matričních efektů je značně závislý na mechanismu ionizace, extrakci identických vzorků či chromatografických podmínkách.

Získané hodnoty výtěžnosti, matričních efektů a účinnosti jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tabulka 5: Výtěžnost, matriční efekt a účinnost studovaných DBZD (n = 5).

Látka	Koncentrace (ng/ml)	Matriční ^a Efekt	Výtěžnost ^b (%)	Účinnost ^c
Nimetazepam	20	80,8	91,8	74,2
	200	96,0	85,2	81,8
Bentazepam	20	87,2	73,3	63,9
	200	95,4	87,9	83,8
Deschloroetizolam	20	103,4	70,0	72,4
	200	93,2	87,3	81,4
Diclazepam	20	88,3	67,5	59,6
	200	96,8	87,8	85,0
Flubromazepam	20	93,5	65,1	60,9
	200	92,9	76,2	70,8
Etizolam	20	115,4	76,7	88,5
	200	93,9	84,3	79,1
Phenazepam	20	88,8	92,8	81,1
	200	96,8	84,9	82,2
Pyrazolam	20	75,3	89,6	67,5
	200	85,3	78,6	67,0
Flubromazolam	20	69,6	75,0	52,2
	200	100	77,7	77,7

^a Matriční efekt vyjádřen jako poměr střední plochy píku příslušného DBZD obohaceného po extrakci a střední plocha píku standardu DBZD násobený 100.

^b Výtěžnost byla vypočítána jako poměr střední plochy píku příslušného DBZD obohaceného před extrakcí a střední plocha píku příslušného DBZD po extrakci násobený 100.

^c Účinnost byla vypočtena jako poměr střední plochy píku příslušného DBZD obohaceného před extrakcí a střední plocha píku příslušného DBZD standardu vynásobena 100.

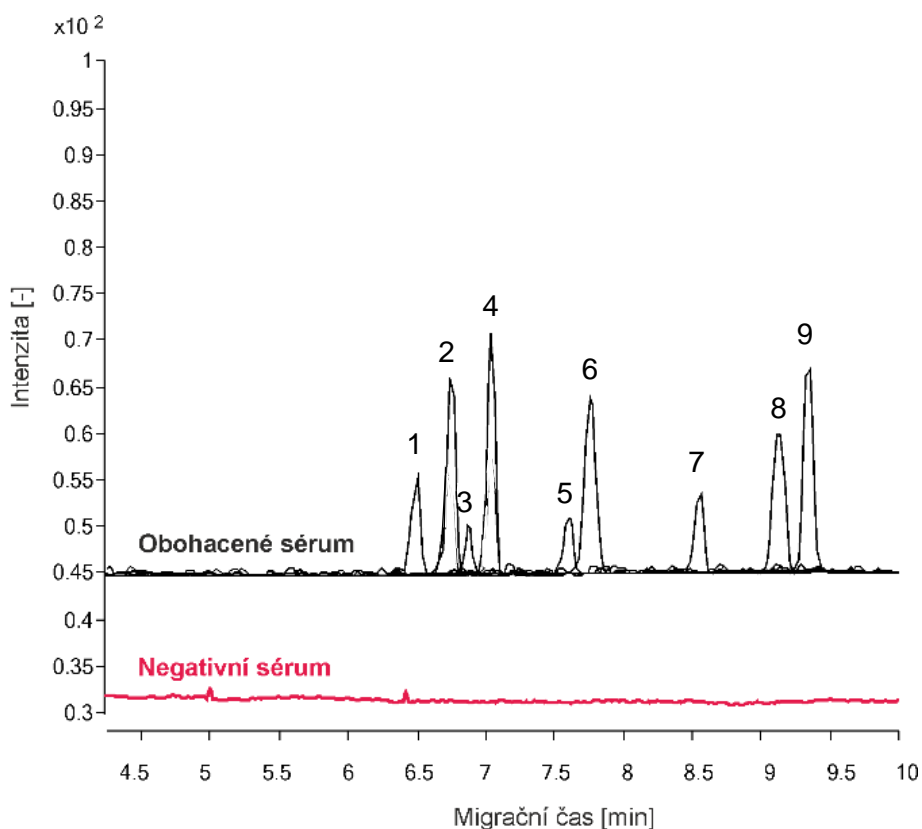
Výtěžnost LLE extrakce byla získána z porovnání ploch píků pro jednotlivé studované DBZD po samotné extrakci a ploch pro jednotlivé studované DBZD před samotnou extrakcí na shodných koncentračních hladinách (20 a 200 ng/ml).

Nebyly pozorovány žádné výrazné účinky matričních efektů (rozmezí 92,9-100 %) pro všechny studované DBZD pro vyšší koncentrační hladinu 200 ng/ml. Bylo pozorované zlepšení ionizace pro etizolam a deschloroetizolam (hodnoty matričního efektu je vyšší než 100 %). Pro ostatní studované DBZD bylo pozorováno potlačení ionizace (hodnoty matričních efektů v rozmezí 69,6-93,5 %) pro 20 ng/ml koncentrační hladinu. Pozorované potlačení ionizace pro nižší pozorovanou hladinu je pravděpodobně způsobeno komigrujícími matričními komponenty v séru.

4.1.1 APLIKACE VYVINUTÉ METODY NA MODELOVÝ VZOREK SÉRA

DBZD obdobně jako klasické benzodiazepiny jsou známy svou silnou vazbou na proteiny krevního séra. Pro extrakci DBZD z krevního séra jakožto modelového vzorku byla použita L-L extrakce za použití 1-chlorbutanu jako extrakčního rozpouštědla. Použitelnost vyvinuté metody je demonstrována na obohaceném vzorku séra po L-L extrakci. Rekonstruovaný MRM elektroferogram CE-ESI-MS/MS separace negativního séra a obohaceného vzorku séra po L-L extrakci za optimálních podmínek je zobrazen na Obrázku 22. V době studia na této diplomové práci nebyl dostupný skutečný reálný vzorek.

Výsledky naznačují použitelnost vyvinuté metody jako alternativního přístupu pro klinickou a toxikologickou analýzu DBZD k nejpoužívanější metodě LC-MS.



Obrázek 22: Rekonstruované MRM chromatogramy NACE-ESI-MS/MS separace extraktu séra obohaceného syntetickými benzodiazepiny 10 (ng/ml) a extraktu slepého vzorku séra. Podmínky: separační elektrolyt 20 mM octan amonný v ACN s přidavkem 100 mM trifluoroctová kyselina, $U = -20$ kV, $U_{ESI} = +4,0$ kV, dávkování 50 mbar/5s, $T = 250$ °C, průtok nebulizačního plynu 10 l/min, tlak nebulizačního plynu 6 psi, pomocná sprejovací kapalina MeOH/voda/HCOOH (50:49,8:0,2, v/v/v), průtok sprejovací kapaliny 6 μ l/min. 1 – diclazepam, 2 – phenazepam, 3 – flubromazolam, 4 – etizolam, 5 – flubromazepam, 6 – nimetazepam, 7 – pyrazolam, 8 – deschloroetizolam, 9 – bentazepam.

4.2 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENTY DBZD

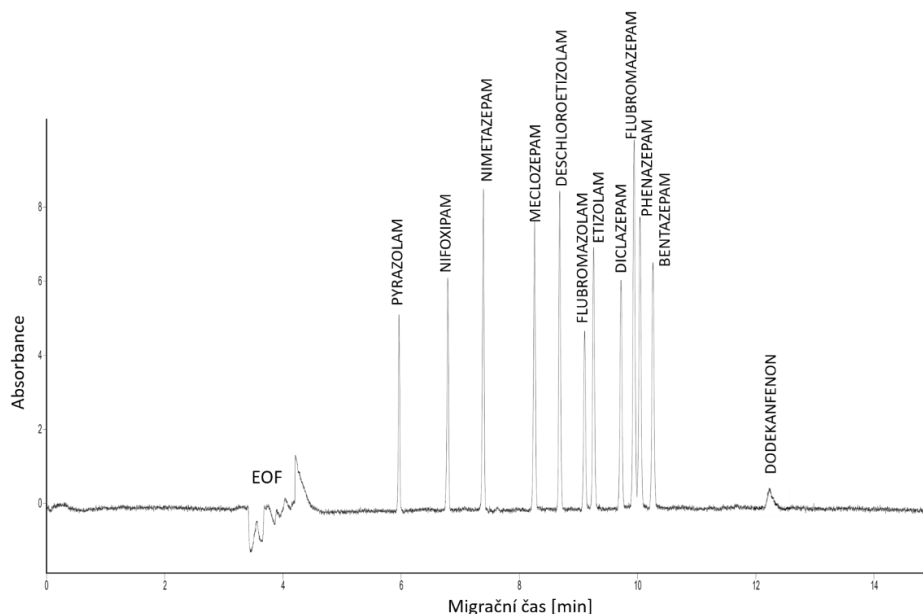
Stanovení hodnot rozdělovacích koeficientů ($\log P$) metodou MEKC je založena na měření kapacitních faktorů studovaných látek, které mohou být vypočteny z jejího retenčního času, migračního času elektroosmotického toku (EOF) a migračního času micel podle rovnice (17).

$$k = \frac{t_r - t_{eof}}{t_{eof} \left(1 - \frac{t_r}{t_{mc}}\right)} \quad (17)$$

kde t_r je retenční čas studované látky, t_{eof} je migrační čas markeru elektroosmotického toku (EOF) a t_{mc} je migrační čas micelárního markeru.

Nejprve byla provedena optimalizace separace DBZD pro MEKC. Byly optimalizovány: pH základního elektrolytu, koncentrace fosforečnanu sodného, koncentrace SDS a množství butan-1-olu pro správné rozlišení analytů.

Vyhovující BGE pro separaci studovaných DBZD byl 20 mM fosforečnan sodný pH 7,5 s 40 mM SDS a přídavkem 7% (v/v) butan-1-olu. Tento BGE byl použit pro naměření hodnot $\log P$ studovaných DBZD v dalším kroku. Elektroferogram separace studovaných DBZD pomocí MEKC je zobrazen na obrázku 23. Stanovení rozdělovacích koeficientů bylo v tomto případě realizováno pro 11 DBZD (navíc nifoxipam a meclonazepam, které byly k dispozici dodatečně).



Obrázek 23: Elektroferogram MEKC separace studovaných DBZD. Podmínky: separační elektrolyt 20 mM fosforečnan sodný pH 7,5, 40 mM SDS a 7% (v/v) butan-1-ol, $U = +20$ kV, injekce vzorku 100 mbar/5 s, vlnová délka 200 nm.

Pro zjištění závislosti mezi $\log k$ a $\log P$ za daných separačních podmínek, byly změřeny a vypočítány hodnoty $\log k$ pro sadu standardů (hydrofobních látek), pro které je hodnota $\log P$ známá a tabelována ¹¹⁷. Jako kalibrační sloučeniny byly použity benzen, toluen, ethylbenzen, propylbenzen a butylbenzen. Jako marker EOF byl použit methanol a dodekanofenon byl využit jako micelární marker.

Získaný lineární vztah a korelační koeficient ve 20 mM fosforečnanu sodném pH 7,5 s 40 mM SDS a 7% (v/v) butan-1-ol je vyjádřen rovnicí (18):

$$\log P = 1,257 \log k + 2,052; R = 0,9996 \quad (18)$$

Kromě studovaných syntetických látek byly měřeny shodným způsobem také některé klasické benzodiazepiny (BZD) u nichž jsou známy hodnoty $\log P$. Naměřené hodnoty $\log P$ pro klasické BZD jsou ve velmi dobré shodě s publikovanými hodnotami jejich rozdělovacích koeficientů. Také experimentálně získané hodnoty $\log P$ studovaných DBZD byly porovnány s vypočítanými hodnotami pomocí softwaru ACDLabs. Vypočítané hodnoty rozdělovacích koeficientů byly obecně nižší než experimentálně získané hodnoty s výjimkou bentazepamu. Korelace mezi experimentálními a vypočtenými hodnotami $\log P$ je relativně vysoká ($R = 0,841$). Experimentálně naměřené hodnoty $\log P$ klasických benzodiazepinů (BZD) spolu s jejich publikovanými hodnotami a experimentálně naměřené hodnoty $\log P$ pro studované DBZD společně s vypočtenými hodnotami jsou uvedeny v Tabulka 66.

Tabulka 6: Experimentální odhady hodnot $\log P$ studovaných DBZD a klasických BZD ($n=5$).

DBZD	$\log P \pm SD$	Vypočtené $\log P \pm SD$
Pyrazolam	$2,26 \pm 0,04$	$1,35 \pm 1,12$
Nimetazepam	$2,66 \pm 0,03$	*
Meclozepam	$2,89 \pm 0,03$	*
Deschloroetizolam	$3,03 \pm 0,02$	$2,47 \pm 1,42$
Flubromazolam	$3,17 \pm 0,02$	$2,29 \pm 1,15$
Etizolam	$3,23 \pm 0,02$	$2,63 \pm 1,43$
Diclazepam	$3,40 \pm 0,02$	$3,12 \pm 0,57$
Flubromazepam	$3,50 \pm 0,02$	$2,29 \pm 1,15$
Phenazepan	$3,55 \pm 0,02$	$3,30 \pm 0,59$
Bentazepam	$3,68 \pm 0,02$	$4,12 \pm 0,87$

BZD	log P ± SD	log P (literatura) ¹¹⁸
Bromazepam	2,60 ± 0,03	2,05
Clomazepam	2,94 ± 0,03	2,41
Oxazepam	3,32 ± 0,02	2,2
Midazolam	3,69 ± 0,02	4,3
Alprazolam	3,07 ± 0,03	2,12
Diazepam	3,38 ± 0,02	2,7
Medazepam	4,05 ± 0,02	4

* Kalkulace hodnoty *Log P* není možná z důvodu přítomnosti nitro- skupiny ve sktruktuře.

5. ZÁVĚR

Vývoj nových analyticko-toxikologických metod s využitím v klinické praxi je nezbytný. Syntetické benzodiazepiny velmi rychle pronikají na evropskou drogovou scénu a je tedy nutné disponovat účinnými metodami jejich stanovení v biologickém materiálu. V tomto kontextu byla vyvinutá nová selektivní metoda.

Metoda NACE-ESI-MS/MS je vhodná pro separaci, identifikaci a kvantifikaci syntetických benzodiazepinů v séru. Pro tuto analýzu byl využit těkavý nevodný elektrolyt na bázi 20 mM octanu amonného s přidavkem 100 mM trifluoroctové kyseliny. Pro analýzu byla využívána SMIL pokrytá kapilára, která generuje silný anodický elektroosmotický tok a urychluje tak samotnou separaci za předpokladu uspokojivého rozlišení a účinnosti. Byly studovány a hodnoceny podmínky separace a detekce, tak aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků v oblasti selektivity, rozlišení a odezvy detektoru. Jako extrakční činidlo pro přečištění a extrakci vzorku pomocí L-L extrakce byl využit 1- chlorbutan. Získané hodnoty limitů detekcí jednotlivých syntetických benzodiazepinů jsou srovnatelné s LC-ESI-MS analýzou a jsou v řádech ng/ml. Vyvinutá metoda NACE-ESI-MS/MS slouží jako účinná alternativa pro klinicko-toxikologickou a forenzní analýzu nejpoužívanějších chromatografických metod. Navíc námi vyvinutá metoda vykazuje lepší rozlišení pouze s mírným prodloužením doby analýzy oproti LC-MS metodě.

Mimo jiné byla také vyvinuta a optimalizována metoda separace syntetických benzodiazepinů pomocí MEKC-DAD. Tato vyvinutá metoda byla využita pro stanovení hodnot rozdělovacích koeficientů jednotlivých studovaných benzodiazepinů. Pro separaci a analýzu studovaných DBZD byl využit elektrolyt 20 mM fosforečnan sodný o pH 7,5 s 40 mM SDS a přidavkem 7% (v/v) butan-1-ol. Experimentálně získané hodnoty byly dále srovnány s hodnotami teoreticky vypočtenými.

6. SUMMARY

The development of new analytical toxicological methods for use in clinical practice is necessary. Synthetic benzodiazepines are rapidly invading the European drug scene; therefore, it is essential to create new effective methods for their determination in biological matrices. In this regard, a new selective method was developed.

The NACE-ESI-MS/MS method is suitable for the separation, identification and quantification of synthetic benzodiazepines in serum. A volatile non-aqueous electrolyte composed of 20 mM ammonium acetate with an addition of 100 mM trifluoroacetic acid was used for the analysis. The analysis was carried out using a SMIL surface modified capillary, which generates a strong anodic electroosmotic flow and therefore accelerates the separation, assuming the resolution and efficiency are suitable. The separation and detection conditions were studied and judged in order to achieve the best selectivity, resolution and detector response values. 1-chlorobutane was used for sample purification and the L-L extraction. The acquired detection limits of the individual synthetic benzodiazepines, being ng/ml, are comparable to an LC-ESI-MS analysis. The developed NACE-ESI-MS/MS method acts as an effective alternative to the most commonly utilized clinical toxicology and forensic chromatographic methods. In addition, this method exhibits better resolution with only a slight extension of the analysis time, compared to an LC-MS method.

Moreover, a MEKC-DAD method for the separation of synthetic benzodiazepines was developed and optimized. This method was used for the determination of the partition coefficients of synthetic benzodiazepines. An electrolyte consisting of 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, and 40 mM SDS with an addition of 7% (v/v) butane-1-ol was used for the separation. The experimental values were compared to theoretical values.

7. SEZNAM LITERATURY

1. Geiger M., Hogerton, A. L. & Bowser, M. . Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **84**, 577–596 (2012).
2. Mikšík, I., Sedláková, P., Mikulíková, K., Eckhardt, A. & Kašička, V. Comparison of CE-MS and LC-MS Analyses of Avian Eggshell Matrix Proteins. *Chromatographia* **67**, 89–96 (2007).
3. Kašička, V. Recent developments in CE and CEC of peptides (2009-2011). *Electrophoresis* **33**, 48–73 (2012).
4. El Rassi, Z. Electrophoretic and electrochromatographic separation of proteins in capillaries: An update covering 2007-2009. *Electrophoresis* **31**, 174–191 (2010).
5. Suntornsuk, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 29–52 (2010).
6. Šolínová, V., Kašička, V., Koval, D., Česnek, M. & Holý, A. Determination of acid-base dissociation constants of amino- and guanidinopurine nucleotide analogs and related compounds by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **27**, 1006–1019 (2006).
7. Tavares, M. F. M. *et al.* Applications of capillary electrophoresis to the analysis of compounds of clinical, forensic, cosmetological, environmental, nutritional and pharmaceutical importance. *J. Braz. Chem. Soc.* **14**, 281–290 (2003).
8. Kašička, V. Teoretické základy a separační principy kapilárních electromigračních metod. *Chem. List.* **91**, 320–329 (1997).
9. Švidrnoch, M. Analýza ethylglukuronidu pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. (Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, 2012).
10. Harley, D. Electroosmotic Flow. *www.community.asdlib.org* (8.4.2013) at <http://community.asdlib.org/imageandvideoexchange/forum/2013/08/04/electroosmotic-flow/>

11. Felhofer, J. L., Blanes, L. & Garcia, C. D. Recent developments in instrumentation for capillary electrophoresis and microchip-capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **31**, 2469–2486 (2010).
12. Harvey, D. Modern analytical chemistry. 368 (McGraw-Hill Companies Inc., 2000).
13. Lucy, C. A. Factors affecting selectivity of inorganic anions in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **850**, 319–337 (1999).
14. Roy, K. I. & Lucy, C. A. Influence of methanol as a buffer additive on the mobilities of organic cations in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **24**, 370–379 (2003).
15. Righetti, P. G., Gelfi, C., Sebastiano, R. & Citterio, A. Surfing silica surfaces superciliously. *J. Chromatogr. A* **1053**, 15–26 (2004).
16. Righetti, P. G., Gelfi, C., Verzola, B. & Castelletti, L. The state of the art of dynamic coatings. *Electrophoresis* **22**, 603–611 (2001).
17. Riekkola, M. L., Wiedmer, S. K., Valkó, I. E. & Sirén, H. Selectivity in capillary electrophoresis in the presence of micelles, chiral selectors and non-aqueous media. *J. Chromatogr. A* **792**, 13–35 (1997).
18. Coufal, P., Štulík, K., Claessens, H. A. & Cramers, C. A. The magnitude and reproducibility of the electroosmotic flow in silica capillary tubes. *J. High Resolut. Chromatogr.* **17**, 325–334 (1994).
19. Potoček, B., Gaš, B., Kenndler, E. & Štědrý, M. Electroosmosis in capillary zone electrophoresis with non-uniform zeta potential. *J. Chromatogr. A* **709**, 51–62 (1995).
20. Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, a & Ando, T. Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular Capillaries. *Anal. Chem.* **56**, 111–113 (1984).
21. Terabe, S. Electrokinetic Chromatography - An Interface between Electrophoresis and Chromatography. *Trac-Trend Anal. Chem.* **8**, 129–134 (1989).
22. Watarai, H. Microemulsion Capillary Electrophoresis. *Chem. Lett.* **20**, 391–394 (1991).

23. Terabe, S. & Isemura, T. Effect of polymer ion concentration on migration velocities in ion-exchange electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* **515**, 667–676 (1990).
24. Terabe, S., Ozaki, H., Otsuka, K. & Ando, T. Electrokinetic chromatography with 2-O-carboxymethyl- β -cyclodextrin as a moving ‘stationary’ phase. *J. Chromatogr. A* **332**, 211–217 (1985).
25. Barker, G., Russo, P. & Hartwick, R. Chiral separation of leucovorin with bovine serum albumin using affinity capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **64**, 3024–3028 (1992).
26. Bächmann, K. & Göttlicher, B. New particles as pseudostationary phase for electrokinetic chromatography. *Chromatographia* **45**, 249–254 (1997).
27. Terabe, S. Micellar Electrokinetic Chromatography. *Anal. Chem.* **76**, 240 A–246 A (2004).
28. Terabe, S. Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2**, 99–120 (2009).
29. Ghosh, D., Pradhan, A. K., Mondal, S., Begum, N. A. & Mandal, D. Proton transfer reactions of 4'-chloro substituted 3-hydroxyflavone in solvents and aqueous micelle solutions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 8594–8607 (2014).
30. Bunton, C. A. & Wolfe, B. The problem of pH in Micellar Catalyzed Reaction. *J. Am. Soc.* **1972**, 3742–3749 (1973).
31. Jorgenson, J. W. & DeArman Lukacs, K. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *J. High Resolut. Chromatogr.* **4**, 230–231 (1981).
32. Jorgenson, J. W. & Lukacs, K. D. Capillary Zone Electrophoresis. *Science.* **222**, 266–272 (1983).
33. Cifuentes, A., Poppe, H., Kraak, J. C. & Erim, F. B. Selectivity change in the separation of proteins and peptides by capillary electrophoresis using high-molecular-mass polyethyleneimine. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **681**, 21–27 (1996).
34. Yao, Y. J. & Li, S. F. Y. Capillary zone electrophoresis of basic proteins with chitosan as a capillary modifier. *J. Chromatogr. A* **663**, 97–104 (1994).

35. Towns, J. K. & Repier, F. E. Capillary Electrophoretic Separations of Proteins Using Nonionic Surfactant Coatings. *Anal. Chem.* **1132**, 1126–1132 (1991).
36. Bedia Erim, F., Cifuentes, A., Poppe, H. & Kraak, J. C. Performance of a physically adsorbed high-molecular-mass polyethyleneimine layer as coating for the separation of basic proteins and peptides by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **708**, 356–361 (1995).
37. Chiu, R. W., Jimenez, J. C. & Monnig, C. A. High molecular weight polyarginine as a capillary coating for separation of cationic proteins by capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* **307**, 193–201 (1995).
38. Liu, Q., Lin, F. & Hartwick, R. Poly (diallyldimethylammonium chloride) as a Cationic Coating for Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr.* **36**, 126–130 (1997).
39. Bruin, G. J. . *et al.* Capillary zone electrophoretic separation of proteins in polyethylene glycol-modified capillaries. *J. Chromatogr. A* **471**, 429–436 (1989).
40. Herren, B. J., Shager, S. G., Alstine, van J., Milton Harris, J. & Snyder, R. J. Control of electroosmosis in coated quartz capillaries. *J. Colloid Interface Sci.* **115**, 46–55 (1987).
41. Xian, H. & Horváth, C. Capillary zone electrophoresis with fluid-impervious polymer tubing inside a fused-silica capillary. *J. Chromatogr. A* **788**, 155–164 (1997).
42. Niessen, W. M. A., Tjaden, U. R. & Greef, J. Van Der. Review Capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **636**, 3–19 (1993).
43. Córdova, E., Gao, J. & Whitesides, G. M. Noncovalent Polycationic Coatings for Capillaries in Capillary Electrophoresis of Proteins. *Anal. Chem.* **69**, 1370–1379 (1997).
44. Katayama, H., Ishihama, Y. & Asakawa, N. Stable capillary coating with successive multiple ionic polymer layers. *Anal. Chem.* **70**, 2254–2260 (1998).
45. Katayama, H., Ishihama, Y. & Asakawa, N. Stable Cationic Capillary Coating with Successive Electrophoresis developed by using a novel coating procedure , successive. *Anal. Chem.* **70**, 5272–5277 (1998).

46. Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Yonker, C. R. & Smith, R. D. On-Line Mass Spectrometric Detection for Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* **59**, 1230–1232 (1987).
47. Schmitt-Kopplin, P. & Frommberger, M. Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications. *Electrophoresis* **24**, 3837–3867 (2003).
48. Maxwell, E. J. & Chen, D. D. Y. Twenty years of interface development for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Chem. Acta* **627**, 25–33 (2008).
49. Hommerson, P., Khan, A. M., de Jong, G. J. & Somsen, G. W. Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Principles, design, and application. *Mass Spectrom. Rev.* **30**, 1096–1120 (2011).
50. Holčápek, M. & Jandera, P. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chem. List.* **92**, 278–286 (1998).
51. Smetková, M., Ondra, P. & Lemr, K. HPLC-MS a CE-MS s ionizací za atmosférického tlaku v analýze morfinu a příbuzných látek. *Chem. List.* **98**, 336–342 (2004).
52. Raffaelli, A. & Saba, A. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **22**, 318–331 (2003).
53. Takats, Z., Wiseman, J. M. J., Gologan, B. B., Cooks, R. G. & Takáts, Z. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science.* **306**, 471–473 (2004).
54. Cody, R. B., Laramee, J. a & Durst, H. D. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Anal. Chem.* **77**, 2297–2302 (2005).
55. Tanaka, K. *et al.* Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 151–153 (1988).

56. Horning, E. C., Horning, M. G., Carroll, D. I., Dzidic, I. & Stillwell, R. N. New Picogram Detection System Based on a Mass Spectrometer with an External Ionization Source at Atmospheric Pressure. *Anal. Chem* **45**, 936–943 (1973).
57. Sakairi, M., Koizumi, H., Takada, Y., Sakairi, M. & Koizumi, H. Atmospheric Pressure Chemical Ionization Interface for Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **67**, 1474–1476 (1995).
58. Isoo, K., Otsuka, K. & Terabe, S. Application of sweeping to micellar electrokinetic chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometric analysis of environmental pollutants. *Electrophoresis* **22**, 3426–3432 (2001).
59. Dole, M. *et al.* Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* **49**, 2240–2249 (1968).
60. Von Brocke, A., Nicholson, G. & Bayer, E. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis* **22**, 1251–1266 (2001).
61. Zhong, X., Zhang, Z., Jiang, S. & Li, L. Recent advances in coupling capillary electrophoresis-based separation techniques to ESI and MALDI-MS. *Electrophoresis* **35**, 1214–1225 (2014).
62. Kebarle, P. & Tang, L. From ions in solution to ions in the gas phase. *Anal. Chem.* **65**, 972A–986A (1993).
63. Ekman, R. *Mass Spectrometry - Instrumentation, Interpretation and Application*. (John Wiley & Sons, 2009).
64. Pantůčková, P., Gebauer, P., Boček, P. & Křivánková, L. Electrolyte systems for on-line CE-MS: Detection requirements and separation possibilities. *Electrophoresis* **30**, 203–214 (2009).
65. Norková, R., Dytrtová, J. J. & Kašička, V. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektro-migračních metod s hmotnostní spektrometrickou detekcí. *Chem. List.* **107**, 949–955 (2013).
66. Lee, E. ., Muck, W., Henion, J. D. & Covey, T. R. Liquid junction coupling for capillary zone electrophoresis ion spray mass-spectrometry. *Biomed. environmental mass Spectrom.* **18**, 844–850 (1989).

67. Fanali, S., D'Orazio, G., Foret, F., Kleparnik, K. & Aturki, Z. On-line CE-MS using pressurized liquid junction nanoflow electrospray interface and surface-coated capillaries. *Electrophoresis* **27**, 4666–4673 (2006).
68. Zhang, B., Foret, F. & Karger, B. L. A microdevice with integrated liquid junction for facile peptide and protein analysis by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **72**, 1015–1022 (2000).
69. Smith, R. D., Barinaga, C. J. & Udseth, H. R. Improved Electrospray Ionization Interface for Capillary Zone-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **60**, 1948–1952 (1988).
70. Bateman, K. P. Electrochemical Properties of Capillary Electrophoresis-Nanoelectrospray Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 309–317 (1999).
71. Ramsey, R. S. & McLuckey, S. A. Capillary electrophoresis/electrospray ionization ion trap mass spectrometry using a sheathless interface. *J. Microcolumn Sep.* **7**, 461–469 (1995).
72. Chen, Y. R. & Her, G. R. A simple method for fabrication of silver-coated sheathless electrospray emitters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 437–441 (2003).
73. Zamfir, A. D., Dinca, N., Sisu, E. & Peter-Katalinić, J. Copper-coated microsyringe interface for on-line sheathless capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry of carbohydrates. *J. Sep. Sci.* **29**, 414–422 (2006).
74. Bendahl, L., Hansen, S. H. & Olsen, J. A new sheathless electrospray interface for coupling of capillary electrophoresis to ion-trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 2333–2340 (2002).
75. Chang, Y. Z. & Her, G. R. Sheathless capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry using a carbon-coated fused silica capillary. *Anal. Chem.* **72**, 626–630 (2000).
76. Fang, L., Zhang, R., Williams, E. R. & Zare, R. N. On-Line Time-of-Flight Mass Spectrometric Analysis of Peptides Separated by Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **66**, 3696–3701 (1994).

77. Cao, P. & Moini, M. A Novel Sheathless Interface for Capillary Electrophoresis/Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using an In-capillary Electrode. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8**, 561–564 (1997).
78. Moini, M. Design and performance of a universal sheathless capillary electrophoresis to mass spectrometry interface using a split-flow technique. *Anal. Chem.* **73**, 3497–3501 (2001).
79. Settlage, R. E., Russo, P. S., Shabanowitz, J. & Hunt, D. F. A Novel μ -ESI Source for Coupling Capillary Electrophoresis and Mass Spectrometry: Sequence Determination of Tumor Peptides at the Attomole Level. *J. Microcolumn Sep.* **10**, 281–285 (1998).
80. Whitt, J. T. & Moini, M. Capillary electrophoresis to mass spectrometry interface using a porous junction. *Anal. Chem.* **75**, 2188–2191 (2003).
81. Figeys, D., Van Oostveen, I., Ducret, A. & Aebersold, R. Protein identification by capillary zone electrophoresis/microelectrospray ionization-tandem mass spectrometry at the subfemtomole level. *Anal. Chem.* **68**, 1822–1828 (1996).
82. Severs, J. C. & Smith, R. D. Characterization of the microdialysis junction interface for capillary electrophoresis/microelectrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **69**, 2154–8 (1997).
83. Moini, M. Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip. *Anal. Chem.* **79**, 4241–4246 (2007).
84. Ishihama, Y., Katayama, H., Asakawa, N. & Oda, Y. Highly robust stainless steel tips as microelectrospray emitters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 913–918 (2002).
85. Mokaddem, M., Gareil, P., Belgaied, J. E. & Varenne, A. A new insight into suction and dilution effects in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry via an electrospray ionization interface. Part I-Suction effect. *Electrophoresis* **29**, 1957–1964 (2008).
86. Gale, D. C. & Smith, R. D. Small volume and low flow-rate electrospray ionization mass spectrometry of aqueous samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **7**, 1017–1021 (1993).

87. Stephens, W. . A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Phys. Rev.* **69**, 691–691 (1946).
88. Hu, Q. Z. *et al.* The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **40**, 430–443 (2005).
89. Boháč, M., Ingendoh, A., Fuchser, J. & Witt, M. Iontová cyklotronová rezonance s fourierovou transformací (FT-ICR MS) a její využití jako nejflexibilnější hmotnostně spektrometrické metody v proteomice. *Chem. List.* **99**, 943–951 (2005).
90. Paul, V. W. & Steinwedel, H. Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Z. Naturforschg.* **8**, 448–450 (1953).
91. Hoffmann, E. *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. (John Wiley & Sons, 2007).
92. Ivanov, D. Maseni spektrometar. *www.technologijahrane.com* (2.8.2008) at <<http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/maseni-spektrometar>>
93. Agilent Technologies. Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS System: Concepts Guide. Publikáční číslo: G3335-90069
94. Lincová, D. *Základní a aplikovaná farmakologie*. (GALÉN, 2002).
95. Tasman, A. & Lieberman, J. A. *Handbook of psychiatric drugs*. (Wiley, 2006).
96. White, J. M. & Irvine, R. J. Mechanisms of fatal opioid overdose. *Addiction* **94**, 961–72 (1999).
97. Abbott, R. & Smith, D. E. The New Designer Drug Wave: A Clinical, Toxicological, and Legal Analysis. *J. Psychoactive Drugs* **47**, 368–371 (2015).
98. Namera, A., Nakamoto, A., Saito, T. & Nagao, M. Colorimetric detection and chromatographic analyses of designer drugs in biological materials: A comprehensive review. *Forensic Toxicol.* **29**, 1–14 (2011).
99. Zaitso, K. *et al.* Recently abused b-keto derivatives of 3,4-methylenedioxyphenylalkylamines: A review of their metabolisms and toxicological analysis. *Forensic Toxicol.* **29**, 73–84 (2011).
100. Auwärter, V. *et al.* ‘Spice’ and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *J. Mass Spectrom.* **44**, 832–837 (2009).

101. Kneisel, S. *et al.* Identification and structural characterization of the synthetic cannabinoid 3-(1-adamantoyl)-1-pentylindole as an additive in 'herbal incense'. *J. Mass Spectrom.* **47**, 195–200 (2012).
102. Uchiyama, N., Kikura-Hanajiri, R., Kawahara, N., Haishima, Y. & Goda, Y. Identification of a cannabinoid analog as a new type of designer drug in a herbal product. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **57**, 439–41 (2009).
103. Moosmann, B., King, L. A. & Auwärter, V. Designer benzodiazepines: A new challenge. *World Psychiatry* **14**, 248–248 (2015).
104. Lukasik-Glebocka, M. *et al.* Flubromazolam - A new life-threatening designer benzodiazepine. *Clin. Toxicol.* **54**, 66–68 (2016).
105. Moosmann, B. *et al.* Characterization of the designer benzodiazepine pyrazolam and its detectability in human serum and urine. *Forensic Toxicol.* **31**, 263–271 (2013).
106. Meyer, M. R., Bergstrand, M. P., Helander, A. & Beck, O. Identification of main human urinary metabolites of the designer nitrobenzodiazepines clonazolam, meclonazepam, and nifoxipam by nano-liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for drug testing purposes. *Anal. Bioanal. Chem.* **408**, 3571–3591 (2016).
107. Pettersson Bergstrand, M., Helander, A., Hansson, T. & Beck, O. Detectability of designer benzodiazepines in CEDIA, EMIT II Plus, HEIA, and KIMS II immunochemical screening assays. *Drug Test. Anal. (in press)*
108. Moosmann, B. *et al.* Detection and identification of the designer benzodiazepine flubromazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics. *J. Mass Spectrom.* **48**, 1150–1159 (2013).
109. Huppertz, L. M. *et al.* Characterization of the four designer benzodiazepines clonazolam, deschloroetizolam, flubromazolam, and meclonazepam, and identification of their in vitro metabolites. *Forensic Toxicol.* **33**, 388–395 (2015).
110. Kriikku, P. *et al.* Phenazepam abuse in Finland: Findings from apprehended drivers, post-mortem cases and police confiscations. *Forensic Sci. Int.* **220**, 111–117 (2012).

111. Pettersson Bergstrand, M., Helander, A. & Beck, O. Development and application of a multi-component LC-MS/MS method for determination of designer benzodiazepines in urine. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1035**, 104–110 (2016).
112. Cronin, M. T. D. The Role of Hydrophobicity in Toxicity Prediction. *Curr. Comput. Aided. Drug Des.* **2**, 405–413 (2006).
113. Berthod, A. & Carda-Broch, S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *J. Chromatogr. A* **1037**, 3–14 (2004).
114. Heibrt, B. J. & Dorsey, J. n-Octanol-Water Partition Coefficient Estimation by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Anal. Chem.* **67**, 744–749 (1995).
115. Peters, F. T., Drummer, O. H. & Musshoff, F. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* **165**, 216–224 (2007).
116. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. & Chavez-Eng, C. . Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 3019–3030 (2003).
117. Gavenda, A. *et al.* Estimation of partition coefficients by MEKC part I: Potential pharmaceuticals based on 2-quinolone and 2-indolone. *J. Sep. Sci.* **24**, 723–728 (2001).
118. Moffat, A. C. & Osselton, M. D. *Clarke's Analysis of Drug and Poisons*. (Pharmaceutical Press, 2004).