

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Vývoj, optimalizace a validace analytické metody  
na stanovení antibiotika karbenicilin ve vodě pomocí  
LC/MS**

Bakalářská práce

**Kateřina Vančurová**

Školitel: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2023

Vančurová, K., 2023: Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení antibiotika karbenicilin ve vodě pomocí LC/MS. [Development, optimization and validation of an analytical method for the determination of the antibiotic carbenicillin in water using LC/MS. Bc. Thesis, in Czech.] – 74 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

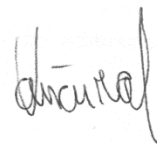
### **Anotace**

This bachelor thesis deals with the development, optimization and validation of an analytical method for the determination of the antibiotic carbenicillin disodium in water by LC/MS. Two chromatographic modes, reversed-phase chromatography (RP) and hydrophilic interaction chromatography (HILIC), were tested for chromatographic separation. For each chromatographic mode, basic optimization of mobile phase composition, mobile phase flow rate and sample injection volume was performed. Subsequently, optimization of mass detection conditions – heated electrospray parameters, ion optics voltage, choice of precursor and product ions, normalized collision energy and ion trap filling time – was done. Finally, validation of both analytical methods was performed for their application to evaluate the applicability of different procedures for the preparation of biologically active thin films releasing the antibiotic carbenicillin to water.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 8. 12. 2023



.....

Kateřina Vančurová

## **Poděkování**

Velké díky patří mému školiteli Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D., za ochotu, cenné rady a v neposlední řadě za nekonečnou trpělivost, která byla mnohokrát pokoušena. Také bych chtěla poděkovat jemu i zbytku laboratoře za vytvoření příjemného a přátelského prostředí.

Dále bych chtěla poděkovat svému příteli a rodině za psychickou podporu v průběhu mého studia.

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Teoretická část .....	2
2.1. Antibiotika .....	2
2.2. Beta-laktamová antibiotika .....	3
2.2.1. Peniciliny .....	4
2.2.2. Karbenicilin disodná sůl .....	6
2.3. Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií .....	8
2.4. Možnosti stanovení karbenicilinu .....	12
3. Materiál a metody .....	16
3.1. Použité chemikálie a činidla .....	16
3.2. Instrumentální vybavení a spotřební materiál .....	16
3.3. Příprava roztoků .....	17
3.3.1. Příprava mobilních fází .....	17
3.3.2. Příprava zásobního roztoku karbenicilinu .....	17
3.3.3. Příprava pracovního roztoku pro optimalizaci (RP) .....	18
3.3.4. Příprava pracovního roztoku pro optimalizaci (HILIC) .....	18
3.3.5. Příprava výchozích roztoků pro validaci (RP) .....	18
3.3.6. Příprava řady pracovních roztoků pro validaci (RP) .....	18
3.3.7. Příprava výchozího roztoku pro validaci (HILIC) .....	18
3.3.8. Příprava řady pracovních roztoků pro validaci (HILIC) .....	19
3.3.9. Příprava slepých roztoků .....	20
4. Výsledky a diskuse .....	21
4.1. Optimalizace chromatografické separace .....	21
4.1.1. Testovací analýza .....	21
4.1.2. Optimalizace mobilní a stacionární fáze .....	22
4.1.2.1. Kolona Acclaim RSLC 120 C18 (LC-003) .....	22

4.1.2.2.	Kolona Kinetex Biphenyl (LC-011).....	24
4.1.2.3.	Kolona Synergi Polar RP C12 (LC-015).....	26
4.1.2.4.	Kolona Kinetex HILIC (LC-009).....	27
4.1.3.	Optimalizace objemu nástřiku.....	29
4.1.4.	Optimalizace průtoku.....	29
4.2.	Optimalizace hmotnostní detekce.....	30
4.2.1.	Optimalizace podmínek elektrospreje.....	30
4.2.2.	Optimalizace parametrů iontové optiky (S-čočky a F-čočky).....	31
4.2.3.	Volba MRM přechodů a optimalizace kolizní energie.....	32
4.2.4.	Optimalizace maximální doby plnění pasti.....	34
4.3.	Souhrn optimalizace chromatografické separace a hmotnostní detekce.....	34
4.4.	Validace metod.....	37
4.4.1.	Validace metody RP.....	37
4.4.1.1.	Kalibrační křivka a rozsah.....	37
4.4.1.2.	Správnost a přesnost.....	42
4.4.1.3.	Rozsah.....	43
4.4.2.	Validace metody HILIC.....	43
4.4.2.1.	Kalibrační křivka a rozsah.....	43
4.4.2.2.	Přesnost a správnost.....	46
4.4.2.3.	Rozsah.....	46
4.5.	Sumarizace dosažených výsledků a porovnání s ostatními studii.....	47
5.	Závěr.....	48
6.	Citovaná literatura.....	49
7.	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	53
8.	Přílohy.....	56
8.1.	Příloha A.....	56
8.2.	Příloha B.....	58

8.3.	Příloha C .....	59
8.4.	Příloha D .....	60
8.5.	Příloha E .....	61
8.6.	Příloha F .....	62
8.7.	Příloha G .....	64
8.8.	Příloha H .....	66
8.9.	Příloha Ch .....	67
8.10.	Příloha I .....	72

# 1. Úvod

Boj člověka s patogeny je každodenní problém celosvětové populace. Moderní věda a technika, v porovnání s dávnou minulostí, poskytuje člověku obrovské možnosti, které dříve nebyly ani představitelné – ať už se jedná o moderní léčiva na bázi proteinů a genetických materiálů nebo antibiotik. V mnoha případech není výzkum zaměřen jen na samotná léčiva, ale i na efektivní přenos do cílových buněk. Bohužel, tyto nové léčivé přípravky jsou většinou velmi drahé a pro většinu populace stále nedostupné. Dalším globálním problémem je zrychlující se nárůst antibiotické rezistence, proti které lze nejlépe bojovat včasnou prevencí.

Nové pomyslné dveře pro účinnější léčbu či prevenci se otvírají s nástupem nanotechnologií. Speciálně upravené povrchy pomocí nanočástic (tzv. tenké vrstvy) se ve zdravotnictví často využívají pro svoje specifické vlastnosti, jako je snadná údržba, a hlavně schopnost účinně potlačovat šíření infekce. Často se kombinují se speciálními nátěry, které navíc mohou čistit vzduch a likvidovat i nepatrné množství patogenů.

Jednou z perspektivních oblastí této technologie je vývoj biologicky aktivních vrstev. Ty se od klasických tenkých vrstev odlišují deponovanou vrstvou obsahující imobilizované biologicky aktivní látky (např. antibiotika), které se mohou za určitých podmínek řízeně uvolňovat do okolního prostředí. Využití takto upravených povrchů nabízí přínos při chirurgických zákrocích, kde by mohly tvořit součást implantátů či různých tkáňových náhrad. Postupné uvolňování biologicky aktivní látky by mohlo zabraňovat či snižovat riziko vzniku infekce, a dokonce přispívat k samotnému procesu hojení.

Pro úspěšné použití biologicky aktivní vrstvy je však nezbytné zvládnout reprodukovatelný proces přípravy této vrstvy, jehož součástí je i charakterizace množství uvolněného antibiotika v závislosti na čase. Vzhledem k extrémně nízkým koncentracím a omezenému množství vzorku je nezbytné použít citlivou metodu, schopnou spolehlivé identifikace a kvantifikace. Těmto požadavkům vyhovuje nejlépe technika kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, která v provedení v systému s obrácenými fázemi a v systému hydrofilní interakční chromatografie umožňuje stanovení velice široké oblasti sloučenin. Cílem této bakalářské práce je vývoj analytické metody využívající výše uvedenou techniku pro stanovení obsahu antibiotika karbencilin ve vodě, která bude použitelná pro hodnocení vhodnosti různých postupů příprav biologicky aktivních tenkých vrstev uvolňujících toto antibiotikum do vody.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Antibiotika

Antibiotika lze zcela jistě zařadit mezi největší objevy minulého století. Lidé je však nevědomě začali využívat již dlouhá staletí před jejich oficiálním vznikem. Jako příklad si lze uvést vaření piva, kde půdní mikroorganismy produkovaly tetracyklin nebo při potírání ran bylinkami s hlínou, za účelem snížení infekce a podpoření tak léčby i dalšími biologicky aktivními látkami. Tyto zkušenosti a poznatky byly využívány bez hlubšího vědění skutečné podstaty jejich fungování, byly předávány z generace na generaci až do dnešních let, kdy věda již jejich skutečnou podstatu řádně vysvětlila [1,2].

V průběhu 17. a 18. století nastala zásadní změna v porozumění mikroorganismům, a to díky objevu mikroskopu. Přestože bylo určité povědomí o mikroorganismech, stále nebyl znám princip přenosu nemocí a účinných způsobů, jak se jim bránit. Až během 19. a 20. století byly objeveny způsoby přenosu nákaz a efektivní léčby [2].

První antibiotikum, které spatřilo světlo světa jako výsledek výzkumné práce, objevil prakticky náhodou doktor Alexandr Fleming na konci 20. let minulého století. Na základě výsledků své studie prokázal, že plíseň *Penicillium notatum* produkuje látku s baktericidním účinkem, kterou pojmenoval penicilin [3].

Nicméně, k dosažení čisté a účinné formy této látky pro použití v léčbě různých onemocnění vyžadovalo více než dalších deset let výzkumu. Po úvodní fázi nastalo v oblasti antibiotik období rychlého rozvoje, tzv. antibiotický boom, kdy byly na trh uváděny nové formy těchto látek. Věřilo se, že antibiotika přinesou revoluční pokrok v léčbě mnoha smrtelných chorob. Toto očekávání však bohužel vedlo k nadměrnému a téměř neomezenému užívání antibiotik [3].

Krátce po zavedení antibiotických léčiv ve 40. letech se však začaly vyskytovat první případy antibiotické rezistence. Na počátku byly tyto případy izolované, částečně díky rychlému uvedení nových antibiotických léčiv v 50. a 60. letech, které kompenzovaly vzniklou rezistenci [4].

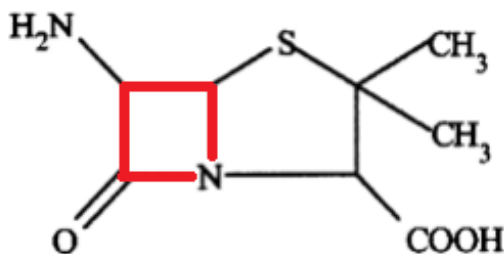
V dnešní době je antibiotická rezistence jednou z největších globálních hrozeb pro zdraví lidstva, potravinovou bezpečnost a celkový rozvoj, protože v budoucnu mohou chybět účinné látky pro boj s patogenními mikroorganismy. Hlavní příčinou tohoto procesu je selekční tlak antibiotik a jejich nevhodné užívání nebo nadužívání, jak u lidí, tak u zvířat. A tento problém se neustále zrychluje. Jelikož celý svět stojí na prahu postantibiotické éry, prioritou by mělo být vyřešit tento problém, aby drobná poranění a běžné infekce opět



nezpůsobovaly smrtelné následky. K tomuto cíli lze přispět prevencí, jako je mytí rukou nebo očkování, vývojem nových antibakteriálních látek a správným užíváním antibiotik [5].

## 2.2. Beta-laktamová antibiotika

Beta-laktamová antibiotika jsou nejčastěji používanou skupinou antibiotik, zahrnující peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy. Zvláštní skupinu tvoří inhibitory beta-laktamáz [6]. Tato antibiotika mají společný znak v podobě tzv. beta-laktamového kruhu, který je vyznačen červeně na Obr. 1 u kyseliny 6-aminopenicilanové. Tento kruh je základem pro tvorbu mnoha druhů penicilinů s různými vlastnostmi. Neporušenost kruhu a schopnost průniku buněčnou stěnou jsou základními podmínkami účinnosti každého beta-laktamového antibiotika. Beta-laktamový kruh se váže do aktivního místa cílových enzymů, jako jsou transpeptidázy a karboxylázy, které se účastní výstavby buněčné stěny bakterií a zajišťují její tvrdost. Vazbou se naruší syntéza peptidoglykanu a buňka ztrácí svou tvarovou i osmotickou stabilitu. Současně se spustí autolytické enzymy rozvolňující již vytvořenou buněčnou stěnu, což vede k lyzi bakteriální buňky a jejímu zániku. Beta-laktamy tedy působí na buňky baktericidně [7].



**Obr. 1:** Beta-laktamový kruh (vyznačeno červeně) v molekule kyseliny 6-aminopenicilanové [7].

Mnoho bakterií je již odolných vůči této třídě antibiotik. Klinicky nejvýznamnějším mechanismem pro vznik rezistence je tvorba enzymů známých jako beta-laktamázy, které hydrolyticky štěpí beta-laktamovou vazbu a tím inaktivují antibiotikum. Tyto enzymy jsou rozděleny na penicilinázy a cefalosporinázy podle svého specifického účinku. Existují také širokospektré enzymy, které účinkují na oba typy antibiotik. V omezené míře může být rezistence způsobena snížením permeability buněčné stěny pro antibiotika.

Třetím mechanismem může být změna citlivosti cílových enzymů na účinky beta-laktamových antibiotik [7].

Inhibitory beta-laktamázy představují nestandardní skupinu, do které patří kyselina klavulanová, sulbaktam a tazobaktam. Tyto látky vykazují velmi nízkou až žádnou antibiotickou aktivitu, avšak jejich účinek spočívá v cílení na enzymy beta-laktamázy a jejich ireverzibilním navázání, čímž dané enzymy deaktivují. Inhibitory beta-laktamázy se používají pouze v kombinaci s beta-laktamovými antibiotiky, která nejsou odolná vůči beta-laktamázám. Tímto se rozšiřuje spektrum účinku antibiotik a zvyšuje se i jejich účinnost [7].

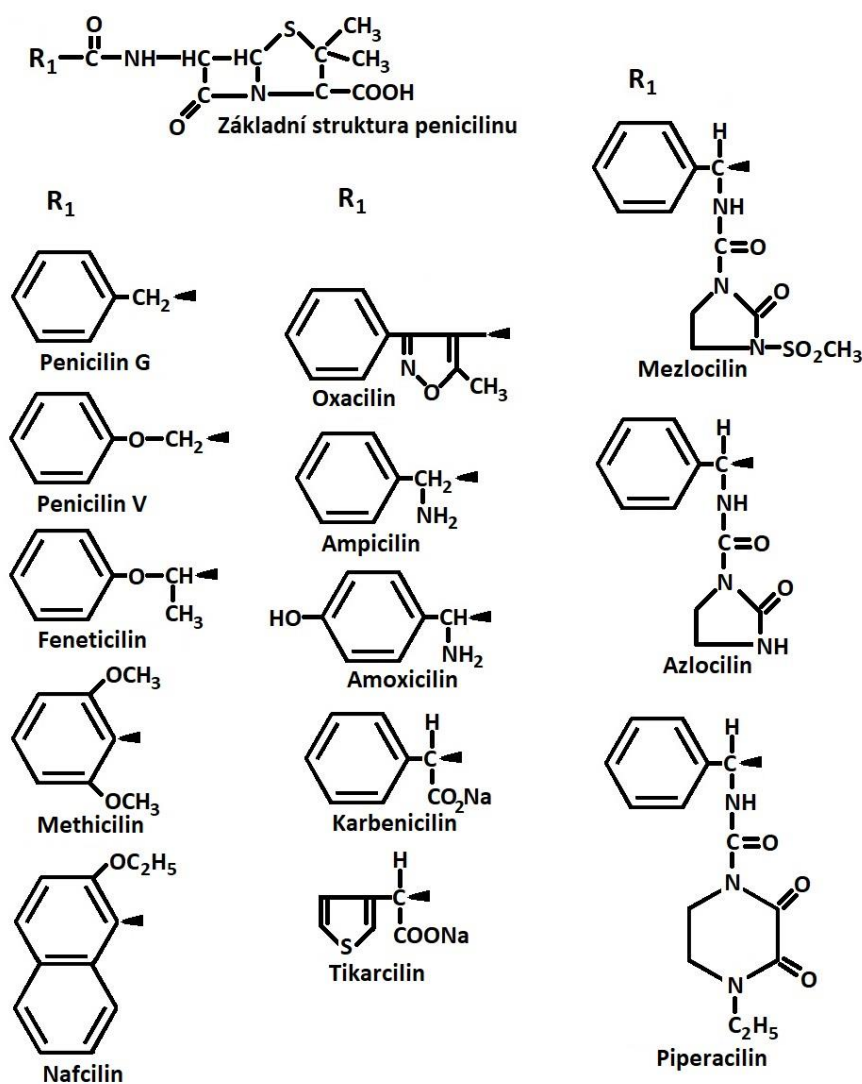
Mezi největší výhody těchto antibiotik se řadí rychlý nástup účinku a nízká toxicita, což umožňuje jejich použití u pacientů všech věkových skupin, včetně novorozenců, těhotných žen a seniorů. Další výhodou je jejich relativně levná syntéza. Jsou nejvhodnější pro léčbu akutních a závažných infekcí v krvi nebo v dobře prokrvených tkáních. Používají se k léčbě infekce dýchacích cest, infekce močových cest, infekce měkkých tkání a neuroinfekce. Nicméně, vedlejší účinky jsou poměrně běžné, především se jedná o alergické reakce, které postihují přibližně každého desátého pacienta. Alergické reakce se mohou projevit jako vyrážky a v extrémních případech mohou vyvolat anafylaktický šok (u 1 z 10 000 pacientů). Často se vyskytují i gastrointestinální obtíže [8].

### **2.2.1. Peniciliny**

V předešlých kapitolách bylo zmíněno, že peniciliny jsou první skupinou objevených a používaných antibiotik. Tyto látky jsou účinné proti rychle se dělícím buňkám, ale na buňky v klidovém stavu příliš nepůsobí. Základní struktura penicilinů obsahuje kyselinu 6-aminopenicilanovou (viz Obr. 1), ke které je navázán thiazolidinový kruh na beta-laktamovém jádře. Z Obr. 2 je patrné, že jednotlivé druhy penicilinů se od sebe odlišují složením bočního řetězce [4,7].

Obecně peniciliny vykazují větší účinnost proti grampozitivním bakteriím než proti gramnegativním. Toto je dáno skutečností, že u gramnegativních bakterií je buněčná stěna obklopena fosfolipidovou dvojvrstvou membránou, což brání průchodu penicilinového antibiotika. Úpravou postranního řetězce je možné modifikovat vlastnosti antibiotika, zahrnující rozšíření jeho antibakteriálního spektra na gramnegativní bakterie, snížení rezistence vůči beta-laktamázám nebo zlepšení farmakokinetických vlastností [7,9].

Přírodní peniciliny, které lze klasifikovat jako 1. generaci, jsou přírodním produktem plísně *Penicillium chrysogenum* a byly základem pro vývoj nových léků. Do této skupiny se řadí penicilin G, penicilin V a benzathin-benzylpenicilin. Tyto peniciliny mají několik výhod, jako je nízká výrobní cena, snadné podávání, vynikající distribuce do tkání a příznivý terapeutický index. Na druhé straně jsou citlivé na žaludeční kyseliny a mohou být snadno degradovány bakteriálními beta-laktamázy. Těž u 10 % pacientů vyvolávají alergické reakce [9,10].



**Obr. 2:** Základní struktury penicilinů [9].

Penicilináze rezistentní peniciliny, označované také jako 2. generace, jsou polosyntetické modifikace přírodních penicilinů. Tyto peniciliny jsou odolné vůči bakteriálnímu enzymu beta-laktamáze a disponují rozšířeným spektrem účinnosti, ačkoliv jsou méně účinné než přírodní peniciliny. Mezi zástupce této skupiny patří

dicloxacilin, nafcilin, oxacilin, cloxacilin, flucloxacilin a methicilin. Některé z těchto látek, jako jsou methicilin, cloxacilin a flukloxacilin, se vyznačují vysokou frekvencí nežádoucích účinků, včetně hepatotoxicity [9,10].

Aminopeniciliny, řazené do 3. generace, jsou rovněž vytvořeny modifikacemi přírodních penicilinů. Tato skupina byla první, u které se prokázala účinnost vůči gramnegativním bakteriím a sloužila jako prototyp pro vývoj dalších penicilinů, například karboxypenicilinů. Mezi zástupce této skupiny patří amoxicilin a ampicilin, bacampicilin a pivampicilin. Aminopeniciliny jsou však nestabilní vůči beta-laktamázám. Často se kombinují s inhibitory, jako je sulbaktam nebo kyselina klavulanová. Stejně jako předchozí generace, mohou aminopeniciliny způsobovat poškození jater [9,10].

Peniciliny s rozšířeným spektrem účinku (4. generace) jsou připraveny substitucí aminoskupiny na molekule ampicilinu. Jejich hlavní výhodou je vysoká účinnost proti gramnegativním bakteriím. Avšak i přes tuto vlastnost jsou stále citlivé na enzym beta-laktamázu. Zástupci této skupiny zahrnují piperacilin a tikarcilin, které jsou často kombinovány s inhibitory beta-laktamázy, stejně jako karbenicilin, mezlocilin a azlocilin. U karbenicilinu a tikarcilinu byla pozorována unikátní toxicita, která se projevuje dysfunkcí krevních destiček, hypokalémií a nebezpečně zvýšenou koncentrací sodíku v krvi (hlavně kvůli potřebě vyšších dávek k léčbě infekce) [9,10].

V průběhu stále probíhajícího výzkumu je snaha vytvořit ideální penicilin, který bude odolný vůči enzymům beta-laktamázy, bude netoxický, snadno dostupný a bude mít vynikající schopnost pronikat bakteriální stěnou a silnou afinitu k proteinům ho vázajícím. Mezi tyto výzkumné léky se zařazuje temocilin, apacilin a foramdinocilin [9].

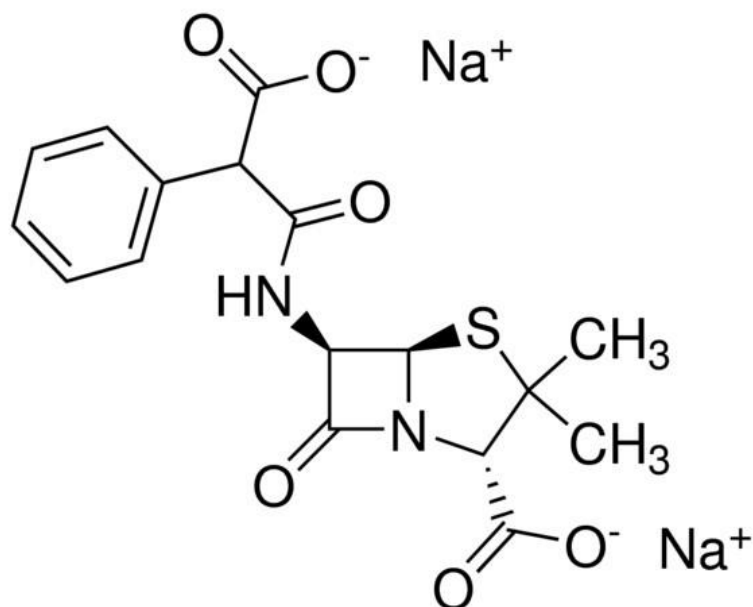
### **2.2.2. Karbenicilin disodná sůl**

V předchozí kapitole bylo zmíněno, že se jedná o semisyntetický karboxypenicilin s chemickým vzorcem uvedeným na Obr. 3, sumárním vzorcem  $C_{17}H_{16}N_2Na_2O_6S$  a systematickým názvem dinatrium-(2S, 5R, 6R)-6-[2-fenylacetamido-2-karboxylato]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3,2,0] heptan-2-karboxylát. Má molekulovou hmotnost 422,36 g/mol a je dostupný jako bílý nebo slabě nažloutlý hygroskopický prášek, který se snadno rozpouští ve vodě, 96% lihu nebo methanolu. Jeho registrační číslo CAS je 4800-94-6 [11,12].

Karbenicilin byl poprvé připraven z ampicilinu, oproti němu má širší spektrum účinku (s výjimkou *Enterococci*), především proti gramnegativním bakteriím. Stejně jako ampicilin

je účinný proti bakteriím jako jsou *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* a beta-laktamáze negativní *H. influenzae*. Karbenicilin navíc vykazuje aktivitu i proti *Pseudomonas aeruginosa* a indol-pozitivním proteům (*Enterobacter*, *Providencia*, *Morganella*) [9]. Často je preferován před ampicilinem v selekčních protokolech, protože vykazuje zvýšenou stabilitu. Karbenicilin se také používá k regulaci bakteriálního růstu v rostlinách a v aplikacích genetické transformace k selekci buněk transformovaných AmpR [13]. Hlavním regulačním genem AmpR se zapíná a vypíná exprese stovky genů, včetně těch, které jsou zapojeny do antibiotické rezistence, a umožňuje náhodným mutacím snadněji zvyšovat expresi genů zodpovědných za antibiotickou rezistenci. Tento gen tedy funguje jako evoluční katalyzátor pro vývoj rezistence vůči antibiotikům. Lze říci, že u mikroorganismů nesoucí AmpR se rezistence vyvíjí rychleji než u těch, které tento gen nemají [14].

Avšak je prokázáno, že některé gramnegativní bakterie si již vypěstovaly rezistenci vůči karbenicilinu, jako je například *Escherichia coli* se 100% rezistencí nebo *Pseudomonas aeruginosa*, u které se vyvinula rezistence na úrovni 13,6 %. I toto je jedním z důvodů, proč se karbenicilin dnes již k léčbě většinou nevyužívá [15].



**Obr. 3:** Strukturální vzorec disodné soli karbenicilinu [16].

Při klasické syntéze karbenicilinu dochází ke vzniku diastereomerů, což komplikuje kvantitativní analýzu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Často se vyskytuje eluce dvou píků, zejména při použití metanolových mobilních fází a vysoce účinných chromatografických kolon [17].

Přestože karbenicilin je penicilinem s rozšířeným spektrem účinku, který je stabilní v přítomnosti žaludečních kyselin, v dnešní době se již v léčivých přípravcích běžně nevyskytuje. Výjimkou je Geocilin (znám i pod názvem Geopen), který obsahuje aktivní látku karbenicilin indanyl sodný [18]. Tento krok zdůvodňují nevýhody karbenicilinu zmíněné v kapitole 2.2.1. Navíc je při použití karbenicilinu nutné podávat vyšší dávky z důvodu jeho nižší aktivity, což může vést k nadměrnému zatížení těla sodíkem [9]. Tomu lze předejít např. lokální aplikací antibiotika. Tím je docíleno rovnoměrné distribuce antibiotika přímo na místě infekce, přičemž lokální koncentrace převyšuje koncentraci při systémové aplikaci. Výhodou je malé vstřebávání, a tudíž i menší celková toxicita. Lze se tak vyhnout rizikům a nevýhodám intravenózní aplikace [19].

### **2.3. Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí patří mezi nejvýznamnější analytické metody, které se používají pro kvalitativní i kvantitativní analýzu organických sloučenin v nejrůznějších matricích. Kapalinový chromatograf slouží k rozdělení složek (sloučenin) vzorku do jednotlivých úzkých a symetrických zón ve tvaru píku. Hmotnostní detektor pak funguje jako identifikátor sloučenin na základě jejich retenčního času,  $m/z$  prekurzorových či produktových iontů a slouží i ke kvantifikaci jejich obsahu ve vzorku na základě intenzity odezev těchto iontů [20].

Kapalinová chromatografie je nejčastěji (80–90 % všech aplikací) realizována v systému s obrácenými fázemi (RP), a tak je většinou první volbou při vývoji nových HPLC metod [20]. Charakteristické uspořádání tohoto systému je tvořeno polárnější MF (vodná a případně i organická složka, s vyšším procentuálním zastoupením vody), zatímco SF je méně polární, typicky tvořena silikagelem modifikovaným různými funkčními skupinami – obvykle se jedná o řetězce oktadecylové (C18). Alternativně lze navázat i jiné nepolární zbytky, jako je řetězec oktylový (C8), alkylový nebo aromatický (cyklohexylové a fenylové skupiny) [21]. Hlavním separačním mechanismem v RP jsou hydrofobní (solvofobní) interakce a obecně zde platí, že čím nižší polaritu analyt má, tím silněji interaguje se stacionární fází a tím vyšší má retenční čas. Tento typ stacionární fáze je v praxi široce rozšířen, neboť dokáže oddělit složky i na základě nepatrných strukturních rozdílů v nepolární části molekul a využívá se tedy hlavně u látek nepolárních či slabě polárních [22].

Další důležitou oblastí chromatografických systémů je hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), což je typ chromatografie, která naopak využívá hydrofobnější MF s vysokým obsahem organické složky (> 80 %), obvykle acetonitrilu s malým množstvím vody nebo pufru. Stacionární fáze má hydrofilnější charakter a je tvořena polárními látkami, jako je silikagel, buď samostatný nebo modifikovaný navázáním polárních ligandů (např. amino, kyano, diol) či polárních organických polymerů. Na povrchu polární SF se po kondicionaci MF vytvoří silně hydrofilní vrstva vody, kde probíhá vlastní separace. Mechanismus dosud není plně objasněn, ale pravděpodobně se jedná o komplexní proces, ve kterém se různou měrou uplatňují elektrostatické interakce, vodíkové vazby a rozdělovací mechanismus. Kombinace těchto mechanismů tak vede k jedinečné selektivitě HILIC systémů. Eluční pořadí v HILIC je opačné než v RP, takže látky, které jsou v RP eluovány v nízkých retenčních časech, mají v HILIC vysokou retenci a naopak. V posledních letech HILIC stoupá na oblíbenosti díky schopnosti efektivně separovat látky polární, hydrofilní a iontové (např. léčiva a jejich metabolity), které se v RP neseparují. Dříve byla HILIC řazena k NP, mechanismem separace se však od tohoto typu značně odlišuje, protože separační mechanismus je u HILIC komplexnější [22,23]. Výhodou oproti NP i RP je možnost analyzovat polární látky ve složitých maticích. Navíc použitím vysokého podílu organické složky v MF se zvyšuje kompatibilita s MS (zvláště ESI), neboť dochází k rychlému vypaření rozpouštědla a tím se zvyšuje celková citlivost oproti RPLC-ESI-MS (až desetinásobně). Co se týče selektivity se HILIC s RP vzájemně dobře doplňují. Na druhé straně je u HILIC často zapotřebí kontrolovat pH a iontovou sílu v použitých MF (např. pro zaručení jedné iontové formy analytu) přidavkem vhodného pufru, což způsobuje nejen zhoršení MS detekce, ale může docházet i k nesymetrickému tvaru a chvostování píků. Soli v pufrech mohou rovněž přispívat k polaritě analytu, a to vede k rozdílným změnám retence [23].

Pro spojení LC-MS se nejčastěji využívají měkké techniky ionizace za atmosférického tlaku (API). Nejuniverzálnější a nejvíce užívanou technikou v této oblasti je ionizace elektrosprejem (ESI), příp. vyhřívaným elektrosprejem (HESI). Při této metodě se vzorek analytu, který vychází z chromatografické kolony nebo skleněné stříkačky, přivádí na kovovou kapiláru s vysokým napětím (3–5 kV). Na konci kapiláry dochází k přenosu náboje, čímž se povrch stává nestabilním a deformuje se, vzniká tzv. Taylorův kužel. Zmlžovací plyn pak rozprašuje přiváděný eluát za vzniku stabilního, jemného spreje, tvořeného drobnými, nabitými kapičkami. Postupným odpařováním rozpouštědla se zvyšuje hustota povrchového náboje na kapičkách. Při překročení kritické hodnoty dojde

ke Coulombické explozi, což je rozpad kapiček na menší kapičky a k rozdělení původních nábojů. Tento proces se opakuje několikrát, až do vzniku iontu analytu [24,25].

Důležitou roli zaujímá i vzájemné postavení kapiláry a transferové trubice, která odvádí vzniklé ionty o správné polaritě dále do analyzátoru. Tato geometrie systému může podstatně ovlivnit celkovou citlivost a robustnost metody. Těchto řešení je vícero – vzájemné postavení může být horizontální, vertikální, pod úhlem 45°, horizontální mimo transferovou trubici či tzv. z-sprej [26].

Zásadní vliv na odezvu detektoru na analyt má polarita ionizace, jejíž volba souvisí se strukturou analytu a jeho ochoty k (de)protonaci. Správný výběr polaritě může signál zesílit až o šest řádů. Je volen vždy takový mód, který poskytuje nejvyšší poměr signálu analytu ku šumu detektoru (S/N). Pro spojení LC-MS se většinou volí pozitivní ionizace, ale pokud je S/N srovnatelný pro oba módy, tak se raději volí ionizace negativní, jelikož snižuje riziko potenciálních nežádoucích interferencí [27].

Celkový počet iontů vstupující do transferové trubice je limitován elektrickým proudem (max. 1  $\mu\text{A}$ ), který vzniká v důsledku potenciálu umístěného na hrotu kapiláry (oxidační nebo redukční proces, v závislosti na volbě módu). Při použití vyšších koncentrací solí bude iontový proud převážně tvořen složkami iontů soli, a ionty vzorku budou hůře detekovatelné – dochází k tzv. iontové supresi. Při nízké koncentraci analytu nebo nízkém průtoku ( $<1 \mu\text{l}$ ) může být iontový proud tvořený z iontů analytu nedostačující, což vede k jejich nahrazením iontů z rozpouštědla nebo k tvorbě radikálů [24].

Při samotném transportu iontů dochází k prudkému ochlazení vlivem změny tlaku, což může vést ke vzniku klastrů. K vyvarování tohoto problému je potřeba transferovou trubicí a iontový zdroj vyhřívat min. na 250 °C a také použít protiproud pomocného zmlžujícího plynu (většinou dusíku), který fokusuje kužel spreje a eliminuje vodní páry a jiné neutrální molekuly [26].

Iontová optika je umístěna ve vakuové části hmotnostního spektrometru a podílí se na účinném přenosu iontů z iontového zdroje do hmotnostního analyzátoru. Úpravou napětí na těchto plochých prstencových elektrodách lze snížit detekční limit přístroje. Bezprostředně za transferovou trubicí jsou umístěny vstupní čočky, které zaostřují přiváděný tok iontů. Ten dále prochází soustavou dalších elektrod a multipólů zakončených koncovými čočkami, které regulují (snižují) rychlost iontů vstupující do analyzátoru [24].

Hmotnostní analyzátor separuje ionty v plynné fázi za vysokého vakua podle jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). K tomu dochází vlivem interakcí iontů s magnetickým nebo elektrickým polem, nebo pomocí různých rychlostí iontů o odlišných  $m/z$  [20].



Z nízkorozlišovacích analyzátorů se nejčastěji používá kvadrupólový analyzátor (Q) nebo sférická iontová past (IT). Nepříliš rozšířená je lineární iontová past (LIT), která je složena ze čtyř hyperbolických elektrod zakončených čočkami. Záchyt iontů je uskutečněn pomocí vložení stejnosměrného (na elektrodách) a vysokofrekvenčního střídavého napětí (na čočkách). Toto uspořádání poskytuje vysokou kapacitu a účinnější záchyt iontů, což vede k vyšší citlivosti a rozsahu přístroje, než lze dosáhnout v klasickém provedení IT [24,28]. Oproti níže uvedeným analyzátorům mají výše uvedené analyzátory bohužel nízké hmotnostní rozlišení i nízkou správnost určení hmoty [29]. Pokročilejšími jsou tzv. vysokorozlišovací analyzátory, mezi které se řadí analyzátor doby letu (TOF), orbitální iontová past (Orbitrap) nebo tzv. iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (ICR) [24]. Stále větší oblíbenosti se však těší tandemové uspořádání, tj. kombinace hmotnostních analyzátorů. Těchto uspořádání je na trhu velké množství, ale pro LC-MS je nejtypičtější trojitý kvadrupól (QQQ), kvadrupól s průletovým analyzátozem (Q-TOF), nebo v poslední době orbitální past s kvadrupólem a/nebo lineární iontovou pastí (hybridní Orbitrapy) [28].

Tandemové hmotnostní spektrometry jsou vybaveny tzv. kolizní celou, v níž jsou ionty izolovány a případně srážkami fragmentovány na požadované produktové ionty pomocí kolizního plynu (o relativně vysokém tlaku) a urychlováním iontů elektrickým polem (kolizní energie). Dochází ke srážkám iontů analytů, tzv. prekurzorových iontů s kolizním plynem, což vede ke zvýšení vnitřní energie iontů, a tím ke vzniku specifických fragmentů, tzv. produktových iontů. Tento jev se nazývá kolizně indukovaná disociace (CID) [25].

Kompletní informaci o fragmentaci vybraného iontu lze získat skenem produktových iontů za vzniku MS/MS spektra, které slouží k identifikaci látek. Ke kvantifikaci se využívá režimu monitorování vybraných reakcí (SRM) nebo monitorování více reakcí (MRM). Pro tyto účely se volí takový produktový ion, který po optimalizaci kolizní energie poskytuje nejintenzivnější ion v MS/MS spektru, nebo v případě interferencí zcela specifický ion, byť může být méně intenzivní. Tímto módem, který je velmi citlivý a selektivní, lze kvantifikovat až stovky analytů v průběhu jedné analýzy [24,25]. Důležitým parametrem v kvantitativní LC-MS analýze je rychlost skenování, která musí být vhodně zvolena s ohledem na šířku chromatografického píku. Pro získání reprodukovatelných výsledků je nezbytné, aby byl chromatografický pík vytvořen z min. 10 bodů, tzn., že musí být v daném časovém okně provedeno min. 10 skenů. Ovšem vyšší rychlost skenování obecně snižuje citlivost přístroje, zejména v případě LIT, proto je nutné často hledat určitý kompromis jak v počtu SRM či MRM přechodů, tak v rychlosti skenování [28].

Při spojení kapalinového chromatografu s hmotnostním detektorem je pro získání intenzivního a stabilního signálu nutné dbát na řadu faktorů. Ačkoliv zdroj ESI poskytuje dobré výsledky pro průtoky MF do 1ml/min, nižší průtoky (0,05–0,2 ml/min) vedou ke zvýšení citlivosti. To však vyžaduje použití kolon s nižším průměrem (1,0–2,1 mm) a menší velikostí částic (<3 μm), přičemž nejlepšího rozlišení se dosahuje s kapilárními kolonami. Je také vhodné používat předkolony, aby bylo sníženo riziko ucpání kolony a k minimalizování vlivu interferujících látek [28].

Též většina typických MF (např. voda, acetonitril, metanol) je kompatibilní s ESI, přičemž při vyšším podílu organické složky v MF dochází ke zlepšení účinnosti ionizace. Při použití pufovaných MF se musí vzít v úvahu i vlastnosti vznikajících aduktů, protože netěkavé adukty mohou způsobovat znečištění iontového zdroje. Z tohoto důvodu se fosfátové pufrů či octan/mravenčan sodný musí zaměnit za octan/mravenčan amonný, které netěkavé adukty nevytváří. Nicméně, i tyto pufrů mohou způsobovat iontovou supresi (ačkoliv v menší míře), proto by jejich koncentrace měla být minimální (zpravidla max. jednotky mmol) [28].

## **2.4. Možnosti stanovení karbenicilinu**

Starší studie (publikovány koncem minulého století) byly většinou zaměřeny na stanovení karbenicilinu v plazmě a moči [30,31], nebo se zabývaly sledováním karbenicilinu a jeho degradačních produktů [17]. Pro separaci a stanovení karbenicilinu byla využívána metoda HPLC s UV detekcí při 208 nm [31] a 254 nm [17, 30]. Nejnovější studie, využívající HPLC-MS/MS metodu, se zaměřují na stanovení karbenicilinu ve složitých matricích spolu s dalšími antibiotiky (především beta-laktamy) [32,33]. Mezi poslední a vysoce účinné metody patří spektrální SERS metoda, v které se dosáhlo podobně nízkých detekčních limitů, jako při použití MS detekce [34]. V Tab. 1 byly shrnuty vybrané parametry analytických metod, s důrazem na spodní meze detekce/kvantifikace, jelikož v této práci je snaha dosáhnout co nejnižších kvantifikačních limitů.

**Tab. 1:** Přehled analytických technik a jejich vybraných parametrů.

Analytická technika	Doba analýzy [min]	Koncentrační rozsah	Mez detekce metody	Koeficient determinace [1]
HPLC-UV [17]	30	0,25–4,05 g/l	neuvedeno	0,998
HPLC-UV [30]	30	10–250 mg/l	neuvedeno	> 0,999
HPLC-UV [31]	8	0,25–20 mg/l	neuvedeno	> 0,99
HPLC-MS/MS [32]	60	1–500 µg/l	0,5–3 µg/kg	neuvedeno
UPLC-MS/MS [33]	23	1–200 µg/l	0,32 µg/kg	0,997
SERS [34]	6	4,22 µg/l–0,42 g/l	2,66 µg/l	0,9908

Ve studii [17] (rok 1980) bylo cílem stanovení monohydrátu karbenicilinu sodného spolu s jeho degradačními produkty a určit nejpravděpodobnější cestu jeho rozpadu. Též byl vyzkoumán vliv pH a složení MF na separaci jeho diastereomerů. K tomu byla použita metoda HPLC s UV detekcí (220 nebo 254 nm) a průtokem 1–1,5 ml/min. Jako MF byla použita směs 35 nebo 37% metanolu s 50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (v/v), jako SF byla použita kolona Spherisorb ODS 5 µm (C18). Úprava pH byla prováděna přidáním 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, jako iontově párové činidlo byl použit tetra-n-butylamoniumbromid. Bylo dokázáno, že velmi přísnou kontrolou pH lze dosáhnout eluci karbenicilinu jen v jednom píku (pH 3,35), rozklad probíhal hydrolytickou nebo dekarboxylační cestou (při pH 7). Mez kvantifikace byla určena jako spodní mez kalibrace, tj. 0,25 g/l [17].

V práci [30] (rok 1993) byla vyvinuta HPLC metoda ke stanovení obou diastereomerů karbenicilinu disodného v plazmě a moči (lidské, králičí a potkaní). K detekci byl použit UV detektor (254 nm). Tato metoda byla také využita ke stanovení vazby diastereomerů karbenicilinu na bílkoviny *in vitro* v lidské a králičí plazmě. Absolutní konfigurace diastereomerů byla určena pomocí <sup>1</sup>H-NMR. Použitá MF byla složena z 50mM octanu amonného a metanolu v různých poměrech – pro lidské vzorky 9:1 (v/v). Průtok MF byl nastaven na 1,2 ml/min. Jako SF byla použita kolona Cosmosil 5 µm (5C18-AR). Vzorky byly připraveny pro analýzu s využitím extrakce analytu na tuhou fázi (SPE). Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu od 10–250 mg/l pro plazmu a 25–500 mg/l pro moč (pro S- i R- karbenicilin). Mez kvantifikace byla určena jako spodní mez kalibrace, tj. 10 mg/l. Vazba na bílkoviny byla měřena ultrafiltrací – bylo zjištěno, že v lidské plazmě je

upřednostňována vazba S-epimeru, zatímco v králičí plazmě je stereoselektivita vazby opačná [30].

V další studii [31] (rok 1994) bylo cílem vyvinout spolehlivou HPLC metodu s UV detekcí při 208 nm pro stanovení monohydrát karbenicilinu sodného v lidském séru za použití vnitřního standardu (IS) piperacilinu. Vývoj zahrnoval i metodu extrakce karbenicilinu do kapaliny, což bylo provedeno kombinací srážení proteinů ACN, zachycení zbytků kyselinou citronovou (pH 1,9) a extrakcí ethylacetátem. Použitá MF obsahovala ACN, 20mM tetrabutylamonium fosfát 40mM fosforečnan sodný monobazický (520:740:740, v/v/v). Úprava pH na 6,6 byla prováděna pomocí roztoku hydroxidu sodného. Průtok byl nastaven na 1 ml/min. Jako SF byla použita kolona Microsorb 3  $\mu\text{m}$  (C18). Metoda byla úspěšně validována v koncentračním rozmezí 0,25–20 mg/l (mez kvantifikace určena jako spodní mez kalibrace). V této studii se nepodařilo spojit diastereomery do jednoho píku i přes vyzkoušení různých kombinací MF a SF. Ke kvantifikaci tak byla použita suma výšek obou píků [31].

V práci [32] (rok 2016) byla vyvinuta a validována HPLC-MS/MS metoda k souběžné analýze 120 léčiv patřící do 12 skupin veterinárních antimikrobiálních látek v potravinách živočišného původu – v mléce, vejcích, svalovině a játrech (hovězí, ovčí, kuřecí, slepičí). Použitá MF obsahovala 0,1% kyselinu mravenčí (MF-A) a ACN (MF-B). Chromatografická separace probíhala v gradientovém režimu (procentuální změna MF-B od 5 % do 80 %) při průtoku 0,1 ml/min (1–5 min) a 0,2 ml/min. (5–60 min). Jako SF byla použita kolona Hypersil Gold 5  $\mu\text{m}$  (C18). K detekci byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem. Karbenicilin s retenčním časem 17,86 min byl kvantifikován v pozitivním módu ionizace pomocí prekurzorového iontu 378,8 m/z a produktových iontů 237,7/300,9 m/z (kolizní energie 17/16 eV). Příprava vzorků zahrnovala extrakci ultrazvukem (UAE) ACN-voda (90:10, v/v) a konečné čištění pomocí automatické SPE obsahující sorbent HLB. Koncentrační rozsah metody (pro všech 120 léčiv) byl 1–500  $\mu\text{g/l}$  s mezí detekce 0,5–3  $\mu\text{g/kg}$  (vztažené na matici) [32].

Pravděpodobně poslední prací [33] (rok 2023) na toto téma byla studie využívající UPLC-MS/MS metodu pro současné stanovení 52 beta-laktamových antibiotik ve vzorcích masa a drůbeže, vodních produktů, mléka a vajec za použití modifikované QuEChERS techniky pro přípravu vzorků. Použitá MF obsahovala 0,4% kyselinu mravenčí (MF-A) a ACN (MF-B). Chromatografická separace probíhala v gradientovém módu (procentuální změna MF-B od 4 % do 80 %) při konstantním průtoku 0,5 ml/min. Jako SF byla použita kolona Agilent ZORBAX SB-Aq 3,5  $\mu\text{m}$  (RP). Také byly vyzkoušeny další dvě kolony. Při použití kolony Waters ACQUITY UPLC-BEH 1,7  $\mu\text{m}$  (C18) nedocházelo k detekci

karbenicilinu a tikarcilinu, celková separace neposkytovala uspokojivé výsledky. Při použití kolony Kinetex F5 1,7  $\mu\text{m}$  již byla separace všech analytů úspěšná, ale píky u karbenicilinu, tikarcilinu a cefotiamu vykazovaly větší šířku. K detekci byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem v režimu MRM a pozitivní ESI. Retenční čas karbenicilinu byl 16,58 min a kvantifikace byla provedena pomocí prekurzorového iontu 379,3 m/z a produktových iontů 160,2/220,1 m/z, přičemž ion 160,2 m/z byl použit jako hlavní kvantifikační ion (kolizní energie 24/18,9 eV). Příprava vzorků byla provedena pomocí metody QuEChERS. Pro optimální extrakci bylo vybráno rozpouštědlo ACN-voda v poměru 75:25 (v/v). Koncentrační rozsah metody pro stanovení karbenicilinu byl 1–200  $\mu\text{g/l}$ , s mezí detekce 0,32  $\mu\text{g/kg}$  (vztaženo na matici) [33].

Poslední uvedená studie [34] využívá ke stanovení karbenicilinu disodného povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS – surface-enhanced Raman scattering). Tato spektrální metoda je založena na stříbrných nanočásticích jako substrátu, který s pomocí agregačního činidla ( $\text{MgSO}_4$ ) umožňuje vysoce citlivou detekci karbenicilinu. Mezi výhody SERS patří rychlý a levný průběh (v porovnání např. s HPLC), nedestruktivnost metody, stejně tak jako vysoká citlivost a efektivní identifikace vnitřních chemických otisků – v některých studiích byly pomocí SERS detekovány jednotlivé molekuly [34]. Princip metody je založen na zesílení Ramanova rozptylu – to je zajištěno nanočásticemi ze vzácného kovu (nejčastěji stříbro a zlato), které mají vhodnou plazmonovou rezonanční frekvenci (zesilují elektromagnetického pole) a tím dokáží zvýšit signál Ramanova rozptylu molekul absorbovaných na povrchu [34,35]. Při SERS analýze karbenicilinu bylo zapotřebí agregačního činidla síranu hořečnatého, bez kterého nebylo možné pozorovat žádný signál. Koncentrační rozsah metody pro stanovení karbenicilinu byl 4,22  $\mu\text{g/l}$ –0,42  $\text{g/l}$ , s mezí detekce 2,66  $\mu\text{g/l}$ . Tato metoda je navíc vhodná i pro sledování reakcí, jako je otevírání beta-laktamového kruhu nebo degradace karbenicilinu – lze aplikovat i na detekci penicilinu G [34].

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Použité chemikálie a činidla

- Standard: karbenicilin disodná sůl – čistota  $\geq 94$  % (PanReac AppliChem)
- Kyselina mravenčí – čistota pro LC-MS  $\geq 99$  % (Thermo Fisher Scientific)
- Kyselina octová – čistota pro LC-MS  $\geq 99,8$  % (Sigma-Aldrich)
- Octan amonný – čistota pro LC-MS  $\geq 99$  % (Sigma-Aldrich)
- Mravenčan amonný – čistota pro MS  $\geq 99$  % (Sigma-Aldrich)
- Metanol – čistota pro LC-MS  $\geq 99,95$  % (Biosolve)
- Acetonitril – čistota pro HPLC  $\geq 99,5$  % (Avantor)
- Deionizovaná voda generována přístrojem Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo)
- Dusík generovaný systémem Genius 1022 – čistota  $\geq 99,5$  % obj. (Peak Scientific)
- Helium – čistota 99,999 % obj. (Linde)

#### 3.2. Instrumentální vybavení a spotřební materiál

- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 (Thermo)
- Hmotnostní detektor Velos Pro s ionizací s vyhřívaným elektrosprejem (Thermo)
- Výrobník deionizované vody Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo)
- Generátor dusíku Genius 1022 (Peak Scientific)
- Analytické váhy MS105DU (Mettler Toledo)
- Automatické dávkovací pipety Transferpette S (Brand) o objemech 10–100  $\mu$ l, 100–1000  $\mu$ l a 1–10 ml
- Odměrné sklo, třída přesnosti A (Fisherbrand)
- Skleněná dávkovací stříkačka o objemu 10  $\mu$ l (Hamilton)
- Spotřební materiál: plastové špičky, krimpovací vialky z čirého skla s hliníkovým uzávěrem a PTFE septem.
- Ovládání systému LC-MS a vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno pomocí programů LTQ Tune plus, Xcalibur a DC MS Link. Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Office Excel.
- Chromatografické kolony uvedené v Tab. 2. Pro jednotlivé kolony (vyjma kolony LC-003) byly použity i příslušné předkolony se shodnou SF.

**Tab. 2:** Testované chromatografické kolony.

Výrobce	Chromatografická kolona	Interní značení
Thermo	Acclaim RSLC C18 (100 x 3,0 mm; 2,2 $\mu\text{m}$ )	LC-003
Phenomenex	Kinetex Biphenyl (150 x 3,0 mm; 2,6 $\mu\text{m}$ )	LC-011
	Synergi Polar RP C12 (250 x 3,0 mm; 4,0 $\mu\text{m}$ )	LC-015
	Kinetex HILIC (150 x 3,0 mm; 2,6 $\mu\text{m}$ )	LC-009

### 3.3. Příprava roztoků

#### 3.3.1. Příprava mobilních fází

Mobilní fáze neobsahující organické rozpouštědlo byly připravovány vždy čerstvé a nebyly uchovávány po dobu více než 2 dnů. Mobilní fáze obsahující organické rozpouštědlo byly uchovávány dle potřeby.

Při přípravě MF obsahující roztok octanu amonného či mravenčanu amonného bylo pro přípravu zásobních roztoků těchto solí vždy naváženo přesně takové množství soli nutné pro požadovaný objem a koncentraci. V průběhu optimalizace metody se vyžadovaný objem i koncentrace roztoků lišily, a tak byly navážky upravovány podle potřeby. Po navážení potřebného množství do kádinky byla navážka rozpuštěna v deionizované vodě a kvantitativně převedena do odměrné baňky, která byla doplněna deionizovanou vodou po rysku.

Pro separace v systému RP (pro kolony LC-003, LC-011 a LC-015) byly MF-A připravovány vždy do vody a MF-B do acetonitrilu nebo methanolu. Pro separace v systému HILIC (pro kolonu LC-009) byly připravovány MF-A vždy do acetonitrilu nebo methanolu a MF-B do vody. V některých případech byly MF dále okyseleny přidávkem kyseliny octové nebo kyseliny mravenčí, v množstvích odpovídajících požadovaným objemovým koncentracím. Konkrétní složení použitých MF je pro jejich poměrně velké množství i přehlednost uvedeno až v příslušných podkapitolách (viz kap. 4. Výsledky a diskuse).

#### 3.3.2. Příprava zásobního roztoku karbenicilinu

Zásobní roztok standardu o koncentraci 1 g/l (ST) byl připraven navážením přesně asi 10 mg karbenicilinu disodné soli do 10 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou

vodou po rysku. Byl připravován pro každé měření čerstvý a neuchovával se pro pozdější měření.

### **3.3.3. Příprava pracovního roztoku pro optimalizaci (RP)**

Pracovní roztoky standardu pro účely optimalizace o požadované koncentraci byly připraveny odpipetováním odpovídajícího objemu zásobního roztoku standardu ST do odpovídající odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

### **3.3.4. Příprava pracovního roztoku pro optimalizaci (HILIC)**

Pracovní roztoky standardu pro účely optimalizace o požadované koncentraci byly připraveny odpipetováním odpovídajícího objemu zásobního roztoku standardu ST do odpovídající odměrné baňky a doplněním MF-A určené pro HILIC separace po rysku.

### **3.3.5. Příprava výchozích roztoků pro validaci (RP)**

Pracovní roztok standardu o koncentraci 10 mg/l ( $ST_{2RP}$ ) byl připraven odpipetováním 100  $\mu$ l ST do 10 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Pracovní roztok standardu o koncentraci 200  $\mu$ g/l ( $ST_{3RP}$ ) byl připraven odpipetováním 250  $\mu$ l  $ST_{2RP}$  do 25 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

### **3.3.6. Příprava řady pracovních roztoků pro validaci (RP)**

Příprava kalibračních roztoků pro RP separaci je shrnuta v Tab. 20 v Příloze A. Celkem bylo připraveno 10 koncentračních úrovní v rozsahu 1–200  $\mu$ g/l, každá koncentrační úroveň v 5 opakováních. Roztoky jednoho opakování každé koncentrační úrovně byly použity jako kalibrační roztoky pro konstrukci kalibrační křivky a zbývající roztoky byly použity jako QC roztoky pro validaci přesnosti a správnosti metody.

### **3.3.7. Příprava výchozího roztoku pro validaci (HILIC)**

Pracovní roztok standardu pro validaci pro metodu HILIC o koncentraci 10 mg/l ( $ST_{2HIL}$ ) byl připraven odpipetováním 250  $\mu$ l ST do 25 ml odměrné baňky a doplněním MF-A určené pro HILIC separace po rysku.



### 3.3.8. Příprava řady pracovních roztoků pro validaci (HILIC)

Nejprve byla připravena řada pracovních roztoků pro validaci o 11 koncentračních úrovních dle Tab. 3 a Tab. 21.

**Tab. 3:** Příprava řady pracovních roztoků pro validaci.

Koncentrační úroveň	Označení roztoku	Koncentrace standardu [µg/l]	Objem standardu ST <sub>2HIL</sub> [ml]	Objem deionizované vody [ml]	Celkový objem [ml]
1	ST <sub>K1</sub>	50	0,05	9,95	10
2	ST <sub>K2</sub>	100	0,1	9,9	10
3	ST <sub>K3</sub>	150	0,15	9,85	10
4	ST <sub>K4</sub>	200	0,2	9,8	10
5	ST <sub>K5</sub>	500	0,5	9,5	10
6	ST <sub>K6</sub>	1000	1	9	10
7	ST <sub>K7</sub>	1500	1,5	8,5	10
8	ST <sub>K8</sub>	2000	2	8	10
9	ST <sub>K9</sub>	3000	3	7	10
10	ST <sub>K10</sub>	4000	4	6	10
11	ST <sub>K11</sub>	5000	5	5	10

Pro dosažení co nejlepších separací v systému HILIC i pro simulaci zamýšleného odběru vzorku destilované vody obsahující karbenicilin je nutné, aby v každém analyzovaném roztoku (kalibrační roztoky, QC roztoky, slepé vzorky, reálné vzorky aj.) bylo zajištěno téměř stejné (nejlépe identické) složení rozpouštědla, a to s maximálním možným obsahem organické složky. Z tohoto důvodu byla pro přípravu vlastních kalibračních roztoků a QC roztoků každá koncentrační úroveň pracovního roztoku pro validaci dále ještě vždy 10x naředěna pomocí MF-A pro HILIC separace. Příprava byla provedena odpipetováním vždy 100 µl daného roztoku (ST<sub>K1</sub> – ST<sub>K11</sub>) z odměrné baňky do 1,8 ml krimpovacích vialek obsahující 900 µl MF-A pro HILIC separace a každá vialka byla poté ihned uzavřena krimpovacím víčkem s PTFE septem. Příprava kalibračních roztoků do vialek je shrnuta v Tab. 21 v Příloze A. Celkem bylo připraveno 11 koncentračních úrovní v rozsahu 5–500 µg/l, každá koncentrační úroveň v 5 opakováních. Roztoky jednoho opakování každé

koncentrační úrovně byly použity jako kalibrační roztoky pro konstrukci kalibrační křivky a zbývající roztoky byly použity jako QC roztoky pro validaci přesnosti a správnosti metody.

### **3.3.9. Příprava slepých roztoků**

Pro kontrolu čistoty chemikálií, přístroje, MF a čistoty práce za účelem odhalení případné kontaminace v průběhu přípravy vzorků anebo při jejich analýze byly v průběhu analýz proměřovaný čistá MF/deionizovaná voda, tj. bylo odpipetováno 1 ml čisté MF/deionizované vody použité při přípravě roztoků v daný den do 1,8 ml vialky.

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. Optimalizace chromatografické separace

#### 4.1.1. Testovací analýza

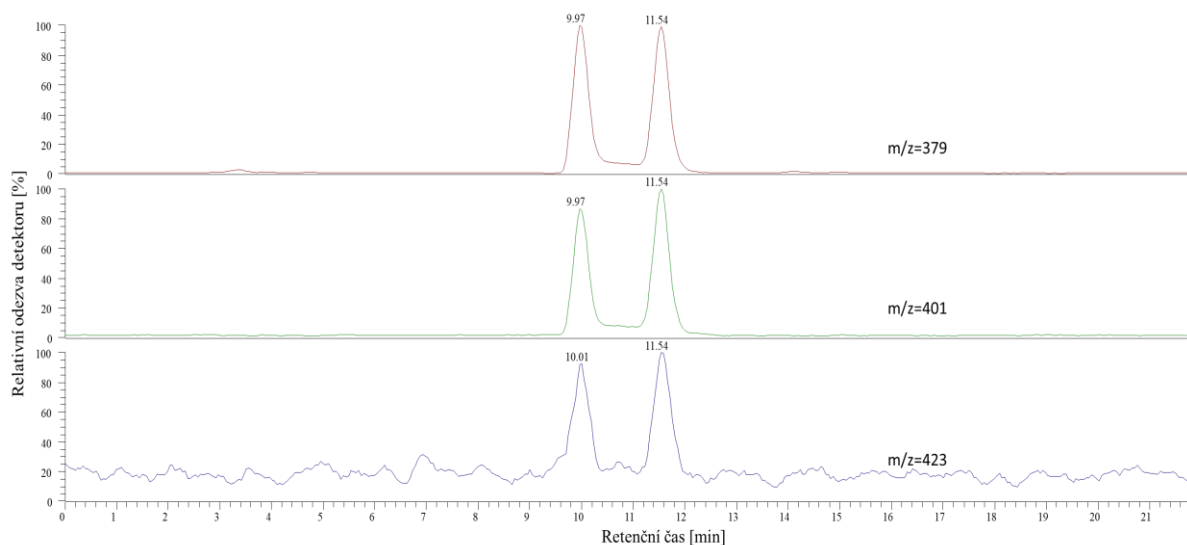
Testovací analýza byla provedena za účelem zjištění retenčního času analytu, popř. retenčních časů jeho obou diastereomerních forem, budou-li chromatograficky rozděleny. Výchozí podmínky separace byly zvoleny s ohledem na doporučení školitele. Jelikož má analyt podobnou strukturu jako ampicilin (liší se ve funkční skupině), byly zvoleny podmínky pro stanovení tohoto analytu stejné jako pro v laboratoři již zavedené stanovení ampicilinu [36]. Chromatogram z testovací analýzy je zobrazen na Obr. 4.

Výchozí podmínky separace:

- Chromatografická kolona: Acclaim RSLC 120 C18  
(100x3,0 mm; 2,2  $\mu\text{m}$ )
- Objem nástřiku: 2,5  $\mu\text{l}$
- Teplota kolony: 30  $^{\circ}\text{C}$
- Průtok MF: 0,5ml/min
- Mobilní fáze: MF-A 0,1% HCOOH ve vodě  
MF-B 0,1% HCOOH v ACN
- Složení MF: 80:20 (v/v)

Výchozí podmínky hmotnostní detekce:

- Teplota transferové trubice: 350  $^{\circ}\text{C}$
- Teplota kapiláry: 350  $^{\circ}\text{C}$
- Poměr průtoků plynu (S/A): 60/20 Arb.
- Potenciál na F-čočkách: -9 V
- Potenciál na S-čočkách: 60 V
- Napětí na kapiláře: +3,0 kV
- MS skeny: FSMS (50–500 m/z)
- XIC: 379 m/z ...  $[\text{M}+\text{H}]^+$   
401 m/z ...  $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$   
423 m/z ...  $[\text{M}+\text{H}+2\text{Na}]^+$



**Obr. 4:** Chromatogram – testovací analýza.

Vzhledem k příliš vysokým retenčním faktorům (9 a 10,5) a oddělení diastereomerů byla provedena základní optimalizace chromatografické separace. Účelem této optimalizace bylo zkrátit dobu analýzy a snaha o eluci analytu v jednom chromatografickém píku (dosažení co nejnižší dolní meze kvantifikace). Optimalizovány byly tyto parametry: složení mobilní a stacionární fáze, průtok MF a objem nástřiku. Po provedené optimalizaci chromatografické separace byla také provedena optimalizace hmotnostní detekce.

Vzhledem k plánovanému použití metody na analýzy pouze vzorků s matricí představující jen deionizovanou vodu za podmínek krátké izokratické separace, nebyl v této fázi vývoje do metody zahrnut vnitřní standard, který jinak bývá nedílnou součástí každé kvantitativní LC-MS analýzy.

## 4.1.2. Optimalizace mobilní a stacionární fáze

### 4.1.2.1. Kolona Acclaim RSLC 120 C18 (LC-003)

Byly vyzkoušeny MF o různém složení uvedené v Tab. 4. U měření č. 1 byl analyt eluován v mrtvém čase (retenční čas 0,8 min). Proto byl u měření č. 2 a 3 snížen podíl MF-B, což zvýšilo retenci, ale bohužel za současného snížení symetrie píků (měření č. 2 faktor asymetrie  $A_s = 0,77$ , resp. 1,9; měření č. 3  $A_s = 1,6$ , šířka píku 9 min). Z tohoto důvodu bylo dalším krokem okyselení MF-A přidávkem kyseliny mravenčí. Při nízkém procentuálním obsahu MF-B (5 % obj.) byl retenční faktor příliš vysoký a nedocházelo k separaci analytu, proto byl podíl MF-B zvýšen. Za těchto podmínek (měření č. 5) byly píky s retenčním

faktorem 5,7, resp. 6,7 již symetričtější ( $A_s=0,89$ ; resp. 1,1), ale byly poměrně široké (0,8 min) a nebyly zcela chromatograficky rozděleny, ani zcela nekoeluovaly ( $R_{ij}$  1,5–2,0). Dále byl vyzkoušen vliv soli v MF-A (octanu amonného) a změna organického rozpouštědla v MF-B (MeOH). Za těchto podmínek (měření č. 6) došlo ke zlepšení separace, píky byly již symetrické ( $A_s=1,1$ , resp. 1,1), ale retence analytu se prodloužila (retenční faktor 13, resp. 17). Proto byly následně (měření č. 7–11) vyzkoušeny MF jak s vyšší koncentrací soli (pro zúžení píků), tak i s vyšším obsahem MeOH (pro snížení retenčního faktoru). Vyšší koncentrace soli však separaci ovlivnila negativně, protože došlo ke snížení odezvy detektoru (snížení poměru signálu k šumu S/N, z měření č. 8→č. 10 o 2,6x, resp. 2,4x), navíc docházelo i k rozšiřování píků (0,6 min), u měření č. 10 opět nebyly píky chromatograficky rozděleny, ani zcela nekoeluovaly ( $R_{ij}$  1,5–2,0). Vyšší obsah organické fáze v MF snížil retenční faktor a napomohl separaci.

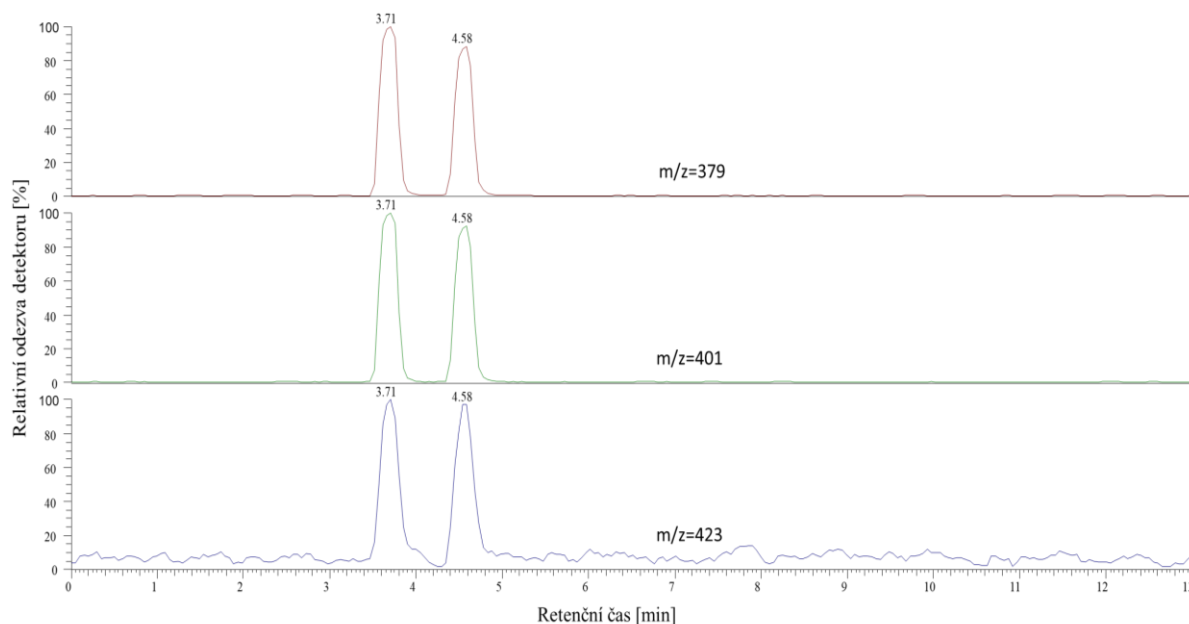
**Tab. 4:** Složení použitých MF a kapacitní faktory analytu (kolona LC-003).

Číslo měření	MF-A		MF-B		Retenční faktor [1]
	Obsah [% obj.]	Složení	Obsah [% obj.]	Složení	
1	80	Deionizovaná voda	20	ACN	nedetekováno
2	95	Deionizovaná voda	5	ACN	0,7 / 1,3
3	98	Deionizovaná voda	2	ACN	8
4	95	0,1% HCOOH	5	ACN	nedetekováno
5	80	0,1% HCOOH	20	ACN	5,7 / 6,7
6	90	50mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	10	MeOH	13 / 17
7	85	50mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	15	MeOH	6,5 / 8,4
<b>8*</b>	<b>80</b>	<b>50mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub></b>	<b>20</b>	<b>MeOH</b>	<b>3,6 / 4,7</b>
9	85	250mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	15	MeOH	8,1 / 10
10	80	250mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	20	MeOH	4,7 / 5,9
11	70	250mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	30	MeOH	1,9 / 2,3

\*Podmínky při dosažení nejlepší separace

Nejlepší separace na koloně LC-003 bylo dosaženo za podmínek měření č. 8, příslušný chromatogram je zobrazen na Obr. 5. Nebylo sice dosaženo úplné koeluce obou forem do jednoho úzkého a symetrického píku, ale separace ve formě dvou zcela chromatograficky

rozdělených úzkých a symetrických píků ( $A_s=0,95$ , resp. 1,1) s optimálními retenčními faktory (3,6, resp. 4,7) byla shledána jako přijatelná pro případné zamýšlené použití. Ideálním případem by však byla úplná koeluce obou forem, a tak byly testovány další možnosti separace.



**Obr. 5:** Chromatogram měření č. 8 (LC-003).

#### 4.1.2.2. Kolona Kinetex Biphenyl (LC-011)

Jelikož analyt obsahoval benzenové jádro, byla vyzkoušena kolona Kinetex Biphenyl, která díky modifikaci SF bifenylovou skupinou vykazuje zvýšenou selektivitu k sloučeninám tohoto typu. V Tab. 5 jsou shrnuty použité MF a retenční faktory analytu. V porovnání s předchozí kolonou (LC-003) však obecně bylo dosaženo horších chromatografických separací.

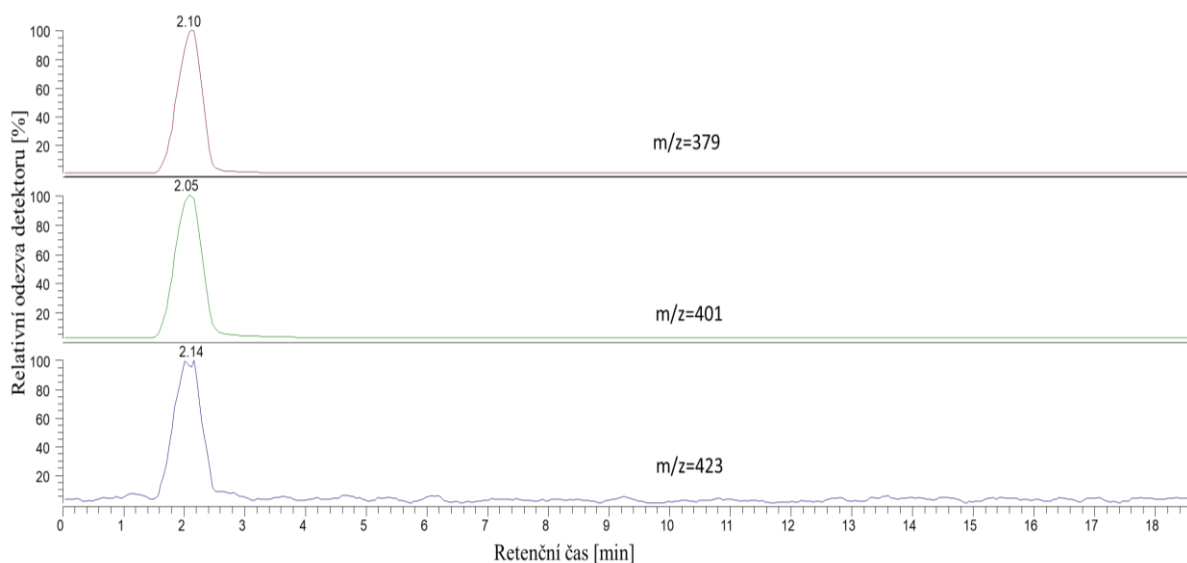
Za podmínek měření č. 1 došlo k očekávanému výraznému zvýšení chromatografickému rozlišení (2,9), ale píky vykazovaly abnormální tvar – oblast maxima výšky píku měla charakter plata. Dále byl vyzkoušen vliv přídavku kyseliny octové do MF-A (měření č. 2). Snížením pH se podle očekávání mírně zvýšila retence, ale lepšího tvaru píků nebylo dosaženo, a navíc došlo ke snížení signálu (o jeden řád). Vzhledem ke skutečnosti, že vliv přídavku aditiv do MF neměl pozitivní efekt na kvalitu separace, byly dále testovány pouze MF obsahující vodu a MeOH. Postupným zvyšováním podílu MeOH v MF (2→10 %) docházelo k očekávanému snižování retenčních časů, ale separace byla zcela nevyhovující.

Při nižším obsahu MF-B obě formy částečně koeluovaly, při vyšším obsahu MF-B docházelo již k eluci jedné formy analytu, avšak bohužel téměř v mrtvém čase – retenční faktor 0,62 (viz Obr. 6). Z důvodu nízkého retenčního faktoru, který by měl být v rozmezí 1–10 [21], je ovšem tato separace prakticky nepoužitelná, protože oblast eluce píku leží v oblasti mrtvého času, a tak existuje zvýšené riziko negativního vlivu nesorbujících se interferentů.

**Tab. 5:** Složení použitých MF a retenční časy analytu (kolona LC-011).

Číslo měření	MF-A		MF-B		Retenční faktor [1]
	Obsah [% obj.]	Složení	Obsah [% obj.]	Složení	
1	90	50mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	10	MeOH	3,1 / 4,4
2	90	50mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> + 0,1% CH <sub>3</sub> COOH	10	MeOH	3,6 / 5,1
3	98	Deionizovaná voda	2	MeOH	2,5 / 3,1
4	97	Deionizovaná voda	3	MeOH	2,1 / 2,4
5	96	Deionizovaná voda	4	MeOH	1,7 / 1,9
6	95	Deionizovaná voda	5	MeOH	1,3 / 1,6
7	94	Deionizovaná voda	6	MeOH	1,3 / 3,4
8	93	Deionizovaná voda	7	MeOH	0,69
<b>9*</b>	<b>90</b>	<b>Deionizovaná voda</b>	<b>10</b>	<b>MeOH</b>	<b>0,62</b>

\*Podmínky při dosažení nejlepší separace



**Obr. 6:** Chromatogram měření č. 8 (LC-011).

#### 4.1.2.3. Kolona Synergi Polar RP C12 (LC-015)

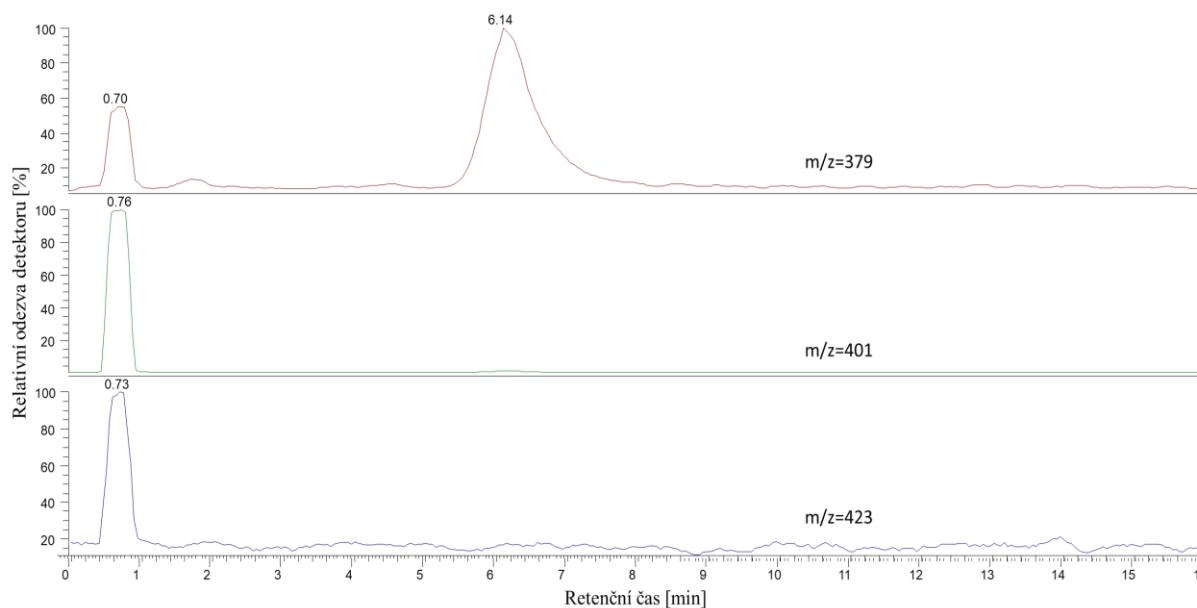
Kolona obsahující tuto SF (hustě vázaná C12) byla zvolena díky své schopnosti efektivněji separovat polární aromatické sloučeniny. Vzhledem k rozměrům kolony a velikosti částic byl na základě doporučení od výrobce průtok MF zvýšen na 1 ml/min. Rovněž bylo vyzkoušeno různé složení (viz Tab. 6), které ale ke zlepšení separace a silnějšímu signálu nevedly (u prvních třech měření pokles signálu o dva řády). Při použití nejlepších nalezených podmínek pro kolonu LC-011 bylo dosaženo podobné separace – docházelo k mírnému zvýšení retenčního faktoru (1,5) a obě formy koeulovaly ve formě jednoho píku, ale signál se výrazně snížil. Při snížení podílu MF-B na 5 % byl již retenční faktor 7,8 v optimálním rozmezí ale pík byl poměrně široký a chvostoval (faktor asymetrie 2,3). Při snížení podílu MF-B na 0 % docházelo k úplné retenci. Pro další testování byl obsah MF-B opět zvolen na úrovni 10 % jako při měření č. 1, ale MF-A byla nově okyselena přidávkem kyseliny octové. Po této úpravě se prudce zvýšila retence (retenční faktor 22; resp. 25), ale docházelo opět k částečné koeluci obou forem a píky byly příliš nízké a široké (2 min). Pro snížení retenčního faktoru byl v měření č. 5 zvýšen podíl MF-B (20 %), ale znovu docházelo k eluci dvou forem analytu a píky byly přibližně stále stejně široké. Posledním měřením byl ještě otestován vliv přídavku octanu amonného, ale opět bez zlepšení chromatografické separace – částečná koeluce obou forem a široký pík (1 min). Nejlepší chromatografická separace pro tuto kolonu byla získána za podmínek měření č. 2 a její chromatogram je zobrazen na Obr. 7.

**Tab. 6:** Složení použitých MF a retenční čas analytu (kolona LC-015).

Číslo měření	MF-A		MF-B		Retenční faktor [1]
	Obsah [% obj.]	Složení	Obsah [% obj.]	Složení	
1	90	Deionizovaná voda	10	MeOH	1,5
<b>2*</b>	<b>95</b>	<b>Deionizovaná voda</b>	<b>5</b>	<b>MeOH</b>	<b>7,8</b>
3	100	Deionizovaná voda	0	MeOH	nedetekováno
4	90	0,1% CH <sub>3</sub> COOH	10	MeOH	22 / 25
5	80	0,1% CH <sub>3</sub> COOH	20	MeOH	7,2
6	90	10mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	10	MeOH	2,1

\*Podmínky při dosažení nejlepší separace





**Obr. 7:** Chromatogram měření č. 2 (LC-015).

#### 4.1.2.4. Kolona Kinetex HILIC (LC-009)

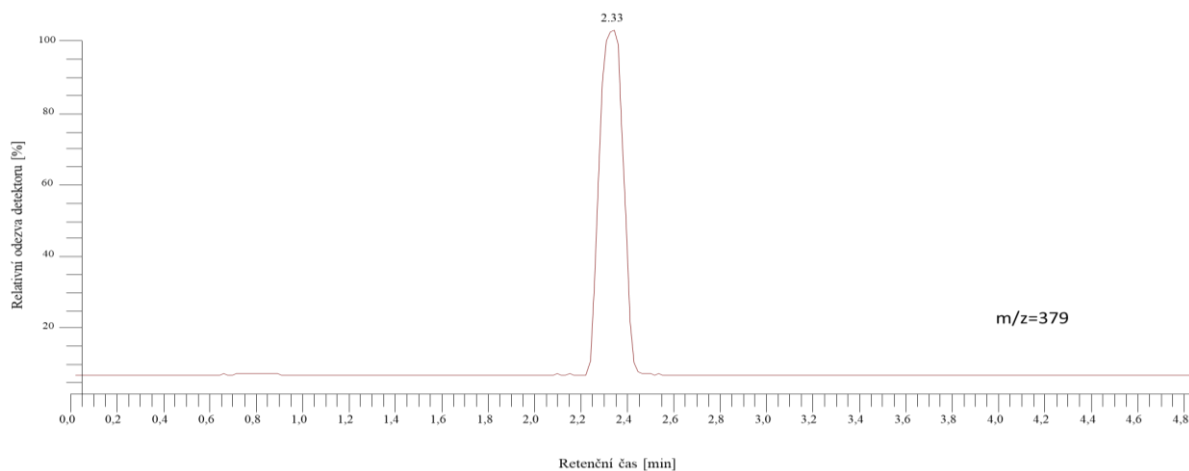
Tato kolona, jejíž SF je tvořena nemodifikovaným silikagelem, separuje analyty pomocí mechanismu HILIC. Vzhledem k parametrům této kolony byl ponechán průtok MF na 1 ml/min (dle doporučení výrobce). Složení použitých MF, s retenčními faktory a poměrem S/N je shrnuto v Tab. 7. Jako první byla otestována separace pouze za použití MF-A – zde se již podařilo eluovat obě formy analytu v jednom úzkém píku, bohužel však v mrtvém retenčním čase. Bylo tedy potřeba najít složení MF s nižší eluční silou. Jako první krok k silnější retenci byla provedena výměna aditiva (octan amonný za mravenčan amonný) a snížení podílu vodné fáze v MF-A na polovinu. Pro možnost dodatečných úprav eluční síly byla zařazena MF-B do celkového složení MF. Za použití těchto podmínek při obsahu MF-B 4 % (obj.) bylo u měření č. 2 dosaženo mírně vyšší retence (retenční faktor 0,82), bohužel stále nízké, ale nepatrně vzrostl poměr S/N (10→11). Proto pro ještě silnější retenci byla zvýšena koncentrace octanu amonného v MF-A, což vedlo u měření č. 3 ke zvýšení jak retenčního faktoru (0,82→1,7), tak i poměru S/N (11→26). Jelikož postupným zvyšováním množství octanové soli ve složení MF vedlo ke zlepšení chromatografické separace, bylo vyzkoušeno další složení MF s koncentrovanějšími roztoky soli. U měření č. 4 bylo opět dosaženo vyššího retenčního faktoru (1,7→2,2) i vyššího poměru S/N (26→32), chromatografický pík byl symetrický ( $A_s = 1,1$ ). Dalším zvýšením množství aditiva v MF-A bylo dosaženo nepatrně vyšší retence (2,2→2,4), ale již došlo k prvnímu poklesu poměru S/N (32→30).

S ohledem na dosažené výsledky, zájem o šetrnější podmínky ESI ionizace i nižší provozní náklady, bylo jako optimální složení MF zvoleny podmínky měření č. 4 (chromatogram viz Obr. 8), které zároveň poskytovaly nejintenzivnější signál (poměr S/N). Tyto podmínky byly následně použity pro optimalizaci zbývajících chromatografických parametrů pro systém HILIC.

**Tab. 7:** Složení použitých MF, retenční čas analytu a poměr S/N (kolona LC-009).

Číslo měření	Podíl MF-B	MF-A	MF-B	Retenční faktor [1]	S/N [1]
1	0 %	100mM HCOONH <sub>4</sub> , ACN (10:90, v/v)	100mM HCOONH <sub>4</sub> , ACN, deionizovaná voda (10:50:40, v/v/v)	0	10
2	4 %	10mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , ACN (5:95, v/v)	100mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , ACN, deionizovaná voda (5:55:40, v/v/v)	0,82	11
3	4 %	50mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , ACN (5:95, v/v)	100mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , ACN, deionizovaná voda (5:55:40, v/v/v)	1,7	26
<b>4*</b>	<b>4 %</b>	<b>100mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, ACN (5:95, v/v)</b>	<b>100mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, ACN, deionizovaná voda (5:55:40, v/v/v)</b>	<b>2,2</b>	<b>32</b>
5	4 %	250mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , ACN (5:95, v/v)	100mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> , ACN, deionizovaná voda (5:55:40, v/v/v)	2,4	30

\*Podmínky při dosažení nejlepší separace.



**Obr. 8:** Chromatogram s optimalizovanou MF měření č. 4 (LC-009).

### 4.1.3. Optimalizace objemu nástřiku

Pro systém RP byl vyzkoušen a zvolen nejvyšší možný objem nástřiku 25  $\mu\text{l}$ . Jelikož optimalizace metody byla zaměřena na dosažení co nejnižší meze kvantifikace a tento nástřik poskytoval uspokojivé výsledky (úzké a vysoké píky, faktory asymetrie 1,1, resp. 1,1), byl zvolen pro tento systém jako optimální.

Optimalizace objemu nástřiku byla prováděna pouze pro HILIC. Při nástřiku vzorku v rozpouštědle s vysokou eluční silou (tj. analyt rozpuštěn ve vodné fázi, jako simulace reálných vzorků) bylo nutné zvolit takový objem, aby nedocházelo k nežádoucímu rozmytí píku nebo eluci analytu v mrtvém čase. Hodnocení tohoto parametru bylo provedeno porovnáním faktoru asymetrie píku v závislosti na objemu nástřiku vzorku ve 2 různých rozpouštědlech (MF-A nebo směs deionizované vody-MF-A 10:90, v/v). S ohledem na získané výsledky (viz Tab. 8.) byl jako optimální zvolen objem nástřiku 10  $\mu\text{l}$ , jelikož vliv eluční síly rozpouštědla již neměl významný vliv na tvar píku a zároveň bylo možné dosáhnout nižší meze kvantifikace nežli s nástřikem o objemu 5  $\mu\text{l}$ .

**Tab. 8:** Výška píku a jeho šířka v závislosti na rozpouštědle a objemu nástřiku.

Objem nástřiku [ $\mu\text{l}$ ]	Kritérium přijatelnosti	Analyt pouze v MF-A		Analyt ve vodě-MF-A (10:90, v/v)	
	$A_s$ [1]	Šířka píku [min]	Faktor asymetrie [1]	Šířka píku [min]	Faktor asymetrie [1]
20	0,9–1,2 [37]	0,21	1,2	0,6	0,49
15		0,19	1,1	0,25	0,74
<b>10*</b>		<b>0,23</b>	<b>1,1</b>	<b>0,22</b>	<b>1,2</b>
5		0,16	0,95	0,21	1,2

\*Podmínky při dosažení nejlepší separace.

### 4.1.4. Optimalizace průtoku

Pro systém RP byla snaha zkrátit dobu analýzy bez negativního vlivu na mez kvantifikace. Byly vyzkoušeny průtoky MF v rozsahu 0,6–1 ml/min. V získaných chromatogramech byly hodnoceny poměry S/N obou píků (vliv na mez kvantifikace), jejich retenční časy (vliv na dobu analýzy) i dosažené tlaky na koloně (vliv na životnost kolony). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 9. Jako optimální byl vybrán průtok 0,6 ml/min při kterém bylo

dosaženo nejvyššího poměru S/N, tlak na koloně poskytoval dostatečnou rezervu vzhledem k maximálnímu možnému tlaku a doba analýzy 5 minut byla stále přijatelná pro zamýšlené účely.

**Tab. 9:** Retenční časy a S/N pro testované průtoky.

Průtok MF [ml/min]	Tlak [bar]		S/N [1]	Retenční čas [min]
	Naměřený	Kritérium přijatelnosti		
<b>*0,6</b>	<b>360</b>	<700 [38]	<b>41 / 86</b>	<b>3,0 / 3,7</b>
0,7	415		28 / 63	2,6 / 3,2
0,8	470		24 / 59	2,3 / 2,8
0,9	530		22 / 52	2,1 / 2,5
1	585		20 / 51	1,9 / 2,3

\*Podmínky při dosažení nejlepší separace.

Průtok pro systém HILIC byl ponechán na 1 ml/min, protože doba analýzy činila jen 3 minuty a tlak na koloně byl 280 bar (max. povolený tlak 600 bar [39]). Optimální hodnota dle doporučení výrobce je tuto kolonu LC-009 stanovena na 0,8 ml/min. Z těchto důvodů nebyla optimalizace prováděna.

## 4.2. Optimalizace hmotnostní detekce

Optimalizace podmínek byla provedena pro prekurzorový ion analytu  $[M+H]^+$  o specifické hmotnosti 379 m/z se zaměřením na dosažení maximální odezvy detektoru a stability signálu.

### 4.2.1. Optimalizace podmínek elektrospreje

Nastavení HESI iontového zdroje bylo pro RP systém zvoleno na základě v laboratoři již vyvinuté a zvalidované metody na stanovení strukturně podobné sloučeniny ampicilin [36]. Výchozí nastavení HESI iontového zdroje pro HILIC systém bylo provedeno na základě doporučení školitele a následně byla provedena důkladná optimalizace vybraných parametrů.

Postupně byly optimalizovány tyto parametry: teplota HESI kapiláry a její potenciál, poměry mezi průtoky hlavního (sheat, S) a pomocného (auxiliary, A) zmlžujícího plynu

a teplota transferové trubice. V Tab. 10 je uveden rozsah testovaných parametrů společně s výchozími hodnotami a výběrem optimálních hodnot. V Přílohách B-E (Obr. 18 až Obr. 21) jsou uvedena data na jejichž základě bylo provedeno vyhodnocení optimalizace uvedených parametrů. V průběhu všech měření se po změně hodnoty optimalizovaného parametru vždy čekalo cca 500 skenů (vyjma při nastavení potenciálu na HESI kapiláře – cca 100 skenů), aby byla zaručena stabilizace podmínek.

**Tab. 10:** Optimalizace podmínek HESI pro systém HILIC.

Optimalizovaný parametr	Příloha	Hodnota		
Teplota HESI kapiláry [°C]	B	250	<b>300*</b>	350 <sup>V</sup>
Potenciál HESI kapiláry [kV]	C	+2,5	+2,75	<b>+3*<sup>V</sup></b> +3,25 +3,50
Poměr průtoku plynu S/A [1]	D	30:10	45:15	<b>60:20*<sup>V</sup></b>
Teplota transferové trubice [°C]	E	<b>250*</b>	300	350 <sup>V</sup>

<sup>V</sup>Výchozí hodnoty, \*hodnota při dosažení optimálního signálu.

Jako optimální teplota HESI kapiláry byla zvolena hodnota 300 °C. Při vyšší teplotě 350 °C sice ještě docházelo k mírnému nárůstu signálu, ale toto zvýšení nebylo nijak významné, a navíc se zvýšila variabilita signálu. Z těchto důvodů byla zvolena šetrnější nižší teplota 300 °C. Hodnota potenciálu na HESI kapiláře byla ponechána na doporučené (výchozí) hodnotě +3 kV, jelikož nedocházelo k významné změně signálu. V případě poměru průtoku hlavního a pomocného plynu byl vybrán poměr 60:20, při němž bylo dosaženo až 3x vyššího signálu než při nižších průtocích plynů, ačkoliv za mírně zvýšené variability signálu. Jako optimální teplota transferové trubice byla zvolena hodnota 250 °C, neboť tato nejnižších z testovaných teplot poskytovala až 2x vyšší odezvu detektoru než při vyhřívání na vyšší teploty. Stabilita signálu po zoptimalizování výše uvedených podmínek byla excelentní s RSD 1,8 % (viz Obr. 26 v Příloze H), přičemž maximální přípustná hodnota uvedená v ovládacím programu přístroje je RSD 15 % .

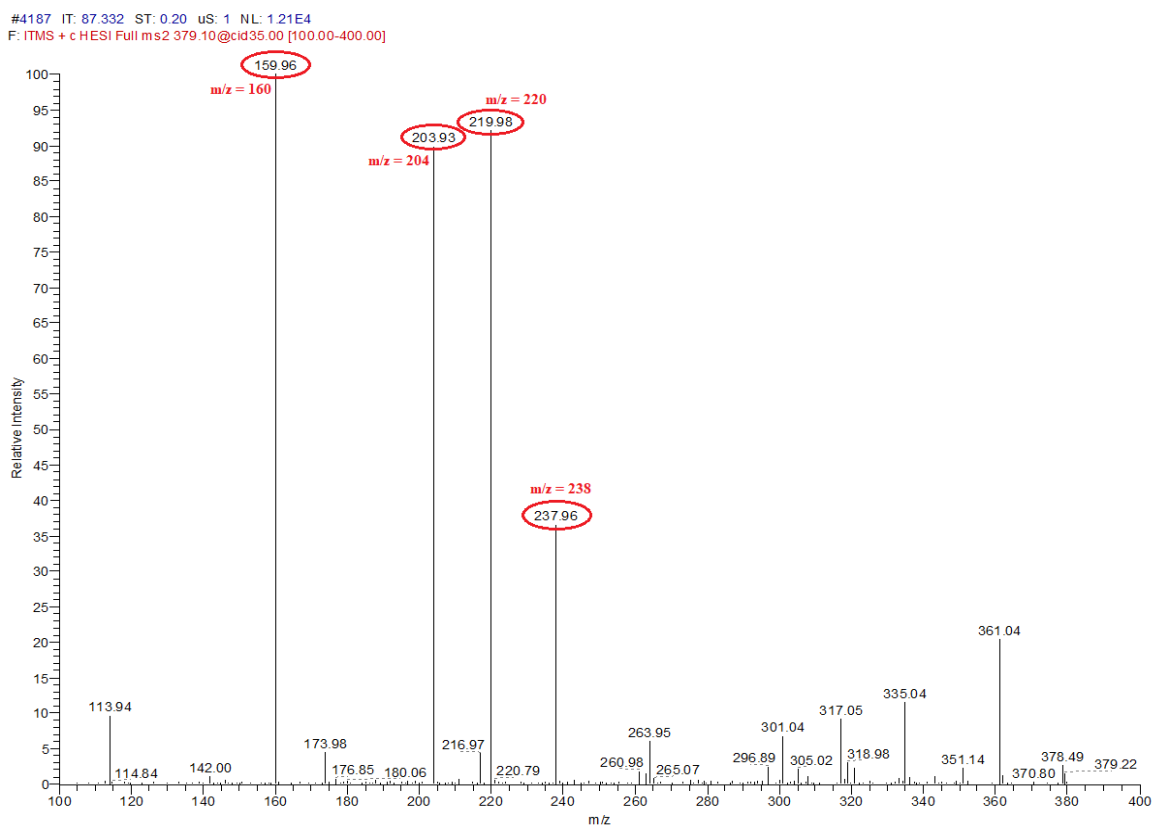
#### 4.2.2. Optimalizace parametrů iontové optiky (S-čočky a F-čočky)

Účelem této optimalizace bylo zvolit takovou hodnotu potenciálů na F-čočkách a S-čočkách, aby bylo dosaženo co nejvyšší transmise iontů z iontového zdroje do iontové pasti, což bylo hodnoceno na základě hodnoty celkového iontového proudu (TIC). Tento parametr mohl být z principu optimalizován pro systém RP a HILIC současně,

protože transport iontů a jejich fokusace se v zásadě neliší při použití obou systémů. Měření potenciálu na F-čočkách bylo provedeno v rozmezí od -30 do -5 V, pro S-čocky v rozmezí od 0 do +70 V. V Příloze F (Obr. 22 a Obr. 23) jsou k dispozici záznamy z těchto měření. Na základě naměřených dat byl zvolen potenciál pro S-čocky +66 V a pro F-čocky -8,5 V.

### 4.2.3. Volba MRM přechodů a optimalizace kolizní energie

Tato část optimalizace byla provedena za účelem volby vhodných MRM přechodů a následně nalezení optimálních hodnot normalizované kolizní energie (NCE) pro každý MRM přechod. Jako prekurzorový ion byl zvolen ion 379 m/z, který vykazoval nejvyšší odezvu nejen za použití všech chromatografických podmínek vyzkoušených v této práci, ale i v některých z dosud publikovaných studií [32,33]. Produktové ionty byly zvoleny na základě velikosti intenzity odezvy detektoru při použití hodnoty NCE 35 %, která je doporučována výrobcem jako výchozí hodnota (viz Obr. 9).



**Obr. 9:** Hmotnostní spektrum analytu (379 m/z) se zvýrazněnými MRM přechody – přímá infuze analytu do iontového zdroje.

V závislosti na použitém separačním systému se získaná MS/MS spektra mírně lišila. Při použití systému s RP měl nejvyšší odezvu MRM přechod 379→160 (shodně s prací [33]), zatímco při použití systému s HILIC byla naměřena nejvyšší odezva pro MRM přechod 379→204. Pro RP byl vybrán MRM přechod 379→160 ke kvantifikaci, jako kontrolní byl vybrán MRM přechod 379→220. Pro HILIC byl vybrán MRM přechod 379→204 ke kvantifikaci, jako kontrolní byl vybrán MRM přechod 379→238.

Dále bylo zapotřebí nastavit vhodnou NCE pro příslušné MRM přechody. Hodnoty byly určeny na základě dat uvedených v Příloze G (Obr. 24 a Obr. 25). Kolizní energie byla testována v rozmezí NCE 0–100 % a na základě těchto záznamů byla zvolena jedna univerzální hodnota NCE 30 %. Výběr této hodnoty byl uskutečněn na základě dvou kritérií – v úvahu byla brána nejen poloha maxima křivky, ale i její průběh, aby ani u jednoho ze čtyř MRM přechodů nebyla zvolena oblast prudkého nárůstu/poklesu křivky. V Tab. 11 jsou zaznamenány NCE pro příslušné MRM přechody.

**Tab. 11:** Naměřené hodnoty NCE pro vybrané MRM přechody.

Separační systém	MRM přechod	Typ MRM přechodu	Normalizovaná kolizní energie [%]	
			Optimální	Univerzální
RP	379→160	Kvantifikační	18	30
	379→220	Kontrolní		
HILIC	379→204	Kvantifikační	30	
	379→238	Kontrolní		

Optimalizace NCE byla pro MRM přechod 379→204 dále provedena i empiricky na základě S/N píku analytu v chromatogramech získaných pomocí HILIC separací. Tyto hodnoty byly shrnuty v Tab. 12. NCE určená empiricky z chromatogramů se shoduje s NCE získanou z měření pomocí přídavného toku analytu do proudu MF, což potvrzuje vhodnost správného určení univerzální hodnoty.

**Tab. 12:** Empirická optimalizace NCE.

NCE [%]	20	25	<b>30*</b>	35	40	45	50
S/N [1]	76	142	<b>217</b>	125	85	61	65

\*Hodnota při dosažení nejintenzivnějšího signálu.

#### 4.2.4. Optimalizace maximální doby plnění pasti

Účelem této optimalizace bylo určit optimální dobu, po kterou je iontová past otevřena pro akumulaci iontů. S prodlužující se dobou plnění iontové pasti se zvyšuje i počet iontů, které mohou být použity k samotné detekci, čímž lze dosáhnout nižších mezí kvantifikace. Tím se ovšem snižuje počet provedených MS/MS skenů, čímž klesá i počet bodů, ze kterých může být zkonstruován daný chromatografický pík. Pro účely kvantifikace je nezbytné, aby tento počet činil min. 10 bodů [28], což bylo použito jako jedno z hlavních kritérií při této optimalizaci. Druhým kritériem byla hodnota poměru S/N. Při použití kolony pro RP i HILIC bylo více než 15 bodů na pík i při maximální testované doby plnění iontové pasti (1000 ms).

Pro koncentraci analytu mírně nad předpokládanou mezi kvantifikace (10 µg/l pro RP, 5 µg/l pro HILIC) byly otestovány doby plnění iontové pasti v rozsahu 200–1000 ms. Z výsledků uvedených v Tab. 13 vyplývá, že maximální testovaná hodnota 1000 ms je optimální pro oba chromatografické systémy, protože je při ní dosaženo přibližně 15 bodů na pík za současného dosažení maximálního S/N.

**Tab. 13:** Hodnoty S/N při optimalizaci maximální doby plnění iontové pasti pro RP.

Doba plnění pasti [ms]	RP		HILIC	
	Počet bodů na pík [1]	S/N [1]	Počet bodů na pík [1]	S/N [1]
200	40	17 / 33	30	29
500	25	25 / 50	20	30
700	20	30 / 67	17	36
<b>1000*</b>	<b>16</b>	<b>40 / 68</b>	<b>15</b>	<b>54</b>

\*Hodnota při dosažení nejintenzivnějšího signálu.

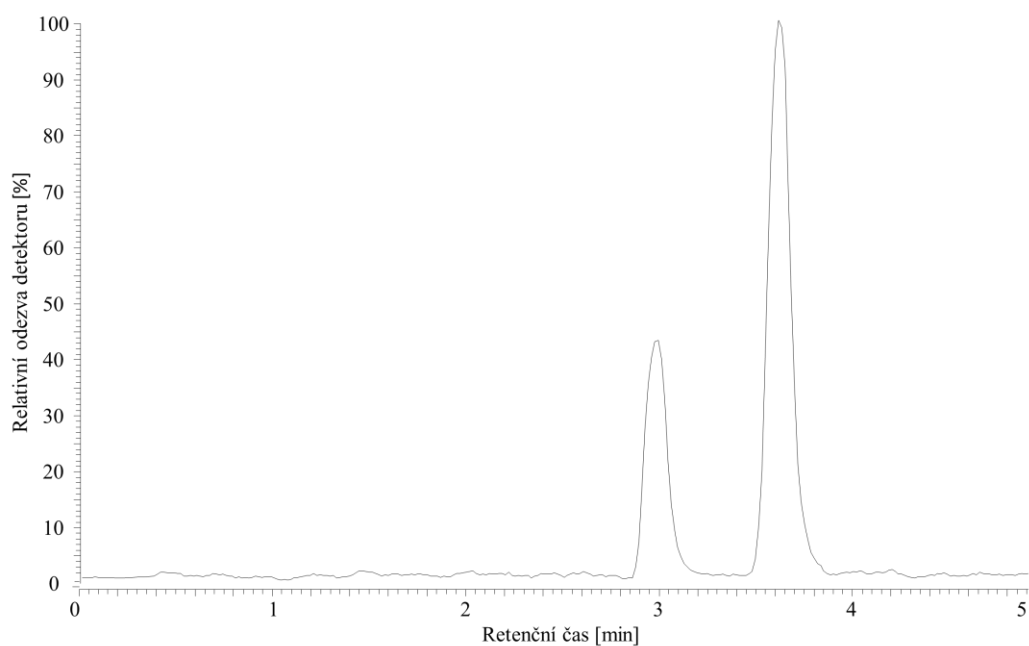
#### 4.3. Souhrn optimalizace chromatografické separace a hmotnostní detekce

Na základě optimalizace chromatografické separace a hmotnostní detekce byly pro každý z obou chromatografických systémů (RP i HILIC) získány informace pro optimální nastavení přístroje uvedené níže.



## System RP

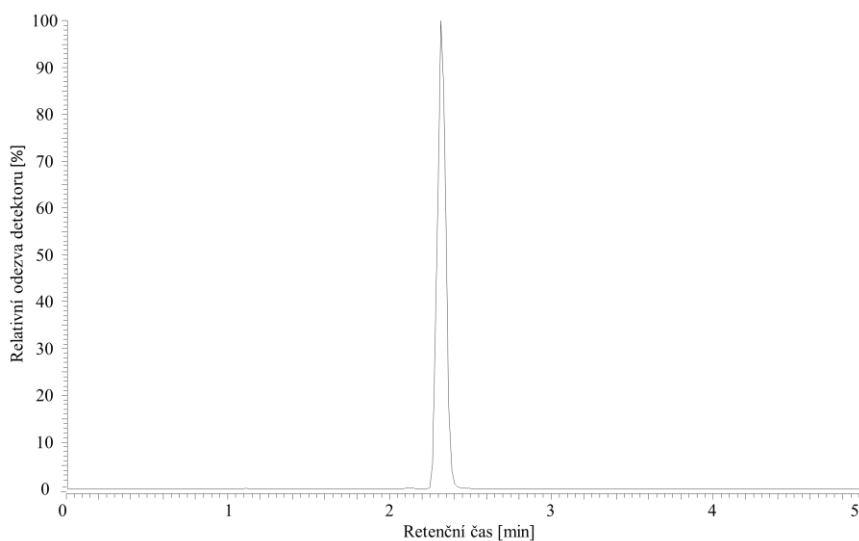
- Chromatografická kolona: Acclaim RSLC C18 (100x3,0 mm; 2,2 µm)
- Objem nástřiku: 25 µl
- Teplota kolony: 30 °C
- Průtok mobilní fáze: 0,6 ml/min
- Použitá mobilní fáze: MF-A 50mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> ve vodě  
MF-B MeOH
- Složení mobilní fáze: 80:20 (v/v) MF-A:MF-B
- Teplota HESI kapiláry: 350 °C
- Napětí na HESI kapiláře: +3,0 kV
- Poměr průtoku plynu (S/A): 60:20 Arb.
- Teplota transferové trubice: 350 °C
- Potenciál na S-čočkách: +66 V
- Potenciál na F-čočkách: -8,5 V
- Typ skenu: Sken produktových iontů
- Počet mikroskenů: 1
- Doba plnění iontové pasti: 1000 ms
- Normalizovaná kolizní energie: 30 %
- Kvantifikační MRM přechod (Obr. 10): 379→160
- Kontrolní MRM přechod: 379→220



**Obr. 10:** Ukázkový chromatogram – RP separace.

## System HILIC

- Chromatografická kolona: Kinetex HILIC (150x3,0 mm; 2,6 µm)
- Objem nástřiku: 10 µl
- Teplota kolony: 30 °C
- Průtok mobilní fáze: 1 ml/min
- Použitá mobilní fáze: MF-A 100mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, ACN (5:95, v/v)  
MF-B 100mM HCOONH<sub>4</sub>, ACN, deionizovaná voda (5:55:40, v/v/v)
- Složení mobilní fáze: 96:4 (v/v) MF-A:MF-B
- Teplota HESI kapiláry: 250 °C
- Napětí na HESI kapiláře: +3,0 kV
- Poměr průtoku plynu (S/A): 60:20 Arb.
- Teplota transferové trubice: 300 °C
- Potenciál na S-čočkách: +66 V
- Potenciál na F-čočkách: -8,5 V
- Typ skenu: Sken produktových iontů
- Počet mikroskenů: 1
- Doba plnění iontové pasti: 1000 ms
- Normalizovaná kolizní energie: 30 %
- Kvantifikační MRM přechod (Obr. 11): 379→204
- Kontrolní MRM přechod: 379→238



**Obr. 11:** Ukázkový chromatogram – HILIC separace.

## 4.4. Validace metod

Po dokončení optimalizace chromatografické separace a hmotnostní detekce byla provedena validace obou nově vytvořených analytických metod. Cílem validace bylo pomocí objektivního posouzení prokázat, že jsou tyto metody vhodné pro kvantitativní analýzu karbenicilinu ve vodě. Pro tyto účely byly vybrány některé základní validační parametry uvedených v doporučení Evropské agentury pro léčivé přípravky (EMA) [40]. Validace však nebyla z časových i praktických důvodů provedena v plné šíři, ale byly vybrány pouze 4 nejdůležitější parametry – kalibrační křivka a rozsah, správnost a přesnost.

Kalibrační křivka (tvořena minimálně 6 body) vyjadřuje vztah mezi nominální koncentrací analytu a odezvou detektoru na daný analyt. Kalibrační standardy pokrývají celý rozsah kalibrace a musí být připravené přidáním známého množství analytu do matrice – v této práci je matricí deionizovaná voda. Rozsah metody je pak určen nejnižším a nejvyšším bodem kalibrační křivky (dolní a horní mezí kvantifikace), přičemž musí být splněna následující kritéria: správnost zpětně vypočtených koncentrací každého kalibračního standardu musí být v rozmezí  $\pm 15\%$  na všech koncentračních úrovních kromě dolní meze kvantifikace, kde je povolené rozmezí  $\pm 20\%$  [40].

Hodnocení přesnosti a správnosti je provedeno pomocí kontrolních vzorků (QC) připravených stejně jako kalibrační standardy, a to minimálně na čtyřech koncentračních úrovních (dolní a horní mez, přibližně v  $1/3$  až v  $1/2$  a minimálně ve  $3/4$  kalibrační křivky), přičemž každá koncentrační úroveň musí být provedena minimálně v pěti opakováních. Správnost je určena jako procentuální diference vypočtené hodnoty od nominální hodnoty koncentrace analytu, která musí být v rozmezí max.  $\pm 15\%$ , vyjma dolní meze kvantifikace, kde musí být v rozmezí max.  $\pm 20\%$ . Přesnost je vyjádřena jako výběrová směrodatná odchylka (RSD), jejíž hodnoty musí být ve stejném rozmezí jako v případě správnosti, tj. max.  $\pm 15\%$  vyjma dolní meze kvantifikace, kde musí být v rozmezí max.  $\pm 20\%$  [40].

### 4.4.1. Validace metody RP

#### 4.4.1.1. Kalibrační křivka a rozsah

Rozsah testovaných koncentrací analytu byl stanoven v rozmezí 1–200  $\mu\text{g/l}$ . Kvůli nesplnění kritérií přijatelnosti bylo nezbytné vyloučit ve všech měřeních nejnižší a nejvyšší koncentraci, tj. 1  $\mu\text{g/l}$  a 200  $\mu\text{g/l}$ . V průběhu vyhodnocování musely být vyloučeny i některé další koncentrační úrovně (pro jednotlivé MRM přechody), které jsou blíže

specifikovány dále v této kapitole. Kvůli rozdělení diastereomerů bylo nutné validovat metodu pro každý pík odděleně, nejprve jsou uvedeny výsledky získané pro první eluovaný pík (s retenčním časem 3 min), poté jsou uvedeny výsledky pro druhý eluovaný pík (s retenčním časem 3,7 min).

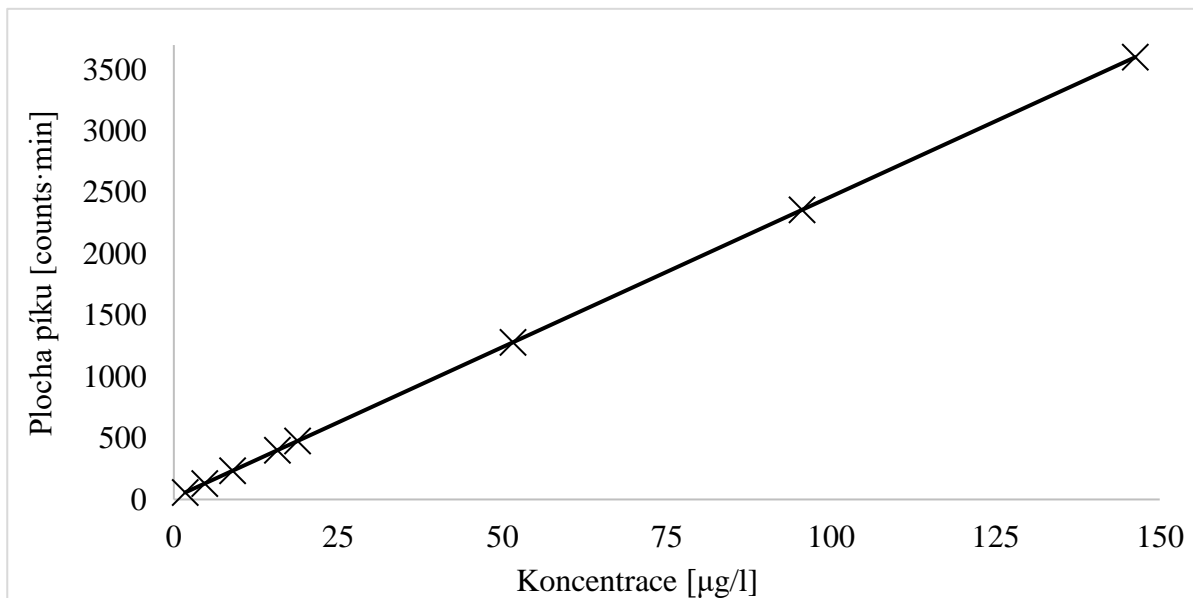
V Tab. 14 jsou shrnuty výsledky pro oba MRM přechody 1. píku. V případě kvantitativního MRM přechodu bylo splněno kritérium přijatelnosti na všech koncentračních úrovních (tj. 2–150 µg/l). Kvůli nesplnění kritéria přijatelnosti na koncentračních úrovních 2 µg/l, 5 µg/l a 10 µg/l na kontrolním MRM přechodu bylo nezbytné tyto kalibrační body vyloučit, takže dolní mez kvantifikace musela být zvýšena až na 15 µg/l.

**Tab. 14:** Diference mezi nominální a vypočtenou koncentrací analytu v kalibračních vzorcích za použití obou MRM přechodů (1. pík).

Nominální koncentrace [µg/l]	Kvantifikační MRM přechod 379→160			Kontrolní MRM přechod 379→220		
	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
2	1,75	-13	Max. ±20 %	Vyloučeno	>±20 %	Max. ±20 %
5	4,71	-5,7				
10	8,94	-11				
15	15,8	5,3	Max. ±15 %	14,1	-5,8	Max. ±15 %
20	18,9	-5,7		20,1	0,47	
50	51,6	3,2		53,3	6,6	
100	95,6	-4,4		93,1	-6,9	
150	146	-2,5		151	0,7	

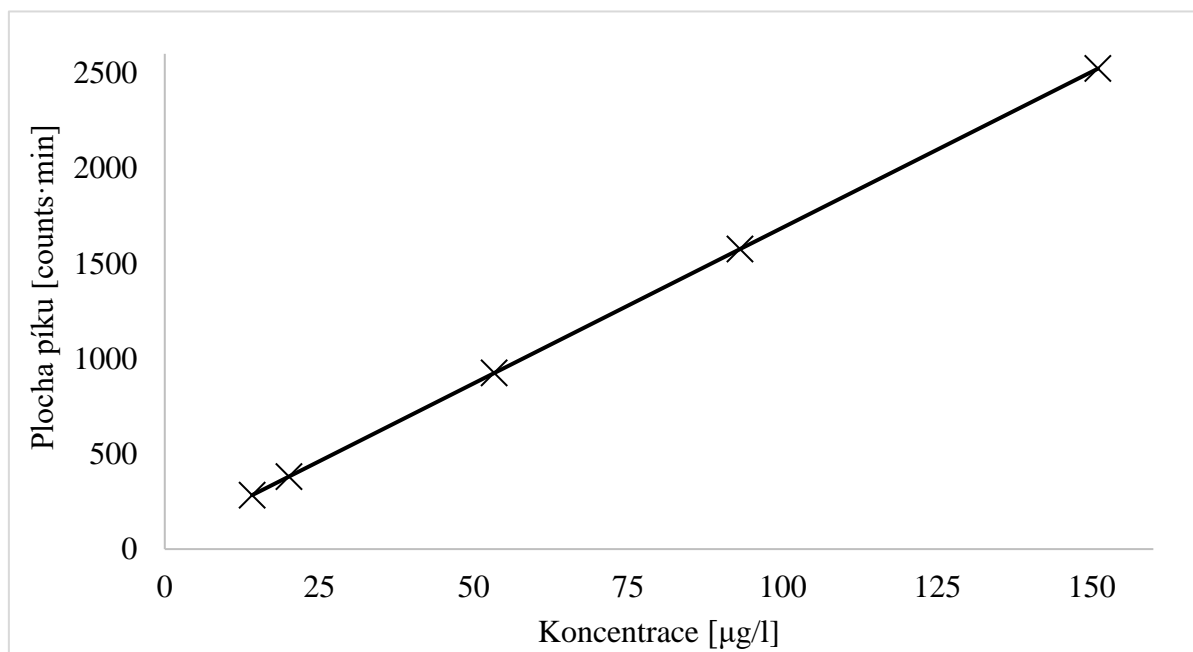
Vzájemná diference mezi vypočtenou koncentrací v kalibračních vzorcích (pro 1. pík) pomocí MRM přechodů 379→160 a 379→220 byla v rozmezí od -11 do 6,6 % (viz Tab. 22 v Příloze Ch).

Kalibrační křivka pro kvantifikační MRM přechod 379→160 1. píku, zobrazena na Obr. 12, byla určena rovnicí ve tvaru  $y = 14,72 + 24,52x$  s koeficientem determinace  $R^2 = 0,9965$ .



**Obr. 12:** Kalibrační křivka pro rozsah 2–150 µg/l pro RP  
(kvantifikační MRM přechod 379→160, 1. píku).

Kalibrační křivka, pro kontrolní MRM přechod 379→220 1. píku, zobrazena na Obr. 13, byla určena rovnicí ve tvaru  $y = 52,05 + 16,36x$  s koeficientem determinace  $R^2 = 0,9966$ .



**Obr. 13:** Kalibrační křivka pro rozsah 15–150 µg/l pro RP  
(kontrolní MRM přechod 379→220, 1. píku).

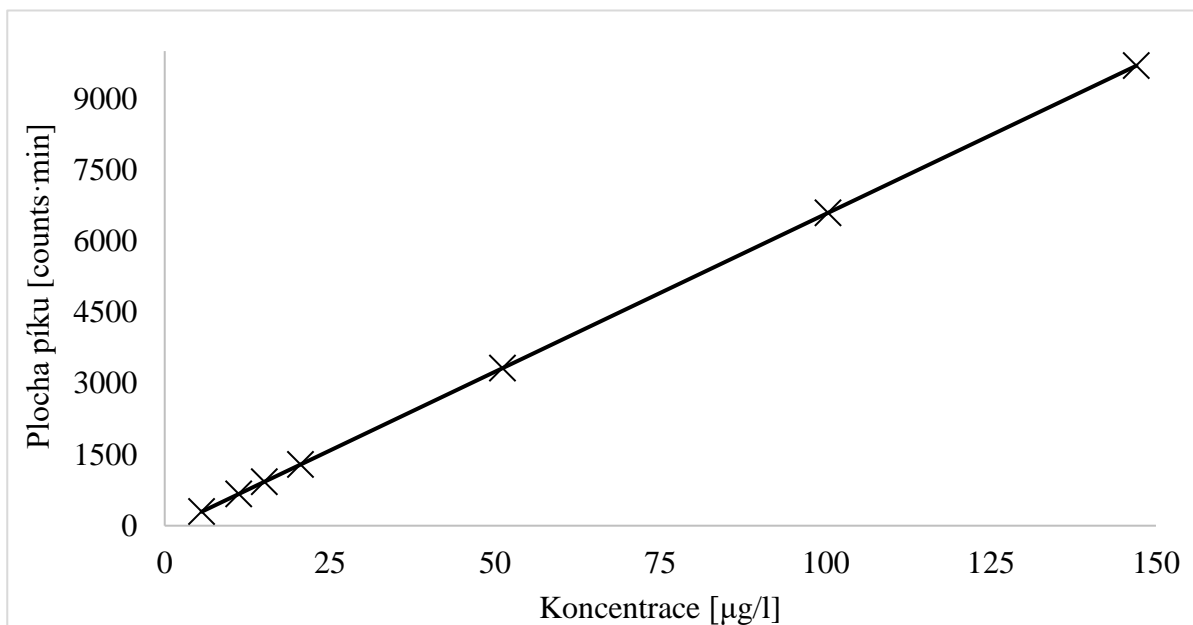
V Tab. 15 jsou shrnuty výsledky pro oba MRM přechody 2. píku. Kvůli nesplnění kritéria přijatelnosti bylo nutné vyloučit pro oba MRM přechody druhou nejnižší koncentraci, tj. 2 µg/l. Navíc pro kontrolní MRM přechod bylo dále nutné vyloučit i koncentrační úroveň 5 µg/l.

**Tab. 15:** Diference mezi nominální a vypočtenou koncentrací analytu v kalibračních vzorcích za použití obou MRM přechodů (2. pík).

Nominální koncentrace [µg/l]	Kvantifikační MRM přechod 379→160			Kontrolní MRM přechod 379→220		
	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
5	5,59	-5,7	Max. ±20 %	Vyloučeno	>±20 %	Max. ±20 %
10	11,2	-11	Max. ±15 %	11,5	15	Max. ±15 %
15	15,1	5,3		16,8	12	
20	20,6	-5,7		20,8	4,0	
50	51,1	3,2		49,7	-0,6	
100	100	-4,4		90,5	-9,5	
150	147	-2,5		157	4,7	

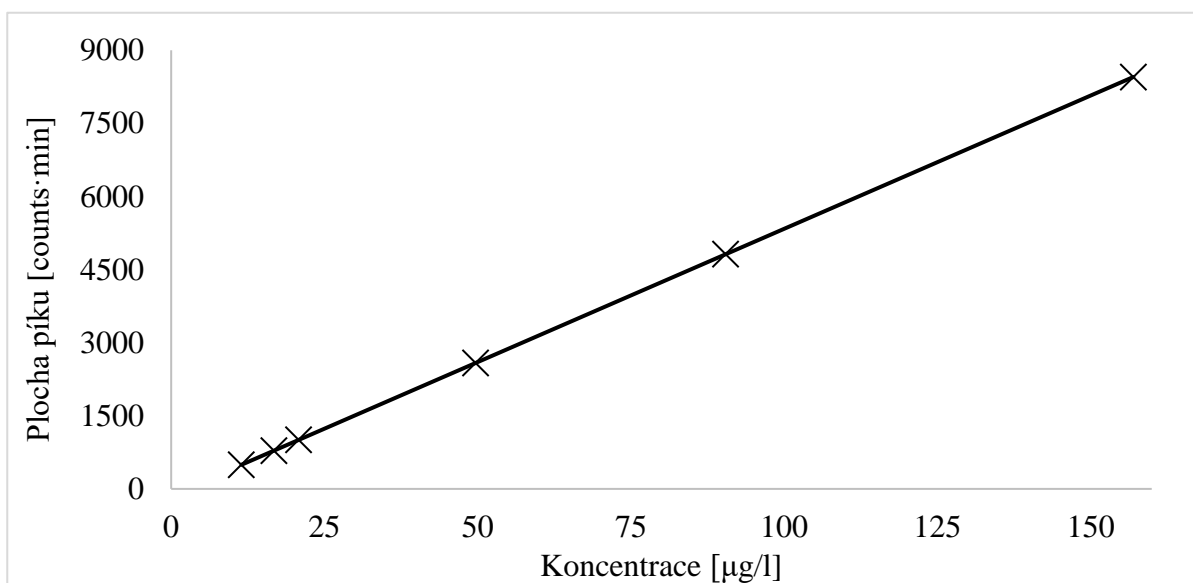
Vzájemná diference mezi vypočtenou koncentrací v kalibračních vzorcích (pro 2. pík) pomocí MRM přechodů 379→160 a 379→220 byla v rozmezí od -9,9 do 11 % (viz Tab. 23 v Příloze Ch).

Kalibrační křivka, pro kvantifikační MRM přechod 379→160 2. píku, zobrazena na Obr. 14, byla určena rovnicí ve tvaru  $y = -76,76 + 66,43x$  s koeficientem determinace  $R^2 = 0,9940$ .



**Obr. 14:** Kalibrační křivka pro rozsah 5–150 µg/l pro RP  
(kvantifikační MRM přechod 379→160, 2. píku).

Kalibrační křivka, pro kontrolní MRM přechod 379→220 2. píku, zobrazena na Obr. 15, byla určena rovnicí ve tvaru  $y = -131,79 + 54,67x$  s koeficientem determinace  $R^2 = 0,9939$ .



**Obr. 15:** Kalibrační křivka pro rozsah 10–150 µg/l pro RP  
(kontrolní MRM přechod 379→220, 2. píku).

#### 4.4.1.2. Správnost a přesnost

Hodnocení správnosti a přesnosti bylo provedeno na všech koncentračních úrovních pokrývající celý rozsah kalibrační křivky, přičemž každá koncentrační úroveň byla provedena ve 4 nezávislých opakováních. Procentuální diference byla vypočtena jak pro každé opakování, tak i jako aritmetický průměr pro každou koncentrační úroveň. Tyto průměrné hodnoty procentuální diference spolu s RSD jsou uvedeny pro první pík v Tab. 16 a pro druhý pík v Tab. 17, přičemž v tabulkách jsou uvedeny vypočtené hodnoty pomocí obou MRM přechodů. Vypočtené hodnoty splňují kritéria přijatelnosti pro dané koncentrační úrovně, s výjimkou v kontrolním MRM přechodu v druhém píku, kde není splněno kritérium přesnosti pro koncentrační úroveň 10 µg/l (pro tento MRM přechod se zužuje koncentrační rozsah na 15–150 µg/l). V Příloze Ch lze najít pro první pík Tab. 24, pro druhý pík Tab. 25, ve kterých jsou vypsány vypočtené koncentrace pro jednotlivé QC vzorky s jednotlivými diferenciemi pro každý vzorek vypočtené pomocí obou MRM přechodů. Dále jsou v Příloze Ch uvedeny Tab. 26 (pro první pík) a Tab. 27 (pro druhý pík), ve kterých byla vypsána vzájemná diference QC vzorků mezi vypočtenou koncentrací pomocí MRM přechodů 379→160 a 379→220 (diference počítána jen na té koncentrační úrovni, kde obě metody splňují daná kritéria).

**Tab. 16:** Průměrná diference a RSD v QC vzorcích pro oba MRM přechody (1. pík).

Nominální koncentrace [µg/l]	Kvantifikační MRM přechod 379→160			Kontrolní MRM přechod 379→220		
	Správnost [%]	Přesnost [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
2	-6,8	11	Max. ±20 %	Vyloučeno	>±20 %	Max. ±20 %
5	1,1	4,9	Max. ±15 %			
10	-1,8	8,7				
15	1,5	7,0				
20	2,1	3,5				
50	0,3	3,7				
100	2,2	2,9				
150	-0,5	1,6		2,9	2,1	Max. ±15 %



**Tab. 17:** Průměrná diference a RSD v QC vzorcích pro oba MRM přechody (2. pík).

Nominální koncentrace [µg/l]	Kvantifikační MRM přechod 379→160			Kontrolní MRM přechod 379→220		
	Správnost [%]	Přesnost [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
5	20	1,0	Max. ±20 %	Vyloučeno	>±20 %	Max. ±20 %
10	7,8	3,3	Max. ±15 %	26	3,5	Max. ±15 %
15	9,0	3,5		14	2,6	
20	7,6	2,3		8,1	1,0	
50	-2,6	2,3		-1,5	1,1	
100	-4,8	3,8		-4,4	2,9	
150	3,7	1,7		0,9	1,9	

#### 4.4.1.3. Rozsah

Na základě kalibračních standardů a z toho odvozené kalibrační přímky, výsledků správnosti a přesnosti QC vzorků bylo potvrzeno, že vytvořená analytická metoda poskytuje výsledky s dostatečnou správností a přesností pro rozsah koncentrací analytu 2–150 µg/l pro 1. eluovaný pík se spodní mezí kvantifikace 2 µg/l a pro 2. eluovaný pík 5-150 µg/l se spodní mezí kvantifikace 5 µg/l.

#### 4.4.2. Validace metody HILIC

##### 4.4.2.1. Kalibrační křivka a rozsah

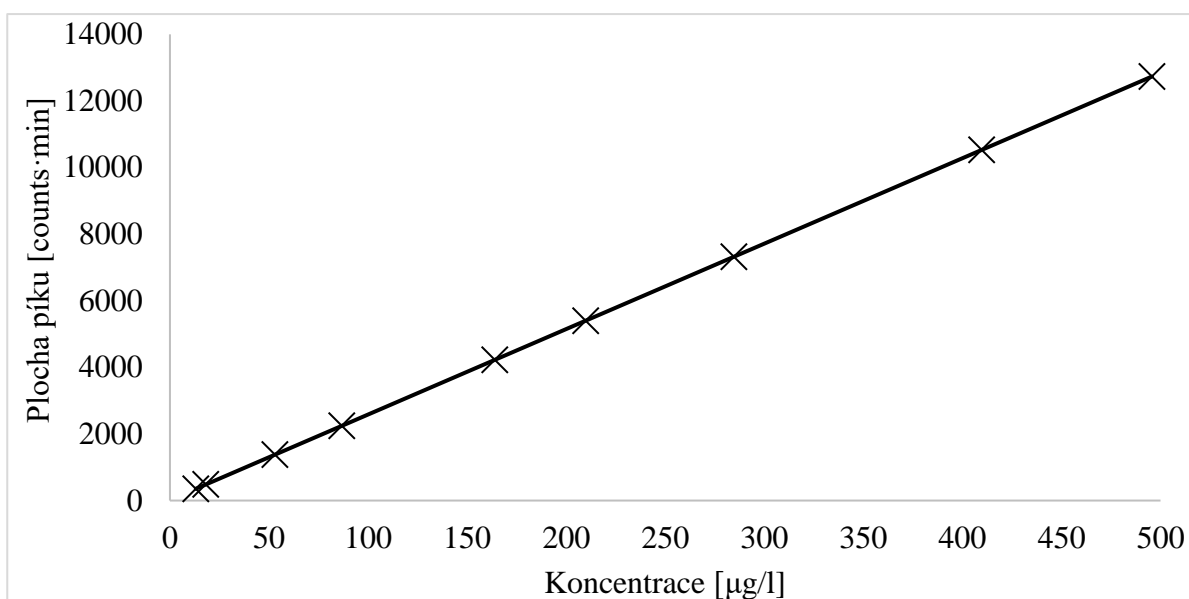
Rozsah testovaných koncentrací analytu byl stanoven v rozmezí 5–500 µg/l. Kvůli nesplnění kritéria přijatelnosti bylo nezbytné vyloučit dvě nejnižší koncentrace, konkrétně 5 µg/l a 10 µg/l. V Tab. 18 jsou shrnuty nominální a vypočtené koncentrace karbencilinu a jejich vzájemná procentuální diference jak pro kvantifikační (379→204) tak i pro kontrolní (379→238) MRM přechod. Výsledky uvedené v Tab. 18. prokazují, že kritérií přijatelnosti bylo dosaženo ve stejném rozsahu 15–500 µg/l.

**Tab. 18:** Diference mezi nominální a vypočtenou koncentrací analytu v kalibračních vzorcích za použití obou MRM přechodů.

Nominální koncentrace [µg/l]	Kvantifikační MRM přechod 379→204			Kontrolní MRM přechod 379→238		
	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
15	13,0	-13	Max. ±20 %	13,5	-10	Max. ±20 %
20	18,1	-9,6	Max. ±15 %	18,4	-7,9	Max. ±15 %
50	53,1	6,1		54,3	8,5	
100	86,7	-13		90,0	-10	
150	164	9,3		167	11	
200	210	5,0		205	2,4	
300	285	-5,1		279	-7,1	
400	410	2,5		406	1,5	
500	496	-0,86		503	0,55	

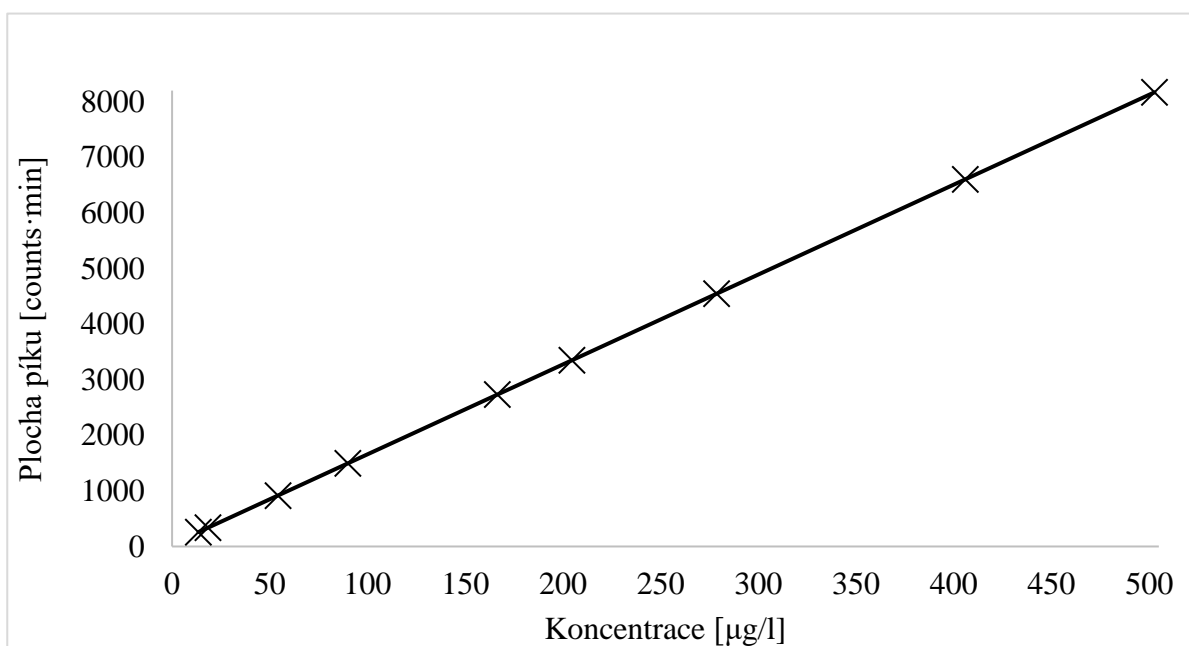
Výjimečná spolehlivost metody je potvrzena i na základě vzájemné procentuální diference mezi vypočtenou koncentrací v kalibračních vzorcích pomocí obou MRM přechodů 379→204 a 379→238, jenž se pohybovala ve velice úzkém rozmezí od -2,5 % do +3,5 % (viz Tab. 28 v Příloze I).

Kalibrační křivka pro kvantifikační MRM přechod 379→204 je zobrazena na Obr. 16 a byla určena rovnicí ve tvaru  $y = 17,88 + 25,65x$  s koeficientem determinace  $R^2 = 0,9965$ .



**Obr. 16:** Kalibrační křivka pro rozsah 15–500 µg/l pro HILIC (kvantifikační MRM přechod 379→204).

Kalibrační křivka pro kontrolní MRM přechod 379→238 je zobrazena na Obr. 17 a byla určena rovnicí ve tvaru  $y = 40,69 + 16,17x$  s koeficientem determinace  $R^2 = 0,9965$ .



**Obr. 17:** Kalibrační křivka pro rozsah 15–500 µg/l pro HILIC (kontrolní MRM přechod 379→238).

#### 4.4.2.2. Přesnost a správnost

Hodnocení správnosti a přesnosti bylo opět provedeno na všech koncentračních úrovních pokrývající celý rozsah kalibrační křivky, přičemž každá koncentrační úroveň byla provedena ve 4 nezávislých opakováních. Procentuální diference byla vypočtena jak pro každé opakování, tak i jako aritmetický průměr pro každou koncentrační úroveň. Tyto průměrné hodnoty procentuální diference spolu s RSD jsou uvedeny v Tab. 19 pro oba MRM přechody. Všechny vypočtené hodnoty splňují kritéria přijatelnosti. V Příloze I lze najít Tab. 29, kde jsou vypsány vypočtené koncentrace pro jednotlivé QC vzorky s jednotlivými diferenciemi pro každý QC vzorek (pro oba MRM přechody). Dále v Příloze I je uvedena Tab. 30, kde byla vypsána vzájemná diference QC vzorků mezi vypočtenou koncentrací pomocí MRM přechodů 379→204 a 379→238.

**Tab. 19:** Průměrná diference a RSD v QC vzorcích pro oba MRM přechody.

Nominální koncentrace [µg/l]	Kvantifikační MRM přechod 379→160			Kontrolní MRM přechod 379→220		
	Správnost [%]	Přesnost [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
15	-13	0,93	Max. ±20 %	-3,2	14	Max. ±20 %
20	-8,4	4,9	Max. ±15 %	-11	11	Max. ±15 %
50	-12	2,9		-10	12	
100	-6,3	6,9		-9,5	6,3	
150	-3,7	2,2		-2,6	1,7	
200	-2,4	8,1		-3,4	6,6	
300	-5,5	10		-4,1	9,6	
400	-3,3	3,1		-4,1	4,8	
500	4,7	1,7		4,3	2,2	

#### 4.4.2.3. Rozsah

Na základě výsledků hodnocení kalibrační křivky, správnosti a přesnosti bylo potvrzeno, že vytvořená analytická metoda pro systém HILIC poskytuje výsledky s dostatečnou správností a přesností pro rozsah koncentrací analytu 15–500 µg/l, s dolní mezí kvantifikace 15 µg/l.

## 4.5. Sumarizace dosažených výsledků a porovnání s ostatními studii

V porovnání s nově vyvinutými analytickými metodami uvedenými v Kap. 2.4. bylo dosaženo podobného rozsahu metody a mezí kvantifikace, ačkoliv v diskutovaných pracích [32,33] byly kromě karbenicilinu stanovovány i další látky, a navíc v komplexních biologických matricích, kde bylo ještě potřeba analyty ze vzorků extrahovat. V těchto metodách byl též shodně použit prekurzorový ion o specifické hmotnosti 379 m/z, který poskytoval nejintenzivnější signál. Ve studii [33] byly identicky použité i kvantifikační a kontrolní MRM přechody pro RP systém (379→160 a 379→220). Při srovnání se spektrální metodou SERS [34] sice nebylo dosaženo tak širokého rozsahu metody, ale bylo dosaženo nižšího kvantifikačního limitu (pouze pro RP systém), což je pro plánované použití této metody žádoucí. Tato spektrální metoda má oproti uvedeným LC-MS metodám výhodu v kratší době analýzy, širšímu rozsahu kalibrace (4,22 µg/l–0,42 g/l) i v méně nákladné analýze, ale umožňuje stanovení pouze jednoho analytu [34].

Metoda využívající separaci v RP systému, s ohledem za použití metanolových fází a vysoce účinných chromatografických kolon [17] umožňovala separaci obou diastereomerních forem karbenicilinu, což by mohlo být budoucnu využito ve výzkumu týkajícího se jedné a/nebo druhé formy. I přestože docházelo k eluci dvou pík, poskytl tento systém pro obě formy nižší kvantifikační limity, které byly vyžadovány pro navazující experiment s biologicky aktivními vrstvami. Rozsah této metody (2–150 µg/l pro 1. eluovaný pík) se velmi blížil k rozsahu (1–200 µg/l) z nejnovější studie pro stanovení karbenicilinu a dalších antibiotik pomocí LC-MS [33].

Při vývoji a optimalizaci druhé metody využívající HILIC systém se tato volba jevila jako efektivnější, jelikož docházelo k eluci obou forem karbenicilinu v jednom píku, což napomohlo dosažení nejnižší instrumentální meze kvantifikace (0,8 µg/l) v rámci této práce. Bohužel na základě nutnosti ředění vzorku rozpouštědlem s nižší eluční silou a následné validace, musel být rozsah metody stanoven na 15–500 µg/l. Tento rozsah se téměř shoduje s rozsahem metody ze studie [32], kde byl stanoven na 1–500 µg/l. V obou metodách byl použit i shodný MRM přechod 379→238, přičemž v této práci byl použit jako kontrolní, zatímco ve studii [32] jako kvantifikační. Oproti RP systému bylo dosaženo širšího rozsahu a přibližně o 30 % kratší doby analýzy. Nevýhodou byla dlouhá kondicionace kolony v řádu hodin, vysoká spotřeba acetonitrilu (téměř 1 ml/min) i aditiv do mobilní fáze v LC-MS kvalitě.

S ohledem na výše uvedené výhody a nevýhody je vhodnější metodou pro zamýšlené účel metoda využívající RP systém.

## 5. Závěr

V rámci teoretické části práce byly souhrnně prezentovány základní informace týkající se beta-laktamových antibiotik, s podrobným popisem disodné soli karbenicilinu. Také byl vysvětlen princip chromatografie na reversních fázích a hydrofilní interakční chromatografie, jejich výhody i nevýhody, včetně spojení s hmotnostní detekcí, s důrazem na použitou techniku ionizace HESI a hmotnostní analyzátor LIT. V závěru této části práce bylo provedeno srovnání analytických metod, které se zabývaly stanovením karbenicilinu.

V rámci experimentální části byla provedena optimalizace chromatografické separace a hmotnostní detekce pro systémy RP i HILIC. Za optimálních podmínek pro každý chromatografický systém byla provedena základní validace obou analytických metod, která vycházela z požadavků Evropské agentury pro léčivé přípravky (EMA) uvedených v dokumentu M10 Validace bioanalytických metod. V případě metody využívající systém RP bylo dosaženo separace obou diastereomerních forem analytu, takže validace metody byla provedena pro každou formu zvlášť, a to pro kvantifikační MRM přechod 379→160 (shodný pro obě formy). Širšího rozsahu (2–150 µg/l) i nižší hodnoty dolní meze kvantifikace bylo dosaženo v případě diastereomeru eluovaného v retenčním čase 3,0 min. Druhý diastereomer eluovaný v retenčním čase 3,7 min sice vykazoval vyšší S/N, ale na koncentrační úrovni 2 µg/l nebylo dosaženo požadovaného kritéria přijatelnosti, takže rozsah pro tuto formu činil 5–150 µg/l. V případě HILIC systému byl již analyt eluován v jedné formě v retenčním čase 2,3 min za použití kvantifikačního MRM přechodu 379→204. Díky této skutečnosti a lepší kompatibilitě chromatografických podmínek bylo sice dosaženo nejnižší instrumentální meze kvantifikace 0,8 µg/l, ale s ohledem na zamýšlené použití analýz vodných roztoků bylo následně nutné tento vodný roztok z důvodu jeho vysoké eluční síly 10x ředit acetonitrilem. Tím bohužel došlo k významnému zvýšení dolní meze kvantifikace a po následném zohlednění výsledku, který na koncentrační úrovni 10 µg/l nevyhovoval danému kritériu přijatelnosti max. ±20 %, musela být zvýšena dolní mez kvantifikace až na 15 µg/l. Na základě zjištěných validačních parametrů lze tedy konstatovat, že vhodnější metodou pro stanovení karbenicilinu ve vodných vzorcích je metoda využívající RP systém při použití MRM přechodu 379→160.

Využití této metody pro hodnocení vhodnosti různých postupů příprav biologicky aktivních tenkých vrstev uvolňujících karbenicilin do vody však již bohužel nebylo realizováno, protože výzkum v této oblasti byl z důvodu nástupu pandemie COVID-19 v závěrečné fázi této kvalifikační práce bez náhrady ukončen.

## 6. Citovaná literatura

- [1] Nelson, M. L.; Dinardo, A.; Hochberg, J.; Armelagos, G. J. Brief Communication: Mass Spectroscopic Characterization of Tetracycline in the Skeletal Remains of an Ancient Population from Sudanese Nubia 350–550 CE. *American Journal Physical Anthropology*, **2010**, *143* (1), 151–154. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21340>.
- [2] Pelczar, R. M.; Pelczar, M. J. mikrobiologie [online]. *Encyclopedia Britannica*, **2023**, červen 26. [cit. 2023-09-25]. Dostupné na: <https://www.britannica.com/>.
- [3] Ostrý V.; Kýrová V. Příběh jedné plísně – „Penicillium notatum“ a objev penicilinu [online]. *Státní zdravotní ústav v Praze, Centrum zdraví, výživy a potravin v Brně*, **2019** [cit. 2022-12-15]. Dostupné na: <https://docplayer.cz/143418416-Pribeh-jedne-plisne-penicillium-notatum-a-objev-penicilinu.html>.
- [4] Švihovec, J.; Bultas, J.; Anzenbacher, P.; Chládek, J.; Příborský, J.; Votava, M.; Slíva, J. Farmakologie. 1. vyd. Praha: *Grada Publishing*, **2018**. 912 (33). ISBN 978-80-247-5558-8.
- [5] Antibiotic resistance [online]. *World Health Organization*, **2023** [cit. 2023-09-25]. Dostupné na: <https://www.who.int/>.
- [6] Rottenbornová, D. Lékařská mikrobiologie, část obecná [online]. *Fakulta zdravotnických studií ZČU v Plzni*. 87 (62–63), **2009**. [cit. 2023-01-15]. Dostupné na: <https://adoc.pub/lekaska-mikrobiologie>.
- [7] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Wehling M. Farmakologie a toxikologie. 2. vyd. Praha: *Grada Publishing*, **2004**. 728 (471–479). ISBN 80-247-0836-1.
- [8] Beneš, J. Antibiotika – systematika, vlastnosti, použití. 1. vyd. Praha: *Grada Publishing*, **2018**. 600 (112-113) ISBN 978-80-271-0636-3.
- [9] Wright, A. J.; Wilkowske, C. J. The Penicillins. *Mayo Clinic Proceedings*, **1991**, *66* (10), 1047–1063. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(12\)61730-3](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(12)61730-3).
- [10] LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Penicillins (1st/2nd/3rd/4th Generation) [online]. *Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*, **2012**. [cit. 2023-02-19]. PMID: 31643176. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>.
- [11] PubChem Compound Summary for CID 16760335, Carbenicillin (disodium) [online]. *National Center for Biotechnology Information*, **2004**. [cit. 2023-03-17]. Dostupné na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.

- [12] Piskač, P.; Chalupová, M.; Prokopcová, Š. Carbenicillinum natricum [online]. *Český lékopis*, **1999** [cit. 2023-02-02]. Dostupné na: <http://lekopis.cz/>.
- [13] Carbenicillin (Disodium) [online]. *Goldbio* (bez data). [cit. 2023-03-17]. Dostupné na: <https://goldbio.com/>.
- [14] Gifford, D. R.; Furió, V.; Papkou, A.; Vogwill, T.; Oliver, A.; MacLean, R. C. Identifying and Exploiting Genes That Potentiate the Evolution of Antibiotic Resistance. *Nature Ecology & Evolution*, **2018**, 2 (6), 1033–1039. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0547-x>.
- [15] Papandreou, S.; Pagonopoulou, O.; Vantarakis, A.; Papapetropoulou, M. Multiantibiotic Resistance of Gram-Negative Bacteria Isolated from Drinking Water Samples in Southwest Greece. *Journal of Chemotherapy*, **2000**, 12 (4), 267–273. <https://doi.org/10.1179/joc.2000.12.4.267>.
- [16] Carbenicillin disodium [online]. *Duchefa Biochemie* (bez data). [cit. 2023-12-1]. Dostupné na: <https://www.duchefa-biochemie.com/>.
- [17] Twomey, P. A. High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Carbenicillin and Its Degradation Products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1981**, 70 (7), 824–826. <https://doi.org/10.1002/jps.2600700736>.
- [18] Castle, S. S. Carbenicillin. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*; Elsevier, **2007**; 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61381-9>.
- [19] Vávrová, V.; Bartošová, J.; Fila, L. Možnosti léčby cystické fibrózy – 1. část [online]. *Klinická farmakologie a farmacie*, **2007**. [cit. 2023-04-18]. Dostupné na: <https://www.klinickafarmakologie.cz/>.
- [20] Drbal, K.; Křížek, M. Analytická chemie. 1. vyd. České Budějovice: *Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta*, **1999**. 186 (136–139, 158–163, 169–173). ISBN 80-7040-352-7.
- [21] Meyer, V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 5. vyd. USA: *John Wiley & Sons Inc*, **2010**. 432 (173, 181–182). ISBN 978-0470-682180.
- [22] Jandera, P. 50 years of high performance liquid chromatography: The contribution of the Department of Analytical Chemistry in Pardubice [online]. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A; Faculty of Chemical Technology* 26, **2020**. 5–66 (14–19). [cit. 2023-09-18]. Dostupné na: <https://dk.upce.cz/>.
- [23] Buszewski, B.; Noga, S. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) – a Powerful Separation Technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**, 402 (1), 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.



- [24] de Hoffmann, E.; Stroobant V. *Mass Spectrometry – Principles and Applications*. 3. vyd. The Atrium, Southern Gate, Chichester: *John Wiley & Sons Ltd*, **2007**. 502 (1–5, 15, 43–54, 88–91, 99, 126–127). ISBN 978-0-470-03311-1.
- [25] Friedecký D.; Lemr K. Úvod do hmotnostní spektrometrie [online]. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **2012**, 20 (41), No. 3, 152–157. [cit. 2023-09-18]. Dostupné na: <https://www.cskb.cz/>.
- [26] Holčapek, M. Ionizační techniky [online]. *Michal Holčapek – Mass Spectrometry Group*, **2022**. [cit. 2023-12-02]. Dostupné na: <https://holcapek.upce.cz/>.
- [27] Liigand, P.; Kaupmees, K.; Haav, K.; Liigand, J.; Leito, I.; Girod, M.; Antoine, R.; Kruve, A. Think Negative: Finding the Best Electrospray Ionization/MS Mode for Your Analyte. *Analytical Chemistry*, **2017**, 89 (11), 5665–5668. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00096>.
- [28] Pitt, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, **2009**, 30 (1), 19–34. PMID: 19224008.
- [29] Holčapek, M. Experimentální metody strukturálního výzkumu [online]. *Michal Holčapek – Mass Spectrometry Group*, **2018**. [cit. 2023-12-02]. Dostupné na: <https://holcapek.upce.cz/>.
- [30] Ishida, M.; Tsuda, Y.; Onuki, Y.; Itoh, T.; Shimada, H.; Yamada, H. Determination of Carbenicillin Epimers in Plasma and Urine with High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **1994**, 652 (1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)E0378-4](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)E0378-4).
- [31] Naidong, W.; Dzerk, A. M.; Lee, J. W. Development and Validation of an LC Method for the Quantitation of Carbenicillin in Human Serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1994**, 12 (6), 845–850. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(94\)80026-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(94)80026-X).
- [32] Chen, D.; Yu, J.; Tao, Y.; Pan, Y.; Xie, S.; Huang, L.; Peng, D.; Wang, X.; Wang, Y.; Liu, Z.; Yuan, Z. Qualitative Screening of Veterinary Anti-Microbial Agents in Tissues, Milk, and Eggs of Food-Producing Animals Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **2016**, 1017–1018, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.02.037>.
- [33] Wu, J.; Guo, E.; Wang, M.; Wang, K.; Ma, L.; Lian, K. Determination of  $\beta$ -Lactam Antibiotics in Animal Derived Foods by Modified QuEChERS Coupled with Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Food*

- Composition and Analysis*, **2023**, *122*, 105437.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105437>.
- [34] Jiang, X.; Chen, Y.; Du, J.; Yang, M.; Shen, Y.; Li, X.; Han, X.; Yang, L.; Zhao, B. SERS Investigation and High Sensitive Detection of Carbenicillin Disodium Drug on the Ag Substrate. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2018**, *204*, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.06.059>.
- [35] Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. SERS Enhancement Factors and Related Topics. *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*; Elsevier, **2009**; 185. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52779-0.00010-6>.
- [36] Kratochvíl, J.; Kahoun, D.; Kylián, O.; Štěrbá, J.; Kretková, T.; Kousal, J.; Hanuš, J.; Vaclová, J.; Prysiazhnyi, V.; Sezemský, P.; Fojtíková, P.; Lieskovská, J.; Langhansová, H.; Krakovský, I.; Straňák, V. Nitrogen Enriched C:H:N:O Thin Films for Improved Antibiotics Doping. *Applied Surface Science*, **2019**, *494*, 301–308. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.07.135>.
- [37] Berruex, L. G.; Freitag, R. Separation and Purification of Biochemicals. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*; Elsevier, **2003**; 651–673. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00683-9>.
- [38] Acclaim 120 C18 Columns [online]. *Thermo Fisher Scientific* (bez data). [cit. 2023-12-01]. Dostupné na: <https://www.thermofisher.com/>.
- [39] Kinetex Core-Shell HILIC HPLC Columns [online]. *Phenomenex*, **2017**. [cit. 2023-12-01]. Dostupné na: <https://www.phenomenex.com/>.
- [40] ICH guideline M10 on bioanalytical method validation [online]. *European Medicines Agency*, **2019**. [cit. 2023-10-18]. Dostupné na: <https://www.ema.europa.eu/en>.

## 7. Seznam použitých zkratk a symbolů

ACN	acetonitril
AmpR	protein rezistence vůči ampicilinu (z angl. ampicillin resistance protein)
API	ionizace za atmosférického tlaku (z angl. atmospheric pressure ionization)
AR	odolnost vůči kyselinám (z angl. acid resistance)
Arb.	relativní veličina určená referenčním měřením (z angl. arbitrary)
BEH	propojený ethylový hybrid (z angl. bridged ethyl hybrid)
CAS	oddělení Americké chemické společnosti spravující databázi chemických sloučenin (z angl. chemical abstracts service)
CID	kolizně indukovaná disociace (z angl. collision-induced dissociation)
C8	oktylová skupina
C18	oktadecylová skupina
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky (z angl. European Medicines Agency)
ESI	ionizace elektrosprejem (z angl. electrospray ionization)
HESI	ionizace vyhřívaným elektrosprejem (z angl. heated electrospray ionization)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (z angl. hydrophilic interaction chromatography)
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha (z angl. hydrophilic-lipophilic balance)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
ICR	iontová cyklotronová rezonance (z angl. ion cyclotron resonance)
IS	vnitřní standard (z angl. internal standard)
IT	iontová past (z angl. ion trap)
LC	kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)
LIT	lineární iontová past (z angl. linear ion trap)
MeOH	metanol
MF	mobilní fáze
MRM	monitorování více reakcí (z angl. multiple reaction monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)

MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (z angl. tandem mass spectrometry)
m/z	poměr hmotnosti iontu ku unifikované atomové hmotnostní jednotce počtem jeho nábojů (bez ohledu na znaménko)
NCE	normalizovaná kolizní energie (z angl. normalized collision energy)
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. nuclear magnetic resonance)
NP	normální fáze (z angl. normal-phase)
ODS	oktadecyl silan
Q	kvadrupólový analyzátor (z angl. quadrupole)
QC	kontrolní (z angl. quality control)
QQQ	trojitý kvadrupól
Q-TOF	kvadrupól s analyzátozem doby letu (z angl. quadrupole-time-of-flight)
QTrap	lineární iontová past
QuEChERS	metoda předúpravy vzorku (z angl. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)
RP	reverzní fáze (z angl. reversed-phase)
RSD	relativní směrodatná odchylka (z angl. relative standard deviation)
RSLC	rychlá kapalinová chromatografie (z angl. rapid separation liquid chromatography)
SB-Aq	stabilní vazba ve vodném prostředí (z angl. stable bond-aqueous)
SERS	povrchem zesílený Ramanův rozptyl (z angl. surface-enhanced Raman scattering)
SF	stacionární fáze
SPE	extrakce na tuhou fázi (z angl. solid phase extraction)
SRM	monitorování vybraných reakcí (z angl. selected reaction monitoring)
S/A	poměr průtoku hlavního a pomocného zmlžovacího plynu (z angl. sheath gas/auxiliary gas)
S/N	poměr signál k šumu
TIC	celkový iontový proud (z angl. total ion current)
TOF	analyzátor doby letu (z angl. time-of-flight)
UAE	extrakce ultrazvukem (z angl. ultrasonic-assisted extraction)
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (z angl. ultra performance liquid chromatography)

UV	ultrafialová oblast spektra
v/v	objemový poměr
XIC	extrahovaný iontový chromatogram (z angl. extracted ion chromatogram)

## 8. Přílohy

### 8.1. Příloha A

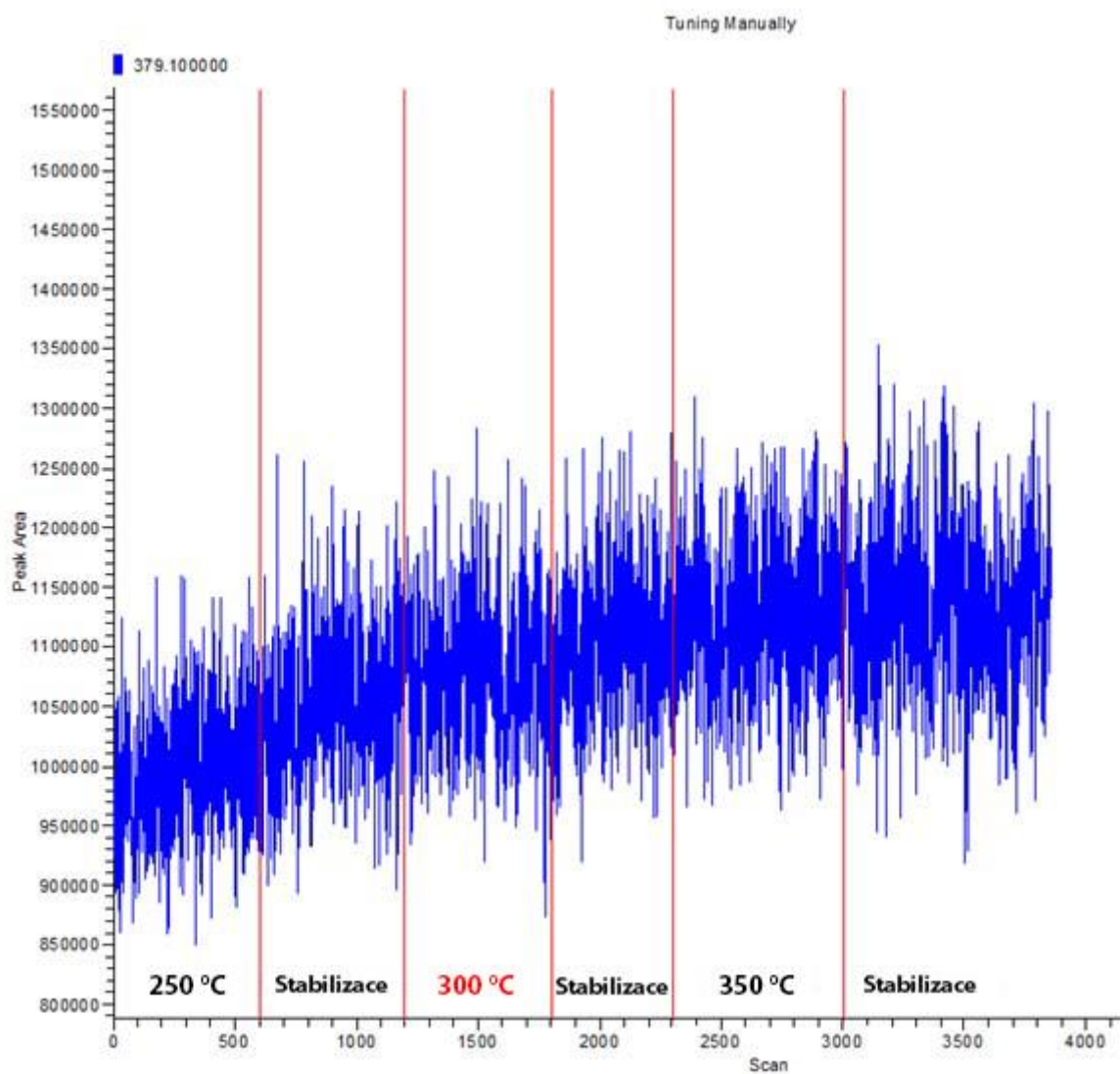
**Tab. 20:** Příprava kalibračních a kontrolních roztoků pro RP.

Koncentrační úroveň	Označení roztoku	Koncentrace karbenicilinu [ $\mu\text{g}/\text{l}$ ]	Objem $\text{ST}_{3\text{RP}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	Objem vody [ $\mu\text{l}$ ]	Celkový objem [ $\mu\text{l}$ ]
1	K1	1	5	995	1000
	QC1a				
	QC1b				
	QC1c				
	QC1d				
2	K2	2	10	990	
	QC2a				
	QC2b				
	QC2c				
	QC2d				
3	K3	5	25	975	
	QC3a				
	QC3b				
	QC3c				
	QC3d				
4	K4	10	50	950	
	QC4a				
	QC4b				
	QC4c				
	QC4d				
5	K5	15	75	925	
	QC5a				
	QC5b				
	QC5c				
	QC5d				
6	K6	20	100	900	
	QC6a				
	QC6b				
	QC6c				
	QC6d				
7	K7	50	250	750	
	QC7a				
	QC7b				
	QC7c				
	QC7d				
8	K8	100	500	500	
	QC8a				
	QC8b				
	QC8c				
	QC8d				
9	K9	150	750	250	
	QC9a				
	QC9b				
	QC9c				
	QC9d				
10	K10	200	1000	0	
	QC10a				
	QC10b				
	QC10c				
	QC10d				

**Tab. 21:** Příprava kalibračních a kontrolních roztoků pro HILIC.

Koncentrační úroveň	Označení roztoku	Koncentrace karbenicilinu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Objem $\text{ST}_{\text{K1-11}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	Objem MF-A [ $\mu\text{l}$ ]	Celkový objem [ $\mu\text{l}$ ]
1	K1	5	100	900	1000
	QC1a				
	QC1b				
	QC1c				
QC1d					
2	K2	10			
	QC2a				
	QC2b				
	QC2c				
QC2d					
3	K3	15			
	QC3a				
	QC3b				
	QC3c				
QC3d					
4	K4	20			
	QC4a				
	QC4b				
	QC4c				
QC4d					
5	K5	50			
	QC5a				
	QC5b				
	QC5c				
QC5d					
6	K6	100			
	QC6a				
	QC6b				
	QC6c				
QC6d					
7	K7	150			
	QC7a				
	QC7b				
	QC7c				
QC7d					
8	K8	200			
	QC8a				
	QC8b				
	QC8c				
QC8d					
9	K9	300			
	QC9a				
	QC9b				
	QC9c				
QC9d					
10	K10	400			
	QC10a				
	QC10b				
	QC10c				
QC10d					
11	K11	500			
	QC11a				
	QC11b				
	QC11c				
QC11d					

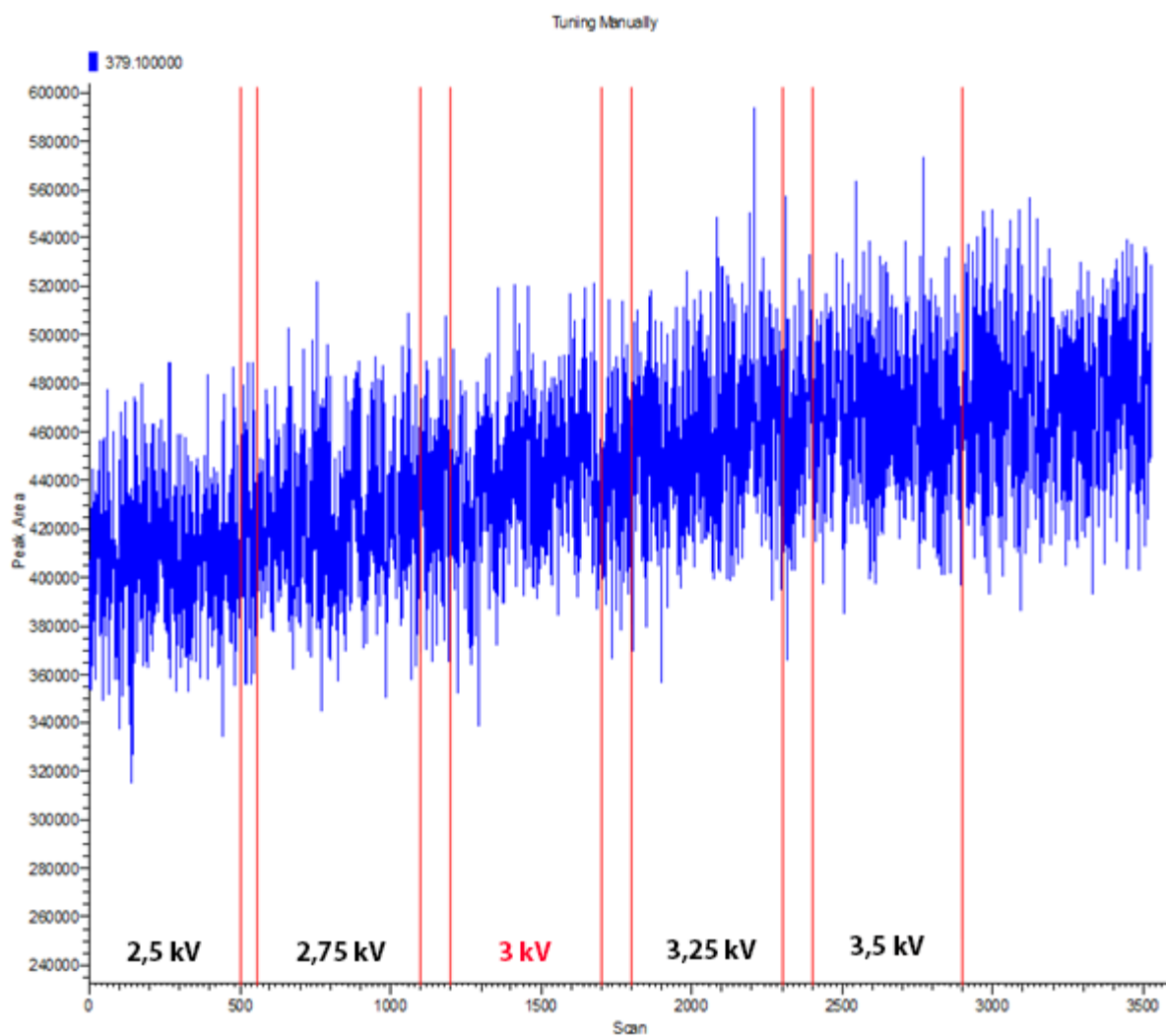
## 8.2. Příloha B



**Obr. 18:** Optimalizace teploty HESI kapiláry (250 °C, 300 °C, 350 °C) pro prekurzorový ion analytu (379,1 m/z).

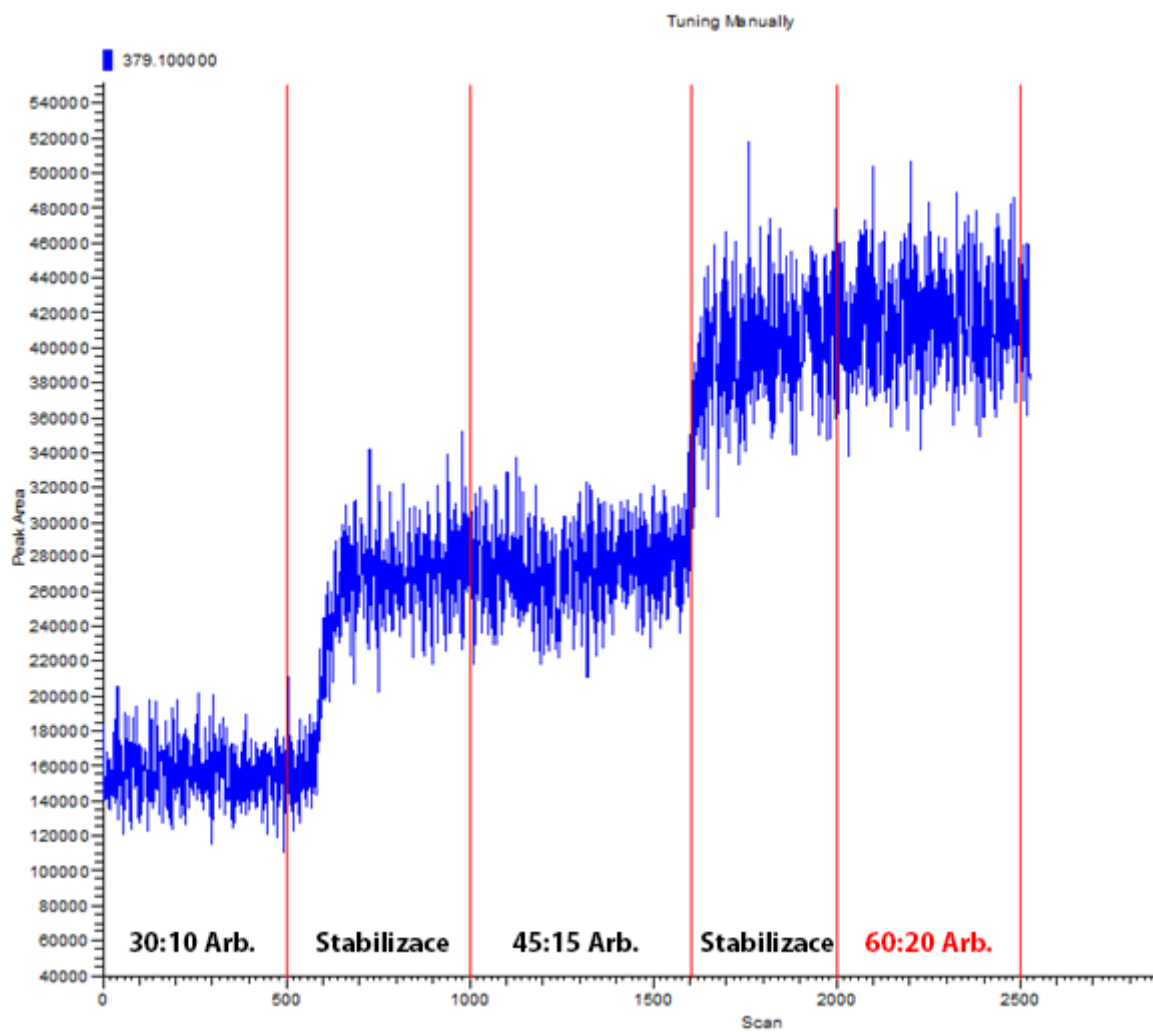


### 8.3. Příloha C



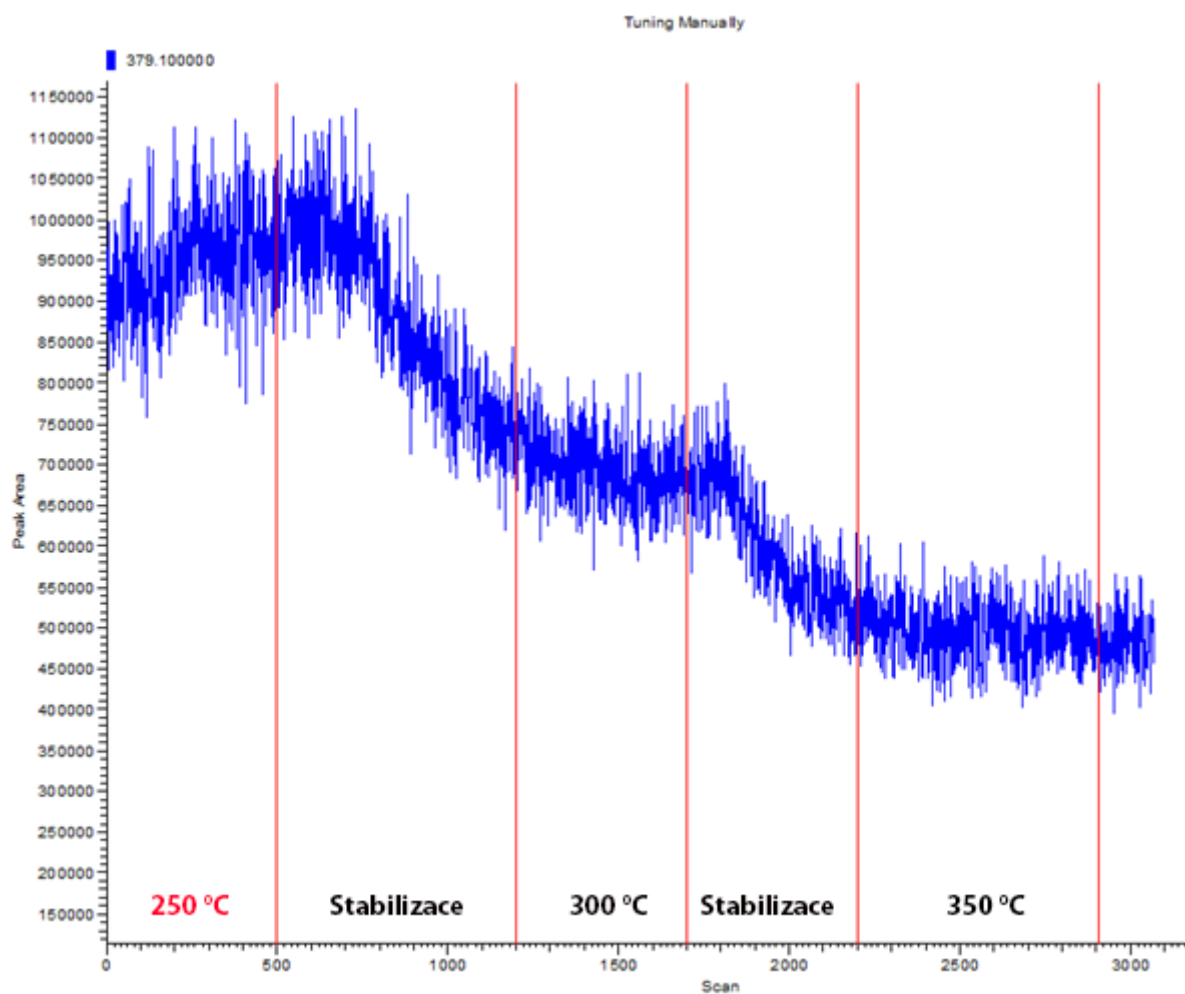
**Obr. 19:** Optimalizace potenciálu HESI kapiláry (2,5 kV; 2,75 kV; 3 kV; 3,25 kV a 3,5 kV) pro prekurzorový ion analytu (379,1 m/z).

## 8.4. Příloha D



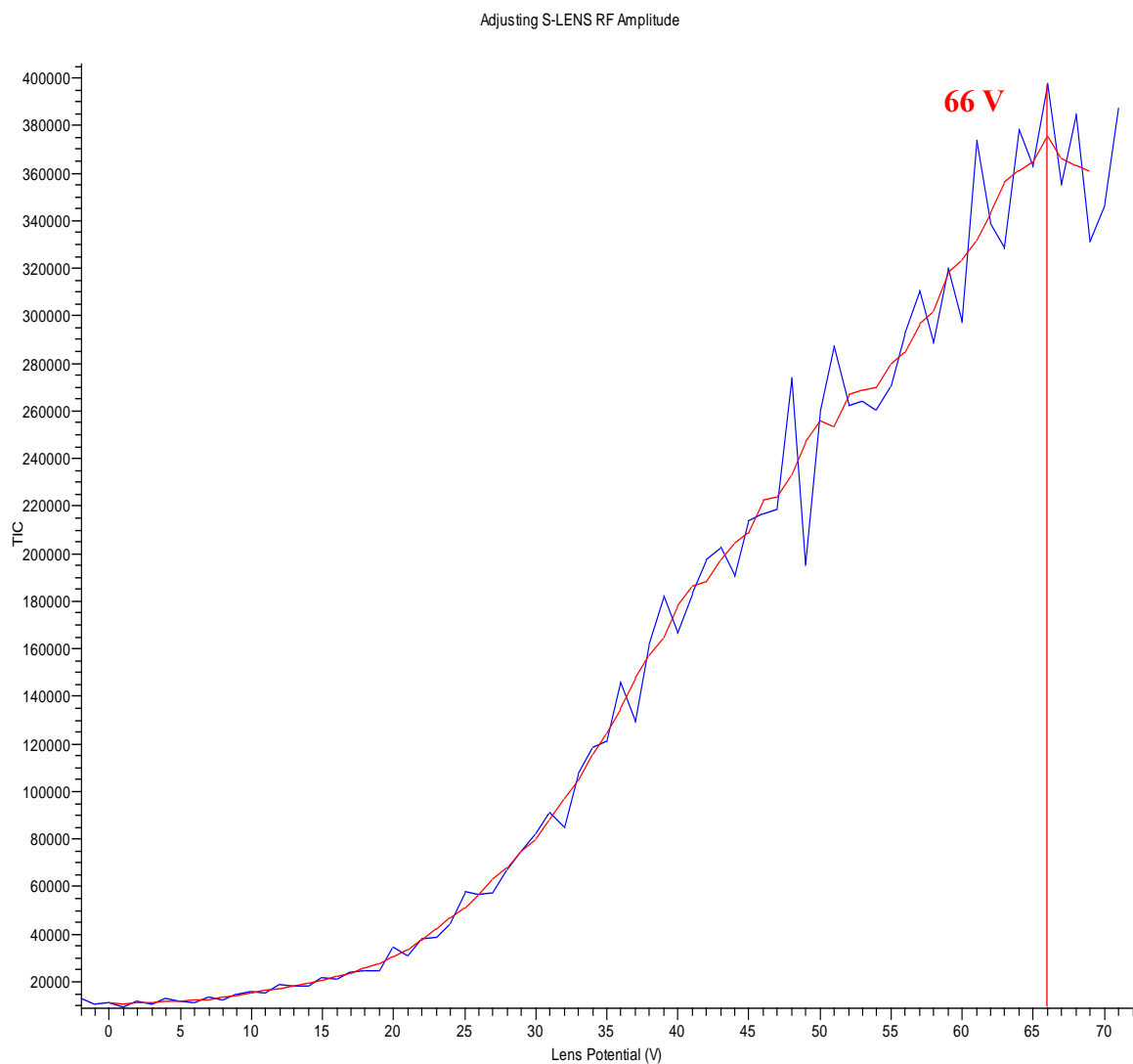
**Obr. 20:** Optimalizace poměru hlavního a pomocného zmlžovacího plynu (30:10, 45:15, 60:20) pro prekurzorový ion analytu (379,1 m/z).

## 8.5. Příloha E



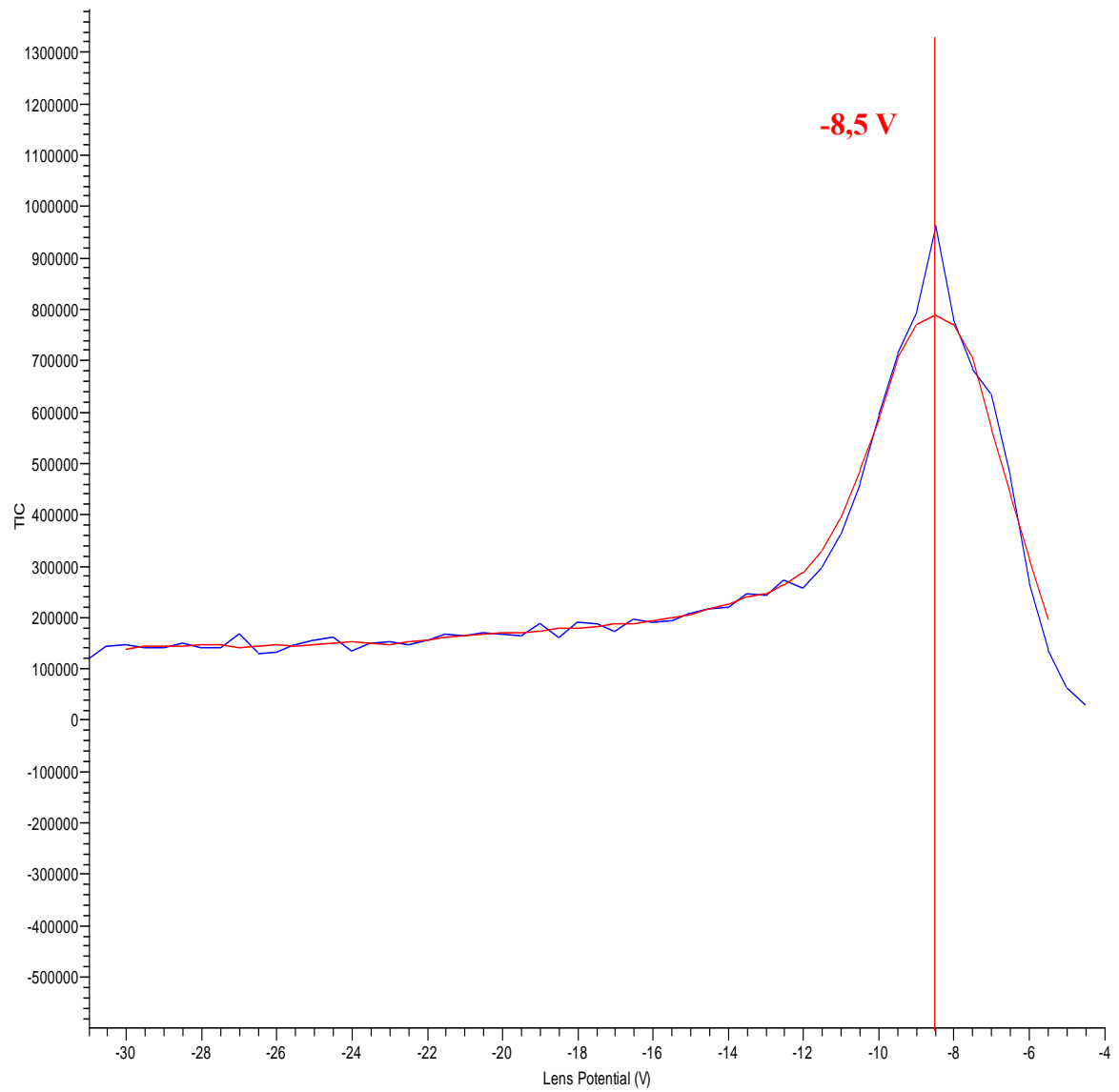
**Obr. 21:** Optimalizace teploty transferové trubice (250 °C, 300 °C, 350 °C) pro prekurzorový ion analytu (379,1 m/z).

## 8.6. Příloha F



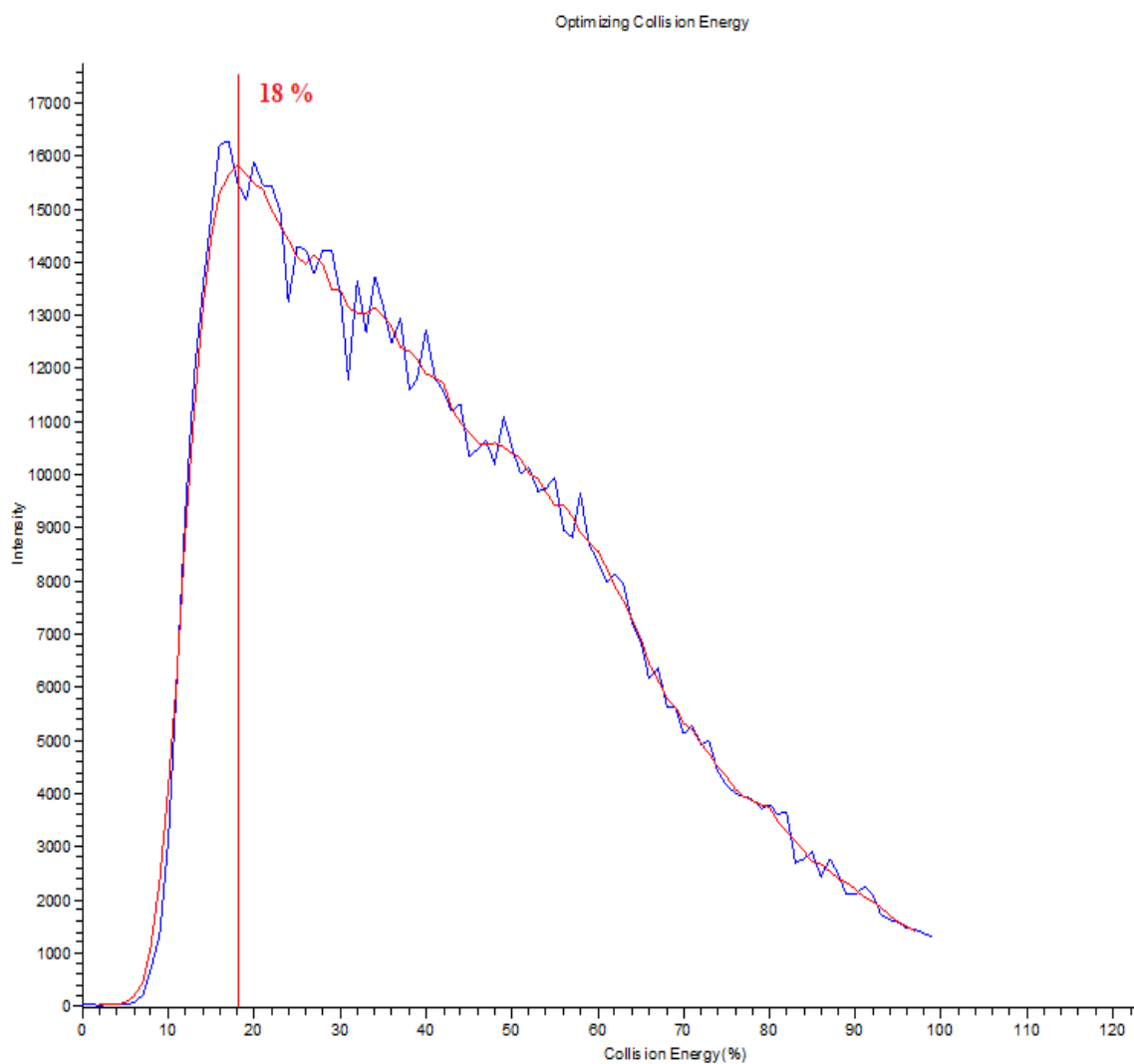
**Obr. 22:** Optimalizace potenciálu S-čoček pro prekurzorový ion analytu (379,1 m/z).

Adjusting Front Lens

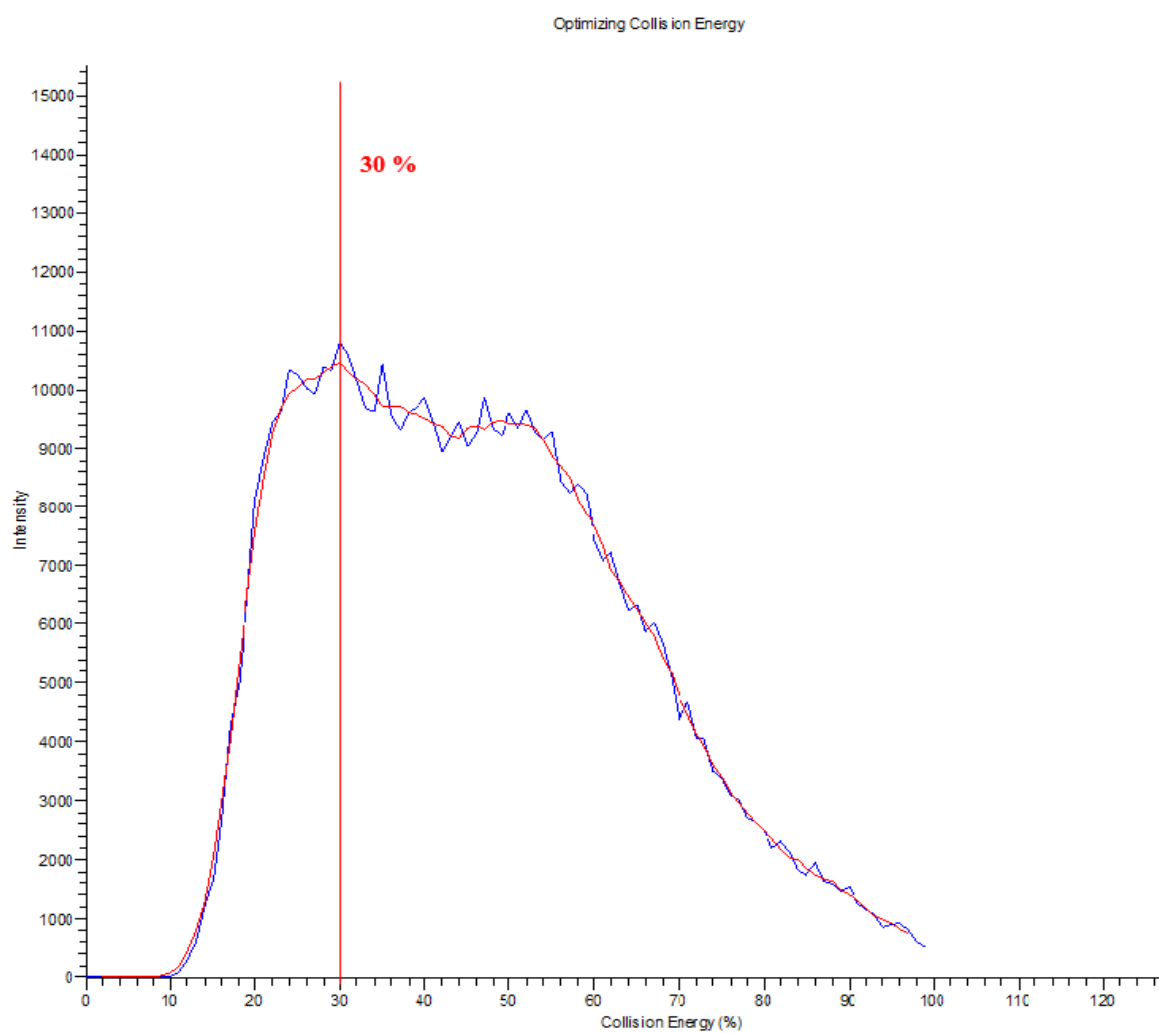


**Obr. 23:** Optimalizace potenciálu F-čoček pro prekurzorový ion analytu (379,1 m/z).

## 8.7. Příloha G

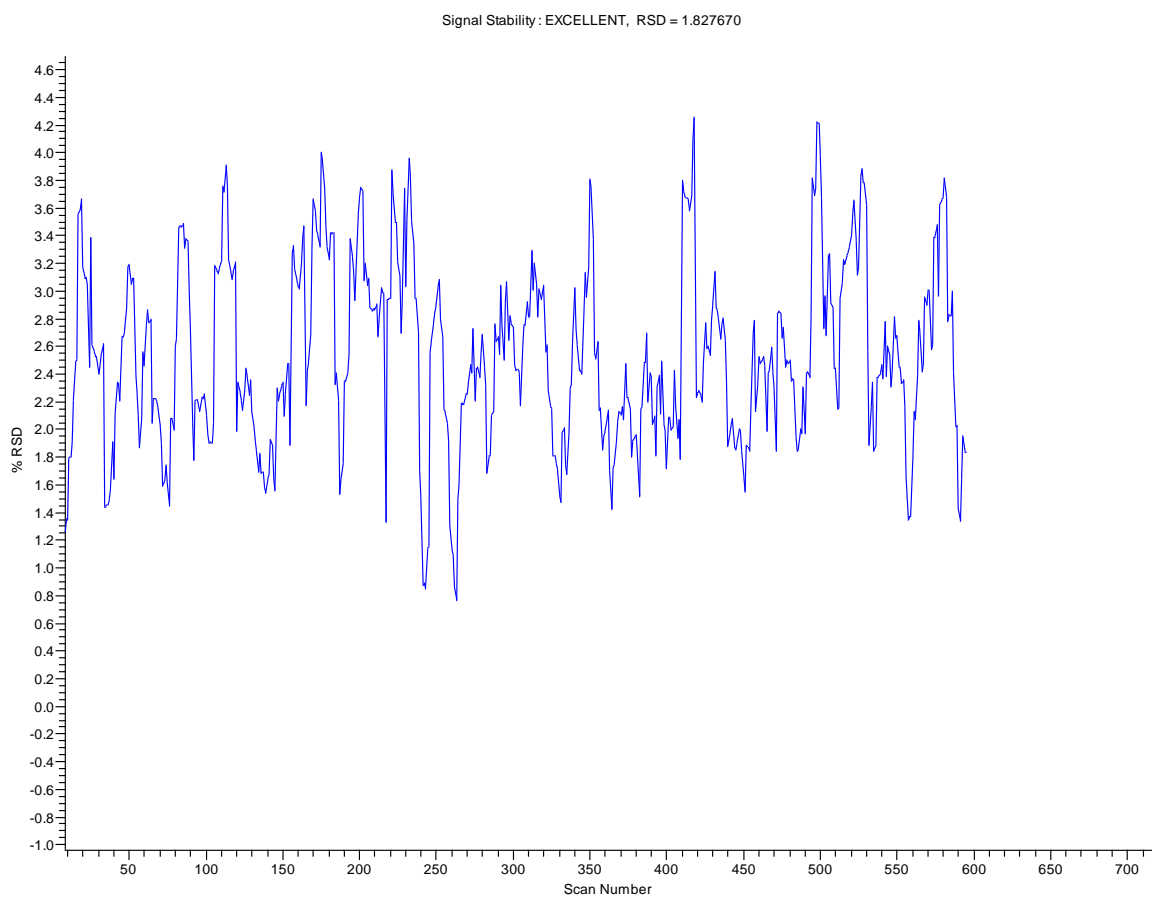


**Obr. 24:** Optimalizace normalizované kolizní energie pro MRM přechod 379→160.



**Obr. 25:** Optimalizace normalizované kolizní energie pro MRM přechod 379→204.

## 8.8. Příloha H



**Obr. 26:** Stabilita signálu odezvy prekurzorového iontu analytu (379,1 m/z) po provedené optimalizaci.



## 8.9.Příloha Ch

Validace metody RP.

**Tab. 22:** Diference mezi koncentracemi analytu (1. pík) v kalibračních vzorcích vypočtených za použití MRM přechodů 379→160 a 379→220 (RP).

Kvantifikační MRM přechod 379→160 [µg/l]	Kontrolní MRM přechodů 379→220 [µg/l]	Diference [%]
15,8	14,1	-11
18,9	20,1	6,6
51,6	53,3	3,3
95,6	93,1	-2,6
146	151	3,3

**Tab. 23:** Diference mezi koncentracemi analytu (2. pík) v kalibračních vzorcích vypočtených za použití MRM přechodů 379→160 a 379→220 (RP).

Kvantifikační MRM přechod 379→160 [µg/l]	Kontrolní MRM přechodů 379→220 [µg/l]	Diference [%]
11,2	11,5	2,5
15,1	16,8	11
20,6	20,8	1,1
51,1	49,7	-2,8
100	90,5	-9,9
147	157	6,8

**Tab. 24:** Nominální a vypočtené koncentrace analytu (1. pík) v QC vzorcích, vypočtené za použití MRM přechodů 379→160 a 379→220 (RP).

Nominální koncentrace [µg/l]	Kvantifikační MRM přechod 379→160			Kontrolní MRM přechod 379→220			
	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	
2	1,68	-16	Max. ±20 %	Vyloučeno	>±20 %	Max. ±20 %	
2	1,78	-10					
2	2,15	7,3					
2	1,84	-7,9					
5	4,86	-2,8	Max. ±15 %				
5	4,99	-0,11					
5	5,42	8,3					
5	4,96	-0,90					
10	10,9	9,5					
10	9,90	-1,0					
10	9,47	-5,3					
10	8,94	-11					
15	15,6	3,8					
15	13,7	-8,5					
15	16,3	8,4					
15	15,3	2,3					
20	20,1	0,35	Max. ±15 %	Max. ±15 %			
20	19,7	-1,4					
20	20,5	2,7					
20	21,4	6,8					
50	50,2	0,31					
50	47,6	-4,8					
50	51,9	3,7					
50	51,0	2,0					
100	101	0,56					
100	101	1,1					
100	107	6,6					
100	101	0,50					
150	148	-1,3					
150	151	0,35					
150	147	-2,3					
150	152	1,3					
					15,6	4,0	
					14,6	-2,3	
					14,6	-2,4	
					13,2	-12	
					18,7	-6,4	
					17,4	-13	
					17,7	-12	
					20,7	3,7	
				48,4	-3,3		
				54,8	9,5		
				53,6	7,2		
				51,3	2,6		
				106	6,5		
				100	0,012		
				102	2,4		
				101	0,84		
				157	4,9		
				157	4,5		
				152	1,5		
				151	0,62		

**Tab. 25:** Nominální a vypočtené koncentrace analytu (2. pík) v QC vzorcích, vypočtené za použití MRM přechodů 379→160 a 379→220 (RP).

Nominální koncentrace [µg/l]	Kvantifikační MRM přechod 379→160			Kontrolní MRM přechod 379→220		
	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
5	6,01	20	Max. ±20 %	Vyloučeno	>±20 %	Max. ±20 %
5	5,97	19				
5	6,04	21				
5	5,90	18				
10	10,8	8,2	Max. ±15 %	13,1	31	Max. ±15 %
10	11,2	12		12,8	28	
10	10,3	3,5		12,3	23	
10	10,7	7,3		12,2	22	
15	16,4	9,3		17,0	13	
15	16,4	9,2		17,7	18	
15	17,0	13		16,7	11	
15	15,6	4,1		17,0	13	
20	21,0	5,1		21,6	7,9	
20	22,2	11		21,9	9,5	
20	21,3	6,5		21,4	7,0	
20	21,5	7,7		21,6	8,0	
50	49,1	-1,9		49,1	-1,9	
50	47,1	-5,8		48,7	-2,5	
50	49,1	-1,8		49,2	-1,6	
50	49,6	-0,87		50,0	0,093	
100	99,1	-0,88		96,5	-3,5	
100	94,3	-5,7		92,8	-7,2	
100	90,6	-9,4		99,1	-0,93	
100	96,9	-3,1		94,2	-5,8	
150	157	4,8	155	3,5		
150	154	2,8	151	0,70		
150	152	1,7	149	-0,60		
150	158	5,6	150	-0,22		

**Tab. 26:** Diference mezi koncentracemi analytu (1. pík) v QC vzorcích vypočtenými pomocí MRM přechodů 379→160 a 379→220 (RP).

Kvantifikační MRM přechod 379→160 [µg/l]	Kontrolní MRM přechodů 379→220 [µg/l]	Diference [%]
15,6	15,6	0,24
13,7	14,6	6,7
16,3	14,6	-10
15,3	13,2	-14
20,1	18,7	-6,7
19,7	17,4	-12
20,5	17,7	-14
21,4	20,7	-2,9
50,2	48,4	-3,6
47,6	54,8	15
51,9	53,6	3,4
51,0	51,3	0,68
101	106	5,9
101	100	-1,1
107	102	-3,9
101	101	0,34
148	157	6,3
151	157	4,1
147	152	3,9
152	151	-0,64

**Tab. 27:** Diference mezi koncentracemi analytu (2. pík) v QC vzorcích vypočtenými pomocí MRM přechodů 379→160 a 379→220 (RP).

Kvantifikační MRM přechod 379→160 [µg/l]	Kontrolní MRM přechodů 379→220 [µg/l]	Diference [%]
16,4	17,0	3,4
16,4	17,7	8,3
17,0	16,7	-1,9
15,6	17,0	8,9
21,0	21,6	2,7
22,2	21,9	-1,3
21,3	21,4	0,46
21,5	21,6	0,23
49,1	49,1	0,016
47,1	48,7	3,5
49,1	49,2	0,29
49,6	50,0	1,0
99,1	96,5	-2,6
94,3	92,8	-1,6
90,6	99,1	9,3
96,9	94,2	-2,8
157	155	-1,2
154	151	-2,1
152	149	-2,2
158	150	-5,5

## 8.10. Příloha I

Validace metody HILIC

**Tab. 28:** Diference mezi koncentracemi analytu v kalibračních vzorcích vypočtených za použití MRM přechodů 379→204 a 379→238 (HILIC).

Kvantifikační MRM přechod 379→204 [µg/l]	Kontrolní MRM přechod 379→238 [µg/l]	Diference [%]
13,0	13,5	3,5
18,1	18,4	1,8
53,1	54,3	2,3
86,7	90,0	3,8
164	167	1,6
210	205	-2,5
285	279	-2,1
410	406	-0,92
496	503	1,4

**Tab. 29:** Nominální a vypočtené koncentrace analytu v QC vzorcích vypočtené za použití MRM přechodů 379→204 a 379→238 (HILIC).

Nominální koncentrace [µg/l]	Kvantifikační MRM přechod 379→204			Kontrolní MRM přechod 379→238		
	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]	Vypočtená konc. [µg/l]	Diference [%]	Kritérium přijatelnosti [%]
15	13,0	-13	Max. ±20 %	14,3	-4,5	Max. ±20 %
15	13,0	-13		12,5	-16	
15	13,0	-13		17,4	16	
15	13,3	-12		13,9	-7,6	
20	17,8	-11	Max. ±15 %	19,4	-2,8	Max. ±15 %
20	17,7	-12		15,0	-25	
20	18,1	-9,3		18,9	-5,4	
20	19,6	-1,8		18,0	-10	
50	44,1	-12		45,6	-8,8	
50	42,9	-14		44,1	-12	
50	43,2	-14		38,5	-23	
50	45,7	-8,6		51,4	2,7	
100	87,7	-12		88,4	-12	
100	91,8	-8,2		92,8	-7,2	
100	92,6	-7,4		83,7	-16	
100	103	2,8		97,0	-3,0	
150	149	-0,78		149	-0,95	
150	143	-4,4		148	-1,4	
150	144	-3,8		143	-4,4	
150	141	-5,8		145	-3,5	
200	199	-0,74		200	-0,25	
200	198	-1,2		199	-0,53	
200	173	-13		174	-13	
200	211	5,5		200	-0,044	
300	244	-19		256	-15	
300	295	-1,5		301	0,36	
300	283	-5,5		275	-8,3	
300	310	3,4		318	6,0	
400	377	-5,8		359	-10	
400	377	-5,8		379	-5,3	
400	394	-1,4		397	-0,70	
400	400	-0,10		398	-0,39	
500	512	2,4	508	1,7		
500	529	5,8	521	4,1		
500	520	4,1	521	4,1		
500	532	6,4	536	7,2		

**Tab. 30:** Diference mezi koncentracemi analytu v QC vzorcích vypočtených pomocí MRM přechodů 379→204 a 379→238 (HILIC).

Kvantifikační MRM přechod 379→204 [µg/l]	Kontrolní MRM přechod 379→238 [µg/l]	Diference [%]
13,0	14,3	9,9
13,0	12,5	-3,4
13,0	17,4	33
13,3	13,9	4,5
17,8	19,4	9,1
17,7	15,0	-16
18,1	18,9	4,3
19,6	18,0	-8,3
44,1	45,6	3,5
42,9	44,1	2,8
43,2	38,5	-11
45,7	51,4	12
87,7	88,4	0,79
91,8	92,8	1,1
92,6	83,7	-9,6
103	97,0	-5,7
149	149	-0,16
143	148	3,1
144	143	-0,65
141	145	2,4
199	200	0,49
198	199	0,65
173	174	0,45
211	200	-5,3
244	256	4,8
295	301	1,9
283	275	-3,0
310	318	2,5
377	359	-4,6
377	379	0,56
394	397	0,70
400	398	-0,29
512	508	-0,67
529	521	-1,6
520	521	0,024
532	536	0,77