

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**SPOJENÍ ELEKTROKINETICKÉ
CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ
SPEKTROMETRIÍ V TOXIKOLOGICKÉ
A KLINICKÉ ANALÝZE**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Jméno autora: RNDr. Martin Švidrnoch

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

Studijní program: P1407 Chemie

Studijní obor: Analytická chemie

Rok: 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně, na základě originálních vědeckých výsledků, a že jsem použil pouze podklady uvedené v příloženém seznamu.

Souhlasím s tím, aby práce byla prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 11. 7. 2016

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli, doc. RNDr. Vítězslavu Maierovi, Ph.D., který mi po celou dobu mého postgraduálního studia věnoval obrovské množství času a energie, a jehož trpělivosti, ochoty, odborných znalostí a entusiasmů si nesmírně vážím.

Rovněž bych chtěl poděkovat všem svým kolegům, současným i minulým, bez jejichž nemalé pomoci a podpory by tato práce nevznikla. Zvláště bych chtěl poděkovat Dr. Adamu Příbylkovi za spolupráci a nespočetné diskuse v laboratoři i mimo ni.

Děkuji také své rodině a přátelům za nepřetržitou podporu po celou dobu mých studií, a svým rodičům v neposlední řadě i za to, že mi umožnili studium na vysoké škole.

Disertační práce vznikla za finanční podpory projektu IGA MZ č. NT 13593 Ministerstva zdravotnictví ČR a projektu IGA UP č. IGA_PrF_2016_016.

Martin Švidrnoch

Abstrakt

Disertační práce je zaměřena na studium nových možností aplikací spojení kapilární elektroforézy s tandemovou hmotnostní spektrometrií v toxikologické a klinické analýze. První část práce je věnována vybraným teoretickým aspektům elektromigračních metod, zejména pak elektrokinetické chromatografii ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Jsou zde popsány základní principy elektrokinetické chromatografie, micelární elektrokinetické chromatografie a dále je diskutován princip enantioseparací s pomocí elektrokinetické chromatografie. Další část teoretické práce je věnována specifikům spojení elektrokinetické chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií využívající ionizaci elektrosprejem.

Následuje část prezentující výsledky tří prací. Byly vyvinuty dvě analytické metody analýzy nových syntetických drog ze skupiny syntetických katinonů a kanabinoidů s využitím spojení micelární elektrokinetické chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie. Separace syntetických katinonů a syntetických kanabinoidů byly uskutečněny s využitím těkavých perfluorovaných karboxylových kyseliny (perfluoroheptanová a perfluorooktanová kyselina), které umožňují dosáhnout selektivní separace uvedených nových syntetických drog, a zároveň umožňují provést jejich identifikaci a kvantifikaci s pomocí tandemové hmotnosti spektrometrie bez experimentálních omezení. Obě vyvinuté metody byly validovány a aplikovány na analýzu biologického materiálu (krevní sérum a moč) pro účely objektivní diagnostiky intoxikace uvedenými drogami.

Třetí analytická metoda využívající spojení elektrokinetické chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií byla vyvinuta za účelem enantioseparace 2-hydroxyglutarové kyseliny s využitím vankomycinu jako chirálního selektoru. Vyvinutá metoda umožňuje dosáhnout enantioseparace 2-hydroxyglutarové kyseliny s dostatečným rozlišením nutným pro kvantifikaci jednotlivých enantiomerů v moči. Metoda byla validována a aplikována na analýzu vzorků moči zdravých jedinců i pacientů trpících vrozenou metabolickou poruchou - hydroxyglutarovou acidurií.

Abstract

The presented dissertation is focused on a study of new possible applications of capillary electrophoresis hyphenated with tandem mass spectrometry in toxicological and clinical analysis. The first part of the work is dealing with theoretical aspects of electrodriven separation methods, especially focused on electrokinetic chromatography and its hyphenation with mass spectrometry. In the next part, principle of enantioseparation by electrokinetic chromatography is discussed. Also other specifics of the hyphenation of electrokinetic chromatography methods with tandem mass spectrometry equipped with electrospray ionization are evaluated in the context of this dissertation.

The following part of the work presents three original works. Two analytical approaches for the analyses of new designer drugs (namely cathinone derivatives and synthetic cannabinoids and their metabolites) using micellar electrokinetic chromatography – tandem mass spectrometry are presented. The separations of synthetic cathinones and cannabinoids were performed using volatile perfluorocarboxylic acids (perfluoroheptanoic and perfluorooctanoic acid) which allow selective separation of the designer drugs. Tandem mass spectrometry enables the objective identification and quantification without experimental limitations. Both of the developed methods were validated and applied on the analyses of biological material (serum and urine).

The third method employing electrokinetic chromatography with tandem mass spectrometry was developed for enantioseparation of 2-hydroxyglutaric acid using vancomycin as chiral selector. The method allows to attain enantioseparation of 2-hydroxyglutaric acid with sufficient resolution which is necessary for individual enantiomers quantification. This method was also validated and its potential was verified on the analyses of urine samples from healthy persons as well as two patients suffering from inherited metabolic disease called hydroxyglutaric aciduria.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
AN	Agregační číslo
CD	Cyklodextrin
CFT	Technika kompletního plnění
CID	Kolizi indukovaná disociace
CMC	Kritická micelární koncentrace
CS	Chirální selektor
CSP	Chirální stacionární fáze
CE	Kapilární elektroforéza
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
<i>D</i>	Difuzní koeficient
DAD	Detektor diodového pole
EKC	Elektrokinetická chromatografie
EOF	Elektroosmotický tok
ESI	Ionizace elektrosprejem
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
ICP	Indukčně vázané plazma
KAT	Kathinony
KP	Krafftův bod
LC	Kapalinová chromatografie
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
LOD	Limit detekce

LOQ	Limit kvantifikace
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	Methanol
M_r	Relativní molekulová hmotnosti
MRM	Skenování více fragmentačních přechodů
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	Poměr hmotnosti k náboji
NLS	Skenování neutrálních ztrát
NSD	Nové syntetické drogy
OPL	Omamně a psychotropní látky
PFT	Technika částečného plnění
PFHA	Perfluoroheptanová kyselina
PFOA	Perfluorooktanová kyselina
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q	Kvadrupól
QqQ	Trojité kvadrupól
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SC	Syntetické kanabinoidy
SD	Směrodatná odchylka
SDS	Dodecylsíran sodný
SIM	Skenování vybraného iontu
SPE	Extrakce tuhou fází
SRM	Skenování jednoho fragmentačního přechodu
TIC	Celkový iontový proud
UV/VIS	Spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti
VAN	Vankomycin
VC	Vankomycin chlorid

Obsah

1. Úvod.....	11
2. Cíle disertační práce.....	13
3. Teoretické základy elektromigračních technik	14
3.1 Zdánlivá a elektroforetická mobilita	15
3.2 Elektroosmotický tok	16
3.3 Spojení elektromigračních metod s hmotnostní spektrometrií.....	17
3.4 Trojitý kvadrupól.....	21
3.5 Pracovní módy trojitého kvadrupólu	22
4. Elektrokinetická chromatografie.....	25
4.1 Micelární elektrokinetická chromatografie	26
4.2 Termodynamické a kinetické aspekty MEKC	28
4.2.1 Retenční faktor a rozlišení.....	28
4.2.2 Účinnost separace.....	30
4.3 Separace neutrálních analytů micelární elektrokinetickou chromatografií.....	31
4.4 Separace ionizovatelných analytů micelární elektrokinetickou chromatografií	32
4.5 Používané tenzidy a jejich vlastnosti	36
4.5.1 Perfluorované tenzidy	38
4.5.2 Specifika spojení MEKC-ESI-MS	40
5. Enantioseparace pomocí elektrokinetické chromatografie	42
5.1 Chiralita molekul.....	42
5.2 Základní aspekty enantioseparací s pomocí EKC	44
5.3 Experimentální přístupy pro enantioseparace s pomocí EKC-ESI-MS	49
5.3.1 Technika částečného plnění při enantioseparaci s pomocí EKC-ESI-MS	49
5.3.2 Vankomycin jako chirální selektor	51
5.4 Literatura	55
6. Analýza syntetických derivátů katinonu pomocí MEKC-ESI-MS/MS	61
6.1 Deriváty katinonu jako nové syntetické drogy.....	61
6.2 Chromatografické metody využívané pro analýzu nových syntetických katinonů ve forenzní a toxikologické analýze.....	63
6.3 Elektromigrační metody v analýze nových syntetických katinonů.....	64
6.4 Experimentální část	65
6.4.1 Použité chemikálie a materiál	65
6.4.2 Instrumentace	66
6.4.3 Příprava standardů, separačního elektrolytu a pomocné sprejovací kapaliny.....	67

6.4.5 Příprava vzorků moči	67
6.5 Výsledky a diskuze.....	68
6.5.1 Volba pracovního elektrolytu pro separaci KAT pomocí CE-DAD	68
6.5.2 Separace KAT pomocí MEKC-ESI-MS/MS	71
6.6 Částečná validace metody	78
6.7 Aplikace vyvinuté metody na modelový vzorek moči.....	80
6.8 Závěr.....	82
6.9 Literatura	83
7. Objektivní diagnostika intoxikace vybranými SC pomocí MEKC-ESI-MS/MS	85
7.1 Syntetické kanabinoidy a jejich vlastnosti	85
7.2 Současné metody analýzy SC v biologickém materiálu	88
7.3 Experimentální část	90
7.3.1 Použité chemikálie a materiál	90
7.3.2 Instrumentace	91
7.3.3 Příprava standardů.....	91
7.3.4 Příprava separačních elektrolytů	92
7.3.5 Příprava vzorků	92
7.3.6 SPE extrakce	93
7.3.7 Extrakce z kapaliny do kapaliny	93
7.4 Výsledky a diskuze.....	94
7.4.1 Měření fragmentačních spekter studovaných SC.....	94
7.4.2 Volba separačního elektrolytu pro separaci SC a jejich metabolitů.....	98
7.4.3 Separace SC a jejich metabolitů s pomocí MEKC.....	99
7.4.4 Separace pomocí MEKC-MS/MS	101
7.4.5 Extrakce SC z biologického materiálu	106
7.5 Částečná validace metody	108
7.6 Aplikace vyvinuté metody na modelové vzorky.....	112
7.7 Závěr.....	114
7.8 Literatura	115
8. Diagnostika hydroxyglutarových acidurií s využitím EKC-ESI-MS/MS – enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny	117
8.1 Kyselina D,L-2-hydroxyglutarová a její role v organismu	117
8.2 Analytické metody diagnostiky hydroxyglutarových acidurií.....	119
8.3 Experimentální část.....	122
8.3.1 Použité chemikálie a materiál	122
8.3.2 Instrumentace	122
8.3.3 Příprava standardů.....	123

8.3.4 Příprava separačních elektrolytů	124
8.3.5 Příprava reálných vzorků moči	124
8.4 Výsledky a diskuse	125
8.4.1 Optimalizace MS detekce.....	125
8.4.2 Optimalizace fragmentace v MS/MS	127
8.4.3 Optimalizace enatióseparace HG	128
8.5 Částečná validace metody	135
8.5.1 Matriční efekty	136
8.6 Analýza reálných vzorků.....	137
8.7 Závěr.....	138
8.8 Literatura	140

1. Úvod

Vysoce účinné separační techniky ve spojení s (tandemovou) hmotnostní spektrometrií jsou v současné době již standardním vybavením mnoha laboratoří zabývajících se analýzami složitých směsí látek v komplexních maticích. Velmi využívané je spojení chromatografických technik s hmotnostní spektrometrií. Kapilární elektroforéza ve spojení s hmotnostní spektrometrií (CE-MS) je však bohužel na okraji zájmu, a představuje spíše techniku využívanou především pro vědecké účely, přitom aplikační potenciál CE-MS je velmi široký. Přestože je spojení CE-MS jednou z nejmladších a opomíjených analytických technik, může její využití přinést nesporné výhody oproti zavedeným chromatografickým technikám, zejména oproti kapalinové chromatografii s hmotnostní spektrometrií (LC-MS).

Spojení CE-MS má oproti LC-MS svá specifika, která je nutno respektovat. Nejčastější spojení CE-MS využívá jako ionizační techniky ionizace elektrosprejem (ESI), avšak ani ostatní iontové zdroje pracující za atmosférického tlaku (APPI či APCI) nejsou dnes výjimkou. Vzhledem k tomu, že průtok separačního elektrolytu v kapiláře během elektroforetické separace je podstatně nižší než je průtok mobilní fáze v LC, je nutné podpořit ionizaci a tvorbu stabilního elektrospreje přidavným tokem kapaliny v místě výstupu eluátu z kapiláry. Dalším úskalím je nutnost využití těkavých složek separačního elektrolytu (nejčastěji na bázi octové a mravenčí kyseliny, hydrogenuhličitanu a amoniaku, případně triethylaminu).

K dosažení požadované selektivity elektroforetické separace je však v mnoha případech nutné využít málo těkavé složky a aditiva separačního elektrolytu, jako jsou např. chirální selektory (cyklodextriny, crown ethery, makrocyclická antibiotika aj.) případně tenzidy (dodecylsírán sodný, cetyltrimethylammonium bromid aj.). Tenzidy také umožňují separovat jak nabitě, tak nenabitě látky v jediné analýze mechanismem micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC).

V případě nutnosti použít netěkavou složku v pracovním elektrolytu je pro spojení CE-ESI-MS možným řešením technika částečného plnění. Kapilára se elektrolytem obsahujícím netěkavou složku naplní pouze zčásti, zbylá část kapiláry obsahuje elektrolyt bez netěkavé složky. Podmínky separace musí být navrženy tak, aby netěkavé složky nevstupovaly do iontového zdroje a nezpůsobovaly jeho kontaminaci. Druhou možností je náhrada netěkavých tenzidů jejich podstatně těkavějšími fluorovanými analogy. Dodecylsulfát sodný je možné nahradit perfluorokarboxylovými nebo perfluorosulfonovými kyselinami ve směsi s hydroxidem amonným. Výsledný separační elektrolyt je pak možné bez nutnosti využití techniky částečného plnění aplikovat pro separaci široké skupiny analytů. Technika částečného plnění je také využívána pro enantioseparace s pomocí CE-MS. Jde o nejčastější způsob zamezení vstupu netěkavého chirálního selektoru do iontového zdroje.

Disertační práce se zabývá možnostmi spojení elektrokinetické chromatografie (EKC) jednoho ze separačních módů CE a tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) v analýze fyziologicky aktivních látek pro potřeby jak toxikologické, tak klinické praxe. Kromě vlastního popisu teoretického základu EKC a jejího spojení s (MS/MS) jsou v jednotlivých kapitolách diskutovány konkrétní příklady použití vyvinutých metod.

Disertační práce je postavena na třech originálních pracích publikovaných v časopisech s impaktním faktorem. Dvě práce jsou zaměřeny na vývoj metod separace, identifikace a kvantifikace nových syntetických drog ze skupiny derivátů katinonu a syntetických kanabinoidů v biologických materiálech (moč a sérum) pro účely objektivní diagnostiky intoxikace uvedenými skupinami drog. Třetí práce je zaměřena na vývoj metody diagnostiky hydroxyglutarových acidurií u dětských pacientů.

2. Cíle disertační práce

Disertační práce se zabývá novými přístupy pro separaci několika skupin látek pro forenzní a klinické účely s pomocí spojení EKC-ESI-MS/MS. Cíle disertační práce lze shrnout do následujících okruhů:

I. Vývoj a aplikace nových metod EKC-ESI-MS/MS pro toxikologickou analýzu nových syntetických drog.

- (i) Využití perfluorooktanové kyseliny jako separačního elektrolytu pro analýzu syntetických derivátů kathinonu pomocí micelární elektrokinetické chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MEKC-ESI-MS/MS). Aplikace vyvinuté metody pro analýzu biologických vzorků za účelem objektivní diagnostiky intoxikace syntetickými kathinony.
- (ii) Studium perfluoroheptanové kyseliny jako těkavého tenzidu pro separaci nových syntetických drog ze skupiny syntetických kanabinoidů metodou MEKC-ESI-MS/MS. Aplikace vyvinuté metody pro analýzu biologických vzorků za účelem objektivní diagnostiky intoxikace syntetickými kanabinoidy.

II. Vývoj a aplikace metody EKC-ESI-MS/MS pro analýzu chirálních metabolitů v klinické analýze.

- (iii) Enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny s využitím vankomycin chloridu jako chirálního selektoru metodou EKC-ESI-MS/MS pro objektivní diagnózu hydroxyglutarových acidurií. Aplikace vyvinuté metody pro analýzu reálných vzorků pacientů.

3. Teoretické základy elektromigračních technik

Kapilární elektromigrační techniky jsou analytické separační techniky mající společný základ – umožňují separaci nabitých částic (iontů, iontových asociátů, nabitých komplexů, biomakromolekul, virů, bakterií atp.) na základě jejich rozdílné rychlosti pohybu ve stejnosměrném elektrickém poli v kapalném elektricky vodivém prostředí [1-3].

Základní veličinou, která definuje pohyb nabitě částice ve stejnosměrném elektrickém poli je elektroforetická mobilita μ_{ep} (1). Její hodnota, společně s intenzitou elektrického pole E , je jedním z faktorů determinujících rychlost pohybu dané částice v_{ep} .

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

Intenzita elektrického pole E je definována vztahem (2):

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

kde U je vložené stejnosměrné napětí a L je celková délka separačního lože.

Elektrická síla F_{el} (3), která umožňuje pohyb částice, je ve vodivém kapalném separačním prostředí vystavena působení síly opačné, frikční F_{fr} (4). Frikční síla je dána Stokesovým zákonem a je určena nábojem částice q , velikosti částice r a viskozitou prostředí η , ve kterém se tato částice pohybuje.

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

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

Vztah pro frikční sílu (4) aproximuje vlastnosti nabitě částice jako kulový objekt s efektivním poloměrem r . Tvar a velikost částice v daném kapalném prostředí je však podstatně odlišný a závisí mimo jiné na její solvataci. Avšak pro základní teoretickou definici tento zjednodušený popis chování částice v elektrickém poli postačuje. Jsou-li

obě síly v rovnováze ($F_{el} = -F_{fr}$, resp. $|F_{el}| = |F_{fr}|$), vzniká ustálený stav, kdy nabitá částice v elektrickém poli migruje určitou rychlostí podle vztahu (1). Elektroforetickou mobilitu μ_{ep} nabité částice je možné definovat pomocí fyzikálních vlastností částice a okolního prostředí (5):

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

3.1 Zdánlivá a elektroforetická mobilita

Výsledky získané experimentálním měřením udávají závislost odezvy zvoleného detektoru na čase, kdy takto zjištěným kvalitativním parametrem je migrační čas t_m . Z migračního času analytu lze vypočítat zdánlivou elektroforetickou mobilitu μ_{av} , která za daných komplexních experimentálních podmínek (složení separačního elektrolytu, iontová síla, teplota, viskozita, pH atd.) odpovídá vektorovému součtu mobility elektroforetické μ_{ep} a elektroosmotické mobility μ_{eof} (6):

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

Samotnou elektroforetickou mobilitu je pak možno jednoduše vypočítat pomocí vztahu (7):

$$\mu_{ep} = \frac{lL}{(\mu_{av} + \mu_{eof})U} \quad (7)$$

kde, kromě již definovaných veličin, vystupuje navíc celková délka separačního lože L a její tzv. efektivní délka l , tedy délka od místa injekce analytu po detektor.

Je-li detekční systém umístěn až na konci kapiláry (obvykle MS, nebo amperometrická detekce), je efektivní délka shodná s délkou celkovou. Získaná elektroforetická mobilita je veličinou závislou na celé řadě parametrů separačního systému a z tohoto důvodu ji nelze použít pro kvalitativní analýzu. Z fyzikálně-chemického hlediska tedy není konstantou. Její význam pro vlastní separaci je však značný, neboť se jedná

o veličinu determinující selektivitu separace dvou migrujících analytů. Selektivitu α (8) lze tedy pro případ CE definovat jako podíl elektroforetických mobilit dvojice analytů (μ_1 a μ_2), přičemž platí, že čím větší je jejich rozdíl, tím větší je selektivita:

$$\alpha = \frac{\mu_1}{\mu_2} \quad (8)$$

3.2 Elektroosmotický tok

Jedním z důležitých faktorů, který se podílí na transportu analytů při jejich migraci v elektrickém poli je elektroosmotický tok (EOF), který vzniká v kapilárách o malém vnitřním průměru (přibližně do 200 μm) po vložení stejnosměrného napětí. Nejčastěji používané kapiláry jsou na bázi taveného křemene, které mají na své vnitřní stěně silanolové skupiny, jejichž $\text{p}K_a \sim 5,3$ [1,4]. Silanolové skupiny jsou, v závislosti na pH separačního elektrolytu, schopné podléhat disociaci. Disociací těchto skupin vzniká záporně nabitá vnitřní vrstva kapiláry, na kterou se elektrostatickými silami vážou kationty přítomné v separačním elektrolytu. Vzniklá vrstva iontů je relativně stabilní a nazývá se Sternova. Další vrstva kationtů je pak vázána podstatně slaběji (tzv. difúzní vrstva). Působením elektrického pole dochází k migraci solvatovaných kationtů směrem ke katodě, což má za následek tvorbu fyzického toku kapaliny. Rychlost EOF, resp. elektroosmotická mobilita, je tím vyšší, čím je vyšší pH separačního elektrolytu. Naopak se zvyšující se iontovou silou dochází ke stlačování obou vrstev a rychlost pohybu EOF je nižší. Při nízkých hodnotách pH (< 2) je generován pouze reziduální EOF, jehož mobilita je zanedbatelná. Samotnou elektroosmotickou mobilitu (μ_{eof}) je možné vyjádřit vztahem (9).

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi\eta} \quad (9)$$

Ze vztahu (9) je patrné, že μ_{eof} je přímo úměrná zeta potenciálu ζ a permitivitě separačního elektrolytu ε ; nepřímo úměrná je pak viskozitě prostředí η . Ze vztahu (9)

také plyne, že μ_{eof} je vlastností separačního systému, zatímco elektroforetická mobilita definovaná vztahem (5) je určena fyzikálně chemickými vlastnostmi analytu. Kromě výše diskutované křemenné kapiláry, jejíž vnitřní povrch dovoluje disociaci, dochází ke generaci EOF také v kapilárách, které na svém povrchu ionizovatelné skupiny nemají (např. PTFE kapiláry). Příčinou tohoto jevu je adsorpce iontů elektrolytu na vnitřní povrch kapiláry, díky níž pak vzniká EOF stejným mechanismem jako v případě křemenné kapiláry. V neposlední řadě je potřeba zmínit, že stabilní kovalentní či fyzikální pokrytí může eliminovat generaci EOF (kdy lze experimentálně sledovat pouze tzv. reziduální EOF limitující k nule [4-6]), případně může dojít k jeho obrácení [7,8].

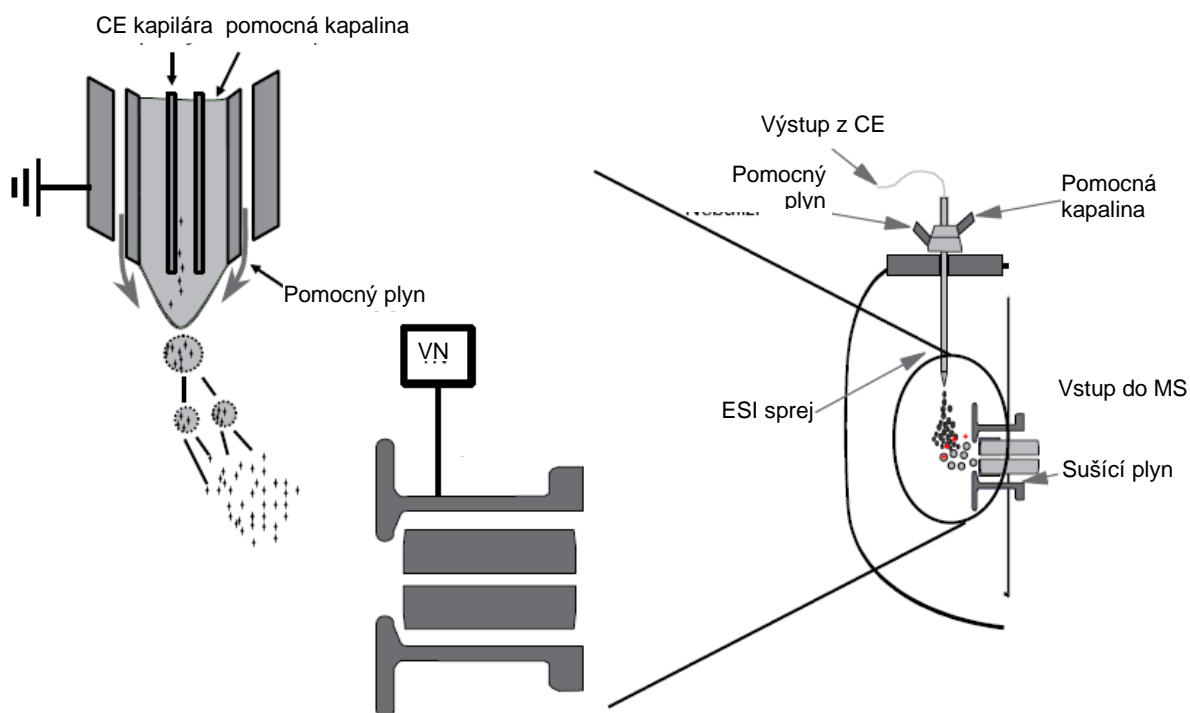
3.3 Spojení elektromigračních metod s hmotnostní spektrometrií

Nejčastěji využívanou detekcí v elektromigračních technikách je UV-VIS detekce. Vzhledem k velmi malému vnitřnímu průměru separačních kapilár a velmi nízkým dávkovaným objemům (řádově jednotky až desítky nl) je UV-VIS detekce málo citlivá (koncentrační citlivost se pohybuje v rozmezí 10^{-6} až 10^{-7} mol/l). Navíc pro přímou UV-VIS detekci je nutné, aby detekované analyty měly ve své struktuře vhodné chromofory.

Citlivější detekci, navíc s možností strukturní identifikace separovaných analytů poskytuje hmotnostní spektrometrie (MS). On-line spojení CE a MS vyžaduje poměrně náročné řešení instrumentace. První spojení CE s MS bylo uskutečněno na konci osmdesátých let [9-11]. Od této doby doznalo spojení CE-MS velmi významného instrumentálního zlepšení a v současnosti je spojení CE-MS komerčně dostupné. CE-MS je velmi významnou komplementární analytickou technikou, která v mnoha případech předčí možnosti spojení LC-MS. Zejména jde o případy, kdy je nutné provádět analýzu polárních, nabitých sloučenin, kdy je obtížné získat separaci s využitím LC na reverzních stacionárních fázích.

Kritickým bodem realizace CE-MS spojení je transfer separovaných analytů ze separační kapiláry do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Tento transfer zajišťuje v případě on-line spojení CE-MS interface. Separace v CE probíhá v křemenné kapiláře v kapalném prostředí separačního elektrolytu, zatímco separace a detekce iontů vzniklých v iontovém zdroji probíhá v analyzátoru hmotnostního spektrometru v plynné fázi a poté ve vakuu [12].

Z dostupných ionizačních technik je pro realizaci on-line spojení CE a MS vhodných pouze několik. Jde o ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku - ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), indukčně vázané plasma (ICP) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI). Nejrozšířenější ionizace v případě CE-MS je ESI, která je instrumentálně nejméně náročným způsobem převodu iontů z kapalně fáze ze separační kapiláry CE do plynné fáze. Aplikace CE-ESI-MS tvoří většinu současně publikovaných prací [12-14]. Spojení CE s ESI-MS umožňuje přímý transfer separovaných analytů v CE kroku ze separační kapiláry do MS. Interface zajišťující přímé spojení CE s ESI-MS je modifikací spojení používaného pro LC-ESI-MS. Ionizace elektrosprejem je velmi výhodná měkká ionizační technika, která umožňuje ionizaci polárních a nabitých sloučenin od velmi malých molekulových hmotností až po biopolymery jejichž molekulová hmotnost je v řádech statisíců Daltonů [15-18]. Schéma nejčastějšího uspořádání interface pro CE-ESI-MS je na Obr. 3.1.



Obr. 3.1 Schematické zobrazení ortogonálního CE-ESI-MS interface. Převzato z [19].

Princip ESI ionizace je založen na průtoku kapaliny kovovou sprejovací kapilárou na jejíž konec je vkládáno stejnosměrné napětí, nejčastěji v rozmezí (2-5 kV). Sprejovací kapilára je současně vyhřívána na teplotu v rozmezí (100 - 300 °C) a pro tvorbu stabilního elektrospreje je navíc přiváděn sprejovací plyn (nejčastěji proud dusíku). Na konci sprejovací špičky dochází k odpařování rozpouštědla a tvorbě nabitých kapiček s vysokou hustotou náboje [18]. Ionty jsou pak desorbovány z povrchu nabitých kapiček nebo dochází vlivem coulombické repulze k expanzi nabitých kapiček (s jednotkovým, eventuálně vícenásobným nábojem). V případě pozitivní ESI ionizace vznikají ionty $[M+nH]^{n+}$, v případě negativní ESI ionizace vznikají analogické $[M-nH]^{n-}$, kde n představuje hodnotu série vznikajících iontů nebo aduktů s kladně nabitými ionty v pozitivním módu (Na^+ , Li^+ , NH_4^+ apod.) nebo negativně nabitými ionty v negativním módu (Cl^- apod.) [20-21]. Z uvedeného principu plyne, že ESI ionizace umožňuje ionizaci jednoduchých anorganických a organických látek, ale také složitých struktur včetně (bio)polymerů. ESI je tak nejuniverzálnější ionizační

technikou. Vzhledem k tomu, že pomocí CE lze velice dobře separovat uvedené sloučeniny, nabízí se tato ionizace jako nejvhodnější. Většina komerčně dostupných ESI interface pro spojení CE-ESI-MS umožňuje provádět ionizaci na konci (špičce) křemenné separační kapiláry.

Spojení CE-ESI-MS však také disponuje určitými nevýhodami a limitacemi. Prvním výrazným omezením je skutečnost, že pro ionizaci elektrosprejem a tvorbu stabilního elektrospreje je nutné dosáhnout určitého objemového průtoku kapaliny přes sprejovací kapiláru - typicky jednotky až stovky $\mu\text{l}/\text{min}$. Průtok pracovního elektrolytu v křemenné separační kapiláře při CE separaci je zajištěn zejména s využitím EOF nebo použitím mírného tlaku aplikovaného na vstupní konec kapiláry (inlet) během separace (nejčastěji do 10 mbar). Rychlost průtoku EOF v křemenné kapiláře (o nejčastějším vnitřním průměru 50 - 75 μm) jsou řádově desítky až stovky nl/min . Tento nízký průtok je nedostatečný pro tvorbu stabilního elektrospreje [12]. Problém nízkého objemového průtoku lze řešit instrumentálně několika způsoby:

- (i) Využitím pomocné sprejovací kapaliny, která zvyšuje celkový průtok kapalně fáze vstupující na špičku sprejovací kapiláry.
- (ii) Využitím tzv. *sheathless* uspořádání (např. nano-ESI), které umožňuje sprejování při extrémně nízkých průtocích kapalně fáze [22].

Nejčastěji je voleno uspořádání s využitím průtoku pomocné sprejovací kapiláry, které neklade vysoké nároky na technické řešení a experimentální zkušenost.

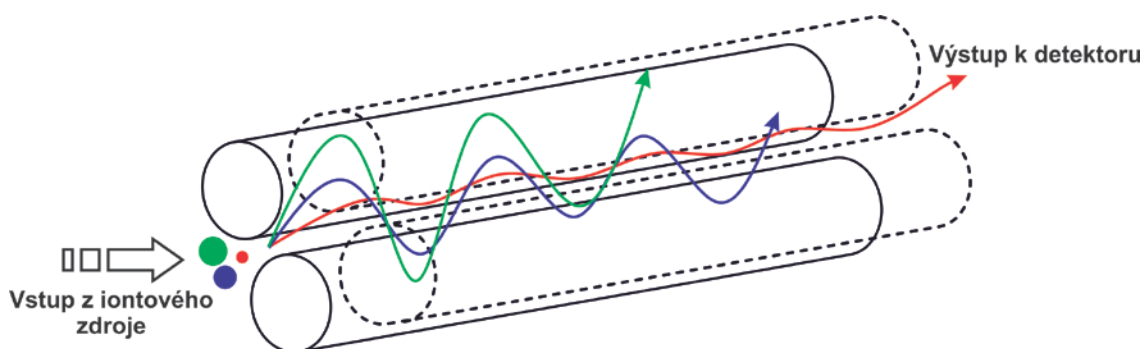
Dalším problémem on-line spojení CE-ESI-MS spočívá v omezeném využití separačních elektrolytů pro separaci v CE, které nejsou vhodné pro ionizaci elektrosprejem a významně snižují účinnost ionizace a citlivost MS detekce, zvyšují chemický šum signálu (zvýšení poměru S/N), a v mnoha případech způsobují znečištění iontového zdroje. Jde zejména o netěkavé složky pracovních elektrolytů, které jsou běžně využívány pro separace v CE, např. fosfát, borát, tenzidy jako jsou

dodecylsíran sodný, chirální selektory pro enantioseparace, apod. Přehledové články zpracovávající problematiku kompatibility CE a ESI-MS s ohledem na poslední trendy publikovala Pantůčková a kol. [23] a Klepárník [24]. Evaluaci volatility různých typů aditiv elektrolytů pro (LC)CE-ESI-MS publikoval také Petritis a kol. na základě dat získaných z ELSD detektoru, který klade stejné požadavky na těkavost složek elektrolytů jako ESI-MS [25].

MS umožňuje jako analytická koncovka detekci a objektivní identifikaci celé řady látek. CE-ESI-MS je separační systém s vysokou účinností separace a zároveň vysokou citlivostí detekce separovaných látek. Vzhledem k zaměření této práce bude MS detekce popsána pouze z hlediska použité instrumentace, tedy trojitého kvadrupólu (QqQ) jako hmotnostního analyzátoru.

3.4 Trojitý kvadrupól

Kvadrupólový filtr se skládá ze dvou párů kovových tyčí (obvykle kruhového nebo parabolického průřezu), které jsou paralelně uspořádány a na něž je proti sobě vloženo stejnosměrné a zároveň střídavé napětí, které je fázově posunuto [26]. Při spojení se separačními metodami dojde nejdříve k ionizaci analytů v iontovém zdroji a poté je pomocí iontové optiky přiveden ion o určité hodnotě poměru m/z do kvadrupólového filtru. Elektrické pole kvadrupólu způsobí oscilaci tohoto iontu, přičemž stabilní dráhy je dosaženo pouze při určité hodnotě vloženého napětí U a amplitudy V . Během skenovacího módu kvadrupólu se mění hodnoty U a V , přičemž jejich poměr je udržován konstantní. Díky tomu projdou do detektoru iontů pouze ionty o zvoleném poměru m/z , ostatní jsou pak zachyceny a vybity na tyčích kvadrupólu (Obr 3.2). Obrovskou výhodou kvadrupólového analyzátoru je vysoká rychlost skenování, což je výhodné zejména má-li separační systém vysokou účinnost separace, kdy analyty migrují rychle a často s malým rozlišením. Rychlost skenování tedy hraje důležitou roli, proto je kvadrupól jako analyzátor často používán ve spojení s CE [27].



Obr. 3.2 Kvadrupólový analyzátor s naznačenými trajektoriemi iontů o různé hodnotě poměru m/z . Stabilní oscilace dosahuje pouze červený ion, jehož trajektorie umožňuje průchod kvadrupólem. Ilustrace autora.

Kvadrupólové analyzátoři je také možné propojit a zařadit za sebou, přičemž nejčastěji se využívá tzv. trojitý kvadrupól (QqQ). Takovéto uspořádání umožňuje kromě standardních vlastností jednoduchého kvadrupólu i tandemovou analýzu v čase, kdy v prvním kvadrupólu (Q_1) dojde k selekci daného iontu. Prostřední kvadrupól (q_2) funguje pouze jako kolizní cela, ve které dochází k fragmentacím iontů pomocí kolizí indukované disociace (CID, *collision-induced dissociation*). V kvadrupólu ve kterém se CID odehrává, musí být přítomen inertní kolizní plyn (např. He nebo N_2), se kterým se ionty analytu nepružně srazí a podle zvolené energie pak vznikají fragmenty původního iontu. Vzniklé fragmenty jsou pak dále vedeny do třetího kvadrupólu (Q_3), kde dojde podle zvoleného módu ke skenu jednotlivých iontů podle poměru m/z .

3.5 Pracovní módy trojitého kvadrupólu

Trojité kvadrupólové analyzátoři může pracovat v několika základních módech (Obr. 3.3). Pomineme-li obecný sken celkového proudu iontů (TIC, *total ion current*), kdy Q_1 i q_2 pouze neselektivně propouštějí všechny ionty ve zvoleném rozsahu poměru m/z do posledního kvadrupólu, kde dojde ke skenu a zaznamenání celkového hmotnostního spektra. Další jsou více selektivní a patří mezi ně následující módy [26,28]:

a) Sledování vybraného iontu (SIM mód, Obr. 3.3A)

V tomto módu jsou Q_1 a q_2 propustné a ionty jsou vedeny na Q_3 , který sleduje pouze intenzitu vybrané hodnoty poměru m/z . Tento mód je vhodný zejména pro optimalizaci metody u látek, u nichž známe molekulové hmotnosti, resp. hodnotu poměru m/z a zároveň nejsou jejich hodnoty poměru m/z izobarické.

b) Sken produktových iontů (Obr. 3.3B)

Při skenu vznikajících fragmentů je Q_1 nastaven na ion o zvolené hodnotě poměru m/z , který je v q_2 pomocí CID fragmentován. Q_3 slouží ke skenu vzniklých produktových iontů (fragmentů). Kromě možnosti identifikace neznámé látky na základě vzniklých fragmentů je tento mód důležitý pro optimalizaci parametrů (zejména kolizní energie), které jsou nutné v případě dalších módů uvedených níže. Tento mód je také využíván při kvantifikaci, kde dojde k navýšení citlivosti detekce prostřednictvím zvýšení poměru signálu k šumu (S/N).

c) Sken prekurzorových iontů (Obr. 3.3C)

V tomto případě je Q_3 nastaven na selektivní propuštění fragmentu o určité hodnotě poměru m/z . Kvadrupól Q_1 skenuje ionty v definovaném intervalu m/z a q_2 složí opět jako kolizní cela. V tomto módu jsou tedy detekovány pouze ty ionty, které mají totožný fragment (např. funkční skupinu, které se při fragmentaci odštěpuje). Lze tak získat informace o strukturně podobných látkách.

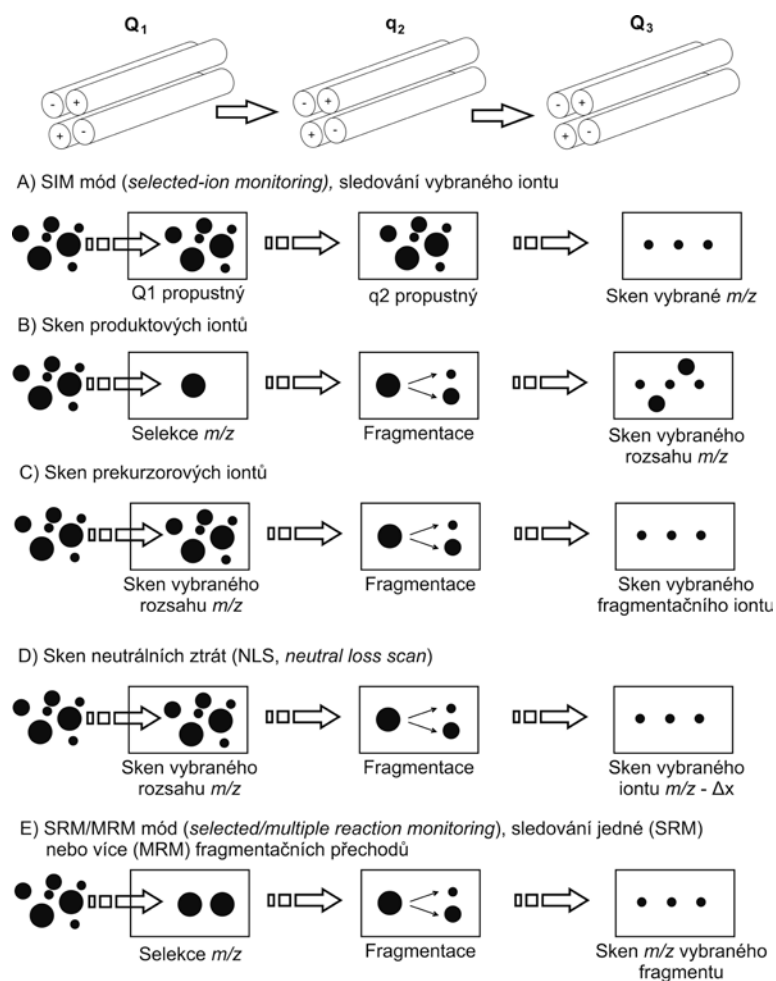
d) Sken neutrálních ztrát (NLS mód, Obr. 3.3D)

Ionty, při jejichž fragmentaci dochází k neutrálním ztrátám (typicky např. ztráta H_2O , NH_3 , CO_2 , aj.), je možné detekovat tak, že Q_1 i Q_3 skenují současně, avšak

s definovanou diferencí $\Delta m/z$ (např. $\Delta m/z$ 18 pro ztrátu H_2O atp.). Prostřední kvadrupól q_2 funguje opět jako kolizní cela.

- e) Sledování jednoho nebo více fragmentačních přechodů (SRM/MRM mód, Obr. 3.3E)

Jsou-li veškeré parametry optimalizovány, lze pomocí trojitého kvadrupólu sledovat konkrétní fragmentační přechod či přechody. Kvadrupól Q_1 slouží k selekci vybrané hodnoty poměru m/z , q_2 jako kolizní cela a vzniklé vybrané fragmenty jsou poté selektovány posledním kvadrupólem Q_3 . Při použití tohoto módu je možné sledovat jak jeden fragmentační přechod (SRM, *selected reaction monitoring*) nebo více fragmentačních přechodů (MRM, *multiple reaction monitoring*), přičemž např. kolizní energie může být pro každý přechod odlišná. Výhodou tohoto módu je vysoká selektivita MS detekce a nízký chemický šum, neboť kvadrupól Q_3 propustí pouze definované fragmenty a ty jsou následně detekovány. SRM/MRM módy jsou proto znatelně citlivější.



Obr. 3.3 Znázornění možných módů měření pomocí trojitého kvadrupólu (QqQ).
Ilustrace autora.

Další specifika spojení elektromigračních technik s hmotnostní spektrometrií, zejména v kontextu elektrokinetické chromatografie a enantioseparací, budou diskutovány v následujících kapitolách.

4. Elektrokinetická chromatografie

Nejjednodušší mechanismus separace v elektromigračních metodách – kapilární zónová elektroforéza (CZE) využívá rozdílu v rychlostech pohybu nabitých látek, který je dán rozdílnou hustotou náboje separovaných molekul [29]. Tento mechanismus vyžaduje, aby separované analyty nesly náboj. Vnesením dalšího děje,

který má zásadní vliv na průběh separace je možné docílit i separace látek nenabitých, či látek, které mají shodnou elektroforetickou mobilitu (např. enantiomery). Jednou z takových možností je kombinace elektroforetického a chromatografického separačního děje – elektrokinetická chromatografie (EKC). Vůbec poprvé byla kombinace elektroforetického a chromatografického děje pro separaci použita S. Terabem v roce 1984 [30]. Elektrokinetická chromatografie (EKC) na rozdíl od CE zahrnuje do separačního děje i rovnováhy uplatňované v chromatografii (např. rozdělovací rovnováha, iontově-výměnná rovnováha, tvorba iontových párů a aduktů, včetně interakce analytů s chirálními selektory) [31].

Samostatnou kapitolou je pak EKC využívající k separaci micelární fázi, kde dochází k rozdělování analytu mezi micely a okolní prostředí pufru [32]. Tato metoda je známá jako micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a je jednou z nejpoužívanějších módů EKC, neboť disponuje obrovským potenciálem pro separaci širokého spektra i značně odlišných nabitých i nenabitých látek. Základním principem elektrokinetické separace látek je jejich dynamické rozdělení mezi elektrolyt (obvykle vodnou fázi) a tzv. separační nosič (angl. *separation carrier*, někdy též pseudostacionární fáze) [33]. Separační nosič může být aditivum, které interaguje s přítomnými analyty (např. chirální selektor (CS), modifikovaný i nemodifikovaný polymer nebo protein, micely tenzidů nebo obecně látky, které mají schopnost více či méně selektivně interagovat s příslušnými analyty) [34]. Separační nosič tvoří v elektroforetickém systému dispergovanou část, která se může pohybovat vlastní elektroforetickou rychlostí (pokud je elektricky neutrální může se pohybovat stejnou rychlostí a směrem jako EOF). Interakcí s analytem je rychlost separačního nosiče ovlivněna pouze zanedbatelně.

4.1 Micelární elektrokinetická chromatografie

Mezi nejčastěji používané separační nosiče v EKC patří tenzidy, tedy látky schopné v daném prostředí vytvářet supramolekulární útvary – micely, které jsou

charakterizovány kritickou micelární koncentrací (CMC, vyjádřena v mol/l) a agregačním číslem AN (počet monomerních jednotek tvořících micelu). Pro vznik micel v daném separačním systému je nutné, aby jejich koncentrace byla vyšší než hodnota CMC [35]. Separační mechanismus MEKC je založen na rozdílné distribuci analytů mezi micelární fází a separační elektrolyt. Toto rozdělení je charakterizováno příslušnou rovnovážnou (distribuční) konstantou $K_{mc/aq}$ (10), která udává poměr koncentrací analytu v micelle $[(c_a)_{mc}]$ a fázi vodné $[(c_a)_{aq}]$:

$$K_{mc/aq} \frac{(c_a)_{mc}}{(c_a)_{aq}} \quad (10)$$

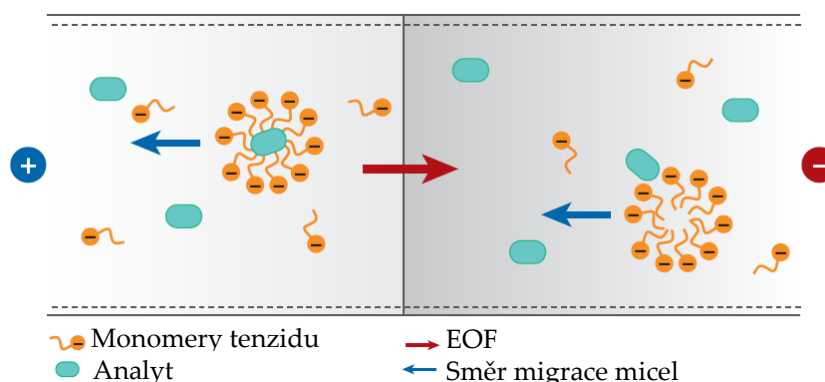
Pro výpočet retenčního faktoru k platí modifikovaný vztah (11), který zahrnuje jak koncentraci samotného tenzidu a hodnotu jeho CMC, tak rovněž parciální molární objem tenzidu v separačním systému (\bar{V}). Z tohoto vztahu je patrné, že retence analytu v micelle závisí na charakteru a koncentraci použitého tenzidu, jeho CMC a specifickém objemu micely (\bar{V}) [5,6]:

$$k = K_{mc/aq} \frac{V_{mc}}{V_{aq}} = K_{mc/aq} \frac{\bar{V}(c_s - CMC)}{1 - \bar{V}(c_s - CMC)} \quad (11)$$

kde V_{mc} a V_{aq} jsou objemy micelární, respektive vodné fáze a c_s je celková koncentrace použitého tenzidu.

Retenční faktor tedy závisí nejen na koncentraci tenzidu, ale také na hodnotě jeho CMC v daném prostředí. Obecně platí, že hodnota k je tím větší, čím větší je hydrofobicita analytu. Na rozdíl od LC, kde teoreticky může nastat nekonečná retence analytu ($k = \infty$), je retence látek v MEKC limitována elučním oknem, tedy rozdílem mezi retenčním časem neutrálního markeru EOF a markeru migrace samotných micel (t_{mc}). Jako marker t_{mc} se používají silně hydrofobní látky, které se inkorporují do micely natolik silně, že žádný další analyt nemůže mít retenční čas větší. Mezi nejčastěji

používané markery patří např. barvivo Sudan III, dodekafenon, dodecylbenzen či tokoferol [31,36]. Základní uspořádání MEKC separace je zobrazeno na Obr. 4.1.



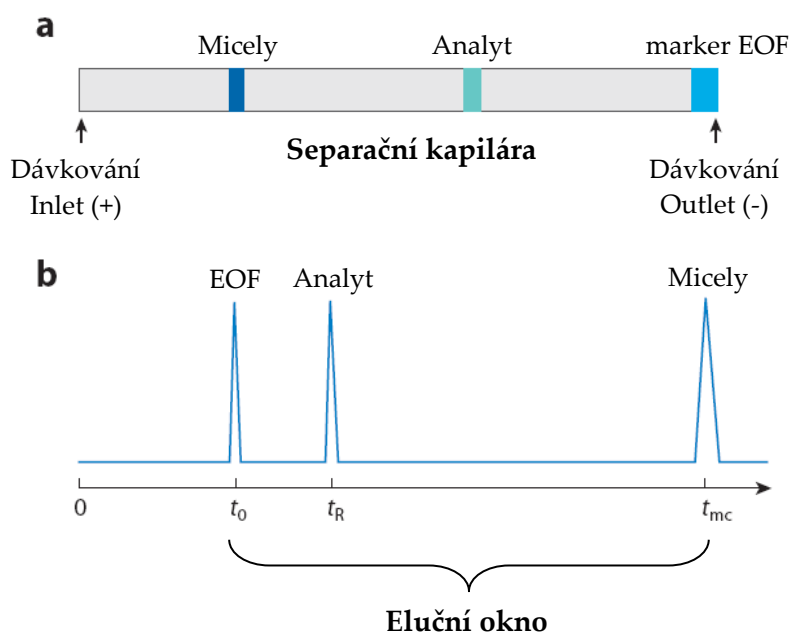
Obr. 4.1 Schematické znázornění separačního mechanismu. Převzato a upraveno z [31].

4.2 Termodynamické a kinetické aspekty MEKC

4.2.1 Retenční faktor a rozlišení

Vzhledem k podobnosti MEKC s LC se namísto migračního času t_m používá častěji retenční čas daného analytu t_R , který lépe vystihuje popsanou kombinaci elektroforetického a rovnovážného chromatografického separačního mechanismu.

Rozdíl v separačním mechanismu (resp. v retenci či interakci analytů) mezi LC a MEKC je dána skutečností, že micely tenzidu nejsou pevně zakotveny na stěně kapiláry a mohou tedy migrovat vlastní rychlostí, přičemž je potřeba do úvahy vzít i případný vliv velikosti a směru pohybu EOF na migraci separačního nosiče. Díky tomuto faktu je možné definovat tzv. eluční okno (obr. 4.2), tedy časový rozdíl mezi retenčním časem markeru EOF (t_{eof}) a retenčním časem micel (t_{mc}).



Obř. 4.2 Schematické znázornění elučního okna MEKC v tzv. normálním módu ($v_{mc} < v_{eof}$). Převzato a upraveno z [31].

Existence elučního okna má za následek, že při MEKC separaci musí být retenční časy t_R všech analytů v separačním systému menší než retenční čas markeru micel ($t_0 < t_R < t_{mc}$). Důsledkem toho je, že rozlišení analytů klesá s rostoucím retenčním časem.

Tento fakt velmi dobře vystihuje vztah pro rozlišení R_s v MEKC (12), jehož první dva členy jsou totožné s obdobným vztahem pro LC a poslední dva členy zohledňují specifika MEKC [2,3,37,38]:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k_2}{1 + k_2}\right) \cdot \left(\frac{1 - t_0/t_{mc}}{1 + (t_0/t_{mc})k_1}\right) \quad (12)$$

Z rovnice (12) je zřejmé, že rozlišení dvojice separovaných analytů je ovlivněno čtyřmi příspěvky. První člen rovnice zahrnuje kinetický aspekt separace, kdy rozlišení je přímo úměrné druhé odmocnině počtu teoretických pater N . Další dva členy spolu úzce souvisí a popisují rozlišení z hlediska termodynamického. Selektivita α je podíl retenčních faktorů separovaných látek k_2 a k_1 . Z tohoto členu rovněž vyplývá, že

rozlišení bude tím menší, čím více se α bude blížit k jedné. Bude-li tedy poměr retenčních faktorů roven jedné, k rozlišení a tedy ani k separaci nedojde (výsledná hodnota druhého členu rovnice bude nulová). Poslední dva členy rovnice se týkají retence analytů v separačním nosiči tedy v micelách. Retenční faktor k lze definovat jako podíl látkového množství analytu vázaného nebo interagujícího micelami tenzidu (n_{mc}), a látkového množství analytu ve fázi vodné (n_{aq}) podle vztahu (13) [30,36,39]:

$$k = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} = K_{mc/aq} \frac{V_{mc}}{V_{aq}} = \frac{t_r - t_0}{t_0(1 - t_r/t_{mc})} \quad (13)$$

Z experimentálních dat je možné retenční faktor snadno vypočítat s použitím poslední části rovnice (14), tedy

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0(1 - t_r/t_{sn})} \quad (14)$$

Ze vztahu (14) je patrné, že poměr t_r/t_{mc} má významný dopad na hodnotu retenčního faktoru. Bude-li jejich poměr roven nule, výsledkem bude retenční faktor analogický pro LC. Je tedy zřejmé, že poměr t_r/t_{mc} musí být v případě MEKC rozdílný od nuly a zároveň menší než jedna. V případě, kdy by poměr t_r/t_{mc} limitoval k jedné, retenční faktor se bude blížit nekonečnu [40].

4.2.2 Účinnost separace

V případě CE je účinnost separace vyjádřena jako počet teoretických pater (N) podle vztahu (15) [41].

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eof})U}{2D} \quad (15)$$

Z tohoto vztahu vyplývá, že počet teoretických pater (tedy účinnost separace) je přímo úměrný elektroforetické mobilitě analytu a EOF a vloženému separačnímu napětí U .

Účinnost je pak nepřímo úměrná difúznímu koeficientu D , který způsobuje longitudinální difúzi analytu. Kromě uvedených veličin snižuje účinnost separace také řada dalších fyzikálně-chemických jevů, zejména pak Jouleovo teplo, sorpce analytů na stěny separační kapiláry nebo rozdílné hodnoty vodivostí separačního elektrolytu a vzorku [3].

V případě MEKC je nutno použít upravený vztah (16) pro výpočet N , neboť je potřeba do něj zahrnout difúzní koeficient analytu (D) i micel tenzidu (D_{mc}) a mobility zaměnit za retenční faktory [31]. Účinnost je v tomto případě vyjádřena jako výškový ekvivalent teoretického patra H , k jehož výpočtu je potřeba znát efektivní (l) nebo celkovou (L) délku separační kapiláry (v závislosti na použité metodě detekce).

$$H = \frac{l}{N} = \frac{2(D + kD_{mc})}{1 + \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)k} \cdot \frac{1}{v_{eof}} \quad (16)$$

4.3 Separace neutrálních analytů micelární elektrokinetickou chromatografií

Vzhledem k tomu, že micely tenzidů nejsou ukotveny jako v případě stacionárních fází v LC, je výsledná rychlost migrace zóny neutrálního analytu v_{tot} dána vektorovým součtem rychlostí migrace micel v_{mc} a rychlosti elektroosmotického toku v_{eof} v souladu s následujícími vztahy (17-19):

$$v_{mc} = \mu_{mc}E \quad (17)$$

$$v_{eof} = \mu_{eof}E \quad (18)$$

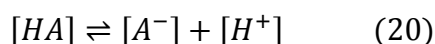
$$v_{tot} = v_{mc} + v_{eof} \quad (19)$$

V případě separace neutrálních analytů je nutné, aby micely měly elektrický náboj. Záleží na vzájemných výsledných rychlostech a směru pohybu EOF a nabitých micel. Neutrální analyt je v okamžiku kdy neinteraguje s nabitými micelami unášen rychlostí, která odpovídá rychlosti pohybu EOF. V okamžiku interakce neutrálního

analytu s nabitými micelami je jeho rychlost dána rychlostí pohybu micel. O vzájemné separaci nenabitých analytů tak rozhodují rozdíly v rozdělovacím poměru nenabitého analytu mezi vodný elektrolyt a micely.

4.4 Separace ionizovatelných analytů micelární elektrokinetickou chromatografií

Odlíšný případ by nastal, pokud by analyt nebyl neutrální, ale vykazoval alespoň částečnou schopnost ionizace (disociace nebo protonizace). Výsledná rychlost migrace analytu by pak závisela nejen na rychlosti EOF a micel (předpokládejme opět nabitě micely), ale také na směru a vlastní rychlosti migrace daného analytu. Tento fakt lze nejlépe demonstrovat na příkladu slabého elektrolytu, např. jednosytné kyseliny HA. Ve vodném prostředí dojde k ustavení disociační rovnováhy (20), popsanou zjednodušeně vztahem pro disociační konstantu (21):



$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad (21)$$

Ve vodném prostředí by pak existovala kyselina jak ve formě disociované tak i nedisociované. Součet jejich rovnovážných koncentrací pak odpovídá celkové analytické koncentraci látky v roztoku. Stupeň disociace kyseliny α (22) je závislý na pH roztoku, v němž se daná kyselina nachází:

$$\alpha = \frac{n_{A^-}}{n_{HA}} \quad (22)$$

Pro praktický výpočet stupně disociace lze použít upravený matematický vztah (23), který zahrnuje jak disociační konstantu, tak pH samotného prostředí, ve kterém je kyselina disociována:

$$\alpha = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_a}} \quad (23)$$

Rychlost migrace této slabé jednosytné kyseliny tedy bude (mimo jiné) závislá na pH pracovního elektrolytu a její elektroforetické mobilitě (μ_{A^-}). Výše uvedený vztah (19) lze tedy rozšířit o rychlost pohybu disociované (A^-) a nedisociované (HA) formy dané kyseliny (v_{A^-} a v_{HA}), přičemž opět bude výsledná rychlost pohybu vektorovým součtem všech uvedených příspěvků (24 a 25):

$$v_{A^-} = \mu_{A^-} E \quad (24)$$

$$v_{tot} = v_{mc} + v_{eof} + v_{A^-} \quad (25)$$

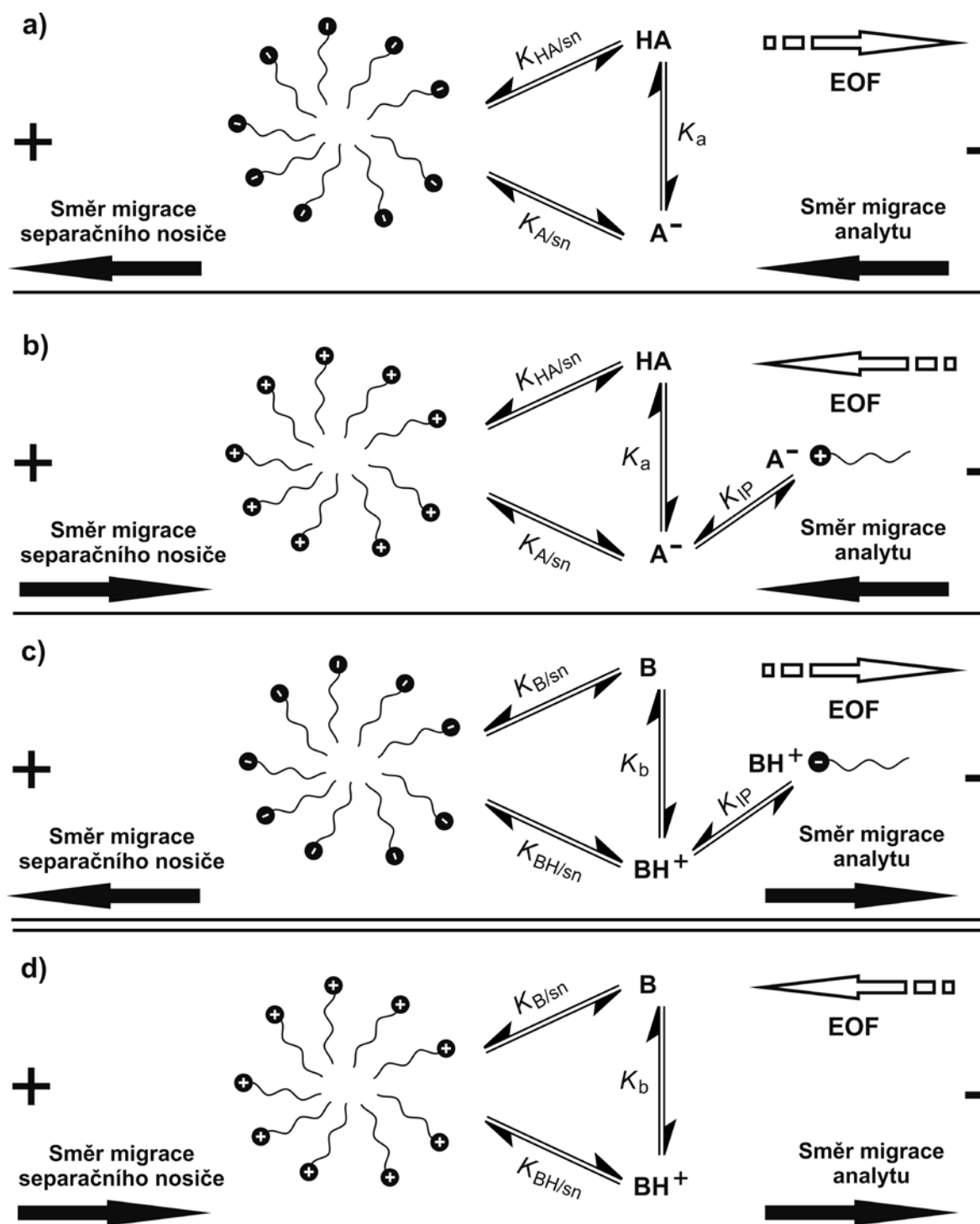
Například pro kyselinu v pracovním elektrolytu o pH, které bude rovno hodnotě jejího pK_a , bude stupeň disociace $\alpha = 0,5$. Tedy 50 % kyseliny bude přítomno ve své nedisociované formě a 50 % ve formě disociované. Závislost retenčního faktoru na stupni disociace kyseliny HA je patrný ze vztahů (26 a 27) [38,42,43]:

$$k = \frac{[HA]}{[HA]+[A^-]} \cdot k_{HA} + \frac{[A^-]}{[HA]+[A^-]} \cdot k_{A^-} \quad (26)$$

$$k = \frac{k_{HA} + k_{A^-} \cdot \left(\frac{K_a}{c(H^+)}\right)}{1 + \left(\frac{K_a}{c(H^+)}\right)} \quad (27)$$

kde k_{HA} a k_{A^-} jsou retenční faktory nedisociované, respektive disociované formy kyselina HA a K_a je její disociační konstanta. Ze vztahu (27) vyplývá, že výsledný retenční faktor k bude silně záviset na pH separačního elektrolytu. Např. při nízkých hodnotách pH mohou být slabé kyseliny přítomny téměř výlučně v nedisociované formě, retenční faktor pak bude možné spočítat s použitím vztahu pro separaci neutrálních analytů. Retenční faktor konkrétní disociovatelné látky je tedy možné

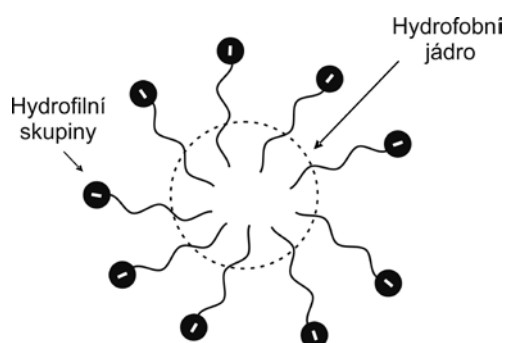
z experimentálních dat vypočítat. Analogickým způsobem lze definovat uvedené vztahy také pro látky podléhající jakékoli ionizaci, např. protonizaci v případě bází. Uvedený popis je však zjednodušený, neboť kromě interakce nedisociované formy může i disociovaná forma interagovat s micelami či monomery tenzidů např. za vzniku iontových asociátů (obr. 4.3, příklad uveden pro různé módy MEKC). Tím vznikají vedlejší rovnováhy, které ztěžují matematický popis retence ionizovatelných látek [42]. Ze vztahů uvedených výše je zřejmá složitost výpočtu retenčního faktoru ionizovatelné látky, neboť některé veličiny nelze jednoduše vypočítat nebo experimentálně zjistit. Hodnoty disociačních konstant analytů ve vodné fázi bez přítomnosti micel a v micelárním systému mohou být rovněž rozdílné, což ovlivňuje výslednou selektivitu separace [44].



Obr. 4.3 Interakce ionizovatelných analytů s nabitými micelami tenzidů: a) disociovatelný analyt (HA) s micelou aniontového tenzidu; b) disociovatelný analyt (HA) s micelou kationtového tenzidu; c) protonizovatelný analyt (B) s micelou aniontového tenzidu; d) protonizovatelný analyt (B) s micelou kationtového tenzidu. Rovnovážná konstanta K_{IP} popisuje interakci mezi analytem a monomerem tenzidu. Ilustrace autora vycházející z [42].

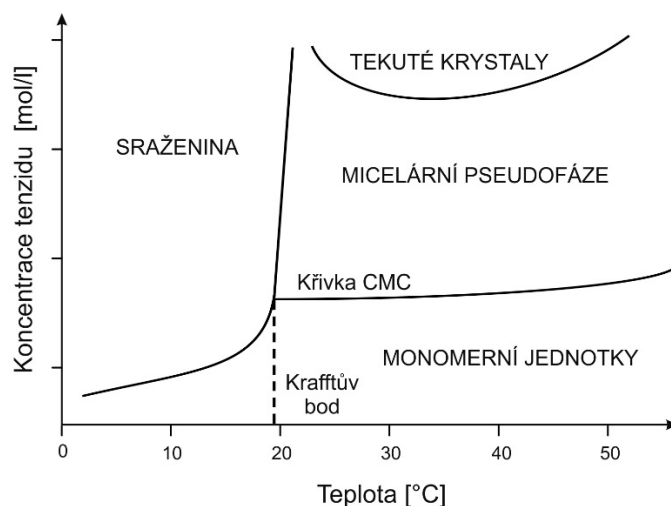
4.5 Používané tenzidy a jejich vlastnosti

Micely jsou dynamické supramolekulární útvary, které za určitých podmínek vznikají agregací monomerních jednotek tenzidů. Monomerní jednotky jsou obvykle amfifilní a skládají se z nepolární (hydrofobní) a polární (hydrofilní) části [35, 45, 46]. Podle povahy jejich hydrofilní skupiny se obecně dělí na aniontové, kationové, zwitteriontové a neiontové tenzidy. Zjednodušené vyobrazení typické micely je uvedeno na Obr. 4.4.



Obr. 4.4 Zobrazení micely ve vodném prostředí kdy nepolární části monomerů směřují dovnitř a vytvářejí hydrofobní jádro (příčný řez). Protionty nejsou pro jednoduchost zobrazeny.
Ilustrace autora.

Při velmi nízkých koncentracích se tenzidy ve vodném prostředí se vyskytují ve formě jejich monomerů, dimerů a podobných oligomerních útvarů, které ale nemají vlastnosti micely. Dojde-li ke zvýšení jejich koncentrace k hodnotě CMC či vyšší, dochází k agregaci za vzniku micel. Tvorba micel v roztocích je velmi silně závislá na fyzikálně chemických vlastnostech okolního prostředí (teplota, viskozita, iontová síla, pH, relativní permitivita). Tenzid může tvořit různé typy supramolekulárních útvarů v závislosti na teplotě. Obecný fázový diagram závislosti koncentrace tenzidu na teplotě je uveden na Obr. 4.5.



Obr. 4.5 Závislost koncentrace tenzidu na teplotě. Ilustrace autora vycházející z [35].

Průměrný počet monomerních jednotek tvořících micelu je označován jako agregační číslo (AN). Další parametr, který charakterizuje micelární systém je Krafftův bod (KP), tedy teplota při které je rozpustnost tenzidu shodná s jeho CMC. Jde o minimální hodnotu teploty, při které z monomerů vznikají micely. Pod hodnotou KP neexistuje pro daný tenzid CMC a v systému se micely nevytvoří při žádné koncentraci tenzidu. Existence a termodynamické vlastnosti micelárních systémů jsou závislé na mnoha dalších parametrech. Mezi nejdůležitější patří např. přítomnost organických rozpouštědel či anorganických látek v jejich roztoku. Přídavek anorganických solí (např. ve formě pufru) snižuje hodnotu CMC a zvyšuje hodnotu AN [47]. Naopak přídavek organického rozpouštědla může CMC zvýšit, případně může dojít k rozpadu micely [48]. Významný vliv na hodnotu CMC má i délka hydrofobního (např. alkylového) řetězce, přičemž obecně platí, že čím delší tento řetězec je, tím menší je hodnota CMC. Opačný vliv na hodnotu CMC má naopak přítomnost rozvětvených nepolárních struktur (sterické bránění), dvojných vazeb mezi atomy řetězce nebo přítomnost polárních či hydrofilních skupin (např. hydroxylová skupina), které mohou způsobovat elektrostatickou repulzi mezi monomerními jednotkami tvořícími micelu [45,49,50].

4.5.1 Perfluorované tenzidy

Zvláštní skupinu tvoří perfluorované tenzidy, kdy jsou všechny molekuly vodíku v alkylovém skeletu substituovány fluorem. Kromě vyšších hodnot CMC ve srovnání s jejich nesubstituovanými analogy, vykazují rovněž vysokou hodnotu tenze par, díky čemuž mohou být využity jako těkavá aditiva pro spojení EKC-ESI-MS [51-53]. Hodnoty CMC jsou ve srovnání s nesubstituovanými analogy přibližně o jednu čtvrtinu větší. Např. perfluorooktanoát sodný má hodnotu CMC 36 mmol/l, jeho analog dodekanoát sodný pak 24 mmol/l [54,55]. Přehled vybraných tenzidů včetně hodnot CMC, AN a Krafftův bod je shrnut v Tabulce 4.1.

Tabulka 4.1 Přehled vybraných tenzidů a hodnoty jejich CMC, AN a KP [32,45-48,54-57]

Tenzid	CMC [mol/l] ^a	AN ^a	KP [°C]
Aniontové tenzidy			
Dodecyl sulfát sodný	$8,1 \cdot 10^{-3}$	62	16
Dodecyl sulfát lithný	$8,8 \cdot 10^{-3}$	63	-*
Tetradecyl sulfát sodný	$2,1 \cdot 10^{-3}$	90	25
	(50 °C)		
Dodecylsulfonát sodný	$9,8 \cdot 10^{-3}$	54	32
	(38 °C)		
Dekanesulfonát sodný	$4,0 \cdot 10^{-3}$	40	-
Dodekanoát sodný	$2,4 \cdot 10^{-2}$	56	-
Perfluoroheptanoát lithný	$9,8 \cdot 10^{-2}$	-	< 0
	(30 °C)		
Perfluoroheptanoát sodný	$17,1 \cdot 10^{-2}$	-	< 0
	(30 °C)		
Perfluoroheptanoát draselný	$12,9 \cdot 10^{-2}$		16,2
	(30 °C)		
Perfluorooktanoát sodný	$3,6 \cdot 10^{-2}$	-	8,6
	(8 °C)		
Perfluorooktanoát amonný	$3,3 \cdot 10^{-2}$	-	2,5
	(2,5 °C)		
Cholát sodný	$13,0 - 15,0 \cdot 10^{-3}$	2-4	-
Deoxycholát sodný	$4,0 - 6,0 \cdot 10^{-3}$	4-10	-
Taurocholát sodný	$10,0 - 15,0 \cdot 10^{-3}$	5	-
Kationtové tenzidy			
Tetradecyltrimethylammonium bromid	$3,5 \cdot 10^{-3}$	75	-
Dodecyltrimethylammonium bromid	$1,5 \cdot 10^{-2}$	50	-
Cetyltrimethylammonium bromid (CTAB)	$9,2 \cdot 10^{-4}$	61	22
Cetylpyridinium chlorid	$9,0 \cdot 10^{-4}$	95	-
Neiontové tenzidy			
Polyoxyethylen (23) dodecyl ether (Brij 35)	$5,5 \cdot 10^{-5}$	40	-
Polyoxyethylen (23) sorbitan monolaurát (Tween 20)	$5,9 \cdot 10^{-2}$	-	-
Zwitteriontové tenzidy			
3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát (CHAPS)	$4,2 - 6,3 \cdot 10^{-3}$	10	-
N-dodecyl-N,N-dimethylammonio-3-propansulfonát	$3,3 \cdot 10^{-3}$	-	-

^a Není-li uvedeno jinak, jedná se o hodnoty při teplotě 25 °C pro deionizovanou vodu.

* Hodnota není v dostupné literatuře uvedena.

4.5.2 Specifika spojení MEKC-ESI-MS

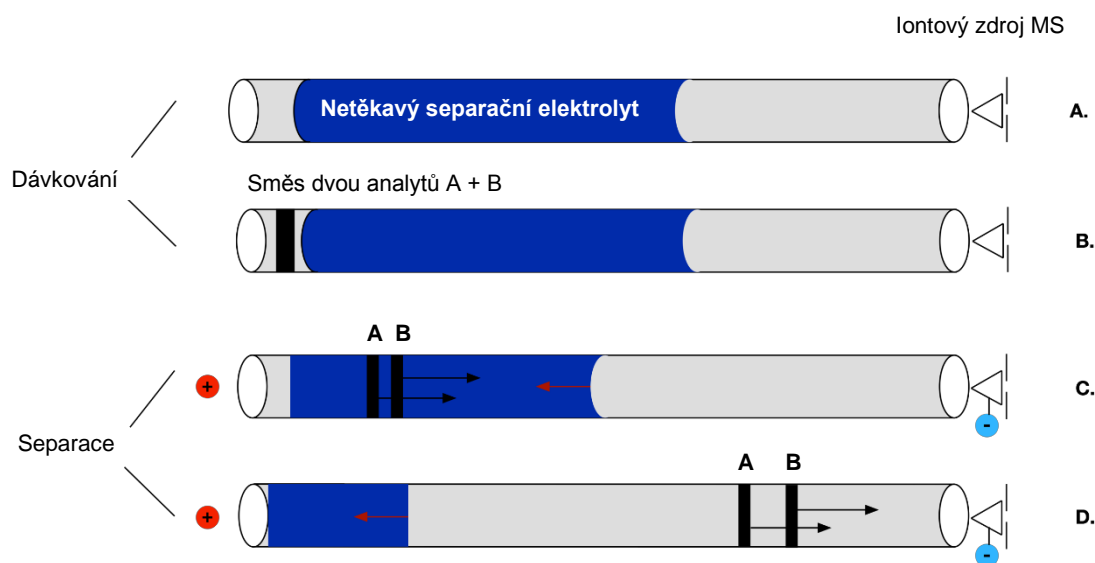
Až na některé výjimky jsou tenzidy používané pro MEKC separaci netěkavé a tato vlastnost tenzidů je pro MEKC-ESI-MS separace velmi limitující. Některé ESI interface umožňují pracovat při velmi nízkých koncentracích tenzidů, aniž by došlo k významnému snížení citlivosti či účinnosti ionizace (např. pro SDS do 20 mM v pracovním elektrolytu) [58,59]. Nízké koncentrace tenzidů často nevedou k dosažení potřebné selektivity separace analytů a je tedy nutné jejich koncentraci zvýšit. V případě využití např. APCI nebo APPI jako ionizační techniky, je možné netěkavé tenzidy používat v elektrolytu bez nutnosti zabránění jejich vstupu do iontového zdroje [60].

Praktickým řešením při ESI ionizaci je využití techniky částečného plnění (PFT) pro MEKC-ESI-MS separace, případně využití polymerních tenzidů, které tvoří micely při velmi nízkých až nulových hodnotách CMC a během ionizace se nerozpadají na monomerní jednotky, které by snižovaly účinnost ionizace [60-62].

Použití PFT není samozřejmě omezeno pouze pro analýzy s pomocí MEKC-ESI-MS, ale je univerzálně použitelná v případě nutnosti využít celou řadu další netěkavých aditiv elektrolytu nebo elektrolytu obsahující složky kontaminující iontový zdroj.

Obecný princip PFT [63] spočívá v naplnění kapiláry pracovním elektrolytem obsahujícím netěkavou složku (CS, tenzid, polymer atd.) do definované části celkové délky kapiláry (např. 90% celkové délky kapiláry, Obr. 4.6A). Netěkavá složka elektrolytu se tak nedostane při dávkování do iontového zdroje. Dalším krokem je dávkování zóny vzorku za zónu nadávkovaného elektrolytu s netěkavou složkou (Obr. 4.6B). Následuje vložení napětí, při kterém dochází k separaci. Výhodou je pokud migrace netěkavé složky probíhá směrem od iontového zdroje do vstupní elektrodové vialky a naopak migrace separovaných analytů probíhá směrem do iontového zdroje (Obr. 4.6C a 4.6D). Toto uspořádání, kdy naproti sobě migrují dvě interagující složky, se označuje jako protisměrná migrace (angl. *counter-current mode*). Takovéto podmínky lze nejjednodušeji dosáhnout v kovalentně pokryté kapiláře

s eliminovaným EOF, a použitá netěkavá složka musí mít opačný náboj k separovaným analytům.



Obr. 4.6 Znárodnění vyjadřující průběh modelové analýzy s využitím techniky částečného plnění (PFT-EKC-ESI-MS) s protisměrnou migrací separačního nosiče (např. micel či CS).
Ilustrace autora.

Podrobnější diskuzi k mechanismu separací s využitím techniky PFT publikoval Amini a kol. [64,65].

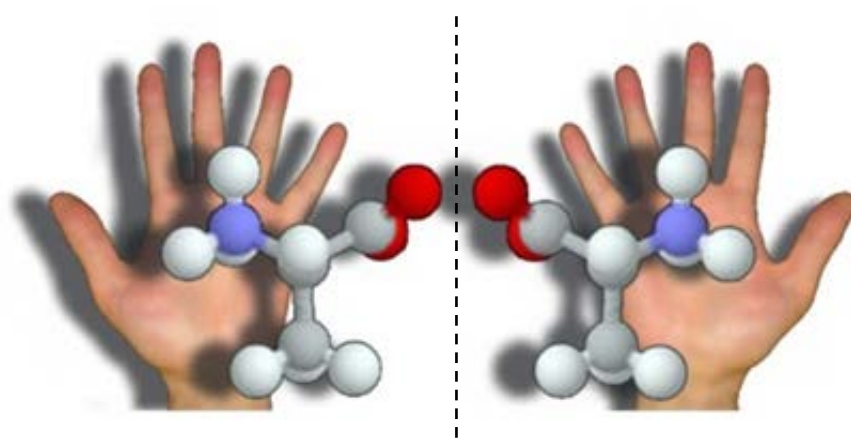
V minulosti byla publikována práce popisující využití dodecylsulfátu amonného jako těkavějšího analogu k dodecylsulfátu sodnému (SDS) pro MEKC-ESI-MS separace, nicméně i v tomto případě dochází bez využití techniky PFT ke kontaminaci iontového zdroje a k supresi MS signálu analytů [66].

Alternativou k PFT experimentálnímu uspořádání může být volba (per)fluorovaného tenzidu, který je dostatečně těkavý a nedochází, s jeho použitím, k významné kontaminaci iontového zdroje. V minulosti bylo publikováno několik prací využívající perfluorované tenzidy pro spojení LC-ESI-MS a MEKC-ESI-MS [59,67-69]. V uvedených pracích byly studovány perflourooktanová a perfluoro-oktansulfonová kyselina a jejich amonné soli jako micelární systém.

5. Enantioseparace pomocí elektrokinetické chromatografie

5.1 Chiralita molekul

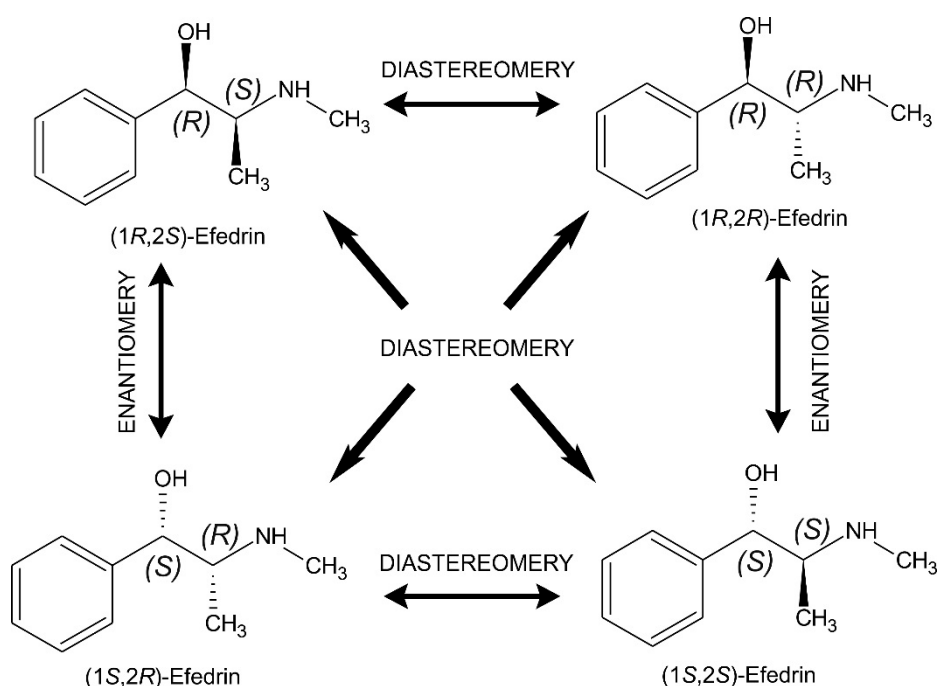
Řada organických látek, které mají stejný konstituční i sumární vzorec, vykazují prostorovou asymetrii a existují jako dvojice molekul s navzájem neztotožnitelným zrcadlovým obrazem (Obr. 5.1). Takové látky jsou označovány jako chirální. Nutným předpokladem pro jejich existenci je přítomnost jednoho či více stereogenních center v molekule [70].



Obr. 5.1 Zobrazení prostorové asymetrie molekuly, jejíž dva optické izomery nejsou ztotožnitelné se svým zrcadlovým obrazem. Převzato z [71].

Chirální centrum je většinou tvořeno asymetrickým uhlíkem, případně dalšími asymetrickými atomy v molekule jako např. dusík, fosfor nebo síra. Další možností je přítomnost chirální osy nebo chirální roviny v molekule. Obecně se látky s těmito vlastnostmi nazývají stereoizomery. Stereoizomery je možné rozdělit do dvou základních skupin. První skupinu tvoří enantiomery, tedy takové látky, které se liší svou konfigurací na všech stereogenních centrech v molekule. Enantiomery tvoří páry stereoizomerů mající stejné fyzikálně-chemické vlastnosti (teplota tání, rozpustnost, index lomu aj.) a v achirálním prostředí je nelze rozlišit či separovat. Každý z enantiomerů může stáčet rovinu polarizovaného světla o stejný úhel pootočení, ale navzájem na opačnou stranu. Druhou skupinou jsou diastereomery, tedy látky mající dvě a více stereogenních center avšak konfigurací se na všech stereogenních centrech

neliší. Diastereomery či diastereomerní komplexy již mají fyzikálně-chemické vlastnosti odlišné, a je tedy možné je na základě těchto vlastností navzájem rozlišit. Prostorové uspořádání a vzájemné vztahy stereoizomerů lze nejlépe demonstrovat na příkladu molekuly se dvěma centry chiralit (např. asymetrickými uhlíky). Takovou látkou je např. efedrin, jejich páry enantiomerů, respektive diastereomerů jsou zobrazeny na obr. 5.2.



Obr. 5.2 Grafické znázornění stereoisomerie efedrinu – dvojice diastereomerních párů z nich každý je složen ze dvou enantiomerů. Ilustrace autora.

Z grafického znázornění je zřejmé, že molekula látky mající n center chiralit může vytvářet 2^n diastereomerů, z nichž každý je tvořen příslušným počtem enantiomerů [70]. Stechiometrická směs obou enantiomerů se nazývá racemát.

Enantiomery hrají při interakcích na molekulární úrovni významnou roli. Jednotlivé enantiomery dané molekuly mohou rozdílně interagovat s prostorově unikátními receptory, enzymy a dalšími látkami. Enantiomery jsou z hlediska chemické povahy stejné, ale v organismu se projevují různě díky stereospecifickým interakcím. Důsledkem rozdílné interakce enantiomerů se stereospecifickými molekulárními

strukturami v organismu, může být i jejich rozdílný farmakologický (farmakokinetický i farmakodynamický), toxikologický a biologický účinek [72-74]. Například celá řada léčiv je dnes vyráběna ve formě čistého enantiomeru, tak aby byly co nejvíce zamezeny negativní účinky opačného enantiomeru na lidský organismus. Stejně tak lidský organismus tvoří v některých případech jako metabolity enantiomery strukturně velmi rozmanitých látek (aminokyseliny, sacharidy, některé deriváty karboxylových kyselin apod). [75]. Z uvedených důvodů je vhodné disponovat vysoce účinnými metodami separací enantiomerů v analytickém měřítku. Je tak možné stanovit nejen obsah jednotlivých studovaných enantiomerů ve vzorcích různé povahy, ale je také možné studovat jejich interakce s biologickým prostředím. CE společně s LC a plynovou chromatografií (GC) jsou v současnosti nejčastěji využívané analytické techniky pro separaci enantiomerů [76]. V dalším textu bude popis principu separace enantiomerů omezen na obecný princip separace enantiomerů elektromigračními technikami v kontextu mechanismu EKC.

5.2 Základní aspekty enantioseparací s pomocí EKC

Enantiomery opticky aktivních látek mají stejnou mobilitu v achirálním prostředí a nejsou v tomto prostředí separovatelné. Pro dosažení diference v mobilitách separovaných enantiomerů je nutná přítomnost chirálního selektoru (CS) buďto přímo v separačním elektrolytu, nebo musí být CS imobilizovaný (adsorbovaný či kovalentně vázaný) na stěně kapiláry. Může být rovněž součástí sorbentu náplně separační kapiláry [77].

CS interaguje se separovanými enantiomery s využitím stereoselektivních interakcí (nekovalentních interakcí), které vedou k tvorbě diastereomerních komplexů enantiomerů s CS lišící se mobilitou v separačním systému. Diference mobilit může být například výsledkem rozdílných konstant stability vzniklých diastereomerních komplexů. Další nutnou podmínkou k dosažení enantioseparace je, aby interakční rovnováha mezi CS a enantiomery byla dostatečně rychlá. Všechny uvedené

podmínky jsou nutné k dosažení enantioseparace, a musí být splněny najednou [70, 78-80].

Vzhledem k tomu, že tvorba diastereomerních komplexů mezi CS a enantiomery je rovnovážný dynamický proces, je možné interakční konstanty ovlivňovat mnoha fyzikálně-chemickými parametry (pH elektrolytu, rozpouštědlem, koncentrací CS, teplotou, iontovou silou apod.). Kromě stereoselektivní interakce mezi enantiomery a CS, musí být ještě splněna podmínka průběhu separace s dostatečnou účinností a dostatečnou rozlišovací schopností detektoru. Enantioseparace založena na dynamické interakci mezi CS a enantiomery během separace se označuje jako přímá metoda. Základní teorii přímé enantioseparace s využitím CE jako první popsali Wren a Rowe [81,82].

Enantiomery mohou být separovány na základě jejich rozdílné interakce s CS v separačním systému, jak vyjadřují rovnice (28, 29):



kde $R-E$ a $S-E$ jsou jednotlivé separované enantiomery, CS je chirální selektor, K_R a K_S jsou interakční konstanty mezi příslušnými enantiomery a CS .

Nejčastěji je enantiorekognice vysvětlována s pomocí tříbodového modelu, kdy jeden z dvojice enantiomerů interaguje s CS na třech specifických místech, zatímco druhý enantiomer pouze na dvou místech a je tedy vázán na CS méně [83]. Tento velmi zjednodušený model je platný pouze v některých případech, zejména tam, kdy interakce mezi CS a enantiomery probíhá na jednom specifickém místě a nereflektuje povahu interakcí (přitažlivých i odpudivých). Je třeba zmínit, že alespoň jedna z interakcí musí být stereoselektivní pro tvorbu přechodných diastereomerních komplexů. I když je tato představa zjednodušená, je tento model stále používán,

zejména pro demonstraci, že k interakci mezi CS a enantiomery dochází v prostoru a nikoli v rovině. Navíc některé typy nekovalentních interakcí, které se podílejí na stereoselektivní diskriminaci jsou vícebodové (např. π - π interakce, nebo interakce dipól-dipól).

Zjednodušeně je možné říci, že enantiomer, který má s CS vyšší konstantu stability splňuje podmínky interakce s CS lépe, na rozdíl od enantiomeru s nižší konstantou stability s CS. Zároveň je potřeba poznamenat, že pokud nedochází k enantiodiskriminaci dvojice enantiomerů s určitým CS, neznamená to, že mezi nimi nedochází k interakci. Indikátorem, že nedochází mezi CS a enantiomery k žádné interakci, je nezávislost jejich mobility na koncentraci CS za daných podmínek. Podrobněji popsali problematiku enantioseparace v přehledovém článku Lämmerhofer [84] a Chankvetadze [85].

EKC má rovněž významné uplatnění v separaci enantiomerů. Princip CZE je založen na rozdílné rychlosti migrace, která je dána rozdílnou hustotou náboje separovaných molekul [29]. Enantiomery mají stejnou hustotu náboje, stejně jako komplexy mezi enantiomery a CS. Nelze tedy tvrdit, že enantioseparace probíhá pouze na základě mechanismu CZE [85]. Ze stejného důvodu se na výsledné enantioseparaci nepodílí:

- (i) Elektroosmotický tok,
- (ii) samotná elektroforetická mobilita analytů,
- (iii) kombinace elektroosmotického toku a elektroforetické mobility analytů,
- (iv) migrace analytu vyvolaná interakcí s neenantioselektivním separačním nosičem.

Jak bylo uvedeno, nutnou podmínkou k dosažení enantioseparace je enantioselektivní interakce mezi enantiomery a CS. Tuto interakci lze analogicky přirovnat k rozdělovacímu mechanismu mezi navzájem nemísitelné fáze jako je tomu při chromatografické separaci. Omezení chromatografických technik je dáno hnací

silou separace – tlakem. Tlak jako hnací síla neumožňuje vytvořit dvě rozdílně pohybující se mísitelné fáze, stejně tak není možné, aby se separované analyty pohybovaly rozdílnou rychlostí ve stejné fázi. Elektroforetický mechanismus separace naopak umožňuje, aby se analyty v jedné fázi pohybovaly různou rychlostí. Enantioseparace v elektromigračních technikách (včetně EKC) tedy probíhají v jednofázovém fyzikálním prostředí a jsou založeny na selektivní distribuci enantiomerů mezi nejméně dvě složky kapalně fáze mající rozdílné mobility [29, 86]. Z uvedeného popisu je zřejmé, že většina enantioseparací s pomocí elektromigračních technik využívá chromatografického mechanismu v kombinaci s elektroforetickou migrací, a je tak možno předpokládat, že enantioseparace probíhají mechanismem EKC.

Je třeba poznamenat, že stále není zavedená jednotná klasifikace enantioseparací v kontextu ke konvenčně definovaným mechanismům elektroforetických separací – CZE, kapilární isoelektrická fokusace (CIEF), kapilární gelová elektroforéza (CGE) a EKC.

V minulosti byly enantioseparace nabitých analytů s využitím neutrálních CS označovány jako CZE enantioseparace, naproti tomu enantioseparace neutrálních analytů s využitím nabitých CS jako EKC enantioseparace. Mechanismus stereoselektivních interakcí je, ale v obou uvedených případech stejný, není žádný rozdíl v principu enantioseparace pokud je analyt nabitý a CS nenabitý, a opačně.

Přestože bylo v předchozích odstavcích uvedeno, že enantioseparace s pomocí EKC probíhají s využitím chromatografického mechanismu, nejde o shodný princip jaký je uplatňován v chromatografických technikách či MEKC. Dále bude uvažováno srovnání principů EKC a LC enantioseparace.

Všechny rozdíly mezi chirálními EKC a LC separacemi vyplývají z faktu, že elektroforetická mobilita je určujícím faktorem selektivity pro separaci enantiomerů ve stejné fyzikální fázi (tj. v separačním elektrolytu v případě EKC). V případě LC enantioseparací, kdy je využívána chirální stacionární fáze (CSP) se v okamžiku

interakce analytu s imobilizovaným CS na CSP analyt nepohybuje. Naproti tomu, v případě EKC enantioseparace se výsledný komplex mezi CS a enantiomerem pohybuje a má tedy vlastní elektroforetickou mobilitu.

Příspěvek elektroforetické mobility k mechanismu enantioseparace s pomocí EKC se dá shrnout do následujících bodů:

- (i) V případě EKC může dojít k tomu, že výsledná enantioselektivita enantioekognice může být vyšší než je enantioselektivita termodynamická (pro chromatografii je nejvyšší termodynamická selektivita, separace probíhá na základě rozdílů afinit enantiomerů k CS) [86,87].
- (ii) V EKC je možné beze změny CS, a beze změny povahy chirálních interakcí mezi CS a enantiomery dosáhnout změny migračního pořadí separovaných enantiomerů. Chromatografické techniky využívající CSP změnu elučního pořadí beze změny povahy chirálních interakcí mezi CS a enantiomery neumožňují.
- (iii) K rozlišení enantiomerů může v případě EKC dojít, i když jsou vazebné konstanty obou enantiomerů s CS shodné [86, 88,89].

Diferenci mobilit, která je nutná pro dosažení rozlišení separovaných enantiomerů je možné definovat s pomocí vztahu (30) za předpokladu, že pro oba komplexy mezi jednotlivými enantiomery a CS platí $\mu_{c1} = \mu_{c2} = \mu_c$ [90]:

$$\Delta\mu = \frac{C(\mu_f - \mu_c)(K_R - K_S)}{1 + C[K_R + K_S] + C^2 K_R K_S} \quad (30)$$

Kde C je celková koncentrace CS v separačním systému, K_S a K_R jsou interakční konstanty pro R - a S - enantiomery s CS, μ_f a μ_c jsou mobility volných a vázaných enantiomerů v komplexu s CS.

Pokud vezmeme do úvahy, že elektroforetická mobilita je vektorovou veličinou, je možné pouhou změnou znaménka výsledné difference mobilit $\Delta\mu$, beze změny enantiorozlišovací schopnosti, změnit migrační pořadí enantiomerů v opačné [91].

Ze vztahu (30) také plyne, jak je možné změnit znaménko difference mobilit $\Delta\mu$ beze změny afinity mezi CS a enantiomerem. Změnu migračního pořadí je možné dosáhnout prostřednictvím změny znaménka rozdílu $K_R - K_S$, ale také změnou znaménka rozdílu $\mu_f - \mu_c$.

Změny znaménka rozdílu $\mu_f - \mu_c$ je možné docílit změnou efektivní mobility analytu nebo CS, anebo změnou efektivních mobilit jak analytu, tak i CS. Vliv pH, iontové síly, koncentrace CS a směr a velikost EOF není explicitně ve vztahu (30) vyjádřen, nicméně všechny uvedené parametry mají samozřejmě také vliv na výsledný rozdíl $\mu_f - \mu_c$. Všechny uvedené parametry tedy mohou přispět ke změně migračního pořadí v EKC.

5.3 Experimentální přístupy pro enantioseparace s pomocí EKC-ESI-MS

Pro enantioseparace s pomocí EKC-ESI-MS je nutné, aby CS nekontaminoval iontový zdroj. Protože všechny dosud popsané CS nejsou dostatečně těkavé, je nutné podobně jako v případně MEKC-ESI-MS separací využít různé experimentální přístupy, které zamezují vstupu CS do iontového zdroje.

Experimentální uspořádání enantioseparací s pomocí EKC-ESI-MS může být provedeno buď s využitím:

- (i) techniky PFT,
- (ii) kombinace techniky PFT a protisměrné migrace enantiomerů a CS (*counter-current separation*).

5.3.1 Technika částečného plnění při enantioseparaci s pomocí EKC-ESI-MS

PFT je založena na velmi jednoduchém principu, kdy je elektrolytem obsahujícím CS plněna pouze určitá část kapiláry (např. 90% celkové délky kapiláry) [63]. Ve vstupní

vialce je elektrolyt bez CS. Výstupní vialku v EKC-ESI-MS tvoří průtok pomocné sprejovací kapaliny, která rovněž neobsahuje CS.

Podle charakteru CS a experimentálních podmínek mohou nastat tyto případy:

- (i) CS je nenabitý, separované enantiomery nesou náboj a separace probíhá za podmínek, kdy je elektroosmotická mobilita zanedbatelná. Elektrolyt s CS tak vytváří nemigrující zónu, přes kterou migrují separované enantiomery směrem k iontovému zdroji MS [60].
- (ii) CS i separované enantiomery mají opačné znaménko náboje a separace probíhá za podmínek, kdy je elektroosmotická mobilita zanedbatelná. V tomto případě enantiomery migrují naproti migrujícími CS. Podmínky separace musí být nastaveny tak, aby CS migroval směr od iontového zdroje MS. Pak se jedná o kombinaci PFT a protisměrné migrace enantiomerů a CS [92-95].

Pokud má CS dostatečně velkou vlastní mobilitu a migruje v opačném směru proti separovým enantiomerům, je možné elektrolytem obsahujícím CS naplnit celou kapiláru. Experimentální uspořádání, kdy je celá kapilára naplněna elektrolytem obsahujícím CS je pak označována jako technika kompletního plnění (*complete filling technique*, CFT) [68]. Určitou výhodou techniky CFT oproti PFT je skutečnost, že k enantioseparaci je využito celé délky kapiláry a odpadá časová náročnost experimentu, neboť celou kapiláru je možné rychle promýt pufrům obsahujícím zvolené aditivum, zatímco dávkování zóny do části kapiláry (PFT) vyžaduje použití nízkých a přesně definovaných tlaků (typicky 3 až 5 kPa) po definovaný čas, což vede k prodlužování celé analýzy. Je nutné poznamenat, že při použití metody CFT pro EKC-ESI-MS separace je nutné zajistit, aby při promývání kapiláry elektrolytem s přídavkem aditiva byla kapilára mimo iontový zdroj a nedocházelo tak k jeho kontaminaci. Uvedené experimentální přístupy jsou v případě LC technicky nedosažitelné.

5.3.2 Vankomycin jako chirální selektor

Pro EKC-ESI-MS je možné využití celou řadu CS (cyklodextriny a jejich deriváty, micely chirálních tenzidů, chirální crown ethery, makrocyklická antibiotika, proteiny, aj), avšak vzhledem k zaměření experimentální části této práce bude podrobněji diskutován pouze vankomycin ze skupiny makrocyklických antibiotik. Vankomycin, byl v disertační práci využit jako CS pro enantioseparaci D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny.

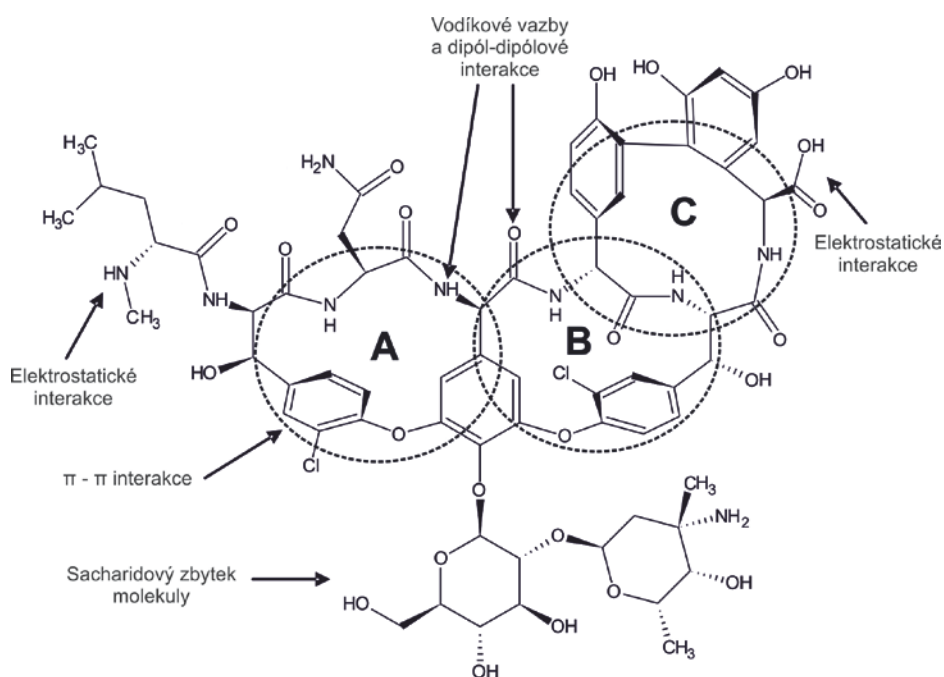
Makrocyklická glykopeptidová antibiotika jsou CS, které jsou produkovány bakteriální fermentací. Využívají se buďto vázaná na silikagel v LC ve formě CSP nebo volně v roztoku v případě EKC. Komerčně dostupnými makrocyklickými antibiotiky, které jsou také využívány jako CS, jsou zejména vankomycin, ristocetin R, teikoplanin, rifamycin a teikoplanin aglykon [96]. Výhodou všech zmíněných CS na bázi antibiotik, je jejich ionizovatelnost a široká škála enantioselektivních interakcí, které mohou poskytovat. Díky mnoha funkčním skupinám jsou tato antibiotika nabitá ve formě kationtů nebo aniontů v závislosti na pH prostředí. Glykopeptidová antibiotika mají obecně jednu nebo více sacharidových jednotek navázané na makrocyklické kruhy. Sacharidové jednotky navázané na aglykon zvyšují rozpustnost aglykonu a tedy celého antibiotika ve vodě. Naproti tomu, nepřítomnost sacharidových jednotek nevyvolá ztrátu antibiotických ani stereoselektivních vlastností [97].

Nejčastěji využívaným CS ze skupiny makrocyklických antibiotik v EKC je vankomycin (komerčně nejčastěji dostupný jako vankomycin chlorid, VC). Jde o CS, jehož tvar připomíná basketbalový koš. VC obsahuje ve své struktuře několik funkčních skupin (hydroxy-, amino-, amido-, karboxy- a také aromatická jádra a dvě sacharidové jednotky). Celkově obsahuje 18 stereogenních center, které hrají významnou roli při enantioseparaci. VC je dobře rozpustný ve vodě a polárních organických rozpouštědlech jako např. dimethylsulfoxid nebo dimethylformamid [98]. Shrnutí fyzikálně-chemických vlastností vankomycinu je v Tabulce 5.1:

Tabulka č. 5.1 – Fyzikálně-chemické vlastnosti vankomycinu [99,100]

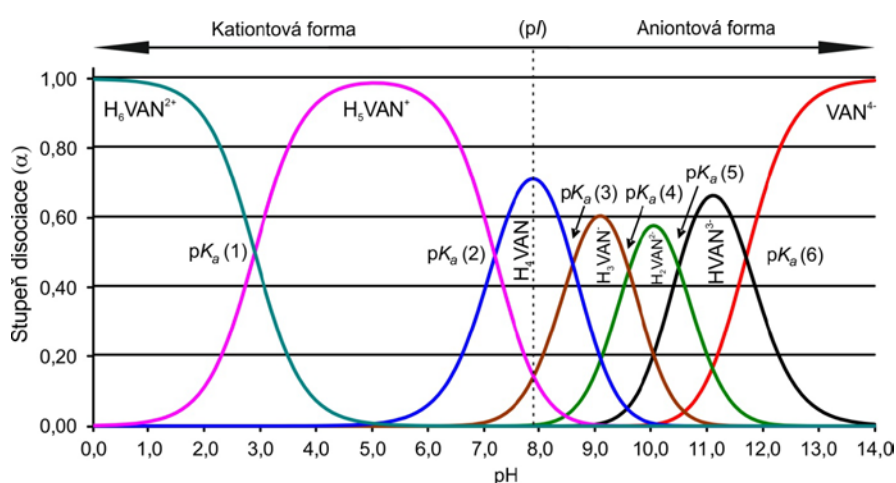
Molekulová hmotnost	1449 g/mol
pK _a	2,9; 7,2; 8,6; 9,6; 10,5; 11,7
Isoelektrický bod (pI)	7,2
Počet stereogenních center	18
Počet makrocyklů	3
Počet hydroxylových skupin	9 (z toho 3 fenolické)
Počet primárních amino- skupin	1
Počet sekundárních amino- skupin	1
Počet karboxylových skupin	1
Počet aromatických jader	5
Počet amidových vazeb	7
Počet sacharidových jednotek	2

Struktura VC s vyznačením možných stereoselektivních interakcí, který může vankomycin při interakci s enantiomery poskytnout je na Obr. 5.3.



Obr. 5.3 Struktura vankomycinu s vyznačením různých typů interakčních oblastí a inkluzních kavit (A, B a C). Ilustrace autora podle [99-101].

Pro využití VC k enantioseparacím s pomocí EKC jsou důležité jeho acidobazické vlastnosti. V kyselém prostředí má vankomycin kladný náboj, při pH rovném isoelektrickému bodu vystupuje vankomycin navenek jako elektroneutrální molekula a v bazickém pH vystupuje vankomycin jako anion. Toto lze dobře demonstrovat s pomocí distribučního digramu (Obr. 5.4) jednotlivých forem vankomycinu a odpovídajícími acidobazickými rovnovahami podle následující rovnice (31):



Obr. 5.4 Distribuční diagram jednotlivých protonizovaných a disociovaných forem vankomycinu (VAN) v závislosti na pH. Výpočet a ilustrace autora podle [83-87].

Kladný náboj VC v kyselém prostředí je dán protonizací aminoskupin. Karboxylová skupina je disociována ve formě aniontu v rozmezí pH 4 až 13. V neutrálním pH je pozitivní náboj protonizovaných amino- skupin kompenzován negativními náboji karboxylových skupin a negativními náboji fenolických skupin. Se zvyšujícím se pH roste disociace jak karboxylové tak i fenolických skupin, takže v rozmezí pH 10 až 12 jsou všechny ve formě aniontu a aminoskupiny jsou deprotonovány a tedy neutrální. Výsledný efektivní náboj vankomycinu nad pH 12 je roven -4.

Ačkoli hodnota pI ($\sim 7,9$) se v uvedeném distribučním diagramu liší od doposud publikovaných hodnot (Tabulka 5.1), je potřeba na celý systém nahlížet komplexně. Vzhledem k tomu, že autoři prací, kteří se zabývali fyzikálně-chemickými vlastnostmi

VC, je vždy experimentálně zjišťovali za různých podmínek a různými metodami. Rozpětí mezi teoreticky vypočítanou a experimentálně stanovenou hodnotou pI u takto komplikovaného systému je tedy pochopitelné. Doposud navíc nebyla publikována žádná práce, která by hodnotu pI při výpočtu extrapolovala na nulovou iontovou sílu. Z uvedených acidobazických vlastností VC plyne, že elektrostatické interakce jsou jedny ze stěžejních typů stereoselektivních interakcí při enantioseparaci v EKC. Nelze však opomenout i ostatní typy interakcí (π - π interakce, interakce dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól, vodíkové vazby, sterické bránění, van der Waalsovy síly), které hrají rovněž důležitou roli při enantiorekognici.

Kromě již zmíněné netěkavosti VC je jeho další nevýhodou sorpce na vnitřní povrch křemenné kapiláry. Sorpce vankomycinu na povrch nepokryté křemenné kapiláry může také způsobovat pokles migračních časů a rozšíření separovaných zón enantiomerů dané zpomalením EOF, které je důsledkem sorpce [102]. Proto je většinou nutné pracovat v pokrytých kapilárách, kde je minimalizována sorpce kladně nabitého vankomycinu na vnitřní povrch kapiláry.

Pro nalezení optimální enantioseparace s použitím VC je kladen důraz na volbu pH, složení a iontovou sílu pufru a případně koncentraci organického rozpouštědla. Vhodné pH pro enantioseparace s vankomycinem je pod hodnotou pI , kdy je vankomycin kladně nabitý (převládá forma H_5VAN^+). Vankomycin je stabilní pouze v roztocích s rozmezím pH 4 až 7. V tomto rozmezí pH jsou také podporovány elektrostatické interakce mezi univalentním kationtem H_5VAN^+ a separovanými enantiomery. Vzhledem k bazické povaze vankomycinu je tento CS vhodný zejména pro enantioseparace negativně nabitých enantiomerů (karboxylových kyselin, hydroxykarboxylových kyselin, derivátů aminokyselin aj.).

První enantioseparaci využívající vankomycin jako CS pro EKC-ESI-MS publikoval Fanali a kol. [103]. Doposud nebyly publikovány žádné další práce využívající ostatní antibiotika pro enantioseparace opticky aktivních látek s využitím EKC-ESI-MS.

5.4 Literatura

- [1] Schwer C., Kenndler E., *Anal. Chem.* 63 (1991) 1801-1807.
- [2] Lauer H.H., Rozing G.P. (ed.): *High Performance Capillary Electrophoresis* Agilent Technologies, Waldbronn, Německo, 2010.
- [3] Marina L.M., Ríos A., Valcárcel M., (ed.): *Comprehensive Analytical Chemistry: Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, Nizozemí, 2005.
- [4] Cifuentes A., Canalejas P., Diez-Masa J.C., *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 423-438.
- [5] Gelfi C., Curcio M., Righetti P.G., Sebastiano R., Citterio A., Ahmadzadeh H., Dovichi N.J., *Electrophoresis* 19 (1998) 1677-1682.
- [6] Horvath J., Dolník V., *Electrophoresis* 22 (2001) 644-655.
- [7] Righetti P.G., Gelfi C., Verzola B., Castelletti L., *Electrophoresis* 22 (2001) 603-611.
- [8] Znaležiona J., Petr J., Knob R., Maier V., Ševčík J., *Chromatographia* 67 (2007) S5-S12.
- [9]. Olivares J.A., Nguyen N.T., Yonker C.R., Smith R.D., *Anal. Chem.* 59 (1987) 1230-1232.
- [10]. Smith R.D., Olivares J.A., Nguyen C.R., Udseth H.R., *Anal. Chem.* 60 (1988) 4360-441.
- [11]. Smith R.D., Baringa C.J., Udseth H.R., *Anal. Chem.* 60 (1988) 1948-1952.
- [12] Schmitt-Kopplin P., Frommberger M., *Electrophoresis* 24 (2003) 3837-3867.
- [13] von Brocke A., Nicholson G., Bayer E., *Electrophoresis* 22 (2001) 1251-1266.
- [14] Zhong X., Zhang Z., Jiang S., Li L., *Electrophoresis* 35 (2014) 1214-1225.
- [15] Dole M., Mack L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D., Alice M.B., *J.Phys. Chem.* 49 (1984) 2240-2249.
- [16] Yamashita M., Fenn J.B., *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4451-4459.
- [17] Yamashita M., Fenn, J.B., *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4671-4675.
- [18] Cech N.B., Enke C.G., *Mass Spectrom. Rev.* 20 (2001) 362- 387.

- [19] Švidrnoch M., Analýza ethylglukuronidu pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií, Diplomová práce, Olomouc, 2012.
- [20] Wilm M., Mol. Cell. Proteomics 10 (2011) M111.009407.
- [21] Gaskell S.J., J. Mass Spec. 32 (1997) 677-688.
- [22] Liu C.C., Zhang J., Dovichi N.J., Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 187-192.
- [23] Pantůčková P., Gebauer P., Boček P., Křivánková L., Electrophoresis 32 (2011) 43-51.
- [24] Klepárník K., Electrophoresis 36 (2015) 159-178.
- [25] Petritis K., Dessans H., Elfakir C. Dreux M., LC-GC Europe (2002) 2-4.
- [26] Hoffmann E. (ed.), Mass Spectrometry – Principles and Applications – 3. vydání, Wiley, Spojené Království, 2007.
- [27] Schmitt-Kopplin P., Frommberger M., Electrophoresis 24 (2003) 3837-3867.
- [28] Griffiths J.W., Wang Y., Chem. Soc. Rev.38 (2009) 1882-1896.
- [29] B. Chankvetadze, G. Blaschke, J. Chromatogr. A 906 (2001) 309-363.
- [30] Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T., Anal. Chem. 56 (1984) 111-113.
- [31] Terabe S., Annu. Rev. Anal. Chem. 2 (2009) 99-120.
- [32] Terabe S., Anal. Chem. 76 (2004) 240A-246A.
- [33] Terabe S., Trends Anal. Chem. 8 (1989) 129-134.
- [34] El Deeb S., Dawwas H. A., Gust R., Electrophoresis 34 (2013) 1295-1303.
- [35] Pramauro E., Pelizeti E. (Ed.). Comprehensive Analytical Chemistry, Surfactants in Analytical Chemistry, Vol. XXXI, Elsevier, Amsterdam, Nizozemí, 1996.
- [36] Ishihama Y., Oda Y., Uchikawa K., Asakawa N., Chem Pharm Bull. 42 (1994) 1525–1527.
- [37] Terabe S., Otsuka K., Ando T., Anal. Chem. 57 (1985) 834-841.
- [38] Pyell U. (ed.), Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation and Application, Wiley & Sons, Chichester, UK, 2006.

- [39] Gavenda A., Bednář P., Barták P., Adamovský P., Ševčík J., Tzoumas P., Ulrichová J., *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 723-728.
- [40] Vindevogel J., Sandra, P., *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*, Hüthing, Heidelberg, Německo, 1992.
- [41] Jorgenson J.W., Lukacs K.D., *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298-1302.
- [42] Quang C., Strasters J.K., Khaledi M.G., *Anal. Chem.* 66 (1994) 1646-1653.
- [43] Otsuka K., Terabe S., Ando, T., *J. Chromatogr. A* 348 (1985) 39-47.
- [44] Riekkola M.L., Wiedmer S.K., Valkó I.E., Sirén H., *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 13-35.
- [45] Rosen M.J.: *Surfactants and Interfacial Phenomena*, Wiley, New York, USA, 1978.
- [46] Davidsohn A., Milwidski B.M., *Synthetic Detergents*, 6. vydání, Wiley, New York, USA, 1978.
- [47] Cordes E.H., Gitler C., *Prog. Bioorg. Chem.* 9 (1973) 1.
- [48] Bunton C.A., *Prog. Solid State Chem.* 8 (1973) 239.
- [49] Farn R.J. (ed.), *Chemistry and Technology of Surfactants*, Blackwell Publishing Ltd., Spojené Království, 2006.
- [50] Porter M.R. (ed.), *Handbook of Surfactants*, 2 vydání, Chapman & Hall, Spojené Království, 1994.
- [51] Krafft M.P., Riess J.G., *Biochemie* 80 (1998) 489.
- [52] Kissa E. (ed.), *Fluorinated surfactants and repellents*, Marcel Dekker, New York, USA, 2001.
- [53] Lopéz-Fontán J.L., Sarmiento F., Schulz P.C., *Colloid. Polym. Sci.* 283 (2005) 862-871.
- [54] Kunleđa H., Shinoda K., *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 2468-2470.
- [55] Armstrong A., *Micelles in Separations: A Practical and Theoretical Review*, Marcel Dekker, New York, USA, 1985.
- [56] Shinoda K. (ed.), *Solvent Properties of Surfactant Solutions*, Marcel Dekker, New York, USA, 1967.

- [57] Kunieda H., Shinoda K., *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 2468-2470.
- [58] Cheng H.L., Tseng M., Tsai P., Her G.R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 1473-1480.
- [59] Petersson P., Jortén-Karlsson M., Stalebro M., *Electrophoresis* 24 (2003) 999-1007.
- [60] Somsen G.W., Mol R., de Jong G.J., *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3978-3991.
- [61] Ozaki H., Ichihara A., Terabe S., *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 117.
- [62] Yang L., Lee C.S., *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 207-218.
- [63] Valtcheva L., Mohammed J., Pettersson G., Hjerten S., *J. Chromatogr.* 638 (1993) 263-267
- [64] Amini A., Wiersma B., Westerlund D., Paulsen-Sörman U., *European J. Pharm. Sci.* 9 (1999) 17-24.
- [65] Amini A., Paulsen-Sörman U., Westerlund D., *Chromatographia* 50 (1999) 497-506.
- [66] Wuethrich A., Haddad P.R., Quirino J.P., *Chirality* 26 (2014) 734-738.
- [67] Van Biesen G., Bottaro C.S., *Electrophoresis* 27 (2006) 4456-4468.
- [68] Ishihama H., Katayama N., Asakawa N., *Anal. Biochem.* 287 (2000) 45-54.
- [69] Viera D.B., Crowell A.M.J., Doucette A.A., *Rapid. Commun. Mass Spetrom.* 26 (2012) 523-534.
- [70] van Eckhauet A., Michotte Y. (ed.), *Chiral Separations by Capillary Electrophoresis*, CRC Press, USA, 2010.
- [71] <http://www.s8int.com/chirality.html> (staženo dne 2.6.2016).
- [72] Smith S.W., *Toxicol. Sci.* 110 (2009) 4-30.
- [73] Nguyen L.A., He H., Pham-Huy C., *Int. J. Biomed. Sci.* 2 (2006) 85-100.
- [74] Draffan A.G., Evans G.R., Henshilwood J.A., *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, 6. vydání., Wiley, 2003.
- [75] Sewell A.C., Heil M., Podebrad F., Mosandl A., *Eur. J. Pediatr.* 157 (1998) 185-191.
- [76] Shen Z., Lv C., Zeng S., *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 1-10.
- [77] Kalíková K., Riesová M., Tesařová E., *Eur. J. Chem.* 10 (2012) 450-471.

- [78] Chankvetadze B., *Capillary electrophoresis in Chiral Analysis*, Wiley, Spojené Království, 1997.
- [79] Rizzi A., *Electrophoresis* 22 (2001) 3079–3106.
- [80] Chankvetadze B., Blaschke G., *Electrophoresis* 20 (1999) 2592–2604.
- [81] Wren S.A.C., Rowe R.C., *J. Chromatogr.* 603 (1992) 347-362.
- [82] Wren S.A.C., Rowe R.C., *J. Chromatogr.* 609 (1992) 363-367.
- [83] Davankov V.A., *Chirality* 9 (1998) 99-102.
- [84] Laemmerhofer M., *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 814-856.
- [85] Chankvetadze B., *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 45-70.
- [86] Chankvetadze B., *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 269-295.
- [87] Chankvetadze B., Burjanadze N., Bergenthal D., Blaschke G., *Electrophoresis* 20 (1999) 2680-2685.
- [88] Chankvetadze B., Blaschke G., *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 309-363.
- [89] Chankvetadze B., Lindner W., Scriba G., *Anal. Chem.* 76 (2004) 4256-4260.
- [90] Wren S.A.C., Rowe R.C., *J. Chromatogr.* 603 (1992) 235-241.
- [91] Chankvetadze B., *Electrophoresis* 23 (2002) 4022-4035.
- [92] Cherkaoui S., Rudaz S., Varesio E., Veuthey J.-L., *Electrophoresis* 22 (2001) 3308–3315.
- [93] Rudaz S., Cherkaoui S., Gouvrit J.-Y., Lantéri P., Veuthey J.-L., *Electrophoresis* 22 (2001) 3316–3326.
- [94] Toussaint B., Palmer M., Chiap P., Hubert P., Crommen J., *Electrophoresis* 22 (2001) 1363-1372.
- [95] Simó C., Rizzi A., Barbas C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 26 (2005) 1432-1441.
- [96] Prokhorova, A.F., Shapalovova, E.N. and Shpigun, O.A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 1170-1179.
- [97] Kaplan J., *J. Med. Chem.* 24 (2001) 1837-1840.
- [98] Higgins H.M., Harrison W.H., Wild G.M., Bungay H.R., McCormick M.H., *Antibiot. Annu.* (1957) 906-914.

- [99] Armstrong D. W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill C., Chen J.R., Anal. Chem. 66 (1994) 1473-1484.
- [100] Ward T.J., Oswald, T.M., J. Chromatogr. A 792 (1997) 309-325.
- [101] Chirobiotic Handbook, 5. vydání, Advanced Separation Technologies Inc., USA, 2004.
- [102] Gasper M., Anal. Chem. 68 (1996) 2501-2514.
- [103] Fanali S., Desiderio C., Schulte G., Heitmeier D., Strickmann B., Chankvetadze B., Blaschke G., J. Chromatogr. A 800 (1998) 69-76.

6. Analýza syntetických derivátů kathinonu pomocí MEKC-ESI-MS/MS

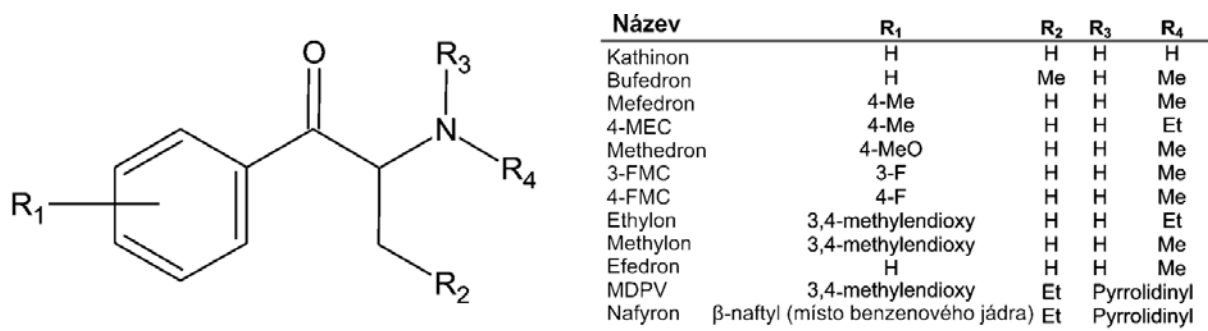
Výsledky, které jsou shrnuty v této části práce, byly publikovány v následující práci: Švidrnoch M., Lněničková L., Válka I., Ondra P., Maier V.: *Utilization of micellar electrokinetic chromatography – tandem mass soectrometry employed volatile micellar phase in the analysis of cathinone designer drugs*. Journal of Chromatography A 1356 (2014) 258-265.

6.1 Deriváty kathinonu jako nové syntetické drogy

Současná situace v oblasti omamných a psychotropních látek (OPL), zejména díky stále se zvyšujícímu počtu odhalených výrobců či distributorů klasických známých drog, vede k rozšiřování „náhražek“ drog či tzv. nových syntetických drog (NSD). Strukturou či účinkem jsou tyto NSD podobné nelegálním drogám, nejsou však často uvedeny na seznamu OPL (většinou se jedná o látky odvozené od kontrolovaných drog s původem v Asii). Mezi léty 2007 – 2014 se výrazně zvýšil počet jednotlivých záchytů i celkového množství zajištěných NSD [1-3]. Deriváty již existujících ilegálních látek se tedy na černém trhu vyskytují *de facto* jako látky legální. Výrobci a distributoři je uživatelům často nabízejí prostřednictvím tzv. sběratelských předmětů, či je nabízejí v kamenných i internetových „Amsterdam shopech“ jako legální náhražky drog (*legal highs* či *bath salts*).

Jednou ze skupin drog patřící mezi NSD jsou deriváty kathinonu (KAT). Jde o látky, které jsou distribuovány jako náhražky návykových látek namísto budivých aminů. [4,5]. Jedná se tedy o látky strukturně podobné látkám amfetaminového typu (fenylethylaminy). Vzhledem k tomu, že se tyto látky vyskytují nově na ilegální drogové scéně a jejich toxicita není dostatečně prozkoumána, mohou způsobit řadu nepředvídatelných a závažných zdravotních komplikací, jak při úmyslném, či náhodném užití [6]. Mezi zdravotní komplikace spojené se zneužíváním KAT patří zejména srdeční selhání, bolest na hrudi, nucení na zvracení, změna vnímání barev, zkrácení dechu, mydriáza, halucinace a deprese. Navíc dosud nejsou příliš známy a popsány interakce KAT s dalšími zneužívanými látkami (alkohol, antidepresiva, kanabinoidy, amfetaminy apod.). Pro včasnou terapii při intoxikaci KAT je nutné znát

jak konkrétní látku, která byla užita tak i její koncentraci v biologických materiálech. Z tohoto důvodu je nutné disponovat rychlými a především citlivými analytickými metodami pro případ forenzní a toxikologické analýzy zaměřenou na průkaz a stanovení KAT. Existuje široká řada strukturně podobných látek patřících do skupiny KAT. Struktury studovaných KAT jsou zobrazeny na Obr. 6.1. Uvedené KAT byly vybrány jako nejčastěji se vyskytující KAT na drogové scéně v EU.



Obr. 6.1 Schéma chemických struktur studovaných KAT.

Chemické struktury KAT jsou odvozeny od základního skeletu fenylethylaminu, který je v poloze β substituován keto skupinou. Fyziologické účinky těchto látek jsou velmi podobné látkám amfetaminového typu. Podrobnější farmakologické, respektive toxikologické aspekty publikoval Kelly v přehledovém článku [7].

V obecné rovině podléhají KAT společným biotransformačním přeměnám, kdy je v I. fázi β -keto skupina oxidována na hydroxylovou skupinu. Rovněž dochází k *N*-desalkylaci substituentů vázaných na aminoskupinu a, pokud je to možné, dochází také k oxidaci na aromatickém jádře. Kromě řady metabolitů, které mohou v další fázi biotransformace tvořit konjugáty s endogenními substráty (zejména s kyselinou glukuronovou a methylsulfátem), se také část podané látky vylučuje v moči v nezměněné podobě [8]. Doposud však existuje pouze několik studií, které se zabývají farmakokinetikou či farmakodynamikou KAT [8,9]. Je však nutné poznamenat, že farmakokinetický profil studovaných látek je velmi obtížně

reprodukovatelný, protože čistota podané látky i její množství jsou u různých forenzních či klinických případů značně variabilní [10].

6.2 Chromatografické metody využívané pro analýzu nových syntetických kathinonů ve forenzní a toxikologické analýze

Chromatografické metody jsou dnes již zavedeným standardem v toxikologické analýze. Separační metody jako je LC nebo GC se pro účely analýzy KAT využívají nejčastěji ve spojení s MS, která umožňuje zejména objektivní identifikaci analyzované látky [11-13]. Následující přehled obsahuje nejvýznamnější dosud publikované práce využívající chromatografické metody pro analýzu nových syntetických kathinonů pro účely toxikologické analýzy.

Metoda založená na HPLC-QqQ-MS(MS) analýze a stanovení vybrané skupiny KAT a látek odvozených od efedrinu v biologickém materiálu získaném *post-mortem* byla publikována Sorensenem a kol. [14]. Další práce publikovaná Wohlfarthem a kol. se opírá o LC-MS/MS analýzu širší skupiny NSD včetně derivátů tryptaminu a piperazinových drog [15]. Přehledový článek zabývající se MS spektry a charakteristickými fragmentacemi KAT získaných pomocí GC-EI/MS a LC-ESI/qTOF-MS publikoval Zuba [16]. Podobně široká skupina NSD byla separována také pomocí HPLC-QqQ-MS, a to rovněž ze vzorků *post-mortem* materiálu [17]. Článek zabývající se metabolity KAT publikoval Shima a kol. [18]. MS s vysokým rozlišením (LTQ/Orbitrap) byla použita pro přímou identifikaci šesti homologů KAT ve forenzních vzorcích [19]. Shrnutí doposud publikovaných metod analýzy široké skupiny NSD včetně KAT publikoval Meyer a kol. [20].

GC je v toxikologické praxi využívána velmi často. Metodu GC-MS analýzy 16 derivátů kathinonu bez derivatizačního kroku publikoval Nic Daed a kol. [21], práce se však zabývá optimalizací vlastní separace vybraných KAT bez validace vyvinuté metody. Deriváty, které mají místo aromatického jádra naftylový skelet (β -nafyrony), byly studovány z hlediska metabolismu pomocí GC-MS a LC-HRMS [22].

Metodu stanovení mefedronu, jako jedné z nejvíce rozšířených látek z této skupiny, pomocí GC-MS publikoval Martin a kol. [23].

Chromatografické metody ve spojení s MS(/MS) jsou dostatečně citlivé a i přesto, že jsou standardně zavedeny v toxikologických laboratořích, mají i určité nevýhody. V případě LC, kdy je často využívána reverzní stacionární fáze k separaci KAT je nutné potlačit protonizaci KAT a pracovat v bazickém prostředí, což může vést k omezení životnosti stacionární fáze. Dále pak v případě separace s pomocí GC je nutné KAT derivatizovat na těkavější deriváty, současně s derivatizací dojde ke snížení polarity KAT, tak aby mohly být separovány na běžných stacionárních fázích.

6.3 Elektromigrační metody v analýze nových syntetických katinonů

Elektromigrační metody jsou využívány pro enantioseparaci opticky aktivních derivátů KAT [24-26]. Využití elektromigračních metod pro objektivní diagnostiku intoxikace syntetickými KAT nebylo dosud publikováno. Vzhledem k tomu, že KAT jsou bazické polární molekuly s nízkou molekulovou hmotností, mohou být elektromigrační metody alternativní metodou pro jejich separaci k chromatografickým metodám. Pro jejich exaktní identifikaci v biologickém materiálu je pak nutností využití spojení elektromigračních metod s MS jako další separační a detekční metody.

V případě analýzy KAT s pomocí CE-ESI-MS je možné využít vysoké účinnosti píků separovaných analytů, velmi nízké spotřeby vzorku a dalších chemikálií, a minimální úpravy vzorku v CE kroku, spolu s možností objektivní identifikace jednotlivých KAT s pomocí MS. Zároveň by tak mohlo být dosaženo i odpovídající citlivosti detekce. Pro forenzní a toxikologickou analýzu je stěžejní především identifikace separovaných KAT v biologickém materiálu, což běžné spojení CE s UV-VIS detekcí (nejčastější dostupná instrumentace) umožňuje jen ve velmi omezené míře. Cílem této práce tedy bylo nalezení vhodných podmínek pro separaci, identifikaci a kvantifikaci uvedených KAT s pomocí spojení CE-ESI-MS.

Separace uvedených KAT pomocí CZE na základě rozdílů jejich mobilit je sice možná, ale pouze v netěkavých pracovních elektrolytech (např. elektrolyty na bázi fosfátu), které nejsou kompatibilní pro spojení CE-ESI-MS. Vzhledem k podobným fyzikálně-chemickým vlastnostem KAT (blízké hodnoty pK_a , resp. elektroforetické mobility) nelze v těkavých elektrolytech (na bázi octanu, mravenčanu či hydrogenuhličitanu amonného nejčastěji využívaných pro CZE-ESI-MS), docílit separace většího počtu látek z této skupiny najednou. Rozmezí hodnot pK_a studovaných KAT je od 7,1 do 8,5. Z uvedených důvodů byla pro separaci vybraných KAT zvolena metoda MEKC-ESI-MS/MS, kdy micelární fázi tvoří těkavý perfluorovaný tenzid. Ta umožňuje lepší separaci uvedených látek zejména z hlediska selektivity a v případě použití těkavých tenzidů je rovněž kompatibilní s ESI ionizací. Pro účely rychlé toxikologické analýzy je PFT metoda využívající netěkavý tenzid (např. SDS) nevhodná, vzhledem k její náročnější optimalizaci a také složitějšímu experimentálnímu uspořádání.

6.4 Experimentální část

6.4.1 Použité chemikálie a materiál

Bufedron, efedron, ethylon, 3-fluoromethkathinon, 4-fluoromethkathinon, kathinon, 4-methylethkathinon, 3,4-methylendioxyprovaleron, methylon, methedron, mefedron a nafyron byly ve formě hydrochloridů zakoupeny od firmy Lipomed (Arlesheim, Švýcarsko). Methanol (MeOH), voda a propan-1-ol (vše v kvalitě pro LC-MS) byly zakoupeny u firmy Merck (Darmstadt, Německo). Acetonitril (ACN, pro LC-MS), octová kyselina ($\geq 99\%$, w/w), mravenčí kyselina ($\geq 95\%$, w/w), hydroxid amonný (25 %, w/w), propan-2-ol (pro LC-MS), perfluorooktanová kyselina (PFOA, 96 %) a 2 M roztok hydroxidu amonného v MeOH byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Není-li uvedeno jinak, byly všechny chemikálie analytické čistoty či vyšší. Deionizovaná voda (18 M Ω .cm) byla připravena pomocí purifikačního systému Millipore (Molsheim, Francie).

Kolonky pro SPE extrakci Supel-Select SCX obsahující hydrofilní polymer na bázi styren-sulfonátu (30 mg/ml) a vakuový extraktor Supelco byly rovněž od firmy Sigma-Aldrich. Křemenné kapiláry o vnitřním průměru 50 μm a vnějším průměru 375 μm byly zakoupeny u firmy MicroSolv (Eatontown, NJ, USA).

6.4.2 Instrumentace

Měření byla prováděna pomocí kapilární elektroforézy Agilent 7100 (Agilent, Waldbronn, Německo) která byla vybavena detektorem diodového pole (DAD, v rozsahu vlnových délek 190 – 600 nm) a on-line spojená s hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 s trojitým kvadrupólovým analyzátozem. Pomocná sprejovací kapalina byla přiváděna isokratickou LC pumpou Agilent 1260 a před vstupem do ESI-MS interface byla dělena děličem toku v poměru 1:100.

Pro experimenty s pomocí CE-DAD byla použita křemenná separační kapilára o průměru 50 μm a celkové délce 48,5 cm (efektivní délka 40 cm). Kapilára byla nejdříve promyta 15 minut 1 M roztokem NaOH, poté 15 minut kondicionována deionizovanou vodou a nakonec 30 minut promývána studovaným separačním elektrolytem. Mezi jednotlivými analýzami pak byla kapilára vždy promyta deionizovanou vodou a separačním elektrolytem po dobu 5 minut. Detektor byl nastaven pro měření při vlnových délkách 210, 214 a 254 nm.

Pro experimenty s pomocí CE-ESI-MS/MS byla použita křemenná kapilára celkové délky 90 cm. Kondicionace kapiláry byla provedena stejně jako v případě experimentů s pomocí CE-DAD. Ostatní parametry nastavení iontového zdroje a analyzátozu hmotnostního spektrometru jsou uvedeny níže. Není-li uvedeno jinak, byla všechna měření prováděna vždy pětkrát.

6.4.3 Příprava standardů, separačního elektrolytu a pomocné sprejovací kapaliny

Zásobní roztoky studovaných KAT byly připraveny rozpuštěním hydrochloridů příslušné báze v MeOH tak, aby výsledná koncentrace volné báze byla 1,0 mg/ml. Standardní roztoky KAT o nižších koncentracích byly připraveny smícháním zásobních roztoků, které byly dále ředěny na nižší koncentrace deionizovanou vodou. Všechny roztoky byly skladovány při teplotě - 18 °C.

Separací elektrolyty na bázi octanu amonného a mravenčanu amonného o potřebné koncentraci (10 až 200 mM) byly připraveny rozpuštěním příslušných kyselin v deionizované vodě a poté titrovány roztokem hydroxidu amonného ve vodě na potřebné pH v rozmezí 3,0 až 7,0. Separací elektrolyt sestávající z PFOA (o koncentracích 40, 60, 80, 100 a 120 mM) a NH₄OH (o koncentracích v rozmezí 100 – 250 mM) byly připraveny modifikací postupu publikovaného Peterssonem a kol. [27] a Van Biesenem a kol. [28]. Separací elektrolyt na bázi PFOA byl připraven tak, že potřebné množství PFOA bylo převedeno do plastové nádoby a opatrně bylo přidáno odpovídající studované množství NH₄OH. Směs PFOA a NH₄OH byla v plastové nádobce přibližně minutu promíchána na vibrační míchačce a poté bylo přidáno odpovídající množství deionizované vody. Nádobka s elektrolytem byla poté po dobu 5 minut umístěna do ultrazvukové lázně při laboratorní teplotě. V případě, že byl studován vliv organického modifikátoru, bylo množství přidané vody menší a organický modifikátor byl přidán po sonifikaci a opatrně promíchán. Veškeré elektrolyty na bázi PFOA byly připravovány každý den čerstvé.

Pomocná sprejovací kapalina o složení MeOH/deionizovaná voda/mravenčí kyselina v poměru 50:49,5:0,5 (v/v) byla připravena smícháním jednotlivých složek.

6.4.5 Příprava vzorků moči

Vzorky moči od pěti zdravých dobrovolníků (různého věku a pohlaví) byly použity jako matrice pro analýzu katinonů. Vzorky moči byly rozděleny na dva díly po 10 ml, kdy vždy jeden vzorek sloužil jako slepý vzorek k vyloučení přítomnosti

analyzovaných látek a druhý vzorek byl spikován všemi studovanými KAT na koncentrační hladinu 300 ng/ml. U všech vzorků bylo pomocí kyseliny mravenčí upraveno pH na hodnotu 3,0, čímž byla podpořena protonizace přítomných KAT. Další úprava vzorků spočívala ve filtraci přes 22 µm PTFE mikrofiltr a alikvotní podíl filtrátu byl poté extrahován SPE podle následujícího postupu:

- (i) SPE kolonka byla kondicionována 1 ml 1 % (v/v) roztoku kyseliny mravenčí v ACN.
- (ii) Do kolonky byl poté nadávkován 1 ml vzorku.
- (iii) Kolonka byla následně opět promyta 1 % (v/v) roztokem kyseliny mravenčí v ACN a 1 ml deionizované vody.
- (iv) Eluce analytů z kolonky byla provedena pomocí 2 ml ACN, který obsahoval 10 % (v/v) 2 M roztoku NH_4OH v MeOH.
- (v) Extrakt byl opatrně odpařen proudem dusíku při laboratorní teplotě a rekonstituován ve 100 µl deionizované vody.

Všechny uvedené kroky byly prováděny pomocí manuálního SPE extraktoru a hodnota vakua byla udržována na -15 mmHg (1 mmHg = 133,32 Pa). Před každým krokem byla vždy kolonka důkladně vysušena vakuem.

6.5 Výsledky a diskuze

6.5.1 Volba pracovního elektrolytu pro separaci KAT pomocí CE-DAD

Pro prvotní optimalizaci separačních podmínek byla použita CE instrumentace s DAD detekcí. Vzhledem k tomu, že všechny studované KAT absorbují UV záření, byla volba vhodného pracovního elektrolytu pro jejich separaci provedena s pomocí DAD detektoru. Vzhledem k záměru použít jako detekci hmotnostní spektrometrii s ESI ionizací, byly studovány pouze těkavé elektrolyty, které jsou kompatibilní s ESI ionizací.

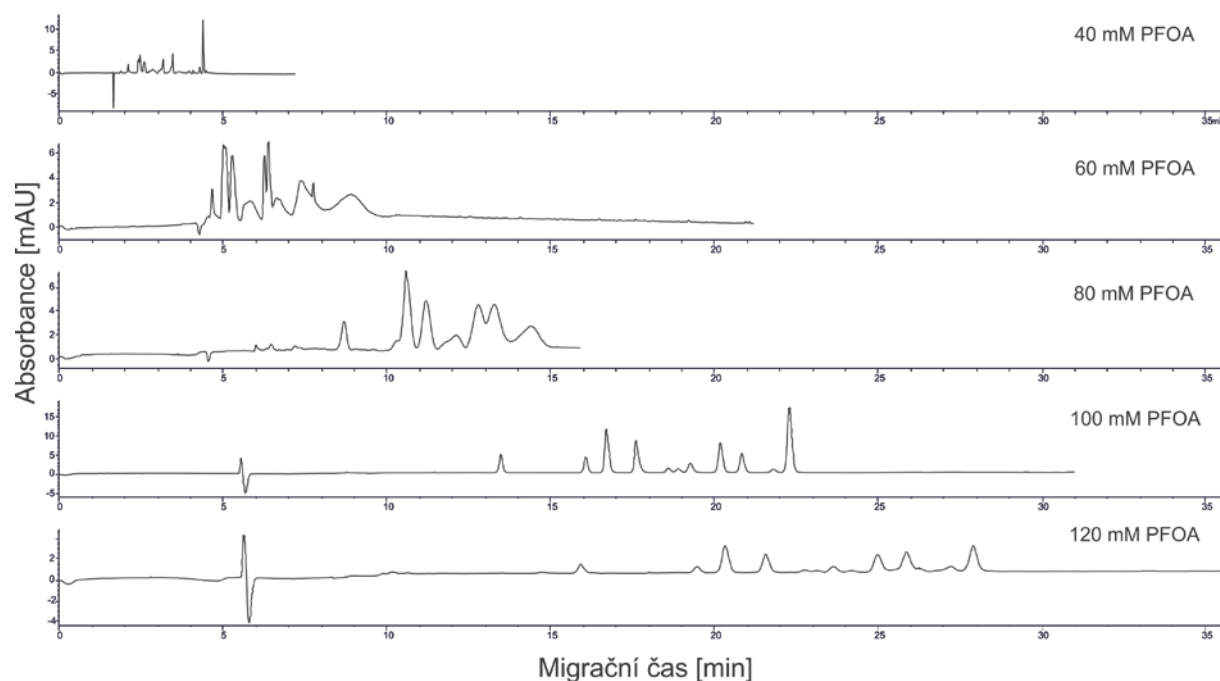
Vzhledem k bazickému charakteru studovaných KAT byly zvoleny separační elektrolyty na bázi octanu a mravenčanu amonného v rozsahu pH od 3,0 do 7,0 (přírůstek pH byl vždy 0,5) a koncentračním rozmezí 10, 20, 30, 50, 100 a 200 mM.

I přes poměrně široký rozsah pH separačních elektrolytů byly efektivní mobility jednotlivých analytů velmi blízké a nebylo možné je za daných podmínek separovat s dostatečným rozlišením mechanismem CZE (na základě rozdílů efektivních mobilit KAT). Jako nejvhodnější se jevil 50 mM octan amonný o pH 5,5 nicméně nebylo dosaženo uspokojivé separace, a proto byl testován vliv přídavku organických modifikátorů s cílem zlepšit selektivitu separačního systému.

Jako organické modifikátory byly použity MeOH, ACN, propan-1-ol a propan-2-ol v rozmezí 0,5 – 5 % (*v/v*), avšak ani jejich přídavek ve zmíněném koncentračním rozmezí nevedl k významnému zlepšení separace. Další běžně používaná aditiva jako např. CD či tenzidy nebylo možné použít, neboť bez použití techniky PFT nejsou kompatibilní s ESI-MS detekcí. Vzhledem k tomu, že se s použitím konvenčních těkavých elektrolytů nebylo dosaženo separace studovaných KAT, byl pro další optimalizaci separace zvolen mechanismus MEKC za použití PFOA jako těkavého tenzidu.

Perfluorované tenzidy jsou díky své volatilitě kompatibilní s ESI-MS a nezpůsobují kontaminaci iontového zdroje. V první fázi byly studovány různé koncentrace PFOA (40 – 120 mM) s konstantní koncentrací NH_4OH (200 mM) s využitím CE-DAD instrumentace. Vyšší koncentrace NH_4OH byla zvolena z důvodu potřeby dostatečně vysoké elektroosmotické mobility, kdy pH všech separačních elektrolytů bylo přibližně 9. Na Obr. 6.2 jsou zobrazeny chromatogramy separace všech studovaných KAT při zvolených koncentracích PFOA. Z chromatogramů je patrné, že koncentrace menší než 100 mM PFOA v elektrolytu nevedou k dostatečnému rozlišení. Naopak vyšší koncentrace PFOA (120 mM) způsobují zbytečně velké rozlišení spojené se ztrátou účinnosti. Navíc vysoké koncentrace tenzidu vedly ke generaci vysokého proudu během separace ($> 45 \mu\text{A}$), což by později činilo potíže při transferu metody

na CE-ESI-MS/MS instrumentaci (instrumentálním limitem pro spojení CE s ESI-MS detekcí je 50 μA). Jako nejvhodnější elektrolyt pro další optimalizaci byla proto zvolena kombinace 100 mM PFOA s 200 mM NH_4OH , která poskytovala jak nejlepší rozlišení, tak zároveň nižší hodnotu a stabilitu separačního proudu ($\sim 35 \mu\text{A}$, pro kapiláru celkové délky 48,5 cm o vnitřním průměru 50 μm).



Obr. 6.2 Chromatogramy MEKC-DAD separace katinonů (50 mg/l) s využitím PFOA a konstantní koncentrací NH_4OH (200 mM). Podmínky separace: $U = +12 \text{ kV}$, dávkování 100 mbar/5s, detekční vlnová délka 214 nm, celková délka kapiláry 48,5 cm, efektivní délka kapiláry 40 cm, vnitřní průměr 50 μm .

V dalším kroku optimalizace byl studován vliv koncentrace NH_4OH na rozlišení separace KAT při konstantní koncentraci PFOA. Byla připravena řada separačních elektrolytů obsahujících 100 mM PFOA a NH_4OH o koncentracích 100 – 250 mM (vždy zvýšených o 50 mM).

PFOA tvoří micely, které jsou záporně nabitě a jejich efektivní elektroforetická mobilita je tedy opačná k mobilitě EOF. Koncentrace NH_4OH v rozmezí 100 – 150 mM byla nedostačující, neboť pH separačního elektrolytu generoval nedostatečně rychlý EOF nutný pro MEKC separaci KAT při normální polaritě. Naopak při koncentraci 250 mM

NH₄OH byla rychlost pohybu EOF příliš vysoká a docházelo díky tomu ke ztrátě rozlišení jednotlivých analytů. Zároveň také opět docházelo ke generování neúměrně vysokého separačního proudu. Pro transfer vyvinuté CE-DAD metody byl tedy zvolen separační elektrolyt o 100 mM koncentraci PFOA a 200 mM koncentraci NH₄OH.

Z uvedených výsledků plyne, že elektrolyt na bázi PFOA/NH₄OH umožňuje uskutečnit separaci studovaných KAT s využitím mechanismu MEKC. PFOA, případně další soli PFOA (Li⁺, Na⁺, K⁺ či NH₄⁺) mají hodnotu CMC v rozmezí 2,8 až 10,6 mmol/l [27]. Uvedené hodnoty CMC jsou tedy výrazně nižší než je celková koncentrace PFOA v použitých elektrolytech. Navíc se dá předpokládat, že díky vysoké iontové síle separačního elektrolytu bude aktuální hodnota CMC ještě nižší než uvedené publikované hodnoty. PFOA je ve směsi s NH₄OH plně disociovaná, takže v tomto případě PFOA tvoří negativně nabitě micely. Studované KAT v tomto případě nesou částečně kladný náboj (pK_a je v rozmezí 7,1 až 8,5), takže separace KAT probíhá jak na základě chromatografického mechanismu (rozdělování KAT mezi micely PFOA a okolní elektrolyt), tak na základě elektroforetického mechanismu (vlastní migrace částečně protonizovaných studovaných KAT). Jejich výsledné retenční pořadí tedy odráží jak vlastní rozdělování KAT mezi micely PFOA a vodný elektrolyt tak jejich vlastní elektroforetickou migraci.

6.5.2 Separace KAT pomocí MEKC-ESI-MS/MS

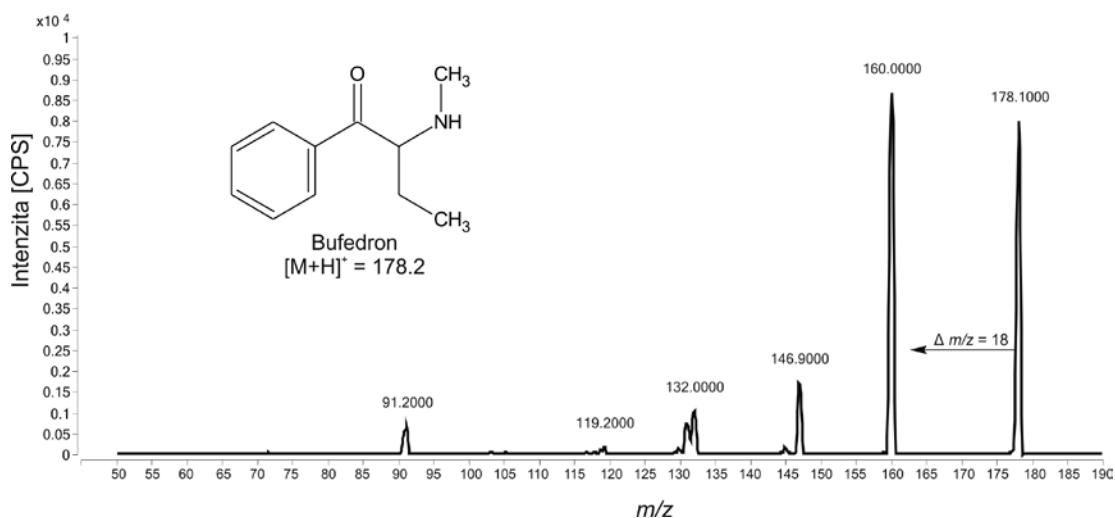
Podmínky separace získané vývojem metody pomocí CE-DAD byly použity pro spojení MEKC s hmotnostní spektrometrií. Vzhledem k charakteru spojení MEKC a ESI-MS/MS však bylo nezbytné upravit některé parametry separace tak, aby mohlo být spojení s MS detekcí realizováno. Především separační kapilára použitá v CE-DAD by byla příliš krátká pro on-line spojení s MS. Z tohoto důvodu byla použita kapilára o celkové délce 90 cm, kdy přibližně 25 % její celkové délky bylo mimo termostatovaný prostor CE instrumentu. Rovněž bylo potřeba upravit i použité separační napětí. Separace KAT byla studována při napětích 15, 18, 20, 22, 25 a 28 kV (normální polarita),

příčemž nejlepších výsledků z hlediska rozlišení a hodnoty protékajícího separačního proudu bylo dosaženo při napětí + 22 kV. Z důvodu delší separační kapiláry bylo rovněž upraveno dávkování vzorku na 100 mbar/8s. Parametry ESI-MS detekce, které byly použity při začátku optimalizace MEKC-ESI-MS/MS metody jsou shrnuty v Tabulce 6.1.

Tabulka 6.1 – Parametry MS detekce

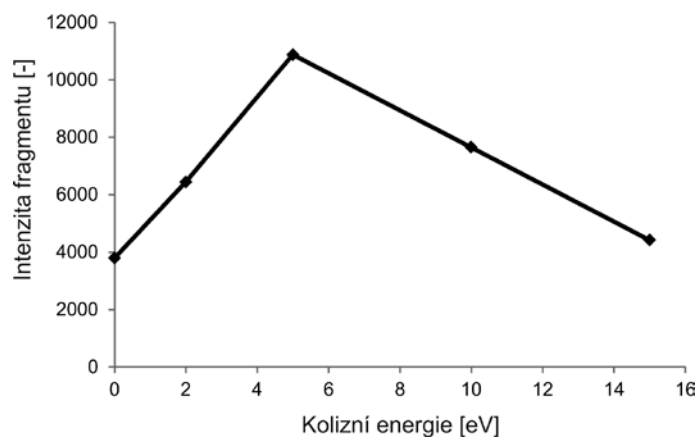
Sprejovací napětí	+ 3,5 kV
Tlak nebulizačního plynu	5 psi (1 psi = 6894.76 Pa)
Průtok nebulizačního plynu	10 l/min
Teplota plynu	185 °C
Průtok pomocné kapaliny	4 µl/min
Složení pomocné kapaliny	MeOH/voda/kyselina mravenčí (50:49,5:0,5; v/v/v)
Detekční mód	SRM

Separované analyty byly detekovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Před samotnou separací bylo tedy nejdříve nutné získat fragmentační spektra jednotlivých KAT a poté optimalizovat vybraný přechod z hlediska použité kolizní energie. Fragmentační spektra byla získána měřením produktových iontů přímým nástřikem standardu dané látky o koncentraci 10 mg/l ve vodě. Při měření byla použita kolizní energie 2, 5, 10 a 15 eV a ze získaných spekter produktových iontů byly vybrány nejintenzivnější fragmentační přechody, jejichž kolizní energie byla dále optimalizována pro účely kvantitativní i kvalitativní analýzy. Příklad fragmentačního spektra bufedronu je uveden na Obr. 6.3.



Obr. 6.3 Fragmentační spektrum bufedronu (kolizní energie 2 eV).

Obdobným způsobem bylo postupováno u všech analyzovaných látek a výsledky, které byly dále používány při měření v MS/MS módu jsou shrnuty v Tabulce 6.2. Příklad závislosti intenzity nejčetnějšího fragmentu bufedronu na kolizní energii je pak zobrazen na Obr. 6.4.



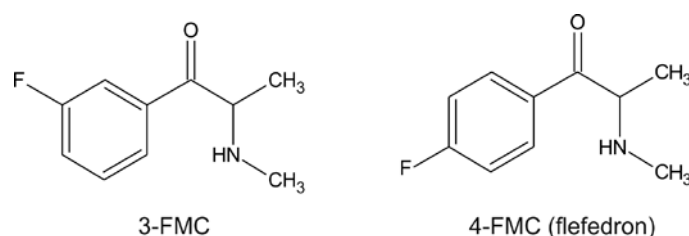
Obr. 6.4 Závislost intenzity nejčetnějšího produktového iontu bufedronu ($m/z = 160$) na kolizní energii.

Tabulka 6.2 – Fragmentační přechody studovaných KAT

Název	M_r	Prekurzorový ion $[M+H]^+$	Produktový ion (m/z) ^a	Kolizní energie [eV]
Kathinon	149,20	150,20	<u>117</u> , 133	15
3-FMC	181,21	182,21	<u>164</u> , 149	15
Efedron	164,21	164,21	<u>146</u> , 131	15
Flefedron	181,21	182,21	<u>164</u> , 149	5
Methylon	207,22	208,22	<u>160</u> , 190	15
Bufedron	177,24	178,24	<u>160</u> , 131, 145, 91	5
Ethylon	221,25	222,25	<u>174</u> , 72, 204	15
Methedron	193,24	194,24	<u>176</u> , 145, 161	5
Mefedron	177,24	178,24	<u>145</u> , 119, 160	15
4-Methylethkathinon	192,27	192,27	<u>174</u> , 119, 146	15
MDPV	275,35	276,35	<u>205</u> , 126, 175	15
Nafyron	281,39	282,39	<u>141</u> , 126, 211	15

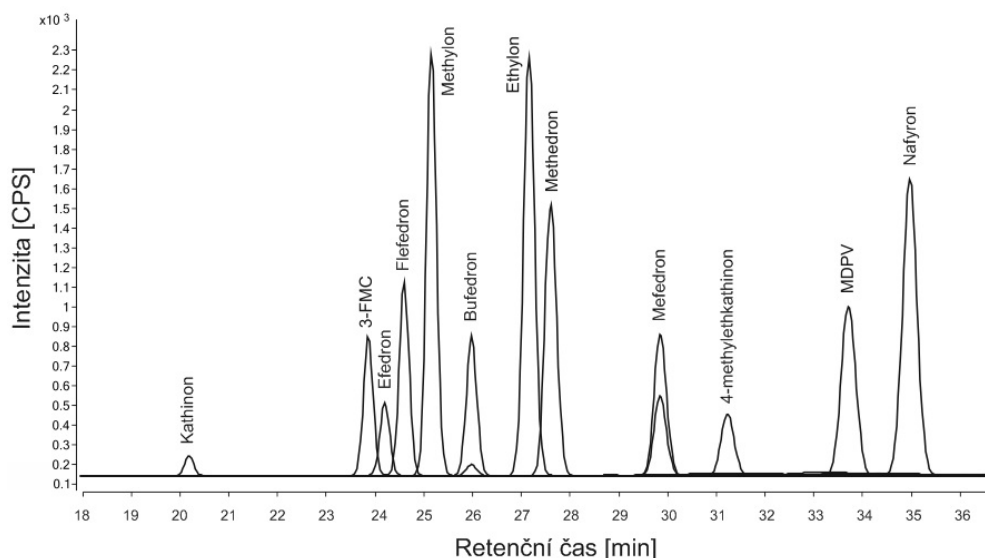
^a Podtržené produktové ionty s nejvyšší intenzitou byly použity pro účely kvantitativní analýzy. Ostatní produktové ionty sloužily k identifikaci analytů.

I přesto, že separace KAT pomocí MEKC vedla k podstatnému zlepšení selektivity a rozlišení, nepodařilo se rozseparovat všechny studované analyty ani s využitím delší separační kapiláry v případě MEKC-ESI-MS. Polohové izomery 3-fluoromethkathinon (3-FMC) a 4-fluoromethkathinon (flefedron, 4-FMC) se liší pouze polohou atomu fluoru na aromatickém kruhu (Obr. 6.5). V použitém separačním elektrolytu (100 mM PFOA ve směsi s 200 mM NH_4OH ve vodě) byla diference jejich efektivních mobilit nulová.



Obr. 6.5 Struktura dvou polohových izomerů 3-FMC a 4-FMC.

Separace ani identifikace obou zmíněných izomerů nebyla možná ani s pomocí MS/MS detekce, neboť obě látky mají izobarickou hmotu. Pro ovlivnění selektivity separace byly studovány přídavky organických modifikátorů separačního elektrolytu (MeOH, ACN, propan-1-ol a propan-2-ol). Všechny modifikátory byly testovány v rozmezí koncentrací od 0,5 do 5 % (*v/v*) (vždy se zvýšením o 0,5 %), avšak kromě propan-2-olu neměl žádný z nich významný vliv na selektivitu separace. Při přídavku ACN a MeOH docházelo pouze k prodlužování celkového času analýzy při zachování totožného rozlišení. Propan-1-ol způsoboval naopak kromě prodloužení analýzy zhoršení selektivity, kdy nedocházelo k separaci ethylonu a methedronu. Naopak propan-2-ol vykazoval již při koncentraci 1 % (*v/v*) zlepšení selektivity zmíněných polohových izomerů při zachování selektivity separace ostatních analytů. Při přídavku 2,5 % (*v/v*) propan-2-olu došlo k úplné separaci všech studovaných KAT, včetně polohových izomerů 3-FMC a 4-FMC. Tento efekt je možné vysvětlit změnou interakce micelární fáze s 3-FMC a 4-FMC popř. efedronu v přítomnosti propan-2-olu. Retenční čas efedronu byl původně nižší než retenční časy 3-FMC a 4-FMC. Po přídavku propan-2-olu došlo ke změně selektivity a tedy i retenčního pořadí. Změna selektivity je dána pravděpodobně kombinací několika faktorů – změna solvatace, viskozity, relativní permitivity, posun disociačních konstant, a další. Chromatogram separace směsi studovaných KAT ve 100 mM PFOA, 200 mM NH₄OH s přídavkem 2,5 % (*v/v*) propan-2-olu je zobrazen na Obr. 7.6. Další zvyšování koncentrace propan-2-olu v separačním elektrolytu již dále neměla výrazný vliv na separaci, pouze docházelo k prodlužování jednotlivých analýz. Pro následnou optimalizaci ESI-MS/MS detekce byl tedy použit separační elektrolyt na bázi 100 mM PFOA, 200 mM NH₄OH s přídavkem 2,5 % (*v/v*) propan-2-olu.



Obr. 6.6 Rekonstruovaný SRM chromatogram separace studovaných KAT.

Podmínky: 100 mM PFOA, 200 mM NH₄OH s přidavkem 2,5 % (v/v) propan-2-olu, U = +22 kV, dávkování 100 mbar/8s, pomocná kapalina MeOH/H₂O/HCOOH (50:49.5:0.5, v/v), průtok pomocné kapaliny 4 µl/min, U_{ESI} = + 3,5 kV, T = 200 °C, 5 psi, 10 l/min.

Ostatní parametry MS detekce byly optimalizovány postupně. Složení pomocné sprejovací kapaliny bylo studováno nejprve pro různé poměry MeOH či propan-2-ol a vody v poměrech 0/100; 25/50; 50/50 a 75/25 (v/v). Obsah MeOH v pomocné sprejovací kapalině menší než 50 % (v/v) vedl ke snížení intenzit signálů studovaných KAT, pravděpodobně v důsledku zhoršení desolvatačního procesu v iontovém zdroji. Vyšší obsah MeOH v pomocné sprejovací kapalině než 50 % (v/v) naopak vedl k tvorbě nestabilního elektrického proudu v iontovém zdroji a také v separační kapiláře, pravděpodobně způsobeným vysokým obsahem organické fáze. Vysoký obsah MeOH vede k nižší vodivosti pomocné sprejovací kapaliny a k nestabilnímu propojení elektrického obvodu mezi CE a ESI-MS nebulizérem. Stejným způsobem byl hodnocen vliv propan-2-olu v pomocné kapalině. V tomto případě došlo k významnému snižování signálu s narůstající koncentrací propan-2-olu. V porovnání s MeOH byl pokles signálu s narůstající koncentrací propan-2-olu v pomocné sprejovací kapalině významnější, a při koncentraci propan-2-olu 50 % (v/v) došlo k úplné ztrátě signálů studovaných KAT. Tuto ztrátu lze vysvětlit na základě suprese ionizace v iontovém zdroji propan-2-olem.

Dále byla optimalizována koncentrace mravenčí kyseliny, která kromě nutné podmínky elektrické vodivosti pomocné sprejovací kapaliny, rovněž přispívá k samotnému procesu ionizace analytů (protonizace) v ESI. Obsah mravenčí kyseliny byl studován v pomocné sprejovací kapalině složené z 50 % MeOH a mravenčí kyseliny o koncentracích 0,1; 0,5 a 1,0 % (v/v), zbytek tvořila vždy voda. Nejlepší citlivosti detekce bylo dosaženo při použití 0,5 % (v/v) mravenčí kyseliny ve směsi MeOH a voda v poměru 50:49,5 (v/v).

V neposlední řadě byl sledován vliv průtoku pomocné sprejovací kapaliny na intenzitu signálu a to v rozsahu 2 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (průtok postupně zvyšován o 2 $\mu\text{l}/\text{min}$). Průtok 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ nebyl pro ionizační proces dostačující a nedocházel k tvorbě stabilního elektrospreje. Naopak průtoky 4 a 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ vedly k dostatečně intenzivnímu signálu. Pouze při průtoku 6 $\mu\text{l}/\text{min}$ docházelo ke zhoršení opakovatelnosti proudu v separační kapiláře. Vyšší průtoky způsobovaly naopak podstatné zhoršení opakovatelnosti ploch jednotlivých studovaných KAT. Jako nejlepší byl tedy zvolen průtok 4 $\mu\text{l}/\text{min}$. Posledními studovanými parametry byly vlivy tlaku a průtoku zmlžujícího plynu a jeho teplota. Závislost tlaku plynu na intenzitě signálu byla studována v rozsahu 5 až 30 psi a průtoku v rozsahu 5 – 30 l/min. Nejvyšší intenzita signálu byla pozorována při tlaku 5 psi a průtoku 10 l/min. Vliv teploty, jakožto důležitého parametru pro desolvataci analytů v iontovém zdroji, byl studován v rozmezí 100 až 300 °C (vždy zvýšením o 25 °C). Nízké teploty pod 150 °C poskytovaly velmi slabou intenzitu signálu. Podobný efekt způsobovaly teploty vyšší než 200 °C, při nichž pravděpodobně docházelo k fragmentaci iontů analytů přímo ve zdroji (tzv. *in-source decay*). Nejvyšší intenzity signálu bylo dosaženo při teplotě 185 °C. Sprejovací napětí bylo studováno v rozmezí +2,0 až +4,5 kV, přičemž nízké hodnoty napětí nebyly dostačující pro tvorbu stabilního elektrospreje. Hodnoty vyšší než +4 kV pak vedly k nestabilnímu sprejovacímu proudu v iontovém zdroji. Nejvhodnější hodnota sprejovacího napětí pak byla +3,5 kV.

6.6 Částečná validace metody

Vyvinutá MEKC-ESI-MS/MS metoda byla částečně validována pro potřeby potenciální aplikace ve forenzní či klinické toxikologii. Vzhledem k tomu, že očekávané koncentrační hladiny studovaných KAT v moči jsou velice nízké (řádově desítky až stovky ng/ml) je nutné před vlastní MEKC-ESI-MS/MS analýzu zařadit prekoncentrační krok – v tomto případě extrakci pevnou fází (SPE). Moč jako biologický materiál byl zvolen z důvodu jeho rychlé dostupnosti a neinvazivní metodě odběru. Navíc nejsou nutné složité úpravy vzorku, jako by tomu bylo v případě analýzy plné krve či séra.

Hodnocené validační parametry zahrnovaly linearitu metody, správnost, přesnost vyjádřenou jako opakovatelnost retenčních časů a ploch píků jednotlivých analytů, limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), výtěžnost SPE extrakce a matriční efekt. Lineární dynamický rozsah a kalibrační závislosti byly testovány na koncentračních hladinách 10 – 5000 ng/ml (6 koncentračních hladin), přičemž každý kalibrační bod byl měřen pětkrát. Příslušné rovnice kalibračních křivek a jejich korelační koeficienty byly vypočítány pomocí metody nejmenších čtverců. LOD a LOQ byly vypočítány z rovnic kalibračních křivek pomocí statistického softwaru QC.Expert 3.3 (TriloByte, Pardubice) s použitím metodologie dle ISO (ISO 11843-2:2000) [29]. Obvyklá metoda výpočtu LOD a LOQ založená na poměru signálu k šumu základní linie nebyla pro případ detekce pomocí SRM módu vhodná, neboť ze samotné podstaty selektivního měření byl šum základní linie zanedbatelný [17]. Rovnice kalibračních závislostí, korelační koeficienty a hodnoty LOD a LOQ po SPE extrakci pro jednotlivé studované KAT jsou uvedeny v Tabulce 6.3. Přesnost vyvinuté metody byla vyjádřena jako procentuální výtěžnost mezi měřenou a teoretickou hodnotou koncentrace jednotlivých KAT ($n = 5$). Správnost (*intra-day* a *inter-day*) byla vyjádřena jako hodnota opakovatelnosti výtěžnosti pro pět opakovaných měření v jednom dni pro vybranou koncentrační hladinu (*intra-day*) a pro jednotlivá opakovaná měření v pěti po sobě jdoucích dnech (*intra-day*).

Tabulka 6.3 – Validační parametry vyvinuté metody (část 1).

Analyt	Regresní křivka ($y = ax + b$)		Korelační koeficient	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/mL]
	Směrnice	Posunutí			
	Kathinon	145,52			
Efedron	492,05	109,44	0,9922	37	55
Bufedron	942,26	278,08	0,9859	49	73
Mefedron	1502,90	475,18	0,9867	19	26
3-FMC	831,46	159,06	0,9932	10	13
Flefedron	1155,20	226,02	0,9933	30	43
4-methylethkathinon	776,25	241,25	0,9897	43	63
Methedron	624,12	173,28	0,9815	16	23
Methylon	2082,20	229,68	0,9920	64	86
Ethylon	1981,20	369,94	0,9880	78	106
MDPV	1348,60	331,50	0,9875	12	26
Nafyron	2529,30	316,55	0,9956	47	64

Pro zjištění matričního efektu byla provedena SPE extrakce vzorků moči bez obsahu studovaných látek a poté byly tyto extrakty fortifikovány všemi studovanými KAT na koncentrační hladiny 120, 250 a 500 ng/ml. Takto připravené vzorky byly analyzovány vyvinutou metodou a výsledné plochy píků byly porovnány s plochami píků získaných při analýze čistých standardů o stejných koncentracích. Relativní matriční efekt byl pro všechny studované KAT menší než 12 %.

Výtěžnost SPE extrakce byla počítána z porovnání ploch pro jednotlivé studované KAT po SPE extrakci a ploch pro jednotlivé studované KAT před SPE extrakci na stejné koncentrační hladině (300 ng/ml). Hodnoty výtěžností jsou spolu s dalším validačními parametry, jako je správnost, přesnost a opakovatelnosti retenčních časů studovaných KAT uvedeny v Tabulce 6.4.

Tabulka 6.4 - Validační parametry vyvinuté metody (část 2.)

Analyt	t _R [min]	t _R RSD [%]	Výtěžnost [%] ^a	Výtěžnost [%] ^b	Správnost [%] ^c	Intra-day RSD [%] ^d	Inter-day RSD [%] ^c
Kathinon	19,02 ± 0,33	1,71	77,5 ± 5,3	84,4 ± 1,9	92	2,3	4,7
3-FMC	22,43 ± 0,38	1,68	34,0 ± 11,0	56,3 ± 5,7	95	2,2	4,7
Efedron	22,81 ± 0,41	1,79	85,5 ± 13,9	97,6 ± 12,8	101	1,6	6,1
Flefedron	23,14 ± 0,40	1,73	63,2 ± 11,0	83,9 ± 10,5	92	3,1	6,8
Methylon	23,68 ± 0,43	1,80	87,0 ± 6,8	99,7 ± 10,2	100	3,1	5,3
Bufedron	24,42 ± 0,41	1,67	65,0 ± 7,8	77,4 ± 11,7	93	3,1	5,8
Ethylon	25,49 ± 0,41	1,63	84,3 ± 9,5	92,3 ± 6,0	99	2,7	6,1
Methedron	25,89 ± 0,44	1,70	137,0 ± 11,0	153,3 ± 8,2	94	3,3	4,1
Mefedron	27,79 ± 0,43	1,55	84,4 ± 1,9	110,6 ± 7,8	92	3,1	5,3
4-Methylethkathinon	28,92 ± 0,41	1,42	126,4 ± 13,0	144,6 ± 4,8	99	3,0	3,8
MDPV	30,89 ± 0,31	1,00	39,5 ± 2,00	37,6 ± 1,0	96	3,2	5,2
Nafyron	31,89 ± 0,29	0,91	25,5 ± 6,40	28,7 ± 0,8	97	2,8	4,6

^a Hodnoty výtěžnosti byly stanoveny na koncentrační hladině 300 ng/ml přímým srovnáním ploch píků po extrakci moči a ploch píků standardů.

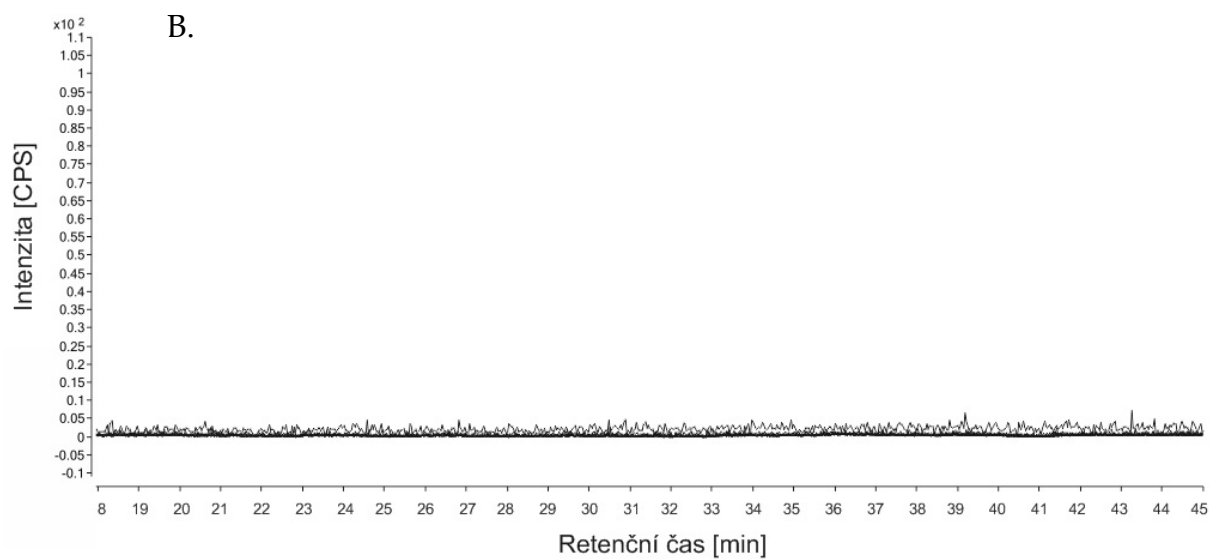
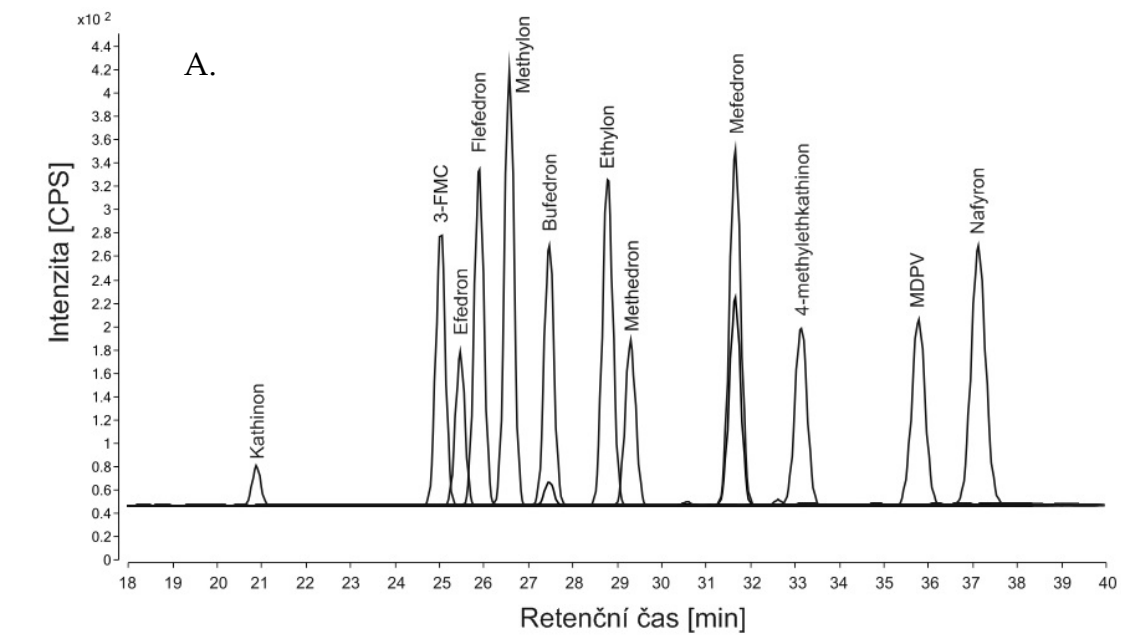
^b Hodnoty výtěžnosti byly stanoveny na koncentrační hladině 300 ng/ml přímým srovnáním ploch píků po extrakci z vody a ploch píků standardů.

^c $n = 5$

^d $n = 25$

6.7 Aplikace vyvinuté metody na modelový vzorek moči

Vyvinutá MEKC-ESI-MS/MS metoda extrakce, separace, identifikace a kvantifikace studovaných KAT byl aplikována na analýzu modelového spikovaného vzorku moči. Skutečný reálný vzorek nebyl v době publikace vyvinuté metody dostupný. S využitím popsaného SPE extrakčního postupu byla provedena analýza slepého vzorku moči a spikované moči. Chromatogramy slepého i spikovaného vzorku moči jsou zobrazeny na Obr. 6.7.



Obr. 6.7 Rekonstruované MRM chromatogramy MEKC-ESI-MS/MS analýzy slepého vzorku moči (A.) a spikovaného vzorku moči (B.) na koncentrační úrovni 300 ng/ml po SPE extrakci.

6.8 Závěr

Prezentovaná metoda MEKC-ESI-MS/MS separace dvanácti KAT, látek spadajících do oblasti NSD, byla aplikována na analýzu spikovaného vzorku moči pro demonstraci potenciální využitelnosti metody pro forenzní a klinicko-toxikologické účely. PFOA byla využita jako micelární složka pracovního elektrolytu, takže separace studovaných KAT probíhala s pomocí mechanismu MEKC. Využitím PFOA pro separace KAT byla vyřešena nedostatečná selektivita CZE separace KAT s použitím těkavých elektrolytů na bázi mravenčanu či octanu amonného. PFOA tvoří při použité koncentraci (100 mM) negativně nabitě micely, které svými vlastnostmi nahrazují netěkavé tenzidy (zejména SDS), které pro spojení MEKC-ESI-MS/MS bez využití metody PFT nejsou vhodné. Kontinuální elektrolytový systém, kdy je složení pracovního elektrolytu stejné ve vstupní (inlet) vialce i v celé separační kapiláře je experimentálně nenáročný a vhodný pro screeningové analýzy. PFOA jakožto těkavý tenzid nezpůsobuje významné potlačení odezvy detekovaných KAT ani kontaminaci iontového zdroje. Využití MS/MS pak umožňuje spolehlivou identifikaci jednotlivých KAT v biologickém materiálu. Dosažené hodnoty LOD po SPE extrakci KAT z moči jsou srovnatelné s publikovanými metodám GC-MS analýzy KAT, kdy je ovšem nutná derivatizace.

Metodu lze samozřejmě využít i pro separaci a identifikaci KAT v zachycených vzorcích (tablety, prášky, psaníčka, apod.) distribuovaných drog na drogové scéně stejně tak i jiných typech biologického materiálu.

6.9 Literatura

- [1] Mravčík V. (ed.), Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2013, Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti, Úřad vlády ČR, Praha, 2013.
- [2] Mravčík V. (ed.), Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2014, Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti, Úřad vlády ČR, Praha, 2014.
- [3] Herzog A., Vejrych T., Richter J., Nové psychoaktivní látky v České republice - výsledky výzkumu, Sanimum, Praha, 2015.
- [4] Henderson G.L., *J. Forensic Sci.* 33 (1998) 569-575.
- [5] Carroll F.I., Lewin S.W., Mascarella H.H., Seltzmann P.A., Reddy N.M., *Ann N.Y., Acad. Sci.* 1248 (2012) 18.
- [6] Cappola M., Mondola R., *Toxicol. Lett.* 211 (2014) 144-149.
- [7] Kelly J.P., *Drug Testing and Analysis* 3 (2011) 439-453.
- [8] Carvalho M., Carmo H., Costa V.M., Capela J.P., Pontes H., Remiao F., Carvalho M., de Lourdes Bastos M., *Arch. Toxicol.* 86 (2012) 1176-1231.
- [9] Prosser J.M., Nelson L.S., *J. Med. Toxicol.* 86 (2013) 33-42.
- [10] Valente M.J., Guedes de Pinho P., de Lourdes Bastos M., Carvalho F., Carvalho M., *Arch. Toxicol.* 88 (2014) 15-45.
- [11] Kraemer T., Maurer H.H., *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 163-187.
- [12] Uralets V., Rana S., Ross W., *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 233-241.
- [13] Marešová V., Chadt J., Přikryl L., *Neuroendocrinology Lett.* 27 (suppl. 2) (2006) 121-124.
- [14] Sorensen L.K., *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 727-736.
- [15] Wohlfarth A., Weinmann W., Dresen S., *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2403-2414.
- [16] Zuba D., *TrAc – Trends in Anal. Chem.* 32 (2012) 15-30.

- [17] Swortwood M.J., Boland D.M., deCaprio A.P., *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1383-1397.
- [18] Shima N., Katagaki M., Kamata H., Matsuta S., Nakanishi K., Zaitso K., Kamata T., *Xenobiotica* 36 (2006) 709-723.
- [19] Power J.D., McDermott S.D., Talbot B., O'Brian J.E., Kavangh P., *Rapid. Comm. Mass Spec.* 22 (2012) 2601-2611.
- [20] Meyrer M.R., Peters F.T., *Therap. Drug. Monit.* 34 (2012) 615-621.
- [21] Nic Daeid N., Savage K.A., Ramsay D., Holland C., Sutcliffe O.B., *Science and Justice* 54 (2014) 22-31.
- [22] Meyrer M.R., Prosser D., Maurere H.H., *Drug Testing and Analysis* 5 (2013) 259-265.
- [23] Martin M., Muller J.F., Turner K., Duez M., Cirimele V., *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 44-48.
- [24] Lurle I.S., Klein R.F.X., Dal Cason T.A., LeBelle M.J., Brenneisen R., Weinberger R.E., *Anal. Chem.* 66 (1994) 4019-4026.
- [25] Fanali S., *J. Chromatogr. A* 735 (1996) 77-121.
- [26] Mohr S., Pilaj S., Chmid M.G., *Electrophoresis* 33 (2012) 1624-1630.
- [27] Petterson P., Jorntén-Karlsson M., Stalebro M., *Electrophoresis* 24 (2003) 999-1007.
- [28] Van Biesen G., Bottaro C.S., *Electrophoresis* 27 (2006) 4456-4468.
- [citace 30 z článku] str. 81 =
- [29] ISO 11843-2:2000: Capability of Detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case, International Organization for Standardization, 2007.

7. Objektivní diagnostika intoxikace vybranými SC pomocí MEKC-ESI-MS/MS

Výsledky shrnuty v této části práce, byly publikovány v následujícím článku: Švidrnoch M., Příbylka A., Maier V.: *Determination of selected synthetic cannabinoids and their metabolites by micellar electrokinetic chromatography – mass spectrometry employing perfluoroheptanoic acid-based micellar phase*. Talanta 150 (2016) 568-576.

7.1 Syntetické kanabinoidy a jejich vlastnosti

Syntetické kanabinoidy (SC) jsou další z rozšiřujících se skupin syntetických halucinogenů, které ačkoli mají podobné fyziologické účinky na organismus, jsou strukturně zcela odlišné od přírodních kanabinoidů [1]. Značné množství dodnes popsaných SC, z nichž řada je strukturně podobných, stěžuje jejich identifikaci při toxikologické a forenzní analýze. Do jisté míry neprostudovaný metabolismus a farmakokinetika některých SC navíc komplikují interpretaci získaných dat.

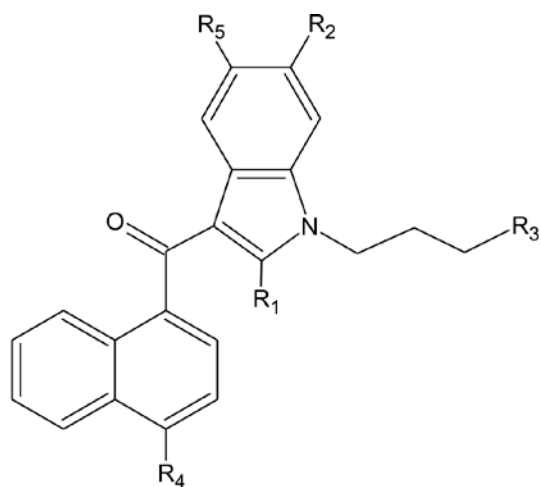
SC jsou nejčastěji zneužívány inhalačně, tedy kouřením sušených bylin s uměle přidanými SC v relativně nízkých koncentracích, tudíž i koncentrace SC a jejich metabolitů v biologických tekutinách bývají velmi nízké. Po inhalaci SC dochází k různým fyziologickým projevům, které zahrnují zejména nevolnost, zvracení, rozostřené vidění, ataxie (porucha koordinace pohybů), třes, zmatenost, podrážděnost, paranoia, halucinace, mydriáza, hypertenze či tachykardie. Do současné doby bylo publikováno několik případových studií, které dokumentují účinky SC na lidský organismus [2-6].

SC jsou metabolizovány ve značné míře a rovněž řada jejich metabolitů vykazuje sekundární fyziologickou aktivitu. Řada metabolických procesů a odpovídající metabolity nejsou u velké části SC stále popsány. Existuje několik prací, které se zabývaly studiem vybraných SC v lidském organismu [7-9]. Objektivní diagnostika intoxikací vyvolanými zneužíváním SC je v běžných toxikologických a klinických laboratořích téměř nemožná, protože dosud neexistují rutinní metody pro screening SC a jejich metabolitů v biologickém materiálu. Vývoj analyticko-toxikologických metod v této oblasti je tedy velmi aktuálním tématem. Jeden z možných přístupů pro

screening SC v biologickém materiálu je využití vysoce účinných separačních metod spojených s hmotnostní spektrometrií. Kromě účinné a selektivní separace SC je totiž nutno také klást důraz na jejich spolehlivou identifikaci a citlivou detekci.

Cílem této práce bylo vyvinout jednoduchou metodu pro separaci, identifikaci a kvantifikaci vybraných SC a jejich metabolitů pomocí MEKC-ESI-MS/MS bez experimentálních omezení (zejména bez nutnosti využít PFT) ve vzorcích krevního séra a moči.

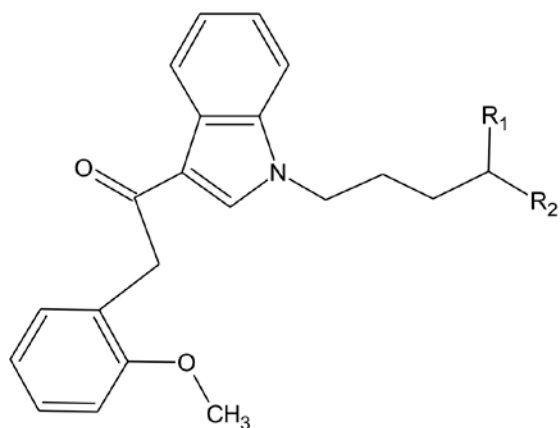
Studované SC a jejich metabolity, které byly předmětem této části dizertační práce, jsou schematicky zobrazeny na Obr. 7.1.



JWH-018, 019, 073 a jejich metabolity

Název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
JWH-018	H	H	Et	H	H
JWH-018 2-hydroxyindol metabolit	OH	H	Et	H	H
JWH-018 6-hydroxyindol metabolit	H	OH	Et	H	H
JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) metabolit	H	H	CH ₂ -OH-CH ₂	H	H
JWH-018 N-pentanová kyselina metabolit	H	H	CH ₂ -COOH	H	H
JWH 019 5-hydroxyindol metabolit	H	H	Pr	H	OH
JWH 019 N-(6-hydroxyhexyl) metabolit	H	H	PrOH	H	H
JWH-073	H	H	Me	H	H
JWH-073 5-hydroxyindol metabolit	H	H	Me	H	H
JWH-073 6-hydroxyindol metabolit	H	OH	Me	H	H

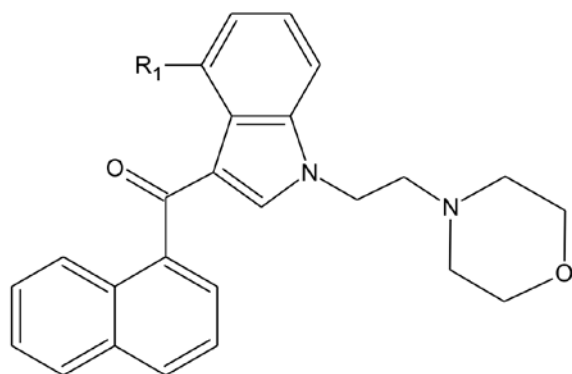
Zkratky: OH - hydroxyl; Me - methyl; Et - ethyl; Pr - propyl;
PrOH - hydroxypropyl; COOH - karboxyl



JWH-250 and jeho metabolity

Název	R ₁	R ₂
JWH-250	H	Me
JWH-250 N-(5-karboxypentyl) metabolit	H	COOH
JWH-250 N-(5-hydroxypentyl) metabolit	OH	Me

Zkratky: OH - hydroxyl; Me - methyl; COOH - karboxyl



JWH-210 a jeho metabolit

Název	R ₁
JWH-200	H
JWH-200 4-hydroxyindol metabolit	OH

Zkratka: OH - hydroxyl

Obr. 7.1 Schéma chemických struktur studovaných SC a jejich metabolitů.

Z Obr. 7.1 plyne strukturní příbuznost jednotlivých studovaných SC (aminoalkylindoly a fenylacetylindoly) a jejich metabolitů. Pozornost si zaslouží také jejich specifické označování. Obecně jsou SC označovány podle autora jejich syntézy (např. JWH – John W. Huffman, Clemsonova Univerzita), či podle místa původu (např. HU – Hebrew University). V současnosti jsou popsány více než dvě stovky SC a jejich metabolitů.

7.2 Současné metody analýzy SC v biologickém materiálu

Mezi nejčastěji používané metody separace a identifikace SC a jejich metabolitů v biologickém materiálu (zejména v moči) patří LC a GC s MS detekcí. Nedávno byly publikovány dvě přehledové práce, zabývající se jak chemickými vlastnostmi SC, tak i kritickým zhodnocením dosud použitých analytických technik pro jejich analýzu [10,11].

Obecně lze říci, že mezi nejvyužívanější separační mód pro analýzu SC s pomocí LC-MS patří separace na reverzních stacionárních fázích, kdy jako stacionární fáze slouží kolony se sorbentem s navázanými alifatickými řetízky C8 a C18. Jako ionizační technika je využívána především ESI nebo APCI [12-14]. Vzhledem k extenzivní metabolizaci je objektivní diagnostika intoxikace SC obtížná, protože je často nemožné identifikovat či stanovit původní SC a diagnostika se tak opírá pouze o nalezené metabolity [15,16]. Scheidweiler a kol. [17] publikoval práci, zabývající se kvantifikací dvaceti SC a jednadvaceti metabolitů a současně semikvantifikací dvanácti hydroxyalkyl metabolitů v moči pomocí LC-MS/MS.

Dále pak Sobolevski a kol. provedly identifikaci dvou majoritních metabolitů JWH-018 pomocí GC-MS a LC-MS metod [18]. I přes fakt, že GC je ve forenzní a klinické toxikologii velmi často využívanou metodou, v případě analýzy SC je její použití komplikováno nutností derivatizace. Nejčastějším typem derivatizace SC je silylace, kdy vznikají dostatečně těkavé deriváty navíc s příznivou retencí, které lze pomocí GC-MS stanovit s dostatečnou selektivitou a citlivostí [19,20].

Málo polární charakter většiny SC (zejména se jedná o obtížně ionizovatelné SC jako původní látky) neumožňuje separaci pomocí CZE (na základě jejich efektivních mobilit). Naproti tomu MEKC separaci SC umožňuje, jak bylo popsáno v několika pracích. Gottardo a kol. publikoval metodu MEKC separace SC v rostlinné matrici s použitím UV detekce [21]. V tomto případě byl jako separační elektrolyt použit borát sodný o pH 8,0 s přídavkem 30 mM SDS a 20 % (v/v) propan-1-olu. Vyvinutá metoda byla aplikována na separaci dvanácti SC, přičemž byly zároveň experimentálně zjištěny hodnoty rozdělovacích koeficientů ($P_{o/w}$). Tyto hodnoty (vyjádřené jako $\log P_{o/w}$) jsou důležitým parametrem při hodnocení hydrofobicity a dalších farmakologických aspektů (biologická dostupnost, absorpce, lipofilita aj.). Další práce využívající MEKC-ESI-MS/MS, která byla doposud publikována, se zabývá separací rovněž dvanácti SC ve vzorcích rostlinné směsi určené k ilegální distribuci. V této metodě byl jako micelární fáze použit 50 mM perfluorooktanoát ve 20 % (v/v) směsi ACN/voda o zdánlivém pH 9,0 [22]. Do současné doby však nebyla publikována žádná práce, která by se zabývala separací a stanovením SC a jejich příslušných metabolitů v biologickém materiálu pomocí elektromigračních technik. I když některé metabolity SC (zejména metabolity nesoucí karboxylovou skupinu) mohou při vyšších pH disociovat a mají tedy vlastní elektroforetickou mobilitu, většinu SC nelze na základě rozdílů elektroforetických mobilit – tedy s využitím CZE separovat. Použití MEKC je v tomto případě podpořeno fyzikálně-chemickými vlastnostmi SC, avšak např. běžně využívaný tenzid SDS není s ESI ionizací kompatibilní. I v tomto případě lze tedy využít spojení MEKC-ESI-MS/MS s použitím těkavého perfluorovaného tenzidu jako micelární složky separačního elektrolytu.

7.3 Experimentální část

7.3.1 Použité chemikálie a materiál

Certifikované referenční standardy následujících SC a jejich metabolitů byly zakoupeny u firmy Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA): JWH-018, JWH-018 2-hydroxyindol metabolit (JWH-018-2-OH), JWH-018 6-hydroxyindol metabolit (JWH-018-6-OH), JWH-018 *N*-(4-hydroxypentyl) metabolit (JWH-018-*N*-4-OH), JWH-018 *N*-pentanová kyselina (JWH-018-*N*-COOH), JWH-019 5-hydroxyindol metabolit (JWH-019-5-OH), JWH-019 *N*-(6-hydroxyhexyl) metabolit (JWH-019-6-OH), JWH 073 2-hydroxyindol metabolit (JWH-073-2-OH), JWH-073 5-hydroxyindol metabolit (JWH-073-5-OH), JWH-073 6-hydroxyindol metabolit (JWH-073-6-OH), JWH-200, JWH-200 4-hydroxyindol metabolit (JWH-200-4-OH), JWH-250, JWH-250 *N*-(5-karboxypentyl) metabolit (JWH-250-5-COOH), JWH-250 *N*-(5-hydroxypentyl) metabolit (JWH-250-5-OH) a 1-*nor*-9-karboxy- Δ -9-tetrahydrocannabinol (11-*nor*-9-karboxy-THC). Uvedené standardy byly dodány jako roztoky o koncentraci 1,0 mg/ml v MeOH. Methanol (pro LC-MS) a chlorovodíková kyselina (HCl; 37 %, *w/w*) byly zakoupeny od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Octová kyselina (≥ 99 %, *w/w*), mravenčí kyselina (≥ 95 %, *w/w*), hydroxid amonný (NH₄OH; 25 %, *w/w*), perfluorooktanová kyselina (PFOA, 96 %), perfluoroheptanová kyselina (PFHA, 99 %), 1,0 M roztok hydroxidu sodného (NaOH), propan-2-ol, acetonitril (ACN, obojí pro LC-MS), *tert*-buthyl(methyl)ether (bezvodý, 99,8 %) byly dodány společností Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Deionizovaná voda (18 M Ω .cm) byla připravena purifikačním systémem Millipore (Molsheim, Francie). Není-li výše uvedeno jinak, všechny chemikálie byly analytické kvality nebo vyšší.

Pro SPE extrakci byly studovány dva druhy kolonek: C18 (Speed SPE 500 mg/3ml, 18 % C; Applied Separations, Allentown, PA, USA) a C8 (Supelclean™ LC-8 SPE, 500 mg/3ml, 7 % C; Sigma-Aldrich). Vakuový extraktor Supelco pocházel rovněž od firmy Sigma-Aldrich. Křemenné separační kapiláry o vnitřním průměru 50 μ m a vnějším průměru 375 μ m byly zakoupeny u firmy MicroSolv (Eatontown, NJ, USA).

7.3.2 Instrumentace

Všechny analýzy byly prováděny pomocí kapilární elektroforézy Agilent 7100 (Agilent, Waldbronn, Německo), která byla on-line spojená s hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 s trojitým kvadrupólovým analyzátozem. Pomocná sprejovací kapalina byla přiváděna isokratickou LC pumpou Agilent 1260 a před vstupem do nebulizéru, byla dělena děličem toku v poměru 1:100. Separační kapilára byla z důvodu krátké délky (70 cm) vedena mimo DAD detektor a byla termostatována na teplotu 25 °C (kromě přibližně 25 % její délky, která byla mimo termostatovaný prostor CE instrumentu).

Separační kapilára byla před použitím nejdříve promyta 15 minut 1 M roztokem NaOH, poté 15 minut kondicionována deionizovanou vodou a nakonec 15 minut promývána studovaným separačním elektrolytem.

Dávkování vzorků bylo hydrodynamické 50 mbar/8s. Mezi jednotlivými analýzami pak byla kapilára vždy promyta separačním elektrolytem po dobu 5 minut.

7.3.3 Příprava standardů

Z důvodu separační optimalizace MEKC separace a ESI-MS/MS detekce byly připraveny dvě sady standardů. První sada zahrnovala celou studovanou řadu SC včetně metabolitů, které byly připraveny z koncentrovaných certifikovaných standardů ředěním na výslednou koncentraci 50 µg/ml směsí MeOH/voda (50:50, v/v). Každý analyt byl takto připraven zvlášť a tato sada individuálních standardů sloužila k získání informací pro ESI-MS/MS detekci, zejména pak fragmentačních spekter.

Druhá sada sestávala ze směšného standardu o koncentraci 100 µg/ml a byla připravena obdobným způsobem. Potřebné nižší koncentrace byly připravovány postupným ředěním a veškeré standardní roztoky byly skladovány při teplotě -20 °C.

7.3.4 Příprava separačních elektrolytů

Studované separační elektrolyty je možné rozdělit do dvou skupin. Jedna skupina sloužila k empirickému studiu elektroforetického chování SC v elektrolytech bez tenzidu, druhá skupina pak zahrnovala separační elektrolyty obsahující těkavé perfluorované tenzidy:

- (i) 50 mM octan amonný byl připraven rozpuštěním příslušného množství octové kyseliny v deionizované vodě a následnou titrací na zvolené pH (3,0 až 9,5; vždy lišící se o 0,5 jednotky).
- (ii) Separační elektrolyty pro MEKC byly připraveny obdobným způsobem jako v kapitole 6.4.3. Byly testovány elektrolyty na bázi jak PFOA, tak PFHA. Elektrolyty byly připraveny navážením potřebného množství PFOA či PFHA do plastové mikrozkušavky a následně byl přidán NH_4OH . Obsah mikrozkušavky byl poté promíchán na vibrační míchačce 1 minutu, doplněn vodou do 2 ml a posléze byla mikrozkušavka umístěna do ultrazvukové lázně a ultrazvukována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Pokud byl studován vliv organického rozpouštědla, bylo množství vody upraveno tak, aby výsledný objem byl po přidání organického rozpouštědla totožný.

Připravené separační elektrolyty byly uchovávány v ledničce při +4 °C.

7.3.5 Příprava vzorků

Vzorky moči byly získány od osmi zdravých osob různého věku a pohlaví. Krevní sérum, u kterého byla výrobcem deklarována nepřítomnost jakýchkoli drog či léčiv (negativní sérum), bylo zakoupeno u firmy Sigma-Aldrich. Před vlastní analýzou byly vzorky moči i séra analyzovány pro potvrzení nepřítomnosti interferujících látek (slepé vzorky). Vzorky pro přípravu kalibračních závislostí byly připraveny v matrici (moč a sérum) na koncentračních hladinách 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150 a 200 ng/ml.

Pro SPE extrakci byla moč spikována všemi SC včetně metabolitů, v případě extrakce z kapaliny do kapaliny (*liquid-liquid extraction*, LLE) byla moč spikována pouze příslušnými metabolity. Sérum bylo pro LLE spikováno pouze původními formami SC, neboť koncentrace původních forem SC je vyšší v krevním séru, naopak v moči je množství původních forem SC zanedbatelné.

7.3.6 SPE extrakce

Pro extrakci bylo použito 2 ml vzorku (slepého i spikovaného), který byl před extrakcí upraven přidávkem 10 μ l koncentrované octové kyseliny, aby byla potlačena disociace karboxylovaných metabolitů SC. Pro extrakci byly vybrány dva typy SPE kolonek - C8 a C18 (specifikace kapitola 7.3.1) a extrakce byly prováděny pomocí manuálního vakuového extraktoru. Postup extrakce byl pro obě studované kolonky následující:

- (i) SPE kolonka byla promyta 3 ml MeOH a 3 ml deionizované vody.
- (ii) 2 ml vzorku bylo nanášeno na kolonku a hodnota vakua byla nastavena tak, aby došlo k pomalému protékání vzorku kolonkou (~ 0,4 ml/min).
- (iii) Poté byla kolonka promyta 3 ml deionizované vody a důkladně vysušena vakuem po dobu 5 minut.
- (iv) Eluce analytů byla provedena 3 ml MeOH.
- (v) Extrakt byl odpařen proudem dusíku při teplotě 50 °C a rekonstituován v desetkrát ředěném separačním elektrolytu (75 mM PFHA/150 mM NH₄OH s přidávkem 10 % (*v/v*) propan-2-olu).

7.3.7 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Pomocí LLE bylo extrahováno 5 ml vzorku moči a krevního séra (v obou případech slepé i spikované vzorky) a extrakce byly prováděny podle následujícího postupu:

- (i) 5 ml vzorku bylo převedeno do 20 ml polypropylenové zkumavky, do níž bylo přidáno 10 ml *tert*-butyl(methyl)etheru (v případě séra sloužila extrakční kapalina rovněž jako deproteinační činidlo).
- (ii) Směs byla po dobu 5 minut vortexována a poté 10 min protřepávána.
- (iii) Poté byla směs centrifugována při 5000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut.
- (iv) Svrchní etherová vrstva byla opatrně převedena pipetou do skleněné vialky a odpařena pod proudem dusíku při teplotě 50 °C. Výsledný extrakt byl opět rekonstituován v desetkrát ředěném separačním elektrolytu.

7.4 Výsledky a diskuze

7.4.1 Měření fragmentačních spekter studovaných SC

Metabolity jednotlivých SC se často liší pouze polohou substituentů na indolovém skeletu, popřípadě na alifatické části vázané na dusík indolu. Díky tomu je obtížně jednotlivé metabolity identifikovat, neboť jejich poměr *m/z* je izobarický. V tomto případě by měření v SIM módu nemělo praktický význam, a bylo nutné přistoupit k detekci pomocí SRM, resp. MRM módu. Jednotlivé studované analyty byly postupně analyzovány pomocí skenu produktových iontů a to přímým nástřikem vzorku o koncentraci 50 µg/ml. Nastavení parametrů MS detekce jsou uvedeny v Tabulce 7.1.

Tabulka 7.1 – Parametry ESI-MS detekce

Sprejovací napětí	+ 3,5 kV
Tlak nebulizačního plynu	5 psi (1 psi = 6894,76 Pa)
Průtok nebulizačního plynu	10 l/min
Teplota plynu	200 °C
Průtok pomocné kapaliny	6 µl/min
Složení pomocné kapaliny	MeOH/voda/mravenčí kyselina (50:49,5:0,5; <i>v/v/v</i>)
Detekční mód	SRM

Při studiu fragmentace byly odečítány intenzity jednotlivých produktových iontů v závislosti na použité kolizní energii, které byly postupně měřeny při hodnotách 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40 eV. Nejvyšších intenzit signálů produktových iontů ve spektru bylo dosaženo při hodnotách kolizní energie 20 – 30 eV. Vyšší hodnoty kolizní energie vedly ke snížení intenzit signálu jednotlivých produktových iontů a rovněž ke zhoršení opakovatelnosti intenzit. Jednotlivé produktové ionty včetně příslušné kolizní energie jsou shrnuty v Tabulce 7.2.

Tabulka 7.2 – Fragmentační přechody studovaných SC a jejich metabolitů

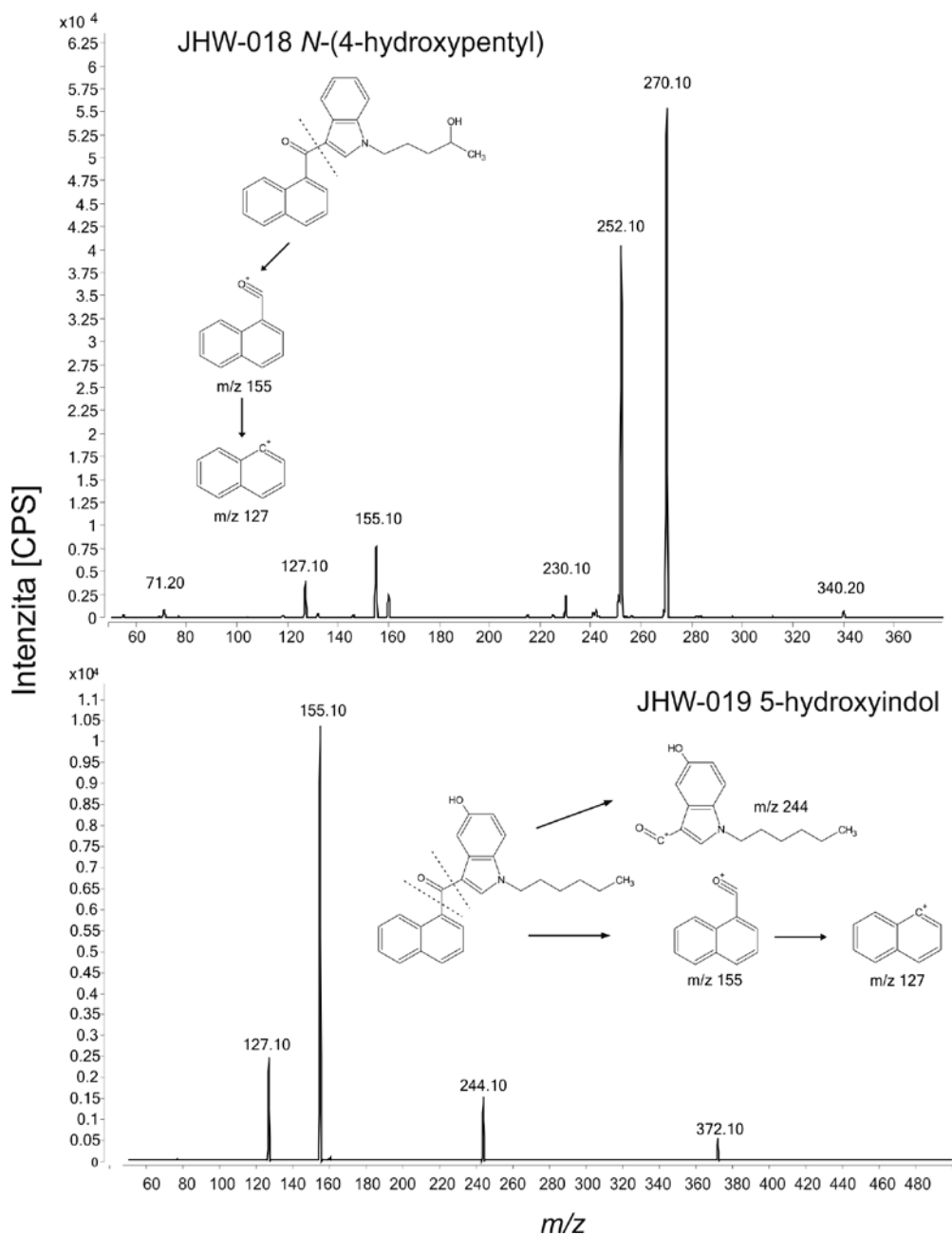
Název	M_r	Precursorový ion (m/z) [M+H] ⁺	Produktové ionty (m/z) ^a	KE ^b [eV]
JWH-250 <i>N</i> -(5-karboxypentyl)	365,42	366,5	<u>121</u> , 91, 55	25
JWH-073 2-hydroxyindol	343,42	344,4	<u>270</u> , 155, 127	30
JWH-018 <i>N</i> -pentanová kyselina	371,43	372,5	<u>155</u> , 127	25
JWH-250 <i>N</i> -(5-hydroxypentyl)	351,44	352,5	<u>121</u> , 216, 91,65	25
JWH-200	384,47	385,5	<u>155</u> , 127, 114, 84	20
JWH-200 4-hydroxyindol	400,47	401,5	<u>155</u> , 127, 114, 70	25
JWH-018 <i>N</i> -(4-hydroxypentyl)	357,44	358,4	155, 340, <u>270</u> , 252	25
JWH-019 <i>N</i> -(6-hydroxyhexyl)	371,47	372,5	<u>155</u> , 127	25
JWH-073 6-hydroxyindol	343,42	344,4	<u>155</u> , 230, 127	25
JWH-073 5-hydroxyindol	343,42	344,4	<u>155</u> , 216, 127	25
JWH-018 6-hydroxyindol	357,44	358,4	<u>155</u> , 230, 127, 77	25
JWH-073	327,42	328,4	<u>155</u> , 200, 127	25
JWH-250	335,44	336,4	<u>121</u> , 200, 144, 91	25
JWH-018	341,45	342,5	<u>155</u> , 214, 127	25
JWH-019 5-hydroxyindol	371,47	372,5	<u>155</u> , 244, 127	25

^a Podtržené produktové ionty s nejvyšší intenzitou byly použity pro účely kvantitativní analýzy. Ostatní produktové ionty sloužily k identifikaci jednotlivých analytů.

^b Kolizní energie.

Z výsledků shrnutých v Tabulce 7.2 je patrné, že většina analytů podléhá fragmentaci za vzniku produktových iontů se stejným poměrem m/z . Tento fakt dále komplikuje objektivní identifikaci SC, kdy je potřeba vzít do úvahy kromě fragmentačního přechodu rovněž ostatní minoritní produktové ionty a nahlížet na výsledky analýzy komplexně ve vztahu k retenčnímu času, resp. elučnímu pořadí. Tento problém by bylo obtížné řešit i pomocí deuterovaných standardů, neboť jejich fragmentační chování by bylo obdobné.

Typické příklady fragmentačních spekter dvou metabolitů SC s naznačením předpokládaných struktur jednotlivých fragmentů jsou uvedeny na Obr. 7.2. Jedná se o MS/MS spektra metabolitu JWH-018 hydroxylovaného na 4. pozici alifatického řetězce a metabolitu JWH-019 hydroxylovaného na 5. pozici indolového skeletu. V případě prvního uvedeného metabolitu měl nejvyšší intenzitu produktový iont o m/z 270, který pravděpodobně odpovídá odštěpení 4-hydroxypentylového řetězce. Další produktový iont o m/z 155 je společný pro většinu studovaných látek a odpovídá ztrátě naftoylového skeletu. Tento produktový iont pak dále podléhá logické ztrátě CO ($\Delta m/z = 28$) za vzniku fragmentu o m/z 127. Uvedená data jsou rovněž v dobré shodě s doposud publikovanými výsledky [23].



Obr. 7.2 Příklady spekter produktových iontů dvou vybraných metabolitů SC.

Výjimku ve spektru produktových iontů tvoří JWH-250 a jeho metabolity, které patří do skupiny fenylacetylindolů u nichž je nejintenzivnější fragmentový iont o m/z 121, který odpovídá odštěpení fenylacetylové skupiny.

Z výše uvedených důvodů je před vlastní MS/MS detekcí žádoucí, aby této detekci předcházela separační krok.

7.4.2 Volba separačního elektrolytu pro separaci SC a jejich metabolitů

Experimenty se zaměřením na elektroforetické chování SC byly nejdříve prováděny pomocí CZE-ESI-MS s využitím těkavých elektrolytů na bázi octanu amonného. Vzhledem k faktu, že acidobazické vlastnosti SC nebyly doposud v žádné práci publikovány, byly testovány elektrolyty v širším rozsahu pH (3,0 – 9,5). Použití těchto elektrolytů však vedlo pouze k částečné separaci metabolitů SC. Původní nemetabolizované formy SC separovány nebyly a migrovali stejným směrem a rychlostí jako EOF. Tento fakt je dán tím, že ve struktuře nemetabolizovaných SC se nenachází žádná funkční skupina schopná nést náboj (protonizovat se či disociovat). Separace jak původních SC, tak i jejich metabolitů na základě rozdílů elektroforetických mobilit nebyla možná.

Ze struktur studovaných metabolitů SC plyne, že některé z nich obsahují jednak disociovatelné karboxylové skupiny a dále fenolické skupiny, které ovšem disociují až v alkalické oblasti. Všechny studované SC a jejich metabolity obsahují dále jedno či více heterocyklických atomů dusíku, které by mohly být protonizovány v kyselém prostředí. Experimentálně bylo však zjištěno, že ve vodném prostředí nedochází k protonizaci heterocyklických atomů dusíku a studované molekuly, tak nemohou nést kladný náboj.

Naproti tomu byla provedena krátká experimentální studie, vedoucí k odhadu zdánlivých disociačních konstant (pK'_a) pro dva metabolity nesoucí karboxylovou skupinu (JWH-250-N-(5-karboxypentyl) metabolit a JWH-073-N-butanová kyselina) a získané zdánlivé disociační konstanty byly srovnány s hodnotou zdánlivé disociační konstanty pro jeden z metabolitů THC (11-nor-9-karboxy-THC).

Ze změřených hodnot efektivních mobilit v závislosti na pH v rozmezí pH 3,0 až 11,0 byly hodnoty zdánlivých disociačních konstant odpovídající karboxylovým skupinám ve strukturách uvedených molekul vypočítány s pomocí volně dostupného programu pK Calcul [24]. Pro studované molekuly byly získány následující hodnoty pK'_a : JWH-250-N-(5-karboxypentyl) metabolit $pK'_a = 4,05$; JWH-073-N-butanová

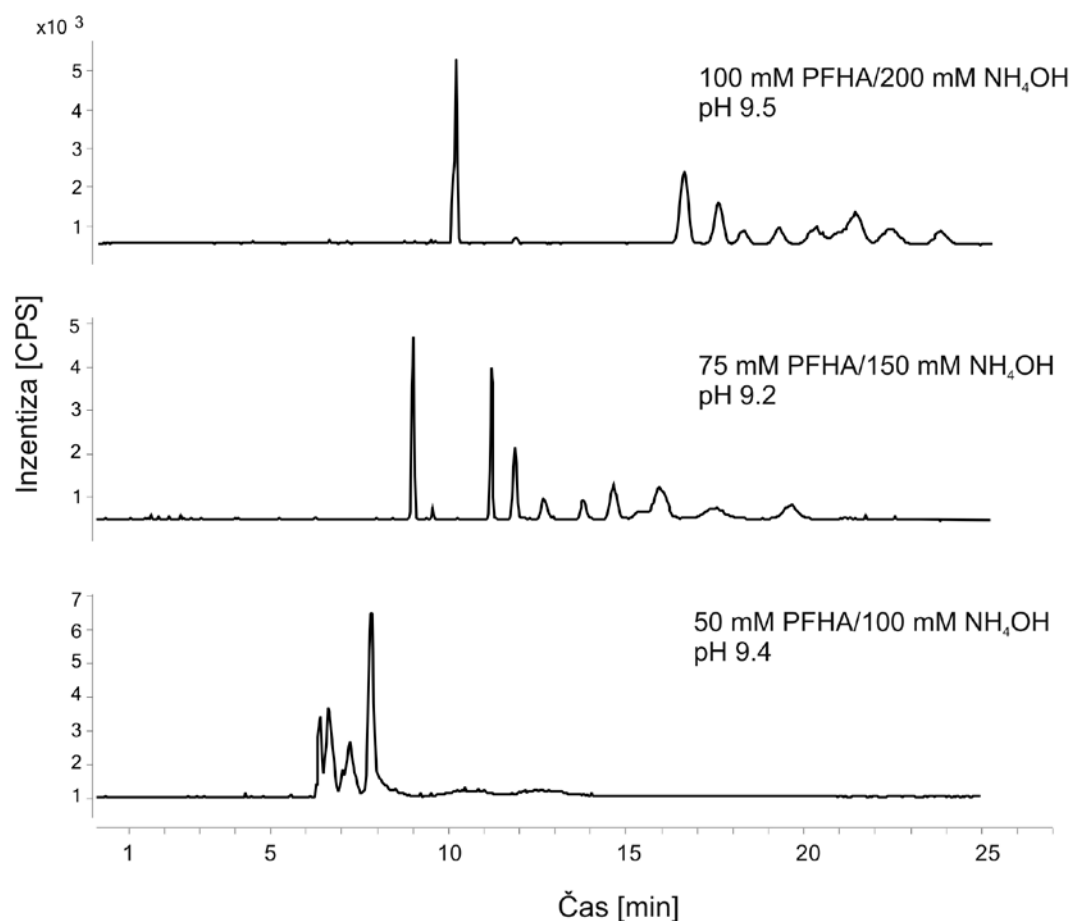
kyselina $pK'_a = 3,41$ a 11-*nor*-9-karboxy-THC $pK'_a = 4,12$. Metabolity SC, které nesou karboxylovou skupinu tedy mohou migrovat jako slabé kyseliny už v mírně kyselém pH separačního elektrolytu.

Vzhledem k tomu, že tedy nebylo dosaženo uspokojivé separace SC a jejich metabolitů s pomocí mechanismu CZE, bylo studováno spojení MEKC s ESI-MS/MS pro jejich separaci, identifikaci a kvantifikaci.

7.4.3 Separace SC a jejich metabolitů s pomocí MEKC

Na základě předchozí experimentální zkušenosti s micelární fází na bázi PFOA byl nejdříve studován separační elektrolyt obsahující PFOA a NH_4OH v různých koncentracích. Rozmezí koncentrací v případě PFOA bylo 50, 75, 100 a 150 mM, koncentrace NH_4OH pak byly 100, 150, 200 a 300 mM (vždy v koncentračním poměru 1:2). Díky tomuto složení měly elektrolyty dostatečně vysoké pH (v rozmezí 9,0 – 9,5), což vedlo ke generaci dostatečně rychlého EOF nutného pro MEKC separaci s využitím normální polarita separačního napětí. Avšak ani při použití MEKC s PFOA jako těkavého tenzidu nebylo dosaženo dostatečného rozlišení studovaných molekul. Interakce mezi SC a micelami PFOA byly pravděpodobně příliš silné, což vedlo k velmi dlouhým retenčním časům (až 50 minut), nízké účinnosti píků a nedostatečnému rozlišení. I když byla PFOA v práci jiných autorů použita k separaci SC a jejich metabolitů [22], v tomto případě její využití nevedlo k uspokojivým výsledkům ani s přidavkem organických rozpouštědel (ACN, MeOH, propan-1-ol, propan-2-ol). Předpoklad silné interakce SC s micelární fází na bázi PFOA vedl k hypotéze využít perfluorovanou kyselinu s kratším uhlovodíkovým řetězcem (PFHA), která je také schopná tvořit ve vodném prostředí micely. Vzhledem ke kratšímu uhlovodíkovému řetězci byla očekávána slabší interakce se separovanými analyty. Na rozdíl od PFOA má PFHA vyšší hodnotu CMC, která je v rozmezí 25,0 – 32,8 mmol/l (v závislosti na použité metodě stanovení). Studované koncentrace PFHA byly zvoleny v podobném rozmezí jako v případě PFOA, tedy 50, 75, 100 a 150 mM

při zachování stejného poměru koncentrace NH_4OH (1:2). Separace směsi SC v separačních elektrolytech obsahujících různé koncentrace PFHA je zobrazena na Obr. 7.3.



Obr. 7.3 Rekonstruované SRM chromatogramy MEKC-ESI-MS/MS separace 15 SC a jejich metabolitů v separačním elektrolytu s různou koncentrací PFHA. Separací napětí + 15 kV, dávkování 50 mbar/8s.

Separací elektrolyt složený z 50 mM PFHA a 100 mM NH_4OH vedl také k nedostatečné separaci studovaných analytů, i když bylo patrné zlepšení selektivity separace oproti těkavým pufrům na bázi octanu amonného nebo PFOA. Vyšší poměr PFHA/ NH_4OH (75 mM/150 mM) již umožňoval separaci většiny SC a jejich metabolitů. Nejvyšší studovaný poměr PFHA/ NH_4OH (100 mM/200 mM) sice vedl také k separaci studovaných analytů, nicméně z důvodu příliš silné retence analytů v micelární fázi docházelo k rozšiřování píků (ztrátě účinnosti) a prodlužování

retenčních časů. Kromě toho elektrolyt s takto vysokými koncentracemi složek způsoboval generování vysokého separačního proudu ($> 50 \mu\text{A}$), přičemž hodnota $50 \mu\text{A}$ představuje instrumentální omezení pro spojení CE-ESI-MS.

Nejvhodnější separační elektrolyt byl tedy tvořen směsí 75 mM PFHA a 150 mM NH_4OH . Další optimalizace s cílem dosáhnout separace všech SC zahrnovala studium vlivu organického modifikátoru, jehož použití obecně vede k ovlivnění výsledných interakcí mezi analyty a micelami. V tomto případě byly jako organické modifikátory studovány ACN, MeOH a propan-2-ol v rozmezí 1 – 15 % (*v/v*). Podobně jako v případě separace derivátů kationonu nevedly přídavky ACN ani MeOH ke zlepšení selektivity separace, docházelo pouze k prodlužování celkové doby analýzy, přičemž rozlišení i retenční pořadí zůstalo zachováno.

Přídavek propan-2-olu nevedl k výrazné změně průběhu separace až do hodnoty 8 % (*v/v*). Poté byly přídavky pečlivě optimalizovány vždy zvýšením o 0,5 % (*v/v*) propan-2-olu v elektrolytu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 10 % (*v/v*), vyšší obsah organické složky již nevedl ke zlepšení selektivity, pouze opět docházelo k prodlužování retenčních časů. Dalším studovaným parametrem separace bylo separační napětí, které bylo testováno v rozsahu +15 až +25 kV (v řadě 15, 18, 20, 22 a 25 kV). Z hlediska separace a především její účinnosti bylo jako optimální napětí zvoleno +22 kV.

7.4.4 Separace pomocí MEKC-MS/MS

Optimalizovaný separační elektrolyt o složení 75 mM PFHA, 150 mM NH_4OH a 10 % (*v/v*) propan-2-olu byl použit pro MEKC-ESI-MS/MS analýzu patnácti SC a jejich metabolitů. Z hlediska ESI-MS/MS detekce byl studován vliv parametrů ionizace nejen s ohledem na intenzitu signálu, ale rovněž také z hlediska kontaminace iontového zdroje a tvorby aduktů mezi separovanými analyty a monomery PFHA. Tvorba aduktů byla studována s využitím skenovacího MS módu, přičemž v MS spektru

nebyly nalezeny žádné adukty, které by odpovídaly interakci mezi monomerními jednotkami tenzidu PFHA a studovanými analyty.

Vliv přítomnosti PFHA na intenzitu signálu byl testován na čtyřech vybraných SC (JHW-018, JWH-018 *N*-pentanová kyselina, JWH-200 a JWH-250 *N*-(5-hydroxypentyl)). Nejprve byl připraven separační elektrolyt 50 mM octan amonný o pH 9,0. JHW-018, JWH-200 a JWH-250 *N*-(5-hydroxypentyl) v tomto případě migrovali stejnou rychlostí a směrem jako EOF, oproti JWH-018 *N*-pentanové kyselině, která migrovala jako anion při normální polaritě separačního napětí. Podobný experiment byl proveden se stejnými analyty v přítomnosti elektrolytu na bázi PFHA (pH elektrolytu bez i s PFHA bylo srovnatelné). Vliv přítomnosti micel PFHA či jejich monomerních jednotek byl vyhodnocen srovnáním ploch píků uvedených studovaných SC a bylo prokázáno, že přítomnost PFHA v separačním elektrolytu nezpůsobuje potlačení signálu MS detektoru.

Jak již bylo zmíněno, vzhledem k izobarickým hodnotám poměru m/z u studovaných SC a jejich metabolitů byl jako detekční mód zvolen MRM. Parametry MS/MS detekce byly rovněž optimalizovány za účelem zvýšení citlivosti detekce. Veškeré SC (včetně metabolitů obsahujících karboxylovou skupinu) byly ionizovány v pozitivním módu ESI.

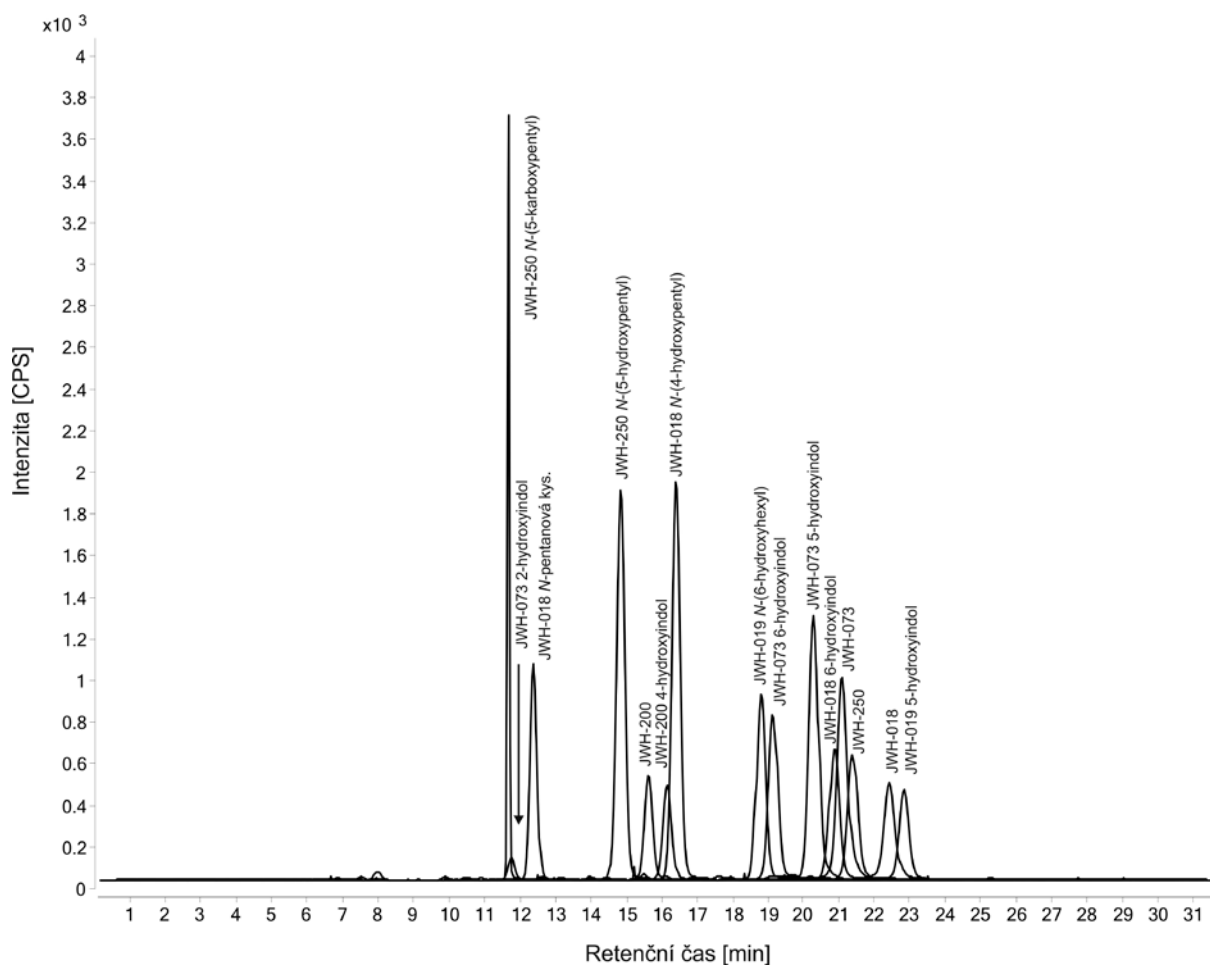
Studium vlivu složení pomocné sprejovací kapaliny bylo prvním krokem optimalizace, přičemž hodnoceny byly různé obsahy MeOH (25, 50 a 75 %, *v/v*) ve směsi s vodou. Obsah mravenčí kyseliny, která sloužila ke zvýšení elektrické vodivosti pomocné sprejovací kapaliny a zároveň také podporovala ionizační proces, byl studován v rozsahu od 0,25 do 1 % (*v/v*). Nízký obsah mravenčí kyseliny v pomocné sprejovací kapalině vedl k nestabilnímu elektrickému spojení mezi CE a ESI-MS, naopak obsah nad 0,5 % (*v/v*) zhoršoval opakovatelnost ploch píků jednotlivých analytů. Jako nejvhodnější složení pomocné kapaliny byl vybrán poměr MeOH/vody/mravenčí kyseliny 50:49,5:0,5 (*v/v/v*). Průtok pomocné sprejovací kapaliny byl testován v rozmezí 2 – 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Nejlepších výsledků z hlediska

intenzity signálu a stability elektrospreje bylo dosaženo při průtoku 8 $\mu\text{l}/\text{min}$. Menší průtoky poskytovaly nižší odezvu studovaných analytů a průtok 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ způsoboval nestabilitu sprejování ESI, pravděpodobně způsobenou nedostatečnou desolvací iontů analytu.

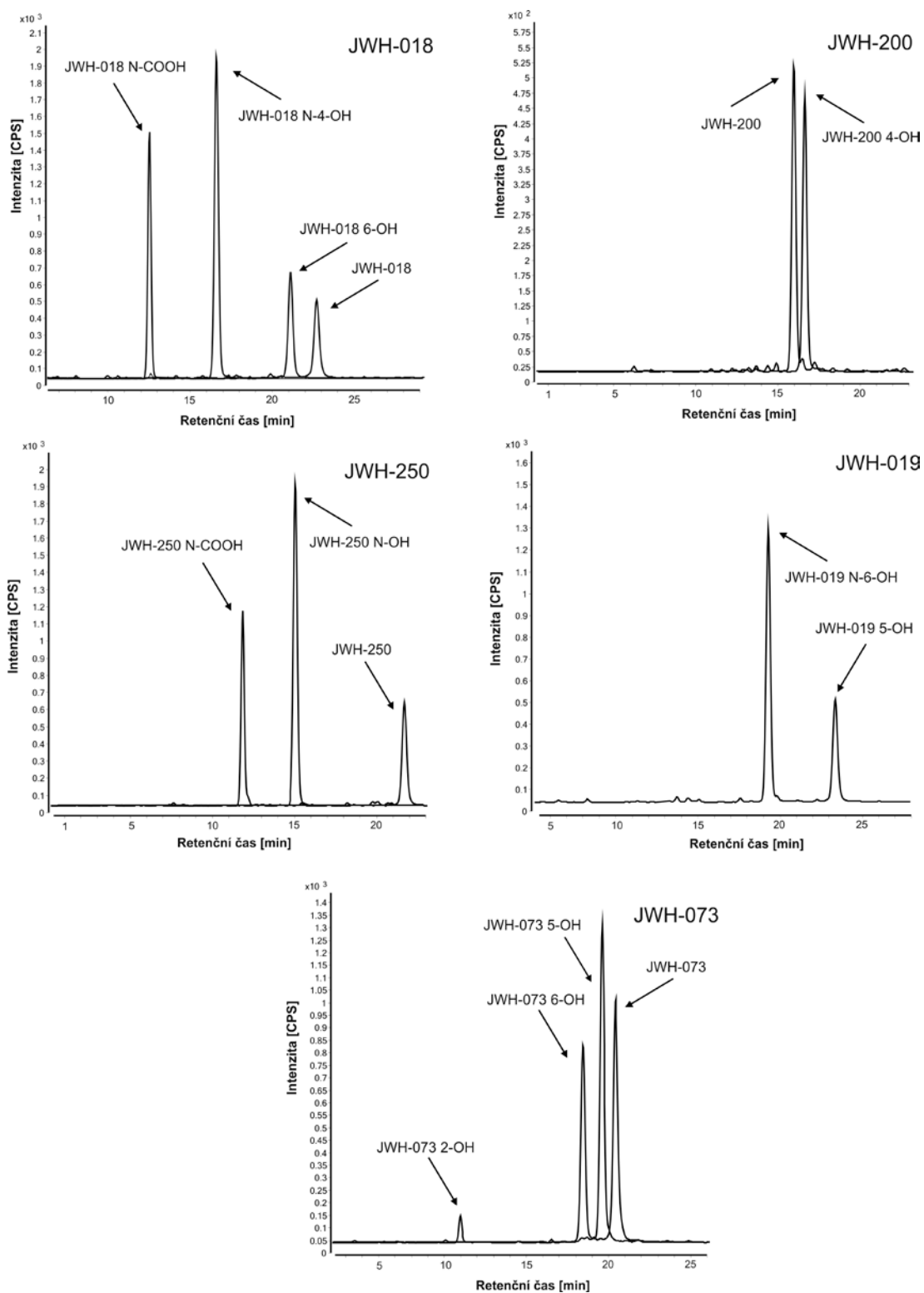
Dalšími parametry, které výrazně ovlivňují intenzitu signálu, jsou tlak a průtok nebulizačního plynu a jeho teplota. Průtok plynu byl studován od 5 do 20 l/min a jako optimum byl zvolen průtok 10 l/min. Tlak plynu je rovněž důležitým parametrem, kdy příliš velký tlak může vést k nestabilnímu elektrickému propojení CE a MS, což je způsobeno rozdíly tlaků na straně CE (separační kapiláry) a iontového zdroje. Vyšší tlaky mohou způsobovat problémy se stabilitou separačního proudu v důsledku nedostatečného toku eluátu ze separační kapiláry, čímž může dojít k přerušení vodivého spojení obou instrumentů. Tlak plynu byl tedy testován v rozmezí 5 až 15 psi, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při tlaku 5 psi.

Posledním krokem optimalizace MS detekce byla teplota plynu. Tento parametr je neméně důležitý jak z hlediska desolvatačního procesu v iontovém zdroji, tak rovněž z hlediska termické stability analyzovaných látek. Teplota plynu byla testována od 100 do 250 $^{\circ}\text{C}$ (vždy zvýšením o 50 $^{\circ}\text{C}$) a podle předpokladu měla její hodnota podstatný vliv na intenzitu signálu. Nízké intenzity signálu analytů byly pozorovány pro teplotu nižší než 150 $^{\circ}\text{C}$. Teplota 200 $^{\circ}\text{C}$ poskytovala nejvyšší intenzitu a poté při teplotě 250 $^{\circ}\text{C}$ docházelo u hydroxylovaných metabolitů k významnému snížení signálu, pravděpodobně vlivem rozpadu iontu analytu již v iontovém zdroji. Rekonstruovaný SRM chromatogram separace všech patnácti SC a jejich metabolitů je zobrazen na Obr. 7.4. Z chromatogramu je zřejmé, že micelární separační systém ve spojení s ESI-MS/MS detekcí umožňuje separovat všechny studované látky. Z toxikologického hlediska je však intoxikace různými druhy SC najednou nepravděpodobná. Důležitým kritériem využitelnosti metody je pak schopnost separace jednotlivých SC a jejich odpovídajících metabolitů. Separace SC rozdělených

do skupin podle příslušného SC a jeho metabolitů byla rovněž testována s cílem potvrdit možnost použití metody v klinické či forenzní toxikologii. Separace jednotlivých skupin SC je zobrazena na Obr. 7.5. Z chromatogramů je patrná dostatečná selektivita systému pro odlišení původních (nemetabolizovaných) forem SC a jejich příslušných metabolitů.



Obr. 7.4 Rekonstruovaný SRM chromatogram separace studovaných SC a jejich metabolitů. Podmínky: separační elektrolyt 75 mM PFHA, 150 mM NH₄OH a 10 % (*v/v*) propan-2-olu, U = +22 kV, injekce vzorku 50 mbar/8s, U_{ESI} = +3,5 kV, T = 200 °C, průtok nebulizačního plynu 10 l/min, tlak nebulizačního plynu 5 psi, pomocná sprejovací kapalina MeOH/voda/HCOOH (50:49,5:0,5, *v/v/v*), průtok sprejovací kapaliny 8 µl/min.



Obr. 7.5 Rekonstruované SRM chromatogramy MEKC-MS/MS separací SC a příslušných metabolitů podle jednotlivých JWH skupin.

7.4.5 Extrakce SC z biologického materiálu

V rámci vývoje metody byly testovány dva typy extrakčních postupů, jejichž cílem bylo přečištění vzorku od matrice a zakoncentrování studovaných SC a jejich metabolitů. Vzhledem k relativně málo polárnímu charakteru SC byla jako první testována SPE extrakce (kolonky se sorbentem C8 a C18) s předpokládanou retencí SC a jejich metabolitů na nepolárním sorbentu po úpravě pH. Pro optimalizaci SPE metody byl použit vzorek o koncentraci 50 ng/ml. Hodnoty výtěžnosti pak byly získány přímým porovnáním ploch píků SC po extrakci s plochami píků standardů o stejné koncentraci. Výtěžnosti jednotlivých SC byly pro obě použité kolonky velmi variabilní, v případě kolonky C8 bylo extrahované množství analytů pod limitem detekce. Kolonka C18 sice umožňovala extrakci všech SC, nicméně jednotlivé výtěžnosti byly v mnoha případech příliš nízké pro praktickou aplikaci metody. Vzhledem k neuspokojivým výsledkům tedy dále nebyla SPE metoda studována ani pro vzorky séra. Výtěžnosti jednotlivých SC pro obě SPE kolonky jsou uvedeny v Tabulce 7.3.

Tabulka 7.3 – Výtěžnosti jednotlivých SC v případě SPE extrakcí

Analyt	Výtěžnost [%]	
	SPE C8 [50 ng/ml] Moč	SPE C18 [50 ng/ml] Moč
JWH-250 N-(5-karboxypentyl)	112,4	104,0
JWH-073 2-hydroxyindol	76,2	88,7
JWH-018 N-pentanová kyselina	66,9	89,6
JWH-250 N-(5-hydroxypentyl)	96,9	88,5
JWH-200	117,3	97,3
JWH-200 4-hydroxyindol	98,9	85,9
JWH-018 N-(4-hydroxypentyl)	36,2	89,7
JWH-019 N-(6-hydroxyhexyl)	52,8	88,9
JWH-073 6-hydroxyindol	37,2	72,4
JWH-073 5-hydroxyindol	43,3	68,4
JWH-018 6-hydroxyindol	< LOD	44,5
JWH-073	< LOD	38,4
JWH-250	< LOD	26,0
JWH-018	71,8	12,0
JWH-019 5-hydroxyindol	70,9	17,2

Jako další extrakční postup byla zvolena LLE, využívající rozdílné distribuce analytů mezi vodnou a organickou fází. V tomto případě byl jako organická fáze zvolen *tert*-butyl(methyl)ether. Pro tento případ byly vzorky rozděleny do dvou skupin podle matrice. Moč byla spikována pouze metabolity SC a sérum bylo naopak spikováno pouze původními nemetabolizovanými SC. Výhoda použité organické fáze zároveň spočívala v tom, že zároveň plnila úlohu deproteinačního činidla. Navíc vzhledem k většímu objemu vzorku použitého k extrakci (5 ml) je možné provést prekoncentraci analytů i při podstatně nižších koncentračních hladinách. Objem vzorku určeného k extrakci navíc není teoreticky v případě moči omezen a je-li dostupné větší množství moči, lze prekoncentrační faktor dále navýšit. Z tohoto důvodu byla LLE metoda testována na dvou koncentračních hladinách a to 15 ng/ml a 150 ng/ml. Výťažnost LLE se pak pohybovala v rozmezí od 78,1 do 103,6 % pro vzorky moči a od 71,9 do 100,2 % pro sérum (na koncentrační hladině analytů 15 ng/ml). LLE extrakce pak byla dále použita při parciální validaci vyvinuté MEKC-ESI-MS/MS metody. Hodnoty výťažnosti jednotlivých SC pro obě koncentrační hladiny jsou uvedeny v Tabulce 7.4.

Tabulka 7.4 – Výťažnosti LLE extrakcí ($n = 5$); (m) = moč, (s) = krevní sérum

Analyt	Výtěžnost [%]	
	15 ng/ml	150 ng/ml
JWH-250 <i>N</i> -(5-karboxypentyl) (m)	103,6	95,6
JWH-073 2-hydroxyindol (m)	86,8	83,25
JWH-018 <i>N</i> -pentanová kyselina (m)	80,1	77,2
JWH-250 <i>N</i> -(5-hydroxypentyl) (m)	97,1	88,9
JWH-200 (s)	83,0	78,5
JWH-200 4-hydroxyindol (m)	97,7	92,1
JWH-018 <i>N</i> -(4-hydroxypentyl) (m)	98,5	90,8
JWH-019 <i>N</i> -(6-hydroxyhexyl) (m)	78,1	75,6
JWH-073 6-hydroxyindol (m)	101,3	99,2
JWH-073 5-hydroxyindol (m)	91,0	94,3
JWH-018 6-hydroxyindole(m)	101,5	97,5
JWH-073 (s)	76,4	78,5
JWH-250 (s)	71,9	81,5
JWH-018 (s)	100,2	95,4
JWH-019 5-hydroxyindol (m)	84,1	89,5

7.5 Částečná validace metody

Po nalezení vhodných podmínek pro extrakci a MEKC-ESI-MS/MS analýzu studovaných SC a jejich metabolitů byla provedena parciální validace vyvinuté metody s ohledem na základní validační parametry, které zahrnovaly selektivitu metody, lineární kalibrační rozsah jednotlivých SC, limity LOD a LOQ, přesnost a správnost, matriční efekt a v neposlední řadě také evaluaci extrakční výtěžnosti. Validace byla provedena v souladu s obecnými zásadami pro validace toxikologických metod, konkrétně na podkladu prací publikovaných Petersem a kol. [25] a Matuzsewskim a kol. [26].

Selektivita byla hodnocena na základě analýzy pěti slepých vzorků krevního séra a pěti slepých vzorků moči. Všechny vzorky byly analyzovány vyvinutou MEKC-MS/MS metodou s negativním výsledkem z hlediska přítomnosti možných endogenních interferujících látek.

Linearita kalibračního rozsahu byla stanovena pomocí spikovaných vzorků séra a moči po provedení extrakčního kroku a to v rozsahu šestibodové kalibrační metody od 10 ng/ml po 200 ng/ml. Každý z kalibračních bodů byl měřen vždy pětkrát. Jako kritická hodnota pro validitu kalibrační závislosti byl zvolen korelační koeficient pro všechny studované SC větší nebo roven 0,990.

Hodnoty LOD a LOQ byly stanoveny jako trojnásobek, respektive desetinásobek poměru signálu k šumu. Příslušné rovnice kalibračních křivek, korelačních koeficientů, limitů detekce a kvantifikace jsou shrnuty v Tabulce 7.5.

V případě správnosti metody bylo použito vyjádření procentuální výtěžnosti mezi hodnotou naměřenou a teoretickou hodnotou koncentrace všech SC ($n = 5$). Přesnost metody byla vyjádřena pomocí RSD retenčních časů a ploch píků pro pět opakovaných měření na každé koncentrační hladině (15, 50 a 150 ng/ml) v rámci jednoho dne (*intra-day*) a pro pět po sobě jdoucích dní ($n = 25$, *inter-day*). Uvedená validační data jsou shrnuta v Tabulce 7.6 a 7.7.

Tabulka 7.5 – Validační parametry metody pro vzorky krevního séra (s) a moči (m)

Analyt	Regresní křivka ($y = ax + b$)		Koefficient determinace R^2	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
	Směrnice (SD) ^a	posunutí (SD) ^a			
JWH-250 <i>N</i> -(5-karboxypentyl) (m)	50,63 (0,73)	135,58 (63,84)	0,9989	1,8	6,0
JWH-073 2-hydroxyindol (m)	3,51 (0,08)	12,10 (6,97)	0,9872	2,9	9,7
JWH-018 <i>N</i> -pentanová kyselina (m)	67,23 (0,25)	-134,93 (21,70)	0,9999	1,3	4,3
JWH-250 <i>N</i> -(5-hydroxypentyl) (m)	102,29 (1,66)	341,39 (145,01)	0,9987	1,1	3,7
JWH-200 (s)	29,15 (1,04)	214,73 (90,39)	0,9937	3,0	10,0
JWH-200 4-hydroxyindol (m)	36,22 (0,84)	152,17 (73,40)	0,9973	2,5	8,3
JWH-018 <i>N</i> -(4-hydroxypentyl) (m)	121,78 (2,33)	610,79 (203,37)	0,9920	0,9	3,0
JWH-019 <i>N</i> -(6-hydroxyhexyl) (m)	94,01 (1,31)	-60,92 (114,77)	0,9920	1,0	3,3
JWH-073 6-hydroxyindol (m)	61,66 (1,00)	267,57 (145,03)	0,9964	1,5	5,0
JWH-073 5-hydroxyindol (m)	100,25 (2,25)	283,43 (196,29)	0,9975	1,2	4,0
JWH-018 6-hydroxyindol (m)	60,67 (0,76)	-26,91 (66,01)	0,9992	1,7	5,7
JWH-073 (s)	137,18 (3,81)	-760,50 (331,86)	0,9962	0,9	3,0
JWH-250 (s)	59,06 (1,08)	-206,51 (94,44)	0,9998	1,8	6,0
JWH-018 (s)	59,63 (0,60)	-142,08 (52,80)	0,9994	1,1	3,7
JWH-019 5-hydroxyindol (m)	54,76 (1,09)	-355,21 (95,03)	0,9975	2,0	6,7

^a V závorce je uvedena směrodatná odchylka

Tabulka 7.6 – Přesnost vyjádřená jako hodnoty RSD [%] retenčních časů pro jednotlivé koncentrační hladiny; (m) = moč, (s) = krevní sérum

Analyt (řázeno podle retenčního pořadí)	Intra-day RSD [%]			Inter-day RSD [%]		
	Intra-day RSD [%]	Intra-day RSD [%]	Intra-day RSD [%]	Intra-day RSD [%]	Intra-day RSD [%]	Intra-day RSD [%]
	15 ng/ml	50 ng/ml	150 g/ml	15 ng/ml	50 ng/ml	150 g/ml
JWH-250 <i>N</i> -(5-karboxypentyl) (m)	4,07	3,56	4,02	5,25	4,85	5,58
JWH-073 2-hydroxyindol (m)	4,63	3,78	4,12	6,12	6,58	6,26
JWH-018 <i>N</i> -pentanová kys. (m)	4,31	3,98	3,45	5,98	6,79	6,23
JWH-250 <i>N</i> -(5-hydroxypentyl) (m)	4,64	4,12	4,03	6,26	6,86	6,12
JWH-200 (s)	4,43	4,56	4,52	6,85	7,12	7,58
JWH-200 4-hydroxyindol (m)	4,29	4,28	4,78	7,05	7,28	8,10
JWH-018 <i>N</i> -(4-hydroxypentyl) (m)	4,52	4,12	4,65	7,15	7,56	8,06
JWH-019 <i>N</i> -(6-hydroxyhexyl) (m)	2,94	3,18	3,26	8,12	7,85	7,52
JWH-073 6-hydroxyindol (m)	2,93	3,00	3,14	8,52	7,97	8,32
JWH-073 5-hydroxyindol (m)	2,71	3,26	3,53	8,12	8,17	7,85
JWH-018 6-hydroxyindol (m)	2,96	3,15	3,78	7,85	8,36	7,56
JWH-073 (s)	3,57	3,45	4,03	7,94	8,58	6,54
JWH-250 (s)	3,20	3,15	3,65	8,15	8,79	8,12
JWH-018 (s)	3,65	3,28	3,75	8,85	9,01	9,15
JWH-019 5-hydroxyindol (m)	3,87	4,03	4,23	9,12	9,26	9,56

Tabulka 7.7 – Přesnost vyjádřená jako hodnoty RSD [%] ploch píků pro jednotlivé koncentrační hladiny; (m) = moč, (s) = krevní sérum

Analyt (řázeno podle retenčního pořadí)	Intra-day RSD [%]			Inter-day RSD [%]		
	Intra-day RSD [%] 15 ng/ml	Intra-day RSD [%] 50 ng/ml	Intra-day RSD [%] 150 g/ml	Intra-day RSD [%] 15 ng/ml	Intra-day RSD [%] 50 ng/ml	Intra-day RSD [%] 150 g/ml
JWH-250 N-(5-karboxypentyl) (m)	3,12	2,94	3,00	4,96	4,85	5,12
JWH-073 2-hydroxyindol (m)	3,65	3,42	3,62	5,19	6,58	6,89
JWH-018 N-pentanová kys. (m)	3,54	3,51	3,78	6,25	6,79	7,02
JWH-250 N-(5-hydroxypentyl) (m)	3,71	3,60	3,98	6,58	6,86	7,12
JWH-200 (s)	3,97	3,84	4,25	6,85	7,12	7,19
JWH-200 4-hydroxyindol (m)	4,01	3,88	4,15	6,98	7,28	7,65
JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) (m)	4,15	4,01	4,35	7,25	7,56	7,76
JWH-019 N-(6-hydroxyhexyl) (m)	4,20	4,14	4,85	7,56	7,85	8,03
JWH-073 6-hydroxyindol (m)	4,22	4,18	4,56	8,12	7,97	8,15
JWH-073 5-hydroxyindol (m)	4,38	4,25	4,85	8,23	8,17	8,65
JWH-018 6-hydroxyindol (m)	4,47	4,36	4,62	8,40	8,36	8,49
JWH-073 (s)	4,68	4,51	4,78	8,65	8,58	8,69
JWH-250 (s)	4,68	4,65	4,98	8,70	8,79	8,95
JWH-018 (s)	4,76	4,68	4,88	8,90	9,01	9,16
JWH-019 5-hydroxyindol (m)	4,99	4,85	5,12	9,15	9,26	9,85

Matriční efekt moči a krevního séra byl hodnocen z hlediska plochy píků, kdy byly analyzovány spikované vzorky v obou maticích, z nichž první řada byla extrahována pomocí LLE, a druhá řada byla analyzována bez extrakčního kroku. Kontrolní řada byla získána analýzou SC v desetkrát ředěném separačním elektrolytu, kde byla koncentrace SC na stejné koncentrační hladině jako obou studovaných matic. Získané výsledky prokázaly pouze zanedbatelný vliv extrakčního postupu na případné ztráty

analytu. Znatelnější rozdíly pak byly mezi plochami píků SC extrahovaných z analyzovaných matric a SC rozpuštěných v desetkrát ředěném elektrolytu. Tento fakt zle pravděpodobně přisoudit komplexnosti obou matric, jejichž složení může negativně ovlivňovat ionizaci v SC iontovém zdroji. Získané matriční efekty jsou shrnuty v Tabulce 7.8. Potlačení ionizace bylo pozorováno pro všechny studované SC a jejich metabolity. Matriční efekty vyjádřené jako procentuální hodnoty potlačeného signálu byl v rozmezí do -80,7 do 9,1 % (pro koncentrační hladinu 15 ng/ml) a od -71,9 do 1,2 (pro koncentrační hladinu 150 ng/ml).

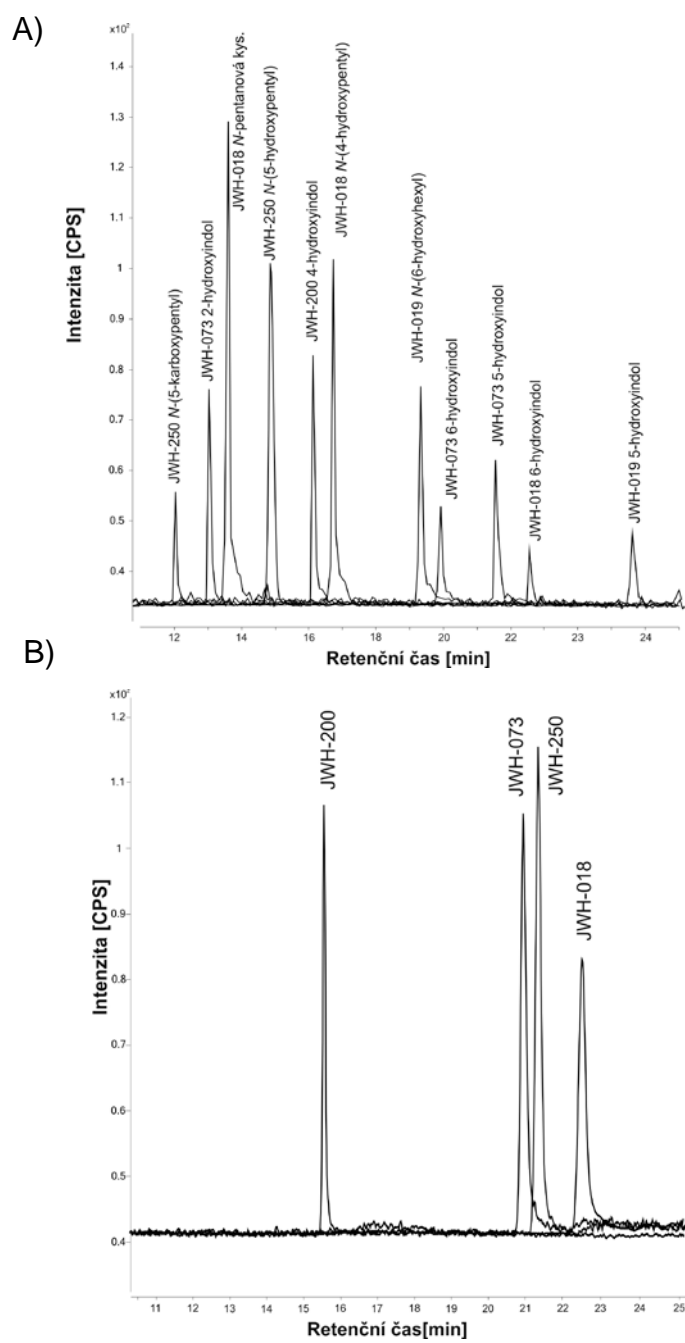
Tabulka 7.8 - Matriční efekty pro spikovanou moč a sérum po LLE extrakci v porovnání s analyty rozpuštěnými v desetkrát ředěném separačním elektrolytu (n = 5).

Analyt	Matriční efekt ^a	
	[% ovlivnění signálu]	
	50 ng/ml	150 ng/ml
JWH-250 <i>N</i> -(5-karboxypentyl) (m)	-26,9	-36,4
JWH-073 2-hydroxyindol (m)	-37,1	-42,4
JWH-018 <i>N</i> -pentanová kyselina (m)	-48,8	-52,3
JWH-250 <i>N</i> -(5-hydroxypentyl) (m)	-64,9	-71,9
JWH-200 (s)	-24,0	-31,1
JWH-200 4-hydroxyindol (m)	-45,9	-54,5
JWH-018 <i>N</i> -(4-hydroxypentyl) (m)	6,1	-4,3
JWH-019 <i>N</i> -(6-hydroxyhexyl) (m)	-41,8	-52,9
JWH-073 6-hydroxyindol (m)	-80,7	-62,1
JWH-073 5-hydroxyindol (m)	-52,0	-58,4
JWH-018 6-hydroxyindol (m)	-73,4	-68,1
JWH-073 (s)	-28,7	-33,1
JWH-250 (s)	9,1	1,2
JWH-018 (s)	0,50	-2,6
JWH-019 5-hydroxyindol (m)	-41,7	-42,7

^a Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech odečtených od 100, tak aby hodnota vyjadřovala potlačení signálu studovanou maticí.

7.6 Aplikace vyvinuté metody na modelové vzorky

Vyvinutá extrakční metoda byla aplikována na spikované vzorky moči (analýza metabolitů SC) a séra (analýza původních forem SC) na koncentrační hladině 50 ng/ml. Rekonstruované SRM chromatogramy vzorku moči a séra po LLE extrakci jsou zobrazeny na Obr. 7.6A a B. Získané výsledky prokazují použitelnost vyvinuté metody pro použití ve forenzní či toxikologické praxi.



Obr. 7.6 Rekonstruované SRM chromatogramy MEKC-MS/MS po extrakci metodou LLE pro moč (A) a krevní sérum (B). Koncentrace jednotlivých analytů 50 ng/ml.

7.7 Závěr

Byla vyvinuta metoda MEKC separace s tandemovou hmotnostní spektrometrií patnácti syntetických kanabinoidů a jejich metabolitů s využitím perfluoroheptanové kyseliny jako micelární složky pufru. Perfluoroheptanová kyselina představuje vhodnou těkavou složku separačního elektrolytu, která umožňuje uskutečnit separaci studovaných syntetických kanabinoidů a metabolitů bez experimentálních omezení a kontaminace iontového zdroje hmotnostního spektrometru netěkavým tenzidem. Zároveň se jedná o první publikovanou práci, kde byla perfluoroheptanová kyselina využita jako těkavý tenzid pro uskutečnění MEKC separace.

Vyvinutá metoda byla validována a poté úspěšně aplikována pro analýzu modelových vzorků moči a séra pro toxikologické a forenzní účely. Vzhledem k relativně jednoduché přípravě vzorků je tuto metodu možné považovat za vhodnou alternativu k zavedeným chromatografickým metodám pro screening intoxikace syntetickými kanabinoidy. Dosažené hodnoty limitů kvantifikací studovaných drog jsou srovnatelné s koncentracemi nalezenými v tělních tekutinách po intoxikaci syntetickými kanabinoidy.

7.8 Literatura

- [1] Gurney S.M.R., Scott K.S., Kacinko S.L., Presley B.C., Logan B.K., *Forensic Sci. Rev.* 26 (2014) 53-78.
- [2] Musclemann M.E., Hampton J.P., *Pharmacotherapy* 34 (2014) 745-757.
- [3] Harris C.R., Brown A., *J. Emerg. Med.* 44 (2013) 360-366.
- [4] Steely K.A., Lapoint J., Moran J.H., Fattore L., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 39 (2012) 234-243.
- [5] Carrol F., Lewin A., Mascarella W., Seltzmann H., Reddy P, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1248 (2012) 18-38.
- [6] Favretto D., Pascali J., Tagliaro F., *J. Chromatogr. A* 1287 (2013) 84-95.
- [7] Rajasekaran M., Brents L.K., Franks L.N., Moran J.H., Prather P.L., *Appl. Pharmacol.* 269 (2013) 100-108.
- [8] Grigoryev A., Melnik A., Savchuk S., Simonov A., Rozhanets V., *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 2519-2526.
- [9] Wohlfarth W., Scheidweiler K.B., Chen X., Liu H., Huestis M.A., *Anal. Chem.* 85 (2013) 3730-3738.
- [10] Znaleziona J., Ginterová P., Petr J., Ondra P., Válka I., Ševčík J., Chrastina J., Maier V., *Anal. Chim. Acta* 847 (2015) 11-25.
- [11] Elsohly M.A., Gul W., Wanas A.S., Radian M.M., *Life Sci.* 97 (2014) 78-90.
- [12] Möller I., Wintermeyer A., Bender K., Jübner M., Thomas A., Krug O., Schänzer W., Thevis M., *Drug Test Anal.* 3 (2011) 609-220.
- [13] Meyer M.R., Maurer H.H., *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 195-208.
- [14] Dresen S., Kneisel S., Weinmann W., Zimmermann R., Auwärter V., *J. Mass Spectrom.* 46 (2011) 163-171.
- [15] Karinko S.L., Xu A., Homan J.W., McMullin M.M., Warrington D.M., Logan B.K., *J. Anal. Toxicol.* 35 (2011) 386-393.
- [16] Kneisel S., Auwärter V., *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 825-835.
- [17] Scheidweiler K.B., Huestis M.A., *J. Chromatogr. A* 1327 (2014) 105-117.

- [18] Sobolevsky T.G., Prasolov I.S., Rodchenkov G., *Forensic Sci. Int.* 200 (2010) 141-147.
- [19] Gambaro V., Arnoldi S., Belluci S., Casagni E., Dell'Acqua L., Fumagalli M., Pallavicini G., Roda G., Rusconi C., Valoti E., *J. Chromatogr. B* 957 (2014) 68-76.
- [20] Emerson B., Durham J., Gidden J., Lay J.O., *Forensic Sci. Int.* 229 (2013) 1-6.
- [21] Gottardo R., Bertaso A., Pascali J., Sorio D., Musile G., Trapini E., Seri C., Serpelloni G., Tagliaro F., *J. Chromatogr. A* 1267 (2012) 198-205.
- [22] Akamatsu S., Misuhashi T., *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 304-307.
- [23] Mazzarino M., de la Torre X., Botre F., *Anal. Chim. Acta* 837 (2014) 70-82.
- [24] <http://www.iach.cz/uiach-n/cz/emm.htm> (staženo dne 10.6.2016).
- [25] Peters F.T., Drummer O.H., Musshoff F., *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 216-224.
- [26] Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M., *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019-3030.

8. Diagnostika hydroxyglutarových acidurií s využitím EKC-ESI-MS/MS – enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny

Výsledky, které jsou shrnuty v této části práce, byly publikovány v následující práci: Švidrnoch M., Příbylka A., Bekárek V., Ševčík J., Smolka V., Maier V.: *Enantioseparation of D,L-2-hydroxyglutaric acid by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry – Fast and efficient tool for D- and L-2-hydroxyglutaricacidurias diagnosis*. Journal of Chromatography A (2016), přijato k publikaci; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.095>.

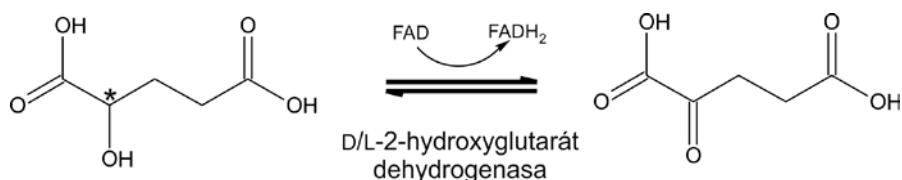
8.1 Kyselina D,L-2-hydroxyglutarová a její role v organismu

Nízkomolekulární alifatické karboxylové kyseliny (AKK) jsou častými produkty mnoha metabolických procesů v lidském organismu. Mezi nejvýznamnější metabolické pochody kde AKK hrají význanou roli patří metabolismus sacharidů, aminokyselin, lipidů či biogenních aminů. Monitorování jejich koncentrace v biologických tekutinách (moč, sérum, cerebrospinální tekutina atd.) může napomoci k objektivní diagnostice některých ze širokého spektra vrozených nebo získaných metabolických poruch. Některé AKK jsou chirální, identifikace a stanovení jednotlivých enantiomerů může vést k přesnější diagnostice poruch metabolismu. V současné době existují dva používané přístupy pro diagnostiku poruch metabolismu.

První přístup je založen na analýze celkového profilu AKK v biologickém materiálu (nejčastěji moč). Vzhledem ke komplexnosti biologických matric a počtu analytů či interferujících látek je tento způsob komplikovaný na správné vyhodnocení a interpretaci. Většinou je tento postup uplaňován při analýze dvoudimenzionální plynovou chromatografií ve spojení s MS. Druhý přístup využívá separace a kvantifikace vybraných markerů, které jsou specifické pro určitý typ metabolické poruchy. Přehledový článek zpracovávající problematiku metabolických poruch a analytických přístupů k jejich diagnostice publikoval Kumps a kol. [1]. Značné množství produktů či intermediátů lidského metabolismu jsou látky opticky aktivní (již zmíněné AKK, aminokyseliny, proteiny aj.). Ve zdravém organismu mají tyto látky

určitý typický poměr jednotlivých enantiomerů. V případě vzniku patologické či vrozené metabolické poruchy dochází k porušení fyziologických procesů, což má za následek rozdílnou exkreci opticky aktivních metabolitů (např. enantiomerů mléčné, glycerové, či 2-hydroxyglutarové kyseliny). Z tohoto důvodu jsou z hlediska diagnostiky kladeny značné nároky nejen na identifikaci a kvantifikaci určitého analytu, ale rovněž na jeho enantioseparaci a stanovení jednotlivých izomerů v případě, že se jedná o chirální látku.

D,L-2-Hydroxyglutarová kyselina (HG) je produkt metabolických drah a při normální funkci metabolismu je dále konvertována na α -ketoglutarovou kyselinu (Obr. 8.1). U některých vrozených metabolických poruch je tato enzymatická přeměna blokována, což se projeví zvýšením hladiny HG kyseliny v moči (hydroxyglutarová acidurie, HGA). HG má jedno chirální centrum (na Obr. 8.1 vyznačeno hvězdičkou), kdy každý enantiomer způsobuje jiný typ metabolické poruchy včetně odlišných klinických projevů.



Obr. 8.1 Schéma metabolické přeměny 2-hydroxyglutarové kyseliny na α -ketoglutarovou kyselinu.

Typické symptomy v případě D-2-hydroxyglutarové acidurie (D-HGA) zahrnují epilepsii, snížení svalového napětí (hypotonie) a psychomotorickou retardaci. V případě L-2-hydroxyglutarové acidurie (L-HGA) jsou symptomy odlišné a zahrnují kromě epilepsie také opožděný vývoj a ataxii. Kromě uvedených forem HGA existuje i kombinovaná acidurie (D,L-HGA), která se projevuje neonatální epileptickou encefalopatií a respirační insuficiencí [2,3].

Je tedy na místě provádět, v případě podezření na tento typ metabolické poruchy, screening nejen samotné HG, ale rovněž provést enantioseparaci a stanovit hladinu jednotlivých enantiomerů HG.

Oba typy acidurií (D-HGA i L-HGA) byly v roce 1980 popsány Chalmersem a kol. [4], Duranem a kol. [5]. Kombinovanou formu D,L-HGA popsal poprvé Muntau a kol. [6]. Biochemické a klinické projevy všech tří skupin HGA shrnul ve svém článku Kranendijk a kol. [7].

8.2 Analytické metody diagnostiky hydroxyglutarových acidurií

Z hlediska analytických technik použitelných pro enantioseparaci a stanovení chirálních AKK v biologických tekutinách jsou nejčastěji využívány GC a LC techniky ve spojení s hmotnostní spektrometrií či LC s UV-VIS detekcí. Hlavní nevýhodou chromatografických technik je nutnost použití CSP [8]. Další možnost představuje derivatizace enantiomerů pomocí vhodného chirálního derivatizačního činidla. Takto lze získat diastereomery AKK, které však mohou podléhat racemizaci a vést k nepřesným výsledkům analýz. Navíc jsou tyto metody náročné na čas a je obvykle vyžadována pečlivá validace derivatizačního procesu, zejména pak jeho výtěžnosti [9]. Vhodnou alternativní metodou k chromatografickým metodám je spojení CE-ESI-MS/MS, které umožňuje rychlou a jednoduchou achirální i chirální separaci, identifikaci a stanovení AKK [10]. Chirální selektor může být přidán přímo do separačního elektrolytu a odpadá tedy potřeba použití nákladných CSP. Tandemová hmotnostní spektrometrie pak umožňuje jak detekci, tak identifikaci a kvantifikaci separovaných enantiomerů. Další výhodou CE-ESI-MS/MS je relativně nekomplikovaná příprava vzorku (zejména moči) před analýzou [11-13]. Objektivní diagnostika určitého typu HGA je založena na separaci, identifikaci a kvantifikaci jednotlivých enantiomerů D,L-HG. V souvislosti s metodou enantioseparace D,L-mléčné kyseliny, která byla na našem pracovišti vyvinuta a publikována [14], lze předpokládat, že enantioseparaci D,L-HG (podobně jako jiné α -hydroxykyseliny) bude možné uskutečnit pomocí vankomycin chloridu (VC) jako CS. Tento selektor je použitelný v kyselém až téměř neutrálním pH (v rozmezí pH 3,0 – 6,0) [15]. Mezi nevýhody využití VC však patří jeho možná adsorpce na vnitřní stěnu separační

kapiláry, což způsobuje zhoršení reprodukovatelnosti jednotlivých analýz z hlediska migračních časů a ploch píků [16]. I v tomto případě spojení CE-ESI-MS/MS vyžaduje pečlivou optimalizaci separačního systému, nejčastěji s použitím kovalentně pokryté kapiláry a metody PFT, čímž lze předejít kontaminaci ESI zdroje netěkavým CS. Podobný přístup popsal ve své práci Fanali a kol. [17], kdy bylo použito kapiláry pokryté polyakrylamidem a protisměrné migrace pro enantioseparaci etodolaku a jeho metabolitů v separačním elektrolytu na bázi octanu amonného o pH 4,8 s VC jako CS.

Kromě diskutovaného VC je rovněž na místě zmínit, že existují práce využívající pro enantioseparaci AKK (např. mléčné, 2-hydroxymáslé, 2-hydroxy-3-methylmáslé či 2-hydroxyisokaproové kyseliny) deriváty cyklodextrinů (CD) [18-20]. V uvedených pracích však bylo nutno použít značné množství CD pro dosažení enantioseparace (řádově desítky až stovky mM), což mělo za následek dlouhé migrační časy analytů a tím i nízkou účinnost. Rozlišení jednotlivých enantiomerů bylo pouze přibližně 1,5. Několik prací se zabývalo enantioseparací a stanovením enantiomerů 2-HG pomocí chromatografických technik. LC-MS/MS metodu využívající ředění stabilních izotopů po derivatizaci 2-HG pomocí anhydridu diacetyl-L-vinné kyseliny publikoval Stryus a kol. [21]. Vyvinutá metoda byla aplikována při diferenciální diagnostice D-HGA, L-HGA i kombinované D,L-HGA. Výsledné diastereomery získané derivatizací D,L-HG byly separovány na reverzní stacionární fázi pomocí LC a detekovány pomocí ESI-MS/MS s použitím MRM módu. Detekční limity pro oba enantiomery byly stanoveny na 20 pmol ve 20 μ l dávkovaného vzorku moči. Odlišný přístup enantioseparace 2-HG publikoval Rashed a kol. [22], který využil CSP na bázi ristocetinu A (Chirobiotic® R) ve spojení s ESI-MS/MS detekcí. Metoda však nebyla plně validována a nejsou tak k dispozici limity detekce jednotlivých enantiomerů. Pro enantioseparaci D,L-HG s pomocí LC byla také nedávno využita CSP na bázi chirálního aneXu tvořeného *terc*-buthylcarbamoylechininem a *terc*-buthylcarbamoylechinidinem [23]. V této práci nebylo sice dosaženo většího rozlišení enantiomerů HG než 1,4, nicméně

studované CSP vykazovaly navzájem opačné eluční pořadí separovaných enantiomerů HG.

První enantioseparaci D,L-HG s pomocí GC-MS publikoval dasNeves a kol. [24]. Jednotlivé enantiomery D,L-HG byly derivatizovány za vzniku alkylesterů a enantioseparace pak probíhala pomocí CSP na bázi CD. Citlivou metodu založenou na ředění stabilních izotopů pro stanovení D-HG a L-HG pomocí GC-MS s chemickou ionizací (využívající amoniak) pro prenatální diagnostiku HGA publikoval Gibson a kol. [25]. Kim a kol. [26] vyvinul nepřímou metodu enantioseparace HG pomocí GC, kdy bylo použito (*S*)-(+)-3-menthyl-2-butylace a *O*-trifluoroacetylace jako derivatizace. Stejná skupina autorů se také zabývala konfigurační analýzou chirálních kyselin včetně HG převedením na *O*-trifluoroacetylované (-)-mentyl estery a jejich následné separaci pomocí duální GC na kapilární koloně. Přímou chirální separaci vybraných AKK (2-hydroxyisokaproové, 3-methyladipové, HG, 3-(4-hydroxyfenyl) mléčné, 2-hydroxysebakové a 3-hydroxysebakové kyseliny) pomocí GC-MS s CSP na bázi heptakis-(2,3-*di-O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyl dimethylsilyl)- β -cyklodextrinu publikoval Muth a kol. [28]. Další metodu přímé separace mléčné, glycerové kyseliny a HG pomocí GC-MS rovněž s cyklodextrinovou CSP publikoval ve své práci Kauzinger a kol. [29].

Několik prací popisuje využití enantioselektivní potenciometrické membrány na bázi maltodextrinů pro selektivní stanovení L-HG v nanomolárních koncentracích v přítomnosti D-HG. Naopak membrána na bázi makrocyclických ATB byla použita pro citlivé stanovení D-HG v přítomnosti L-HG [30,31]. Rychlý enzymatický test určený pro detekci D-HG v biologických tekutinách či tkáních pomocí dvoukrokové enzymatické reakce s D-2-hydroxyglutarát dehydrogenasou publikoval Blass a kol. [32].

Cílem této práce bylo vyvinout metodu přímé enantioseparace D,L-HG s pomocí CE-ESI-MS/MS pro účely objektivní diagnostiky hydroxyglutarových acidurií v reálných vzorcích moči s využitím jednoduché úpravy vzorků.

8.3 Experimentální část

8.3.1 Použité chemikálie a materiál

Octová kyselina ($\geq 99\%$, w/w), mravenčí kyselina ($\geq 95\%$, w/w), hydroxid amonný (25%, w/w), dihydrát fosforečnanu monosodného ($\geq 99\%$), peroxidisíran draselný ($\geq 99\%$), akrylamid, *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED), vankomycin chlorid, kreatinin, imidazol, chlorid sodný, methanol a propan-2-ol (obojí v kvalitě pro LC-MS), D-2-hydroxyglutarát sodný a L-2-hydroxyglutarát sodný byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Voda (pro LC-MS) a absolutní ethanol byly zakoupeny u firmy Merck (Darmstadt, Německo). Není-li uvedeno jinak, byly všechny použité chemikálie analytické čistoty nebo vyšší. Křemenné kapiláry o vnitřním průměru 50 μm a vnějším průměru 375 μm byly zakoupeny u firmy MicroSolv (Eatontown, NJ, USA).

8.3.2 Instrumentace

Z důvodu různých fyziologických obsahů vody v moči u jednotlivých vzorků bylo nezbytné provést standardizaci výsledných koncentračních hladin jednotlivých izomerů HG na koncentraci kreatininu v moči [33]. Stanovení kreatininu bylo provedeno modifikací metody publikované Liottou a kol. [34]. Modifikace spočívala v použití normálního dávkování namísto původního dávkování z krátkého konce separační kapiláry. Ke stanovení byla použita kapilární elektroforéza Agilent 7100 (Agilent, Waldbronn, Německo) vybavená DAD detektorem. Křemenná separační kapilára o celkové délce 33 cm a efektivní délce 24,5 cm byla před prvním použitím promyta 15 minut 1 M roztokem NaOH, poté 15 minut kondicionována deionizovanou vodou a nakonec 15 minut promývána separačním elektrolytem (200 mM fosforečnan monosodný/200 mM octová kyselina pH 3,8). Před každou analýzou byla kapilára promyta 5 minut vodou a 5 minut separačním elektrolytem. Kapilára byla termostatována na teplotu 25 °C. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky při tlaku

50 mbar/5s. Detekční vlnová délka byla nastavena na 200 nm. Použité separační napětí bylo +25 kV.

Pro enantioseparaci D- a L-HG bylo použito spojení CE-ESI-MS/MS. Všechny experimenty byly prováděny pomocí kapilární elektroforézy Agilent 7100 (Agilent, Waldbronn, Německo) on-line spojenou s hmotnostním spektrometrem Agilent 6460 s trojitým kvadrupólovým analyzátozem a ESI iontovým zdrojem. Část separační kapiláry umístěna v CE instrumentu byla termostatována na 25 °C. Pomocná sprejovací kapalina byla vedena isokratickou LC pumpou Agilent 1260 a před vstupem do ESI nebulizéru dělena děličem toku v poměru 1:100. Jako separační kapilára byla použita kapilára kovalentně pokrytá polyakrylamidem (PAA) o délce 60 cm. Pokrytí PAA bylo provedeno dle postupu v dříve publikované práci [14]. Vzhledem ke krátké délce separační kapiláry byla kapilára vedena mimo DAD detektor přímo do iontového zdroje MS.

8.3.3 Příprava standardů

Standardní roztoky kreatininu o koncentraci 500 mM byly připraveny rozpuštěním potřebného množství kreatininu v deionizované vodě. Interní standard imidazol byl připraven obdobně jako 50 mM roztok. Nižší koncentrace byly připraveny postupným ředěním standardních roztoků 0,9 % (*w/v*) roztokem chloridu sodného ve vodě.

Standardní roztok obou enantiomerů HG (jako racemická směs) byl připraven rozpuštěním příslušného množství jednotlivých enantiomerů HG v deionizované vodě tak, aby výsledná koncentrace jednotlivých enantiomerů byla 1,0 mmol/l. Roztoky kalibračních standardů HG byly připraveny postupným ředěním racemické směsi deionizovanou vodou a byly připraveny standardy o koncentracích 0,200; 1,0; 100,0; 250,0 a 400,0 $\mu\text{mol/l}$. Ke stanovení opakovatelnosti jednotlivých měření (*inter-day* a *intra-day*) byla použita koncentrace 0,200 $\mu\text{mol/l}$ obou enantiomerů zvlášť. Vzorky určené pro kontrolu kvality (QC) z hlediska přesnosti a správnosti metody byly připraveny následovně: vzorek moči 1 (QC1) byl získán od zdravého jedince

(s fyziologickými hodnotami jednotlivých enantiomerů HG), vzorek 2 (QC2) byl připraven ze stejného vzorku moči jako v předchozím případě spikování jednotlivými enantiomery HG na koncentrační hladinu 5 $\mu\text{mol/l}$. Vzorky pro hodnocení výtěžnosti metody byly opět připraveny z moči zdravého jedince a spikovány na koncentrační hladiny 10 a 300 $\mu\text{mol/l}$ každého enantiomeru. Není-li dále v textu uvedeno jinak, byla všechna měření prováděna vždy pětkrát.

8.3.4 Příprava separačních elektrolytů

Pro stanovení kreatininu v moči pomocí CE-DAD byl připraven pufr sestávající z 200 mM roztoku fosforečnanu monosodného a 200 mM octové kyseliny, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 3,8 pomocí 50 % (*w/v*) roztoku NaOH.

Separací elektrolyty pro CE-ESI-MS analýzy byly připraveny jako roztoky octové kyseliny a mravenčí kyseliny (o příslušné studované koncentraci) rozpuštěním příslušného množství v deionizované vodě. Jednotlivé hodnoty pH (3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 a 6,0) byly připraveny titrací hydroxidem amonným. Vankomycin chlorid byl poté do studovaných pufrů přidáván na konec.

8.3.5 Příprava reálných vzorků moči

Vzorky moči od 10 zdravých jedinců a dvou pacientů trpících nadměrnou exkrecí HG do moči byly před úpravou a analýzou skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmražení při laboratorní teplotě byly jednotlivé vzorky centrifugovány při 5000g po dobu 5 minut. Supernatant byl pak dále použit k analýze. V případě stanovení kreatininu metodou CE-DAD byly vzorky moči 20-krát zředěny deionizovanou vodou, která obsahovala 0,4 mM imidazol jako interní standard. Vzorky byly promíchány na vibrační míchače po dobu 1 minuty, filtrovány pomocí nylonového mikrofiltru s velikostí pórů 22 μm a poté analyzovány.

Vzorky určené pro stanovení enantiomerů HG byly zředěny 10-krát deionizovanou vodou a obdobně jako v předchozím případě promíchány na vibrační míchače a filtrovány pomocí mikrofiltru. Filtráty byly poté přímo dávkovány a analyzovány.

8.4 Výsledky a diskuse

8.4.1 Optimalizace MS detekce

Prvním krokem, který předcházel samotné optimalizaci enantioseparace, bylo nalezení vhodných podmínek pro MS detekci. Základní podmínky detekce, ze kterých vycházela optimalizace MS detekce, byly následující: sprejovací napětí -3,0 kV, tlak nebulizačního plynu 5 psi při průtoku 10 l/min a teplotě 200 °C; pomocná sprejovací kapalina sestávala z MeOH, vody a hydroxidu amonného v poměru 50:49,5:0,5 (*v/v/v*) o průtoku 4 µl/min. Jako vzorek byla použita racemická směs HG o koncentraci 500 µmol/l, přičemž podmínky separace byly zvoleny s ohledem na použitou PAA pokrytou kapiláru (EOF je eliminován) a následné využití VC jako CS. Separační elektrolyt tedy sestával z 50 mM octanu amonného o pH 4,5 a separační napětí bylo -20 kV, čímž bylo zajištěno pH při němž HG migruje jako aniont, a zároveň se jedná o pH v rozsahu použitelnosti VC pro chirální separace.

Jako první detekční mód bylo použito skenování v rozsahu *m/z* od 70 do 400, přičemž nejintenzivnější pík ve spektru byl pík s poměrem *m/z* 147, odpovídající deprotonované molekule HG ($[M-H]^-$). Před optimalizací MRM módu byly nejdříve studovány ostatní parametry MS detekce s cílem získat co nejvyšší intenzitu signálu analytu. Nejprve bylo studováno složení pomocné sprejovací kapaliny a její průtok, konkrétně byl hodnocen vliv organické složky (MeOH a propan-2-olu) na intenzitu signálu. Směsi obou organických složek s vodou a hydroxidem amonným byly testovány z hlediska intenzity signálu iontu *m/z* 147 a poměru signálu k šumu základní linie. Pomocná sprejovací kapalina obsahující MeOH, vodu a hydroxid amonný poskytovala řádově lepší výsledky, a proto byla zvolena pro další optimalizaci. Koncentrace MeOH ve směsi byla měněna z 25 na 50 a 75 % (*v/v*),

přičemž koncentrace 25 a 50 % (v/v) vedly ke snížení signálu, pravděpodobně díky negativnímu ovlivnění desolvatačního procesu v iontovém zdroji. Jako nejvhodnější byla zvolena směs MeOH a vody obsahující 50 % (v/v) MeOH. Dále byl testován vliv obsahu NH₄OH ve směsi v koncentrační řadě 0,1; 0,5 a 1,0 % (v/v). Nejlepší citlivosti (nejvyšší intenzity signálu a nejvyššího poměru signálu k šumu základní linie) bylo dosaženo při použití 0,5 % (v/v) NH₄OH. Nejvhodnější složení pomocné sprejovací kapaliny tedy bylo MeOH, voda a NH₄OH v poměrech 50:49,5:0,5 (v/v/v). Dále byl studován vliv průtoku pomocné sprejovací kapaliny na intenzitu signálu rozsahu 2 až 10 μ l/min (vždy zvýšením o 2 μ l/min). Nejlepší výsledky z hlediska intenzity signálu a poměru signálu k šumu bylo dosaženo při průtoku 6 μ l/min. Nižší průtoky vedly ke zhoršené opakovatelnosti z hlediska ploch píku analytu, vyšší průtoky pak snižovaly intenzitu signálu, pravděpodobně z důvodu ředění eluátu vystupujícího ze separační kapiláry. Průtok a tlak nebulizačního plynu byly hodnoceny v rozsahu 5 až 30 l/min (vždy zvýšením o 5 l/min) a tlak od 5 do 20 psi (opět vždy zvýšením o 5 psi). Při použití vyšších hodnot tlaku nebulizačního plynu (> 10 psi) docházelo ke snížení migračního času analytu. Tento fakt by při enantioseparaci mohl negativně ovlivňovat rozlišení jednotlivých enantiomerů, proto byl jako optimální zvolen tlak 10 psi. V případě průtoku nebulizačního plynu byla z hlediska citlivosti a opakovatelnosti migračních časů a jejich ploch zvolena hodnota 10 l/min. Vliv teploty nebulizačního plynu je rovněž kritickým parametrem při spojení CE-ESI-MS, neboť zejména termolabilní látky mohou degradovat při vyšších teplotách již v iontovém zdroji, a dochází tak ke zbytečnému snížení signálu analytů. Karboxylové kyseliny mohou při vyšších teplotách podléhat zmíněné dekompozici či fragmentaci v iontovém zdroji (tzv. *in-source decay*), proto byla optimalizace teplot prováděna pečlivě v rozsahu od 100 do 300 °C a to vždy zvýšením o 25 °C. Nižší teploty (< 150 °C) vedly k nízké intenzitě signálu, zatímco vyšší teploty (> 200 °C) již pravděpodobně vedly k termické dekompozici v iontovém zdroji a proto byl signál odpovídající deprotonované

molekule HG výrazně snižen. Jako nejvhodnější byla proto zvolena teplota 200 °C. Posledním studovaným parametrem bylo sprejovací napětí. Obecně je známo, že negativní ionizace je náchylnější k tvorbě nestabilního elektrospreje či koronovým výbojům, proto byly testovány hodnoty od -2 do -4,5 kV (vždy zvýšením o -0,5 kV). Nejvyšší intenzity signálu při zachování stability sprejování bylo dosaženo při použití -2,5 kV. Všechny optimalizované parametry MS detekce jsou shrnuty v Tabulce 8.1.

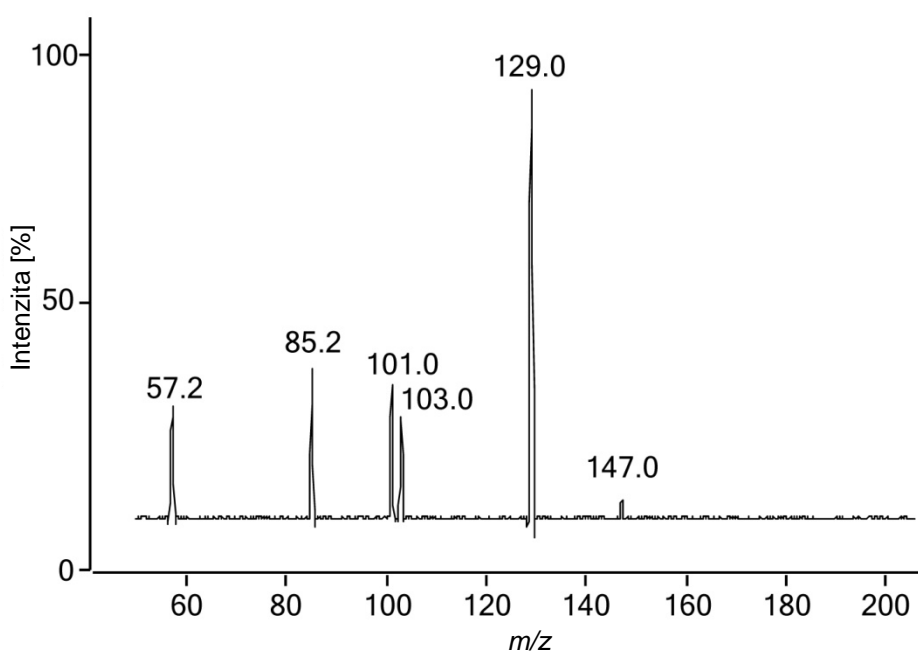
Tabulka 8.1 – Parametry ESI-MS detekce

Sprejovací napětí	- 2,5 kV
Tlak nebulizačního plynu	10 psi (1 psi = 6894,76 Pa)
Průtok nebulizačního plynu	10 l/min
Teplota plynu	200 °C
Průtok pomocné sprejovací kapaliny	6 µl/min
Složení pomocné sprejovací kapaliny	MeOH/voda/NH ₄ OH (50:49,5:0,5; v/v/v)

8.4.2 Optimalizace fragmentace v MS/MS

Citlivá kvantifikace jednotlivých enantiomerů HG a jejich objektivní identifikace pomocí ESI-MS/MS je nezbytným parametrem pro použití metody v praxi, zejména v případech, kdy jsou koncentrace jednoho či obou sledovaných enantiomerů nízké. Pro dosažení citlivé detekce je tandemová hmotnostní spektrometrie vhodná, neboť kromě identifikace umožňuje eliminovat šum základní linie (v případě MRM módu), čímž je zvýšena citlivost detekce. Optimalizace fragmentačních přechodu HG byla provedena skenem produktových iontů analytu ($m/z = 147$) při kolizních energiích 0, 2, 5, 10, 15 a 20 eV. Při fragmentaci docházelo zejména k logickým ztrátám, z nichž nejintenzivnější byl přechod m/z 147 → 129 [M-H-H₂O] ($\Delta m/z$ 18 odpovídající logické ztrátě vody). Tento přechod byl vzhledem k nejvyšší intenzitě zvolen pro účely kvantifikace. Další přechody zahrnovaly pravděpodobně ztrátu CO₂ (m/z 103), což odpovídá iontu [M-H-COO]⁻, či logické ztráty jak vody tak CO₂ (m/z 85) odpovídající

[M-H₂O-COO]⁻. Ostatní přechody odpovídaly iontům o složení [M-H-HCOOH]⁻ (*m/z* 101) a [CH₃CH₂O]⁻ (*m/z* 57). Experimentálně získané výsledky fragmentačních přechodů jsou ve velmi dobré shodě s daty publikovanými s použitím LC-ESI-MS/MS [22]. Příklad fragmentačního spektra HG při kolizní energii 10 eV je zobrazen na Obr. 8.2.



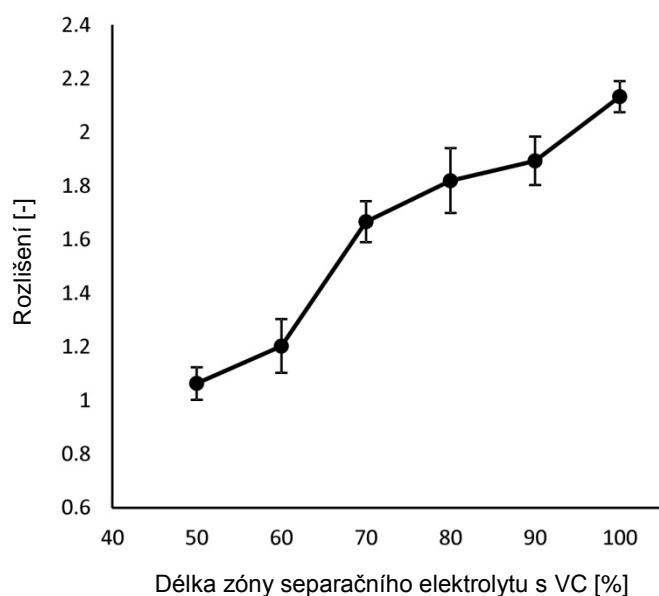
Obr. 8.2 Fragmentační spektrum HG. Podmínky MS/MS detekce: $U_{\text{ESI}} = -2,5$ kV, tlak a průtok plynu 5 psi a 10 l/min, teplota plynu 200 °C. Kolizní energie 10 eV.

8.4.3 Optimalizace enantioseparace HG

Jak již bylo zmíněno, řada dosud publikovaných prací se zabývá aplikací VC jako CS pro enantioseparaci α -hydroxykarboxylových kyselin. Z tohoto důvodu byl předpoklad, že stereospecifické interakce, které VC nabízí vedoucí k enantiorekognici budou využitelné i při enantioseparaci HG.

Separací elektrolyt na bázi 50 mM octanu amonného o pH 4,5 byl použit jako základní elektrolyt pro enantioseparaci, přičemž koncentrace VC byla 25 mM. Z důvodu zabránění kontaminace iontového zdroje netěkavým CS byl studován vliv

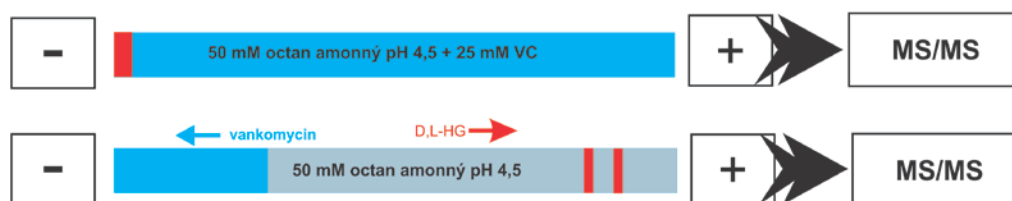
délky zóny separačního elektrolytu s obsahem VC na rozlišení (technika PFT). Separační kapilára byla vždy 15 min promývána puftrem bez obsahu VC a poté byla nadávkována zóna elektrolytu s obsahem VC o příslušné studované délce. Závislost délky zóny se separačním elektrolytem obsahujícím VC na rozlišení jednotlivých enantiomerů HG je zobrazen na Obr. 8.3. Z obrázku je zřejmé, že nejvyššího rozlišení bylo dosaženo v případě, kdy celá kapilára byla vyplněna elektrolytem obsahujícím VC. Výsledky byly ve shodě s předpokladem, že čím delší zóna separačního elektrolytu s VC bude použita, tím vyšší bude rozlišení [35]. Jak bylo uvedeno v teoretické části tento přístup je označován jako technika kompletního plnění (CTF) [36].



Obr. 8.3 Závislost rozlišení enantiomerů HG na délce zóny elektrolytu obsahující VC (25 mM). Podmínky analýzy jsou uvedeny v textu.

Experimentální uspořádání CFT pro enantioseparaci HG s využitím VC bylo uskutečněno tak, že kapilára byla zcela naplněna separačním elektrolytem s VC, a poté byl nadávkován vzorek. Během plnění kapiláry elektrolytem se selektorem byla sice kapilára umístěna v iontovém zdroji, nicméně nastavení neumožňovalo vstup případné kapaliny eluující z kapiláry dále do MS. Veškerý nadbytečný elektrolyt,

kteřý by mohl způsobit kontaminaci iontového zdroje, byl veden do odpadu (tzv. „to waste“ mód). V průběhu separace byl pak konec kapiláry při katodě ponořen do roztoku elektrolytu s VC a konec kapiláry při anodě byl umístěn v iontovém zdroji MS. Je-li pro separaci použita negativní (obrácená) polarita, pak dochází k protisměrné migraci kladně nabitého kationtu VAN⁺ a negativně nabitých enantiomerů HG v PAA pokryté kapiláře v kyselém separačním elektrolytu (EOF je zanedbatelný). V tomto uspořádání (Obr. 8.4) migruje kladně nabitý vankomycin směrem ke katodě a záporně nabité enantiomery HG směrem k anodě, tedy k MS detektoru. Použitím uvedeného experimentálního uspořádání dochází nejen k potřebné interakci mezi selektorem a enantiomery HG, ale díky migraci netěkavého VAN⁺ směrem od iontového zdroje také k prevenci jeho kontaminace. Díky protisměrné migraci VAN⁺ a enantiomerů HG mohla být využita technika CFT.



Obr. 8.4 Schematické znázornění techniky CFT a protisměrné migrace vankomycinu a jednotlivých enantiomerů HG (červené zóny). Ilustrace autora.

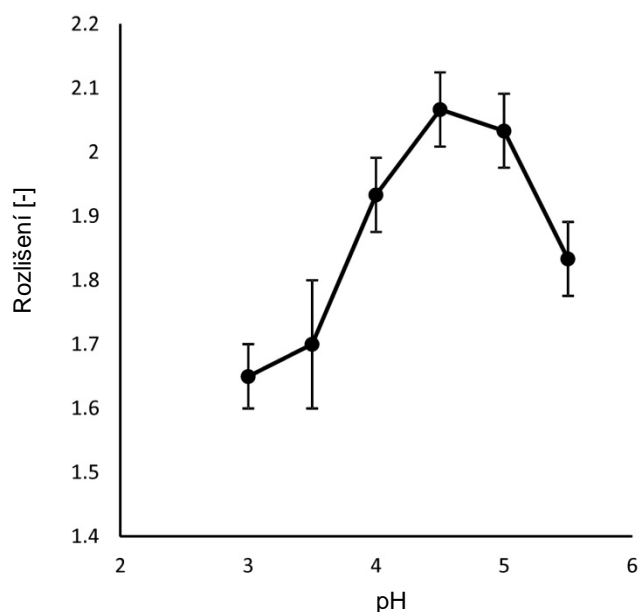
Zároveň je nutno poznamenat, že jak enantiomery tak VAN⁺ migrují s vlastní elektroforetickou mobilitou v separačním systému a separace tak probíhá mechanismem EKC.

Pro confirmaci, že nedochází při použití CFT ke kontaminaci iontového zdroje byly použity dva experimentální přístupy. První experiment spočíval v naplnění kapiláry separačním elektrolytem s 25 mM VC a aplikací separačního napětí o -25 kV. Detekce pomocí MS byla provedena v pozitivním i negativní skenovací módu v rozsahu *m/z* od 100 do 2000. Ani v jednom případě nebyly ve spektrech pozorovány žádné

ionty, které by odpovídaly kontaminaci iontového zdroje VC, či jeho addukty se sodnými či chloridovými ionty.

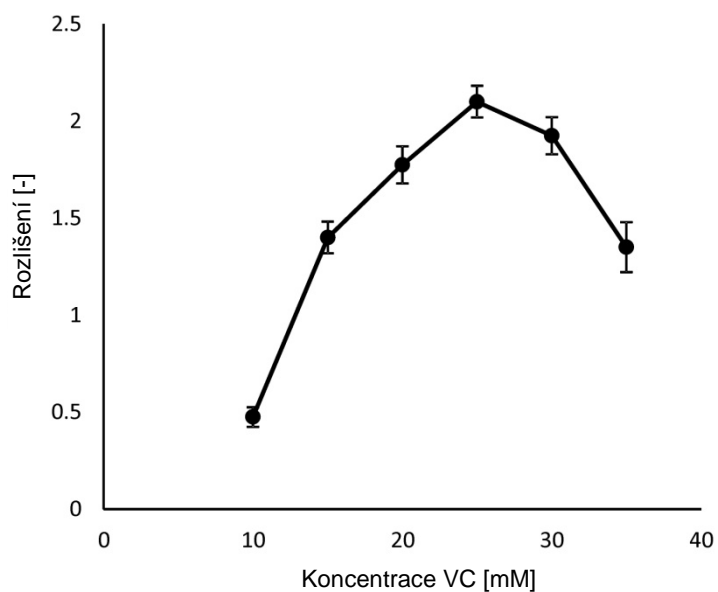
Druhý experiment spočíval v nadávkování L-HG (50 mg/l) a jeho separaci v 50 mM octanu amonném o pH 4,5 bez přídavku VC. Následně byl pro separaci L-HG použit elektrolyt s obsahem 25 mM VC. Byly porovnány plochy píků získané oběma experimenty, přičemž rozdíl jejich ploch vyjádřený jako RSD byl menší než 8 % ($n = 10$). Rovněž tyto výsledky prokázaly, že při použití zvolených experimentálních podmínek separace nedochází ke kontaminaci iontového zdroje použitým CS. Metoda CFT byla tedy dále použita pro optimalizaci dalších parametrů enantioseparace HG. Další krok spočíval ve studiu vlivu složení, koncentrace a pH separačního elektrolytu na rozlišení enantiomerů HG. Jak již bylo zmíněno v teoretické části práce, je pro spojení CE-ESI-MS nezbytné použití těkavých elektrolytů. V tomto případě byl kromě uvedeného octanu amonného testován také 50 mM mravenčan amonný o pH 4,5 s přídavkem 25 mM VC. Separační elektrolyt na bázi mravenčanu amonného však poskytoval nižší rozlišení jednotlivých enantiomerů, přičemž také došlo k poklesu účinnosti píků enantiomerů HG. Pro další část optimalizace byl tedy zvolen 50 mM octan amonný a studován byl dále vliv pH na rozlišení enantiomerů HG. Je na místě zmínit, že rozsah pH, které jsou použitelné v případě VC je poměrně úzký, neboť VC musí být ve zvoleném pH kladně nabitý a zároveň separované enantiomery HG musí naopak nést záporný náboj. Vzhledem k tomu, že HG je relativně slabá dikarboxylová kyselina s hodnotami pK_a 3,28 a 4,16 [37], slabě kyselý separační elektrolyt umožňuje disociaci enantiomerů HG a zároveň protonizaci pozitivně nabitých iontů vankomycinu. Vliv pH na rozlišení enantiomerů HG byl tedy testován v rozsahu 3,0 až 6,0 s VC o koncentraci 25 mM. Nejvyššího rozlišení a také symetrie (A_s) píků enantiomerů ($A_s = b/a$, přičemž a je vzdálenost mezi kolmicí na základní linii, která je vedena v maximu píku a přední (frontující) hranou píku v jeho 10 % výšky a b je vzdálenost mezi kolmicí v maximu píku a zadní (chvostující) hranou píku, opět v jeho

10 % výšky) bylo dosaženo při použití 50 mM octanu amonného o pH 4,5. Závislost rozlišení enantiomerů HG na pH separačního elektrolytu je zobrazena na Obr. 8.5.



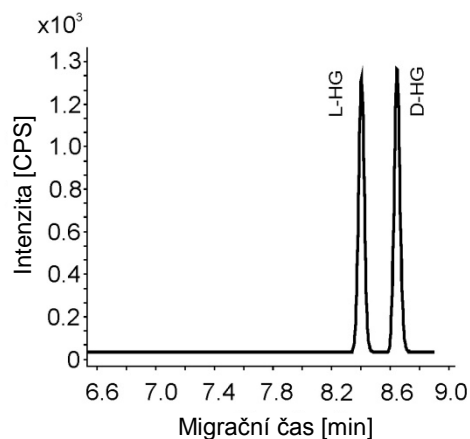
Obr. 8.5 Závislost rozlišení HG na pH v 50 mM octanu amonného s přidavkem 25 mM VC.

Důležitým parametrem, který ovlivňuje enantioseparaci je koncentrace CS. V tomto případě bylo studováno koncentrační rozmezí VC v separačním elektrolytu od 10 do 35 mM. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo při koncentraci 25 mM VC s použitím metody CFT. Migrační časy jednotlivých enantiomerů se zvyšovaly se zvyšující se koncentrací VC a maximálního rozlišení bylo dosaženo při 25 mM VC (Obr. 8.6).



Obr. 8.6 Závislost rozlišení HG na koncentraci VC v separačním elektrolytu na bázi 50 mM octanu amonného pH 4,5.

Posledním studovaným parametrem byla koncentrace octové kyseliny (v rozmezí od 10 do 100 mM) v acetátu amonném pH 4,5. Nízké koncentrace acetátu v elektrolytu způsobovaly zhoršení symetrie píků, vyšší naopak vysoký separační proud. Jako nejvhodnější separační elektrolyt byl proto zvolen 50 mM octan amonný o pH 4,5. Separace modelové racemické směsi HG za použití optimalizovaných podmínek a SIM detekčního módu MS je zobrazena na Obr. 8.7. Konečné podmínky enantioseparace HG jsou pro přehlednost shrnuty v Tabulce 8.2.



Obr. 8.7 Elektroferogram SIM záznamu enantioseparace racemické směsi HG (50 $\mu\text{mol/l}$). Podmínky separace jsou shrnuty v Tabulce 9.2.

Tabulka 8.2 – Shrnutí optimalizovaných parametrů CE-ESI-MS/MS enantioseparace HG

Sprejovací napětí	- 2,5 kV
Tlak nebulizačního plynu	10 psi (1 psi = 6894,76 Pa)
Průtok nebulizačního plynu	10 l/min
Teplota plynu	200 °C
Průtok pomocné kapaliny	6 $\mu\text{l/min}$
Složení pomocné kapaliny	MeOH/voda/hydroxid amonný (50:49,5:0,5; <i>v/v/v</i>)
Separáční elektrolyt	50 mM octan amonný pH 4,5
Separáční elektrolyt použitý při metodě CFT	50 mM octan amonný pH 4,5 s p�ridavkem 25 mM VC
Separáční kapilára	Kovalentn� pokryt� polyakrylamidem, vnitřního průměru 50 μm a celkově délky 60 cm
Dávkování	100 mbar/15s
Separáční napětí	- 25 kV
Kolizní energie při MRM módu	10 eV
SRM pro kvantifikaci D,L-HG	m/z 147 [M-H] ⁻ -> m/z 129 [M-H-H ₂ O] ⁻
SRM pro identifikaci D,L-HG	m/z 147 [M-H] ⁻ -> m/z 101 [M-H-H ₂ O] ⁻ -> m/z 85

8.5 Částečná validace metody

Validace metody byla provedena podle požadavků ICH [38]. Šest kalibračních standardů o koncentračních hladinách od 0,130 do 400 $\mu\text{mol/l}$ jednotlivých enantiomerů HG byly použity pro měření kalibračních závislostí (šestibodová kalibrační křivka, každý z bodů měřen pětkrát). K vyhodnocení kalibračních křivek bylo použito lineární regrese a metody nejmenších čtverců. Jako přijatelné kritérium byla zvolena hodnota korelačního koeficientu kalibračních křivek větší než 0,9990. Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly vypočítány pomocí poměru signálu k šumu (S/N), kdy pro LOD byla hodnota $S/N = 3$ a pro LOQ pak $S/N = 10$. Opakovatelnosti vyjádřené jako RSD ploch píků a migračních časů (*intra-day* a *inter-day*) byly vypočteny z jednotlivých měření (koncentrace každého enantiomeru byla 0,200 $\mu\text{mol/l}$), přičemž *intra-day* opakovatelnost zahrnovala deset měření a *inter-day* opakovatelnost zahrnovala šest měření v pěti po sobě jdoucích dnech. Základní validační parametry jsou shrnuty v Tabulce 8.3.

Tabulka 8.3 – Základní validační parametry metody

Parametr	L-HG	D-HG
Kalibrační křivka	$y = (163,91 \pm 0,90)x + (1,534 \pm 0,09)$	$y = (199,99 \pm 0,73)x + (10,48 \pm 0,01)$
Koeficient determinace R^2	0,99994	0,99993
LOD [nmol/l] ^a	31,0	38,0
LOQ [nmol/l] ^b	103,0	127,0
RSD opakovatelnosti migračních časů (<i>intra-day</i>) [%] ^c	4,24	4,78
RSD opakovatelnosti ploch píků (<i>intra-day</i>) [%] ^c	5,71	6,03
RSD opakovatelnosti migračních časů (<i>inter-day</i>) [%] ^d	7,34	7,65
RSD opakovatelnosti ploch píků (<i>inter-day</i>) [%] ^d	10,23	11,10

^a Vyjádřeno jako $S/N = 3$

^b Vyjádřeno jako $S/N = 10$

^c $n = 10$

^d $n = 30$

Pro evaluaci přesnosti a správnosti metody byly analyzovány QC1 a QC2 vzorky. Jejich příprava je uvedena v kapitole 8.3.3. Každý QC vzorek byl analyzován v dubletech v průběhu šesti následujících dní. Správnost byla vyhodnocena jako výtěžnosti obou enantiomerů HG v QC2 vzorku. Přesnost byla hodnocena jako hodnota RSD opakovaného stanovení enantiomerů HG v obou QC vzorcích. Přesnost a správnost metody byla nižší než 10 %. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 8.4.

Tabulka 8.4 – Správnost a přesnost metody ($n = 6$)

	Průměr [μmol/l]	RSD [%]	Výtěžnost [%]
L-HG			
QC1 ^a	7,65	5,12	-
QC2 ^b	12,54	3,03	97,8
D-HG			
QC1	9,11	6,10	-
QC2	13,96	4,96	97,0

^a Vzorek moči 1 (QC1) byl získán od zdravého jedince (s fyziologickými hodnotami jednotlivých enantiomerů),

^b vzorek 2 (QC2) byl připraven ze stejného vzorku moči jako v předchozím případě spikováním jednotlivými enantiomery HG na koncentrační hladinu 5 μmol/l.

8.5.1 Matriční efekty

Pro hodnocení vlivu matrice moči byly stanoveny výtěžnosti obou enantiomerů HG (koncentrační hladiny 10 μmol/l a 300 μmol/l pro každý enantiomer) v šesti vzorcích moči. Získané hodnoty výtěžnosti se pohybovaly mezi 90 až 110 % pro oba enantiomery HG (Tabulka 8.5). Z uvedených výsledků plyne, že stanovení hladiny obou enantiomerů HG, není potenciálními rozdíly jednotlivých vzorků moči významně ovlivněno.

Tabulka 8.5 – Výtěžnosti L- and D-HG pro koncentrace 10 a 300 $\mu\text{mol/l}$ v šesti rozdílných vzorcích moči

Enantiomer	Výtěžnost	RSD (%)
L-HG		
10 $\mu\text{mol/l}$	9,65	1,33
300 $\mu\text{mol/l}$	299,07	0,81
D-HG		
10 $\mu\text{mol/l}$	9,04	1,41
300 $\mu\text{mol/l}$	298,41	1,51

8.6 Analýza reálných vzorků

Vyvinutá metoda EKC-ESI-MS/MS enantioseparace HG byla aplikována na dva reálné vzorky moči získané od dětských pacientů trpících abnormální exkrecí HG do moči. Stejně tak byla metoda aplikována na vzorky moči zdravých jedinců s běžnými fyziologickými hladinami HG v moči. Vzorky byly připraveny tak, jak je uvedeno v části 8.3.5. Ve všech vzorcích moči pacientů byly pomocí vyvinuté metody identifikovány a stanoveny hladiny jednotlivých enantiomerů HG. Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce 8.6. Výsledky byly vztaženy na hodnotu změřené koncentrace kreatininu.

Tabulka 8.6 Výsledky stanovení D,L-HG v reálných vzorcích moči

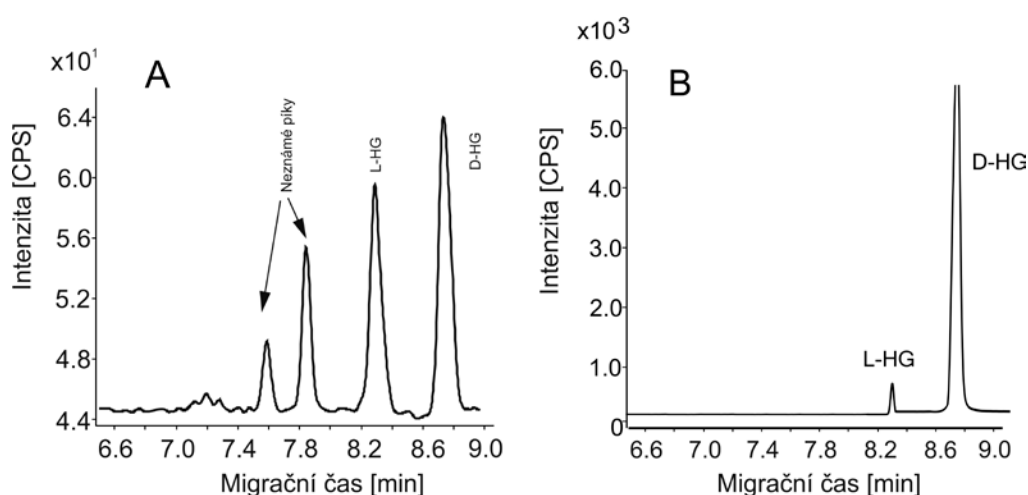
Pacient	L-HG (mmol/mol kreatininu)	D-HG (mmol/mol kreatininu)
Zdravý jedinec (průměr) ^a	1,30 – 15,78 (8,13)	2,21 – 10,52 (6,34)
Dětský pacient (1) ^b	1,13 \pm 0,42	104,5 \pm 2,1
Dětský pacient (2) ^b	2,01 \pm 0,38	2200,0 \pm 12,6

^a Koncentrace L-HG a D-HG ve vzorcích moči vyjádřené jako nalezené koncentrační rozmezí s průměrnou hodnotou uvedenou v závorce ($n = 10$).

^b $n = 5$

Výsledky stanovení enantiomerů HG v reálných vzorcích moči dobře korespondují s dosud publikovanými hodnotami a to jak z hlediska koncentrací enantiomerů HG v případě zdravých jedinců, tak v rovněž v případě pacientů se zvýšenou exkrecí některého z enantiomerů L-HG a D-HG. Publikovaná koncentrační rozmezí enantiomerů HG v moči u zdravých jedinců jsou 1,3 – 19,0 mmol/mol kreatininu pro L-HG a 2,8 – 17,0 mmol/mol kreatininu pro D-HG [5]. Uvedené výsledky u obou dětských pacientů indikují D-HGA, díky vysokým nalezeným koncentracím D-HG ve vzorcích moči. Zjištěný typ hydroxyglutarové acidurie byl dále potvrzen dalšími diagnostickými nástroji ve Fakultní nemocnici Olomouc.

Příklad SRM elektroferogramu separace moči zdravého jedince a pacienta, trpícího D-HGA je uveden na Obr. 8.7A a B.



Obr. 8.7 Rekonstruovaný SRM elektroferogram analýzy moči zdravého jedince (A) a pacienta s abnormální exkrecí L-HG (B). Podmínky měření jsou uvedeny v Tabulce 8.2.

8.7 Závěr

Vyvinutá metoda enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny pomocí EKC-ESI-MS/MS je první publikovanou metodou přímé enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny bez nutnosti derivatizačního kroku. Vankomycin chlorid v mírně kyselém separačním elektrolytu poskytuje dostatečné rozlišení enantiomerů 2-hydroxyglutarové kyseliny pro jejich spolehlivou identifikaci

a kvantifikaci s pomocí ESI-MS/MS. Technika kompletního plnění kapiláry elektrolytem s vankomycinem je vhodným experimentálním přístupem pro dosažení potřebného rozlišení. Při enantioseparaci bylo s výhodou využito širokého spektra stereoselektivních interakcí, který nabízí kladně nabitý vankomycin (zejména tvorby vodíkových vazeb, interakce dipól-dipól, van der Waalsovy síly a Coulombické interakce). Zejména Coulombické interakce hrají stěžejní roli při dosažení vysokého rozlišení enantiomerů D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny ($R_s = 2,5$) prostřednictvím protisměrné migrace navzájem opačně nabitého selektoru a separovaných enantiomerů. Enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny tak probíhá mechanismem elektrokinetické chromatografie.

Vyvinutá metoda byla validována a následně byla aplikovaná na analýzu dvou reálných vzorků moči dětských pacientů trpících abnormální exkrecí 2-hydroxyglutarové kyseliny. U obou vzorků moči byla s pomocí vyvinuté metody diagnostikována D-hydroxyglutarová acidurie. Zjištěná diagnóza byla následně potvrzena dalšími diagnostickými nástroji ve Fakultní nemocnici Olomouc. Navíc klinické projevy u obou pacientů odpovídají popsaným projevům pro D-2-hydroxyglutarovou acidurii.

8.8 Literatura

- [1] Kumps A., Duez P., Mardens Y., Clin. Chem. 48 (2002) 708-717.
- [2] Seijo-Martinez M., Navarro C., Castro del Rio M., Vila O., Puig M., Ribes A., Butron M., Arch. Neurol. 62 (2005) 666-670.
- [3] Nyhan W.L., Shelton G.D., Jakobs C., Holmes B., Bowe C., Curry C.J., Vance C., Duran M., Sweetman L., J. Child. Neurol. 10 (1995) 137-142.
- [4] Chalmers R.A., Lawson A.M., Watts R.W., J. Inherited Metab. Dis. 3 (1980) 11-15.
- [5] Duran M., Kamerling J.P., Bakker H.D., van Gennip A.H., Wadman S.K., J. Inherited Metab. Dis. 3 (1980) 109-112.
- [6] Muntau A.C., Roschinger W., Meskneschlager A., Neuropediatrics 31 (2000) 137-140.
- [7] Kranendijk M., Struys E.A., Salomons G.S., Van der Knaap M.S., Jakobs C., J. Inherit. Metab. Dis. 35 (2012) 571-587.
- [8] Ianni F., Pataj Z., Gross H., Sardella R., Natalini B., Lindner W., Lammerhofer M., J. Chromatogr. A 1363 (2014) 101-108.
- [9] Wuethrich A., Quirino J.P., Electrophoresis 37 (2016) 44-55.
- [10] Barbas C., Saavedra L., J. Sep. Sci. 25 (2002) 1190-1196.
- [11] Simó C., Garcia-Cañas V., Cifuentes A., Electrophoresis 31 (2010) 1442-1456.
- [12] Scriba G.K.E., Topics in current chemistry 340 (2013) 209-276.
- [13] Mikuš P., Chiral capillary electrophoresis in current pharmaceutical and biomedical analysis, InTech, Rijeka, 2012.
- [14] Maier V., Petr J., Knob R., Horáková J., Ševčík J., Electrophoresis 28 (2007) 1815-1822.
- [15] Armstrong D.W., Nair U.B., Electrophoresis 18 (1997) 2331-2342.
- [16] Ward T.J., Dann III C., Brown A.P., Chirality 8 (1996) 77-83.
- [17] Fanali S., Desiderio C., Schulte G., Heitmeier S., Strickmann D., Chankvetadze B., Blaschke G., J. Chromatogr. A 800 (1998) 69-76.
- [18] Tan L., Wang Y., Liu X., Ju H., Li J., J. Chromatogr. B, 814 (2005) 393-398.

- [19] Kodama S., Yamamoto A., Matsunaga A., Soga T., Minoura K., *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 371-377.
- [20] Kodama S., Yamamoto A., Matsunaga A., *Analyst* 124 (1999) 55-59.
- [21] Stryus E.A., Jansen E.E.W., Verhoeven N.M., Jakobs C., *Clin. Chem.* 50 (2004) 1391-1395.
- [22] Rashed M.S., AlAmoudi M., Aboul-Enein H.Y., *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 317-320.
- [23] Calderón C., Horak J., Lämmerhofer M., *J. Chromatogr. A*, doi: 10.1016/1.chroma.2016.05.042, v tisku.
- [24] dasNeves H.J.C., Noronha J.P., Rufino H., *Chromatogr.* 19 (1996) 161-164.
- [25] Gibson K.M., Ten Brink H.J., Schor D.S.M., Kok R.M., Bootsma A.H., Hoffmann G.F., Jakobs C., *Pediatric Research* 34 (1993) 277-280.
- [26] Kim K.R., Lee J., Ha D., Jeon J., Park H.G., Kim J.H., *J. Chromatogr. A*, 874 (2000) 91-100.
- [27] Kim K.R., Lee J., Ha D., Jeon J., Park H.G., *J. Chromatogr. A* 891 (2000), 257-266.
- [28] Muth A., Jung J.C., Bilke S., Scharrer A., Mosandl A., Sewell A.C., Bohles H., *J. Chromatogr. B* 792 (2003) 269-277.
- [29] Kaunzinger A., Rechner A., Beck T., Mosandl A., Sewell A.C., Bohles H., *J. Stereochem.* 1 (1996) 177-182.
- [30] Nejem R.M., Stefan R.I., vanStaden J.F., Aboul-Enein H.Y., *Talanta*, 65 (2005) 437-440.
- [31] Stefan R.I., Nejem W.M., van Staden J.F., Aboul-Enein H.Y., *Sens. Actuators B-Chem.* 106 (2005) 791-795.
- [32] Balss J., Pusch S., Beck A., Herold-Mende C., Krämer A., Thiede C., Buckel W., Langhans C., Okun J.G., von Deimling A., *Acta Neuropathol.* 124 (2012) 883 – 891.
- [33] Arndt T., *Forensic Sci. Int.* 186 (2009) 48–51.
- [34] Liotta E., Gottardo R., Bonizzato L., Pascali J.P., Bertaso A., Tagliaro F., *Clin. Chim. Acta* 409 (2009) 52-55.

[35] Amini A., Paulsen-Sörman U., Westerlund D., Chromatographia 50 (1999) 497-506.

[36] Amini A., Wiersma B., Westerlund D., Paulsen-Sörman U., Eur. J. Pharm. Sci. 9 (1999) 17-24.

[37] www.chemicalize.org

[38] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures, Q2(R1), verze 4, 2005.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

**SPOJENÍ ELEKTROKINETICKÉ CHROMATOGRAFIE S
HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ V TOXIKOLOGICKÉ
A KLINICKÉ ANALÝZE**

Autor práce: RNDr. Martin Švidrnoch

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

Olomouc 2016

Disertační práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v letech 2012 až 2016 pod vedením doc. RNDr. Vítězslava Maiera, Ph.D. Část práce vznikla za finanční podpory projektu Ministerstva zdravotnictví IGA MZ č. NT 13593 Objektivní diagnostika látkami typu „designer drugs“ a projektu IGA UP č. IGA_PrF_2016_016.

Spoluautoři publikací, které vznikly na základě výsledků předkládané disertační práce, potvrzují 60% a vyšší podíl autora disertační práce na publikacích, kde je autor uveden jako první v pořadí.

Cíle disertační práce

Disertační práce se zabývá novými přístupy pro separaci několika skupin látek pro forenzní a klinické účely s pomocí spojení EKC-ESI-MS/MS. Cíle disertační práce lze shrnout do následujících okruhů:

I. Vývoj a aplikace nových metod EKC-ESI-MS/MS pro toxikologickou analýzu nových syntetických drog.

- (i) Využití perfluorooktanové kyseliny jako separačního elektrolytu pro analýzu syntetických derivátů kathinonu pomocí micelární elektrokinetické chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MEKC-ESI-MS/MS). Aplikace vyvinuté metody pro analýzu biologických vzorků za účelem objektivní diagnostiky intoxikace syntetickými kathinony.
- (ii) Studium perfluoroheptanové kyseliny jako těkavého tenzidu pro separaci nových syntetických drog ze skupiny syntetických kanabinoidů metodou MEKC-ESI-MS/MS. Aplikace vyvinuté metody pro analýzu biologických vzorků za účelem objektivní diagnostiky intoxikace syntetickými kanabinoidy.

II. Vývoj a aplikace metody EKC-ESI-MS/MS pro analýzu chirálních metabolitů v klinické analýze.

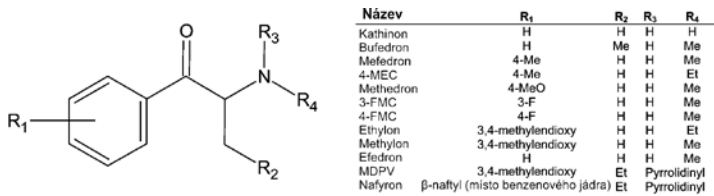
- (iii) Enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny s využitím vankomycin chloridu jako chirálního selektoru metodou EKC-ESI-MS/MS pro objektivní diagnózu hydroxyglutarových acidurií. Aplikace vyvinuté metody pro analýzu reálných vzorků pacientů.

1. Analýza syntetických derivátů katinonu pomocí MEKC-ESI-MS/MS

Současná situace v oblasti omamných a psychotropních látek (OPL), zejména díky stále se zvyšujícímu počtu odhalených výrobců či distributorů klasických známých drog, vede k rozšiřování „náhražek“ drog či tzv. nových syntetických drog (NSD). Strukturou či účinkem jsou tyto NSD podobné nelegálním drogám, nejsou však často uvedeny na seznamu OPL (většinou se jedná o látky odvozené od kontrolovaných drog s původem v Asii). Mezi léty 2007 – 2014 se výrazně zvýšil počet jednotlivých záchytů i celkového množství zajištěných NSD [1-3]. Deriváty již existujících ilegálních látek se tedy na černém trhu vyskytují *de facto* jako látky legální. Výrobci a distributoři je uživatelům často nabízejí prostřednictvím tzv. sběratelských předmětů, či je nabízejí v kamenných i internetových „Amsterdam shopech“ jako legální náhražky drog (*legal highs* či *bath salts*).

Jednou ze skupin drog patřící mezi NSD jsou deriváty katinonu (KAT). Jde o látky, které jsou distribuovány jako náhražky návykových látek namísto budivých aminů [4,5]. Jedná se tedy o látky strukturně podobné látkám amfetaminového typu (fenylethylaminy). Vzhledem k tomu, že se tyto látky vyskytují nově na ilegální drogové scéně a jejich toxicita není dostatečně prozkoumána, mohou způsobit řadu nepředvídatelných a závažných zdravotních komplikací, jak při úmyslném, či náhodném užití [6]. Mezi zdravotní komplikace spojené se zneužíváním KAT patří zejména srdeční selhání, bolest na hrudi, nucení na zvracení, změna vnímání barev, zkrácení dechu, mydriáza, halucinace a deprese. Pro včasnou terapii při intoxikaci KAT je nutné znát jak konkrétní látku, která byla užita tak i její koncentraci v biologických materiálech. Z tohoto důvodu je nutné disponovat rychlými a především citlivými analytickými metodami pro případ forenzní

a toxikologické analýzy zaměřenou na průkaz a stanovení KAT. Existuje široká řada strukturně podobných látek patřících do skupiny KAT. Struktury studovaných KAT jsou zobrazeny na Obr. 1.1. Uvedené KAT byly vybrány jako nejčastěji se vyskytující KAT na drogové scéně v EU.



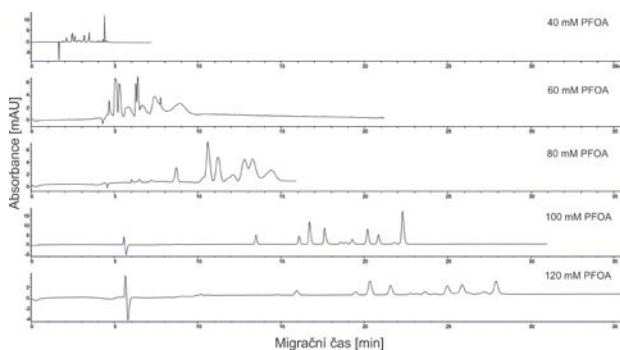
Obr. 1.1 Schéma chemických struktur studovaných KAT.

Vzhledem k podobným fyzikálně-chemickým vlastnostem KAT (blízké hodnoty pK_a , resp. elektroforetické mobility, pK_a je v rozmezí 7,1 až 8,5) nelze v těkavých elektrolytech (na bázi octanu, mravenčanu či hydrogenuhličitanu amonného nejčastěji využívaných pro CZE-ESI-MS), docílit separace většího počtu látek z této skupiny najednou. Rozmezí hodnot pK_a studovaných KAT je od 7,1 do 8,5.

Z uvedených důvodů byla pro separaci vybraných KAT zvolena metoda MEKC-ESI-MS/MS, kdy micelární fázi tvoří těkavý perfluorovaný tenzid. Ta umožňuje lepší separaci uvedených látek zejména z hlediska selektivity a v případě použití těkavých tenzidů je rovněž kompatibilní s ESI ionizací. Pro účely rychlé toxikologické analýzy je metoda částečného plnění (PFT) využívající netěkavý tenzid (např. SDS) nevhodná, vzhledem k její náročnější optimalizaci a také složitějšímu experimentálnímu uspořádání.

Perfluorované tenzidy jsou díky své volatilitě kompatibilní s ESI-MS a nezpůsobují kontaminaci iontového zdroje. Byly studovány různé koncentrace PFOA (40 – 120 mM) s konstantní koncentrací NH_4OH (200 mM) s využitím CE-DAD instrumentace. Vyšší koncentrace NH_4OH byla zvolena

z důvodu potřeby dostatečně vysoké elektroosmotické mobility, kdy pH všech separačních elektrolytů bylo přibližně 9. Na Obr. 1.2 jsou zobrazeny chromatogramy separace všech studovaných KAT při zvolených koncentracích PFOA. Z chromatogramů je patrné, že koncentrace menší než 100 mM PFOA v elektrolytu nevedou k dostatečnému rozlišení. Naopak vyšší koncentrace PFOA (120 mM) způsobují zbytečně velké rozlišení spojené se ztrátou účinnosti. Jako nejvhodnější elektrolyt pro další optimalizaci byla proto zvolena kombinace 100 mM PFOA s 200 mM NH_4OH , která poskytovala jak nejlepší rozlišení, tak zároveň nižší hodnotu a stabilitu separačního proudu ($\sim 35 \mu\text{A}$, pro kapiláru celkové délky 48,5 cm o vnitřním průměru 50 μm).



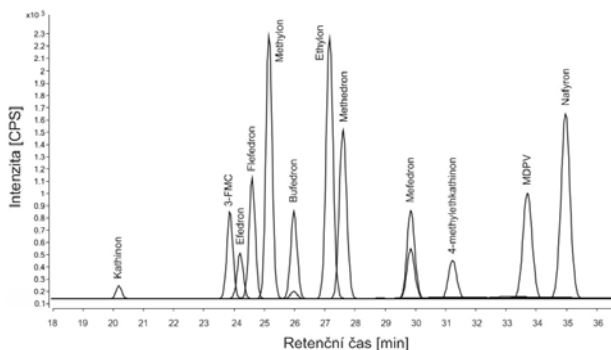
Obr. 1.2 Chromatogramy MEKC-DAD separace kationů (50 mg/l) s využitím PFOA a konstantní koncentrací NH_4OH (200 mM). Podmínky separace: $U = +12 \text{ kV}$, dávkování 100 mbar/5s, detekční vlnová délka 214 nm, celková délka kapiláry 48,5 cm, efektivní délka kapiláry 40 cm, vnitřní průměr 50 μm .

Z uvedených výsledků plyne, že elektrolyt na bázi PFOA/ NH_4OH umožňuje uskutečnit separaci studovaných KAT s využitím mechanismu MEKC. PFOA, případně další soli PFOA (Li^+ , Na^+ , K^+ či NH_4^+) mají hodnotu CMC v rozmezí 2,8 až 10,6 mmol/l [7]. Uvedené hodnoty CMC jsou tedy výrazně nižší než je

celková koncentrace PFOA v použitých elektrolytech. PFOA je ve směsi s NH_4OH plně disociovaná, takže v tomto případě PFOA tvoří negativně nabitě micely. Studované KAT v tomto případě nesou částečně kladný náboj, takže separace KAT probíhá jak na základě chromatografického mechanismu (rozdělování KAT mezi micely PFOA a okolní elektrolyt), tak na základě elektroforetického mechanismu (vlastní migrace částečně protonizovaných studovaných KAT). Jejich výsledné retenční pořadí tedy odráží jak vlastní rozdělování KAT mezi micely PFOA a vodný elektrolyt tak jejich vlastní elektroforetickou migraci. Pro transfer vyvinuté CE-DAD metody byl tedy zvolen separační elektrolyt o 100 mM koncentraci PFOA a 200 mM koncentraci NH_4OH .

Podmínky separace získané vývojem metody pomocí CE-DAD byly použity pro spojení MEKC s hmotnostní spektrometrií. Vzhledem k charakteru spojení MEKC a ESI-MS/MS však bylo nezbytné upravit některé parametry separace tak, aby mohlo být spojení s MS detekcí realizováno. I přesto, že separace KAT pomocí MEKC vedla k podstatnému zlepšení selektivity a rozlišení, nepodařilo se rozseparovat všechny studované analyty ani s využitím delší separační kapiláry v případě MEKC-ESI-MS. Kritickým párem při separaci směsi KAT byla dvojice polohových izomerů 3-FMC a 4-FMC, které se liší pouze polohou atomu fluoru na aromatickém jádře. V použitém separačním elektrolytu (100 mM PFOA ve směsi s 200 mM NH_4OH ve vodě) byla diference jejich efektivních mobilit nulová.

Nejlepšího rozlišení a tedy i separace bylo dosaženo přidávkem 2-propanolu do pracovního elektrolytu. Pro následnou optimalizaci ESI-MS/MS detekce byl tedy použit separační elektrolyt na bázi 100 mM PFOA, 200 mM NH_4OH s přidávkem 2,5 % (*v/v*) propan-2-olu. Chromatogram separace směsi studovaných KAT v uvedeném elektrolytu je na Obr. 1.3.



Obr. 1.3 Rekonstruovaný SRM chromatogram separace studovaných KAT. 100 mM PFOA, 200 mM NH_4OH s přídavkem 2,5 % (*v/v*) propan-2-olu, $U = +22$ kV, dávkování 100 mbar/8s, pomocná kapalina MeOH/ H_2O / HCOOH (50:49.5:0.5, *v/v*), průtok pomocné kapaliny 4 $\mu\text{l}/\text{min}$, $U_{\text{ESI}} = +3,5$ kV, $T = 200$ °C, 5 psi, 10 l/min.

Ostatní parametry MS detekce byly optimalizovány postupně a jsou shrnuty v Tabulce 1.1.

Tabulka 1.1 – Parametry MS detekce

Sprejovací napětí	+ 3,5 kV
Tlak nebulizačního plynu	5 psi (1 psi = 6894.76 Pa)
Průtok nebulizačního plynu	10 l/min
Teplota plynu	185 °C
Průtok pomocné kapaliny	4 $\mu\text{l}/\text{min}$
Složení pomocné kapaliny	MeOH/voda/kyselina mravenčí (50:49,5:0,5; <i>v/v/v</i>)
Detekční mód	SRM

Fragmentační spektra byla získána měřením produktových iontů přímým nástřikem standardu dané látky o koncentraci 10 mg/l ve vodě. Při měření

byla použita kolizní energie 2, 5, 10 a 15 eV a ze získaných spekter produktových iontů byly vybrány nejintenzivnější fragmentační přechody, jejichž kolizní energie byla dále optimalizována pro účely kvantitativní i kvalitativní analýzy. Fragmentační přechody spolu s nevhodnější kolizní energií jsou uvedeny v Tabulce 1.2.

Tabulka 1.2 – Fragmentační přechody studovaných KAT

Název	M _r	Prekurzorový ion [M+H] ⁺	Produktový ion (m/z) ^a	Kolizní energie [eV]
Kathinon	149,20	150,20	<u>117</u> , 133	15
3-FMC	181,21	182,21	<u>164</u> , 149	15
Efedron	164,21	164,21	<u>146</u> , 131	15
Flefedron	181,21	182,21	<u>164</u> , 149	5
Methylon	207,22	208,22	<u>160</u> , 190	15
Bufedron	177,24	178,24	<u>160</u> , 131, 145, 91	5
Ethylon	221,25	222,25	<u>174</u> , 72, 204	15
Methedron	193,24	194,24	<u>176</u> , 145, 161	5
Mefedron	177,24	178,24	<u>145</u> , 119, 160	15
4-MMethylethkathinon	192,27	192,27	<u>174</u> , 119, 146	15
MDPV	275,35	276,35	<u>205</u> , 126, 175	15
Nafyron	281,39	282,39	<u>141</u> , 126, 211	15

^a Podtržené produktové ionty s nejvyšší intenzitou byly použity pro účely kvantitativní analýzy.

Ostatní produktové ionty sloužily k identifikaci analytů.

Vyvinutá MEKC-ESI-MS/MS metoda byla částečně validována pro potřeby potenciální aplikace ve forenzní či klinické toxikologii pro analýzu moči. Vzhledem k tomu, že očekávané koncentrační hladiny studovaných KAT v moči jsou velice nízké (řádově desítky až stovky ng/ml) je nutné před vlastní

MEKC-ESI-MS/MS analýzu zařadit prekoncentrační krok – v tomto případě extrakci pevnou fází (SPE).

Hodnocené validační parametry zahrnovaly linearitu metody, správnost, přesnost vyjádřenou jako opakovatelnost retenčních časů a ploch pík jednotlivých analytů, limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), výtěžnost SPE extrakce a matriční efekt. Lineární dynamický rozsah a kalibrační závislosti byly testovány na koncentračních hladinách 10 – 5000 ng/ml (6 koncentračních hladin), přičemž každý kalibrační bod byl měřen pětkrát. Příslušné rovnice kalibračních křivek a jejich korelační koeficienty byly vypočítány pomocí metody nejmenších čtverců. LOD a LOQ byly vypočítány z rovnic kalibračních křivek pomocí statistického softwaru QC.Expert 3.3 (TriloByte, Pardubice) s použitím metodologie dle ISO (ISO 11843-2:2000) [8]. Obvyklá metoda výpočtu LOD a LOQ založená na poměru signálu k šumu základní linie nebyla pro případ detekce pomocí SRM módu vhodná, neboť ze samotné podstaty selektivního měření byl šum základní linie zanedbatelný [9]. Rovnice kalibračních závislostí, korelační koeficienty a hodnoty LOD a LOQ po SPE extrakci pro jednotlivé studované KAT jsou uvedeny v Tabulce 1.3. Přesnost vyvinuté metody byla vyjádřena jako procentuální výtěžnost mezi měřenou a teoretickou hodnotou koncentrace jednotlivých KAT ($n = 5$). Správnost (*intra-day* a *inter-day*) byla vyjádřena jako hodnota opakovatelnosti výtěžnosti pro pět opakovaných měření v jednom dni pro vybranou koncentrační hladinu (*intra-day*) a pro jednotlivá opakovaná měření v pěti po sobě jdoucích dnech (*intra-day*).

Tabulka 1.3 – Validační parametry vyvinuté metody (část 1).

Analyt	Regresní křivka ($y = ax + b$)		Korelační koeficient	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/mL]
	Směrnice	Posunutí			
Kathinon	145,52	18,42	0,9753	67	99
Efedron	492,05	109,44	0,9922	37	55
Bufedron	942,26	278,08	0,9859	49	73
Mefedron	1502,90	475,18	0,9867	19	26
3-FMC	831,46	159,06	0,9932	10	13
Flefedron	1155,20	226,02	0,9933	30	43
4-methylethkathinon	776,25	241,25	0,9897	43	63
Methedron	624,12	173,28	0,9815	16	23
Methylon	2082,20	229,68	0,9920	64	86
Ethylon	1981,20	369,94	0,9880	78	106
MDPV	1348,60	331,50	0,9875	12	26
Nafyron	2529,30	316,55	0,9956	47	64

Pro zjištění matričního efektu byla provedena SPE extrakce vzorků moči bez obsahu studovaných látek a poté byly tyto extrakty fortifikovány všemi studovanými KAT na koncentrační hladiny 120, 250 a 500 ng/ml. Takto připravené vzorky byly analyzovány vyvinutou metodou a výsledné plochy píků byly porovnány s plochami píků získaných při analýze čistých standardů o stejných koncentracích. Relativní matriční efekt byl pro všechny studované KAT menší než 12 %.

Výtěžnost SPE extrakce byla počítána z porovnání ploch pro jednotlivé studované KAT po SPE extrakci a ploch pro jednotlivé studované KAT před SPE extrakci na stejné koncentrační hladině (300 ng/ml). Hodnoty výtěžností jsou spolu s dalšími validačními parametry, jako je správnost, přesnost a opakovatelnosti retenčních časů studovaných KAT uvedeny v Tabulce 1.4.

Tabulka 1.4 - Validační parametry vyvinuté metody (část 2.)

Analyt	t _R RSD [%]	Výtěžnost [%] ^a	Výtěž- nost [%] ^b	Správ- nost [%] ^c	Intra- day RSD [%] ^d	Inter-day RSD [%] ^c
Kathinon	1,71	77,5 ± 5,3	84,4 ± 1,9	92	2,3	4,7
3-FMC	1,68	34,0 ± 11,0	56,3 ± 5,7	95	2,2	4,7
Efedron	1,79	85,5 ± 13,9	97,6 ± 12,8	101	1,6	6,1
Flefedron	1,73	63,2 ± 11,0	83,9 ± 10,5	92	3,1	6,8
Methylon	1,80	87,0 ± 6,8	99,7 ± 10,2	100	3,1	5,3
Bufedron	1,67	65,0 ± 7,8	77,4 ± 11,7	93	3,1	5,8
Ethylon	1,63	84,3 ± 9,5	92,3 ± 6,0	99	2,7	6,1
Methedron	1,70	137,0 ± 11,0	153,3 ± 8,2	94	3,3	4,1
Mefedron	1,55	84,4 ± 1,9	110,6 ± 7,8	92	3,1	5,3
4-Methyleth- kathinon	1,42	126,4 ± 13,0	144,6 ± 4,8	99	3,0	3,8
MDPV	1,00	39,5 ± 2,00	37,6 ± 1,0	96	3,2	5,2
Nafyron	0,91	25,5 ± 6,40	28,7 ± 0,8	97	2,8	4,6

^a Hodnoty výtěžnosti byly stanoveny na koncentrační hladině 300 ng/ml
přímým srovnáním ploch
píků po extrakci moči a ploch píků standardů.

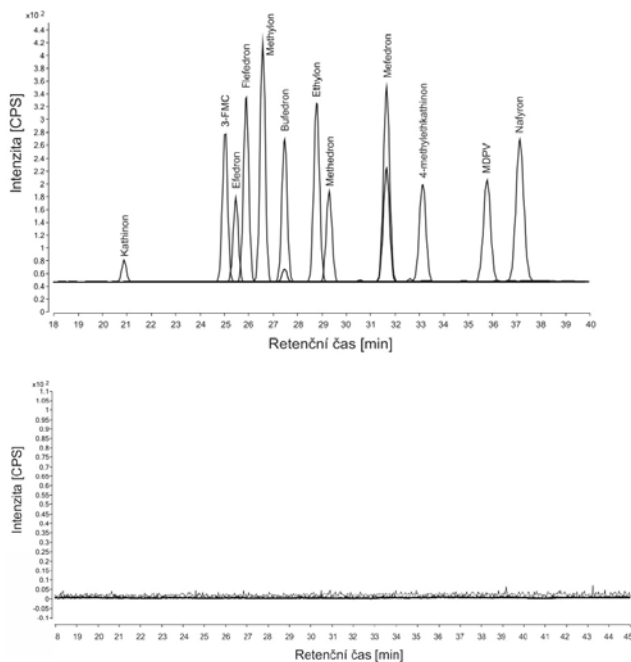
^b Hodnoty výtěžnosti byly stanoveny na koncentrační hladině 300 ng/ml
přímým srovnáním ploch
píků po extrakci z vody a ploch píků standardů.

^c $n = 5$

^d $n = 25$

Vyvinutá MEKC-ESI-MS/MS metoda extrakce, separace, identifikace a kvantifikace studovaných KAT byl aplikována na analýzu modelového spikovaného vzorku moči. Skutečný reálný vzorek nebyl v době publikace vyvinuté metody dostupný. S využitím popsaného SPE extrakčního postupu

byla provedena analýza slepého vzorku moči a spikované moči. Chromatogramy slepého i spikovaného vzorku moči jsou zobrazeny na Obr. 1.4.



Obr. 1.4 Rekonstruované MRM chromatogramy MEKC-ESI-MS/MS analýzy slepého vzorku moči (A.) a spikovaného vzorku moči (B.) na koncentrační úrovni 300 ng/ml po SPE extrakci.

Prezentovaná metoda MEKC-ESI-MS/MS separace dvanácti KAT, látek spadajících do oblasti NSD, byla aplikována na analýzu spikovaného vzorku moči pro demonstraci potenciální využitelnosti metody pro forenzní a klinicko-toxikologické účely. PFOA byla využita jako micelární složka pracovního elektrolytu, takže separace studovaných KAT probíhala s pomocí mechanismu MEKC. Využitím PFOA pro separace KAT byla vyřešena

nedostatečná selektivita CZE separace KAT s použitím těkavých elektrolytů na bázi mravenčanu či octanu amonného. PFOA tvoří při použité koncentraci (100 mM) negativně nabitě micely, které svými vlastnostmi nahrazují netěkavé tenzidy (zejména SDS), které pro spojení MEKC-ESI-MS/MS bez využití metody PFT nejsou vhodné. Kontinuální elektrolytový systém, kdy je složení pracovního elektrolytu stejné ve vstupní (inlet) vialce i v celé separační kapiláře je experimentálně nenáročný a vhodný pro screeningové analýzy. PFOA jakožto těkavý tenzid nezpůsobuje významné potlačení odezvy detekovaných KAT ani kontaminaci iontového zdroje. Využití MS/MS pak umožňuje spolehlivou identifikaci jednotlivých KAT v biologickém materiálu. Dosažené hodnoty LOD po SPE extrakci KAT z moči jsou srovnatelné s publikovanými metodám GC-MS analýzy KAT, kdy je ovšem nutná derivatizace.

Metodu lze samozřejmě využít i pro separaci a identifikaci KAT v zachycených vzorcích (tablety, prášky, psaníčka, apod.) distribuovaných drog na drogové scéně, a stejně tak i v jiných typech biologického materiálu. Výsledky obsaženy v této práci byly publikovány v časopise *Journal of Chromatography A* [10].

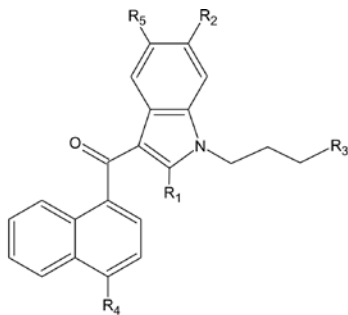
2. Objektivní diagnostika intoxikace vybranými SC pomocí MEKC-ESI-MS/MS

Syntetické kanabinoidy (SC) jsou další z rozšiřujících se skupin syntetických halucinogenů, které ačkoli mají podobné fyziologické účinky na organismus, jsou strukturně zcela odlišné od přírodních kanabinoidů [11]. Značné množství dodnes popsaných SC, z nichž řada je strukturně podobných, stěžuje jejich identifikaci při toxikologické a forenzní analýze. Do jisté míry neprostudovaný metabolismus a farmakokinetika některých SC navíc komplikují interpretaci získaných dat.

SC jsou metabolizovány ve značné míře a rovněž řada jejich metabolitů vykazuje sekundární fyziologickou aktivitu. Řada metabolických procesů a odpovídající metabolity nejsou u velké části SC stále popsány. Existuje několik prací, které se zabývaly studiem vybraných SC v lidském organismu [12-14]. Objektivní diagnostika intoxikací vyvolanými zneužíváním SC je v běžných toxikologických a klinických laboratořích téměř nemožná, protože dosud neexistují rutinní metody pro screening SC a jejich metabolitů v biologickém materiálu. Jeden z možných přístupů pro screening SC v biologickém materiálu je využití vysoce účinných separačních metod spojených s hmotnostní spektrometrií. Kromě účinné a selektivní separace SC je totiž nutno také klást důraz na jejich spolehlivou identifikaci a citlivou detekci.

Cílem této práce bylo vyvinout jednoduchou metodu pro separaci, identifikaci a kvantifikaci vybraných SC a jejich metabolitů pomocí MEKC-ESI-MS/MS bez experimentálních omezení (zejména bez nutnosti využít PFT) ve vzorcích krevního séra a moči.

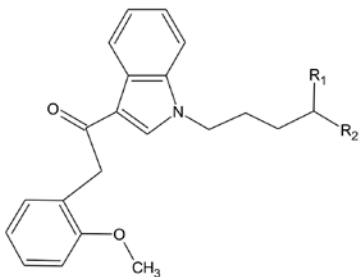
Studované SC a jejich metabolity, které byly předmětem této části dizertační práce, jsou schematicky zobrazeny na Obr. 2.1.



JWH-018, 019, 073 a jejich metabolity

Název	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
JWH-018	H	H	Et	H	H
JWH-018 2-hydroxyindol metabolit	OH	H	Et	H	H
JWH-018 6-hydroxyindol metabolit	H	OH	Et	H	H
JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) metabolit	H	H	CH ₂ -OH	H	H
JWH-018 N-pentanová kyselina metabolit	H	H	CH ₂ -COOH	H	H
JWH 019 5-hydroxyindol metabolit	H	H	Pr	H	OH
JWH 019 N-(6-hydroxyhexyl) metabolit	H	H	PrOH	H	H
JWH-073	H	H	Me	H	H
JWH-073 5-hydroxyindol metabolit	H	H	Me	H	H
JWH-073 6-hydroxyindol metabolit	H	OH	Me	H	H

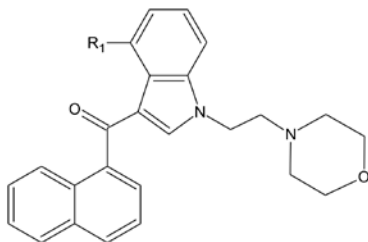
Zkratky: OH - hydroxyl; Me - methyl; Et - ethyl; Pr - propyl;
PrOH - hydroxypropyl; COOH - karboxyl



JWH-250 and jeho metabolity

Název	R ₁	R ₂
JWH-250	H	Me
JWH-250 N-(5-karboxypentyl) metabolit	H	COOH
JWH-250 N-(5-hydroxypentyl) metabolit	OH	Me

Zkratky: OH - hydroxyl; Me - methyl; COOH - karboxyl



JWH-210 a jeho metabolit

Název	R ₁
JWH-200	H
JWH-200 4-hydroxyindol metabolit	OH

Zkratka: OH - hydroxyl

Obr. 2.1 Schéma chemických struktur studovaných SC a jejich metabolitů.

Metabolity jednotlivých SC se často liší pouze polohou substituentů na indolovém skeletu, popřípadě na alifatické části vázané na dusík indolu. Díky tomu je obtížně jednotlivé metabolity identifikovat, neboť jejich poměr m/z je izobarický. Při studiu fragmentace byly odečítány intenzity jednotlivých produktových iontů v závislosti na použité kolizní energii (0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40 eV). Nejvyšších intenzit signálů produktových iontů ve spektru bylo dosaženo při hodnotách kolizní energie 20 – 30 eV. Jednotlivé produktové ionty včetně příslušné kolizní energie jsou shrnuty v Tabulce 2.1.

Tabulka 2.1 – Fragmentační přechody studovaných SC a jejich metabolitů

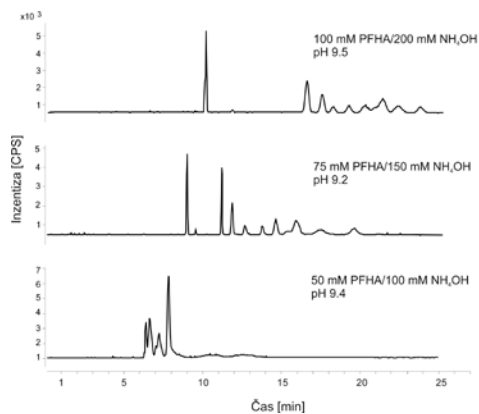
Název	M_r	Precursorový ion (m/z) [M+H] ⁺	Produktové ionty (m/z) ^a	KE ^b [eV]
JWH-250 <i>N</i> -(5-karboxypentyl)	365,42	366,5	<u>121</u> , 91, 55	25
JWH-073 2-hydroxyindol	343,42	344,4	<u>270</u> , 155, 127	30
JWH-018 <i>N</i> -pentanová kyselina	371,43	372,5	<u>155</u> , 127	25
JWH-250 <i>N</i> -(5-hydroxypentyl)	351,44	352,5	<u>121</u> , 216, 91,65	25
JWH-200	384,47	385,5	<u>155</u> , 127, 114, 84	20
JWH-200 4-hydroxyindol	400,47	401,5	<u>155</u> , 127, 114, 70	25
JWH-018 <i>N</i> -(4-hydroxypentyl)	357,44	358,4	155, 340, <u>270</u> , 252	25
JWH-019 <i>N</i> -(6-hydroxyhexyl)	371,47	372,5	<u>155</u> , 127	25
JWH-073 6-hydroxyindol	343,42	344,4	<u>155</u> , 230, 127	25
JWH-073 5-hydroxyindol	343,42	344,4	<u>155</u> , 216, 127	25
JWH-018 6-hydroxyindol	357,44	358,4	<u>155</u> , 230, 127, 77	25
JWH-073	327,42	328,4	<u>155</u> , 200, 127	25
JWH-250	335,44	336,4	<u>121</u> , 200, 144, 91	25
JWH-018	341,45	342,5	<u>155</u> , 214, 127	25
JWH-019 5-hydroxyindol	371,47	372,5	<u>155</u> , 244, 127	25

^a Podtržené produktové ionty s nejvyšší intenzitou byly použity pro účely kvantitativní analýzy. Ostatní produktové ionty sloužily k identifikaci jednotlivých analytů.

^b Kolizní energie.

Na základě předchozí experimentální zkušenosti s micelární fází na bázi PFOA byl nejdříve studován separační elektrolyt obsahující PFOA a NH_4OH v různých koncentracích. Rozmezí koncentrací v případě PFOA bylo 50, 75, 100 a 150 mM, koncentrace NH_4OH pak byly 100, 150, 200 a 300 mM (vždy v koncentračním poměru 1:2). Díky tomuto složení měly elektrolyty dostatečně vysoké pH (v rozmezí 9,0 – 9,5), což vedlo ke generaci dostatečně rychlého EOF nutného pro MEKC separaci s využitím normální polarita separačního napětí. Avšak ani při použití MEKC s PFOA jako tčavého tenzidu nebylo dosaženo dostatečného rozlišení studovaných molekul.

Interakce mezi SC a micelami PFOA byly pravděpodobně příliš silné, což vedlo k velmi dlouhým retenčním časům (až 50 minut), nízké účinnosti píků a nedostatečnému rozlišení. I když byla PFOA v práci jiných autorů použita k separaci SC a jejich metabolitů [15], v tomto případě její využití nevedlo k uspokojivým výsledkům ani s přidavkem organických rozpouštědel (ACN, MeOH, propan-1-ol, propan-2-ol). Předpoklad silné interakce SC s micelární fází na bázi PFOA vedl k hypotéze využít perfluorovanou kyselinu s kratším uhlovodíkovým řetězcem (PFHA), která je také schopná tvořit ve vodném prostředí micely. Vzhledem ke kratšímu uhlovodíkovému řetězci byla očekávána slabší interakce se separovanými analyty. Na rozdíl od PFOA má PFHA vyšší hodnotu CMC, která je v rozmezí 25,0 – 32,8 mmol/l (v závislosti na použité metodě stanovení). Studované koncentrace PFHA byly zvoleny v podobném rozmezí jako v případě PFOA, tedy 50, 75, 100 a 150 mM při zachování stejného poměru koncentrace NH_4OH (1:2). Separace směsi SC v separačních elektrolytech obsahujících různé koncentrace PFHA je zobrazena na Obr. 2.2.

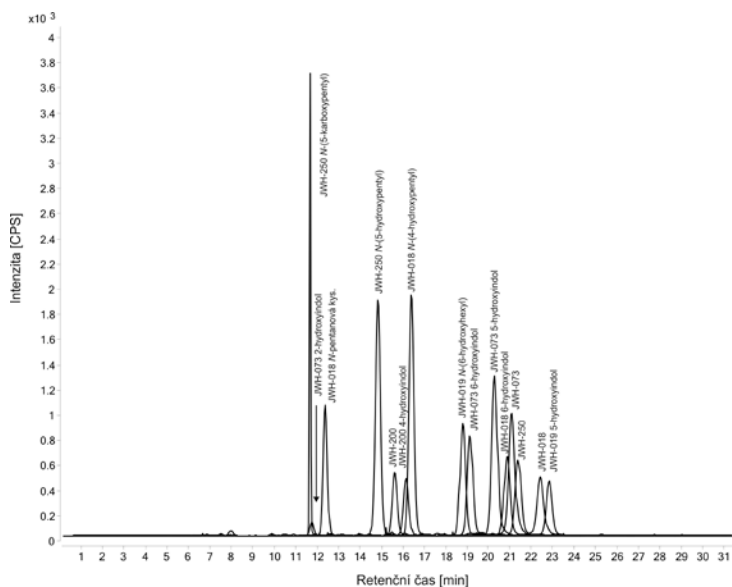


Obr. 2.2 Rekonstruované SRM chromatogramy MEKC-ESI-MS/MS separace 15 SC a jejich metabolitů v separačním elektrolytu s různou koncentrací PFHA. Separační napětí +15 kV, dávkování 50 mbar/8s.

Nejvhodnější separační elektrolyt byl tedy tvořen směsí 75 mM PFHA a 150 mM NH_4OH . Další optimalizace s cílem dosáhnout separace všech SC zahrnovala studium vlivu organického modifikátoru. V tomto případě byly jako organické modifikátory studovány ACN, MeOH a propan-2-ol v rozmezí 1 – 15 % (v/v). Přidávky ACN ani MeOH nevedly ke zlepšení selektivity separace, docházelo pouze k prodlužování celkové doby analýzy, přičemž rozlišení i retenční pořadí zůstalo zachováno.

Přídavek propan-2-olu nevedl k výrazné změně průběhu separace až do hodnoty 8 % (v/v). Poté byly přídávky pečlivě optimalizovány vždy zvýšením o 0,5 % (v/v) propan-2-olu v elektrolytu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 10 % (v/v). Dalším studovaným parametrem separace bylo separační napětí, které bylo testováno v rozsahu +15 až +25 kV (v řadě 15, 18, 20, 22 a 25 kV). Z hlediska separace a především její účinnosti bylo jako optimální napětí zvoleno +22 kV. Optimalizovaný separační elektrolyt o složení 75 mM PFHA, 150 mM NH_4OH a 10 % (v/v) propan-2-olu byl použit

pro MEKC-ESI-MS/MS analýzu patnácti SC a jejich metabolitů. Rekonstruovaný SRM chromatogram separace všech patnácti SC a jejich metabolitů je zobrazen na Obr. 2.3. Z chromatogramu je zřejmé, že micelární separační systém ve spojení s ESI-MS/MS detekcí umožňuje separovat všechny studované látky.



Obr. 2.3 Rekonstruovaný SRM chromatogram separace studovaných SC a jejich metabolitů. Podmínky: separační elektrolyt 75 mM PFHA, 150 mM NH_4OH a 10 % (*v/v*) propan-2-olu, $U = +22$ kV, injekce vzorku 50 mbar/8s, $U_{\text{ESI}} = +3,5$ kV, $T = 200$ °C, průtok nebulizačního plynu 10 l/min, tlak nebulizačního plynu 5 psi, pomocná sprejovací kapalina MeOH/voda/HCOOH (50:49,5:0,5, *v/v/v*), průtok sprejovací kapaliny 8 $\mu\text{l}/\text{min}$.

V rámci vývoje metody byly testovány dva typy extrakčních postupů, jejichž cílem bylo přechištění vzorku od matrice a zakonzentrování studovaných SC a jejich metabolitů. Vzhledem k relativně málo polárnému charakteru SC byla jako první testována SPE extrakce (kolonky se sorbentem C8 a C18)

s předpokládanou retencí SC a jejich metabolitů na nepolárním sorbentu po úpravě pH. Výtěžnosti jednotlivých SC byly pro obě použité kolonky velmi variabilní, v případě kolonky C8 bylo extrahované množství analytů pod limitem detekce. Kolonka C18 sice umožňovala extrakci všech SC, nicméně jednotlivé výtěžnosti byly v mnoha případech příliš nízké pro praktickou aplikaci metody. Vzhledem k neuspokojivým výsledkům tedy dále nebyla SPE metoda studována ani pro vzorky séra.

Jako další extrakční postup byla zvolena LLE, využívající rozdílné distribuce analytů mezi vodnou a organickou fází. V tomto případě byl jako organická fáze zvolen *tert*-butyl(methyl)ether. Pro tento případ byly vzorky rozděleny do dvou skupin podle matrice. Moč byla spikována pouze metabolity SC a sérum bylo naopak spikováno pouze původními nemetabolizovanými SC. Výhoda použité organické fáze zároveň spočívala v tom, že zároveň plnila úlohu deproteinačního činidla. Navíc vzhledem k většímu objemu vzorku použitého k extrakci (5 ml) je možné provést prekoncentraci analytů i při podstatně nižších koncentračních hladinách. Objem vzorku určeného k extrakci navíc není teoreticky v případě moči omezen a je-li dostupné větší množství moči, lze prekoncentrační faktor dále navýšit. Z tohoto důvodu byla LLE metoda testována na dvou koncentračních hladinách a to 15 ng/ml a 150 ng/ml. Výtěžnost LLE se pak pohybovala v rozmezí od 78,1 do 103,6 % pro vzorky moči a od 71,9 do 100,2 % pro sérum (na koncentrační hladině analytů 15 ng/ml). LLE extrakce pak byla dále použita při parciální validaci vyvinuté MEKC-ESI-MS/MS metody. Hodnoty výtěžnosti jednotlivých SC pro obě koncentrační hladiny jsou uvedeny v Tabulce 2.2.

Tabulka 2.2 – Výtěžnosti LLE extrakcí (*n* = 5); (m) = moč, (s) = krevní sérum

Analyt	Výtěžnost [%]	
	15 ng/ml	150 ng/ml
JWH-250 <i>N</i> -(5-karboxypentyl) (m)	103,6	95,6
JWH-073 2-hydroxyindol (m)	86,8	83,25
JWH-018 <i>N</i> -pentanová kyselina (m)	80,1	77,2
JWH-250 <i>N</i> -(5-hydroxypentyl) (m)	97,1	88,9
JWH-200 (s)	83,0	78,5
JWH-200 4-hydroxyindol (m)	97,7	92,1
JWH-018 <i>N</i> -(4-hydroxypentyl) (m)	98,5	90,8
JWH-019 <i>N</i> -(6-hydroxyhexyl) (m)	78,1	75,6
JWH-073 6-hydroxyindol (m)	101,3	99,2
JWH-073 5-hydroxyindol (m)	91,0	94,3
JWH-018 6-hydroxyindole(m)	101,5	97,5
JWH-073 (s)	76,4	78,5
JWH-250 (s)	71,9	81,5
JWH-018 (s)	100,2	95,4
JWH-019 5-hydroxyindol (m)	84,1	89,5

Po nalezení vhodných podmínek pro extrakci a MEKC-ESI-MS/MS analýzu studovaných SC a jejich metabolitů byla provedena parciální validace vyvinuté metody s ohledem na základní validační parametry, které zahrnovaly selektivitu metody, lineární kalibrační rozsah jednotlivých SC, limity LOD a LOQ, přesnost a správnost, matriční efekt a v neposlední řadě také evaluaci extrakční výtěžnosti. Selektivita byla hodnocena na základě analýzy pěti slepých vzorků krevního séra a pěti slepých vzorků moči. Všechny vzorky byly analyzovány vyvinutou MEKC-MS/MS metodou s negativním výsledkem z hlediska přítomnosti možných endogenních interferujících látek. Linearita kalibračního rozsahu byla stanovena pomocí spikovaných vzorků séra a moči po provedení extrakčního kroku a to v rozsahu šestibodové kalibrační metody od 10 ng/ml po 200 ng/ml. Každý z kalibračních bodů byl měřen vždy pětkrát. Jako kritická hodnota pro validitu

kalibrační závislosti byl zvolen korelační koeficient pro všechny studované SC větší nebo roven 0,990.

Hodnoty LOD a LOQ byly stanoveny jako trojnásobek, respektive desetinásobek poměru signálu k šumu. Příslušné rovnice kalibračních křivek, korelačních koeficientů, limitů detekce a kvantifikace jsou shrnuty v Tabulce 2.3. V případě správnosti metody bylo použito vyjádření procentuální výtěžnosti mezi hodnotou naměřenou a teoretickou hodnotu koncentrace všech SC ($n = 5$). Přesnost metody byla vyjádřena pomocí RSD retenčních časů a ploch píků pro pět opakovaných měření na každé koncentrační hladině (15, 50 a 150 ng/ml) v rámci jednoho dne (*intra-day*) a pro pět po sobě jdoucích dní ($n = 25$, *inter-day*). Hodnoty *intra-day* opakovatelnosté pro všechny studované kontrace byly nižší než 5 % a hodnoty *intra-day* opakovatelností byly nižší než 10 %.

Tabulka 2.3 – Validační parametry metody pro vzorky krevního séra (s) a moči (m)

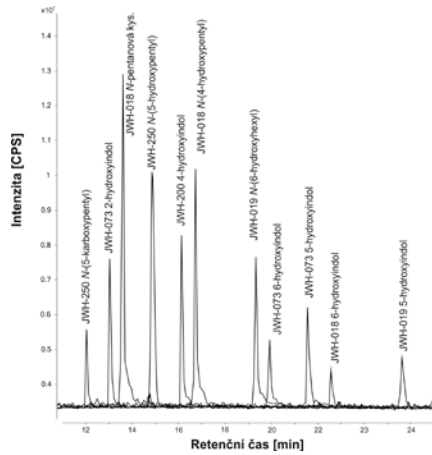
Analyt	Regresní křivka ($y = ax + b$)		Koefficient determinace R^2	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
	Směrnice	Posunutí			
JWH-250 N-(5-karboxypentyl) (m)	50,63	135,58	0,9989	1,8	6,0
JWH-073 2-hydroxyindol (m)	3,51	12,10	0,9872	2,9	9,7
JWH-018 N-pentanová kyselina (m)	67,23	-134,93	0,9999	1,3	4,3
JWH-250 N-(5-hydroxypentyl) (m)	102,29	341,39	0,9987	1,1	3,7
JWH-200 (s)	29,15	214,73	0,9937	3,0	10,0
JWH-200 4-hydroxyindol (m)	36,22	152,17	0,9973	2,5	8,3
JWH-018 N-(4-hydroxypentyl) (m)	121,78	610,79	0,9920	0,9	3,0
JWH-019 N-(6-hydroxyhexyl) (m)	94,01	-60,92	0,9920	1,0	3,3
JWH-073 6-hydroxyindol (m)	61,66	267,57	0,9964	1,5	5,0
JWH-073 5-hydroxyindol (m)	100,25	283,43	0,9975	1,2	4,0
JWH-018 6-hydroxyindol (m)	60,67	-26,91	0,9992	1,7	5,7
JWH-073 (s)	137,18	-760,50	0,9962	0,9	3,0
JWH-250 (s)	59,06	-206,51	0,9998	1,8	6,0
JWH-018 (s)	59,63	-142,08	0,9994	1,1	3,7
JWH-019 5-hydroxyindol (m)	54,76	-355,21	0,9975	2,0	6,7

Matриční efekt moči a krevního séra byl hodnocen z hlediska plochy píků, kdy byly analyzovány spikované vzorky v obou maticích, z nichž první řada byla extrahována pomocí LLE, a druhá řada byla analyzována bez extrakčního kroku. Kontrolní řada byla získána analýzou SC v desetkrát ředěném separačním elektrolytu, kde byla koncentrace SC na stejné koncentrační hladině jako obou studovaných matic. Získané výsledky prokázaly pouze zanedbatelný vliv extrakčního postupu na případné ztráty analytu. Znatelnější

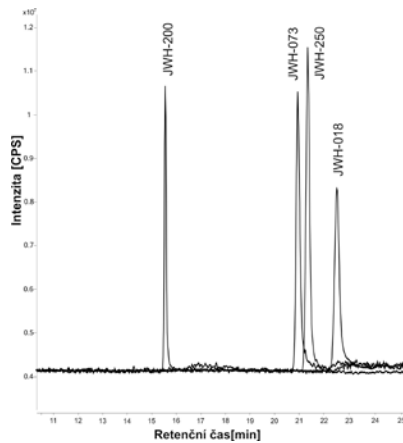
rozdíly pak byly mezi plochami píků SC extrahovaných z analyzovaných matric a SC rozpuštěných v desetkrát ředěném elektrolytu. Tento fakt zle pravděpodobně přisoudit komplexnosti obou matric, jejichž složení může negativně ovlivňovat ionizaci v SC iontovém zdroji. Potlačení ionizace bylo pozorováno pro všechny studované SC a jejich metabolity. Matriční efekty vyjádřené jako procentuální hodnoty potlačeného signálu byl v rozmezí do -80,7 do 9,1 % (pro koncentrační hladinu 15 ng/ml) a od -71,9 do 1,2 (pro koncentrační hladinu 150 ng/ml).

Vyvinutá extrakční metoda byla aplikována na spikované vzorky moči (analýza metabolitů SC) a séra (analýza původních forem SC) na koncentrační hladině 50 ng/ml. Rekonstruované SRM chromatogramy vzorku moči a séra po LLE extrakci jsou zobrazeny na Obr. 2.4A a B. Získané výsledky prokazují použitelnost vyvinuté metody pro použití ve forenzní či toxikologické praxi.

A)



B)



Obř. 2.4 Rekonstruované SRM chromatogramy MEKC-MS/MS po extrakci metodou LLE pro moč (A) a krevní sérum (B). Koncentrace jednotlivých analytů 50 ng/ml.

Byla vyvinuta metoda MEKC separace s tandemovou hmotnostní spektrometrií patnácti syntetických kanabinoidů a jejich metabolitů s využitím perfluoroheptanové kyseliny jako micelární složky pufru. Perfluoroheptanová kyselina představuje vhodnou těkavou složku separačního elektrolytu, která

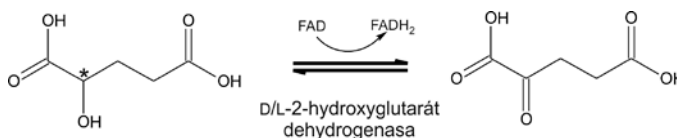
umožňuje uskutečnit separaci studovaných syntetických kanabinoidů a metabolitů bez experimentálních omezení a kontaminace iontového zdroje hmotnostního spektrometru netěkavým tenzidem. Zároveň se jedná o první publikovanou práci, kde byla perfluoroheptanová kyselina využita jako těkavý tenzid pro uskutečnění MEKC separace.

Vyvinutá metoda byla validována a poté úspěšně aplikována pro analýzu modelových vzorků moči a séra pro toxikologické a forenzní účely. Vzhledem k relativně jednoduché přípravě vzorků je tuto metodu možné považovat za vhodnou alternativu k zavedeným chromatografickým metodám pro screening intoxikace syntetickými kanabinoidy. Dosažené hodnoty limitů kvantifikací studovaných drog jsou srovnatelné s koncentracemi nalezenými v tělních tekutinách po intoxikaci syntetickými kanabinoidy. Tato práce byla publikována v časopise Talanta [16].

3. Diagnostika hydroxyglutarových acidurií s využitím EKC-ESI-MS/MS – enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny

Nízkomolekulární alifatické karboxylové kyseliny (AKK) jsou častými produkty mnoha metabolických procesů v lidském organismu. Mezi nejvýznamnější metabolické pochody kde AKK hrají významnou roli patří metabolismus sacharidů, aminokyselin, lipidů či biogenních aminů. Některé AKK jsou chirální, identifikace a stanovení jednotlivých enantiomerů může vést k přesnější diagnostice poruch metabolismu.

D,L-2-Hydroxyglutarová kyselina (HG) je produkt metabolických drah a při normální funkci metabolismu je dále konvertována na α -ketoglutarovou kyselinu (Obr. 3.1). U některých vrozených metabolických poruch je tato enzymatická přeměna blokována, což se projeví zvýšením hladiny HG kyseliny v moči (hydroxyglutarová acidurie, HGA). HG má jedno chirální centrum, kdy každý enantiomer způsobuje jiný typ metabolické poruchy včetně odlišných klinických projevů.



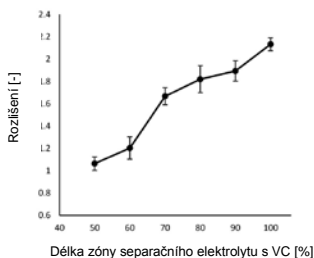
Obr. 3.1 Schéma metabolické přeměny 2-hydroxyglutarové kyseliny na α -ketoglutarovou kyselinu (chirální centrum je označeno hvězdičkou).

Typické symptomy v případě D-2-hydroxyglutarové acidurie (D-HGA) zahrnují epilepsii, snížení svalového napětí (hypotonie) a psychomotorickou retardaci. V případě L-2-hydroxyglutarové acidurie (L-HGA) jsou symptomy odlišné a zahrnují kromě epilepsie také opožděný vývoj a ataxii. Kromě

uvedených forem HGA existuje i kombinovaná acidurie (D,L-HGA), která se projevuje neonatální epileptickou encefalopatií a respirační insuficiencí [17,18]. Biochemické a klinické projevy všech tří skupin HGA shrnul ve svém článku Kranendijk a kol. [19].

V souvislosti s metodou enantioseparace D,L-mléčné kyseliny, která byla na našem pracovišti vyvinuta a publikována [20], lze předpokládat, že enantioseparaci D,L-HG (podobně jako jiné α -hydroxykyseliny) bude možné uskutečnit pomocí vankomycin chloridu (VC) jako CS. Tento selektor je použitelný v kyselém až téměř neutrálním pH (v rozmezí pH 3,0 – 6,0) [21].

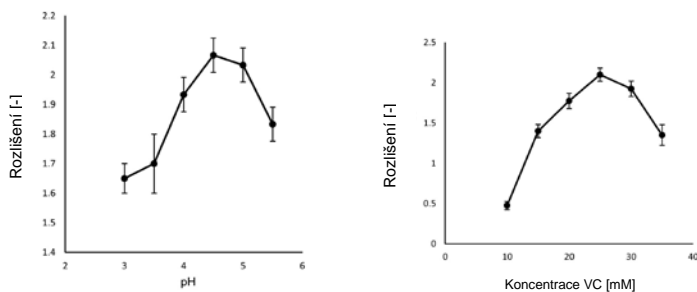
Separační elektrolyt na bázi 50 mM octanu amonného o pH 4,5 byl použit jako základní elektrolyt pro enantioseparaci HG, přičemž koncentrace VC byla 25 mM. Z důvodu zabránění kontaminace iontového zdroje netěkavým CS byl studován vliv délky zóny separačního elektrolytu s obsahem VC na rozlišení (technika PFT). Závislost délky zóny se separačním elektrolytem obsahujícím VC na rozlišení jednotlivých enantiomerů HG je zobrazen na Obr. 3.2. Z obrázku je zřejmé, že nejvyššího rozlišení bylo dosaženo v případě, kdy celá kapilára byla vyplněna elektrolytem obsahujícím VC. Technika využívající naplnění celé kapiláry elektrolytem s chirálním selektorem je označována jako technika kompletního plnění (CFT).



Obr. 3.2 Závislost rozlišení enantiomerů HG na délce zóny elektrolytu obsahující VC (25 mM). Podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulce 3.1.

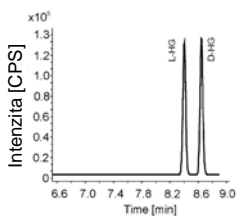
Zároveň je nutno poznamenat, že jak enantiomery tak VAN^+ migrují s vlastní elektroforetickou mobilitou v separačním systému a separace tak probíhá mechanismem EKC.

Dále byly studovány vliv pH 50 mM acetátu amonného s přidávkem 25 mM VC na rozlišení a vliv koncentrace VC na rozlišení s použitím CFT. Závislost rozlišení na pH a koncentraci VC je na Obr. 3.3.



Obr. 3.3 Závislost rozlišení HG na pH a koncentraci VC v separačním elektrolytu na bázi 50 mM octanu amonného pH 4,5.

Konečné podmínky enantioseparace HG jsou pro přehlednost shrnuty v Tabulce 3.1 a separace modelové racemické směsi HG za použití optimalizovaných podmínek a SIM detekčního módu MS je zobrazena na Obr. 3.4.



Obr. 3.4 Elektroferogram SIM záznamu enantioseparace racemické směsi HG (50 $\mu\text{mol/l}$). Podmínky separace jsou shrnuty v Tabulce 3.1.

Tabulka 3.1 – Shrnutí optimalizovaných parametrů CE-ESI-MS/MS enantioseparace HG

Sprejovací napětí	- 2,5 kV
Tlak nebulizačního plynu	10 psi (1 psi = 6894,76 Pa)
Průtok nebulizačního plynu	10 l/min
Teplota plynu	200 °C
Průtok pomocné kapaliny	6 µl/min
Složení pomocné kapaliny	MeOH/voda/hydroxid amonný (50:49,5:0,5; v/v/v)
Separáční elektrolyt	50 mM octan amonný pH 4,5
Separáční elektrolyt použitý při metodě CFT	50 mM octan amonný pH 4,5 s přidavkem 25 mM VC
Separáční kapilára	Kovalentn� pokryt� polyakrylamidem, vnit�rn�ho průměru 50 µm a celkov� délky 60 cm
Dávkování	100 mbar/15s
Separáční napětí	- 25 kV
Kolizní energie při MRM módu	10 eV
SRM pro kvantifikaci D,L-HG	<i>m/z</i> 147 [M-H] -> <i>m/z</i> 129 [M-H-H ₂ O]
SRM pro identifikaci D,L-HG	<i>m/z</i> 147 [M-H] -> <i>m/z</i> 101 [M-H-H ₂ O] -> <i>m/z</i> 85

Validace metody byla provedena podle požadavků ICH [22].  est kalibračních standardů o koncentračních hladinách od 0,130 do 400 µmol/l jednotlivých enantiomerů HG byly použity pro měření kalibračních z vilost  ( estibodov  kalibrační křivka, ka d  z bodů m ren pětkrát). K vyhodnocení kalibračních křivek bylo použito linearní regrese a metody nejmen ších čtverců. Jako p ijateln  kritérium byla zvolena hodnota korelačního koeficientu kalibračních křivek větši než 0,9990. Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly vypo t ny pomocí poměru signálu k šumu (S/N), kdy pro LOD byla hodnota S/N = 3 a pro LOQ pak S/N = 10. Opakovatelnosti vyj dřen  jako RSD ploch

píků a migračních časů (*intra-day* a *inter-day*) byly vypočteny z jednotlivých měření (koncentrace každého enantiomeru byla 0,200 $\mu\text{mol/l}$), přičemž *intra-day* opakovatelnost zahrnovala deset měření a *inter-day* opakovatelnost zahrnovala šest měření v pěti po sobě jdoucích dnech. Základní validační parametry jsou shrnuty v Tabulce 3.2.

Tabulka 3.2 – Základní validační parametry metody

Parametr	L-HG	D-HG
Kalibrační křivka	$y = (163,91 \pm 0,90)x + (1,534 \pm 0,09)$	$y = (199,99 \pm 0,73)x + (10,48 \pm 0,01)$
Koeficient determinace R^2	0,99994	0,99993
LOD [nmol/l] ^a	31,0	38,0
LOQ [nmol/l] ^b	103,0	127,0
RSD opakovatelnosti t_m (<i>intra-day</i>) [%] ^c	4,24	4,78
RSD opakovatelnosti ploch píků (<i>intra-day</i>) [%] ^c	5,71	6,03
RSD opakovatelnosti t_m (<i>inter-day</i>) [%] ^d	7,34	7,65
RSD opakovatelnosti ploch píků (<i>inter-day</i>) [%] ^d	10,23	11,10

^a Vyjádřeno jako $S/N = 3$

^b Vyjádřeno jako $S/N = 10$

^c $n = 10$

^d $n = 30$

Pro hodnocení vlivu matrice moči byly stanoveny výtěžnosti obou enantiomerů HG (koncentrační hladiny 10 $\mu\text{mol/l}$ a 300 $\mu\text{mol/l}$ pro každý enantiomer) v šesti vzorcích moči. Získané hodnoty výtěžnosti se pohybovaly mezi 90 až 110 % pro oba enantiomery HG. Z uvedených výsledků plyne, že

stanovení hladiny obou enantiomerů HG, není potenciálními rozdíly jednotlivých vzorků moči významně ovlivněno.

Vyvinutá metoda EKC-ESI-MS/MS enantioseparace HG byla aplikována na dva reálné vzorky moči získané od dětských pacientů trpících abnormální exkrecí HG do moči. Stejně tak byla metoda aplikována na vzorky moči zdravých jedinců s běžnými fyziologickými hladinami HG v moči. Ve všech vzorcích moči pacientů byly pomocí vyvinuté metody identifikovány a stanoveny hladiny jednotlivých enantiomerů HG. Získané výsledky jsou shrnuty v Tabulce 3.3. Výsledky byly vztaženy na hodnotu změřené koncentrace kreatininu.

Tabulka 3.3 Výsledky stanovení D,L-HG v reálných vzorcích moči

Pacient	L-HG (mmol/ mol kreatininu)	D-HG (mmol/ mol kreatininu)
Zdravý jedinec (průměr) ^a	1,30 – 15,78 (8,13)	2,21 – 10,52 (6,34)
Dětský pacient (1) ^b	1,13 ± 0,42	104,5 ± 2,1
Dětský pacient (2) ^b	2,01 ± 0,38	2200,0 ± 12,6

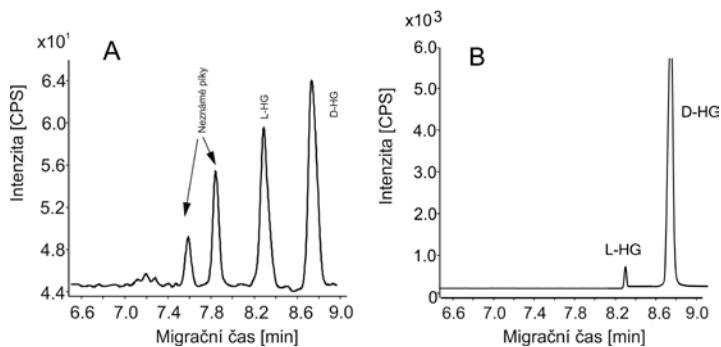
^a Koncentrace L-HG a D-HG ve vzorcích moči vyjádřené jako nalezené koncentrační rozmezí s průměrnou hodnotou uvedenou v závorce ($n = 10$).

^b $n = 5$.

Výsledky stanovení enantiomerů HG v reálných vzorcích moči dobře korespondují s dosud publikovanými hodnotami a to jak z hlediska koncentrací enantiomerů HG v případě zdravých jedinců, tak v rovněž v případě pacientů se zvýšenou exkrecí některého z enantiomerů L-HG a D-HG. Publikovaná koncentrační rozmezí enantiomerů HG v moči u zdravých jedinců jsou 1,3 – 19,0 mmol/mol kreatininu pro L-HG a 2,8 – 17,0 mmol/mol kreatininu pro D-HG [23]. Uvedené výsledky u obou dětských pacientů indikují D-HGA, díky vysokým nalezeným koncentracím D-HG ve vzorcích

moči. Zjištěný typ hydroxyglutarové acidurie byl dále potvrzen dalšími diagnostickými nástroji ve Fakultní nemocnici Olomouc.

Příklad SRM elektroferogramu separace moči zdravého jedince a pacienta, trpícího D-HGA je uveden na Obr. 3.5A a B.



Obr. 3.5 Rekonstruovaný SRM elektroferogram analýzy moči zdravého jedince (A) a pacienta s abnormální exkrecí L-HG (B). Podmínky měření jsou uvedeny v Tabulce 3.1.

Vyvinutá metoda enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny pomocí EKC-ESI-MS/MS je první publikovanou metodou přímé enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny bez nutnosti derivatizačního kroku. Vankomycin chlorid v mírně kyselém separačním elektrolytu poskytuje dostatečné rozlišení enantiomerů 2-hydroxyglutarové kyseliny pro jejich spolehlivou identifikaci a kvantifikaci s pomocí ESI-MS/MS. Technika kompletního plnění kapiláry elektrolytem s vankomycinem je vhodným experimentálním přístupem pro dosažení potřebného rozlišení. Při enantioseparaci bylo s výhodou využito širokého spektra stereoselektivních interakcí, který nabízí kladně nabitý vankomycin (zejména tvorby vodíkových vazeb, interakce dipól-dipól, van der Waalsovy síly a Coulombické interakce). Zejména Coulombické interakce hrají stěžejní roli při dosažení vysokého rozlišení enantiomerů D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny ($R_s = 2,5$) prostřed-

nictvím protisměrné migrace navzájem opačně nabitého selektoru a separovaných enantiomerů. Enantioseparace D,L-2-hydroxyglutarové kyseliny tak probíhá mechanismem elektrokinetické chromatografie.

Vyvinutá metoda byla validována a následně byla aplikovaná na analýzu dvou reálných vzorků močí dětských pacientů trpících abnormální exkrecí 2-hydroxyglutarové kyseliny. U obou vzorků močí byla s pomocí vyvinuté metody diagnostikována D-hydroxyglutarová acidurie. Zjištěná diagnóza byla následně potvrzena dalšími diagnostickými nástroji ve Fakultní nemocnici Olomouc. Navíc klinické projevy u obou pacientů odpovídají popsaným projevům pro D-2-hydroxyglutarovou acidurii. Výsledky prezentované v této části práce byly publikovány v časopise Journal of Chromatography A [24].

Literatura

- [1] Mravčík V. (ed.), Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2013, Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti, Úřad vlády ČR, Praha, 2013.
- [2] Mravčík V. (ed.), Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2014, Národní monitorovací středisko pro drogy a závislosti, Úřad vlády ČR, Praha, 2014.
- [3] Herzog A., Vejrych T., Richter J., Nové psychoaktivní látky v České republice - výsledek výzkumu, Sanimum, Praha, 2015.
- [4] Henderson G.L., *J. Forensic Sci.* 33 (1998) 569-575.
- [5] Carroll F.I., Lewin S.W., Mascarella H.H., Seltzmann P.A., Reddy N.M., Ann N.Y., *Acad. Sci.* 1248 (2012) 18.
- [6] Cappola M., Mondola R., *Toxicol. Lett.* 211 (2014) 144-149.
- [7] Petterson P., Jorntén-Karlsson M., Stalebro M., *Electrophoresis* 24 (2003) 999-1007.
- [8] ISO 11843-2:2000: Capability of Detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case, International Organization for Standardization, 2007.
- [9] Swortwood M.J., Boland D.M., deCaprio A.P., *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1383-1397.
- [10] Švidrnoch M., Lněničková L., Válka I., Ondra P., Maier V., *Journal of Chromatography A* 1356 (2014) 258-265.
- [11] Gurney S.M.R., Scott K.S., Kacinko S.L., Presley B.C., Logan B.K., *Forensic Sci. Rev.* 26 (2014) 53-78.
- [12] Rajasekaran M., Brents L.K., Franks L.N., Moran J.H., Prather P.L., *Appl. Pharmacol.* 269 (2013) 100-108.
- [13] Grigoryev A., Melnik A., Savchuk S., Simonov A., Rozhanets V., *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 2519-2526.

- [14] Wohlfarth W., Scheidweiler K.B., Chen X., Liu H., Huestis M.A., *Anal. Chem.* 85 (2013) 3730-3738.
- [15] Akamatsu S., Misuhashi T., *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 304-307.
- [16] Švidrnoch M., Přebylka A., Maier V., *Talanta* 150 (2016) 568-576.
- [17] Seijo-Martinez M., Navarro C., Castro del Rio M., Vila O., Puig M., Ribes A., Butron M., *Arch. Neurol.* 62 (2005) 666-670.
- [18] Nyhan W.L., Shelton G.D., Jakobs C., Holmes B., Bowe C., Curry C.J., Vance C., Duran M., Sweetman L., *J. Child. Neurol.* 10 (1995) 137-142.
- [19] Kranendijk M., Struys E.A., Salomons G.S., Van der Knaap M.S., Jakobs C., *J. Inherit. Metab. Dis.* 35 (2012) 571-587.
- [20] Maier V., Petr J., Knob R., Horáková J., Ševčík J., *Electrophoresis* 28 (2007) 1815-1822.
- [21] Armstrong D.W., Nair U.B., *Electrophoresis* 18 (1997) 2331-2342.
- [22] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures, Q2(R1), verze 4, 2005.
- [23] Rashed M.S., AlAmoudi M., Aboul-Enein H.Y., *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 317-320.
- [24] Švidrnoch M., Přebylka A., Bekárek V., Ševčík J., Smolka V., Maier V., *J Chromatogr A* (2016), v tisku; <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.095>.

Curriculum vitae

Osobní informace:

Jméno a příjmení: RNDr. Martin Švidrnoch
Datum narození: 22.12.1987
Email: martin.svidrnoch@upol.cz

Dosavadní praxe:

2012-2015 Univerzita Palackého v Olomouci,
Přírodovědecká fakulta, lektor
2016 - dosud Univerzita Palackého v Olomouci,
Přírodovědecká fakulta, vědecký pracovník

Vzdělání:

2014 Univerzita Palackého v Olomouci,
Přírodovědecká fakulta, Státní rigorózní
zkouška v oboru Analytická Chemie (RNDr.)
2012 - dosud Univerzita Palackého v Olomouci,
Přírodovědecká fakulta,
Doktorský studijní program P1417 Chemie, obor
Analytická chemie (Ph.D.)
2010 - 2012 Univerzita Palackého v Olomouci,
Přírodovědecká fakulta
Navazující magisterský studijní program N1407
Chemie, obor Analytická chemie (Mgr.)
2007 – 2010 Univerzita Palackého v Olomouci,
Přírodovědecká fakulta
Bakalářský studijní program B1407 Chemie,
obor Management v Chemii (Bc.)
1999 – 2007 Gymnázium Hladnovská 35, Ostrava – Slezská
Ostrava, maturitní zkouška

Zahraníční stáže:

2011 (září – listopad) Department of Chemistry, University of Basel,
Basilej, Švýcarsko; skupina prof. Petera Hausera
2013 (říjen-prosinec) Department of Chemistry and Biochemistry,
University of Texas at Arlington, Texas, USA;
skupina prof. Daniela W. Armstronga

- 2014 (březen) Korean Institute of Science and Technology
(KIST-Europe), Saarbrücken, Německo;
skupina prof. Andraese Manze
- 2014 (říjen) Department of Chemistry and Biochemistry,
University of Texas at Arlington, Texas, USA;
skupina prof. Daniela W. Armstronga

Přehled odborné činnosti

Publikace:

Maier V., Ranc V., **Švidrnoch M.**, Petr J., Ševčík J., Tesařová E., Armstrong D.W.: Study on the use of boromycin as a chiral selector in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1237 (2012) 128-32.

Bartošová Z., Jirovský D., Riman D., Halouzka V., **Švidrnoch M.**, Hrbáč J.: HPLC-ED of low-molecular weight brominated phenols and tetrabromobisphenol A using pretreated carbon fiber microelectrode, *Talanta* 122 (2014) 115-121.

Maier V., Kalíková K., Příbylka A., Vozka J., Smuts J., **Švidrnoch M.**, Ševčík J., Armstrong, D.W., Tesařová E.: Isopropyl derivative of cyclofructan 6 as chiral selector in liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1338 (2014) 197-200.

Švidrnoch M., Lněníčková L., Válka I., Ondra, P., Maier, V.: Utilization of micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry employed volatile micellar phase in the analysis of cathinone designer drugs, *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 258-265.

Geryk, R., **Švidrnoch, M.**, Příbylka, A., Kalíková, K., Maier, V., Tesařová, E.: A supercritical fluid chromatography method for the systematic toxicology analysis of cannabinoids and their metabolites, *Anal. Methods* 7 (2015) 6056-6059.

Příbylka, A., **Švidrnoch, M.**, Ševčík, J., Maier, V.: Enantiomeric separation of 1,3-dimethylamylamine by capillary electrophoresis with indirect UV detection using dual-selector system, *Electrophoresis* 36 (2015) 2866-2873.

Příbylka, A., Švidrnoch, M., Tesařová, E., Armstrong, D.W., Maier, V.: The empirical comparison of cyclofructans and cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrophoretic separation of atropisomers of *R,S*-1,1'-binaphthalene-2,2'-diyl hydrogen phosphate, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 973-979.

Táborský, J., Švidrnoch, M., Kurka O., Borovcová, L., Bednář, P., Barták, P., Skopalová, J.: Electrochemical oxidation of zopiclone, *Monatsh. Chem.* 147 (2016) 53-60.

Švidrnoch, M., Příbylka, A., Maier, V.: Determination of selected synthetic cannabinoids and their metabolites by micellar electrokinetic chromatography – mass spectrometry employing perfluoroheptanoic acid-based micellar phase, *Talanta* 150 (2016) 568-576.

Švidrnoch, M., Příbylka, A., Bekárek, V., Ševčík, J., Smolka, V., Maier, V.: Enantioseparation of D,L-2-hydroxyglutaric acid by capillary electrophoresis with tandem mass spectrometry - fast and efficient tool for D- and L-2-hydroxyglutaracidurias diagnosis, *Journal of Chromatography A* (2016) in press, doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.095.

Učební texty:

Maier, V., Švidrnoch, M., Příbylka, A., Znalezona, J.: Cvičení z forenzní chemie, Elektronická skripta, Olomouc, 2014, (česká i anglická verze - <http://ach.upol.cz/user-files/files/cfc.pdf>, http://ach.upol.cz/userfiles/files/CFC_EN.pdf).

Švidrnoch M., Maier V.: Toxikologie, multimediální výukový text pro předmět Toxikologie, Olomouc, 2012.

Plakátová sdělení:

Švidrnoch M., Ranc V., Hartmanová L., Maier V., Havlíček V., Lemr K.: Identification of toxicologically important compounds in a spot of human blood using desorption nano-electrospray ionization mass spectrometry, Micro Scale Bioseparations (MSB), Praha, 2010.

Maier V., Kupcová R., Ranc V., Znalezona J., Knob R., Ginterová P., Megová M., Švidrnoch M., Ševčík J.: Determination of D,L-lactic acid enantiomers by capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry, Micro Scale Bioseparations (MSB), Praha, 2010.

Švidrnoch M., Ranc V., Hartmanová L., Maier V., Havlíček V., Lemr K.: Glassy micro-fiber filters as an efficient surface for desorption nano-electrospray ionization mass spectrometry, International Symposium Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal, Olomouc, 2010.

Lehnert P., Maier V., Příbylka A., **Švidrnoch M.**, Ševčík J., Douša M.: Chiral separation of R,S-tolterodine by capillary electrophoresis employed negatively charged cyclodextrins, International Symposium Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal, Olomouc, 2010.

Hartmanová L., **Švidrnoch M.**, Myjavcová R., Bednář P., Havlíček V., Lemr K.: Alternative surfaces for analysis by desorption nano-electrospray ionization mass spectrometry, Informal Meeting on Mass Spectrometry (IMMS), Kőszeg, Maďarsko, 2010.

Maier V., **Švidrnoch M.**, Petr J., Armstrong D.W., Ševčík J.: Evaluation of boromycin as a chiral selector in non-aqueous capillary electrophoresis, Chirality 2010, Sapporo, Japonsko, 2010.

Švidrnoch M., Ranc V., Maier L., Ševčík J., Maier V.: Determination of mescaline in lophophora williamsii plants grown in the culture using capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry, International Symposium on Chromatography (ISC) 2010, Valencia, Španělsko.

Maier V., Ranc V., **Švidrnoch M.**, Petr J., Ševčík J.: The pilot study of using boromycin as chiral selector in capillary electrophoresis and direct injection mass spectrometry – a comparative study, International Symposium on Chromatography (ISC) 2010, Valencia, Španělsko.

Hartmanová L., **Švidrnoch M.**, Ranc V., Havlíček V., Lemr K.: Influence of surface and composition of spray liquid on signal stability in Desorption nanoElectrospray Ionization, Informal Meeting on Mass Spectrometry (IMMS), Fiera di Primiero, Itálie, 2011.

Hartmanová L., Ranc V., **Švidrnoch M.**, Havlíček V., Lemr K.: Studium vybraných experimentálních parametrů ovlivňujících analýzu látek pomocí desorpčního nanoelektrospreje, 13. ročník ceny Shimadzu 2011, Vysoké Tatry, Slovensko.

Švidnoch M., Maier V., Petr J., Ševčík J.: A CE-ESI-MS approach to analysis of ethyl glucuronide in human urine, Nordic Separation Science Society (NSSS) 2011, Riga, Lotyšsko.

Švidnoch M., Příbylka A., Ševčík J., Maier V.: The use of non-aqueous capillary electrophoresis with formamide-based buffer for enantioseparation of zopiclone and its impurities, ITP 2013, Tenerife, Španělsko, 2013.

Švidnoch M., Ševčík J., Smolka V., Maier V.: Diagnosis of D,L-hydroxyglutaric aciduria by capillary electrophoresis with tandem mass spectrometry, ITP 2013, Tenerife, Španělsko, 2013.

Příbylka A., **Švidnoch M.**, Maier V., Ševčík J.: Enantioseparation of 1,3-dimethylalylamine using capillary electrophoresis, ITP 2013, Tenerife, Španělsko, 2013.

Švidnoch M., Lněničková L., Knob R., Válka I., Ondra P., Maier V.: New Designer Drugs: Utilization of a CE-MS/MS in the analysis of their miscellaneous derivatives, The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2013, Madeira, Portugalsko, 2013.

Příbylka A., **Švidnoch M.**, Chrastina J., Maier V.: On-line preconcentration and separation of selected designer drugs by micellar electrokinetic chromatography, The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2013, Madeira, Portugalsko, 2013.

Knob R., Maier V., **Švidnoch M.**, Ševčík J., Petr J.: Separation of selected designer drugs by porous layer open-tubular capillary electrochromatography, 40th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC) 2013, Hobart, Austrálie, 2013.

Švidnoch M., Hajný J., Maier V.: The piperazine-based designer drugs: The slow introduction of CE-ESI-MS/MS to the forensic and toxicological analyses, The 38th International Symposium on Capillary Chromatography (ISCC), Riva del Garda, Itálie, 2014.

Příbylka A., **Švidnoch M.**, Maier V.: Enantioseparation of 1,3-dimethylamylamine and 1,4-dimethylamylamine by capillary electrophoresis with mass spectrometry, Chirality 2014, Praha, ČR.

Táborský, J., **Švidrnoch, M.**, Macíková, P., Švecová, H., Marková, E., Součková, J., Skopalová, J.: Electrochemical oxidation of zopiclone, 15th International Conference on Electroanalysis (ESEAC) 2014, Malmö, Švédsko.

Švidrnoch, M., Příbylka, A., Válka, I., Ondra, P., Maier, V.: Analysis of synthetic cannabinoids and their metabolites using online combination of micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry, The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2014, Buenos Aires, Argentina.

Jirovský, D., **Švidrnoch, M.**, Příbylka, A., Bartošová, Z., Maier, V.: Electrochemical detection in the analysis of synthetic Cannabinoids by HPLC, The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2014, Buenos Aires, Argentina.

Geryk, R., **Švidrnoch, M.**, Příbylka, A., Válka, I., Ondra, P., Maier, V.: Pilot study of synthetic cannabinoids analysis by SFC and GC-MS for toxicological screening analysis, The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2014, Buenos Aires, Argentina.

Znalezona, J., **Švidrnoch, M.**, Maier, V.: Novel additives for sensitive and selective capillary electrophoresis mass spectrometry, 8th Nordic Separation Science symposium (NoSSS) 2015, Helsinki, Finsko.