

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2024

Bc. Jan Gebrt

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Vývoj LC/MS metody pro stanovení potenciálních léčiv narkolepsie

Bc. Jan Gebrt

Diplomová práce

2024

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jan Gebrt**  
Osobní číslo: **C22286**  
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**  
Téma práce: **Vývoj LC/MS metody pro stanovení potenciálních léčiv narkolepsie**  
Téma práce anglicky: **Development of LC/MS method for determination of potential drugs for narcolepsy treatment**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

- V teoretické části podejte přiměřený úvod do problematiky narkolepsie, včetně komerčně dostupných léčiv. Popište módy kapalinové chromatografie používané pro separace uvedených léčiv. Zpracujte rešeršní formou publikované práce s tematikou separace léčiv určených pro léčení narkolepsie, včetně potenciálních preparátů N-sulfonamidového typu.
- Proměřte retenční chování vybraných komerčních léčiv a dostupných potenciálních léčiv na vybraných kolonách. Optimalizujte podmínky gradientu a účinnost separace. Experimentálně ověřte možnosti kvantitativní analýzy, včetně stanovení parametrů kvantitativních metod.
- Získané výsledky zhodnoťte a kriticky diskutujte.

---

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Michal Kašpar**  
Katedra analytické chemie  
Datum zadání diplomové práce: **7. února 2024**  
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2024

## **Prohlašuji:**

Práci s názvem Vývoj LC/MS metody pro stanovení potenciálních léčiv narkolepsie jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9. 5. 2024

Bc. Jan Gebrt v.r.

**Poděkování:**

Děkuji panu doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D., za odborné vedení práce, konzultace a za zprostředkování praktických i teoretických zdrojů do diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat panu Ing. Michalu Kašparovi za jeho pomoc při experimentální části a za cenné rady a doporučení, které mi byly při psaní závěrečné práce velkým přínosem. Nezhodnotitelné poděkování patří také mé rodině a přátelům za podporu při studiu po celý můj čas na univerzitě.

## **ANOTACE**

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat metodu analýzy potenciálních léčiv narkolepsie pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Teoretická část práce je soustředěna na informace o symptomech a metodách léčby narkolepsie. Dále jsou popsány principy, instrumentace a módy měření v kapalinové chromatografii a hmotnostní spektrometrii. Poslední část rešerše je věnována postupům interpretace, optimalizace a validace chromatografických metod. V experimentální části lze nalézt procesy přípravy a analýzy vzorků, použitou instrumentaci a chemikálie. Poslední část této práce shrnuje a hodnotí dosažené výsledky.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Narkolepsie, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, pitolisant, fluoxetin

## **TITLE**

Development of an LC/MS method for the determination of potential drugs for narcolepsy.

## **ANNOTATION**

The aim of this thesis was to develop, optimize and validate a method for the analysis of potential drugs for narcolepsy using liquid chromatography in conjunction with mass spectrometry. The theoretical part of the work is focused on information about the symptoms and methods of treatment of narcolepsy. The principles, instrumentation and modes of measurement in liquid chromatography and mass spectrometry are also described. The last part of the research is devoted to the procedures of interpretation, optimization and validation of chromatographic methods. In the experimental part, you can find sample preparation and analysis procedures, used instrumentation and chemicals. The last part of this work summarizes and evaluates the achieved results.

## **KEYWORDS**

Narcolepsy, liquid chromatography, mass spectrometry, pitolisant, fluoxetine

# OBSAH

ÚVOD .....	18
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	19
1.1 Narkolepsie .....	19
1.1.1 Informace o narkolepsii .....	20
1.1.2 Metody léčby .....	21
1.1.2.1 Modafinil .....	21
1.1.2.2 Amfetaminové stimulanty.....	22
1.1.2.3 Oxybutyrát sodný.....	23
1.1.2.4 Sulfonamidy .....	24
1.1.2.5 Pitolisant .....	26
1.1.2.6 Fluoxetin .....	27
1.1.3 Analogické metody stanovení studovaných látek.....	28
1.2 Kapalinová chromatografie.....	32
1.2.1 Teorie separace .....	32
1.2.2 Módy kapalinové chromatografie .....	34
1.2.2.1 Systém s normálními fázemi.....	34
1.2.2.2 Systém s reverzními fázemi .....	35
1.2.2.3 Systémy založené na jiném principu .....	36
1.2.3 Instrumentace.....	36
1.2.4 Hmotnostní spektrometrie.....	38
1.2.4.1 Iontové zdroje .....	38
1.2.4.2 Hmotnostní analyzátory .....	40
1.2.4.3 Detektory .....	43
1.2.4.4 Dodatečná technika .....	43
1.2.5 Vývoj HPLC metod .....	44
1.2.5.1 Vyhodnocení výsledků .....	45



1.2.5.2	Optimalizace separace .....	46
1.2.5.3	Validace analytické metody .....	48
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	51
2.1	Použitá instrumentace a vybavení.....	51
2.1.1	Instrumentace využitá na přípravu roztoků .....	51
2.1.2	LC/MS systém .....	51
2.1.3	Kolony .....	51
2.2	Použité chemikálie a standardní látky .....	52
2.2.1	Mobilní fáze a aditiva .....	52
2.2.2	Standardy .....	52
2.3	Příprava standardních roztoků a kalibrační řady .....	53
2.4	Příprava vzorků z metabolizovaných extraktů.....	53
2.5	HPLC/MS analýza látek .....	53
3	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	55
3.1	Volba kolony na základě výsledků izokratické eluce .....	55
3.1.1	Kinetex C18 .....	58
3.1.2	Evosphere DPH.....	59
3.1.3	Hydrosphere C18 .....	59
3.1.4	Arion Plus C18.....	60
3.2	Výběr vhodného aditiva do mobilní fáze.....	61
3.3	Optimalizace programu gradientové eluce .....	65
3.4	Optimalizace fragmentační energie .....	65
3.5	Optimalizace teploty separace .....	67
3.6	Optimalizace průtoku mobilní fáze.....	67
3.7	Měření kalibrační křivky a validace vyvinuté metody .....	70
3.8	Měření metabolizovaných roztoků optimalizovanou metodou .....	73
4	ZÁVĚR .....	77

5	POUŽITÁ LITERATURA .....	79
	Přílohy.....	90

## SEZNAM ILUSTRACÍ

<b>Obrázek 1:</b> Schéma mechanismu a role orexinů v kataplexickém útoky.....	22
<b>Obrázek 2:</b> Aktivita konstitutivně aktivních receptorů a efekt vázaných ligandů .....	27
<b>Obrázek 3:</b> Schéma kapalinového chromatografu ve spojení s hmotnostní spektrometrií .....	37
<b>Obrázek 4:</b> Schéma elektrosprejové ionizace.....	39
<b>Obrázek 5:</b> Schéma pohybu nabitě částice v magnetickém poli .....	41
<b>Obrázek 6:</b> Schéma konstrukce a funkce trojitého kvadrupólu s kolizní celou .....	42
<b>Obrázek 7:</b> Grafické znázornění pozice softwarem odečtených hodnot potřebných k výpočtu píkové symetrie a jejich definice .....	56
<b>Obrázek 8:</b> Retenční modely pitolisantu měřené izokratickou elucí na dostupných kolonách .....	57
<b>Obrázek 9:</b> Retenční modely fluoxetinu měřené izokratickou elucí na dostupných kolonách .....	58
<b>Obrázek 10:</b> Chromatogram analýz s různými aditivami vodné mobilní fáze pitolisantu.....	62
<b>Obrázek 11:</b> Vliv typu a koncentrace [% (v/v)] kyselých aditiv na výšku píků pitolisantu se zobrazenou směrodatnou odchylkou měření (n=3) .....	62
<b>Obrázek 12:</b> Chromatogram analýz s různými aditivami vodné mobilní fáze fluoxetinu .....	63
<b>Obrázek 13:</b> Vliv typu a koncentrace [% (v/v)] kyselých aditiv na výšku píků fluoxetinu se zobrazenou směrodatnou odchylkou měření (n=3) .....	64
<b>Obrázek 14:</b> Grafické znázornění optimalizace fragmentační energie pitolisantu se zvýrazněným zvoleným optimem.....	66
<b>Obrázek 15:</b> Grafické znázornění optimalizace fragmentační energie fluoxetinu se zvýrazněným zvoleným optimem.....	66
<b>Obrázek 16:</b> Vliv teploty na retenci obou léčiv se zvýrazněným zvoleným bodem optima...	67
<b>Obrázek 17:</b> H-u křivka pro pitolisant se zvýrazněným zvoleným bodem optima.....	69
<b>Obrázek 18:</b> H-u křivka pro fluoxetin se zvýrazněným zvoleným bodem optima .....	69
<b>Obrázek 19:</b> Chromatogram separace kalibračního roztoku o koncentraci 0,1 mg/l .....	70
<b>Obrázek 20:</b> Sestrojené kalibrační křivky pro všechny léčiva se zobrazenou rovnicí a linearitou trendu (n=3) .....	71
<b>Obrázek 21:</b> Chromatogram metabolizovaného roztoku pitolisantu měřeného vyvinutou metodou .....	75
<b>Obrázek 22:</b> Chromatogram metabolizovaného roztoku fluoxetinu měřeného vyvinutou metodou .....	75

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Retenční a kinetické charakteristiky léčiv narkolepsie na vybraných kolonách...	57
<b>Tabulka 2:</b> Retenční časy, faktory a jejich logaritmované hodnoty léčiv narkolepsie pro kolonu Kinetex C18 .....	59
<b>Tabulka 3:</b> Retenční časy, faktory a jejich logaritmované hodnoty léčiv narkolepsie pro kolonu Evosphere DPH .....	59
<b>Tabulka 4:</b> Retenční časy, faktory a jejich logaritmované hodnoty léčiv narkolepsie pro kolonu Hydrosphere C18 .....	60
<b>Tabulka 5:</b> Retenční časy, faktory a jejich logaritmované hodnoty léčiv narkolepsie pro kolonu Arionplus C18.....	61
<b>Tabulka 6:</b> Použitá aditiva do vodné mobilní fáze a úrovně jejich koncentrací během analýz .....	61
<b>Tabulka 7:</b> Program gradientů a výsledné retenční charakteristiky léčiv narkolepsie (TA = čas analýzy; b <sub>G</sub> = strmost gradientu) .....	65
<b>Tabulka 8:</b> Vypočítané validační parametry metody pro všechna léčiva .....	71
<b>Tabulka 9:</b> Výsledky měření metabolizovaných roztoků s uvedenou správností (n=3) .....	74
<b>Tabulka 10:</b> Naměření retenční charakteristiky a vypočtené hodnoty reproduktibility pitolisantu pro kalibrační roztok o koncentraci 0,1 mg/l.....	90
<b>Tabulka 11:</b> Naměření retenční charakteristiky a vypočtené hodnoty reproduktibility fluoxetinu pro kalibrační roztok o koncentraci 0,1 mg/l .....	90

## SEZNAM ROVNIC

<b>Rovnice 1:</b> Výpočet retenčního faktoru .....	55
<b>Rovnice 2:</b> Výpočet účinnosti kolony .....	55
<b>Rovnice 3:</b> Výpočet rovnicového komponentu m <sub>1</sub> výpočtu píkovej symetrie.....	56
<b>Rovnice 4:</b> Výpočet rovnicového komponentu m <sub>2</sub> výpočtu píkovej symetrie.....	56
<b>Rovnice 5:</b> Výpočet rovnicového komponentu m <sub>3</sub> výpočtu píkovej symetrie.....	56
<b>Rovnice 6:</b> Výpočet rovnicového komponentu m <sub>4</sub> výpočtu píkovej symetrie.....	56
<b>Rovnice 7:</b> Výpočet symetrie píku z předem vypočítaných komponentů.....	56
<b>Rovnice 8:</b> Výpočet lineární rychlosti toku mobilní fáze pro odpovídající hodnoty průtoku .68	
<b>Rovnice 9:</b> Přepočet účinnosti kolony spočítané z šířky píku odečteného v polovině jeho výšky na odpovídající výšku teoretického patra.....	68

<b>Rovnice 10:</b> Výpočet správnosti měření .....	72
<b>Rovnice 11:</b> Výpočet opakovatelnosti měření pro daný den .....	72
<b>Rovnice 12:</b> Výpočet limitu detekce .....	73
<b>Rovnice 13:</b> Výpočet limitu kvantifikace .....	73

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

2D-LC – Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie

3D – Třídimeznionální prostor

5HTR1A – 5-hydroxytryptaminový receptor typu 1A

$\alpha$ 1-receptor – Alfa adrenergní receptor typu 1

AC – Afinitní chromatografie

ACN – Acetonitril

ADHD – Porucha pozornosti s hyperaktivitou

API – Ionizace za atmosférického tlaku

APCI – Chemická ionizace za atmosférického tlaku

APPI – Fotoionizace za atmosférického tlaku

AWS – Syndrom odnětí alkoholu

BEH – Technologie hybridních částic s ethylenovými můstky

CHMP – Výbor pro humánní léčivé přípravky

C18 – Oktadecylsilikagel

CNS – Centrální nervová soustava

CV – Koeficient variace

CYP2C9 – Cytochrom P450 rodiny 2, podrodiny C číslo 9

DA – Diodové pole

DAT – Transportní protein pro zpětné vychytávání dopaminu

DBS – Metoda suché krevní kapky

EC – Extracelulární extrakt

EI – Elektronová ionizace

EIC – Chromatogram s extrahovaným signálem vybraného iontu (extrahovaný iontový chromatogram)

EMA – Evropská léková agentura

ESI – Elektrosprejová ionizace

EU – Evropská unie

FDA – Federální drogová administrace

G-protein – Guaninový nukleotid-vázající protein

GABA –  $\gamma$ -aminomáselná kyselina

GABA-B – Receptor B pro kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou

GC – Plynová chromatografie

GHB –  $\gamma$ -hydroxymáselná kyselina

GPC – Gelová permeační chromatografie

H1-receptor – Histaminergní receptor typu 1

H3-receptor – Histaminergní receptor typu 3

HILIC – Chromatografie hydrofilních interakcí

HTLC – Vysokoteplotní kapalinová chromatografie

HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie

IC – Iontová chromatografie / Intracelulární extrakt

IEC – Chromatografie iontové výměny

IPC – Chromatografie iontových párů

KBBV – Katedra biologických a biochemických věd

LC – Kapalinová chromatografie

LOD – Limit detekce

LOQ – Limit kvantifikace

MAO – Enzym monoaminoxidáza

MDD – Majoritní depresivní porucha

MS – Hmotnostní spektrometrie

MS/MS – Tandemová hmotnostní spektrometrie

NIST – Národní institut pro standardy a technologie

NPC – Kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi

OCD – Obsesivně kompulzivní porucha

OX1R – Orexinový receptor 1

OX2R – Orexinový receptor 2

PET – Pozitronová emisní tomografie

PMME – Mikroextrakce pomocí polymerní monolitů

PTSD – Post-traumatická stresová porucha

Q – Kvadrupólový analyzátor

QqQ – Trojitý kvadrupólový analyzátor

REM – Fáze spánku s rychlým pohybem očí

RP – Rozlišovací schopnost

RPC – Kapalinová chromatografie v systému s reverzními fázemi

SEC – Velikostně vylučovací chromatografie

SIM – Monitoring zvoleného iontu

SRM – Standardní referenční materiál

SSRI – Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu

SPE – Extrakce na tuhém sorbentu

TIC – Celkový iontový proud

TLC – Tenkovrstvá chromatografie

TOF – Analyzátor délky letu

UHPLC – Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie



USA – Spojené státy americké

UV – Ultrafialová oblast elektromagnetického spektra

VIS – Viditelná oblasti elektromagnetického spektra

VMAT – Transportní protein vezikulárního monoaminu

## ÚVOD

Narkolepsie je vysilující porucha centrální nervové soustavy, která způsobuje postiženým velká trápení svými příznaky, neústupností a omezeními, které klade na jejich pracovní, společenské i soukromé životy. Může také být i hrozbou pro jejich vlastní život, jelikož narkolepsie způsobuje neočekávatelné usnutí při aktivních nebo rutinních činnostech, jako je chůze, jídlo, cvičení či dokonce řízení vozidla. Z tohoto důvodu musí pacienti trpící narkolepsií denně užívat předepsané léky, jelikož k dnešnímu dni stále ještě neexistuje trvalé řešení. Dnes je k dispozici mnoho léčiv, z nichž mnohé se prokázaly jako účinný a spolehlivý způsob, jak zmírnit příznaky narkolepsie. Vzhledem k potenciálním rizikům, kterým mohou pacienti čelit, pokud jejich léky nebudou zaručené kvality, si výrobci musí být jisti, že léky, které vyrábějí, jsou správně připraveny a ve správném dávkování. Moderním a spolehlivým nástrojem pro tento úkol je od nástupu 21. století kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Vysokouúčinná kapalinová chromatografie nám umožňuje separovat i složité směsi na čisté složky, zatímco hmotnostní spektrometrie nám poskytuje všechny kvalitativní a kvantitativní informace, které potřebujeme ke stanovení čistoty léčiva, dávky nebo dokonce residuálního obsahu v klinických studiích.

Cílem diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat metodu analýzy léčiv pro narkolepsii pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Z tohoto důvodu byla nejprve vypracována literární rešerše obsahující informace o symptomech a metodách léčby narkolepsie, a také historii a využití N-sulfonamidové struktury v klinických aplikacích. Dále byly v teoretické části popsány principy, instrumentace a módy měření v kapalinové chromatografii a hmotnostní spektrometrii, kde jsou studie, zabývající se analýzou vybraných léčiv použitých v experimentální části těmito technikami, také uvedeny. Poslední část rešerše je věnována postupům interpretace, optimalizace a validace chromatografických metod. Cílem experimentální části bylo optimalizovat podmínky gradientové eluce, srovnat účinnost vybraných kolon určených pro separaci v systému s obrácenými fázemi a validovat výslednou metodu, která byla následně využita pro určení residuálního obsahu analyzovaných léčiv v metabolizovaných roztocích.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Narkolepsie

Narkolepsie je chronická neurologická porucha, která ovlivňuje schopnost mozku řídit cyklus spánku a bdění. Lidé žijící s narkolepsií se mohou po probuzení cítit odpočatí, nicméně po zbytek dne trpí silnou, často neovlivnitelnou, denní ospalostí. Mnoho jedinců s narkolepsií také zažívá nepravidelný a přerušovaný spánek. Narkolepsie je tedy běžně zařazována mezi poruchy spánku [1] [2].

Mezi další poruchy spánku patří např.:

- "*Idiopatická hypersomnie*" je stav, který je charakterizován extrémní ospalostí, k němuž dochází bez identifikovatelného důvodu, nicméně postižení jedinci v tomto případě nezažívají náhlé spánkové epizody a navíc se necítí svěží po probuzení.
- "*Spánková apnoe*" je běžná porucha spánku charakterizovaná dočasnými, opakujícími se disrupcemi dýchání během spánku. Mezi příznaky poruchy patří časté přerušování spánku během noci, nadměrná ospalost během dne, ronchopatie, podrážděnost a špatné soustředění na denní aktivity v důsledku nedostatku hlubokého spánku.
- „*Kleine-Levinův syndrom*“ je vzácná porucha charakterizovaná potřebou nadměrného množství spánku (až 20 hodin denně), nadměrným příjmem potravy a změnami chování. V bdělém stavu mohou postižení jedinci vykazovat podrážděnost, nedostatek energie či nedostatek emocí. Mohou také vypadat zmateně, dezorientovaně a zažívat halucinace [2] [3] [4].

Narkolepsie může významně ovlivnit každodenní aktivity. Lidé mohou neochotně usnout, i když jsou uprostřed činnosti, jako je konzumace jídla, konverzace nebo dokonce řízení auta. Mezi jiné relevantní příznaky patří např. náhlá svalová slabost a další poruchy motoriky, kde nejzávažnější z nich je úplná neschopnost se pohybovat (tzn. „*kataplexie*“). Rovněž byly hlášeny případy živých obrazů nebo halucinace podobné snům. V neposlední řadě mohou pacienti zažít celkovou paralýzu těla těsně před usnutím nebo těsně po probuzení. Z důvodu možného nebezpečí pro pacienta a jeho okolí je, ve většině případů, pro provoz veřejnost ohrožujících aktivit (např.: řízení auta) vyžadováno potvrzení o zdravotní způsobilosti, běžně podmiňováno preventivní lékařskou prohlídkou a následnou léčbou předepsanými terapeutiky či odlišnou kompenzací [1] [2] [5].

Narkolepsie je celoživotní problém, i když se s přibývajícím věkem většinou nezhoršuje, příznaky se mohou dokonce časem i částečně zlepšit, ale nikdy úplně nevymizí. Pokud

narkolepsie není diagnostikována nebo léčena, může narušovat psychologické, sociální i kognitivní fungování a vývoj a může narušovat akademické, pracovní a společenské aktivity [1] [2].

### **1.1.1 Informace o narkolepsii**

Narkolepsie obvykle začíná mezi 10. a 20. rokem života buďto náhlým nebo postupným nástupem přetrvávající denní ospalosti. Poměrně často je diagnóza stanovena až poté, co se objevily vážné problémy, jako je horší prospěch ve škole, špatný výkon v práci nebo nehoda motorového vozidla. Od ostatních spánkových poruch ji lze snadno odlišit stálostí pocitu ospalosti. Po celonočním spánku se sice diagnostikovaná osoba může cítit osvěžená, ale ospalost se vrátí už za 1 až 2 hodiny [3].

Narkolepsie je také charakterizována narušenou regulací spánku s rychlým pohybem očí (REM). REM spánek se normálně vyskytuje pouze během obvyklého spánkového období a zahrnuje živé, příběhové sny, rychlé pohyby očí a paralýzu téměř všech kosterních svalů, kromě svalů dýchacích. U osob s diagnózou narkolepsie může REM spánek nastat v kteroukoli denní dobu a klasické prvky REM spánku často pronikají do bdělosti a vytvářejí zvláštní přechodné stavy [2] [3].

Nejdramatičtější z těchto stavů je kataplexie – náhlé epizody částečné nebo úplné paralýzy svalů. Tyto epizody jsou často spouštěny silnými emocemi, nejčastěji pozitivními, jako jsou ty spojené se smíchem nebo nečekaným setkáním s přítelem. U některých lidí však může být kataplexie spuštěna intenzivními negativními emocemi, jako je frustrace nebo hněv. K paralýzám obvykle dochází během několika sekund. Nejprve je postihnut obličej a krk a poté způsobí slabost trupu a končetin. U částečné kataplexie je běžná nezřetelná řeč a povislá tvář, s kompletními epizodami může osoba klesnout na zem, plně při vědomí, ale ve stavu nehybnosti po dobu 1 nebo 2 minut [2] [3].

Stejně jako u mnoha vzácných onemocnění se prevalence narkolepsie liší v závislosti na metodách studie a studované populaci. Ze studií provedených ve Spojených státech amerických (USA) a západní Evropě, kde byla specificky hledána četnost narkolepsie se symptomy kataplexie, se výsledná hodnota pohybuje mezi 19 a 56 případy na 100 000 lidí. Prevalence zjištěná studií v Norsku přinesla srovnatelnou hodnotu 22 případů na 100 000 lidí. Výsledky z východní Asie se nepohybují daleko, dosahují hodnot 15 až 34 případů na 100 000 lidí, ale byly zjištěny i vyšší hodnoty, např. ze studie v Japonsku, kde výsledná hodnota byla 590 případů na 100 000 lidí. Prevalence narkolepsie v okolí východního

Středomoří a Perského zálivu je srovnatelně nižší, dosahující hodnot od 4 případů na 100 000 ze studie v Saudské Arábii až po 1 případ na každých 500 000 lidí ze studie v Izraeli. Je třeba zmínit, že počet nahlášených případů stoupá s eliminací více závažnějších příznaků narkolepsie z hledaných parametrů studie. Tyto příznaky jsou kvůli jejich komplexnímu vlivu na afektované osoby hůře spojitelné s narkolepsií a proto je bezpečnější je vynechat, než by mohlo dojít ke zkreslení studie. Obecné příznaky narkolepsie jsou mnohem častější než diagnóza narkolepsie s kataplexií [6] [7] [8] [9] [10] [11].

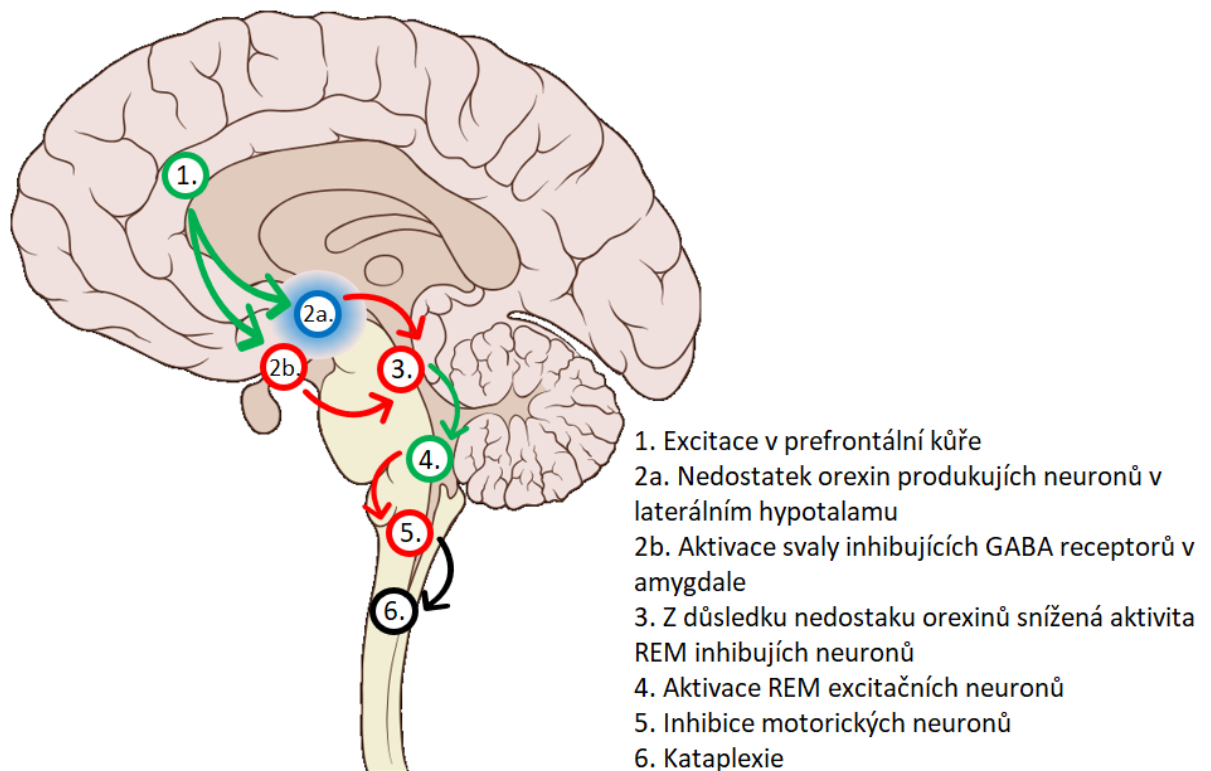
### **1.1.2 Metody léčby**

Většina lidí s narkolepsií vyžaduje léčbu léky podporující bdělost. Narkolepsie se nejčastěji léčí kombinací behaviorálních a farmakologických přístupů. Existuje mnoho způsobů, jak mohou být léky dodávány do lidského těla. Jak z bezpečnostních důvodů, tak z limitací způsobovaných chemickou strukturou látek a jejich vlastnostmi a i pro pohodlí pacienta se většina léků předepisovaných na narkolepsii aplikuje orálně. Protože narkolepsie může pro potřeby léčby vyžadovat použití neurologických stimulantů, z nichž některé mají zvýšené riziko vzniku závislosti, má orální podání, zejména formulace s pomalým uvolňováním, nejnižší potenciál pro zneužití a jsou tak pro pacienta bezpečnější. Denní ospalost způsobenou narkolepsií lze minimalizovat nebo částečně snížit dostatečným kvalitním nočním spánkem a odpoledním krátkým odpočinkem [12].

#### **1.1.2.1 Modafinil**

Modafinil je neamfetaminový stimulant centrálního nervového systému (CNS) s vlastnostmi podporujícími bdělost. Pro mírnou až střední denní ospalost je Modafinil často dobrou volbou, protože má přijatelný profil vedlejších účinků a nízký potenciál ke zneužití. Modafinil je známý jako slabý inhibitor zpětného vychytávání dopaminu, ale předpokládá se, že Modafinil má i jiné efekty zvyšující signalizaci v hypothalamických orexinových a histaminových neurotransmiterových dráhách. Jsou zde konkrétně míněny orexinový receptor 1 (OX1R) a orexinový receptor 2 (OX2R). Tyto receptory jsou antagonistovány orexinovými neuropeptidy. Neuropeptid Orexin A se skládá z 33 aminokyselin se dvěma disulfidovými můstky, zatímco Orexin B je lineární neuropeptid s 28 zbytky. Tyto orexiny regulují různé fyziologické funkce, jako je příjem potravy, hédonistické chování a cykly spánku a bdění. Nedávné objevy v neurologii ukázaly, že patofyziologie lidské narkolepsie je silně spojena se ztrátou laterálních hypothalamických neuronů produkujících stimulanty orexinových receptorů, viz. Obrázek 1, jako jsou orexin A a orexin B. Ztráta orexinergních neuronů je tedy spojena s těžkou ospalostí a neschopností udržet bdělost. Modafinil je tedy

nepřímo spojen s produkcí orexinů působením v CNS jako inhibitor zpětného vychytávání dopaminu [3] [12] [13] [14] [15].



**Obrázek 1:** Schéma mechanismu a role orexinů v kataplexickém útoky [16]

Co se týče závažných nežádoucích účinků, byly hlášeny případy Stevens-Johnsonova syndromu, toxické epidermální nekrolýzy a další lékové vyrážky. Tyto život-ohrožující kožní reakce spojené s užíváním Modafinilu, ačkoli jsou extrémně vzácné, se zdají být častější v případech, kdy byl Modafinil aplikován mimo rozsah své léčebné kapacity, tzn. „off-label“ aplikace, jako jsou případy poruchy pozornosti s hyperaktivitou (ADHD), spánkových poruch způsobenými extrémní pracovní směnou, spánkové apnoe atd. Výbor pro humánní léčivé přípravky (CHMP) Evropské lékové agentury (EMA) ve svém přehodnocení z roku 2010 doporučuje omezení užívání Modafinilu v případech, kdy není specificky léčena narkolepsie [13] [14] [17].

### 1.1.2.2 Amfetaminové stimulanty

Skupina látek běžně nazývána „amfetaminy“ jsou deriváty  $\alpha$ -methylfenethylaminu. Jsou lipofilnější než přirozené monoaminové sloučeniny jako dopamin, norepinefrin a epinefrin, takže se snadno dostávají do CNS a jsou, ve své základní formě, dostupnější pro reabsorpci. Tyto sloučeniny napodobují mnoho monoaminergních účinků v mozku, výjimečně dobře podporují probuzení a ve vysokých dávkách také snižují kataplexii u narkoleptických

pacientů. Amfetaminy mají komplexní farmakologické účinky, které jsou závislé na dávce a nejsou plně charakterizovány. Vzhledem k jejich vyšší vazebné afinitě v monoaminergních transportérech jsou přednostně absorbovány synapsí skrze lokace zpětného vychytávání dopaminu (DAT). Odtud amfetaminy narušují ukládání přirozených monoaminů do vezikul inhibiční transportního proteinu vezikulárního monoaminu (VMAT). V důsledku toho se do synapse uvolňuje více monoaminů. Kromě toho je amfetamin schopen v dosud nepochopeném procesu zvrátit funkci DAT, což způsobuje uvolnění neuložených monoaminů do presynaptického prostoru. Zde vzniká pozitivní zpětná vazba. Jelikož jsou amfetaminy snadněji transportovány přes DAT, jsou také snadněji znovu absorbovány, čímž celý cyklus začíná znovu. Jako poslední stimulační efekt jsou amfetaminy ve vyšších dávkách schopny inhibovat enzym monoaminoxidázu (MAO), čímž znemožní mechanismus degradace dopaminu [13].

Léky se strukturou na bázi amfetaminu jsou komerčně dostupné a jsou často předepisovány k léčbě narkolepsie, kataplexie a symptomů ADHD. Jako příklady lze uvést dextroamfetamin, komerčně známý jako Dexedrin, methylfenidát, také známý jako Ritalin a další. Některé běžné vedlejší účinky amfetaminů jsou důsledkem periferního uvolňování norepinefrinu, což má za následek zvýšenou srdeční frekvenci a krevní tlak, časté jsou také znatelné srdeční palpitace a pocení. Nálada může být dočasně zlepšena i zhoršena, převážně u predisponovaných pacientů, ale účinek není obecně udržitelný sám o sobě u pacientů s depresí. Při vysokých dávkách mohou amfetaminy urychlit i nástup psychózy. Stejně jako u všech psychotropních léků se však mohou objevit závažnější a nevratné psychiatrické komplikace. Nejčastějším závažným vedlejším účinkem spojeným s užíváním amfetaminů je jejich potenciál pro zneužití a vznik závislosti. Off-label aplikace a zneužívání těchto léků může být zdrojem obav, ale riziko lze snížit úpravou léčiv na pomalé uvolňování a také řádnou edukací a monitoringem [3] [13].

### **1.1.2.3 Oxybutyrát sodný**

Stimulanty se užívají během dne k zajištění bdělosti a správné funkce CNS. Negativní příznaky narkolepsie lze však zmírnit i správným nočním spánkem. Vzhledem k tomu, že narkolepsie může narušovat cykly bdění a spánku, mohou být k zajištění nočního spánku předepsány vhodné sedativní látky. Jedním takovým lékem je hydroxybutyrát sodný, komerčně známý jako Xyrem. Při správném užívání, nejčastěji jednou před spaním a další dávkou o 2,5 až 4 hodiny později, může vést k velmi hlubokému spánku bez REM fáze. Po

několika týdnech léčby je nedostatečně popsaným mechanismem dosaženo znatelného snížení denní ospalosti a kataplexie [12].

Oxybutyrát sodný je silným tlumičem aktivity CNS. Jednou z hypotéz mechanismu, jak hydroxybutyrát sodný zlepšuje stav u pacientů trpících narkolepsií, je jeho struktura analogická endogenním neurotransmiterům indukujícím spánek. Jako sůl  $\gamma$ -hydroxymáselné kyseliny (GHB), která má svůj původ jako metabolit neurotransmiteru  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny (GABA), jsou jeho terapeutické účinky připisovány agonizaci receptoru B pro GABA (GABA-B). Několik studií ukázalo, že lék má účinky podobné ethanolu. Experimenty došly k závěru, že ve srovnání se skupinou užívající placebo, se u skupiny alkoholiků projeví až 34% nárůst abstinence. Myšlenka podporuje již zavedené používání oxybutyrátu sodného jako prostředku pro léčení syndromu odnětí alkoholu (AWS) a udržení abstinence [18].

Nejčastějším vedlejším účinkem oxybutyrátu sodného je nevolnost a zvracení. Mezi další hlášené příznaky patří závratě, bolesti hlavy, močová inkontinence a zmatenost, tedy negativní efekty nelišící se tolik od efektů spojených se zneužíváním alkoholu. Závažnější vedlejší účinky jsou vzácné, ale byla zaznamenána závažná akutní psychóza, úzkost a sebevražedné myšlenky. Celkově se riziko nežádoucích účinků zvyšuje při vyšších dávkách, vrcholící při předávkování, zneužívání nebo užívání v kombinaci s jinými léky či drogami a má tendenci ustupovat s přerušáním léčby [18].

#### 1.1.2.4 Sulfonamidy

Sulfonamid je funkční skupina, která je základem pro celou řadu léčiv. Jeho reakční všestrannost je důležitou vlastností pro farmakologickou a organickou chemii, kde se používá při syntéze antimikrobiálních, protinádorových, protizánětlivých, hypoglykemických, antipsychotických a protirakovinných léků, stejně jako několika bioaktivních sloučenin, které mají mimo jiné proteázy inhibiční vlastnosti [19].

Historie sulfonamidů začíná revolučním lékem, komerčně známým jako Salvarsan, s chemickým názvem arsfenamin. Salvarsan byla organokovová sloučenina, obsahující dvojnou vazbu mezi dvěma atomy arsenu. Bylo zjištěno, že Salvarsan je účinné antibiotikum proti trypanosomiáze (spavé nemoci) a syfilisu. Bylo to nedokonalé řešení vážného problému, převážně kvůli jeho vedlejším účinkům, jako jsou vyrážky a poškození jater. Pozdější studie ukázaly, že Salvarsan je ve skutečnosti polymer a obsahuje jednovazebné atomy arsenu umístěné v aromatickém cyklu. Benzenový kruh byl zde hlavním strukturálním prvkem, protože se v polymeru může vyskytovat v několika různých formách. Jednou z těchto forem



byla sulfamyl (-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) skupina. Historicky bylo již známo, že sulfamyllová skupina umožňuje vazbu barviv na textilie obsahující přírodní proteiny (např.: ovčí vlna). Proto byla zkoumána antibakteriální aktivita některých barviv, včetně prontosilové červeně. Pozitivní výsledky prontosilové červeně v testech na lidech vedly k objevu, že účinnou látkou v antibiotických vlastnostech je biotransformační produkt sulfanilamid. Následně syntetizovaná antibiotika využívající tuto funkční skupinu měla nejprve problém s rozpustností metabolitů. Aminoskupina byla u lidí acetylována a acetátový produkt pak krystalizoval v ledvinách kvůli jeho vysokému pKa. Byla provedena řada strukturálních změn, tak aby se tento problém neopakoval [19] [21].

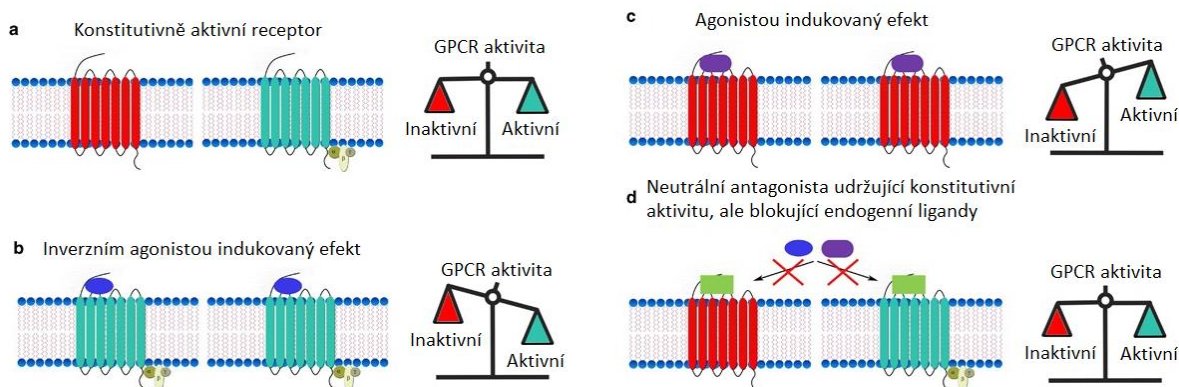
Pokud jde o pravděpodobný mechanismus antibakteriálního účinku sulfonamidu, nejvíce důkazů pochází ze strukturální podobnosti n-sulfanylamidu a kyseliny *p*-aminobenzoové. Díky této strukturní podobnosti sulfonamidy kompetitivně inhibují dihydropteroátsyntetázu, životně důležitý enzym, který usnadňuje konverzi *p*-aminobenzoové kyseliny na kyselinu dihydrolistovou. Dále, kyselina dihydrolistová je prekurzorem kyseliny tetrahydrolistové, která je koenzymem pro řadu základních biosyntetických kroků včetně syntézy thymidinu, jedné z hlavních složek nukleových kyselin. Tím pádem je kyselina *p*-aminobenzoová bakteriálním růstovým faktorem. U lidí je kyselina listová základním dietárním faktorem, bez níž vznikají komplikace, včetně únavy, slabosti, vředů v ústech a neurologických problémů, protože naše tělo potřebuje kyselinu listovou pro správnou funkci krevních buněk. Jakožto vitamín nemůže být biosyntetizována a je třeba ji získávat z potravy. V důsledku toho nemají sulfonamidy žádný přímý účinek na kyselinu listovou u člověka, ale pouze na produkci kyseliny listové v bakteriích [19] [21] [22].

Sulfonamidy byly prvními účinnými antibiotiky zavedenými do klinické medicíny, používaly se nepřetržitě od 30. let 20. století, neboť mají široké spektrum antimikrobiální aktivity proti gram-pozitivním i gram-negativním organismům, dnes jejich popularita a nasazení neustále klesá z důvodu nárůstu rezistence proti antibiotikům a s příchodem silnějších tříd antibiotik. Stále jsou však široce používány ve specifických oblastech. Jednou z nich jsou infekce močových cest, kde se používají v kombinaci s trimethoprimem a pro léčbu nebo prevenci parazitárních a malarických infekcí, obvykle v kombinaci s trimethoprimem nebo pyrimethaminem. Je dobře známo, že sulfonamidy způsobují idiosynkratické poškození jater. Hepatotoxičita je zde skupinovým účinkem. Prakticky veškeré použití sulfonamidů bylo dodnes spojeno s dokumentovanými případy poškození jater, jinak nevysvětlitelného než působením předepsaných léků. Většina případů poškození jater souvisejících se

sulfonamidem je však mírné až střední závažnosti a je často spojována s alergiemi. Mezi další důležité vedlejší účinky sulfonamidů patří průjem, nevolnost, kožní vyrážka, bolesti hlavy a závratě. Mezi 1 až 2 % pacientů má alergické reakce na sulfonamidy, ale většina z nich je mírná, spontánně odeznívá a není spojena s významným poškozením jater. Vzácné závažné vedlejší účinky zahrnují těžké alergické kožní vyrážky, spolu s již dříve zmíněným Stevens-Johnsonovým syndromem, lékovou horečkou, sérovou nemocí, agranulocytózou, aplastickou anémií, nefritidou, pankreatitidou, zmateností, ataxií a záchvaty. Tyto nežádoucí vedlejší účinky se mohou vyskytovat současně s hepatotoxicitou [23].

#### **1.1.2.5 Pitolisant**

Pitolisant, komerčně známý jako Wakix, je další neamfetaminový stimulant CNS, který v těle působí jako inverzní agonista histaminergního receptoru typu 3 (H3-receptor). Inverzní agonisty je třeba nezaměňovat s antagonisty, což jsou molekuly, které se vážou na receptor, ale neaktivují ho. Inverzní agonisté se sice vážou na stejný receptor jako agonisté, ale vyvolávají svou vazbou opačný účinek. Inverzní agonisté mohou mít tento efekt pouze na lokacích, která jsou konstitutivně aktivní, neboli vykazující konstantní aktivitu, která může být buďto zesílena nebo utlumena, jinak budou působit jako antagonisté, blokující vazbu správných ligandů (viz. Obrázek 2). Jednou z těchto lokací je receptor H3. Je to receptor vázaný na Guaninový nukleotid vázající protein (G-protein), rodinu receptorů známou svou konstitutivní aktivitou, jehož funkcí je regulovat produkci histaminových neurotransmiterů modulací jejich syntézy. Agonizace tohoto receptoru způsobuje inhibici této syntézy, kde tedy inverzní agonisté, jako Pitolisant, budou mít opačný účinek. Když Pitolisant difunduje přes hematoencefalickou bariéru, naváže se na tento receptor a zesílí jeho účinek, což způsobí nárůst v produkci histaminu. Zvýšená koncentrace histaminu je spojena s uvolňováním různých bdění podporujících neurotransmiterů, jako jsou dopamin, noradrenalin a acetylcholin [24] [25].



**Obrázek 2:** Aktivita konstitutivně aktivních receptorů a efekt vázaných ligandů [26]

Dne 31. března roku 2016 vydala EMA platné povolení k použití Pitolisantu při léčbě narkolepsie u dospělých ať už s kataplektickými záchvaty nebo bez nich. Stalo se tak po registraci z roku 2014, přezkoumání výborem CHMP a několika počátečních klinických studiích, které prokázaly, že je účinný při snižování dvou hlavních příznaků narkolepsie, nadměrné denní ospalosti a kataplexie u dospělých, dospívajících a dětí od 6 let. Vzhledem k tomu, že bezpečnostní profil přípravku Wakix byl považován za přijatelný a nebyly zjištěny žádné závažné bezpečnostní problémy, agentura EMA rozhodla, že přínosy přípravku Wakix převyšují jeho rizika a že by mohl být registrován k použití v Evropské unii (EU). Pokud jde o tyto nežádoucí účinky, Pitolisant byl obecně dobře snášen u dospělých pacientů, kde nejčastějšími hlášenými nežádoucími účinky byly bolesti břicha, zvýšená chuť k jídlu, následné přibírání na váze, bolesti hlavy, mírné případy nespavosti mezi dávkami a úzkost. Většina z nich měla malý klinický význam a mezi skupinami užívajícími Pitolisant, Modafinil či placebo nebyly žádné klinicky relevantní rozdíly. V kombinaci s nízkým potenciálem zneužití Pitolisantu a malými až žádnými abstinenciemi účinky, je Pitolisant považován za účinné léčivo proti narkolepsii [27] [28].

### 1.1.2.6 Fluoxetin

Fluoxetin, nejběžněji komerčně dostupný jako Prozac, je selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (SSRI). SSRI byly užitečné při léčbě kataplexie, jelikož jsou teoreticky schopné zabraňovat REM fázi spánku, hlavní příčině kataplektických záchvatů (viz. Obrázek 1). SSRI byly původně syntetizovány k vyřešení problému objevujícího se u tricyklických antidepresiv. Tyto léky také inhibičně působily na zpětné vychytávání serotoninu, ale zároveň blokovaly muskarinové, histaminergní receptory typu 1 (H1-receptor) a alfa-adrenergní receptory typu 1 ( $\alpha$ 1-receptor), což vedlo k závažným vedlejším účinkům, jako je sucho v ústech, sedace a hypotenze. Na základě konsenzu odborníků bylo tehdy

rozhodnuto, že pokud jsou SSRI schopné inhibovat zpětné vychytávání serotoninu, mohly by být schopny zmírnit některé příznaky kataplexie. V důsledku toho, že pacienti trpící narkolepsií jsou často diagnostikováni i kataplexií, bylo rozhodnuto, že SSRI budou předepisovány i těmto pacientům. A jelikož testy na kataplexii nejsou prováděny tak často, jak by měly, začaly být SSRI předepisovány i pacientům trpícím narkolepsií ať už s potvrzenou kataplexií nebo bez ní [13] [29] [30] [31].

Fluoxetin inhibuje zpětné vychytávání serotoninu do presynaptických neuronů blokováním transportního 5-hydroxytryptaminového receptoru typu 1A (5HTR1A) umístěného v presynaptickém zakončení. Vzhledem k tomu, že u pacientů s depresí je přítomen nižší počet těchto míst zpětného vychytávání, lze Fluoxetin účinně použít k léčbě velké depresivní poruchy (MDD). Mezi další použití přípravku Prozac schválené Federální drogovou administrací (FDA) patří obsedantně kompulzivní porucha (OCD), mentální bulimie a panická porucha. Fluoxetin má však několik aplikací, které nejsou schváleny FDA. Patří mezi ně sociální úzkostná porucha, posttraumatická stresová porucha (PTSD) u dospělých, hraniční porucha osobnosti, Raynaudův fenomén, selektivní mutismus a narkolepsie [32] [33].

Současná situace s používáním Fluoxetinu jako léčby narkolepsie od roku 2021 je pouze v druhé linii jako možnost léčby kataplexie. V současné době stále není schválen FDA nebo EMA kvůli jeho profilu rizikových vedlejších účinků. Mezi běžné zprávy o nežádoucích účincích patří symptomy související se spánkem, jako je nespavost, nevolnost, bolest hlavy, ospalost, zívání, svalová slabost a třes. Dále vykazuje příznaky spojené s hubnutím, jako je průjem, sucho v ústech a anorexie. Závažné psychické účinky, často se projevující při změnách dávkování zahrnují úzkost, nervozitu, snížené libido, mánie, sebevražedné myšlenky a chování. Mezi vzácnější tělesné příznaky patří krvácení, modřiny nebo hyperhidróza (nadměrné pocení) [34] [35].

### **1.1.3 Analogické metody stanovení studovaných látek**

Pro analýzu léčiv a jejich metabolitů se běžně používají separační metody v různém uspořádání. V jednodušších analýzách (např. potravinářských vzorků) se nejčastěji používá tenkovrstvá chromatografie (TLC) v kombinaci s fluorimetrickou skenovací denzitometrií pro kvantitativní stanovení. Pro stanovení v komplexních maticích, zejména ve farmakologickém a klinickém materiálu, se využívají výkonnější separační techniky s vyšším rozlišením, jako

například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS)

Nirogi R. a kol. [36] kvantifikovali metabolizovanou úroveň Pitolisantu v homogenizovaných vzorcích mozku a krve laboratorních krys pomocí kapalinové chromatografie (LC) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Pitolisant byl na počátku studie intravenózně a orálně podán dvěma skupinám subjektů ve dvou různých koncentracích. Vzorky krve byly odebírány po administraci od obou setů po dobu jednoho dne. Vzorky mozkové tkáně byly odebrány od subjektů s orálně podaným Pitolisantem a po omytí od residuální krve byly homogenizovány do formy kapalného roztoku. Obě skupiny vzorků byly před analýzou extrahovány acetonitrem pomocí odstředivky. Na analýzu byla použita oktadecylsilikagelová (C18) kolona XBridge (50 × 2,1 mm, 3,5 μm). Objem nástřiku extraktu byl 5 μl. Mobilní fáze se skládala z 10mM mravenčanu amonného s 0,2% obsahem kyseliny mravenčí (mobilní fáze A) a acetonitrilu (ACN) (mobilní fáze B). Analýza byla provedena podle přednastaveného programu formou gradientové eluce při konstantním průtoku mobilní fáze 0,35 ml/min. Eluované složky byly po vstupu do hmotnostního spektrometru ionizovány pomocí turboiontového spreje provozovaném v pozitivním módu. Látky byly následně detekovány trojitým kvadrupólem. Ke kvantifikaci byl použit Aripiprazol, který byl přidán do homogenizovaných vzorků jako vnitřní standard. Doba analýzy byla cca 2,5 minuty.

Rusjan P. a kol. [37] se soustředili na analýzu lokální obsazenosti histaminových H3 receptorů podaným Pitolisantem. Pro identifikaci transportu a akumulace podaného léčiva v lidském těle byla použita technika pozitronové emisní tomografie (PET), která využívá detekce pozitronových emisí  $\beta^+$  zářiči značených molekul, ke stanovení přesné lokace značeného léčiva. Zároveň byla stanovena i úroveň obsahu Pitolisantu v krvi pro monitoring jeho metabolismu. Ke stanovení koncentrace Pitolisantu byl použit LC-MS/MS systém s elektrosprejovou ionizací (ESI) a trojitým kvadrupólem (QqQ). Pro eluci v LC systému byla využita Acquity C18 kolona s technologií hybridních částic s ethylenovými můstky (BEH) (50 × 2,1 mm, 1,7 μm). Krev byla centrifugována a krevní plazma byla nastříknuta do systému přes extrakční patronu s tuhým sorbentem (SPE). Mobilní fáze byla složena ze 10:90 směsi acetonitrilu a vody obsahující 0,1 % kyseliny mravenčí (mobilní fáze A) a acetonitrilu obsahující 0,1 % kyseliny mravenčí (mobilní fáze B). Separace látek probíhala podle přednastaveného programu gradientovou elucí při konstantním průtoku 0,8 ml/min. Látky byly ionizovány na ESI. Teplota kolony při analýze byla nastavena na 50 °C.

Gummadi S. a Rajya Lakshmi N. [38] vyvíjeli jednoduchou metodu jak analyzovat Pitolisant v orálně podávaných léčivech pomocí kapalinové chromatografie s reverzními fázemi (RPC). Kolonou zvolenou pro tuto analýzu byla Inertsil C18 (250 × 4,6 mm, 3,5 μm). Mobilní fáze se skládala z 0,1% roztoku kyseliny mravenčí (mobilní fáze A) a acetonitrilu (mobilní fáze B). Chromatografický proces probíhal metodou izokratické analýzy o konstantním složení mobilní fáze A:B 10:90 a konstantním průtokem 1 ml/min. V této metodě byl využit detektor s fotodiodovým polem (DA), kdy detekce probíhala při 268 nm. Objem nástřiku byl 10 μl a celková doba analýzy byla 6 minut.

Ahmad I. a kol. [39] vytvářeli metodu pro extrakci a analýzu úrovně Fluoxetinu v lidské krevní plazmě. Vzorky plazmy byly extrahovány pomocí automatizovaného SPE systému a 10 μl bylo nástříknuto do HPLC-MS/MS zařízení. Kolona na niž analýza probíhala byla Ascentis Express C18 (75 × 4,6 mm, 2,7 μm). Mobilní fáze se skládala z vodného roztoku 5mM mravenčanu amonného (mobilní fáze A) a acetonitrilu (mobilní fáze B). Analýza proběhla izokratickou elucí s konstantním složením a průtokem mobilní fáze o hodnotách A:B 10:90 a 0,5 ml/min resp. Teplota kolony byla nastavena na 40 °C. Látky byly ionizovány pomocí turboiontového spreje a analyzovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Doba analýzy pro jeden vzorek byla 3,5 minuty.

Cezimbra de Silva A. C. a kol. [40] simultánně analyzovali úroveň Fluoxetinu a Norfluoxetinu v suchých krevních skvrnách pomocí HPLC-MS/MS. Metodologie suchých krevních skvrn (DBS) je velice užitečnou technikou odběru pro případy, kdy je nemožné vzorky kapalně krve analyzovat na místě a je třeba je zaslat do vzdálených laboratoří. Během DBS je krev odebrána pacientům a po kapkách nanese na sušící papír. Po vysušení krve od veškeré vody byly vzorky dvakrát extrahovány s ještě jedním sušícím mezikrokem na odstředivce. Objem nástřiku supernatantu byl 20 μl. Složky extrahované směsi se rozdělávaly na Accucore C18 (100 × 2,1 mm, 2,6 μm) koloně. Eluce probíhala formou gradientu podle přednastaveného programu při konstantním průtokem 0,4 ml/min. Mobilní fáze byla složena z 0,1% vodného roztoku kyseliny mravenčí (mobilní fáze A) a acetonitrilu s 0,1% obsahem kyseliny mravenčí (mobilní fáze B). Teplota kolony byla nastavena na 40 °C. Eluenty byly zpracovány tandemovou hmotnostní spektrometrií s ESI v pozitivním módu a trojitým kvadrupólem. Doba analýzy byla 9 min.

Xiangjun Q. a kol. [41] se zaměřovali na současnou analýzu Glimepiridu a Fluoxetinu v lidské krevní plazmě. Glimepirid je léčivo užívané ke snižování hladiny cukru v krvi

u diabetických pacientů, které je v těle primárně metabolizováno cytochromem P450 z rodiny 2, podrodiny C číslo 9 (CYP2C9). Jelikož je Fluoxetin také částečně metabolizován stejným cytochromem, bylo usouzeno, že při vzájemném podání těchto léčiv, by se mohly vyskytnout nežádané interakce. Pro další studie interakcí léčiv musí nejprve však existovat metoda, jak je vzájemně stanovovat. Na tento úkol byla použita ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) ve spojení s MS/MS. Tato metoda využívala Acquity UHPLC BEH C18 kolonu (50 × 2,1 mm, 1,7 μm). Odebrané vzorky krevní plazmy byly centrifugovány s roztokem vnitřního standardu a 6 μl výsledného supernatantu bylo nastříknuto na kolonu. Složení mobilní fáze, sestávající z acetonitrilu (mobilní fáze A) a vody s 0,1% obsahem kyseliny mravenčí (mobilní fáze B), se během analýzy měnilo podle přednastaveného programu gradientové eluce. Průtok mobilní fáze byl nastaven na konstantní hodnotu 0,4 ml/min. K záznamu eluentů byl využit MS systém sestávající z ESI a trojitého kvadrupólu k detekci. Doba analýzy byla, díky těmto podmínkám, pouhé 2,4 minuty.

So Y. W. a kol. [42] se zabývali analýzou 14 veterinárních sulfonamidů nalézáných v mořských produktech. K analýze byl použit HPLC systém se spektrofotometrickým detektorem v ultrafialové oblasti (UV) a pro kontrolu byla dodatečně použita technika HPLC-MS z důvodu eliminace chyby způsobené maticí vzorků. Pro první analýzu byly látky separovány na koloně Capcellpak C18 (rozměry 250 × 4,6 mm, 5 μm). Objem nástřiku byl 10 μl. Mobilní fáze zde byla složena z 5 mM dihydrogenfosforečnanu draselného (mobilní fáze A) a methanolu (mobilní fáze B). Režim separace probíhal podle přednastaveného programu formou gradientu při průtoku mobilní fáze 1 ml/min. K detekci byl použit UV detektor s diodovým polem nastavený na záznam vlnové délky 270 nm. Následně k validaci výsledků byla využita analýza pomocí ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. V této analýze se použila kolona ACQUITY UHPLC<sup>TH</sup> BEH C18 (rozměry 100 × 2,1 mm, velikost částic 1,7 μm). Mobilní fáze se pro tuto analýzu skládala z 5 mM vodného roztoku kyseliny mravenčí (mobilní fáze A) a 5 mM kyseliny mravenčí v acetonitrilu (mobilní fáze B). Látky byly po separaci ionizovány v hmotnostním spektrometru pomocí elektrospreje v pozitivním módu (ESI+). Doba analýzy pomocí HPLC-MS/MS byla 16 minut.

Giegold S. a kol. [43] stanovili běžné veterinární sulfonamidy pomocí techniky HPLC a vysokoteplotní kapalinové chromatografie (HTLC). HTLC přináší oproti HPLC řadu výhod, jako je nižší viskozita mobilní fáze, která následně vede k nižším zpětným tlakům systému. HTLC umožňuje čerpat kapalinu systémem při vyšších průtocích bez překročení tlakového

limitu kolony. V kombinaci s mikročásticemi lze zde dosáhnout vysokých účinností. Zorbax Stable Bond C18 kolona (rozměry 50 × 3 mm, velikost částic 1,8 μm) byla použita v kombinaci s HT-HPLC 200 kolonovým termostatem. Teplota kolony se pohybovala v oblasti 70-105 °C dle programu gradientu. Objem nástřiku byl 1 μl. Mobilní fáze se skládala z 0,1% kyseliny mravenčí v deionizované vodě (mobilní fáze A) a 0,1% kyseliny mravenčí v ACN (mobilní fáze B). Díky vysokým teplotám mobilní fáze se průtok mohl zvýšit na 1,7 ml/min. Detekce probíhala kombinací UV/DA (270 nm) a MS (trojitý kvadrupól). Doba analýzy byla díky efektivním podmínkám separace nižší než 2 minuty.

Zheng M-M. a kol. [44] optimalizovali vytvořenou metodu pro analýzu sulfonamidových reziduí ve vejcích a mléce za využití chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) spojenou s MS. Kvůli komplexnosti vzorků zde byla využita prekoncentrace SPE pomocí polymerních monolitů (tzj. PMME). Na tento prekoncentrační krok je k eluci vyextrahovaných analytů potřeba rozpouštědla s vysokým obsahem organické složky, na což je HILIC metoda ideální. Eluent z prekoncentrace byl rovnou nastříknut na kolonu Luna NH<sub>2</sub> (rozměry 2 × 150 mm, velikost částic 3 μm) od společnosti Phenomenex. Objem nástřiku byl 10 μl. Teplota kolony byla udržována při 40 °C. Průtok mobilní fáze byl konstantní 0,2 ml/min. Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu obsahující 0,05 % kyseliny mravenčí (mobilní fáze A) a mobilní fází B byla voda. Přesné složení mobilní fáze bylo nastaveno dle programu gradientu. Separované látky byly detekovány MS systémem, obsahující ESI ionizaci a jednotný kvadrupól (Q) pro měření selektivního iontu (SIM). Doba analýzy nepřesahovala 16 minut.

## **1.2 Kapalinová chromatografie**

Kapalinová chromatografie je separační metoda moderní instrumentální analýzy široce používaná pro analýzu léčiv, biomolekul, polymerů, kontaminantů, složek potravin, tělních tekutin a mnoha dalších organických iontových i neiontových sloučenin. Její robustnost, vzorková kapacita a vysoká přesnost výsledků v kombinaci s její modifikovatelností a kompatibilitou se specializovanými detekčními technikami patří mezi hlavní faktory, proč je kapalinová chromatografie, v současnosti, hlavní metodou v analýze léčiv. Nicméně, vzhledem ke složitosti separačního mechanismu a jeho závislosti na podmínkách analýzy může vývoj a optimalizace nových postupů trvat delší dobu [45].

### **1.2.1 Teorie separace**

Cílem procesů separace při analýze vzorků složených z různých složek je změnit relativní množství látek ve směsi a převést ji na nové vzorky, z nichž každý v ideálním případě sestává



pouze z jediné komponenty. Mechanismus, kterým jsou individua od sebe oddělována, může být různý. Jedna kategorie procesů využívá principu fázové rovnováhy, kde se systém skládá ze dvou fází sloužících jako extrahovadla, která jsou vzájemně nemísitelná, zatímco třetí složka, která je přidávána do systému, je do určité míry rozpustná v obou fázích. Poměr výsledných koncentrací třetí složky v obou fázích nazýváme distribuční koeficient  $K$ , zatímco poměr distribučních koeficientů dvou složek separovaných stejným procesem je znám jako separační faktor  $\alpha$ . Ideální separační proces je takový, který má oba koeficienty dostatečně vysoké. Kapalinová chromatografie je separační proces, který je schopen tuto podmínku splnit. V chromatografii se separace provádí mezi dvěma fázemi – stacionární fází, která je fixována v systému, a mobilní fází, která je neustále doplňována a hnána skrze systém. V případě kapalinové chromatografie je mobilní fází vždy kapalina. Rozpustnější složky jsou promyty systémem mobilních fází, zatímco méně rozpustné složky ulpívají na povrchu stacionární fáze. Separace časem dosáhne dynamicky stabilního stavu, kdy si lze představit, že každá jednotlivá složka má v koloně svou vlastní zónu. Pokud si v tomto čase horizontální pohyb látky kolonou odmyslíme, bude se daná složka ve své zóně rozdělovat mezi přístupnou stacionární a mobilní fází, dokud stav nedosáhne rovnováhy závislé na rovnovážném koeficientu složky. Toto vysvětlení bylo původně navrženo podle procesu frakcionační destilace, kde se složky rozdělují podle jejich bodu varu mezi fyzicky přítomná patra. Odtud je odvozován název modelu teoretického patra a v chromatografii nám slouží jako jednoduchý a užitečný způsob popsání účinnosti kolony. Čím více teoretických pater kolona má, tím více teoretických individuí je schopna rozdělit. I když se ale pohyb mobilní fáze v tomto momentu zastaví, nedojde k úplnému zastavení horizontálního pohybu složek. Jednotlivé analyty se nadále budou šířit do sousedních pater od bodu největší koncentrace vlivem přirozené difúze. Tento jev, společně s vířivou difúzí, způsobovanou nehomogenní velikostí částic, a s molekulární difúzí, popisující dostupný povrch stacionární fáze, nám způsobuje rozšiřování píků v důsledku ředění koncentrace analytu [46] [47].

Téměř ve všech chromatografických systémech dochází k transportu těchto zón výhradně v mobilní fází. Transport je nezbytnou součástí chromatografického systému, protože nejběžnější uspořádání využívá nástřiku vzorku na počátku systému a detektoru na konci systému, mezi nimiž je separační kolona naplněná stacionární fází, přičemž zavádění a detekce vzorku probíhá výhradně v mobilní fází. Ideálně se směs látek nejprve rozdělí na jednotlivé složky, přičemž všechny stráví určitou dobu v mobilní fází, kde budou

transportovány kolonou, a určitý čas ve stacionární fázi, kde se liší svými interakcemi se stacionární fází [46].

## 1.2.2 Módy kapalinové chromatografie

### 1.2.2.1 Systém s normálními fázemi

Při kapalinové chromatografii v systému s normálními fázemi (NPC) probíhá separace mezi polární stacionární fází a nepolární mobilní fází. NPC byla historicky první zaznamenanou variantou chromatografického procesu, která byla původně využita na počátku 20. století Mikhailem S. Tsvetem k separaci rostlinných barviv, odkud, z řeckého slova pro barvy (chroma), tato metoda odvozuje své jméno. V NPC migruje směs analytů kolonou a rozděluje se mezi dvě fáze na základě dvou sorpčních mechanismů. Lokalizovaná sorpce je charakteristická pro polární látky a je řízena fyzickou dostupností funkčních skupin v molekulách analytů nebo v molekulách stacionární fáze. Analyty zde kompetitivně soutěží o dostupná polární centra, kde se složky s vyšší afinitou vážou silněji a jsou následně déle zadržovány. Druhý mechanismus je delokalizovaný, nespecifický a je čistě závislý na koncentraci a složení mobilní fáze. Pokud bude mobilní fáze obsahovat větší podíl složky s vyšší eluční silou, bude se retence snižovat a naopak [45] [47] [48] [49].

Nejčastěji používanou stacionární fází v NPC je stále silikagel. Systém konjugovaných silanolových vazeb tvořící přirozené póry je perfektní pro chromatografické účely, jelikož vykazuje velký specifický povrch, komerčně dosahující až 150 m<sup>2</sup>/g, a je schopen chemické modifikace. Běžná velikost částic pro komerční kolony oxidu křemičitého je 3,5 až 10 μm, dnes už však existují i menší verze. Jednou z největších nevýhod silikagelových kolon je jejich omezená stabilita mimo stanovený rozsah pH, obvykle 2-8. Za kyselějších podmínek může lože částic, tvořené systémem Si-O-Si vazeb, podléhat hydrolyze a reagovat za vzniku volných silanolových skupin, což poškozuje kolonu. Tomu lze zabránit chemickou úpravou, aby se zamezilo přístupu mobilní fáze k základně částic. Mnohem větší degradace však nastává za podmínek vyššího pH, protože v důsledku přítomnosti hydratovaných silanolových skupin je povrch částic silikagelu slabě kyselý a je třeba dávat velký pozor, aby pH mobilní fáze nepřekročilo 8, jinak může dojít k rozpuštění částic. Tento problém je řešitelný buďto pomocí dodatečné chemické modifikace nebo nahrazení silikagelu za více stabilní fáze jako např. alumina. Alumina, neboli oxid hlinitý, je druhou nejvíce používanou stacionární fází v NPC. Oxid hlinitý tvoří podobné systémy konjugovaných vazeb s volnými hydroxylovými skupinami, zahříváním lze ale residuální hydroxyly deaktivovat za vzniku neutrální aluminu, která je pro potřeby chromatografie vhodnější. Jako mobilní fáze se používají různá nepolární

organická rozpouštědla, např. hexan, cyklohexan, isooktan nebo aromatické sloučeniny jako benzen, toluen či xylen. Organické složky jsou během analýz běžně ve směsi s vodou pro zvýšení eluce polárních látek [50] [51] [52].

NPC je dnes málokdy používána pro analýzu látek kvůli komplikacím s opakovatelností metody, z důvodu snadné kontaminace vysoce zadržovanými složkami, a s dostupností organických nepolárních rozpouštědel. Nicméně stále nachází využití u preparativních a chirálních separací, kde princip lokalizované sorpce polárních funkčních skupin se zde stává výhodou, při separaci cis a trans isomerů [45] [49].

### 1.2.2.2 Systém s reverzními fázemi

V případě systémů s reverzními (obrácenými) fázemi je polarita jednotlivých fází opačná, vzhledem k NPC, se vložené analyty dělí mezi nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. Historicky nejranější modifikace byly systémy, kde nepolární kapalná rozpouštědla byla adsorbována na stacionární sorbent, skrz který byla následně hnána polární mobilní fáze, nejčastěji voda, příležitostně s vodorozpustnými aditivami. Mechanismus separace na těchto fázích je striktně nelokalizovaný a závisí čistě na struktuře molekul analytů a hydrofobicitě obsažených strukturních prvků. Dnes se běžně používají stacionární fáze, kde je nepolární složka chemicky trvale vázána na vhodný nosič. Příklady nejběžněji používaných silikagelů jsou oktadecyl, oktyl, fenyl nebo různé alkylfenyly, obvykle připojené k substrátu na bázi oxidu křemičitého nebo polymeru a poté dodatečně chemicky modifikované. Nevýhodou těchto fází na bázi dlouhých lineárních alkylů je jejich strukturní nestabilita v čistě vodném prostředí, kde alkylové řetězce se shluknou v celky nedaleko podobné micelám. Tato změna je často trvalá a kolona ztrácí tak svůj potenciál využití pro další analýzy. Je tedy zapotřebí, aby měření byla vždy prováděna v mobilních fázích obsahujících určitý podíl organické složky. V RPC, podobně jako v názvu modifikace, je pořadí retence analytů obrácené. Nejprve jsou eluovány polární složky a poté, se zvyšujícím podílem organického rozpouštědla, se začnou eluovat nepolární sloučeniny podle délky jejich alkylových řetězců či počtu aromatických jader [45] [47] [49] [50] [53] [54].

RPC se dnes používá u 75 – 90 % všech HPLC aplikací. Výhody této modifikace umožňují její použití pro analýzu polárních, středně polárních a některých nepolárních analytů. Iontové analyty mohou být separovány pomocí technik iontové suprese nebo iontového párování. RPC je široce používána v analýzách čistoty a stability látek. Slabé disperzní síly odpovědné

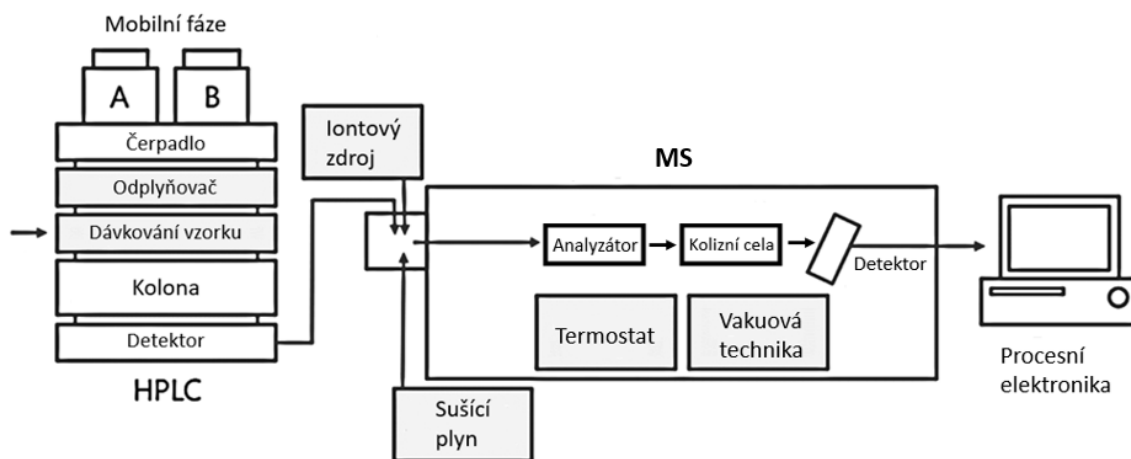
za retenci rozpuštěných látek zaručují, že všechny složky analytu budou eluovány z kolony, prodlužující tak její životnost a zvyšující reproduktibilitu metody [45] [55].

### **1.2.2.3 Systémy založené na jiném principu**

Velkou většinu organických látek lze rozdělit a analyzovat podle polaritě jejich struktury. Pro látky, které takto nelze separovat nebo pokud jejich stanovení pomocí NPC či RPC neposkytuje žádané výsledky, je možné využít chromatografických systémů, jejichž mechanismus separace je založený na specifických vlastnostech látky. Jedna z nejméně dnes používaných metod je velikostně vylučovací chromatografie (SEC) nebo její modifikace gelová permeační chromatografie (GPC), využívající různě velikých pórů stacionární fáze k rozdělení látek podle jejich fyzické velikosti, kde největší molekuly jsou zadržovány nejméně a malé molekuly nejvíce. Iontová chromatografie (IC), často dělená na modifikace iontové výměnnou chromatografií (IEC) a chromatografií iontových párů (IPC), je schopna efektivně rozdělit a analyzovat iontové látky, využívající afinitu iontové látky k iontoměničce nebo konverzi iontových látek na neutrální formu pomocí vhodných párových činidel s následnou separací na základě polaritě výsledné struktury. Dále lze zmínit bioafinitní chromatografií (AC), kde na povrchu stacionární fáze jsou ukotveny biopolymerní struktury schopné selektivně rozpoznávat analyty podle jejich trojrozměrné struktury (tj. receptory) [45] [47].

### **1.2.3 Instrumentace**

Moderní zvýšení v účinnosti, rychlosti a rozlišení chromatografických separací úzce souvisí s rozsáhlým výzkumem a vývojem v oblasti instrumentace, stacionárních fází a kolonové technologie. Historicky se druhá kategorie vyvíjela rychleji než první. To ale vedlo k problému, kde účinná kolonová a citlivá detekční technologie sice byla k dispozici, ale instrumentace, která by se vypořádala se zvýšením požadavků na tlak, nebyla dostupná. Moderní technologie však tyto problémy řeší a umožňuje plně využít potenciál mikročásticových kolon a online spojení s hmotnostními spektrometry [55].



**Obrázek 3:** Schéma kapalinového chromatografu ve spojení s hmotnostní spektrometrií [56]

Instrumentální výbava pro moderní HPLC systém se skládá z několika podstatných komponent, viz. Obrázek 3, bez nichž se dnes žádná modifikace metody neobejde. První součástí jsou běžně minimálně dva zásobníky pro mobilní fáze, které ve spojení s vysokotlakým čerpadlem a směšovací komorou umožňují gradientovou eluci analytů konstantním, bezpulsním a reprodukovatelným tokem mobilní fáze o nastavitelném složení. Původně by bylo třeba mobilní fáze nejprve vložit do ultrazvukové lázně pro eliminaci rozpuštěných plynů z kapaliny, krok, který výrazně prodlužoval a komplikoval separační proces. Dnes však jsou už moderní chromatografy vybaveny online odplyňovacím zařízením, díky čemuž nutnost tohoto kroku odpadá. Odplyněná mobilní fáze je hnána pod tlakem do zvolené kolony, na níž dochází k separaci podle odpovídajícího mechanismu, a zde nastává nutnost zavádění vzorku do proudu mobilní fáze před vstupem do kolony dostatečnou rychlostí, aniž by došlo ke vzniku tlakové ztráty. Řešením této komplikace jsou dnes plně automatizované dávkovací smyčky, běžně ve spojení s autosamplrem, které nejprve ukládají nabíraný objem vzorku ve smyčce oddělené od hlavního průtoku mobilní fáze, a pak vstříkují celý objem naráz pouhým zapojením izolované smyčky do hlavního oběhu. V neposlední řadě je detektor, který umožňuje získat kvalitativních i kvantitativních informací o výstupech z kolony. Celý systém je doprovázen a spojován potrubím, buď z plastového či ocelového materiálu podle vyžadované úrovně tlaku, procesní a řídicí elektronikou a řadou sond, zajišťující přesný a konstantní monitoring aktuálních separačních podmínek. Dodatečné komponenty mohou být připojeny (např. sorpční jednotky, derivatizační cely apod.), případně může být využito kombinace nedestruktivních (UV, DA) a destruktivních (MS) detektorů či více čerpadel a kolon jako v případě dvoudimenzionální chromatografie (2D-LC) [50] [57] [58].

### 1.2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je moderní instrumentální metodou analýzy elektricky nabitých látek využívající vlastností a chování nabitých částic v elektromagnetickém poli. Moderní hmotnostní spektrometr se skládá ze čtyř primárních částí: iontového zdroje, schopného převést neutrální sloučeniny na nabitě částice, hmotnostního analyzátoru rozdělujícího vytvořené ionty podle jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), detekční cely, jejímž účelem je zaznamenat intenzitu jednotlivých iontů a doprovodné techniky nutné k ustanovení podmínek analýzy (např. vakuová technika, iontová optika, termostaty apod.). Mezi největší výhody hmotnostní spektrometrie patří její citlivost i při nízkých koncentracích, možnost selektivního stanovení vybraných iontů a schopnost poskytovat jak kvantitativní, tak kvalitativní informace, užitečné pro identifikaci struktury analytu. Přínosy, které hmotnostní spektrometrie nabízí, se dnes staly téměř nepostradatelnými v metodách instrumentální analýzy léčiv, potravin, biopolymerů, vzorků životního prostředí, iontových i neiontových látek a také bojových a toxických látek. Využití techniky MS je dnes ještě více prevalentní, díky spojení HPLC a MS, umožňující efektivní rozdělení komplikovaných směsí a detailní analýzu eluovaných složek. Nicméně, je třeba zmínit, že spojení LC-MS bylo v historii dlouho omezováno komplikacemi spojením kapalinové chromatografie, využívající velké množství občasně málo těkavých kapalin pod vysokým tlakem, a hmotnostní spektrometrie, pracující v plynné fázi za vysokého vakua. Polární rozdíly těchto metod byly ve finále vyřešeny vynalezením iontových zdrojů pracujících za nízkého vakua blízkého atmosférickému tlaku [45] [55] [58] [59].

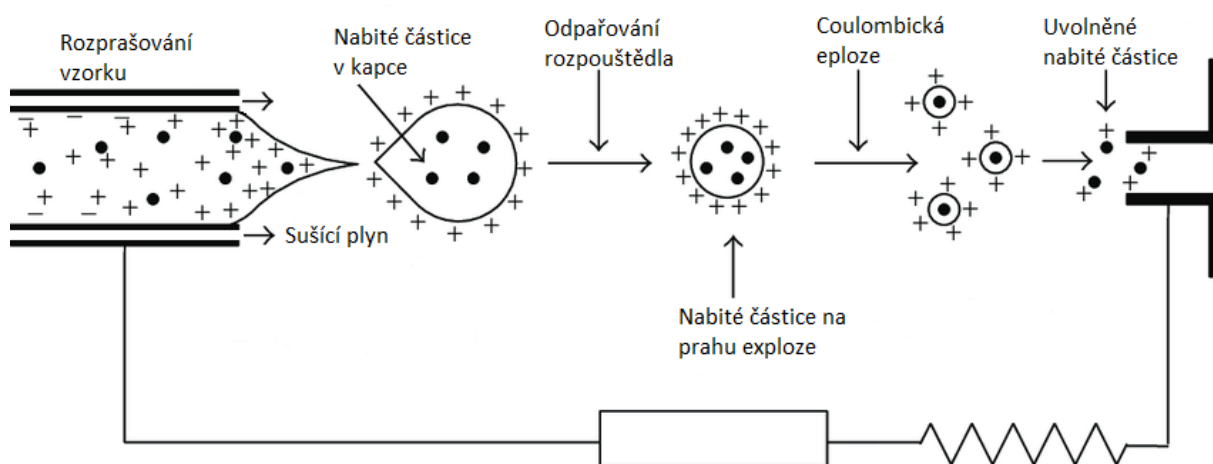
#### 1.2.4.1 Iontové zdroje

Protože molekuly jsou elektricky neutrální, musí být nejprve ionizovány, aby mohly být analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Toho je dosaženo pomocí iontového zdroje. Dnes většina iontových zdrojů pracuje při atmosférickém tlaku, protože to nejen umožňuje kombinaci LC-MS metod, ale také se ušetří čas, který by jinak byl nutný ke tvorbě vakua. Protože negativní aspekty vakuové ionizace byly opraveny inovací, dnes se hranice analytické chemie zaměřuje na snížení průtoku, aniž by byla afektována účinnost nebo doba separace [45] [55] [58] [59].

Elektronová ionizace (EI), také známá jako ionizace elektronového nárazu, je převážně jediná metoda iontového zdroje, která se stále používá při vysokém vakuu, ale je tedy omezena pouze na spojení plynové chromatografie (GC) s hmotnostní spektrometrií. EI funguje na systému dvou elektrod. Katoda (např. wolframová) produkuje volné elektrony

prostřednictvím termionické emise, což lze v podstatě charakterizovat jako zahřívání. Tyto elektrony jsou pak urychleny k anodě nastaveným rozdílem potenciálů mezi elektrodami. Ve vysokém vakuu pak tyto elektrony narážejí na molekuly plynného analytu, vyrážejí jejich valenční elektrony a dávají jim tak kladný náboj. Pokud je kinetická energie emitovaného elektronu dostatečně vysoká, může náraz potenciálně rozbit molekulu na fragmenty charakteristické pro její strukturu. Elektronová ionizace nemá dnes velké využití kromě GC-MS analýzy těkavých nepolárních sloučenin, ale má výhodu v tom, že jde o historicky první objevenou ionizační metodu a spektra jsou pro řadu sloučenin široce zdokumentována [45] [58] [59].

Elektrosprejová ionizace je dnes dominantní metodou iontového zdroje v moderní analýze. V ESI je kapalná fáze čerpána přes nabitou kapiláru při vysokých tlacích a je následně rozprašována na aerosol nabitých částic. Vytvořené ionty jsou však stále rozpuštěny v nenabitém rozpouštědle, takže pro jejich extrakci je přes aerosol hnán zahřátý sušící plyn. Jak se kapky smršťují v důsledku odpařování rozpouštědla, dochází při překročení určitého prahu ke „coulombické explozi“. Práh exploze je určen silou elektrostatičkého odporu nabitých částic v poměru se silou povrchového napětí kapky. Jakmile je síla odporu vyšší než povrchové napětí, dochází k uvolnění iontů, které jsou následně přeměřovány do hmotnostního spektrometru, viz. Obrázek 4. Pomocí ESI lze produkovat kladně i záporně nabité ionty a je dokonce schopna produkovat i vícenásobně nabité ionty. Avšak kvůli nízkému napětí aplikovanému na vstupní kapiláry je ESI považován za měkký zdroj iontů, neprodukuje fragmenty molekul. ESI je používán pro ionizaci silně polárních látek [45] [55] [58] [59].



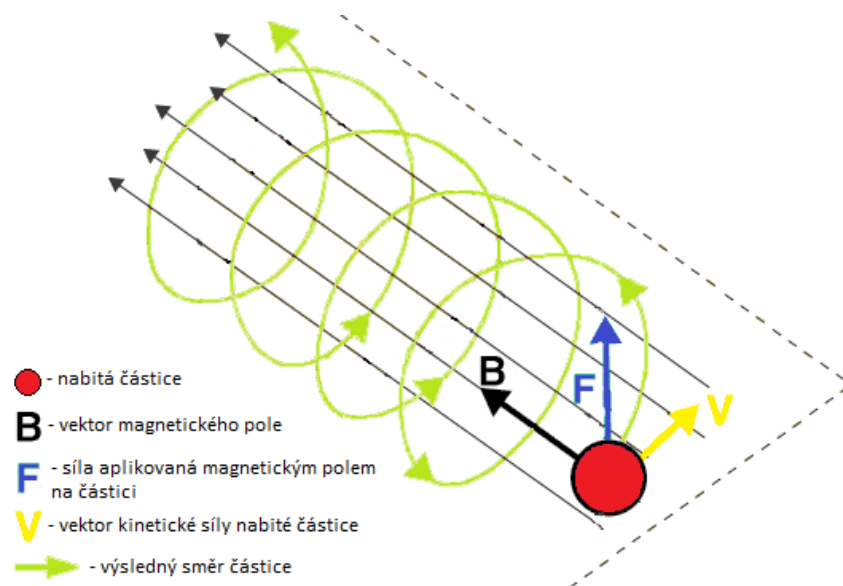
**Obrázek 4:** Schéma elektrosprejové ionizace [60]

Dalšími metodami ionizace za atmosférického tlaku (API) jsou fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Tyto dvě metody pracují s podobným ionizačním mechanismem využívajícím intramolekulárních interakcí a přenosu náboje. Mají však jinou konstrukci aparatury. APPI využívá zdroj elektromagnetického záření k produkci volných radikálů. Rozpouštědlo se také excituje, ale pokud je potenciální ionizační energie analytu nižší než rozpouštědlo, dochází k intramolekulární interakci a náboj rozpouštědla se přenáší na analyt. Tato metoda je měkkým iontovým zdrojem a má nízkou excitační energii, takže pro analýzu sloučenin s vyšší energií je nutné použití dopantů. Dopanty jsou sloučeniny, které jsou snadno ionizovatelné a mají vysokou rekombinační energii, vyžadující velmi málo energie k reakci s molekulami analytu. APCI využívá koronální výboj k ionizaci molekul nebulizačního plynu. Tyto nabitě molekuly pak interagují s analytem a přenášejí na něj svůj náboj. APPI i APCI se používají pro středně nepolární látky [45] [55] [58] [59].

#### **1.2.4.2 Hmotnostní analyzátory**

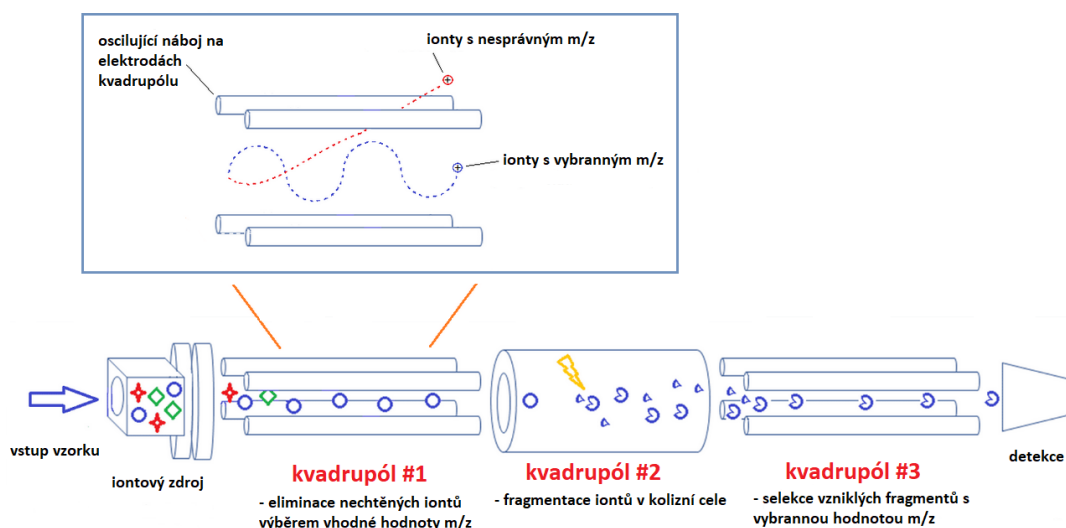
V elektromagnetickém poli lze nabitou částici ovlivnit dvěma způsoby, viz. Obrázek 5. Nejprve nabitá částice bude cestovat a bude urychlována směrem k elektrodě opačného náboje, přičemž její rychlost závisí na rozdílu potenciálu mezi elektrodami. Tento princip můžeme použít buď k vedení iontů spektrometrem, nebo naopak k vypuzení nežádoucích iontů. V magnetickém poli však může být ovlivněn pouze směr nabitě částice, protože síla magnetického pole je kolmá na kinetickou sílu. Tím, že máme silnější magnetické pole, můžeme změnit trajektorii částice, ale ne její rychlost. Na základě těchto dvou principů hmotnostní analyzátor odděluje vytvořené ionty podle jejich poměru  $m/z$ . Hmotnostní analyzátory můžeme rozdělit do dvou kategorií, kde částice procházejí magnetickým polem buď přímou cestou nebo v periodických oscilacích iniciovanými elektrickým polem [55] [61].





**Obrázek 5:** Schéma pohybu nabitě částice v magnetickém poli [62]

Kvadrupólový analyzátor obsahuje dvě sady elektrod z nerezové oceli. Dvě elektrody jsou nabitě záporně a dvě kladně, viz. Obrázek 6. Systém pak automaticky osciluje mezi kladným a záporným nábojem elektrod a mění tak přímou dráhu iontů skrz analyzátor na oscilace v třídímním prostoru (3D). Frekvence oscilací elektrod je nastavena tak, aby odpovídala frekvenci harmonických oscilací iontů ve vybrané oblasti  $m/z$ . Jakékoli ionty mimo vybranou oblast budou mít oscilace nestabilní a narazí ve své dráze do povrchu elektrod. Kvadrupól je tak schopen analyzovat celou sérii produkovaných iontů (TIC), vybranou oblast  $m/z$  (EIC) nebo i jednotlivý vybraný iont (SIM). Kvadrupólové analyzátoři jsou kompaktní, rychlé, vysoce selektivní a snadno použitelná levná zařízení. Jejich rozlišovací schopnost (RP), míra citlivosti na podobné  $m/z$  ionty, je však srovnatelně nízká. Lze ji však zvýšit spojením tří kvadrupólů do série. Trojitý kvadrupól je jedním z oblíbených MS/MS uspořádání, které umožňuje nejen vyšší RP, ale také tvorbu fragmentů pomocí tzv. kolizní cely. Kolize probíhají ve druhém kvadrupólu, který je naplněn srážkovým plynem (např. dusík, argon...). Výsledné fragmenty pak putují přes třetí kvadrupól, který může selektivně eliminovat vybrané fragmenty. QqQ umožňuje pak tedy daleko více režimů monitorování, než v případě jednoduchého Q analyzátoru [45] [58] [59].



**Obrázek 6:** Schéma konstrukce a funkce trojitého kvadrupólu s kolizní celou [63]

Analyzátor doby letu (TOF) separuje ionty tím, že jim umožňuje se pasivně rozdělovat podle jejich hmotnosti. V TOF analyzátoru ionty nejprve projdou vstupní elektrodou, která je urychlí k výstupní štěrbině. Předaná kinetická síla je pro všechny ionty stejná, jejich rychlost je pak diferencována pouze jejich hmotností. Jak ionty procházejí úzkou trubicí, rozdělují se do odlišných skupin a dostávají se do detekční zóny. TOF lze považovat za analyzátor s vysokým RP, avšak nepatrný rozdíl v energii získané mezi ionty stejné skupiny může vést k tomu, že dosáhnou detekční zóny nesynchronizované. RP je také omezena fyzickou délkou trubky. Jedním z účinných způsobů, jak zvýšit RP, je použitím reflektoru. Reflektor je v podstatě další sada elektrod se stoupajícím potenciálem. Když oddělená skupina iontů dosáhne reflektoru, ionty s vyšší energií pronikají elektrodovou sadou hlouběji a zvyšují jejich délku letu, zatímco ionty s nižší energií pronikají velmi málo. Rychlost iontů se však nemění, takže jakmile jsou ionty vypuzeny elektrodou, synchronizují se dříve, než dosáhnou detekční zóny [45] [58] [59].

Orbitrap je hmotnostní analyzátor řazený do kategorie iontových pastí. Iontové pasti fungují tak, že zachycují nabitě částice a pak je buď vypuzují do detektoru podle určeného poměru  $m/z$ , nebo je rovnou rozdělují a analyzují podle jejich poměru  $m/z$ . Specifická konstrukce hmotnostních analyzátorů je pro každý typ odlišná, ale obecně se iontová past skládá ze tří elektrod, dvou hraničních elektrod, které zadržují ionty v komoře, a třetí, obvykle kulaté elektrody, která vytváří elektromagnetické pole pro pohyb částic. Orbitrap je kombinací obou principů a skládá se ze dvou částí. První část, nazývaná C-past, nejprve imobilizuje ionty, a pak je kolmo vypuzuje do Orbitrapu. Pro správnou funkci Orbitrapu je nutný správný vstupní směr iontů. V orbitrapu ionty po vstupu krouží kolem centrální elektrody

tangenciálním pohybem a dělí se do odlišných zón se specifickým poměrem  $m/z$ . Tyto zóny nyní cyklují tam a zpět, odpuzovány hraničními elektrodami, přičemž jejich rychlost je striktně určena pouze jejich poměrem  $m/z$ . Detekce probíhá v komoře, kde se zaznamenává frekvence výskytu iontů v detekční zóně. Výstupem je periodický signál složený z několika dílčích signálů o specifické frekvenci, které lze extrahovat pomocí Fourierovy transformace [45] [58] [59].

#### **1.2.4.3 Detektory**

Podobně jako při elektronové ionizaci, kde využíváme srážku elektronů k fragmentaci molekul na ionty, můžeme tak využít nabitou částici k vyrazení elektronů z jiných materiálů. Nejběžnějším zařízením používaným k detekci v hmotnostní spektrometrii jsou elektronové násobiče, také známé jako dynodová pole. Fungují tak, že nejprve urychlí nabitou částici sadou elektrod, aby přímo dopadla na povrch dynody pokryté mědí a beryliem. Síla nárazu vyrazí elektrony z jejího povrchu, které jsou pak urychleny směrem k další dynodě. Rozdíl potenciálů mezi dynodami vede a zesiluje elektrony při každém dopadu, zvyšující intenzitu signálu a snižující detekční limit. Dynodová pole lze nejčastěji nalézt ve dvou seřazeních, buďto jako systém diskrétních dynod nebo ve formě jednodílné zakřivené dynody [45] [58] [64].

Obdobně jako dynody nárazem produkují elektrony, lze použít materiál, který po srážce s nabitou částicí produkuje fotony. Emitované světlo lze následně detekovat pomocí fotonásobiče. Toto je mechanismus funkce scintilačních detektorů. Běžné je před fotonásobičem a scintilátorem přidat ještě sadu násobících dynod jednak převádějící dopadající částice z iontů na elektrony a také zvyšující intenzitu signálu, zaručující aktivaci scintilátoru [58] [64].

#### **1.2.4.4 Dodatečná technika**

Součástí hmotnostního spektrometru je mnoho dalších technologií, které jsou potřeba k provozu elementárních komponent, ale pokud bychom měli vyčlenit nějaké další vybavení jako důležité, pak by to byla iontová optika a vakuové pumpy. Hlavním účelem iontové optiky je generovat elektromagnetické pole pro pohyb nabitých částic a vést ionty přístrojem na potřebná místa bez případných ztrát signálu. Dále se iontová optika využívá k odpuzování, urychlování či zpomalování nabitých částic dle potřeby. Obou těchto cílů se dosahuje vložením napětí na sadu elektrod se střídavou polaritou, tak aby nebyly vyčleněny částice s pouze záporným či kladným nábojem, a následně jsou ionty skrze magnetické pole usměrněny radiofrekvenčním pulzem. V moderních spektrometrech se používá konstrukce iontového trychtýře, což lze popsat jako sadu plochých prstencových elektrod, které lze

upřesnit postupným zmenšováním a soustředěním cesty iontů do jediného bodu. Tato konstrukce vyžaduje velké množství elektrod a procesní elektroniky k přesnému ovládní výšky vkládaného napětí a frekvence radiofrekvenčních pulsů. Existují i šetrnější sestavy, které usměřňují ionty buďto pouze pomocí rozdílu vkládaného napětí mezi elektrodami, jako např. Einzelova čočka, nebo použitím stejného principu jako kvadrupolový analyzátor, např. multipólové iontovody [65] [66].

Přestože byly dnešní iontové zdroje optimalizovány pro provoz při atmosférickém tlaku, je vakuum i dnes stále nezbytnou částí hmotnostních spektrometrů. Aby hmotnostní spektrometr správně fungoval, je zapotřebí vysokého vakua, běžně mezi  $10^{-3}$  až  $10^{-9}$  Torr, aby generované ionty mohly proudit strojem bez překážek, jako jsou kolize s částicemi vzduchu. Této úrovni vakua nelze dosáhnout běžnými metodami, protože při těchto úrovních se vzduch nechová jako viskózní kapalina a netvoří tlakový gradient. Abychom mohli jít níž, musíme maximalizovat pravděpodobnost odčerpání zbylých částic vzduchu, které se nám podaří zachytit, ze systému. Toho lze dosáhnout dvěma způsoby. Dražším řešením je použití turbomolekulárních vývěv. Zde se částice zbytkového plynu časem střetnou s rotujícími lopatkami turbíny, které jsou nakloněny tak, aby částice nemohly uniknout zpět. Rotory však musí dosáhnout vysokých otáček a jsou zde kladeny přísné požadavky na kvalitu oceli, aby nedocházelo k odplyňování zabudovaných plynů. Mnohem levnější a pro většinu řešení vhodnější je použití difúzních čerpadel. Tato čerpadla fungují tak, že průběžně odpařují stlačitelný olej, jehož páry pak stoupají k bodu kontaktu s komorou. Zde chladicí kanály zkondenzují olej zpět do kapalného stavu, kde velké molekuly oleje zachycují veškerý přítomný plyn. Kapalný olej pak padá zpět do odpařovací komory a jelikož jsou olej a voda nemísitelné, lze vodu oddělit a olej regenerovat [67] [68].

### **1.2.5 Vývoj HPLC metod**

Vývoj metod HPLC zahrnuje získávání a interpretaci dat, statistickou analýzu a optimalizaci podmínek měření za účelem dosažení určitého cíle analýzy, které se mohou lišit v závislosti na aplikaci metody. Mezi nejčastější cíle, pro které optimalizujeme, patří rychlejší analýza, nižší detekční limit, větší kapacita kolony, vzájemná analýza několika analytů nebo snížení nákladů. Jakmile je však stanoveného cíle dosaženo, musí být zajištěno, pokud má být metoda komerčně životaschopná, aby výsledky byly stále přesné, opakovatelné, reprezentativní pro skutečný vzorek a snadno změřitelné, aniž by proces analýzy obsahoval nevyhnutelné překážky, jako jsou nedostatek instrumentace nebo zdrojů.

### 1.2.5.1 Vyhodnocení výsledků

Datový výstup z chromatografického procesu separace se nazývá chromatogram. Jde o vizuální záznam sestávající z dat detektoru na vertikální ose v závislosti na záznamu uplynulého času, nejčastěji měřeného času nebo objemu mobilní fáze od počátku analýzy, na horizontální ose. V křivce vyjádřené na chromatogramu nalezneme jak kvalitativní, tak kvantitativní informace [69] [70].

Termín kvalitativní informace lze vyjádřit jako informace, které jsou používány k identifikaci sloučeniny, která je přítomna v separované frakci. Čas, ve kterém složka opustí kolonu do detektoru, se nazývá retenční čas. Za konstantních podmínek je retenční čas pro danou sloučeninu charakteristický. Tuto skutečnost můžeme využít použitím standardů, čistých sloučenin bez rušivých příměsí. Pokud se pík standardu a daný pík vzorku polohou na chromatogramu shodují, můžeme předpokládat, že tyto sloučeniny jsou identické. Více kvalitativních informací lze vyčíst z UV-VIS nebo MS spekter, která jsou získána kombinací HPLC systému s příslušnými detektory [69] [70].

Kvantitativní informace, jak název napovídá, se snaží určit kvantitu analyzované látky ve vzorku. V chromatografii se k určení kvantity látky v dané frakci nejčastěji používá buď výška nebo plocha píku. Obě hodnoty by se měly se zvyšujícím obsahem látky také zvyšovat a naopak. Výšku píku lze jednoduše určit odečtením hodnoty detekovaného signálu na vertikální ose chromatogramu v bodě maxima píku. Pro určení plochy píku je třeba nejprve určit jeho začátek a konec, a pak, za předpokladu, že měříme v provozním rozsahu detektoru a separace byla dostatečně účinná, aby zabránila koeluci analytů, by měla být plocha pod křivkou úměrná množství látky. Kvantitu látky lze následně určit vztahením odečtené hodnoty k obdobné hodnotě standardu se známou koncentrací. Pro zjištění koncentrace dané látky ve vzorku je nejčastěji využíváno dvou metod – metody kalibrační křivky a metody standardního přídávku. Metoda kalibrační křivky zahrnuje analýzu několika standardních roztoků na různých koncentračních úrovních v rámci lineární odezvy detektoru. Následně je sestrojena kalibrační křivka (závislost odezvy detektoru na koncentraci), jejíž rovnici regrese lze využít pro získání koncentrace látky ve vzorku. Metoda standardního přídávku využívá jednoho či několika přídávků standardu dané látky ke vzorku. HPLC metodou je proměřen vzorek bez přídávku a s přídávky a na základě konkrétní rovnice je vypočítána koncentrace látky ve vzorku. U hmotnostní spektrometrie s dostatečně vysokou rozlišovací schopností lze získat kvantitativní informace i bez použití identických látek metodou vnitřního standardu, kde přidáváme látky s podobným retenčním chováním do vzorku před jakýmkoli zpracováním.

V hmotnostním spektru pak nalezneme dva píky s podobnými retenčními časy, ale s odlišnou intenzitou, které, když víme, jak standardní odezva signálu roste ve vztahu k množství, můžeme použít k určení množství v původním vzorku využitím jednoduché trojčlenky. Nejjednodušším způsobem, jak získat látky s odlišnou hmotou, ale podobným chováním, je deuterizace, což je v podstatě navýšení molekulové hmotnosti originální látky o jednu jednotku navíc [69] [70] [71] [72].

### 1.2.5.2 Optimalizace separace

Optimalizaci chromatografického procesu lze interpretovat jako logickou volbu separačních podmínek pro co nejefektivnější dosažení požadovaných cílů, kterými běžně bývají buď nejvyšší rychlost analýzy, rozlišení sousedních píků nebo kapacita kolony. Optimalizace pro jeden z těchto aspektů se však často provádí na úkor ostatních, a tak se v HPLC provozují určité režimy separace, které byly optimalizovány převážně pro jeden z těchto cílů. Vysoké kapacity kolony, umožňující zpracování většího množství vzorku, je využíváno obzvláště v preparativní chromatografii, obvykle ve spojení s vysokými výtěžky, s cílem získat co největší množství čisté frakce vzorku. Rozlišení je jedním z číselných kritérií separace, popisující míru koeluce píků dvou sousedních frakcí. Dostatečné rozlišení je vyžadováno víceméně u všech analýz, i když jeho potřebu lze snížit i experimentálními modifikacemi, např. u analýz jednoduchých směsí nebude v koloně přítomno mnoho složek, které by bylo třeba dokonale separovat. Z tohoto důvodu je dnes nejvíce využíváno vysokých rozlišení v analýzách komplexních směsí či analýzách reálných vzorků s komplexními maticemi. Rychlejší analýzy jsou ceněny ve všech oborech, ale v chromatografii je nižší čas běžně limitujícím faktorem, neumožňujícím obsaženým složkám se od sebe separovat. Je tedy pochopitelné, proč analýzy jednoduchých směsí s nízkým počtem frakcí patří mezi ty nejrychlejší. V chromatografii nelze tedy dosáhnout všech cílů na nejvyšší hodnotu a kompromis je pak výsledným způsobem, jak optimalizovat metodu. Kompromisem je upřednostňování jednoho aspektu před ostatními, ale zároveň je nutné se snažit neklesnout s neoptimalizovanými aspekty příliš nízko. Pro optimalizaci zvoleného aspektu máme k dispozici různé parametry měření, které lze snadno měnit. Příklady zahrnují typ stacionární fáze, její rozměry a velikost částic, složení mobilní fáze, její průtok a lineární rychlost, způsob detekce, jeho citlivost a selektivita, teplota měření nebo případně předúpravy vzorku, prekoncentrace, derivatizace či kombinaci metod v dvourozměrných technikách. Výběr, který z těchto parametrů budeme měnit, závisí na našem vzorku, instrumentaci, zdrojích a efektu, který od chromatografické separace požadujeme [73] [74] [75].

Při optimalizaci separace nejčastěji měníme zvolený parametr a sledujeme vliv jeho změny na retenci analyzovaných složek. Nejdůležitějším faktorem k optimalizaci v kapalinové chromatografii, hned po volbě mechanismu, kterým budeme vzorek separovat, je určitě složení mobilní fáze. V kompozici mobilní fáze lze měnit spoustu faktorů. Mezi historicky prozkoumávané patří např. počet složek mobilní fáze, pH a přidávaná aditiva. Nejpodstatnější vliv na retenci však bude mít obsah organické složky ve spojení s volbou pracovního režimu buďto v systému s normálními nebo reverzními fázemi. Jelikož je RPC dnes nejčastěji používanou metodou, demonstrujeme vliv změny poměru organické a vodné fáze na tomto systému. Obecným pravidlem u RPC je, že se zvyšujícím se obsahem organické složky v mobilní fázi se bude retenční čas/objem snižovat. Na úplných retenčních modelech lze však vidět, že tento vliv má své horní i spodní hranice a existují hodnoty, kdy změna poměru už nebude mít na retenci složek viditelný vliv [74] [75] [76] [77].

Stejně jako můžeme optimalizovat složení mobilní fáze, můžeme optimalizovat i její rychlost průtoku skrze kolonu. Moderní technologie nám dnes umožňují, aby lineární rychlost mobilní fáze nebyla limitujícím faktorem v analýzách. Čerpadla dnes dokážou poskytovat snadno reprodukovatelné průtoky s velmi přesným a volně nastavitelným složením mobilní fáze a kolonová technologie je schopna odolat nárůstu tlaku, který přichází se zvýšenými průtoky. Analýza za vysokých rychlostí však nebude vždy nejúčinnějším způsobem separace, protože vyšší průtoky budou sice vést k rychlejší analýze, ale také k nižší účinnosti, jelikož sloučeniny nebudou mít čas se oddělit. Podobně však pomalé rychlosti průtoku nejen prodlouží dobu analýzy, ale také rozšíří píky, čímž snižují účinnost. V určitém okamžiku poměr účinnosti kolony k lineární rychlosti dosáhne optimálního bodu, kdy mobilní fáze proudí tak rychle, jak je to jen možné, a zároveň utrpíme co nejnižší ztrátu účinnosti. Toto je Van Deemterova křivka, někdy nazývaná H-u křivka, kde název odkazuje na složky os. Kde „H“ nám představuje výšku teoretického patra, popisující účinnost, a „u“ je lineární rychlost závislá na rychlosti proudění a délce kolony [73] [76].

Jedním z faktorů, který ovlivňuje jak lineární rychlost toku mobilní fáze, tak retenční charakteristiky, je teplota. Teplota kolony byla po dlouhou dobu také limitujícím faktorem, protože používané stacionární fáze nebyly stabilní při vyšších teplotách, což drasticky snižovalo životnost kolon. Stabilita kolony při vyšších teplotách je dodnes stále problémem pro většinu běžně používaných kolon, ale řešení už dnes není tak náročné jako v minulosti. Pokud jsou pro analýzu vyžadovány vyšší teploty, existují stabilnější materiály použitelné pro stacionární fáze, jako např. alumina, zirkon (oxid zirkoničitý) nebo termostabilní polymery.

Vztah mezi teplotou a retencí je popsán pomocí van't Hoffova modelu, ale v podstatě by vyšší teploty měly vést k nižším retenčním časům/objemům. Dodatečně má teplota vliv na selektivitu separace a do určité míry ji lze využít pro změnu rozlišení konkrétní dvojice látek [74] [75] [77] [78].

V neposlední řadě můžeme optimalizovat proces výběru kolony, který může, ale nemusí ovlivnit separační mechanismus. Před optimalizací některého z výše uvedených parametrů se doporučuje nejprve vybrat kolonu používanou pro měření. I když by však tento výběrový proces měl mít prioritu, není to nejdůležitější rozhodnutí v procesu separace. Většina kolon dnes dokáže dosáhnout výsledků s vysokým rozlišením v kombinaci s optimálními hodnotami výše uvedených parametrů. Dnes je k dispozici velký výběr kolon od různých výrobců a se značným množstvím literatury k jejich porovnání podle předchozích výsledků a metod [79].

### 1.2.5.3 Validace analytické metody

Jakmile je nová analytická metoda vyvinuta a optimalizována tak, aby splňovala své účely, musí být dále validována a standardizována, má-li se stát rutinní v praxi. Validační studie nám potvrzují, že nové metody splňují požadované specifikace. Žádné kvantitativní výsledky nemají vypovídací hodnotu, pokud nejsou doprovázeny odhadem úrovně chyb, které jsou v nich obsaženy. Úkolem při validaci tedy není kvantifikovat rozsah pouze správných, ale i chybných výsledků v metodě. Nejběžnějším způsobem validace je porovnání výsledků z nové metody s výsledky získanými pomocí zavedeného referenčního testu. Alternativně lze pomocí nové metody analyzovat standardní referenční materiály (SRM) (např. normy certifikované NIST), aby se prokázala její přesnost. Dnes existuje řada statistických nástrojů, které nám pomáhají spočítat výkonné specifikace [80] [81].

Prvními validačními parametry jsou správnost a přesnost. Správnost je termín používaný k popisu míry odchylky hodnoty získané měřením od skutečné hodnoty, obvykle stanovené nějakou normou či standardem. Správnost se často vyjadřuje jako procentuální rozdíl od skutečné hodnoty. Pro většinu analytických aplikací by laboratoře měly dosáhnout úrovně správnosti v rozmezí 5–10 % certifikovaných referenčních koncentrací. Přesnost charakterizuje stupeň krátkodobé kontroly nad analytickou metodou a popisuje variabilitu v souboru měření, aneb jak blízko jsou si opakovaná měření na jednom vzorku. Přesnost lze vypočítat pro vzorky v rámci jednotlivého cyklu (přesnost v rámci testu) nebo napříč více cykly (přesnost mezi testy). Přesnost může být vyjádřena pomocí procentuálního variačního koeficientu (CV), což je směrodatná odchylka vyjádřená jako procento střední hodnoty, nebo



jako vypočtená kladná a záporná hodnota odchylky ( $\pm$ ). Laboratoře by měly typicky dosahovat úrovně přesnosti  $<10\%$ , v případech stopové analýzy, kde je šum pozadí podstatnou částí celkového měřeného signálu, může být CV  $>10\%$ . Jak přesnost tak správnost by měly být v ideálním případě stanoveny při více koncentracích analytu [81] [82] [83] [84].

Reprodukovatelnost má podobný předpoklad jako přesnost v tom, že obě měří variabilitu výsledků v sadě měření. Avšak zatímco přesnost se snaží identifikovat krátkodobé odchylky v měření, reprodukovatelnost charakterizuje dlouhodobé chyby. Tyto nepřesnosti mohou být způsobeny řadou faktorů, jako jsou teploty, obsluha, konfigurace HPLC, stáří použitých chemikálií nebo dokonce místa odlišná od původního místa vývoje metody. Celkovou odchylku reprodukovatelnosti můžeme vyjádřit jako souhrn dílčích chyb v každém z těchto faktorů. Jednu věc je však třeba mít na paměti, vzorek použitý k identifikaci reprodukovatelnosti metody musí být stejný v přípravě, skladování, koncentraci a pokud možno i v šarži. Některé vzorky však nejsou stabilní za určitých podmínek přepravy, skladování či analýzy, a proto je nezbytné také vyhodnotit stabilitu analytu za různých podmínek. Vzorky mohou být odebírány s konzervačními látkami, skladovány, chlazeny nebo zmrazeny [81] [82] [83] [84].

Analytická měření se běžně provádějí, když je k dispozici dostatečné množství vzorku, kdy se člověk snaží využít centrální část dynamického rozsahu, protože výstup signálu je vysoký a není třeba se obávat saturačních efektů. Rozhodnutí použít menší koncentrace nebo množství se volí z různých důvodů, např. šetření se vzácným vzorkem, snížení přetížení analytického systému za účelem zlepšení rozlišení nebo se přirozené koncentrace běžně vyskytují ve stopové oblasti. Při menších množstvích ale riskujeme, že se dostaneme pod hranici toho, co je detektor schopen detekovat. Konkrétně, detektor, za předpokladu, že je dostatečně citlivý, dokáže detekovat vše, ale i v nejčistší laboratoři jsou přítomny interferenty, které mohou také vyvolat odezvu signálu. To se nazývá šum a v analýze kvantifikujeme tzv. poměr signálu k šumu (S/N) porovnáním vzorového signálu s průměrnou hodnotou šumu. Ze stanovené hodnoty S/N lze vypočítat dva limity. Mez detekce (LOD) je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze detekovat, a obecně se uznává, že je trojnásobkem průměrné hodnoty šumu pozadí. Limit kvantifikace (LOQ) je nejnižší koncentrace analytu, která je detekována a kvantifikována se specifikovanou správností a přesností a je obvykle přijímána jako 5 – 10krát vyšší než šum pozadí [81] [82] [83] [84].

Většina analytických metod vytváří signál, který je v oblasti s nízkou koncentrací určený interferencí pozadí a šumem měření a v regionu vysokých koncentrací v průměru konstantní, protože se blížíme k hranici toho, co detektor dokáže zpracovat. Mezi těmito hranicemi dává však většina analytických metod lineární vztah mezi odezvou přístroje a nejčastěji koncentrací analytu. Tento rozsah nazýváme jako linearitu metody, a i když teoreticky není nezbytně nutná, je přesto užitečným požadavkem, který je třeba splnit. Důvod, proč se snažíme dosáhnout vysoké, ne-li úplné, linearity, i když to znamená transformaci dat, je ten, že to zjednodušuje výpočty a minimalizuje množství faktorů ovlivňujících měření. Nelineární křivky značně komplikují výpočty, protože k vytvoření matematického modelu je zapotřebí více kalibračních bodů a interpolace od signálu ke koncentraci je často zdlouhavá a nepřesná. Linearitu modelu můžeme vypočítat pozorováním hodnoty korelačního koeficientu ( $r$ ) nebo koeficientu determinace ( $R^2$ ). Ideální analytická metoda by měla být, pokud možno, lineární a měla by být dosažena hodnota  $>0,99$ . Neexistuje žádný statistický způsob, jak předpovědět nebo vypočítat rozsah linearity metody a musí být stanoven empiricky pomocí experimentu, i když můžeme předpokládat, že podobné metody s podobným vybavením budou mít podobné rozsahy [81] [82] [83] [84].

Selektivita nebo specifická je posledním validačním parametrem a je definována jako schopnost metody identifikovat cílový analyt v přítomnosti potenciálně interferujících látek. Mezi nejběžnější analytické interference patří složky matrice, produkty degradace, metabolity a další strukturně příbuzné sloučeniny. V praxi, i když je selektivita pro sledovaný analyt požadovaným parametrem, separační metody jako je GC nebo HPLC samotné, mohou poskytnout pouze omezená instrumentální řešení k jeho dosažení. To nás nutí používat místo toho metody předúpravy vzorku, např. SPME nebo podobné extrakční prekoncentrační techniky. Dnešní moderní technologie, jako je MS nebo MS/MS, nám dávají možnost izolovat vybrané ionty, což usnadňuje optimalizaci selektivity. Existují však případy, ve kterých by snížení selektivity bylo prospěšné, jako například v testech určených k detekci celé třídy sloučenin. Příklady zahrnují zkříženou reaktivitu protilátek, která je nezbytná v imunitestech používaných ke screeningu více léků nebo tříd léků. Screeningové metody jsou každopádně nakonec spárovány s testovacími metodami, které k potvrzení výsledků používají odlišnou analytickou metodu se zvýšenou selektivitou [81] [82] [83] [84].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Náplní experimentální části byl návrh, optimalizace a validace metody pro separaci a analýzu vybraných léčiv narkolepsie pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi ve spojení s MS detektorem. Použitými léčivy byly konkrétně pitolisant, komerčně známý jako Wakix, a fluoxetin, komerčně dostupný jako Prozac. Vývoj metody se skládal ze dvou diskrétních fází, kde v první fázi, využívající podmínek izokratické eluce, byla z dostupných kolon vybrána ta, na které se analyzované standardy dělily nejúčinněji. V druhé fázi byla zvolená kolona použita pro vývoj a optimalizaci metody v režimu gradientové eluce. Vyvinutá metoda byla následně validována v rámci přesnosti, správnosti, linearity, reprodukovatelnosti, LOD a LOQ. Poslední částí experimentální úlohy bylo ověřit využití optimalizované a validované metody pro analýzu residuálního obsahu analyzovaných léčiv v metabolizovaném extraktu lidských mozkových buněčných kultur.

### 2.1 Použitá instrumentace a vybavení

#### 2.1.1 Instrumentace využitá na přípravu roztoků

K navažování standardních látek byly využity analytické digitální váhy Sartorius (Sartorius AG, Göttingen, Německo) společně s dodatečným vybavením jako jsou lodičky a špachtle.

Na odměřování objemů kapalných chemikálií v řádu mikrolitrů byly využity automatické mikropipety Thermo Fischer Scientific, modelů 100–1000  $\mu\text{l}$ , 10–100  $\mu\text{l}$  a 1–10  $\mu\text{l}$  (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA).

Připravené roztoky byly následně vortexovány na vortexu Yellowline TTS2 (IKAworks Inc., Staufen, Německo).

#### 2.1.2 LC/MS systém

Na analýzu všech připravených roztoků byl použit Agilent 1260 Infinity II HPLC systém obsahující zásobníky na mobilní fáze, kvarterní čerpadlo se směšovací komorou, integrovaný degaser, autosampler, kolonový termostat, DA a MS (jednoduchý kvadrupól) detektor (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornie, USA).

#### 2.1.3 Kolony

Pro tuto práci byly zváženy a testovány čtyři různé kolony s obrácenými fázemi:

- Kinetex C18 (délka 150 mm; vnitřní průměr 3 mm; velikost částic 2,6  $\mu\text{m}$ , Phenomenex Inc., Torrance, Kalifornie, USA)

- YMC–UltraHT Hydrosphere C18 (délka 100 mm; vnitřní průměr 2 mm; velikost částic 2 µm, YMC America Inc., Devens, Massachusetts, USA)
- Arion Plus C18 (délka 100 mm; vnitřní průměr 2,1 mm; velikost částic 2,2 µm, Chromservis s.r.o., Praha, Česká republika)
- Evosphere Diphenyl (délka 150 mm; vnitřní průměr 3 mm; velikost částic 3 µm, Fortis Technologies, Neston, Cheshire, Spojené Království)

## **2.2 Použité chemikálie a standardní látky**

### **2.2.1 Mobilní fáze a aditiva**

Na přípravu mobilních fází pro všechny analýzy byly použity následné chemikálie:

- Acetonitril  $\geq 99,9$  % LC-MS grade (Sigma-Aldrich s.r.o., Burlington, Massachusetts, USA)
- Methanol  $\geq 99,9$  % LC-MS grade (Honeywell International Inc., Charlotte, Severní Karolína, USA)
- Voda LiChrosolv MQ100 LC-MS grade (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Kyselina octová 100 % LC-MS grade (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí 98 – 100 % LC-MS grade (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Octan amonný  $\geq 98$  % LC-MS grade (Sigma-Aldrich s.r.o., Burlington, Massachusetts, USA)

### **2.2.2 Standardy**

Pro vývoj metody schopné analýzy komerčně používaných přípravků byly použity následující standardy:

- Pitolisant hydrochlorid  $\geq 98$  % HPLC grade (Sigma-Aldrich s.r.o., Burlington, Massachusetts, USA)
- Fluoxetin hydrochlorid MQ300 HPLC grade (Sigma-Aldrich s.r.o., Burlington, Massachusetts, USA)
- Thiomočovina (ze zásob Univerzity Pardubice)

### **2.3 Příprava standardních roztoků a kalibrační řady**

Zásobní roztoky pitolisantu a fluoxetinu o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny navážením příslušného množství standardu a rozpuštěním v demineralizované vodě. Roztok byl následně vortexován do rozpuštění navážky. Z takto připravených zásobních roztoků byly ředěním připraveny roztoky individuálních standardů a směs o koncentraci 0,1 mg/l, které byly využity pro vývoj a optimalizaci LC-MS metody.

Podobným způsobem byl připraven i roztok thiomocoviny (koncentrace 1 mg/l), který byl využit pro zjištění mrtvých časů vybraných kolon.

Pro účely kvantitativní analýzy a validaci metody byla připravena kalibrační křivka směsi pitolisantu a fluoxetinu na následujících koncentračních úrovních: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 a 1 mg/l.

### **2.4 Příprava vzorků z metabolizovaných extraktů**

Vzorky metabolizovaných extraktů lidských mozkových buněk byly obdrženy ve spolupráci s Katedrou biologických a biochemických věd (KBBV), Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice. Lidské mozkové buňky z linie SH-SY5Y (CRL-2266, ATCC, USA) byly nejprve nasazeny do kultivačního média a inkubovány po dobu 24 hodin. Destičky s nasazenými liniemi byly následně vystaveny roztokům standardních látek o počátečních úrovních koncentrace 10 a 100  $\mu\text{mol/l}$  pro každou látku. Po 3 hodinách metabolizace byla provedena extrakce intracelulárního (IC) a extracelulárního (EC) prostoru. Pro přípravu vzorků IC prostoru bylo buněčné médium nejprve desetkrát naředěno kyselinou metafosforečnou a ponecháno inkubovat 10 minut v chladničce. Pro přípravu vzorků EC prostoru bylo buněčné médium nejprve naředěno 5% kyselinou metafosforečnou v poměru 1:2 a ponecháno inkubovat 10 minut v chladničce. Po uplynutí doby byly všechny vzorky zfiltrány a centrifugovány (20000g) po dobu 10 minut. Připravené extrakty byly následně desetkrát zředěny demineralizovanou vodou a převedeny do vialek. Takto připravené roztoky byly změřeny vyvinutou a validovanou HPLC/MS metodou s gradientovou elucí a vyhodnoceny pomocí modelu odezvy kalibrační řady.

### **2.5 HPLC/MS analýza látek**

Na základě výsledků optimalizace byly finální separace uskutečněny na koloně Kinetex C18. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu (mobilní fáze B) a demineralizované vody s 0,025% (v/v) obsahem kyseliny mravenčí (mobilní fáze A). Analýza probíhala metodou gradientové eluce podle následného programu: 0 min - 20 % B; 10 min - 50 % B;

10,01 min – 100 % B; 12 min – 100 % B (v/v). Po ukončení analýzy následovala pětiminutová ekvilibrace systému na původní podmínky (20 % B (v/v)). Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na konstantní hodnotu 0,4 ml/min. Kolona byla udržována při konstantní teplotě 40 °C. Dávkovaný objem pro všechny analýzy byl 1 µl.

Hmotnostní spektrometr byl nastaven na následující podmínky. Látky byly ionizovány elektrosprejem v pozitivním módu (napětí kapiláry 3500 V; teplota sušícího plynu 325 °C; průtok sušícího plynu 13 l/min; tlak v nebulizéru 55 psi). Záznamy analýz probíhaly ve SCAN módu s hodnotou fragmentační energie 95 V a s rozsahem m/z 50 - 400. Pro účely kvantitativní analýzy byl využit SIM mód nastavený na hodnotu m/z 296 s fragmentační energií 115 V pro pitolisant a dále na hodnotu m/z 310 s fragmentační energií 55 V pro fluoxetin. Vyhodnocování výsledků probíhalo v software Agilent OpenLAB CDS 2.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Volba kolony na základě výsledků izokratické eluce

Pro výběr nejvhodnější kolony byly na vybraných kolonách postupně proměřeny individuální standardy obou léčiv o koncentraci 0,1 mg/l metodou izokratické eluce. Mobilní fáze se v této části skládala z 0,1% (v/v) vodného roztoku kyseliny octové a acetonitrilu. Počáteční průtok byl nastaven na arbitrární hodnotu 0,4 ml/min, která byla u dalších kolon změněna tak, aby lineární rychlost mobilní fáze zůstala konstantní. Teplota mobilní fáze byla u všech měření nastavena na konstantní hodnotu 30 °C. Obsah organické fáze byl v těchto měřeních volen tak, aby analyty setrvaly v koloně po dobu šesti až osmi minut. Jakmile byl odpovídající podíl organické fáze nalezen, byla provedena dvě následující měření, kde poměr organické fáze byl snížen a zvýšen o 5 % (v/v) a byl zaznamenán efekt na eluci látek. Z chromatogramů byly odečteny šířky píků v základně i v polovině výšky a retenční čas. Ze získaných retenčních charakteristik, včetně mrtvého času všech kolon, byl vypočten retenční faktor látek pomocí Rovnice 1 a účinnost kolony pomocí Rovnice 2. Symetrie odečtených píků byla vypočítána softwarem pomocí Rovnice 3; 4; 5; 6 a 7. Na základě hodnot účinnosti, celkového času analýzy a symetrie píků byla vybrána nejvhodnější kolona. Odečtené i vypočtené retenční a kinetické charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 1.

**Rovnice 1:** Výpočet retenčního faktoru

$$k_R = \left( \frac{RT - TM}{TM} \right)$$

$k_R$  ... retenční faktor složky

$RT$  ... retenční čas složky

$TM$  ... mrtvý čas kolony

**Rovnice 2:** Výpočet účinnosti kolony

$$N_{0.5} = 5,545 \cdot \left( \frac{RT_{opt}}{w_{0.5opt}} \right)^2$$

$N_{0.5}$  ... účinnost kolony vypočtená z šířky píku odečtené v polovině jeho výšky

$RT_{opt}$  ... retenční čas složky odečtený z analýzy s optimální hodnotou 6-8 min

$w_{0.5opt}$  ... šířka píku odečtená v polovině jeho výšky z analýzy s optimální hodnotou

$RT$  6 - 8 min

**Rovnice 3:** Výpočet rovnicového komponentu  $m_1$  výpočtu píkové symetrie

$$m_1 = a_1 \cdot \left( t_2 + \frac{a_1}{1,5 \cdot H_f} \right)$$

**Rovnice 4:** Výpočet rovnicového komponentu  $m_2$  výpočtu píkové symetrie

$$m_2 = \frac{a_2^2}{0,5 \cdot H_f + 1,5 \cdot H}$$

**Rovnice 5:** Výpočet rovnicového komponentu  $m_3$  výpočtu píkové symetrie

$$m_3 = \frac{a_3^2}{0,5 \cdot H_r + 1,5 \cdot H}$$

**Rovnice 6:** Výpočet rovnicového komponentu  $m_4$  výpočtu píkové symetrie

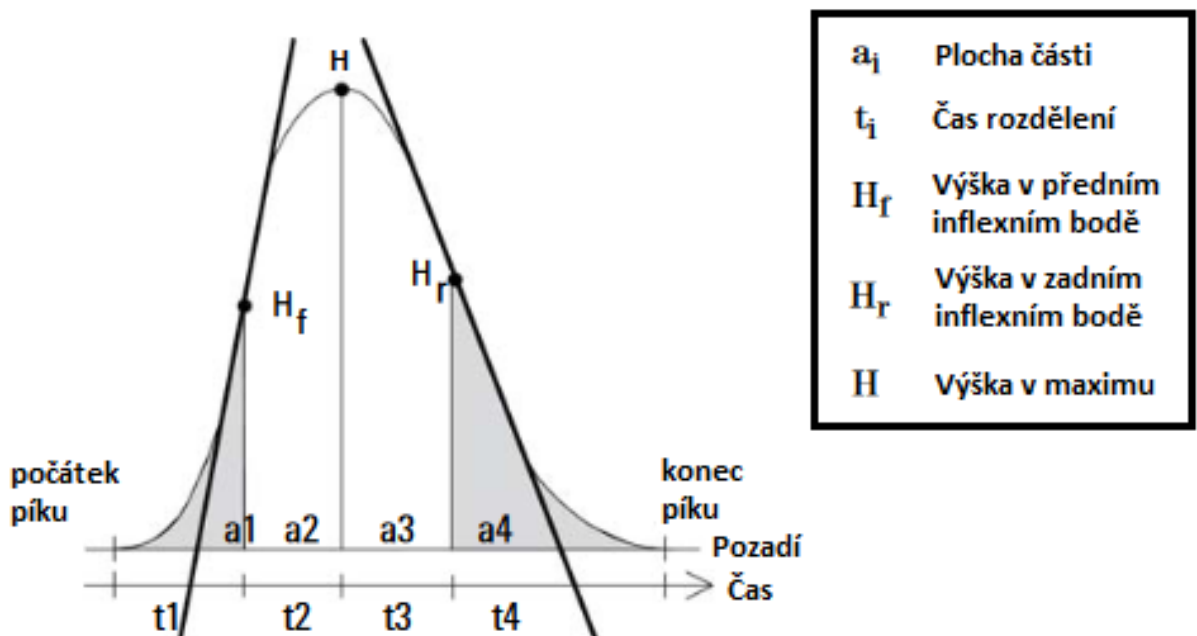
$$m_4 = a_4 \cdot \left( t_3 + \frac{a_4}{1,5 \cdot H_r} \right)$$

**Rovnice 7:** Výpočet symetrie píku z předem vypočítaných komponentů

$$\text{píková symetrie} = \sqrt{\frac{m_1 + m_2}{m_3 + m_4}}$$

Kde význam jednotlivých členů rovnic ve vztahu k tvaru píku jsou uvedeny na Obrázku 7.

**Obrázek 7:** Grafické znázornění pozice softwarem odečtených hodnot potřebných k výpočtu píkové symetrie a jejich definice [85]

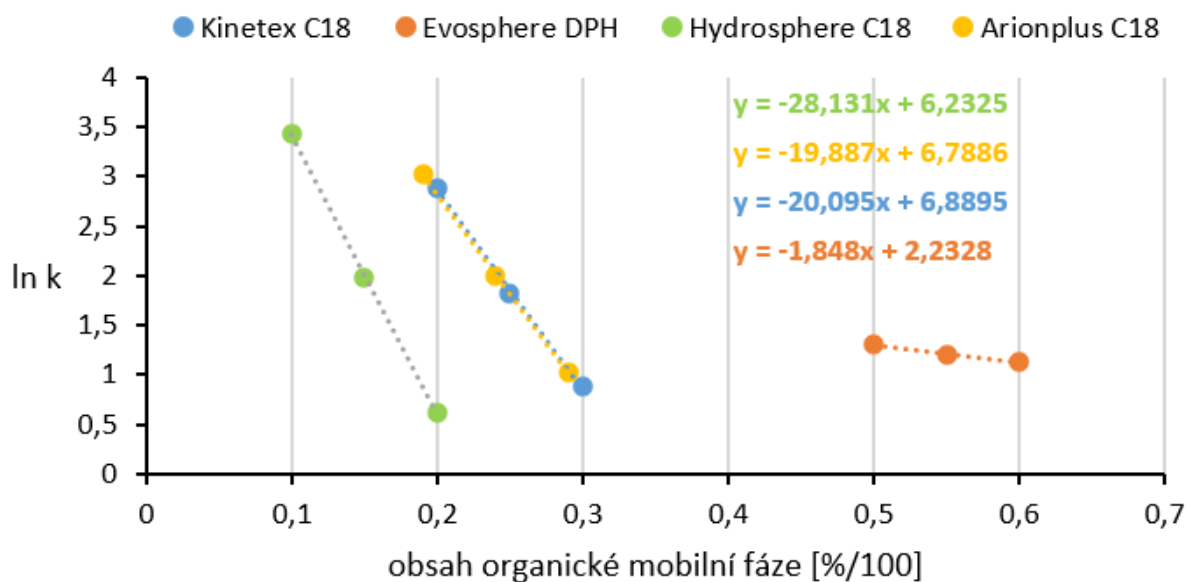




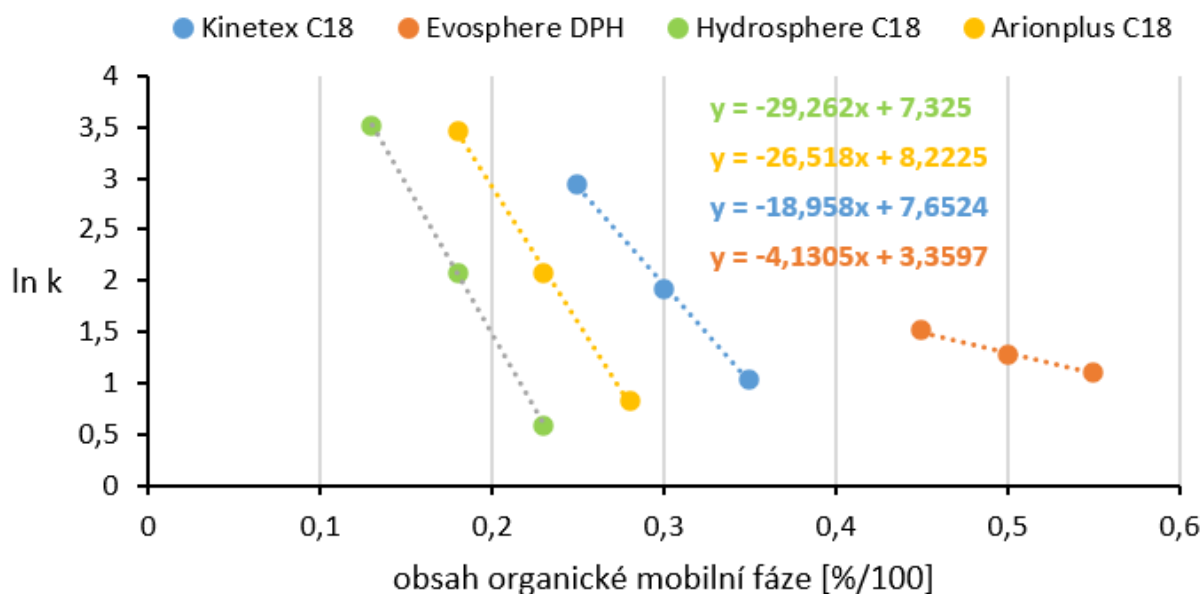
**Tabulka 1:** Retenční a kinetické charakteristiky léčiv narkolepsie na vybraných kolonách

	Kolona	$\varphi B_{opt}$ [%]	$RT_{opt}$ [min]	w [min]	$w_{0.5}$ [min]	Symetrie	$N_{0.5}$ [PTP]	TM [min]
	Pitolisant	Kinetex C18	25	7,096	4,413	0,217	0,411	5949
Evosphere DPH		55	7,160	1,398	0,288	1,808	3427	1,65
Hydrosphere C18		15	6,675	10,57	0,392	0,162	1607	0,812
Arionplus C18		24	6,290	6,506	0,914	0,223	262	0,75
	Kolona	$\varphi B_{opt}$ [%]	$RT_{opt}$ [min]	w [min]	$w_{0.5}$ [min]	Symetrie	$N_{0.5}$ [PTP]	TM [min]
	Fluoxetin	Kinetex C18	30	7,640	1,617	0,185	0,632	9456
Evosphere DPH		50	7,465	1,462	0,218	1,413	6532	1,634
Hydrosphere C18		18	7,116	3,06	0,222	0,21	5687	0,795
Arionplus C18		23	6,763	2,018	0,309	0,589	2656	0,75

Hodnoty retenčních faktorů byly zlogaritmovány a v závislosti na obsahu organické fáze byly sestrojeny izokratické retenční modely obou látek na jednotlivých kolonách, viz. Obrázek 8 a 9.

**Obrázek 8:** Retenční modely pitolisantu měřené izokratickou elucí na dostupných kolonách

**Obrázek 9:** Retenční modely fluoxetinu měřené izokratickou elucí na dostupných kolonách



### 3.1.1 Kinetex C18

Na koloně Kinetex C18 byly pro analýzu pitolisantu použity koncentrace organické mobilní fáze 20, 25 a 30 % (v/v), zatímco pro analýzu fluoxetinu byly použity podobné hodnoty 25, 30 a 35 % (v/v). Všechna měření byla provedena za konstantního průtoku 0,692 ml/min. Retenční faktory vypočtené z retenčních časů a jejich logaritmované hodnoty pro jednotlivé látky jsou uvedeny v Tabulce 2. Účinnost této kolony, vypočtená z retenčního času a šířky odečtené z poloviny píku obou standardů v optimálním měření (viz. Tabulka 1) se rovnala 5949 teoretických pater pro pitolisant a 9456 teoretických pater pro fluoxetin. U obou měření byla píková symetrie nižší než 1 (viz. Tabulka 1) naznačující zvýšenou asymetrii na konci píku. Hodnoty účinnosti dosahovaly na této koloně nejvyšších hodnot (viz. Tabulka 1) ve srovnání s ostatními kolonami a šířky píků, odečtené v polovině jejich výšky, byly nejmenší. Uvedený fakt je zajímavý s ohledem na to, že kolona Kinetex C18 nemá nejmenší částice ze studované sady kolon. Nejlepší kinetické parametry tak mohou být ovlivněny tloušťkou porézní vrstvy částic, nebo sekundární úpravou částic a potlačením interakcí s volnými silanoly (endcapping). Z těchto důvodů byla kolona Kinetex C18 vybrána jako nejvhodnější kandidát pro další optimalizaci separace analyzovaných léčiv.

**Tabulka 2:** Retenční časy, faktory a jejich logaritmované hodnoty léčiv narkolepsie pro kolonu Kinetex C18

Pitolisant				Fluoxetin			
% B	RT [min]	k	ln k	% B	RT [min]	k	ln k
20	18,632	17,974	2,889	25	19,435	18,852	2,937
25	7,096	6,226	1,829	30	7,640	6,804	1,918
30	3,348	2,409	0,879	35	3,751	2,831	1,041

### 3.1.2 Evosphere DPH

Na analýzu pitolisantu byly pro tuto kolonu použity koncentrace organické mobilní fáze 50, 55 a 60 % (v/v), zatímco pro analýzu fluoxetinu byly použity podobné hodnoty 45, 50 a 55 % (v/v). Všechna měření byla provedena za konstantního průtoku 0,6 ml/min. Retenční faktory vypočtené z retenčních časů a jejich logaritmované hodnoty pro jednotlivé látky jsou uvedeny v Tabulce 3. Účinnost této kolony, vypočtená z retenčního času a šířky odečtené z poloviny píku obou standardů v optimálním měření (viz. Tabulka 1) se rovnala 3427 teoretických pater pro pitolisant a 6532 teoretických pater pro fluoxetin. U obou měření byla píkova symetrie vyšší než 1 (viz. Tabulka 1) naznačující zvýšenou asymetrii na začátku píku. Tato kolona má na rozdíl od ostatních kolon v této části zcela odlišné retenční modely obou léčiv, jak je viditelné na Obrázku 8 a 9. Retence látek nebyla v měřeném rozsahu silně ovlivněna změnou obsahu organické mobilní fáze.

**Tabulka 3:** Retenční časy, faktory a jejich logaritmované hodnoty léčiv narkolepsie pro kolonu Evosphere DPH

Pitolisant				Fluoxetin			
% B	RT [min]	k	ln k	% B	RT [min]	k	ln k
50	7,790	3,721	1,314	45	9,046	4,536	1,512
55	7,160	3,339	1,206	50	7,465	3,569	1,272
60	6,754	3,093	1,129	55	6,538	3,001	1,099

### 3.1.3 Hydrosphere C18

Kolona Hydrosphere C18 byla první měřenou kolonou, a proto všechna měření byla provedena za konstantního průtoku 0,4 ml/min. Na analýzu pitolisantu byly na této koloně použity koncentrace organické mobilní fáze 10, 15 a 20 % (v/v), zatímco pro analýzu fluoxetinu byly použity podobné hodnoty 13, 18 a 23 % (v/v). Retenční faktory vypočtené

z retenčních časů a jejich logaritmované hodnoty pro jednotlivé látky jsou uvedeny v Tabulce 4. Účinnost této kolony, vypočtená z retenčního času a šířky odečtené z poloviny píku obou standardů v optimálním měření (viz. Tabulka 1) se rovnala 1607 teoretických pater pro pitolisant a 5687 teoretických pater pro fluoxetin. U obou měření byla píkova symetrie nižší než 1 (viz. Tabulka 1) naznačující zvýšenou asymetrii na konci píku.

**Tabulka 4:** Retenční časy, faktory a jejich logaritmované hodnoty léčiv narkolepsie pro kolonu Hydrosphere C18

Pitolisant				Fluoxetin			
% B	RT [min]	k	ln k	% B	RT [min]	k	ln k
10	26,07	31,106	3,437	13	27,473	33,557	3,513
15	6,675	7,220	1,977	18	7,116	7,951	2,073
20	2,328	1,867	0,624	23	2,225	1,799	0,587

### 3.1.4 Arion Plus C18

Pro tuto kolonu byly pro analýzu pitolisantu použity koncentrace organické mobilní fáze 19, 24 a 29 % (v/v), a pro analýzu fluoxetinu byly použity podobné hodnoty 18, 23 a 28 % (v/v). Tato kolona se svými dimenzemi velice podobala předchozí koloně Hydrosphere C18. Z tohoto důvodu všechna měření byla provedena za konstantního průtoku 0,401 ml/min. Retenční faktory vypočtené z retenčních časů a jejich logaritmované hodnoty pro jednotlivé látky jsou uvedeny v Tabulce 5. Účinnost této kolony, vypočtená z retenčního času a šířky odečtené z poloviny píku obou standardů v optimálním měření (viz. Tabulka 1) se rovnala 262 teoretických pater pro pitolisant a 2656 teoretických pater pro fluoxetin. U obou měření byla píkova symetrie nižší než 1 (viz. Tabulka 1) naznačující zvýšenou asymetrii na konci píku. Jak lze vidět z Tabulky 2, účinnost optimální separace pro pitolisant na této koloně byla výrazně nižší než u jiných kolon. Hodnota šířky v základně i v polovině výšky píku je také výrazně vyšší než u dalších kolon.

**Tabulka 5:** Retenční časy, faktory a jejich logaritmované hodnoty léčiv narkolepsie pro kolonu Arionplus C18

Pitolisant				Fluoxetin			
% B	RT [min]	k	ln k	% B	RT [min]	k	ln k
19	16,092	20,456	3,018	18	24,855	32,140	3,470
24	6,290	7,387	2,000	23	6,763	8,017	2,082
29	2,850	2,800	1,030	28	2,450	2,267	0,818

### 3.2 Výběr vhodného aditiva do mobilní fáze

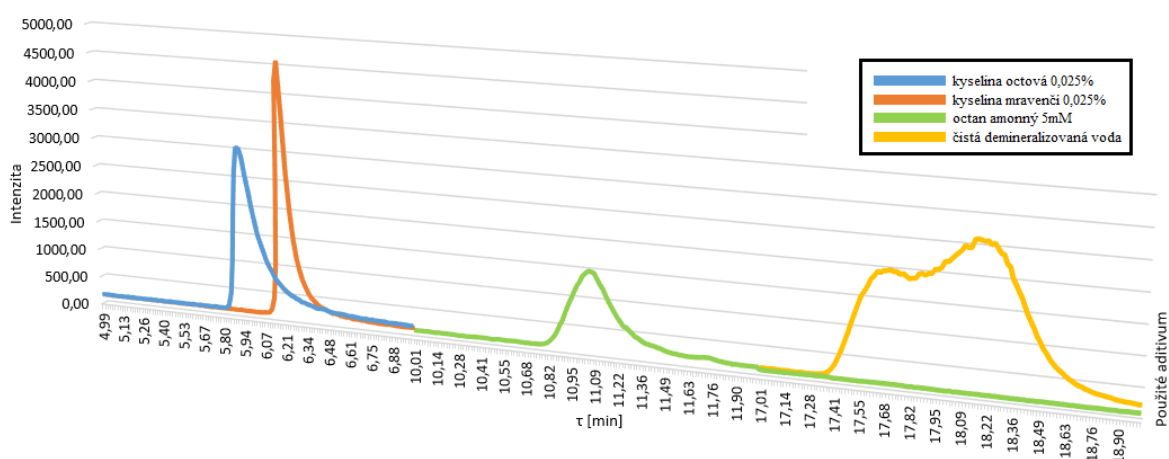
Dalším krokem v optimalizaci metody bylo vybrat vhodné aditivum do vodné mobilní fáze A. Byl testován vliv tří různých aditiv: kyseliny octové, kyseliny mravenčí a octanu amonného. Dodatečně byl ještě testován průběh analýzy s mobilní fází bez přídavku aditiva. Všechna dostupná aditiva byla měřena při třech úrovních koncentrace (viz. Tabulka 6) pokud výsledky jejich měření byly vyhovující z hlediska délky analýzy, výšky a vzhledu píků. K analýzám byl použit směsný standard všech léčiv o koncentraci 0,1 mg/l. Pro usnadnění separace látek probíhala separace na koloně vybrané jako nejúčinnější metodou gradientové eluce. Počáteční úroveň gradientu byla arbitrárně nastavena na 20 % (v/v) organické fáze B a 80 % (v/v) vodné fáze A s přidanou úrovní aditiva. Gradient následně pokračoval lineárně na 50 % B (v/v) a 50 % A (v/v) v 10. minutě analýzy. Po ukončení analýzy následovala pětiminutová ekvilibrace systému na původní podmínky (20 % B (v/v)). Všechna měření probíhala za konstantní teploty 30 °C a průtoku 0,692 ml/min.

**Tabulka 6:** Použitá aditiva do vodné mobilní fáze a úrovně jejich koncentrací během analýz

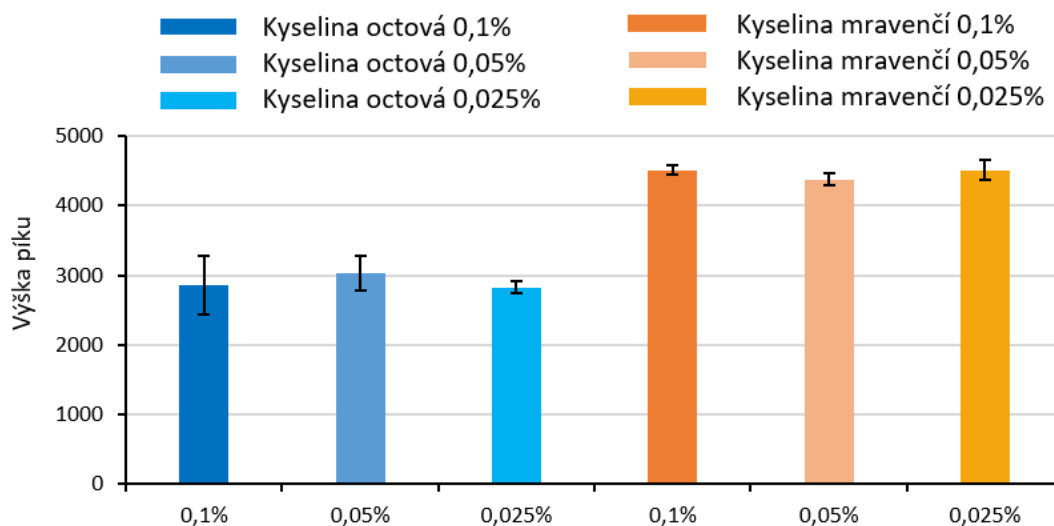
Použitá aditivum:	Kyselina octová	Kyselina mravenčí	Octan amonný	Čistá voda
Experiment	$\varphi$ CH <sub>3</sub> COOH [%]	$\varphi$ HCOOH [%]	c CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> [mM]	$\varphi$ H <sub>2</sub> O [%]
1	0,1	0,1	10	100
2	0,05	0,05	5	-
3	0,025	0,025	-	-

Z analyzovaných dat byly nejprve vykresleny chromatogramy zobrazující průběh separace obou složek (viz. Obrázek 10 a 12). Chromatogramy analýz jednotlivých aditiv byly složeny do jednotného grafu pro lepší vizualizaci výsledků a efektu aditiva na retenci daného léčiva. Na následujících grafech jsou zobrazeny chromatogramy využívající nejnižší změřenou úroveň koncentrace aditiv.

**Obrázek 10:** Chromatogram analýz s různými aditivy vodné mobilní fáze pitolisantu



**Obrázek 11:** Vliv typu a koncentrace [% (v/v)] kyselých aditiv na výšku píků pitolisantu se zobrazenou směrodatnou odchylkou měření (n=3)

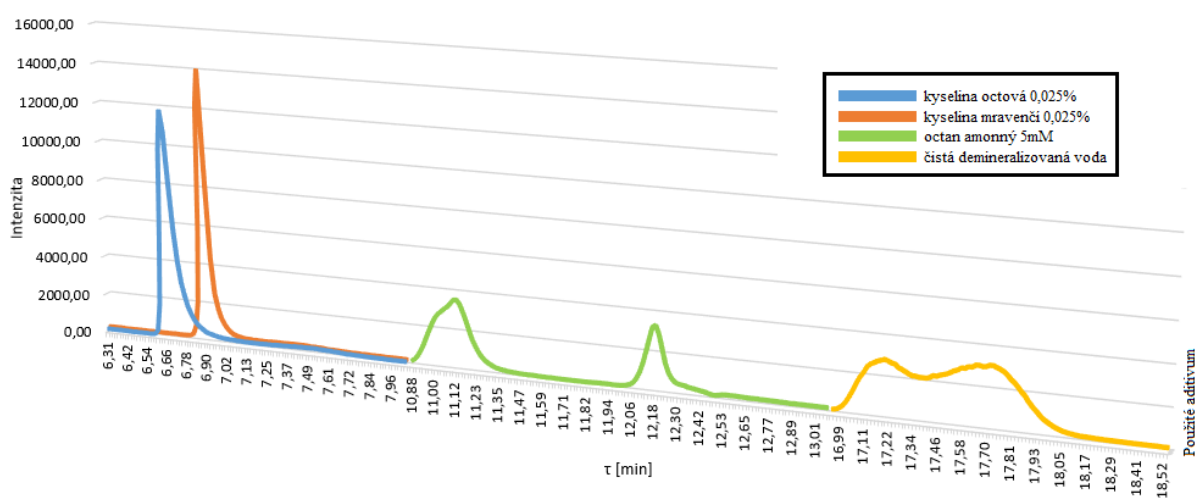


Na Obrázku 10 zobrazujícím průběh separace pitolisantu lze postřehnout několik podstatných efektů aditiv. Za prvé, přidavkem kyselina mravenčí či kyseliny octové nedochází k silnému ovlivnění separace a látka eluuje v oblasti páté až šesté minuty analýzy. Zároveň lze vidět i zjevný rozdíl ve výšce zmíněných píků, kde analýza s přidavkem kyseliny mravenčí poskytovala podstatně užší a vyšší píky než analýza s přidavkem kyseliny octové. Lepší ilustraci toho efektu lze vidět na Obrázku 11, kde je snadno viditelné jak v analýzách s přidavkem kyseliny mravenčí jsou nejen větší výšky píků, ale i nižší směrodatné odchylky výšky píků při opakovaných analýzách. V obou analýzách jsou píky asymetrické na konci píku, ale z Obrázku 10 je viditelné, že v analýze s přidavkem kyseliny mravenčí je efekt asymetrie mnohem menší.

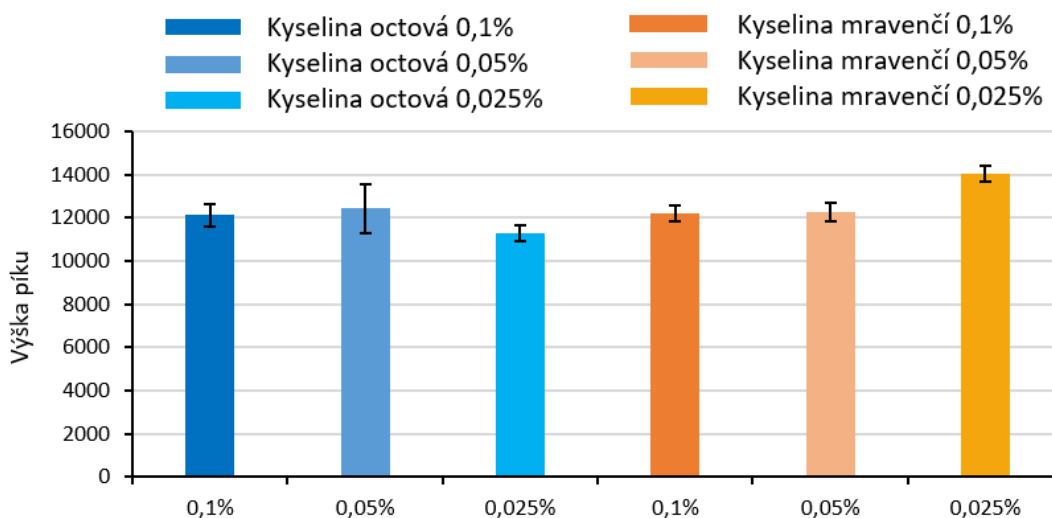
Druhý efekt, který lze z chromatogramu extrahovat, je vliv přídavku octanu amonného na retenční chování pitolisantu. Dochází zde k podstatnému prodloužení analýzy až do úrovně, kde předem stanovený gradient nestačil na separaci látek (docházelo k postgradientové eluci) a musel být nastaven rozsah gradientu na následující podmínky: 0 min - 20 % B; 23,33 min - 90 % B (v/v). Po ukončení analýzy následovala pětiminutová ekvilibrace systému na původní podmínky (20 % B (v/v)) (strmost modifikovaného gradientu byla zachována konstantní na původní hodnotě, tj. 3 %B/min). Pík pitolisantu je za těchto podmínek drasticky nižší a širší se silnou asymetrií na konci píku.

Podobný efekt lze vyzorovat i v analýze bez přídavku iontových aditiv, používající pouze čistou demineralizovanou vodu, kde opět dochází k prodloužení analýzy do úrovně, kde musel být použit modifikovaný program gradientu. Nicméně analýzou pitolisantu mobilní fázi bez jakéhokoli přídavku dochází k dodatečnému efektu. V chromatogramu se objevuje druhý pík, který částečně koeluuje s, a nelze ho hmotnostně rozlišit od píku pitolisantu. Důvod pro přítomnost druhého píku je neznámý, nicméně z koeluce píků by šlo uvažovat, že látky mají podobné vlastnosti a strukturu. Možnou hypotézou pro vysvětlení tohoto efektu je přítomnost pitolisantu v neionizované formě (Hydrochlorid pitolisantu), která by nepřítomností kyselých aditiv byla obsažena ve větších množstvích. Tato hypotéza však nevysvětluje, proč podobný efekt není patrný v analýze s přídavkem octanu amonného, který je v čisté formě pH neutrální, nicméně i octan amonný by v přítomnosti volné kyseliny chlorovodíkové, uvolněné z molekuly pitolisantu, tvořil kyselý roztok pufru s očekávanou hodnotou pH 4,75.

**Obrázek 12:** Chromatogram analýz s různými aditivy vodné mobilní fáze fluoxetinu



**Obrázek 13:** Vliv typu a koncentrace [% (v/v)] kyselých aditiv na výšku píků fluoxetinu se zobrazenou směrodatnou odchylkou měření (n=3)



Na Obrázku 12 zobrazujícím průběh separace fluoxetinu lze postřehnout několik podobných efektů aditiv. Jako u pitolisantu, přidavkem kyseliny octové nebo mravenčí nedochází k výraznému ovlivnění separace a látka eluuje v oblasti šesté až sedmé minuty. Opět lze vidět i zjevný rozdíl ve výšce píků, kde analýza s přidavkem kyseliny mravenčí poskytovala vyšší píky než analýza s přidavkem kyseliny octové, ale na rozdíl od pitolisantu není mezi píky tak výrazný rozdíl, jak lépe ukazuje schéma na Obrázku 13. Asymetrie píků je v obou analýzách minimální, ale v analýze s přidavkem kyseliny octové je asymetrie lehce vyšší.

U analýzy s přidavkem octanu amonného, která byla opět provedena metodou modifikovaného gradientu se stejnou strmostí 3 %B/min, lze vidět první podstatný rozdíl mezi analýzou pitolisantu a fluoxetinu. V této analýze se objevuje druhý pík, který nelze hmotnostně rozlišit od píku fluoxetinu. Výška obou píků je v porovnání s kyselými aditivy podstatně nižší a oba jsou silně asymetrické.

Analýza fluoxetinu bez přidavku aditiv poskytuje podobné výsledky jako u analýzy pitolisantu. Píky se opět objevují dva a vzájemně částečně koeluují. Píky jsou nízké a silně asymetrické. Hypotéza pro přítomnost extra píků v analýzách bez a s přidavkem octanu je stejná jako v minulém případě, kde originální forma standardu je také hydrochlorid fluoxetinu.

Z těchto výsledků lze vyhodnotit, že přidavek kyseliny mravenčí o koncentraci 0,025 % (v/v) má na retenci a odezvu MS detektoru obou léčiv nejvíce pozitivní účinky a v této analýze bylo rozhodnuto, že bude používán po zbytek práce.



### 3.3 Optimalizace programu gradientové eluce

Se stacionární i mobilní fází vybranou po zbytek analýz bylo dalším krokem optimalizovat podíl složek mobilní fáze a průběh gradientové eluce. Na vybrané koloně byly pro tuto analýzu změřeny tři gradienty s rozdílnou strmostí. Počáteční a koncové úrovně gradientu byly založeny na výsledcích z předchozí úlohy a arbitrárně sníženy nebo zvýšeny za účelem posouzení retenčního chování a dalších charakteristik, včetně rozlišení pitolisantu a fluoxetinu. K analýzám byl použit směsný standard všech léčiv o koncentraci 0,1 mg/l. Všechna měření probíhala za konstantní teploty 30 °C a průtoku 0,692 ml/min.

**Tabulka 7:** Program gradientů a výsledné retenční charakteristiky léčiv narkolepsie (TA = čas analýzy;  $b_G$  = strmost gradientu)

Gradienty			Pitolisant			Fluoxetin			Rozlišení
% B	TA [min]	$b_G$ [%B/min]	RT [min]	k	w [min]	RT [min]	k	w [min]	R
20 – 50	10	3	6,346	5,462	1,349	7,042	6,171	0,652	0,696
20 – 70	10	5	5,13	4,224	1,041	5,503	4,604	0,809	0,403
30 – 50	10	2	3,508	2,572	1,402	4,164	3,240	0,816	0,592

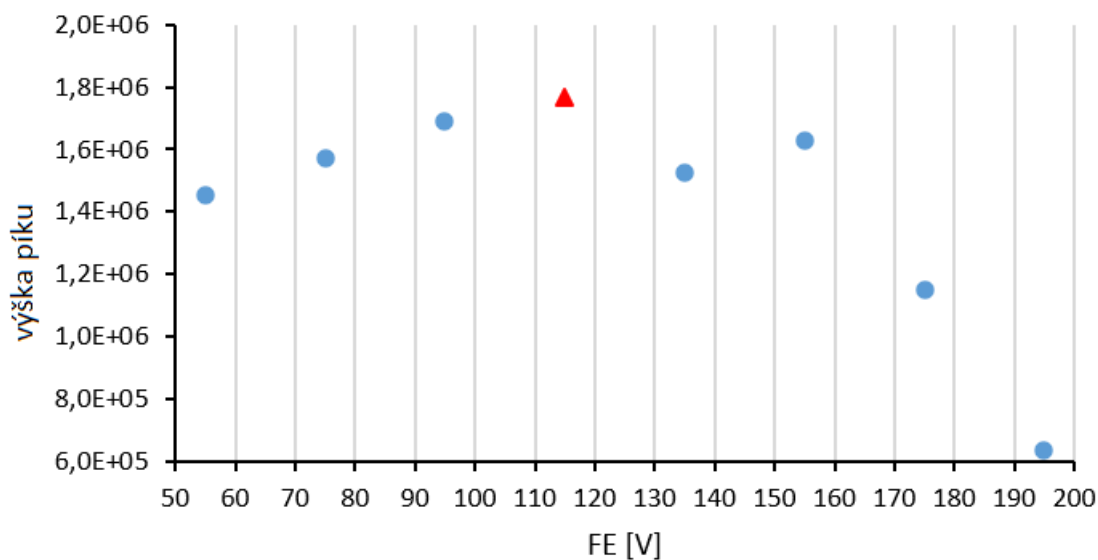
Ze získaných a vypočítaných retenčních charakteristik (viz. Tabulka 7) lze usoudit, že gradient použitý v předchozí metodě o průběhu: 0 min – 20 % B; 10 min – 50 % B (v/v) dosahoval nejlepších výsledků z hlediska rozlišení obou píků s přijatelnými retenčními časy, a proto byl zvolen jako optimální pro finální metodu.

### 3.4 Optimalizace fragmentační energie

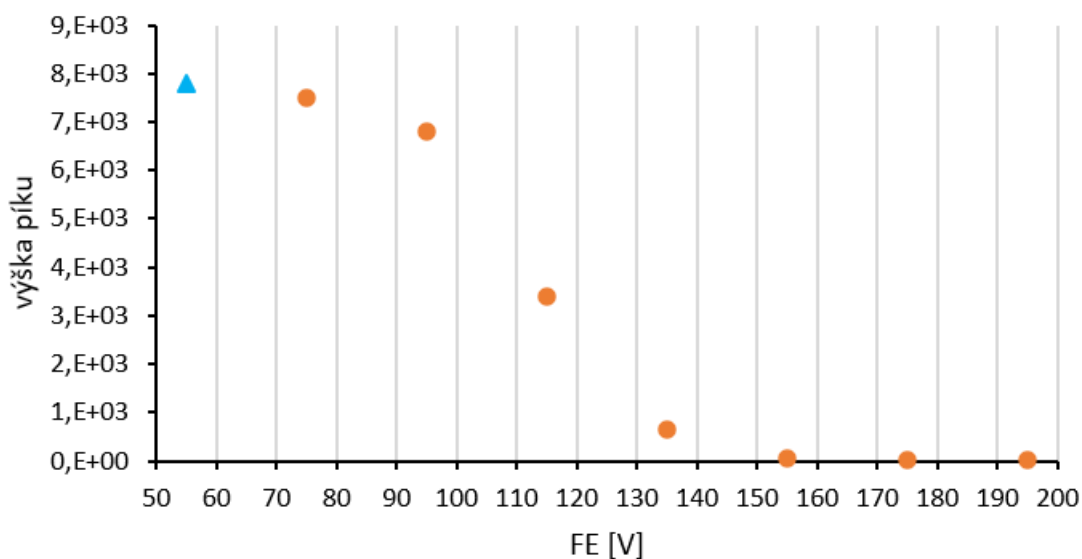
Dalším optimalizovaným parametrem byla fragmentační energie, což je ve své podstatě napětí vložené na používaný ionizační zdroj, které, pokud je dostatečně vysoké, má potenciál fragmentovat molekuly analytů na dílčí části, jejichž struktura a velikost je závislá na typu použité ionizace a originální struktuře analytů. Cílem optimalizace fragmentační energie v metodě, která se nezabývá analýzou fragmentů, bylo najít vhodné napětí, při kterém by se ionizovalo maximální množství analytu a zároveň minimum by bylo fragmentováno. Optimální bod v napětí vloženém na ionizační zdroj by byl tedy energetický práh před začátkem fragmentace v iontovém zdroji. K analýze byly použity podmínky určené jako optimální v předchozích kapitolách a vzorek směsného standardu všech léčiv o koncentraci 0,1 mg/l. Optimální fragmentační energie byla zjišťována v rozsahu 55 až 195 V s krokem 20 V. Z výsledného chromatogramu byla odečtena výška obou píků, která byla následně

vložena do závislosti na nastavené fragmentační energii (viz. Obrázek 14 a 15). Podle grafického znázornění byla následně zvolena fragmentační energie s nejvyšší výslednou výškou píku, resp. 115 V pro pitolisant a 55 V pro fluoxetin. Všechna měření probíhala za konstantní teploty 30 °C a průtoku 0,692 ml/min.

**Obrázek 14:** Grafické znázornění optimalizace fragmentační energie pitolisantu se zvýrazněným zvoleným optimem



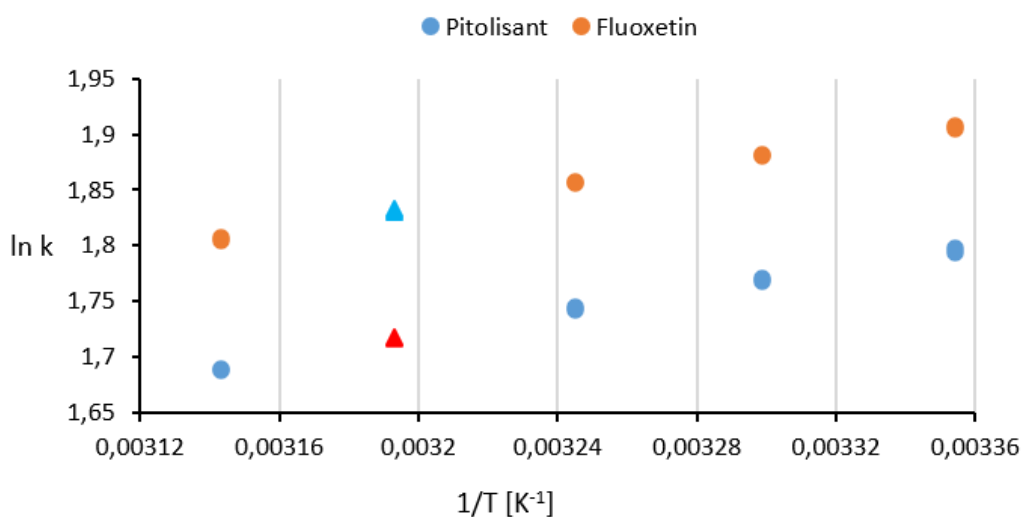
**Obrázek 15:** Grafické znázornění optimalizace fragmentační energie fluoxetinu se zvýrazněným zvoleným optimem



### 3.5 Optimalizace teploty separace

Jak bylo již uvedeno v kapitole 1.2.5.2, charakteristiky metody lze ovlivnit rovněž změnou teploty kolony. Zvýšením teploty by teoreticky šlo docílit rychlejší analýzy. V této analýze byly opět použity všechny předem stanovené optimální podmínky a směsný standard všech léčiv o koncentraci 0,1 mg/l. Standard byl měřen při pěti teplotách (25; 30; 35; 40 a 45 °C) metodou gradientové eluce. Ze získaných chromatogramů byly odečteny retenční časy a výšky obou píků. Ze získaných dat byly dále vypočteny retenční faktory obou látek v gradientu, které byly následně zlogaritmovány a vloženy do závislosti s převrácenou hodnotou teploty převedené na jednotky Kelvinů (viz. Obrázek 16). Z výsledného grafu je viditelné, že se zvyšující teplotou dochází ke snížení retence obou látek.

**Obrázek 16:** Vliv teploty na retenci obou léčiv se zvýrazněným zvoleným bodem optima



Na základě těchto výsledků bylo rozhodnuto v dalších analýzách využít teplotu 40 °C z důvodu urychlení separace, zisku užších píků a menšího rizika degradace stacionární fáze v porovnání s teplotou 45 °C.

### 3.6 Optimalizace průtoku mobilní fáze

Pro dosažení co nejvyšší účinnosti separace byla pozornost dále věnována optimální hodnotě průtoku, resp. optimální lineární rychlosti mobilní fáze. Toho bylo dosaženo na základě van Deemterovy teorie a tzv. H-u křivky, tedy závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze. Principem Van Deemterovy teorie je, zjednodušeně, že při příliš vysokých či příliš nízkých rychlostech analýzy dochází ke snížení účinnosti separace. Při nadměrně vysokých rychlostech jsou látky eluovány dřív než jsou schopné se účinně rozdělit, zatímco při moc nízkých rychlostech dochází k retenci složek v částicích stacionární fáze a jejich eluce trvá podstatně déle. Běžný tvar H-u křivky je tedy přibližně

parabolický, kde bod v minimu křivky by měl znamenat optimální rychlost mobilní fáze za zisku maximální účinnosti. Je tady ovšem limitující faktor celkového času analýzy, kde při příliš nízkých rychlostech trvají analýzy příliš dlouho. Cílem optimalizace lineární rychlosti mobilní fáze je tedy najít co nejvyšší rychlost mobilní fáze, která má dostatečně vysokou výslednou účinnost.

H-u křivka se měří při konstantních podmínkách izokratické eluce. Pro tuto analýzu byl zvolen režim izokratické eluce o konstantním složení mobilní fáze s 30% obsahem organické fáze B a 70% obsahem předem optimalizované vodné fáze. K analýze byl použit směsný standard všech léčiv o koncentraci 0,1 mg/l a standardní roztok thiomocoviny o koncentraci 1 mg/l pro určení mrtvého objemu při dané hodnotě průtoku. Všechna měření probíhala při předem optimalizované teplotě 40 °C. Hodnoty analyzovaných průtoků byly zvoleny arbitrárně v rozsahu <0,03; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 ... 0,7> ml/min s krokem 0,5 ml/min u průtoků s hodnotou přesahující 0,05 ml/min. Čas analýzy byl nastaven individuálně pro každý průtok, tak aby došlo k úplné eluci všech složek. Ze získaných chromatogramů byly, mimo mrtvých časů, odečteny i retenční časy a šířky píků v polovině výšky píku. Ze získaných dat byly vypočteny lineární rychlosti mobilní fáze podle Rovnice 8 a účinnosti separace pro jednotlivé složky, které byly následně přepočteny pomocí dimenzí kolony na výšku teoretického patra podle Rovnice 9. Na Obrázku 17 a 18 lze vidět zkonstruované H-u křivky a zvolený bod optimální rychlosti mobilní fáze.

**Rovnice 8:** Výpočet lineární rychlosti toku mobilní fáze pro odpovídající hodnoty průtoku

$$u = \left( \frac{l}{TM} \right)$$

u ... odpovídající lineární rychlost mobilní fáze pro daný průtok

l ... délka kolony (Pro Kinetex C18: 150 mm)

TM ... mrtvý čas kolony pro daný průtok

**Rovnice 9:** Přepočet účinnosti kolony spočítané z šířky píku odečteného v polovině jeho výšky na odpovídající výšku teoretického patra

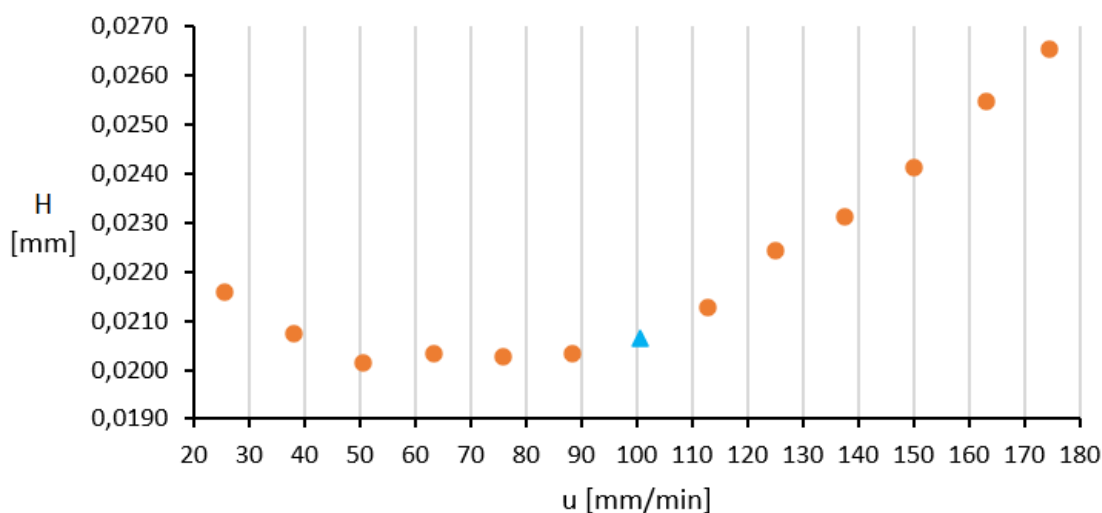
$$H = \left( \frac{N_{0.5}}{l} \right)$$

H ... výška teoretického patra

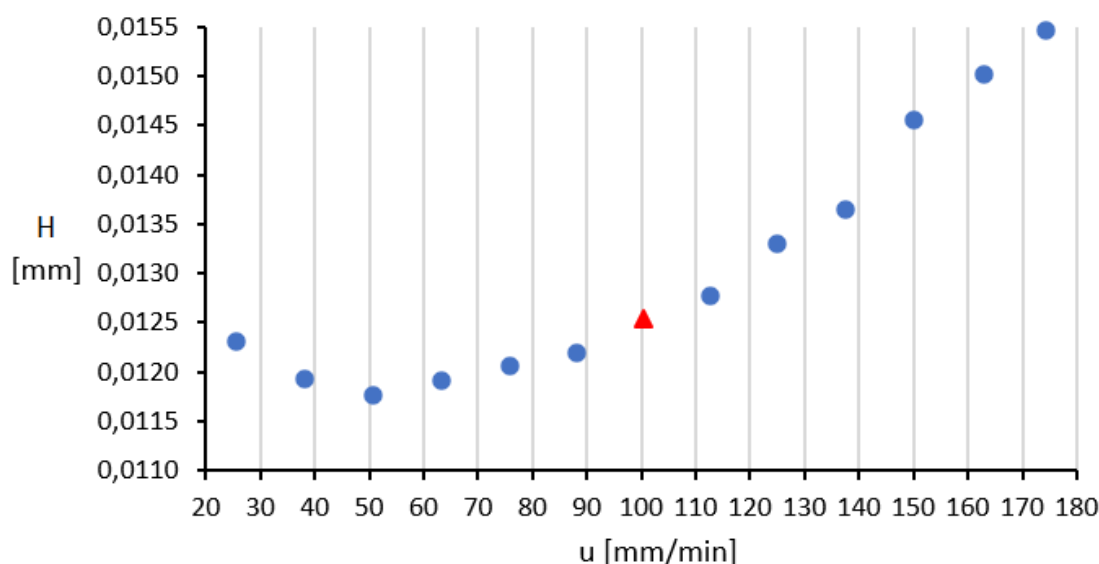
$N_{0.5}$  ... účinnost kolony vypočtená z šířky píku odečtené v polovině jeho výšky

l ... délka kolony (Pro Kinetex C18: 150 mm)

**Obrázek 17:** H-u křivka pro pitolisant se zvýrazněným zvoleným bodem optima



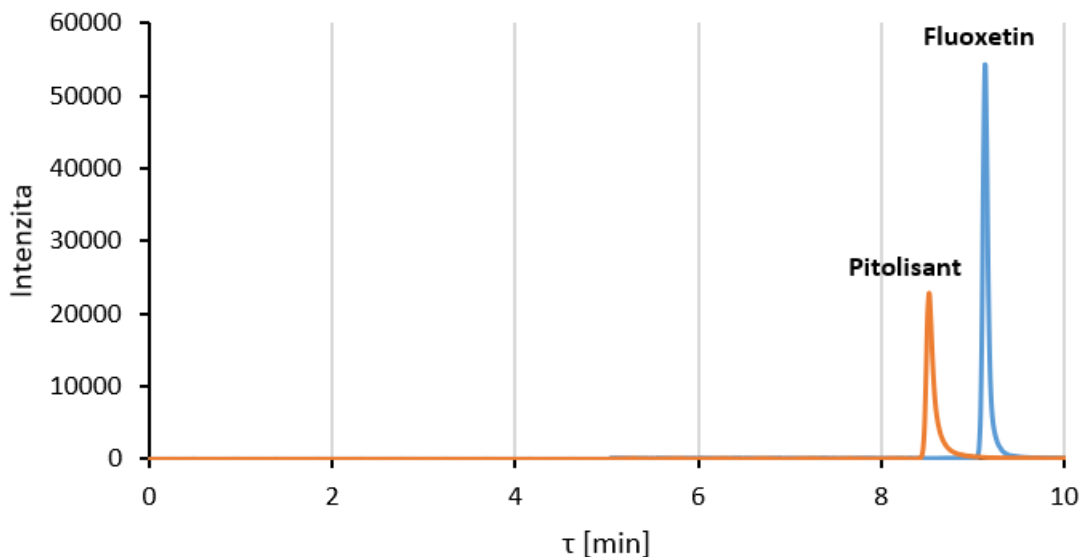
**Obrázek 18:** H-u křivka pro fluoxetin se zvýrazněným zvoleným bodem optima



Z H-u křivek je viditelné, že se snižující se lineární rychlostí mobilní fáze dochází ke snižování výšky teoretického patra a výsledně i ke zvyšování účinnosti. Zároveň lze i vidět, že při nejnižších rychlostech dochází ke zpětnému zvyšování výšky patra a snižování účinnosti. Teoretické optimum je z obou křivek viditelné v oblasti lineární rychlosti 50 mm/min, což by odpovídalo průtoku mobilní fáze 0,2 ml/min. Nicméně retenční časy obou látek jsou za těchto podmínek bodě nadměrně vysoké, a pokud by tato hodnota průtoku byla použita, tak by na analýzu nestačil zavedený program gradientu a musel by být modifikován. Bylo tedy rozhodnuto použít průtok 0,4 ml/min, který byl výrazně účinnější než předem používaných cca 0,7 ml/min a poskytoval retenční časy u všech léčiv do deseti minut. Lineární rychlost toku mobilní fáze byla poslední optimalizovanou podmínkou. Pomocí výsledné metody byl změřen směsný standard všech léčiv o koncentraci 0,1 mg/l a z výsledných hodnot byl

vykreslen chromatogram zobrazující separaci všech léčiv za optimálních podmínek (viz. Obrázek 19)

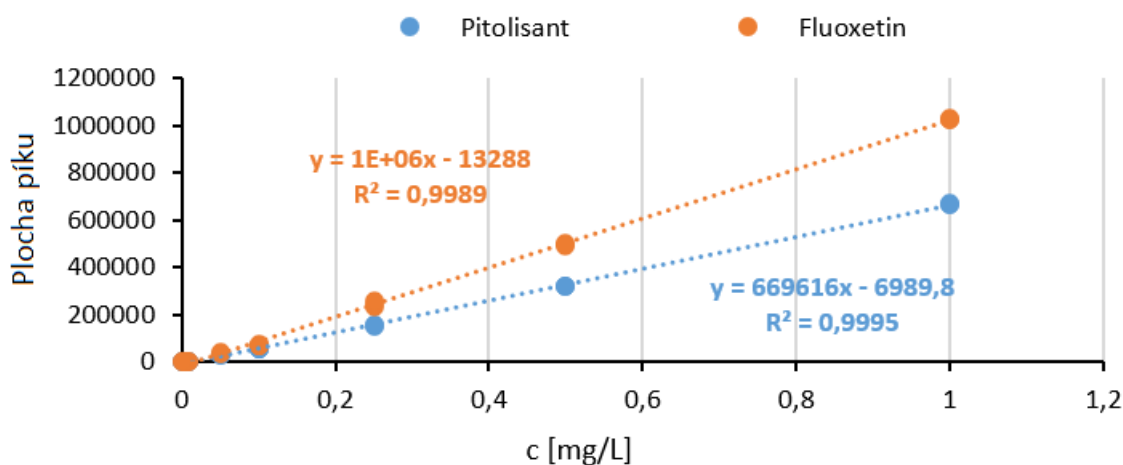
**Obrázek 19:** Chromatogram separace kalibračního roztoku o koncentraci 0,1 mg/l



### 3.7 Měření kalibrační křivky a validace vyvinuté metody

Pomocí optimalizované metody (viz Kapitola 2.5) byla následně analyzována kalibrační řada směsných roztoků pitolisantu a fluoxetinu na následujících koncentračních úrovních: 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 a 1 mg/l. Ze získaných dat byly sestrojeny kalibrační závislosti ploch píků na koncentraci látek (viz. Obrázek 20). Body v kalibrační křivce byly proloženy lineárním trendem a ze spojnice trendu byla odečtena rovnice regrese a koeficient determinace určující linearitu kalibrační řady. Tato rovnice trendu byla následně použita k výpočtu správnosti metody (viz. Tabulka 8). Kalibrační roztok o koncentraci 0,1 mg/l byl proměřen stejnou metodou (6x/den) ještě po další dvou dnech na stejném zařízení pro zjištění opakovatelnosti metody (viz. Tabulka 8). Jako poslední byly spočítány limity detekce a limity kvantifikace obou látek (viz. Tabulka 8).

**Obrázek 20:** Sestrojené kalibrační křivky pro všechna léčiva se zobrazenou rovnicí a linearitou trendu (n=3)



Na Obrázku 20 lze vidět, že výsledné kalibrační křivky měly linearitu 0,9995 pro pitolisant a 0,9989 pro fluoxetin. Dále lze vidět, že kalibrační křivky byla lineární v celém rozsahu koncentrací a nedocházelo ke snižování přesnosti během měření. Lze tedy usoudit, že rozsah linearitu této metody byl v celém použitém rozsahu koncentrací kalibrační křivky od 0,001 mg/l po 1 mg/l.

**Tabulka 8:** Vypočítané validační parametry metody pro všechna léčiva

Validační parametr	Pitolisant	Fluoxetin
Linearita	0,9995	0,9989
Rozsah linearitu [mg/l]	0,001–1	0,001–1
Správnost nízká [%] (0,01 mg/l)	160,87	178,74
Správnost střední [%] (0,1 mg/l)	92,09	85,52
Správnost vysoká [%] (0,5 mg/l)	98,65	101,41
Opakovatelnost 1. den [%]	0,388	1,549
Opakovatelnost 1.–3. den [%]	12,631	10,381
LOD [ng/l]	160	94
LOQ [ng/l]	534	313

V Tabulce 8 lze vidět správnost měření u tří kalibračních roztoků o koncentracích 0,5; 0,1 a 0,01 mg/l. Správnost metody byla spočítána vložení naměřených ploch vybraných kalibračních roztoků do rovnice trendu kalibrační křivky a následným srovnáním se skutečnou hodnotou koncentrace (viz Rovnice 10). V Tabulce 8 lze vidět, že správnost metody se blíží hodnotě 100 u vyšších koncentrací, zatímco u nižších koncentrací dochází ke

snižování správnosti. Z hodnoty správnosti u nižších koncentrací lze zároveň usoudit, že rovnice trendu kalibrační řady nadhodnocuje vypočtené koncentrace oproti skutečným hodnotám. Hypotézou, proč dochází k nadhodnocování je přítomnost bodů s několikanásobně vysokou koncentrací (viz. Obrázek 20). Pokud by tyto body byly z kalibrační křivky odebrány, správnost metody pro nižší koncentrace by se zlepšila, což by mohl být postup vhodný pro analýzy léčiv v užším rozsahu koncentrací.

**Rovnice 10:** Výpočet správnosti měření

$$CV = \left( \frac{\bar{\phi} c_{teor.} (kal.)}{c_{real} (kal.)} \right) \cdot 100$$

CV ... správnost měření

$c_{teor.}$  ... konc. vypočtená z rovnice trendu

$c_{real}$  ... skutečná konc.

Dalším validačním parametrem byla opakovatelnost. Z hodnot ploch píků kalibračního roztoku o koncentraci 0,1 mg/l byla v první den validace pomocí Rovnice 11 vypočítána jednodenní opakovatelnost jejíž hodnoty byly 0,388 % pro pitolisant a 1,549 % pro fluoxetin. Opakovatelnost nám vyjadřuje relativní odchylku v dané sérii měření. Stejný roztok byl následně měřen stejnou metodou po další 2 dny a průměru všech hodnot byla vypočítána mezi denní opakovatelnost, která nabývala hodnot 12,631 % pro pitolisant a 10,381 % pro fluoxetin. V analytické praxi jsou hodnoty do 10 % považovány za dobré. Z hodnot v Tabulce 8 lze tedy usoudit, že odchylky v měření v jeden den jsou zanedbatelné, zatímco odchylky v mezi denním měřením dosahují hodnot na hraně významnosti výsledků. V tomto případě byla nízká mezi denní opakovatelnost způsobena vysokými odchylkami v 2. den měření (viz. Přílohy: Tabulka 10 a 11).

**Rovnice 11:** Výpočet opakovatelnosti měření pro daný den

$$REP_{X.den} = 100 \cdot \left( \frac{\sigma A_{kal.}}{\bar{\phi} A_{kal.}} \right)_{X.den}$$

$REP_{X.den}$  ... opakovatelnost metody vypočítaná pro daný den

Poslední spočítanou validační hodnotou byly limity detekce a kvantifikace. Z měření kalibračního roztoku o koncentraci 0,1 mg/l v první den validace byly odečteny průměrné hodnoty šumu na pozadí, které se rovnaly 6,115 pro pitolisant a 7,185 pro fluoxetin. Ty byly následně vyděleny směrnici z dodatečně sestavené kalibrační křivky závislosti výšky píků na



koncentraci kalibračních roztoků a vynásobeny podle Rovnic 12 a 13 konstantou vyjadřující nutnou úroveň rozdílu mezi maximem píku a přirozeným pozadím. Z Tabulky 8 lze vidět, že jak limit detekce, tak limit kvantifikace byly pod nejnižší hodnotou koncentrace kalibrační řady roztoků.

**Rovnice 12:** Výpočet limitu detekce

$$LOD = 3 \cdot \left( \frac{\sigma \text{ šum}}{B_{h/c}} \right)$$

LOD ... limit detekce

$B_{h/c}$  ... směrnice z kalibrační závislosti h/c

**Rovnice 13:** Výpočet limitu kvantifikace

$$LOQ = 10 \cdot \left( \frac{\sigma \text{ šum}}{B_{h/c}} \right)$$

LOQ ... limit kvantifikace

$B_{h/c}$  ... směrnice z kalibrační závislosti h/c

### 3.8 Měření metabolizovaných roztoků optimalizovanou metodou

Jako poslední část této práce analyzovány vzorky metabolizovaných roztoků všech léčiv. Z předem připravených buněčných extraktů (viz. Kapitola 2.4) byla připravena řada desetinásobně ředěných vzorků, která byla následně proměřena vyvinutou, optimalizovanou a validovanou metodou. Získané plochy byly rovnicí trendu z přeměřené kalibrační křivky přepočítány na residuální koncentrace léčiv v  $\mu\text{mol/l}$ , vynásobeny buďto 100x nebo 30x pro kompenzaci ředění a byly zaznamenány odchylky v měření (viz. Tabulka 9). Z hodnot koncentrací v Tabulce 9 lze vypožorovat určité trendy.

Jako první je třeba poznamenat, že původní vypočtené koncentrace jsou výrazně vyšší než počáteční. Důvodem pro tuto chybu je nízká správnost metody pro nižší koncentrace. Druhým ředěním připravených vzorků se residuální koncentrace dostala do oblasti 0,01 mg/l, která má nízkou správnost a skutečné koncentrace nadhodnocuje (viz. Tabulka 8). Pokud přepočítáme tyto koncentrace pomocí určené správnosti, zjistíme že, až na roztok M6 IC, jsou všechny koncentrace nižší než původní koncentrace. Residuální koncentrace fluoxetinu jsou podstatně nižší než koncentrace pitolisantu. Z této skutečnosti lze usoudit, že fluoxetin je mnohem snadněji metabolizován než pitolisant. Jako poslední trend, který v hodnotách existuje, je rozdíl v residuálních koncentracích mezi IC a EC roztoky. Z Tabulky 9 je vidět, že residuální koncentrace v IC roztocích jsou v některých případech více jak dvakrát vyšší než residuální

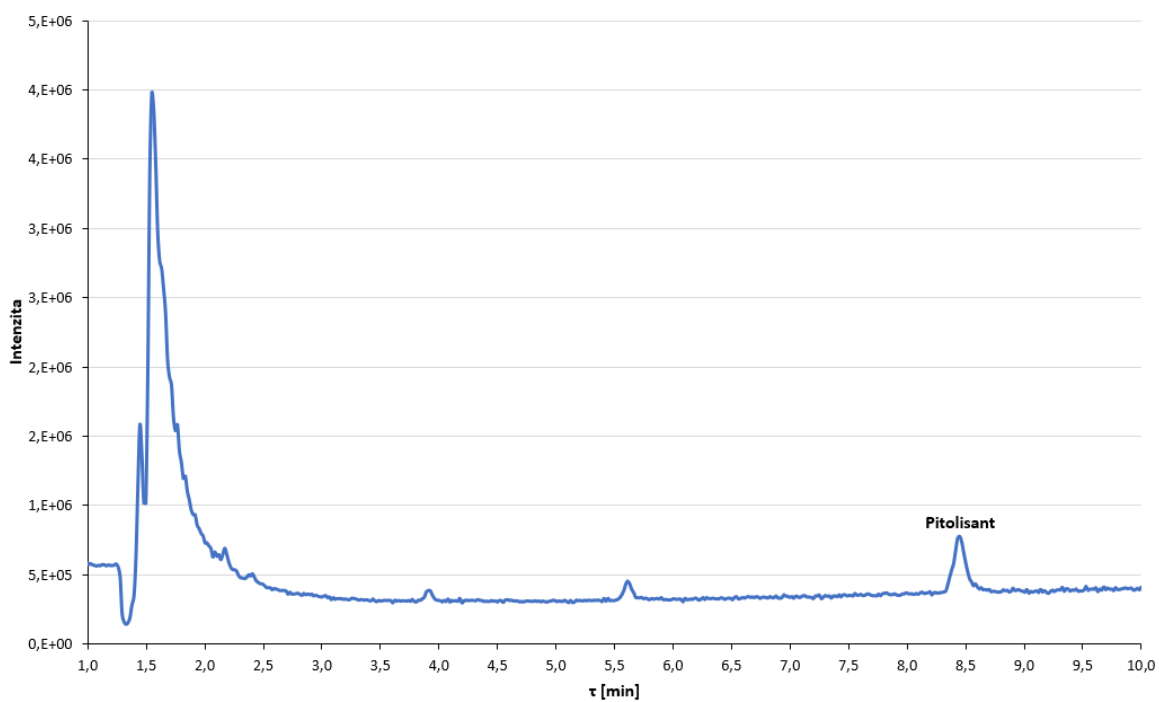
koncentrace v EC roztocích. Existují dvě možnosti pro tento výsledek. Jednak buněčné kultury nebyly vybranou počáteční koncentrací poškozeny a mohli tak dále metabolizovat léčiva relativně pomalou rychlostí. Nebo byly analyzovaná léčiva snadno přenášeny před buněčnou membránu a v důsledky byly intracelulární koncentrace po extrakci vyšší.

Pro ilustraci výsledků byly vykresleny chromatogramy metabolizovaných roztoků obou léčiv zobrazující závislosti intenzity odezvy MS detektoru nastaveného na SCAN mód v záznamu pozitivních iontů na čase (viz. Obrázek 21 a 22). Kvantitativní výsledky byly počítány z ploch odečtených z neilustrovaných chromatogramů závislosti intenzity SIM módu na čase. Je třeba podotknout, že u těchto měření došlo k malé modifikaci vyvinuté metody, přidáním promývacího kroku v posledních 2 minutách analýzy, kdy obsah organické mobilní fáze byl navýšen a udržován na 100 % (v/v), aby došlo k vymytí případných neznámých látek s vyšší retencí z kolony. Po skončení analýzy následovala pětiminutová ekvilibrace na počáteční podmínky (20 % B (v/v)).

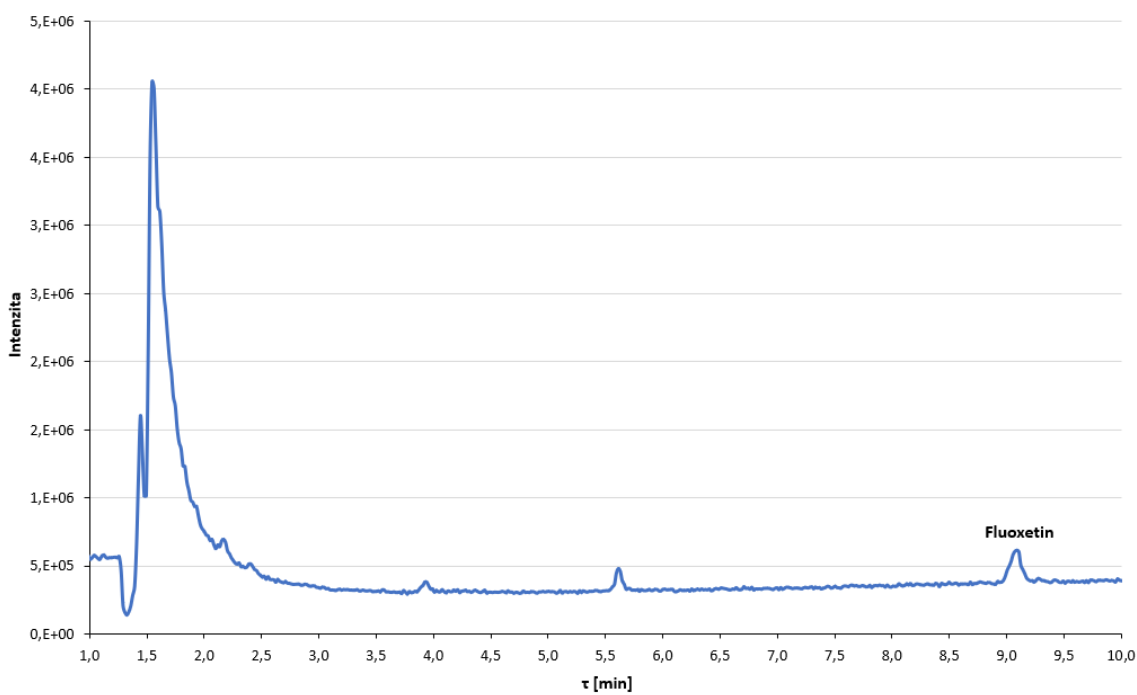
**Tabulka 9:** Výsledky měření metabolizovaných roztoků s uvedenou správností (n=3)

Informace o extraktech				Pitolisant		Fluoxetin	
Jméno vzorku	Typ vzorku	Obsažená látka	C <sub>0</sub> [μmol/l]	c P [μmol/l]		c F [μmol/l]	
				σ = 0	σ = 160,87	σ = 0	σ = 178,74
M2	IC	Fluoxetin	10	-	-	9,560 ± 0,089	5,349
	EC		10	-	-	3,591 ± 0,123	2,009
M4	IC	Fluoxetin	100	-	-	84,37 ± 0,158	47,203
	EC		100	-	-	48,000 ± 1,572	26,855
M6	IC	Pitolisant	10	19,940 ± 0,200	12,395	-	-
	EC		10	9,3690 ± 0,363	5,824	-	-
M8	IC	Pitolisant	100	144,89 ± 0,583	90,067	-	-
	EC		100	107,06 ± 1,603	66,551	-	-

**Obrázek 21:** Chromatogram metabolizovaného roztoku pitolisantu měřeného vyvinutou metodou



**Obrázek 22:** Chromatogram metabolizovaného roztoku fluoxetinu měřeného vyvinutou metodou



Na chromatogramech lze vidět, že mimo píky analyzovaných léčiv se nevyskytují jinak odlišné píky a u přítomných píků se nemění jejich intenzita. Mohli bychom tedy uvažovat, že v metabolizovaných roztocích se nevyskytují diskrétní píky metabolitů, ale jelikož použitá metoda nebyla vyvinuta na analýzu metabolitů pitolisantu a fluoxetinu, existuje možnost, že metabolity jsou v roztoku přítomné, ale nejsou za nastavených podmínek analyzovatelné. Tato hypotéza je dobrým začátkem pro příští studie kde se lze zaměřit jednak na změnu separačního mechanismu a složení mobilní fáze lépe vhodnější pro více polární látky. V optimalizaci hmotnostní spektrometrie se lze soustředit na změnu fragmentační energie, tak aby byla maximalizována ionizace metabolitů. Hmotnostní rozsah spektrometru ve SCAN módu není třeba měnit, jelikož navýšení hmotnosti léčiv degradací metabolismem lze očekávat za nepravděpodobné. Z těchto závěrů lze uvažovat, že vyvinutou metodou nelze metabolity pitolisantu a fluoxetinu analyzovat.

## 4 ZÁVĚR

V této diplomové práci byla vypracována rešerše zabývající se informacemi o symptomech a metodách léčby narkolepsie, instrumentací a módy měření v kapalinové chromatografii a hmotnostní spektrometrii a postupy interpretace, optimalizace a validace chromatografických metod. V experimentální části práce byla optimalizována metoda pro analýzu vybraných léčiv narkolepsie v režimu izokratické a gradientové eluce. Výsledky z izokratické eluce byly jednak využity k výběru vhodné kolony, na které by probíhala metoda gradientové eluce, a dále použity k sestrojení a optimalizaci h-u křivky, která posloužila k identifikaci a výběru optimální lineární rychlosti mobilní fáze skrz kolonu.

První polovina teoretické části je věnována obecným informacím o symptomech a rizicích narkolepsie s částečnou zmínkou o legislativní regulaci a prevalenci poruchy. Dále jsou v této části podrobně zpracovány informace o přípravcích používaných k léčbě narkolepsie, o principu jejich funkce a vedlejších účincích. Kapitola je zakončena seznamem analogických metod stanovení léčiv vybraných pro analýzu v experimentální části. V druhé polovině teoretické části je zpracována teorie separačních metod, instrumentace, fázové systémy a metody detekce v kapalinové chromatografii. Značná část se zabývá i popisem podobných témat v hmotnostní spektrometrii.

Cílem této diplomové práce byla optimalizace a validace podmínek chromatografické separace režimem gradientové eluce a výběr vhodné kolony pro analýzu vybraných léčiv pro narkolepsii. Na počátku práce bylo původně plánováno získat preparáty nově vyvinutých léčiv se strukturou na bázi sulfonamidů od Centrum biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové, což se bohužel nepodařilo uskutečnit. Jako náhrada byly pořízeny certifikované standardy aktuálně používaných léčiv narkolepsie. Konkrétně byly použity pitolisant, komerčně známý jako Wakix, a fluoxetin, komerčně dostupný jako Prozac. Vyvinutá metoda byla následně použita pro analýzu residuálních koncentrací těchto léčiv v metabolizovaných extraktech lidských buněk. Chromatografické separace byly provedeny v systému s obrácenými fázemi na čtyř různých kolonách v izokratických podmínkách ve spojení s hmotnostním detektorem. Kolony Evosphere DPH, Hydrosphere C18 a Arionplus C18 se kvůli svým výsledkům ukázaly jako nevhodné volby pro účinnou separaci. Zbývající kolona Kinetex C18 se prokázala jako nejúčinnější a byla zvolena pro následnou optimalizaci gradientové eluce. V následující sérii experimentů byla věnována pozornost optimalizaci pracovních podmínek. Mezi optimalizované parametry patřilo složení mobilní fáze, program gradientové eluce, teplota kolony, lineární rychlost mobilní fáze a fragmentační energie.

Výsledná metoda byla validována se zaměřením na linearitu a její rozsah, přesnost, správnost, opakovatelnost, LOD a LOQ. Výsledky validace lze považovat za uspokojivé.

Z analýzy metabolizovaných roztoků bylo určeno, že léčiva byly vybraným kmenem lidských buněk metabolizovány, ale metoda přípravy vzorků zvyšovala chybu ve stanovení. Bylo usouzeno, že fluoxetin je metabolizován snadněji než pitolisant. Dalším zjištěním byla zvýšená koncentrace obou léčiv v extraktech intracelulárního prostoru ve srovnání s extrakty extracelulárního prostoru. V závěru metody bylo konstatováno, že v chromatogramech analýzy metabolizovaných roztoků nejsou viditelné diskrétní píky metabolitů, a tedy metodu nelze využít pro cílenou analýzu metabolitů pitolisantu či fluoxetinu.

## 5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] *Narcolepsy*. Online. GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA. National Institute of Neurological Disorders and Stroke. September 20, 2023. Dostupné z: <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/narcolepsy>. [cit. 2023-10-12].
- [2] CHOKROVERTY, S. Overview of sleep & sleep disorders. Online. In: *Indian Journal of Medical Research*. Medknow Publications, 2010. ISBN PMID: 20308738. Dostupné z: <https://journals.lww.com/ijmr/Pages/default.aspx>. [cit. 2024-03-04].
- [3] KAPPELLA, Mary C. a CARLEY, David W. *Narcolepsy*. Online. National Organisation for Rare Diseases (NORD). June 23, 2017. Dostupné z: <https://rarediseases.org/rare-diseases/narcolepsy/>. [cit. 2023-10-12].
- [4] THORPY, Michael J. Classification of Sleep Disorders. Online. In: *Neurotherapeutics*. The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2012. Dostupné z: [10.1007/s13311-012-0145-6](https://doi.org/10.1007/s13311-012-0145-6). [cit. 2024-03-04].
- [5] ČESKÁ REPUBLIKA. Vyhláška č. 277/2004 Sb: Příloha č. 3: Nemoci, vady, nebo stavy, které vylučují nebo podmiňují zdravotní způsobilost k řízení motorových vozidel. In: . 2004, 89/2004. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-277/zneni-20180322#f2566734>
- [6] GOSWAMI, Meeta; THORPY, Michael J. a PANDI-PERUMAL, S.R. (ed.). *Narcolepsy: A Clinical Guide*. 2nd. Springer, 2016. ISBN 9783319237398. DOI: 10.1007/978-3-319-23739-8
- [7] M. S. Heier; T. Evsiukova; J. Wilson; M. Abdelnoor; C. Hublin et al. Prevalence of narcolepsy with cataplexy in Norway. Online. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2009, č. 120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2009.01166.x>. [cit. 2024-04-22].
- [8] SHIN, Y. K.; YOON, I. Y.; HAN, E. K.; NO, Y. M.; HONG, M. C. et al. Prevalence of narcolepsy-cataplexy in Korean adolescents. Online. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2008, č. 117. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00930.x>. [cit. 2024-04-22].
- [9] WING, Yun-Kwok; YEUNG LI, Raymond Hiu-Yeung; LAM, Ching-Wan; HO, Crover Kwok-Wah; FONG, Samson Yuk-Yat et al. The prevalence of narcolepsy among Chinese in Hong Kong. Online. *Annals of Neurology*. 2002, č. 51. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ana.10162>. [cit. 2024-04-22].
- [10] HUBLIN, C.; PARTINEN, M.; KAPRIO, J.; KOSKENVUO, M. a GUILLEMINAULT, C. Epidemiology of Narcolepsy. Online. *Sleep*. 1994, roč. 17, č. 8.

- Dostupné z: [https://academic.oup.com/sleep/article-pdf/17/suppl\\_8/S7/13688710/sleep-17-suppl\\_8-S7.pdf](https://academic.oup.com/sleep/article-pdf/17/suppl_8/S7/13688710/sleep-17-suppl_8-S7.pdf). [cit. 2024-04-22].
- [11] AL RAJEH, S.; BADEMOSI, O.; ISMAIL, H.; AWADA, A.; DAWODU, A. et al. A community survey of neurological disorders in Saudi Arabia: the Thugbah study. Online. *Neuroepidemiology*. 1993, roč. 12, č. 3. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000110316>. [cit. 2024-04-22].
- [12] SCAMMELL, Thomas E., CAMPION, Edward W. (ed.). Narcolepsy. In: *The New England Journal of Medicine*. 27. Massachusetts Medical Society, 2015, s. 2654-2655. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1500587>.
- [13] MIGNOT, Emmanuel J. M. *A Practical Guide to the Therapy of Narcolepsy and Hypersomnia Syndromes*. Online. 4. 2012, roč. 9, č. 4. Elsevier, 2012. DOI: 10.1007/s13311-012-0150-9. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3480574/>. [cit. 2024-03-02].
- [14] GREENBLATT, Karl a ADAMS, Ninos. Modafinil. Online. *StatPearls*. 2023. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531476/>. PMID: 30285371. [cit. 2024-03-02].
- [15] JANOCKOVA, Jana; DOLEZAL, Rafael; NEPOVIMOVA, Eugenie; KOBRLOVA, Tereza; BENKOVA, Marketa; KUCA, Michal; KONECNY, Jan; MEZEIOVA, Eva; MELIKOVA HEPNAROVA, Vendula; RING, Avi; SOUKUP, Ondrej; KORABECNY, Jan. Investigation of New Orexin 2 Receptor Modulators Using In Silico and In Vitro Methods. *Molecules*. 2018, roč. 23, č. 2926, s. 1-2. DOI: 10.3390/molecules23112926.
- [16] Řez mozkiem. [Wikipedie]. In: Wikipedia.org [online] [cit. 2024-02-01]. Dostupné z: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Varol%C5%AFv\\_most](https://cs.wikipedia.org/wiki/Varol%C5%AFv_most)
- [17] *European Medicines Agency recommends restricting the use of modafinil*. Online. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. European Union. 2010. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/news/european-medicines-agency-recommends-restricting-use-modafinil>. [cit. 2023-02-03].
- [18] DOMINGUEZ, Alvio; GALLEGO, Lucia Soca a PARMAR, Mayur. Sodium Oxybate. Online. *StatPearls*. 2023. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562283/>. PMID: 32965954 [cit. 2024-03-02].
- [19] MODAL, Shovan a MALAKAR, Sunity. Synthesis of sulfonamide and their synthetic and therapeutic applications: Recent advances. In: *Tetrahedron*. 48. Elsevier, 2020, s. 2-3. ISSN Print: 0040-4020 Online: 1464-5416. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131662>.



- [20] HANSON, James R. The Sulfonamide anti-bacterial agents. In: *Chemistry and Medicines - An Introductory Text*. United Kingdom: Royal Society of Chemistry (RSC), 2006, s. 108-111. ISBN 978-0-85404-645-4. Dostupné také z: [https://app.knovel.com/kn/resources/kpCMAIT001/toc?b-q=sulfonamide%20medicine&include\\_synonyms=no](https://app.knovel.com/kn/resources/kpCMAIT001/toc?b-q=sulfonamide%20medicine&include_synonyms=no).
- [21] VARDANYAN, Ruben a HRUBY, Victor. Antibacterial drugs: Sulfonamides. In: *Synthesis of Best-Seller Drugs*. University of Arizona: Elsevier, 2016, s. 645-650. ISBN 978-0-12-411492-0. Dostupné také z: [https://app.knovel.com/kn/resources/kpSBSD0007/toc?b-q=sulfonamide%20medicine&include\\_synonyms=no](https://app.knovel.com/kn/resources/kpSBSD0007/toc?b-q=sulfonamide%20medicine&include_synonyms=no).
- [22] CLEVELAND CLINIC. *Folate Deficiency*. Online. Cleveland clinic. December 12th, 2021. Dostupné z: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/22198-folate-deficiency>. [cit. 2023-10-24].
- [23] BETHESDA (MD): NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES AND DIGESTIVE AND KIDNEY DISEASES. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury: Sulfonamides*. Online. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. National library of medicine. 2012, December 5th, 2017. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548382/#Sulfonamides.OVERVIEW>. [cit. 2023-10-24].
- [24] KOLLB-SIELECKA, Marta; DEMOLIS, Pierre; EMMERICH, Joseph; MARKEY, Greg; SALMONSON, Tomas et al. The European Medicines Agency review of pitolisant for treatment of narcolepsy: summary of the scientific assessment by the Committee for Medicinal Products for Human Use. Online. In: *Sleep Medicine*. 33. Elsevier Science B.V., 2017. Dostupné z: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389945717300102?ref=cra\\_js\\_challenge&fr=RR-1](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389945717300102?ref=cra_js_challenge&fr=RR-1). [cit. 2024-03-15].
- [25] HANCOCK, Arthur A.; ESBENSHADE, Timothy A.; KRUEGER, Kathleen M. a YAO, Betty Bei. Genetic and pharmacological aspects of histamine H3 receptor heterogeneity. Online. In: *Life Sciences*. 24. Elsevier, 2003. Dostupné z: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320503007410?ref=cra\\_js\\_challenge&fr=RR-1](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320503007410?ref=cra_js_challenge&fr=RR-1). [cit. 2024-03-15].
- [26] Constitutive GPCR activity and inverse agonism. [TranslationalPsychiatry] In: Nature.com [online] [cit. 2024-03-15]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/tp2013130>

- [27] *Wakix*. Online. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. European Union. 2016. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/wakix#ema-inpage-item-overview>. [cit. 2023-03-15].
- [28] SYED, Yahiya Y. Pitolisant: First Global Approval. Online. *Drugs*. 2016, roč. 76. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0620-1>. [cit. 2024-03-15].
- [29] GRAM, Lars F. Fluoxetine. Online. *The New England Journal of Medicine*. 1994, roč. 331, č. 20. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJM199411173312008>. [cit. 2024-03-21].
- [30] BARATEAU, Lucie; LOPEZ, Régis a DAUVILLIERS, Yves. Treatment Options for Narcolepsy. Online. In: *CNS Drugs*. 30. SpringerLink, 2016. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40263-016-0337-4>. [cit. 2024-03-21].
- [31] VIGNATELLI, Luca; D'ALESSANDRO, Roberto a CANDELISE, Livia. Antidepressant drugs for narcolepsy. Online. *Cochrane Library: Cochrane Reviews*. 2008, č. 1. PMID: 18254030. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003724.pub3>. [cit. 2024-03-21].
- [32] SOHEL, Ahsan J.; SHUTTER, Mollie C. a MOLLA, Mohammed. Fluoxetine. Online. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, 2022. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459223/>. [cit. 2024-03-21].
- [33] *2017 First Generic Drug Approvals*. Online. U.S.FDA. U.S. Food & Drug ADMINISTRATION. 2017, 02/20/2018. Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/first-generic-drug-approvals/2017-first-generic-drug-approvals>. [cit. 2024-03-21].
- [34] FRANCESCHINI, Christian; PIZZA, Fabio; CAVALLI, Francesca a PLAZZI, Giuseppe. A practical guide to the pharmacological and behavioral therapy of Narcolepsy. Online. In: *Neurotherapeutics*. The American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2021. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01051-4>. [cit. 2024-03-21].
- [35] THORPY, Michael J. a BOGAN, Richard K. Update on the pharmacologic management of narcolepsy: mechanisms of action and clinical implications. Online. In: *Sleep Medicine*. 68. Elsevier B.V., 2019. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2019.09.001>. [cit. 2024-03-21].
- [36] NIROGI, Ramakrishna; AJJALA, Devender Reddy; KANDIKERE, Vishwottam; PANTANGI, Hanumanth Rao; JONNALA, Mahesh Reddy et al. LC-MS/MS method for the determination of pitolisant: application to rat pharmacokinetic and brain penetration

- studies. Online. *Biomedical Chromatography*. 2013, roč. 11, č. 27. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.2939>. [cit. 2024-04-11].
- [37] RUSJAN, Pablo; SABIONI, Pamela; DI CIANO, Patricia; MANSOURI, Esmail; BOILEAU, Isabelle et al. Exploring occupancy of the histamine H3 receptor by pitolisant in humans using PET. Online. *British Journal of Pharmacology*. 2020, roč. 15, č. 177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/bph.15067>. [cit. 2024-04-11].
- [38] SOWJANYA, Gummadi a RAJYA LAKSHMI, Nimmagadda. Quantification of Pitolisant: A RP - HPLC study. Online. *YMER*. 2022, roč. 21, č. 6. ISSN 0044-0477. [cit. 2024-04-13]. Dostupné z: <https://ymerdigital.com/uploads/YMER2106E0.pdf>.
- [39] AHMAD, Ishtiaque; ULLAH, Zabih; KHAN, Mohd Ibrahim; ALAHMARI, Abdullah Khaloofa a KHAN, Mohd. Faiyaz. Development and validation of an automated solid-phase extraction-LC-MS/MS method for the bioanalysis of fluoxetine in human plasma. Online. *Journal of Advanced Pharmaceutical technology & Research*. 2021, roč. 3, č. 12. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8300324/>. [cit. 2024-04-12].
- [40] CEZIMBRA DE SILVA, Anne Caroline; RAASCH, Juliana Raquel; VARGAS, Tainara Gomes; PETEFII, Giovana Piva; PERRASOLO, Magda Susana et al. Simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine in dried blood spots using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Online. In: *Clinical Biochemistry*. 52. Canadian Society of Clinical Chemists, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.10.002>. [cit. 2024-04-12].
- [41] XIANGJUN, Qiu; HONG-WEI, Wang; YING-FEI, Wang; MING, Sun a XUE-SUN, Huang. An UHPLC–MS/MS method for the analysis of glimepiride and fluoxetine in human plasma. Online. In: *Journal of Chromatography B*. 980. Elsevier B.V., 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.12.023>. [cit. 2024-04-13].
- [42] SO, Young Won; CHANG, Hee Lee; HYE, Sook Chang; SU, Ok Kim; SUN, Hee Lee et al. Monitoring of 14 sulfonamide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS. In: *Food Control*. 7. Republic of Korea: Elsevier, 2011, s. 1101-1107. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.005>.
- [43] GIEGOLD, Sascha; TEUTENBERG, Thorsten; TUERK, Jochen; KIFFMEYER, Thekla a WENCLAWIAK, Bernd. Determination of sulfonamides and trimethoprim using high temperature HPLC with simultaneous temperature and solvent gradient. In: *Journal of Separation Science*. 20. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008, s. 3497–3502. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.200800330>.

- [44] ZHENG, Ming-Ming; ZHANG, Man-Yu; PENG, Guang-Yu a FENG, Yu-Qi. Monitoring of sulfonamide antibacterial residues in milk and egg by polymer monolith microextraction coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry. In: *Analytica Chimica Acta*. 2. Wuhan University, China: Elsevier B.V, 2008, s. 160–172. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.07.033>.
- [45] DONG, Michael W. INTRODUCTION. Online. In: *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists (2nd Edition)*. John Wiley & Sons, 2019. ISBN 978-1-5231-2826-6. Dostupné z: <https://app.knovel.com/kn/resources/kpHPLCUHP4/toc?b-q=Liquid%20chromatography>. [cit. 2023-12-12].
- [46] KARGER, Barry L. *Separation and purification*. Online. ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA, INC. Britannica. 1998, Aug 17 2022. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/separation-and-purification>. [cit. 2023-12-12].
- [47] WILSON, Ian D. a POOLE, Colin F. Centrifugation to Covalent Chromatography. In: *Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science*. ISBN Print: 978-0-12-375095-2 Electronic: 978-0-12-375727-2. Dostupné také z: [https://app.knovel.com/kn/resources/kpHMISSV0D/toc?b-q=separation%20methods&include\\_synonyms=no](https://app.knovel.com/kn/resources/kpHMISSV0D/toc?b-q=separation%20methods&include_synonyms=no).
- [48] KELLER, Roy A. a GIDDINGS, J. Calvin. *Chromatography*. Online. Britannica. 1998, 18th January 2024. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/chromatography>. [cit. 2024-02-15].
- [49] NOVÁKOVÁ, Lucie; DOUŠA, Michal a ČESLA, Petr. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [50] DOUŠA, PH.D., Michal. *HPLC.cz: Adsorbenty a chemicky vázané fáze; Chromatografické kolony; Zařízení pro dávkování vzorku; Detektory*. Online. 1999, 16th January 2020. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>. [cit. 2023-12-21].
- [51] TEUTENBERG, Thorsten; HOLLEBEKKERS, Koen; WIESE, Steffen a BOERGERS, Andrea. Temperature and pH-stability of commercial stationary phases. Online. *Journal of Separation Science*. 2009, č. 32. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.200800712>. [cit. 2024-03-11].
- [52] KIRKLAND, J. J.; VAN STRATEN, M. A. a CLAESSENS, H. A. High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns. Online. *Journal of Chromatography A*. 1995, roč. 691, č. 1-2. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)00631-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)00631-1). [cit. 2024-03-11].

- [53] CLAESSENS, H.A. a VAN STRATEN, M.A. Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. Online. *Journal of Chromatography A*. 2004, č. 1060. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.098>. [cit. 2024-03-11].
- [54] MAJORS, Ronald E. (ed.). The Cleaning and Regeneration of Reversed- Phase HPLC Columns. Online. *Column Watch*. 2003, roč. 23, č. 1. Dostupné z: [http://alfresco-static-files.s3.amazonaws.com/alfresco\\_images/pharma/2014/08/22/0de7c19f-2f68-482f-b0e7-82c9286770a1/article-45058.pdf](http://alfresco-static-files.s3.amazonaws.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/0de7c19f-2f68-482f-b0e7-82c9286770a1/article-45058.pdf). [cit. 2024-03-11].
- [55] FANALI, Salvatore; PAUL R., Haddad; COLIN F., Poole a MARJA-LIISA, Riekkola. Instrumentation for UHPLC. Online. In: *Liquid Chromatography - Fundamentals and Instrumentation, Volume 1 (2nd Edition)*. 2. Elsevier, 2017. Dostupné z: <https://app.knovel.com/kn/resources/kpLCFIVE01/toc?b-q=Liquid%20chromatography>. [cit. 2023-12-21].
- [56] Schematic diagram of HPLC-MS/MS system. [KSEE]. In: Eeer.org [online] [cit. 2024-02-01]. Dostupné z: <https://www.eeer.org/journal/view.php?number=905>
- [57] LACOURSE, William R. *Liquid Chromatography Instrumentation*. Online. Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. 2024. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/liquid-chromatography-instrumentation>. [cit. 2024-02-02].
- [58] HIGSON, Séamus. Separatory methods and chromatography. Online. In: *Analytical Chemistry*. Oxford University Press, 2004. ISBN 978-0-19-850289-0. Dostupné z: [https://app.knovel.com/kn/resources/kpAC000001/toc?b-q=hplc%20columns&include\\_synonyms=no](https://app.knovel.com/kn/resources/kpAC000001/toc?b-q=hplc%20columns&include_synonyms=no). [cit. 2023-12-21].
- [59] KAKLAMANO, George; APREA, Eugenio; THEODORIDIS, Georgios a YOLANDA, Pico. Mass spectrometry: principles and instrumentation. Online. In: *Chemical Analysis of Food - Techniques and Applications (2nd Edition)*. 2. Elsevier, 2020. Dostupné z: <https://app.knovel.com/kn/resources/kpCAFTA02/toc?b-q=mass%20spectrometry%20instrumentation>. [cit. 2024-02-20].
- [60] Schematic representation of the electrospray ionization process. [ResearchGate]. In: Reasearchgate.net [online] [cit. 2024-02-23]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-electrospray-ionization-process\\_fig31\\_225050758](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-electrospray-ionization-process_fig31_225050758)
- [61] WOLLNIK, Hermann. Online. In: *Optics of Charged Particles*. 2. Academic Press, 2021. ISBN 9780128214664. Dostupné z:

- [https://books.google.cz/books?id=TewnEAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs\\_atb#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=TewnEAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_atb#v=onepage&q&f=false). [cit. 2024-02-23].
- [62] Motion of a charged particle in a magnetic field. [Byju's]. In: Byjus.com [online] [cit. 2024-02-27]. Dostupné z: <https://byjus.com/physics/motion-charged-particle-magnetic-field/>
- [63] Tandem LC-MS. [EmeryPHARMA]. Emerypharma.com [online] [cit. 2024-02-27]. Dostupné z: <https://emerypharma.com/solutions/analytical-services/lcms-analysis/>
- [64] MEDHE, Sharad. Mass Spectrometry: Detectors Review. *Chemical and Biomolecular Engineering*. 2018, roč. 3, č. 4. ISSN 2578-8876. [https://www.researchgate.net/profile/Sharad-Medhe/publication/328661548\\_Mass\\_Spectrometry\\_Detectors\\_Review/links/5bdb0512a6fdcc3a8db587da/Mass-Spectrometry-Detectors-Review.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Sharad-Medhe/publication/328661548_Mass_Spectrometry_Detectors_Review/links/5bdb0512a6fdcc3a8db587da/Mass-Spectrometry-Detectors-Review.pdf)
- [65] MASS SPEC PRO. *Ion optics*. Online. Mass spec pro. Dostupné z: <http://www.massspecpro.com/ion-optics>. [cit. 2024-03-26].
- [66] WOLLNIK, Hermann. Ion Optics in Mass Spectrometers. Online. *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*. 1999, roč. 10, č. 34. Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9888\(199910\)34:10<991::aid-jms870>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9888(199910)34:10<991::aid-jms870>3.0.co;2-1). [cit. 2024-03-26].
- [67] *How to Measure Vacuum: Methods, Units and Scales*. Online. TAWI. TAWI. 2020. Dostupné z: <https://www.tawi.com/en-us/insights/how-to-measure-vacuum-methods-units-and-scales/>. [cit. 2024-03-27].
- [68] BUSCH, Kenneth L. High-Vacuum Pumps in Mass Spectrometers. Online. In: *Spectroscopy*. 16 (5). MDPI, 2001. Dostupné z: [https://www2.chemistry.msu.edu/courses/cem832/Vacuum\\_pumps.pdf](https://www2.chemistry.msu.edu/courses/cem832/Vacuum_pumps.pdf). [cit. 2024-03-27].
- [69] HUYNH-BA, Kim. Analytical Techniques Used in the GMP Laboratory; Development and Validation of Analytical Procedures. Online. In: *Analytical Testing for the Pharmaceutical GMP Laboratory*. John Wiley, 2022. ISBN 978-1-119-12091-9. Dostupné z: [https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpATPGMPL4/cid:kt013EGVW7/viewerType:khtml/root\\_slug:analytical-testing-pharmaceutical/url\\_slug:raw-data-analytical-data?&b-q=mass%20spectrometry%20detectors&facet\\_expanded=content&include\\_synonyms=no&s\\_page\\_no=0&sort\\_on=default&view=collapsed&zoom=1&page=4&q=mass%20spectrometry%20detectors](https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpATPGMPL4/cid:kt013EGVW7/viewerType:khtml/root_slug:analytical-testing-pharmaceutical/url_slug:raw-data-analytical-data?&b-q=mass%20spectrometry%20detectors&facet_expanded=content&include_synonyms=no&s_page_no=0&sort_on=default&view=collapsed&zoom=1&page=4&q=mass%20spectrometry%20detectors). [cit. 2024-03-12].



- [70] SNYDER, Lloyd R. a DOLAN, John W. Online. In: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd. John Wiley, 2010. ISBN 978-0-470-16754-0. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=taurNJU0u2AC&oi=fnd&pg=PT11&dq=liquid+chromatography+data+interpretation+chromatogram&ots=ydANYo15zz&sig=Ojyuw3VXUKcuwo5ujuYYIAhjKxo&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=taurNJU0u2AC&oi=fnd&pg=PT11&dq=liquid+chromatography+data+interpretation+chromatogram&ots=ydANYo15zz&sig=Ojyuw3VXUKcuwo5ujuYYIAhjKxo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false). [cit. 2024-03-12].
- [71] WANG, Miao; WANG, Chunyan a HAN, Xianlin. Selection of internal standards for accurate quantification of complex lipid species in biological extracts by electrospray ionization mass spectrometry – What, how and why? Online. In: *MassSpectrometryReviews*. 6. Wiley Periodicals, 2016. DOI: 10.1002/mas.21492. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4947032/>. [cit. 2024-03-13].
- [72] TOKUOKA, S. M., YASUMOTO, A., KITA, Y., SHIMIZU, T., YATOMI, Y., & ODA, Y. Limitations of deuterium-labeled internal standards for quantitative electrospray ionization mass spectrometry analysis of fatty acid metabolites. Online In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Ltd. 2020. DOI:10.1002/rcm.8814. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32307763/>
- [73] CHURÁČEK, Jaroslav; JANDERA, Pavel; KRUPČÍK, Jan; POLONSKÝ, Josef; POPL, Milan et al. In: *Analytická separace látek*. SNTL, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [74] KUSS, Hans Joachim. Optimization of a Reversed-Phase Gradient Separation Using EXCEL. Online. In: KROMIDAS, Stavros (ed.). *Gradient HPLC for Practitioners - RP, LC-MS, Ion Analytics, Biochromatography, SFC, HILIC*. John Wiley, 2019. ISBN 978-1-5231-2820-4. Dostupné z: [https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpGHPLCPR6/cid:kt0125E8P2/viewerType:khtml/root\\_slug:gradient-hplc-practitioners/url\\_slug:optimization-reversed?&b-q=effects%20of%20temperature%20change%20on%20the%20retention%20parameters%20in%20HPLC&include\\_synonyms=no&s\\_page\\_no=0&sort\\_on=default&view=collapsed&zoom=1&page=1&q=effects%20of%20temperature%20change%20on%20the%20retention%20parameters%20in%20HPLC](https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpGHPLCPR6/cid:kt0125E8P2/viewerType:khtml/root_slug:gradient-hplc-practitioners/url_slug:optimization-reversed?&b-q=effects%20of%20temperature%20change%20on%20the%20retention%20parameters%20in%20HPLC&include_synonyms=no&s_page_no=0&sort_on=default&view=collapsed&zoom=1&page=1&q=effects%20of%20temperature%20change%20on%20the%20retention%20parameters%20in%20HPLC). [cit. 2024-04-21].
- [75] MCCALLEY, David V. Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column. Online. *Journal of Chromatography A*. 2000, roč. 902, č. 2. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00924-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00924-9). [cit. 2024-04-21].
- [76] VALKÓ, Klara; SNYDER, Lloyd R. a GLAJCH, Josepj L. Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition. Online. *Journal*

- of Chromatography A. 1993, roč. 656, č. 1-2. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)80816-Q](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)80816-Q). [cit. 2024-04-21].
- [77] TRAN, Johnny V.; MOLANDER, Paal; GREIBROKK, Tyge a LUNDANES, Elsa. Temperature effects on retention in reversed phase liquid chromatography. Online. Journal of Separation Science. 2001, roč. 24, č. 12. Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/1615-9314\(20011201\)24:12<930::aid-jssc930>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1615-9314(20011201)24:12<930::aid-jssc930>3.0.co;2-2). [cit. 2024-04-21].
- [78] GUILLARME, D. a ROCCA, J. L. Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography. Online. Journal of Chromatography A. 2004, roč. 1052, č. 1-2. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.052>. [cit. 2024-04-21].
- [79] STEINER, Frank a LAMOTTE, Stefan, KROMIDAS, Stavros (ed.). Optimization Strategies in RP-HPLC. Online. In: The HPLC Expert: Possibilities and Limitations of Modern High Performance Liquid Chromatography. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2016. ISBN 9783527677610 DOI: <https://doi.org/10.1002/9783527677610>. [cit. 2024-04-21].
- [80] NOVÁKOVÁ, Lucie; DOUŠA, Michal; BLATNÝ, Pavel; JANDERA, Pavel; MAIER, Vítězslav et al. In: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* 1. Europrint, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [81] BERTHOLF, Roger L. a WINECKER, Ruth E. (ed.). INTERNAL QUALITY ASSURANCE AND CONTROL. Online. In: *Chromatographic Methods in Clinical Chemistry and Toxicology*. John Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-02309-9. Dostupné z: <https://www.wiley.com/en-au/Chromatographic+Methods+in+Clinical+Chemistry+and+Toxicology-p-9780470023099>. [cit. 2024-04-07].
- [82] MILLER, James N. a MILLER, Jane C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry Sixth Edition*. Online. 6th. Ashford Colour Press, 2010. ISBN 978-0-273-73042-2. Dostupné z: <http://repo.upertis.ac.id/1924/1/Statistik.pdf>. [cit. 2024-04-07].
- [83] MEIER, Peter C. a ZUND, Richard E. *Statistical Methods in Analytical Chemistry Second Edition*. Online. 2nd. Canada: John Wiley, 2000. ISBN 0-471-29363-6. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471728411>. [cit. 2024-04-07].
- [84] RYSKA, Miroslav. Validace bioanalytických HPLC/MS metod. Sborník přednášek. In: HOLČAPEK, Michal (ed.). *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*. 1. Kongresová hala Univerzity Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-390-8. [cit. 2024-04-07].



- [85] System suitability: Calculation of peak asymmetry and symmetry. Online. *Data Analysis Reference Guide*. 2016, roč. 8. [cit. 2024-04-29].

## PŘÍLOHY

**Tabulka 10:** Naměření retenční charakteristiky a vypočtené hodnoty reproductibility pitolisantu pro kalibrační roztok o koncentraci 0,1 mg/l

1. den	2. den	3. den	1. – 3. den
A	A	A	A
54960	38845	52269	Σ A (1.; 2.; 3. den)
54929	40124	52292	
54606	38925	53601	
54779	38280	52985	
54644	53810	53243	
54401	53992	52934	
<b>REP: 0,388</b>	<b>REP: 17,493</b>	<b>REP: 0,995</b>	<b>REP: 12,631</b>

**Tabulka 11:** Naměření retenční charakteristiky a vypočtené hodnoty reproductibility fluoxetinu pro kalibrační roztok o koncentraci 0,1 mg/l

1. den	2. den	3. den	1. – 3. den
A	A	A	A
74731	54929	63788	Σ A (1.; 2.; 3. den)
73090	56906	65229	
72082	56215	66712	
72268	53962	67448	
72349	73269	67652	
71528	72548	67724	
<b>REP: 1,549</b>	<b>REP: 14,760</b>	<b>REP: 2,400</b>	<b>REP: 10,381</b>