

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Fakulta přírodovědecká**  
**Katedra analytické chemie**



**Desorpce/ionizace biologicky aktivních látek  
ve volně prodejných léčivých přípravcích**

Diplomová práce

Autor práce:  
Studijní obor:

Bc. Tereza Matušů  
Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Lucie Hartmanová, Ph.D.

**Olomouc 2016**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Lucie Hartmanové, Ph.D. s použitím uvedené literatury.

Souhlasím s tím, že tato diplomová práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....

Vlastnoruční podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu prof. RNDr. Karlu Lemrovi, Ph.D. a Mgr. Lucii Hartmanové, Ph.D. za odborné vedení a důležité informace, které vedly k vypracování této diplomové práce.

Mé obrovské poděkování patří mým rodičům, kteří mně psychicky a finančně podporovali v dokončení studia.

Dále bych velmi ráda poděkovala mým sestřám, které mě motivovaly k dopsání této práce.

A nakonec bych poděkovala svému příteli, který byl velice tolerantní v posledních chvílích dokončování této práce.

## Souhrn

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na analýzu léčiv hmotnostní spektrometrií. Dále se práce zaměřuje na desorpční techniky hmotnostní spektrometrie, konkrétně na desorpční nanoelektrosprej (nanoDESI), vyvinutý na Katedře analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci, transmisní desorpční elektrosprej (TM-DESI) a desorpci/ionizaci laserem za účasti matrice (MALDI) a příkladů jejich použití. Jsou zde zmíněny analyzátory, které lze využít pro spojení s desorpčními technikami. Následující kapitoly pak pojednávají o výkladu základních pojmů, jako je léčivo, účinná látka, pomocná látka, léčivý přípravek, a samotném rozdělení léčiv do různých kategorií. Poslední část se zabývá analýzou vybraných účinných látek, kterými byly kyselina acetylsalicylová, paracetamol, ibuprofen a kofein.

Experimentální část se věnuje desorpčním technikám, vyjmenovaným výše, v analýze léčiv hmotnostní spektrometrií a jejich porovnáním. Dále je zkoumán vliv přípravy vzorků u jednotlivých technik. U ionizačních technik laserem (MALDI-QTOF a MALDI-SYNAPT) je také zkoumán vliv matric.

Výsledky těchto experimentů ukazují na lepší odezvy a rychlosti měření technikami nanoDESI-QTOF a TM-DESI-QTOF než technikami MALDI. MALDI techniky však oproti DESI technikám mají výhodu v měření v sekvenci.

## Summary

Theoretical part of diploma thesis is focused on drug analysis by mass spectrometry. Further, the thesis focuses on desorption ionization techniques of mass spectrometry, namely a desorption nanoelectrospray ionization (nanoDESI), developed at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, transmission mode desorption electrospray ionization (TM-DESI), and matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI), and examples of their usage. There are mentioned some analyzers which can be used for connection with desorption ionization techniques. Following chapters describe the interpretation of basic concepts, such as a drug, active substance, excipient, medicinal preparation, and the sort of drugs into different categories. The last part deals with analysis of selected active substances which were acetylsalicylic acid, paracetamol, ibuprofen, and caffeine.

The experimental part focuses on desorption ionization techniques listed above in the analysis of pharmaceuticals by mass spectrometry and their comparison. It is also studied the influence of sample preparation for each of techniques. The influence of matrixes is studied for laser ionization techniques (MALDI-QTOF and MALDI-SYNAPT).

The results of these experiments showed a better response and speed of measurements by techniques nanoDESI-QTOF and TM-DESI-QTOF than MALDI techniques. However, MALDI techniques in compared with DESI techniques have the advantage in measurement in sequence.

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Úvod.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. Teoretická část .....</b>   | <b>2</b>  |
| 2.1 Analýza léčiv hmotnostní spektrometrií .....  | 2         |
| 2.2 MALDI.....  | 3         |
| 2.3 nanoDESI.....   | 6         |
| 2.3.1 Iontový zdroj desorpční nanoelektrosprej, vyvinutý na Katedře analytické chemie<br>PŘF UPOL ..... | 6         |
| 2.3.2 Desorpční nanoelektrosprej podle Laskin .....   | 11        |
| 2.4 TM-DESI.....  | 15        |
| 2.5 Analyzátory .....   | 18        |
| 2.6 Léčiva.....   | 20        |
| 2.6.1 Rozdělení léčiv do kategorií .....  | 20        |
| 2.7 Hmotnostní spektrometrie vybraných účinných látek .....   | 25        |
| 2.7.2 Kyselina acetylsalicylová a paracetamol.....  | 25        |
| 2.7.2 Kofein.....   | 27        |
| 2.7.3 Ibuprofen .....   | 31        |
| <b>3. Experimentální část .....</b>   | <b>32</b> |
| 3.1 Použité techniky .....  | 32        |
| 3.2 Použité chemikálie.....   | 34        |
| 3.3 Pracovní postup .....   | 37        |
| <b>4. Výsledky a diskuze .....</b>  | <b>39</b> |
| 4.1 NanoDESI-QTOF.....  | 39        |
| 4.2 TM-DESI-QTOF.....   | 42        |
| 4.3 MALDI-QTOF.....   | 44        |
| 4.4 MALDI-SYNAPT .....  | 47        |
| 4.5 Srovnání hmotnostních technik .....   | 50        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5. Závěr.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>6. Literatura .....</b>  | <b>52</b> |
| <b>7. Přílohy .....</b>   | <b>56</b> |
| I. Hmotnostní spektra léčiv pořízené technikou nanoDESI-QTOF .....  | I         |
| II. Hmotnostní spektra léčiv pořízené technikou MALDI-QTOF .....    | IX        |
| III. Hmotnostní spektra léčiv pořízené technikou MALDI-SYNAPT ..... | XXV       |

# 1. Úvod

Analýza léčiv je v poslední době aktuální téma, neboť každým dnem se vyrábějí nová léčiva a na světě existuje stále více uživatelů jakýchkoliv léčiv. Hlavním zájmem studia léčiv je znečištění životního prostředí, vliv možných nežádoucích účinků na život člověka, případně zvířete, a také výroba nových účinných látek. Existuje mnoho technik pro analýzu léčiv. V minulosti se více jednalo o kapalinovou či plynovou chromatografii, avšak nynější doba si žádá inovace v těchto analýzách, především ve zrychlení analýzy a snížení nároků na přípravu vzorků.

Cílem této diplomové práce je analýza vybraných léčiv desorpčními technikami hmotnostní spektrometrie a jejich srovnání. Jedná se o tři iontové zdroje – desorpční nanoelektrosprej (nanoDESI), transmisní desorpční elektrosprej (TM-DESI) a desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (MALDI). Testována byla vhodnost těchto iontových zdrojů pro screeningové účely.



## 2. Teoretická část

### 2.1 Analýza léčiv hmotnostní spektrometrií

Farmaceutické přípravky se v posledních letech dostávají do zájmu vědecké komunity, neboť tyto látky mají za následek znečištění prostředí, nikoliv primárně z výroby, ale všeobecným a neustálým používáním u člověka a zvířat. Biologická aktivita těchto sloučenin může vést k nepříznivým vlivům na vodní ekosystém a potenciálně i na pitnou vodu. V lidském těle mohou být léčiva přeměněna na jeden nebo více metabolitů a vylučují se jako směs původní sloučeniny a metabolitů, přičemž mateřská sloučenina je v častých případech minoritní složkou. Nicméně, některé léky jsou hůře metabolizovány a jsou vylučovány v nezměněné formě. Stupeň metabolismu závisí na spoustě faktorech, jako jsou věk, pohlaví, etnika, stav pacienta a doba podání léku. V dnešní době jsou nejběžněji používanými metodami pro analýzu léčiv techniky LC-MS a GC-MS.<sup>1</sup>

Metody SPE a LC-MS/MS byly použity pro studium 16 léčiv: anti-epileptikum karbamazepin, analgetická/protizánětlivá léčiva (meganamová kyselina, indometacin, ibuprofen, naproxen, diclofenac, ketorolac, acetaminofen), analgetické opium kodein, antidepressiva (fluoxetin, paroxetin),  $\beta$ -blokátory (atenolol, propranolol), antibiotika (trimetoprim, metronidazol, erytromycin) a léčiva na vředy (ranitidin) v odpadní vodě nemocnice. Metoda umožňuje simultánní SPE extrakci farmaceutických sloučenin. Analyty byly identifikovány a kvantitativně stanoveny LC-MS/MS. Výtěžnost léčiv byla vyšší než 75 %, s výjimkou ranitidinu, a s celkovou variabilitou metody nižší než 9 %. Přesnost metody, vypočtená jako relativní směrodatná odchylka (RSD) byla v rozmezí 0,3-4,9 %. Metoda vyvinutá v této práci se ukázala jako cenný nástroj pro analýzu odpadních vod pocházejících z nemocnic a zdravotnických zařízení.<sup>2</sup>

Následující studie pojednává o vývoji metody GC-MS pro analýzu léčiv, zahrnující extrakci analytů pomocí SPE. Zkoumanými léčivy byly: aspirin, kofein, karbamazepin, diclofenac, ketoprofen, naproxen, ibuprofen, klofibrát, kyselina klofibrová a gemfibrozil, v různých vzorcích vody (odpadní a povrchové). Po filtraci byly vzorky extrahovány a koncentrovány pomocí C<sub>18</sub> nebo HLB cartridge, v závislosti na charakteru sloučeniny. Byly kontrolovány a optimalizovány podmínky skladování vzorků tak, aby byla zajištěna ochrana farmaceutické složky. Pro většinu léčiv byla výtěžnost v rozmezí 53-99 %.

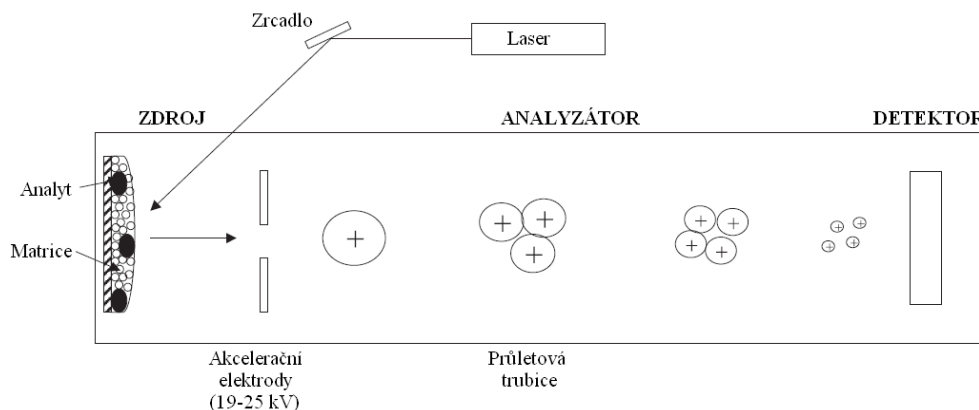
Tato studie se ukázala jako cenná pro další vývoje metod pro analýzy odpadních a povrchových vod.<sup>3</sup>

Zkoumání syntetických organických sloučenin a sloučenin nalezených v přírodě se provádí ve velikém měřítku. V dnešní době se testování takovýchto sloučenin odehrává ve farmaceutických laboratořích, farmaceutických společnostech a v neposlední řadě také v laboratořích univerzit a různých institucí. Důležitým cílem této studie je najít nové látky s farmakologickou aktivitou. Ve farmaceutických společnostech je hlavním záměrem najít nová a zároveň účinnější léčiva. Dalším krokem po izolaci sledované látky, je použití screeningových metod.<sup>4</sup>

Desorpčními iontovými zdroji míníme takové zdroje, které pomocí daného mechanismu předají svou energii analytu. Odtud se pak desorbují ionty, které jsou usměrněny do hmotnostního analyzátoru.<sup>5</sup> V této diplomové práci se konkrétně jednalo o iontové zdroje MALDI, nanoDESI a TM-DESI.

## 2.2 MALDI

MALDI – Desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (z angl. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) je měkká ionizační technika, která umožňuje citlivou analýzu velkých, netěkavých a labilních molekul hmotnostní spektrometrií.<sup>6</sup> Principem této metody je generování iontů pro hmotnostní analýzu laserovým zářením za účasti matrice (Obrázek 1.).<sup>7</sup> Analyzovaný vzorek je umístěn na kovovou destičku a pokryt vrstvou matrice (uvedeny v Tab.I.). Tato matrice je schopna po ozáření laserem předat svou energii analytu, který se tímto procesem ionizuje, a takto vzniklé ionty jsou usměrněny do hmotnostního analyzátoru. Používané matrice musí absorbovat laserové záření a musí být v přebytku.



Obrázek 1. Princip iontového zdroje MALDI.(převzato z cit. <sup>9</sup>)

Pomocí MALDI jsme schopni analyzovat proteiny, oligosacharidy i peptidy a při využití MALDI k zobrazování hmotnostní spektrometrií dokážeme zjistit distribuci těchto analytů v živočišných, ale i rostlinných tkáních. Prostorové rozlišení je omezeno velikostí laserového paprsku, laserový paprsek má šířku běžně okolo 5 - 50  $\mu\text{m}$ .<sup>7-9</sup>

*Tab. I* Nejčastěji užívané matrice pro MALDI-IMS, jejich molekulová hmotnost, vlnová délka použitého laseru a selektivní použití.<sup>7-9</sup>

| Matrice  | $M_r$ | Laser $\lambda$ [nm] | Použitelné pro:   |
|--|-------|----------------------|---|
| Kys. 2,5-dihydroxybenzoová (DBH)               | 154   | 337                  | lipidy, malé peptidy, sacharidy, nukleotidy               |
| Kys. $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) | 189   | 266, 337             | peptidy, malé proteiny, lipidy, glykoproteiny, nukleotidy |
| Kys. 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (SA)     | 224   | 266, 337             | velké proteiny, glykoproteiny, hydrofobní proteiny        |
| 2,4,6-trihydroxyacetofenon (THAP)              | 186   | 337                  | oligonukleotidy, lipidy                                   |
| Kys. 3-hydroxypikolinová (3-HPA)               | 139   | 337, 355             | oligonukleotidy   |
| Kys. pikolinová                                | 123   | 266                  | oligonukleotidy   |
| 2,6-dihydroxyacetofenon (DHAP)                 | 152   | 337, 355             | fosfolipidy, velké proteiny                               |
| Kys. nikotinová                                | 123   | 266, 337, 355        | proteiny, oligonukleotidy                                 |

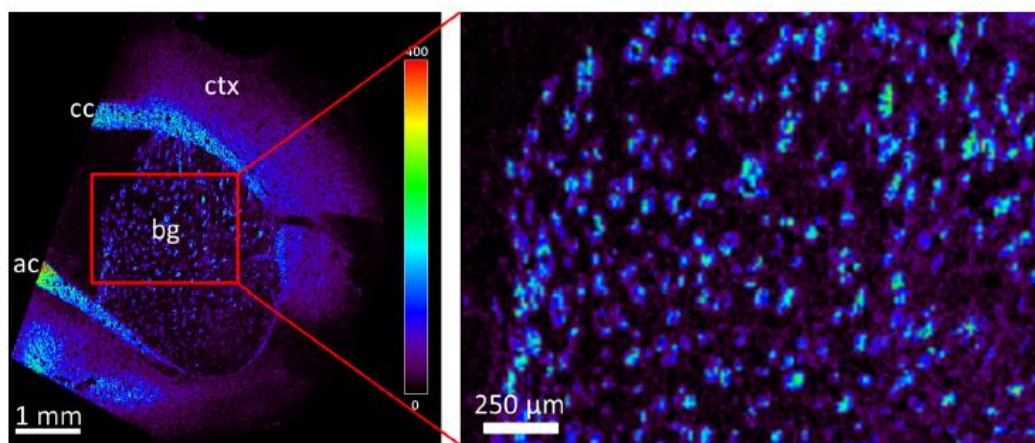
MALDI ionizace ve spojení s průletovým analyzátozem nachází uplatnění v mnoha analytických odvětvích. Mezi konkrétní příklady patří identifikace proteinů<sup>11</sup>, analýza bakterií<sup>12,13</sup>, charakterizace peptidů<sup>14</sup>, analýza lipidů<sup>15,16</sup> nebo analýza léčiv<sup>17,18</sup>.

Jednou z aplikací MALDI bylo sledování změny hladiny ethanolaminu myšího plodu u jedinců léčených na vysoký tlak. Vzhledem k tomu, že o serotoninu, homocysteinu a oxytocinu je známo, že kolísají v průběhu těhotenství savců, rozhodli se vědci zaměřit na amin. Konkrétně na ethanolamin, který je spojen se změnami krevního tlaku v březosti myši. Na druhé straně byl popsán nepříznivý vliv změn hladin těchto hormonů u onemocnění komplikujících těhotenství, jako je právě vysoký tlak, který na celém světě postihuje až 10 % budoucích matek a má za následek poškození ledvin, jater a srdce. Poruchy mateřského metabolismu aminů, jako je například hormon štítné žlázy a homocystein, nijak neovlivňují metabolické procesy plodu. Naproti tomu jsou pozorovány nitroděložní retardace růstu a perinatální úmrtí plodu (tj. úmrtí novorozence do 7 dnů ode dne porodu). Snažíme-li se porozumět změnám plodu a nemocem spojených s těhotenstvím, musíme pozorovat aminy,

kteřé jsou v extrakčním vzorku plodu. Technika MALDI-TOF/MS se tímto experimentem ukázala jako schopná pro detekci látek v klinickém a forenzním odvětví.<sup>19</sup>

V nedávné době byl uveden na trh hmotnostní spektrometr s iontovou mobilitou SYNAPT, který ve spojení s MALDI může zvýšit potenciál hmotnostně spektrometrického zobrazování (MSI – mass spectrometry imaging), lze jej využít v biologickém výzkumu<sup>20-23</sup> a charakterizaci chemických materiálů<sup>24-26</sup>, kombinuje nejvyšší výkon s výkonnými pracovními postupy a nabízí nesrovnatelnou experimentální všestrannost.

Hmotnostní spektrometry z řady Synapt-G1/G2 jsou velice používané přístroje pro MALDI-MSI. Typické rozlišení těchto přístrojů je okolo 50  $\mu\text{m}$ , což je často nižší než požadované rozlišení buněk. Tento experiment ukazuje první příklady použití MALDI-MSI prokazující rozlišení 10  $\mu\text{m}$  získané právě přístrojem Synapt G2-S HDMS bez zvyšování množství vzorku. Tohoto zlepšení se dosáhlo pomocí tvarování laserového paprsku. V této studii byla použita matrice dithranol, který je efektivní matricí pro zobrazování kyselých lipidů, jako jsou sulfamidy, gangliosidy a fosfatidylinositoly v negativním iontovém režimu, je také vhodný pro zobrazování základních lipidů i v pozitivním iontovém módu. Koronální řezy myšími mozkovými tkáněmi byly zkoumány jako široce používané standardní vzorky pro vývoj a testování MALDI-MSI metodiky. Snímek z MALDI-MSI analýzy můžeme sledovat na Obrázku 2.<sup>27</sup>



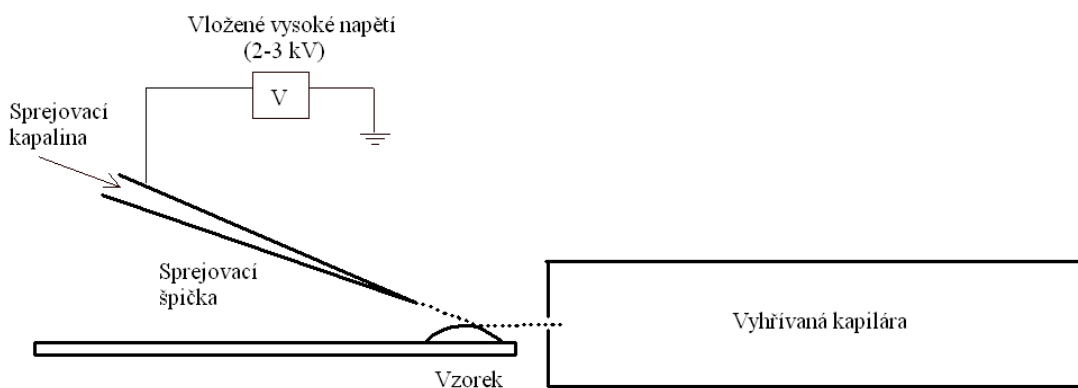
Obrázek 2. MALDI-MSI snímky myšího mozku pořízeného v negativním módu. Viditelné struktury corpus callosum (cc, kalózní těleso, shluk nervových vláken spojující obě hemisféry), přední komisura (ac, svazek nervových vláken spojující dvě mozkové hemisféry napříč podélné osy), mozková kůra (ctx) a bazální ganglia (bg, součást šedé hmoty koncového mozku zevně od thalamu). (převzato z cit. <sup>27</sup>)

## 2.3 NanoDESI

*DESI* – Desorpční elektrosprej (z angl. Desorption ElectroSpray Ionization) je měkká ionizační technika představená v roce 2004.<sup>28</sup> Principem této metody je ionizace vzorku nabitými částicemi rozpouštědla a následná desorpce vzniklých iontů do hmotnostního spektrometru. Tato metoda umožňuje přímou analýzu a zobrazování biologických materiálů a ostatních povrchů. Ve studiích farmaceutických sloučenin bylo prokázáno, že odezva DESI signálu je lineární ( $R^2 = 0,996$ ), s relativní chybou  $\pm 7 \%$  a relativní směrodatnou odchylkou  $\pm 7 \%$ , při analýze čistých roztoků nanesených na hydrofobní povrchy. DESI poskytuje informace o prostorovém rozložení molekul na povrchu s laterálním rozlišením, které je v dnešní době  $\sim 250 \mu\text{m}$ . Při dodržení mnoha parametrů (dodržení vzdálenosti vzorku a sprejovací kapiláry, průtok sprejovací kapaliny, správný výběr terčíku atd.) lze dosáhnout rozlišení až  $40 \mu\text{m}$ .<sup>29</sup> DESI přináší mnoho výhod v tom, že příprava vzorku je minimální a měkká ionizace umožňuje neporušení molekuly, která má být detekována.<sup>7,30</sup>

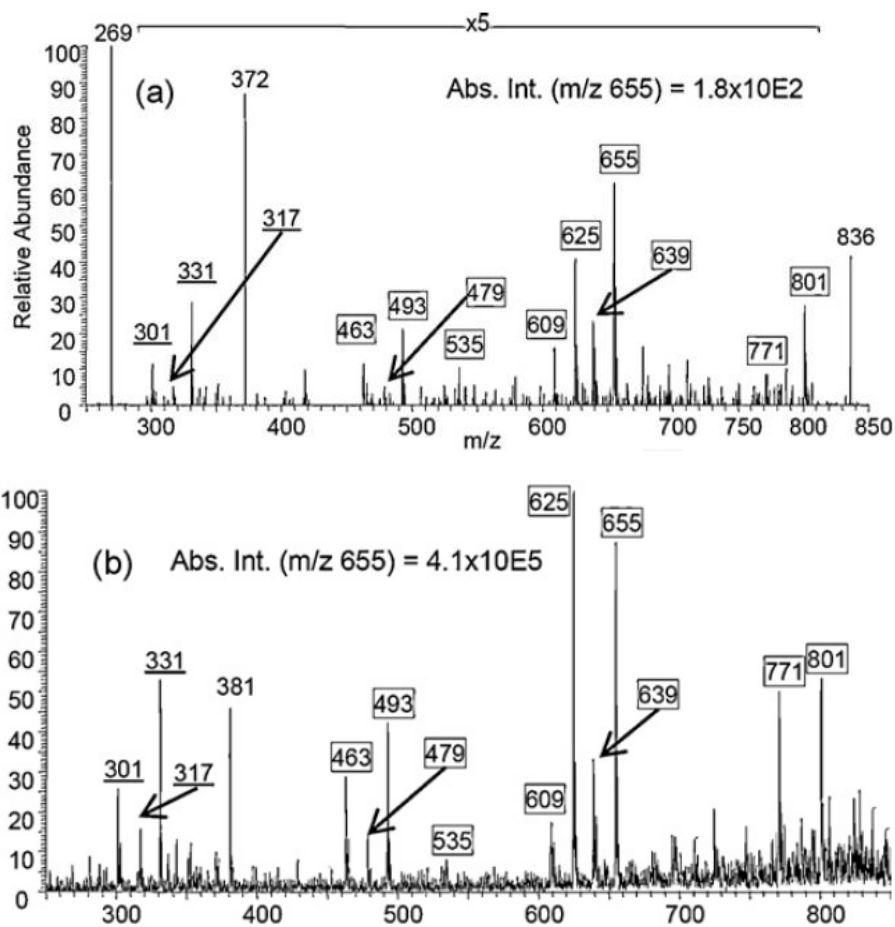
### 2.3.1 Iontový zdroj desorpční nanoelektrosprej, vyvinutý na Katedře analytické chemie PŘF UPOL

*nanoDESI* – Desorpční nanoelektrosprej (z angl. Desorption Nanoelectrospray Ionization) je ve své podstatě miniaturizovaný desorpční elektrosprej. Hlavní rozdíl od běžného DESI je v průměru sprejovací špičky, která u nanoDESI je  $1\text{-}3\mu\text{m}$  (u DESI to bývá několik desítek  $\mu\text{m}$ ), dalším neméně důležitým rozdílem je, že nepotřebuje zmlžovací plyn, který je naopak u DESI nezbytný. Dopadající nabitě kapičky sprejovací kapaliny předávají svou energii na vzorek, odkud jsou ionty desorbovány do vyhřívané kapiláry, která ústí do hmotnostního analyzátoru. Obrázek 3. popisuje princip metody nanoDESI. Jedná se o novou techniku umožňující analyzovat různé typy vzorků bez speciální úpravy vzorku.<sup>31-33</sup>



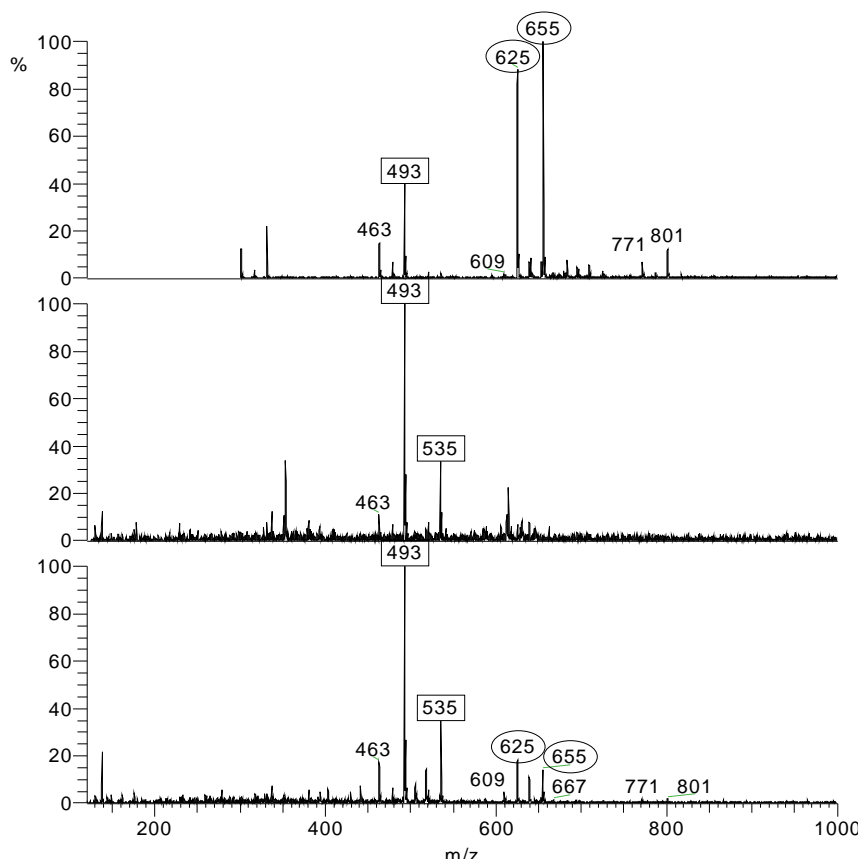
Obrázek 3. Princip nanoDESI (převzato z cit .<sup>30</sup>).

Příkladem aplikace nanoDESI je analýza antokyaninů ve víně. Antokyaniny jsou z chemického hlediska flavonoidní pigmenty. Tato barviva jsou v přírodě zodpovědná za většinu červených, růžových, fialových a modrých odstínů u rostlin. V této práci se vědci snažili nalézt techniku, která by umožňovala analýzu červených vín bez nutnosti použití separační techniky před vlastní analýzou. Bylo analyzováno 6 červených vín (tři druhy: Alibernet, Neronet a Rubinet ve dvou ročnících 2005 a 2007). Nejdříve byly zoptimalizované podmínky analýzy. Nejvhodnější sprejovací kapalinou byla směs rozpouštědel: MeOH : H<sub>2</sub>O (75 : 25 v/v) okyselená 0,2% kyselinou mravenčí. Antokyaniny se vyskytují v různých acidobazických formách v závislosti na kyselosti roztoku. Jestliže je pH roztoku menší než 2, převládají flavyliové kationty. Bylo zjištěno, že okyselené vzorky poskytovaly více desorbovaných iontů a zlepšily kvalitu spekter (Obrázek 4.).<sup>34</sup>



Obrázek 4. NanoDESI spektrum Rubinetu (ročník 2005). a) neokyselený vzorek, měřený okamžitě, b) okyselený vzorek, měřený okamžitě. (převzato z cit. <sup>34</sup>)

Desorpční nanoelektrosprej se ukázal jako vhodná technika pro screening červených vín, například při dobarvování vín. Toto bylo demonstrováno na dobarvení vína vínem. Dobarvovalo se víno Modrý Portugal vínem Rubinet, což je barvička a ty obsahují jiné, specifické anthokyaniny, které lze pozorovat v dobarveném víně i ve stopovém množství. Na Obrázku 5. vidíme spektrum Rubinetu a neobarveného vína a poté i vína dobarveného Rubinetem. Anthokyaniny v kroužku jsou typické pro Rubinet a nevyskytují se v Modrém Portugalu.<sup>34</sup>

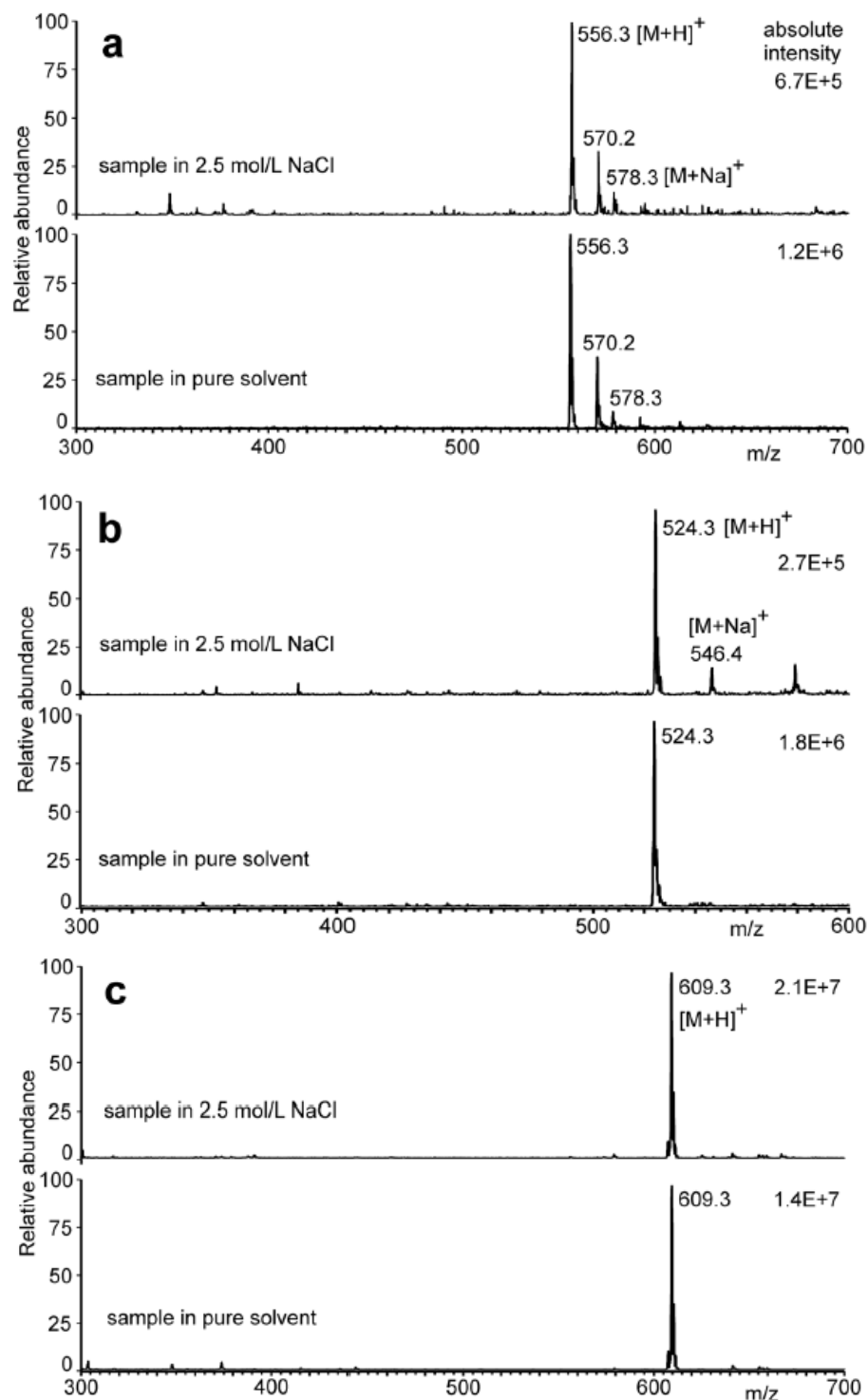


Obrázek 5. Dobarvení vína Modrý Portugal vínem Rubinet 2005. (převzato z cit. <sup>34</sup>)

horní – Rubinet 2005; prostřední – Modrý Portugal; dolní – Modrý Portugal dobarvený Rubinetem

Následující studie se věnovala měření vnitřní energie iontů tvořených nanoDESI a jejich toleranci k vlivu zasolení. Tato nová technická modifikace podstatně zlepšila robustnost měření a umožňuje prosazení této ionizační techniky i do jiných oblastí hmotnostních analýz. Sprejovací kapalinou byla směs rozpouštědel: MeOH : H<sub>2</sub>O (50 : 48 v/v) okyselená 2 % kyselinou octovou. Analyty byly rozpuštěny ve směsi MeOH : H<sub>2</sub>O (50 : 50 v/v), koncentracích 10 µg/ml (kofein, MRFA, leucin-enkefalin, reserpin), nebo 100 µg/ml (benzylpyridiniové soli). A 3 µl těchto alikvótů bylo nadávkováno na okraj sklička, kde postupně uschly, v závislosti na okolních podmínkách. Tři ze zkoumaných látek (leucin-enkefalin, MRFA, reserpin) byly desorbovány/ionizovány ze zaschlých skvrn neobsahujících sůl, a ze skvrn, obsahujících 2,5 mol/l NaCl. MRFA a leucin-enkefalin v zasolených vzorcích potlačovaly signál, oproti tomu signál reserpinu nebyl ovlivněn (Obrázek 6.). Vysoká koncentrace soli nezasahuje do generování iontů a poměr signálu k šumu se nezměnil.<sup>35</sup>

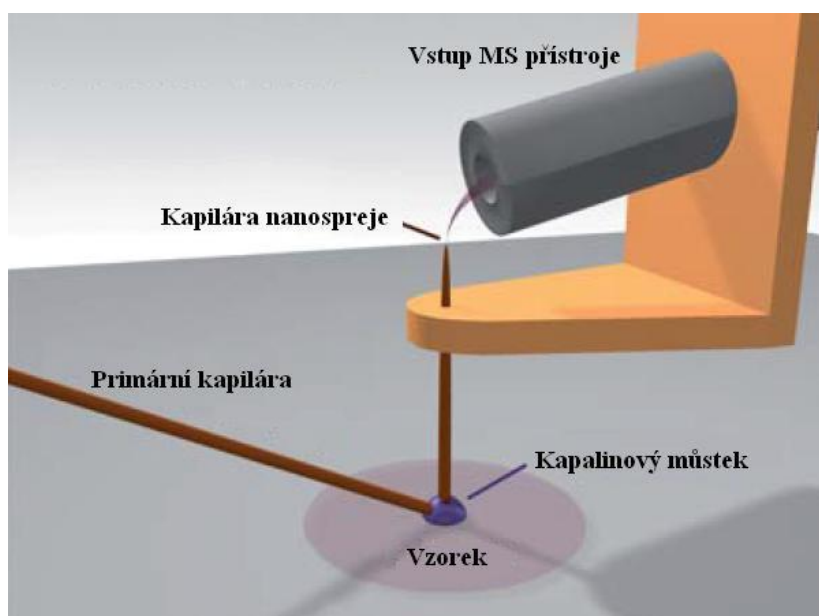




Obrázek 6. NanoDESI spektra vzorků, připravených v čistém rozpouštědle a 2,5 mol/l NaCl. a) leucin-enkefalin;  $m/z$  570 je neznámá kontaminace nebo degradace produktů, b) MRFA, c) reserpin. (převzato z cit. <sup>35</sup>)

### 2.3.2 Desorpční nanoelektrosprej podle Laskin

Nano-DESI (z angl. nanospray desorption electrospray ionization) je ionizační technika za normálního tlaku vhodná pro analýzy organických sloučenin. Principem této metody je desorpce analytu z povrchu vzorku kapalinovým můstkem, který je tvořen rozpouštědlem a umístěn mezi dvě kapiláry. Jedna kapilára dodává rozpouštědlo, čímž udržuje kapalinový můstek, druhá kapilára má za úkol přenášet rozpuštěný analyt z můstku do hmotnostního spektrometru (viz Obrázek 7.). Vysoké napětí vložené na vstup hmotnostního spektrometru a primární kapiláru vytváří samonasávací děje.<sup>36</sup> Tato technika je odlišná oproti nanoDESI popsaném výše.



Obrázek 7. Konstrukce nanoDESI – Laskin (převzato z cit. <sup>36</sup>)

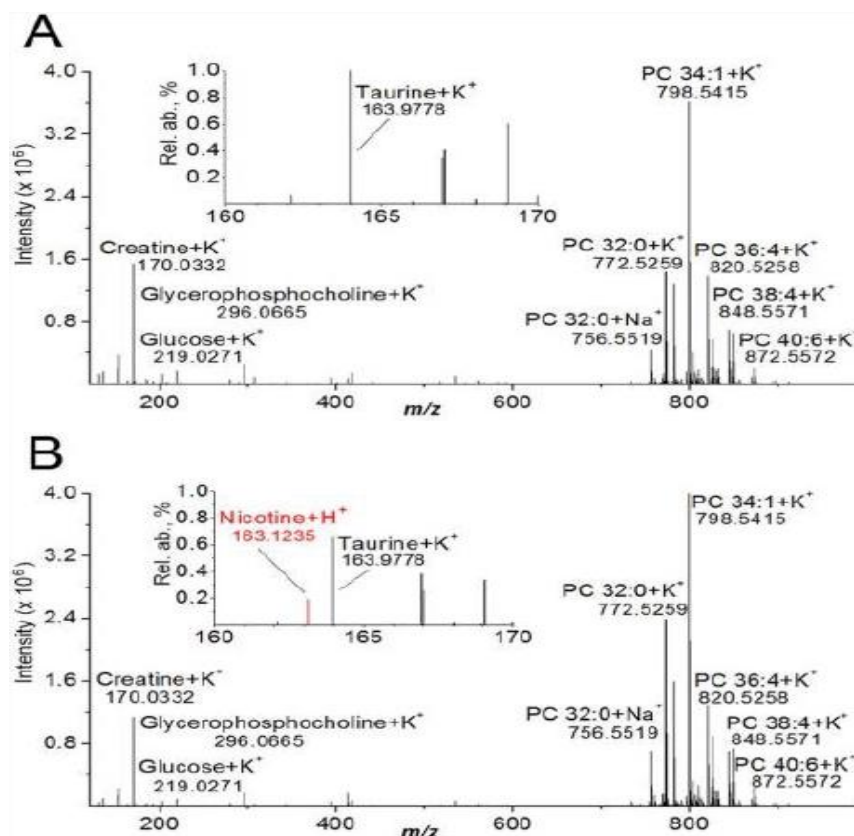
Iontový zdroj nano-DESI byl použit pro analýzu glykolipidů a metabolitů v živých sinicích. Mikroorganismy uvolňují různé organické sloučeniny, které umožňují komunikaci, nebo poskytují výhody ostatním mikrobům. Znalost mikrobiální produkce metabolitů přispívá k pochopení mikrobiálního světa a mohou vést k vývoji nových léčiv, výroby biopaliv a zlepšení klinického výzkumu. Nano-DESI je technikou, která umožňuje získání detailního chemického složení z určitého místa na povrchu bez speciálních úprav vzorku. V této studii bylo použito sinice rodu *Synechococcus* sp. PCC 7002, jedná se o mořské sinice, které se pěstují na médiu s vysokým obsahem soli. Vyžadují pouze světlo, anorganické minerální živiny a oxid uhličitý k produkci stovek organických sloučenin, které by mohly

být použity v metabolických procesech, při získávání živin a při mezibuněčné komunikaci. Analýza byla provedena na kousku agaru vyříznutého v Petriho misce a umístěného na podložní sklíčko mikroskopu. Toto sklíčko bylo umístěno do držáku. V této studii bylo zjištěno, že většina metabolitů byla lokalizována na kolonii. Sacharóza a glukosylglycerol, důležité látky pro ochranu organismu před osmotickým tlakem, byly rozptýleny v agaru. Také bylo dokázáno, že produkce glukosylglycerolu je závislá na stáří kolonie.<sup>37</sup>

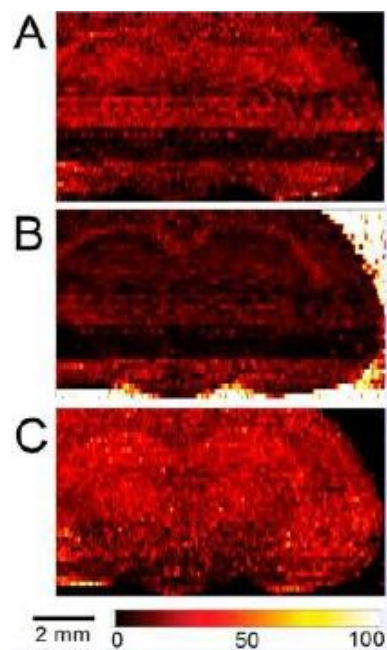
Další aplikací nano-DESI je analýza aerosolových vzorků z terénní studie CalNex2010 pomocí hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením (HR-MS) spojeného s nano-DESI. Byla zjištěna přítomnost více než 850 jedinečných molekulárních druhů v rozsahu hodnot  $m/z$  50-400, při použití ESI v pozitivním modu vzorků aerosolu v rozmezí velikosti 0,18-0,32  $\mu\text{m}$ . Analýza byla zaměřena na identifikaci dvou hlavních skupin: sloučeniny obsahující pouze uhlík, vodík a kyslík a na organické sloučeniny obsahující dusík. Druhá skupina, sloučeniny obsahující dusík, představovala 40 % sloučenin pozorovaných v odpoledních hodinách a 52 % v časných ranních hodinách. Srovnáním dvojic reaktant-produkt bylo zjištěno, že 50 % sloučenin obsahujících dusík mohly být vytvořeny v reakcích přetvářejících karbonyly na iminy. Fotochemický zdroj potvrzuje, že sloučeniny obsahující uhlík, vodík a kyslík byly dominantní v odpoledních hodinách.<sup>38</sup>

Jiný výzkum byl věnován zobrazování návykové látky, nikotinu, v krysí mozkové tkáni s využitím nano-DESI. Lokalizace nikotinových acetylcholinových receptorů byla již provedena mikropozitronovou emisní tomografií, autoradiografií a imunoanalýzou. Ačkoliv tyto techniky poskytují snímky o vysoké kvalitě, vyžadují analytické označení zkoumané molekuly, a proto umožňují vizualizaci pouze jediného druhu v daném čase. Naproti tomu MSI nevyžaduje žádné speciální značení a všechny ionizovatelné sloučeniny je schopna sledovat najednou. Mnoho ionizačních technik může být použito pro tento experiment, jako jsou MALDI, SIMS a DESI. NanoDESI technika byla pro tuto studii vybrána proto, že dokáže pracovat za normálního tlaku. V této studii bylo dvěma krysám peritoneálně (do pobřišnice) podán nikotin v dávkovaném objemu 1 ml DMSO na 1 kg tělesné hmotnosti a 10 mg nikotinu na 1 kg tělesné hmotnosti. Kontrolním krysám byl podán pouze 1  $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Obrázek 8. ukazuje na nano-DESI spektrum vzorků kontrolních a analyzovaných. Tato studie představila experimentální přístup pro přesné prostorové mapování drog a metabolitů v tkáňových vzorcích. V tomto experimentu se využíval

izotopicky označený standard, který byl přidán do nano-DESI rozpouštědla pro kompenzaci vlivů matrice a potlačení iontu. Bylo prokázáno, že přítomnost vnitřního standardu umožnila kvantifikaci molekul analytu, získaných z řezu tkání. Snímky iontů byly následně mapovány na anatomických oblastech mozku v analyzované oblasti (viz Obrázek 9.). Tento postup byl využit pro mapování rozložení nikotinu v krysí mozkové tkáni, drogy byly podávány in vivo.<sup>39</sup>



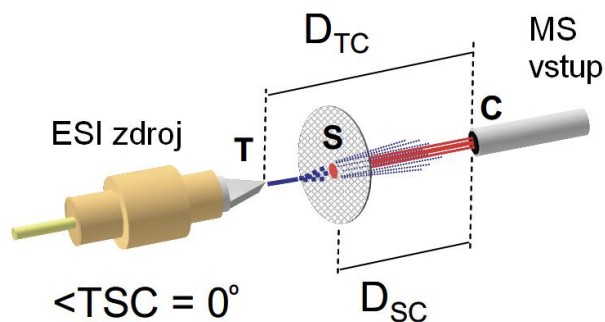
Obrázek 8. Srovnání nano-DESI spekter mozkových tkání a) kontrolní a b) tkáně vystavené nikotinu. Spektra byla snímána po dobu 10 min (cca 680 skenů). Spektrum a) kontrolního vzorku a b) vzorku vystaveného nikotinu bylo v hmotnostním rozsahu  $m/z$  120 – 1000. Analyzovaný vzorek s obsahem nikotinu b) ukázal oproti kontrolnímu vzorku a) pík při hodnotě 163,1235 odpovídající nikotinu  $[M+H]^+$ . (převzato z cit. <sup>39</sup>)



Obrázek 9. Záznam získaný z koronální části mozku krysy, které byl podáván nikotin peritoneálně. a)  $[M+H]^+$  ion nikotinu ( $m/z$  163,1235). b)  $[M+H]^+$  ion nikotinu-d ( $m/z$  166,1420). c)  $[M+H]^+$  ion nikotinu ( $m/z$  163,1235) normalizovaného na  $[M+H]^+$  ion nikotinu-d ( $m/z$  166,1420). (převzato z cit. <sup>39</sup>)

## 2.4 TM-DESI

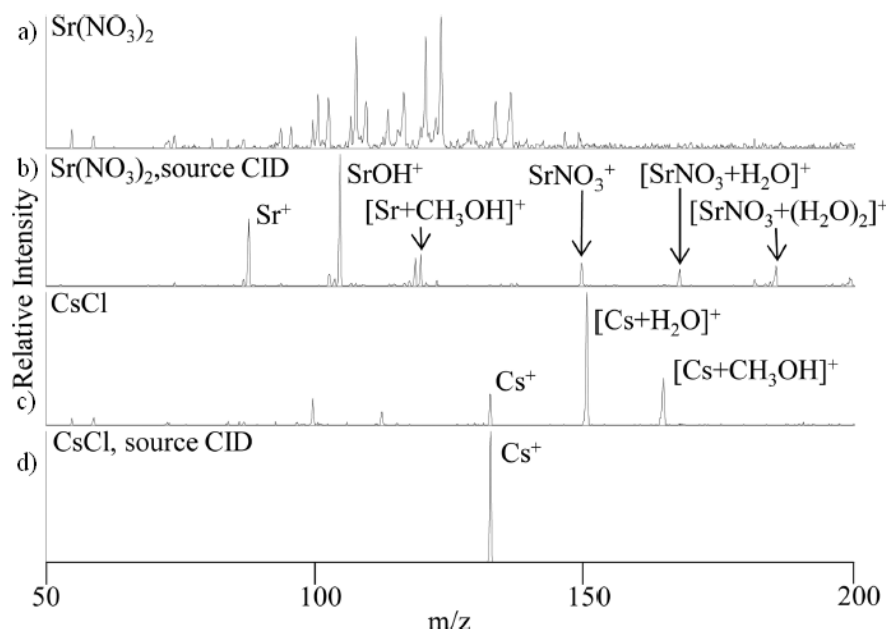
TM-DESI – transmisní desorpční elektrosprej (z angl. Transmission Mode Desorption Electrospray Ionization) představuje novou modifikaci desorpčního elektrospreje. Dokáže analyzovat kapalně či pevně vzorky po odpaření rozpouštědel. Rozdíl mezi tradičním DESI a TM-DESI je ten, že se snížil úhel mezi spojovacím hrotem, vzorkovací mřížkou a přívodní kapilárou hmotnostního přístroje na  $0^\circ$ . Principem metody je uložení vzorku na transmisní mřížku, přičemž ionizace spočívá v přenosu energie z rozprášených nabitých kapiček rozpouštědla na vzorek (viz Obrázek 10.). Možné rozmezí vzdáleností  $D_{TC}$  a  $D_{SC}$  je:  $5 \text{ mm} < D_{TC} < 21 \text{ mm}$ ,  $1 \text{ mm} < D_{SC} < 20 \text{ mm}$ . Tato konfigurace umožňuje rychlou analýzu vzorků bez speciální optimalizace rozprašovacích vzdáleností nebo úhlů. Technika TM-DESI není příliš vhodná pro analýzu sypkých materiálů, ale je spíše určena ke zjednodušení procesu přípravy vzorků kapalných. Tato metoda může snížit čas analýzy a množství vzorku potřebného pro analýzu. Nevýhodou této techniky je její neschopnost analýzu sekvencovat, neboť pro správný průběh analýzy se musí neustále pohybovat s mřížkou, aby bylo zaručeno dopravení dostatečného množství vzorku do hmotnostního přístroje.<sup>40,41</sup>



Obrázek 10. Geometrie TM-DESI. Vzorkem (S) proudí elektrosprej, přičemž úhel mezi elektrosprejovou špičkou (T), vzorkem (S) a kapilárním vstupem (C) je  $0^\circ$ .  $D_{TC}$  je vzdálenost od elektrospreje ke kapiláře a  $D_{SC}$  je vzdálenost od vzorku ke kapiláře. (převzato z cit. <sup>40</sup>)

Konkrétním příkladem použití TM-DESI je simultánní analýza potenciálních anorganických a organických složek radiologických disperzních zařízení. V této studii bylo použito spojení TM-DESI a iontové pasti s kolizí indukovanou disociací (CID). CID významně posílila signál iontů kovů a poskytla přesné izotopové poměry sledovaných kovů. Byl taktéž sledován vliv zapnuté a vypnuté CID (viz Obrázek 11.). Analyzovanými látkami byly chlorid hořečnatý, dusičnan hlinitý, chlorid draselný, chlorid vápenatý, dusičnan nikelnatý, chlorid kobaltnatý, síran měďnatý, dusičnan strontnatý, jodid sodný, chlorid cesný,

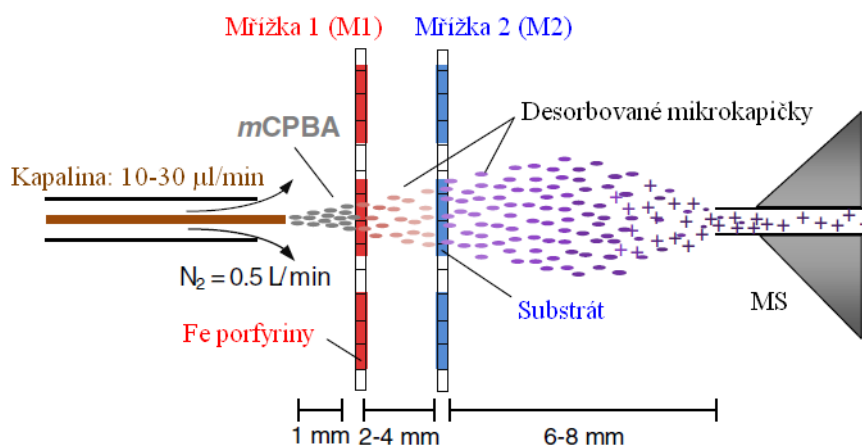
dusičnan barnatý a dusičnan olovnatý. Výsledky analýzy spojením technik TM-DESI a hmotnostního spektrometru s iontovou pastí ukazují, že tato technologie by mohla být silným nástrojem pro jaderné a forenzní vědy.<sup>42</sup>



Obrázek 11. Hmotnostní spektrum a) 400 ng  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  a c)  $\text{CsCl}$  s vypnutým CID zdrojem; b) 400 ng  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$  a d)  $\text{CsCl}$  se zapnutým CID zdrojem. (převzato z cit.<sup>42</sup>)

Další studie pojednává o objasňování mechanismů reakcí pomocí TM-DESI. Charakterizace reakčních mechanismů je důležitá pro vývoj nových katalyzátorů, léčiv a materiálů, zabývající se vědeckými a socioekonomickými problémy. Nicméně bývá často obtížné získat podrobné informace o molekulárním mechanismu za běžných laboratorních podmínek, neboť meziproducty mají velmi krátkou životnost (zpravidla méně než 1 s), existují ve složitých a dynamických maticích, které zahrnují různé reakční cesty a mají nízké koncentrace. Tyto problémy bývají podstatně výraznější pro homogenní multikatalytické systémy, které se zdají být vhodné pro složité transformace a zlepšují efektivitu, selektivitu a enantiomerní čistotu. Tato studie využívá dvou mřížek v sérii (M1 a M2, Obrázek 12.), dále ukazuje na charakterizaci reakčních mechanismů ( $\text{TM}^n\text{-DESI}$ , kde  $n$  představuje počet desorpčních kroků, konvenční konfigurace TM-DESI má  $n=1$ ). Použitím  $\text{TM}^2\text{-DESI-MS}$  byla sledována železo(Fe)porfyrin-katalyzovaná hydroxylace. Výsledky experimentu ukazují, že  $\text{TM}^2\text{-DESI}$  poskytuje prostorovou separaci činidel a dokáže

určit jejich pořadí, ve kterém jsou zaváděny do reakčních nádob. Srovnáním  $TM^1$ -DESI a DESI-MS analýzy chemické redukce dichlorfenolindofenolátu L-askorbové kyseliny se ukázalo, že  $TM^1$ -DESI umožňuje reakční dobu menší než 1 ms. Tento výzkum prokázal, že analýza metodou  $TM^n$ -DESI poskytuje schopnost sledovat reakční mechanismy, zejména katalytické děje, a umí zachytit vysoce reaktivní meziproducty s krátkou životností.<sup>43</sup>



Obrázek 12. Dvourozměrná konfigurace  $TM^2$ -DESI-MS. (převzato z cit. <sup>43</sup>)



## 2.5 Analyzátory

Hmotnostní analyzátory mají důležitou roli v hmotnostně spektrometrických měřeních. Většina desorpčních analýz využívá průletového analyzátoru (TOF, Time-Of-Flight). V průletovém analyzátoru jsou všechny ionty urychleny v definovaném poli. Ionty poté vstupují do prostoru, kde již na ně nepůsobí žádné pole, a je zkoumána jejich kinetická energie v závislosti na jejich náboji a síle urychlení v daném poli. V technice jako je MALDI je většina iontů nabitá jednonásobně a tyto ionty vstupují do prostoru bez pole (elektrického i magnetického) se stejnou kinetickou energií. Rychlost iontů a jejich doba letu v prostoru bez pole je zaznamenávána v závislosti na síle zrychlení v tomto prostoru a jejich hmotnosti. Menší ionty jsou rychlejší než větší ionty. Parametry, jakými jsou vysoká detekční účinnost, paralelní detekce a široké  $m/z$  detekční rozmezí, udělaly z průletového analyzátoru nepostradatelnou součást hmotnostních analýz. Moderní komerčně dostupné průletové analyzátory jsou vybaveny lasery, které umožňují nárůst jeho frekvence až na 2 kHz. Taková rychlost je předpokladem pro vyšší prostorové rozlišení a 3D zobrazení živočišných vzorků tkání. Průletové analyzátory mohou také kombinovat dva nebo více hmotnostních komponent, jako jsou kvadrupól-TOF (tzv. QTOF), iontová mobilita-TOF a iontová past-TOF.<sup>44</sup>

Dalším analyzátozem vhodným pro spojení s desorpčními technikami je trojitý kvadrupól (tzv. QqQ). Toto uspořádání je velice výkonnou komponentou pro využití v tandemových spektrálních technikách (MS/MS), které tvoří tři kvadrupóly spojené za sebou, přičemž první kvadrupól (Q1) slouží k vybrání iontů a je následován kolizní celou (q2) se za vedeným kolizním plynem, který má za následek kolizní excitaci daných iontů a jejich fragmenty jsou analyzovány pomocí třetího kvadrupólu (Q3). Často bývá tento analyzátor používán pro monitorování vybraných reakcí, skenování produktových iontů, výchozích iontů a ztráty neutrální částice. Pro každé výše uvedené využití jsou selektivně nastaveny parametry Q1, q2 a Q3.<sup>45</sup>

Dalšími vhodnými technikami pro spojení s měkkými iontovými zdroji je orbitrap a iontová cyklotronová rezonance. Orbitrap je zařízení skládající se z vnější a vnitřní elektrody, na které je vkládáno napětí. Ionty oscilují kolem vnitřní elektrody a je měřen proud indukovaný těmito ionty na vnějších elektrodách. Hmotnostní spektrum se získá po Fourierově transformaci (FT) signálu. Výhodou tohoto analyzátoru je správnost měření a vysoké rozlišení, naopak nevýhodou je komplikovaný a drahý systém.<sup>46,47</sup>

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) se skládá z cyklotronové cely, která je vložena do středu velmi silného magnetického pole (okolo 7 Tesla). Když se analyzovaný ion dostane do tak silného magnetického pole, začne se pohybovat s cykloidální trajektorií o určité cyklotronové frekvenci. Poté jsou ionty excitovány radiofrekvenčně (RF) na vyšší orbit. Pro každou hodnotu  $m/z$  existuje specifická cyklotronová frekvence. Detekce je umožněna měřením indukovaného proudu ionty na detekčních deskách. Fourierovou transformací získáme z těchto frekvencí hmotnostní spektrum.<sup>48</sup> Komplexní přehled analyzátorů je uveden v tabulce (II.) včetně vhodnosti jejich použití.

*Tab II. Přehled aplikací jednotlivých typů analyzátorů včetně jejich výhod a nevýhod.*<sup>44-51</sup>

| Technika    | Molekulární třída                     | Výhody   | Nevýhody                   |
|-------------|---------------------------------------|--|----------------------------|
| TOF         | proteiny, peptidy, lipidy, metabolity | vysoká citlivost, neomezené pro vyšší $m/z$                  | nízké hmotnostní rozlišení |
| FT-ICR      | metabolity, lipidy, peptidy           | největší hmotnostní rozlišení                                | drahé vybavení a údržba    |
| FT-Orbitrap | metabolity, lipidy, peptidy           | velmi vysoké hmotnostní rozlišení                            | drahé vybavení a údržba    |
| QqQ         | farmaceutika, lipidy                  | sledování více reakcí: mód pro vysokou citlivost a specifitu | pouze cílené analýzy       |
| QTOF        | metabolity, lipidy, peptidy           | MS/MS, kombinace s iontovou mobilitou                        | Omezený rozsah $m/z$       |

## 2.6 Léčiva

Léčivo je nadřazeným pojmem a dělí se na dvě skupiny: léčivé látky a léčivé přípravky. Zákon č. 378/2007 Sb. definuje léčivou, pomocnou látku a léčivý přípravek takto:

- *Léčivá látka* je jakákoliv látka nebo směs látek určená k použití při výrobě nebo přípravě léčivého přípravku, která se po použití při této výrobě nebo přípravě stane účinnou složkou léčivého přípravku určenou k vyvinutí farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku za účelem obnovy, úpravy nebo ovlivnění fyziologických funkcí anebo ke stanovení lékařské diagnózy.
- *Pomocná látka* je jakákoli složka léčivého přípravku, která není léčivou látkou nebo obalovým materiálem.
- *Léčivým přípravkem* se rozumí látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat, nebo látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat či podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy.<sup>52</sup>

Léčivo může být klasifikováno podle chemického typu účinné látky, nebo podle způsobu použití léčby konkrétního stavu. Každé léčivo může být však zařazeno do jedné nebo více lékových skupin.<sup>53</sup> Následující rozdělení léčiv nepojednává o všech kategoriích, jedná se pouze o výtah některých skupin.

### 2.6.1 Rozdělení léčiv do kategorií

- *Steroidy kůry nadledvinek*  
Neboli kortikosteroidy jsou hormony syntetizované kůrou nadledvinek. K dispozici jsou 2 typy kortikosteroidů mineralokortikosteroidy a glukokortikosteroidy. Jedná se o léčiva s vysokým protizánětlivým účinkem.
- *Inhibitory steroidů kůry nadledvinek*  
Jsou léčiva, která inhibují klíčové kroky v biosyntéze hormonů produkovaných kůrou nadledvinek, jako jsou například estrogen a androgen. Používají se k léčení Cushingova

syndromu a některých typů rakoviny. V diagnostice pak jako postup pro kontrolu funkce hypofýzy.

- *Andrenergní bronchodilatátory*

Léky působící na průdušky a uvolnění hladké bronchiální svaloviny.

- *Léčiva na snižování tlaku*

Jsou to léčiva, která okamžitě snižují krevní tlak, podávají se parenterálně (mimostřevně). Hypertenzní stavy mohou být hypertenzní encefalopatie, eklampsie, akutní selhání levé komory a akutní srdeční selhání.

- *Léčiva na plicní hypertenzi*

Jedná se o léčiva, která snižují krevní tlak v plicích. Plicní hypertenze obvykle zapříčiňuje zvýšenou dušnost a selhání pravé strany srdce.

- *Antagonisté aldosteronového receptoru*

Hlavním účinkem aldosteronu je zvýšení resorpce sodíku ledvinami. Zároveň se zvyšuje vylučování vodíku a draselných iontů. Antagonisté receptoru aldosteronu blokuje tyto účinky, tedy snižují resorpci sodíku a zadržování vody v ledvinách a důsledkem toho je snížení krevního tlaku. Tato léčiva se tudíž používají na snižování tlaku.

- *Alkylační činidla*

Jsou třídou chemoterapeutických léků, které se váží na DNA a brání správné replikaci DNA. Alkylační činidla jsou používány jako součást chemoterapie na různé typy rakoviny.

- *Inhibitory  $\alpha$ -glukosidázy*

Enzym  $\alpha$ -glukosidáza je jedním z enzymů zodpovědných za rozložení sacharidů na menší cukerné částice jako je glukóza. Inhibitory tohoto enzymu zpomalují trávení sacharidů a tím i vstřebávání glukózy. To má za následek pomalejší vzestup hladiny glukózy v krvi po jídle a po celý den.

- *Alternativní léky*

Jsou různé léčebné systémy, jako jsou homeopatika, bylinné a přírodní medikamenty, chiropraxe, akupunktura atd.

- *Aminoglykosidy*

Jsou skupinou baktericidních antibiotik, které inhibují syntézu bílkovin. Jejich použití je omezeno kvůli potenciálním vedlejším účinkům a mohou vést k poškození ledvin a uší. Aminoglykosidy jsou používány pouze v případě, že jiná méně toxická antibiotika

jsou kontraindikována nebo neúčinná. Jsou aktivní zejména proti aerobním gram-negativním bacilům a stafylokokům.

- *Aminopeniciliny*

Jsou to baktericidní  $\beta$ -laktámová antibiotika, která brání syntéze bakteriální buněčné stěny. Jsou chemicky podobné penicilinu, ale mají širší použití než peniciliny. Používají se k léčbě horních cest dýchacích, infekce dolních cest močových, kožních infekcí atp.

- *Aminosalicyláty*

Inhibují syntézu kyseliny listové a/nebo inhibují syntézu buněčné stěny. Brání také bakteriální rezistenci k lékům, jako je streptomycin a izoniazid. Používá se spolu s jinými léky k léčbě tuberkulózy.

- *Antagonisté AMPA receptorů*

Jsou to antikonvulziva (léky na léčbu epilepsie) používané u pacientů s epilepsií a při léčbě epileptických záchvatů.

- *Analogy amylinu*

Jedná se o stabilní syntetické sloučeniny, které jsou podávány podkožně před jídlem. Používají se k léčbě cukrovky.

- *Analgetika*

Jsou léky, které zmírňují bolest, aniž by docházelo k anestezii. Obvykle se používají k úlevě od silné bolesti.

- *Kombinace analgetik*

Obsahují buď jednu nebo více typů analgetik s jinými léčivy. Různá analgetika mají odlišný způsob působení a pracují současně ke snížení bolesti.

- *Androgeny a anabolické steroidy*

K této skupině patří mužský pohlavní hormon testosteron a dihydrotestosteron a další látky, chovající se jako tyto pohlavní hormony. Stimulují vývoj mužských pohlavních znaků (hlubší hlas, růst vousů) a vývoj mužských pohlavních orgánů. Tato léčiva se používají jako substituční terapie k léčbě opožděné puberty u dospívajících chlapců, impotence u mužů a léčbě rakoviny prsu u žen.

- *Anorektální přípravky*

Obvykle obsahují lokální anestetikum a léky proti bolestem a protizánětlivá činidla v kombinaci jako masti nebo čípky. Používají se k léčbě vnitřních i vnějších hemoroidů.

- *Anorexianty*  
Jsou léky, které působí v mozku potlačení chuti k jídlu. Mají povzbuzující účinek v hypotalamu a limbických oblastech, které ovládají pocit sytosti. Používají se k léčbě obezity.
- *Antacidy*  
Látky neutralizující žaludeční kyseliny a zvyšující pH v žaludku.
- *Antihelmetika*  
Jedná se o léčiva používané k odstranění červů ze střev. Tyto látky jsou velmi účinné proti červům, ale jsou nezbytná další hygienická opatření, aby se zabránilo opakované infekci.
- *Anti-angiogenní oční přípravky*  
Působí regeneračně na nové krevní cévy v sítnici.
- *Protiinfekční přípravky*  
Tyto léky mohou zničit buď původce infekce, a nebo zastavují její další šíření. Sem patří antibiotika, antimykotika, antivirotika a antiprotozoika.
- *Antiandrogeny*  
Antiandrogenem rozumíme některý ze skupiny léků, které působí jako blokátory receptory androgenu. Používají se k léčbě rakoviny prostaty.
- *Antiangiální léčiva*  
Používají se k léčbě anginy pectoris.
- *Antidepresiva*  
Jsou to léky, které léčí deprese a zlepšují jejich příznaky.
- *Antidiabetika*  
Jejich cílem je dosažení optimální hladiny glukózy v krvi a zmírnění diabetických symptomů jako je žízeň, polyurie, hubnutí a ketoacidóza. Dlouhodobým záměrem tohoto léčiva je zabránění rozvoji, nebo zpomalení rozvoje, dlouhodobých komplikací spojených s tímto onemocněním.
- *Antibiotika*  
Antibiotika jsou léky, které mohou buď zabít infekční bakterie, nebo inhibují jejich růst. Různá antibiotika pracují různými mechanismy a jsou určeny k léčbě infekcí způsobených bakteriemi, které jsou citlivé na konkrétní antibiotikum.

- *Antikonvulziva*  
Léčiva, která zabraňují nebo snižují závažnost a frekvenci záchvatů různých typů epilepsie. Různé typy antikonvulziv mohou působit na různé receptory v mozku a mohou mít odlišné účinky.
- *Antiemetika*  
Přípravky na léčbu nevolnosti a s ní spojené zvracení vyvolané chemoterapií.
- *Antimykotika*  
Léky zabíjející houby a jsou určeny k léčbě plísňových infekcí (včetně kvasinkových infekcí).
- *Antihyperlipidemická činidla*  
Pomáhají snížit hladinu celkového cholesterolu snížením LDL cholesterolu a triglyceridů a zvýšením HDL cholesterolu.
- *Antimalarika*  
Léky účinné při léčbě malárie. Malárie je infekční onemocnění způsobené štípnutím komára Anopheles infikovaným určitými prvoky. Nejlepším způsobem jak zabránit malárii je očkováním antimalariky preventivně před vstupem do endemické oblasti.
- *Cytostatika*  
Ovlivňují růst a dělení nádorových buněk, brání tedy jejich dalšímu šíření.
- *Léčiva na Parkinsonovu chorobu*  
Tyto přípravky mají za úkol nahradit dopamin buď léčivy, která uvolňují dopamin, nebo léčivy, která napodobují účinky dopaminu. Parkinsonova choroba je degenerativní onemocnění pohybového ústrojí, ke kterému dochází v důsledku nedostatku dopaminu v bazálních gangliích.
- *Anxiolytika, sedativa a hypnotika*  
Jsou léky, které působí na centrální nervový systém k léčbě úzkosti a nespavosti. Hlavní třídy těchto léčiv jsou benzodiazepiny a barbituráty.
- *Diuretika*  
Diuretika jsou přípravky, které zvyšují tvorbu moči za účelem vylučování soli a vody z ledvin. Používají se ke snížení otoku způsobeným zadržováním soli a vody, které mohou vést k selhání srdce, ledvin, jater a plic.<sup>53-62</sup>

V této diplomové práci se jednalo především o skupinu látek s analgetickými účinky.

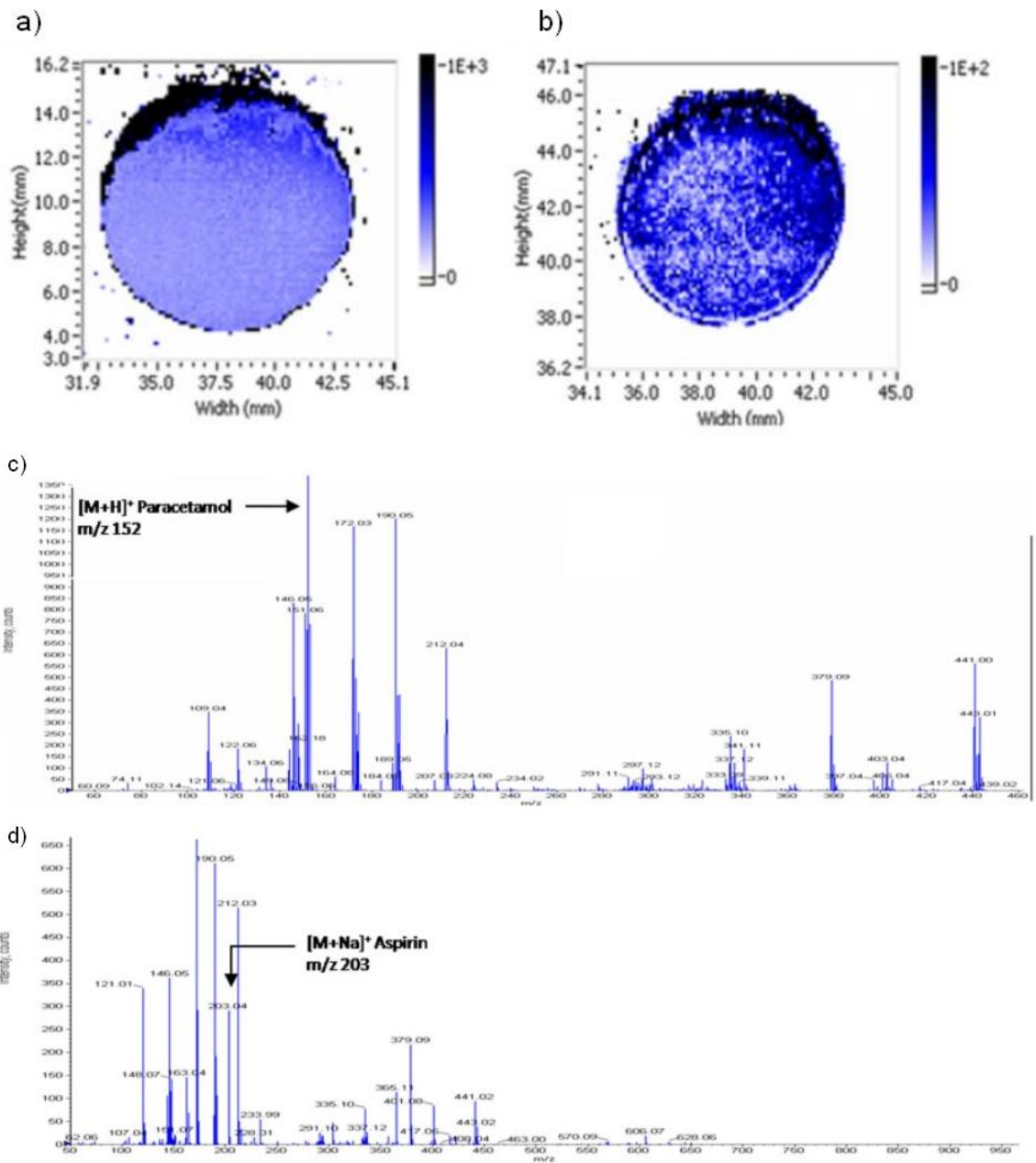
## 2.7 Hmotnostní spektrometrie vybraných účinných látek

Vybranými účinnými látkami jsou: kyselina acetylsalicylová, ibuprofenum, paracetamol a kofein. Tyto látky byly analyzovány v praktické části této diplomové práce.

### 2.7.1 Kyselina acetylsalicylová a paracetamol

Ke stanovení účinných látek acetylsalicylové kyseliny a paracetamolu v celé tabletě byla použita metoda MALDI MSI. Cílem práce bylo zjištění distribuce účinných látek napříč tabletou. Povrch tablet obsahující výše zmiňované účinné látky byly pokryty vrstvou matrice (CHCA 25 mg/ml v EtOH, obsahující 0,1% TFA) před MALDI analýzou pomocí sprejovací techniky. Tvar tablety může do jisté míry určovat přípravu vzorku, tzn. pokud je povrch tablety zakřivený, musí se tento povrch upravit, aby byl zcela plochý (skalpelem, brusným papírem). Vzhledem k tomu, že MALDI je povrchově ionizační technika, povlak tablety (především hypromelosa a triacetin) může vykazovat problém s interferencí ve spektru. Tomuto se dá zabránit vypalováním laserem na delší dobu na každém místě. Studovanou účinnou látku paracetamol lze pozorovat na Obrázku 13. a) distribuce protonované molekuly  $[M+H]^+$  při  $m/z$  152 napříč celou tabletou. Data byla normalizována proti korespondujícímu píku matrice  $[M+H]^+$  při  $m/z$  190. Snímek a korespondující intenzita iontu ukazují, že distribuce paracetamolu je konzistentní a homogenně rozložená, ačkoliv k okrajům tablety se zdá být jasnější. Obrázek 13. b) znázorňuje distribuci sodného aduktu kyseliny acetylsalicylové  $[M+Na]^+$  při  $m/z$  203. Data byla normalizována proti korespondujícímu píku matrice  $[M+Na]^+$  při  $m/z$  212. Tento sodný adukt se spíše ukázal ve spektru než protonovaná molekula acetylsalicylové kyseliny  $[M+H]^+$  při 181. Snímek ukazuje, že acetylsalicylová kyselina je rozmístěna po okraji tablety.<sup>63</sup>

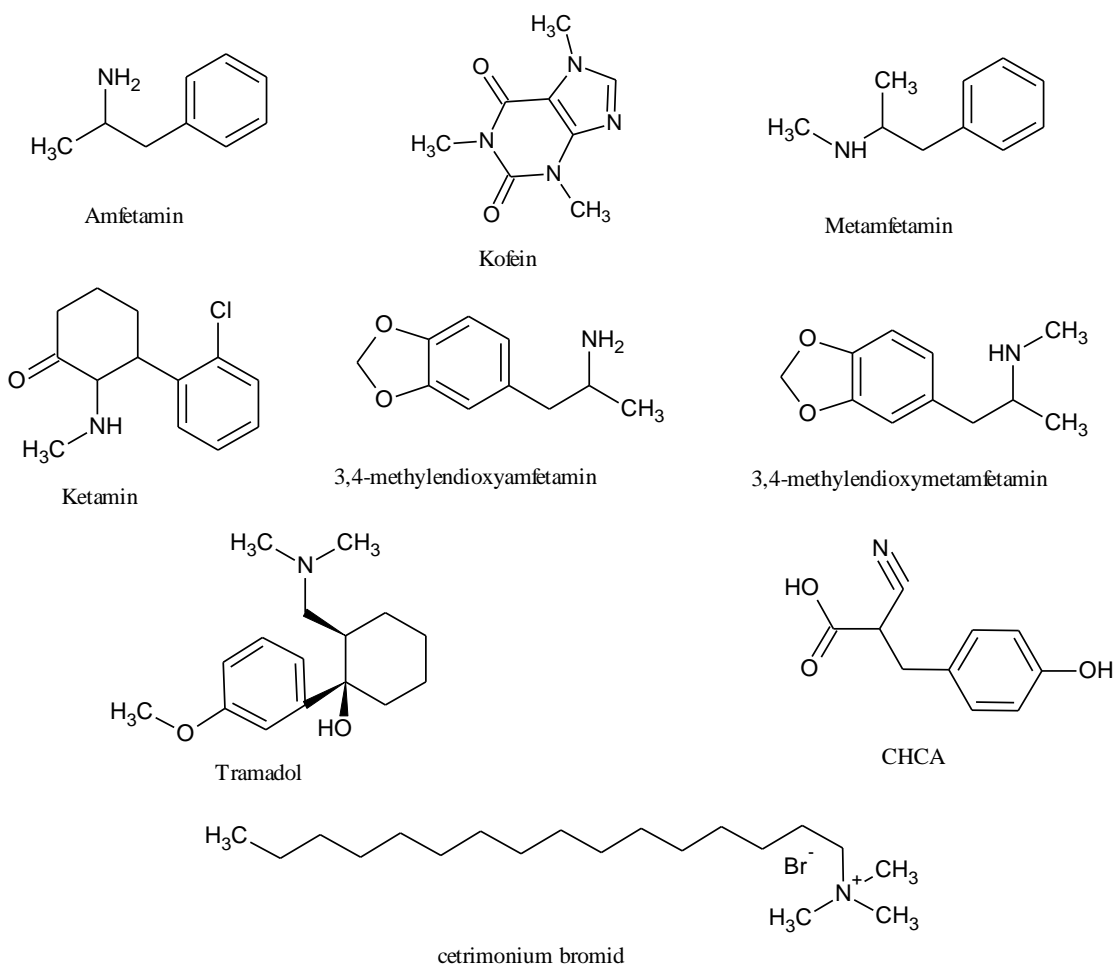




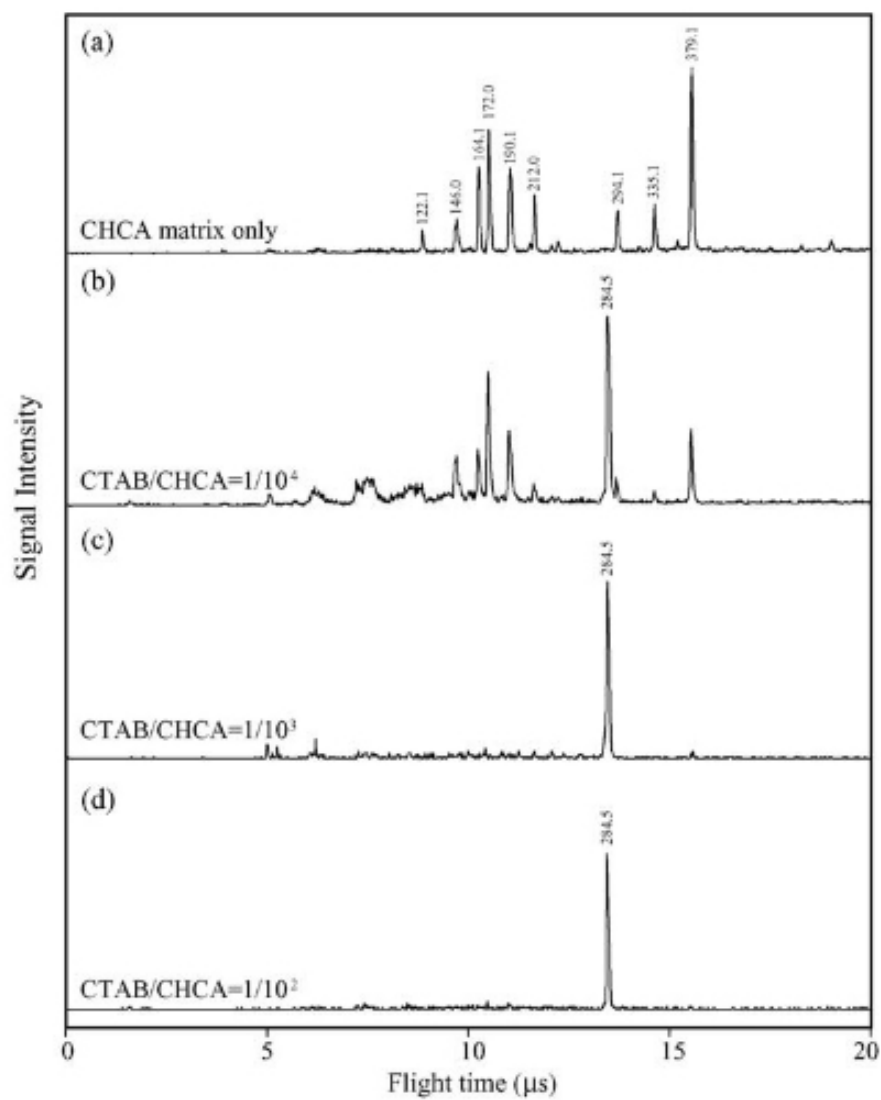
Obrázek 13. MALDI MS snímky: a) paracetamolu, b) acetylsalicylové kyseliny. MALDI spektra účinných látek: c) paracetamolu, d) acetylsalicylové kyseliny. (Převzato z cit. <sup>63</sup>)

### 2.7.2 Kofein

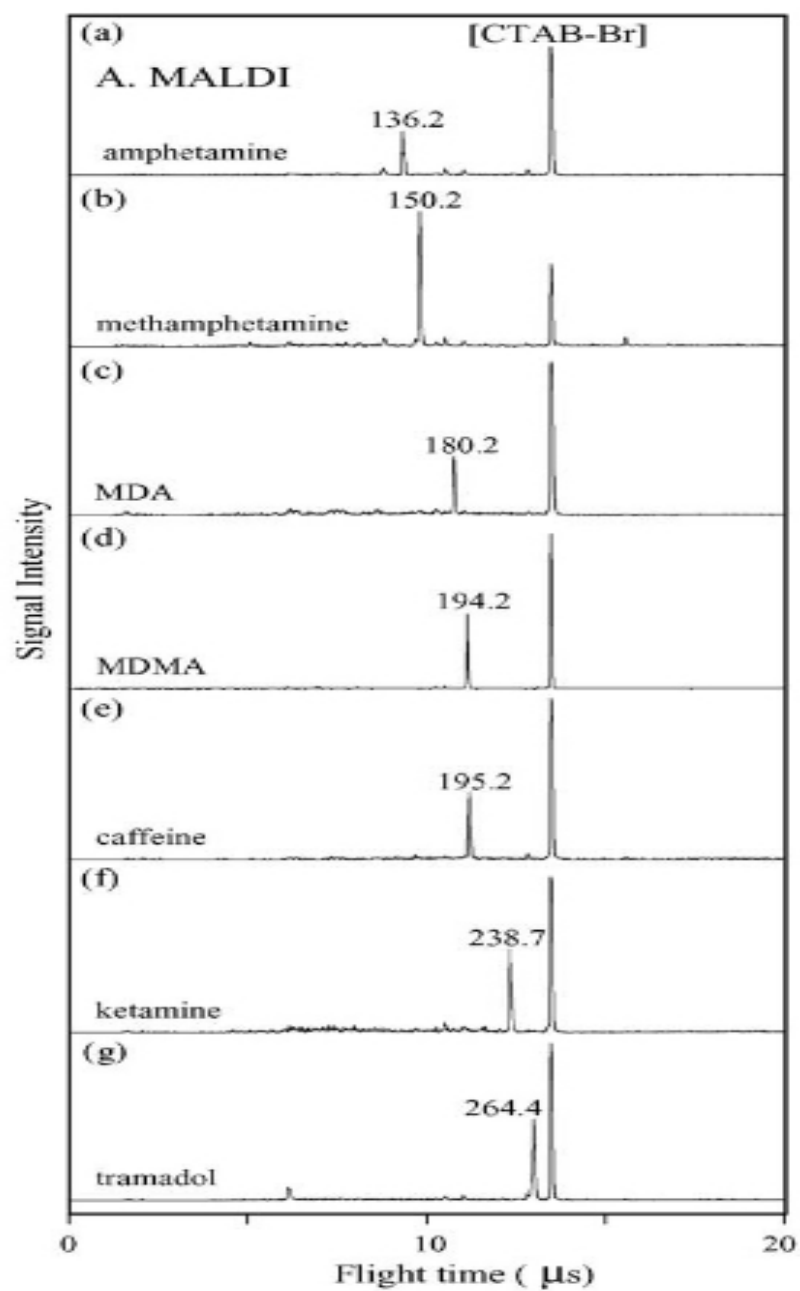
MALDI-TOF metoda byla použita pro analýzu ilegálních látek (amfetamin, methamfetamin, 3,4-methylendioxyamfetamin - MDA, 3,4-methylendioxymethamfetamin - MDMDA) a pro běžně dostupné látky (kofein, ketamin a tramadol). Použitou matricí byla směs cetrimonium bromidu (CTAB) a CHCA. Tablety byly rozetřeny na prach a zhruba 1 mg byl rozpuštěn v 1 ml MeOH. Po 2 minutách v ultrazvuku a po 2 minutách v odstředivce (při 5000 rpm) se vzala horní vrstva pro přímou analýzu. Na Obrázku 14. lze pozorovat molekulární struktury hlavních sloučenin. Amfetamin, methamfetamin, MDA, MDMA jsou silné stimulanty centrální nervové soustavy a jsou označovány spíše jako drogy. Kofein m/z 194, ačkoliv drogou není, se často nachází jako příměs v zakázaných přípravcích a zvyšuje srdeční tep a krevní tlak. Ketamin je rychle účinkující anestetikum pro zvířata a lidi. Tramadol je centrálně působící analgetikum. Obrázek 15. ukazuje hmotnostní spektrum získané MALDI-TOF MS metodou z CHCA matrice (a) a směsi CHCA a CTAB v různých koncentračních poměrech (b-d, CTAB/CHCA = 1/10<sup>4</sup>, CTAB/CHCA = 1/10<sup>3</sup>, CTAB/CHCA = 1/10<sup>2</sup>). Obrázek 16. znázorňuje výsledky pro supresivní účinek CTAB v přítomnosti amfetaminu a příbuzných sloučenin (hmotnostní spektra a-g: amfetamin, methamfetamin, MDA, MDMA, kofein, ketamin a tramadol).<sup>64</sup>



Obrázek 14. Molekulární struktury amfetaminu ( $M_r$  135,2), metamfetaminu ( $M_r$  149,2), MDA ( $M_r$  179,2), MDMA ( $M_r$  193,2), kofeinu ( $M_r$  194,2), ketaminu ( $M_r$  237,7), tramadolu ( $M_r$  263,4), CHCA ( $M_r$  189,2) a CTAB ( $M_r$  364,4). (Převzato z cit. <sup>64</sup>)



Obrázek 15. MALDI-TOF hmotnostní spektra získané a) z matrice CHCA, b) – d) ze směsi CHCA a CTAB v různém koncentračním poměru ( $\text{CTAB/CHCA} = 1/10^4$ ,  $\text{CTAB/CHCA} = 1/10^3$ ,  $\text{CTAB/CHCA} = 1/10^2$ ). (Převzato z cit. <sup>64</sup>)



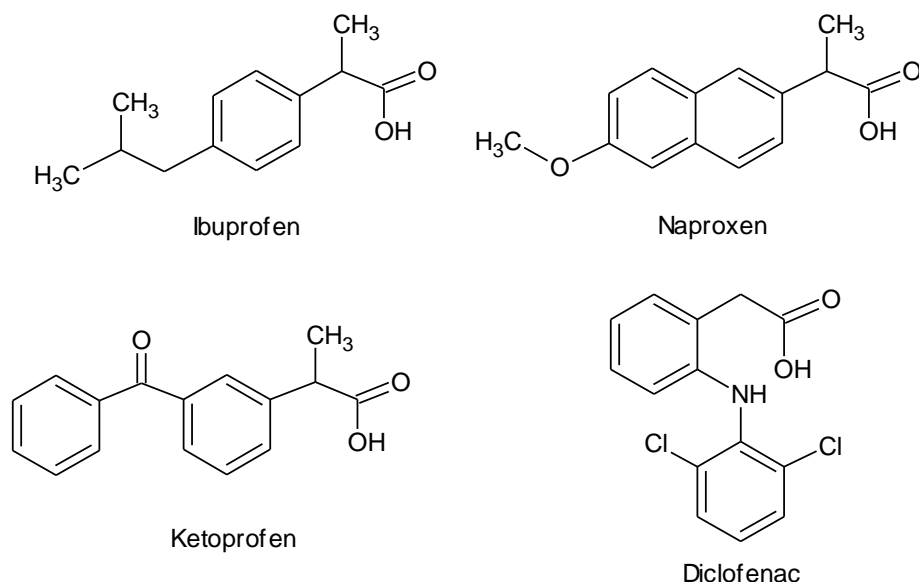
Obrázek 16. MALDI-TOF MS supresivní efekt CTAB (1/1000 ku CHCA) v přítomnosti amfetaminu a příbuzných sloučenin (hmotnostní spektra a – g): amfetamin, methamfetamin, MDA, MDMA, kofein, ketamin a tramadol). (Převzato z cit. <sup>64</sup>)

### 2.7.3 Ibuprofenum

Tato práce pojednává o derivatizaci a hmotnostní fragmentaci nejběžnější nesteroidních protizánětlivých léků, jakými jsou ibuprofen, naproxen, ketoprofen a diclofenac (chemické vzorce viz Obrázek 17.), které byly identifikovány a kvantifikovány ve vodném prostředí, metodou GS-MS. Derivatizace byla prováděna se čtyřmi silylačními činidly s cílem vybrat jedno vhodné. Testovanými činidly byly N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamin (BSTFA), N-methyl-N-(trimethylsilyl)-fluoroacetamid (MSTFA), N-methyl-N-terc-butyldimethylsilyl-trifluoroacetamid (MTBSTFA) a hexamethyldisilazan (HMDS) + kyselina trifluoroctová (TFAA), přičemž poslední činidlo se ukázalo být optimálním. Reprodukovatelnosti měření vyjádřené relativní směrodatnou odchylkou (RSD) byly v rozmezí 0,93 – 4,11 % RSD. Tabulka 3. pojednává o hodnotách m/z vybraných léčiv a jejich fragmentů.<sup>65</sup>

Tab. III. Přehled analyzovaných léčiv a jejich m/z hodnot a fragmentů.<sup>65</sup>

| Léčivo     | Základní pík m/z | Fragmenty m/z      |
|------------|------------------|--------------------|
| Ibuprofen  | 206,3            | 161, 234, 263, 278 |
| Naproxen   | 230,3            | 185, 243, 287, 302 |
| Ketoprofen | 254,3            | 267, 282, 311, 326 |
| Diclofenac | 318,13           | 214, 242, 277, 368 |



Obrázek 17. Chemické vzorce analyzovaných látek: ibuprofen, naproxen, ketoprofen a diclofenac. (Převzato z cit.<sup>65</sup>)

## 3. Experimentální část

### 3.1 Použité techniky

Pro analýzu účinných látek v tabletách byly použité tři typy iontových zdrojů – desorpční nanelektrosprej, popsáný v kapitole 2.3.1, transmisní desorpční elektrosprej, popsáný v kapitole 2.4 a desorpce ionizace laserem za účasti matrice, popsaná v kapitole 2.2. Všechny tyto iontové zdroje byly spojené s průletovým analyzátozem s předřazeným kvadrupólem QTOF (QTOF Premier, Waters, Manchester, UK). Iontový zdroj MALDI byl také testován ve spojení s novějším hmotnostním spektrometrem SYNAPT G2-S (Waters, Manchester, UK). Pro MALDI byl použit standardní MALDI plate s 96 pozicemi pro vzorky (Waters).

Parametry jednotlivých iontových zdrojů jsou uvedeny v následujících tabulkách IV.-VII.

Tab. IV. Parametry nastavení iontového zdroje pro nanoDESI-QTOF

| Parametry                    | Hodnoty   |
|------------------------------|---|
| Sprejovací napětí            | 3 kV  |
| Napětí na vyhřívání kapiláry | 40 V  |
| Teplota vyhřívání kapiláry   | 120 °C  |
| Kolizní energie              | 5 kV (negativ), 2 kV (pozitiv)  |
| Sprejovací špička            | PicoTipemitterGlassTip, I.D. = $2 \pm 1$ $\mu$ m;<br>New Objective, Woburn, USA |

Tab. V. Parametry nastavení iontového zdroje pro TM-DESI-QTOF

| Parametry                    | Hodnoty   |
|------------------------------|---|
| Sprejovací napětí            | 3 kV  |
| Napětí na vyhřívání kapiláry | 40 V  |
| Teplota vyhřívání kapiláry   | 120 °C (pozitiv), 100 °C (negativ)  |
| Kolizní energie              | 2 kV (pozitiv), 5 kV (negativ)  |
| Sprejovací špička            | PicoTipemitterGlassTip, I.D. = $2 \pm 1$ $\mu$ m;<br>New Objective, Woburn, USA |

Posledními technikami pro analýzu léčiv byla ionizační technika MALDI. Konkrétně ve spojení s analyzátory QTOF a SYNAPT. Parametry nastavení jsou popsány v následujících tabulkách (viz Tab. VI. a Tab. VII.).

*Tab. VI.* Parametry nastavení iontového zdroje pro MALDI-QTOF

| Parametry              | Hodnoty     |
|------------------------|-------------|
| Vlnová délka laseru    | 337,1 nm    |
| Energie laseru         | 300 $\mu$ J |
| Rozsah měřených hodnot | 50-1000 Da  |

*Tab. VII.* Parametry nastavení iontového zdroje pro MALDI-SYNAPT G2-S

| Parametry              | Hodnoty     |
|------------------------|-------------|
| Vlnová délka laseru    | 350 nm      |
| Energie laseru         | 400 $\mu$ J |
| Rozsah měřených hodnot | 50-1200 Da  |



## 3.2 Použité chemikálie

Pro analýzy pomocí nanoDESI a TM-DESI byla použita jako sprejovací kapalina směs rozpouštědel methanol (HPLC kvalita, Sigma Aldrich), deionizovaná voda (HPLC kvalita, Lab-Scan) a pro okyselení kyselina mravenčí (Sigma Aldrich) v poměru MeOH : H<sub>2</sub>O + HCOOH (1 : 1 + 2 % v/v).

Pro MALDI byly použity matrice:

- kyselina  $\alpha$ -kyano-4hydroxyokořicová (CHCA, Sigma Aldrich)
- kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyokořicová (kyselina sinapová, SINAP, Sigma Aldrich)
- 1,8-dihydroxy-9(10OH)-antracenon (dithranol, DITH, Sigma Aldrich)
- 2,4,6-trihydroxyacetofenon (THAP, Sigma Aldrich)
- kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB, Sigma Aldrich)

Ke studiu této práce byla použita následující léčiva:

- Paralen 500 12 tbl.
- Acylpyrin 10 tbl.
- Ibuprofen AL 400 10 tbl.
- Ibalgin 400 30 tbl.
- APO-Ibuprofen 400 30 tbl.
- Acylcoffin 10 tbl.
- Panadol Extra 10 tbl.
- Migralgin 10 tbl.

Přehled těchto léčiv s jejich účinnými a pomocnými látkami (seznam uvedený v příbalové informaci léku) je zaznamenán v následujících tabulkách (VIII. a IX.).

Tab. VIII. Přehled analyzovaných jednosložkových léčiv s uvedením účinných a pomocných látek<sup>66,67</sup>

| Léčivo   | Účinná látka                              | M <sub>r</sub> | Pomocné látky                    | M <sub>r</sub> |
|--|---|----------------|----------------------------------|----------------|
| Acylpyrin<br>(Herbacos Recordati s.r.o.)                   | Kyselina<br>acetylsalicylová (500 mg/tbl) | 180,160        | Bramborový škrob                 | (162,142)n     |
|  |   |                | Mastek                           | 379,27         |
| Ibuprofen AL 400<br>(bílý)<br>(Aluid Pharma GmbH)          | Ibuprofenum<br>(400 mg/tbl)               | 206,280        | Magnézium stearát                | 591,3          |
|  |   |                | Kukuřičný škrob                  | (162,142)n     |
|  |   |                | Sodná sůl karboxymethylškrobu    |                |
|  |   |                | Hydroxypropylmethylcelulóza      |                |
|  |   |                | Makrogol 400                     | 400            |
|  |   |                | Makrogol 6000                    | 6000           |
| Ibalgin 400<br>(růžový)<br>(Zentiva)                       | Ibuprofenum<br>(400 mg/tbl)               | 206,280        | Kukuřičný škrob                  | (162,142)n     |
|  |   |                | Hypromelóza 2910/3               |                |
|  |   |                | Předželatinovaný kukuřičný škrob |                |
|  |   |                | Sodná sůl karboxymethylškrobu    |                |
|  |   |                | Kyselina stearová                | 284,48         |
|  |   |                | Mastek                           | 379,27         |
|  |   |                | Koloidní bezvodý oxid křemičitý  | 60,08          |
|  |   |                | Makrogol 6000                    | 6000           |
|  |   |                | Oxid titaničitý                  | 79,88          |
|  |   |                | Simetikonová emulze SE 4         | 222 461        |
| APO-IBUPROFEN 400<br>(oranžový)<br>(Apotex Nederland B.V.) | Ibuprofenum<br>(400 mg/tbl)               | 206,280        | Mikrokrytalická celulóza         |                |
|  |   |                | Sodná sůl kroskarmelózy          |                |
|  |   |                | Magnézium stearát                | 591,3          |
|  |   |                | Koloidní bezvodý oxid křemičitý  | 60,08          |
|  |   |                | Hyprolóza                        |                |
|  |   |                | Makrogol 8000                    | 8000           |
|  |   |                | Oxid titaničitý                  | 79,88          |
| Hlinitý lak oranžové žluti (E110)                          |   |                |                                  |                |
| Paralen 500<br>(Zentiva)                                   | Paracetamolium<br>(500 mg/tbl)            | 151,163        | Předbobtnalý kukuřičný škrob     | (162,142)n     |
|  |   |                | Povidon 30                       | 111,1          |
|  |   |                | Sodná sůl kroskarmelózy          |                |
|  |   |                | Kyselina stearová                | 284,48         |

Tab. IX. Přehled analyzovaných vícesložkových léčiv s uvedením účinných a pomocných látek<sup>66,67</sup>

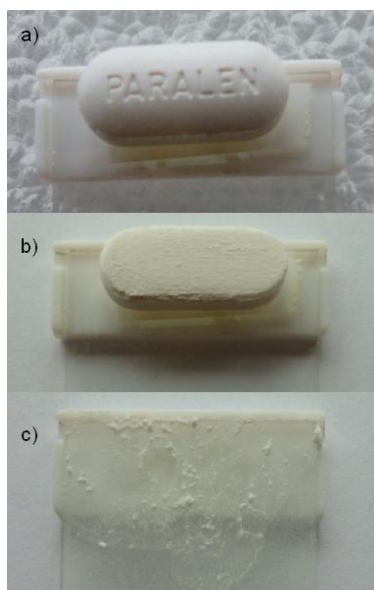
| Léčivo   | Účinná látka                              | M <sub>r</sub>              | Pomocné látky                   | M <sub>r</sub> |
|--|---|-----------------------------|---------------------------------|----------------|
| Acylcoffin<br>(Saneca Pharmaceuticals a.s.)      | Kyselina acetylsalicylová<br>(450 mg/tbl) | 180,160                     | Bramborový škrob                | (162,142)n     |
|  | Kofein<br>(50 mg/tbl)                     | 194,190                     |                                 |                |
| Panadol Extra<br>(GlaxoSmithKline Dungavan Ltd.) | Paracetamolium<br>(500 mg/tbl)            | 151,163                     | Mastek                          | 379,27         |
|  | Kofein<br>(65 mg/tbl)                     | 194,190                     | Kukuřičný škrob                 | (162,142)n     |
|  |   |                             | Předbobtnalý škrob              | (162,142)n     |
|  |   |                             | Povidon 25                      | 111,1          |
|  |   |                             | Kalium sorbát                   | 150,22         |
|  |   |                             | Mastek                          | 379,27         |
|  |   |                             | Kyselina stearová               | 284,48         |
|  |   |                             | Sodná sůl kroskarmelózy         |                |
|  |   | Hydroxypropylmethylcelulóza |                                 |                |
|  |   | Triacetin                   | 218,21                          |                |
| Migralgin<br>(Zentiva)                           | Kyselina acetylsalicylová<br>(250 mg/tbl) | 180,160                     | Monohydrát laktózy              | 360,31         |
|  | Paracetamolium<br>(250 mg/tbl)            | 151,163                     | Kukuřičný škrob                 | (162,142)n     |
|  |   |                             | Koloidní bezvodý oxid křemičitý | 60,08          |
|  | Kofein<br>(50 mg/tbl)                     | 194,190                     | Kyselina stearová               | 284,48         |

### 3.3 Pracovní postup

Zásobní roztoky pro analýzu technikou MALDI byly připraveny rozpuštěním jedné tablety každého léčiva do 20 ml MeOH : H<sub>2</sub>O (1 : 1 v/v) ve výsledných koncentracích:

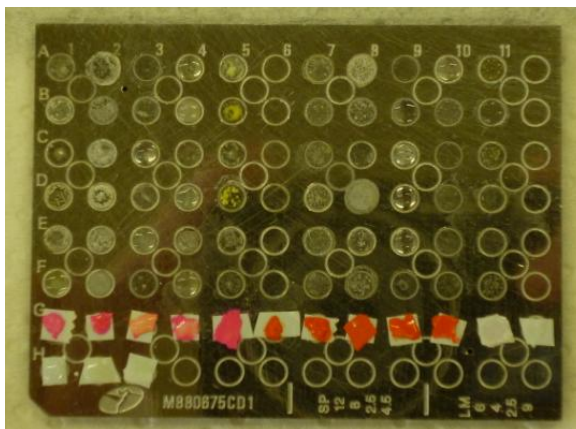
- Paralen 500 – paracetamol 25 mg/ml
- Ibuprofen AL 400 – ibuprofen 20 mg/ml
- Acylpyrin – kyselina acetylsalicylová 25 mg/ml
- Acylcoffin – kyselina acetylsalicylová 25 mg/ml, kofein 2,5 mg/ml
- Panadol Extra – paracetamol 25 mg/ml, kofein 3,25 mg/ml
- Migralgin – kyselina acetylsalicylová 12,5 mg/ml, paracetamol 12,5 mg/ml, kofein 2,5 mg/ml

Pro analýzu pomocí nanoDESI byly vzorky analyzovány jako celá tableta bez jakékoliv úpravy, následně byla povrchová vrstva léčiva odstraněna a zbroušena do rovna brusným papírem, poté byla na takto upravený povrch nanášena sprejem sprejovací kapalina, tableta byla navlhčena, a nakonec byl na mikroskopové sklíčko takto navlhčené tablety proveden otěr (Obrázek 18.a-c)). Sklíčko s těmito vzorky bylo umístěno do teflonové pomůcky ke zvýšení opakovatelnosti a zabránění elektrického výboje mezi sklíčkem a vstupní kapilárou hmotnostního přístroje.



Obrázek 18. Povrchová úprava tablety Paralenu 500 a) bez povrchové úpravy, b) zbroušený povrch, c) otěr tablety.

Vzorky pro analýzu pomocí MALDI (Obrázek 19.) byly zásobní roztoky uvedených léčiv. Při analýze MALDI-SYNAPT byla léčiva nadrcena a malá část prášku byla oboustrannou lepicí páskou přilepena k MALDI platu.



Obrázek 19. MALDI plate pro analýzu roztoků léčiv.

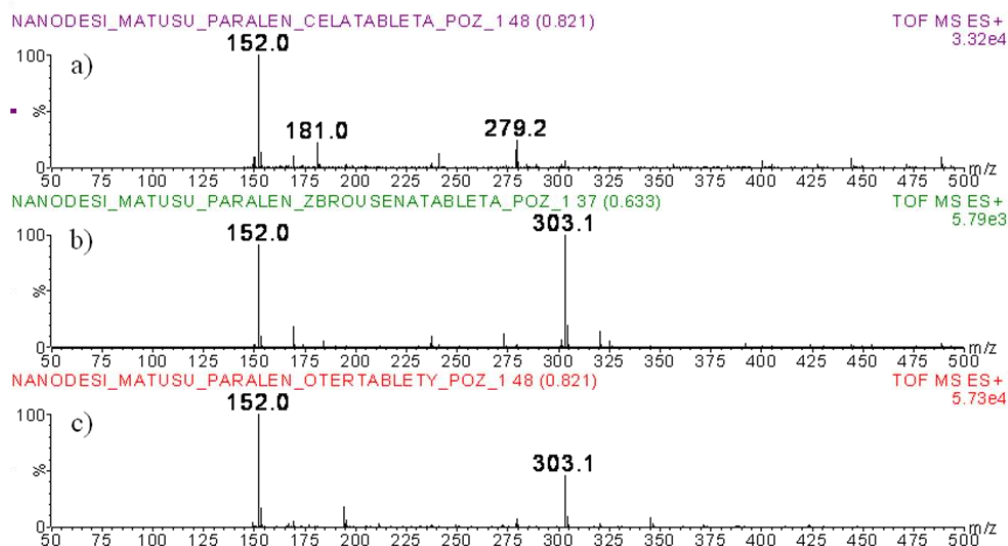
Analýza transmisním DESI nevyžadovala žádnou speciální úpravu vzorku. Vzorek byl rozpůlen a jednou polovinou tohoto léčiva byla potřena celá mřížka tak, aby byl zajištěn vstup dostatečného množství analyzované látky do přístroje.

## 4. Výsledky a diskuze

V této práci bylo zkoumáno 6 různých léčiv hmotnostními technikami nanoDESI-QTOF, TM-DESI-QTOF, MALDI-QTOF a MALDI-SYNAPT.

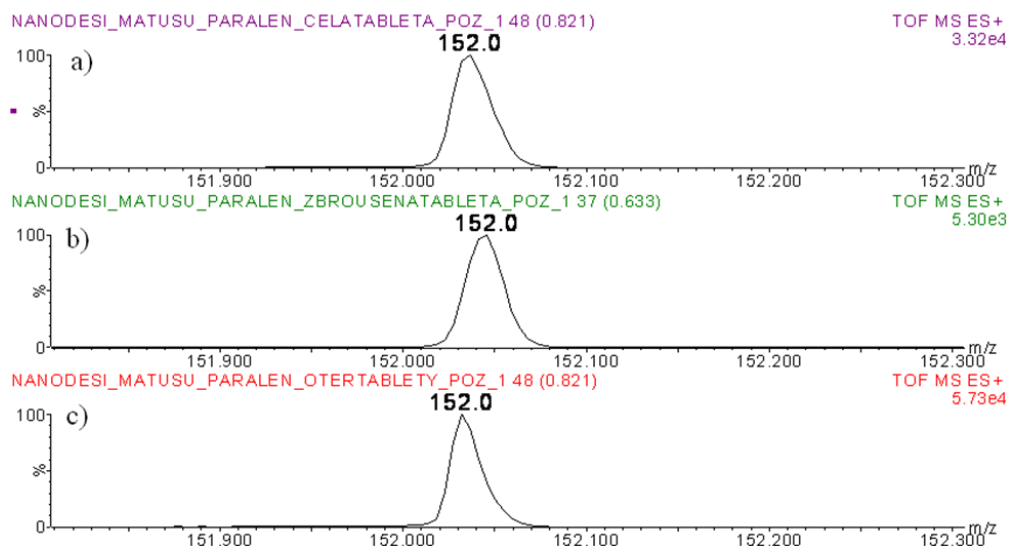
### 4.1 NanoDESI-QTOF

Toto uspořádání bylo použito ke sledování všech analyzovaných léků. Jednalo se zde o analýzu drobných povrchových úprav tablet. Na obrázku 20. vidíme hmotnostní spektra získaná desorpčním nanoelektrosprejem z povrchu tablety (a), ze zbroušeného povrchu tablety (b) a z otěru tablety na sklíčko (c). Ion o  $m/z=152$  odpovídá molekule paracetamolu a pohled na tento ion ve spektru je přiblížený na obrázku 20.



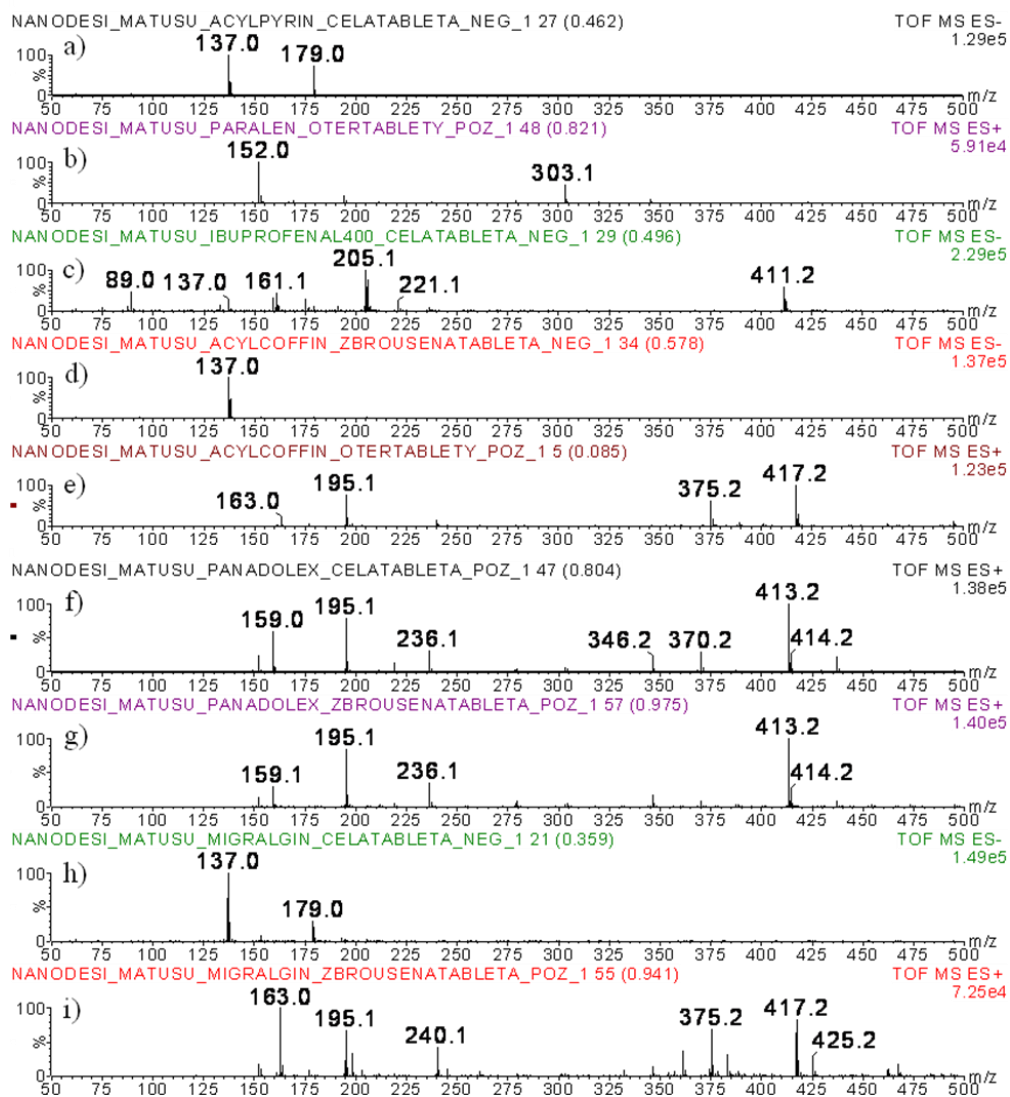
Obrázek 20. Spektrum Paralenu 500 a) celá tableta bez povrchové úpravy, b) tableta se zbroušeným povrchem, c) otěr tablety.

Z experimentu je patrné, že otěr tablety poskytoval nejlepší odezvu  $m/z$   $152 = 5,73 \cdot 10^4$  (Obrázek 20. c) a Obrázek 21. c)). Předchozími pokusy bylo dokázáno, že hmota s píky o hodnotách  $m/z$  279 a 303 patří ftalátům.



Obrázek 21. Přiblížení na pík  $m/z$  152.

Následující Obrázek 22. popisuje analýzu všech dostupných léčiv nejvhodnější technikou přípravy. Pro Acylpyrin byla nejvhodnější technika bez povrchové úpravy; pro Paralen 500 technika otěru tablety; pro Ibuprofen AL 400 analýza bez povrchové úpravy tablety; Acylcoffin pro  $m/z$  179 ze zbroušené tablety, pro  $m/z$  195 z otěru tablety; Panadol Extra pro  $m/z$  152 analýza bez povrchové úpravy tablety, pro  $m/z$  195 ze zbroušené tablety; Migralgin pro  $m/z$  152 ze zbroušené tablety, pro  $m/z$  179 analýza bez povrchové úpravy tablety, pro  $m/z$  195 ze zbroušené tablety. Z tohoto spektra je patrné, že kyselina acetylsalicylová  $m/z$  179 se velmi ochotně převáděla na fragment o hodnotě  $m/z$  137. U ibuprofenu si lze povšimnout taktéž tohoto píku o hodnotě  $m/z$  137, která nikoliv nepatří ke fragmentům píku  $m/z$  205. Jedná se o fragment kyseliny acetylsalicylové, který se velmi špatně a dlouho vymýval z hmotnostního přístroje. Je však nutno podotknout, že tento fragment se již ve spektrech ostatních léčiv, neobsahující kyselinu acetylsalicylovou, neobjevil. Všechna spektra léčiv a technik jejich analýzy jsou zahrnuta v příloze.



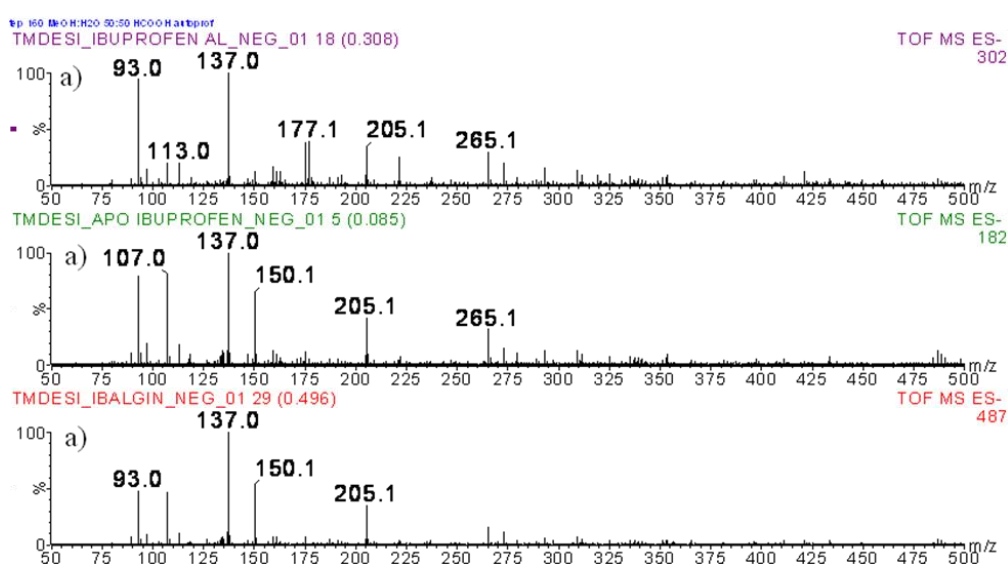
Obrázek 22. Spektrum analyzovaných léčiv vybranou technikou přípravy:

- Acylpyrin – bez povrchové úpravy
- Paralen 500 – otěr tablety
- Ibuprofen AL 400 – bez povrchové úpravy
- Acylcoffin, m/z 179 – zbroušená tableta
- Acylcoffin, m/z 195 – otěr tablety
- Panadol Extra, m/z 152 – bez povrchové úpravy
- Panadol Extra, m/z 195 – zbroušená tableta
- Migralgin, m/z 179 – bez povrchové úpravy
- Migralgin, m/z 152 a m/z 195 – zbroušená tableta

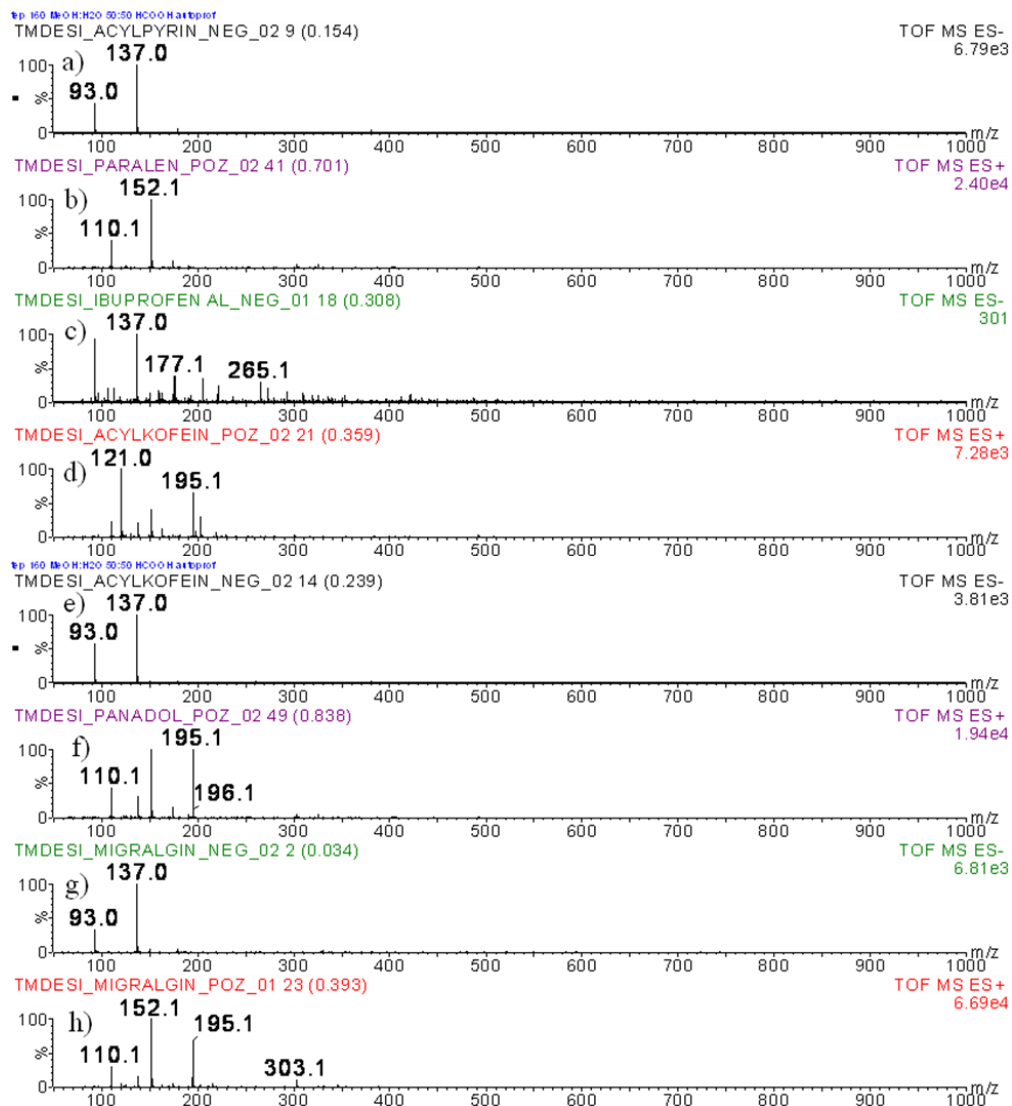


## 4.2 TM-DESI-QTOF

Všechna léčiva byla proměřena také technikou TM-DESI-QTOF (Obrázek 24.), včetně všech léčiv, obsahující účinnou látku ibuprofenum (Obrázek 23.). Analýza léčiv, obsahující ibuprofenum, technikou TM-DESI-QTOF se příliš nevydařila. Tato spektra sice ukazovala účinnou látku s píkem o hodnotě  $m/z$  205, ale jsou zde patrné kontaminace předchozím experimentem. Konkrétně léčivem Acylpyrin s účinnou látkou kyselina acetylsalicylová  $m/z$  179 a její fragment  $m/z$  137.



Obrázek 23. Spektrum léčiv obsahující účinnou látku ibuprofenum: a) Ibuprofen AL 400, b) APO-IBUPROFEN 400, c) Ibalgin 400.



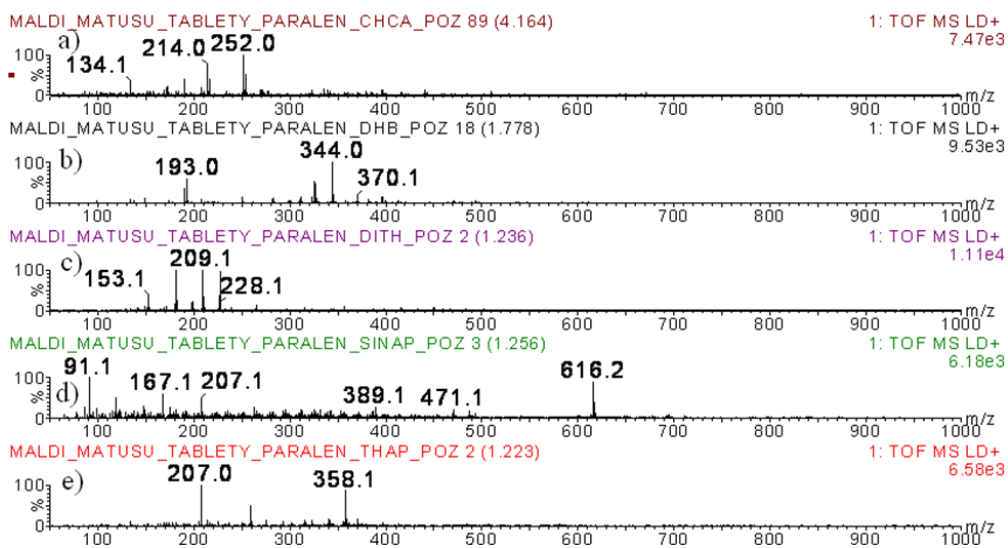
Obrázek 24. Spektrum analyzovaných léčiv a) Acylpyrin; b) Paralen 500; c) Ibuprofen AL 400; d) Acylcoffin v pozitivním modu; e) Acylcoffin v negativním modu; f) Panadol Extra; g) Migralgin v negativním modu; h) Migralgin v pozitivním modu.

### 4.3 MALDI-QTOF

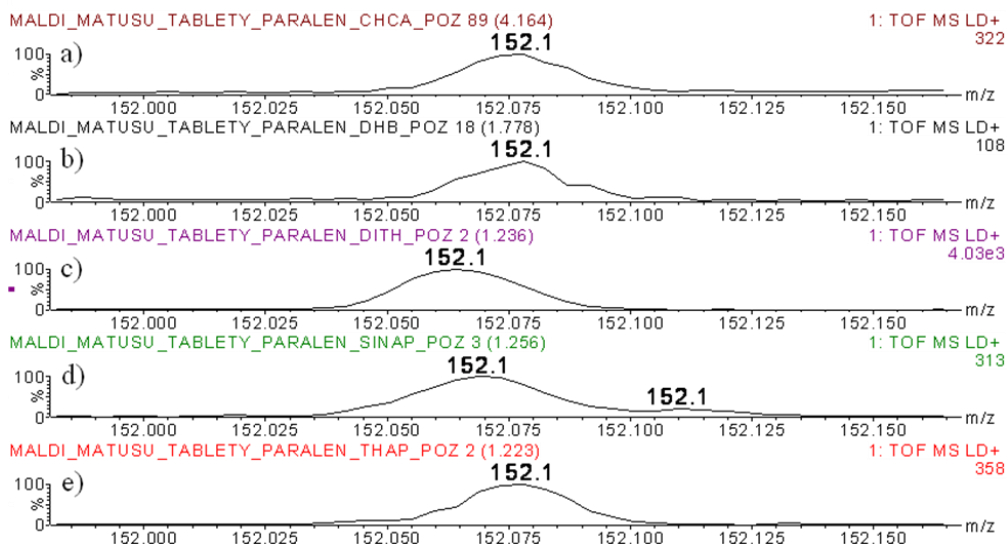
Analýza technikou MALDI-QTOF byla provedena pro všechna. Testovány byly zásobní roztoky léčiv. Touto technikou jsme získali informace o dvou nejvhodnějších maticích pro každý z dostupných léků:

- Acylpyrin – THAP, SINAP
- Paralen 500 – THAP, DITH
- Ibuprofen AL 400 – THAP, SINAP
- APO-IBUPROFEN 400 – THAP, SINAP
- Ibalgin 400 – THAP, SINAP
- Acylcoffin – THAP, SINAP
- Panadol Extra – CHCA, DITH
- Migralgin – CHCA, DHB

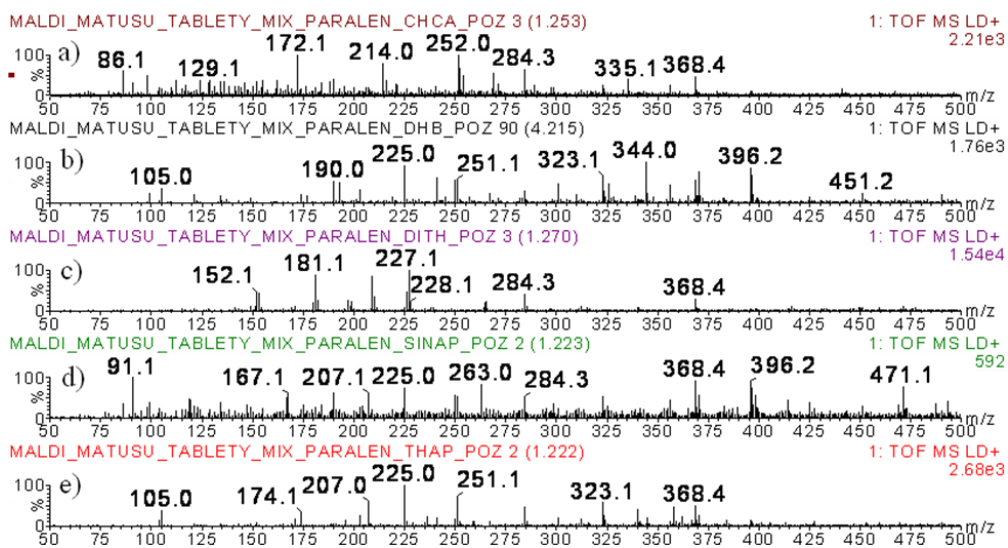
Dále jsme zkoumali vliv nanášení matrice (překryv vzorku maticí, směs vzorku a matrice). Následující obrázky (Obrázek 25-28.) pojednávají o MALDI analýzách léčiva Paralen 500, způsobu nanášení matrice a vhodnosti vybraných matic. Z těchto obrázků je patrné, že pro další analýzu tohoto léčiva se jako nejvhodnější ukázaly matrice THAP a DITH. Všechna spektra ostatních léčiv a technik jejich analýzy jsou zahrnuta v příloze.



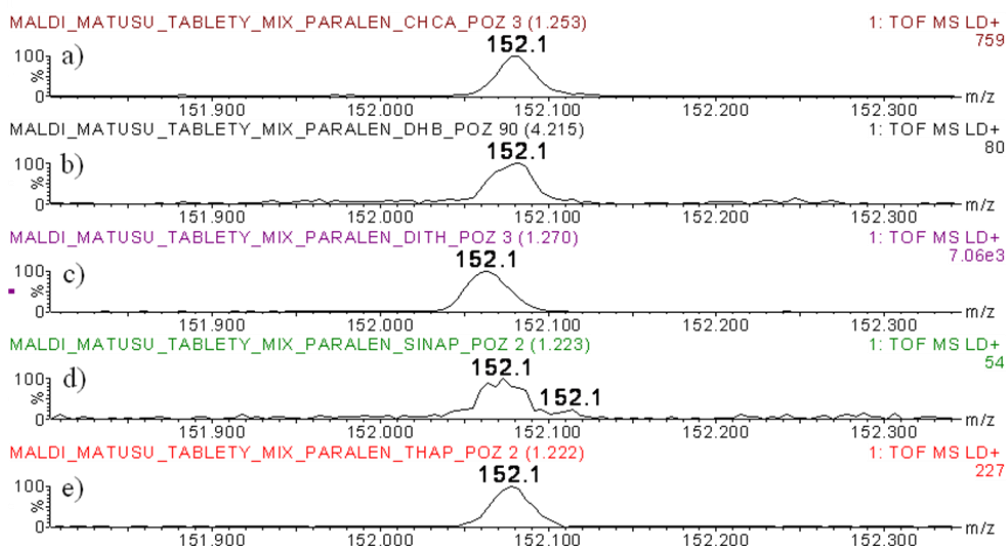
Obrázek 25. Spektrum Paralenu 500, překryv vzorku maticí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



Obrázek 26. Zaostření na pik paracetamolu m/z 152, překryv vzorku maticí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



Obrázek 27. Spektrum Paralenu 500, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



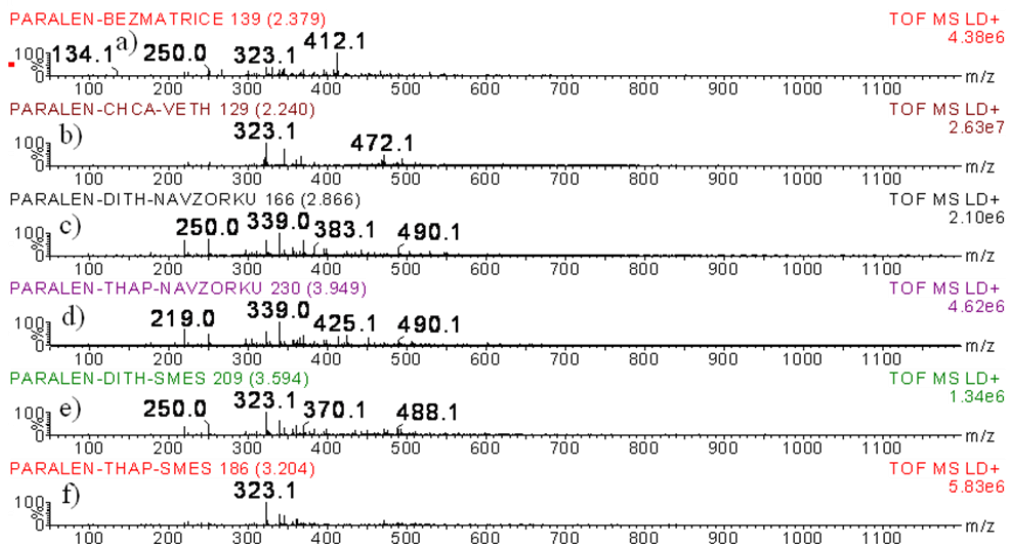
Obrázek 28. Zaostření na pík paracetamolu m/z 152, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.

## 4.4 MALDI-SYNAPT

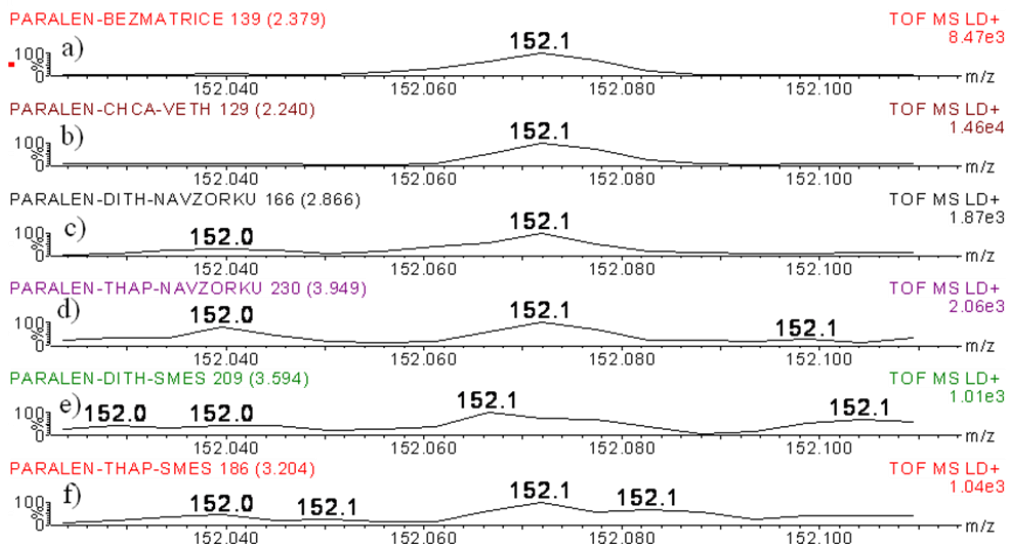
Metodou MALDI-SYNAPT byla analyzována všechna léčiva. Na základě předchozího měření MALDI-QTOF byly použity dvě nejvhodnější matrice pro každé z dostupných léčiv (viz kapitola 4.3 MALDI-QTOF) a k těmto matricím byla použita i matrice CHCA v ethanolu (viz kapitola 2.7.1 Kyselina acetylsalicylová a paracetamol, vrstvení vzorku a matrice). Byl také zkoumán vliv na analýzu bez použití matrice na léčivo v roztoku i práškovém vzorku. Testovány byly zásobní roztoky, metodou vrstvení vzorku a matrice a směsi vzorku a matrice, i práškové formy léčiv, připevněné na MALDI plate oboustrannou lepicí páskou. Tato technika byla využita k porovnání dvou stejných ionizačních technik MALDI na jiném přístroji, v tomto případě SYNAPT, který měří s vyšším rozlišením než QTOF Premier.

Tato technika se ukázala být značně nevhodnou pro analýzu daných léčiv. Následující obrázky znázorňují celé spektrum analyzovaného léčiva Paralenu 500 (viz Obrázek 29. a Obrázek 31.). Ze zaostření na pík paracetamolu o hodnotě  $m/z$  152 je však patrné, že u roztoků tohoto léčiva je tento pík pozorován pouze u jedné z matric, konkrétně u matrice CHCA v ethanolu (viz Obrázek 30.). Oproti tomu v práškových vzorcích tohoto léku, je tento pík pozorován u stejné matrice (CHCA v ethanolu) i u vzorku, na který nebyla nanesena matrice (viz Obrázek 32.).

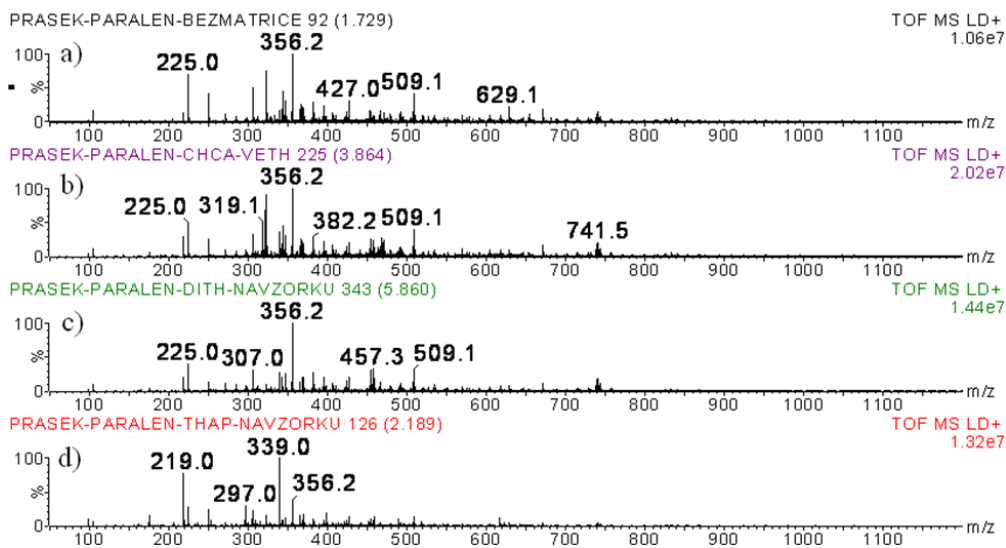
V těchto spektrech roztoku a práškového vzorku Paralenu 500 není viditelný pík matrice CHCA v ethanolu ( $m/z$  190) a ani sodný adukt této matrice ( $m/z$  212, podle kapitoly 2.7.2 Kyselina acetylsalicylová a paracetamol). Všechna spektra ostatních léčiv a technik jejich analýzy jsou zahrnuta v příloze.



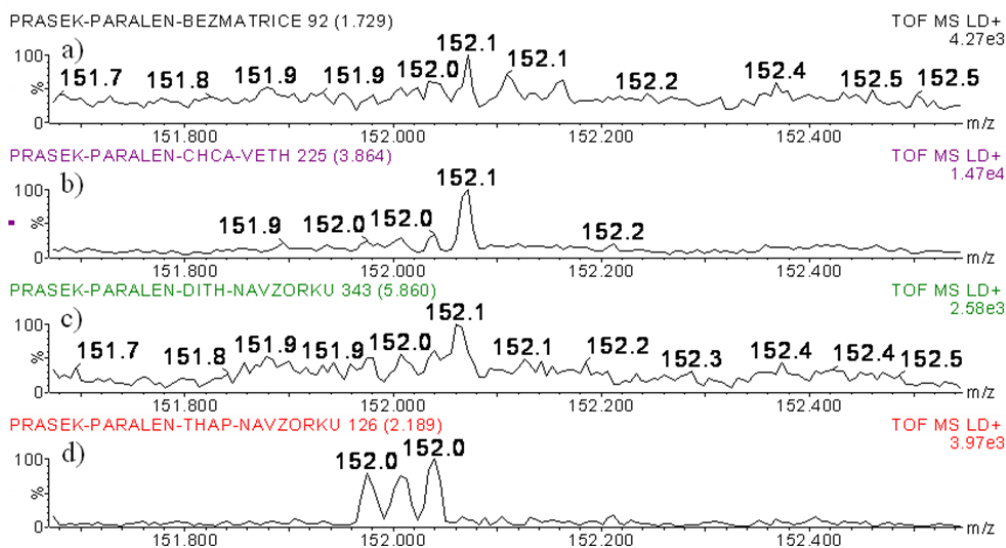
Obrázek 29. Spektrum roztoku Paralenu 500 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) DITH, d) THAP; směs vzorku a matrice: e) DITH, f) THAP.



Obrázek 30. Zaostření na pík paracetamolu m/z 152 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) DITH, d) THAP; směs vzorku a matrice: e) DITH, f) THAP.



Obrázek 31. Spektrum práškového vzorku Paralelu 500 a) bez matrice; překryv vzorku maticí: b) CHCA v ethanolu, c) DITH, d) THAP.



Obrázek 32. Zaostření na pík paracetamolu m/z 152 a) bez matrice; překryv vzorku maticí: b) CHCA v ethanolu, c) DITH, d) THAP



## 4.5 Srovnání hmotnostních technik

Techniky DESI (nanoDESI-QTOF a TM-DESI-QTOF) poskytovaly lepší odezvy než ionizace MALDI na obou hmotnostních spektrometrech, taktéž příprava vzorků nebyla nijak složitá, nevýhodou měření byla geometrie nanoDESI, taktéž citlivost DESI přístrojů na okolní prostředí (foukání klimatizace), poměrně složité zapojení ionizačního zařízení, nemožnost puštění analýzy v sekvenci. U ionizací MALDI (MALDI-QTOF a MALDI-SYNAPT) bylo výhodou měření pustit na sekvenci, přístroj nebyl náchylný na změny okolního prostředí, nevýhodami však byly odezvy matric, které rušily signál analyzovaných látek, dále nutnost dodržení správného dávkování vzorku na místa k tomu určená (terčíky) na MALDI plate. U MALDI-QTOF bylo také problémem nastavení kamery a tím i nastavení laseru (laser nedopadal na terčík v MALDI plate).

## 5. Závěr

Tato diplomová práce měla za úkol posoudit vhodnost vybraných iontových zdrojů pro screeningové analýzy léčiv. Jednalo se o skupinu volně prodejných léčiv s analgetickými účinky ve formě bílých tablet.

Screeningovými technikami jsme studovali 6 vybraných tablet. Hlavními sledovanými parametry tohoto zkoumání byla nenáročná doba přípravy vzorku, rychlá analýza a jednoznačné určení účinných látek v tabletách.

U nanoDESI a TM-DESI byly tyto parametry dosaženy. MALDI techniky sice mohly být spuštěny na sekvenci a přístroje mohly běžet i přes noc. Nicméně nebylo splněno kritérium rychlosti analýzy a jednoznačné určení účinné látky v tabletě a proto nejsou úplně vhodnými technikami pro rychlou analýzu léčiv, která by neměla zahrnovat složitou přípravu vzorku. Proto byly použity pouze základní matrice připravené podle standardního návodu.

U MALDI-QTOF byl také zkoumán způsob nanášení vzorku a matrice na terčík na MALDI plate. Směs vzorku a matrice sice poskytovala vyšší odezvy než u překryvu vzorku matricí, ale celkové spektrum vykazovalo větší zašumění. Lze tedy tvrdit, že obdržené výsledky technik nanoDESI a TM-DESI prokazují lepší vhodnost pro rychlou screeningovou analýzu léčiv než MALDI.

Techniky nanoDESI a TM-DESI se ukázaly být vhodnější a rychlejší dokonce i než dosud používané techniky v analýze léčiv (LC, GC).

## 6. Literatura

- [1] Pérez, S.; Barceló, D.: *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 26, 494-514, 2007.
- [2] Gómez, M.J.; Petrović, M.; Fernández-Alba, A.R.; Barceló, D.: *Journal of Chromatography A*, vol. 1114, 224-233, 2006.
- [3] Togola, A.; Budzinski, H.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 388, 627-635, 2007.
- [4] Turner, R.: *Screening Methods in Pharmacology*. New York, Academic Press, 1965. 332 s.
- [5] Andrade, F.J.; Shelley, J.T.; Wetzel, W.C.; Webb, M.R.; Gamez, G.; Ray, S.J.; Hieftje, G.M.: *Analytical Chemistry*, vol. 80, 2654-2663, 2008.
- [6] Hillenkamp, F.; Peter-Katalinic, J.: *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, John Wiley&Sons, 2013. 430 s.
- [7] Wiseman, J.M.; Ifa, D.R.; Zhu, Y.; Kissinger, C.B.; Manicke, N.E.; Kissinger, P.T.; Cooks, R.G. : *PNAS*, vol. 107, 18120-18121, 2008.
- [8] Vidová, V.; Lemr, K.; Havlíček, V.: *Chemické Listy*, vol. 102, 959, 2008.
- [9] Stübiger, G.; Belgacem, O.: *Analytical Chemistry*, vol. 79, 3206-3213, 2007.
- [10] Marvin, L.F.; Roberts, M.A.; Fay, L.B.: *Clinica Chimica Acta*, vol. 337, 11-21, 2003.
- [11] Novikova, S.I.; He, F.; Cutrufello, N.J.; Lidow, M.S.: *Neurobiology of Disease*, vol. 23, 61-76, 2006.
- [12] Wu, W; Wang, L.; Sui, W.; Zhang, G.: *Shoudu Yike Daxue Xuebao*, vol. 36, 444-448, 2015.
- [13] Lay, J.O.: *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 20, 172-194, 2001.
- [14] Medzihradsky, K.F.; Campbell, J.M.; Balwin, M.A.; Falick, A.M., Juhasz, P; Vestal, M.L.; Burlingame, A.L.: *American Chemical Society*, vol. 72, 552-558, 2000.
- [15] Schiller, J.; Süß, R.; Arnhold, J.; Fuchs, B.; Leßig, J.; Müller, M.; Petković, M.; Spalteholz, H.; Zschörnig, O.; Arnold, K.: *Progress in Lipid Research*, vol. 43, 449-488, 2004.
- [16] Fuchs, B.; Süß, R.; Schiller, J.: *Progress in Lipid Research*, vol. 49, 450-475, 2010.
- [17] Marinach, C.; Alanio, A.; Palous, M.; Kwasek, S.; Fekkar, A.; Brossas, J.Y.; Brun, S.; Snounou, G.; Hennequin, C.; Sanglard, D.; Datry, A.; Golmard, J.L.; Mazier, D.: *Proteomics*, vol. 9, 4627-4631, 2009.

- [18] Notari, S.; Mancone, C.; Tripodi, M.; Narcisco, P.; Fasano, M.; Ascenzi, P.: *Journal of Chromatography B*, vol. 833, 106-116, 2006.
- [19] Kako, K.; Nakamura, A.; Nagashima, Y.; Ishida, J.; Fukamizu, A.: *Journal of Chromatography B*, vol. 1006, 93-98, 2015.
- [20] Scarff, C.A.; Thalassinos, K.; Hilton, G.R.; Scrivens, J.H.: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 22, 3297-3304, 2008.
- [21] Yang, B.; Zhang, A.; Sun, H.; Dong, W.; Yan, G.; Li, T.; Wang, X.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 58, 113-124, 2012.
- [22] Jurneczko, E.; Barran, P.E.: *Analyst*, vol. 136, 20-28, 2011.
- [23] Bush, M.F.; Hall, Z.; Giles, K.; Hoyes, J.; Robinson, C.V.; Ruotolo, B.T.: *Analytical Chemistry*, vol. 22, 9557-9565, 2010.
- [24] Wang, H.; Yan, G.; Zhang, A.; Li, Y.; Wang, Y.; Sun, H.; Wu, X.; Wang, X.: *Analyst*, vol. 138, 3303-3312, 2013.
- [25] Thalassinos, K.; Grabenauer, M.; Slade, S.E.; Hilton, G.R.; Bowers, M.T.; Scrivens, J.H.: *Analytical Chemistry*, vol. 81, 248-254, 2009.
- [26] Yin, Q.; Wang, P.; Zhang, A.; Sun, H.; Wu, X.; Wang, X.: *Journal of Separation Science*, vol. 36, 1238-1246, 2013.
- [27] Kettling, H.; Vens-Cappell, S.; Soltwisch, J.; Pirkl, A.; Haier, J.; Müthing, J.; Dreisewerd, K.: *Analytical Chemistry*, vol. 86, 7798-7805, 2014.
- [28] Takáts, Z.; Wiseman, J.M.; Gologan, B.; Cooks, R.G.: *Science*, vol. 306, 471-473, 2004.
- [29] Kertesz, V.; Van Berkel, G.J.: *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, vol. 22, 2639-2644, 2008.
- [30] Bennet, R. V.; Gamage, C. M.; Fernández, F. M.: *Journal of Visualised Experiments*, vol. 77, 50575, 2013.
- [31] Hartmanová, L.: *Disertační práce*. Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. 149 s.
- [32] Lorencová, I.: *Diplomová práce*. Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci, 2015. 76 s.
- [33] Ranc, V.; Havlíček, V.; Bednář, P.; Lemr, K.: *Chemické Listy*, vol. 101, 524-529, 2007.
- [34] Hartmanová, L.; Ranc, V.; Papoušková, B.; Bednář, P.; Havlíček, V.; Lemr, K.: *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, 4223-4228, 2010.

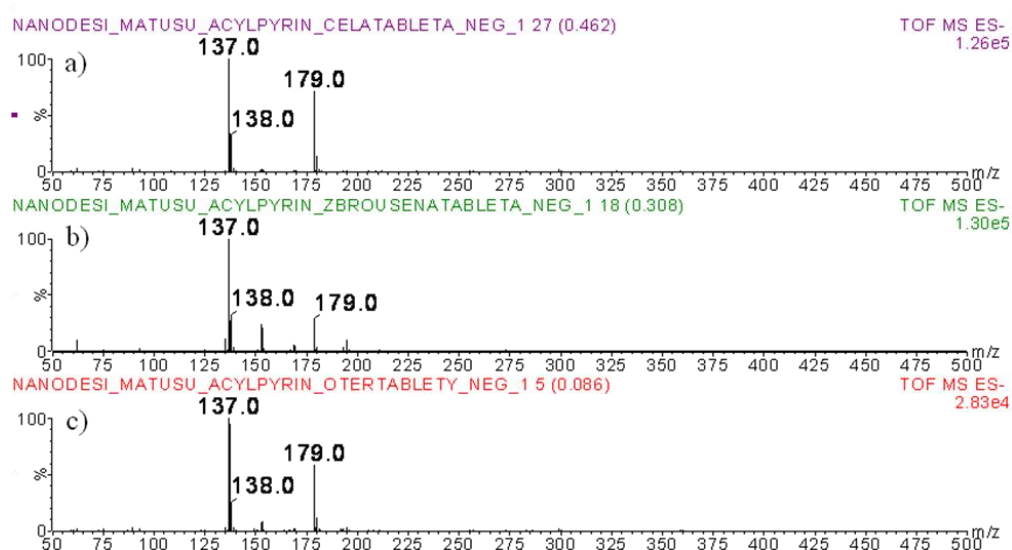
- [35] Hartmanová, L.; Fryčák, P.; Soural, M.; Tureček, F.; Havlíček, H.; Lemr, K.: *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 49, 750-754, 2014.
- [36] Roach, P.J.; Laskin, J., Laskin, A. : *Analyst*, vol. 135, 2161-2452, 2010.
- [37] Lanekoff, I.; Geydebrekht, O.; Pinchuk, G.E.; Konopka, A.E.; Laskin, J.: *Analyst*, vol.138, 1911-2200, 2013.
- [38] O'Brien, R.E.; Laskin, A.; Laskin, J.; Liu, S.; Weber, R.; Russell, L.M.; Goldstein, A.H.: *Atmospheric Environment*, vol. 68, 265-272, 2013.
- [39] Lanekoff, I.; Thomas, M.; Carson, J.P.; Smith, J.N.; Timchalk, C.: *Analytical Chemistry*, vol. 85, 882-889, 2013.
- [40] Chipuk, J.E.; Brodbelt, J.S.: *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, vol. 19, 1612-1620, 2008.
- [41] Chipuk, J.E.; Brodbelt, J.S.: *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, vol. 20, 584-592, 2009.
- [42] Evans-Nguyen, K.M.; Quinto, A.; Hargraves, T.; Brown, H.; Speer, J.; Glatter, D.: *Analytical Chemistry*, vol. 85, 11826-11834, 2013.
- [43] Peters, K.C.; Comi, T.J.; Perry, R.H.: *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, vol. 26, 1494-1501, 2015.
- [44] Tata, A.; Montemurro, C.; Porcari, A.M.; Silva, K.C.; de Faria, J.B.L.; Eberlin, M.N.: *Drug Testing and Analysis*, vol. 6, 949-952, 2014.
- [45] Lalli, P.M.; Corilo, Y.E.; Fasciotti, M.; Riccio, M.F.; de Sa, G.F.; Daroda, R.J.; Souza, G.H.M.; McCullagh, M.; Bartberger, M.D.; Eberlin, M.N.; Campuzano, I.D.G.: *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 48, 989-997, 2013.
- [46] Kanu, A.B.; Dwivedi, P.; Tam, M.; Matz, L.; Hill, H.H.: *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 43, 1-22, 2008.
- [47] Balluff, B.; Carriera, R.J.; McDonnell, L.A.: *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 63, 159-185, 2014.
- [48] Amstalden van Hove, E.R.; Smith, D.F.; Heeren, R.M.A.: *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, 3946-3954, 2010.
- [49] Trim, P.J.; Henson, C.M.; Avery, J.L.; McEwen, A.; Snel, M.F.; Claude, E.; Marshall, P.S.; West A., Princivalle A.P., Clench M.R.: *Analytical Chemistry*, vol. 80, 8628-8634, 2008.

- [50] Cornett, D.S.; Frappier, S.L.; Caprioli, R.M.: *Analytical Chemistry*, vol. 80, 5648-5653, 2008.
- [51] Brunelle, A.; Laprévotte, O.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 393, 31-35, 2009.
- [52] Zákon č. 378/2007 Sb. O léčivech
- [53] Christensen, F.M.: *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 28, 212-221, 1998.
- [54] Sanderson, H.; Brain, R.A.; Johnson, D.J.; Wilson, C.J.; Solomon, K.R.: *Toxicology*, vol. 203, 27-40, 2004.
- [55] Ågerstrand, M.; Wester, M.; Rudén, C.: *Environment International*, vol. 35, 778-786, 2009
- [56] Joss, A.; Zabczynski, S.; Göbel, A.; Hoffmann, B.; Löffler, D.; McArdell, C.S.; Ternes, T.A.; Thomsen, A.; Siegrist, H.: *Water Research*, vol. 40, 1686-1696, 2006.
- [57] Carlsson, C.; Johansson, A.K.; Alvan, G.; Bergman, K.; Kühler, T.: *Science of Total Environment*, vol. 364, 67-87, 2006.
- [58] Wu, K.M.: *Pharmaceuticals*, vol. 2, 77-81, 2009.
- [59] Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Thurman, E.M.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B.; Buxton, H.T.: *Environmental Science and Technology*, vol. 36, 1201-1211, 2002.
- [60] Daughton, C.G.; Ternes, T.A.: *Environmental Health Perspectives*, vol. 107, 907-938, 1999.
- [61] Olson, H.; Betton, G.; Robinson, D.; Thomas, K.; Monro, A.; Kolaja, G.; Lilly, P.; Sanders, J.; Sipes, G.; Bracken, W.; Dorato, M.; Van Deun, K.; Smith, P.; Berger, B.; Heller, A.: *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 32, 56-67, 2000.
- [62] Databáze Státního úřadu pro kontrolu léčiv [www.sukl.cz](http://www.sukl.cz)
- [63] Earnshaw, C.J.; Carolan, V.A.; Richards, D.S.; Clench, M.R.: *Rapid Communication in Mass Spectrom.*, vol. 24, 1665-1672, 2010.
- [64] Su, A.K.; Liu, J. T.; Lin, C.H.: *Talanta*, vol. 67, 718-724, 2005.
- [65] Sebök, Á.; Vasanits-Zsigrai, A.; Palkó, G.; Záray G., Molnár-Perl, I.: *Talanta*, vol. 76, 642-650, 2008.
- [66] Ministerstvo zdravotnictví České republiky: *Český lékopis*, 2. díl, Grada Publishing a.s., Praha 2009.
- [67] Ministerstvo zdravotnictví České republiky: *Český lékopis*, 10. díl, Grada Publishing a.s., Praha 2009.

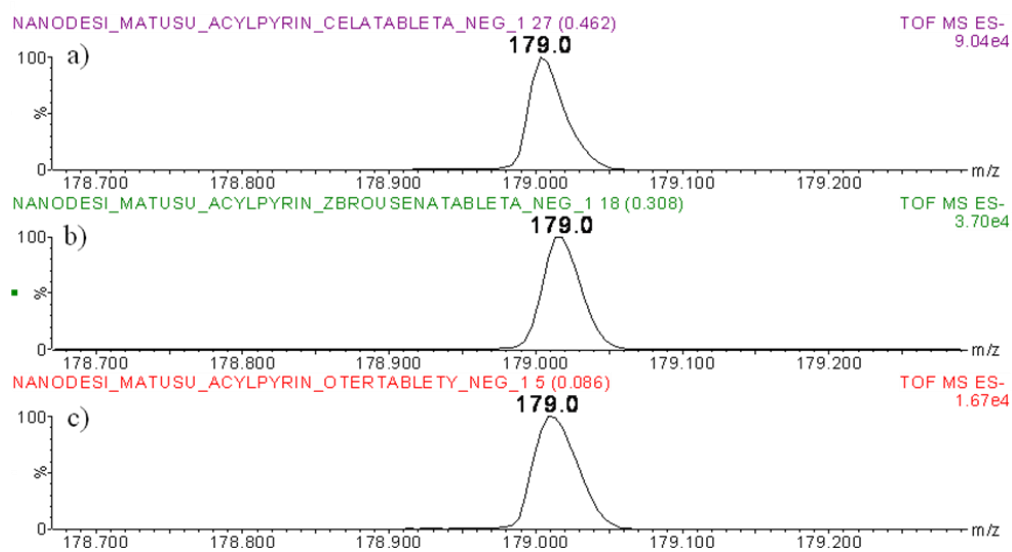
## **7. Přílohy**

- I. Hmotnostní spektra léčiv pořízené technikou nanoDESI-QTOF
- II. Hmotnostní spektra léčiv pořízené technikou MALDI-QTOF
- III. Hmotnostní spektra léčiv pořízené technikou MALDI-SYNAPT

# I. Hmotnostní spektra léčiv technikou nanoDESI-QTOF

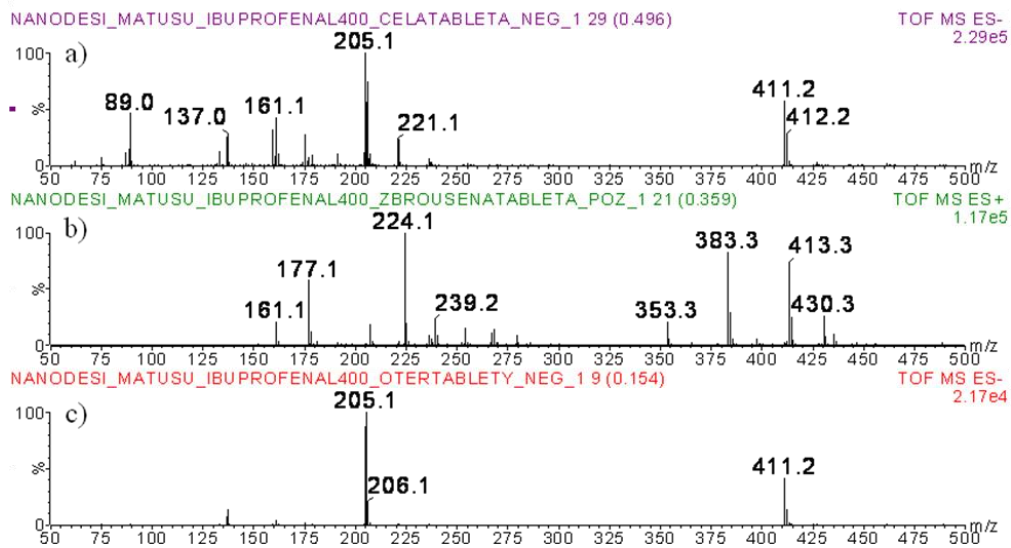


Spektrum Acylpyrinu a) celá tableta bez povrchové úpravy, b) tableta se zbroušným povrchem, c) otěr tablety.

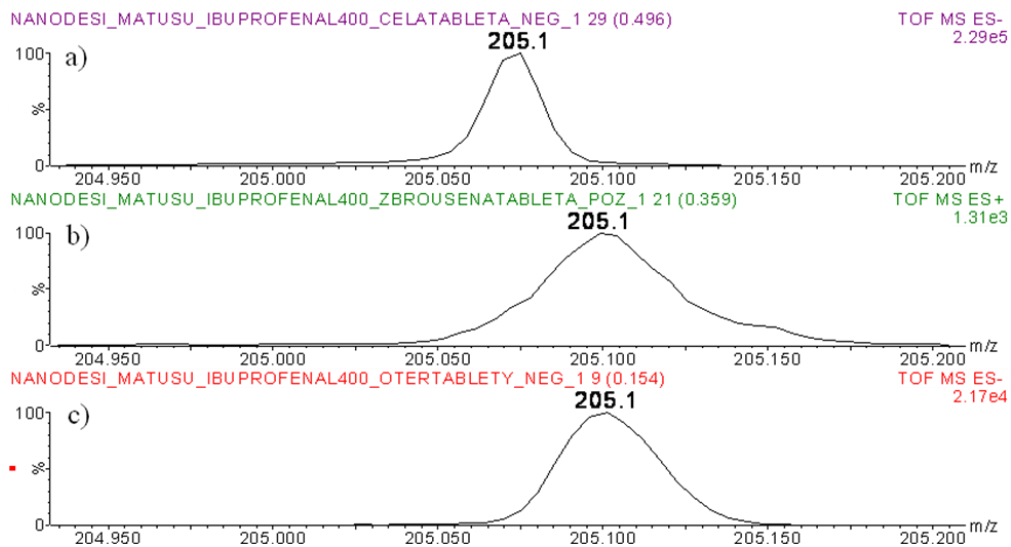


Acylpyrin – přiblížení na pík m/z 179.

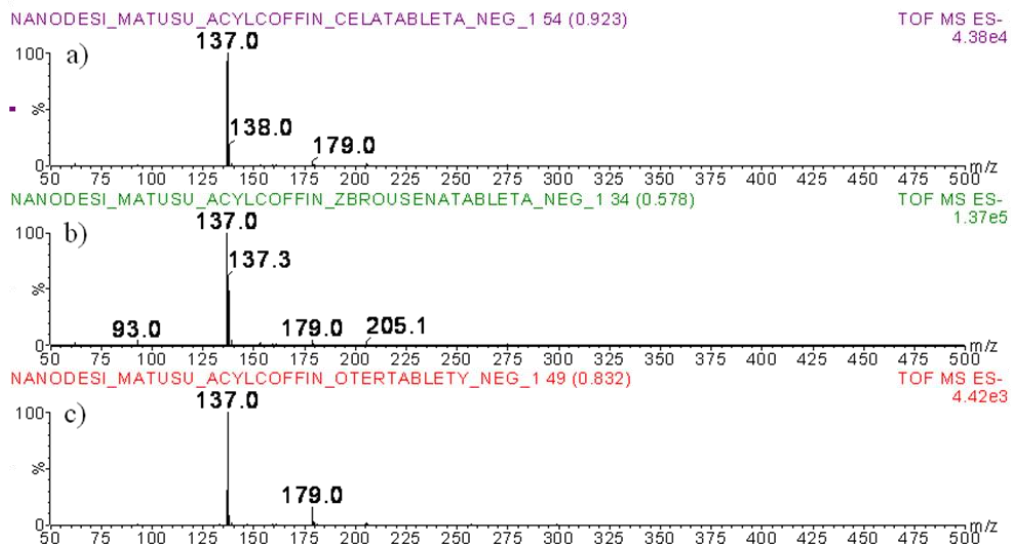




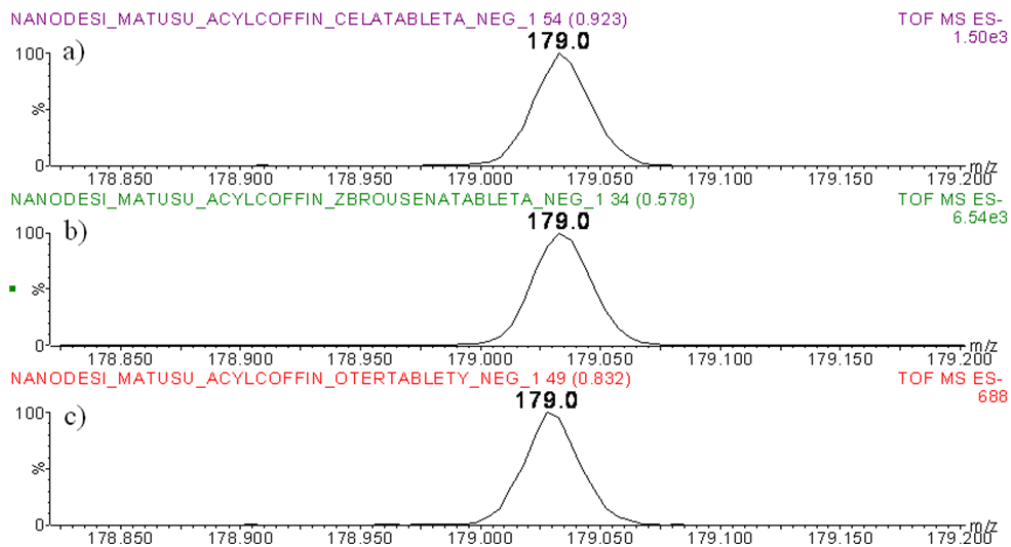
Spektrum Ibuprofen AL 400 a) celá tableta bez povrchové úpravy, b) tableta se zbrošeným povrchem, c) ořet tablety.



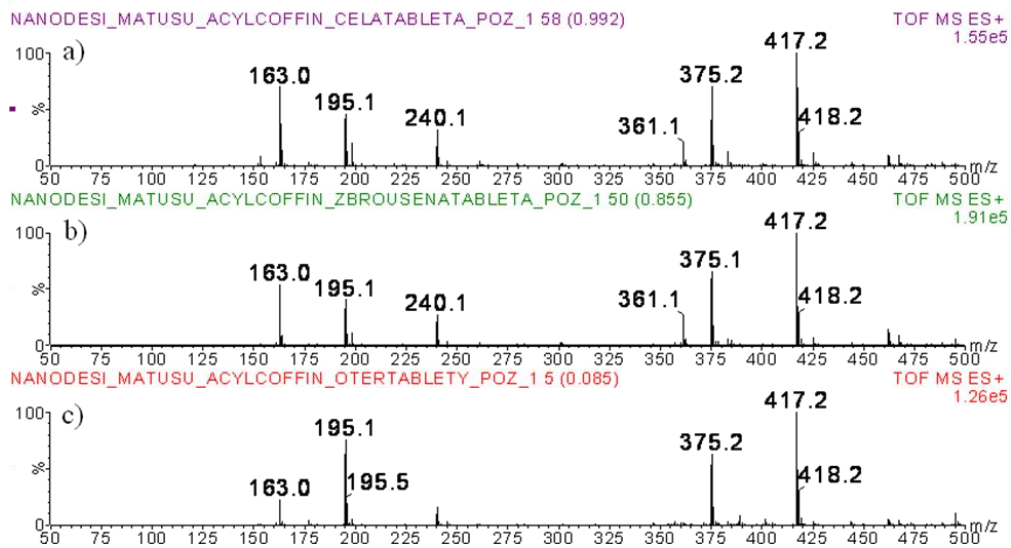
Ibuprofen AL 400 – přiblížení na pík m/z 205.



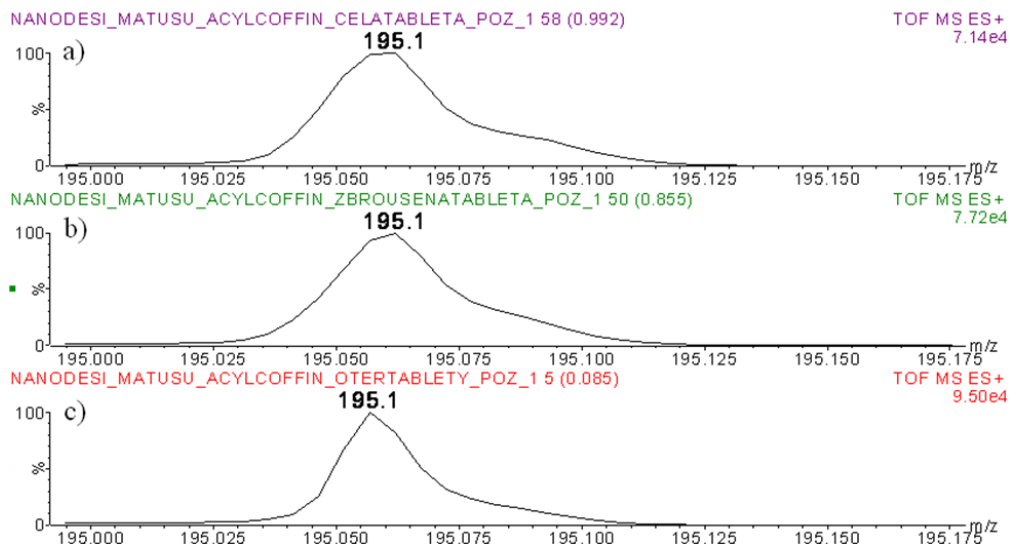
Spektrum Acylcoffinu v negativním modu a) celá tableta bez povrchové úpravy, b) tableta se zbrošeným povrchem, c) oťěr tablety.



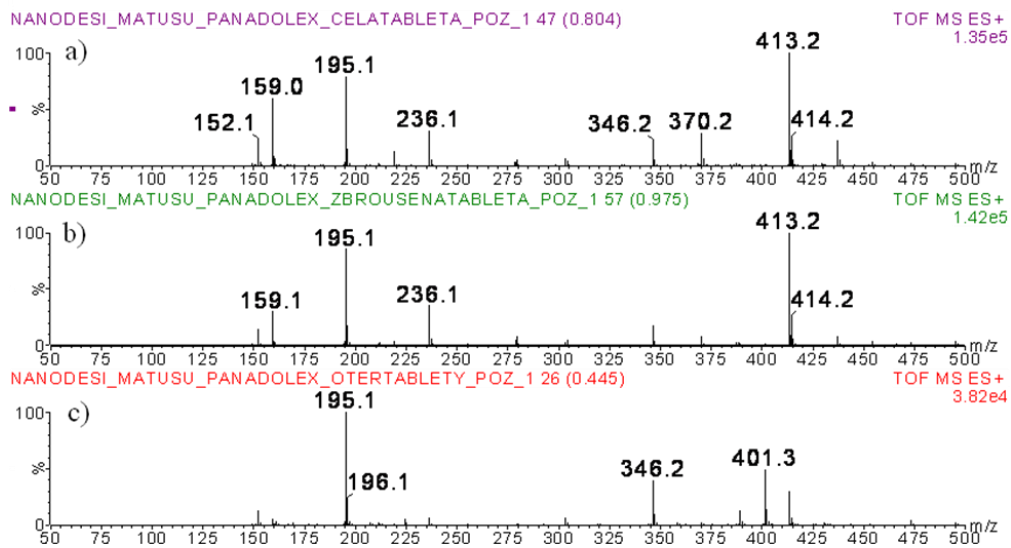
Acylcoffin – přiblížení na pík m/z 179.



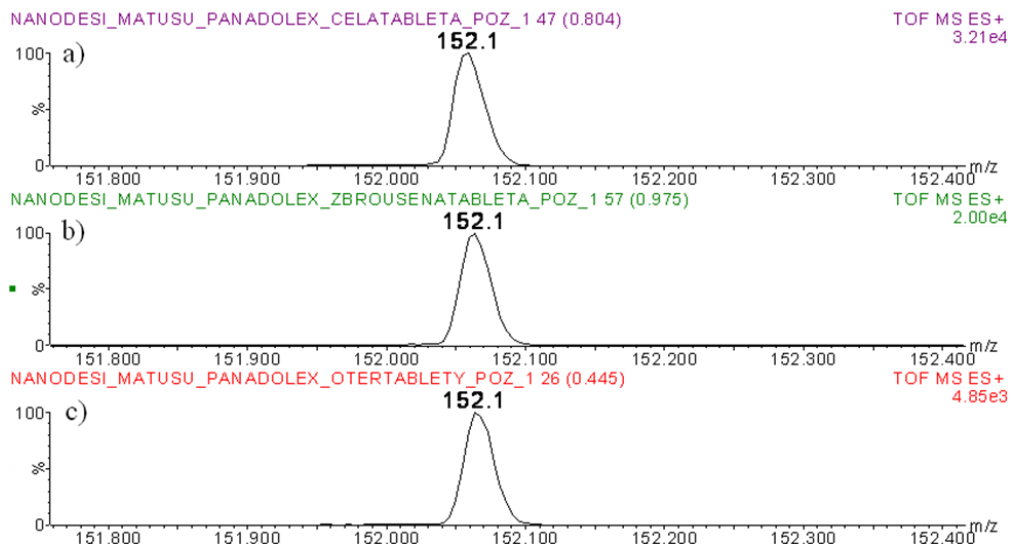
Spektrum Acylcoffinu v pozitivním modu a) celá tableta bez povrchové úpravy, b) tableta se zbrošeným povrchem, c) oťěr tablety.



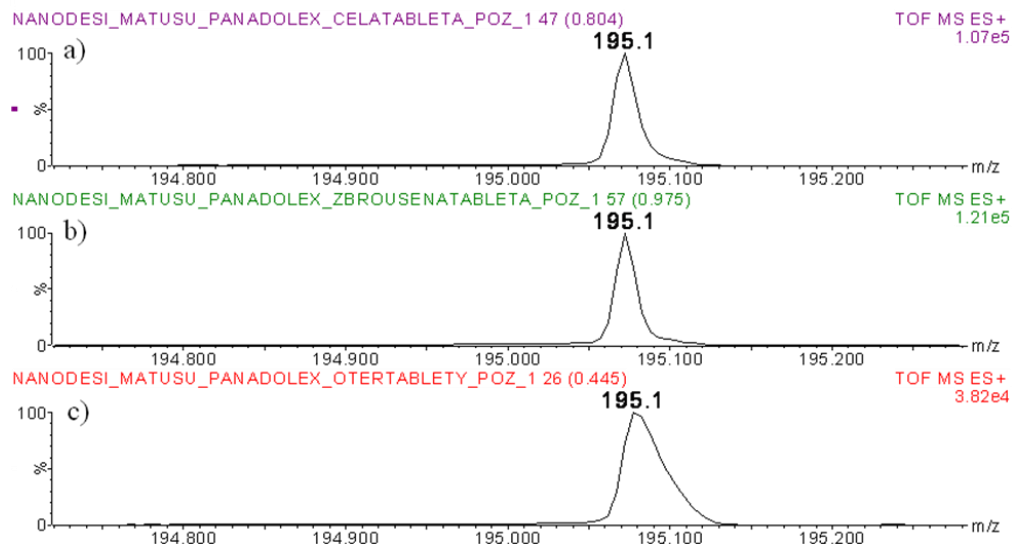
Acylcoffin – přiblížení na pík m/z 195.



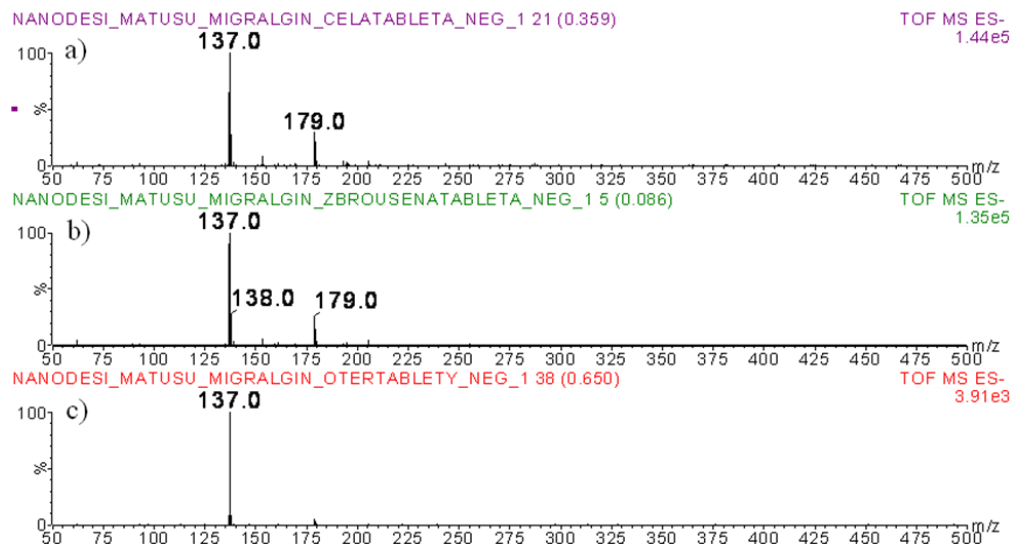
Spektrum Panadol Extra a) celá tableta bez povrchové úpravy, b) tableta se zbroušeným povrchem, c) otěr tablety.



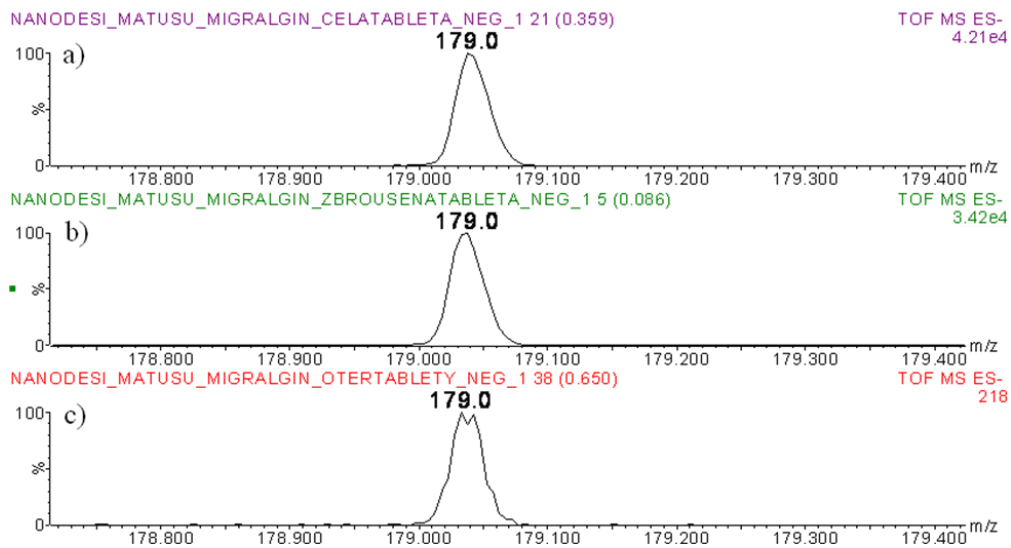
Panadol Extra – přiblížení na pík m/z 152.



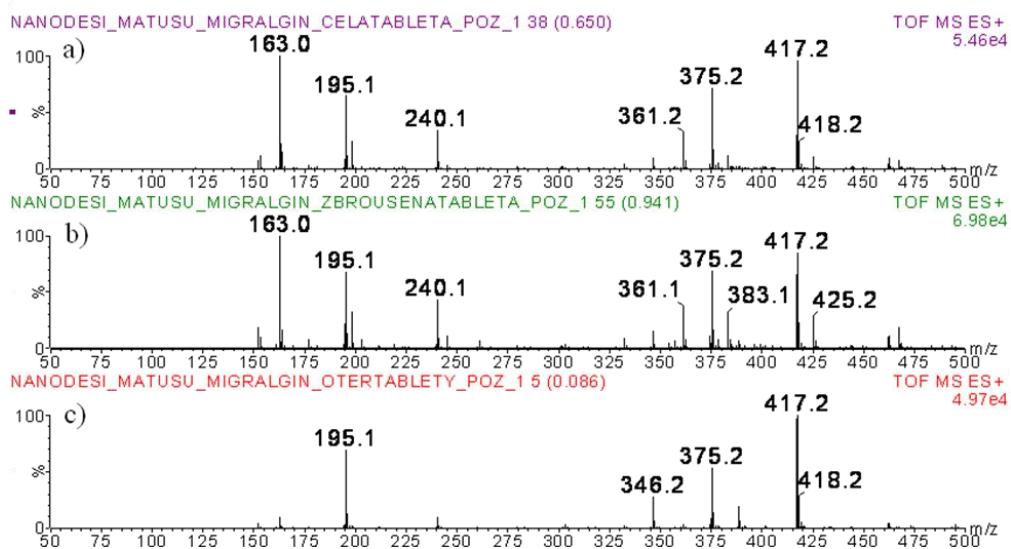
Panadol Extra – přiblížení na pík m/z 195.



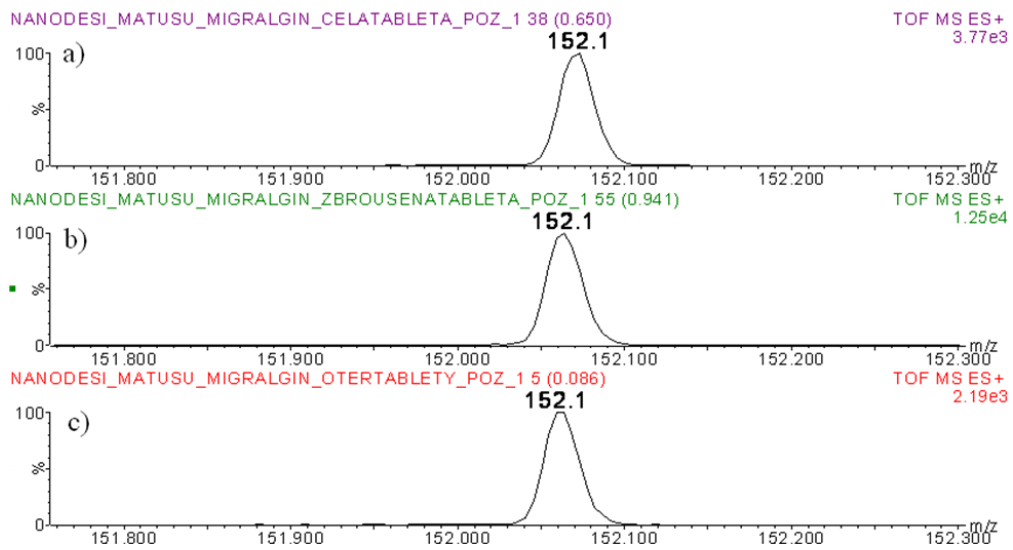
Spektrum Migralginu v negativním modu a) celá tableta bez povrchové úpravy, b) tableta se zbroušeným povrchem, c) ořez tablety.



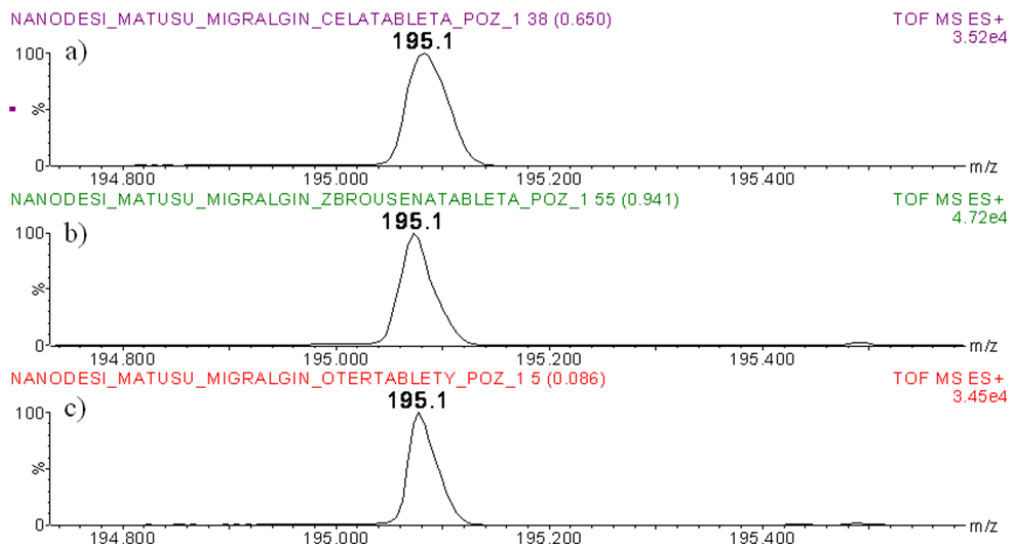
Migralgin – přiblížení na pík m/z 179.



Spektrum Migralginu v pozitivním modu a) celá tableta bez povrchové úpravy, b) tableta se zbrošeným povrchem, c) ořez tablety.

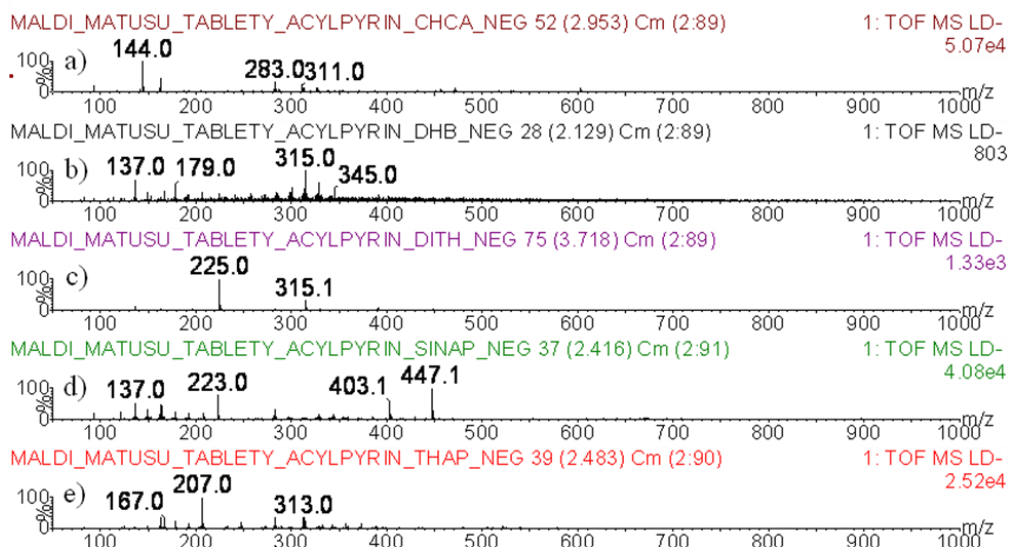


Migralgin – přiblížení na pík m/z 152.

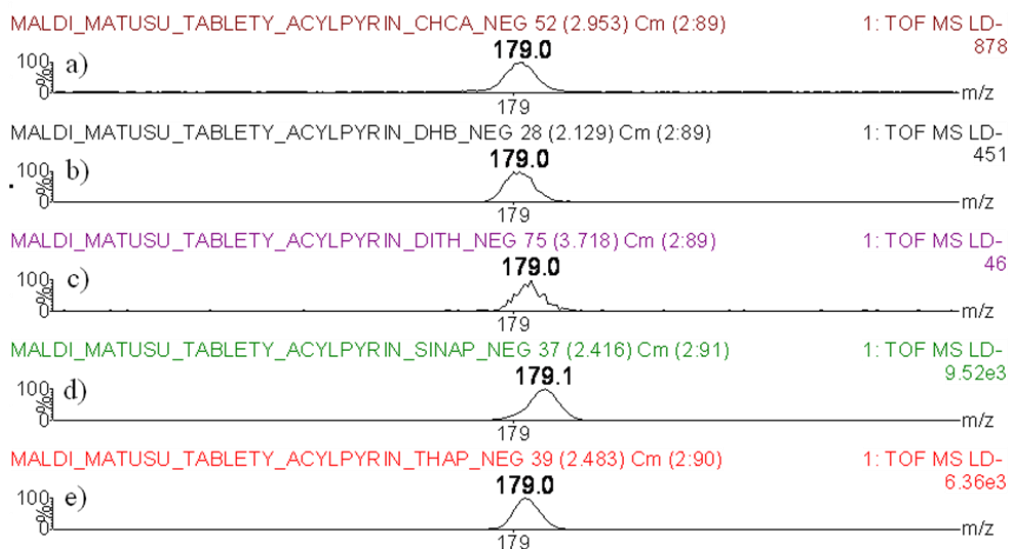


Migralgin – přiblížení na pík m/z 195.

## II. Hmotnostní spektra léčiv technikou MALDI-QTOF

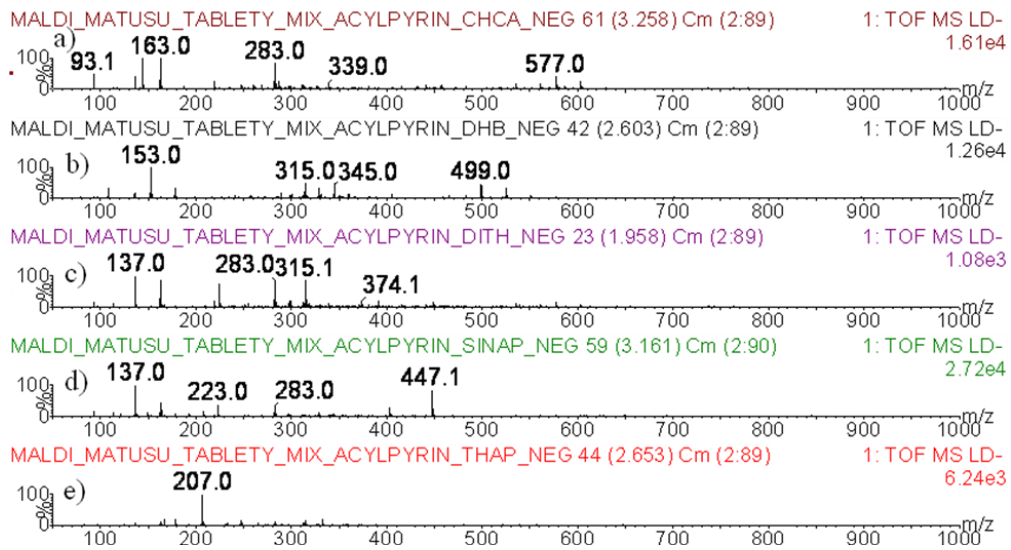


Spektrum Acylpyrinu, překryv vzorku matricí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.

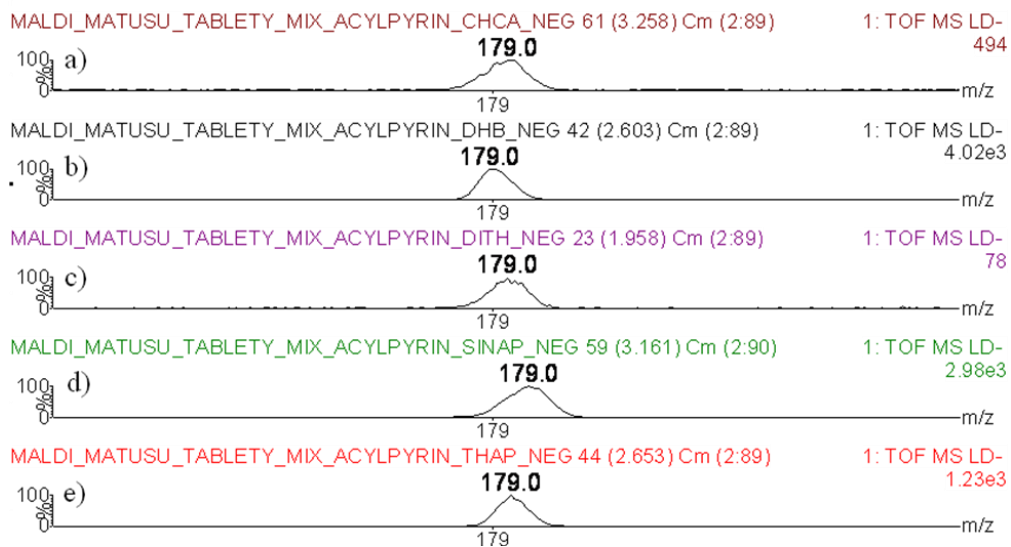


Acylpyrin – přiblížení na pík m/z 152, překryv vzorku matricí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.

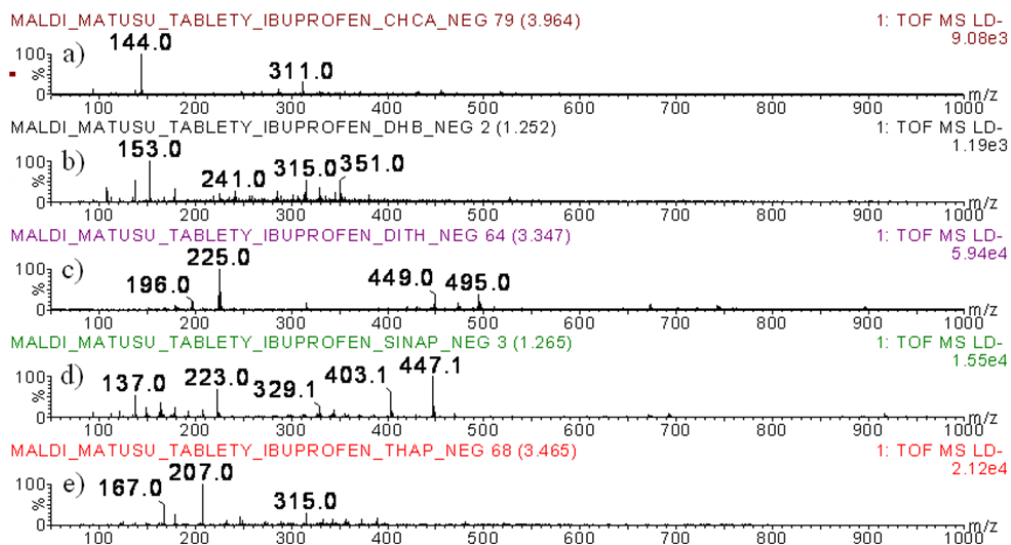




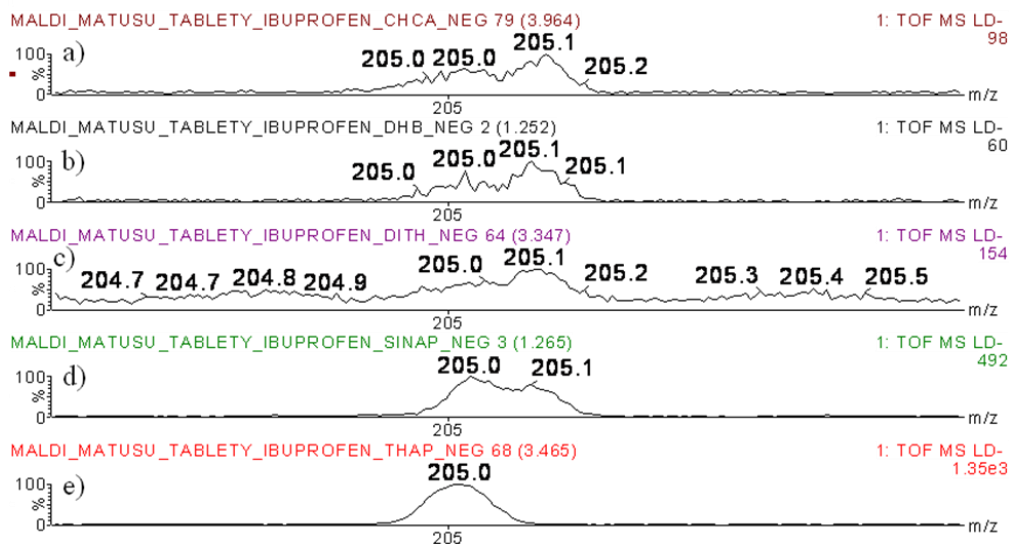
Spektrum Acylpyrinu, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



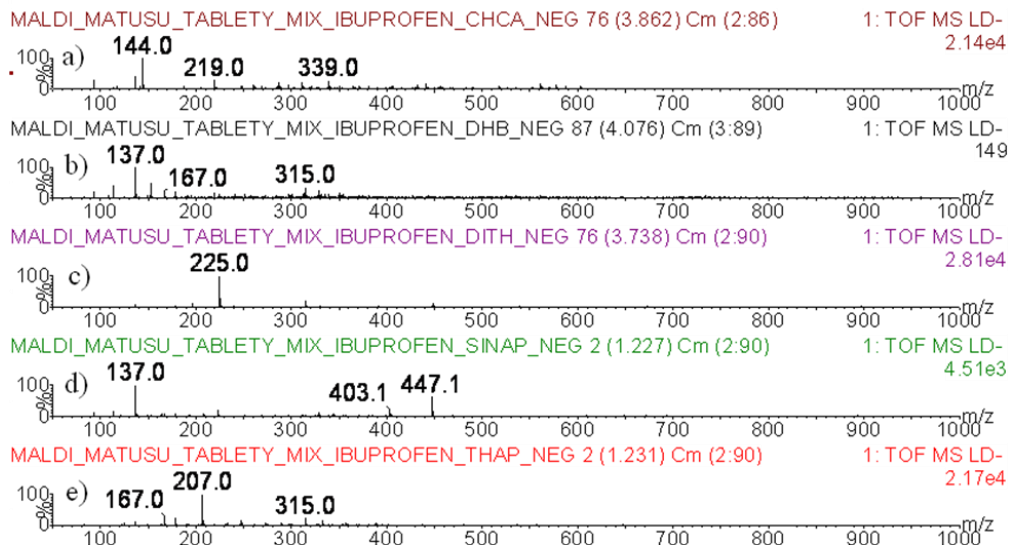
Acylpyrin – přiblížení na pík m/z 179, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



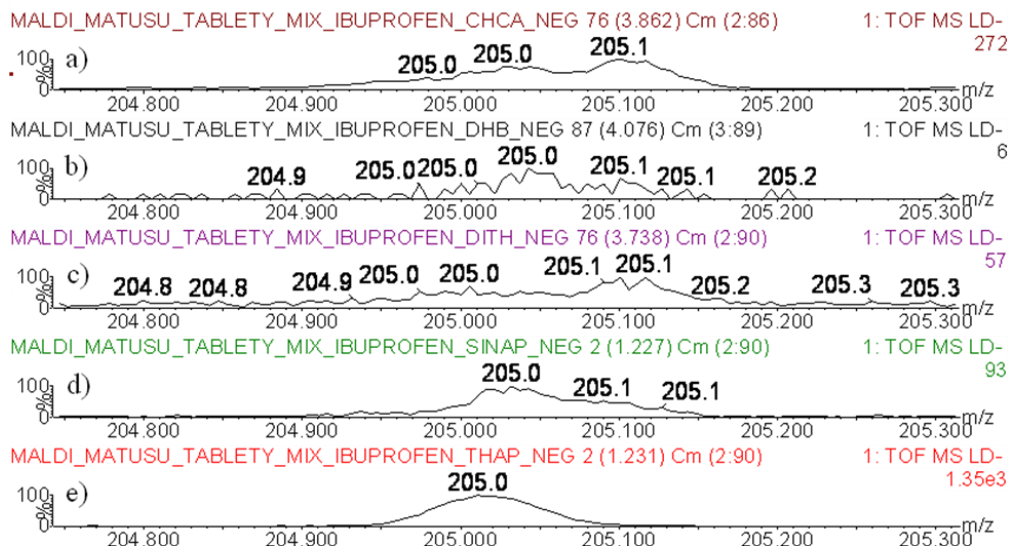
Spektrum Ibuprofen AL 400, překryv vzorku matricí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



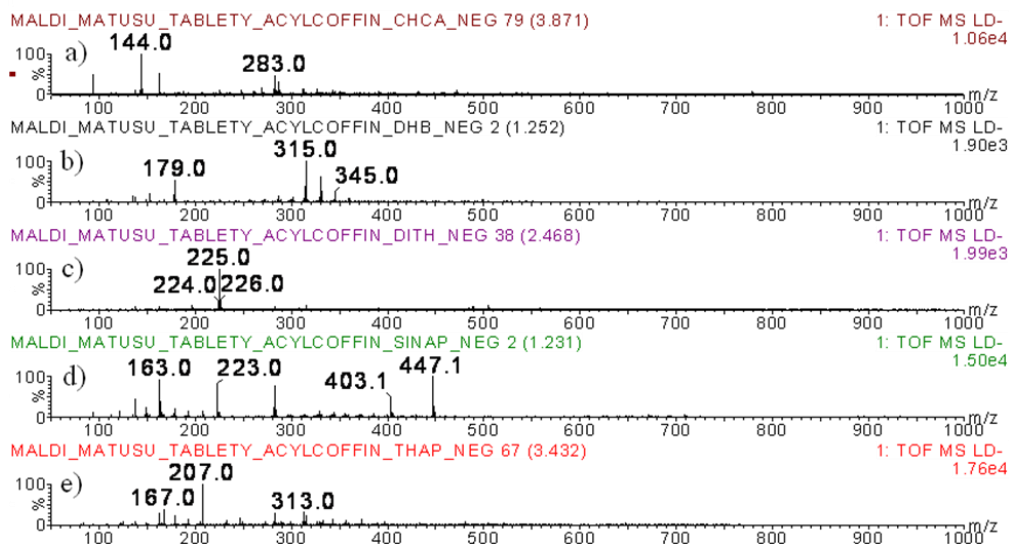
Ibuprofen AL 400 – přiblížení na pík m/z 205, překryv vzorku matricí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



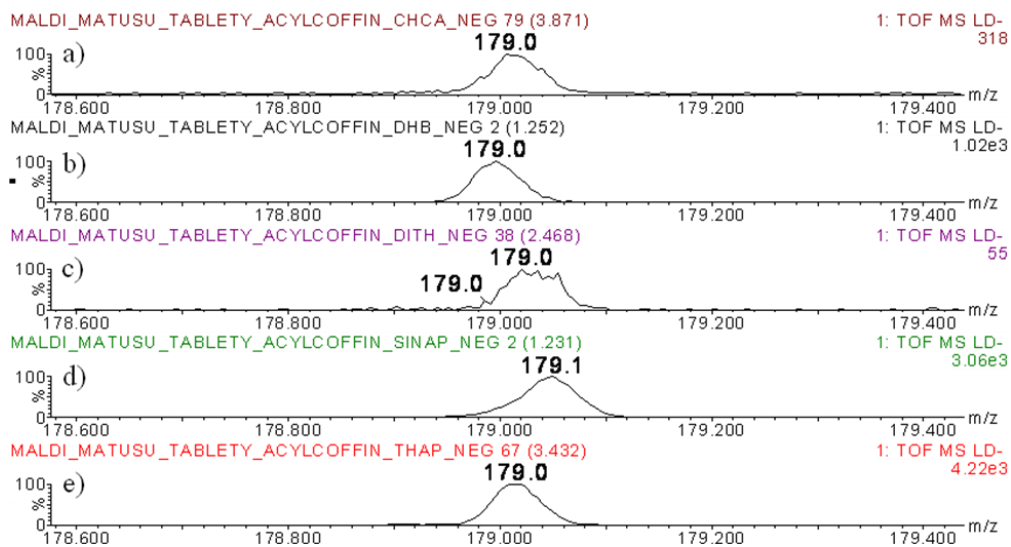
Spektrum Ibuprofen AL 400, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



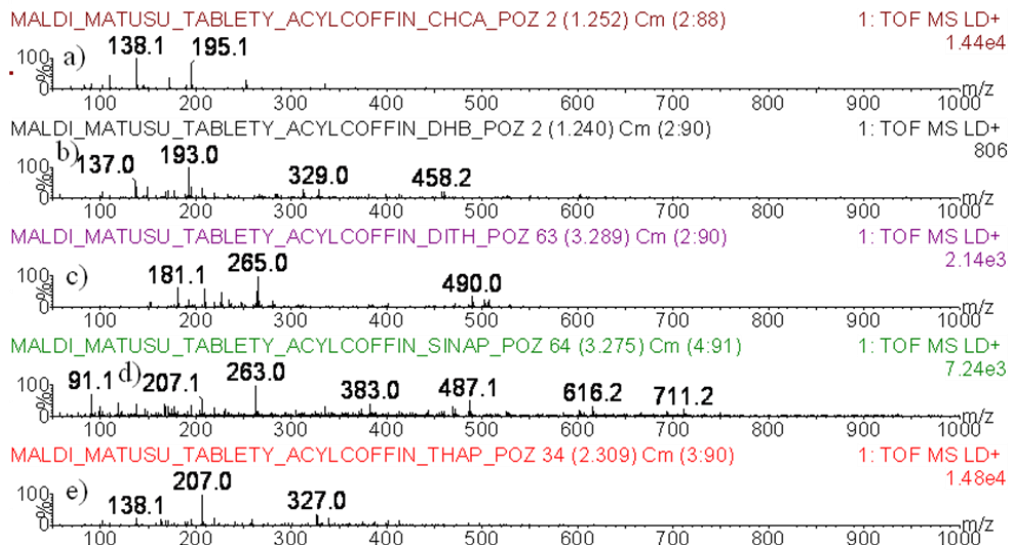
Ibuprofen AL 400 – přiblížení na pík m/z 205, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



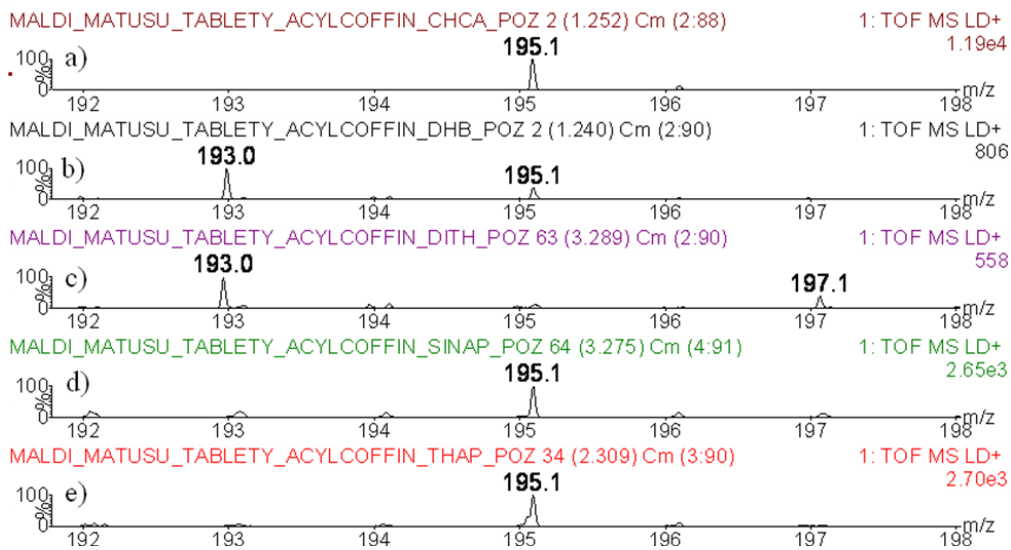
Spektrum Acylcoffinu v negativním modu, překryv vzorku maticí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



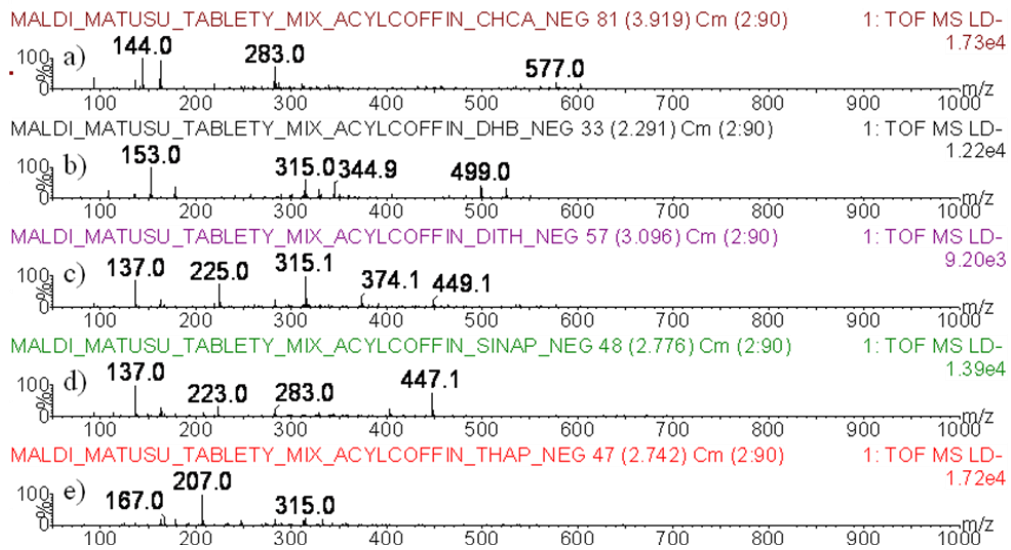
Acylcoffin – přiblížení na pik m/z 179, překryv vzorku maticí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



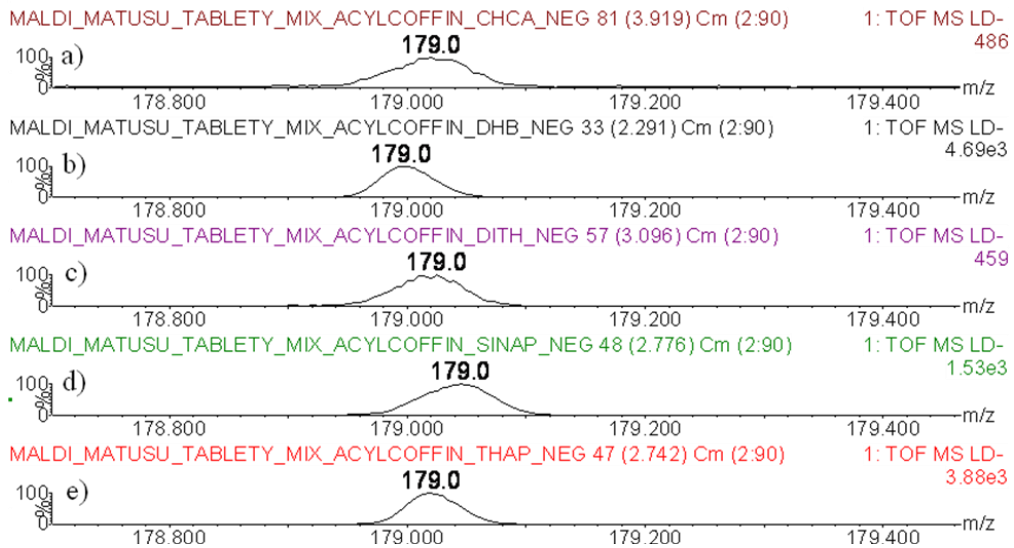
Spektrum Acylcoffinu v pozitivním modu, překryv vzorku maticí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



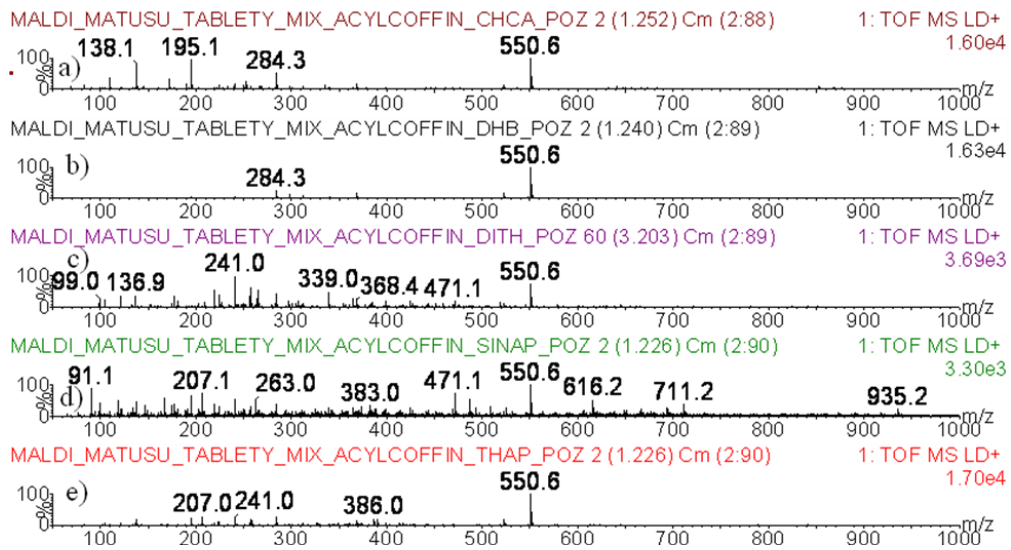
Acylcoffin – přibližení na pík m/z 195, překryv vzorku maticí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



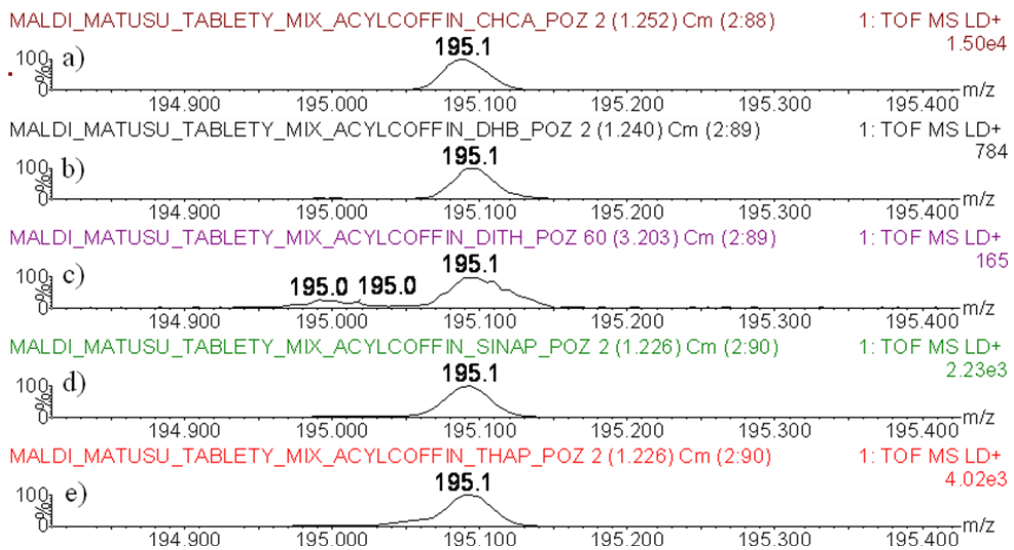
Spektrum Acylcoffinu v negativním modu, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



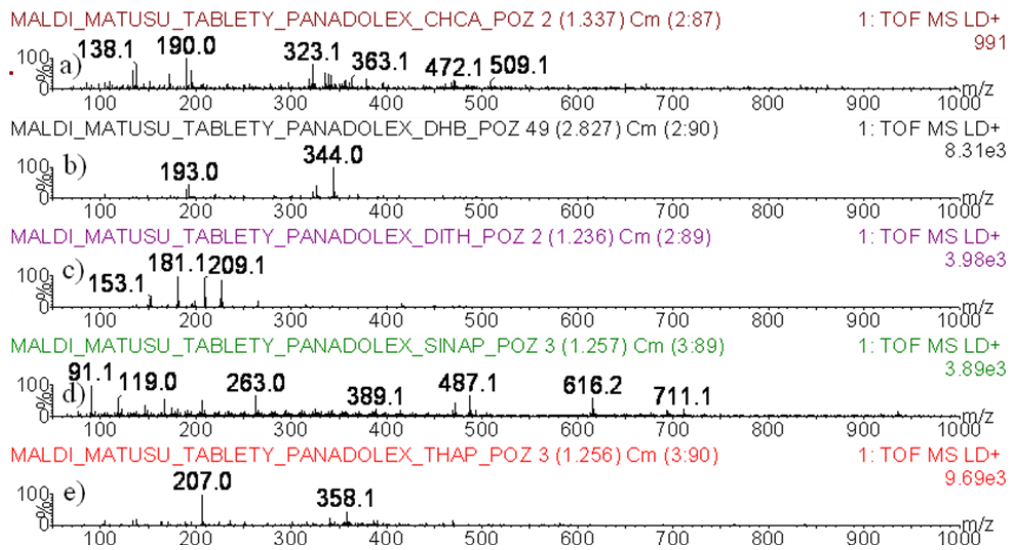
Acylcoffin – přibližení na pik m/z 179, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



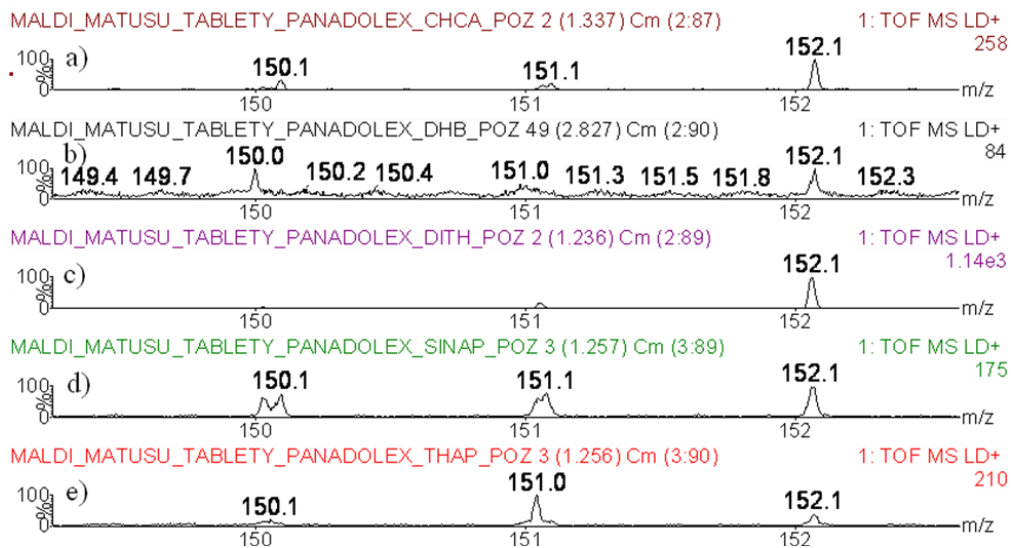
Spektrum Acylcoffinu v pozitivním modu, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



Acylcoffin – přibližení na pik m/z 195, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.

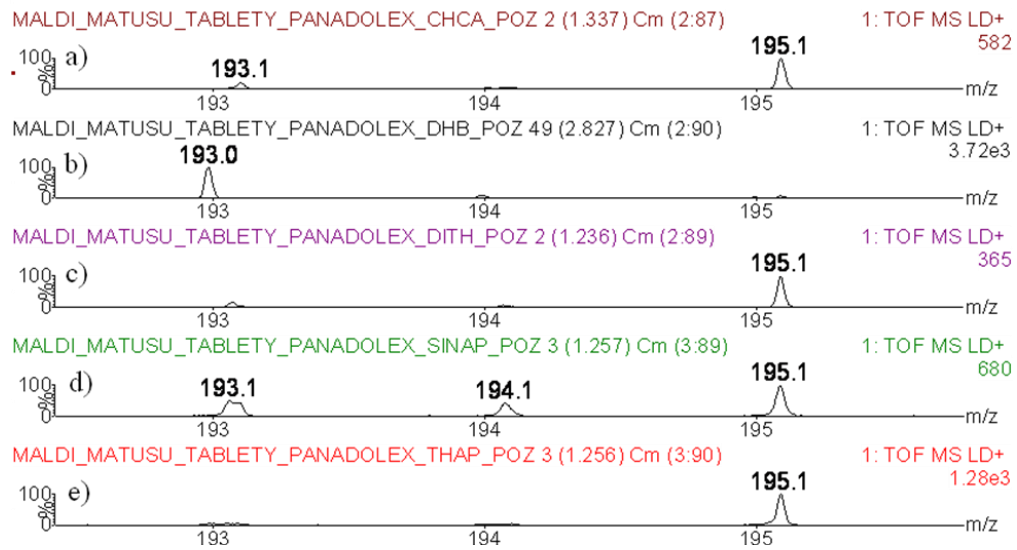


Spektrum Panadolu Extra, překryv vzorku maticí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.

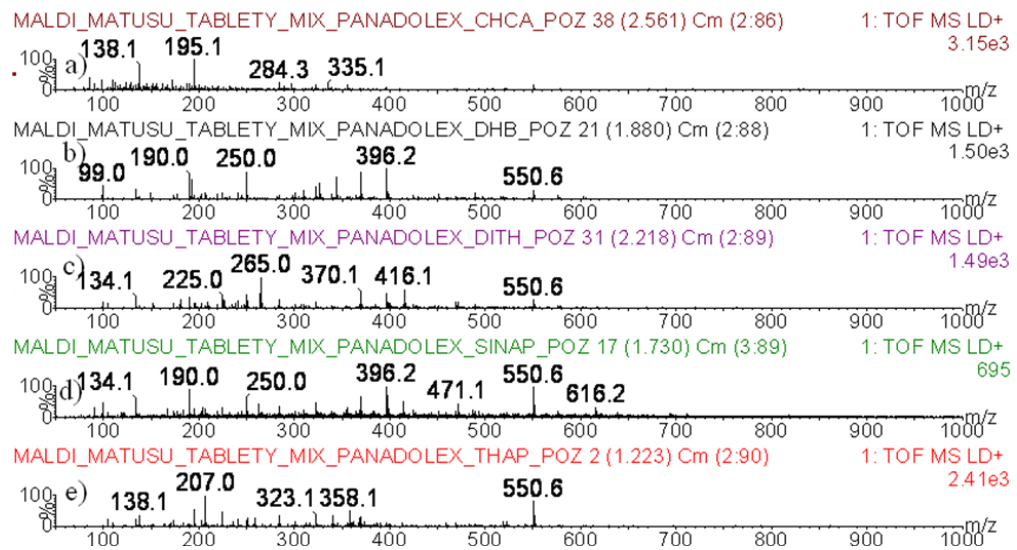


Panadol Extra – přiblížení na pík m/z 152, překryv vzorku maticí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.

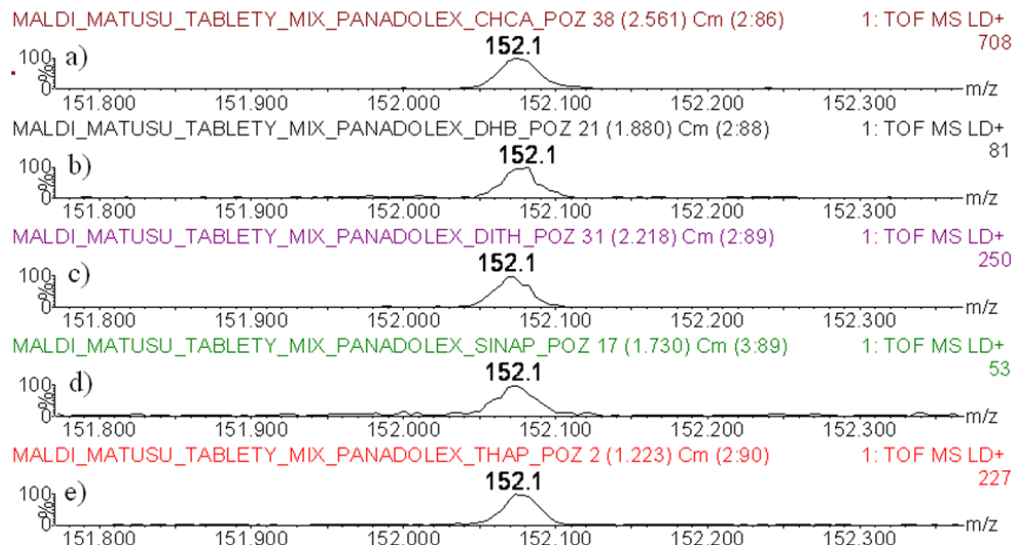




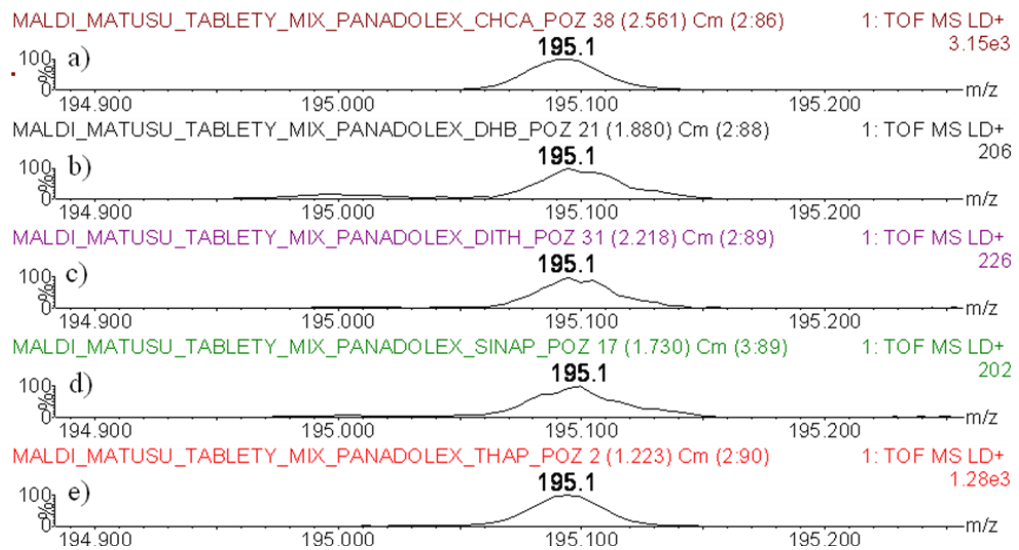
Panadol Extra – přibližení na pík m/z 195, překryv vzorku matricí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



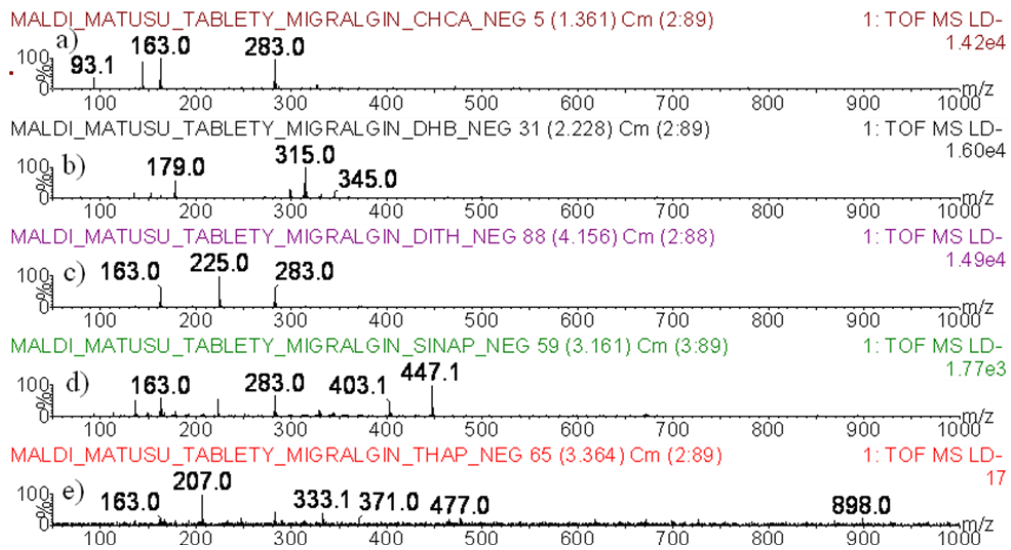
Spektrum Panadolu Extra, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



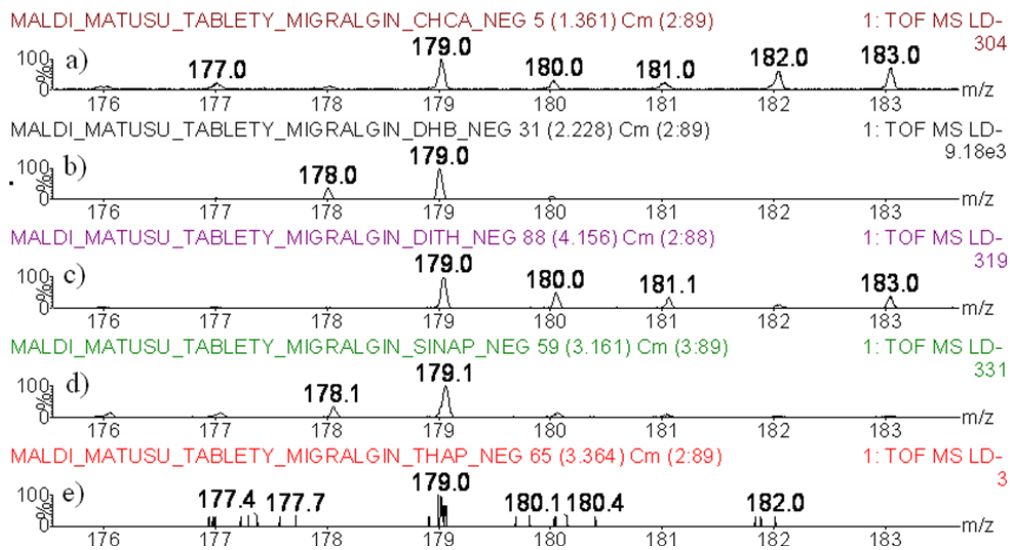
Panadol Extra – přiblížení na pík m/z 152, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



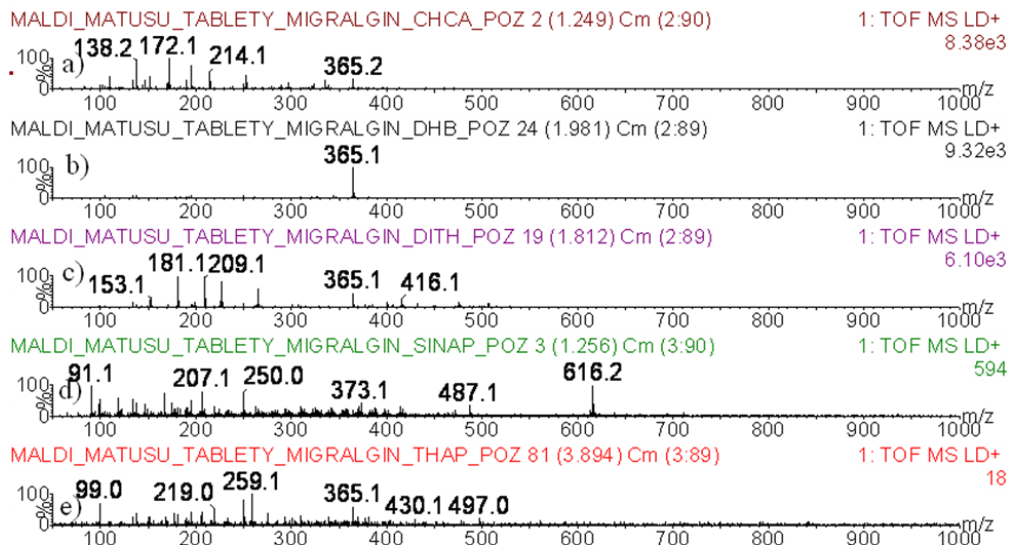
Panadol Extra – přiblížení na pík m/z 195, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



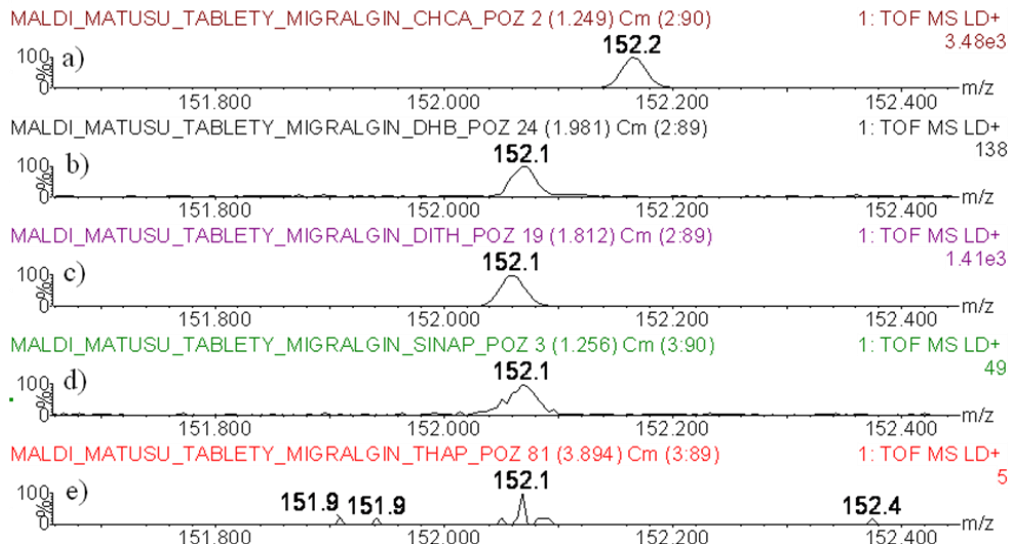
Spektrum Migralginu v negativním modu, překryv vzorku matricí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



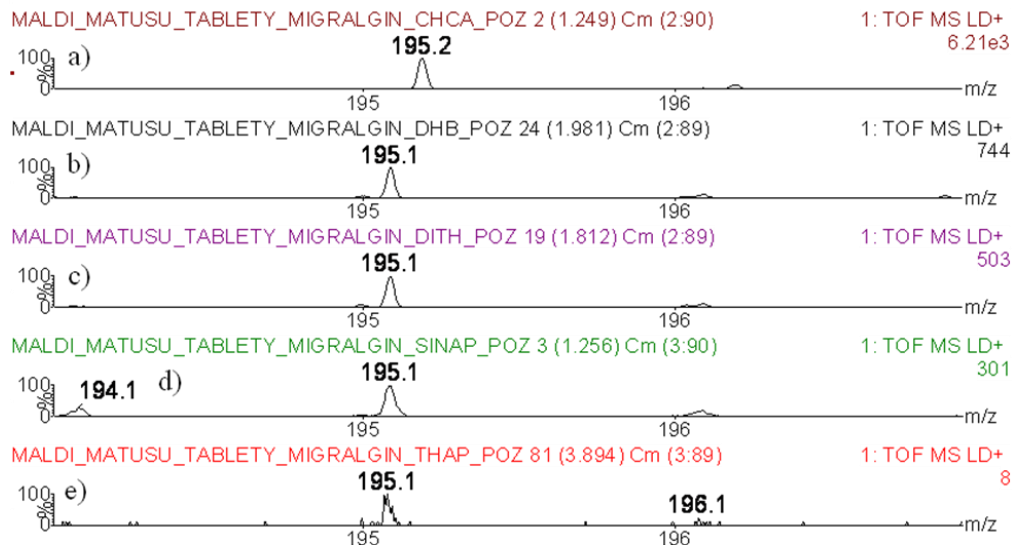
Migralgin – přiblížení na pík m/z 179, překryv vzorku matricí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



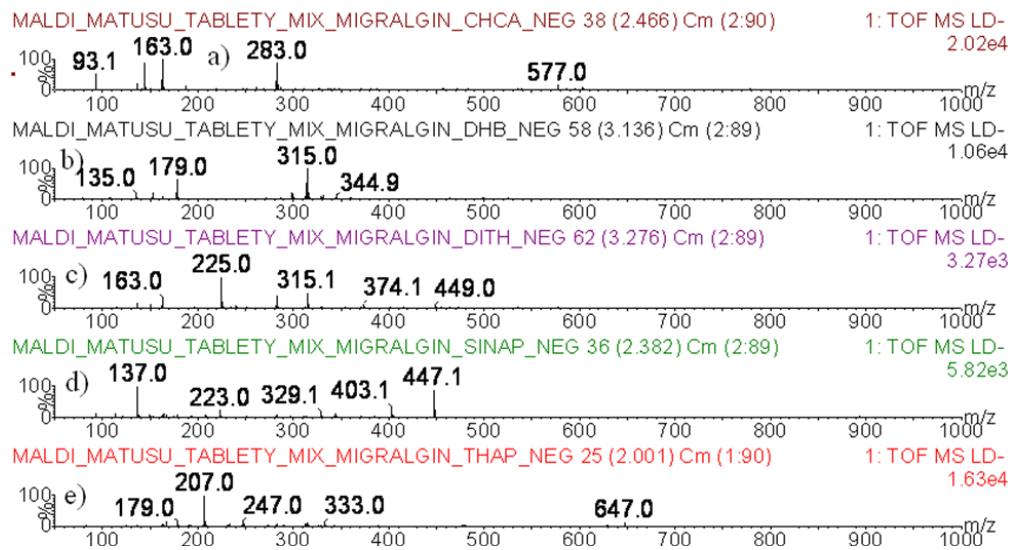
Spektrum Migralginu v pozitivním modu, překryv vzorku matricí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



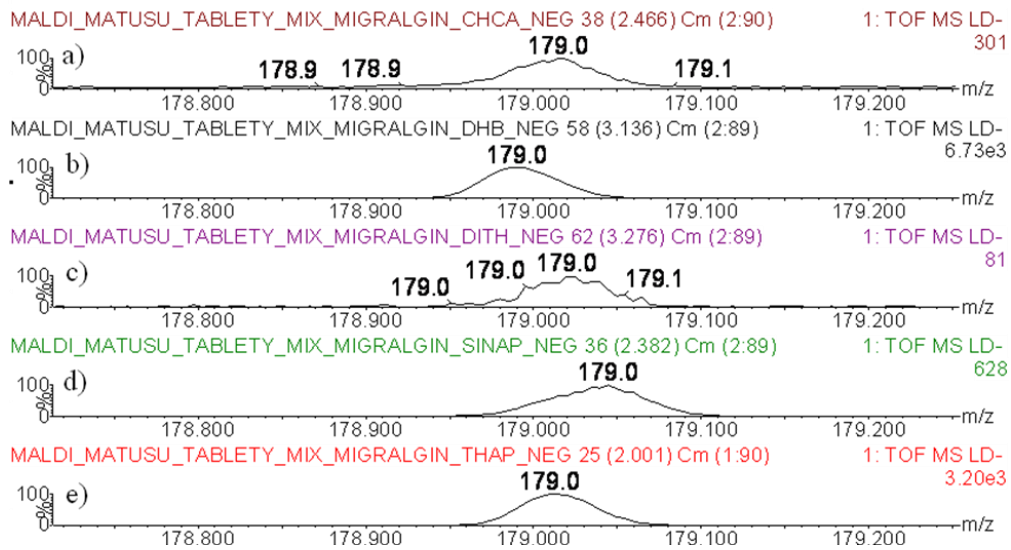
Migralgin – přiblížení na pík m/z 152, překryv vzorku matricí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



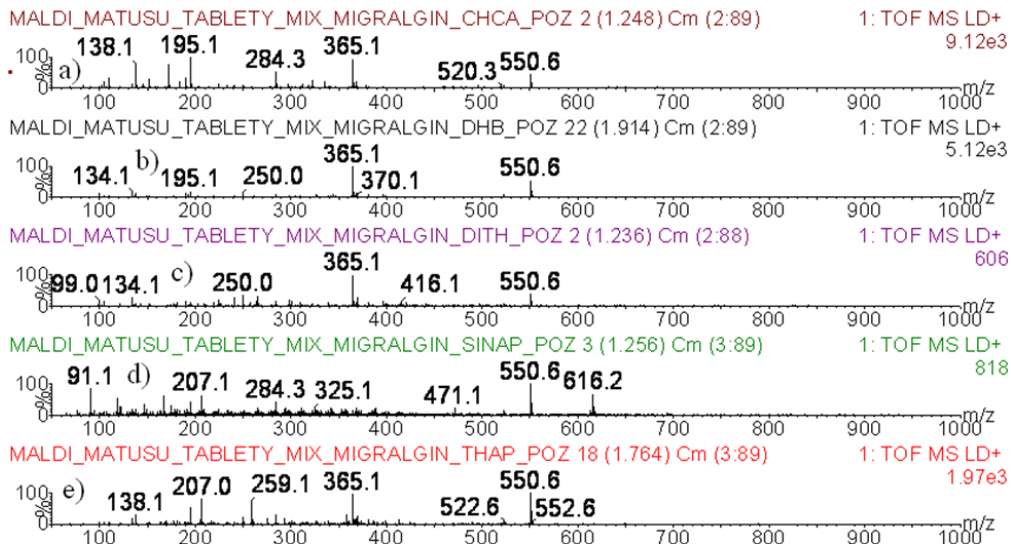
Migralgin – přiblížení na pík m/z 195, překryv vzorku matricí: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



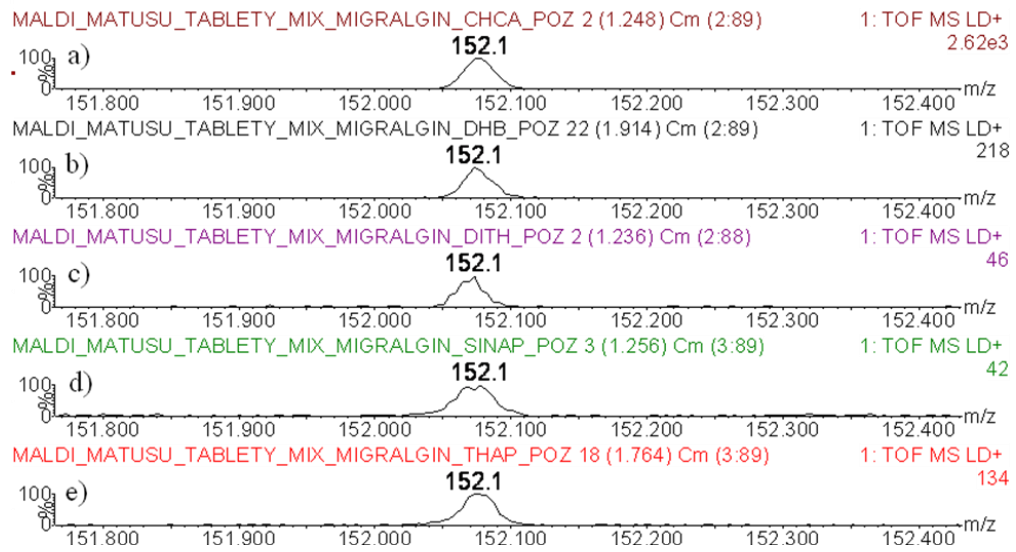
Spektrum Migralginu v negativním modu, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



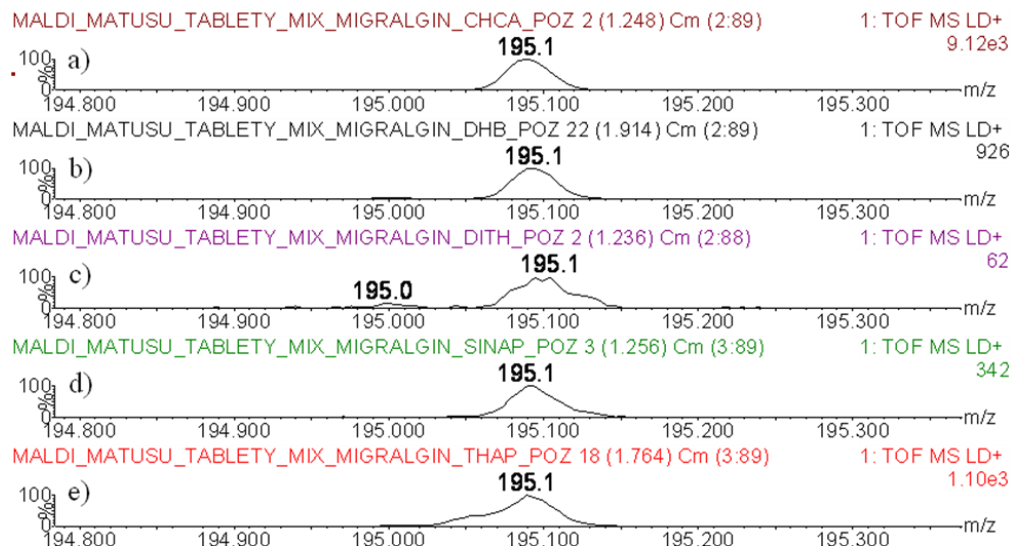
Migralgin – přiblížení na pík m/z 179, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.



Spektrum Migralginu v pozitivním modu, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.

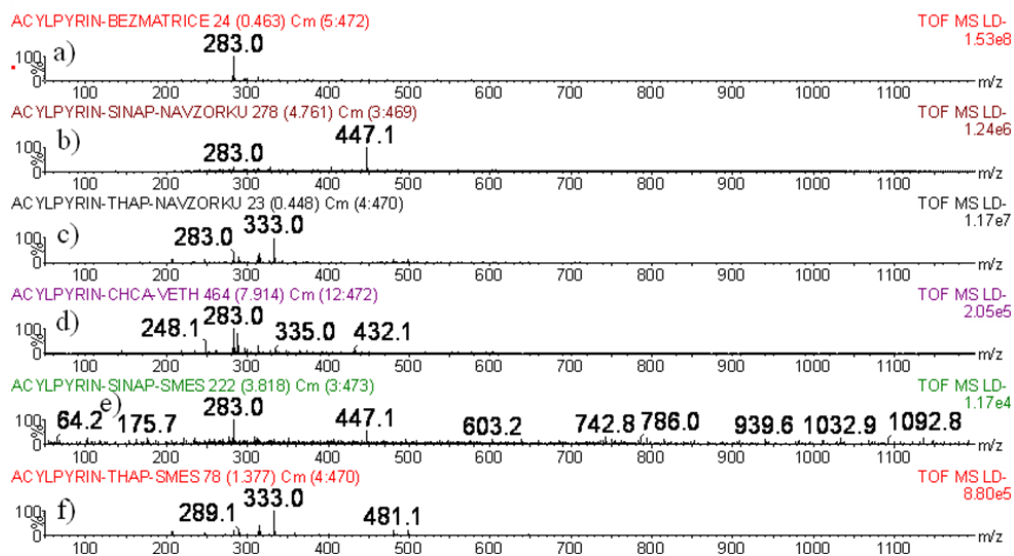


Migralgin – přiblížení na pík m/z 152, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.

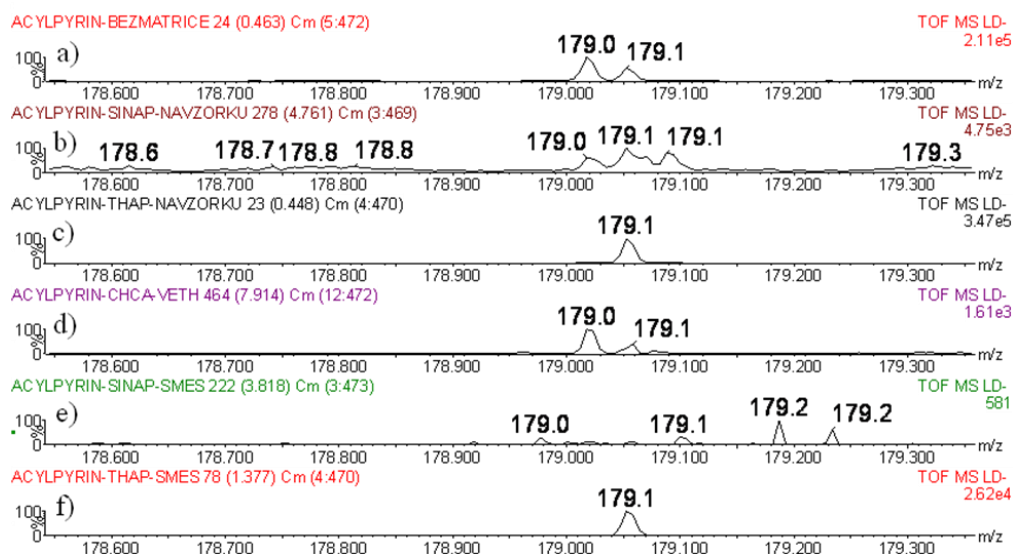


Migralgin – přiblížení na pík m/z 195, směs vzorku a matrice: a) CHCA, b) DHB, c) DITH, d) SINAP, e) THAP.

### III. Hmotnostní spektra léčiv technikou MALDI-SYNAPT

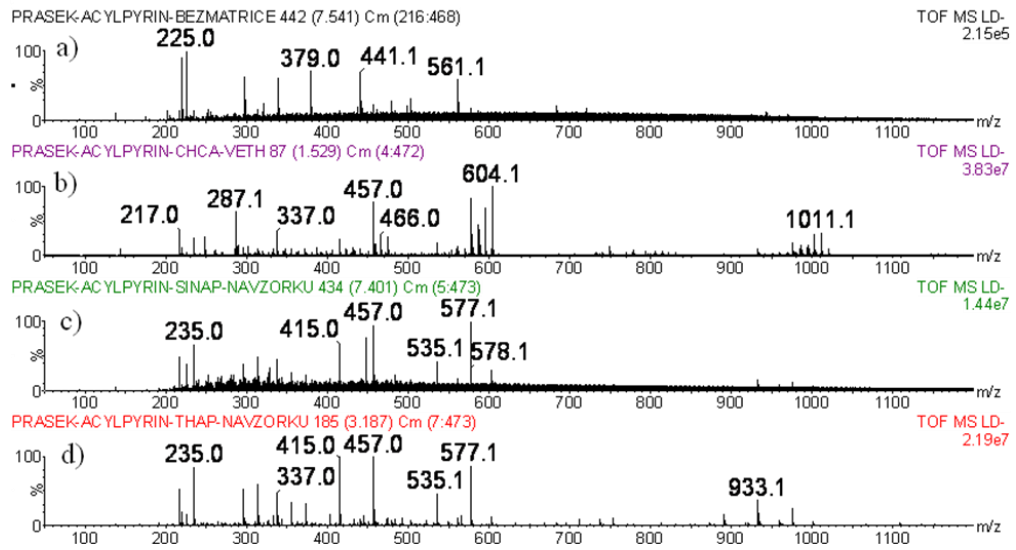


Spektrum roztoku Acylpyrinu a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) SINAP, c) THAP, d) CHCA v ethanolu; směs vzorku a matrice: e) SINAP, f) THAP.

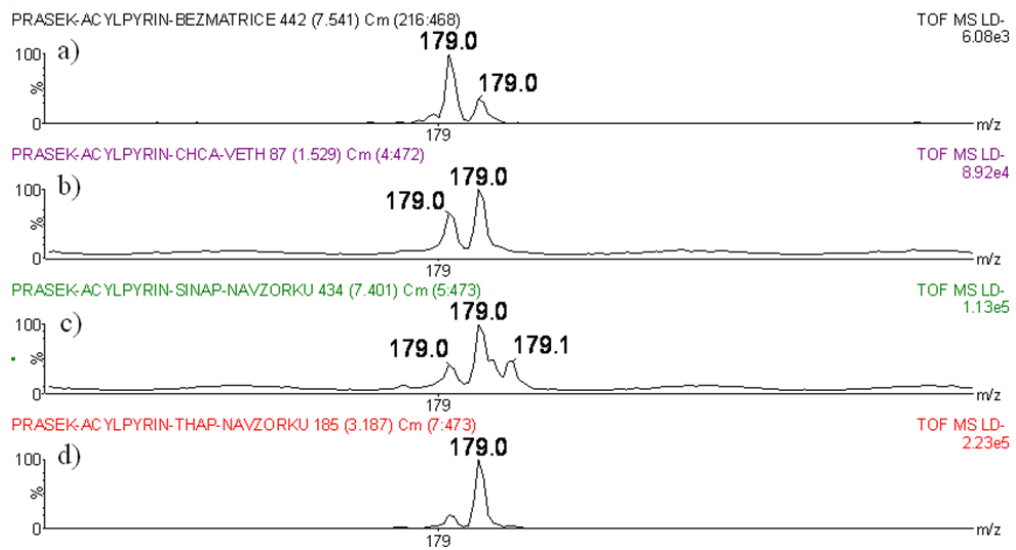


Roztok Acylpyrinu – přiblížení na pík m/z 179 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) SINAP, c) THAP, d) CHCA v ethanolu; směs vzorku a matrice: e) SINAP, f) THAP.

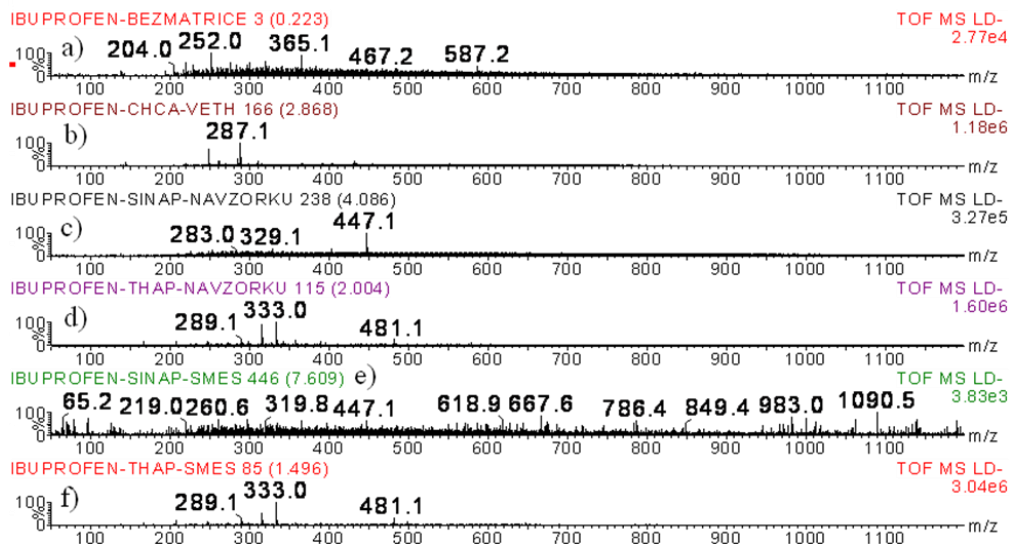




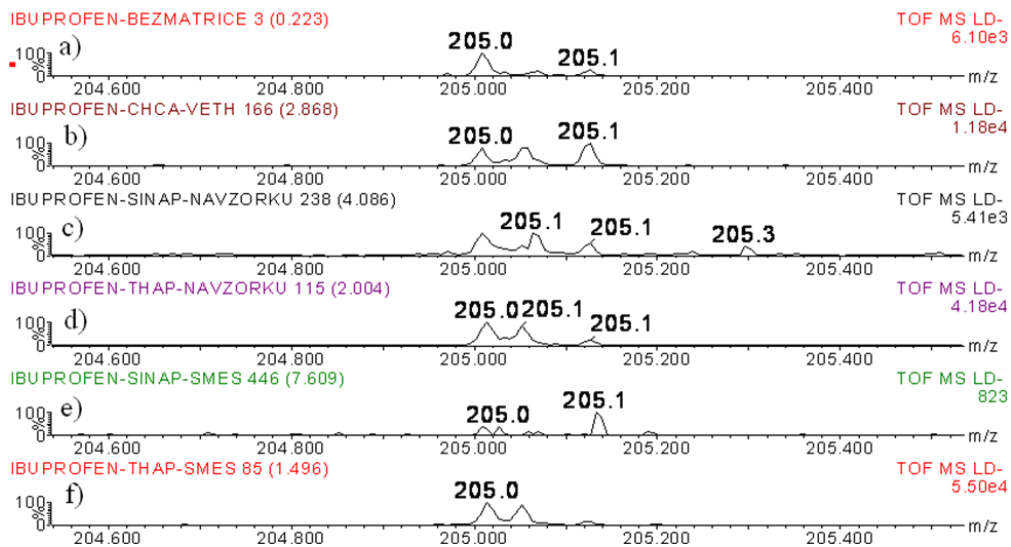
Spektrum práškového vzorku Acylpyrinu a) bez matrice; překryv vzorku maticí: b) CHCA v ethanolu, c) SINAP, d) THAP.



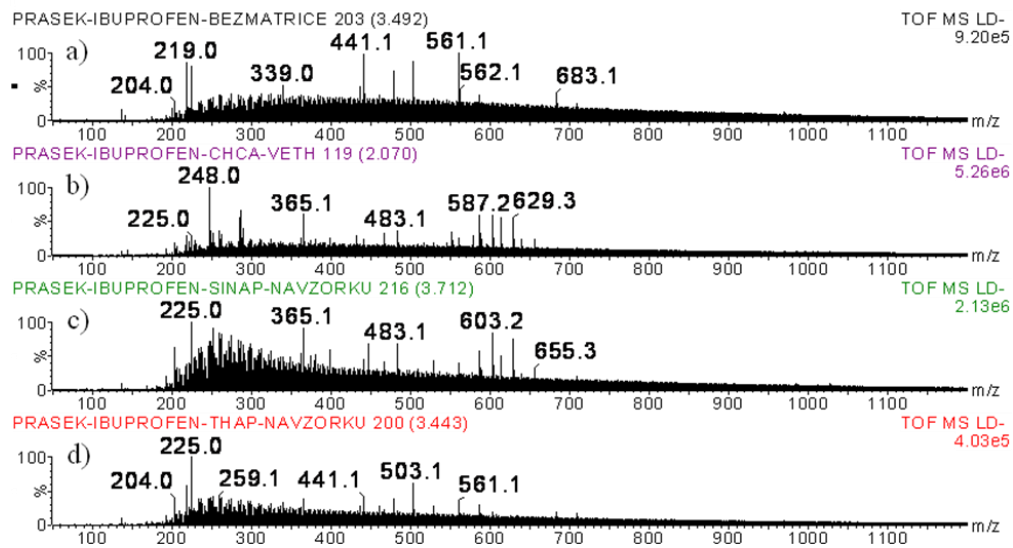
Prášek Acylpyrinu – přiblížení na pik m/z 179 a) bez matrice; překryv vzorku maticí: b) CHCA v ethanolu, c) SINAP, d) THAP.



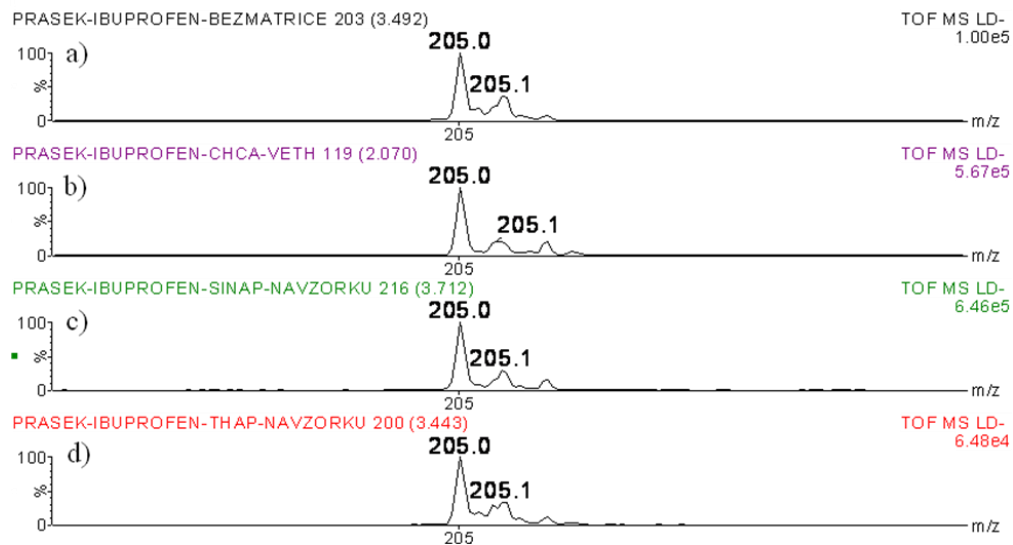
Spektrum roztoku Ibuprofen AL 400 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) SINAP, d) THAP; směs vzorku a matrice: e) SINAP, f) THAP.



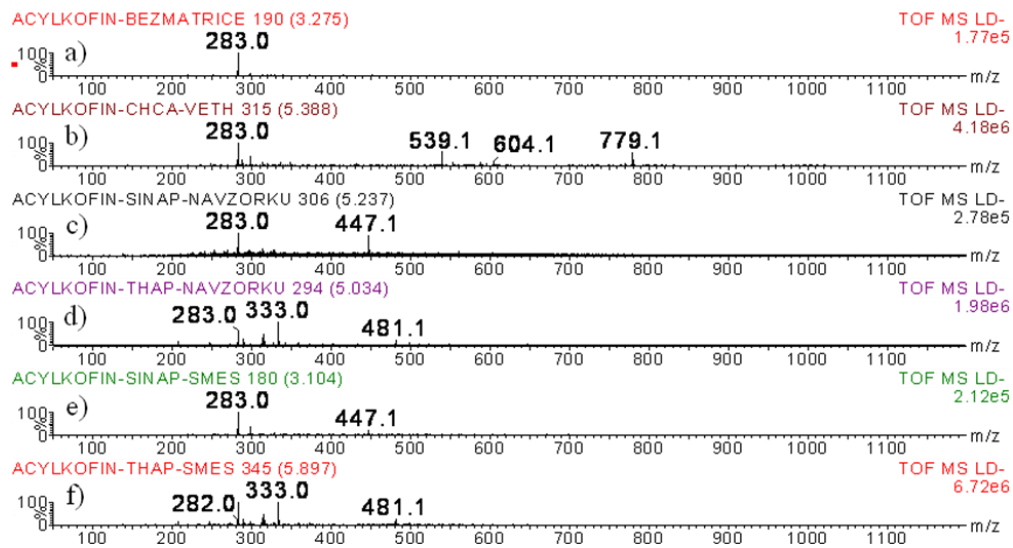
Roztok Ibuprofenu AL 400 – přiblížení na pík m/z 205 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) SINAP, d) THAP; směs vzorku a matrice: e) SINAP, f) THAP.



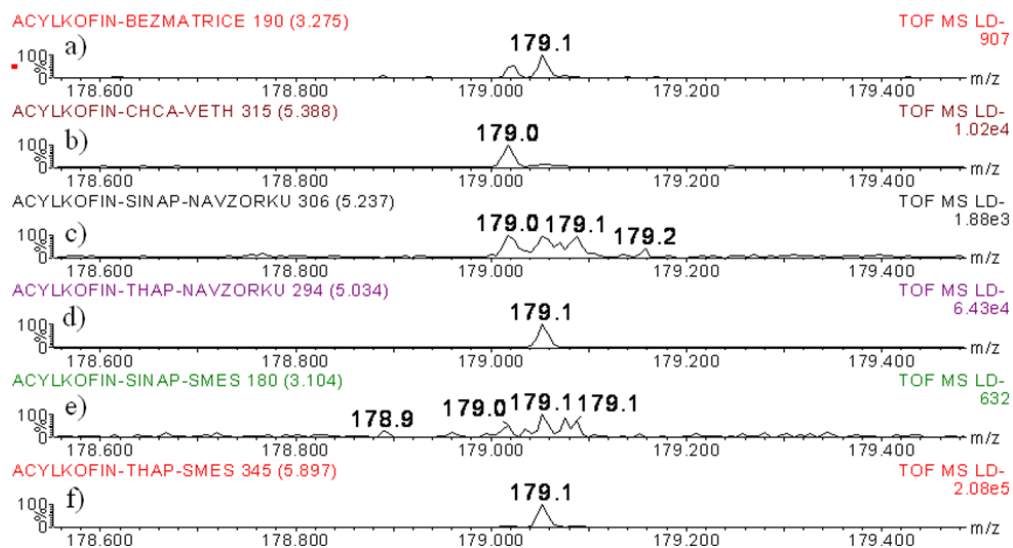
Spektrum práškového vzorku Ibuprofen AL 400 a) bez matrice; překryv vzorku maticí: b) CHCA v ethanolu, c) SINAP, d) THAP.



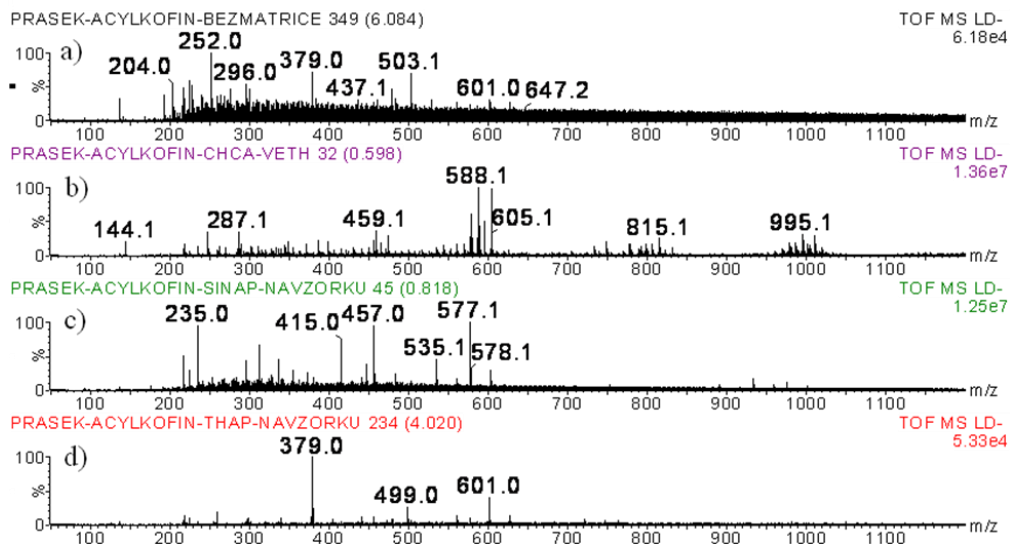
Prášek Ibuprofenu AL 400 – přiblížení na pík m/z 205 a) bez matrice; překryv vzorku maticí: b) CHCA v ethanolu, c) SINAP, d) THAP.



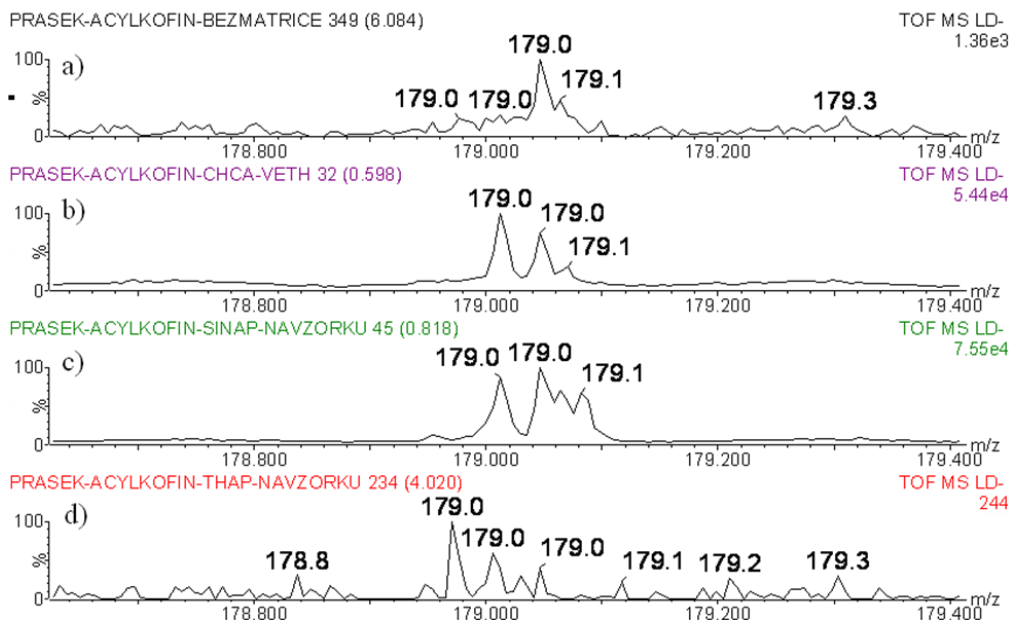
Spektrum roztoku Acylcoffinu v negativním modu a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) SINAP, d) THAP; směs vzorku a matrice: e) SINAP, f) THAP.



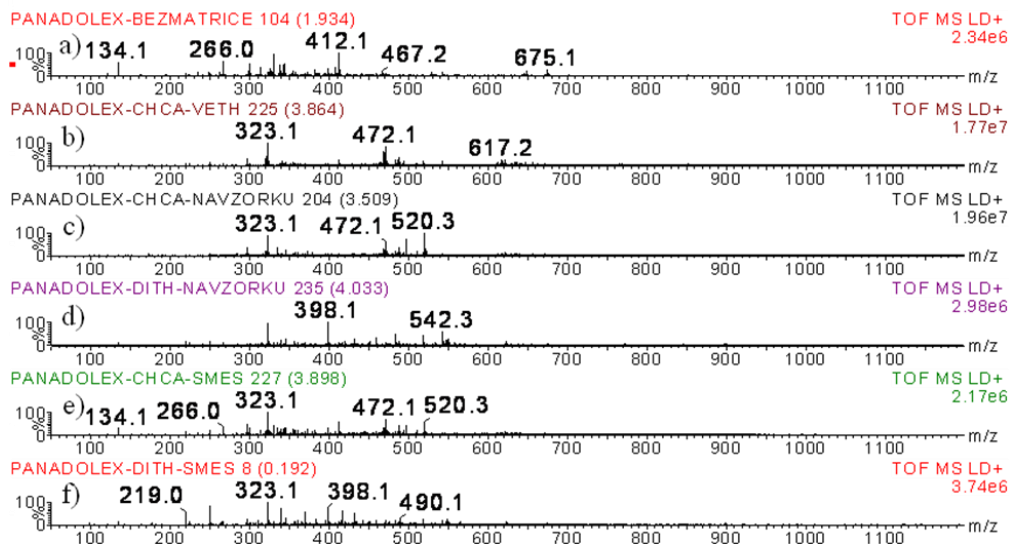
Roztok Acylcoffinu – přiblížení na pík m/z 179 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) SINAP, d) THAP; směs vzorku a matrice: e) SINAP, f) THAP.



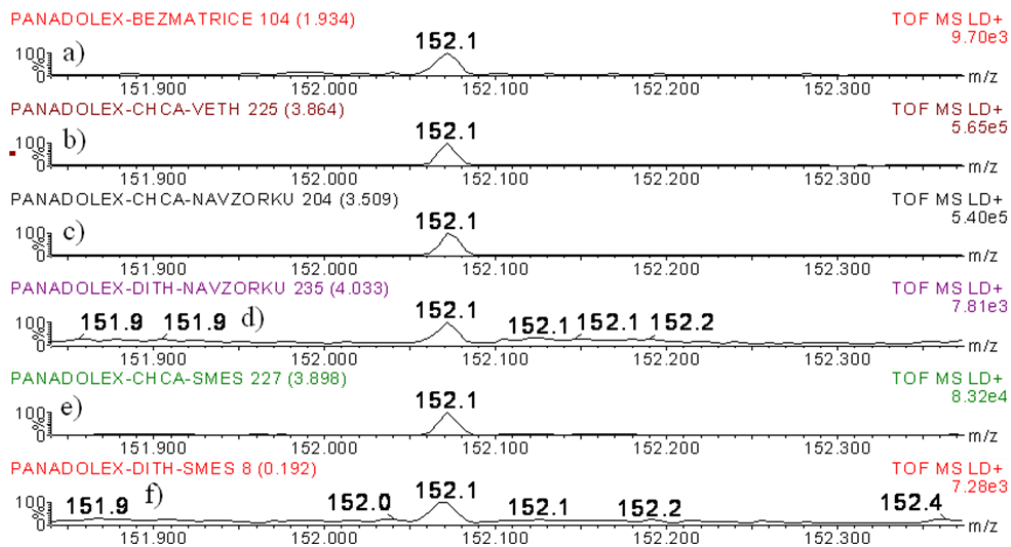
Spektrum práškového vzorku Acylcoffinu v negativním modu a) bez matrice; překryv vzorku maticí: b) CHCA v ethanolu, c) SINAP, d) THAP.



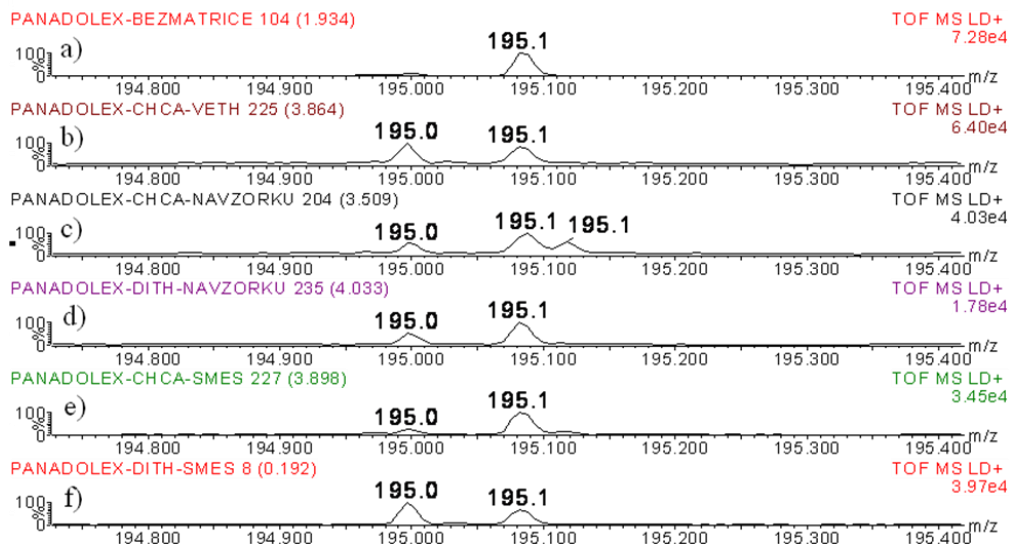
Prášek Acylcoffinu – přiblížení na pík m/z 179 a) bez matrice; překryv vzorku maticí: b) CHCA v ethanolu, c) SINAP, d) THAP.



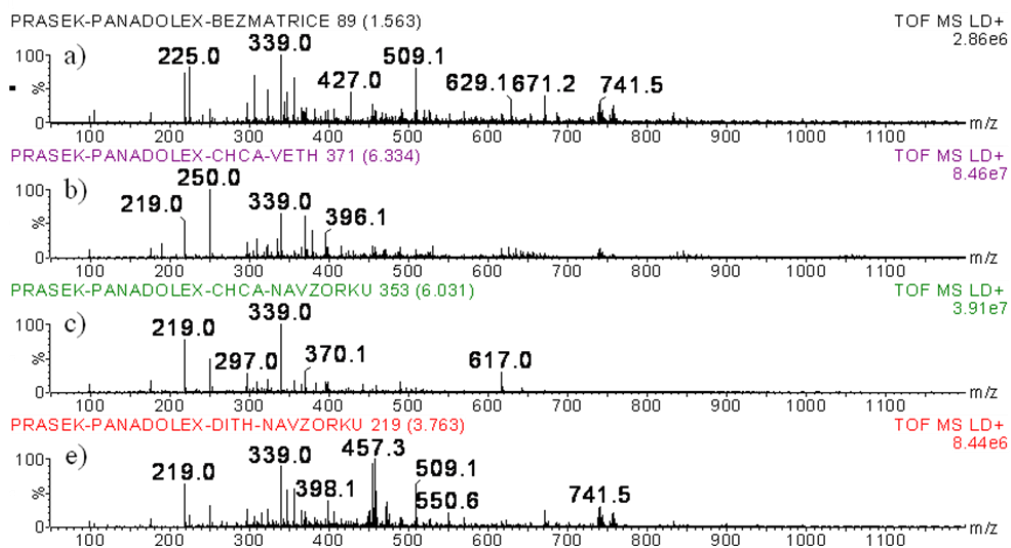
Spektrum roztoku Panadolu Extra a) bez matrice; překryv vzorku a matrice: b) CHCA v ethanolu, c) CHCA, d) DITH; směs vzorku a matrice: e) CHCA, f) DITH.



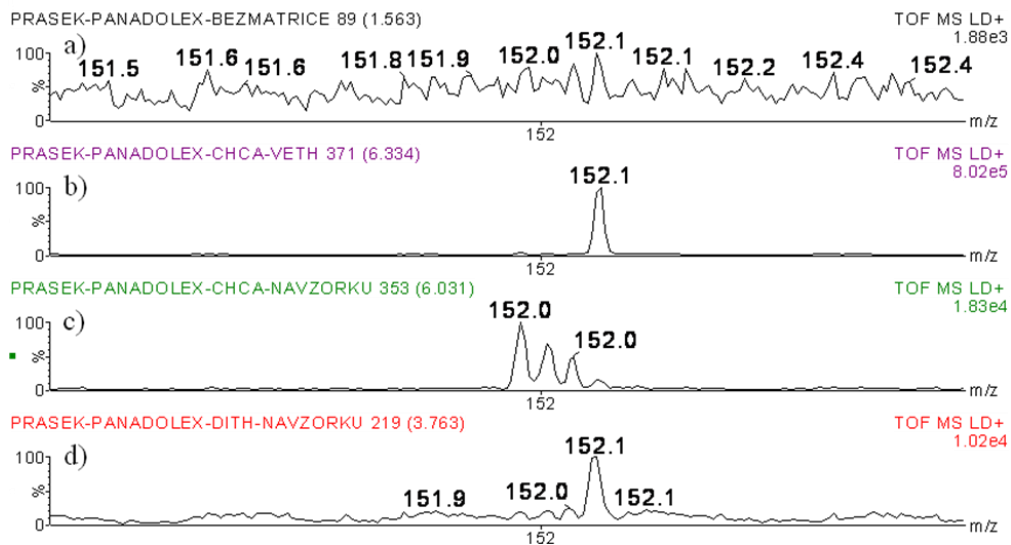
Roztok Panadolu Extra – přiblížení na pík m/z 152 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) CHCA, d) DITH; směs vzorku a matrice: e) CHCA, f) DITH.



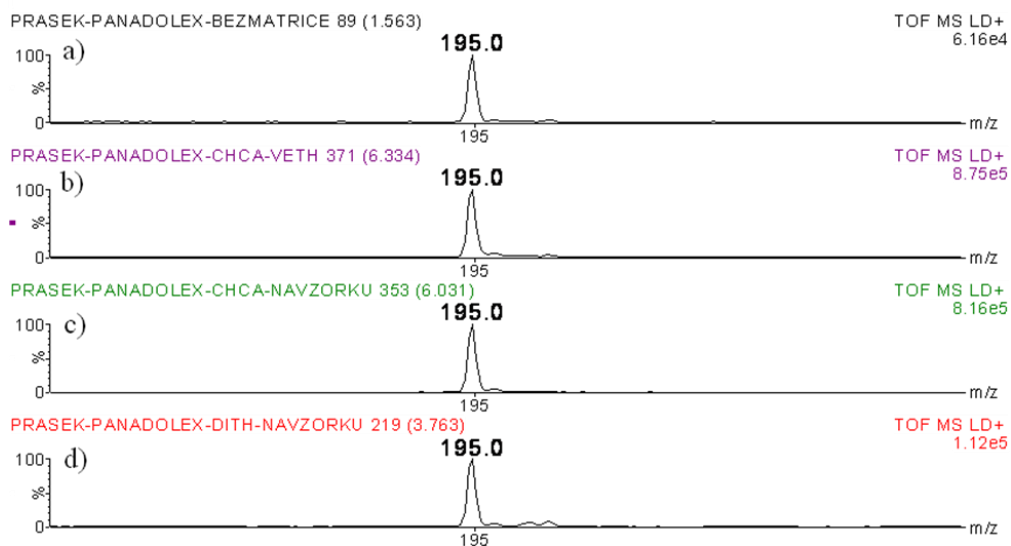
Roztok Panadolu Extra – přiblížení na pík m/z 195 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) CHCA, d) DITH; směs vzorku a matrice: e) CHCA, f) DITH.



Spektrum práškového vzorku Panadolu Extra a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) CHCA, d) DITH.

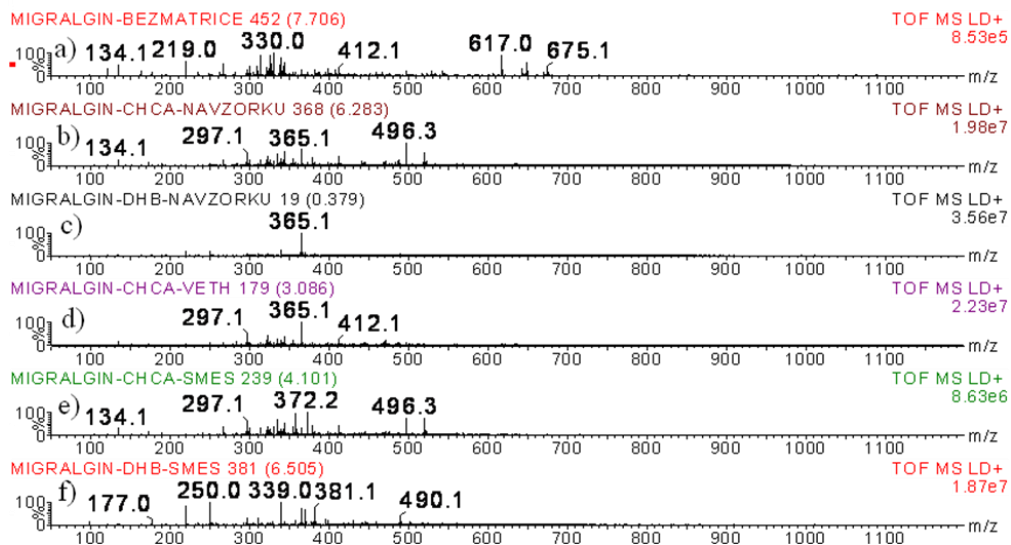


Prášek Panadolu Extra – přiblížení na pík m/z 152 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) CHCA, d) DITH; směs vzorku a matrice: e) CHCA, f) DITH.

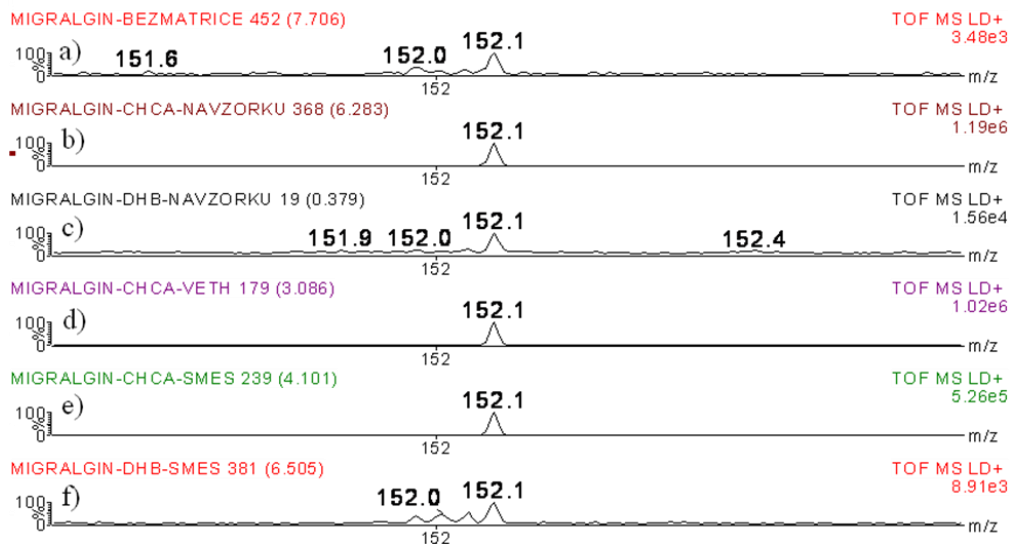


Prášek Panadolu Extra – přiblížení na pík m/z 195 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) CHCA, d) DITH; směs vzorku a matrice: e) CHCA, f) DITH.

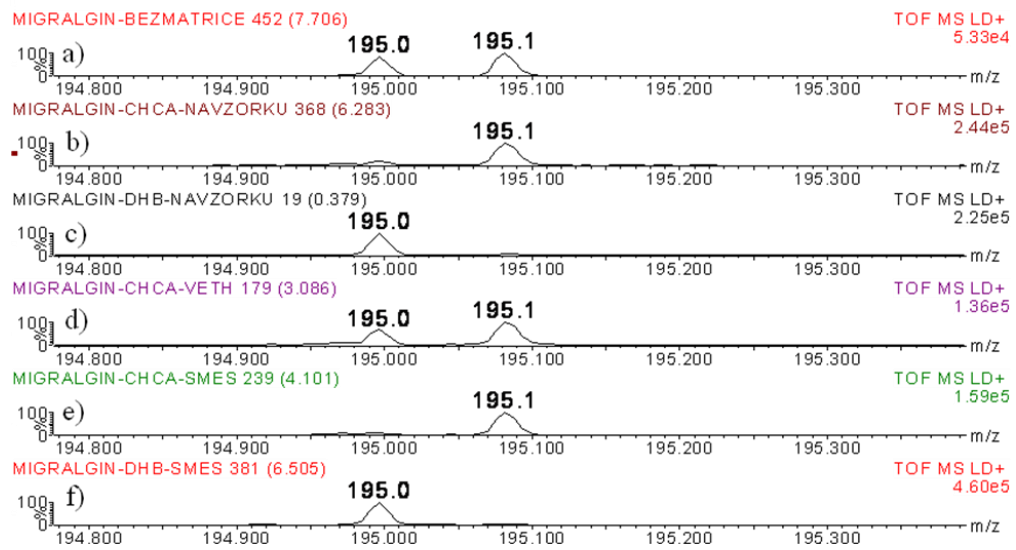




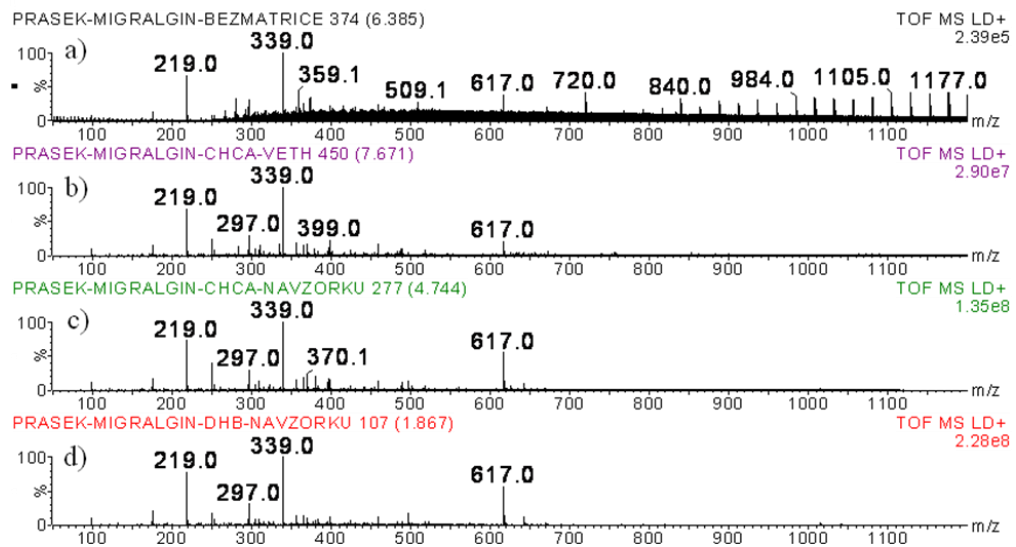
Spektrum roztoku Migralginu v pozitivním modu a) bez matrice; překryv vzorku maticí: b) CHCA, c) DHB, d) CHCA v ethanolu; směs vzorku a matrice: e) CHCA, f) DHB.



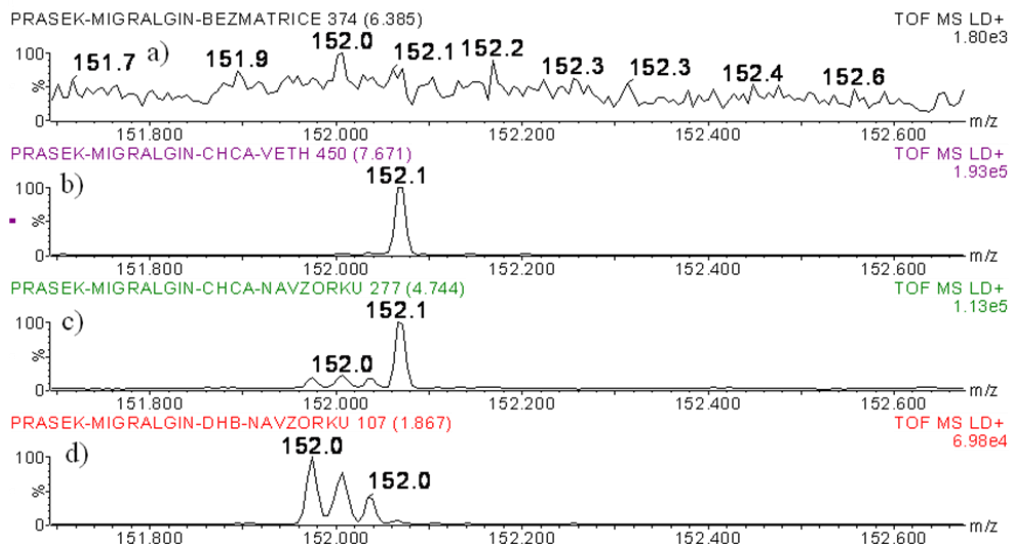
Roztok Migralginu – přiblížení na pík m/z 152 a) bez matrice; překryv vzorku maticí: b) CHCA, c) DHB, d) CHCA v ethanolu; směs vzorku a matrice: e) CHCA, f) DHB.



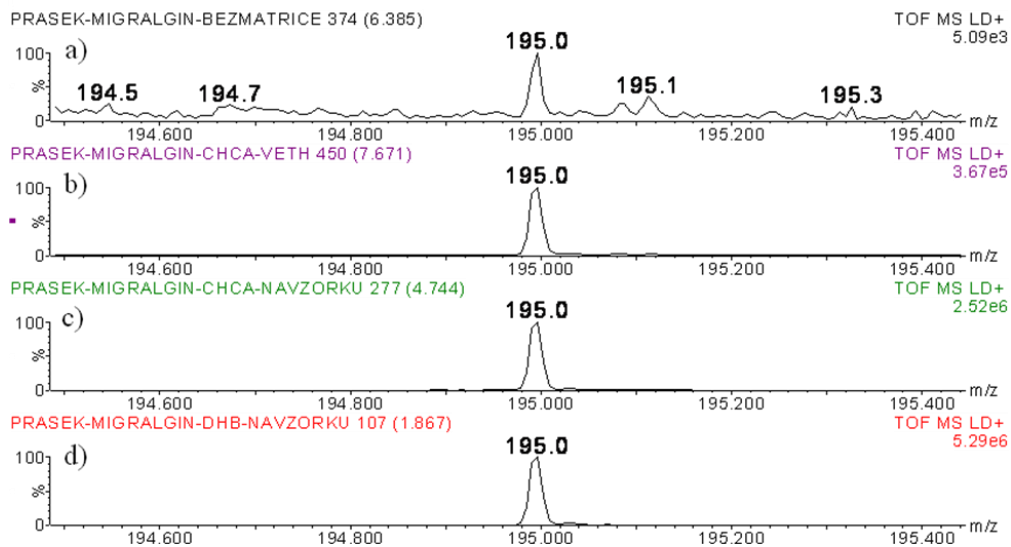
Roztok Migralginu – přiblížení na pík m/z 195 a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA, c) DHB, d) CHCA v ethanolu; směs vzorku a matrice: e) CHCA, f) DHB.



Spektrum práškového vzorku Migralginu v pozitivním modu a) bez matrice; překryv vzorku matricí: b) CHCA v ethanolu, c) CHCA, d) DHB.



Prášek Migralginu – přiblížení na pík m/z 152 a) bez matrice; překryv vzorku maticí:  
 b) CHCA v ethanolu, c) CHCA, d) DHB.



Prášek Migralginu – přiblížení na pík m/z 195 a) bez matrice; překryv vzorku maticí:  
 b) CHCA v ethanolu, c) CHCA, d) DHB.