

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Nikola Hennhoferová

VÝVOJ UHPLC-MS/MS METODY PRO STANOVENÍ
CIPROFLOXACINU A JEHO ČTYŘ METABOLITŮ
V KRYSÍM SÉRU

Developement of a UHPLC-MS/MS method for determination
of ciprofloxacin and its four metabolites in rat serum

Diplomová práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

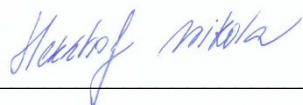
Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 11.06.2021



Nikola Hennhoferová

Abstrakt

Diplomová práce se zaměřuje na vývoj metody pomocí ultra vysokoučinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) pro stanovení ciprofloxacinu a jeho metabolitů (desethylenciprofloxacinu, formylciprofloxacinu, oxociprofloxacinu a sulfociprofloxacinu) v biologické matrici.

V rámci této práce bylo optimalizováno nastavení hmotnostního spektrometru a byla optimalizována chromatografická separace. Nalezené optimální parametry jsou následující: chromatografická kolona ACE® Excel® C₁₈-Amide (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies, Skotsko. Jako mobilní fáze (MF) byla zvolena směs 5 mmol l⁻¹ pufru mravenčanu amonného o pH 3 (složka A) a methanolu (složka B) za gradientové eluce. Průtok MF byl 0,5 ml min⁻¹, nástřik 1 μl, celková doba analýzy 12 minut, teplota na dávkovači 15 °C, teplota kolony 40 °C. Byly sledovány následující MRM přechody v pozitivním režimu: ciprofloxacin a sulfociprofloxacin: 332,1/314,1 (Q₁: -12 V, CE: -21 V, Q₃: -22 V), desethylenciprofloxacin: 306,2/288,2 (Q₁: -15 V, CE: -19 V, Q₃: -30 V), oxociprofloxacin: 346,1/328,1 (Q₁: -17 V, CE: -20 V, Q₃: -23 V), formylciprofloxacin: 360,1/342,1 (Q₁: -18 V, CE: -21 V, Q₃: -23 V) a pro sulfociprofloxacin byl sledován MRM přechod také v negativním režimu: 410,1/366,1 (Q₁: 30 V, CE: 23 V, Q₃: 24 V). Nastavení iontového zdroje bylo následující: průtok nebulizačního plynu 3 l min⁻¹, teplota zdroje 350 °C, průtok sušícího plynu 10 l min⁻¹, napětí na kapiláře 3000 V, teplota desolvatační kapiláry 250 °C.

Limit detekce (LOD) pro tuto metodu byl odhadnut na hodnotu 0,5 ng ml⁻¹. Na závěr byla vyvinutá metoda aplikována na biologickou matrici. Bylo ověřeno, že matrice nijak neovlivňuje separaci a tvary chromatografických píků. Matriční efekty se pohybovaly do 30 %.

Klíčová slova: ciprofloxacin, desethylenciprofloxacin, oxociprofloxacin, formylciprofloxacin, sulfociprofloxacin, UHPLC-MS/MS, krysí sérum.

Abstract

This diploma thesis is focused on the development of a ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method (UHPLC-MS/MS) for the determination of ciprofloxacin and its metabolites (desethylciprofloxacin, oxociprofloxacin, formylciprofloxacin and sulfociprofloxacin) in biological matrix.

In this work, the settings of the mass spectrometer and chromatographic separation were optimized. The optimal conditions were as follows. Chromatographic column ACE® Excel® C₁₈-Amide (100 mm × 2.1 mm; 1.7 μm), Advanced Chromatography Technologies, Scotland. Mobile phase composed of 5 mmol l⁻¹ ammonium formate buffer pH 3 (component A) and methanol (component B) under gradient elution. Flow rate was 0.5 ml min⁻¹, injection volume 1 μl, analysis time 12 minutes, autosampler temperature 15 °C and column temperature 40 °C. The following MRM transitions at positive mode were monitored: ciprofloxacin and sulfociprofloxacin: 332.1/314.1 (Q₁: -12 V, CE: -21 V, Q₃: -22 V), desethylciprofloxacin: 306.2/288.2 (Q₁: -15 V, CE: -19 V, Q₃: -30 V), oxociprofloxacin: 346.1/328.1 (Q₁: -17 V, CE: -20 V, Q₃: -23 V), formylciprofloxacin: 360.1/342.1 (Q₁: -18 V, CE: -21 V, Q₃: -23 V) and for sulfociprofloxacin MRM transition at negative mode was also monitored: 410.1/366.1 (Q₁: 30 V, CE: 23 V, Q₃: 24 V). The setting of the ion source was as follows: nebulization gas flow 3 l min⁻¹, source temperature 350 °C, drying gas flow 10 l min⁻¹, capillary voltage 3 000 V, desolvation capillary temperature 250 °C.

The limit of detection (LOD) was estimated to be 0.5 ng ml⁻¹. Finally, the developed method was applied to a biological matrix. It was verified that the matrix did not affect the separation and peak shapes. Matrix effects were up to 30 %.

Key words: ciprofloxacin, desethylciprofloxacin, oxociprofloxacin, formylciprofloxacin, sulfociprofloxacin, UHPLC-MS/MS, rat serum.

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce RNDr. Petru Kozlíkovi, PhD. za odborné vedení, velkou míru trpělivosti a za cenné rady během celého laboratorního měření a při sepisování této práce.

Velké díky patří rovněž mé rodině a Ing. Jiřímu Večerkovi za obrovskou podporu a umožnění studia.

Obsah

| | |
|--|---------------|
| 1 Teoretický úvod..... | - 10 - |
| 1.1 Cíl práce..... | - 10 - |
| 1.2 Ciprofloxacin a jeho metabolity | - 10 - |
| 1.3 UHPLC | - 13 - |
| 1.3.1 LC-MS instrument..... | - 14 - |
| 1.3.2 LC-MS 8045 Shimadzu..... | - 15 - |
| 1.4 Analýza ciprofloxacinu..... | - 16 - |
| 1.4.1 Analýza ciprofloxacinu v biologickém materiálu | - 17 - |
| 2 Experimentální část..... | - 21 - |
| 2.1 Použité chemikálie a instrumentace..... | - 21 - |
| 2.1.1 Chemikálie..... | - 21 - |
| 2.1.2 Instrumentace..... | - 21 - |
| 2.2 Příprava vzorků..... | - 23 - |
| 2.2.1 Ciprofloxacin | - 23 - |
| 2.2.2 Desethylenciprofloxacin..... | - 23 - |
| 2.2.3 Oxociprofloxacin..... | - 23 - |
| 2.2.4 Formylciprofloxacin | - 23 - |
| 2.2.5 Sulfociprofloxacin | - 24 - |
| 2.2.6 Směsný vzorek bez sulfociprofloxacinu..... | - 24 - |
| 2.2.7 Směsný vzorek..... | - 24 - |
| 2.2.8 Vzorek pro stanovení LOD..... | - 24 - |
| 2.2.9 Vzorek obsahující biologickou matici..... | - 25 - |
| 2.3 Analytické zpracování dat | - 25 - |
| 2.3.1 Vliv matričního efektu..... | - 25 - |
| 2.3.2 Faktor symetrie píku..... | - 25 - |

| | | |
|----------|--|---------------|
| 3 | Výsledky..... | - 26 - |
| 3.1 | Optimalizace hmotnostního spektrometru | - 26 - |
| 3.2 | Optimalizace UHPLC | - 33 - |
| 3.2.1 | Chromatografická kolona Acquity UPLC HSS C ₁₈ | - 34 - |
| 3.2.2 | Chromatografická kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C ₁₈ | - 35 - |
| 3.2.3 | Chromatografická kolona Acquity UPLC CSH C ₁₈ | - 38 - |
| 3.2.4 | Chromatografická kolona Kinetex F5, 100 Å | - 40 - |
| 3.2.5 | Chromatografická kolona Acquity UPLC CSH, fluorofenylová..... | - 43 - |
| 3.2.6 | Chromatografická kolona Zorbax Bonus RP..... | - 44 - |
| 3.2.7 | Chromatografická kolona Atlantis PREMIER BEH C ₁₈ AX..... | - 45 - |
| 3.2.8 | Chromatografická kolona Atlantis TM dC ₁₈ | - 48 - |
| 3.2.9 | Chromatografická kolona ACE® Excel® C ₁₈ -Amide | - 51 - |
| 3.3 | Odhad LOD..... | - 56 - |
| 3.4 | Aplikace metody v biologické matrici..... | - 57 - |
| 4 | Závěr | - 58 - |
| | Soupis bibliografických citací..... | - 59 - |

Seznam zkratek

| | |
|----------|---|
| API | léčivá látka přípravku (z angl. <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>) |
| BEH | hybridní sorbent s ethylenovými můstky (z angl. <i>Ethylene Bridged Hybrid</i>) |
| CE | kolizní energie (z angl. <i>Collision Energy</i>) |
| CID | kolizi indukovaná disociace (z angl. <i>Collision-Induced Dissociation</i>) |
| CSH | hybridní technologii povrchově nabitých částic (z angl. <i>Charged Surface Hybrid</i>) |
| DAD | detektor diodového pole (z angl. <i>Diode Array Detector</i>) |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>) |
| HSS | silně vázaný oxid křemičitý (z angl. <i>High Strength Silica</i>) |
| ICH | Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci léčivých přípravků pro humánní použití (z angl. <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>) |
| IS | vnitřní standard (z angl. <i>Internal Standard</i>) |
| IUPAC | Mezinárodní unie pro čistou a užitnou chemii (z angl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>) |
| LC-MS | kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (z angl. <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>) |
| LC-MS/MS | kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (z angl. <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>) |
| LOD | limit detekce (z angl. <i>Limit of Detection</i>) |
| LOQ | limit kvantifikace (z angl. <i>Limit of Quantification</i>) |
| ME | matriční efekt |
| MF | mobilní fáze |
| MRM | mód sledování vícero reakcí (z angl. <i>Multiple Reaction Monitoring</i>) |
| MS | hmotnostní spektrometrie (z angl. <i>Mass Spectrometry</i>) |
| PEEK | polyetheretherketon |
| SIM | mód sledování vybraného iontu (z angl. <i>Selected Ion Monitoring</i>) |
| SF | stacionární fáze |

| | |
|-------|---|
| SPE | extrakce na pevné fázi (z angl. <i>Solid Phase Extraction</i>) |
| SPS | spektrofotometrie na pevné fázi (z angl. <i>Solid Phase Spectrophotometry</i>) |
| UHPLC | ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>) |

Seznam symbolů

| | |
|----------|---|
| A | faktor symetrie píku |
| m/z | poměr hmotnosti ku náboji |
| t_r | retenční čas |
| ϕ_A | objemové procento vodné složky v mobilní fázi |
| ϕ_B | objemové procento organické složky v mobilní fázi |

1 Teoretický úvod

1.1 Cíl práce

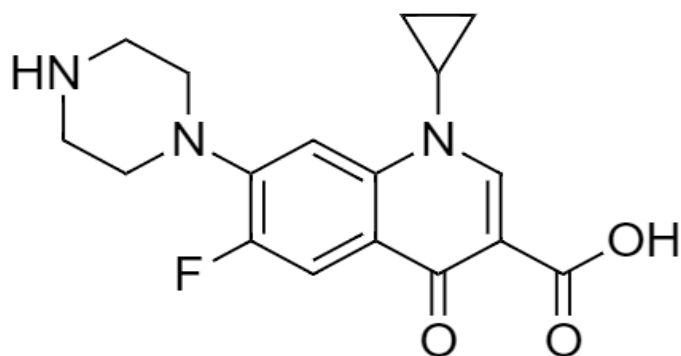
Cílem této diplomové práce bylo vyvinout dostatečně citlivou a selektivní metodu pomocí ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS), která by byla vhodná pro stanovení účinné látky (API) ciprofloxacinu a jeho čtyř metabolitů - desethyleneciprofloxacin, sulfociprofloxacin, oxociprofloxacin a formylciprofloxacin v biologickém materiálu. Tato metoda bude sloužit k monitorování ciprofloxacinu a jeho metabolitů v krysím séru po podání inovativních lékových forem ve spolupráci s 1. LF UK.

1.2 Ciprofloxacin a jeho metabolity

Ciprofloxacin je fluorochinolonové širokospektrální antibiotikum s molární hmotností $331,3 \text{ g mol}^{-1}$ [1], jehož celý název dle IUPAC je 1cyklopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-chinolin karboxylová kyselina [2]. Na Obr. 1 je znázorněna jeho struktura. Jedná se o světle žlutý krystalický prášek, který je prakticky nerozpustný ve vodě [3]. Ciprofloxacin má dvě hodnoty pKa: 6,09 (skupina karboxylové kyseliny) a 8,74 (dusík na piperazinylovém kruhu) [4].

Mechanismem účinku je inhibice replikace DNA inhibicí bakteriální DNA topoizomerázy IV a DNA-gyrázy (topoizomerázy II). Je zejména účinný proti gramnegativním bakteriím a taktéž proti některým grampozitivním bakteriím [5,6]. Mimo ciprofloxacin se do kategorie chinolonů 2. generace řadí také například norfloxacin, ofloxacin nebo lomefloxacin [7].

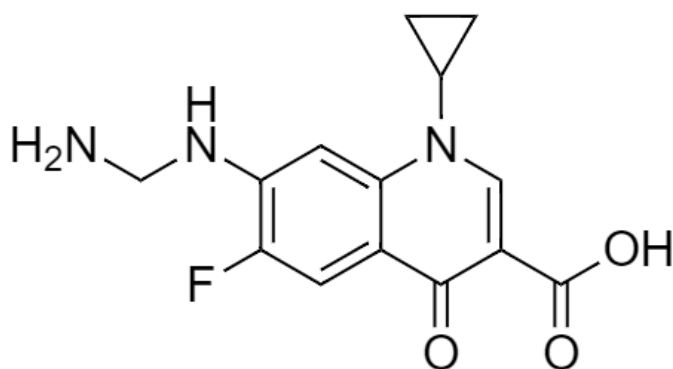
Léčivé přípravky obsahující API ciprofloxacin jsou pacientovi podávány perorálně nebo intravenózně [9] a jsou u nás dostupné pod komerčními názvy Cifloxinal, Ciloxan, Ciplox, Ciprinol nebo Ciprofloxacin Kabi [10]. Tyto léky jsou předepisovány na různé druhy infekcí (zejména na infekce močových a pohlavních cest).



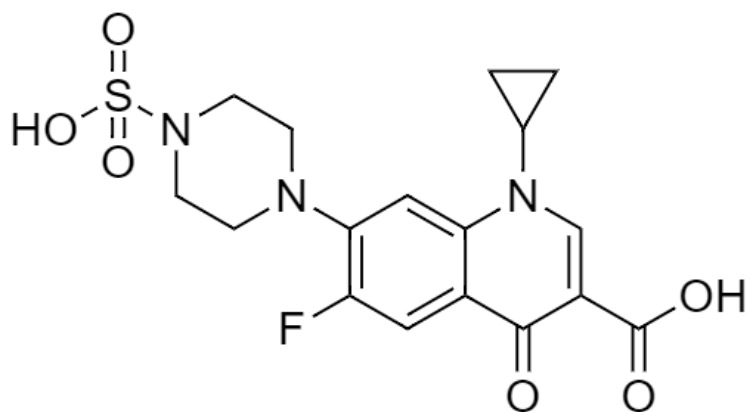
Obr. 1: Znázornění struktury ciprofloxacinu (vytvořeno v programu ACD/ChemSketch 12.01 [8]).

Ciprofloxacin se z větší části biotransformuje v játrech. U člověka byly identifikovány čtyři následující metabolity, které se vyskytují ve velmi malých koncentracích: *desethylenciprofloxacin* M1 (struktura znázorněna na Obr. 2), jehož molární hmotnost je $305,3 \text{ g mol}^{-1}$, *sulfociprofloxacin* M2 (struktura znázorněna na Obr. 3) s molární hmotností $411,4 \text{ g mol}^{-1}$, *oxociprofloxacin* M3 (struktura znázorněna na Obr. 4) s molární hmotností $345,3 \text{ g mol}^{-1}$ a *formylciprofloxacin* M4 (struktura znázorněna na Obr. 5) [11], jehož molární hmotnost je $359,4 \text{ g mol}^{-1}$.

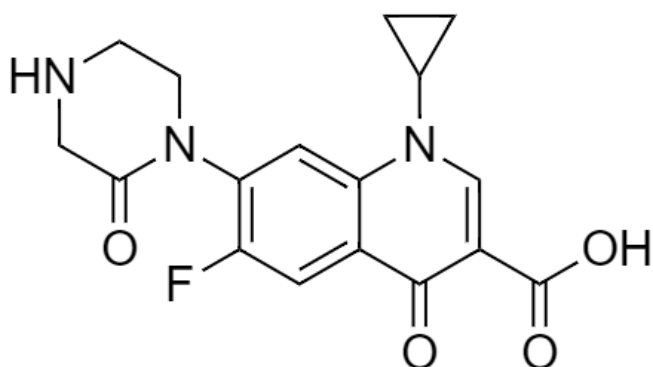
Ciprofloxacin se v nezměněné formě vylučuje převážně renálně a v menším množství také stolicí. Oxociprofloxacin je hlavním metabolitem, který je vylučován močí. Sulfociprofloxacin je pak majoritním metabolitem při vylučování stolicí [12].



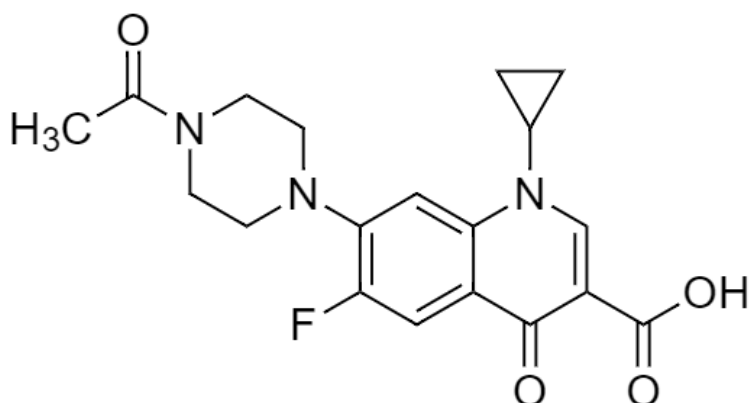
Obr. 2: Znázornění struktury desethylenciprofloxacinu M1 (vytvořeno v programu ACD/ChemSketch 12.01 [8]).



Obr. 3: Znázornění struktury sulfociprofloxacinu M2 (vytvořeno v programu ACD/ChemSketch 12.01 [8]).



Obr. 4: Znázornění struktury oxociprofloxacinu M3 (vytvořeno v programu ACD/ChemSketch 12.01 [8]).



Obr. 5: Znázornění struktury formylciprofloxacinu M4 (vytvořeno v programu ACD/ChemSketch 12.01 [8]).

1.3 UHPLC

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) se principem separace nijak neliší od vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Jak už ale z názvu vyplívá, UHPLC systémy využívají podstatně vyšších tlaků, kterým musí být přizpůsobena instrumentace. Zásadními rozdíly mezi UHPLC a HPLC jsou:

- *velikost částic* – v HPLC systémech jsou velikosti částic stacionární fáze (SF) řádově typicky 3–5 μm , zatímco UHPLC je charakterizován částicemi o velikosti menší než 2 μm [13,14]
- *rozměry kolony* – stejně jako u velikosti částic dochází u UHPLC ke zkrácování délky kolon; typická HPLC kolona má vnitřní průměr 4,6 mm a délku kolony 250 mm, oproti tomu UHPLC kolona má vnitřní průměr 2,1 mm (i méně) s délkou například 100 mm [13,14]
- *průtoková rychlost* – UHPLC používá daleko nižší průtokovou rychlost (například 0,2–0,7 ml min^{-1}), HPLC systémy pracují s rychlostmi 1–2 ml min^{-1} [13,14]
- *zpětný tlak* – s menšími částicemi a menším vnitřním průměrem separační kolony, dochází ke zvyšování zpětného tlaku; přístroje pro HPLC pracují při maximálním tlaku 400–600 barů (UHPLC systémy mohou pracovat až do 1500 barů) [13,14]

Mimo výše uvedené parametry, využívají UHPLC instrumenty spojovací prvky, které jsou zhotoveny z vysoce odolných materiálů, aby odolávaly vysokému tlaku, kterých se při separaci dosahuje. Příkladem takového materiálu může být pozlacená ocel, vysoce odolný polyetheretherketon (PEEK) nebo kombinace ocel-PEEK [15].

UHPLC tak oproti klasické HPLC přináší řadu předností, jako je zvýšení separační účinnosti, kratší dobu analýzy a s tím související snížení spotřeby rozpouštědel, zvýšení citlivosti a snížení meze detekce [16].

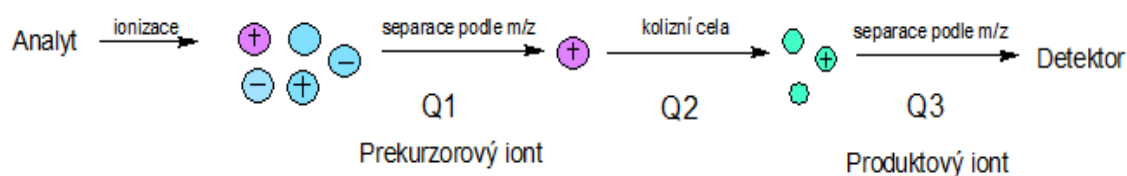
Typickými oblastmi využívající separaci látek pomocí HPLC/UHPLC jsou:

- farmacie – antibiotika, analgetika, sedativa [17]
- biochemie – aminokyseliny, proteiny, lipidy [18]
- potravinářství – umělá sladidla, aditiva, antioxidanty [19]
- forenzní analýza – alkohol v krvi, narkotika, drogy [20]
- klinická analýza – metabolity léčiv, extrakty moči [21]

1.3.1 LC-MS instrument

Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) umožňuje identifikaci a zároveň kvantifikaci jednotlivých složek v různorodých směsích [22].

Vyšší selektivity lze dosáhnout díky *tandemové hmotnostní spektrometrii* (LC-MS/MS), která využívá spojení dvou nebo více analyzátorů za sebou. Mezi nejčastěji využívanými tandemovými hmotnostními spektrometry jsou trojitě kvadrupóly nebo spojení kvadrupólu a průletový analyzátor, popřípadě kvadrupól a iontová past. Princip trojitěho kvadrupólu je takový, že v první fázi dochází v iontovém zdroji k převedení nenabitých molekul na nabitě ionty. Tyto ionty jsou následně vedeny do prvního hmotnostního analyzátoru, který propouští pouze ionty o určité hodnotě m/z (prekurzorový iont). Tato hmota je převedena do kolizní cely, kde dochází k fragmentaci (dodáním energie). Zde vznikají produktové ionty, které jsou transportovány do druhého hmotnostního analyzátoru a jsou znovu separovány na základě m/z (schéma je zobrazeno na Obr. 6) [23].



Obr. 6 : Princip tandemové hmotnostní spektrometrie, kde je jako hmotnostní analyzátor využit trojitý kvadrupól (vytvořeno v programu ACD/ChemSketch 12.01 [8]).

Vzhledem k tomu, že jsou kvadrupóly v sériovém zapojení, lze první a poslední kvadrupól nastavit na konstantní hodnotu m/z nebo skenovat ve zvoleném rozsahu m/z . Díky tomuto lze MS využívat hned v několika módech – úplný sken (SCAN), sledování vybraného iontu (SIM), sledování vícero reakcí (MRM), sken produktových iontů, sken prekurzorových iontů a sken neutrálních ztrát [23]. Pro kvantifikaci se nejčastěji využívá MRM a SIM mód [24, 25]. Ostatní skeny se využívají především v kvalitativní analýze [26, 27]. Nespornou výhodou LC-MS/MS je vyšší citlivost a selektivita oproti klasické LC-MS. Nevýhodou jsou však vyšší finanční náklady na provoz instrumentu [22].

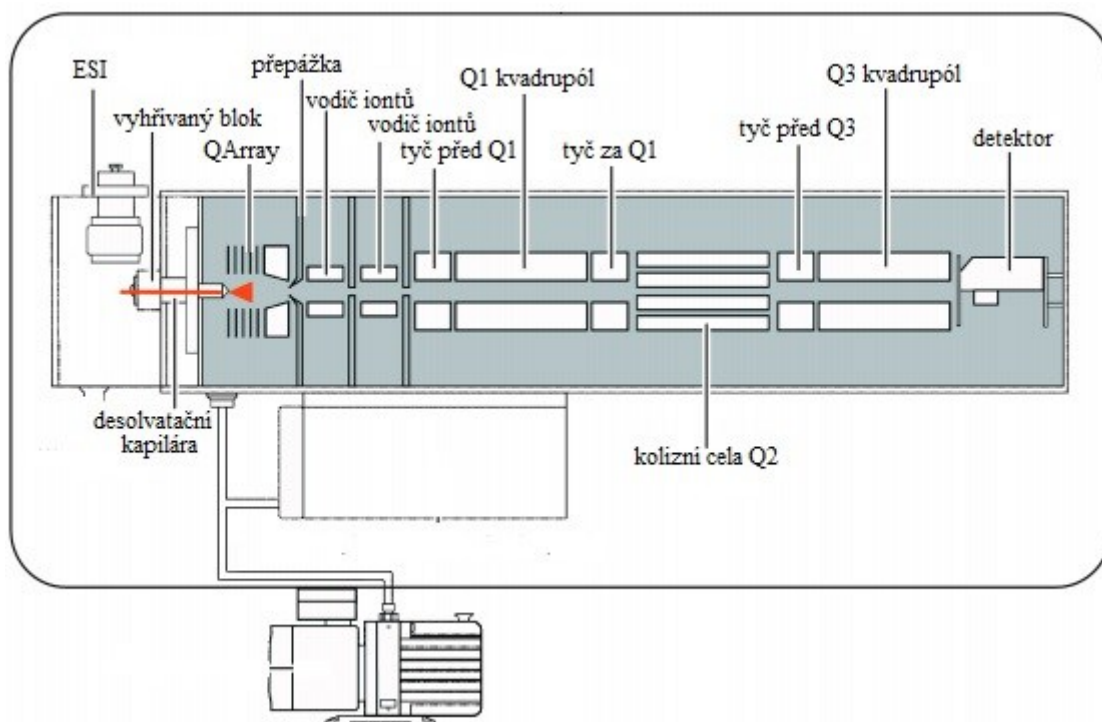
1.3.2 LC-MS 8045 Shimadzu

V rámci této diplomové práce byla všechna měření prováděna na instrumentu LC-MS/MS 8045 od japonské firmy Shimadzu.

V roce 2016 přišla společnost Shimadzu na trh s novým LC-MS instrumentem typu 8045, který je součástí řady Ultra Fast Mass Spectrometer a obsahuje tak řadu ultrarychlých technologií. Mezi tyto technologie se řadí rychlost skenování 30 000 u sec⁻¹ a přepínání polarit v čase 5 ms, což zajišťuje reprodukovatelná data i pro velmi složité matrice. Instrument byl navržen tak, aby byl robustní. Všechny součásti (vyhřívaná sonda ESI, vysokoteplotní topný blok, vyhřívané desolvatační potrubí, sušící plyn a zaostřovací optika) pracují tak, aby byla dosažena maximální citlivost [28].

Na Obr. 7 je uvedeno schéma instrumentu [29]. LC-MS/MS 8045 je vybaven vyhřívanou sondou ESI. Vysokoteplotní vzdušný plyn doplňuje nebulizační plyn (dusík), což vede ke zlepšení účinnosti desolvatace. To pak usnadňuje ionizaci široké škály sloučenin. Instrument využívá vysokorychlostní kolizní celu (označení UFsweeper II), která je vysoce citlivá a vyznačuje se svým vylepšeným zaostřováním iontů pomocí technologie vysokorychlostní přepravy iontu. Tato technologie poskytuje lepší přenos produktových iontů v kolizní cele, stabilnější intenzitu signálu a schopnost dosáhnout nižšího limitu detekce (LOD). Patentovaný kvadrupól QArray™ je navržen tak, aby zaostřoval na široký rozsah m/z překrytím více elektrických polí [28].

Instrument lze využívat pro řadu aplikací – environmentální analýza, analýza léčiv, potravin, atp [28].



Obr. 7: Schéma instrumentu LC-MS 8045 od firmy Shimadzu. Upraveno a převzato z [29].

1.4 Analýza ciprofloxacinu

V současné době není publikovaná UHPLC-MS/MS metoda, která by se zabývala analýzou ciprofloxacinu a jeho čtyř metabolitů v biologickém materiálu. V této kapitole jsou proto vypsány metody, zabývající se vývojem/validací/stanovením ciprofloxacinu ve farmaceutických přípravcích nebo v biologickém materiálu.

Scherer a kol. [30] publikovali článek, který se zabývá vývojem a validací metody vhodné pro stanovení ciprofloxacinu v tabletách (500 mg) a kapslích (250 mg a 500 mg) pomocí HPLC na reverzních fázích (RP-HPLC) s ultrafialovou (UV) detekcí. Jako separační kolona byla zvolena XBridge® C₁₈ (150 mm × 4,6 mm; 3,5 μm). Pro detekci byla zvolena vlnová délka 278 nm. Mobilní fáze (MF) byla směs 0,025 mol l⁻¹ kyseliny fosforečné (pH upraveno na hodnotu 3,0 pomocí triethylaminu) a acetonitrilu v poměru 60:40 (v/v). Průtok MF byl 1 ml min⁻¹. Kalibrační závislost byla lineární v rozsahu 0,3-50 mg ml⁻¹. LOD byl vypočítán jako trojnásobek hodnoty šumu základní

linie a jeho hodnota byla $0,11 \text{ mg ml}^{-1}$. LOQ byl vyjádřen jako desetinásobek hodnoty šumu základní linie a jeho hodnota byla $0,35 \text{ mg ml}^{-1}$.

Krishna a kol. [31] ve svém článku popsali vývoj a validaci UV spektrofotometrické metody, kterou jsou schopni stanovit ciprofloxacin hydrochlorid a ornidazol v tabletě Cifran-oz. Jako rozpouštědlo byla zvolena destilovaná voda. Pracovní roztok obsahoval koncentraci $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ obou analytů. Skenováním v rozsahu vlnových délek 400–200 nm byla vybrána vlnová délka 270 nm pro kvantifikaci ciprofloxacinu. Kalibrační závislost byla lineární v rozsahu $2\text{--}12 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. LOD byl stanoven pro ciprofloxacin na hodnotu $0,546 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ a LOQ $1,65 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

Suhagia a kol. [32] publikovali ve svém článku RP-HPLC metodu pro stanovení ciprofloxacinu a dexamethasonu v očních/ušních kapkách. Separační kolona byla C₁₈ Grace Smart (25 cm × 4,6 mm; 5 μm). MF byla směs methanolu, vody a triethylaminu (55:45:0,6; v/v/v). Pomocí kyseliny ortho-fosforečné bylo upraveno pH MF na hodnotu 3,0. Průtok MF byl $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. Ciprofloxacin byl kvantifikován pomocí UV detekce při vlnové délce 254 nm. Ciprofloxacin eluoval ve 4,1 minutě a celková doba analýzy byla 10 minut. Kalibrační závislost byla lineární v rozsahu $3\text{--}18 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Hodnota LOD byla $0,29 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ a LOQ $0,89 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

Pascal-Reguera a kol. [33] vyvinuli metodu pro stanovení ciprofloxacinu pomocí spektrofotometrie na pevné fázi (SPS). Principem SPS je přímé měření absorpce světla iontoměniče obsahující sledovanou látku. Jako iontoměnič byl zvolen Sephadex SP C25. Jako rozpouštědlo byla použita $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina chlorovodíková. Pufr byl tvořen 1 mol l^{-1} kyselinou mravenčí (pH bylo upraveno pomocí 1 mol l^{-1} hydroxidu sodného na hodnotu 2,2). Absorpční maximum ciprofloxacinu bylo při vlnové délce 277 nm a 380 nm. Kalibrační závislost byla lineární v rozsahu $0,050\text{--}0,300 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Hodnota LOD byla $0,012 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ a LOQ $0,040 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$.

1.4.1 Analýza ciprofloxacinu v biologickém materiálu

Wang a kol. [34] se ve své publikaci zabírali stanovením ciprofloxacinu v lidské moči a séru pomocí HPLC-MS/MS. Vzorky biologických materiálů byly před analýzou upraveny metodou extrakce na pevné fázi (SPE). Vzorky byly nanášeny na extrakční kolonu a promyty 0,05% kyselinou mravenčí, vysušeny a poté eluovány methanolem.

Dále byly vzorky odpařeny pod proudem dusíku a rekonstituovány v 90% methanolu. Jako tandemový hmotnostní spektrometr byl pro experimentální měření zvolen trojitý kvadrupól s elektrosprejem v pozitivním módu jako zdroj ionizace. Bylo měřeno na koloně Zorbax SB-Aq C₁₈ s obrácenou fází (100 mm × 2,1 mm; 1,8 μm). MF byla směs 0,1% kyseliny mravenčí a acetonitrilu. Zastoupení jednotlivých složek se měnilo podle gradientového programu (viz Tab. 1). Půtok MF byl 0,2 ml min⁻¹. Analyt eluoval ve 4,05 minutě a celková doba analýzy byla 10 minut. MRM přechod pro ciprofloxacin byl 332,0/314,0 (*m/z*). V této metodě byl jako IS použit ciprofloxacin-D8 jehož MRM přechod byl 340,0/322,0 (*m/z*). Kalibrační závislost byla lineární v rozsahu 5–100 ng ml⁻¹. Hodnota LOD činila 1 ng ml⁻¹ (vyhodnocován jako trojnásobek hodnoty šumu základní linie) a hodnota LOQ byla 3 ng ml⁻¹ (vyhodnocován jako desetinásobek hodnoty šumu základní linie).

Matta a kol. [35] publikovali ve svém článku kvantifikaci ciprofloxacinu v biologickém materiálu myši pomocí UHPLC-MS/MS s trojitým kvadrupólem jako hmotnostním analyzátozem. Pro extrakci ciprofloxacinu z plasmy a moči byla využita technika srážení proteinů. K danému množství biologického materiálu byl přidán acetonitril obsahující IS. Ke srážení docházelo na srážecích destičkách. Po promíchání na třepačce a odstředění, byl vzniklý supernatant analyzován. Jako iontový zdroj byl zvolen elektrosprej a bylo měřeno v pozitivním MRM módu. Separace probíhala na koloně C₁₈ Zorbax Agilent Technologies (50 mm × 2,1 mm; 3,5 μm). MF byla složena z 5 mmol l⁻¹ mravenčanu amonného s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí (vodná složka A) a acetonitrilu (organická složka B). Zastoupení vodné a organické složky se v průběhu analýzy měnilo podle gradientového programu (viz Tab. 2). Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml min⁻¹. Jako IS byl zvolen izotopicky značený ciprofloxacin-D8. Oba analyty eluovaly v 0,87 minutě a celková doba analýzy byla 3 minuty. MRM přechod pro ciprofloxacin byl 332,1/230,8 (*m/z*) a pro izotopicky značený standard 340,1/296,1 (*m/z*). Kalibrační závislost byla lineární v rozsahu 100–500 ng ml⁻¹. Hodnota LOQ byla 100 ng ml⁻¹ a jednalo se o takovou koncentraci analytu ve vzorku, která odpovídala desetinásobku poměru signál/šum.

Tab. 1: Gradientový program eluce, podle kterého se měnilo zastoupení 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu (složka B).

| t (min) | ϕ_A (%) | ϕ_B (%) |
|-----------|--------------|--------------|
| 0 | 90 | 10 |
| 5 | 90 | 10 |
| 5,1 | 40 | 60 |
| 6 | 40 | 60 |
| 6,1 | 90 | 10 |
| 10 | 90 | 10 |

Tab. 2: Gradientový program eluce, podle kterého se měnilo zastoupení 5 mmol l⁻¹ mravenčanu amonného s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu (složka B).

| t (min) | ϕ_A (%) | ϕ_B (%) |
|-----------|--------------|--------------|
| 0 | 90 | 10 |
| 0,3 | 90 | 10 |
| 0,8 | 30 | 70 |
| 1,6 | 30 | 70 |
| 2,2 | 90 | 10 |
| 3 | 90 | 10 |

Czyz a kol. [36] popsali ve svém článku metodu pro stanovení ciprofloxacinu a enrofloxacinu v plasmě plazů pomocí HPLC s detektorem diodového pole (DAD). Příprava vzorku spočívala v přidavku 70% kyseliny chloristé k plasmě ve skleněné zkumavce. Tato zkumavka byla promíchaná a následně odstředěna. Separační kolona byla Kinetex® RP C₁₈ (150 mm × 4,6 mm; 5 μm) a MF byla směs 0,002 mol l⁻¹ kyseliny fosforečné a acetonitrilu (83:17, v/v). Separace probíhala izokratickou elucí při vlnové délce 280 nm a průtokem MF 0,5 ml min⁻¹. Ciprofloxacin eluoval v 7,25 minutě s celkovou dobou analýzy 14 minut. Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu

od 3 do 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Hodnota LOQ byla 3 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Hodnota LOD byla odečítána ve trojnásobku poměru signál/šum. Konkrétní hodnota LOD není v publikaci uvedena.

Choudhury a kol. [37] se v publikaci zabývali vývojem a validací LC-MS/MS metody pro studium farmakokinetiky ciprofloxacinu u zdravých mužských dobrovolníků. Vzorky byly připraveny smícháním krevní plasmy s IS a následným promícháním. Extrakce takto připraveného roztoku probíhala pomocí ručního vytřepávání v chloroformu. Po odstředění byl vzniklý supernatant odebrán a odpařen pod přívodem dusíku. Poté byla k odparku přidána MF. Pro tuto práci byl využit HPLC-MS/MS instrument s trojitým kvadrupólem jako hmotnostním spektrometrem. Zdrojem ionizace byl elektrosprej. Stacionární fázi (SF) byla kolona C_{18} (75 mm \times 4,6 mm; 3,5 μm). MF byla směs methanolu a 0,2% kyseliny mravenčí (90:10, v/v), která byla pumpována průtokem 0,5 ml min^{-1} . Jako vnitřní standard byl využit ofloxacin. Celková doba analýzy byla 3 minuty. Ciprofloxacin eluoval v 1,07 minutě a ofloxacin v 1,05 minutě. Vyvinutou metodou byly zjištěny následující MRM přechody (měřeno v pozitivním módu): ciprofloxacin 332,0/231,3 (m/z) a ofloxacin 362,2/261,0 (m/z). Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 0,01–5 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Hodnota LOQ byla 0,01 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

2 Experimentální část

2.1 Použité chemikálie a instrumentace

2.1.1 Chemikálie

- Voda, LC-MS čistota, Sigma Aldrich, Německo
- Acetonitril, CHROMASOLV™, LC-MS čistota $\geq 99,9\%$, Honeywell, Francie
- Methanol, CHROMASOLV™, LC-MS čistota $\geq 99,9\%$, Honeywell, Francie
- Kyselina mravenčí, 98% p. a., LC-MS čistota, Honeywell, Francie
- Mravenčan amonný, LC-MS čistota $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich, Německo
- Ciprofloxacin hydrochlorid, čistota $> 98\%$, Clearsynth, Indie
- Formylciprofloxacin, čistota $> 98\%$, Clearsynth, Indie
- Desethylenciprofloxacin, čistota $> 98\%$, Clearsynth, Indie
- Sulfociprofloxacin, čistota $> 98\%$, Clearsynth, Indie
- Oxociprofloxacin, čistota $> 98\%$, Clearsynth, Indie

2.1.2 Instrumentace

- Instrument LC-MS/MS 8045, Shimadzu, Japonsko
- Chromatografická kolona Acquity UPLC HSS C₁₈ (100 mm \times 2,1 mm; 1,7 μm), Waters, USA
- Chromatografická kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm \times 2,1 mm; 1,9 μm), Agilent, USA
- Chromatografická kolona Acquity UPLC CSH C₁₈ (150 mm \times 2,1 mm; 1,7 μm), Waters, USA
- Chromatografická kolona Kinetex F5, 100 Å (100 mm \times 2,1 mm; 1,7 μm), Phenomenex, USA
- Chromatografická kolona Acquity UPLC CSH, fluorofenylová (100 mm \times 2,1 mm; 1,7 μm), Waters, USA
- Chromatografická kolona Zorbax Bonus RP, Rapid Resolution HD (150 mm \times 2,1 mm; 1,7 μm), Agilent, USA

- Chromatografická kolona Atlantis™ dC₁₈ (100 mm × 2,1 mm; 3 μm), Waters, USA
- Chromatografická kolona ACE® Excel® C₁₈-Amide (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies, Skotsko
- Chromatografická kolona Atlantis PREMIER BEH C₁₈ AX (150 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters, USA
- Analytické váhy, Entris®, Sartorius, Německo
- Homogenizátor, VORTEX, Chromservis, Česká republika
- Odstředivka, Ependorf MiniSpin, USA
- Ultrazvukový sonikátor, Elma S15H, Elmasonic, Německo
- pH metr, 3540 pH/conductivity meter, Jenway, Velká Británie
- Magnetická míchačka, Velp Scientifica, Itálie

2.2 Příprava vzorků

2.2.1 Ciprofloxacin

Na analytických vahách bylo naváženo 6 mg API ciprofloxacinu hydrochlorid, ke vzorku byl následně přidán 1 ml vody a 1 ml acetonitrilu. Vzorek byl vložen do ultrazvukové lázně na 10 minut. Koncentrace roztoku byla 3 mg ml⁻¹. Pro optimalizaci MS byl dále tento vzorek naředěn pomocí směsi voda:acetonitril (v poměru 7:3, v/v) tak, aby jeho koncentrace byla 0,6 µg ml⁻¹.

2.2.2 Desethylenciprofloxacin

Na analytických vahách bylo naváženo 0,6 mg API desethylenciprofloxacinu a k tomuto vzorku byly postupně přidávány 2 ml vody a 2 ml acetonitrilu. Vzorek byl vložen do ultrazvukové lázně na 10 minut. Koncentrace roztoku byla 0,15 mg ml⁻¹. Pro optimalizaci MS byl dále tento vzorek naředěn pomocí směsi voda:acetonitril (v poměru 7:3, v/v) tak tak, aby jeho koncentrace byla 1,5 µg ml⁻¹.

2.2.3 Oxociprofloxacin

Na analytických vahách bylo naváženo 0,3 mg API oxociprofloxacinu a k tomuto vzorku byl postupně přidáván 1 ml vody a 6 ml acetonitrilu. Vzorek byl vložen do ultrazvukové lázně na 10 minut. Koncentrace roztoku byla 0,04 mg ml⁻¹. Pro optimalizaci MS byl dále tento vzorek naředěn pomocí směsi voda:acetonitril (v poměru 7:3, v/v) tak, aby jeho koncentrace byla 0,86 µg ml⁻¹.

2.2.4 Formylciprofloxacin

Na analytických vahách bylo naváženo 1,1 mg API formylciprofloxacinu a k tomuto vzorku byly postupně přidávány 2 ml vody a 2 ml acetonitrilu. Vzorek byl vložen do ultrazvukové lázně na 10 minut. Koncentrace roztoku byla 0,28 mg ml⁻¹. Pro optimalizaci MS byl dále tento vzorek naředěn pomocí směsi voda:acetonitril (v poměru 7:3, v/v) tak, aby jeho koncentrace byla 2,75 µg ml⁻¹.

2.2.5 Sulfociprofloxacín

Na analytických vahách bylo naváženo 0,3 mg API sulfociprofloxacínu a k tomuto vzorku byl postupně přidáván 1 ml vody a 1 ml acetonitrilu. Vzorek byl vložen do ultrazvukové lázně na 10 minut. Koncentrace roztoku byla 0,15 mg ml⁻¹. Pro optimalizaci MS byl dále tento vzorek naředěn pomocí směsi voda:acetonitril (v poměru 7:3, v/v) tak, aby jeho koncentrace byla 0,75 µg ml⁻¹.

2.2.6 Směsný vzorek bez sulfociprofloxacínu

Vzhledem k tomu, že při zahájení experimentálního měření této diplomové práce nebyl k dispozici analyt sulfociprofloxacín, byl nejprve připraven směsný vzorek bez této látky. Směsný vzorek byl připraven smícháním roztoku ciprofloxacínu (viz kapitola 2.2.1), desethylenciprofloxacínu (viz kapitola 2.2.2), oxociprofloxacínu (viz kapitola 2.2.3) a formylciprofloxacínu (viz kapitola 2.2.4) tak, aby koncentrace každého analytu ve vzorku byla 100 ng ml⁻¹. Jako rozpouštědlo byla zvolena směs voda:acetonitril v poměru 7:3 (v/v).

2.2.7 Směsný vzorek

Dále byl připraven směsný vzorek obsahující již všech pět analytů a tento vzorek vznikl smícháním roztoku ciprofloxacínu (viz kapitola 2.2.1), desethylenciprofloxacínu (viz kapitola 2.2.2), oxociprofloxacínu (viz kapitola 2.2.3), formylciprofloxacínu (viz kapitola 2.2.4) a sulfociprofloxacínu (viz kapitola 2.2.5) tak, aby koncentrace sulfociprofloxacínu ve vzorku byla 1 µg ml⁻¹ a koncentrace ostatních čtyř analytů byla 500 ng ml⁻¹. Jako rozpouštědlo byla zvolena směs voda:acetonitril v poměru 7:3 (v/v).

2.2.8 Vzorek pro stanovení LOD

Směsný vzorek (viz kapitola 2.2.7) byl nejprve 10x naředěn směsí voda:acetonitril v poměru 7:3 (v/v) poté byl ještě 10× naředěn směsí voda:acetonitril v poměru 7:3 (v/v). Směsný vzorek byl tedy celkem 100× naředěn.

2.2.9 Vzorek obsahující biologickou matici

Vzorek obsahující biologickou matici vznikl smícháním 30 μl krysího séra + 10 μl směsného vzorku (viz kapitola 2.2.7) + 80 μl acetonitrilu. Přídavkem acetonitrilu došlo k vysrážení proteinů. Vzorek byl promíchán na homogenizátoru a odstředěn na centrifuze (7 minut, 12 500 otáček za minutu). Supernatant byl převeden do kónické HPLC vialky.

Dále byl připraven vzorek, který obsahoval 30 μl směsi voda:acetonitril v poměru 7:3 (v/v) + 10 μl směsného vzorku (viz kapitola 2.2.7) + 80 μl acetonitrilu. Tento vzorek byl promíchán na homogenizátoru.

2.3 Analytické zpracování dat

2.3.1 Vliv matričního efektu

Vliv matričního efektu na výslednou separaci byl vypočítán podle vztahu:

$$\text{ME} = \left(\frac{A^*}{A^{**}} \cdot 100 \right) - 100 \quad (1)$$

kde ME je matriční efekt, A^* je plocha píku analytu přítomného ve vzorku obsahující krysí sérum a A^{**} je plocha píku analytu přítomného ve vzorku neobsahující krysí sérum.

2.3.2 Faktor symetrie píku

Faktor symetrie píku byl vypočítán podle následujícího vztahu:

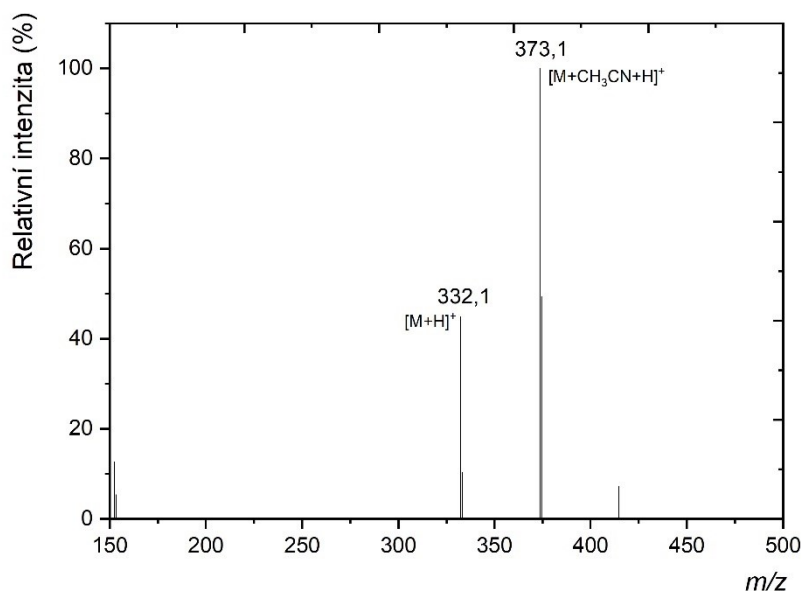
$$A = \frac{b}{a} \quad (2)$$

kde A je faktor symetrie píku, b je šířka píku sestupné části v jedné desetině výšky píku, a je šířka píku vzestupné části v jedné desetině výšky píku.

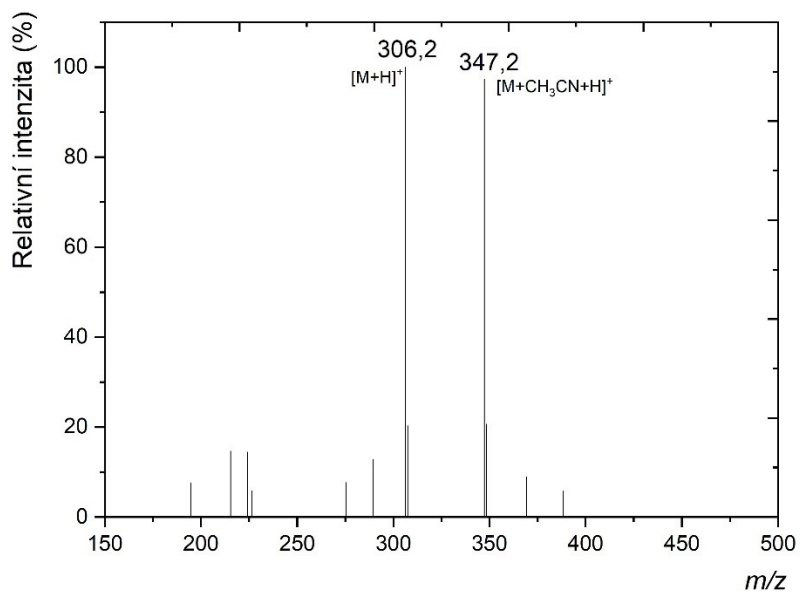
3 Výsledky

3.1 Optimalizace hmotnostního spektrometru

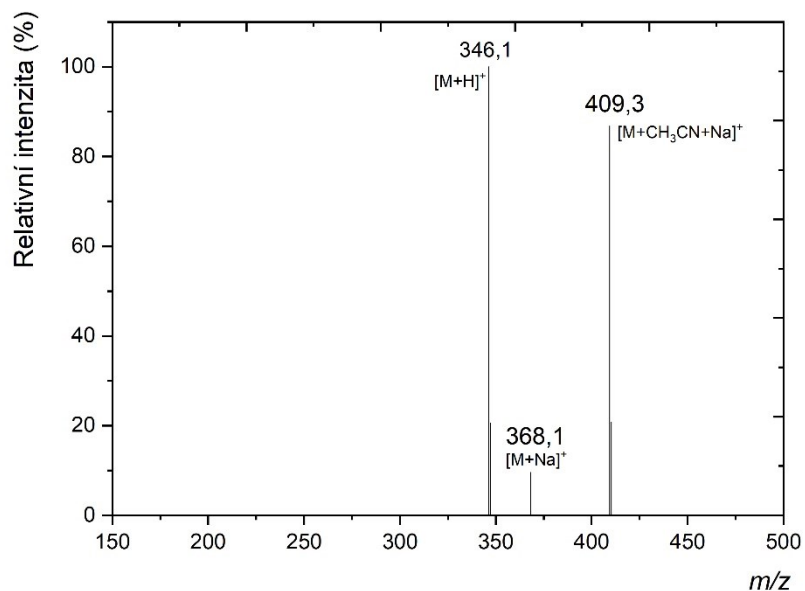
Cílem optimalizace hmotnostního spektrometru bylo nalezení specifických přechodů mezi prekurzorovým a produktovým iontem daného analytu a dále nastavení iontové optiky tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti. V první fázi byla proměřena hmotnostní spektra ve scan módu v rozmezí m/z 150–500. Hmotnostní spektra jednotlivých analytů jsou uvedena na Obr. 8 – 13. Z hmotnostních spekter vidíme, že se většina analytů (ciprofloxacin, desethylciprofloxacin, oxociprofloxacin a formylciprofloxacin) nabíjí jako adukt s vodíkem ve formě $[M+H]^+$. Zajímavostí je, že tyto analyty podporují relativně intenzivní adukty s acetonitrilem. Sulfociprofloxacin neposkytoval v pozitivním módu molekulový adukt s vodíkem, ale ve spektru lze pozorovat pouze hmotu s m/z 332,1 (Obr. 12), která odpovídá ztrátě sulfoskupiny již ve zdroji. V negativním módu již můžeme pozorovat adukt s m/z 410,1, který odpovídá sulfociprofloxacinu ve formě $[M-H]^-$.



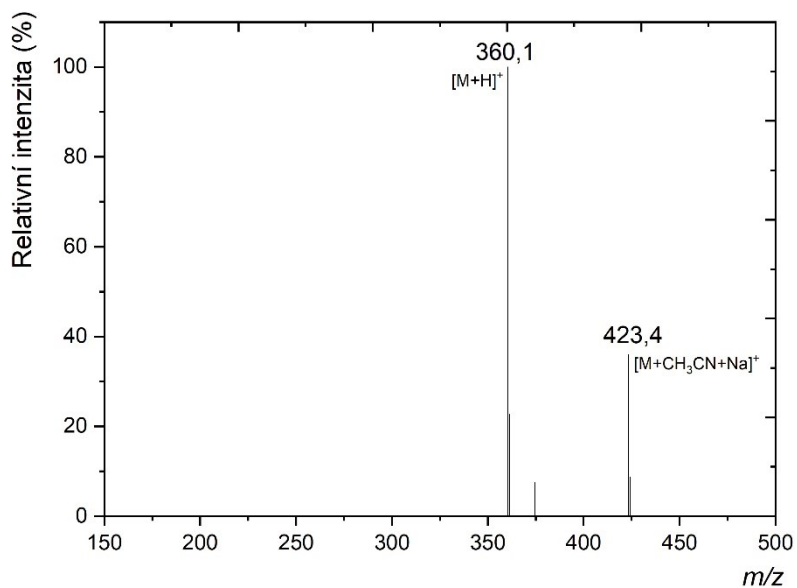
Obr. 8: Hmotnostní spektrum ciprofloxacinu měřené v pozitivním módu. MF směs voda:acetonitril v poměru 3:7 (v/v), průtok MF $0,2 \text{ ml min}^{-1}$, doba analýzy 1,5 minuty, nástřik $1 \mu\text{l}$, skenováno v rozmezí 150-500 m/z .



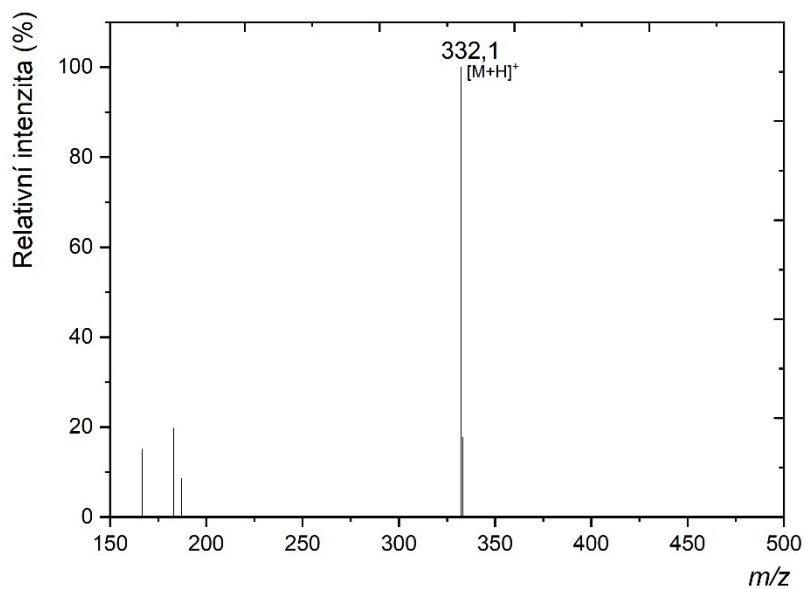
Obr. 9: Hmotnostní spektrum desethylciprofloxacinu měřené v pozitivním módu. MF směs voda:acetonitril v poměru 3:7 (v/v), průtok MF 0,2 ml min⁻¹, doba analýzy 1,5 minuty, nástřik 1 μ l, skenováno v rozmezí 150 -500 m/z .



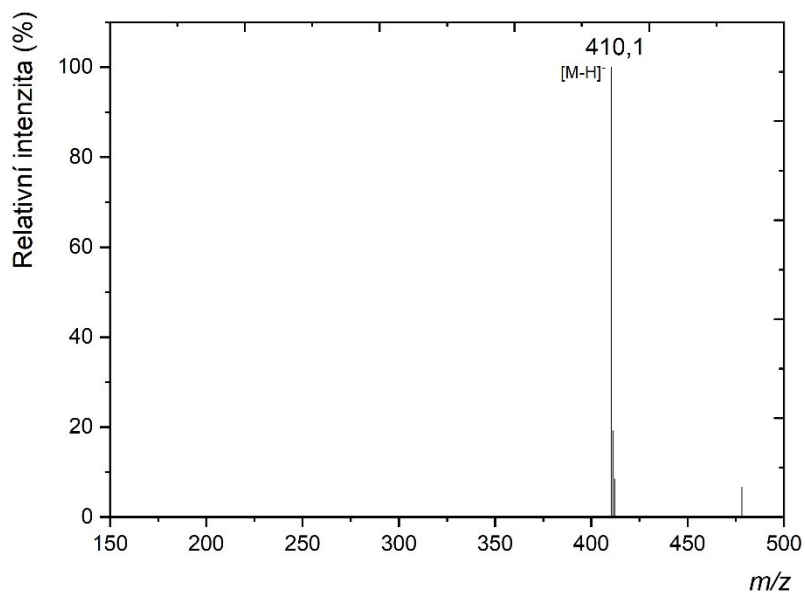
Obr. 10: Hmotnostní spektrum oxociprofloxacinu měřené v pozitivním módu. MF směs voda:acetonitril v poměru 3:7 (v/v), průtok MF 0,2 ml min⁻¹, doba analýzy 1,5 minuty, nástřik 1 μ l, skenováno v rozmezí 150 -500 m/z .



Obr. 11: Hmotnostní spektrum formylciprofloxacinu měřené v pozitivním módu. MF směs voda:acetonitril v poměru 3:7 (v/v), průtok MF $0,2 \text{ ml min}^{-1}$, doba analýzy 1,5 minuty, nástřik $1 \mu\text{l}$, skenováno v rozmezí 150-500 m/z .

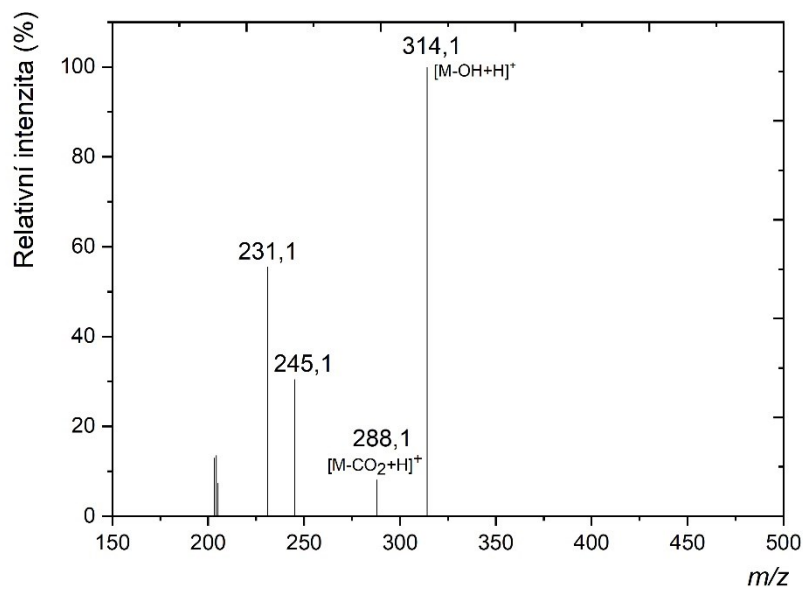


Obr. 12: Hmotnostní spektrum sulfociprofloxacinu měřené v pozitivním módu. MF směs voda:acetonitril v poměru 3:7 (v/v), průtok MF $0,2 \text{ ml min}^{-1}$, doba analýzy 1,5 minuty, nástřik $1 \mu\text{l}$, skenováno v rozmezí 150-500 m/z .

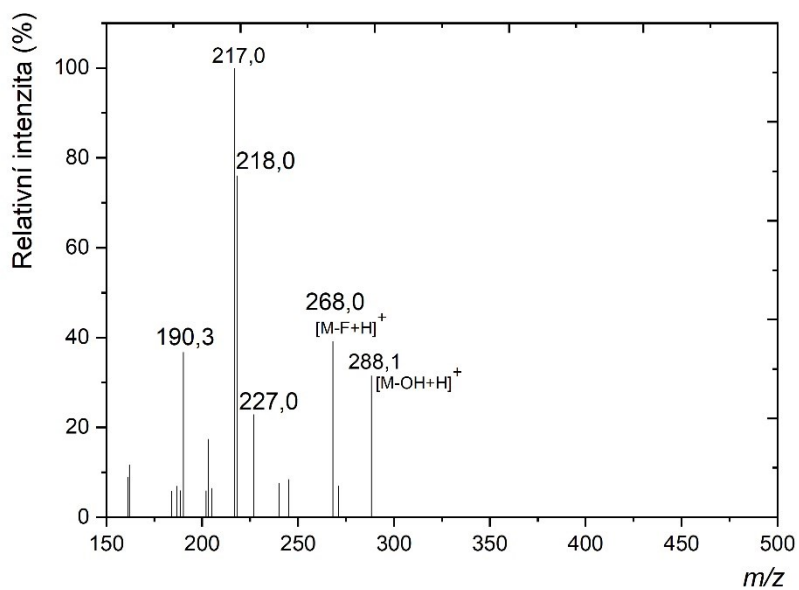


Obr. 13: Hmotnostní spektrum sulfociprofloxacinu měřené v negativním módu. MF směs voda:acetonitril v poměru 3:7 (v/v), průtok MF 0,2 ml min⁻¹, doba analýzy 1,5 minuty, nástřik 1 μl, skenováno v rozmezí 150-500 m/z.

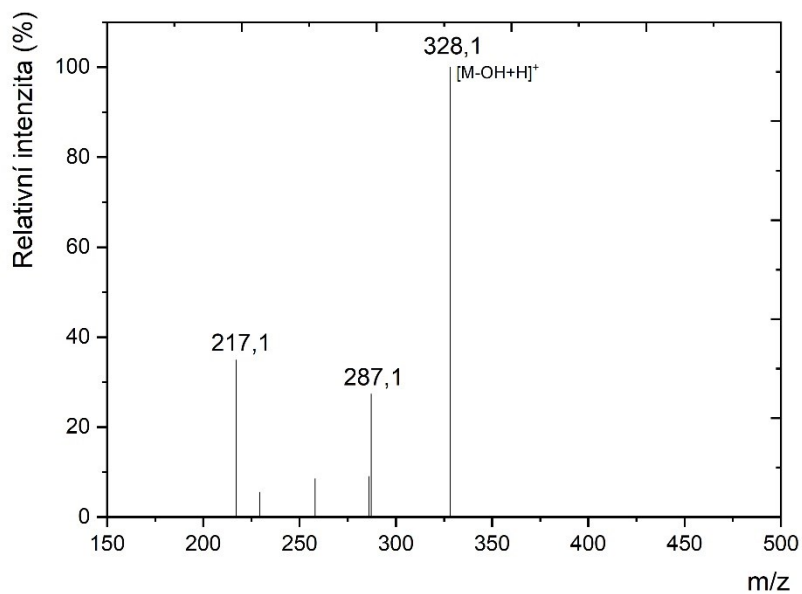
V další fázi byla získána hmotnostní spektra produktových iontů vzniklá štěpením prekurzorových iontů v kolizní cele při různých hodnotách kolizní energie. Jako prekurzorové ionty byly voleny pro všechny analyty [M+H]⁺ adukty, mimo sulfociprofloxacin, kde byl zvolen [M-H]⁻ adukt. Fragmentační spektra jednotlivých analytů jsou uvedena na Obr. 14–18.



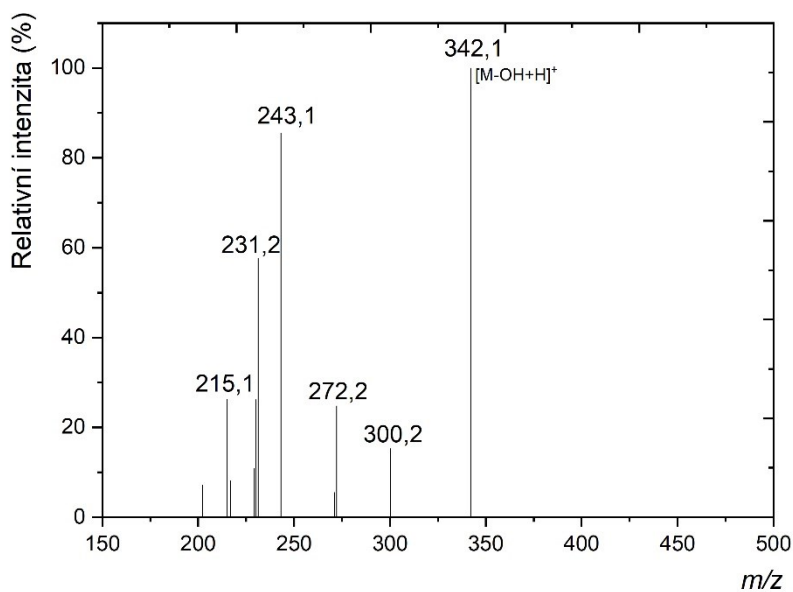
Obr. 14: Fragmentační spektrum prekurzového iontu ciprofloxacinu (332,1 m/z) získané v pozitivním módu při kolizní energii -25 V.



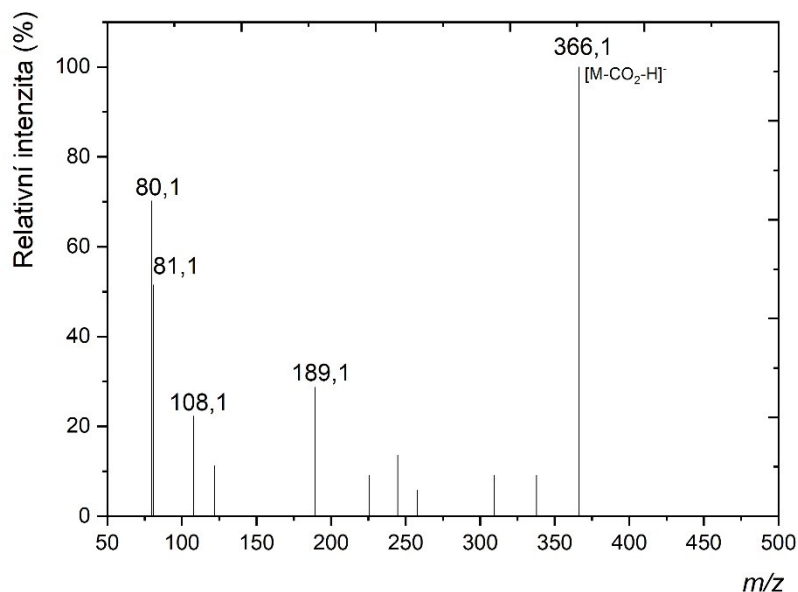
Obr. 15: Fragmentační spektrum prekurzového iontu desethylenciprofloxacinu (306,2 m/z) získané v pozitivním módu při kolizní energii -35 V.



Obr. 16: Fragmentační spektrum prekurzového iontu oxociprofloxacinu ($346,1 m/z$) získané v pozitivním módu při kolizní energii -25 V.



Obr. 17: Fragmentační spektrum prekurzového iontu formylciprofloxacinu ($360,1 m/z$) získané v pozitivním módu při kolizní energii -30 V.



Obr. 18: Fragmentační spektrum prekurzového iontu sulfociprofloxacinu (410,1 m/z) získané v negativním módu při kolizní energii 30 V.

Následně byla optimalizována iontová optika MS. V pozitivním režimu bylo optimalizováno napětí v následujícím rozsahu: Q_1 : od -50 V do -10 V s krokem po 2 V; Q_3 : od -50 V do -10 V s krokem po 2 V; kolizní energie (CE): od -60 V do -5 V s krokem po 5 V. V negativním režimu bylo optimalizováno napětí v následujícím rozsahu: Q_1 : od +50 V do +10 V s krokem po 2 V; Q_3 : od +50 V do +10 V s krokem po 2 V; CE: od +60 V do +5 V s krokem po 5 V. Po nalezení optimální CE byla tato energie dále ještě optimalizována po kroku 1 V \pm 5 V.

Pro každý analyt byly získány celkem tři MRM přechody. V Tab. 3 jsou uvedeny MRM přechody pro všechny analyty s optimalizovaným napětím iontové optiky.

Tab. 3: MRM přechody mezi prekurzorovými a produktovými ionty pro jednotlivé analyty, optimalizace napětí iontové optiky.

| Analyt | Prekurzorový iont (m/z) | Produktový iont (m/z) | Q ₁ (V) | CE (V) | Q ₃ (V) |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|--------|--------------------|
| ciprofloxacin | 332,1 | 314,1 | -12 | -21 | -22 |
| | 332,1 | 231,1 | -16 | -31 | -24 |
| | 332,1 | 288,1 | -16 | -19 | -30 |
| desethylen-ciprofloxacin | 306,2 | 288,2 | -15 | -19 | -30 |
| | 306,2 | 268,0 | -15 | -27 | -30 |
| | 306,2 | 217,0 | -15 | -38 | -22 |
| oxo-ciprofloxacin | 346,1 | 328,1 | -17 | -20 | -23 |
| | 346,1 | 217,1 | -10 | -41 | -22 |
| | 346,1 | 287,1 | -10 | -32 | -29 |
| formyl-ciprofloxacin | 360,1 | 342,1 | -18 | -21 | -23 |
| | 360,1 | 215,1 | -17 | -49 | -23 |
| | 360,1 | 243,1 | -10 | -37 | -25 |
| sulfo-ciprofloxacin | 410,1 | 366,1 | 30 | 23 | 24 |
| | 410,1 | 80,1 | 20 | 43 | 30 |
| | 410,1 | 81,1 | 20 | 32 | 32 |

3.2 Optimalizace UHPLC

Při optimalizaci UHPLC systému byly využívány pouze nejintenzivnější MRM přechody: ciprofloxacin: 332,1/314,1; desethylen-ciprofloxacin: 306,2/288,1; oxociprofloxacin: 346,1/328,1; formylciprofloxacin: 360,1/342,1; sulfociprofloxacin: 410,1/366,1. Nastavení iontového zdroje bylo následující: průtok nebulizačního plynu 3 l min⁻¹, průtok sušícího plynu 10 l min⁻¹, napětí na kapiláře 3000 V, teplota zdroje 350 °C, teplota desolvatační kapiláry 250 °C. Chromatogramy v této kapitole znázorňují překryv jednotlivých MRM záznamů. Při optimalizaci byla testována řada chromatografických kolon.

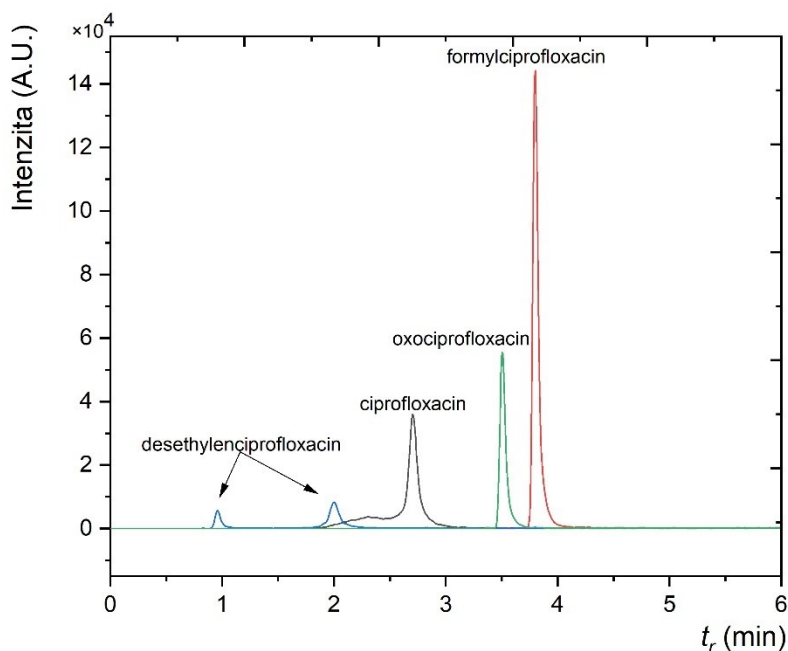
3.2.1 Chromatografická kolona Acquity UPLC HSS C₁₈

Jako první testovaná kolona byla zvolena Acquity UPLC HSS (High Strength Silica) C₁₈ (100 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters. Tato kolona obsahuje patentově chráněnou stacionární fázi vázanou na oxidu křemičitém. Kolona je stabilní v rozsahu pH 1–8 a dle výrobce je vhodná pro separaci polárních látek.

MF byla směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Pro separaci byly zvoleny následující podmínky: průtok MF 0,3 ml min⁻¹, nástřik 1 μl, celková doba analýzy 10 minut, teplota na dávkovači 15 °C, teplota kolony 40 °C. Vzhledem k vysoké polaritě studovaných analytů byl počátek gradientového programu nastaven na vyšší procento vodné složky. Zastoupení jednotlivých složek se měnilo podle gradientového programu (viz Tab. 4). Při separaci byl použit směsný vzorek bez sulfociprofloxacinu (viz kapitola 2.2.6). Na Obr. 19 je uveden výsledný chromatogram. Na tomto chromatogramu lze pozorovat dvojitý pík u desethylenciprofloxacinu, pík ciprofloxacinu je velmi rozmytý vpředu, u píku oxociprofloxacinu a formylciprofloxacinu lze sledovat rozmývání vzadu. Nesymetričnost jednotlivých píků s největší pravděpodobností souvisí s iontovou interakcí mezi částečně disociovanými zbytkovými silanoly a pozitivně nabitým dusíkem na piperazinylovém kruhu (pK_a 8,74).

Tab. 4: Gradientový program eluce, podle kterého se měnilo zastoupení složky A a složky B v MF.

| <i>t</i> (min) | ϕ_A (%) | ϕ_B (%) |
|----------------|--------------|--------------|
| 0 | 85 | 15 |
| 1 | 85 | 15 |
| 5 | 10 | 90 |
| 7 | 10 | 90 |
| 8 | 85 | 15 |
| 10 | 85 | 15 |



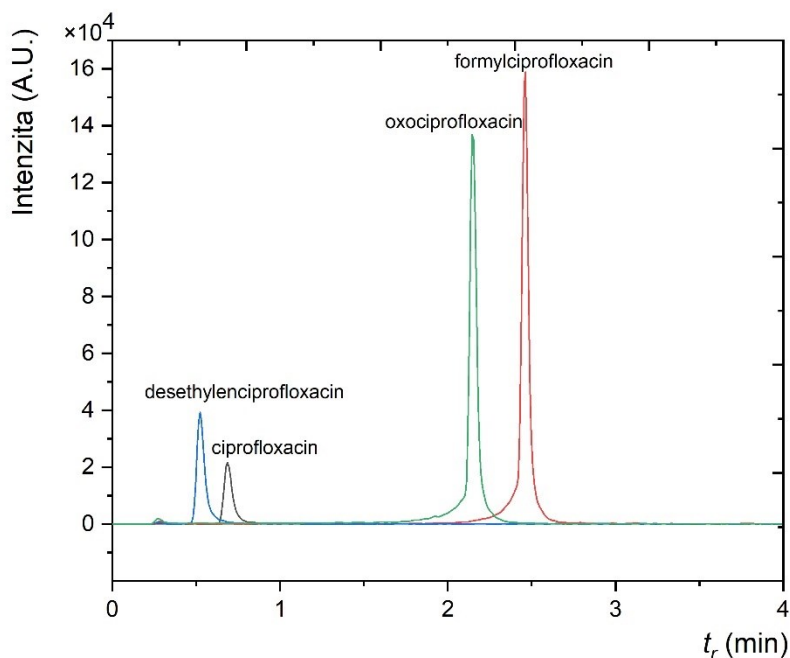
Obr. 19: Chromatogram separace směsného vzorku bez sulfociprofloxacinu. Kolona Acquity UPLC HSS C₁₈ (100 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,3 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

3.2.2 Chromatografická kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈

Další testovanou kolonou byla InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 × 2,1 mm; 1,9 μm), Agilent. Tato kolona obsahuje povrchově porézní částice, které mají pevné jádro z oxidu křemičitého a vnější porézní vrstvu tvořenou oxidem křemičitým, na které je navázána oktadecylová fáze. Tato kolona poskytuje vyšší účinnost separace při nižších tlacích oproti kolonám, které obsahují pouze porézní částice. Kolony lze využívat při rozsahu pH 2–9.

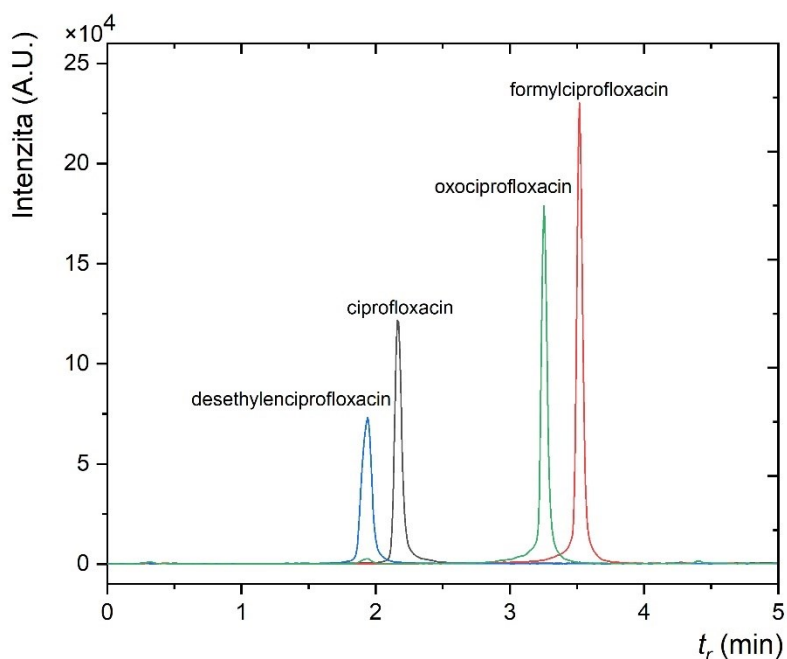
Nejprve byla jako MF zvolena směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). V Tab. 4 je uveden gradientový program, podle kterého se měnilo zastupení obou složek v MF. Podmínky separace jsou následující: průtok MF 0,3 ml min⁻¹, nástřik 1 μl, celková doba analýzy 10 minut, teplota na dávkovači 15 °C, teplota kolony 40 °C. Na této koloně byla provedena separace

směsného vzorku bez sulfociprofloxacinu a na Obr. 20 je uveden výsledný chromatogram. V porovnání s předchozí kolonou Acquity UPLC HSS C₁₈ došlo ke snížení retence, jelikož acetonitril je silnější eluční činidlo. Desethylenciprofloxacín již není rozštěpen na dva chromatografické píky jako na předchozí koloně Acquity UPLC HSS C₁₈, ale eluuje jako jedna chromatografická zóna. Dále můžeme pozorovat, že došlo ke snížení odezvy u ciprofloxacinu a naopak došlo k viditelnému zvýšení odezvy u oxociprofloxacinu, což je dáno odlišným složením mobilní fáze (vliv na účinnost ionizace). Na rozdíl od předchozí kolony jsou analyty oxociprofloxacinu a formylciprofloxacinu výrazně rozmyty vpředu (pravděpodobným důvodem jsou iontové interakce).



Obr. 20: Chromatogram separace směsného vzorku bez sulfociprofloxacinu. Kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 × 2,1 mm; 1,9 μm), Agilent; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,3 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

Následně bylo otestováno, zda změna organické složky MF nebude mít vliv na rozmývání píků jednotlivých analytů. Jako MF byla tentokrát zvolena směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Podmínky pro separaci zůstaly nezměněny, stejně tak gradientová eluce. Z Obr. 21 lze vidět, že změna MF neměla na rozmývání píků žádný vliv. Při porovnání s Obr. 20 je na první pohled patrná vyšší retence analytů (methanol je slabší eluční činidlo než acetonitril) a vyšší odezva (methanol jako donor protonu více podporuje ionizaci analytů).

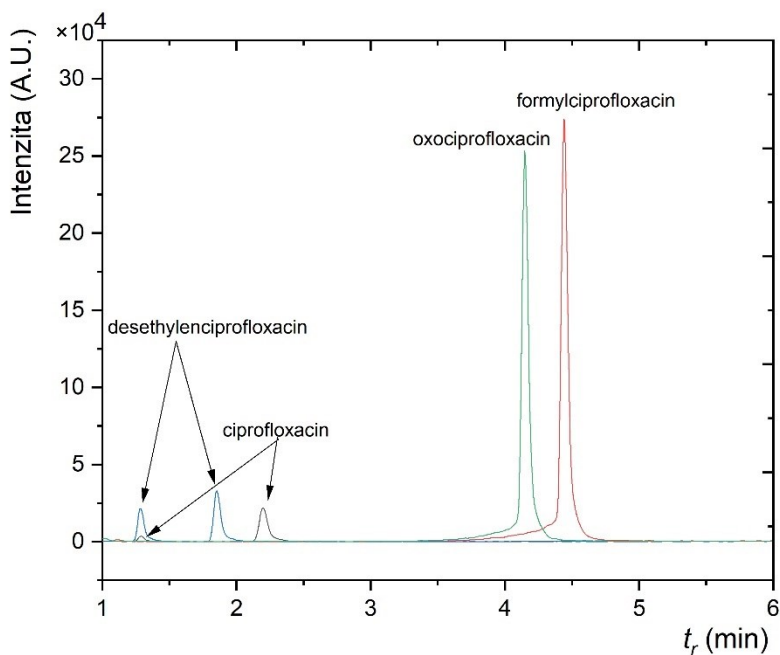


Obr. 21: Chromatogram separace směšného vzorku bez sulfociprofloxacinu. Kolona InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 × 2,1 mm; 1,9 μm), Agilent; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,3 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

3.2.3 Chromatografická kolona Acquity UPLC CSH C₁₈

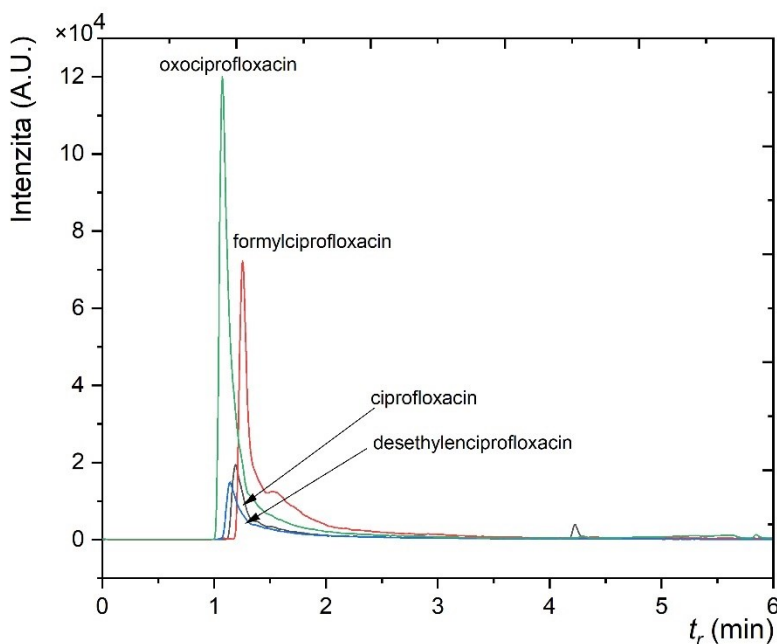
V pořadí třetí testovanou kolonou byla Acquity UPLC CSH (Charged Surface Hybrid) C₁₈ (150 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters. SF je připravována hybridní technologií povrchově nabitých částic (CSH). Tato technologie využívá pozitivního náboje (pyridylová skupina) vázaného na povrchu SF. Tím by mělo docházet ke zlepšení tvarů píků bazických látek. Velkou výhodou je také stabilita v rozsahu pH 1–11.

MF byla směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Separční podmínky a gradientová eluce byly opět stejné jako v případě obou předchozích použitých kolon (viz Tab. 4). Obr. 22 znázorňuje výslednou separaci. Na této SF došlo k rozštěpení píku desethylenciprofloxacinu stejně jako v případě kolony Acquity UPLC HSS C₁₈. Píky oxociprofloxacinu a formylciprofloxacinu jsou výrazně rozmyty vpředu jako v případě kolony InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈. Dále vidíme, že i pík ciprofloxacinu je rozštěpen na dva chromatografické píky, přičemž první pík koeluuje s desethylenciprofloxacinem.



Obr. 22: Chromatogram separace směsného vzorku bez sulfociprofloxacinu. Kolona Acquity UPLC CSH C₁₈ (150 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,3 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

Následně byla provedena separace vzorku za stejných podmínek separace i gradientové eluce, ale se změnou MF. V tomto případě byla směs tvořena 0,1% hydroxidem amonným (složka A) a acetonitrem (složka B). Bazické pH vodné složky bylo zvoleno proto, aby dusík na piperazinylovém kruhu nebyl nabitý. Při tomto pH ale zároveň dochází k disociaci karboxylové kyseliny (pK_a 6,09) Na Obr. 23 je chromatogram této separace. Změna disociace funkčních skupin analytů má za následek, že analyty elují téměř v mrtvém čase a nejsou od sebe odseparovány. Dále je vidět, že bazické pH potlačuje ionizaci v pozitivním módu, což je projevem snížené odezvy jednotlivých analytů.



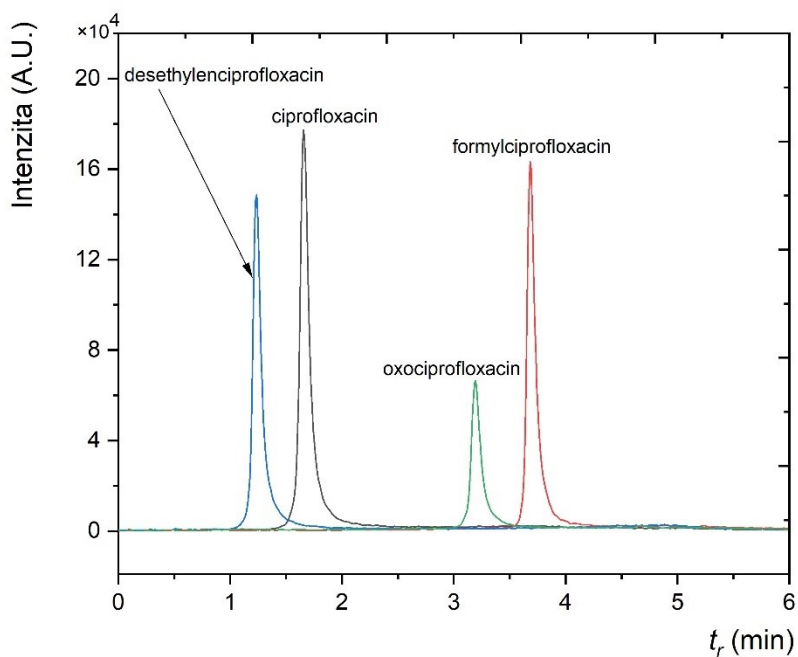
Obr. 23: Chromatogram separace směsného vzorku bez sulfociprofloxacinu. Kolona Acquity UPLC CSH C₁₈ (150 × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF směs 0,1% hydroxidu amonného (složka A) a acetonitrilu (složka B); průtok MF 0,3 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

3.2.4 Chromatografická kolona Kinetex F5, 100 Å

Čtvrtou testovanou kolonou byla Kinetex F5, 100 Å (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Phenomenex. Jedná se o kolonu, která obsahuje povrchově porézní částice, na které je navázaný pentafluorofenyl. Tato SF by měla podporovat π - π interakce a interakce s molekulami obsahujícími ve své struktuře fluor. MF byla tvořena 0,1% kyselinou mravenčí (složka A) a methanolem s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Průtok MF 0,45 ml min⁻¹. Gradientová eluce je uvedena v Tab. 5. Začátek gradientu vychází z vyššího obsahu methanolu v MF, aby se podpořila π - π interakce. Ostatní parametry separace zůstaly nezměněny. Výsledný chromatogram je uveden na Obr. 24. Za daných chromatografických podmínek eluuje každý analyt v jedné chromatografické zóně a všechny analyty jsou od sebe odseparovány. I na této koloně můžeme pozorovat nesymetrické tvary píků způsobené pravděpodobně iontovými interakcemi.

Tab. 5: Gradientový program eluce, podle kterého se měnilo zastoupení složky A a složky B v MF.

| t (min) | ϕ_A (%) | ϕ_B (%) |
|-----------|--------------|--------------|
| 0 | 60 | 40 |
| 1 | 60 | 40 |
| 5 | 10 | 90 |
| 7 | 10 | 90 |
| 8 | 60 | 40 |
| 10 | 60 | 40 |

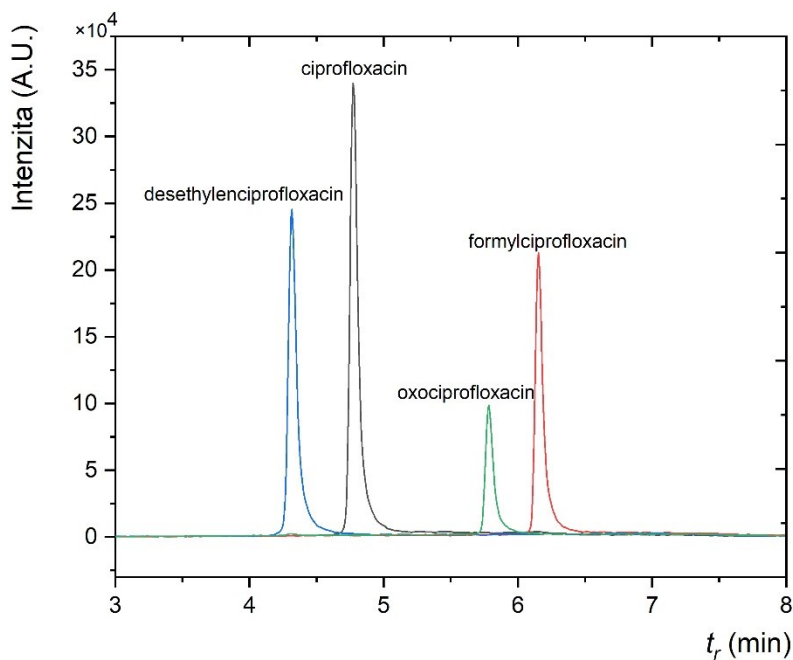


Obr. 24: Chromatogram separace směšného vzorku bez sulfociprofloxacinu. Kinetex F5, 100 Å (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Phenomenex; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,45 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; celková doba analýzy 10 minut; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

Na této koloně byla dále otestována separace analytů při změně gradientu, který je uveden v Tab. 6. Zvýšením obsahu vodné složky se podstatně zvýšil zpětný tlak na koloně, a proto bylo nutné snížit průtok z původních $0,45 \text{ ml min}^{-1}$ na $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. Všechny ostatní parametry separace zůstaly stejné jako v předchozím případě. Na Obr. 25 je uveden chromatogram separace. Při porovnání chromatogramů při dvou různých gradientech (Obr. 24 a Obr. 25), lze konstatovat, že v tomto případě neměla změna obsahu vodné složky v MF významný vliv na rozmývání píků, došlo pouze ke zvýšení retence, což je způsobeno právě zvýšeným obsahem vodné složky v MF (analyty jsou déle zadržovány ve SF), a k nepatrnému zlepšení separace jednotlivých analytů.

Tab. 6: Gradientový program eluce, podle kterého se měnilo zastoupení složky A a složky B v MF.

| t (min) | ϕ_A (%) | ϕ_B (%) |
|-----------|--------------|--------------|
| 0 | 90 | 10 |
| 1 | 90 | 10 |
| 7 | 10 | 90 |
| 8 | 10 | 90 |
| 8,5 | 90 | 10 |
| 10 | 90 | 10 |



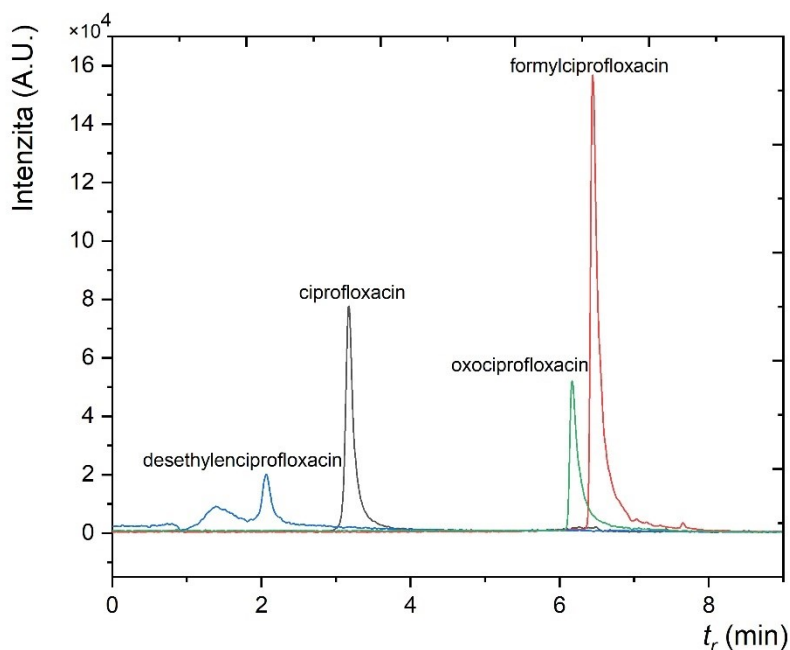
Obr. 25: Chromatogram separace směšného vzorku bez sulfociprofloxacinu při změně gradientu. Kinetex F5, 100 Å (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Phenomenex; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,4 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

3.2.5 Chromatografická kolona Acquity UPLC CSH, fluorofenylová

Další testovanou kolonou byla kolona Acquity UPLC CSH, fluorofenylová (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters, neboť obsahuje výše zmíněnou CSH technologii a fluorofenyl se prokázal jako potencionálně vhodná SF pro separaci studovaných analytů (viz kapitola 3.2.4)

MF byla směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Gradientová eluce je uvedena v Tab. 6. Průtok MF byl ponechán na hodnotě 0,4 ml min⁻¹. Všechny ostatní parametry separace byly nezměněny. Chromatogram separace je uveden na Obr. 26. Oproti předešlé koloně vykazuje fluorofenylová Acquity UPLC CSH kolona vyšší retentivitu. Avšak chromatografický

pík desethylenciprofloxacinu byl velmi nesymetrický a jeho šířka byla přes 3 minuty. Tuto kolonu nelze proto považovat jako vhodnou pro analýzu sledovaných analytů.



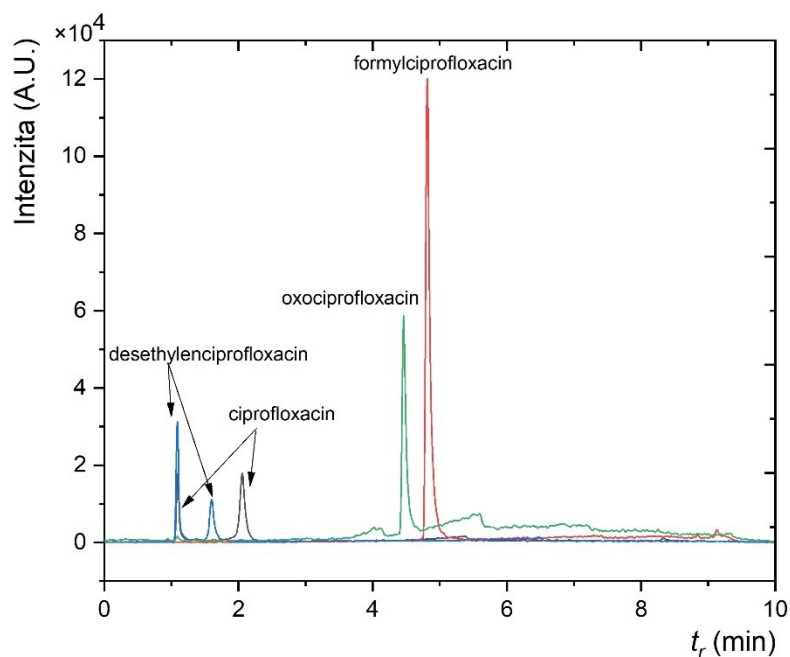
Obr. 26: Chromatogram separace směsného vzorku bez sulfociprofloxacinu; Acquity UPLC CSH, fluorofenylová (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,40 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

3.2.6 Chromatografická kolona Zorbax Bonus RP

Šestou testovanou kolonou byla kolona Zorbax Bonus RP, Rapid Resolution HD (150 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Agilent. Bonus RP kolony používají jako SF diisopropyl-C₁₄ skupiny kovalentně vázané amidovou vazbou na silikagel. V porovnání s klasickými C₁₈ kolonami jsou kolony Bonus RP vhodné pro separaci polárních látek.

MF byla směs 0,1% kyseliny mravenčí (vodná složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (organická složka B). Zastoupení složek v MF bylo měněno podle gradientového programu (viz Tab. 6). Ostatní parametry pro separaci zůstaly nezměněny. Výsledný chromatogram je znázorněn na Obr. 27. Ani tato kolona není

vhodná pro analýzu studovaných látek. Z chromatogramu vidíme, že dochází ke štěpení píku desethylenciprofloxacinu a ciprofloxacinu. Oxociprofloxacín je na této koloně silně rozmýván a jeho chromatografická zóna eluuje v rozmezí retenčních časů 3,7 až 9,5 minuty.



Obr. 27: Chromatogram separace směšného vzorku bez sulfociprofloxacinu. Zorbax Bonus RP, Rapid Resolution HD (150 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Agilent; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,40 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

3.2.7 Chromatografická kolona Atlantis PREMIER BEH C₁₈ AX

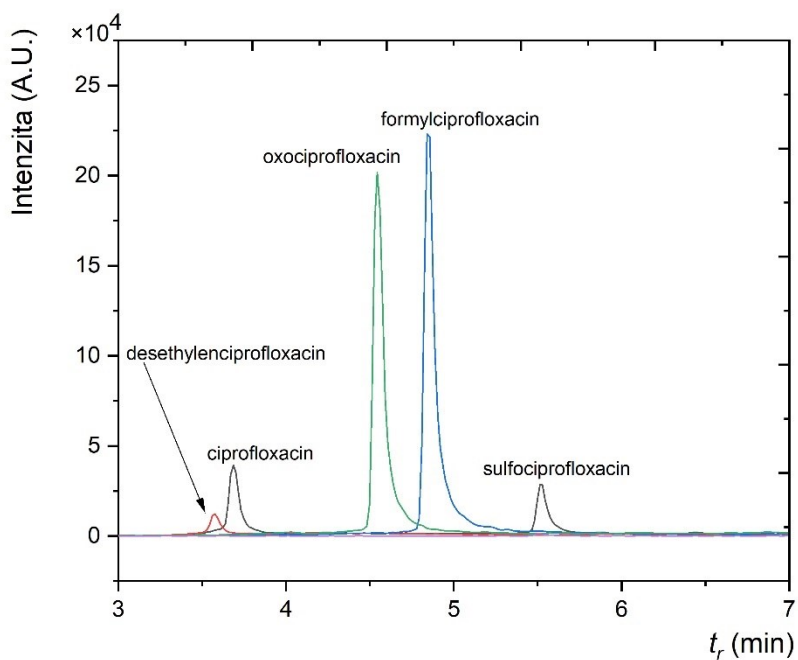
Jako sedmá kolona byla použita Atlantis PREMIER BEH (Ethylene Bridged Hybrid) C₁₈ AX (150 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters. Tato kolona používá hybridní sorbent s ethylenovými můstky (BEH). Jako SF slouží C₁₈ s terciální alkyaminovou skupinou, která vytváří kladný náboj na povrchu SF. V této fázi práce byl již dostupný standard

sulfociprofloxacinu, proto bylo dále pracováno se směsným vzorkem obsahujícím všech pět analytů (viz kapitola 2.2.7).

Jelikož se jedná o tzv. „mixed-mode“ kolonu, kde se uplatňují jak hydrofobní interakce, tak i iontové interakce, byla jako MF použita směs 20 mmol l⁻¹ pufru mravenčanu amonného o pH 3,6 (složka A) a acetonitrilu (složka B). Gradientová eluce je uvedena v Tab. 7. Průtok MF byl 0,3 ml min⁻¹ a doba analýzy 8 minut. Další parametry separace zůstaly nezměněny. Znárodnění chromatogramu je na Obr. 28. Lze vidět, že píky formylciprofloxacinu a oxociprofloxacinu jsou rozmyty vzadu. Pík desethylenciprofloxacinu eluuje jako první analyt a částečně koeluuje s ciprofloxacinem, což ale není nijak závadné, vzhledem k tomu, že desethylenciprofloxacín a ciprofloxacín mají odlišné MRM přechody. Velice důležitým poznatkem je fakt, že pro MRM přechod ciprofloxacinu vidíme dva chromatografické píky. První chromatografický pík tohoto přechodu náleží ciprofloxacinu (potvrzeno analýzou samostatných standardů) a druhý chromatografický pík (poslední pík v chromatogramu) náleží sulfociprofloxacinu. Je to způsobeno tím, že sulfoskupina sulfociprofloxacinu odpadá již ve zdroji, a tudíž se molekula sulfociprofloxacinu v MS zdánlivě tváří jako molekula ciprofloxacinu. Sulfociprofloxacín se ionizuje i v negativním módu, ale zhruba s o řád nižší účinností. Přechod v negativním MRM módu tudíž nedosahoval dostatečné citlivosti pro aplikace v biologickém materiálu. Pro kvantifikaci sulfociprofloxacinu je proto výhodné používat MRM přechod shodný s ciprofloxacinem, ale za předpokladu chromatografické separace těchto dvou analytů. Z chromatogramu vidíme, že na této koloně dochází k dostatečné separaci těchto dvou analytů. Sulfociprofloxacín eluuje jako poslední analyt díky interakci negativně nabitě sulfoskupiny s pozitivně nabitým kvartérním alkylaminem SF. Jelikož chromatografické píky analytů byly stále podstatně široké a nesymetrické, byla otestována další kolona.

Tab. 7: Gradientový program eluce, podle kterého se měnilo zastoupení složky A a složky B v MF.

| t (min) | ϕ_A (%) | ϕ_B (%) |
|-----------|--------------|--------------|
| 0 | 90 | 10 |
| 1 | 90 | 10 |
| 4 | 30 | 70 |
| 5 | 30 | 70 |
| 5,8 | 90 | 10 |
| 8 | 90 | 10 |



Obr. 28: Chromatogram separace směšného vzorku; Atlantis PREMIER BEH C₁₈ AX (150 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Waters; MF směš 20 mM pufru mravenčanu amonného pH 3,6 (složka A) a acetonitrilu (složka B); průtok MF 0,3 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

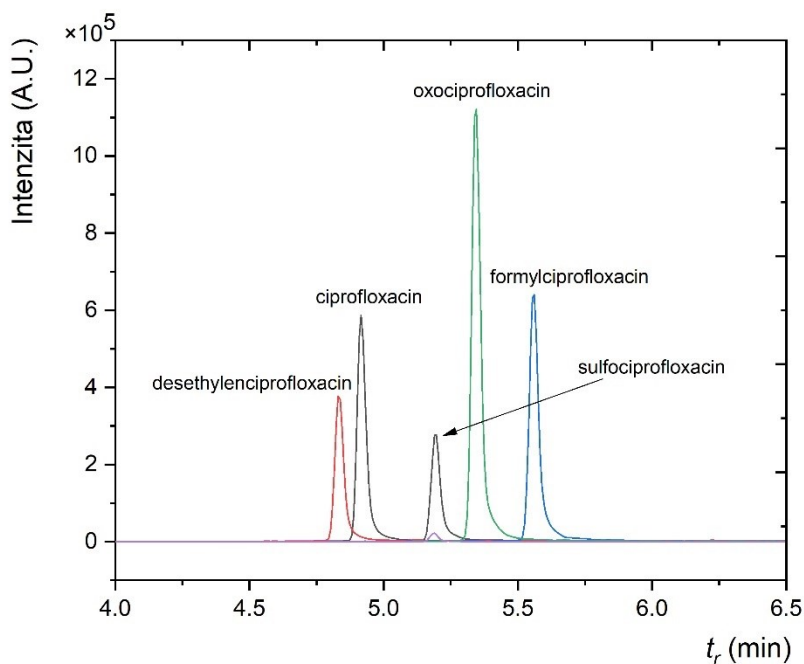
3.2.8 Chromatografická kolona Atlantis™ dC₁₈

Jako osmá byla testována chromatografická kolona Atlantis™ dC₁₈ (100 mm × 2,1 mm; 3 μm), Waters. Tato kolona obsahuje C₁₈ SF a je charakteristická tím, že může být používána se 100% vodnou MF. Tato kolona byla zvolena proto, aby bylo možno od sebe odseparovat sulfociprofloxacín a ciprofloxacín na základě jejich polarit, a ne na základě iontových interakcí, které u předchozích kolon způsobovaly značnou asymetrii píků.

Jako MF byla zvolena směs 5 mmol l⁻¹ pufru mravenčanu amonného o pH 3 (složka A) a acetonitrilu (složka B). Vzhledem k větší velikosti částic byl zvolen vyšší průtok MF 0,6 ml min⁻¹. Zastoupení jednotlivých složek bylo měněno podle gradientového programu uvedeného v Tab. 8, kdy se začíná se 100 % složky A. Celková doba analýzy byla 12 minut. Všechny ostatní parametry separace zůstaly nezměněny. Na Obr. 29 je uveden chromatogram separace směšného vzorku, který obsahoval všech pět sledovaných analytů. Oproti předchozí koloně se změnila selektivita sulfociprofloxacínu, který nyní eluuje před oxociprofloxacínem (nedochází k uplatnění iontových interakcí, ale eluční pořadí je dáno hlavně polaritou daných analytů). Použitím 100% vodné složky na počátku gradientu v kombinaci s touto kolonou způsobilo razantní zlepšení symetrie všech chromatografických píků.

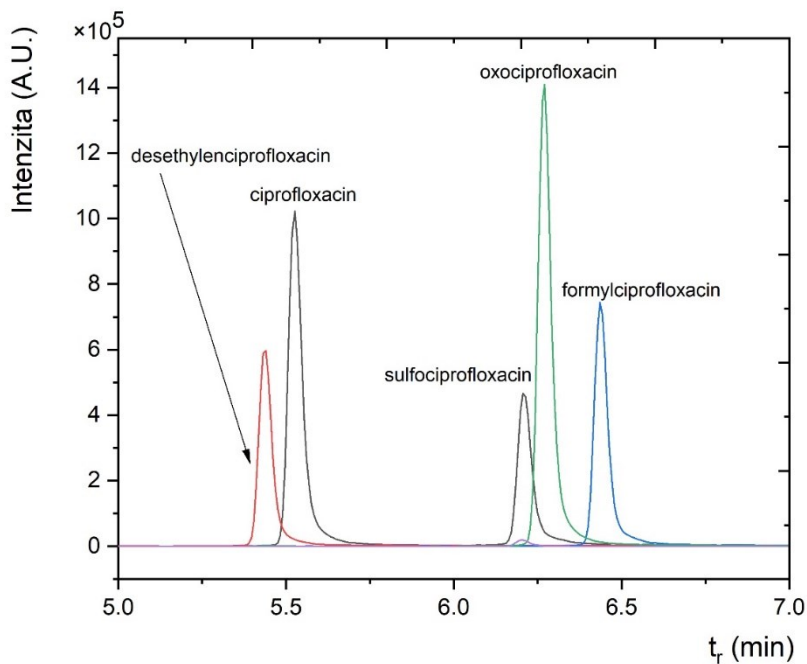
Tab. 8: Gradientový program eluce, podle kterého se měnilo zastoupení složky A a složky B v MF.

| t (min) | ϕ_A (%) | ϕ_B (%) |
|-----------|--------------|--------------|
| 0 | 100 | 0 |
| 3 | 100 | 0 |
| 6 | 30 | 70 |
| 7 | 30 | 70 |
| 8 | 100 | 0 |
| 12 | 100 | 0 |



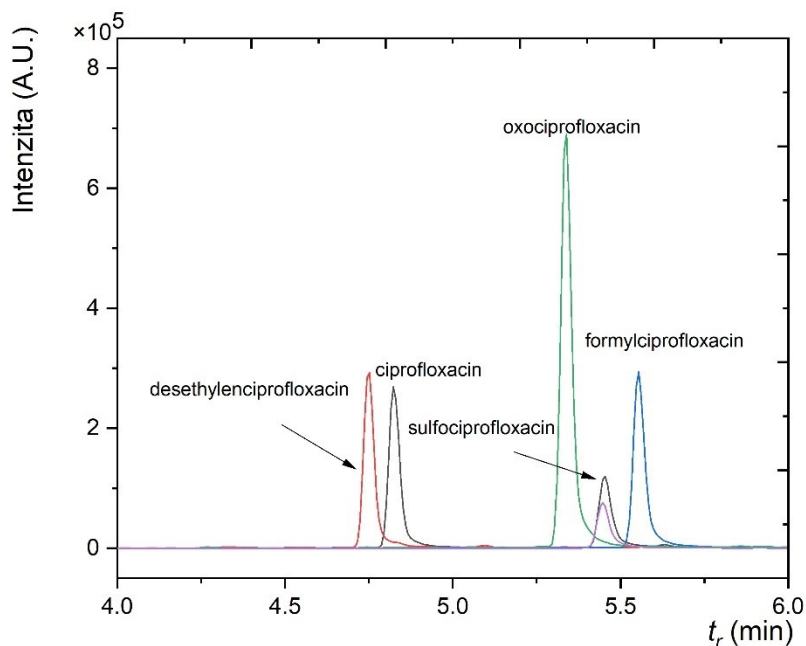
Obr. 29: Chromatogram separace směsného vzorku; AtlantisTM dC₁₈ (100 mm × 2,1 mm; 3 μm), Waters; MF směs 5 mmol l⁻¹ pufru mravenčanu amonného o pH 3 (složka A) a acetonitrilu (složka B); průtok MF 0,6 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

Dále byla provedena analýza směsného vzorku při změně organické složky MF, kde místo původního acetonitrilu byl použit methanol. Na Obr. 30 je uveden chromatogram. V porovnání s chromatogramem na Obr. 29 můžeme pozorovat vyšší rozlišení mezi ciprofloxacinem a sulfociprofloxacinu. Vlivem methanolu došlo jednak ke zvýšení retence (methanol je slabší eluční činidlo než acetonitril) a jednak ke zvýšení odezvy (lepší ionizace analytů).



Obr. 30: Chromatogram separace směsného vzorku; AtlantisTM dC₁₈ (100 mm × 2,1 mm; 3 μm), Waters; MF směs 5 mmol l⁻¹ pufru mravenčanu amonného o pH 3 (složka A) a methanolu (složka B); průtok MF 0,6 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

Na Obr. 31 je chromatogram směsného vzorku, kde jako MF byla použita směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Tato MF byla vyzkoušena z důvodu jednodušší přípravy a ze zvyklosti uživatelů MS na 0,1% kyselinu mravenčí. Při použití tohoto složení MF dosahujeme daleko nižší odezvy, než v případě použití směsi pufr:acetonitril nebo pufr:methanol. Dále došlo ke změně selektivity, kdy sulfociprofloxacin eluuje až za oxociprofloxacinem.



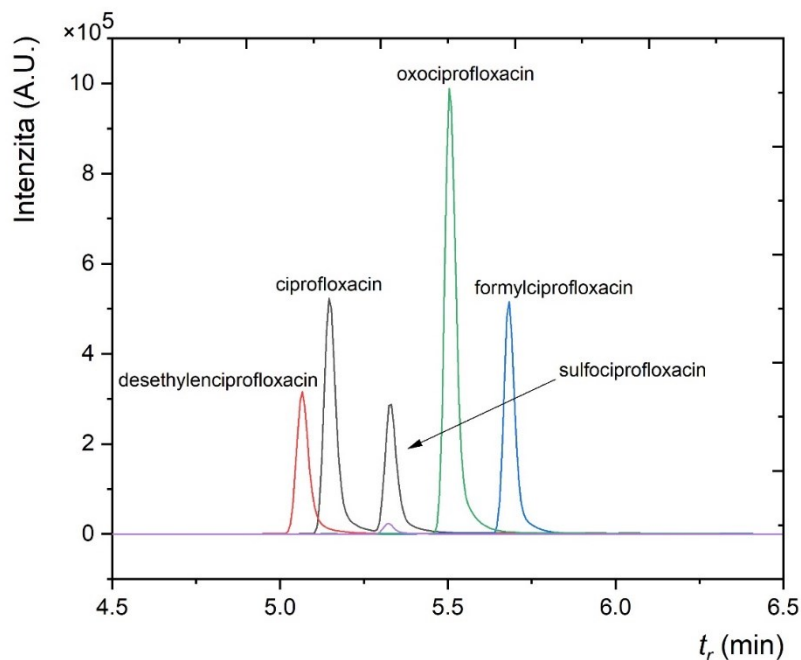
Obr. 31: Chromatogram separace směsného vzorku; Atlantis™ dC₁₈ (100 mm × 2,1 mm; 3 μm), Waters; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,6 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

3.2.9 Chromatografická kolona ACE® Excel® C₁₈-Amide

Jako poslední testovaná kolona byla kolona ACE® Excel® C₁₈-Amide (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies, Skotsko. Tato kolona obsahuje amid, který je navázaný mezi silikagelem a oktadecylovým řetězcem. Kolona je také kompatibilní se 100% vodnou složkou.

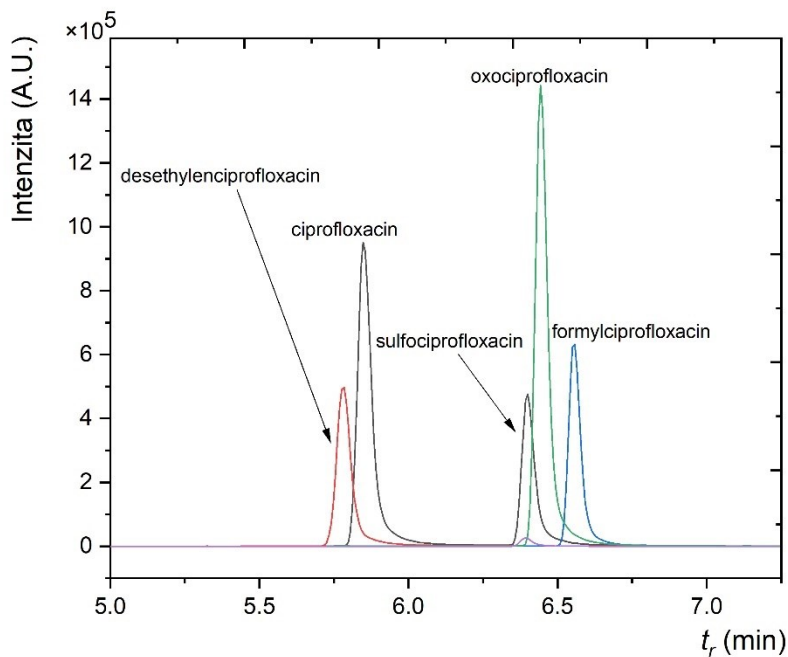
Jako MF byla použita nejprve směs 5 mmol l⁻¹ pufru mravenčanu amonného o pH 3 (složka A) a acetonitrilu (složka B) a následně směs stejného pufru, ale tentokrát s methanolem. Průtok MF byl 0,5 ml min⁻¹. V Tab. 8 je uveden gradientový program. Celková doba analýzy byla 12 minut. Ostatní parametry separace zůstaly nezměněny. Na Obr. 32 a Obr. 33 jsou uvedeny chromatogramy. V případě použití této kolony bylo dosaženo relativně symetrických píků. Při použití acetonitrilu jako organické složky

je vidět, že analyty ciprofloxacin a sulfociprofloxacin nejsou od sebe odděleny až na základní linii (viz Obr. 32).



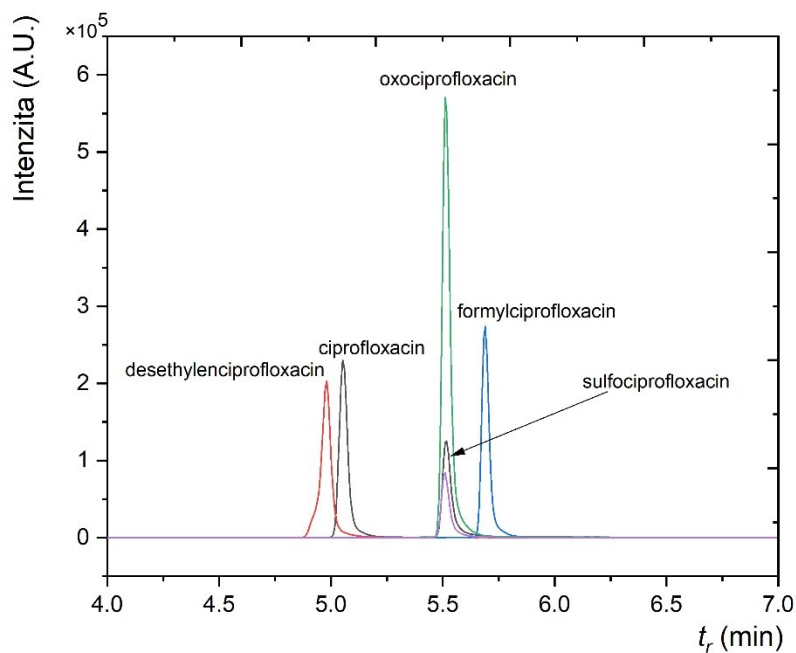
Obr. 32: Chromatogram separace směsného vzorku; ACE® Excel® C₁₈-Amide (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies; MF směs 5 mmol l⁻¹ pufr mravenčanu amonného o pH 3 (složka A) a acetonitrilu (složka B); průtok MF 0,5 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

V případě, kde byl jako organická složka použit methanol (viz Obr. 33) vidíme, že došlo ke zvýšení retence a zvýšení odezvy. Taktéž jsou od sebe lépe odseparovány ciprofloxacin se sulfociprofloxacinem.



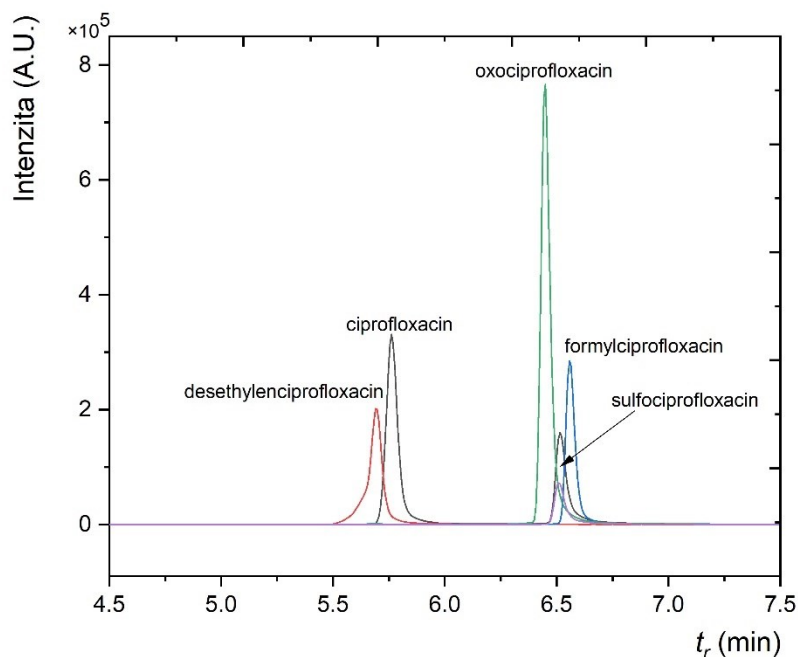
Obr. 33: Chromatogram separace směsného vzorku; ACE® Excel® C₁₈-Amide (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies; MF směs 5 mmol l⁻¹ pufr mravenčanu amonného o pH 3 (složka A) a methanolu (složka B); průtok MF 0,5 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

Následně byl změřen směsný vzorek, kde byla jako MF použita nejprve směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Následně byla připravena MF, kterou tvořila směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B). Na Obr. 34 je uveden chromatogram, kde jako organická složka byl použitý okyselený acetonitril. Pokud bychom chromatogram porovnali s Obr. 32, kde byla MF směs pufr:acetonitril, tak vidíme, že došlo ke změně selektivity u sulfociprofloxacinu (nyní koeluuje s oxociprofloxacinem) a k rozmytí píku desethylenciprofloxacinu v přední části. Taktéž došlo ke snížení odezvy.



Obr. 34: Chromatogram separace směsného vzorku; ACE® Excel® C₁₈-Amide (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a acetonitrilu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,5 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

Na Obr. 35 je znázorněn chromatogram, kde byl použit okyselený methanol jako organická složka. V porovnání s Obr. 34 lze pozorovat vyšší odezvu. Na druhou stranu pík desethylenciprofloxacinu je výrazněji rozmytý vpředu.

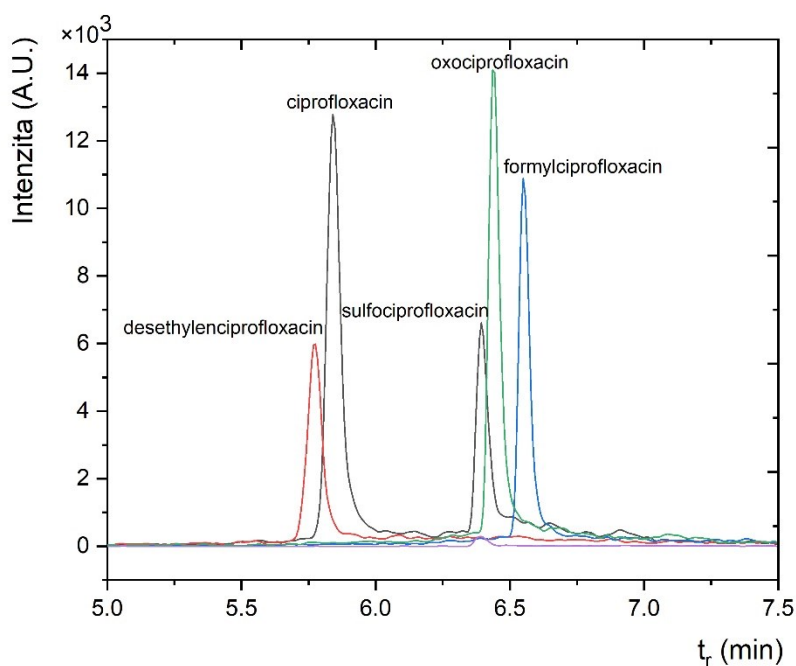


Obr. 35: Chromatogram separace směsného vzorku; ACE® Excel® C₁₈-Amide (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies; MF směs 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a methanolu s 0,1% kyselinou mravenčí (složka B); průtok MF 0,5 ml min⁻¹; nástřik 1 μl; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

Z testovaných kolon byly jako nejvhodnější kolony pro analýzu ciprofloxacinu a jeho metabolitů vybrány kolony Atlantis™ dC₁₈ a ACE® Excel® C₁₈-Amide vzhledem k dobré separační účinnosti a symetrickému tvaru chromatografických píků. V další části práce bylo pracováno s kolonou ACE® Excel® C₁₈-Amide a složením MF jako na Obr. 33 vzhledem k nejvyšší odezvě analytů a dostatečné separaci.

3.3 Odhad LOD

Ve slepém vzorku (blanku) byl zaznamenán přenos vzorku. Odhad hodnoty LOD se provedl následovně – směsný vzorek byl ředěn na takovou koncentraci, kdy odezva jednotlivých analytů na chromatogramu byla vyšší než odezva ve slepém vzorku. LOD pro tuto metodu byl stanoven na hodnotu $0,5 \text{ ng ml}^{-1}$. Chromatogram naředěného směsného vzorku je uveden na Obr. 36.



Obr. 36: Odhad hodnoty LOD. ACE® Excel® C₁₈-Amide (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies; MF směs 5 mmol l⁻¹ pufru mravenčanu amonného o pH 3 (složka A) a methanolu (složka B); průtok MF 0,5 ml min⁻¹; nástřik 1 μl ; teplota na dávkovači 15 °C; teplota kolony 40 °C.

3.4 Aplikace metody v biologické matrici

V posledním kroku bylo sledováno, zda biologická matrice ovlivní chromatografické chování analytů a zda bude mít zásadní vliv na ionizaci sledovaných analytů. Optimalizovanou metodou byl nejprve proměřen vzorek, který neobsahoval krysí sérum a následně vzorek s přidavkem séra (viz kapitola 2.2.9). V Tab. 9 jsou vypsané retenční časy (t_r) jednotlivých analytů, vliv matričních efektů (ME) na separaci a faktor symetrie píku (A). Z tabulky je vidět, že přítomnost biologické matrice neovlivňuje retenci jednotlivých analytů. Největší vliv ME můžeme sledovat v případě desethylen-ciprofloxacinu (-29 %) a ciprofloxacinu (-21 %). Znaménko mínus před jednotlivými hodnotami ME značí, že došlo k poklesu plochy píku analytu v přítomnosti krysího séra.

Tab. 9: Vliv přítomnosti matrice na výslednou chromatografii.

| Analyt | t_r^* (min) | t_r^{**} (min) | ME (%) | A^* | A^{**} |
|------------------------------|------------------|---------------------|-----------|-------|----------|
| ciprofloxacin | 5,85 | 5,85 | -21 | 1,43 | 1,66 |
| desethylen- ciprofloxacin | 5,78 | 5,78 | -29 | 1,74 | 1,53 |
| oxo- ciprofloxacin | 6,44 | 6,44 | -13 | 1,42 | 1,59 |
| formyl- ciprofloxacin | 6,54 | 6,55 | -9 | 1,57 | 1,51 |
| sulfo- ciprofloxacin | 6,39 | 6,39 | -10 | 1,58 | 1,75 |

*vzorek obsahující sérum

** vzorek neobsahující sérum

4 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout metodu vhodnou pro stanovení ciprofloxacinu a jeho čtyř metabolitů (desethylenciprofloxacinu, oxociprofloxacinu, formylciprofloxacinu a sulfociprofloxacinu) v biologickém materiálu (krysím séru).

V první fázi byla provedena optimalizace MS. Pro každý analyt byl nalezen vhodný prekurzorový iont a následně byla provedena optimalizace MRM přechodů mezi prekurzorovými a produktovými ionty a optimalizace iontové optiky. U analytů ciprofloxacin, desethylenciprofloxacin, oxociprofloxacin a formylciprofloxacin byly získány MRM přechody v pozitivním režimu. Sulfociprofloxacin poskytoval molekulový iont $[M-H]^-$ pouze v negativním režimu. V pozitivním režimu MS dochází ke ztrátě sulfoskupiny již ve zdroji, a proto sulfociprofloxacin poskytuje shodné MRM přechody jako ciprofloxacin. Nejintenzivnější sledované MRM přechody v pozitivním režimu byly následující: ciprofloxacin a sulfociprofloxacin: 332,1/314,1 (Q_1 : -12 V, CE: -21 V, Q_3 : -22 V), desethylenciprofloxacin: 306,2/288,2 (Q_1 : -15 V, CE: -19 V, Q_3 : -30 V), oxociprofloxacin: 346,1/328,1 (Q_1 : -17 V, CE: -20 V, Q_3 : -23 V), formylciprofloxacin: 360,1/342,1 (Q_1 : -18 V, CE: -21 V, Q_3 : -23 V). Sulfociprofloxacin byl pro potvrzení sledován také v negativním režimu: 410,1/366,1 (Q_1 : 30 V, CE: 23 V, Q_3 : 24 V).

V další části diplomové práce byla optimalizována separace studovaných analytů. Bylo testováno celkem devět různých separačních kolon. Jako optimální kolona byla zvolena ACE® Excel® C₁₈-Amide (100 mm × 2,1 mm; 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies, Skotsko. Jako MF byla zvolena směs 5 mmol l⁻¹ pufru mravenčanu amonného o pH 3 (složka A) a methanolu (složka B). Zastoupení jednotlivých složek MF se měnilo podle gradientového programu. Průtok MF byl 0,5 ml min⁻¹, nástřik 1 μl, celková doba analýzy 12 minut, teplota na dávkovači 15 °C, teplota kolony 40 °C. Za těchto separačních podmínek došlo k rozseparování kritického páru ciprofloxacin a sulfociprofloxacin a všechny analyty poskytovaly dostatečně symetrické píky. Byla odhadnuta hodnota LOD na 0,5 ng ml⁻¹. Při aplikaci vyvinuté metody na reálnou matici (kryší sérum) bylo prokázáno, že její přítomnost nijak neovlivňuje retenci, separaci a tvar píků. Vlivem matričních efektů došlo ke snížení intenzity (do 30 %) sledovaných analytů. Optimalizovaná UHPLC-MS/MS metoda je připravena pro následovnou validaci.

Soupis bibliografických citací

- [1] National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Compound Summary for CID 2764, Ciprofloxacin. Převzato 23.02.2021 z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin>. Genentech.
- [2] Mack, G. Improved High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Ciprofloxacin and Its Metabolites in Human Specimens. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1992**, 582 (1–2), 263–267.
- [3] Český Lékopis 2009 (ČL 2009), Pharmacopoea Bohemica MMIX (Ph. B. MMIX). 2. díl, 1. vyd., Grada Publishing a. s., Praha, 2009, s. 1719, 2301.
- [4] Torniainen, K.; Tammilehto, S.; Ulvi, V. The Effect of PH, Buffer Type and Drug Concentration on the Photodegradation of Ciprofloxacin. *International Journal of Pharmaceutics* **1996**, 132 (1–2), 53–61.
- [5] Campoli-Richards, D. M.; Monk, J. P.; Price, A.; Benfield, P.; Todd, P. A.; Ward, A. Ciprofloxacin. A Review of Its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use. *Drugs* **1988**, 35 (4), 373–447.
- [6] LeBel, M. Ciprofloxacin: Chemistry, Mechanism of Action, Resistance, Antimicrobial Spectrum, Pharmacokinetics, Clinical Trials, and Adverse Reactions. *Pharmacotherapy* **1988**, 8 (1), 3–33.
- [7] Oliphant, C. M.; Green, G. M. Quinolones: A Comprehensive Review. *Am Fam Physician* **2002**, 65 (3), 455–464.
- [8] ACD/ChemSketch (počítačový program). Verze 12.01.2009
- [9] Davis, R.; Markham, A.; Balfour, J. A. Ciprofloxacin. An Updated Review of Its Pharmacology, Therapeutic Efficacy and Tolerability. *Drugs* **1996**, 51 (6), 1019–1074.
- [10] Státní ústav pro kontrolu léčiv. Léčivé přípravky obsahující účinnou látku ciprofloxacin. Převzato 28.02.2020 z <https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
- [11] SPC Ciplox 250. Převzato 28.02.2021 z <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0015653&tab=texts>
- [12] Al-Omar, M. A. Ciprofloxacin: Drug Metabolism and Pharmacokinetic Profile. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; Elsevier, **2005**, 31, 209–214.

- [13] Kumar, A.; Saini, G.; Nair, A.; Sharma, R. UPLC: A Preeminent Technique in Pharmaceutical Analysis. *Acta Pol Pharm* **2012**, *69* (3), 371–380.
- [14] Roge, A. B.; Firke, S. N.; Dhane, R. M.; Gunjkar, V. J.; Vadvalkar, S. M. Novel Achievement of HPLC: UPLC. *International Journal of PharmaTech Research* **2011**, *3* (3), 1423-1429.
- [15] Háková, E.: Pokroky v moderních separačních metodách. 2012. Převzato 05.03.2021 z <https://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/pokroky-v-modernich-separacnich-metodach/ultra-performance-liquid-chromatography-uplc/>
- [16] Olšovská, J.; Jurková, M. Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod. *Kvasný Průmysl* **2012**, *58* (3), 30-35.
- [17] Nováková, L.; Svoboda, P.; Pavlík, J. Ultra-High Performance Liquid Chromatography. In *Liquid Chromatography*; Elsevier **2017**, 719–769.
- [18] Mayer, H. K.; Fiechter, G. Application of UHPLC for the Determination of Free Amino Acids in Different Cheese Varieties. *Anal Bioanal Chem* **2013**, *405* (25), 8053–8061.
- [19] Di Stefano, V.; Avellone, G.; Bongiorno, D.; Cunsolo, V.; Muccilli, V.; Sforza, S.; Dossena, A.; Drahos, L.; Vékey, K. Applications of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Food Analysis. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1259*, 74–85.
- [20] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Analytická chemie (z angl. Fundamental of analytical chemistry), s. 844, Praha, VŠCHT, 2019.
- [21] Strano Rossi, S.; Anzillotti, L.; Castrignanò, E.; Frison, G.; Zancanaro, F.; Chiarotti, M. UHPLC-MS/MS and UHPLC-HRMS Identification of Zolpidem and Zopiclone Main Urinary Metabolites and Method Development for Their Toxicological Determination. *Drug Test Anal* **2014**, *6* (3), 226–233.
- [22] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Analytická chemie (z angl. Fundamental of analytical chemistry), s. 749, Praha, VŠCHT, 2019.
- [23] Dooley, K. C. Tandem Mass Spectrometry in the Clinical Chemistry Laboratory. *Clin Biochem* **2003**, *36* (6), 471–481.
- [24] LabTraining, Převzato 04.04.2021 z <https://lab-training.com/2016/01/28/what-is-the-difference-between-gc-ms-full-scan-and-selected-ion-monitoring/>

- [25] Waters the science of what's possible, Převezato 08.03.2021 z <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001439en.pdf>
- [26] Murray, K. K.; Boyd, R. K.; Eberlin, M. N.; Langley, G. J.; Li, L.; Naito, Y. Definitions of Terms Relating to Mass Spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure and Applied Chemistry* **2013**, 85 (7), 1515–1609.
- [27] Enovatia. Převezato 10.04.2021 z https://www.enovatia.com/wp-content/uploads/2009/07/Scan_types.pdf
- [28] Shimadzu, Převezato 02.04.2021 z <https://www.shimadzu.eu.com/sites/shimadzu.seg/files/jpo119007.pdf>
- [29] Shimadzu Corporation: Shimadzu LC-MS 8045 User Manual. 2016
- [30] Scherer, R.; Pereira, J.; Firme, J.; Lemos, M.; Lemos, M. Determination of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations Using HPLC Method with UV Detection. *Indian J Pharm Sci* **2014**, 76 (6), 541–544.
- [31] Krishna, J.R.; B. Naga Sandhya, B.N.; Prasad, S.H.V.V.L.N. Development and Validation of UV Spectrophotometric method for the Simultaneous estimation of Ciprofloxacin Hydrochloride and Ornidazole in Combined Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* **2014**, 4 (4), 405-408.
- [32] Suhagia B.; Desai, U.; Patel, M.; Mehta, J. RP-HPLC method for simultaneous estimation of Ciprofloxacin and Dexamethasone in eye/ear drops. *Int. J. Pharm. Sci.* **2013**, 5 (2), 62-66.
- [33] Pascual-Reguera, M. Solid-Phase UV Spectrophotometric Method for Determination of Ciprofloxacin. *Microchemical Journal* **2004**, 77 (1), 79–84.
- [34] Wang, X.; Guo, T.; Wei, Y.; Xu, G.; Li, N.; Feng, J.; Zhao, R. Determination of Quinolone Antibiotic Residues in Human Serum and Urine Using High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **2019**, 43 (7), 579–586.
- [35] Matta, M. K.; Chockalingam, A.; Gandhi, A.; Stewart, S.; Xu, L.; Shea, K.; Patel, V.; Rouse, R. LC-MS/MS Based Quantitation of Ciprofloxacin and Its Application to Antimicrobial Resistance Study in Balb/c Mouse Plasma, Urine, Bladder and Kidneys. *Anal. Methods* **2018**, 10 (10), 1237–1246.

- [36] Czyz, I.; Salvi, J.-P.; Ducrotte, A.; Kirilov, P.; Perrot, S.; Pignon, C.; Pirot, F.; Falson, F.; Boulieu, R. Development of a HPLC Method for the Determination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Reptile Plasma After Transdermal Delivery. *International Journal Pharmacy* **2015**, *5*, 571–576.
- [37] Choudhury, H.; Gorain, B.; Paul, A.; Sarkar, P.; Dan, S.; Chakraborty, P.; Pal, T. Development and Validation of an LC-MS/MS-ESI Method for Comparative Pharmacokinetic Study of Ciprofloxacin in Healthy Male Subjects. *Drug Res (Stuttg)* **2016**, *67* (2), 94–102.