

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

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

Bakalářská práce

Jana Vaclová

Vedoucí práce: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2018

Vaclová, J., 2018: Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení antibiotika ciprofloxacin ve vodě pomocí LC/MS. [Development, optimization and validation of an analytical method for determination of antibiotic ciprofloxacin in water using LC/MS. Bc. Thesis, in Czech.] – 54 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 determination of antibiotic ciprofloxacin in water using LC/MS. At first, the development and optimization of the analytical method was performed. The following parameters were selected for optimization: mobile phase composition and injection volume of sample, conditions of electrospray, voltage on S-lens and F-lens, collision energy, maximum trap fill time and number of microscans. Then, the analytical method was successfully validated. Finally, the method was applied for the determination of the antibiotic ciprofloxacin in the layers made from PEEK.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Klíčová slova

Ciprofloxacin, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, validace, optimalizace, magnetronové naprašování

Key words

Ciprofloxacin, liquid chromatography, mass spektrometry, validation, optimization, magnetron sputtering

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu kdykoli pomoci a trpělivost.

Dále bych také chtěla poděkovat Mgr. Jiřímu Kratochvílovi za přípravu a dodání vrstev a svému příteli, rodině a přátelům za velkou podporu a pomoc.

OBSAH

1	CÍLE PRÁCE.....	1
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1	Fluorochinolonová antibiotika	2
2.1.1	Klasifikace.....	2
2.2	Ciprofloxacin	3
2.3	Kapalinová chromatografie.....	4
2.4	Hmotnostní detektor	7
2.5	Fluorescenční detektor.....	8
2.6	Magnetronové naprašování.....	9
2.7	Kvantitativní analýza ciprofloxacinu pomocí HPLC	10
3	MATERIÁL A METODY.....	12
3.1	Použité chemikálie a činidla	12
3.2	Instrumentální vybavení a spotřební materiál.....	12
3.3	Příprava roztoků	14
3.3.1	Příprava mobilních fází.....	14
3.3.2	Příprava zásobních roztoků	14
3.3.3	Příprava pracovních roztoků pro optimalizaci	14
3.3.4	Příprava pracovních roztoků pro zjištění stability analytu.....	15
3.3.5	Příprava pracovních roztoků pro kalibraci	16
3.3.6	Příprava kalibračních roztoků	16
3.3.7	Příprava roztoků pro zjištění LOD a LOQ	18
3.3.8	Příprava kontrolních roztoků.....	19
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	20
4.1	Optimalizace chromatografické separace	20
4.1.1	Testovací analýza.....	20
4.1.2	Optimalizace složení mobilní fáze.....	21
4.1.3	Optimalizace objemu nástřiku.....	22
4.2	Optimalizace hmotnostní detekce	23
4.2.1	Optimalizace podmínek elektrospreje	23
4.2.2	Optimalizace parametrů iontové optiky (S-čočky a F-čočky)	23

4.2.3	Optimalizace kolizní energie a volba MRM přechodů.....	24
4.2.4	Optimalizace maximální doby plnění pasti a počtu mikroskenů.....	26
4.3	Volba podmínek fluorescenční detekce.....	27
4.4	Volba podmínek spektrofotometrické detekce	28
4.5	Stabilita ciprofloxacinu.....	29
4.6	Validace metod LC-MS a LC-FLD.....	32
4.6.1	Linearita	32
4.6.2	Správnost a přesnost	34
4.6.3	Rozsah.....	34
4.6.4	Mez detekce a mez stanovitelnosti	35
4.7	Testování metody pro stanovení ciprofloxacinu ve vrstvách	36
4.7.1	Depozice vrstev	36
4.7.2	Stanovení ciprofloxacinu ve vrstvách.....	37
5	ZÁVĚR.....	39
6	CITOVANÁ LITERATURA	41
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	44
8	PŘÍLOHY.....	45
8.1	Příloha A.....	45
8.2	Příloha B.....	46
8.3	Příloha C	47
8.4	Příloha D.....	48
8.5	Příloha E	49
8.6	Příloha F.....	50
8.7	Příloha G.....	51
8.8	Příloha H.....	53

1 CÍLE PRÁCE

- Vypracovat literární rešerši na dané téma.
- Vypracovat analytickou metodu na stanovení antibiotika ciprofloxacin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí včetně provedení základní optimalizace této analytické metody.
- Provést validaci analytické metody.
- V případě dostupnosti vzorků biologicky aktivních vrstev obsahující antibiotikum ciprofloxacin, pro jejichž hodnocení je metoda vyvíjena, provést stanovení obsahu tohoto antibiotika uvolněného z těchto vrstev do roztoku (zpravidla destilovaná voda).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fluorochinolonová antibiotika

Fluorochinolonová antibiotika, deriváty chinolonových antibiotik, patřily do nedávna k jedním z nejužívanějších antibiotických přípravků. Důvodem je účinek vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím, tzv. atypickým patogenům (mykoplazmata, chlamydie) a z části i bakteriím anaerobním [1, 2]. Dalším důvodem je též schopnost rychlého baktericidního účinku a rychlého pronikání do buněk a tkání. Fluorochinolony jsou přípravky čistě syntetického původu [1].

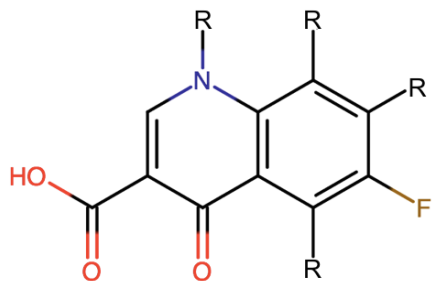
Mechanismus účinku je založen na inaktivaci enzymů topoizomeráz (DNA gyráza a topoizomeráza IV), které rozplétají dvoušroubovici bakteriální DNA, což má za následek neschopnost bakteriální buňky transkripce a dělení, tedy vzniku jejích dceřiných buněk [2].

Jako u většiny léčiv i při užívání fluorochinolonů může dojít ke vzniku nežádoucích účinků. Mezi zřídka se vyskytující, avšak v literatuře nejčastěji diskutované patří fototoxicita, vznik srdeční arytmie a zánět šlach [2]. Dále bylo prokázáno poškození růstových chrupavek na animálních modelech, proto platí pro všechny fluorochinolony kontraindikace do 18 let, v období těhotenství a kojení (nicméně byla provedena řada studií zabývajících se tímto problémem bez zjevného prokázání tohoto nežádoucího účinku) [2, 3]. K obvyklejším nežádoucím účinkům pak patří bolesti hlavy, závratě, neuzea (nutkání ke zvracení) a průjem [2].

Fluorochinolony jsou z hlediska rezistence jednou z nejrizikovějších skupin antibakteriálních léčiv, jelikož rezistence k nim vzniká velmi rychle, v některých případech i v průběhu léčby [2, 3]. S ohledem na tento závažný problém jsou fluorochinolony v současné době léky pouze rezervními, indikovanými v případě neúčinnosti či nevhodnosti jiných antibiotik in vitro (ve skle) z důvodu toxicity nebo nežádoucích účinků [3].

2.1.1 Klasifikace

Chinolony, jejichž základní struktura je uvedena na Obr. 1, jsou děleny do čtyř generací na základě jejich účinnosti. Mimo chinolony 1. generace jsou všichni ostatní zástupci označovány jako fluorochinolony, jelikož obsahují atom fluoru na chinolovém jádře. To má za následek výrazné zvýšení jejich účinnosti [2, 3].



Obr. 1: Základní struktura chinolonů.

1. *generace* zahrnuje přípravky, které jsou dnes již většinou překonané [3]. Jedná se o přípravky kyselého charakteru, využívané pro léčbu infekcí močových cest z důvodu jejich špatného vstřebávání a vylučování močí v nezměněné formě. Spektrum účinku zahrnuje jen bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. Mezi zástupce této generace patří kyselina nalidixová, kyselina oxolinová a cinoxacin [4].

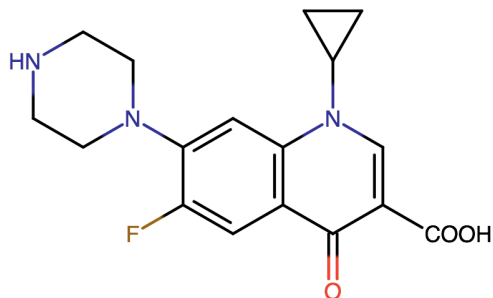
2. *generace* má vlivem substituce fluorem a nahrazením methyly piperazinovým zbytkem výrazně vyšší účinnost oproti 1. generaci a schopnost proniknout do sekretů a tkání, což rozšiřuje jejich použití na infekce měkkých tkání, horních a dolních cest dýchacích a jiné. Přípravky této generace též účinkují na chlamydie a mykoplazmata. Zástupci této skupiny jsou ciprofloxacin, ofloxacin a levofloxacin [4].

3. *generace* vykazuje rozšíření spektra účinku, avšak též nárůst účinků nežádoucích, jako jsou například neurotoxicita a kardiotoxicita. Mezi zástupce této generace patří léky neregistrované v ČR jako např. pazufloxacin, gatifloxacin a sparfloxacin [3, 4].

4. *generace* má opět rozšířené spektrum účinku, a to o anaerobní bakterie a pneumokoky. K zástupcům této skupiny patří moxifloxacin a gatifloxacin [4].

2.2 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin je chemická sloučenina se strukturním vzorcem uvedeným na Obr. 2 a systematickým názvem 1-cyklopropyl-6-fluor-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylová kyselina s molekulovou hmotností 331,35 g/mol. Je to téměř bílý či nažloutlý krystalický prášek, slabě hygroskopický, prakticky nerozpustný ve vodě [5].



Obr. 2: Strukturní vzorec ciprofloxacinu.

Jako jeden ze zástupců 2. generace fluorochinolonů vykazuje pozoruhodnou antimikrobiální aktivitu (MIC = 10 ng/ml pro bakterii *Escherichia coli*), vynikající farmakokinetické vlastnosti a málo vedlejších účinků. Z těchto důvodů byl zaveden do klinické praxe pro léčení různých bakteriálních infekcí, včetně infekcí horních a dolních cest dýchacích, některých infekcí kůže, kostí a měkkých tkání [6].

V případě nesnášenlivosti či neúčinnosti antituberkulotik první řady lze ciprofloxacin použít k terapii tuberkulózy a společně s levofloxacinem nacházejí uplatnění také v terapii proti *Mycobacterium avium* u pacientů pozitivních na HIV [6, 7].

Ciprofloxacin byl poprvé uveden na trh v roce 1986 [1] a od té doby je stále používán v mnoha léčivých přípravcích, jejichž seznam je uveden v příloze A. Všechny léčivé přípravky obsahující tuto léčivou látku jsou v ČR vydávány pouze na lékařský předpis. Pro rok 2017 bylo do lékáren a jiných zdravotnických zařízení dodáno 548 524 kusů léčivých přípravků, které obsahovaly léčivou látku ciprofloxacin [8].

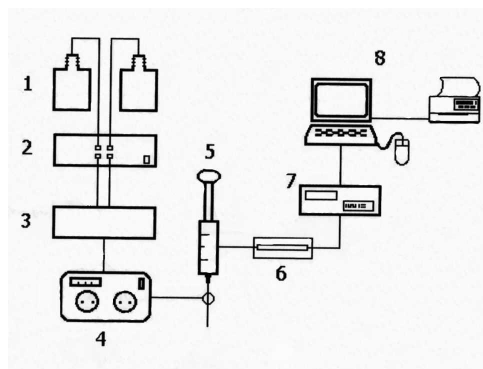
2.3 Kapalinová chromatografie

Chromatografické metody patří do skupiny separačních metod, které využívají dělení složek vzorku mezi dvě různé, vzájemně nemísitelné fáze. Fází mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). V případě kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina, stacionární fáze pak může být tuhá látka nebo kapalina ukotvená na povrchu tuhého nosiče. Stacionární fáze, obvykle označovaná jako sorbent, je umístěna v chromatografické koloně [9, 10]. Přes tuto kolonu pak protéká mobilní fáze a dochází k postupnému rozdělování složek, při němž dochází k opakovanému ustalování rovnováhy látek mezi fázemi, což lze popsat distribuční konstantou K_D [9].

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} \quad (1)$$

Kde K_D je distribuční konstanta, $[A]_s$ je koncentrace složky A ve stacionární fázi, $[A]_m$ je koncentrace složky A v mobilní fázi. Čím je hodnota distribuční konstanty dané látky vyšší, tím delší dobu bude složka zadržována ve stacionární fázi, tedy hodnota jejího retenčního času bude vyšší a naopak [10].

V současné době se pro stopovou kvantitativní analýzu organických sloučenin nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), kde je mobilní fáze přiváděna do systému pomocí vysokotlakého čerpadla [9]. Na Obr. 3 je znázorněno blokové schéma HPLC.



Obr. 3: Blokové schéma HPLC. (1) Zásobníky mobilních fází, (2) odplyňovač, (3) směšovač, (4) vysokotlaké čerpadlo, (5) dávkovač vzorku, (6) chromatografická kolona, (7) detektor, (8) datová stanice. Obrázek převzat z publikace [9].

Směšovací zařízení slouží s využitím zásobníků obsahujících různé mobilní fáze buď k přípravě směsi kapalin o stálém složení v průběhu separace (izokratická eluce), nebo k řízení změn ve složení mobilní fáze v průběhu separace (gradientová eluce) [11].

Vysokotlaká čerpadla jsou zařízení zajišťující požadovaný průtok mobilní fáze, kde se běžně pracuje s tlaky v rozmezí 1–100 MPa při průtoku mobilní fáze 0,1–10 ml.min⁻¹ [9, 10]. Materiál čerpadel musí být zcela inertní, tzn., nesmí být narušován mobilní fází a kontaminovat ji uvolněnými látkami [11].

Dávkovací zařízení je téměř výhradně tvořeno šesticestným ventilem s dávkovací smyčkou definovaného objemu, jež slouží k nástřiku vzorku pomocí skleněné mikrostřikačky do proudu mobilní fáze, která je protlačována kolonou pod vysokým tlakem [11, 12]. V současnosti je již většina zařízení vybavena automatickými dávkovači různých konstrukcí (tzv. autosamplery) [9].

Chromatografické kolony pro HPLC jsou, na rozdíl od kolon pro plynnou chromatografii (GC), kratší, s menším vnitřním průměrem a jsou plněné mikroparticulárními částicemi. Nejčastější délka kolon se pohybuje v rozmezí 10–20 cm s vnitřním průměrem od 0,2 do 2 cm [10]. Vzhledem k potřebě odolnosti vůči vysokému tlaku mobilní fáze jsou většinou vyrobeny z antikorozi oceli či tlustostěnného skla. Náplň, vhodná stacionární fáze, je obvykle oxid křemičitý (silikagel) převážně chemicky modifikován navázáním vhodných funkčních skupin, které určují výslednou polaritu stacionární fáze [12]. Velikost zrn náplně se převážně pohybuje mezi 2–5 μm [9]. Jako ochrana kolony před ucpáním nerozpuštěnými mechanickými částicemi ze vzorku či mobilní fáze se velmi často používají chromatografické předkolony [11].

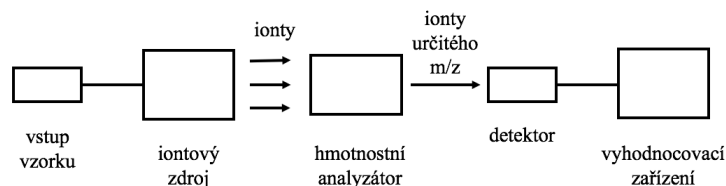
Detektory používané v HPLC systému, které jsou vždy umístěny za chromatografickou kolonou, zaznamenávají změny v signálu při průchodu mobilní fáze obsahující složky vzorku a čisté mobilní fáze [9]. Měly by být selektivní pro analyt, málo citlivé na mobilní fázi i interferující sloučeniny, s širokým lineárním dynamickým rozsahem, nízkým šumem i driftem základní linie a musí co nejméně přispívat k rozšiřování chromatografických zón [11]. Mezi nejběžnější patří spektrofotometrický detektor, který umožňuje detekci látek absorbující záření v UV/VIS oblasti, fluorimetrický detektor pro látky vykazující fluorescenci nebo hmotnostní detektor, který detekuje jednotlivé separované látky na základě jejich poměru hmotnosti a náboje aj. [11, 12].

Výsledkem chromatografické analýzy je pak chromatogram, tedy záznam odezvy detektoru na retenčním čase. Lze z něj získat kvalitativní i kvantitativní informace týkající se separovaných látek. Základní kvalitativní charakteristikou je retenční čas látky, tedy doba uplynutá od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky (píku). Další kvalitativní charakteristiky lze získat dle typu použitého detektoru, přičemž nejvíce kvalitativních charakteristik lze získat většinou použitím hmotnostního detektoru. Kvantitativní charakteristikou je pak plocha píku či jeho výška [9].

2.4 Hmotnostní detektor

Hmotností spektrometrie je fyzikálně chemická metoda, sloužící k převodu molekul na ionty, rozlišení vzniklých iontů na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z) a záznamu relativních intenzit těchto iontů. Základními kroky této techniky jsou: odpaření vzorku, ionizace, urychlení iontů pomocí iontové optiky, separace iontů v hmotnostním analyzátoru a jejich detekce [11].

Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou vstup vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Schéma hmotnostního spektrometru je znázorněno na Obr. 4. [11].



Obr. 4: Schéma hmotnostního spektrometru.

Iontový zdroj slouží k ionizaci analyzované látky, jehož konstrukce se liší podle použité ionizační techniky [13, 14]. Univerzální ionizační technika neexistuje. Pro spojení LC-MS jsou nejzásadnější API techniky (ionizace za atmosférického tlaku). Nejvýznamnější nejvíce užívanou API technikou je technika užívající k ionizaci molekul elektrosprej (ESI). Rozpuštěný analyt je přiveden do kovové kapiláry, na níž je vloženo vysoké napětí (3–5 kV). Na jejím výstupu dochází vlivem zmlžujícího plynu k rozprášení přiváděného eluátu (z chromatografické kolony nebo přímo ze skleněné stříkačky) za vzniku jemného spreje drobných kapiček s vysokou hustotou povrchového náboje. Postupným odpařováním rozpouštědla dochází ke zvyšování hustoty povrchového náboje, až v okamžiku překročení kritické hodnoty dojde k rozpadu na ještě menší kapičky a rozdělení původních nábojů. Opakováním celého procesu nakonec dojde ke vzniku iontů analytu [13].

Hmotnostní analyzátor slouží k dělení iontů podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) [14]. K rozlišení iontů dochází na základě různých fyzikálních principů. Ve spojení s kapalinovou chromatografií se často uplatňuje kvadrupólový analyzátor, ve kterém dochází k dělení iontů na základě stability oscilace ve střídavém elektrickém poli. Dále pak iontová past, která pracuje na podobném principu jako kvadrupólový analyzátor, průletový analyzátor, kde

dochází k rozdělení iontů na základě různé doby letu a nejnovější typ, orbitální iontová past, kde dochází k rozdělení iontů vlivem různé frekvence jejich harmonických oscilací [13, 14].

Detektory převádějí proud dopadajících iontů na proud elektronů. K detekci iontů se velmi často používají elektronové násobiče, které obsahují další elektrody, jež výrazně zesilují elektronový proud (10^4 až 10^8 krát). Dalším typem je detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem, který mění v konverzní elektrodě náraz iontu na vyražený elektron, ten vyrazí foton při dopadu na fosforescenční stínítko, jež je následně zachycen fotonásobičem. Oba detektory jsou velmi citlivé, avšak životnost elektronového násobiče je výrazně kratší [11].

Použitím hmotnostního detektoru lze získat dva základní druhy záznamů: chromatogram (viz. Kapitola 2.4) a hmotnostní spektrum [13]. Hmotnostní spektrum je označení pro závislost relativních intenzit iontů na poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z), kde relativní intenzita nejintenzivnějšího iontu představuje 100 % [9].

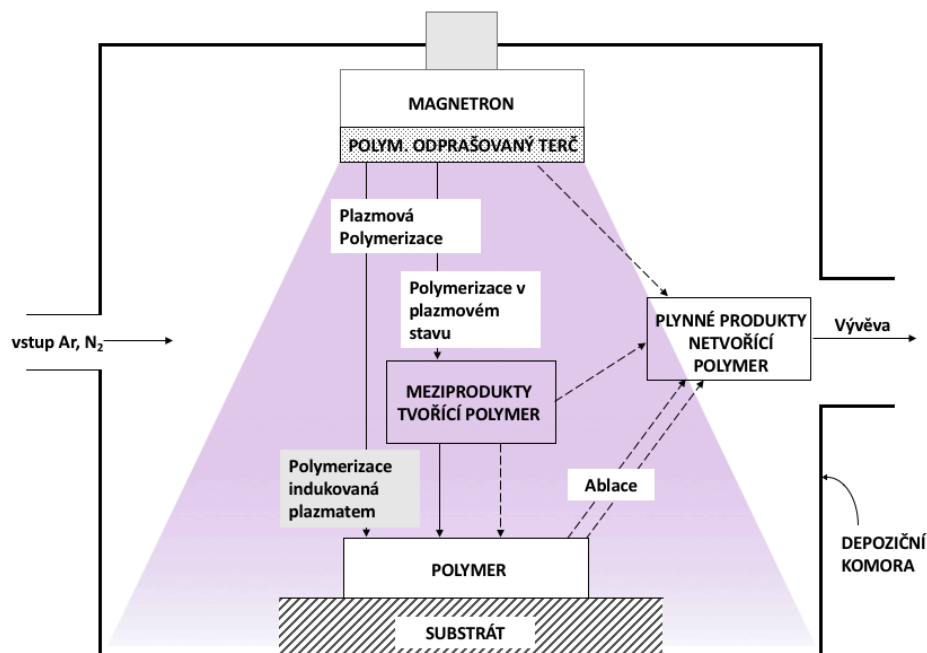
2.5 Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektory měří intenzitu fluorescenčního záření, tzn. intenzitu sekundárního emisního záření fluoreskujících látek vznikajícího po absorpci primárního excitačního záření. Po absorpci excitačního záření z ultrafialové oblasti záření látky emitují fluorescenční záření o stejné, nebo častěji o vyšší vlnové délce (vlivem vibrační relaxace), než byla vlnová délka absorbovaného excitačního záření [9, 15]. Detekce emisního záření je prováděna pomocí fotonásobiče, který musí být chráněn před vlivem excitačního záření, a to jeho umístěním kolmo na směr excitačního záření a použitím interferenčních filtrů [9]. Mobilní fáze by měly být také důkladně odvdušněny, jelikož vlivem vzdušného kyslíku přítomného v roztocích dochází k tzv. zhašení, tedy jevu způsobujícího pokles výtěžku luminiscence [9].

Moderně zkonstruované fluorescenční detektory umožňují snímat emisní i excitační spektra separovaných látek v průběhu separace a poté zvolit optimální vlnovou délku excitačního i emitovaného záření. Hodnoty těchto vlnových délek lze programovatelně měnit v průběhu eluce pro dosažení maximální citlivosti pro jednotlivé separované látky [9]. Fluorescenční detektory patří k velmi selektivním a citlivým detektorům, často používaným ve spojení s HPLC [15].

2.6 Magnetronové naprašování

Magnetronové naprašování je jednou z často používaných technik pro depozici tenkých vrstev. Takto připravené vrstvy je pak v praxi možné použít v biomedicině, lékařství, elektrotechnickém průmyslu – senzory, displeje mobilních telefonů; strojírenství (zlepšení mechanických vlastností a tření) – vrtáky, frézy; energetice – fotovoltaika, kontakty na polovodičích a mnoho dalších. Schéma magnetronového naprašování je znázorněno na Obr. 5.



Obr. 5: Schéma magnetronového naprašování.

Magnetron je tvořen elektrodou, uvnitř které jsou umístěny magnety. Tyto magnety vytvářejí magnetické pole, jež tvoří spolu s polem elektrickým elektromagnetickou past pro elektrony, která slouží ke zvýšení koncentrace elektronů v blízkosti odprašovaného terče. Tyto elektrony ionizují pracovní plyn [16].

Vlivem nerovnovážnosti plazmatu, kdy těžké kationty plynu získávají oproti výrazně lehčím elektronům menší energii, dochází ke vzniku tzv. stejnosměrného záporného předpětí na vysokofrekvenční katodě, které následně urychluje kationty jejím směrem. Při dostatečné energii dopadajících kationtů pak dochází k emisi atomů, molekul nebo molekulových fragmentů z terče, tedy stavebních prvků, z nichž následnou polymerizací vznikají vysokomolekulární látky (polymery) [16].

Polymerizace se uskutečňuje buď iontovými a/nebo radikálovými procesy. Dochází k tzv. propagaci, při níž reakcemi mezi jednotlivými radikály či ionty vznikají kovalentní vazby, nebo dojde pouze k nárůstu řetězce a přesunutí aktivního centra [17].

Vzniklé polymerní meziprodukty pak dopadají na substrát, kde vytvoří plazmový polymer (vrstvu). Nicméně nadeponovaná vrstva je stále ovlivňována působením plazmatu a dochází k polymerizaci v již vzniklých vysokomolekulárních látkách. Polymerizace tedy probíhá jak v plynné fázi, tak na povrchu substrátu. Dalším ovlivňujícím faktorem je pak sprašování, kdy dochází k tzv. ablaci již nadeponovaného materiálu [17].

V rámci procesu je možno měnit mnoho parametrů jako například příkon, teplotu, depoziční rychlost, tlak v depoziční komoře aj. Tím je možno ovlivňovat vlastnosti deponované vrstvy, mezi něž patří například stupeň sesíťování, chemické složení, drsnost výsledného povrchu atd. Můžeme tak tedy deponovat nejen materiály s podobnými vlastnostmi jako je počáteční materiál terče, ale také materiály s vlastnostmi lepšími, či zcela novými [16].

2.7 Kvantitativní analýza ciprofloxacinu pomocí HPLC

Ciprofloxacin je v praxi sledován zejména jako kontaminant vod. Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.1, dochází k nežádoucímu nárůstu rezistence nejen na ciprofloxacin, ale na většinu fluorochinolonů, na čemž má hlavní podíl jejich časté užívání a jimi znečištěné životní prostředí.

Odpadní vody z farmaceutických továren či nemocnic obvykle obsahují vysoké koncentrace léčivých přípravků, zejména antibiotik a konvenční čistírny odpadních vod nejsou vhodné pro jejich odstranění. To má za následek možné znečištění vod povrchových. Z tohoto důvodu je nutné přítomnost léčiv v odpadních vodách sledovat. Analýza je prováděna v naprosté většině pomocí HPLC se spektrofotometrickou, fluorescenční či hmotností detekcí. Za účelem odstranění negativního vlivu matrice a dosažení co nejnižších detekčních limitů je často prováděna extrakce analytu na tuhou fázi (SPE) nebo derivatizace (v případě použití FLD). V Tab. 1 jsou shrnuté různé techniky a detekční limity pro stanovení ciprofloxacinu, jichž bylo dosaženo ve vybraných pracích.

Tab. 1: Přehled detekčních limitů ciprofloxacinu pro různé analytické techniky.

Analytická technika	Extrakční technika	Derivatizace	LOD [µg/l]	Objem k extrakci [ml]	Citace
LC-DAD	-	-	0,25	-	
LC-FLD	-	-	0,063	-	[18]
LC-DAD-FLD	SPE (Strata X 500 mg/3ml)	fluoreskamin	0,001	100	
LC-MS/MS (tripl. kvadrupol)	SPE (Strata X 500 mg/3ml)	-	0,001	100	[19]
LC-MS/MS (tripl. kvadrupol)	SPE (Strata X 500 mg/3ml)	-	0,03	50	[20]
LC-DAD	EME	-	0,04	10	[21]
LC-FLD	EME	-	0,018	10	

Nejvyšších detekčních limitů bylo dosaženo v práci [18] za použití technik LC-DAD a LC-FLD, což není překvapivé, vzhledem k nevyužití úpravy vzorku k analýze (extrakce či derivatizace). Naopak nejnižších detekčních limitů bylo dosaženo v pracích [18, 19]. V práci [18] byla využita technika LC-DAD-FLD v kombinaci s derivatizací fluoreskaminem a SPE extrakcí a v práci [19] byla využita technika LC-MS/MS pouze v kombinaci s SPE extrakcí. Výhodou LC-MS/MS techniky, oproti LC-DAD-FLD, je tedy možnost eliminace extrakčního kroku při současném dosažení stejných či podobných detekčních limitů. S klesajícím počtem operací při přípravě vzorku k analýze klesá možnost vzniku náhodných i systematických chyb a dochází k úspoře času, chemikálií i spotřebního materiálu. Z Tab. 1 je zřejmé, že s využitím různých analytických technik lze dosáhnout velmi nízkých hodnot detekčních limitů pro stanovení antibiotika ciprofloxacin, nicméně tato hodnota je poměrně závislá na úpravě analytu (extrakce či derivatizace) a použitím detektoru.

Pro účely této práce bylo nutné použití takové techniky, kterou lze dosáhnout co nejnižších mezí detekce (max. stovky ng/l), a to bez nutnosti jakékoli úpravy vzorku k analýze, jelikož k dispozici bude omezené množství vzorku (jednotky mililitrů). Dalším faktorem je též snaha o maximální přesnost stanovení, jelikož v počáteční fázi tohoto typu výzkumu je důležité prokazatelně rozlišit i drobné změny v množství imobilizovaného ciprofloxacinu. Z těchto důvodů je proto velmi vhodné použití LC-MS/MS techniky, která se těmto požadavkům blíží nejvíce.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použité chemikálie a činidla

- Standard: ciprofloxacin – čistota pro HPLC: $\geq 98,0$ % (Sigma-Aldrich)
- Vnitřní standard: umbeliferon – čistota 99 % (Sigma-Aldrich)
- Kyselina mravenčí – čistota pro LC-MS: ≈ 98 % (Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková – 36 % (Merck)
- Acetonitril – čistota pro LC-MS: $\geq 99,9$ % (Merck)
- Deionizovaná voda generovaná 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 řady UltiMate 3000 (Thermo) složený ze zásobníku mobilní fáze SRD-3600, čerpadla mobilní fáze HPG-3400RS, nástřikového modulu s chlazeným zásobníkem vialek WPS-3000TRS, vyhřívaným kolonovým prostorem TCC-3000RS, spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem DAD-3000RS a hmotnostním detektorem Velos Pro s ionizací vyhřívaným elektrosprejem. Ovládání přístroje i vyhodnocování naměřených dat bylo provedeno pomocí programů Chromeleon Xpress, LTQ Tune Plus 2.7 a Xcalibur 2.2.
- Kapalinový chromatograf řady UltiMate 3000 (Thermo) složený ze zásobníku mobilní fáze SR-3000, čerpadla mobilní fáze LPG-3400SD, nástřikového modulu s chlazeným zásobníkem vialek WPS-3000TSL, vyhřívaným kolonovým prostorem TCC-3000SD, spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem DAD-3000RS, fluorescenčním detektorem FLD-3400RS a elektrochemickým detektorem ECD-3000RS. Ovládání přístroje i vyhodnocování naměřených dat bylo provedeno pomocí programu Chromeleon 7.2.
- Chromatografická kolona: Acclaim 120 C18; délka 100 mm; vnitřní průměr 3,0 mm; velikost částic 2,2 μm (Thermo)

- Chromatografická předkolona: SecurityGuard Cartridges™; C18; délka 4 mm; vnitřní průměr 3,0 mm (Phenomenex)
- Výrobník deionizované vody Smart2Pure 6 UV/UF (Thermo)
- Generátor dusíku Genius 1022 (Peak Scientific)
- Analytické váhy: MS105DU (Mettler Toledo™)
- Orbitální třepačka: Orbit 1000 (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta BioPettePLUS o objemu 100–1000 µl (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta BioPettePLUS o objemu 10–100 µl (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta Transferpette®S o objemu 1–10 ml (Brand)
- Odměrné sklo, třída přesnosti A (Fisherbrand)
- Skleněné dávkovací stříkačky o objemu 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µl (Hamilton)
- Spotřební materiál: plastové špičky, krimpovací vialky z čirého skla s hliníkovým uzávěrem a septem pryž/teflon, hliníková fólie
- Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Excel 2015 (Microsoft) a EffiValidation 4.0 (EffiChem).

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Příprava mobilních fází

Mobilní fáze A (MF-A) byla připravena odpipetováním 250 μ l kyseliny mravenčí automatickou pipetou (100–1000 μ l) do 250 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku. Mobilní fáze byla pro každé měření připravována vždy čerstvá a nebyla dále uchovávána.

Mobilní fáze B (MF-B) byla připravena odpipetováním 250 μ l kyseliny mravenčí automatickou pipetou (100–1000 μ l) do 250 ml odměrné baňky a doplněním acetonitrem po rysku. Mobilní fáze byla uchovávána max. 1 měsíc při laboratorní teplotě.

3.3.2 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok standardu pro optimalizaci (ST-Ia) o koncentraci 1 g/l byl připraven navážením přesně asi 5 mg ciprofloxacinu do 5 ml odměrné baňky, rozpuštěním v roztoku 0,1 % obj. HCOOH ve vodě (MF-A) a doplněním stejným roztokem po rysku. Zásobní roztok byl pro každé měření připravován vždy čerstvý a nebyl dále uchováván.

Zásobní roztok standardu pro kvantifikaci (ST-Ib) o koncentraci 1 g/l byl připraven navážením přesně asi 5 mg ciprofloxacinu do 5 ml odměrné baňky, rozpuštěním v roztoku 0,1 M HCl a doplněním stejným roztokem po rysku. Zásobní roztok byl pro každé měření připravován vždy čerstvý a nebyl dále uchováván.

Zásobní roztok vnitřního standardu (VS-I) o koncentraci 1 g/l byl připraven navážením přesně asi 5 mg umbeliferonu do 5 ml odměrné baňky, rozpuštěním v roztoku acetonitril-voda v poměru 20/80 obj. a doplněním stejným roztokem po rysku. Zásobní roztok byl pro každé měření připravován vždy čerstvý a nebyl dále uchováván.

3.3.3 Příprava pracovních roztoků pro optimalizaci

Pracovní roztok standardu pro optimalizaci (PR_{ST-I}) o koncentraci 10 mg/l byl připraven odpipetováním 100 μ l zásobního roztoku standardu ST-Ia automatickou pipetou (10–100 μ l) do 10 ml odměrné baňky a doplněním stejným rozpouštědlem po rysku.

3.3.4 Příprava pracovních roztoků pro zjištění stability analytu

Příprava pracovních roztoků standardu (PR_{ST-Ix}, PR_{ST-IIx}) pro zjištění stability standardu je shrnuta v Tab. 2.

Pracovní roztok standardu (PR_{ST-Ix}) o koncentraci 10 mg/l byl připraven odpipetováním 100 µl zásobního roztoku automatickou pipetou (10–100 µl) do 10 ml odměrné baňky a doplněním daným rozpouštědlem po rysku.

Pracovní roztok standardu (PR_{ST-IIx}) o koncentraci 200 µg/l byl připraven odpipetováním 1000 µl pracovního roztoku PR_{ST-Ix} automatickou pipetou (100–1000 µl) do 50 ml odměrné baňky a doplněním daným rozpouštědlem po rysku.

Tab. 2: Příprava pracovních roztoků pro stabilitu analytu.

Zásobní roztok	Označení PR _{ST-Ix}	Rozpouštědlo	Konc. PR _{ST-Ix} [mg/l]	Označení PR _{ST-IIx}	Rozpouštědlo	Konc. PR _{ST-IIx} [µg/l]
ST-Ia	PR _{ST-IA}	deion. voda		PR _{ST-IIA}	deion. voda	
ST-Ib	PR _{ST-IB}	0,1 M HCl	10	PR _{ST-IIB}	0,1 M HCl	200
ST-Ib	PR _{ST-IC}	deion. voda		PR _{ST-IIC}	deion. voda	

Pracovní roztok vnitřního standardu (VS-II) o koncentraci 10 mg/l byl připraven odpipetováním 100 µl VS-I automatickou pipetou (10–100 µl) do 10 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku.

Příprava směsných pracovních roztoků (PR_{mix-II}) pro testování stability o koncentraci 100 µg/l je shrnuta v Tab. 3. Celkem bylo pro každý pracovní roztok PR_{ST-IIA–C} připraveno 6 lékovek, přičemž 3 lékovky byly obaleny hliníkovou fólií pro testování ve tmě a 3 lékovky byly ponechány čiré pro testování za světla. Roztoky PR_{ST-IIA–C} a příslušné rozpouštědlo byly pipetovány automatickou pipetou (1–10 ml), roztoky PR_{VS-II} byly pipetovány automatickou pipetou (100–1000 µl).

Tab. 3: Příprava směsných pracovních roztoků (PR_{mix}-II), příslušná rozpouštědla a testovací podmínky.

Označ. PR _{mix} - II	Testovací podmínky	Prac. roztok stand.	Objem PR _{ST} -II [ml]	Objem VS-II [ml]	Rozpouštědlo	Objem rozp. [ml]	Celk. objem [ml]
A	tma světlo	PR _{ST} -IIA			deion. voda		
B	tma světlo	PR _{ST} -IIB	5	1	0,1 M HCl	4	10
C	tma světlo	PR _{ST} -IIC			deion. voda		

3.3.5 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Pracovní roztok standardu (ST-II) o koncentraci 10 mg/l byl připraven odpipetováním 98,6 µl ST-Ib automatickou pipetou (10–100 µl) do 10 ml odměrné baňky a doplněním 0,1 M roztokem HCl po rysku.

Pracovní roztok standardu (ST-III) o koncentraci 200 µg/l byl připraven odpipetováním 200 µl ST-II automatickou pipetou (100–1000 µl) do 10 ml odměrné baňky a doplněním 0,1 M roztokem HCl po rysku.

Při přípravě pracovního roztoku vnitřního standardu (VS-II) bylo postupováno stejně jako v kap. 3.3.4.

Pracovní roztoky, včetně roztoků zásobních byly vždy připravovány čerstvé.

3.3.6 Příprava kalibračních roztoků

Příprava kalibračních roztoků je shrnuta v Tab. 4. Celkem bylo připraveno 10 koncentračních úrovní, všechny ve třech nezávislých opakováních. Kalibrační roztoky byly připraveny do 1,8 ml čirých vialek.

0,1 M roztok HCl byl pipetován automatickou pipetou (100–1000 µl), pracovní roztok standardu ST-III stříkačkou Hamilton (5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µl) pod hladinu 0,1 M roztoku HCl a pracovní roztok vnitřního standardu VS-II. stříkačkou Hamilton (100 µl určenou pro pipetování vnitřních standardů) nad hladinu roztoku ve vialce.

Tab. 4: Příprava kalibračních roztoků.

Konc. úroveň	Označ. roztoku	Konc. ST [µg/l]	Konc. VS [µg/l]	Objem ST-III [µl]	Objem VS-II [µl]	Objem 0,1 M HCl [µl]	Celkový objem [µl]
1	K1a	0,1	100	0,5	100	900	1000
	K1b						
	K1c						
2	K2a	0,2	100	1	100	899	1000
	K2b						
	K2c						
3	K3a	0,5	100	2,5	100	898	1000
	K3b						
	K3c						
4	K4a	1	100	5	100	895	1000
	K4a						
	K4c						
5	K5a	2	100	10	100	890	1000
	K5b						
	K5c						
6	K6a	5	100	25	100	875	1000
	K6b						
	K6c						
7	K7a	10	100	50	100	850	1000
	K7b						
	K7c						
8	K8a	20	100	100	100	800	1000
	K8b						
	K8c						
9	K9a	50	100	250	100	650	1000
	K9b						
	K9c						
10	K10a	100	100	500	100	400	1000
	K10b						
	K10c						

3.3.7 Příprava roztoků pro zjištění LOD a LOQ

Pracovní roztok standardu (ST-IV) o koncentraci 10 mg/l byl připraven odpipetováním 93,8 µl ST-Ib automatickou pipetou (10–100 µl) do 10 ml odměrné baňky a doplněním 0,1 M roztokem HCl po rysku.

Pracovní roztok standardu (ST-V) o koncentraci 200 µg/l byl připraven odpipetováním 200 µl ST-IV automatickou pipetou (100–1000 µl) do 10 ml odměrné baňky a doplněním 0,1 M roztokem HCl po rysku.

Pracovní roztok standardu (ST-VI) o koncentraci 200 ng/l byl připraven odpipetováním 100 µl ST-V automatickou pipetou (10–100 µl) do 100 ml odměrné baňky a doplněním 0,1 M roztokem HCl po rysku.

Při přípravě pracovního roztoku vnitřního standardu (VS-II) bylo postupováno stejně jako v kap. 3.3.4.

Příprava roztoků pro zjištění LOD a LOQ, které byly použity pro vlastní měření, je shrnuta v Tab. 5. Celkem byly připraveny 4 koncentrační úrovně, každá ve 3 nezávislých opakováních. 0,1 M roztok HCl byl pipetován automatickou pipetou (100–1000 µl), pracovní roztok standardu ST-VI stříkačkou Hamilton (5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µl) pod hladinu 0,1 M roztoku HCl a pracovní roztok vnitřního standardu VS-II stříkačkou Hamilton (100 µl určenou pro pipetování vnitřních standardů) nad hladinu roztoku ve vialce.

Tab. 5: Příprava roztoků pro zjištění LOD a LOQ.

Konc. úroveň	Označ. roztoku	Konc. ST [ng/l]	Konc. VS [µg/l]	Objem ST-VI [µl]	Objem VS-II [µl]	Objem 0,1 M HCl [µl]	Celkový objem [µl]
1	1a	1	100	5	100	895	1000
	1b						
	1c						
2	2a	2	100	10	100	890	1000
	2b						
	2c						
3	3a	5	100	25	100	875	1000
	3b						
	3c						
4	4a	10	100	50	100	850	1000
	4a						
	4c						

3.3.8 Příprava kontrolních roztoků

Pro kontrolu čistoty chemikálií, jednotlivých roztoků, mobilní fáze, přístroje a čistoty práce za účelem odhalení případné kontaminace v průběhu přípravy vzorků a/nebo při jejich analýze byly připraveny 3 kontrolní roztoky, jejichž příprava je shrnuta v Tab. 6.

Tab. 6: Příprava kontrolních roztoků.

Označení roztoku	Objem ST-III [μl]	Objem VS-II [μl]	Objem 0,1 M HCl [μl]	Celkový objem [μl]
Rozpouštědlo	0	0	1000	1000
Vnitřní standard	0	100	900	1000
Standard	100	0	900	1000

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

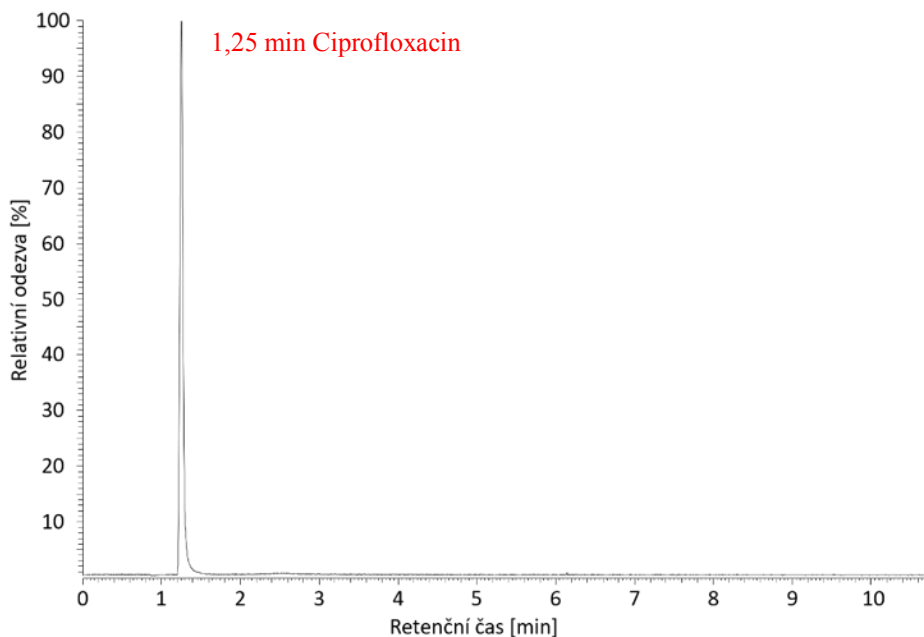
4.1 Optimalizace chromatografické separace

4.1.1 Testovací analýza

Testovací analýza byla provedena za účelem identifikace a přiřazení hodnoty retenčního času analytu (ciprofloxacinu). Výchozí podmínky separace i volba vnitřního standardu (umbeliferon), které byly zvoleny na základě doporučení mého školitele a vycházejí z již používané metody na stanovení ampicilinu ve vodě [22], jsou shrnuty v následujícím přehledu:

Výchozí podmínky separace:

- Chromatografická kolona a předkolona: viz. kap. 3.2
- Objem nástřiku: 20 μ l
- Teplota kolony: 30 $^{\circ}$ C
- Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min
- Mobilní fáze: 80% obj. MF-A a 20 % obj. MF-B (izokratická eluce)
- Chromatogram: viz Obr. 6



Obr. 6: Chromatogram – testovací analýza.

Na základě testovací analýzy bylo zjištěno, že za výchozích podmínek je analyt eluován téměř v oblasti mrtvého času, což znamená, že retence byla příliš nízká. Bylo tedy nezbytné provést základní optimalizaci složení mobilní fáze a objemu nástřiku, aby bylo dosaženo vhodné retence a co nejnižší meze detekce.

4.1.2 Optimalizace složení mobilní fáze

Cílem této optimalizace bylo dosáhnout dostatečné retence analytu, tedy dostatečně dlouhé doby zadržení analytu na koloně. Míra retence byla posuzována na základě hodnot kapacitního poměru (viz rovn. 2). Kapacitní poměr by měl být vždy vyšší než 2,0 [23]. Pokud jsou výsledné hodnoty nižší než 2,0, není analyt na koloně zadržován dostatečně dlouhou dobu. Testování složení MF je shrnuto v Tab. 7.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2)$$

Kde k je kapacitní poměr, t_R je retenční čas sloučeniny, t_M je mrtvý retenční čas.

Tab. 7: Optimalizace složení mobilní fáze – hodnoty kapacitních poměrů.

Složení mobilní fáze		Kapacitní poměr [1]
MF-A [% obj.]	MF-B [% obj.]	
90	10	11,6
85	15	3,9
82,5	17,5	2,2
80	20	0,3
70	30	0,6

Na základě těchto měření bylo zjištěno, že při obsahu 20 a 30 % MF-B docházelo k příliš nízké retenci analytu. Naopak při obsahu 10 % MFB byla retence příliš vysoká a analýza trvala příliš dlouhou dobu. S ohledem na požadavek co nejkratší analýzy a podmínku dostatečné retence analytu na chromatografické koloně, byl tedy nakonec zvolen obsah MFB 17,5 %, při němž bylo dosaženo hodnoty kapacitního poměru 2,2.

4.1.3 Optimalizace objemu nástřiku

Cílem optimalizace tohoto parametru bylo dosáhnout co největšího objemu nástřiku vzorku pro získání co nejnižší meze detekce analytu, za současné podmínky dodržení symetrie píku. Jako hodnotící kritérium byl použit faktor symetrie (A_s). Hodnota A_s by se měla pohybovat v rozmezí 0,8–1,5. Hodnota 1,0 značí úplnou symetrii píku [23].

Testovány byly objemy nástřiku: 5; 10; 15; 20; a 25 μl . Výsledné hodnoty A_s jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8: Optimalizace objemu nástřiku – hodnoty faktoru symetrie.

Objem nástřiku [μl]	Faktor symetrie [1]
5	2,00
10	1,86
15	1,79
20	1,86
25	1,86

Z Tab. 8 je patrné, že žádná hodnota faktoru symetrie nevyhovuje uvedenému rozmezí 0,8 – 1,5. Všechny hodnoty jsou vyšší než 1,5, tedy dochází k tzv. chvostování píků.

Vzhledem k použití této metody a s ohledem na nulový vliv matrice, byl zvolen objem nástřiku 25 μl i přes vyšší hodnotu faktoru symetrie z důvodu požadavku na dosažení co nejnižší meze detekce.

4.2 Optimalizace hmotnostní detekce

Optimalizace podmínek hmotnostní detekce byla provedena pouze pro analyt a jako výchozí podmínky byly zvoleny hodnoty doporučené v dokumentaci výrobce přístroje.

4.2.1 Optimalizace podmínek elektrospreje

Cílem této optimalizace bylo zvolit vhodnou kombinaci potenciálu HESI kapiláry, průtoku plynů a teplot HESI kapiláry a transferové trubice tak, aby odezva detektoru byla co nejvyšší a zároveň byla zajištěna dostatečná stabilita signálu hmotnostního detektoru.

Při optimalizaci bylo postupováno podle Tab. 9, tedy od optimalizace č. 1 po optimalizaci č. 5. U každé optimalizace byly testovány tři hodnoty. Jako výchozí pro dané testování byly zvoleny hodnoty označené hvězdičkou (*). Po vybrání nejvhodnější hodnoty dané optimalizace (tučně zvýrazněná) byla právě tato hodnota použita za výchozí pro následné optimalizace.

Tab. 9: Optimalizace podmínek ionizace vyhřívaným elektrosprejem.

Číslo optimalizace	Příloha	Parametr	Hodnota		
1	B	potenciál HESI [kV]	2	3*	4
2	C	průtok hl. zmlžujícího plynu [arb]	50	60*	70
3	D	průtok pomocného zmlžujícího plynu [arb]	15	20*	25
4	E	teplota HESI [°C]	300	350*	400
5	F	teplota transferové trubice [°C]	350	380*	400

Optimální hodnoty parametrů byly vybrány na základě údajů ze záznamů uvedených v přílohách B–F.

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

Cílem této optimalizace bylo nastavení vybraných parametrů iontové optiky tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší odezvy detektoru. Největší význam v této části přístroje mají tzv. S-čočky a F-čočky, což jsou ploché prstencové elektrody, které jsou umístěny ve vakuové části hmotnostního spektrometru. Zaostrují a regulují tok iontů přicházejících z iontového zdroje do hmotnostního analyzátoru [24]. Hodnotou napětí na těchto kruhových elektrodách lze značně ovlivnit meze detekce přístroje.

Nejprve bylo provedeno měření potenciálu na S-čočkách v rozmezí 0 až 70 V, dále pak na F-čočkách v rozmezí -15 až -5 V. Každé měření bylo provedeno třikrát. V Tab. 10 jsou uvedeny naměřené hodnoty této optimalizace.

Tab. 10: Hodnoty TIC při optimalizaci S-čoček a F-čoček.

Měření	Potenciál [V]	
	S-čočky	F-čočky
1	60	-7,75
2	62	-8,00
3	60	-7,75

Na základě naměřených dat uvedených v Tab. 10 byl zvolen potenciál pro S-čočky 60 V a pro F-čočky -7,75 V. Záznamy měření č. 3 jsou uvedeny v příloze G.

4.2.3 Optimalizace kolizní energie a volba MRM přechodů

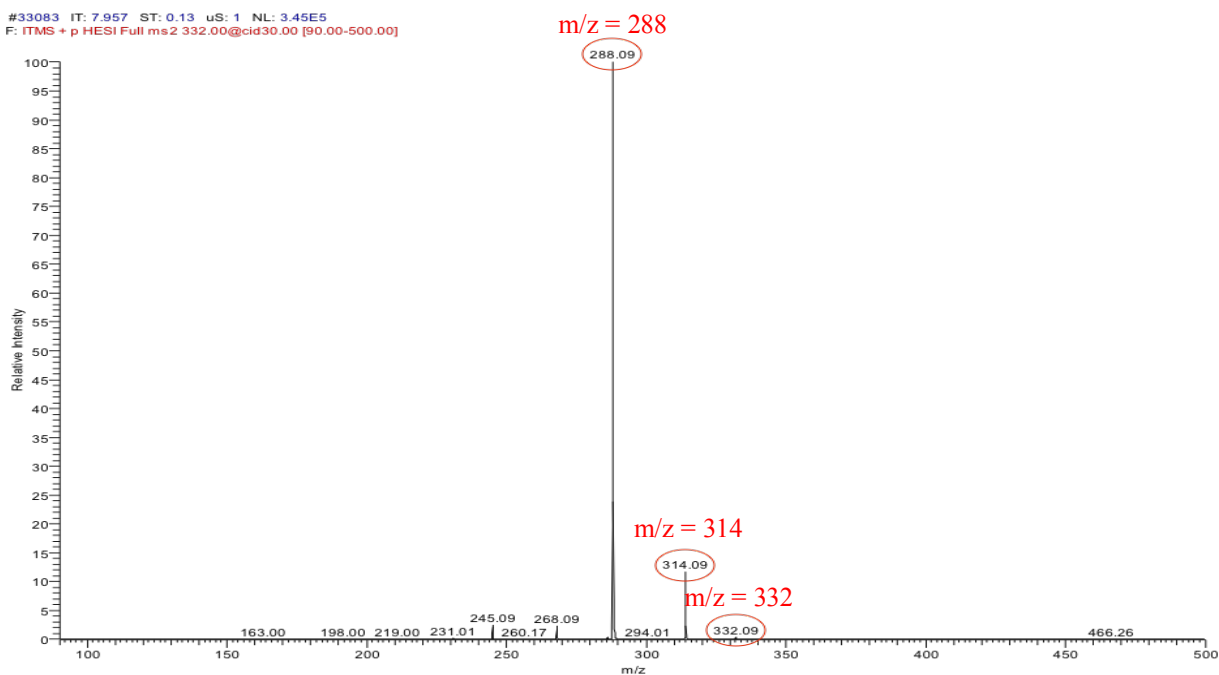
Při této optimalizaci byla zvolena nejvhodnější hodnota kolizní energie, která je nutná k optimální fragmentaci molekulárního iontu analytu na fragmentované ionty. Pro analyt i vnitřní standard byly zvoleny dva přechody. Jeden přechod ke kvantifikaci, druhý za účelem ověření, tedy identifikaci. Hodnoty fragmentových iontů byly zvoleny na základě nejvyšší intenzity odezvy detektoru. Hodnoty kolizních energií a zvolené MRM přechody jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11: Hodnota optimálních kolizních energií a MRM přechody.

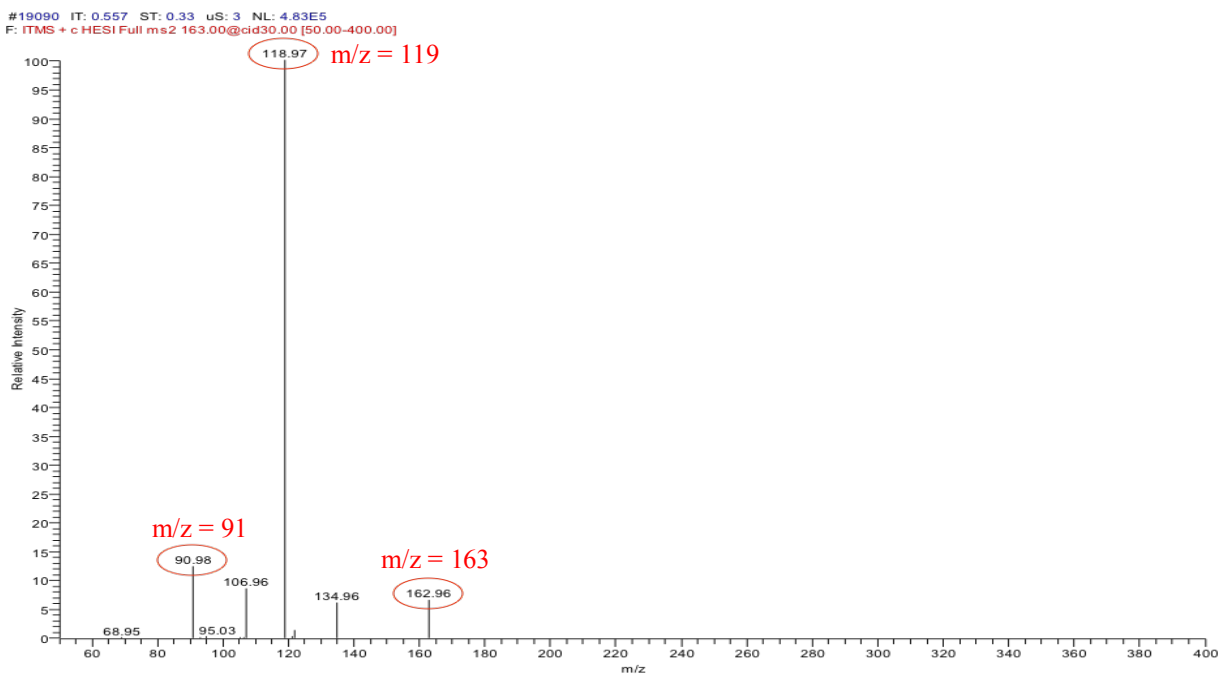
	Kolizní energie [%]	Přechod ke kvantifikaci	Přechod k ověření
Ciprofloxacin	31	332 → 288	332 → 314
Umbeliferon	26	163 → 119	163 → 91

Hodnoty energie 31 % a 26 % byly zvoleny na základě údajů v příloze H, tedy hodnoty energie, po jejíž aplikaci byla odezva detektoru na daný fragmentový iont maximální. Jako optimální pak byla zvolena hodnota 31 %.

Na Obr. 7 a Obr. 8 jsou zobrazena hmotností spektra analytu a vnitřního standardu se zvýrazněnými hodnotami MRM přechodů.



Obr. 7: Hmotnostní spektrum analytu se zvýrazněnými MRM přechody.



Obr. 8: Hmotnostní spektrum vnitřního standardu se zvýrazněnými MRM přechody.

4.2.4 Optimalizace maximální doby plnění pasti a počtu mikroskenů

Cílem této optimalizace bylo zvolení nejhodnější maximální doby plnění pasti s tak vysokým počtem mikroskenů, aby byl výsledný chromatografický pík složen alespoň z 15 bodů a zároveň bylo dosaženo co nejvyššího poměru signálu k šumu. Čím vyšší je maximální doba plnění pasti, tím vyšší je i množství iontů, které lineární iontová past může použít k detekci a čím vyšší je počet mikroskenů, tím vyšší je poměr signálu k šumu (S/N) [24].

Měření bylo provedeno za použití pracovního roztoku standardu o koncentraci 10 ng/l. Testovány byly hodnoty počtů mikroskenů 1, 3 a 5 a pro každou hodnotu byla zvolena doba plnění pasti 100, 200 a 500 ms. Hodnoceny byly primární záznamy bez použití matematického vyhlazování dat. Výsledné hodnoty počtu bodů na pík a signálu k šumu jsou shrnuty v Tab. 12.

Tab. 12: Naměřené hodnoty optimalizace maximální doby plnění pasti a počtu mikroskenů.

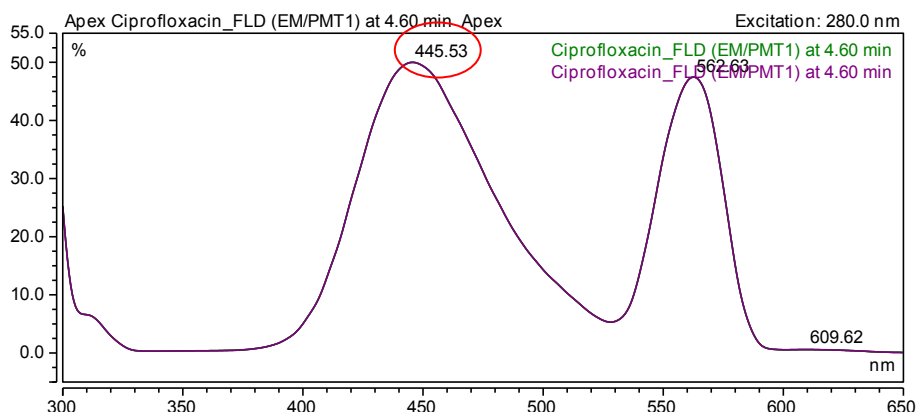
Koncentrace analytu [ng/l]	Počet mikroskenů	Doba plnění pasti [ms]	RAW data		Data po mat. vyhlazení		
			Počet bodů na pík	S/N	Počet bodů na pík	S/N	
10	1	100	> 30	18	> 30	25	
		200	> 30	16	> 30	8	
		500	> 30	24	27	15	
	3	100	30	25	23	10	
		200	27	27	21	15	
		500	15	18	12	18	
		100	22	19	12	12	
		5	200	17	21	12	16
			500	14	33	9	34

Z naměřených dat uvedených v Tab. 12 je zřejmé, že kombinace 3 mikroskenů a doby plnění pasti 200 ms je pro požadovaný účel nejhodnější (tučně zvýrazněná). Uvedená jsou RAW data a pro porovnání i data po úpravě a vyhlazení.

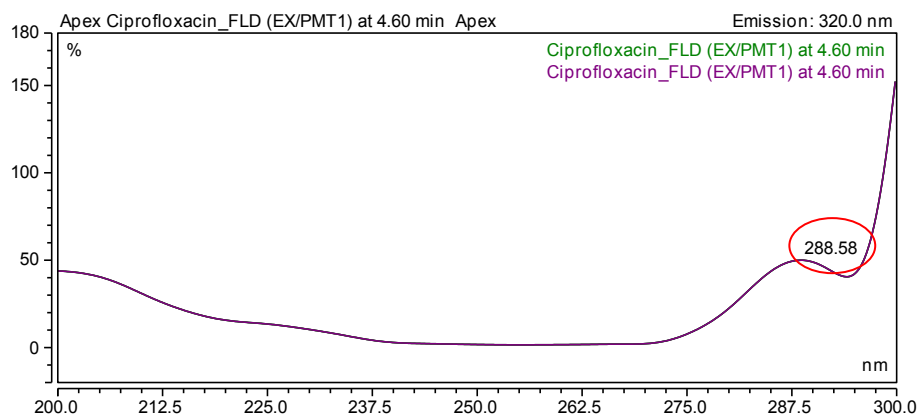
4.3 Volba podmínek fluorescenční detekce

Volba podmínek fluorescenční detekce zahrnovala vhodnou volbu vlnové délky excitačního záření, vlnové délky emisního záření a vlnové délky emisního filtru.

Nejprve bylo provedeno měření emisního a excitačního spektra analytu a nalezení těch vlnových délek, při nichž bylo dosaženo maximální odezvy detektoru. Emisní vlnová délka byla měřena v rozsahu vlnových délek 300–650 nm, excitační vlnová délka pak v rozsahu 200–300 nm. Emisní a excitační spektra analytu jsou uvedena na Obr. 9 a Obr. 10. Následně byl zvolen emisní filtr o vhodné vlnové délce, jehož hodnota se musí nacházet mezi excitační a emisní vlnovou délkou analytu. K dispozici byly emisní filtry o vlnových délkách 280 nm, 370 nm, 435 nm a 530 nm.



Obr. 9: Emisní spektrum analytu.



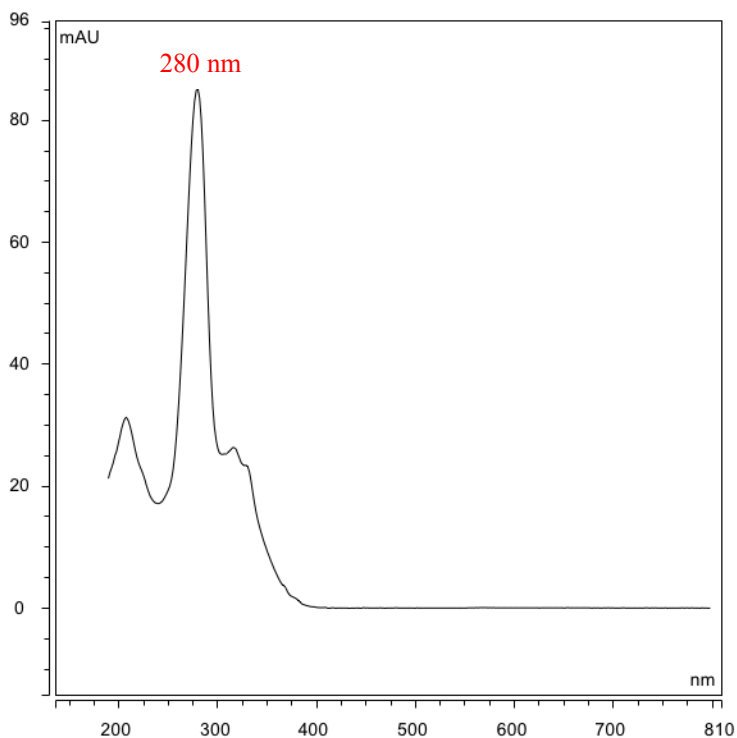
Obr. 10: Excitační spektrum analytu.

Na základě získaných hodnot z Obr. 9 a Obr. 10 byla zvolena excitační vlnová délka 446 nm, emisní vlnová délka 289 nm a vlnová délka emisního filtru 370 nm.

4.4 Volba podmínek spektrofotometrické detekce

V případě tohoto typu detekce bylo provedeno pouze měření absorpčního spektra analytu v UV/VIS oblasti v rozsahu 190–800 nm a následně byla vybrána vlnová délka maxima absorpční křivky.

Na Obr. 11 je zobrazeno absorpční spektrum pro analyt.



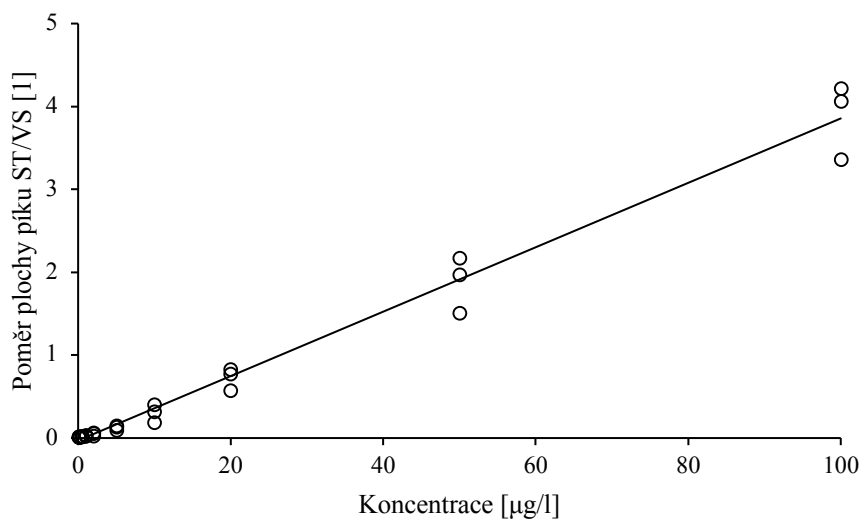
Obr. 11: Absorpční spektrum analytu.

Na základě získaných hodnot z Obr. 11 byla zvolena vlnová délka pro spektrofotometrickou detekci v UV/VIS oblasti 280 nm.

4.5 Stabilita ciprofloxacinu

Při prvním měření kalibrace zásobního roztoku standardu ST-Ia, při němž byla pro rozpuštění analytu použita MF-A, byla pozorována nedostatečná stabilita analytu. Příprava kalibračních roztoků byla stejná jako v kapitole 3.3.5 a 3.3.6, avšak namísto použití zásobního roztoku ST-Ib byl použit již zmiňovaný zásobní roztok ST-Ia a ředění bylo provedeno pomocí deionizované vody.

Na Obr. 12 jsou zobrazeny poměry ploch píků analytu k plochám píků vnitřního standardu v závislosti na zvyšující se koncentraci.



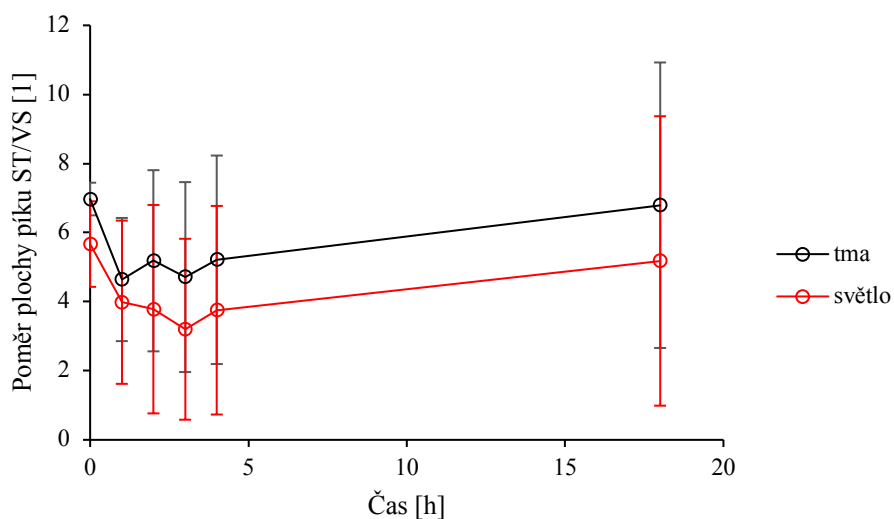
Obr. 12: Kalibrační křivka – analyt rozpuštěn v MF-A.

Z Obr. 12 je patrná jistá nestabilita analytu, jelikož odezva detektoru na vnitřní standard vyjádřená jako plocha píku byla téměř konstantní (RSD = 1,1 %). Byla proto vyloučena možnost nesprávné přípravy roztoků či chyba způsobena LC/MS systémem. Z tohoto důvodu byla provedena sada experimentálních měření, kde byly testovány různé vlivy, které by mohly stabilitu ovlivnit. Testovanými vlivy byly vliv nepřímého denního slunečního světla (světlo vs. tma) a druh rozpouštědla (MF-A vs. 0,1 M HCl vs. voda). Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr naměřených hodnot +/- interval spolehlivosti na statistické hladině významnosti 95 %.

Při každém testování bylo použito šest lékovek, přičemž vždy tři byly obaleny hliníkovou fólií a tři ponechány čiré, tedy světlo mohlo pronikat skrz skleněnou stěnu lékovky do roztoku. Jako rozpouštědla pak byly testovány roztoky MF-A a 0,1 M HCl.

Z každé lékovky bylo po předem určených časových intervalech 0, 1, 2, 3, 4 a 18 h (navíc 24 h při použití 0,1% HCl jako rozpouštědla), odebráno 500 μ l roztoku automatickou pipetou (100–1000 μ l) a následně změřeno. Příprava roztoků pro testování stability byla shrnuta v kapitole 3.3.4.

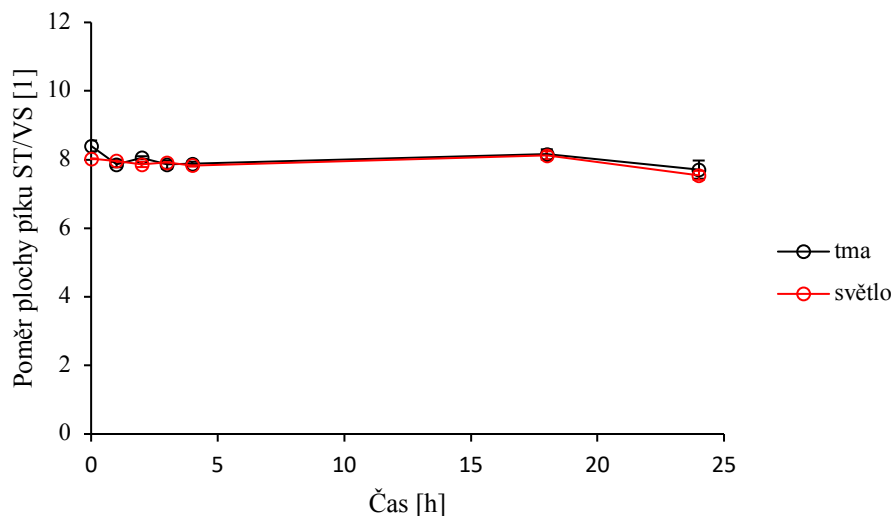
Na Obr. 13 jsou zobrazeny výsledné hodnoty testování stability za světla a ve tmě za použití zásobního roztoku ST-Ia (rozpuštědlo MF-A).



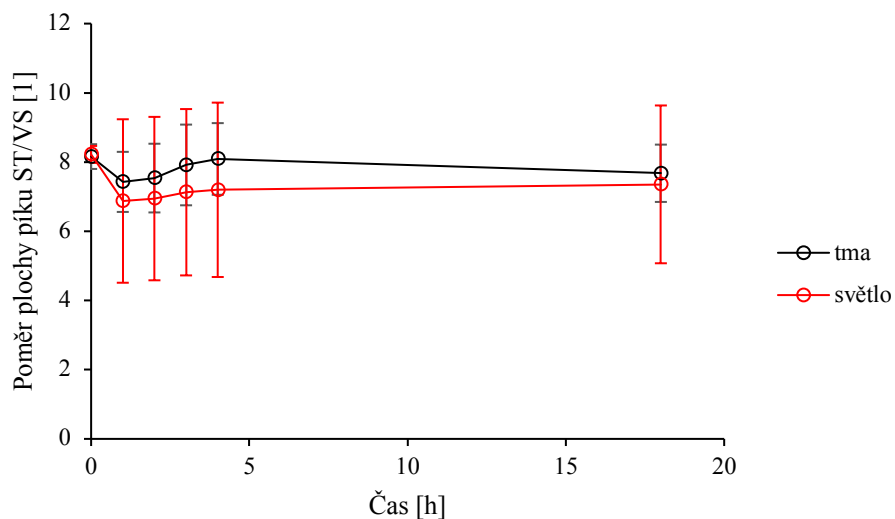
Obr. 13: Testování stability – analyt rozpuštěn pomocí MF-A.

Z naměřených dat uvedených na Obr. 13 je patrné, že použití MF-A má negativní vliv na stabilitu roztoku, a to za přístupu i nepřístupu světla. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno ke změně rozpouštědla a MF-A byla nahrazena 0,1 M HCl.

Na Obr. 14 a Obr. 15 jsou zobrazené výsledné hodnoty testování stability za přístupu světla a ve tmě za použití zásobního roztoku ST-Ib (rozpuštědlo 0,1 M HCl).



Obr. 14: Testování stability – analyt rozpuštěn pomocí 0,1 M HCl, ředění v 0,1 M HCl.



Obr. 15: Testování stability – analyt rozpuštěn pomocí 0,1 M HCl, ředění v deionizované vodě.

Z Obr. 14 je zřejmé, že změnou rozpouštědla bylo dosaženo výrazně vyšší stability analytu. Z toho důvodu byl pro účely kvantifikace připravován nový zásobní roztok standardu ST-Ib, který byl připravován za použití 0,1 M HCl jako rozpouštědla a tímto rozpouštědlem byl následně i ředěn. Pro plánované využití roztoku analytu pro imobilizaci na vrstvy však muselo být navíc provedeno i testování stability za mírnějších podmínek (pH 5), čehož bylo dosaženo rozpuštěním analytu pomocí roztoku 0,1 M HCl a následným ředěním deionizovanou vodou. Jak je vidět na Obr. 15, vyšší hodnota pH způsobila v některých případech snížení stability, které však bylo spolupracovníkem vyvíjejícím vrstvy vyhodnoceno jako akceptovatelné.

4.6 Validace metod LC-MS a LC-FLD

Po provedené optimalizaci chromatografické separace, hmotnostní detekce a volby vhodného rozpouštědla byla provedena validace analytické metody, která měla prokázat její vhodnost pro zamýšlenou kvantitativní analýzu antibiotika ciprofloxacin ve vodě. Validace byla provedena pro metodu LC-MS a pro porovnání i pro metody LC-FLD a LC-UV.

Základními hodnocenými validačními parametry byly linearita, správnost, přesnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti. Pro metodu LC-UV mohly být hodnocenými validačními parametry pouze mez detekce a mez stanovitelnosti, a to z důvodu nedostatku minimálního počtu kalibračních bodů (5 bodů) způsobeného nedostatečnou citlivostí UV detekce.

4.6.1 Linearita

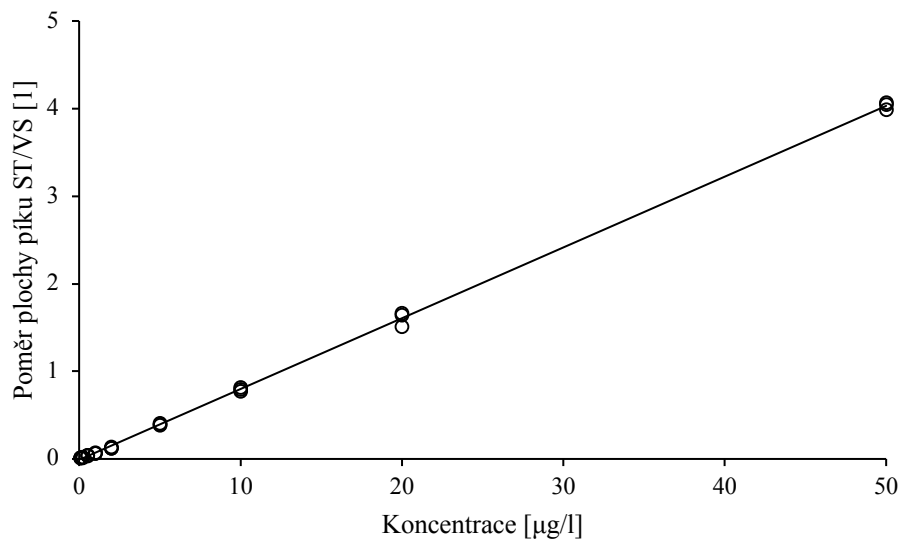
Prvním hodnoceným parametrem byla linearita, která byla pro obě metody vyhodnocena na základě kritérií přijatelnosti (QC koeficient < 5 % a korelační koeficient > 0,9990), převzatých z publikace [25]. Testovaný rozsah koncentrace analytu byl zvolen na koncentrační úrovni 0,1–100 µg/l. V obou případech detekce bylo nutné z důvodu nesplnění kritérií přijatelnosti vyloučit nejvyšší koncentrační úroveň, tedy 100 µg/l.

V Tab. 13 jsou shrnuty základní parametry týkající se linearity v testovaném rozsahu 0,1–50 µg/l. Rovnice obou kalibračních přímk jsou uvedeny ve tvaru $y = k \cdot x + q$, kde k je směrnice kalibrační přímky, q je intercept, y je poměr plochy píku analytu ku ploše píku vnitřního standardu a x je poměr koncentrace analytu ku koncentraci vnitřního standardu. Pro větší přehlednost a s ohledem na vždy stejnou hodnotu koncentrace vnitřního standardu je v kalibračních křivkách na ose x uvedena pouze koncentrace analytu. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Effivaldation 4.0.

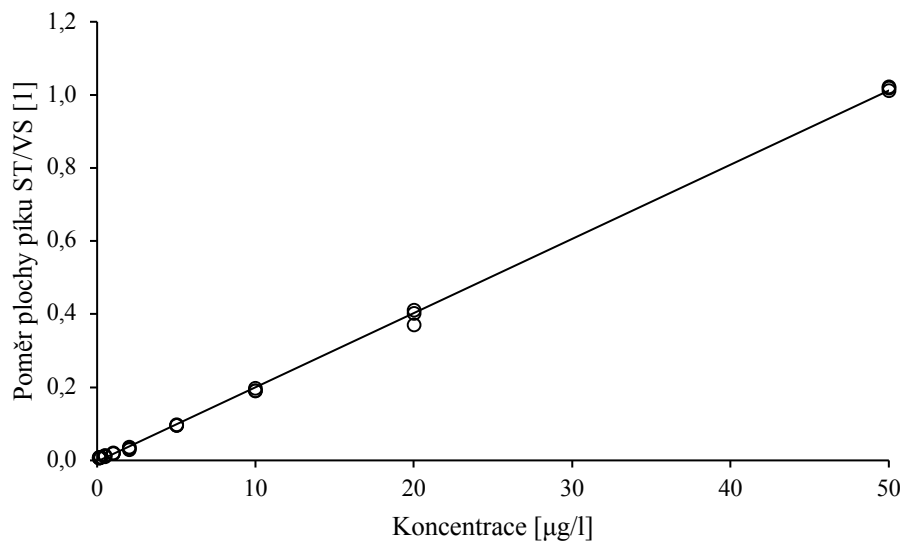
Tab. 13: Validační parametry – linearita.

Parametr	Kritérium přijatelnosti	LC-MS	LC-FLD
Směrnice [l/µg]	-	0,0808	0,0203
Intercept [1]	-	-0,0097	-0,0029
Korelační koeficient [1]	> 0,9990	0,9997	0,9996
QC koeficient [%]	< 5,00	3,70	4,38

Na Obr. 16 a Obr. 17 jsou zobrazeny výsledné kalibrační přímky obou metod v rozsahu koncentrací analytu 0,1–50 $\mu\text{g/l}$.



Obr. 16: Kalibrační přímka pro LC-MS.



Obr. 17: Kalibrační přímka pro LC-FLD.

4.6.2 Správnost a přesnost

Dalšími hodnotícími parametry byly správnost vyjádřená jako výtěžnost a přesnost vyjádřená jako opakovatelnost pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD). Hodnotící kritéria byla převzána z publikace Guidelines for Standard Method Performance Requirements [26].

Testování správnosti a přesnosti bylo provedeno za použití hodnot získaných při měření kalibrace v koncentračním rozsahu 0,1–50 µg/l pro LC-MS i LC-FLD. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Effvalidation 4.0 a je shrnuto v Tab. 14.

Tab. 14: Výsledné hodnoty pro správnost a přesnost.

Koncentrační úroveň [µg/l]	Kritérium přijatelnosti		LC-MS		LC-FLD	
	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]
1,0			95	5,1	104	4,7
10	60 - 115	≤ 21	100	2,9	96	2,4
50			100	1,0	101	0,7

Na základě naměřených hodnot uvedených v Tab. 14 bylo zjištěno, že správnost pro LC-MS se pohybuje v rozmezí 95–100 % a v případě LC-FLD 96–104 %. Přesnost pro LC-MS se pohybuje v rozmezí 1,0–5,1 % a v případě LC-FLD 0,7–4,7 %. V obou případech byla splněna kritéria přijatelnosti v koncentračním rozmezí 1,0–50 µg/l, u nižších koncentrací nikoli. Obě metody jsou tedy schopné stanovit analyt s téměř stejnou správností a přesností, přičemž nepatrně lepších hodnot bylo dosaženo podle očekávání u FLD detekce, která je mnohem robustnější, než MS detekce.

4.6.3 Rozsah

Na základě výsledků linearit, správnosti a přesnosti bylo potvrzeno, že obě metody (LC-MS, LC-FLD) poskytují výsledky s dostatečnou správností a přesností v koncentračním rozsahu 1,0–50 µg/l.

4.6.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Posledními hodnocenými parametry byly mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Hodnoty těchto parametrů byly zjištěny experimentálně postupným snižováním koncentrace analytu do okamžiku přibližného dosažení poměru signálu k šumu (S/N) hodnoty 3 pro LOD a hodnoty 10 pro LOQ dle požadavků uvedených v publikaci [9]. LOD a LOQ byly hodnoceny pro metody LC-MS, LC-FLD a LC-UV.

Příprava roztoků pro zjištění LOD a LOQ je shrnuta v kapitole 3.3.8. Zjištěné hodnoty S/N získané z vyhodnocovacích programů Xcalibur a Chromeleon jsou uvedeny v Tab. 15–17.

Tab. 15: Hodnoty S/N pro stanovení LOD a LOQ metodou LC-MS.

Koncentrační úroveň [ng/l]	2			5			10		
Označení roztoku	a	b	c	a	b	c	a	b	c
S/N	3	3	2	6	7	5	10	18	9

Tab. 16: Hodnoty S/N pro stanovení LOD a LOQ metodou LC-FLD.

Koncentrační úroveň [ng/l]	30			100		
Označení roztoku	a	b	c	a	b	c
S/N	3,8	2,9	3,2	12,7	9,7	10,5

Tab. 17: Hodnoty S/N pro stanovení LOD a LOQ metodou LC-UV.

Koncentrační úroveň [ng/l]	5 000			10 000		
Označení roztoku	a	b	c	a	b	c
S/N	3	3	2,5	12,3	12,9	12,5

Na základě hodnot poměrů signálu k šumu (S/N) z Tab. 15–17 bylo zjištěno, že pro metodu LC-MS hodnota meze stanovitelnosti (LOQ) odpovídá koncentraci 10 ng/l a hodnota meze detekce (LOD) odpovídá koncentraci 2 ng/l. Pro metodu LC-FLD odpovídá hodnota meze stanovitelnosti (LOQ) koncentraci 100 ng/l a hodnota meze detekce (LOD) koncentraci 30 ng/l. Pro metodu LC-UV byla zvolena hodnota koncentrace meze stanovitelnosti (LOQ) 8 000 ng/l a hodnota koncentrace meze detekce (LOD) 5 000 ng/l.

Na základě porovnání mezi detekce a stanovitelnosti se ukázalo, že při použití hmotnostního detektoru lze dosáhnout přibližně o 1 řád nižších hodnot než při použití fluorescenčního detektoru. Oproti tomu při použití spektrofotometrického detektoru v UV oblasti se hodnoty meze detekce i stanovitelnosti pohybovaly přibližně o 3 řády výše.

4.7 Testování metody pro stanovení ciprofloxacinu ve vrstvách

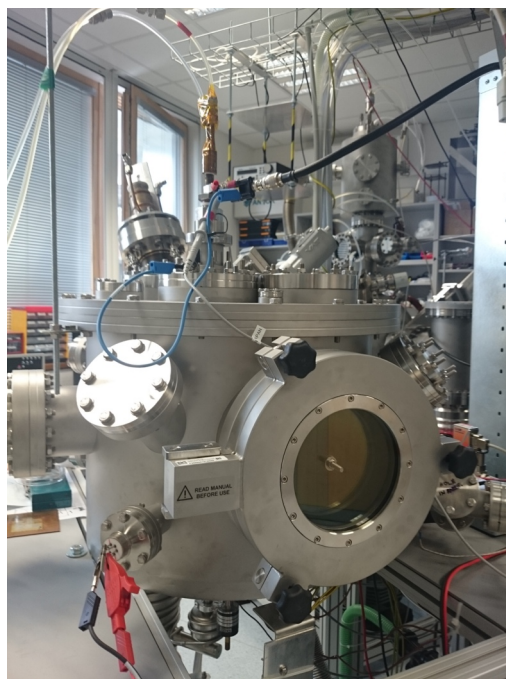
4.7.1 Depozice vrstev

Vrstvy byly připraveny a dodány Mgr. Jiřím Kratochvílem. Depozice vrstev byla prováděna na PřF JU na Ústavu fyziky a biofyziky v laboratoři fyziky plazmatu.

Podmínky depozice vrstev pomocí techniky magnetronového naprašování:

- Průtok pracovního plynu: Ar = 10 sccm, N₂ = 10 sccm
- Radiofrekvenční příkon na magnetron: 40 W
- Tlak v depoziční komoře: 3 Pa
- Vzdálenost vzorku od magnetronu: 10 cm
- Magnetron: 3 palcový, plně vyvážený
- Deponovaný materiál: nylon 6,6
- Čas depozice: 1 h
- Tloušťka vrstvy: 400 nm

Na Obr. 18 je uvedena fotografie použitého magnetronu.



Obr. 18: Použitý magnetron.

4.7.2 Stanovení ciprofloxacinu ve vrstvách

Celkem bylo připraveno 9 vrstev, které byly nanесeny na polymerním substrátu PEEK a 9 kontrol (substrát bez deponovaných vrstev). Vrstvy společně s kontrolami (dále jen vzorky) byly po třech vloženy do petriho misek (celkem 6) a zality roztokem ciprofloxacinu o koncentraci 5 g/l. V tomto roztoku byly impregnovány po dobu 30 min.

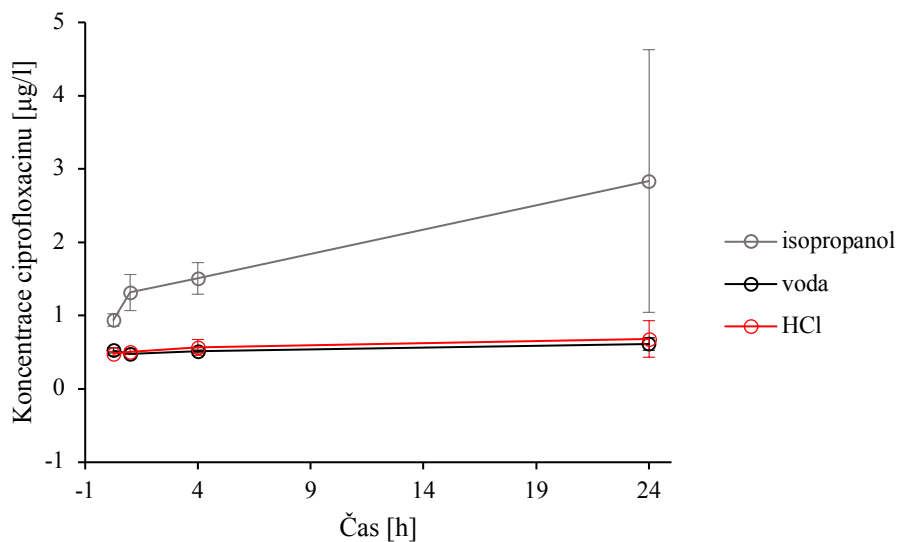
Po uplynutí 30 min impregnace byly vzorky po jednom vyjmuty pomocí pinzety z roztoku a oplachovány způsobem, jež je uveden v Tab. 18.

Tab. 18: Postup oplachu vrstev a kontrol.

Označení misky	Oplachová kádinka 1	Oplachová kádinka 2	Oplachová kádinka 3
V1 K1	0,1 M HCl	0,1 M HCl	0,1 M HCl
V2 K2	isopropanol	isopropanol	isopropanol
V3 K3	deionizovaná voda	deionizovaná voda	deionizovaná voda

Mezi oplachovými kádinkami 1–2 a 2–3 byly vzorky opláchnuty ještě pomocí stříčky obsahující isopropanol z důvodu co nejefektivnějšího odstranění přebytečného ciprofloxacinu obsaženého na povrchu vzorků. Následovalo sušení, při němž byly vzorky opřeny o petriho misku kolmo k filtračnímu papíru, jímž byla pokryta pracovní plocha stolu. Sušení probíhalo při pokojové teplotě, aby se zabránilo tvorbě makroskopických nepravidelných sedimentů [22]. Poté byly suché vzorky opět pomocí pinzety vloženy do skleněných lékovek (celkem 18) umístěných na třepačkách a zality 10 ml roztoku vnitřního standardu o koncentraci 100 µg/l.

Za stálého třepání bylo z každé lékovky odebíráno 500 µl roztoku v časových intervalech 15 min, 1 h, 4 h, 24 h. Kinetika uvolňování ciprofloxacinu z vrstev je uvedena na Obr. 19.



Obr. 19: Uvolňování ciprofloxacinu z vrstev.

Z Obr. 19 je zřejmé, že vrstvy, které byly oplachovány v 0,1 M HCl či deionizované vodě, nevykazují prakticky žádný nárůst koncentrace v závislosti na čase. Tento problém byl zřejmě způsoben při sušení vzorků, vlivem povrchového napětí, které má kapka vody (tedy i kapka 0,1 M HCl) oproti isopropanolu výrazně vyšší. Ciprofloxacin tedy pravděpodobně difundoval z vrstvy do kapky a společně s ní byl absorbován filtračním papírem. Oproti tomu vrstvy, které byly oplachovány samotným isopropanolem, vykazují poměrně uspokojivý nárůst koncentrace, avšak uvolňování ciprofloxacinu bylo značně nestabilní. Vzorky kontrol obsahovaly ze zatím neznámých důvodů poměrně vysoké koncentrace ciprofloxacinu. Vzhledem k nedostatečným časovým možnostem však již nebylo možné v rámci této kvalifikační práce provést další experimenty.

5 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byly shrnuty základní informace o fluorochinolonových antibiotikách a ciprofloxacinu. Dále byla popsána metoda kapalinové chromatografie, hmotnostní a fluorescenční detekce a technika magnetronového naprašování. V poslední části pak byly porovnány možnosti kapalinové chromatografie pro stanovení ciprofloxacinu ve vodě.

V praktické části této práce byla nejprve provedena optimalizace podmínek chromatografické separace, konkrétně složení mobilní fáze a objem nástřiku. Optimálních podmínek bylo dosaženo při obsahu 17,5 % mobilní fáze B (0,1 % HCOOH v acetonitrilu) v mobilní fázi A (0,1% HCOOH v deionizované vodě), průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min, teplotě separace 30 °C a objemu nástřiku 25 µl. Poté byla provedena optimalizace podmínek hmotnostní detekce. Optimálních podmínek bylo dosaženo při potenciálu HESI kapiláry 4 kV, průtoku hlavního zmlžujícího plynu 50 arb, průtoku pomocného zmlžujícího plynu 20 arb, teplotě HESI kapiláry 350 °C, teplotě transferové trubice 350 °C, potenciálu na S-čočkách 60 V, potenciálu na F-čočkách -7,75 V, normalizované kolizní energii 31 % a kombinaci 3 mikroskenů s dobou plnění pasti 200 ms. Nakonec byla provedena volba vhodných podmínek fluorescenční detekce a spektrofotometrické detekce v UV/VIS oblasti. Pro fluorescenční detekci byla zvolena excitační vlnová délka 446 nm, emisní vlnová délka 289 nm a vlnová délka emisního filtru 370 nm. Pro spektrofotometrickou detekci byla zvolena vlnová délka 280 nm. Dále pak bylo provedeno testování stability analytu, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití 0,1 M HCl jako rozpouštědla a následného ředění v témže roztoku.

Po zoptimalizování metody LC-MS a volbě vhodných podmínek pro metody LC-FLD a LC-UV byla provedena jejich validace, při níž byly hodnoceny parametry linearita, správnost (vyjádřená jako výtěžnost), přesnost (vyjádřená jako opakovatelnost), rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti (pro LC-UV pouze mez detekce a mez stanovitelnosti). Bylo zjištěno, že metody LC-MS i LC-FLD poskytují výsledky s dostatečnou správností a přesností v rozsahu koncentrací 1,0–50 µg/l. Pro LC-MS byla zjištěna mez stanovitelnosti 10 ng/l a mez detekce 2 ng/l. Pro LC-FLD byla zjištěna mez stanovitelnosti 100 ng/l a mez detekce 30 ng/l. Obě tyto metody lze tedy použít pro zamýšlené použití. Pro metodu LC-UV byla zjištěna mez stanovitelnosti 8 000 ng/l a mez detekce 5 000 ng/l, což bylo již pro danou aplikaci nedostačující.

V závěru této práce pak byla metoda LC-MS testována v rámci experimentu, jež se zabýval stanovením ciprofloxacinu ve vrstvách. Vrstvy deponované na sorbentu PEEK společně s kontrolami byly impregnovány v roztoku ciprofloxacinu o koncentraci 5 g/l a oplachovány v isopropanolu, 0,1 M HCl či deionizované vodě. Následně byla testována kinetika uvolňování ciprofloxacinu z vrstev v přesně určených časových intervalech. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při oplachování v isopropanolu za současného omývání isopropanolem ve stříčce. Výsledky experimentu byly poměrně uspokojivé a byla prokázána funkčnost metody pro její zamýšlené použití. Dále byla prokázána správná volba vrstev, sorbentu a koncentrace roztoku ciprofloxacinu pro impregnaci.

6 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] APPELBAUM P.C. a P.A. HUNTER. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000, (16), 5–15.
- [2] HANULÍK Vojtěch, Miroslava HTOUTOU SEDLÁKOVÁ, Jana PETRŽELOVÁ a Milan KOLÁŘ. Možnosti fluorochinolonů v současné klinické praxi. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2010, (24), 184–186.
- [3] Subkomise pro antibiotickou politiku Komise pro lékovou politiku a kategorizaci léčiv ČLS JEP. Konsensus používání antibiotik III. Chinolony. *Praktický lékař*. 2006, (86), 570-574.
- [4] KOPEČNÁ, Klára. *Vyhodnocení aktivity potenciálně antibiotických látek pomocí mikrodiluční bujónové metod*. Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra biologických a lékařských věd.
- [5] *Český lékopis 2009 – Doplněk 2012*. Praha: Grada, 2009, 2154–2156.
- [6] ZHANG, Gui-Fu, Xiaofeng LIU, Shu ZHANG, Baofeng PAN a Ming-Liang LIU. Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, (146), 599-612. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.01.078.
- [7] PODLIPSKÁ, Kateřina. *Hodnocení toxicity směsi léčiv*. Hradec Králové, 2015. Rigorózní práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie.
- [8] *SÚKL Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. 10. duben 2018 [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz>
- [9] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha: Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [10] KŘÍŽEK, Martin a Šíma JAN. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích - Zemědělská fakulta, 2015. ISBN 978-80-7394-486-5.
- [11] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Klouda, 2003. ISBN 80-96369-07-2.
- [12] OPEKAR, František, Ivan JELÍNEK, RYCHOVSKÝ a Zbyněk PLZÁK. *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-0553-1.
- [13] HOLČAPEK, Michal. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze* [online]. 2017 [cit. 2018-04-11]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>

- [14] ŠTULÍK, Karel a kolektiv. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0852-9.
- [15] VÁŇA, Jaroslav. *Analyzátory plynů a kapalin*. 2. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1984. ISBN 04-614-84.
- [16] KRATOCHVÍL, Jiří. *Příprava nanokompozitních tenkých vrstev*. Praha, 2015. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Katedra makromolekulární fyziky.
- [17] BIEDERMAN, Hynek a Yoshihito OSADA. *Plasma Polymerization Processes*. Amsterdam: Elsevier, 1992. ISBN 0-444-88724-5.
- [18] AŠPERGER, Danijela, Vesna TIŠLER, Mirta ZRNČIĆ, Dragana MUTAVDŽIĆ PAVLOVIĆ, Sandra BABIĆ, Alka J. M. HORVAT a Marija KAŠTELAN-MACAN. HPLC–DAD–FLD Determination of Veterinary Pharmaceuticals in Pharmaceutical Industry Wastewater with Precolumn Derivatization Using Fluorescamine. *Chromatographia*. 2014, (77), 1059-1066. DOI: 10.1007/s10337-014-2685-x.
- [19] BABIĆ, Sandra, Dragana MUTAVDŽIĆ PAVLOVIĆ, Danijela AŠPERGER, Martina PERIŠA, Mirta ZRNČIĆ, Alka J. M. HORVAT a Marija KAŠTELAN-MACAN. Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, (398), 1185–1194. DOI: 10.1007/s00216-010-4004-1.
- [20] DAOUK, Silwan, Sandrine FLEURY-SOUVERAIN a Youssef DAALI. Development of an LC-MS/MS Method for the Assessment of Selected Active Pharmaceuticals and Metabolites in Wastewaters of a Swiss University Hospital. *Chimia*. 2015, (69), 684–689. DOI: 10.2533/chimia.2015.684.
- [21] RAMOS-PAYÁN, María, Mercedes VILLAR-NAVARRO, Rut FERNÁNDEZ-TORRES, Manuel CALLEJÓN-MOCHÓN a Miguel Ángel BELLO-LÓPEZ. Electromembrane extraction (EME)—an easy, novel and rapid extraction procedure for the HPLC determination of fluoroquinolones in wastewater samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, (405), 2575–2584. DOI: 10.1007/s00216-012-6664-5.

- [22] KRATOCHVÍL, Jiří, David KAHOUN, Ján ŠTĚRBA, et al. Plasma polymerized C:H:N:O thin films for controlled release of antibiotic substances. *Plasma Process and Polymers*. 2017, 1-9. DOI: 10.1002/ppap.201700160.
- [23] KAHOUN, David. *Laboratorní cvičení z analytické chemie – úloha č. 5: Stanovení fenolu a α -naftolu ve vodě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na obrácených fázích se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti (RP-HPLC-UV)*. 4. České Budějovice.
- [24] KAHOUN, David. *Laboratorní cvičení z hmotnostní spektrometrie - úloha č.1: Optimalizace chromatografických a detekčních podmínek pro stanovení fenylalaninu a tyrosinu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s ionizací vyhřívaným elektrosprejem a s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-HESI-MS/MS)*. 2. České Budějovice.
- [25] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha: Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [26] Association of Analytical Communities. Official Methods of Analysis. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements: Appendix F*. [Online] 2009. [cit. 2018-04-11] <http://www.eoma.aoac.org/>.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

API	ionizace za atmosférického tlaku
Arb	relativní veličina určená referenčním měřením
EME	elektromembránová extrakce
ESI	ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie
in vitro	ve skle
K	kontrola
LC-DAD	spojení kapalinové chromatografie s detektorem s diodovým polem
LC-FLD	spojení kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí
LC-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí
LC-MS/MS	spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
LC-UV	spojení kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MF	mobilní fáze
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRM	přechod pro monitorování vícenásobné reakce
m/z	poměr hmotnosti iontu a náboje
PEEK	polyetherketon
PR	pracovní roztok
QC	koeficient kvality lineární regrese
RSD	relativní směrodatná odchylka
SPE	extrakce tuhou fází
ST	standard
S/N	poměr signálu k šumu
TIC	celkový iontový proud
V	vrstva
VS	vnitřní standard

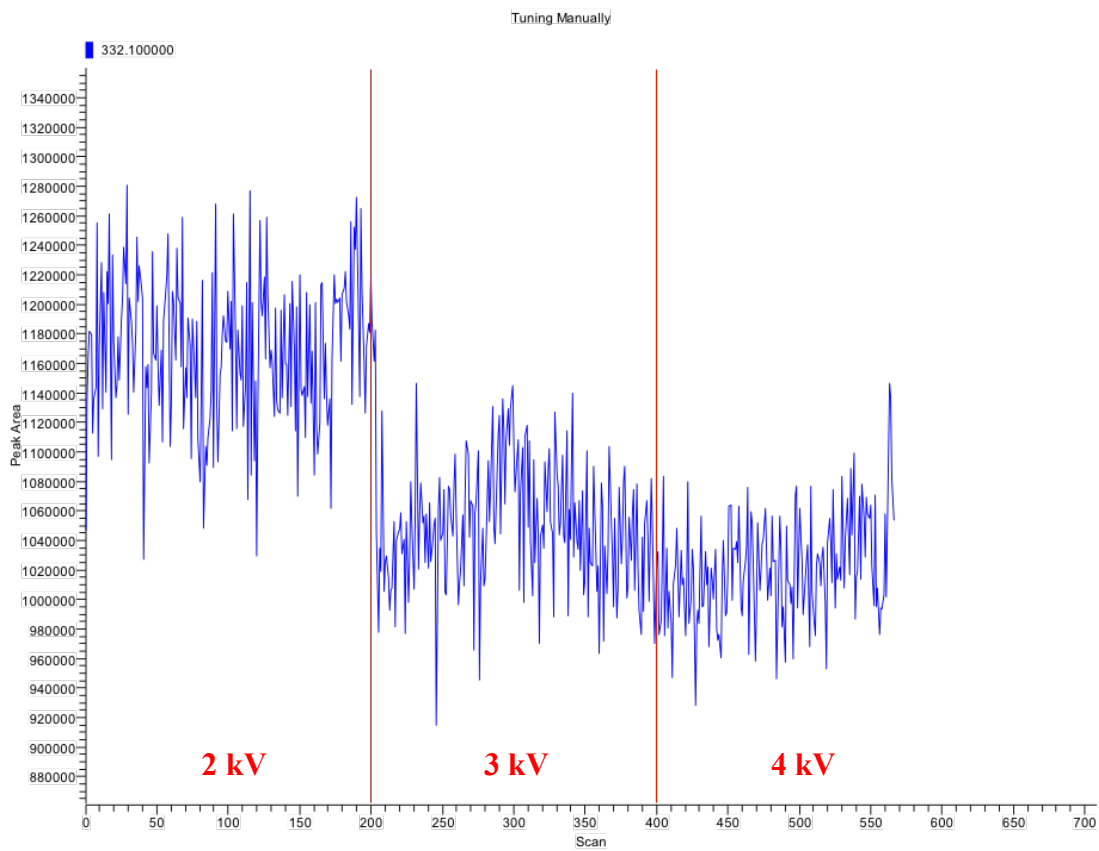
8 PŘÍLOHY

8.1 Příloha A

Tab. 19: Léčivé přípravky obsahující ciprofloxacin registrované v ČR ke dni 20. 3. 2018 [8].

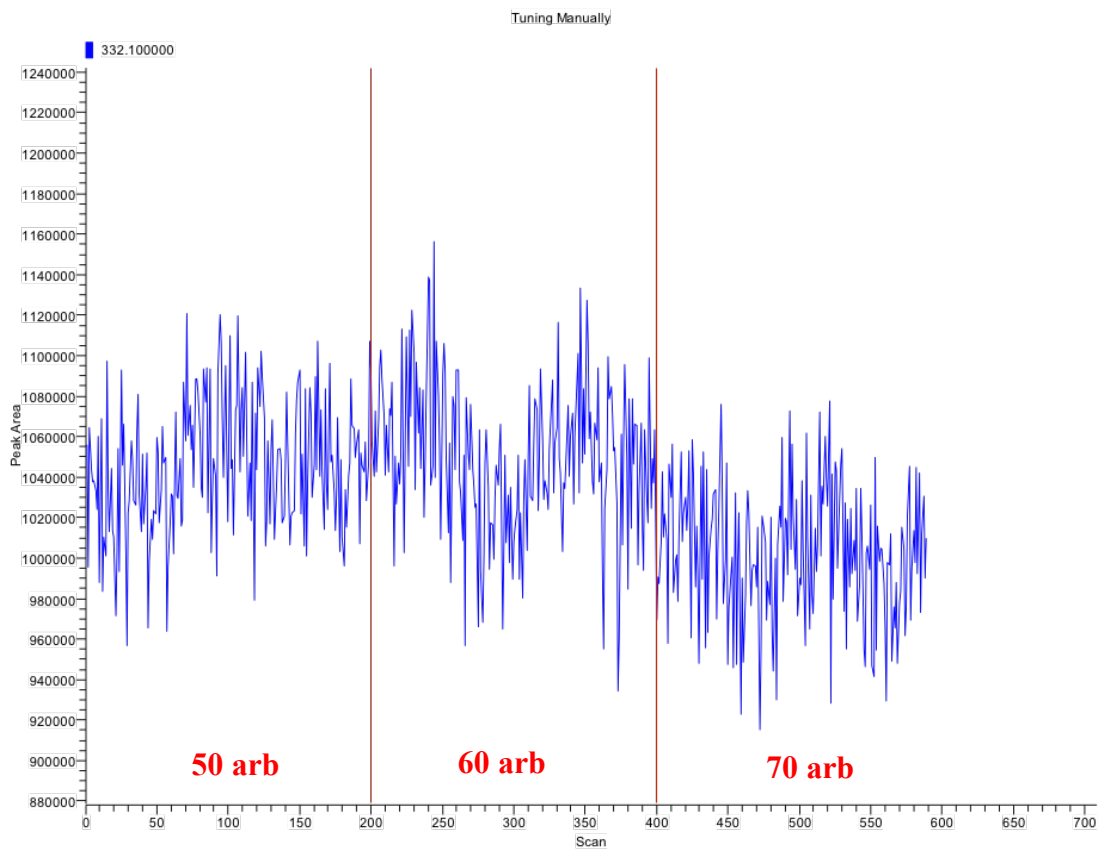
Registrovaný název LP	Doplňk názvu	Léková forma
CIFLOXINAL 250 MG	250MG TBL FLM 10	Potahované tablety
CIFLOXINAL 500 MG	500MG TBL FLM 10	Potahované tablety
CILOXAN	3MG/ML AUR/OPH GTT SOL 1X5ML	Oční/ušní kapky, roztok
CIPLOX	500MG TBL FLM 10	Potahované tablety
CIPRINOL	200MG/100ML INF SOL 1X100ML	Infuzní roztok
CIPRINOL 100 MG/10 ML	10MG/ML INF CNC SOL 5X10ML	Koncentrát pro infuzní roztok
CIPRINOL 250	250MG TBL FLM 10	Potahované tablety
CIPRINOL 500	500MG TBL FLM 10	Potahované tablety
CIPROFLOXACIN KABI	400MG/200ML INF SOL 10X200ML	Infuzní roztok
CIPROFLOXACIN KABI	200MG/100ML INF SOL 10X100ML	Infuzní roztok
INFALIN DUO 3 MG/ML + 0,25 MG/ML UŠNÍ KAPKY, ROZTOK	30MG/ML+0,25MG/ML AUR GTT SOL 10ML	Ušní kapky, roztok (3mg ciprofloxacin + 0,25 mg další léčivá látka)

8.2 Příloha B



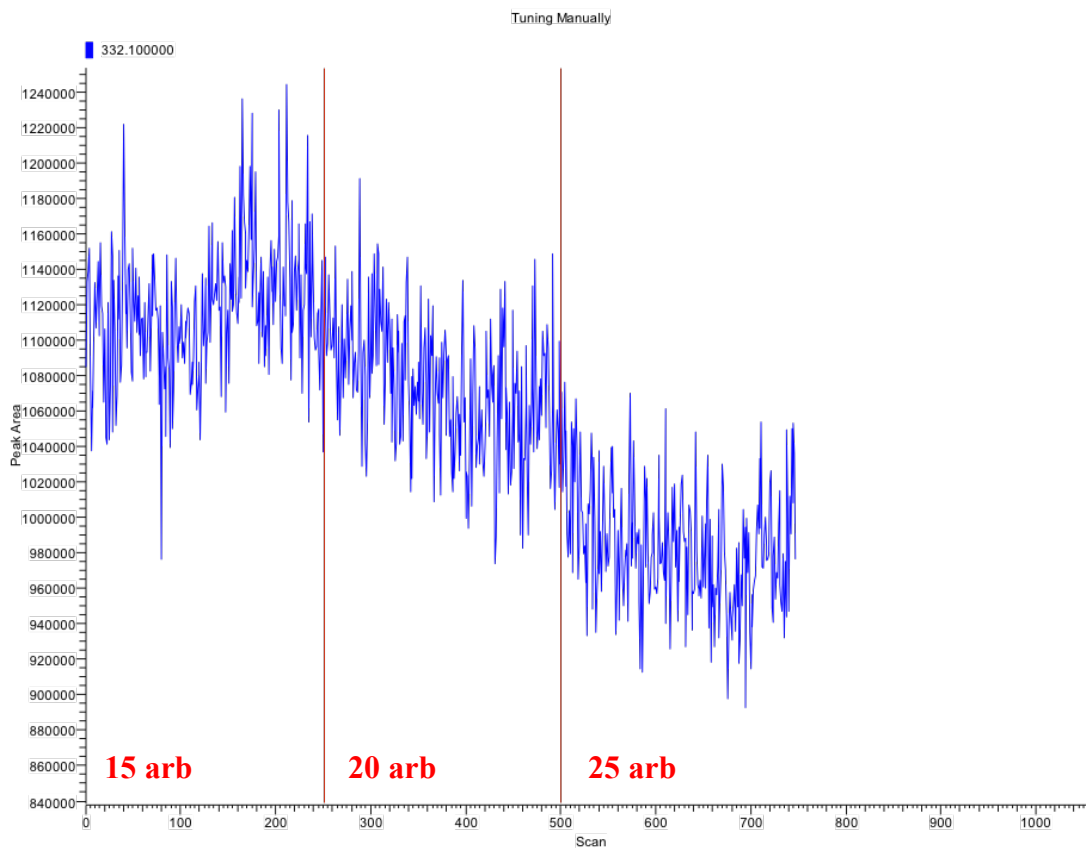
Obr. 20: Závislost odezvy detektoru na molekulární iont analytu na potenciálu HESI kapiláry (2, 3, 4 kV).

8.3 Příloha C



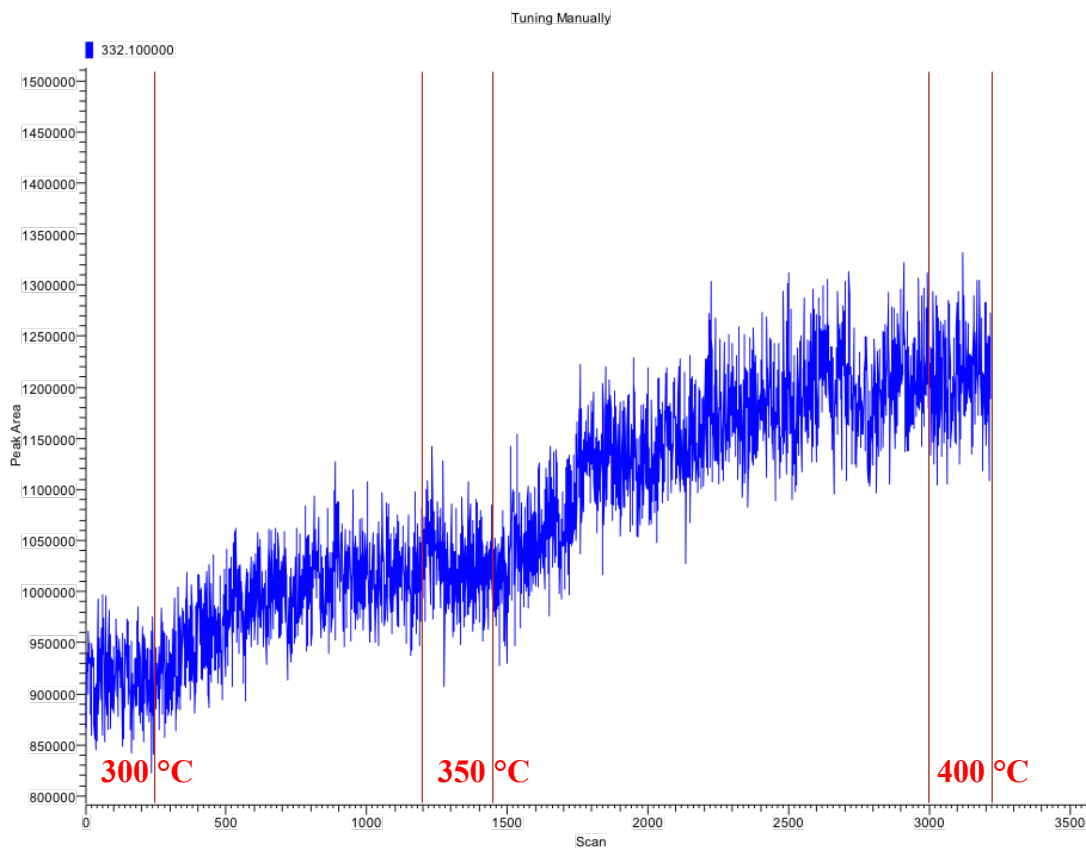
Obr. 21: Závislost odezvy detektoru na molekulární iont analytu na průtoku hlavního zmlžujícího plynu (50, 60, 70 arb).

8.4 Příloha D



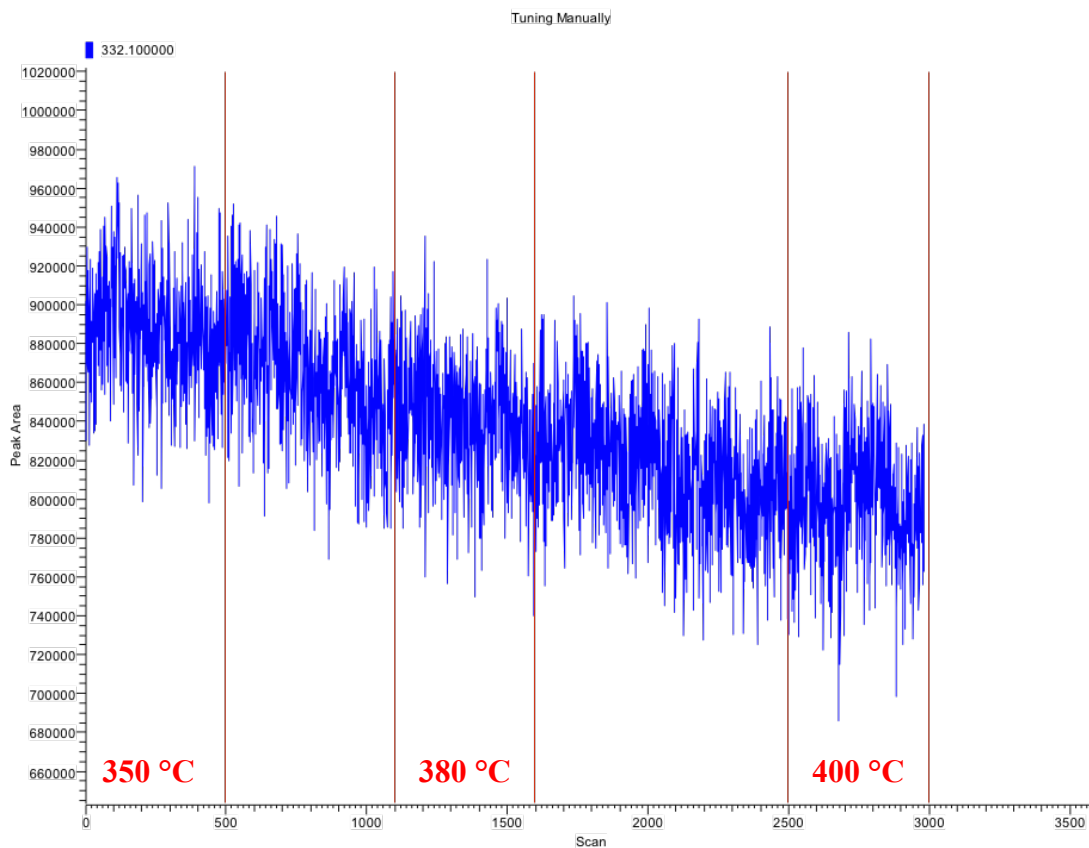
Obr. 22: Závislost odezvy detektoru na molekulární iont analytu na průtoku pomocného zmlžujícího plynu (15, 20, 25 arb).

8.5 Příloha E



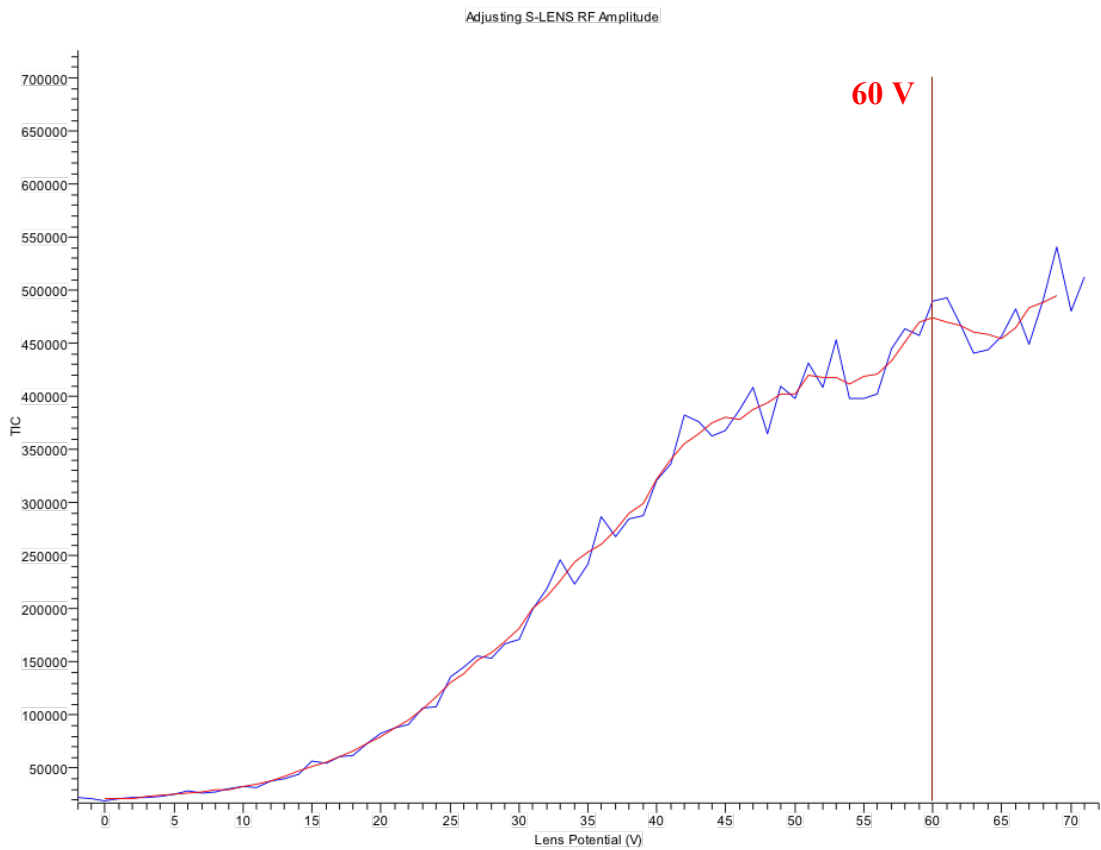
Obr. 23: Závislost odezvy detektoru na molekulární iont analytu na teplotě HESI kapiláry (300, 350, 400 °C).

8.6 Příloha F

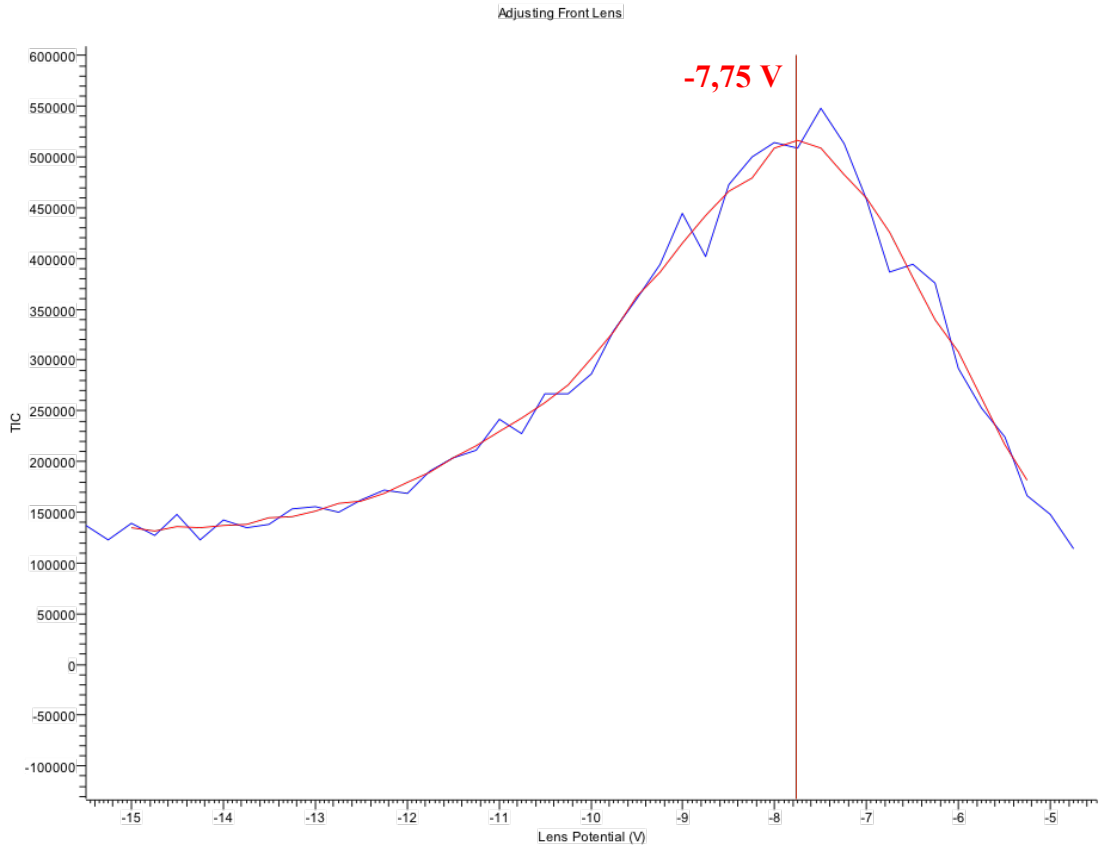


Obr. 24: Závislost odezvy detektoru na molekulární iont analytu na teplotě transferové trubice (350°, 380, 400 °C).

8.7 Příloha G

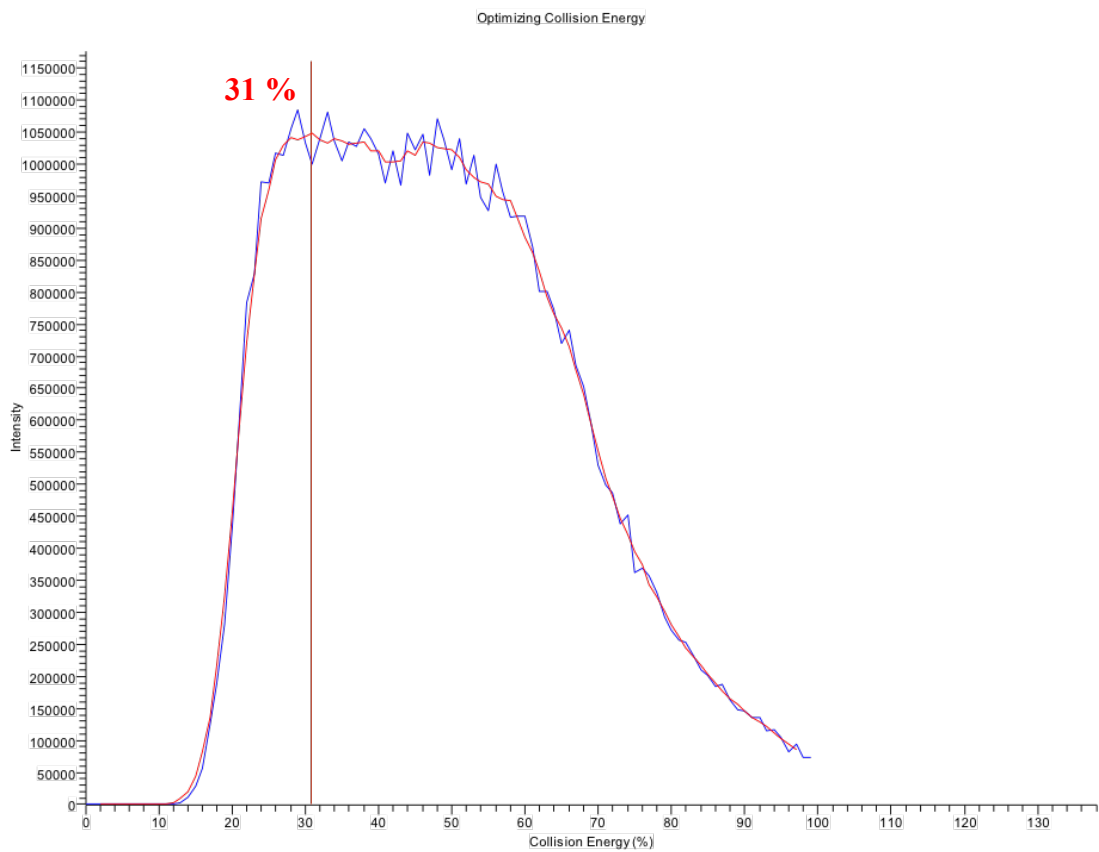


Obr. 25: Optimalizace potenciálu S-čoček (0 až 70 V).

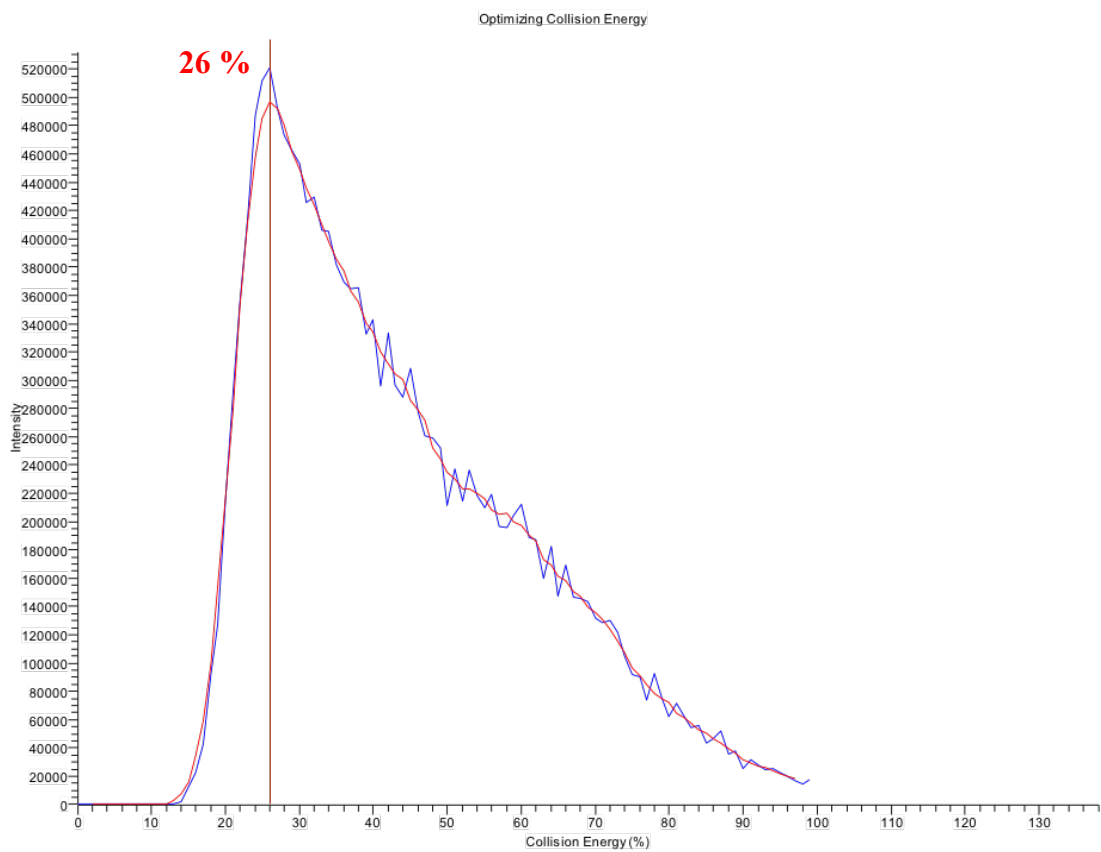


Obr. 26: Optimalizace potenciálu F-čoček (-15 až -5 V).

8.8 Příloha H



Obr. 27: Optimalizace kolizní energie pro analyt pro přechod 332 → 288 (0 až 100 %).



Obr. 28: Optimalizace kolizní energie pro vnitřní standard pro přechod 163 → 119 (0 až 100 %).