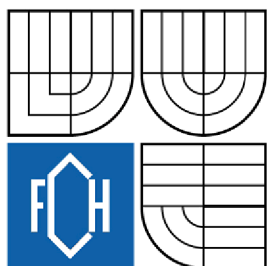


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ REZIDUÍ CHLORAMFENIKOLU V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU, VODĚ A KRMIVECH METODOU GC/MS

THE ASSESSMENT OF CHLORAMPHENICOL RESIDUES IN BIOLOGICAL MATERIAL, WATER AND FEED BY GC/MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. DAGMAR LUKAČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Mgr. MARTINA REJTHAROVÁ

BRNO 2009

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se věnuje problematice výskytu a stanovení reziduí chloramfenikolu v biologickém materiálu. Teoretická část je literární rešerší shrnující informace o veterinárních léčivech, jejichž použití je u potravinových zvířat zakázáno a dále shrnuje platné legislativní požadavky týkající se výskytu těchto látek v potravinách a potravinářských surovinách živočišného původu.

V experimentální části pak bylo provedeno porovnání stávajících analytických metod používaných pro stanovení reziduí chloramfenikolu v různých biologických materiálech, které jsou vesměs založeny na čištění extraktu metodou extrakce tuhou fází, s novými postupy přípravy vzorku pomocí kolonek, ve kterých funkci sorbentu plní molekulárně otištěné polymery (Molecularly Imprinted Polymers - MIP).

ABSTRACT

This diploma thesis addresses the presence and determination of chloramphenicol residues in biological materials. The theoretical part presents the literature retrieval containing information about veterinary medicaments with the banned use in food producing animals and also the sum of the legislative requirements concerning the presence of these substances in foodproducts and raw food materials of animal origin.

The comparison was carried out between the existing analytical methods used for the determination of chloramphenicol residues in different biological materials, which are altogether based on the solid phase extraction for the extract cleaning and the new procedures for sample preparations using columns where the sorbent performs on the molecularly imprinted polymers principle.

KLÍČOVÁ SLOVA

chloramfenikol, GC, MS, SPE, MIP

KEYWORDS

chloramphenicol, GC, MS, SPE, MIP

LUKAČKOVÁ, D.: *Stanovení reziduí chloramfenikolu v biologickém materiálu, vodě a krmívech metodou GC/MS*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 66 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Martina Rejtharová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem úplně a správně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být komerčně využita jen se souhlasem vedoucí diplomové práce a děkana FCH VUT.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych touto cestou poděkovat Mgr. Martině Rejtharové a Mgr. Liboru Rejtharovi za odborné vedení, cenné rady, připomínky, pomoc, trpělivost a čas, které mi věnovali při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Evě Vítové za odborné konzultace, pomoc a čas, které mi věnovala zejména při vypracování teoretické části práce.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Veterinární léčiva, jejichž použití je zakázáno při chovu potravinových zvířat	10
2.1.1 Aristolochia ssp. a preparáty z ní	11
2.1.2 Dapson	12
2.1.3 Dimetridazol, metronidazol, ronidazol	12
2.1.4 Chloroform	14
2.1.5 Chlorpromazin	14
2.1.6 Kolchicin	15
2.1.7 Nitrofurany včetně furazolidonu	15
2.1.8 Chloramfenikol	16
2.1.8.1 Charakteristika	16
2.1.8.2 Cytotoxicita a genotoxicita	17
2.1.8.3 Hematotoxicita	19
2.1.8.4 Gray baby syndrom	19
2.1.8.5 Rezidua v potravinách	19
2.2 Legislativní požadavky na kontrolu nelegálního použití zakázaných	20
látek	20
2.2.1 Směrnice Rady (ES) č. 96/23/ES	20
2.3 Použití analytická metoda	21
2.3.1 Příprava primárního extraktu	21
2.3.2 Extrakce tuhou fází	22
2.3.3 Molekulárně otištěné polymery	23
2.3.4 Derivatizace	25
2.3.5 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE	26
2.3.5.1 Části plynového chromatografu	27
2.3.5.1.1 Zdroj nosného plynu	27
2.3.5.1.2 Čistící zařízení	27
2.3.5.1.3 Regulační systém	27
2.3.5.1.4 Dávkovač	28
2.3.5.1.5 Chromatografická kolona	29
2.3.5.1.6 Termostat	30
2.3.5.1.7 Detektor	30
2.3.5.1.8 Vyhodnocovací zařízení	31
2.3.5.2 Detektory v plynové chromatografii	31
2.3.5.2.1 Tepelně vodivostní detektor	31
2.3.5.2.2 Ionizační detektory	32
2.3.5.3 Kvalitativní analýza	33
2.3.5.4 Kvantitativní analýza	36
2.3.6 HMOTNOSTNÍ SPEKTROSKOPIE	36
2.3.6.1 Ionizace a iontové zdroje v MS	37
2.3.6.1.1 Ionizace nárazem elektronů (Electron Impact - EI)	37
2.3.6.1.2 Chemická ionizace	38
2.3.6.1.3 Negativní chemická ionizace	38
2.3.6.2 Hmotnostní analyzátor	39
2.3.6.2.1 Kvadrupólový analyzátor	39
2.3.6.2.2 Iontová past	39

2.3.6.2.3 Průletový analyzátor	39
2.3.6.3 Detektor	40
2.3.6.4 Datasystém.....	41
2.3.6.5 Hmotnostní spektrum	41
2.3.6.6 Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií	43
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
3.1 Laboratorní vybavení	44
3.1.1 Standard, vnitřní standard a jejich roztoky	44
3.1.2 Chemikálie.....	44
3.1.3 Pracovní pomůcky	45
3.1.4 Přístroje	45
3.2 Pracovní postupy	46
3.2.1 Příprava vzorků - SPE	46
3.2.1.1 Med	46
3.2.1.2 Moč	46
3.2.1.3 Mléko	46
3.2.2 Příprava vzorků - MIP	46
3.2.1.1 Med	46
3.2.1.2 Moč	47
3.2.1.3 Mléko	47
3.2.3 Kondicionace.....	47
3.2.4 Extrakce - SPE	47
3.2.4.1 Voda.....	47
3.2.4.2 Med	47
3.2.4.3 Moč	47
3.2.4.4 Mléko	48
3.2.5 Extrakce - MIP	48
3.2.5.1 Voda.....	48
3.2.5.2 Med	48
3.2.5.3 Moč	48
3.2.5.4 Mléko	49
3.2.6 Derivatizace.....	49
3.2.7 Chromatografická analýza	49
3.3 Výsledky	50
3.3.1 Kalibrace.....	50
3.3.2 Opakovatelnost	56
3.4 Statistické zpracování dat.....	58
3.4.1 Lineární regrese kalibrační přímky	58
3.4.2 Opakovatelnost	60
3.4.3 Limit rozhodnutí.....	61
3.4.4 Detekční schopnost	61
4. Závěr	62
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	66

1. ÚVOD

Moderní intenzivní produkce potravin živočišného původu se v současné době jen stěží obejde bez používání léčiv, ovšem to musí být v souladu se zásadami správné veterinární praxe s ohledem na bezpečnost konzumentů. Cílem je zajistit co nejlepší zdravotní stav potravinových zvířat, který je nezbytným předpokladem vysoké a efektivní produkce kvalitních, zdravotně nezávadných a biologicky plnohodnotných potravin. Konzument potravin živočišného původu má největší zájem na tom, aby bylo respektováno zdravotně hygienické hledisko při používání léčiv k prevenci nebo terapii potravinových zvířat, tedy těch druhů hospodářských zvířat, která jsou chována nebo lovena za účelem produkce potravin, tj. masa, požitelných orgánů, mléka, vajec, medu, protože to je jedním z předpokladů bezpečnosti potravin živočišného původu.

Intenzifikace živočišné výroby zahrnuje koncentraci zvířat do velkých celků a minimalizaci investičních nákladů na zařízení pro chov zvířat. Je tedy pochopitelné, že v takovýchto podmínkách nejsou výjimkou různá onemocnění, především infekční. Ovšem intenzivní používání léčivých přípravků, krmných doplňků a jiných přípravků ke zvýšení produkce vyvolalo obavy z potenciálního rizika výskytu nežádoucích reziduí v potravinách živočišného původu.

Proto Rada Evropské unie vydala v roce 1996 směrnici č. 96/23/ES, která stanovuje zásady sledování některých látek a jejich reziduí u živých zvířat a ve výrobcích živočišného původu. Každý členský stát EU má k tomuto účelu zřízenou minimálně jednu referenční laboratoř, které za tuto činnost zodpovídá.

Látky sledované v rámci monitoringu prováděného podle směrnice 96/23/EC

Skupina A – Látky s anabolickým účinkem a zakázané látky

1. Stilbeny, jejich deriváty, soli a estery

- Diethylstilbestrol
- Dienestrol
- Hexestrol

2. Thyreostatické látky

- Thiouracil
- Methylthiouracil
- Propylthiouracil
- Tapazol

3. Steroidy

- 17 β -boldenon
- 17 β -nortestosteron (17 α -nortestosteron)
- Ethinylestradiol
- 17 β -estradiol
- Methyltestosteron
- 17 β -trenbolon (17 α -trenbolon)
- Stanozolol (16 β -hydroxystanozolol)
- Megestrol (acetat)
- Melengestrol (acetat)
- Chlormadinon
- Medroxyprogesteron
- Dexamethason

4. Laktony kyseliny resorcylové včetně zeranolu

- Zeranol
- Taleranol
- Zearalanol

5. Beta-agonisté (látky stimulující beta-adrenergní receptory)

- Clenbuterol
- Brombuterol
- Chlorbrombuterol
- Mabuterol
- Mapenterol
- Tulobuterol
- Hydroxymethylclenbuterol
- Clenpenterol
- Clenpropenterol
- Cimaterol
- Isoxsuprine
- Ritodrin
- Ractopamin
- Clencyclohexerol
- Salbutamol
- Salmeterol
- Zilpaterol

- Fenoterol
 - Terbutalin
 - Orciprenalin
6. Látky uvedené v příloze IV Nařízení Rady No 2377/90 (EHS) z 26. června 1990
- Aristolochia ssp. a preparáty z ní
 - Dapson
 - Dimetridazol
 - Chloramfenikol
 - Chloroform
 - Chlorpromazin
 - Kolchicin
 - Metronidazol
 - Nitrofurany (včetně furazolidonu)
 - Ronidazol

Skupina B – veterinární léčiva a kontaminanty

1. Antibakteriální látky včetně sulfonamidů a chinolonů
2. Ostatní veterinární léčiva
 - Anthelmintika
 - Antikokcidika
 - Karbamáty a dithiokarbamáty
 - Sedativa
 - Nesteroidní protizánětlivé látky
 - Ostatní farmakologicky účinné látky
3. Ostatní látky a kontaminanty prostředí
 - Organochlorové sloučeniny včetně polychlorovaných bifenyly
 - Organofosforové sloučeniny
 - Chemické prvky
 - Mykotoxiny
 - Barviva
 - Ostatní

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Veterinární léčiva, jejichž použití je zakázáno při chovu potravinových zvířat

Potravinová zvířata jsou zvířata chovaná, držená a porážená pro účely produkce potravin a nebo jsou od nich získávány produkty pro výrobu potravin. Veterinární léčiva musí být bezpečná jednak pro léčená zvířata, ale také pro uživatele (veterinární lékaře, chovatele) a v neposlední řadě také pro konzumenty živočišných produktů. Každý nový veterinární léčivý přípravek musí projít registračním řízením. Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL) zamítne žádost o tuto registraci v případě, že se v průběhu tohoto registračního řízení prokáže, že:

- veterinární léčivý přípravek určený pro aplikaci zvířatům, jejichž maso nebo produkty jsou určeny pro lidskou spotřebu, obsahuje léčivou látku nebo látky schopné farmakologického působení, které nejsou uvedeny ve zvláštním právním předpisu a nemají stanoven maximální limit reziduí (MRL) v souladu s tímto zvláštním právním předpisem (MRL je koncentrace reziduí určitého léčiva včetně jeho případných metabolitů, která nemá nepříznivé účinky pro konzumenta),
- u veterinárního léčivého přípravku určeného pro aplikaci zvířatům, jejichž maso nebo produkty jsou určeny pro lidskou spotřebu, nebyla stanovena přiměřená ochranná lhůta, tedy doba od skončení podávání veterinárního léčivého přípravku, po kterou může tento nepříznivě ovlivňovat zdravotní nezávadnost živočišných produktů¹.

U potravinových zvířat smí být použita výlučně taková léčiva, která obsahují farmakologicky aktivní látky pro které EMEA (European Medicines Agency) v souladu s nařízením 2377/90; ČR vyhl. 106/2002 stanovila pro daný druh a kategorii zvířat maximální limit reziduí (MRL) a která jsou uvedena v příloze I, II nebo III nařízení 2377/90, resp. vyhl. 106/2002¹.

Při podávání veterinárních léčivých přípravků je nutné dodržovat zásady správné veterinární praxe, která je definována jako: Selektivní a správné používání registrovaných veterinárních léčiv – v souladu s návodem k použití – při indikacích, pro které jsou povoleny, když je stanovena diagnóza a vzal se v úvahu problém reziduí v potravinách živočišného původu, jakož i dopad na životní prostředí při použití těchto látek¹³.

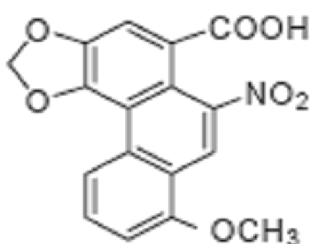
Distribuci léčiva, tvorbu metabolitů, vylučování léčiva a jeho metabolitů z organismu zvířete může ovlivňovat řada fyziologických, patofyziologických a technických faktorů, jako např. druh zvířete, jeho věk případně i pohlaví, vzájemná interakce současně podávaných léčiv, interakce léčiva s potravou a také vliv zoohygienických podmínek. Rezidua těchto látek se mohou lišit v různých produktech, jako je maso, mléko, vejce a med. Vliv na metabolický profil může mít i způsob podání léčiva. Všechny tyto faktory mohou pozměnit jak absorpci, tak i distribuci a prodloužit eliminaci léčiva a jeho metabolitů a mohou tak přispívat k riziku výskytu nepředvídaných reziduí přesahujících hladinu MRL¹³.

Léčiva nebezpečná pro zdraví člověka, která nesmějí být používána pro potravinová zvířata jsou uvedena ve Vyhlášce Ministerstva zdravotnictví 106/2002 Sb. ze dne 12. března 2002. Jsou to:

- Aristolochia ssp. a preparáty z ní
- Dapson
- Dimetridazol
- Chloramfenikol
- Chloroform
- Chlorpromazin
- Kolchicin
- Metronidazol
- Nitrofurany (včetně furazolidonu)
- Ronidazol."

2.1.1 Aristolochia ssp. a preparáty z ní

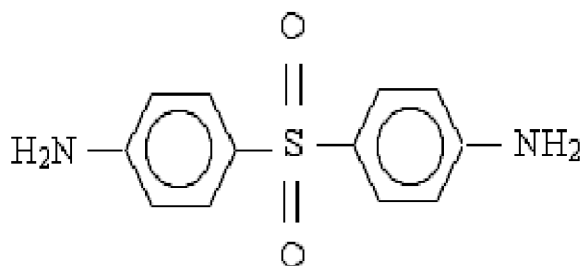
Aristolochia ssp. je čeleď liánovitých rostlin, které mimo jiné obsahují nitrofenantrenové sloučeniny - kyselinu aristocholovou I a II. Majoritní podíl v rostlinném materiálu tvoří kyselina aristocholová I (8-methoxy-3,4-methyldioxy-10-nitrofenanthren-1-karboxylová kyselina) - viz obr. 1). Tyto rostliny byly používány k lékařským účelům už v době starověku, a to k léčbě hadího uštknutí, artritidy, dny, revmatismu a hnisavých poranění a také v porodnictví. Kyseliny aristocholové vyvolávají u lidí poškození ledvin, nádory vývodných močových cest a močového měchýře a u hlodavců také maligní tumory ledvin a močových cest. Po jejich aktivaci se vytváří v játrech i ledvinách adukty s deoxyadenosinem a deoxyguanosinem. Ty ovšem vedou k tumoru pouze v ledvinách, i když v játrech probíhá biotransformace většiny xenobiotik. Základní mechanismus tkáňově specifické karcinogenity kyseliny aristocholové není známý. Jejich použití v terapii nadváhy pomocí čínských bylin vedlo k vývoji ledvinového selhání a nádorů močových cest. IARC (International Agency for Research on Cancer; Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny) klasifikovala produkty obsahující kyselinu aristocholovou jako lidský karcinogen^{2,3,7}.



Obr. 1: kyselina aristocholová I²

2.1.2 Dapson

Dapson - 4,4-diamino-difenyl-sulfon (strukturní vzorec viz obr. 2) patří do skupiny sulfonů (obr. 2). Jeho nejčastější použití je při léčbě lepry. Působí prostřednictvím enzymu DHPS (dihydropteroát syntetázy), který inhibuje biosyntézu kyseliny dihydrolistové. K její syntéze potřebují četné bakterie kyselinu *p*-aminobenzoovou. Dapson na základě své chemické podobnosti s touto kyselinou namísto ní obsazuje její cílová místa a tím brzdí produkci kyseliny dihydrolistové, která je potřebná pro množení bakterií. V důsledku jejího nedostatku se snižuje syntéza purinů nutných pro syntézu DNA a RNA. Nejvýznamnějším nežádoucím účinkem dapsonu je hemolytická anémie.⁴



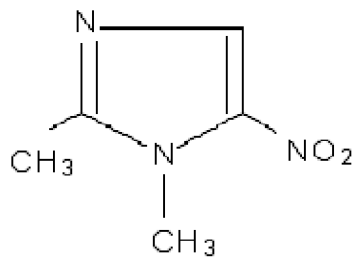
Obr. 2: dapson²

2.1.3 Dimetridazol, metronidazol, ronidazol

Tyto tři sloučeniny patří do skupiny nitroimidazolů a všechny se v dřívější době používaly jako profylaxe v krmivech pro krůty k prevenci a terapii histomonózy (černohlavosti krůt). Toto onemocnění je vyvoláno bičíkovci a projevuje se akutními průjmy vedoucími k úhynu především mláďat.⁵

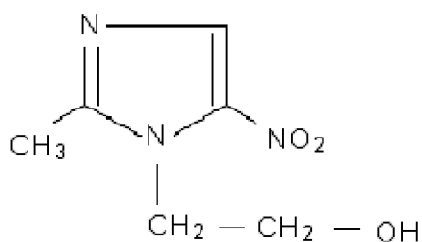
Většina aromatických nitrosloúčenin vykazuje mutagenní aktivitu v bakteriálních i savčích systémech a jsou to karcinogeny vyvolávající nádorové procesy. Jejich cílovými orgány jsou především játra, plíce a prsní žlázy. Klíčovým místem metabolické aktivace aromatických nitrosloúčenin je nitroskupina. Její redukcí vzniká hydroxylamin, který je nestabilní a ochotně tvoří nitreniový ion, který reaguje s nukleofilními centry molekuly DNA za vzniku aduktů. K aktivaci nitroaromátů v některých případech přispívá i jejich oxidační metabolismus. Mohou také působit prostřednictvím iniciace radikálových procesů. Jejich výsledkem jsou hydroxylované deriváty purinových bází. Pozorován byl také nárůst jednořetězových i dvouřetězových zlomů DNA^{7,27}.

Dimetridazol -1,2-dimethyl-5-nitroimidazol (strukturní vzorec viz obr. 3) - na základě výjimky jej lze použít u plůdku sumců proti kořovci.



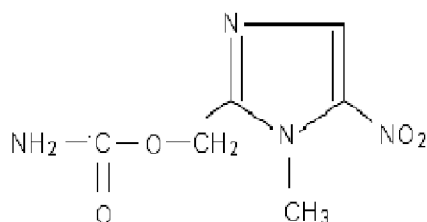
Obr. 3: Dimetridazol²

Metronidazol - 1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazol (strukturní vzorec viz obr. 4) lze použít také při léčbě infekčních onemocnění vyvolaných anaerobními bakteriemi (*Campylobacter*, *Clostridium*). Dále je účinný na řadu protozoí : *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* a *Balantidium coli*.⁶



Obr. 4: Metronidazol²

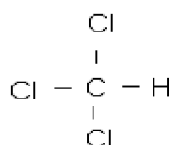
Ronidazol - 1-methyl-2-carbamoyloxymethyl-5-nitroimidazol - se používal také jako profylaxe enterohepatitidy krůt, při léčbě mykoplazmatických infekcí. Je účinný jak proti G⁺ tak i proti G⁻ bakteriím⁸. Strukturní vzorec viz obr. 5.



Obr. 5: Ronidazol²

2.1.4 Chloroform

Po dlouhou dobu byl chloroform - trichlormethan (strukturní vzorec viz obr. 6) spolu s diethyléterem jediným používaným celkovým anestetikem. Jeho účinek spočívá v nespecifickém uložení molekul do hydrofobního nitra fosfolipidické dvojvrstvy buněčné membrány. Nevýhodou ovšem je, že je to podezřelý karcinogen a že je hepatotoxický, při chronické expozici může vyvolat i cirhózu jater. Současně bývají poškozeny i ledviny. Při biotransformaci chloroformu vznikají reaktivní metabolity, které se kovalentně vážou na proteiny, tuky a fosfolipidy. S tím je spojena aktivita fosfolipázy C, která odbourává buněčnou membránu⁴. Vzniká také v menších množstvích z některých organických látek (alkoholy, ketony, aldehydy) při dezinfekci pitné vody chlorováním, což může vést k chronickým zdravotním potížím při jejím dlouhodobém používání k přípravě pokrmů a nápojů⁹.



Obr. 6: Chloroform²

2.1.5 Chlorpromazin

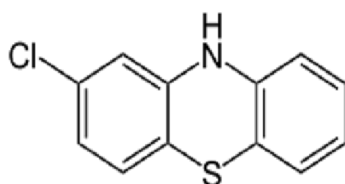
Chlorpromazin - 2-chlor-10-(3-dimethyl-aminopropyl)-10H-fenothiazin (strukturní vzorec viz obr. 7) je neuroleptická látka široce používaná v medicíně pro své tišící, antipsychotické a také antiemetické vlastnosti. Po perorálním podání se dobře resorbuje, metabolizuje se v játrech a je vylučován do moči a žluči. Plazmatická hladina rychle klesá, ale eliminační poločas je velmi dlouhý (4 nebo více týdnů), protože se nespecificky váže na membrány. Existují tři cesty jeho metabolismu:

- hydroxylace na jádře a následná konjugace (nejčastěji s kyselinou glukuronovou)
- demethylace
- oxidace síry a dusíku

Tyto děje probíhají paralelně, takže v organismu se současně vyskytuje velké množství metabolitů chlorpromazinu⁴.

Chlorpromazin se váže rychle do fosfolipidické dvouvrstvy, ruší organizaci molekul fosfolipidů, což může vést až k ruptuře membrány.²⁸

Působením UV záření vznikají z chlorpromazinu reaktivní volné radikály, které mohou vyvolat vznik genových mutací a chromozomálních aberací¹⁰.



Obr. 7: chlorpromazin²

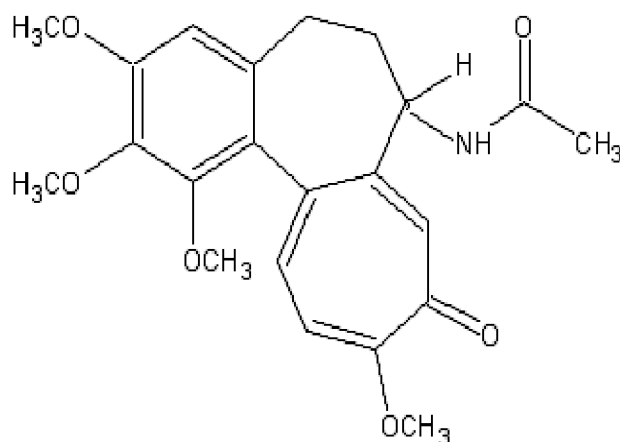
2.1.6 Kolchicin

Kolchicin -N-((7S)-5,6,7,9-tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzo(a)heptalen-7-yl)acetamide je alkaloid získaný z ocúnu. Je to mitotický jed - mitózu zastavuje ve stádiu metafáze, tím že inhibuje tvorbu mirotubulů).

Používá se při akutních záchvatech dny, což je porucha metabolismu proteinů projevující se nadměrným hromaděním kyseliny močové v organismu. Při akutním záchvatu dny dochází ke zvýšení koncentrace urátu v krvi a tkáňovém moku, urát pak vypadává z roztoku ve formě krystalků a to především v málo prokrvených tkáních jako jsou například kloubní chrupavky. Fagocytující buňky tyto krystalky fagocytují, dojde k těsnému spojení lysozomální membrány s tímto krystalem a tím se sníží její mechanická stabilita a membrána praskne. Tím dojde k uvolnění agresivních lysozomálních enzymů a zároveň k uvolnění původně fagocytovaného krystalku urátu. Tyto enzymy pak narušují přilehlé tkáně. Účinek kolchicinu pak spočívá v tom, že inhibuje tuto fagocytární aktivitu a tím zabrání uvolňování agresivních lysozomálních enzymů^{4,29}.

Je to podezřelý teratogen - snadno prostupuje placentární bariérou. Také dochází k jeho hromaděni v mateřském mléce.²⁹

V současné době se kolchicin využívá v genetickém výzkumu k záměrnému vyvolání genomových reakcí.²⁹

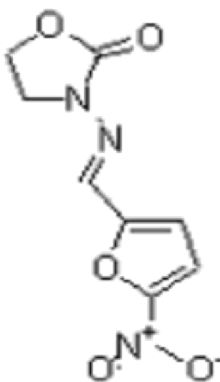


Obr. 8 : Kolchicin²

2.1.7 Nitrofurany včetně furazolidonu

Nitrofurany jsou syntetická širokospektrální antibiotika, které byla v minulosti používána v živočišné výrobě, a to v chovech drůbeže, prasat, telat a dalších hospodářských zvířat jako prevenci a terapie střevních infekcí způsobených bakteriemi *Escherichia coli* a *Salmonella* spp. a také jako stimulatory růstu. Nejčastěji používaným nitrofuránem byl furazolidon -N-(5-nitro-2-furfurylidene-3-amino)-2-ox-azolidinon (strukturní vzorec viz obr. 9). V roce 1995 bylo použití nitrofuránů u potravinových zvířat zakázáno v rámci celé Evropské unie, protože byla prokázána jejich karcinogenita a mutagenita^{11,30}.

Nitrofurany se po požití rychle metabolizují a výsledkem tohoto složitého metabolismu je tvorba stabilních, na tkáň vázaných reziduí, která v metabolizované formě přetrvávají ve zvířatech ještě nejméně šest týdnů po ukončení léčby. Chemická stabilita těchto metabolitů zůstává uchována i při dlouhodobém skladování in vitro a také při tepelném zpracování. Metabolity mohou být v kyselém prostředí žaludku uvolněny z vazby a mohou takto představovat zdravotní riziko pro spotřebitele^{11,30}.

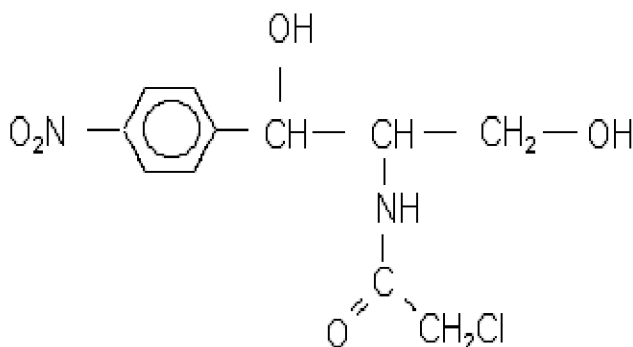


Obr. 9: furazolidon²

2.1.8 Chloramfenikol

2.1.8.1 Charakteristika

Chloramfenikol - 2,2-Dichloro-*N*-[β-hydroxy-α-(hydroxymethyl)-4-nitrophenethyl]acetamide, (strukturní vzorec viz obr. 10) je širokospektrální antibiotikum se širokým spektrem účinku. V dřívější době bylo hojně používané ve veterinární praxi, a to ve všech významnějších chovech zvířat produkujících potraviny.



Obr. 10 : chloramfenikol²

V současné době nachází použití v humánní medicíně při léčbě těch infekčních onemocnění, při kterých jsou jiná antibiotika neúčinná a nebo je k nim původce infekce získal rezistenci. Jde především o tato onemocnění - břišní tyfus, bakteriální meningitida, anaerobní infekce,

brucelóza, riketsiální infekce. Dále se používá ve forma kapek nebo masti při léčbě očních infekcí, jako je zánět spojivek nebo rohovky, dále ve formě masti k léčbě zevního ucha nebo pokožky. Ve veterinární medicíně se smí používat pouze u psů, koček, koní a akvarijních rybek,¹⁴.

Poprvé byl izolován z půdních mikroorganismů *Sterptomyces venezuelae* v roce 1947, ale nyní se připravuje výhradně synteticky. Při systémové léčbě se používají tři jeho formy, a to v závislosti na způsobu podání léku - chloramfenikol s volnou bází, chloramfenikol palmitát a chloramfenikol sukcinát¹⁴.

Vlastní chloramfenikol a inaktivní chloramfenikol-palmitát se používají při perorálním podání. K hydrolyze esterové vazby chloramfenikol-palmitátu dochází v duodenu činností pankreatických lipáz. Uvolněný chloramfenikol je absorbován v gastrointestinálním traktu. Pro parenterální aplikace se používá chloramfenikol sukcinát; k jeho hydrolyze může docházet činnostmi esteráz jak v játrech, tak i v ledvinách i v plicích¹⁵.

Chloramfenikol je dobře distribuován do všech částí těla a snadno dosahuje terapeutické koncentrace i v CNS, kde se také může akumulovat. Asi 50% chloramfenikolu se váže na plazmatické proteiny, tato vazba je nižší u jedinců s cirrhózou a u novorozenců. Poločas chloramfenikolu byl závislý na koncentraci bilirubinu v plazmě¹⁵.

Při současném podávání pyridoxinu byla koncentrace chloramfenikolu séru výrazně nižší a současně byla vyšší rychlost eliminace jeho reziduí z tkání. Současné podávání glycinu chrání játra před toxickým účinkem chloramfenikolu.^{33,34}

Nejčastěji se eliminuje v játrech, a to konjugací s kyselinou glukuronovou za vzniku inaktivního glukuronidu. Tento metabolit je stejně jako samotný chloramfenikol vylučován močí¹⁵.

U zvířat léčených chloramfenikolem byly v ledvinách, játrech a ve svalovině nalezeny tyto tři metabolity :

- dehydrochloramfenikol
- nitrofenylaminopropandionchloramfenikol (NPAP-chloramfenikol)
- nitrosochloramfenikol

U všech byl prokázán cytotoxický efekt. Tyto metabolity vznikají také v kostní dřeni jako výsledek metabolické transformace, z čehož lze usuzovat, že kostní dřeň je druhým místem metabolické konverze chloramfenikolu a tím i cílem poškození¹⁴.

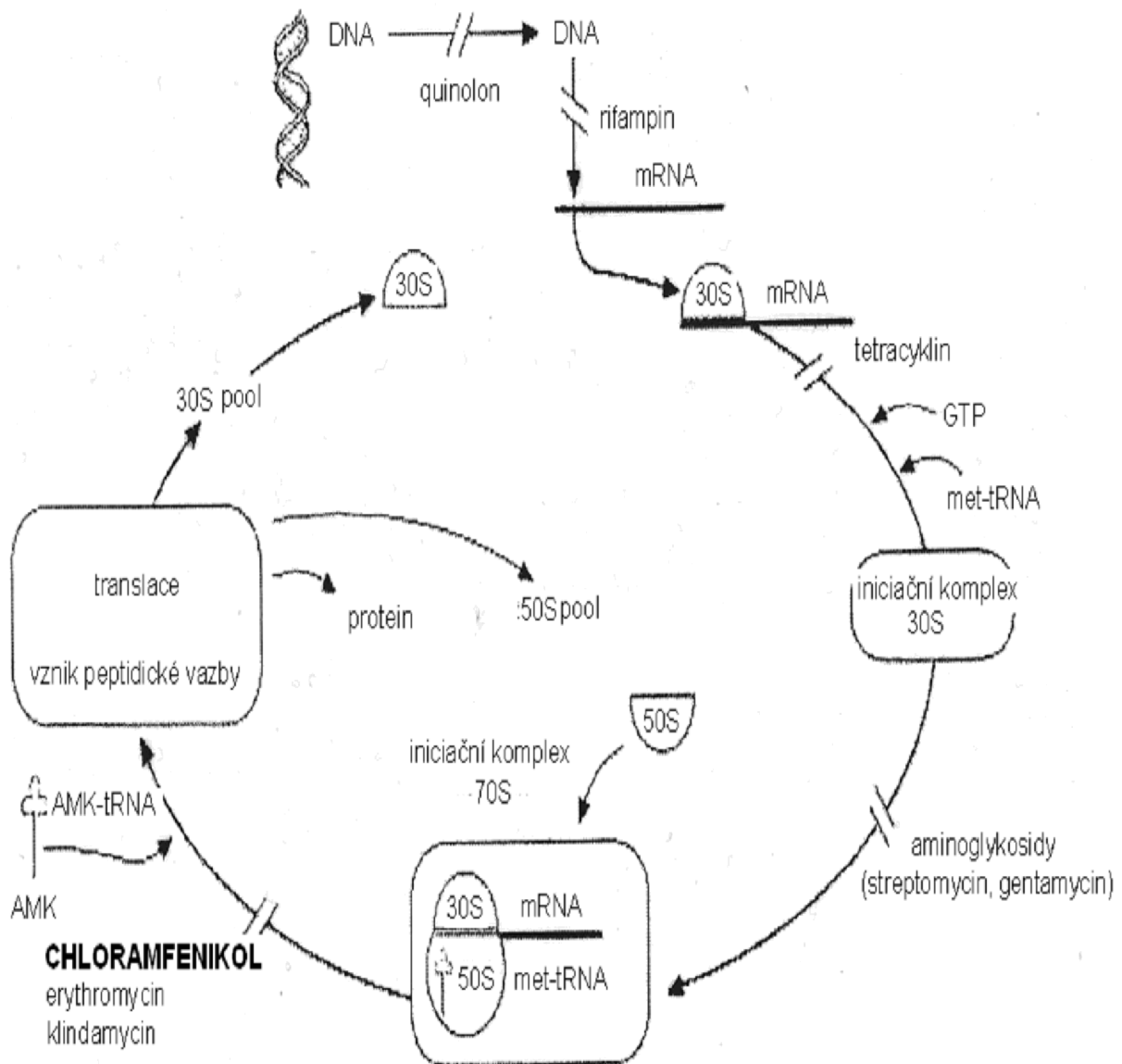
Chloramfenikol je také prokázáný inhibitor oxidativní fosforylace, snižuje využití glukózy v mozku a ovlivňuje průběh spánkového cyklu.^{32,36}

2.1.8.2 Cytotoxicita a genotoxicita

Cytotoxický účinek chloramfenikolu spočívá v tom, že inhibuje peptidyltransferázu. Tento enzym je součástí velké 50S podjednotky ribozomu a katalyzuje vznik peptidické vazby při translaci. Chloramfenikol inhibuje proteosyntézu u prokaryotických buněk a v menší míře také u buněk eukaryotických. Ze savčích buněk jsou na účinek chloramfenikolu nejcitlivější buňky erythropoetické. Důvodem tohoto jevu je, že mitochondriální a bakteriální ribozomy jsou si podobné (oba mají velikost 70S), zatímco cytoplazmatické mitochondrie savců mají velikost 80S¹⁵.

K inhibici proteosyntézy působením chloramfenikolu dochází také tím, že chloramfenikol negativně ovlivňuje kompletaci malé a velké ribozomální podjednotky.³¹ Možnosti inhibice proteosyntézy znázorňuje obr. 11.

Další nevýhodou chloramfenikolu je jeho genotoxicita - indukuje výměnu sesterských chromatid a také bylo prokázáno, že vyvolává zlomy v jednořetězcové DNA. Nejvyšší genotoxické účinky má nitroso-chloramfenikol a dehydro-chloramfenikol a ke genotoxickým účinkům těchto derivátů jsou buňky kostní dřeně vnímavější než lymfocyty.³⁶



Obr. 11 : Místa inhibice proteosyntézy různými antibiotiky³⁵

2.1.8.3 Hematotoxicita

Existují dvě formy toxicity vyvolané chloramfenikolem:

1. reverzibilní, na velikosti dávky závislé poškození kostní dřeně, které se vyvíjí během léčby. Pacient se vrací do normálního stavu po vysazení léku. K této formě toxicity dochází při každém použití léku.
2. ireverzibilní, s velikostí dávky nesouvisející aplastická anémie, která je charakterizovaná nedostatečnou tvorbou krevních buněk vedoucí k úbytku červených krvinek, bílých krvinek i krevních destiček. Je spojena s poškozením DNA vyvolaným nitrochloramfenikolem, který je produktem redukce nitro skupiny chloramfenikolu. Schopnost této redukce je geneticky daná. Tato forma je vzácnější, ale často končí smrtí nebo se z ní může vyvinout leukémie. Příznaky se mohou objevit až několik týdnů nebo i měsíců po podání poslední dávky.⁴

Vzhledem k tomu, že vývin aplastické anémie nezávisí na výši dávky chloramfenikolu, není pro tuto látku stanovena ani přijatelná denní dávka (acceptable daily intake - ADI) a ani maximální reziduální limit (maximum residue limit - MRL)^{4, 36}.

Toxicita vyvolaná chloramfenikolem úzce souvisí s oxidačním stresem, s možným spojením mezi metabolickým vznikem volných radikálů a útlumem kostní dřeně.⁴

2.1.8.4 Gray baby syndrom

U novorozenců může být chloramfenikol smrtelný, zvláště u těch předčasně narozených. K vývoji onemocnění dochází 2 - 9 dní po začátku léčby a projevuje se zvracením, nechutí k sání, nepravidelným a zrychleným dýcháním a volným odchodem zelené stolice. Následuje ospalost, světlešedé zbarvení kůže (odtud název syndromu), hypotermie a oběhový kolaps.

Za toxicitu chloramfenikolu u novorozenců jsou zodpovědné dva mechanismy:

1. jeho neschopnost navázat se na kyselinu glukuronovou, což je způsobeno tím, že aktivita glukuronyltransferázy v játrech je v prvních 3 - 4 týdnech života odlišná od aktivity v pozdějším věku
2. nesprávné vylučování nevázané látky ledvinami novorozenců nedokáží správně vylučovat nevázaný chloramfenikol¹⁵

2.1.8.5 Rezidua v potravinách

Přítomnost reziduí chloramfenikolu v potravinách živočišného původu může mít - kromě ilegálního použití tohoto léku u potravinových zvířat - hned několik příčin:

- chloramfenikol je přirozeně produkován některými půdními mikroorganismy a takto kontaminovaná půda může být volně se pasoucími zvířaty mimoděk pozřena s potravou
- do půdy se může chloramfenikol dostat také prostřednictvím hnoje, který pocházel od léčených zvířat a který se následně použil jako hnojivo
- zvířata mohou být příležitostně vystavena působení perzistujících environmentálních reziduí chloramfenikolu, které jsou následkem dřívějšího veterinárního použití

- v kombinovaných chovech hospodářských zvířat a ryb lze výkaly použít také jako hnojivo do rybníků a pokud byla některá zvířata v tomto systému léčena chloramfenikolem, pak se jeho rezidua mohou dostat i do vody a tak i do těl vodních živočichů¹⁴.

Hladiny reziduí vzniklé v živočišných produktech těmito cestami jsou však řádově nižší, než po podání chloramfenikolu zvířatům v terapeutických dávkách.

2.2 Legislativní požadavky na kontrolu nelegálního použití zakázaných látek

Přítomnost reziduí veterinárních léčivých přípravků v produktech živočišného původu představuje problém z hlediska ochrany veřejného zdraví. Dne 9. března 1995 zdůraznil Evropský parlament naléhavou potřebu jednotného a účinného monitorovacího systému ve Společenství a požádal členské státy o posílení kontroly a sledování s ohledem na použití nedovolených látek. Dosavadní právní předpisy Společenství o kontrole reziduí v potravinách živočišného původu nebyly dostatečně jasné a dávaly možnost různých interpretací v jednotlivých členských státech a dále bylo nutno posílit kontroly prováděné jednotlivými státy a v jednotlivých členských státech.

Proto dne 29. dubna 1996 vydala Rada dvě nové směrnice:

1. 96/22/EC o zákazu používání některých látek s hormonálním nebo tyreostatickým účinkem a beta-sympatomimetik v chovech zvířat - tato směrnice ruší předchozí směrnice 81/602/EHS, 88/146/EHS a 88/299/EHS
2. 96/23/EC o kontrolních opatřeních u některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech – tato směrnice ruší směrnice 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS²¹.

2.2.1 Směrnice Rady (ES) č. 96/23/ES

Tato směrnice vymezuje monitoring postupu produkce zvířat a výrobků živočišné prvovýroby za účelem zjištění přítomnosti reziduí a látek uvedených v příloze I u živých zvířat, v jejich výkalech a tělních tekutinách, ve tkáních a ve výrobcích živočišného původu, v krmivech a v napájecí vodě.

Členské státy musí vypracovat a předložit Komisi plán zjišťování skupin látek či reziduí podle typů zvířat a vymezit opatření v případě pozitivního nálezu.

Dále musí členské státy zajistit, aby na trh byly uváděny pouze takové potraviny živočišného původu, které pocházejí ze zvířat, kterým nebyly podány nepovolené látky a pokud jim byly podány povolené látky byla dodržena ochranná lhůta.

Musí se provádět namátkové kontroly během výroby, manipulace, skladování, přepravy a distribuce těchto potravin, u vodních živočichů také vody, ze které byli vyloveni. Kontrole podléhá i produkce a distribuce krmiv. Tato kontrola se vztahuje i na dovoz potravin živočišného původu ze států mimo EU.

Každý členský stát určí alespoň jednu národní referenční laboratoř - v České republice je to pro kontrolu látek uvedených ve skupině A v příloze této vyhlášky Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (USKVBL), pro kontrolu látek skupiny B je určen Státní veterinární ústav. Skupinu A tvoří látky s anabolickým účinkem a nepovolené látky, skupinu

B veterinární léčiva a kontaminanty. Zvířata, která byla posouzena jako nevyhovující musí být bezprostředně poražena a jejich těla odeslána do zařízení ke zpracování velmi nebezpečných materiálů. Minimálně po dobu jednoho roku je hospodářská jednotka, kde byl potvrzen nevyhovující nález, pod zesílenou kontrolou.

Tato vyhláška specifikuje pro každou kategorii hospodářských zvířat minimální počet kontrolovaných kusů a dále stanoví, jaký podíl z těchto zvířat má být vyšetřen na rezidua látek skupiny A a na rezidua skupiny B²¹.

V Rozhodnutí Komise 2003/181/EC ze dne 13. března 2003 byly stanoveny minimální požadované dosahované limity (minimum required performance limit - MRPL) analytických metod pro látky, pro něž nebyl stanoven přípustný limit (MRL), a zejména pro ty látky, jejichž použití není ve Společenství povoleno nebo je výslovně zakázáno. Pro chloramfenikol je hodnota MRPL 0,3µg/kg, a to pro všechny sledované matrice (maso, vejce, mléko, moč, med, vodní živočichové)²².

Požadavky na analytické metody, kterými jsou rezidua stanovována, jsou definovány v Rozhodnutí Komise 2002/657/EC.³⁷

2.3 Použití analytická metoda

Pro všechny analytické metody na stanovení chloramfenikolu jsou typické následující tři základní kroky:

- příprava primárního extraktu
- purifikace primárního extraktu
- detekce a kvantifikace reziduí chloramfenikolu

2.3.1 Příprava primárního extraktu

Příprava vzorku patří k základním úkonům při analýze vzorků, zvláště pak vzorků biologických, ve kterých chceme stanovovat rezidua v koncentracích řádově desetin až jednotek µg/kg biologického materiálu. Na jejím provedení záleží celkový úspěch analytického stanovení – a to jak z kvalitativního, tak i z kvantitativního hlediska.

Dalším hlediskem, které je třeba brát v úvahu při výběru postupu přípravy primárního extraktu je čas potřebného pro přípravu vzorku a pracnost přípravy. Každé zjednodušení postupu zvyšuje správnost provedení analýzy.

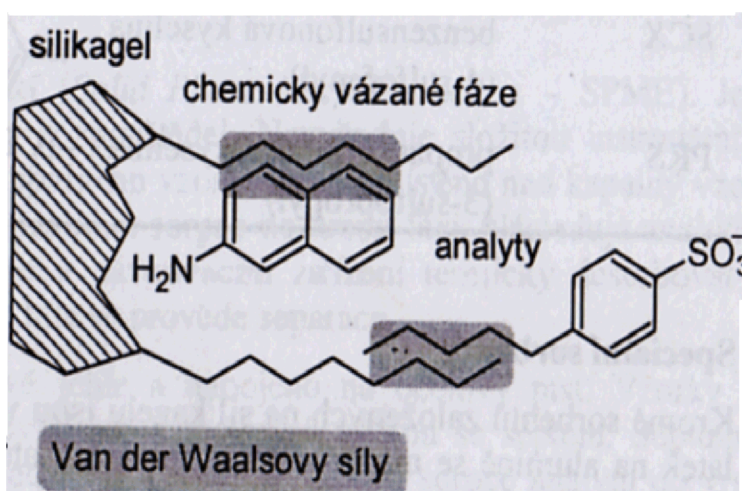
Cílem je připravit vyčištěný extrakt, který bude možno analyzovat vysoce účinnou analytickou metodou. Tuhé vzorky je nutné převést do roztoku, vzorky obsahující tuhé nečistoty se musí zfiltrovat a pokud vzorek obsahuje pevné částice, na které je analyt adsorbován, musí se nejprve analyt z těchto částíček desorbovat.

U biologických vzorků není výjimkou, že analyt je chemicky vázán na biomakromolekuly. Nejobvyklejší metodou rozrušení této vazby je hydrolýza (kyselá, alkalická, enzymatická). Biologické vzorky jsou vždy komplikované směsi (komplexní matrice) a proto se musí odstranit veškeré interferující složky.¹⁶

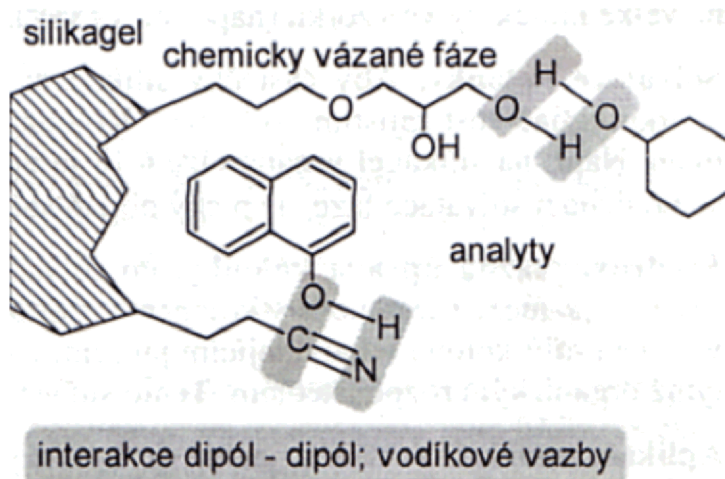
2.3.2 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction - SPE) je v současné době nejrozšířenější separační technikou používanou při zpracování kapalných vzorků s různou polaritou, pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich zakonzentrování a odstranění nežádoucích příměsí, které by mohly rušit následná analytická stanovení. Její podstatou je zachycení molekul analytu na tuhém sorbentu, přes který vzorek protéká - využívá se chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí na sorbentu ulpívají. Mechanismy zachycování látek spočívají v různých molekulárních interakcích mezi analytem a sorbentem:

- van der Waalsovy síly („nepolární“ interakce) - viz obr. 12
- vodíkové můstky („polární“ interakce) - viz obr. 13
- iontové interakce¹⁶



Obr. 12: Interakce na nepolárních sorbentech¹⁶



Obr. 13: Interakce na polárních sorbentech¹⁶

Sorbenty jsou většinou založeny na bázi chemicky modifikovaného silikagelu - na povrchové silanolové skupiny se chemicky navazují skupiny různých vlastností, které pak rozhodují o výsledných vlastnostech sorbentu. Pro extrakci chloramfenikolu, který je nepolární musí být zvolena nepolární fáze - nejčastěji je to oktadecyl (C18). Aby částičky silikagelu pokryté nepolární fází zadržovaly analyt, je nezbytné smáčení fáze vázané na silikagel rozpouštědlem s vhodnou polaritou. Pak následuje nasycení kolonky čistým rozpouštědlem shodným s rozpouštědlem analyzovaného vzorku. V případě fáze C18 se kolonka solvatuje methanolem a pak nasytí vodou. Tato operace se označuje jako solvatace nebo také kondicionace kolonky¹⁶.

Na takto připravenou kolonku se nanese analyzovaný vzorek a nechá protékat přiměřenou rychlostí - rychlý průtok může způsobit, že se analyt nezadrží úplně, pomalý průtok zvyšuje časovou náročnost procesu a tím zhoršuje jeho ekonomiku

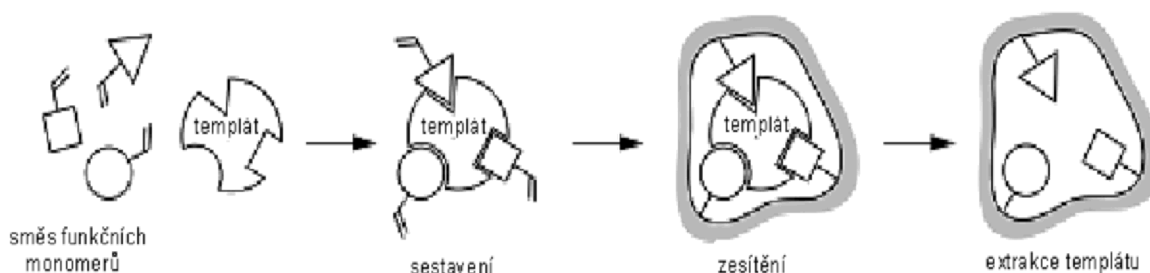
Následuje selektivní eluce nežádoucích sloučenin vhodným rozpouštědlem, ve kterém je analyt nerozpustný. Posledním krokem je eluce analytu z vázaných fází vhodným rozpouštědlem. Opět je nutné kontrolovat přiměřená rychlost průtoku, protože při rychlém průtoku se nemusí vymýt všechny analyt. Průtok kapaliny přes kolonku lze urychlit následujícími metodami:

- vakuem na výstupu z kolonky
- tlakem na vstupu kolonky
- centrifugací¹⁶

2.3.3 Molekulárně otištěné polymery

Poměrně novou technologií purifikace primárního extraktu jsou jako náplně SPE kolonek vyráběny speciální polymery, které na základě kombinovaných vlastností (velikost pórů a jejich polarita) selektivně zadržují konkrétní analyty, pro které jsou připraveny.

Tyto molekulárně otištěné polymery (Molecularly Imprinted Polymers - MIP) se vyrábí z vysoce zesítěných polymerů v přítomnosti cílové molekuly jako templátu. Po odstranění tohoto templátu se odhalí vazebná místa v polymerní síti, která jsou k templátu komplementární jak ve velikosti a tvaru, tak i v pozici funkčních skupin. Tento polymer pak může být použit jako selektivně vázající médium pro cílový analyt a jiné strukturně obdobné sloučeniny.¹⁷ Schéma přípravy MIP znázorňuje obr. 14.



Obr. 14: Schéma přípravy MIP¹⁹

Vzhledem k tomu, že chloramfenikol je zcela zakázán u potravinových zvířat, je nutné jako templát použít jeho analog, neboť případně nedostatečně odstraněný templát z MIP by mohl vyvolat falešně pozitivní výsledky¹⁷.

Tato metoda vykazuje vysokou extrakční selektivitu, zvýšení výtěžku analytu, vyšší čistotu konečného extraktu, zkrácení času a dobrou citlivost umožňující detekci stopových množství chloramfenikolu, a to v koncentraci již od 0,03 µg/kg, což je koncentrace desetkrát nižší než je MRPL stanovený pro chloramfenikol.¹⁷

Suchý polymer se umístí do prázdné SPE kolonky mezi dvě polyethylenové frity. Takto připravené MIP kolonky lze zakoupit od komerčních výrobců. Před vlastní extrakcí musí proběhnout kondicionace (solvatace) promývacím rozpouštědlem. Pak se na kolonku nanese analyzovaný vzorek a nakonec se provede eluce vhodným rozpouštědlem. Rychlost průtoku vzorku i elučního činidla kolonkou musí být přiměřená. Příliš pomalá rychlost prodlužuje dobu potřebnou na analýzu, příliš vysoká rychlost průtoku vzorku může způsobit, že se cílový analyt „nestihne“ navázat na specifické vazebné místo, vysoká rychlost eluce pak může způsobit, že ne všechny analyt se z kolonky vyplaví¹⁸.

Retence chloramfenikolu je způsobena selektivními vodíkovými vazbami pokud je použit nepolární promývací roztok a neselektivními vodíkovými vazbami při použití polárního promývacího roztoku¹⁸.

Hlavní přínosy použití MIP při extrakci chloramfenikolu tedy jsou:

- velmi vysoký stupeň přečištění vzorku a vysoká selektivita, které je dosaženo při rychlé a jednoduché úpravě vzorků
- velmi nízké detekční limity
- stabilita v širokém rozsahu pH a teploty
- vyšší výtěžky
- zkrácení času přípravy vzorku oproti použití klasických kolonek SPE-C18¹⁹

Použití kolonek MIP pro chloramfenikol bylo optimalizováno pro různé komplexní matrice (mléko, plazmu, med, moč a těla krevet či garnátů). Rozdíly v použitých promývacích a elučních roztocích jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Příprava biologického materiálu před vlastní extrakcí na MIP kolonkách je pro některé matrice odlišná od přípravy tohoto materiálu před extrakcí na klasických kolonkách SPE-C18. Čerstvé mléko se před nanesením na kolonku musí centrifugovat a použije se pouze vrstva nacházející se mezi horní vrstvou tuků a dolní vrstvou bílkovin. Plazma se také centrifuguje a na kolonku se použije pouze supernatant. Med stačí pouze rozpustit v deionizované vodě. Rychlost rozpouštění lze zvýšit zahřevem na 45°C. Moč se také centrifuguje a supernatant je nutné upravit na pH7 pomocí kyseliny octové nebo amoniaku. Příprava vzorků z krevet a garnátů spočívá v homogenizaci syrového nebo vařeného masa, homogenizát se smíchá s ethylacetátem a centrifuguje. Supernatant se vysuší a znovu rozpustí v deionizované vodě a zfiltruje. Opět je nutné vzorek před aplikací na kolonku upravit na pH7 pomocí kyseliny octové nebo amoniaku²⁰.

Tabulka č. 1²⁰:

matrice	LOD	1. promytí	2. promytí	eluce
mléko	0,10 ng/ml	A ACN + AA A ACN + NH ₃	dichlormethan	metOH:AA:A (89:1:10)
plazma	0,02 ng/ml	A ACN + AA A ACN + NH ₃	dichlormethan	metOH:AA:A (89:1:10)
moč	0,02 ng/g	A ACN + AA NH ₃ ACN + NH ₃	2%AA rozpuštěná v dichlormethanu	10% metOH v dichlormethanu
med	0,02 ng/g	A ACN + AA NH ₃ ACN + NH ₃	2%AA rozpuštěná v dichlormethanu	metOH
krevety a garnáti	0,07 ng/g	A ACN + AA NH ₃ ACN + NH ₃	dichlormethan	metOH:dichlormethan (10:90)

A - voda; ACN - acetonitril; AA - kyselina octová; metOH - methanol

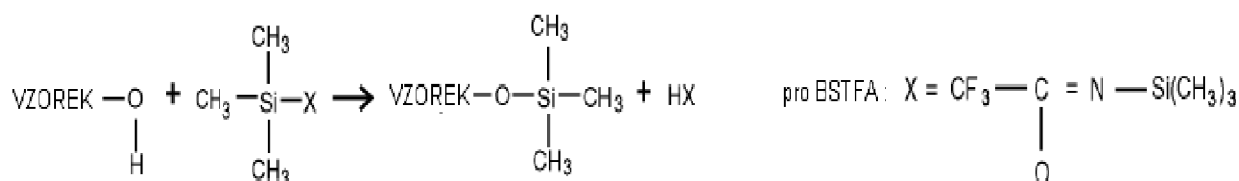
2.3.4 Derivatizace

Derivatizace umožňuje stanovit pomocí plynové chromatografie i látky před derivatizací obtížně stanovitelné, termolabilní nebo málo těkavé. Jde o nahrazení reaktivních atomů vodíku ve funkčních skupinách organických látek, jako jsou například alkoholy, fenoly, glykoly, karboxylové kyseliny, hydroxykyseliny, aminokyseliny, aminy, amidy nebo thioly jinou skupinou. S ohledem na vlastnosti analytů a zvolenou analytickou techniku detekce se nejčastěji používá silylace, acylace, esterifikace, alkylace, cyklizace nebo kombinace některých z těchto metod. Vzniklé deriváty mají v porovnání s původními sloučeninami nižší polaritu, vyšší těkavost a jsou termicky stabilnější²³.

Derivatizaci můžeme rozdělit Podle místa, kde probíhá derivatizační reakce, existují následující derivatizační techniky:

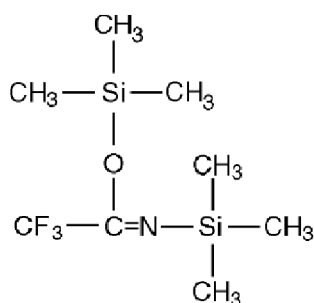
- předkolonová derivatizace (pre-column derivatization); chemická reakce probíhá před kolonou
- postkolonová derivatizace (post-column derivatization); chemická reakce probíhá za kolonou
- derivatizace na koloně (on-column); chemická reakce probíhá přímo v koloně

Všechny způsoby derivatizace mají vliv na eluční charakteristiky separovaných látek (účinnost separace a dobu analýzy)¹². Vznik trialkylsilyl derivátů ukazuje rovnice na obr. 15 .



Obr. 15: Reakce vzniku trialkylsilyl derivátů²⁴

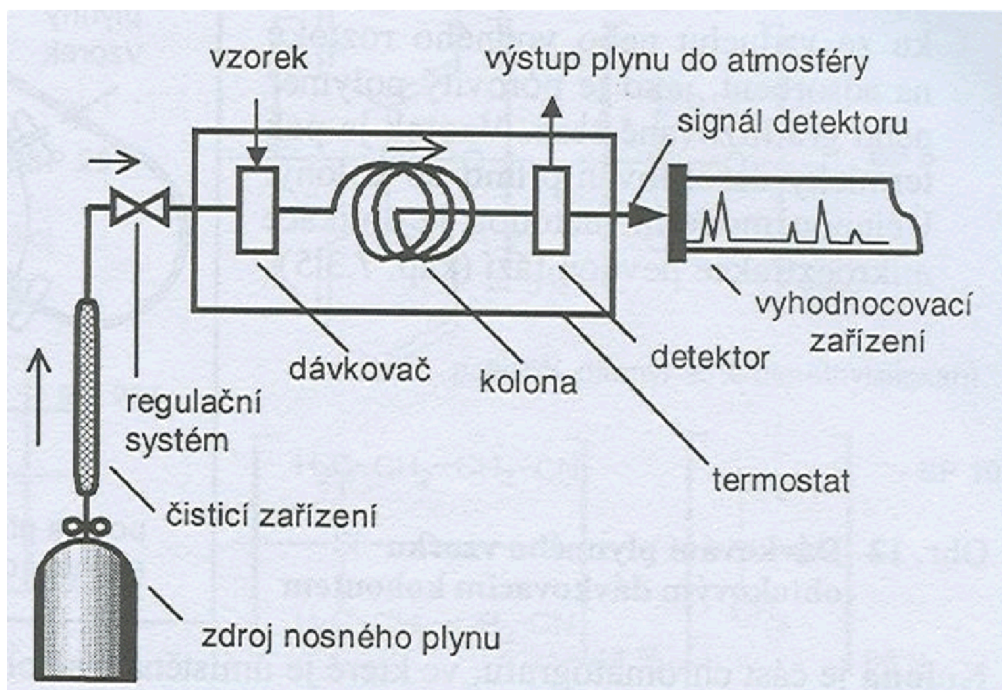
Nejběžnější metodou derivatizace pro plynovou chromatografii je silylace, při níž dochází k nahrazení vodíku trimethylsilylovou skupinou. Tyto deriváty jsou ovšem oproti původním sloučeninám mnohem náchylnější k hydrolyze. Pro derivatizaci chloramfenikolu se nejčastěji používá BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) - strukturní vzorec viz obr. 16. Ke vzorku se silylační činidlo přidává v nadbytku - molární poměr BSTFA : aktivní vodík by měl být alespoň 2 : 1²⁴.



Obr. 16: BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)²⁴

2.3.5 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE

Plynová chromatografie je separační metoda, při které se rozdělují složky vzorku mezi stacionární a mobilní fází, které jsou navzájem nemísitelné. U plynové chromatografie je mobilní fází inertní plyn, který unáší vzorek kolonou obsahující fází stacionární. Jednotlivé složky vzorku jsou separovány na základě rozdílných interakcí s touto stacionární fází a jsou postupně eluovány inertním nosným plynem. Složky vycházející z kolony jsou postupně indikovány detektorem a signál odpovídající jejich obsahu nebo koncentraci v nosném plynu, je samočinně registrován jako funkce času nebo objemu. Je to ideální metoda pro termostabilní látky, látky silně polární musí být před vlastní analýzou chemicky upraveny derivatizací. Každý chromatograf má tyto základní části: zdroj nosného plynu, čistící zařízení, regulační systém, dávkovač, kolonu, termostat, detektor a vyhodnocovací zařízení.¹⁶ Schéma plynového detektoru je na obr. 17.



Obr. 17: Schéma plynového chromatografu¹⁶

2.3.5.1 Části plynového chromatografu

2.3.5.1.1 Zdroj nosného plynu

Zdrojem nosného plynu, tedy mobilní fáze, je tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon. Funkcí nosného plynu je unášet vzorek kolonou a jeho nejdůležitější vlastností je, že neinteraguje ani s dělenou směsí ani se stacionární fází. Druh plynu je určen jeho úkolem unášet vzorek kolonou a potřebou inertního chování vůči jeho složkám. Velkou roli při jeho výběru hraje též potřeba netoxicity, bezpečnosti práce a v neposlední řadě také cena^{12,16}.

2.3.5.1.2 Čisticí zařízení

Jeho úkolem je zachycovat nečistoty nacházející se v nosném plynu, které mohou interagovat s analytem i se stacionární fází. Z tohoto hlediska jsou kritickými nečistotami vodní pára a kyslík, a to jak pro separační systém (chemická změna stacionární fáze, tzv. stárnutí a z něho vyplývající omezená přesnost výsledků pozorování), tak i pro měřicí systém^{12,16}.

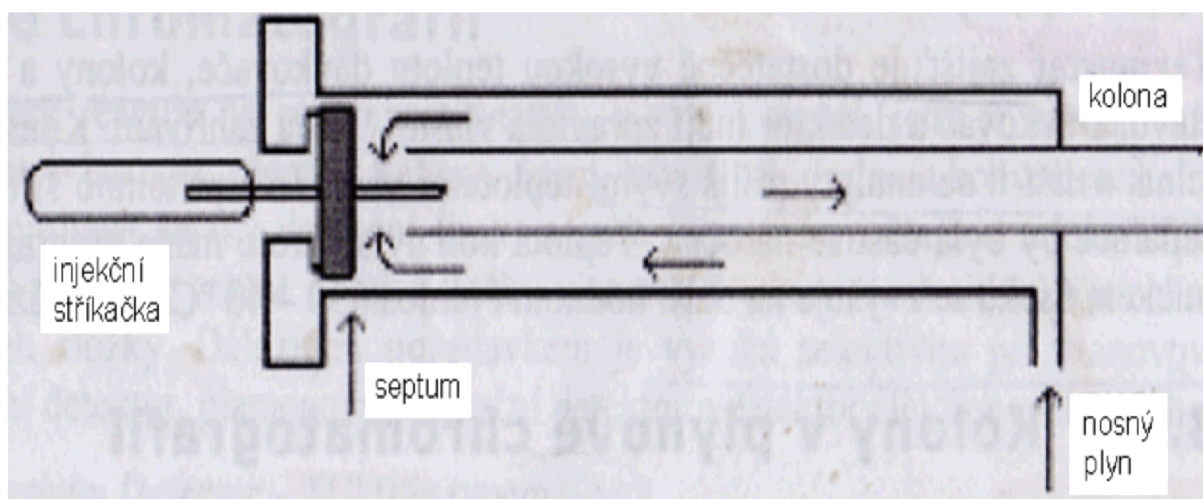
2.3.5.1.3 Regulační systém

Regulační systém zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu, případně jeho vstupní tlak. Udržování definovaného průtoku nosného plynu kolonou je důležitou součástí analýzy, protože tento průtok ovlivňuje jak kvalitativní tak i kvantitativní analýzu (retenční čas)^{12,16}.

2.3.5.1.4 Dávkovač

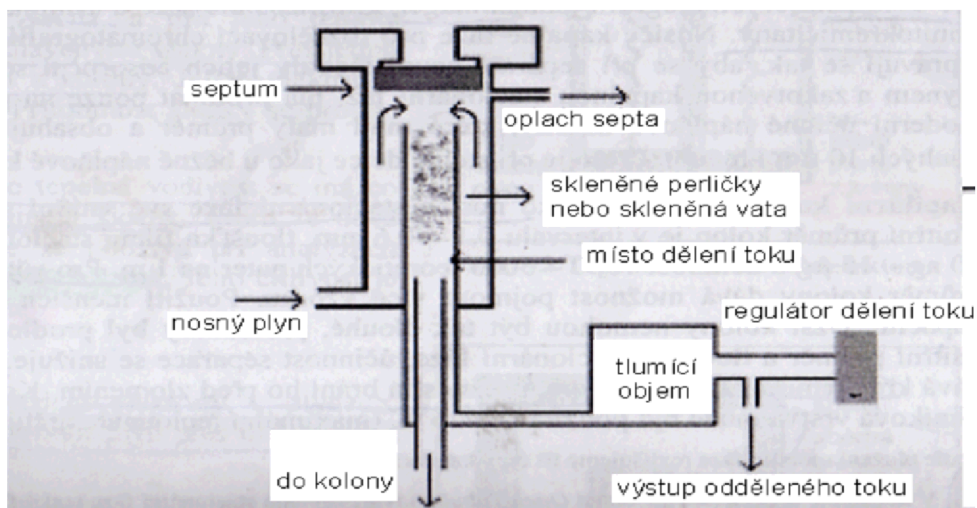
Dávkovače slouží k zavedení analyzovaného vzorku na začátek chromatografické kolony, k jeho převedení do plynného stavu a vnesení do proudu nosného plynu. Toto dávkování musí být rychlé a vzorek se musí rychle odpařit. Množství dávkovaného vzorku musí vyhovovat daným parametrům použité kolony a v ideálním případě by měl vzorek zaujmout prostor odpovídající jednomu teoretickému patru. Dávkuje se pomocí stříkačky přes septum. Existuje několik způsobů dávkování:

- **on column** - aplikace kapalného vzorku přímo do kolony (viz obr. 18). Tento způsob je vhodný zejména pro termolabilní látky. Horní část kolony je zahřívána na teplotu přibližně o 10 - 30°C nižší než je bod varu rozpouštědla. Vzorek se musí nastříknout rychle, aby vytvořil kapalnou film na stěně kolony. Pak se teplota v této části kolony prudce zvýší a dojde k odpaření vzorku



Obr. 18 : Nástřik přímo do kolony plynového chromatografu¹⁶

- **split injection** - nástřik pomocí děliče toku (viz obr.17) je nejčastěji používaná technika, při které do kolony vstupuje jen definovaný zlomek nástřiku. Dělič je otevřený a přebytečná část vzorku tak odchází do prostředí. Vzorek je dávkován do vyhřívaného injektoru a skleněná vata nebo skleněné kuličky v odpařovací trubici zajišťují homogenní odpařování a účinné promíchání vzorku před vstupem do kolony. Tento způsob se používá především pro analýzu vzorků obsahujících velké množství složek.
- **splitless injection** - nástřik bez děliče toku. Tato metoda je vhodná pro relativně velké objemy, které je nutno použít pro stopovou analýzu. Používá se stejné zařízení jako při nástřiku s dělením toku, ale odvod děliče je uzavřen. Vzorek se pomalu dávkuje do odpařovací trubice a nechá se cca 1 minutu odpařovat. Používá se rozpouštědlo s vyšší teplotou varu, která pak kondenzuje a v hlavě kolony vytvoří kapalnou film. Po zachycení všech analytů se provede oplach septa a zvýší se teplota^{12,16}.

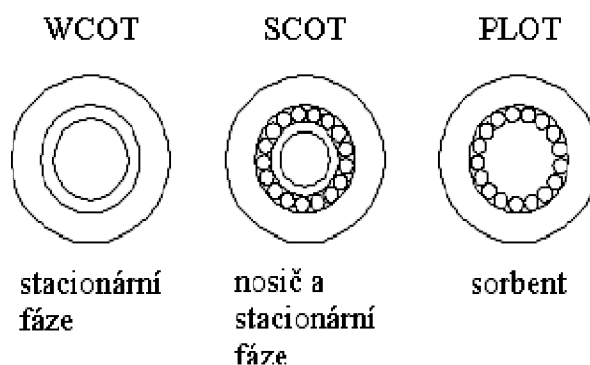


Obr. 17: Nástřik s děličem toku¹⁶

2.3.5.1.5 Chromatografická kolona

Kolona je ta část chromatografu, ve které je umístěna stacionární fáze a kde dochází k vlastní separaci složek. V podstatě existují dva typy chromatografických kolon:

- náplňové - to jsou trubice naplněné sorbentem nebo nosiči pokrytými kapalnou fází. Pro adsorpční chromatografii se jako náplň používá silikagel nebo alumina, jako molekulová síta se používají hlinitokřemičitany. Nosiče kapalně fáze bývají většinou na bázi křemeliny.
- kapilární - nosičem stacionární fáze jsou vnitřní stěny kapiláry, které se zpravidla vyrábí z taveného křemene, skla a nebo z nerezové oceli. Vzhledem k tomu, že tyto materiály jsou křehké, obaluje se kapilára polyimidovou vrstvou, která dodá tomuto materiálu pružnost a chrání ho před zlomením. Podle uložení mobilní fáze rozlišujeme tři typy kapilárních kolon (rozdíly mezi nimi ukazuje obr. 18):
 - WCOT - kapalná stacionární fáze je zakotvena na vnitřní stěně kapiláry
 - SCOT - na vnitřní stěně kapiláry je vrstva nosiče a v něm je stacionární fáze zakotvena
 - PLOT - na vnitřní stěně kapiláry je vrstva pórovitého materiálu, který slouží jako sorbent^{12,16}



Obr. 18: Chromatografické kolony³⁸

2.3.5.1.6 Termostat

Termostat zajišťuje dostatečně vysokou teplotu dávkovače, kolony a detektoru, aby byl vzorek udržen v plynném stavu. Dávkovač a detektor mají většinou vlastní řízené zahřívání. Konstantní teplota se využívá při separaci analytů, které se příliš neliší svými teplotami varu. Složitější směsi jsou většinou analyzovány za podmínek teplotního gradientu, což umožňuje dosáhnout úplné separace složek v kratším čase¹⁶.

2.3.5.1.7 Detektor

Nosný plyn z kolony protéká detektorem, který reaguje na přítomnost analytu. Změna v jeho složení se převádí na změnu některé elektrické veličiny (nejčastěji napětí), která se potom sleduje v závislosti na čase. Teplotu detektoru v plynové chromatografii volíme o něco vyšší než je teplota kolony, aby nedocházelo ke kondenzaci analytů.

Detektor by měl splňovat následující požadavky:

- vysoká citlivost a nízký šum (citlivost je nejmenší změna koncentrace látky, která je metodou stanovitelná, v podstatě je to směrnice kalibrační přímky; všechny změny, které nejsou způsobeny elucí analytu se zahrnují pod pojem šum detektoru)
- rychlá odezva nezávislá na toku mobilní fáze, lineární závislost této odezvy při změně koncentrace (odezva detektoru je lineární tehdy, je-li odezva na jednotkové množství analytu konstantní)
- schopnost pokrýt co největší koncentrační rozsah
- dobrá stabilita signálu a jeho opakovatelnost a reprodukovatelnost
- obdobná odezva pro všechny analyty a nebo selektivní odezva pro jednu nebo více skupin analytů^{12,16}

Podle dějů, které probíhají při detekci, lze detektory rozdělit na:

- destrukční – látka se při detekci ireverzibilně změní
- nedestrukční – látka prochází detektorem bez toho, aby se chemicky změnila

Podle povahy závislosti signálu, lze detektory rozdělit na:

- koncentrační – reagují na okamžitou koncentraci složky v eluátu
- hmotnostní – reagují na celkové množství detekované složky v čidle

Podle způsobu vyhodnocení lze detektory rozdělit na:

- integrální – reagují na celkové množství separovaných látek od začátku měření do jeho ukončení
- diferenciální – signál je úměrný okamžité koncentraci látky v prostoru detektoru

Další dělení detektorů:

- univerzální – použitelné k detekci širokého spektra sloučenin (ovšem nutno zdůraznit, že žádný z používaných detektorů nesplňuje všechny požadavky a nelze tedy jednoznačně určit univerzálně nejlepší detektor; každý má své optimální využití)
- selektivní – umožňují detekci sloučenin specifických vlastností

Mez detekce (LOD – limit of detection) je nejnižší množství analytu, které způsobí odchylku detektoru definovaným způsobem odlišnou od šumu - je to dvojnásobek standardní odchylky šumu.

Mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification) – nejnižší koncentrace analytu, která může být stanovena s definovaným stupněm přesnosti; většinou se jedná o nejnižší bod kalibrační křivky.

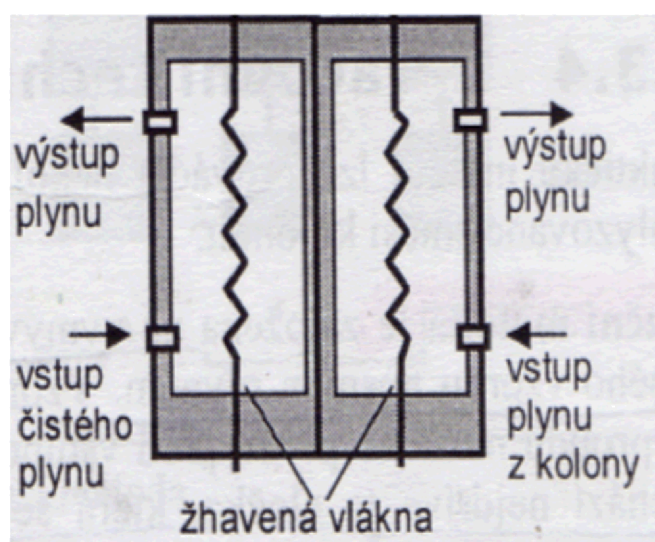
2.3.5.1.8 Vyhodnocovací zařízení

V současné době se k vyhodnocování analýzy používá počítač, který pracuje automaticky. Zpracovává signál z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku a vyhodnocuje ji. Z chromatogramu se tak mohou získat informace pro kvalitativní i kvantitativní stanovení¹⁶.

2.3.5.2 Detektory v plynové chromatografii

2.3.5.2.1 Tepelně vodivostní detektor

Tepelně vodivostní detektor (Thermal Conductivity Detector - TCD) - přes vlákno žhavené elektrickým proudem proudí nosný plyn a tím ho ochlazuje (schéma TCD je na obr. 19). Přítomnost analytu změní tepelnou vodivost prostředí kolem žhaveného vlákna a tím i jeho teplotu a elektrický odpor. Obvykle se pracuje se dvěma vlákny - přes jedno proudí čistý nosný plyn a přes druhé nosný plyn z kolony, který obsahuje analyt. Provede se porovnání jejich elektrických odporů. Důležitá je volba nosného plynu - jeho tepelná vodivost by se měla co nejvíce odlišovat od tepelné vodivosti analyzovaných složek. Nejčastěji se používá při analýze anorganických plynů a nízkomolekulárních organických látek¹⁶.

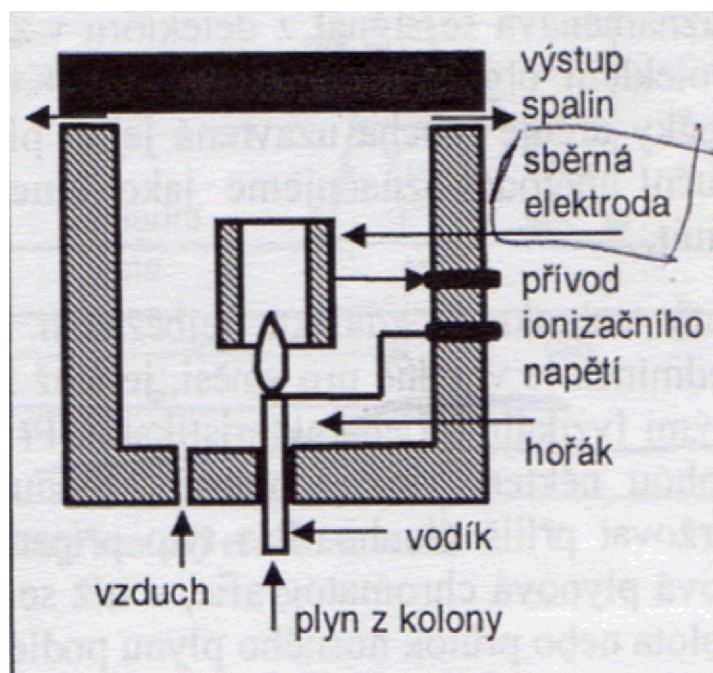


Obr. 19: Tepelně vodivostní detektor¹⁶

2.3.5.2.2 Ionizační detektory

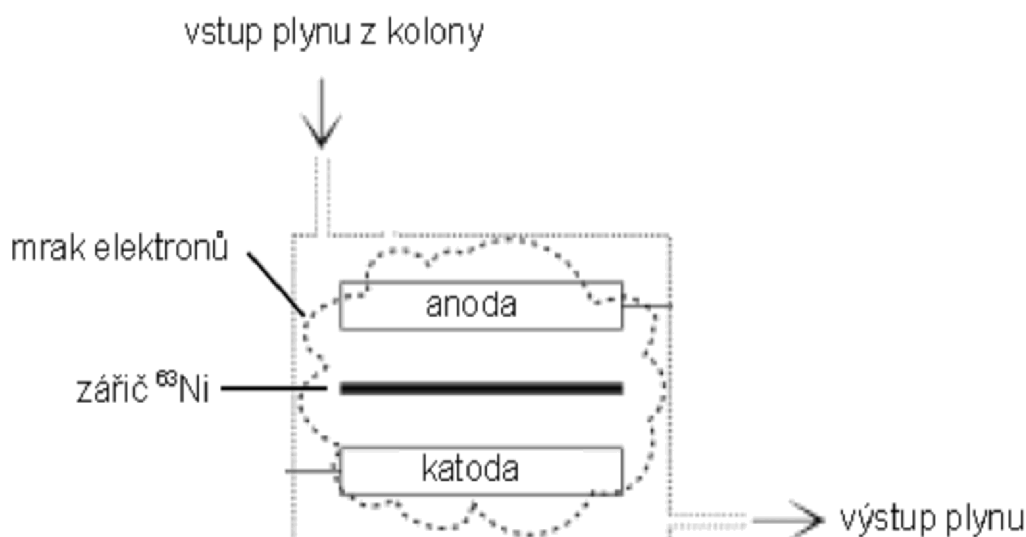
Funkce ionizačních detektorů je založena na vedení elektřiny v plynech - plyn proudí přes dvě kovové desky (elektrody), mezi nimiž je elektrické pole.

- **plamenový ionizační detektor** (Flame Ionization Detector - FID) - molekuly plynu se ionizují v kyslíkovodíkovém plameni a vedou ionizační proud mezi elektrodami. Přítomnost analytu tuto ionizaci zvýší a tím se zvýší i protékající proud. Lze jej použít téměř na všechny látky s výjimkou anorganických par. Jako nosný plyn se používá dusík. Schéma tohoto detektoru je na obr. 20.



Obr. 20: Plamenový ionizační detektor¹⁶

- **plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem** (Alkali Flame Ionization Detector - AFID) - v účinném prostoru obsahuje sůl alkalického kovu. Jeho ionty se teplem kyslíkovodíkového plamene dostávají do plynné fáze a ochotně reagují s heteroatomy organických látek, především s fosforem a dusíkem.
- **bezplamenový detektor s alkalickým kovem** (Thermal Ionization Detector - TID) - zdrojem iontů alkalického kovu je jejich elektricky vyhřívaná sůl. Na jejím povrchu se působením vysoké teploty spaluje vodík. Energie při spalování nestačí na ionizaci uhlovodíků, ale stačí na specifické reakce s fragmenty obsahujícími fosfor a dusík. Používá se na detekci opiátů, dopingových látek a podobně.
- **detektor elektronového záchytu** (Electron Capture Detector - ECD) - radioaktivní zářič ^{63}Ni svým β -zářením ionizuje molekuly dusíku jakožto nosného plynu a tím vyvolává ionizační proud. Zvláště citlivý je tento detektor na halogeny, dále pak na sloučeniny obsahující fosfor, kyslík, síru, olovo, nitrosloučeniny a areny. Schéma tohoto detektoru je na obr. 21.



Obr. 21: Detektor elektronového záchytu³⁸

- **fotoionizační detektor** (Photo Ionization Detector - PID) - fotoionizační detektor používá zdroj ultrafialového světla (UV) k rozštěpení měřených molekul na pozitivně a negativně nabitě částice a ty mohou být snadno kvantifikovány. K ionizaci dochází při absorpci vysokoenergetického UV záření, které způsobuje excitaci molekul, jejíž výsledkem je dočasné odštěpení elektronů a vytvoření kladně nabitých iontů. Měřený plyn se tak stane nositelem náboje, který je v podobě elektrického proudu snímán mezi elektrodami detektoru. Ionty se v prostoru detektoru rychle rekombinují a vytvářejí tak původní molekuly.³⁹
- **hmotnostní spektrometr** (Mass Spectrometry - MS) - ionizuje atomy, molekuly a fragmenty molekul analytů vystupující z kolony a vzniklé ionty se potom separují podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z . Moderní iontové zdroje umožňují analýzu vysokomolekulárních netěkavých látek (biochemický, klinický výzkum)^{12,16}.

2.3.5.3 Kvalitativní analýza

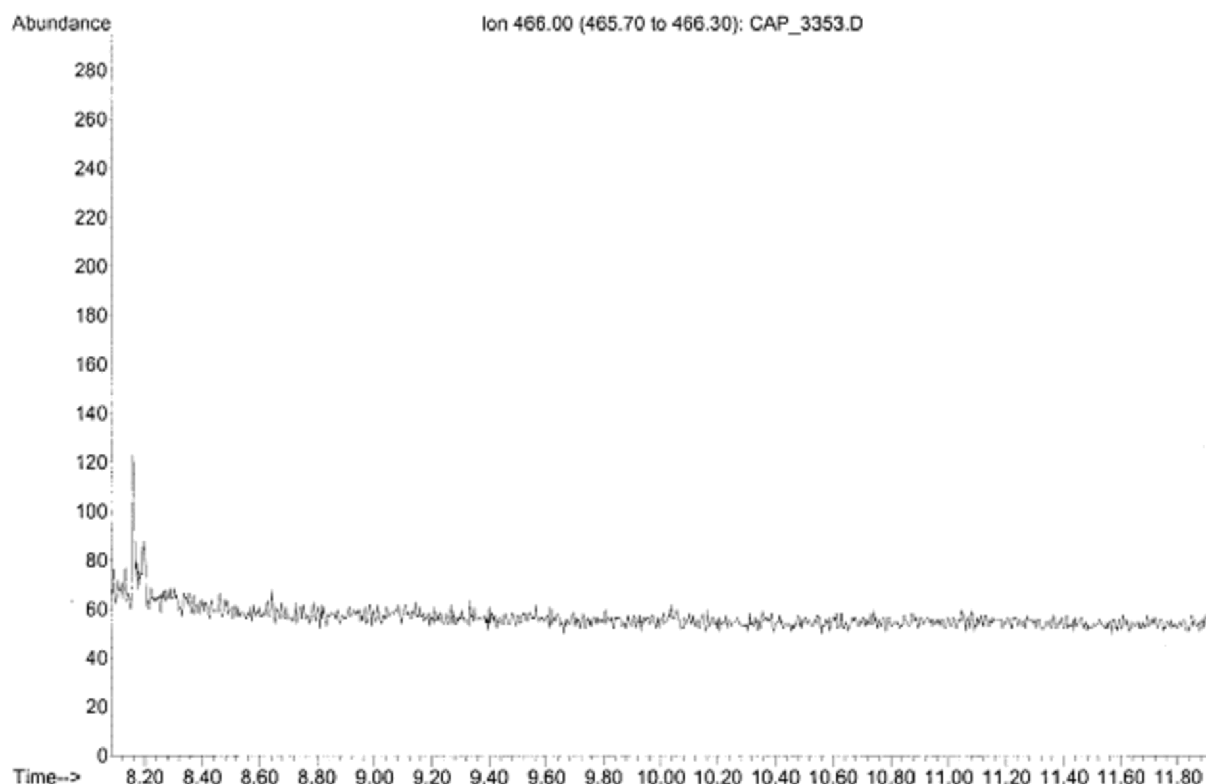
Pro identifikaci složky je v plynové chromatografii podstatné umístění maxima píku v chromatogramu (ukázky chromatogramů jsou na obr. 22, 23 a 24). Toto umístění lze vyjádřit retenčními charakteristikami. Retence analyzované látky v koloně je úměrná její distribuci mezi stacionární a mobilní fází, kterou lze popsat distribuční konstantou K_D . Čím je hodnota této konstanty vyšší, tím je složka stacionární fází více vázána a v koloně se zdržuje déle.

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

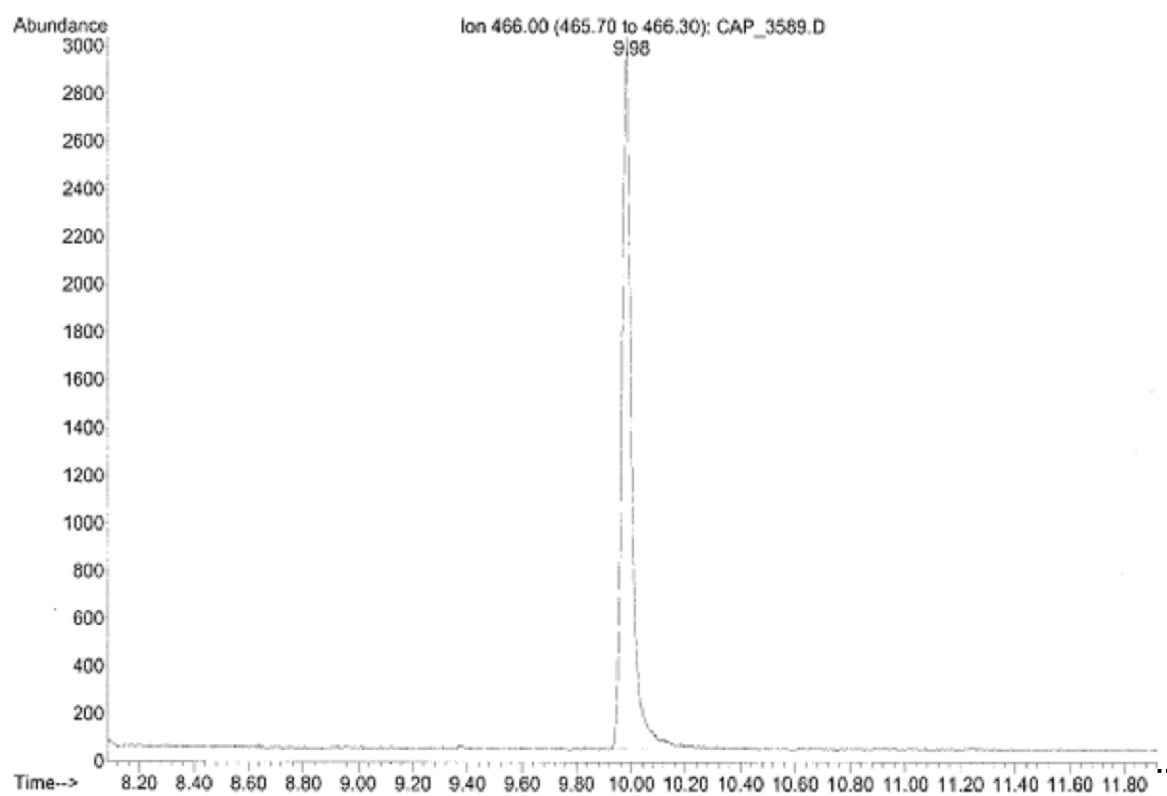
c_s je koncentrace složky ve stacionární fází
 c_m je koncentrace složky ve fázi mobilní^{12,16}.

Zadržení složky v koloně se vyjadřuje retenčními charakteristikami, které lze uvádět absolutně pomocí času nebo objemu, nebo relativně ve srovnání se standardy nebo inertem. Základní retenční charakteristiky:

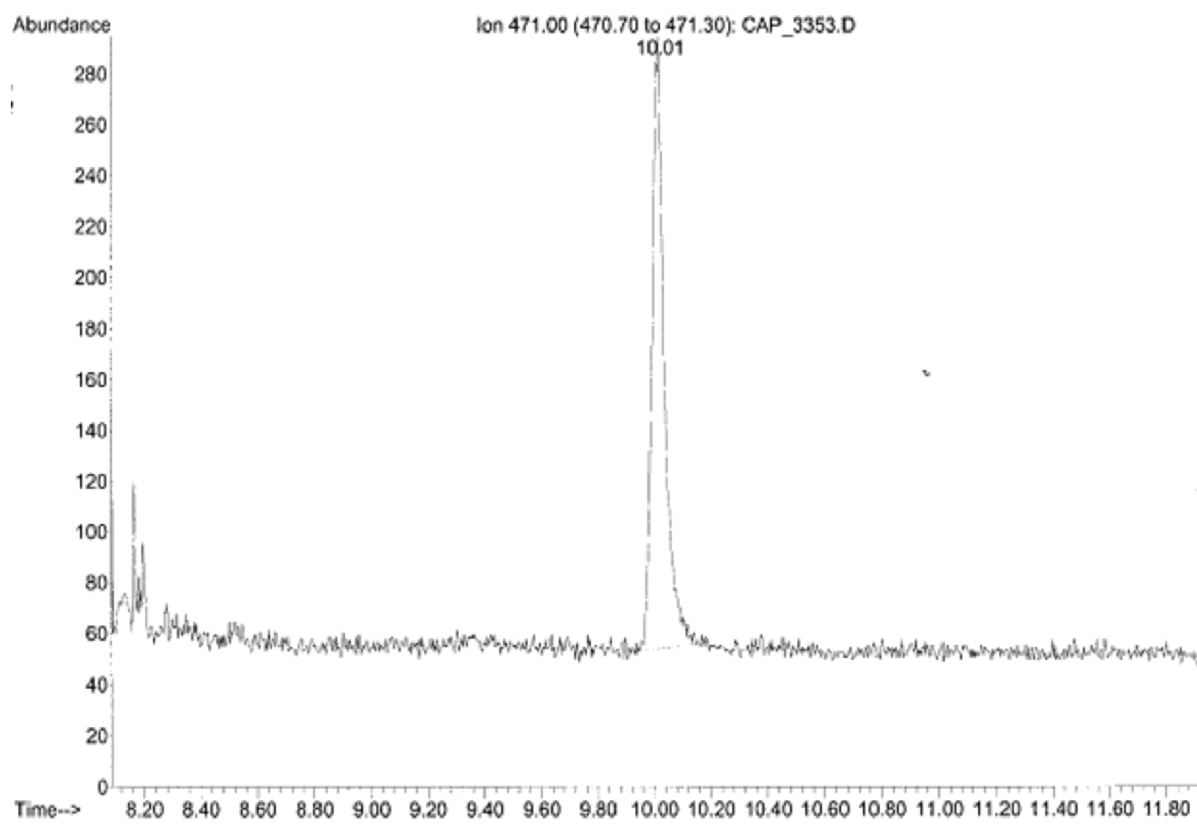
- retenční (eluční) čas, což je doba, která uplyne od okamžiku nastříknutí vzorku do okamžiku, kdy je zaznamenáno maximum chromatografického píku. Při identifikaci se porovnává retenční čas neznámé látky s retenčními časy standardů. Tento čas lze rozdělit na mrtvý retenční čas a na redukovaný retenční čas
- mrtvý retenční čas je čas, po který setrvává analyt v mobilní fázi
- redukovaný retenční čas je čas, po který setrvává analyt ve stacionární fázi.
- relativního retenčního času, který je vztahován buď na retenci jedné standardní látky v chromatogramu, nebo na retenci členů homologické řady standardních látek
- retenční objem je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony
- retenční faktor je relativní retenční charakteristika vztažená ke stupnici retenčních charakteristik zvolených standardů. Vyjadřuje polohu píku identifikované látky v chromatogramu vzhledem k poloze píků řady standardů^{12,16,41}



Obr.: 22: Příklad chromatogramu blanku



Obr. 23: Příklad chromatogramu chloramfenikolu



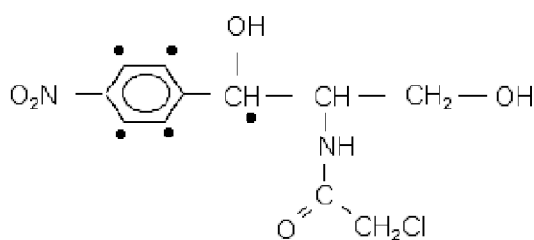
Obr. 24: Příklad chromatogramu deuterizovaného chloramfenikolu

2.3.5.4 Kvantitativní analýza

Ke kvantitativnímu vyhodnocení se používá plocha píku složky, která je vymezena jeho základnou a eluční křivkou.

Pracovní techniky kvantitativní analýzy

- **metoda vnitřní normalizace** - tato metoda se používá při určování obsahu látek ve směsích, je-li počet komponent relativně nízký a všechny komponenty jsou známy. Sečtou se plochy všech píků, položí se rovny 100% a ze známé plochy pod píkem jednotlivé složky se vypočítá relativní plocha v % a tím i procentuální zastoupení této složky
- **metoda absolutní kalibrace** - do kolony se dává známé množství analyzovaného vzorku a standardu za identických podmínek a porovná se plocha jejich píků. Správnost této metody závisí na dobré reprodukovatelnosti dávkovaného objemu, doporučuje se používat autosampler
- **metoda standardního přídatku** - na kolonu se dává vzorek a vzorek, do kterého bylo přidáno známé množství standardu stanovované látky. Zvětšení plochy píků je přímo úměrné přidanému množství standardu
- **metoda vnitřní standardizace** - ke vzorku se přidá určité množství vnitřního standardu (Internal Standard - IS). Ten nesmí být v původním vzorku přítomen a musí tvořit samostatný pik v blízkosti píku stanovované složky. Přednostně by to měl být analyt značený stabilním izotopem, který je vhodný pro detekci hmotnostním detektorem. Výhodou této metody je, že není třeba znát přesný objem nástřiku. Tato metoda se používá také při stanovování chloramfenikolu, jako vnitřní standard se používá deuterizovaný chloramfenikol (strukturní vzorec viz obr. 25), který má ve své molekule nahrazeno pět vodíkových atomů deuteriem.^{16, 41}



Obr. 25: deuterizovaný chloramfenikol²³

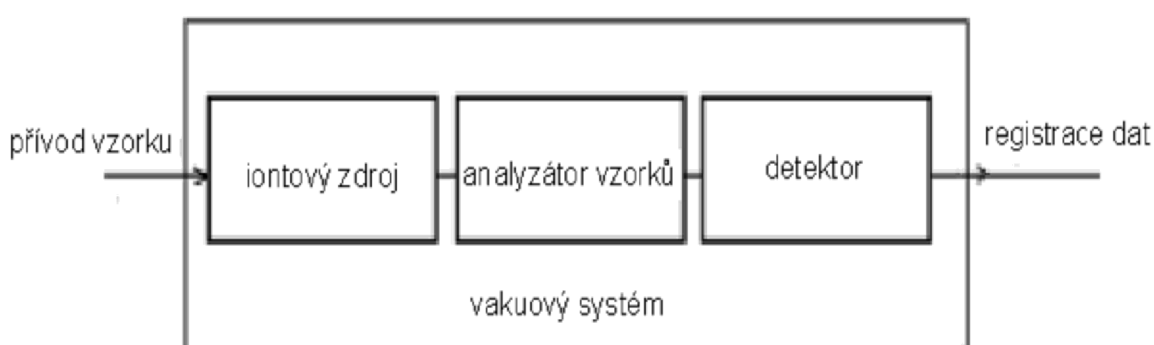
2.3.6 HMOTNOSTNÍ SPEKTROSKOPIE

Při hmotnostní spektrometrii (Mass spectrometry – MS) se ionizují atomy, molekuly a fragmenty molekul analytů vystupující z kolony a vzniklé ionty se potom separují podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z . Hlavní oblastí využití hmotnostní spektrometrie je stopová analýza organických látek v komplexních maticích. Podmínkou je, aby analyt byl schopen přejít do plynné fáze při teplotě nižší než je jeho teplota rozkladu.²⁶

Každý hmotnostní spektrometr má tyto základní stavební prvky:

- iontový zdroj
- hmotnostní analyzátor
- detektor
- datasystém

Nedílnou součástí každého hmotnostního spektrometru je výkonný, obvykle dvoustupňový vakuový systém. Ten zajišťuje udržení dostatečného vakua v systému, protože je nutné, aby nedocházelo ke srážkám iontů s jinou částicí během celé jeho cesty hmotnostním spektrometrem^{12,16,40}. (blokové schéma hmotnostního spektrometru je na obr. 26)



Obr. 26: Blokové schéma hmotnostního spektrometru²⁶

2.3.6.1 Ionizace a iontové zdroje v MS

Iontový zdroj převádí analyzovanou látku do ionizovaného stavu, neboť všechny informace poskytované hmotnostním spektrometrem se týkají jen částic nenesoucích náboj (iontů). Energie nutná k ionizaci závisí na typu látky. Práh ionizace pro většinu organických látek je mezi 7 – 16 eV. Podle množství dodané energie rozlišujeme měkké techniky (vzniká pouze molekulový iont) a tvrdé techniky (rozsáhlejší fragmentace primárně vzniklého molekulového iontu)^{25,26}.

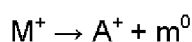
2.3.6.1.1 Ionizace nárazem elektronů (Electron Impact - EI)

Ionizace nárazem elektronů (Electron Impact – EI) je tvrdá ionizační technika, při které analyzovaná látka interaguje s proudem urychlených elektronů za vzniku radikálkationtu. Děje, ke kterým při této interakci dochází:

- 1) ionizace molekuly a vznik molekulárního iontu o jednotkovém náboji



- 2) rozpad molekulárního iontu na fragmentový ion a elektroneutrální částici

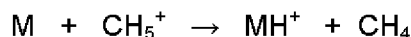
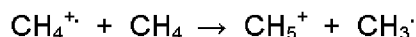
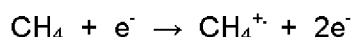


Možnost vzniku radikalaniontu je vzhledem k hlubokému vakuu silně potlačena. Proud elektronů je směřován prostorem iontového zdroje směrem k anodě. Elektrony jsou vytlačovány ze žhavené katody (rheniové nebo wolframové vlákno), urychleny potenciálem 70 eV a směřují k anodě. Molekuly vzorku se dostávají do proudu elektronů a dochází k jejich ionizaci. Vzniklé kladné ionty jsou vytlačovány elektrostatickým polem vytlačovací elektrodou, která je udržována na vhodném potenciálu. Proud iontů je dále urychlen a směřován z iontového zdroje soustavou urychlovacích a fokusačních elektrod. Schéma iontového zdroje je na obr. 27.

Potenciálový rozdíl mezi žhaveným vláknem a anodou určuje energii elektronů přicházejících do kontaktu s ionizovanou látkou. Za standardní je považována energie 70 eV, která ve většině případů zajišťuje vznik maximálního počtu iontů a jejich rozsáhlou fragmentaci. Pro zvýšení pravděpodobnosti interakce s molekulou je někdy dráha elektronů zakřívována polem malého permanentního magnetu umístěného v prostoru ionizační komůrky^{16,25}.

2.3.6.1.2 Chemická ionizace

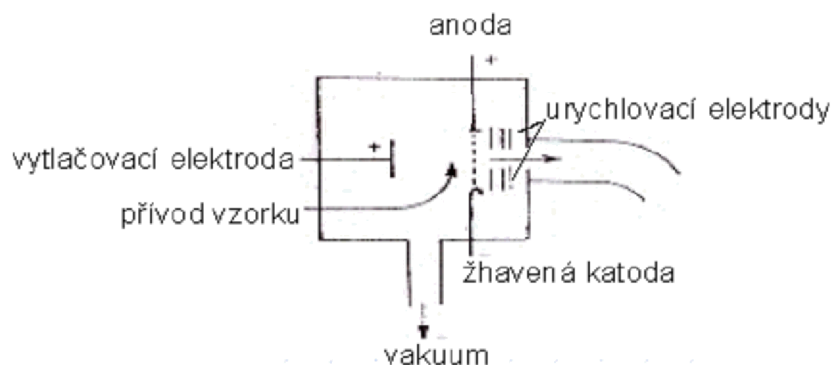
Chemická ionizace (Chemical Ionization – CI) je měkká ionizační technika, primárním zdrojem energie je stejně jako u EI proud urychlených elektronů. Ovšem jejich energie je na analyzovanou látku přenášena prostřednictvím reakčního média (nejčastěji methanu), které se zavádí do ionizační komůrky, tím se zvýší možnost mezimolekulárních a meziiontových interakcí, rekombinací za zvýšeného tlaku. Při chemické ionizaci dochází k přenosu protonu z kationtů reakčního plynu na neutrální molekulu a vzniká tzv. kvazimolekulární ion MH^+ (pozitivní chemická ionizace).²⁶



Konstrukční řešení iontového zdroje pro chemickou ionizaci je obdobné jako pro ionizaci nárazem elektronů.

2.3.6.1.3 Negativní chemická ionizace

Při ionizaci nárazem elektronů je výskyt záporných iontů ve srovnání s ionty kladnými řádově nižší. V komplikovaných maticích lze výrazně zvýšit citlivost analýzy použitím techniky NCI, kdy elektronegativní molekuly analytu zachycují nízkoenergetické elektrony, které se uvolnily při ionizaci reakčního media.



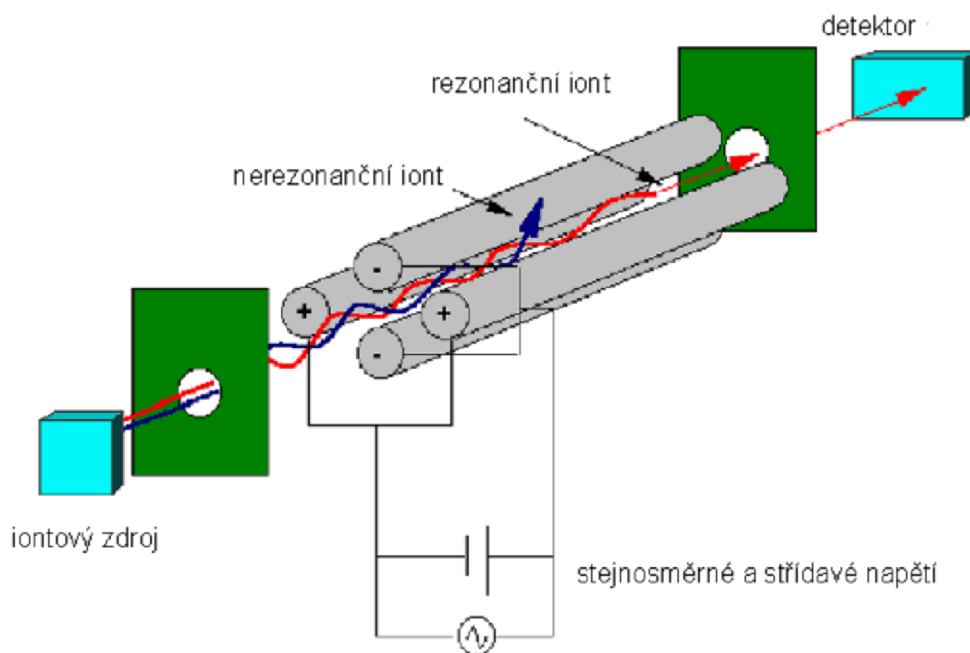
Obr. 27: Schéma iontového zdroje⁴⁰

2.3.6.2 Hmotnostní analyzátor

Úkolem hmotnostního analyzátoru je separace iontů vzniklých v iontovém zdroji podle podílu jejich hmotnosti a náboje m/z , případně podle kinetické energie.

2.3.6.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor (schéma viz. obr. 28) tvoří čtyři rovnoběžné tyčové elektrody, které jsou připojeny na zdroj stejnosměrného a střídavého napětí. Ionty, které vlétnou do prostoru mezi tyčemi se dostanou do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat. Při určitém poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí projdou kvadrupolem pouze ionty o určitém m/z . Nastavení veličin kvadrupólu se postupně mění a tak detektor zachycuje postupně ionty o různých m/z ^{16,26}.



obr. 28: Kvadrupólový analyzátor²⁶

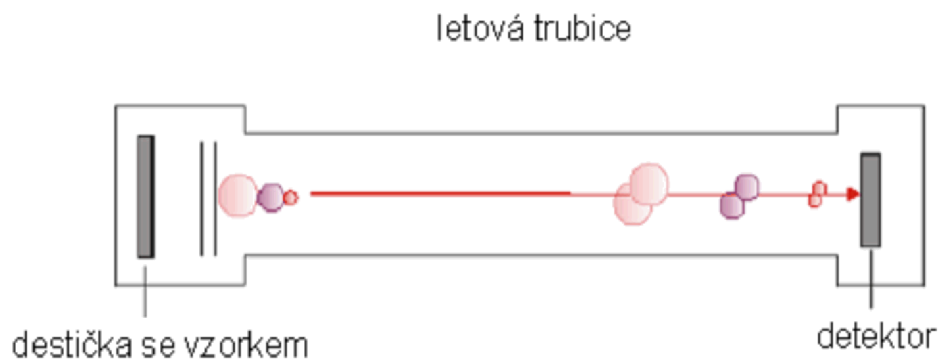
2.3.6.2.2 Iontová past

Iontovou past tvoří tři elektrody - vstupní a výstupní, které jsou uzemněny a středová prstencová, na kterou je vkládáno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Ionty jsou nuceny pohybovat se uvnitř iontové pasti po uzavřených kruhových drahách, s rostoucí amplitudou napětí se ionty s rostoucím m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor iontové pasti směrem k detektoru^{16,26}.

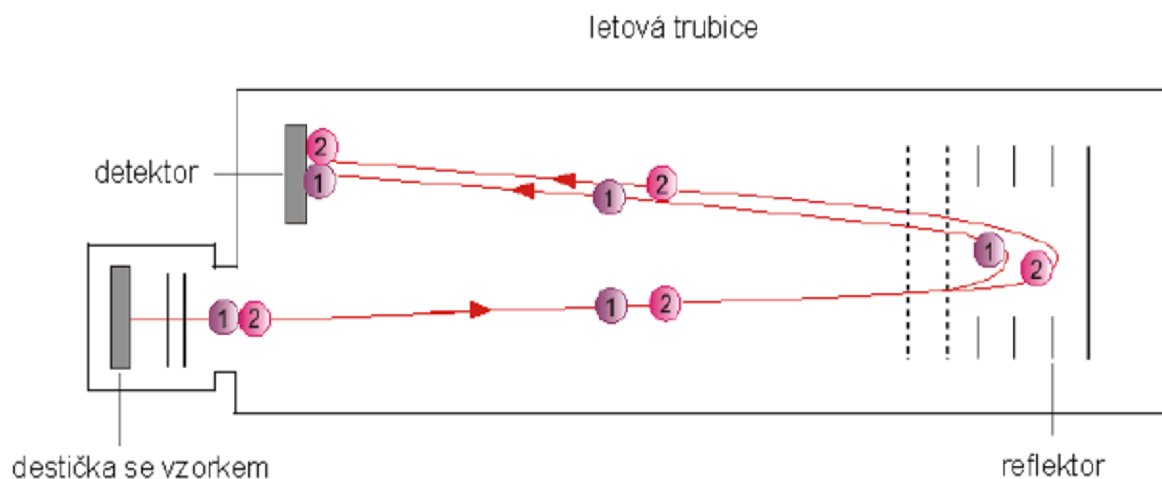
2.3.6.2.3 Průletový analyzátor

Průletový analyzátor (Time of Flight - TOF) je nejjednodušší a nejrychlejší. Celý vzorek iontů je akcelerován najednou, všem iontům je dodána stejná energie. Ionty vstupují do evakuované letové trubice. K rozdělení iontů podle m/z dochází na základě jejich rozdílné délky letu - těžší ionty se pohybují pomaleji a dorazí k detektoru později^{16,26,40}. Tento analyzátor může pracovat:

- v **lineárním módu** - přímá dráha letu, délka letové trubice 1 - 2m (obr. 29)
- v **reflektovaném módu** - dráha letu je prodloužena pomocí refletronového iontového zrcadla (obr. 30)⁴⁰



Obr. 29: Průletový analyzátor - lineární mód⁴⁰



Obr. 30: Průletový analyzátor - reflektovaný mód⁴⁰

2.3.6.3 Detektor

Detektor slouží k detekci iontů po jejich separaci podle m/z a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů. Toto zařízení vyhodnocuje elektrický proud vznikající dopadem stanovovaných iontů²⁶.

Dělí se do dvou skupin

- **detektory pro přímá měření** - detekují el. proud vznikající přímým dopadem stanovovaných iontů
- **násobičové detektory** - využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů (nejčastěji používané detektory v MS, poskytují měřitelný signál pro jednotlivé ionty)⁴⁰

2.3.6.4 Datasystém

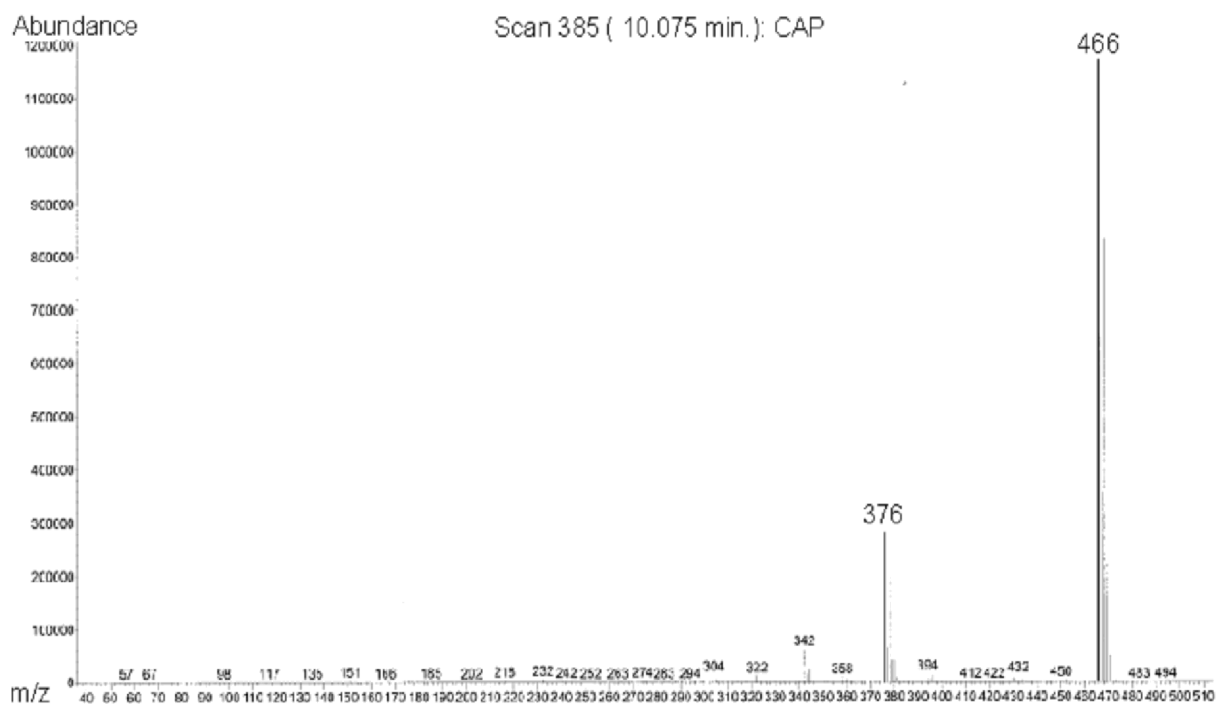
Datasystém je tvořen výkonným osobním počítačem s příslušným programovým vybavením pro ovládání a kontrolu všech funkcí systému a pro sběr a zpracování naměřených dat. Tento systém většinou pracuje pod operačním systémem MS-Windows²⁶.

2.3.6.5 Hmotnostní spektrum

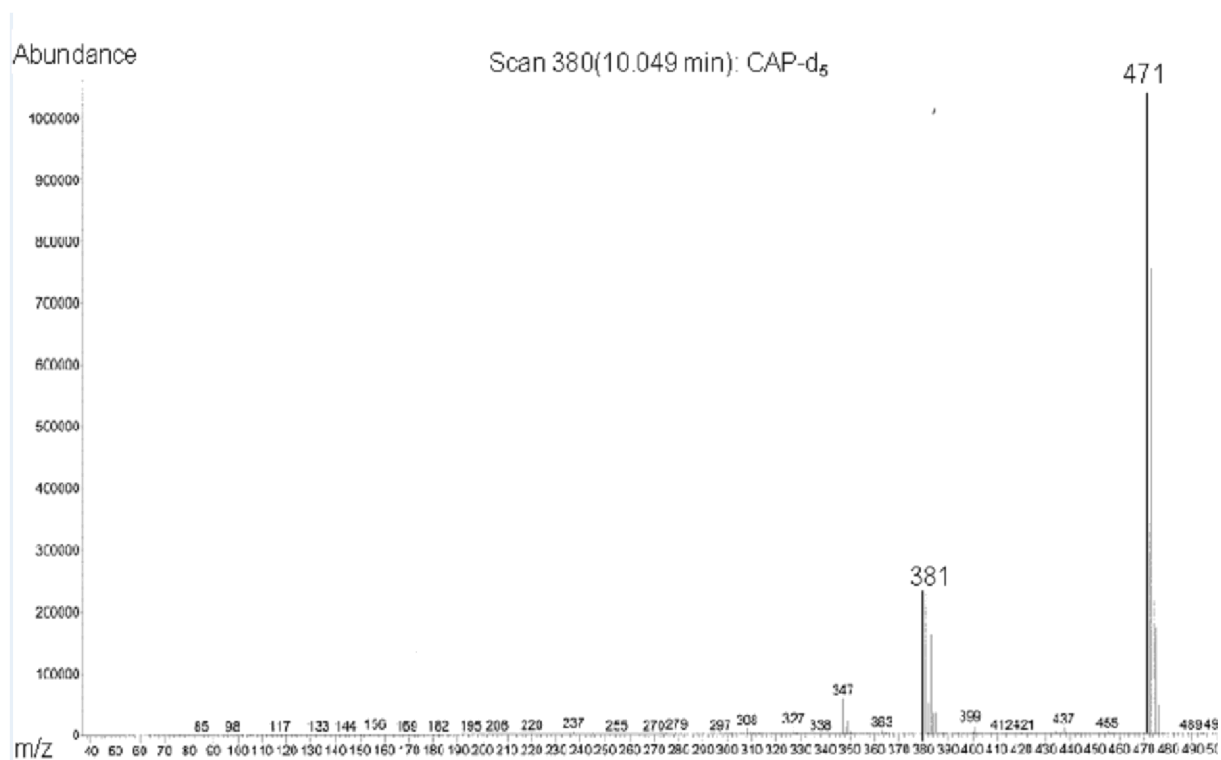
Hmotnostní spektrum představuje závislost odezvy detektoru, tedy intenzity iontového proudu, na hodnotě m/z . Hmotnostní spektra jsou většinou programově převáděna do normalizovaného tvaru (%); nejintenzivnějšímu píku ve spektru přísluší hodnota 100 %. Na ose y hmotnostního spektra je zaznamenáván vznikající iontový proud nebo je proveden přepočít na procenta intenzity základního (nejintenzivnějšího) iontu spektra. Na ose x je podíl hmotnosti a náboje m/z .

Obvykle pozorujeme pík odpovídající molekulárnímu iontu a píky odpovídající fragmentovým iontům. Hmotnostní spektrometr ve spojení se separační technikou může pracovat ve dvou základních modech:

- **SCAN** - v tomto modu probíhá detekce všech iontů ve zvoleném rozsahu m/z . Při snímání celého spektra, musí být přítomny všechny měřené diagnostické ionty (molekulový iont, charakteristické adukty molekulárního iontu, charakteristické iontové fragmenty a isotopové ionty), které mají v referenčním spektru kalibračního standardu relativní intenzitu vyšší než 10 %. Na obr. 31 a 32 je příklad hmotnostního spektra pořízeného v modu Scan pro chloramfenikol a jeho interní standard - deuterizovaný chloramfeniol
- **SIM** (Single Ion Monitoring) - v tomto modu probíhá cílená detekce pouze vybraných iontů se zvoleným m/z . Provádí-li se hmotnostně spektrometrické stanovení fragmentografií, musí být molekulárním iontem přednostně jeden z vybraných diagnostických iontů (molekulární iont, charakteristické adukty molekulárních iontů, charakteristické iontové fragmenty a isotopové ionty). Není třeba, aby vybrané diagnostické ionty pocházely výhradně z téže části molekuly. Poměr signál-šum musí být pro každý diagnostický iont minimálně 3:1^{25,26}.



Obr. 31: Hmotnostní spektrum chloramfenikolu



Obr. 32: Hmotnostní spektrum deuterizovaného chloramfenikolu

2.3.6.6 Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Hmotnostní spektrometrie ve spojení s plynovou chromatografií (GC/MS) slouží ke kvalitativní i kvantitativní analýze. Při tomto uspořádání detektor analyzuje vícesložkovou směs tak rychle, jak jsou jednotlivé složky eluovány a získáme dva druhy záznamů:

- chromatogram, který dává informace o počtu složek přítomných ve vzorku
- hmotnostní spektra jednotlivých píků, ze kterých lze posoudit kvalitu složek, případně prokázat současnou eluci více složek v jediném píku.

Při GC dochází k rozdělení směsi na komponenty, které postupně vycházejí z kolony společně s nosným plynem. Kapilární kolona je zavedena do evakuovaného prostoru hmotnostního spektrometru - do jeho iontového zdroje. Analyzované látky jsou nesený v toku nosného plynu, který je v nadbytku. Oddělení nosného plynu a balastních látek ze vzorku se děje díky výkonnému dvoustupňovému vakuovému systému, který udržuje tlak v komoře hmotnostního spektrometru $10^{-5} - 10^{-6}$ mm rtuťového sloupce.²⁵

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Standard, vnitřní standard a jejich roztoky

standard: chloramphenicol (CAP) Sigma cat. no. C-0378

- zásobní roztok: 1 mg/ml v methanolu (skladuje se při - 20°C v temnu)
- pracovní roztok: 0.1 µg/ml v methanolu (připravuje se vždy čerstvý - nadávkovat 2 µl zásobního roztoku do 20 ml methanolu)

vnitřní standard: chloramphenicol-ring-d₄-benzyl-d (CAP - d₅) CIL cat. no. DLM 119

- zásobní roztok: 1 mg/ml v methanolu (skladuje se při - 20°C v temnu)
- pracovní roztok: 0.1 µg/ml v methanolu (připravuje se vždy čerstvý - nadávkovat 2µl zásobního roztoku do 20 ml methanolu)

3.1.2 Chemikálie

- methanol, Merck, cat. no. 1.06011
- ethylacetát, Merck, cat. no. 1.10972
- acetonitril, Merck, cat. no. 1.00017
- tercbutylmetylether (tBME), Merck, cat. no. 1.01995
- toluen, Merck, cat. no. 1.08389
- chloroform, Merck, cat. no. 1.02432
- n-hexan, Merck, cat. no. 1.04391
- kyselina octová, Merck, cat. no. 1.00062
- kyselina chlorovodíková 1M vodný roztok, Merck, cat. no. 1.09057
- kyselina chlorovodíková 5M vodný roztok, Merck, cat. no. 1.10317
- amoniak 28-30% roztok, Merck cat. no. 1.05423
- dichlormethan, Merck, cat. no. 1.06054
- β-glukuronidasa Merck, cat. no. 1.04114
- bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) s 1%TMCS Sigma cat. no. T6381
- voda - deionizovaná, přečištěná aparaturou Barnstead
- helium 6.0 Linde, tlaková láhev
- dusík 5.0 Linde, tlaková láhev

3.1.3 Pracovní pomůcky

- kolonky SPE - LiChrolut[®], Merck, cat. no. 1.02122; objem 6 ml, 1000mg sorbentu (sorbent = silikagel, na jehož povrchu je navázána organická fáze C-18)
- kolonky MIP - SupelMIP[™] SPE - Chlormaphenicol, Supelco, cat. no. 53210-U; náplň 25 mg sorbentu
- kolonky Extrelut NT 3, Merck, cat. no. 1.15095
- derivatizační vialky 1 ml, septum neopren/teflon
- mikrostříkačky
- odměrné baňky, odměrné válce, kádinky, zkumavky

3.1.4 Přístroje

- plynový chromatograf Hewlett Packard 6890 s hmotnostním detektorem HP 5973 v NCI modu a s on column injektorem (systém duck bill)
- křemenná kapilární kolona Agilent Technologies HP-1MS cat. no. 19091S-933, délka 30m, I.D. 0.25 mm, film 0.25 μ m
- počítač PC, Intel Pentium Processor, software Agilent Technologies, rev. D
- vakuový separátor Visiprep Supelco
- předvážky OHAUS
- analytické váhy Sartorius Genius
- ultrazvuková lázeň Ultrasonic Tesla UC 005 AJ1
- rotační vakuový odpařovák Heidolph VV Micro
- koncentrátor Termovap TV-10
- pH metr Mettler MI229KI

3.2 Pracovní postupy

Cílem práce bylo provést porovnání stávajících analytických metod používaných na Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL) pro stanovení reziduí chloramfenikolu v různých biologických materiálech, které jsou vesměs založeny na čištění extraktu metodou SPE-C18, s novými postupy přípravy vzorku pomocí kolonek MIP.

3.2.1 Příprava vzorků - SPE

3.2.1.1 Med

Do zkumavky se šroubovým uzávěrem se naváží přesně 0,5 g medu. Ten se rozpustí ve 3 ml 50% roztoku acetonitrilu, přidá se pracovní roztok vnitřního standardu. Vzorek se extrahuje 2 x 3 ml ethylacetátu (intenzivně třepat minimálně 30 sekund). Spojené extrakty se odpaří na rotačním odpařováku při 50°C dosucha, rozpustí ve 2 ml 5% acetonitrilu a pak se nanese na kolonku SPE.

3.2.1.2 Moč

Ke 3 ml přefiltrovaného vzorku se přidá pracovní roztok vnitřního standardu a pH vzorku se upraví 1M kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu pH 5-6. Potom se přidá 30 µl roztoku β-glukuronidasy a nechá stát přes noc při laboratorní teplotě. Po inkubaci se vzorek nanese na kolonu Extrelut NT 3 a nechá se stát 10 minut. Potom se na kolonu nanese 2 ml tBME. Za dalších 5 minut se analyt vymyje 8 ml tBME do zkumavky. Extrakt se odpaří dosucha proudem dusíku nebo na rotačním odpařováku při 40°C.

3.2.1.3 Mléko

Rozmražený vzorek mléka se zhomogenizuje, odeberou se z něj 2 ml a přenesou se do 50 ml centrifugační kyvety. Ke vzorku se přidá pracovní roztok vnitřního standardu, 100 µl 5M HCl a vzorek se promíchá. Při zpracování sušeného mléka nebo sušené syrovátky se 1 g sušeného mléka (syravátky) zhomogenizuje s 9 g vody. Z homogenátu se odváží 5 g do centrifugační kyvety. Další postup je shodný s postupem pro čerstvé mléko.

K takto připravenému vzorku se přidá 25 ml ethylacetátu a obsah kyvety se homogenizuje do rozmixování sraženiny. Následuje centrifugace 5 minut při 2 400 x g za laboratorní teploty. Ethylacetátová vrstva se převede pipetou do 50 ml baňky vakuového odpařováku. Veškerý ethylacetát se odpaří při 55°C.

3.2.2 Příprava vzorků - MIP

3.2.1.1 Med

Do zkumavky se odváží 1 g medu a rozpustí se v 1 ml deionizované vody. Rozpouštění lze urychlit zahřátím na 45°C. Pomocí kyseliny octové nebo amoniaku se upraví pH roztoku na pH 7 - 8, přidá se pracovní roztok vnitřního standardu.

3.2.1.2 Moč

Z přefiltrovaného vzorku se odebere část o objemu 1 ml do čisté zkumavky. Přidá se pracovní roztok vnitřního standardu a pomocí kyseliny octové nebo amoniaku se upraví pH roztoku na pH 7 - 8.

3.2.1.3 Mléko

Rozmražený vzorek neodstředěného mléka se zhomogenizuje, přidá se pracovní roztok vnitřního standardu a pak následuje centrifugace 10 minut při 5 500 x g za laboratorní teploty. Na kolonu se pak nanáší vrstva, která se nachází mezi horní tukovou vrstvou a spodní vrstvou bílkovin. Pomocí kyseliny octové nebo amoniaku se upraví pH roztoku z této vrstvy na pH 7 - 8.

3.2.3 Kondicionace

Kondicionace se provádí stejným způsobem pro všechny uvedené matrice. Kolonky SPE se postupně promyjí 10 ml methanolu a 20 ml deionizované vody; kolonky MIP se promyjí 1 ml methanolu a 1 ml deionizované vody. Před nanesením vzorku na kolonku již nesmí na sorbent proniknout vzduch.

3.2.4 Extrakce - SPE

3.2.4.1 Voda

nanese vzorek 10 ml napájecí vody, do které byl přidán pracovní roztok vnitřního standardu. Promyje se 3 ml deionizované vody a eluce chloramfenikolu se provede 5ml 40% acetonitrilu. Eluát se extrahuje 2 x 3 ml ethylacetátu. Spojené extrakty s obsahem stanovované látky se odpaří ve vakuovém rotačním odpařováku při 50°C dosucha. Odparek se převede 2 x 0,5 ml tBME do vialky.

3.2.4.2 Med

Vzorek se nanese na kolonku a zkumavka se vymyje ještě 1 ml 5% acetonitrilu, který se také nanese na kolonku. Kolonka se promyje 20 ml 5% acetonitrilu. Analyt se vymyje do zkumavky se šroubovým uzávěrem 5 ml 40% acetonitrilu. Eluát se extrahuje 2 x 3 ml ethylacetátu. Spojené extrakty s obsahem stanovované látky se odpaří ve vakuovém rotačním odpařováku při 50°C dosucha. Odparek se převede 2 x 0,5 ml tBME do vialky.

3.2.4.3 Moč

Na kolonku se nanese vzorek rozpuštěný ve 2 ml 5% acetonitrilu. Zkumavka se vymyje ještě 1 ml 5% acetonitrilu, který se také nanese na kolonku. Kolonka se promyje 10 ml 5% acetonitrilu a 5 ml 20% acetonitrilu. Analyt se vymyje do zkumavky se šroubovým uzávěrem 5 ml 40% acetonitrilu. Eluát se extrahuje 2 x 3 ml ethylacetátu. Spojené extrakty s obsahem

stanovované látky se odpaří ve vakuovém rotačním odpařováku při 50°C dosucha. Odparek se převede 2 x 0,5 ml tBME do vialky.

3.2.4.4 Mléko

Primární extrakt se převede 2 x 1 ml směsi hexan : chloroform (1:1) do krátké zkumavky se šroubovým uzávěrem. Přidají se 2 ml deionizované vody a obsah zkumavky se důkladně protřepe. Zkumavky se centrifugují 10 minut při 5 400 x g při teplotě 5°C. Vodná (horní) fáze se převede do zkumavky a přidá se 100 µl acetonitrilu a nanese se na kolonku. Zkumavka se vymyje ještě 1 ml roztoku acetonitril : voda (5:95), který se také nanese na kolonku. Při analýze syrovátky nebo odtučněného sušeného mléka se primární extrakt přímo převede na kondicionovanou kolonku 2 ml + 1 ml roztoku acetonitril : voda (5:95). Kolonka se promyje 10 ml roztoku acetonitril : voda (5:95) a analyt se vymyje 5 ml roztoku acetonitril : voda (1:1) do zkumavky se šroubovým uzávěrem. Eluát se extrahuje 2 x 3 ml ethylacetátu (třepat intensivně 30 sekund). Spojené extrakty se odpaří na vakuovém odpařováku při 55°C. Odparek se převede 2 x 0.5 ml tBME do 1 ml derivatizační vialky.

3.2.5 Extrakce - MIP

3.2.5.1 Voda

Na kolonku se nanese vzorek 10 ml napájecí vody, promyje se 1 ml 5% acetonitrilu ve vodném roztoku 0,5% kyseliny octové, 2 ml 1% vodného roztoku amoniaku a 1ml 20% roztoku acetonitrilu v 1% roztoku amoniaku. Kolonka se vysuší prosáváním vzduchu podtlakem po dobu 5 minut. Pak následuje promytí 2 ml dichlormethanu a kolonky se vysuší prosáváním vzduchem po dobu 1 minuty. Potom se provede eluce 2 ml roztoku dichlormethan : kyselina octová : methanol (89 : 1 : 10). Eluát se opatrně odpaří na vakuovém rotačním odpařováku při 40°C dosucha. Odparek se převede 2 x 0.5 ml tBME do derivatizační vialky.

3.2.5.2 Med

Na kolonku se aplikuje maximálně 1 ml vzorku. Následuje promytí 2 ml deionizované vody, 2 ml 5% acetonitrilu ve vodném roztoku 0,5% kyseliny octové, 2 ml 1% amoniaku a 2 ml 20% acetonitrilu v 1% amoniaku. Kolonka se vysuší prosáváním vzduchu podtlakem po dobu 5 minut. Pak následuje promytí 2 ml dichlormethanu. Kolonka se opět vysuší prosáváním vzduchu po dobu 1 minuty. Následuje eluce 2 ml roztoku dichlormethan : kyselina octová : methanol (89 : 1 : 10). Eluát se opatrně odpaří na vakuovém rotačním odpařováku při 40°C dosucha. Odparek se převede 2 x 0.5 ml tBME do derivatizační vialky.

3.2.5.3 Moč

Na kolonku se nanese 1 ml vzorku a následuje promytí 2 ml deionizované vody, 1 ml 5% acetonitrilu ve vodném roztoku 0,5% kyseliny octové, 2 ml 1% vodného roztoku amoniaku a 1 ml 20% acetornitrilu v 1% vodném roztoku amoniaku. Kolonka se vysuší prosáváním vzduchu podtlakem po dobu 5 minut. Pak následuje promytí 2 ml

dichlormethanu. Kolonka se opět vysuší prosáváním vzduchu po dobu 1 minuty. Potom se provede eluce 2ml roztoku dichlormethan : kyselina octová : methanol (89 : 1 : 10). Eluát se opatrně odpaří na vakuovém rotačním odpařováku při 40°C dosucha. Odparek se převede 2 x 0.5 ml tBME do derivatizační vialky.

3.2.5.4 Mléko

Na kolonku se nanáší 1 ml vzorku a následuje promytí 2 ml deionizované vody, 1 ml 5% acetonitrilu ve vodném roztoku 0,5% kyseliny octové, 2 ml deionizované vody a 1 ml 20% acetonitrilu v 1% vodném roztoku amoniaku. Kolonka se vysuší prosáváním vzduchu podtlakem po dobu 5 minut. Pak následuje promytí 3 ml dichlormethanu. Kolonka se opět vysuší prosáváním vzduchu po dobu 1 minuty. Potom se provede eluce 2ml roztoku dichlormethan : kyselina octová : methanol (89 : 1 : 10). Eluát se opatrně odpaří na vakuovém rotačním odpařováku při 40°C dosucha. Odparek se převede 2 x 0.5 ml tBME do derivatizační vialky.

3.2.6 Derivatizace

Roztok v derivatizacční vialce se odpaří dosucha proudem dusíku. K odparku se přidá mikrostříkačkou 40µl BSTFA, odparek se rozpustí a směs se inkubuje 45 min při 75°C. Přebytek činidla se odpaří proudem dusíku dosucha. Těsně před vlastní chromatografií se tento odparek se rozpustí v 50 µl toluenu. Derivatizace jednotlivých vzorků se časuje tak, aby bylo možno bezprostředně po derivatizaci provést chromatografickou analýzu. Pokud nelze analýzu provést ihned, je nutno vialky s derivatizovaným vzorkem uložit do mrazáku.

3.2.7 Chromatografická analýza

Pro chromatografickou analýzu chloramfenikolu byl použit plynový chromatograf Hewlett Packard 6890 s hmotnostním detektorem HP 5973

Nástřík 1.0 µl metodou cool on column injection

Chromatografické podmínky:

- nosný plyn He 5.0
- průtok nosného plynu 1.2 ml/min. (EPC - constant flow)
- teplota interface 280°C
- teplota iontového zdroje 150°C
- teplota kvadrupólu 150°C
- teplotní program: $T_{poč}$ 80°C, 0 min., β_1 30°C/min. do 250°C, β_2 5°C/min. do 280°C, 8min. 280°C

Metoda ionizace NCI, průtok methanu 40

Detektor v SIM mode

Sledované ionty pro kvantifikaci:

- m/z 466 pro chloramfenikol
- m/z 471 pro interní standard

3.3 Výsledky

V této práci bylo provedeno porovnání stávajících analytických metod používaných na ÚSKVBL pro stanovení reziduí chloramfenikolu v různých biologických materiálech, které jsou vesměs založeny na čištění extraktu metodou SPE – C18, s novými postupy přípravy vzorku pomocí kolonek MIP.

3.3.1 Kalibrace

Vzorky pro kalibraci se připravily podle výše popsaných postupů. Bylo měřeno vždy 6 vzorků pro každou matici a metodu čištění. K pěti vzorkům byl přidán pracovní roztok standardu chloramfenikolu, a to ve vzrůstající koncentraci, šestý vzorek sloužil jako blank. Množství přidaného pracovního roztoku interního standardu bylo pro všechny vzorky (včetně blanku) stejné. Vzorky se změřily na m/z 466 pro chloramfenikol a 471 pro vnitřní standard. Výsledky měření pro kalibraci pro jednotlivé matrice a metody čištění jsou uvedeny v tabulkách č. 2 - 5. Z těchto zjištěných hodnot byly sestaveny grafy kalibračních přímk. Na osu x se vynášejí koncentrace přidaného standardu, na osu y potom hodnoty poměru pík 466/477. Vypočteny regresní rovnice, regresní a korelační koeficienty (viz grafy 1 - 8). Dále byly na základě těchto hodnot vypočteny regresní rovnice, regresní a korelační koeficienty.

Tabulka č. 2: Kalibrace - voda

SPE		MIP	
cCAP (ng/ml)	466/471	cCAP(ng/ml)	466/471
0,00	0,167	0,00	0,088
0,02	0,395	0,01	0,184
0,05	0,547	0,02	0,265
0,10	0,865	0,05	0,511
0,20	1,652	0,10	0,918
0,50	3,912	0,20	1,736

Tabulka č. 3: Kalibrace - med

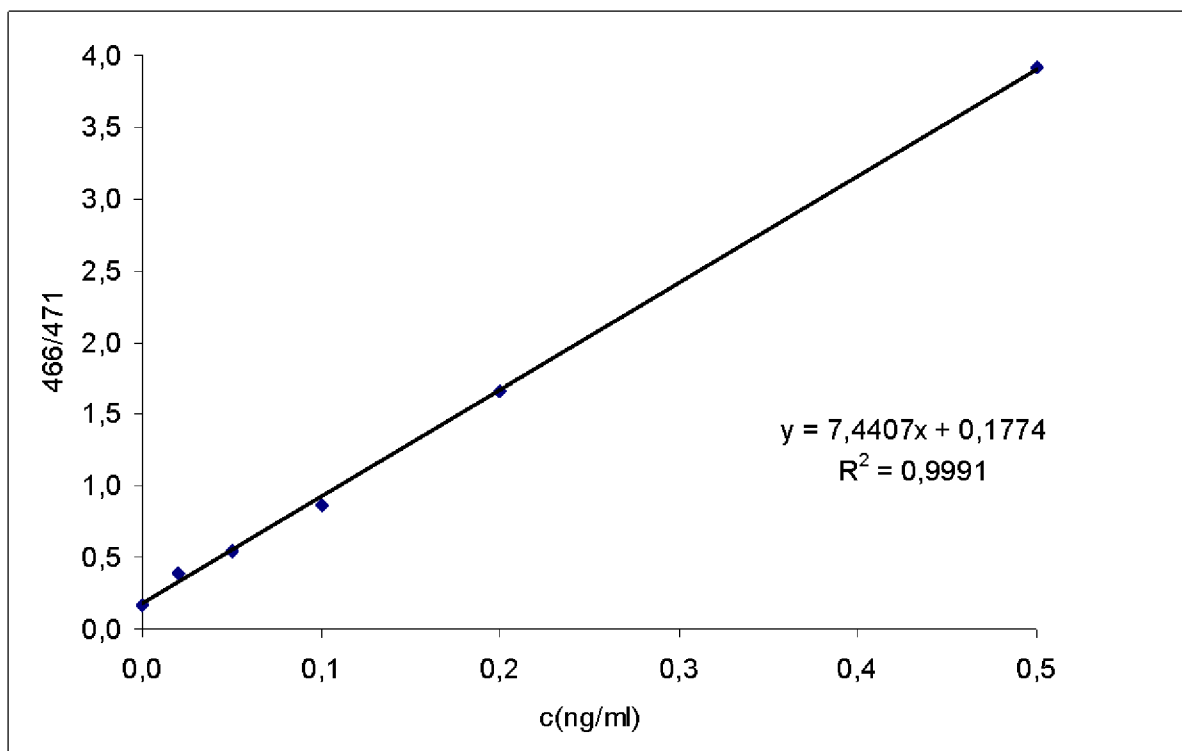
SPE		MIP	
cCAP (ng/g)	466/471	cCAP(ng/g)	466/471
0,0	0,051	0,0	0,000
0,4	0,340	0,5	0,335
1,0	0,673	1,0	0,541
2,0	1,371	2,0	0,946
4,0	2,306	5,0	2,094

Tabulka č. 4: Kalibrace - moč

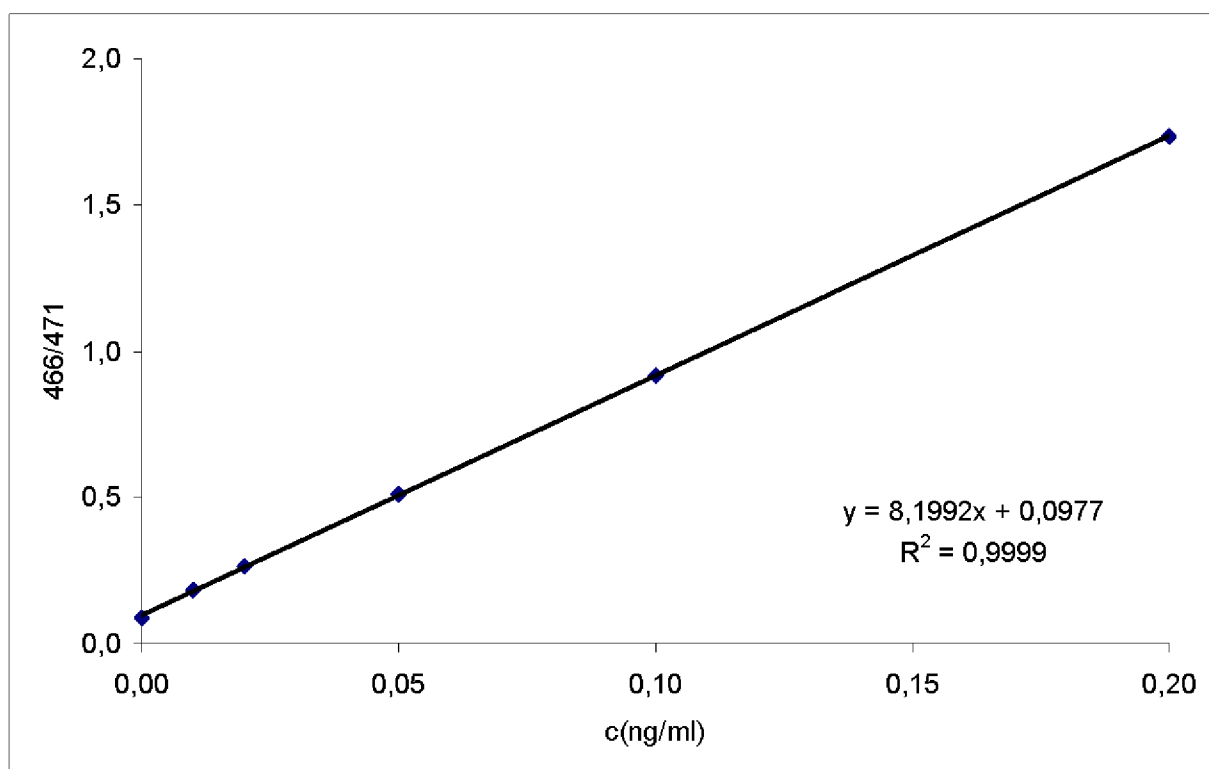
SPE		MIP	
cCAP (ng/ml)	466/471	cCAP(ng/ml)	466/471
0,0	0,000	0,0	0,021
0,1	0,295	0,2	0,211
0,2	0,487	0,5	0,527
0,5	1,163	1,0	0,816
1,0	2,327	2,0	1,614
0,0	0,000	0,0	0,021

Tabulka č. 5: Kalibrace - mléko

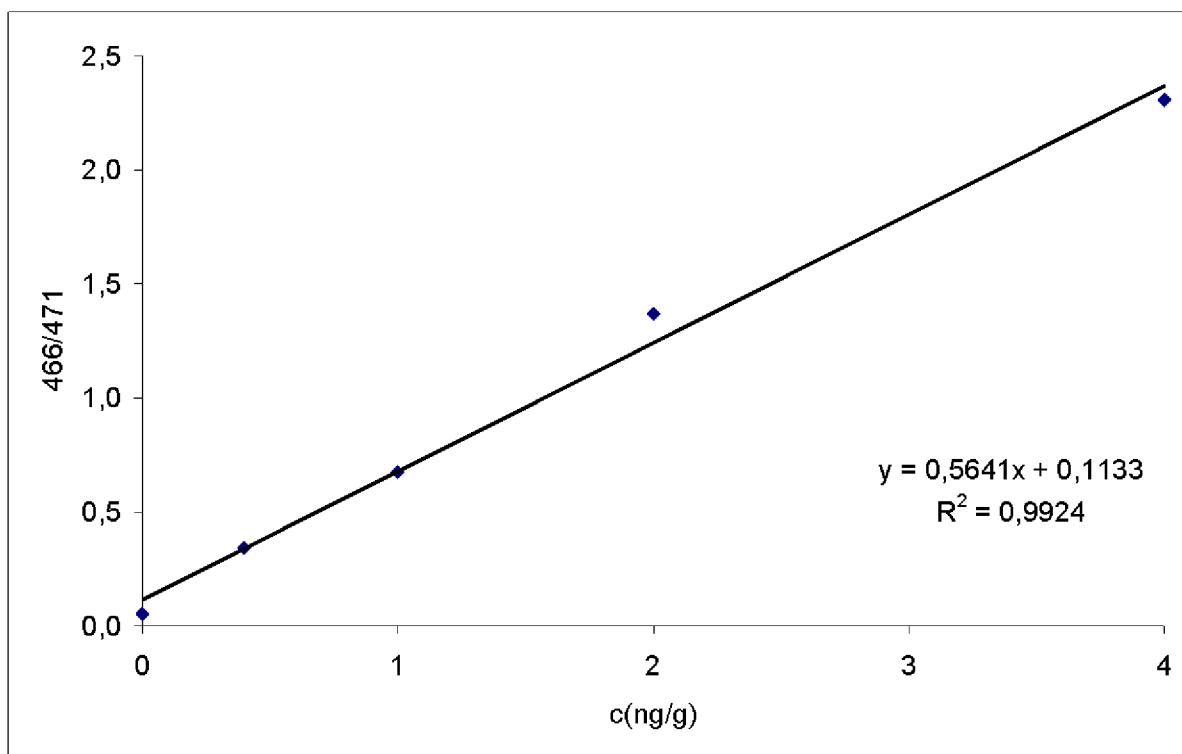
SPE		MIP	
cCAP (ng/ml)	466/471	cCAP(ng/ml)	466/471
0,0	0,000	0,0	0,000
0,4	0,571	0,1	0,060
0,6	0,794	0,2	0,135
0,8	1,154	0,5	0,291
1,0	1,382	1,0	0,545
		2,0	1,133



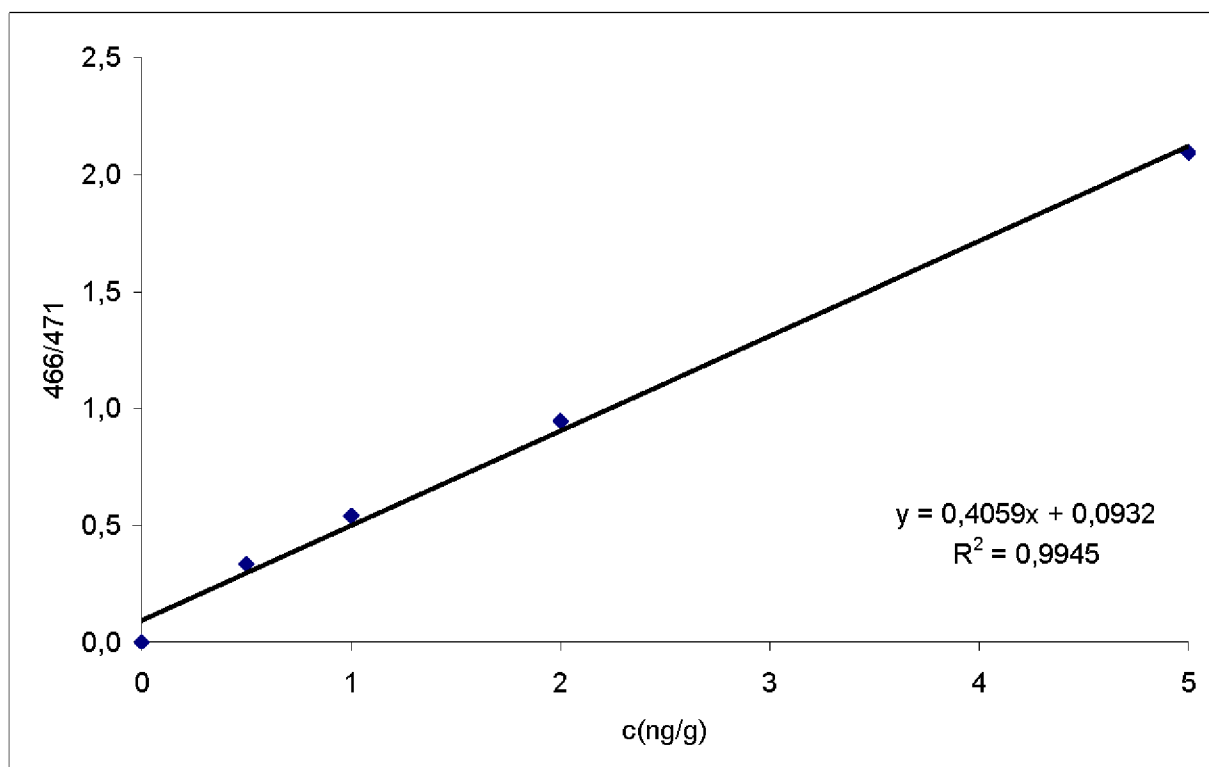
Graf č. 1: Kalibrační přímka pro vodu - SPE



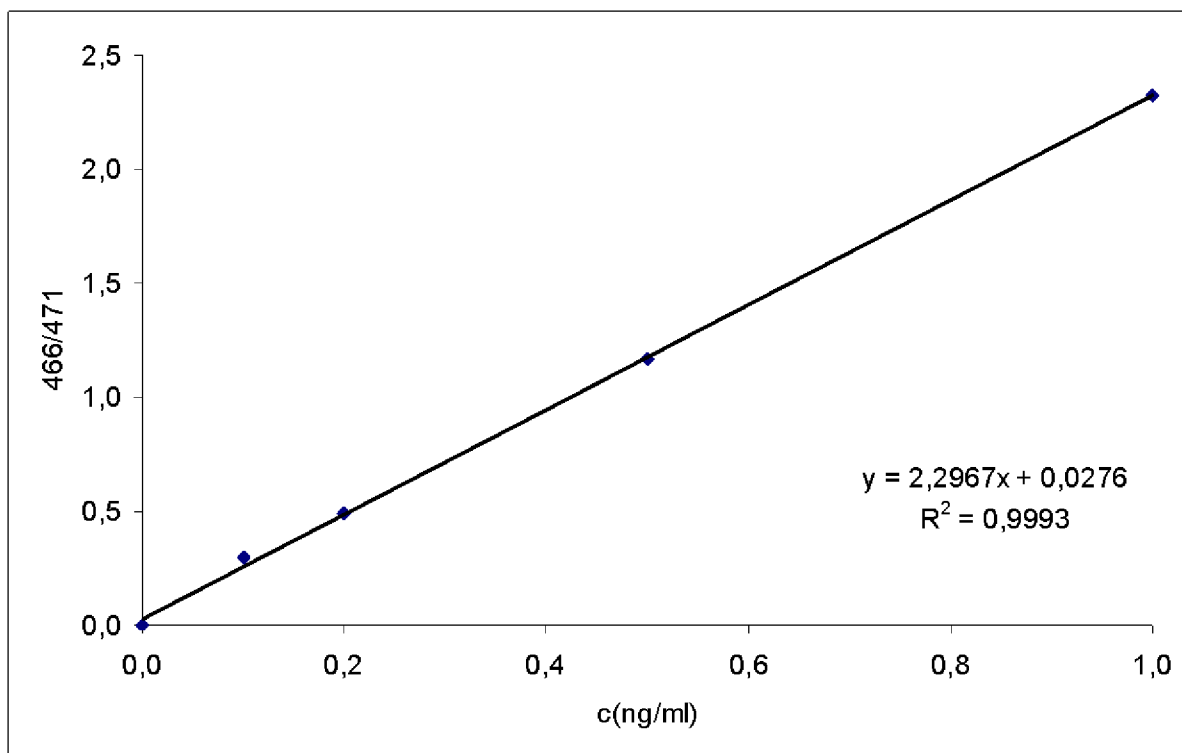
Graf č. 2: Kalibrační přímka pro vodu - MIP



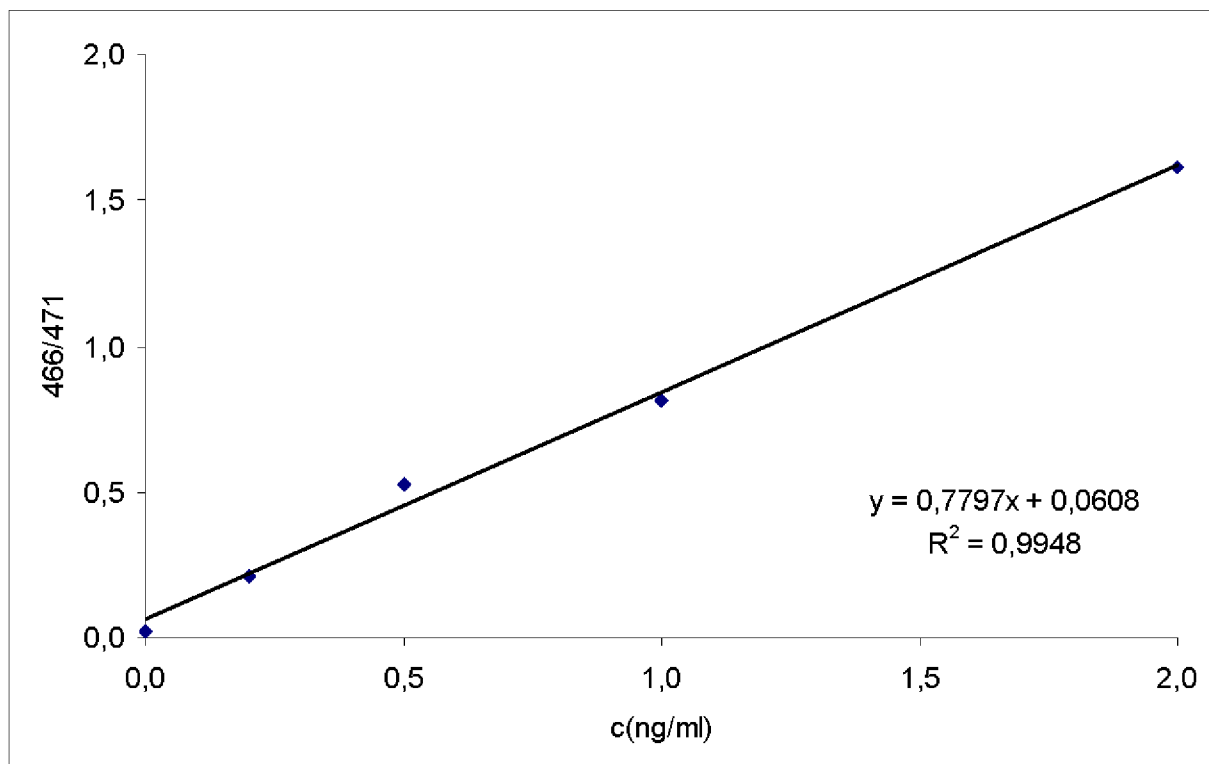
Graf č. 3 : Kalibrační přímka pro med - SPE



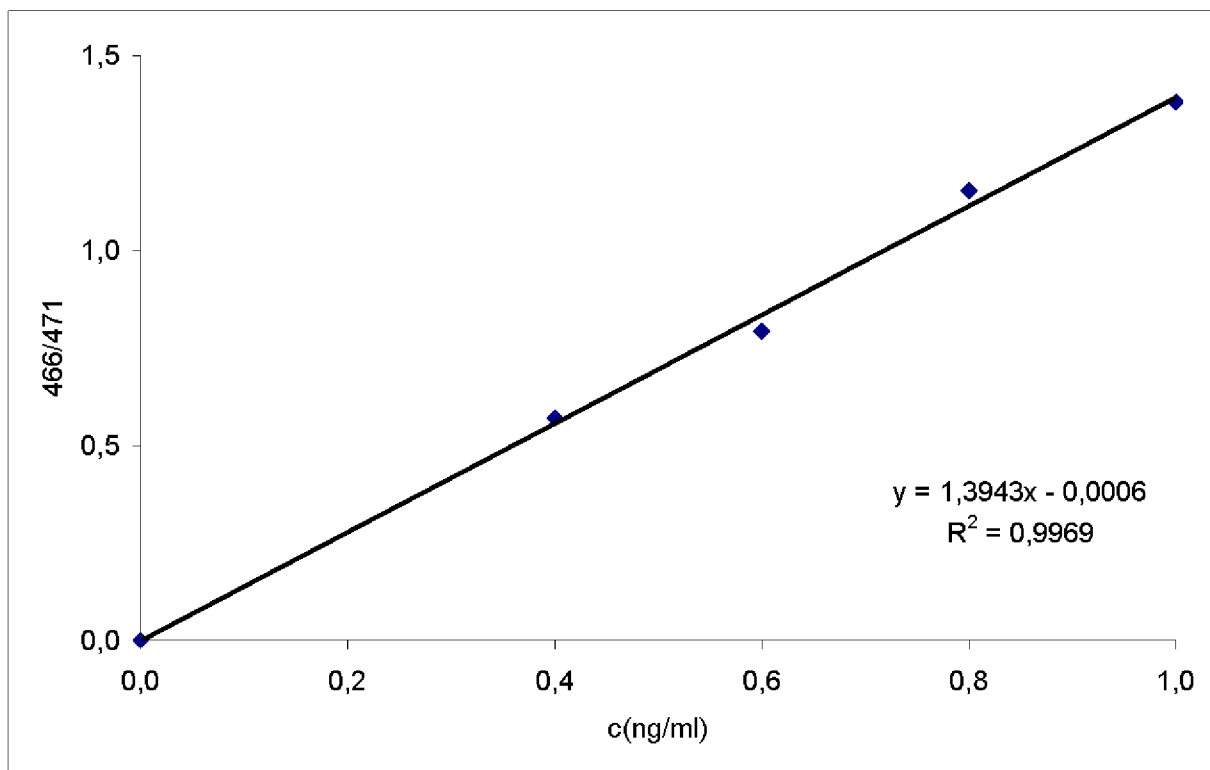
Graf č. 4 : Kalibrační přímka pro med - MIP



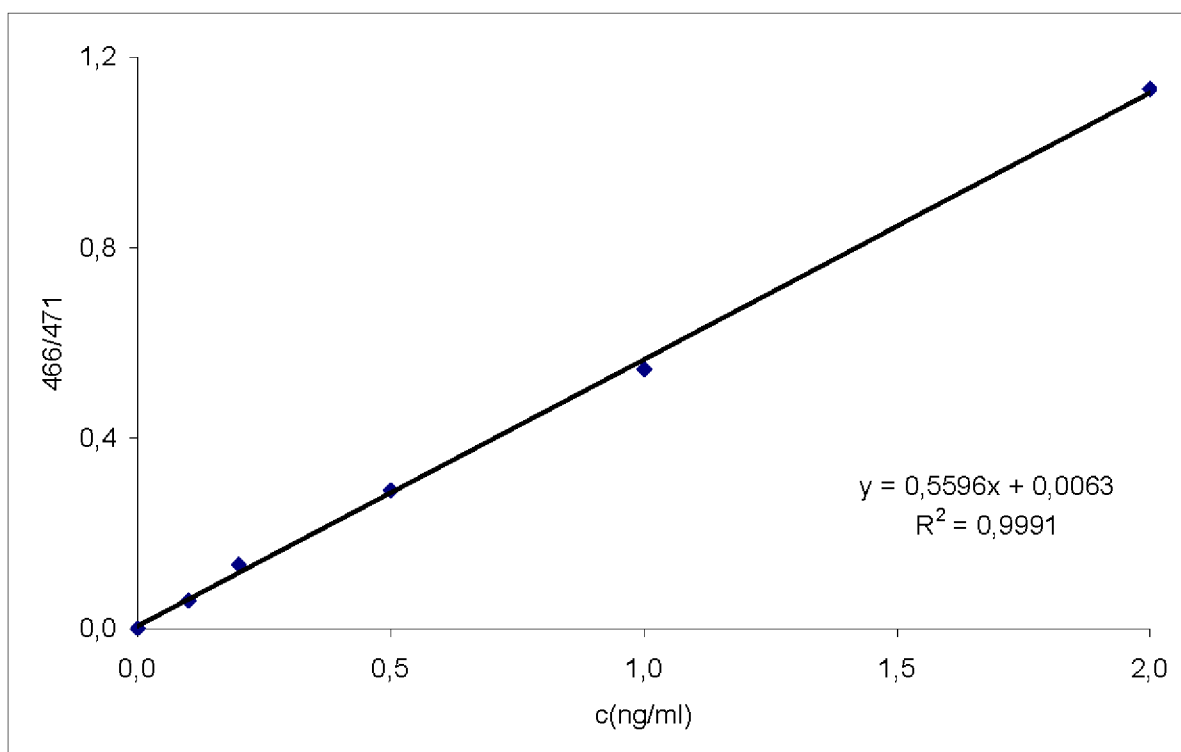
Graf č. 5: Kalibrační přímka pro moč - SPE



Graf č. 6: Kalibrační přímka pro moč - MIP



Graf č. 7: Kalibrační přímka pro mléko - SPE



Graf č. 8: Kalibrační přímka pro mléko - MIP

3.3.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla zjišťována vždy na šesti vzorcích každé matrice pro postup čištění SPE C-18 a na šesti vzorcích každé matrice pro postup čištění MIP. Jednotlivé vzorky byly připraveny podle postupů uvedených v kapitole 3.2. Ke každému z těchto vzorků bylo přidáno stejné množství pracovního roztoku standardu. Množství přidaného pracovního roztoku vnitřního standardu bylo též stejné pro všechny vzorky. Při následné chromatografii vzorků byly změřeny píky pro m/z 466 pro chloramfenikol a m/z 471 pro vnitřní standard. Podmínkou měření bylo, že vzorky pro jednu matrici a metodu čištění musely být připraveny i změřeny ve stejný den, stejným způsobem a na stejném laboratorním vybavení. Ze získaných měření byla vypočítán průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Výsledky získané při tomto měření jsou uvedeny v tabulkách č. 6 - 9.

Tabulka č. 6: Opakovatelnost - voda

SPE		MIP	
č. vzorku	466/471	č. vzorku	466/471
1	1,534	1	0,334
2	1,638	2	0,339
3	1,654	3	0,345
4	1,670	4	0,353
5	1,724	5	0,358
6	2,438	6	0,347
průměr	1,644	průměr	0,346
směrodatná odchylka (s)	0,070	směrodatná odchylka (s)	0,009
relativní směrodatná odchylka v % (RSD)	4,24	relativní směrodatná odchylka v % (RSD)	2,53

Tabulka č. 7: Opakovatelnost - med

SPE		MIP	
č. vzorku	466/471	č. vzorku	466/471
1	0,265	1	0,198
2	0,246	2	0,205
3	0,276	3	0,230
4	0,239	4	0,191
5	0,246	5	0,190
6	0,259	6	0,201
průměr	0,255	průměr	0,203
směrodatná odchylka (s)	0,014	směrodatná odchylka (s)	0,013
relativní směrodatná odchylka v % (RSD)	5,49	relativní směrodatná odchylka v % (RSD)	6,60

Tabulka č. 8: Opakovatelnost - moč

SPE		MIP	
č. vzorku	466/471	č. vzorku	466/471
1	1,405	1	0,126
2	1,380	2	0,111
3	1,475	3	0,119
4	1,618	4	0,129
5	1,488	5	0,123
6	1,325	6	0,117
průměr	1,448	průměr	0,121
směrodatná odchylka (s)	0,103	směrodatná odchylka (s)	0,006
relativní směrodatná odchylka v % (RSD)	7,10	relativní směrodatná odchylka v % (RSD)	4,94

Tabulka č. 9: Opakovatelnost - mléko

SPE		MIP	
č. vzorku	466/471	č. vzorku	466/471
1	1,016	1	0,069
2	1,031	2	0,066
3	1,076	3	0,073
4	1,085	4	0,071
5	1,092	5	0,067
6	1,048	6	0,063
průměr	1,058	průměr	0,068
směrodatná odchylka (s)	0,031	směrodatná odchylka (s)	0,003
relativní směrodatná odchylka v % (RSD)	2,93	relativní směrodatná odchylka v % (RSD)	4,82

3.4 Statistické zpracování dat

3.4.1 Lineární regrese kalibrační přímky

Kalibrace je v analytické chemii nejběžnější vztah dvou proměnných veličin, kdy se zjišťuje závislost sledovaného signálu (závisle proměnná) na koncentraci analytu (nezávisle proměnná). Každá příčinná závislost dvou nebo více proměnných může v obecném pohledu vykazovat dvojí formu:

- **funkční závislost** - určité hodnotě nezávisle proměnné x odpovídá vždy jediná, určitá hodnota závisle proměnné y ;
- **statistická závislost** - pro určitou hodnotu nezávisle proměnné x existuje vždy určité pravděpodobnostní rozdělení závisle proměnné y (náhodné veličiny). Toto rozdělení je charakterizováno především aritmetickým průměrem hodnot y a rozptylem. Se změnou hodnoty x se hodnoty y zákonitě mění a mění se i aritmetický průměr. Funkční závislost proměnných veličin řeší regresní analýza. Posouzení těsnosti rozložení závisle proměnné y kolem regresně vypočítané funkce $y = f(x)$ umožňuje korelace.

Regresní analýza lineární závislosti má za úkol určit odhady koeficientů a (posunutí) a b (směrnice), které charakterizují regresní přímku, vyjádřenou rovnicí

$$y = a + bx$$

Předpokládá se, že nezávisle proměnná x je prakticky bez chyby nebo aspoň s chybou podstatně menší než je chyba závisle proměnné y . Regresní analýza se uskutečňuje metodou nejmenších čtverců - ze všech možných přímek se vybere taková, pro kterou je součet druhých mocnin (čtverců) vzdáleností kalibračních bodů od kalibrační přímky minimální. Těsnost rozložení závisle proměnné veličiny kolem lineární regresní přímky určuje korelační koeficient R^2 . Čím je hodnota tohoto koeficientu bližší ± 1 , tím je závislost mezi proměnnými těsnější a tím více se blíží přímce.^{42,43}

Hodnoty regresních a korelačních koeficientů pro jednotlivé matrice a metody čištění jsou uvedeny v tabulkách č. 10 a 11.

Tabulka č. 10: Hodnoty regresních a korelačních koeficientů - SPE

	posunutí (a)	směrnice (b)	korelační koeficient (R^2)
voda	0,1174	7,4407	0,9991
med	0,1133	0,5641	0,9924
moč	0,0276	2,2967	0,9993
mléko	0,0006	1,3943	0,9969

Tabulka č. 11: Hodnoty regresních a korelačních koeficientů - MIP

	posunutí (a)	směrnice (b)	korelační koeficient (R^2)
voda	0,0977	8,1991	0,9999
med	0,0932	0,4059	0,9945
moč	0,0608	0,7797	0,9948
mléko	0,0063	0,5596	0,9991

3.4.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku.

Přesnost kalibrace je charakterizována směrodatnou odchylkou s , což je rozptyl hodnot závisle proměnné kolem regresní přímky. Tato směrodatná odchylka se vypočítá podle následujícího vztahu:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Relativní směrodatná odchylka pak udává procentuální rozptyl od střední hodnoty a je dána vztahem^{42,43}

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} 100\%$$

Hodnoty směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek pro jednotlivé matrice a metody čištění jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Tabulka č. 12 : Hodnoty směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek

	směrodatná odchylka (s) SPE	směrodatná odchylka (s) MIP	relativní směrodatná odchylka (s _r) SPE	relativní směrodatná odchylka (s _r) MIP
voda	0,070	0,009	4,24	2,53
med	0,014	0,013	5,49	6,60
moč	0,103	0,006	7,10	4,94
mléko	0,031	0,003	2,93	4,82

Z údajů v této tabulce vyplývá, že oba způsoby čištění mají velmi dobrou opakovatelnost (hodnota relativní směrodatné odchylky byla maximálně 7,1%)

3.4.3 Limit rozhodnutí

Limit rozhodnutí $CC\alpha$ (decision limit) - validační parametr metody podle vyhlášky 2002/657/EC se vypočítá podle vztahu

$$CC\alpha = 2,5 \frac{Sb_w}{m_w}$$

Sb_w je standardní odchylka hodnoty b_w vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti

m_w je směrnice přímky závislosti relativní odezvy na koncentraci při měření vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti

Při malém počtu měření ($n < 10$), se místo hodnoty Sb_w použije standardní odchylka hodnoty posunutí z regresní rovnice kalibrační přímky, jako hodnota m_w se použije její směrnice a podíl těchto hodnot se násobí koeficientem 3.

3.4.4 Detekční schopnost

Detekční schopnost $CC\beta$ (detection capability) - validační parametr metody podle vyhlášky 2002/657/EC se vypočítá podle vztahu

$$CC\beta = CC\alpha + \left(1,64 \frac{Sb_w}{m_w} \right)$$

Vypočtené hodnoty limitu rozhodnutí a detekční schopnosti pro jednotlivé matrice a metody čištění jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Tabulka č. 13: Hodnoty $CC\alpha$ a $CC\beta$ jednotlivých analytů

	SPE		MIP	
	$CC\alpha$	$CC\beta$	$CC\alpha$	$CC\beta$
voda	0,010 ng/ml	0,015 ng/ml	0,001 ng/ml	0,002 ng/ml
med	0,311 ng/mg	0,481 ng/mg	0,317 ng/mg	0,491 ng/mg
moč	0,023 ng/ml	0,036 ng/ml	0,129 ng/ml	0,199 ng/ml
mléko	0,064 ng/ml	0,099 ng/ml	0,043 ng/ml	0,067 ng/ml

4. Závěr

V této práci bylo provedeno porovnání stávajících analytických metod používaných na ÚSKVBL pro stanovení reziduí chloramfenikolu v různých biologických materiálech, které jsou vesměs založeny na čištění extraktu metodou SPE – C18, s novými postupy přípravy vzorku pomocí kolonek MIP.

Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction - SPE) je separační technika používaná při zpracování kapalných vzorků s různou polaritou, pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a odstranění nežádoucích příměsí, které by mohly rušit následná analytická stanovení. Její podstatou je zachycení molekul analytu na tuhém sorbentu, přes který vzorek protéká - využívá se chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí na sorbentu ulpívají. Mechanismy zachycování látek spočívají v různých molekulárních interakcích mezi analytem a sorbentem (van der Waalsovy síly, vodíkové můstky, iontové interakce).

Molekulárně otištěné polymery (Molecularly Imprinted Polymers - MIP) se vyrábí z vysoce zesíťovaných polymerů v přítomnosti cílové molekuly jako templátu. Po odstranění tohoto templátu se odhalí vazebná místa v polymerní síti, která jsou k templátu komplementární jak ve velikosti a tvaru, tak i v pozici funkčních skupin. Tento polymer pak může být použit jako selektivně vazající médium pro cílový analyt a jiné strukturně obdobné sloučeniny.

Nejvíce chyb při analýze reziduí chloramfenikolu v komplexních maticích vzniká právě při vlastní přípravě vzorku pro analýzu. Proto každé zjednodušení postupu zvyšuje správnost provedení analýzy.

Kolonky MIP umožňují provést extrakci a čištění vzorků v jediném kroku (na rozdíl od dříve používaného postupu přípravy primárního extraktu a jeho čištění na kolonkách SPE C18). Tím se dosáhne především zkrácení času potřebného pro přípravu vzorku a během jednoho dne tak lze připravit a analyzovat větší počet vzorků. Další výhodou použití kolonek MIP je snížení nákladů na analýzu, protože při tomto postupu se ušetří značné množství chemikálií i elektrické energie (odpadá zdlouhavé odpařování ethylacetátu z eluátu). A to i přesto, že cena 1 kolonky MIP je asi dvojnásobná oproti klasické kolonce SPE-C18.

Z výsledků této práce vyplývá, že výsledky získané oběma uvedenými způsoby jsou srovnatelné. Postup přípravy vzorků pomocí MIP je vhodný pro dosažení potřebných limitů analytické metody pro chloramfenikol, které jsou dané vyhlášeným MRPL 0.3 ng/g a po provedených validacích bude tato metoda používána v laboratořích ÚSKVBL.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BILLOVÁ V.: *Hodnocení kvality, bezpečnosti a účinnosti - MRL, OL*. [online], dostupné z farmakologie.webzdarma.cz/p10_veterina_hodnoceni_kvality_bezpecnosti_a_ucinno sti_MRLOL.ppt.
2. HAMPL F., RÁDL S., PALEČEK J.: *Farmakochemie*. 2002. ISB 978-80-7080-639-5
3. CHEN T., GUO L., ZHANG L., SHI L., FANG H., SUN Y., FUSCO J., MEI N.: Gene Expression Profiles Distinguish the Carcinogenic Effects of Aristolochic Acid in Target (Kidney) and Non-target(Liver) Tissues in Rats. *BMC Biotransformatics*, 2006, vol. 7, pp. 22
4. LÜLLMANN H., MOHR K., WEHLING M.: *Farmakologie a toxikologie*. 2004. ISBN 80-247-0836-1
5. HADAŠ Z., DOLEŽAL J.: *Výživa zvířat a nauka o krmivech*. [online], dostupné z old.mendelu.cz/~agro/af/222/pages/vyuka/vyziva
6. Souhrn údajů o přípravku. [online], dostupné z www.sukl.cz/download/spc/SPC81474.doc
7. STIBOROVÁ M.: Aromatické nitrosloučeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka, *Chemické listy*, 2002, vol. 96, pp. 784 - 791
8. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS : Ronidazole - summary report. [online], dostupné z www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/ronidazole1.pdf
9. Speciální toxikologie. [online], dostupné z kalch.upce.cz/add_on/tox9.pdf
10. GOECKE E.: Review of the genotoxic properties of chlorpromazine and related phenothiazines. *Mutation Research - Review in Genetic Toxicology*, 1996, vol. 386, pp. 9 - 21
11. FRÁNEK M.: Rezidua nitrofuránových antibiotik v potravinách, *Veterinářství*, 2005, vol. 55, pp. 573 - 574
12. CHURÁČEK J. a kol.: *Analýza organických látek*. 1999. ISBN 80-902432-9-0
13. BUŠ A.: Význam farmakologie v produkci potravin. *Veterinářství*, 2005, vol. 55, pp. 39 - 42
14. WONGTAVATCAI J., McLEAN J.G., RAMOS F., ARNOLD D.: Chloramphenicol. *Monograph in Toxicological evaluation of certain veterinary drugs in food, WHO*. 2005, Additive Series: 53, IPCS, Geneva, pp. 7 - 84
15. Chloramphenicol intro. [online], dostupné z www.med.howard.edu/pharmacology/handouts/cmp_tet.ppt
16. KLOUDA P.: *Moderní analytické metody*. 2003. ISBN 80-86369-072

17. MOHAMED R., RICHOZ-PAYOT J., GREMAUD E., MOTTIER P., YILMAZ E., TABE J. C., GUY P. A.: Advantage of Molecularly Imprinted Polymers LC-ESI-MS/MS for the Selective extraction and Quantification of Chloramphenicol in Milk-Based Matrixes. Comparison with a Classical Sample Preparation. *Anal. Chem.*, 2007, vol. 79, no. 24, pp. 9557 - 9565
18. SCHRIMER K., MEISEL H.: Molecularly Imprinted Polymers for the Selective Solid-Phase Extraction of Chloramphenicol. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, vol. 392, pp. 223 - 229
19. Molecularly Imprinted Polymers for the Highly Selective Extraction of Trace Analytes from Complex Matrices. [online], dostupné z www.labicom.cz
20. SupelMIP™ SPE - Chloramphenicol. [online], dostupné z www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/t706024.pdf
21. Official Journal of the European Communities L125, 23.5.1996, p. 10. Commission decision 96/23/EC
22. Official Journal of the European Communities L171, 15.3.2003, p. 17. Commission decision 2003/181/EC
23. PIERCE A. E.: Silylation of organic compounds, Pierce Chemical Company, Rockford. (1968)
24. BSTFA - product specification. [online], dostupné z www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Aldrich/General_Information/bstfa.pdf
25. STUŽKA V.: *Instrumentální metody chemické analýzy II. Hmotnostní spektrometrie organických molekul*. 1996. ISBN 80-7067-613-2
26. BALÍKOVÁ M.: *Plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie – aplikace v toxikologii*. [online], dostupné z www.lf1.cuni.cz/Data/files/Toxikologie/GC-MS%20apilkace%20%20v%20toxikologii.ppt
27. STIBOROVÁ M., PATOČKA J., FREI E., SCHMIESER H. H.: Biochemické a toxikologické aspekty etiologie balkánské endemické nefropatie. *Chemické listy*, 2005, vol. 99, pp. 782 - 788
28. NUSSIO M. R., SYKES M. J., MINERS J. O., SHAPTER J. G.: Kinetics Membrane Disruption Due to Drug Interactions of Chlorpromazine Hydrochloride, *Langmuir*, 2009, vol. 25, pp. 1086 - 1090
29. POUZAR M.: *Kolchicin*. [online], dostupné z www.mpouzar.net/prednasky/kolchicin.ppt
30. VASS M., HRUŠKA K., FRANĚK M.: Nitrofurán Antibiotics: a Review on the Application, Prohobotion and Residual Analysis, *Veterinární medicína*, 2008, vol. 53, pp. 469 - 500
31. SIIBAK T., PEIL L., XIONG L. Q., MANKIN A., REMME J., TENSON T.: Erythromycin and Chloramphenicol Induced Ribosomal Assembly Defects Are Secondary Effects of Protein Synthesis Inhibition, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, vol. 53, pp. 563 - 571

32. MOULIN-SALLANON M., MILLET P., ROUSSET C., ZIMMER L., DEBILLY G., PETIT J. M., CESPUGILIO R., MAGISTRETTI P., IBANEZ V.: Chloramphenicol Decreases Brain Glucose Utilization and Modifies the Sleep-Wake Cycle Architecture in Rats. *Journal of Neurochemistry*, 2005, vol. 93, pp. 1623 - 1632
33. ATEF M., HANAFY M., ELAZIZ M.: Effect of Pyridoxine on the Distribution of Chloramphenicol and its Residues in the Chicken. *British Poultry science*, 1993, vol. 34, pp. 161 - 166
34. ESIMONE C. O., NWORU C. S., EKECHUKWU A.C., AWEMU A.G.: Effects of Phenylalanine and Glycine on Some Toxic Effects of Chloramphenicol. *Scientific Research and Essays*, 2007, vol. 2, pp. 105 - 111
35. Antibiotika - sekundární metabolity. [online], dostupné z biomikro.vscht.cz/documents/biochemie_mikroorganismu/pdf/Antibiotika.pdf
36. COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS: Cloramphenicol - summary report. [online], dostupné z www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/chloramphenicol.pdf
37. Official Journal of the European Communities L221, 17.8.2002, p. 8. Commission decision 2002/657/EC
38. COUFAL P.: Gas Chromatography. [online], dostupné z www.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html
39. VLK L., KREJČA P.: PID - technologie pro detekci širokého spektra sloučenin. *Chemické listy*, 2006, vol. 16, no. 6, pp. 24 - 25
40. HENRICOVÁ L.: Základy hmotnostní spektrometrie. [online], dostupné z www.pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni_spektrometrie_08.pdf
41. Plynová chromatografie (GC). [online], dostupné z www.chemi.muni.cz/~literak/uvod.pdf
42. POPELKA J.: Regresní analýza. [online], dostupné z www.volny.cz/popelka_jan/statistika/Statistika2008_7.ppt
43. Hodnocení analytických výsledků. [online], dostupné z <http://ach.upol.cz/ucebnice/hodnoceni7.htm>

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADI	acceptable daily intake; přijatelná denní dávka
AFID	Alkali Flame Ionization Detector; plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem
CI	Chemical ionization; chemická ionizace
DHPS	enzym dihydropteroát syntetáza
ECD	Electron Capture Detector; detektor elektronového záchytu
EI	Electron Impact; ionizace nárazem elektronů
EMA	European Medicines Agency;
FID	Flame Ionization Detector; plamenový ionizační detektor
GC	Gas Chromatography; plynová chromatografie
LOD	Limit of detection; detekční limit
LOQ	Limit of quantification; mez stanovitelnosti
MIP	Molecularly Imprinted Polymers; molekulárně otištěné polymery
MRL	Maximum residue limit; maximální limit reziduí
MRPL	minimum required performance limit; minimální požadovaný limit analytické metody
MS	Mass Spectrometry ; hmotnostní spektrometr
NCI	Negative chemical ionization; negativní chemická ionizace
PID	Photo Ionization Detector; fotoionizační detektor
SPE	Solid Phase Extraction; extrakce tuhou fází
TCD	Thermal Conductivity Detector; tepelně vodivostní detektor
TID	Thermal Ionization Detector; bezplamenový detektor s alkalickým kovem
ÚSKVBL	Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv