

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Praha 2008

Tereza Tylová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Chemie životního prostředí

Stanovení vybraných antibiotik
v povrchových vodách metodou
UPLC-UV a HPLC-MS/MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce:	RNDr. Miroslav Flieger, CSc.
Školitel – garant:	Doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc.
Školitel – konzultant:	RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Praha 2008

Tereza Tylová

Klíčová slova: doxycyklin, klindamycin, linkomycin, tetracyklin, SPE, UPLC-UV, HPLC-MS/MS

Předmětová hesla: stanovení antibiotik ve vodách, zpracování vzorků říční vody metodou SPE, linkosamidová antibiotika, tetracyklinová antibiotika

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením RNDr. Miroslava Fliegera, CSc., RNDr. Jany Olšovské, Ph.D. a Doc. RNDr. Evy Tesařové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 28.4.2008

.....

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	6
1 ÚVOD.....	8
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	9
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1 ANTIBIOTIKA.....	10
3.1.1 DĚLENÍ ANTIBIOTIK.....	10
3.1.1.1 Dělení podle původu.....	10
3.1.1.2 Dělení podle biologických účinků	11
3.1.1.3 Dělení podle mechanismu účinku.....	11
3.1.1.4 Dělení podle chemické struktury	11
3.1.2 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH SKUPIN ANTIBIOTIK.....	12
3.1.2.1 Mechanismus působení vybraných skupin antibiotik.....	12
3.1.2.2 Linkosamidy	12
3.1.2.2.1 Klindamycin	13
3.1.2.2.1.1 Stanovení klindamycinu	14
3.1.2.2.1.2 Metody extrakce klindamycinu z matrice	14
3.1.2.2.2 Linkomycin.....	14
3.1.2.2.2.1 Stanovení linkomycinu	15
3.1.2.2.2.2 Metody extrakce linkomycinu z matrice	16
3.1.2.3 Tetracyklíny.....	16
3.1.2.3.1 Doxycyklin	17
3.1.2.3.1.1 Stanovení doxycyklinu	17
3.1.2.3.1.2 Metody extrakce doxycyklinu z matrice	18
3.1.2.3.2 Tetracyklin.....	18
3.1.2.3.2.1 Stanovení tetracyklinu	19
3.1.2.3.2.2 Analytické metody použité pro extrakci tetracyklinu	19
3.2 VÝSKYT ANTIBIOTIK V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ.....	20
3.3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	22
3.3.1 Základní typy rezistence vůči antibiotikům.....	22
3.3.2 Mechanismy získané rezistence vůči antibiotikům.....	22

4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
4.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A STANDARDNÍ LÁTKY	24
4.2	ANALYTICKÉ METODY	24
4.2.1	<i>Příprava vzorků</i>	24
4.2.2	<i>SPE</i>	24
4.2.3	<i>UPLC – UV</i>	25
4.2.4	<i>Validace analytické metody</i>	27
4.2.5	<i>HPLC – MS/MS (Ing. Petr Novák, Ph.D., MBÚ AV ČR)</i>	28
4.3	VÝSLEDKY A DISKUSE	30
4.3.1	<i>SPE</i>	30
4.3.2	<i>OPTIMALIZACE UPLC METODY</i>	32
4.3.2.1	Vlnová délka UV detekce	32
4.3.2.2	Složení mobilní fáze	32
4.3.2.3	Optimalizace pH mobilní fáze	36
4.3.2.4	Optimalizace gradientu UPLC metody	37
4.3.3	<i>VALIDACE ANALYTICKÉ METODY</i>	40
4.3.4	<i>HPLC-MS/MS</i>	43
5	ZÁVĚR	45
6	PŘÍLOHY	46
7	SEZNAM LITERATURY	51

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACN	acetonitril
BEH	Bridged Elhylene Hybrid (kolonový UPLC sorbent)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis)
f-Met-tRNA	N-formylmethionyl tranfer RNA
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
HLB	Hydrophilic-Lipophilic-Balanced (sorbent pro extrakci tuhou fází)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction)
LLOQ	limit kvantifikace (lower limit of quantification)
m/z	poměr hmotnost ku náboji fragmentu
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
MeOH	metanol
MF	mobilní fáze
MISPE	extrakce tuhou fází založená na molekulovém rozpoznávání (molecularly imprinted polymer solid phase extraction)
M_r	relativní molekulová hmotnost
mRNA	messenger RNA
MS ev. MS/MS	hmotnostní spektrometrie ev. tandemová hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MSPD	extrakce disperzní tuhou fází (matrix solid phase dispersion)
Na ₂ EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
PDA detektor	detektor diodového pole (polydiod array detector)
ppm	parts per million
$R_{i,j}$	míra rozlišení píků dvou sousedních analytů
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
SPE	extrakce na tuhé fázi (solid phase extraction)

TLC	tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)
tRNA	transferová RNA
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (ultra performance liquid chromatography)
UV detekce	detekce ultrafialovým zářením (ultraviolet detection)
v/v	poměr objemů

1 ÚVOD

Antibiotika mají široké využití v humánní i veterinární medicíně a jsou také hojně používána v oblasti chovu dobytka k urychlování růstu hospodářských zvířat. V organismu dochází po aplikaci antibiotik k jejich částečné metabolizaci, značná část těchto látek je však vyloučena v nezměněné či konjugované formě, přičemž konjugované formy mohou být následně přeměněny zpět na původní látku. Do životního prostředí se antibiotika dostávají exkrecí z organismu, z odpadních vod nebo ze zemědělských polí hnojených mrvou s obsahem těchto látek. Antibiotika následně kontaminují povrchové a podzemní vody a mohou se dostávat také do vody pitné. Studie prokazují některé vlivy na živé organismy, jako jsou hormonální změny u vodních živočichů či rezistence bakterií. Přítomnost antibiotik v pitné vodě však představuje zatím neznámé zdravotní riziko pro živé organismy včetně člověka, neboť dochází k celoživotní chronické expozici těmto látkám. Tato fakta poukazují na nutnost vývoje nových metod vhodných pro detekci antibiotik ve vodním prostředí, stejně jako monitorování výskytu antibiotik na území České republiky.

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vypracování metody stanovení čtyř vybraných antibiotik (klindamycin, linkomycin, doxycyklin, tetracyklin) v říční vodě.

Vzorky byly analyzovány metodou UPLC s UV detekcí. UPLC představuje v porovnání s HPLC modernější, účinnější a časově méně náročnou metodu, výhodou je také nižší spotřeba rozpouštědel a vzorku. Metoda UPLC byla pro své výhody využita při vývoji metody SPE a chromatografických parametrů. Pro konečné analýzy reálných vzorků říční vody byla metoda převedena do HPLC-MS/MS módu z důvodu detekčního limitu metody. Metodou UPLC-UV byly nejprve analyzovány vzorky standardů čtyř antibiotik a vzorky říční vody spikované směsí antibiotik o vyšší koncentraci, řádově desítek až stovek $\mu\text{g/L}$. Metoda zpracování a extrakce vzorků říční vody pro potenciálně přítomné koncentrace (desítky ng/L) antibiotik ve vodě byla ověřena pomocí HPLC s MS/MS detekcí, kdy byla říční voda spikována směsí antibiotik na konečnou koncentraci 50 ng/L .

V budoucnu bude UPLC metoda propojena s hmotnostním spektrometrem (např. využitím tzv. MALDI spotting systému), čímž bude použitelná i pro detekci reziduálních antibiotik v říční vodě.

Klíčovými parametry vyvíjené metody zpracování, extrakce a stanovení směsi antibiotik metodou UPLC-UV v říční vodě byly: maximální výtěžnost metody, limit kvantifikace (LLOQ) a reprodukovatelnost metody. Velký důraz byl kladen na selektivitu metody, neboť říční voda obsahuje velké množství nečistot a představuje tak velmi složitou matici. V neposlední řadě by měla být metoda co nejjednodušší a časově a ekonomicky nepřilíš náročná.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ANTIBIOTIKA

Antibiotika jsou látky, které inhibují růst (množení) mikroorganismů, tj. navozují bakteriostázu, nebo je usmrcují, tj. působí baktericidně¹. Jedná se o nízkomolekulární látky s molární hmotností nižší než 2000 g/mol, které jsou produkovány bakteriemi nebo houbami^{1,2} (výjimkou jsou některá peptidová antibiotika, která mají molekulovou hmotnost mnohem vyšší). Antibiotika se vyrábí fermentační cestou a mohou být dále modifikována nebo přeměňována pomocí biotransformace na nové látky s novými biologickými účinky². Antibiotika vyráběná fermentační cestou jsou využívána nejen proti patogenním mikroorganismům, ale také v terapii proti nádorovým onemocněním, k ochraně rostlin (herbicide) a dále jako insekticidy, pesticidy, akaracidy (proti roztočům) apod. Základním požadavkem na antibiotikum je optimální antimikrobiální účinek a minimální toxicita pro hostitele, tj. vysoká selektivita účinku¹.

3.1.1 DĚLENÍ ANTIBIOTIK

Antibiotika lze rozdělit do několika skupin podle různých hledisek, například podle původu, podle biologických účinků, podle chemické struktury podle mechanismu účinku či dalších kritérií².

3.1.1.1 Dělení podle původu²

Z hlediska původu lze antibiotika rozdělit na ta, která jsou produkována:

- a) mikroorganismy jako jsou streptomycety, houby, mykobakterie, apod.
- b) vyššími rostlinami, řasami a lišejníky
- c) živočichy

3.1.1.2 Dělení podle biologických účinků²

Podle biologických účinků antibiotik lze tyto látky dělit na následující skupiny:

- a) antibiotika s antiinfekční aktivitou (antibakteriální, antivirální, antitrypanosomální apod.)
- b) antibiotika s protinádorovou aktivitou (kancerostatická, cytostatická)
- c) antibiotika s jinou aktivitou proti živým buňkám (insekticidní, herbicidní, akaricidní (proti roztočům), nematocidní (proti hád'átkům), defoliační apod.)

3.1.1.3 Dělení podle mechanismu účinku²

Na základě mechanismu účinku dělíme antibiotika do následujících podskupin:

- a) antibiotika způsobující inhibici syntézy buněčné stěny (např. peniciliny)
- b) antibiotika způsobující poruchy funkce cytoplasmatické membrány (např. azoly)
- c) antibiotika způsobující inhibici syntézy bílkovin (např. makrolidy, tetracykliny)
- d) antibiotika způsobující inhibici syntézy nukleových kyselin (např. sulfonamidy)

3.1.1.4 Dělení podle chemické struktury¹

Podle chemické struktury dělíme antibiotika na mnoho podskupin: peniciliny, cefalosporiny, chloramfenikol, tetracykliny, makrolidy, bazická aminoglykosidová antibiotika, cyklická polypeptidová antibiotika, sulfonamidy, linkosamidy a další.

3.1.2 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH SKUPIN ANTIBIOTIK

Následující podrobnější popis vlastností jednotlivých skupin antibiotik se bude týkat pouze těch skupin, do kterých spadají antibiotika, jež jsou předmětem diplomové práce. Jedná se tedy o linkosamidy (klindamycin, linkomycin) a tetracykliny (doxycyklin, tetracyklin).

3.1.2.1 Mechanismus působení vybraných skupin antibiotik

Obecný mechanismus působení linkosamidů a tetracyklinů je shodný, neboť patří do skupiny látek způsobujících inhibici syntézy bakteriálních bílkovin. Selektivita účinku je dána odlišnou strukturou bakteriálního a eukaryotického ribozómu². Bakteriální ribozóm sestává ze dvou podjednotek – 30S a 50S, velikost celého ribozómu je 70S. Ribozómy v eukaryotických buňkách jsou složeny z podjednotek o velikosti 40S a 60S a celkový rozměr ribozómu je 80S². Bakteriální syntéza bílkovin na ribozómech (translace) probíhá v několika krocích¹. Stimulem pro zahájení je vazba messenger RNA (mRNA) na menší ribozomální podjednotku (30S). Na iniciační kodon (triplet bází odpovídající určité aminokyselině) mRNA se naváže N-formylmethionyl transfer RNA (fMet-tRNA) a následně dochází k připojení větší ribozomální podjednotky (50S). Dále nastává proces tvorby a prodlužování peptidového řetězce, tzv. elongace, kdy se transferová RNA (tRNA), nesoucí odpovídající antikodon (triplet bází, který se navazuje na příslušný kodon v mRNA) a příslušnou aminokyselinu váže na specifické místo na ribozómu a jednotlivé aminokyseliny jsou propojovány peptidovou vazbou do peptidového řetězce. Přítomnost stop-kodónu na mRNA zastaví proces elongace a dojde k uvolnění vzniklého peptidového řetězce². Antibiotika inhibující syntézu bílkovin ovlivňují proces elongace peptidového řetězce různými mechanismy¹, viz. kapitoly 3.1.2.2 a 3.1.2.3.

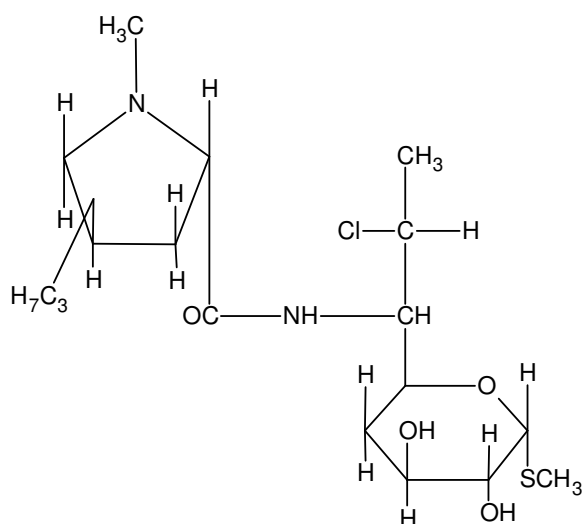
3.1.2.2 Linkosamidy

Linkosamidy se vyznačují neobvyklým antimikrobiálním spektrem působení. Přírodním linkosamidem je například linkomycin. Semisyntetické deriváty linkomycinu byly připraveny ve snaze zlepšit jeho vlastnosti, ukázaly se však být méně aktivní. Výjimku tvoří chlorovaný derivát klindamycin, který je efektivnější než přírodní

linkomycin. Linkosamidy jsou efektivní proti mnoha Gram-pozitivním a neefektivní proti Gram-negativním aerobním bakteriím, jsou však široce a silně efektivní proti anaerobům². Linkosamidová antibiotika se používají výhradně u nemocných s infekcemi kostí a měkkých tkání, a to hlavně u infekcí, které vznikly při stomatologických onemocněních³. Mechanismus působení linkosamidů se nepodařilo zatím plně objasnit, je však velmi pravděpodobné, že tato antibiotika ovlivňují peptidyltransferázovou reakci zablokováním specifického místa bakteriálního ribozómu, čímž zamezí translaci².

3.1.2.2.1 Klindamycin

Klindamycin je bílá krystalická látka, jejíž relativní molekulová hmotnost je $M_r = 424,2$ a $pK_a = 7,7$ ⁴. Klindamycin je semisyntetický produkt dodávaný ve formě hydrochloridu a představuje nejúčinnější antibiotikum skupiny linkosamidů⁵. Vodné roztoky této látky se vyznačují velmi hořkou chutí². Klindamycin se silně váže na bílkoviny, vylučuje se žlučí a močí. Penetruje dobře do kostní tkáně, šlach a kloubů. Je proto vhodný u stafylokokových osteomyelitid a u infekcí necitlivých na jiná protistafylokoková antibiotika¹. Dále je aplikován při léčbě zápalu plic, angíny, akné a dalších onemocnění². Struktura klindamycinu je uvedena na *Obr. 1*.



Obr. 1: Klindamycin

3.1.2.2.1.1 Stanovení klindamycinu

UPLC metoda stanovení klindamycinu nebyla dosud v literatuře popsána. Z chromatografických metod byla pro stanovení klindamycinu v různých matricích majoritně použita metoda reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen reverzní HPLC) lišící se v jednotlivých publikacích provedením a způsoby detekce. Literatura uvádí využití UV detekce^{6,7}, elektrochemické detekce⁸, MS či MS/MS detekce^{9,10,11}, chemiluminiscenční detekce pomocí tris(bipyridine)-ruthenia(III)¹² či metodu reverzní HPLC za použití iontově párového činidla s následnou UV detekcí¹³. Starší publikace uvádějí také stanovení klindamycinu metodou tenkovstvé chromatografie (dále jen TLC)¹⁴. Uvedenými metodami bylo toto antibiotikum stanoveno například v lidské či zvířecí plazmě^{6,7,10,11}, v lidském séru⁹ či v léčivech¹³.

Ve vodné matrici byl klindamycin přednostně stanovován metodou reverzní HPLC s MS/MS detekcí¹⁵.

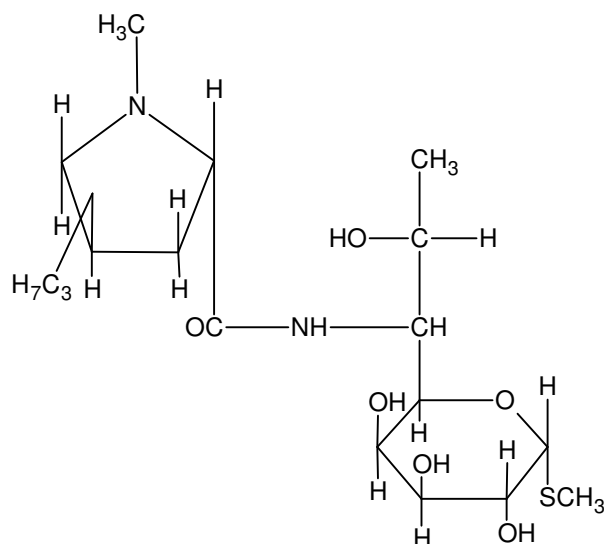
3.1.2.2.1.2 Metody extrakce klindamycinu z matrice

Literaturou uváděné extrakční postupy při stanovení klindamycinu v různých matricích jsou extrakce na tuhé fázi (dále jen SPE) a extrakce kapaliny kapalinou (dále jen LLE). Například pro extrakci klindamycinu ze vzorku svaloviny byla použita metoda SPE¹⁶, ze vzorku lidské plazmy byla tato látka izolována pomocí LLE¹⁷. Pro extrakci klindamycinu z vodné matrice byla dle publikací využita SPE¹⁸. Touto metodou dochází k přečištění vzorku, oddělení analytu od interferujících složek matrice a zakoncentrování analytu ve vzorku¹⁸.

3.1.2.2.2 Linkomycin

Linkomycin je bílá krystalická látka, jejíž relativní molekulová hmotnost je $M_r = 406,2$ a $pK_a = 7,6$. Linkomycin je produkován jako sekundární metabolit bakterie *Streptomyces linkolnensis* a komerčně je dodáván ve formě hydrochloridu. Je aktivní proti Gram-pozitivním organismům, hlavně streptokokům a stafylokokům, mykobakterie však vykazují vůči tomuto antibiotiku rezistenci. Linkomycin je využíván k léčbě stafylokokové faryngitidy, zánětu středního ucha způsobeného Gram-pozitivním kokem, zápalu plic či hnisavých kožních onemocnění. Je také vhodnou náhradou

k léčbě infekcí způsobených Gram-pozitivním kokem, kdy stav pacienta vylučuje užívání penicilinu. Pro tyto aplikace je dnes však před linkomycinem dávana přednost klindamycinu². Struktura linkomycinu je znázorněna na *Obr. 2*.



Obr. 2: Linkomycin

3.1.2.2.1 Stanovení linkomycinu

Stanovení linkomycinu v kultivačním médiu bylo popsáno za použití UPLC¹⁹, stanovení linkomycinu v různých matricích metodou reverzní HPLC^{19,20,21,22}, metodou plynové chromatografie (dále jen GC)²³ či metodou kapilární zónové elektroforézy (dále jen CZE)²⁴ za použití různých detekčních metod. Jedná se například o UV detekci¹⁹, elektrochemickou detekci^{21,24}, MS či MS/MS detekci^{20,22,25}. Uvedenými technikami byl linkomycin detekován v různých matricích, například v kultivačním médiu¹⁹, v kravském mléce, v jogurtu²⁰, v medu²¹, ve veterinárních přípravcích²⁶ či ve směsi látek chemicky podobných²¹. Některé publikace uvádějí také stanovení linkomycinu metodou TLC s denzitometrickým stanovením²⁶.

Ve vodné matrici byl linkomycin stanoven metodou reverzní HPLC s MS/MS detekcí²⁵.

3.1.2.2.2 Metody extrakce linkomycinu z matrice

Linkomycin lze extrahovat z matrice metodou extrakce disperzní tuhou fází (matrix solid phase dispersion – MSPD)²⁰ a metodou SPE^{19,22,25}, která byla také převzata a upravena v této práci.

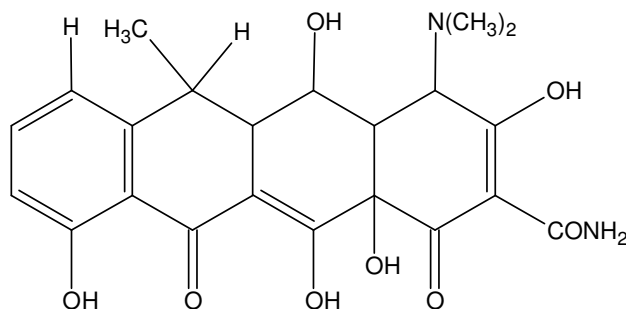
3.1.2.3 Tetracykliny

Skupinu tetracyklinů tvoří přírodní látky produkované bakterií *Streptomyces spp.* a jejich semisyntetické deriváty odvozené od hydronaftacénového jádra obsahujícího čtyři spojené kruhy. Mezi přírodní produkty patří například chlortetracyklin či tetracyklin, skupina semisyntetických analogů obsahuje například doxycyklin či methacyklin². Tetracykliny představují širokospektrá antibiotika inhibující mnohé běžné Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie, chlamidie, riketsie a další². Obecně se uvádí, že jsou efektivnější proti Gram-pozitivním bakteriím než proti Gram-negativním bakteriím². Jednotlivá antibiotika skupiny tetracyklinů se navzájem liší farmakokinetickými vlastnostmi a citlivostí mikroorganismů.¹ Tetracykliny působí převážně bakteriostaticky inhibicí syntézy bílkovin. Do buňky pronikají energeticky závislým pochodem, v cytoplasmě se váží na 30S ribozomální podjednotky v místě vazby aminoacyl-tRNA na komplex tvořený ribozómem a mRNA. Tato vazba brání přístupu nových aminokyselin do nově vytvářeného peptidového řetězce, čímž je dočasně narušena syntéza bakteriálních bílkovin^{1,2}. Tetracykliny však zároveň pronikají do savčích buněk a mohou tak ovlivňovat proteosyntézu v eukaryotických ribozómech. Koncentrace antibiotik dosažené při léčbě naštěstí nepoškozují cytoplasmatické ribozómy a jsou účinné pouze proti mitochondriálním ribozómům. Vysvětlením se zdá být fakt, že antibiotika nejsou koncentrována mitochondriemi tak aktivně, jako je tomu v případě bakterií, a dosažené koncentrace tudíž neovlivňují enzymy dýchacího řetězce. Využití tetracyklinů, navzdory jejich širokému spektru účinnosti, v dnešní době významně klesá. Důvodem je stále se zvyšující rezistence některých běžně se vyskytujících bakterií na tato antibiotika a možnost jejich náhrady aktivnějšími a lépe tolerovanými léčivy. Vzhledem ke své finanční dostupnosti jsou však tetracykliny stále hojně využívány v rozvojových zemích. Zároveň představují vhodnou alternativu při léčbě široké škály nemocí, jako je například leptospiróza, antrax (černé neštovice),

syfilitida, kapavka či venerický granulom. Tetracykliny se stále používají při léčbě infekcí dýchacích cest a mají také využití při dlouhodobé léčbě u pacientů s alergií na penicilin².

3.1.2.3.1 Doxycyklin

Doxycyklin je žlutá krystalická látka bez zápachu, o $M_r = 444,2$, která obsahuje ve své molekule tři ionizovatelné skupiny a je tudíž charakterizována třemi hodnotami pK_a : $pK_{a1} = 3,4$; $pK_{a2} = 7,7$; $pK_{a3} = 9,3$ ²⁷. Aktivita, spektrum působení a použití doxycyklinu plně odpovídá obecné charakteristice skupiny tetracyklinů. Doxycyklin má své využití při léčbě infekcí dýchacích cest a různých pohlavních chorob². Struktura doxycyklinu je znázorněna na *Obr. 3*.



Obr. 3: Doxycyklin

3.1.2.3.1.1 Stanovení doxycyklinu

Stejně jako v případě linkomycinu byl doxycyklin prekoncentrován a extrahován z různých matric metodou SPE a stanovován reverzní HPLC^{28,29,30}, metodou CZE^{31,32} či micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií³³ (MECC) za použití UV detekce^{28,33,34}, fluorescenční detekce³⁵, MS/MS detekce^{30,36}, elektrochemické detekce²⁹ nebo chemiluminiscenční detekce³⁷. UPLC metoda stanovení doxycyklinu nebyla dosud v literatuře popsána. Mezi jednodušší a finančně méně náročné metody stanovení této látky patří metoda TLC s UV detekcí a denzitometrickým stanovením³⁸. Uvedenými metodami byl doxycyklin stanoven

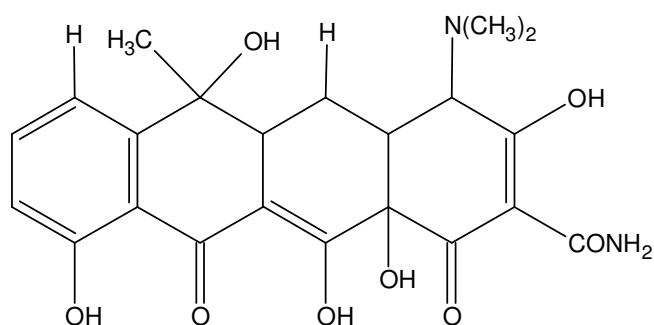
například v lidské plazmě či séru^{28,34}, v kravském mléku³⁰, ve svalech či ledvinách³⁵, v moči³⁴, v lécích³³ a dalších matricích. Pro stanovení doxycyklinu ve vodné matrici byla použita metoda reverzní HPLC s MS/MS detekcí²⁵.

3.1.2.3.1.2 Metody extrakce doxycyklinu z matrice

Publikace uvádějí pro extrakci analytu z různých matric a pro úpravu vzorků použití metod SPE, LLE a MSPD. Například pro extrakci doxycyklinu ze vzorků moči a séra byla použita metoda SPE²⁵, z mléka byla tato látka extrahována metodou extrakce disperzní tuhou fází (MSPD)³⁹ či metodou LLE⁴⁰. Pro extrakci doxycyklinu z vodné matrice uvádí literatura majoritní využití SPE²⁵.

3.1.2.3.2 Tetracyklin

Tetracyklin je žlutá krystalická látka o $M_r = 444,2$. Tetracyklin obsahuje ve své molekule tři ionizovatelné skupiny a je tudíž charakterizován třemi hodnotami pK_a : $pK_{a1} = 3,3$; $pK_{a2} = 7,7$; $pK_{a3} = 9,5$ ⁴¹. Aktivita, spektrum působení a použití této látky plně odpovídá obecné charakteristice skupiny tetracyklinů. Tetracyklin je stále hojně využíván k léčbě pohlavně přenosných nemocí. Využívá se také k léčbě kožních onemocnění, jako například k léčbě akné². Struktura tetracyklinu je uvedena na *Obr. 4*.



Obr. 4: Tetracyklin

3.1.2.3.2.1 Stanovení tetracyklinu

UPLC metoda stanovení tetracyklinu nebyla dosud v literatuře popsána. Literatura uvádí stanovení tetracyklinu v různých matricích metodou reverzní HPLC^{29,42,43} či CZE⁴⁴ za použití různých detekčních metod. Jedná se například o UV detekci^{42,43}, elektrochemickou detekci²⁹, fluorescenční detekci⁴⁵, MS/MS detekci^{25,46}, chemiluminiscenční detekci⁴⁷ či metodu reverzní HPLC za použití iontově párového činidla s následnou UV detekcí⁴⁸. Některé práce uvádějí také stanovení tetracyklinu metodou TLC⁴⁹. Uvedenými metodami byl tetracyklin stanoven například v kravském mléce⁴³, v medu⁴⁵, ve vejcích a drůbežím mase⁴⁸ a dalších matricích. Pro stanovení tetracyklinu ve vodné matrici byla použita metoda reverzní HPLC s MS/MS detekcí^{25,50}.

3.1.2.3.2.2 Analytické metody použité pro extrakci tetracyklinu

Prekoncentrace a extrakce tetracyklinu z rybích tkání byla provedena metodou SPE založené na molekulovém rozpoznávání (molecularly imprinted polymer solid phase extraction-MISPE)⁴⁷, z medu byl tetracyklin extrahován metodou SPE^{44,46}. Pro extrakci tetracyklinu z vodné matrice uvádí literatura využití SPE^{25,50}, kdy dochází k přečištění vzorku, oddělení analytu od interferujících složek matrice a zakoncentrování analytu ve vzorku¹⁸.

3.2 VÝSKYT ANTIBIOTIK V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Antibiotika tvoří velkou část léčiv používaných v posledních letech¹⁵. Ze studií vyplývá, že zatímco v roce 1997 bylo použito na území Evropské unie při veterinární léčbě bakteriálních infekcí celkem 3 494 tun antibiotik, v roce 1999 činila spotřeba 3 902 tun. Navíc bylo v roce 1997 použito 1 599 tun antibiotik pro podporu růstu hospodářských zvířat. Do roku 1999 bylo toto množství zredukováno na 786 tun z důvodu zákazu některých látek a kvůli obecné diskusi o nezbytnosti používání antibiotik za tímto účelem v oblasti chovu dobytka. V humánní medicíně bylo v roce 1997 spotřebováno 7 659 tun antibiotik, zatímco v roce 1999 vzrostla spotřeba na 8 528 tun^{15,51}.

Vzhledem ke skutečnosti, že průměrná míra degradace antibiotik se pohybuje v rozmezí 50-60 %, je zřejmé, že z celkové sumy více než 13 000 tun veterinárních i humánních antibiotik spotřebovaných v roce 1999, došlo na území Evropy k vyloučení několika tisíců tun těchto látek do životního prostředí¹⁵. Použitá antibiotika tak mohou být transportována do podzemních i povrchových vod a následně i do pitné vody. Mrva obsahující antibiotika je často používána k hnojení zemědělských půd, čímž může dojít ke kontaminaci podzemních vod, případně i vod povrchových. Stejně tak antibiotika používaná v humánní medicíně se mohou dostat do životního prostředí, a to buď exkrecí nebo vypouštěním přebytečných antibiotik do odpadního systému¹⁸. Vzhledem k tomu, že čistírny odpadních vod nejsou v současné době schopny odstranit velké množství léčiv obsažených v odpadním vodách, dochází k vypouštění těchto látek do povrchových vod¹⁵. Výskyt antibiotik v povrchových a podzemních vodách byl v některých zemích již potvrzen, a to v koncentracích řádově desítek ng/L^{15,18,50}.

Přítomnost antibiotik v podzemních a povrchových vodách představuje ohrožení přítomných živočichů, neboť dlouhodobé vystavování chronickým dávkám těchto látek způsobuje hormonální změny v jejich organismech. Jedná se například o tvorbu specifických proteinů či výskyt určitých charakteristických znaků u opačného pohlaví než je obvyklé¹⁵. Nicméně hlavní problém představuje vznik a rozšíření nových druhů rezistentních bakterií³⁵. Jak již bylo zmíněno, antibiotika mohou setrvávat v povrchových a podzemních vodách a mohou být následně transportována do pitné

vody. Potenciální přítomnost antibiotik ve zdrojích pitné vody může způsobovat zatím neznámé poruchy z důvodu celoživotní expozice chronickým dávkám těchto látek²⁵.

3.3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE

Bakterie jsou organismy, které se vyznačují vysokou adaptabilitou, velmi rychlým růstem, vysokou četností populace a vysokou hustotou výskytu a také značnou odolností. Tyto vlastnosti výrazně podporují vznik rezistence vůči běžně používaným antibiotikům². Přítomnost reziduálních antibiotik v povrchových a podzemních vodách je důležitým faktorem, který přispívá ke vzniku získané bakteriální rezistence⁴.

Obecně lze pojem rezistence charakterizovat jako schopnost organismu přežít v přítomnosti chemické látky o takové koncentraci, která je běžně pro daný druh letální. Antibiotická rezistence je termín užívaný k popisu situace, kdy není možné dosáhnout v místě infekce koncentrace potřebné k usmrcení bakterie⁵².

3.3.1 Základní typy rezistence vůči antibiotikům

Primární rezistence²

Primární rezistence je dána druhem bakterie a jeho přirozenými vlastnostmi. Takový druh je rezistentní, neboť pro dané antibiotikum nenese příslušné zásahové místo.

Získaná rezistence²

Získaná rezistence vzniká jako důsledek mutací nebo různých genetických přenosů. Bakterie, která byla původně na antibiotikum citlivá, se stává rezistentní, což z hlediska využití antibiotik při léčbě infekčních nemocí představuje závažný problém.

3.3.2 Mechanismy získané rezistence vůči antibiotikům²

Aby bylo antibiotikum účinné, musí být splněny tři základní podmínky: mikroorganismus musí ve své buňce obsahovat zásahové (cílové) místo, které je citlivé na nízké koncentrace antibiotika; dostatečné množství antibiotika musí proniknout do bakteriální buňky až k zásahovému místu; antibiotikum nesmí být inaktivováno či vyloučeno z bakteriální buňky před navázáním na zásahové místo.

Z těchto podmínek proto vyplývají čtyři hlavní mechanismy získané rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům:

- a) inaktivace nebo modifikace chemické struktury antibiotika před vstupem nebo uvnitř bakteriální buňky pomocí specifických enzymů
- b) modifikace buněčných obalů bakterií, čímž dochází ke snížení jejich průchodnosti pro antibiotikum
- c) aktivní vyloučení antibiotika z bakteriální buňky pomocí specifických transportních jevů
- d) modifikace zásahového místa a tím znemožnění vazby antibiotika na toto místo.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A STANDARDNÍ LÁTKY

Klindamycin hydrochlorid (Fluka, Buchs, Switzerland)

Doxycyklin hydrochlorid (Calbiochem, San Diego, California)

Linkomycin hydrochlorid (Sigma, Steinheim, Germany)

Tetracyklin (Sofa, Praha, Česká republika)

Acetonitril (TJ.Baker, Deventer, Holland)

Metanol HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany)

Kyselina octová (Sigma, Steinheim, Germany)

Na₂EDTA (Sigma, Steinheim, Germany)

4.2 ANALYTICKÉ METODY

4.2.1 Příprava vzorků

Vzorky říční vody byly odebírány z řeky Vltavy, lokalita Roztoky u Prahy. Vzorky byly sbírány do tmavých skleněných lahví o objemu 2,5 L a byly skladovány při teplotě 4 °C. Pro přípravu spikovaných vzorků byly vzorky vody spikovány takovým množstvím doxycyklinu, klindamycinu, linkomycinu a tetracyklinu, aby bylo dosaženo výsledných koncentrací jednotlivých analytů ve vzorku 125 a 10 µg/L. Následně byl do vzorku přidán roztok Na₂EDTA o koncentraci 50 mg/L. Bezprostředně před extrakcí byly vzorky vody filtrovány nejprve přes skleněný filtr (Glass microfibre filter, Whatman, England) o porozitě 1,6 µm a následně přes nylonový membránový filtr o porozitě 0,22 µm (Millipore, Ireland) a pH bylo upraveno na hodnotu 6 kyselinou octovou.

4.2.2 SPE

SPE (extrakce na tuhé fázi) byla prováděna za použití kolonek obsahujících 200 mg hydrofilně-lipofilního sorbetu (HLB, Waters, Milford, MA). Kolona byla nejprve kondicionována 3 mL MeOH a následně ekvilibrována 3 mL redestilované vody. Vzorek

říční vody o objemu 1000 mL byl extrahován průtokovou rychlostí 7 mL/min. Poté byla kolonka promyta 4 mL redestilované vody a následně byly analyty eluovány 4 mL roztoku 1 % kyseliny octové v MeOH (kyselina octová/ MeOH, 1/ 99, v/ v). Extrakt byl odpařen dosucha na rotační vakuové odparce a přerozpuštěn v 1 mL roztoku 1 % kyseliny octové v MeOH. Popsanou metodou byl vzorek zakoncentrován 1000x.

4.2.3 UPLC – UV

UPLC analýza (Ultra Performance Liquid Chromatography) s UV detekcí byla prováděna na Acquity UPLC systému (Waters, Česká republika, Praha) sestávajícího z pumpy (Acquity UPLC Solvent Manager), automatického dávkovače (Acquity UPLC Sample Manager), kolonového termostatu (Acquity UPLC Column Heater/cooler) a detektoru diodového pole (Acquity UPLC PDA Detector), ke zpracování dat byl použit Empower software. Pro analýzu byla použita kolona Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm i.d.; velikost částic 1,7 μ m; Waters) spojená s předkolonou Van-Guard C18 (Waters). Vybraná antibiotika byla analyzována za použití gradientové eluce. UPLC analýzy byly prováděny při průtoku mobilní fáze 0,4 mL/min s UV detekcí při 195 nm pro linkomycin a klindamycin a 350 nm pro tetracyklin a doxycyklin. Změna vlnové délky v čase při procesování naměřených dat je podrobně uvedena v *Tab. 1*.

Tab. 1: Časová změna vlnové délky UV detekce UPLC metody.

čas analýzy (min)	vlnová délka detekce (nm)
0,00	195
1,33	350
1,88	195

Jako mobilní fáze A byl použit 10 mM octan amonný o pH 4,0, mobilní fáze B byl 100 % ACN. Standardy doxycyklinu, klindamycinu, linkomycinu a tetracyklinu byly analyzovány ve směsi gradientovou metodou (min/ %A): (0/ 95), (2,6/ 50), následně byl poměr fází skokově změněn na počáteční podmínky. Celkové trvání jedné analýzy vzorku standardů bylo 4,5 minuty, a to včetně ekvilibračního kroku. Pro analýzu reálných vzorků říční vody byla použita totožná gradientová metoda doplněná

o 2 minutový promývací krok při 100 % B. Tento krok byl začleněn z důvodu, že reálné vzorky říční vody obsahují i po provedení SPE velké množství nečistot, které se mohou pevně vázat na kolonu a tím snižovat její životnost. Vysoké procento organické fáze přispívá k vymytí těchto látek z kolony. Celkové trvání jedné analýzy reálného vzorku říční vody bylo 6,5 minuty, a to včetně ekvilibračního kroku. Pro přehlednost je gradientová metoda pro analýzu vzorků standardů a reálných vzorků říční vody popsáno v *Tab. 2* a *Tab. 3*. Retenční časy jednotlivých antibiotik a vlnová délka, při které byla prováděna UV detekce, jsou uvedeny v *Tab. 4*.

Tab. 2: UPLC metoda pro analýzu vzorků standardů^I.

čas (min)	% A	% B
0,0	95	5
2,6	50	50*
4,5	95	5**

^IA: octan amonný, pH 4.0; B: ACN.

* lineární změna poměru fází

** skoková změna poměru fází

Tab. 3: UPLC metoda pro analýzu reálných vzorků říční vody^{II}.

čas (min)	% A	% B
0,0	95	5
2,6	50	50*
4,6	0	100**
6,5	95	5**

^{II}A: octan amonný, pH 4.0; roztok B, ACN.

* lineární změna poměru fází

** skoková změna poměru fází

Tab. 4: Retenční časy jednotlivých antibiotik a vlnová délka UV detekce.

analyt	t _R (min)	vlnová délka detekce (nm)
linkomycin	1,17	195
tetracyklin	1,47	350
doxycyklin	1,79	350
klindamycin	1,95	195

4.2.4 Validace analytické metody

Selektivita UPLC metody

Selektivita metody je ověřena srovnáním vzorku standardu, vzorku matrice a vzorku matrice spikované analytem o koncentraci blízké LLOQ. Porovnáním chromatogramů je zjištěno, zda s analyty neinterferuje žádná látka přítomná v matrici vzorku.

Kalibrační křivka

Pro sestavení kalibrační křivky byly měřeny vzorky obsahující směs standardů čtyř testovaných antibiotik (doxycyklin, klindamycin, linkomycin, tetracyklin) o shodné koncentraci, připraveny ze zásobního roztoku o koncentraci 250,0 $\mu\text{g/mL}$ postupným ředěním vždy na poloviční koncentraci. Vzorky byly rozpuštěny v roztoku 1 % kyseliny octové v MeOH (kys. octová/ MeOH, 1/ 99, v/ v). V rozmezí 250,0 – 7,8 $\mu\text{g/mL}$ bylo měřeno šest vzorků o koncentraci složek 250,0 $\mu\text{g/mL}$, 125,0 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 31,3 $\mu\text{g/mL}$, 15,6 $\mu\text{g/mL}$ a 7,8 $\mu\text{g/mL}$ (uvedené hodnoty jsou zaokrouhleny na jedno desetinné místo), každý vzorek byl měřen třikrát.

Správnost a přesnost UPLC metody

Správnost analytické metody popisuje blízkost výsledků testovacích měření získaných analytickou metodou a skutečné hodnoty (koncentrace) analytu. Správnost metody je ověřena opakovanou analýzou vzorků obsahujících známou koncentraci analytu. Přesnost analytické metody popisuje rozptyl jednotlivých měření určitých vzorků analytu. Pro ověření správnosti a přesnosti analytické metody bylo připraveno šest kontrolních vzorků na třech koncentračních hladinách. Jako míra správnosti metody byl považován procentuální poměr naměřené hodnoty ku skutečné hodnotě koncentrace analytu, relativní směrodatná odchylka (RSD %) popisovala míru přesnosti metody. Pro správnou a přesnou metodu se musela každá z koncentračních hladin vykazovat správností 85-115 % a relativní směrodatnou odchylkou (RSD %) nižší než 15 %.

LLOQ

Jako LLOQ (lower limit of quantification) byl označen nejnižší bod kalibrační křivky (8,0 $\mu\text{g/mL}$), který se vyznačoval relativní směrodatnou odchylkou (RSD %)

nižší než 20 % a správností v rozmezí 80-120 %. Ověření tohoto bodu bylo provedeno ze šesti opakovaných měření.

Výtěžnost analytické metody

Výtěžnost analytické metody (recovery) je popsána jako procentuální poměr odezvy detektoru při kvantifikaci analytu ve vzorku po zpracování a provedení extrakce z matrice ku odezvě detektoru získané měřením čistého standardu o skutečné koncentraci analytu. Výtěžnost metody byla zjištěna měřením vzorků spikovaných směsí standardů čtyř antibiotik na konečnou koncentraci 125 a 10 µg/L. Pro každou koncentrační hladinu byly připraveny čtyři vzorky.

Stabilita vzorků

Roztoky standardů čtyř antibiotik a vzorky říční vody spikované směsí antibiotik zpracované SPE metodou byly testovány pro zjištění jejich krátkodobé a dlouhodobé stability. Při zjišťování stability byly vzorky skladovány při specifických podmínkách a měřeny po daném čase. Testováním krátkodobé stability bylo zjištěno, zda dochází k degradaci vzorků při laboratorních podmínkách během dne, kdy bylo se vzorky manipulováno v době před provedením UPLC analýzy. Vzorky byly skladovány při laboratorních podmínkách a analyzovány po 0, 2, 4, 6, 8, 12 a 24 hodinách. Dlouhodobá stabilita zpracovaných vzorků říční vody byla zjišťována s ohledem na časovou náročnost přípravy vzorků před měřením. Pro určení dlouhodobé stability byly všechny vzorky rozděleny na odpovídající počet částí, skladovány při teplotě -20°C a analyzovány po 0, 1, 2, 3, 4, 7 a 14 dnech. Byly měřeny vzorky o dvou koncentracích testovaných antibiotik, pro každou koncentrační hladinu byly připraveny tři vzorky.

4.2.5 HPLC – MS/MS (Ing. Petr Novák, Ph.D., MBÚ AV ČR)

Vzorek směsi standardů o koncentraci 50 ng/L a vzorky říční vody spikované směsí antibiotik na konečnou koncentraci 50 ng/L byly analyzovány metodou HPLC s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-MS/MS). Vzorky byly připraveny postupem popsaným v kapitolách 4.2.1 a 4.2.2 s tím rozdílem, že byly po odpaření přerozpuštěny

ve 200 mL roztoku 5 % kyselého MeOH v H₂O (kys. octová/ MeOH/ H₂O, 0,05/ 4,95/ 95, v/ v/ v). Analyty ve vzorku tak byly zakoncentrovány 5000x. Analýza byla prováděna na Ultimate 1000 HPLC systému (Dionex) s hmotnostním spektrometrem APEX-Qe Ultra FTMS vybaveným 9.4 T superconducting magnetem a Dual II ESI/MALDI iontovým zdrojem (Bruker Daltonics, Billerica MA) s ESI ionizací v pozitivním módu, data byla zpracována DataAnalysis 3.4 softwarem. Pro analýzu byla použita kolona Magic C18 column (150 x 0,2 mm i.d.; velikost částic 5μm, porozita 100 Å; Michrom Bioresources). Průtok mobilní fáze byl 4 μL/min, objem dávkovaného vzorku byl 5 μL. Mobilní fázi A tvořila 0,2 % kyselina mravenčí v H₂O s přídavkem 2,5 % isopropanolu a 2,5 % ACN (kys. mravenčí/ H₂O/ isopropanol/ ACN, 0,2/ 94,8/ 2,5/ 2,5, v /v / v/ v), mobilní fáze B byla 0,16 % kyselina mravenčí v ACN s přídavkem 10 % isopropanolu a 5 % H₂O (kys. mravenčí/ ACN/ isopropanol/ H₂O, 0,16/ 84/ 84/ 10/ 5, v/ v/ v/ v). Vzorky byly analyzovány gradientovou metodou (min/ %A): (0/ 100), (1/ 99), (30/ 60), (35/ 5).

4.3 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.3.1 SPE

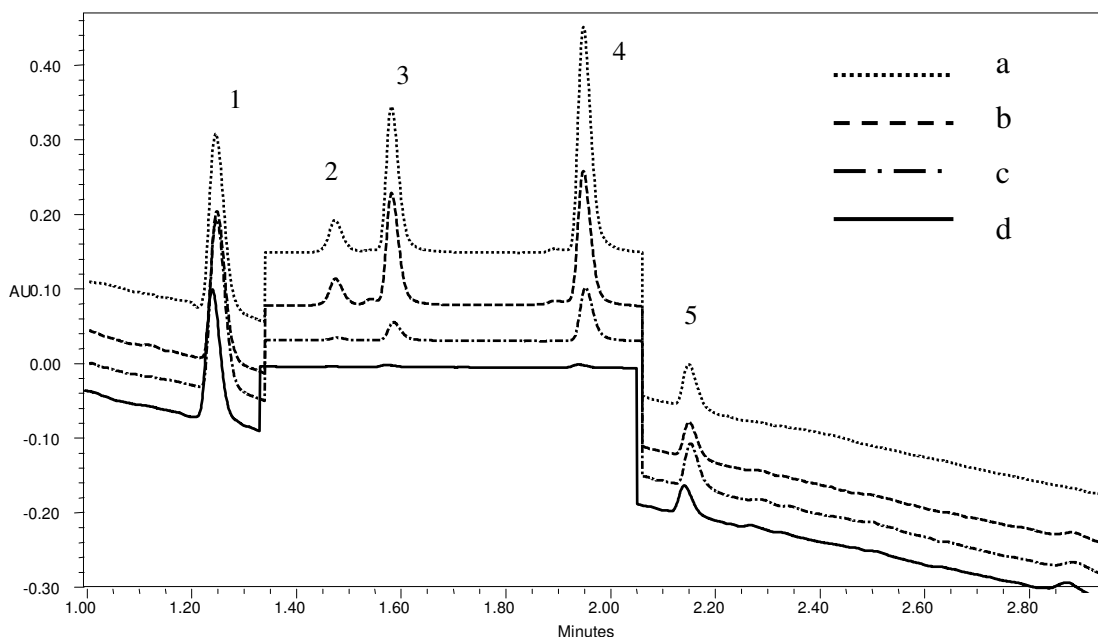
Na₂EDTA o koncentraci 50 mg/L byla přidána do vzorku říční vody z důvodu zabránění tvorby komplexů tetracyklinových antibiotik s divalentními ionty a kovy. Tento postup byl převzat z publikovaných prací zabývajících se extrakcí tetracyklinů z vodné matrice.²⁵ Vliv Na₂EDTA na výtěžnost metody byl zjišťován pro určení optimální koncentrace Na₂EDTA ve zpracovávaném vzorku. Byly měřeny vzorky o koncentraci antibiotik 50 µg/L, výsledek analýz je uveden v *Tab. 5*. Jak vyplývá z *Tab. 5*, pro linkomycin a klindamycin nemá změna koncentrace Na₂EDTA výrazný vliv na výtěžnost metody. Pro tetracyklin a doxycyklin je však zřejmé, že se zvyšující se koncentrací Na₂EDTA se výrazně zvyšuje výtěžnost metody pro tetracyklinová antibiotika. Jako optimální byla vybrána koncentrace Na₂EDTA 50 mg/L, neboť při dalším zvyšování přídatku této látky již nedochází ke zlepšení výtěžnosti metody.

Tab. 5: Vliv koncentrace Na₂EDTA na výtěžnost analytické metody.

koncentrace Na ₂ EDTA (mg/L)	linkomycin	výtěžnost (%)		
		tetracyklin	doxycyklin	klindamycin
0	88,6	37,7	33,2	88,7
1	89,3	50,4	49,8	92,2
5	90,4	57,8	64,6	93,1
10	91,7	57,6	63,3	91,0
50	91,7	72,3	74,3	91,6
100	91,4	71,5	74,5	91,4
250	91,1	69,7	71,6	89,8

K eluci analytu z HLB kolonky byl použit roztok 1 % kyseliny octové v MeOH, aby bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti v porovnání se 100 % MeOH a jinými testovanými rozpouštědly. Dále byl zjišťován vliv použitého rozpouštědla na odezvu jednotlivých analytů po přerozpouštění odpařené SPE frakce. Pro srovnání byl vzorek přerozpouštěn v 10 % MeOH dle již publikovaných metod²⁵, dále ve 100 % MeOH a 1 % kyselině octové v MeOH. Výsledky optimalizace SPE metody jsou uvedeny na *Obr. 5* a v *Tab. 6*. Jak je z výsledků zřejmé, nejúčinnější extrakce a nejvyšší odezvy analytů

bylo dosaženo metodou *a* (SPE eluce i přerozpuštění roztokem 1 % kys. octové v MeOH).



Obr. 5. Optimalizace SPE metody vzorků říční vody (výřez); srovnání chromatogramů.

1. linkomycin; **2.** neznámá látka; **3.** tetracyklin; **4.** doxycyklin; **5.** klindamycin.

a. SPE eluce: 1 % kyselina octová v MeOH, přerozpuštění: 1 % kyselina octová v MeOH;

b. SPE eluce: 1 % kyselina octová v MeOH, přerozpuštění: 10 % MeOH; **c.** SPE eluce: 100 % MeOH, přerozpuštění: 100 % MeOH; **d.** SPE eluce: 100 % MeOH, přerozpuštění: 10 % MeOH.

Tab. 6: Optimalizace SPE metody vzorků říční vody; srovnání ploch analytů.

metoda ^{III}	plocha píku (V*sec)			
	linkomycin	tetracyklin	doxycyklin	klindamycin
a	475549	331117	526233	109422
b	380505	238281	308441	81825
c	428226	40022	126040	105032
d	313705	3501	5816	62782

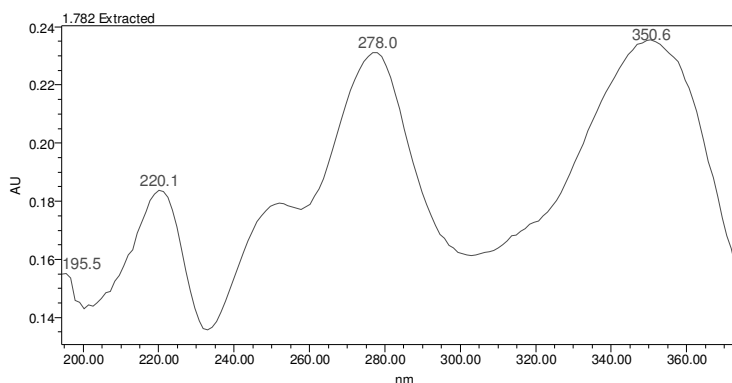
^{III}**a.** SPE eluce: 1 % kyselina octová v MeOH, přerozpuštění: 1 % kyselina octová v MeOH; **b.** SPE eluce: 1 % kyselina octová v MeOH, přerozpuštění: 10 % MeOH; **c.** SPE eluce: 100 % MeOH, přerozpuštění: 100 % MeOH; **d.** SPE eluce: 100 % MeOH, přerozpuštění: 10 % MeOH.

4.3.2 OPTIMALIZACE UPLC METODY

Při vývoji UPLC metody byly optimalizovány následující parametry: vlnová délka UV detekce, selektivita mobilní fáze, pH mobilní fáze a gradient UPLC metody.

4.3.2.1 Vlnová délka UV detekce

V rozsahu vlnových délek měřitelných PDA detektorem (190–800 nm) byla zjišťována absorpční maxima jednotlivých analytů. V tomto intervalu jsou látky klindamycin a linkomycin charakteristické absorpčním maximem odpovídajícím 195 nm, což byla zvolená vlnová délka jejich detekce. Doxycyklin a tetracyklin se vyznačují třemi absorpčními maximy, a to 220, 275 a 350 nm. Pro detekci těchto látek byla zvolena vlnová délka 350 nm, neboť při této vlnové délce neabsorbují nečistoty obsažené ve vzorcích říční vody a je tudíž dosaženo maximální selektivity UPLC metody. Příklad UV spektra doxycyklinu získaného PDA detektorem, je uvedeno na *Obr. 6*.



Obr. 6: UV spektrum doxycyklinu získané PDA detektorem

4.3.2.2 Složení mobilní fáze

Organickou složku tvořil ve všech případech ACN, který je běžně používán pro UPLC analýzy. Podmínkou pro výběr vodné složky mobilní fáze byla kompatibilita s hmotnostním spektrometrem z důvodu budoucího spojení UPLC-MS. Při optimalizaci složení vodné části mobilní fáze byly testovány následující kyseliny a pufrů: kyselina mravenčí a octová, mravenčan amonný a octan amonný. U pufrů byl testován vliv pH na účinnost separace. Parametry při výběru optimální vodné části mobilní fáze byly

následující: retenční časy jednotlivých analytů (t_R), účinnost separace (míra rozlišení píků, $R_{i,j}$) a šířka a symetrie píků (tailing factor). Vzorky byly analyzovány gradientovou metodou (min/ %A): (0/ 95), (3/ 50), s následnou skokovou změnou poměru fází na původní podmínky. Další podmínky zůstaly zachovány, viz. kapitola 4.2.3.

a. Kyselina mravenčí 10 mM

Mobilní fáze složená z 10 mM kyseliny mravenčí a ACN byla testována pro analýzu směsi antibiotik doxycyklinu, klindamycinu, linkomycinu a tetracyklinu. Výsledek analýzy je uveden na *Obr. 7* a v *Tab. 7*. V *Tab. 7* je uvedena hodnota $R_{i,j}$ pouze pro doxycyklin a klindamycin, pro ostatní analyty byla hodnota $R_{i,j} \gg 1,5$. Ačkoliv byl pro pík doxycyklinu a klindamycinu $R_{4,5} > 1,5$ (separace je tudíž dostatečná), software nedovoluje měnit vlnovou délku detekce pro analyty s tak blízkými retenčními časy. Proto byly klindamycin i doxycyklin detekovány při vlnové délce 195 nm.

b. Kyselina octová 10mM

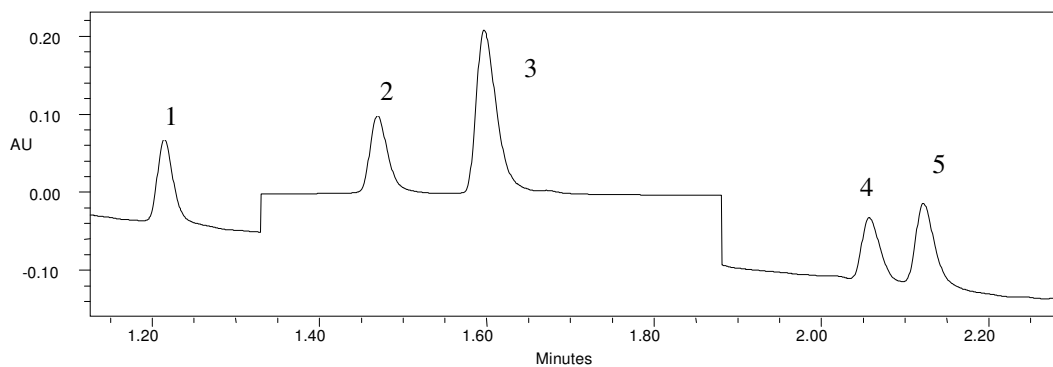
Jako vodná část mobilní fáze byla dále testována 10 mM kyselina octová. Výsledek analýzy je uveden v následujícím *Obr. 8* a v *Tab. 7*.

c. Mravenčan amonný

Dále byl testován 10 mM mravenčan amonný o různém pH jako vodná složka mobilní fáze. Z testovaných hodnot pH tohoto pufru bylo dosaženo nejlepších výsledků při pH 4,0. Výsledek analýzy je ukázán v následujícím *Obr. 9* a v *Tab. 7*.

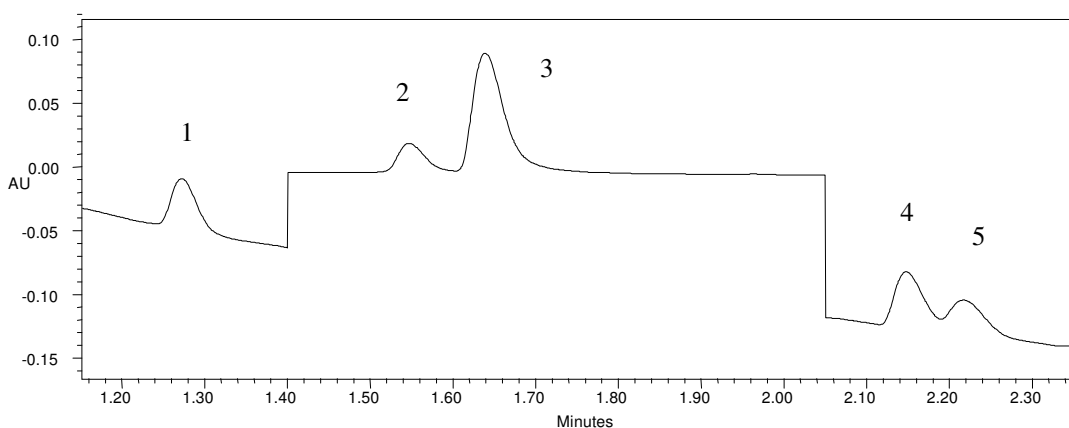
d. Octan amonný

Dalším testovaným puftrem byl 10 mM octan amonný o různém pH. Nejúčinnější separace bylo dosaženo za použití octanu amonného o pH 4,0. Výsledek analýzy je ukázán na *Obr. 10* a v *Tab. 7*.



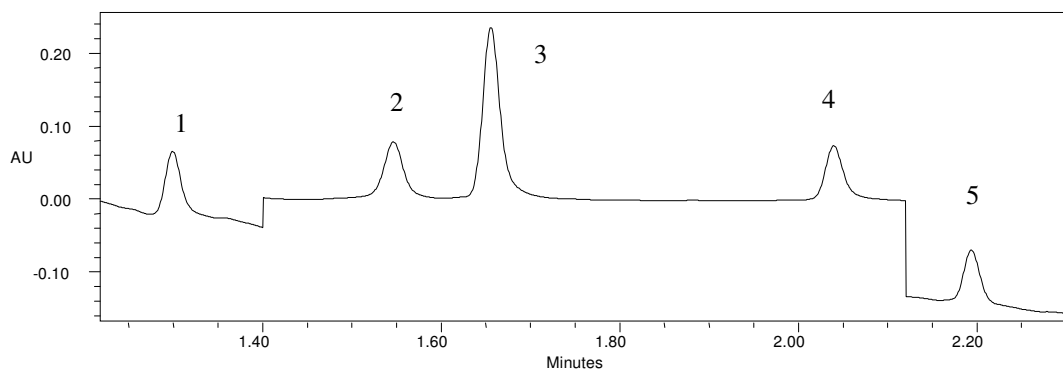
Obr. 7: Kyselina mravenčí 10 mM jako MF (výřez).

1. linkomycin; 2. neznámá látka; 3. tetracyklin; 4. klindamycin; 5. doxycylin.



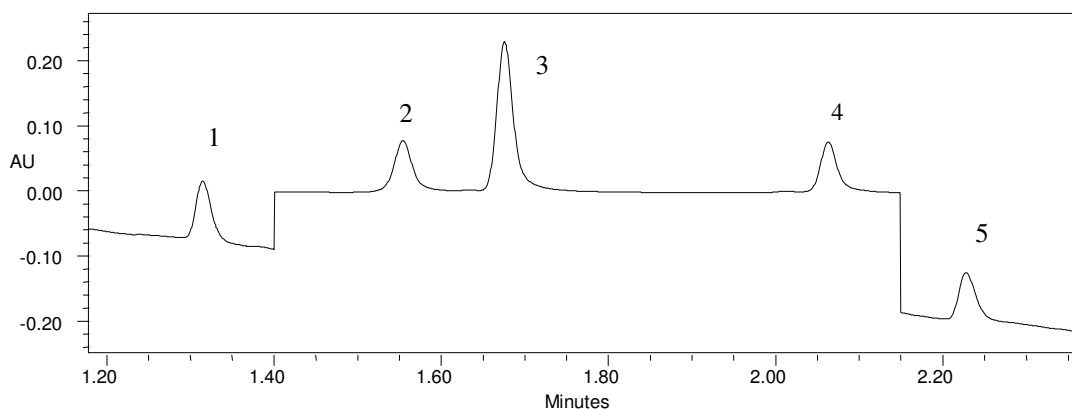
Obr. 8: Kyselina octová 10mM jako MF (výřez).

1. linkomycin; 2. neznámá látka; 3. tetracyklin; 4. klindamycin; 5. doxycylin.



Obr. 9: Mravenčan amonný pH 4,0 jako MF (výřez).

1. linkomycin; 2. neznámá látka; 3. tetracyklin; 4. doxycylin; 5. klindamycin.


Obr. 10: Octan amonný pH 4,0 jako MF (výřez).

1. linkomycin; 2. neznámá látka; 3. tetracyklin; 4. doxycyklin; 5. klindamycin.

Tab. 7: Optimalizace složení mobilní fáze.

mobilní fáze	analyt	t_R (min)	šířka píku (sec)	tailing factor (symetrie píku) ^{IV}	$R_{4/5}$ ^V
kyselina mravenčí 10 mM	linkomycin	1,22	3,85	1,38	1,59
	tetracyklin	1,60	5,55	1,49	
	doxycyklin	2,06	3,80	1,37	
	klindamycin	2,12	3,65	1,41	
kyselina octová 10 mM	linkomycin	1,27	4,50	1,33	1,08
	tetracyklin	1,64	6,65	1,60	
	doxycyklin	2,15	- ^{VI}	-	
	klindamycin	2,22	-	-	
mravenčan amonný pH 4,0	linkomycin	1,30	3,15	1,43	>> 1,5
	tetracyklin	1,66	4,70	1,34	
	doxycyklin	2,04	3,95	1,35	
	klindamycin	2,19	2,90	1,34	
octan amonný pH 4,0	linkomycin	1,32	3,00	1,22	>> 1,5
	tetracyklin	1,68	4,45	1,27	
	doxycyklin	2,06	3,90	1,19	
	klindamycin	2,23	3,05	1,26	

^{IV} tailing factor – hodnota vyjadřující symetrii píku; tailing f. = 1, absolutně symetrický pík; tailing f. > 1, pík chvostuje; tailing f. < 1, pík rozmytý vpředu.

^V rozlišení píku doxycyklinu a klindamycinu.

^{VI} hodnoty nejsou udány kvůli nedostatečné separaci analytů.

Jak je patrné z jednotlivých chromatogramů a z *Tab. 7*, při použití mravenčanu a octanu amonného o pH 4,0 dochází k dostatečné separaci doxycyklinu a klindamycinu a je tudíž možno měnit vlnovou délku detekce během analýzy. Retenční časy analytů, a tím i celková délka analýzy, byly pro mravenčan a octan amonný srovnatelné. Jak je patrné z *Tab. 7*, při použití octanu amonného je dosaženo dostatečné separace všech analytů ($R_{4,5} \gg 1,5$) a největší symetrie píků jednotlivých analytů. Octan amonný o pH 4,0 byl proto vybrán jako optimální vodná složka mobilní fáze pro analýzu reálných vzorků říční vody.

4.3.2.3 Optimalizace pH mobilní fáze

V rámci optimalizace podmínek UPLC analýzy byl zjišťován vliv pH mobilní fáze jednak na matici vzorku a jednak na retenční chování analytů. Vzorky byly analyzovány gradientovou metodou (min/ %A): (0/ 95), (3/ 50), další podmínky zůstaly zachovány, viz. kapitola 4.2.3. Testována byla 10 mM kyselina octová (pH 3,25) a 10 mM octan amonný v rozsahu pH 3,5-6,0 v kyselé oblasti a 8,0-9,0 v zásadité oblasti s krokem 0,5 pH, neboť pufrovací rozsah octanu amonného je pro kyselou oblast 3,76-5,76 a pro zásaditou oblast 8,20-10,20. Posuzovanými kritérii pro výběr optimální hodnoty pH mobilní fáze byly: vliv na matici vzorku, retenční časy analytů, míra separace jednotlivých analytů a šířka a symetrie píků. Výsledky analýz jsou uvedeny v *Tab. 8*. Výsledky v zásadité oblasti nejsou uvedeny, neboť klindamycin nebylo možno danou metodou analyzovat a docházelo k nedostatečné separaci píků tetracyklinu a doxycyklinu ($R_{4,5} < 1,5$). Hodnoty $R_{i,j}$ nejsou v *Tab. 8* uvedeny, neboť v kyselé oblasti byly ve všech případech $R_{i,j} \gg 1,5$.

Tab. 8: Optimalizace pH mobilní fáze.

pH mobilní fáze	analyt	t_R (min)	šířka píku (sec)	tailing factor (symetrie píku) ^{VII}
3,25	linkomycin	1,21	5,80	1,57
	tetracyklin	1,58	5,10	1,35
	doxycyklin	2,00	4,55	1,36
	klindamycin	2,09	6,20	2,13

3,5	linkomycin	1,22	5,50	1,38
	tetracyklin	1,57	4,75	1,18
	doxycyklin	1,97	5,05	1,18
	klindamycin	2,09	5,90	1,59

4,0	linkomycin	1,23	4,10	1,21
	tetracyklin	1,56	4,30	1,16
	doxycyklin	1,92	4,45	1,15
	klindamycin	2,13	4,00	1,21
4,5	linkomycin	1,27	3,60	1,24
	tetracyklin	1,57	4,45	1,31
	doxycyklin	1,91	4,15	1,41
	klindamycin	2,21	4,00	1,28
5,0	linkomycin	1,31	3,90	1,48
	tetracyklin	1,55	4,55	1,24
	doxycyklin	1,88	4,80	1,38
	klindamycin	2,36	4,20	1,23
5,5	linkomycin	1,43	4,25	1,15
	tetracyklin	1,55	4,35	1,24
	doxycyklin	1,88	4,55	1,44
	klindamycin	2,70	4,10	0,93
6,0	linkomycin	1,44	4,25	0,85
	tetracyklin	1,55	4,35	1,26
	doxycyklin	1,89	4,55	1,45
	klindamycin	2,72	4,10	0,93

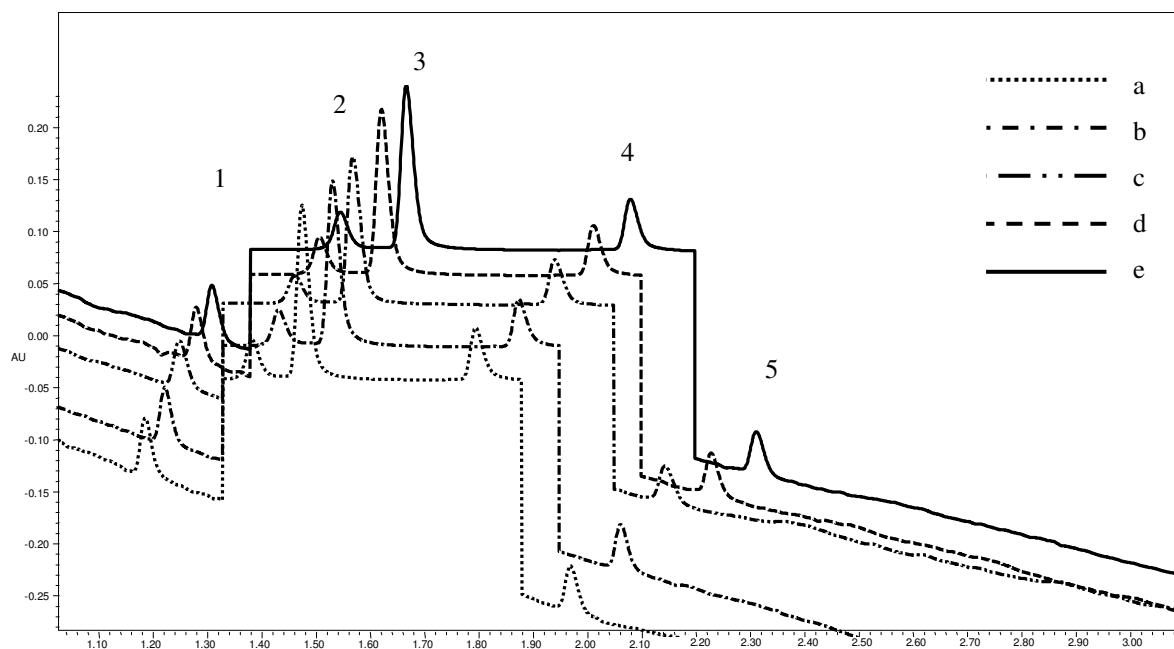
^{VII} tailing factor – hodnota vyjadřující symetrii píku; tailing f. = 1, absolutně symetrický pík; tailing f. > 1, pík chvostuje; tailing f. < 1, pík rozmytý vpředu.

Na základě výsledků analýz bylo zjištěno, že pH mobilní fáze nemá výrazný vliv na matici vzorku, má však vliv na retenční chování jednotlivých analytů. Z *Tab. 8* je zřejmé, že linkomycin a klindamycin jsou se zvyšujícím se pH na koloně více zadržovány (retenční čas se zvyšuje). Pro tetracyklin a doxycyklin není takový trend příliš viditelný, ale v zásadě dochází s rostoucím pH ke snížení jejich retenčních časů. Na základě výsledků byl vybrán pro UPLC analýzu octan amonný o pH 4,0.

4.3.2.4 Optimalizace gradientu UPLC metody

Vliv rychlosti a strmosti gradientu metody byl testován pro optimalizaci podmínek UPLC analýzy. Srovnávané gradienty (min/ %A) byly následující: a. (0/ 95), (2,6/ 50); b. (0/ 95), (2,8/ 50); c. (0/ 95), (3,0/ 50); d. (0/ 95), (3,2/ 50); e. (0/ 95), (3,4/ 50). Další podmínky zůstaly zachovány, viz kapitola 4.2.3. Při výběru optimální gradientové metody byly hlavními kritérii: retenční časy analytů a celková délka analýzy, míra separace jednotlivých analytů, šířky a symetrie píků jednotlivých analytů. Výsledky optimalizace gradientu UPLC metody jsou uvedeny na *Obr. 11* a v *Tab. 9*. Hodnoty

$R_{i,j}$ nejsou v *Tab. 9* uvedeny, neboť ve všech případech byly $R_{i,j} \gg 1,5$. Porovnáním výsledků z jednotlivých analýz byly vybrány nejvhodnější podmínky gradientové eluce pro analýzu směsi antibiotik. Z *Obr. 11* a *Tab. 9* je zřejmé, že optimální separace jednotlivých analytů, nejnižších hodnot šířky píků a jejich největší symetrie a optimálních retencí jednotlivých analytů je dosaženo metodou *a* (min/ %A): (0/ 95), (2,6/ 50). Rychlejší změna gradientu by již nebyla vhodná, neboť rychlejší gradient snižuje retence jednotlivých analytů. Retenční čas linkomycinu, který se na koloně nejméně zdržuje, je při zmiňované metodě 1,17 minut. Při analýze reálných vzorků říční vody by další snížení retence linkomycinu mohlo vést ke koeluci tohoto analytu se složkami matrice vzorku.



Obr. 11: Optimalizace gradientu UPLC metody (výřez).

1. linkomycin; **2.** neznámá látka; **3.** tetracyklin; **4.** doxycyklin; **5.** klindamycin.

a. gradient (0 / 95), (2,6 / 50); **b.** gradient (0 / 95), (2,8 / 50); **c.** gradient (0 / 95), (3,0 / 50);

d. gradient (0 / 95), (3,2 / 50); **e.** gradient (0 / 95), (3,4 / 50).

Tab. 9: Optimalizace gradientu UPLC metody.

gradient	analyt	t _R (min)	šířka píku (sec)	tailing factor (symetrie píku) ^{VIII}
(0/95), (2,6/50)	linkomycin	1,19	3,15	1,38
	tetracyklin	1,48	4,40	1,43
	doxycyklin	1,80	3,95	1,33
	klindamycin	1,97	3,25	1,31

(0/95), (2,8/50)	linkomycin	1,22	3,30	1,41
	tetracyklin	1,53	4,70	1,43
	doxycyklin	1,88	4,00	1,38
	klindamycin	2,06	3,45	1,36

(0/95), (3,0/50)	linkomycin	1,25	3,80	1,42
	tetracyklin	1,57	4,80	1,44
	doxycyklin	1,94	4,55	1,40
	klindamycin	2,15	3,85	1,35

(0/95), (3,2/50)	linkomycin	1,28	3,85	1,52
	tetracyklin	1,62	5,05	1,48
	doxycyklin	2,01	4,50	1,50
	klindamycin	2,23	3,95	1,48

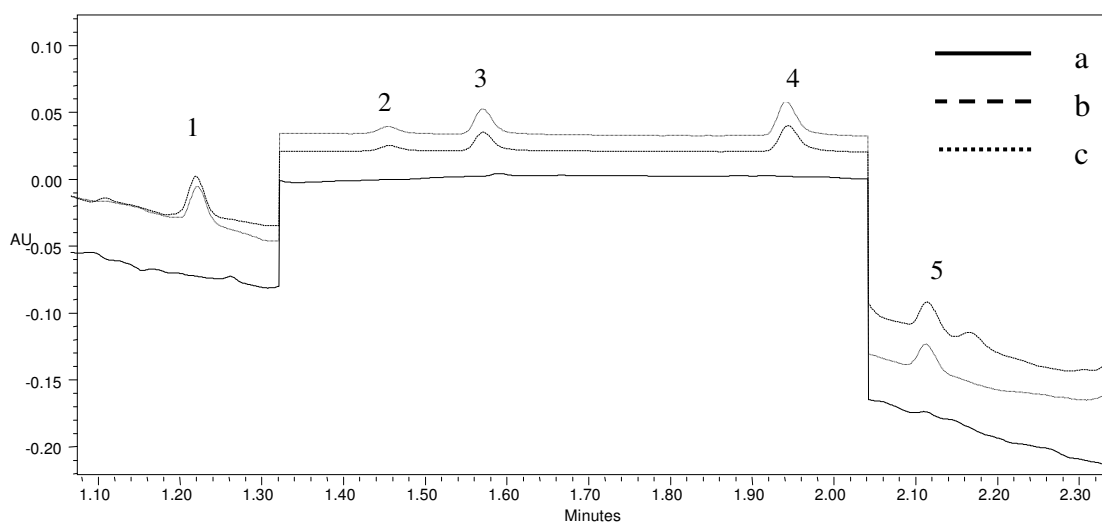
(0/95), (3,4/50)	linkomycin	1,31	3,95	1,58
	tetracyklin	1,67	5,55	1,48
	doxycyklin	2,08	4,85	1,61
	klindamycin	2,31	3,95	1,72

^{VIII} tailing factor – hodnota vyjadřující symetrii píku; tailing f. = 1, absolutně symetrický pík; tailing f. > 1, pík chvostuje; tailing f. < 1, pík rozmytý vpředu.

4.3.3 VALIDACE ANALYTICKÉ METODY

Selektivita UPLC metody

Selektivita UPLC metody byla určena srovnáním vzorku směsi standardů čtyř antibiotik, vzorku říční vody nespikované antibiotiky (blank) a vzorku spikovaného směsí čtyř antibiotik o koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tedy koncentraci blízké LLOQ. Výsledek testování selektivity je uveden na *Obr. 12*. Jak je z obrázku zřejmé, UPLC metodou dochází k separaci čtyř analytů, přičemž žádná z analyzovaných látek neinterferuje při dané vlnové délce se složkami matrice vzorku.



Obr. 12: Selektivita UPLC metody (výřez).

1. linkomycin; 2. neznámá látka; 3. tetracyklin; 4. doxycyklin; 5. klindamycin.

a. vzorek říční vody nespikované antibiotiky (blank). b. vzorek říční vody spikované směsí čtyř antibiotik o koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ zpracovaný SPE metodou. c. vzorek standardu antibiotik o koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Kalibrační křivka

Parametry kalibračních křivek pro linkomycin, doxycyklin, klindamycin a tetracyklin v koncentrační škále od 7,8 do 250,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (hodnoty jsou zaokrouhleny na jedno desetinné místo) jsou uvedeny v *Tab. 10*.

Tab. 10: Parametry kalibračních křivek pro jednotlivé analyty^{IX}.

	k	q	r ² x
linkomycin	2,231175·10 ³	3,903776·10 ³	0,999528
tetracyklin	2,394853·10 ³	– 3,455166·10 ³	0,999524
doxycyklin	3,833219·10 ³	– 3,331548·10 ³	0,999691
klindamycin	2,126719·10 ³	2,652767·10 ²	0,999615

^{IX}pro rovnici ve tvaru: $y = kx + q$

^xkoeficient determinace

Správnost a přesnost UPLC metody

Pro ověření správnosti a přesnosti analytické metody bylo připraveno šest kontrolních vzorků na třech koncentračních hladinách, a to 250 µg/mL; 60 µg/mL a 8 µg/mL. Vyhodnocením jednotlivých měření byla zjištěna správnost a přesnost (RSD %) metody. Výsledky ověření správnosti a přesnosti metody pro jednotlivá antibiotika jsou uvedena v Tab. 11. Získané hodnoty splňují požadovaná kritéria a bylo potvrzeno, že vyvinutá UPLC metoda je správná a přesná.

Tab. 11: Správnost a přesnost UPLC metody pro analýzu směsi čtyř antibiotik.

	nominální koncentrace (µg/L)	správnost (%)	RSD (%)
linkomycin	250	102,9 ± 1,7	1,3
	60	102,7 ± 4,9	4,4
	8	90,1 ± 6,7	7,3
tetracyklin	250	96,3 ± 3,1	2,7
	60	102,6 ± 5,7	7,2
	8	100,1 ± 4,2	3,7
doxycyklin	250	102,9 ± 2,3	1,7
	60	98,5 ± 6,1	5,1
	8	93,5 ± 2,0	7,2
klindamycin	250	104,1 ± 4,0	3,6
	60	99,1 ± 5,9	5,2
	8	90,1 ± 8,5	7,7

LLOQ

LLOQ byl určen jako nejnižší bod kalibračních křivek (8 µg/mL) a byl ověřen s následujícími hodnotami: pro linkomycin se hodnota LLOQ vyznačovala přesností $90,1 \pm 6,7 \%$ a RSD 7,3 %, pro tetracyklin přesností $100,1 \pm 4,2 \%$ a RSD 3,7 %, pro doxycyklin přesností $93,5 \pm 2,0 \%$ a RSD 7,2 % a pro klindamycin přesností $90,1 \pm 8,5 \%$ a RSD 7,7 %. Všechny získané hodnoty splňují požadovaná kritéria pro LLOQ.

Výtěžnost analytické metody

Výtěžnost analytické metody (recovery), která zahrnuje veškeré ztráty při úpravě vzorku, extrakci metodou SPE a analýze látek metodou UPLC, se pro linkomycin pohybuje v rozmezí 89,6 - 93,3 %, pro tetracyklin 69,7 - 73,1 %, pro doxycyklin 71,5 - 77,0 % a pro klindamycin 89,7 - 92,9 %. Přesné výtěžnosti metody pro jednotlivá antibiotika a jednotlivé koncentrace jsou uvedeny v Tab. 12. Nízké výtěžnosti vzorků říční vody spikovaných antibiotiky jsou zapříčiněny složitou maticí, kterou říční voda představuje. U tetracyklinů (doxycyklin, tetracyklin) je známý také fakt, že se mohou silně vázat na půdní organické částice a usazeniny, což je potvrzeno dřívějšími studii¹⁵.

Tab. 12: Výtěžnost analytické metody.

	nominální koncentrace (µg/L)	výtěžnost (%)
linkomycin	125	$92,1 \pm 0,7$
	10	$90,6 \pm 2,7$
tetracyklin	125	$71,8 \pm 1,4$
	10	$72,3 \pm 4,4$
doxycyklin	125	$73,8 \pm 3,8$
	10	$72,5 \pm 4,0$
klindamycin	125	$90,6 \pm 2,3$
	10	$92,1 \pm 2,1$

Stabilita vzorků

Stabilita vzorků byla zjišťována za podmínek popsaných v experimentální části, viz. kapitola 4.2.4. Testováním stability bylo zjištěno, že zásobní roztoky standardních látek i spikované vzorky říční vody jsou po provedení SPE stabilní a nedochází za daných podmínek k jejich degradaci. Získané hodnoty pro spikované vzorky říční vody jsou uvedeny v *Tab. 13*. Dosažení zůstatku vyššího než 100 % mohlo být způsobeno postupným odpařováním rozpouštědla, čímž došlo k zakoncentrování vzorku.

Tab. 13: Stabilita vzorků říční vody spikované směsí antibiotik.

	nominální koncentrace ($\mu\text{g/L}$)	zůstatek (%) ^x	
		krátkodobá stabilita (24h)	dlouhodobá stabilita (14 dní)
linkomycin	125	109,6	101,3
	50	102,6	101,4
tetracyklin	125	103,7	101,6
	50	99,7	99,4
doxycyklin	125	102,4	99,0
	50	96,4	98,7
klindamycin	125	107,3	99,4
	50	100,0	100,7

^xvyhodnoceno ze 3 měření

4.3.4 HPLC-MS/MS

Analýza HPLC-MS/MS vzorků říční vody spikované směsí antibiotik o koncentraci 50 ng/L byla provedena pro ověření použitelnosti SPE metody pro analýzu potenciálně přítomných koncentrací reziduálních antibiotik v povrchových vodách (desítky ng/L). Na základě analýzy standardů byla vyvinuta HPLC-MS/MS metoda, kterou byla následně detekována antibiotika ve vzorku říční vody po provedení extrakce. Analyty byly identifikovány ve spikovaném vzorku říční vody na základě jejich fragmentačních spekter. V následující *Tab. 14* jsou uvedeny sumární vzorce analytů, hodnoty m/z , retenční časy a další parametry HPLC-MS/MS analýzy. Příslušné

chromatogramy z HPLC-MS/MS analýzy, fragmentační spektra a struktury antibiotik jsou uvedeny v příloze, kapitola 6.

Tab. 14: Sumární vzorce a molekulové hmotnosti jednotlivých analytů.

analyt	sumární vzorec	m/z (M) ^{XI}	m/z (M + H) ^{+ XII}
linkomycin	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S ₁	406,2	407,22103
tetracyklin	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444,2	445,16054
klindamycin	C ₁₈ H ₃₃ Cl ₁ N ₂ O ₅ S ₁	424,2	425,18715
doxycyklin	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444,2	445,16054

^{XI}M – molekula analytu (obecné označení)

^{XII}M – molekula analytu v protonované formě

5 ZÁVĚR

V předložené práci byla vyvinuta metoda pro stanovení směsi čtyř vybraných antibiotik (linkomycin, klindamycin, doxycyklin, tetracyklin) v povrchové vodě. Metoda zahrnuje odběr a úpravu vzorků říční vody, extrakci na tuhé fázi a analýzu metodou UPLC s UV detekcí. Validací metody byla ověřena její selektivita, správnost, přesnost a byl určen limit kvantifikace (pro všechna antibiotika LLOQ = 8,0 µg/mL). Dále byla zjištěna procentuální výtěžnost metody pro jednotlivá antibiotika: pro linkomycin se hodnoty pohybují v rozmezí 89,6 - 93,3 % , pro tetracyklin 69,7 - 73,1 % , pro doxycyklin 71,5 – 77,0 % a pro klindamycin 89,7 – 92,9 %.

Přítomnost reziduálních antibiotik v povrchových vodách byla dřívějšími studii již potvrzena v Evropě či v USA, a to v koncentracích řádově desítek ng/L. Takovou koncentraci sice není možno detekovat UV detekcí, metoda UPLC je však připravená pro MS/MS detekci, kterou se podařilo zmíněné kritické koncentrace v rámci této práce stanovit.

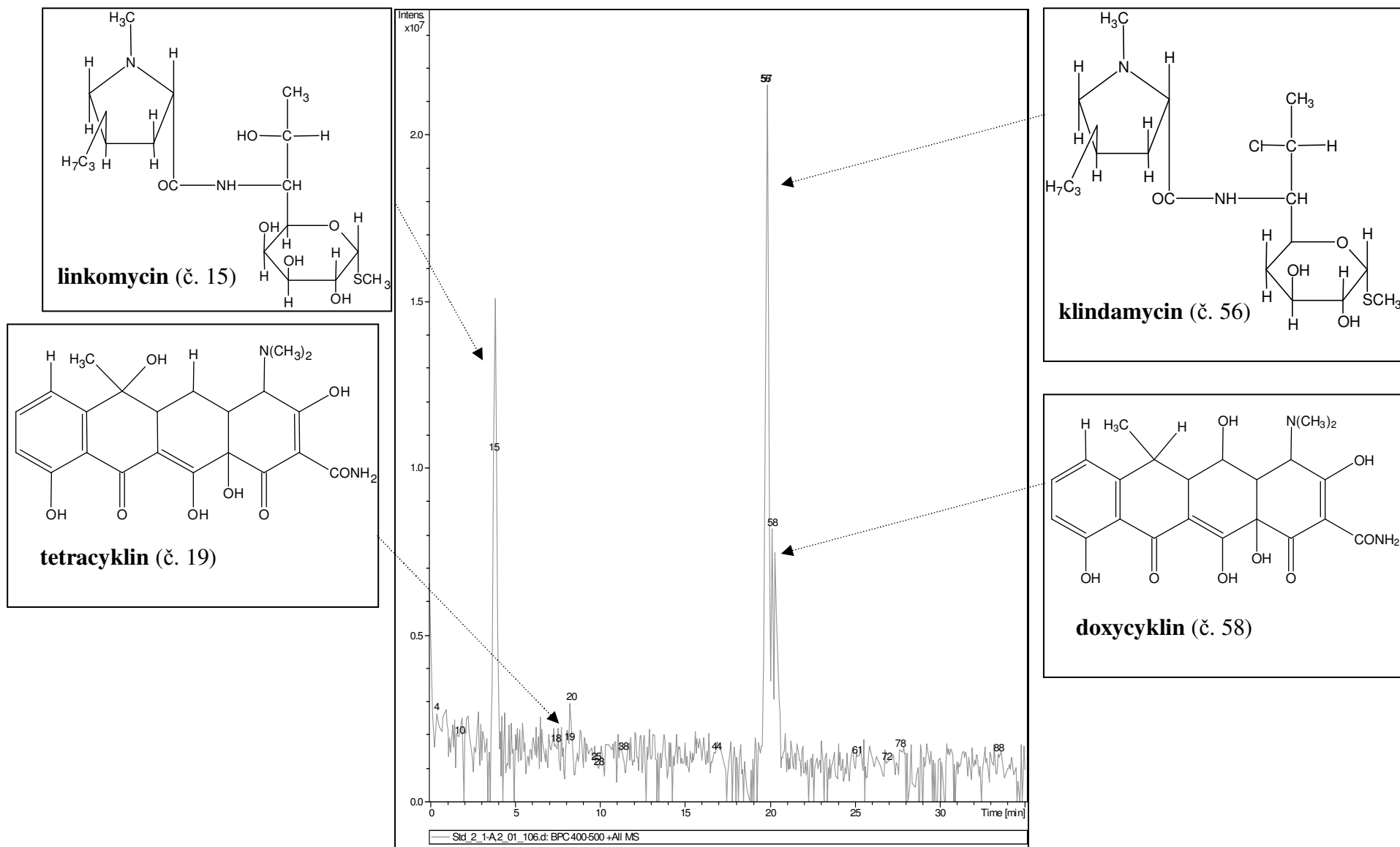
6 PŘÍLOHY

Tab. 15: Parametry HPLC-MS/MS analýzy vzorků standardů a říční vody spikované směsí antibiotik.

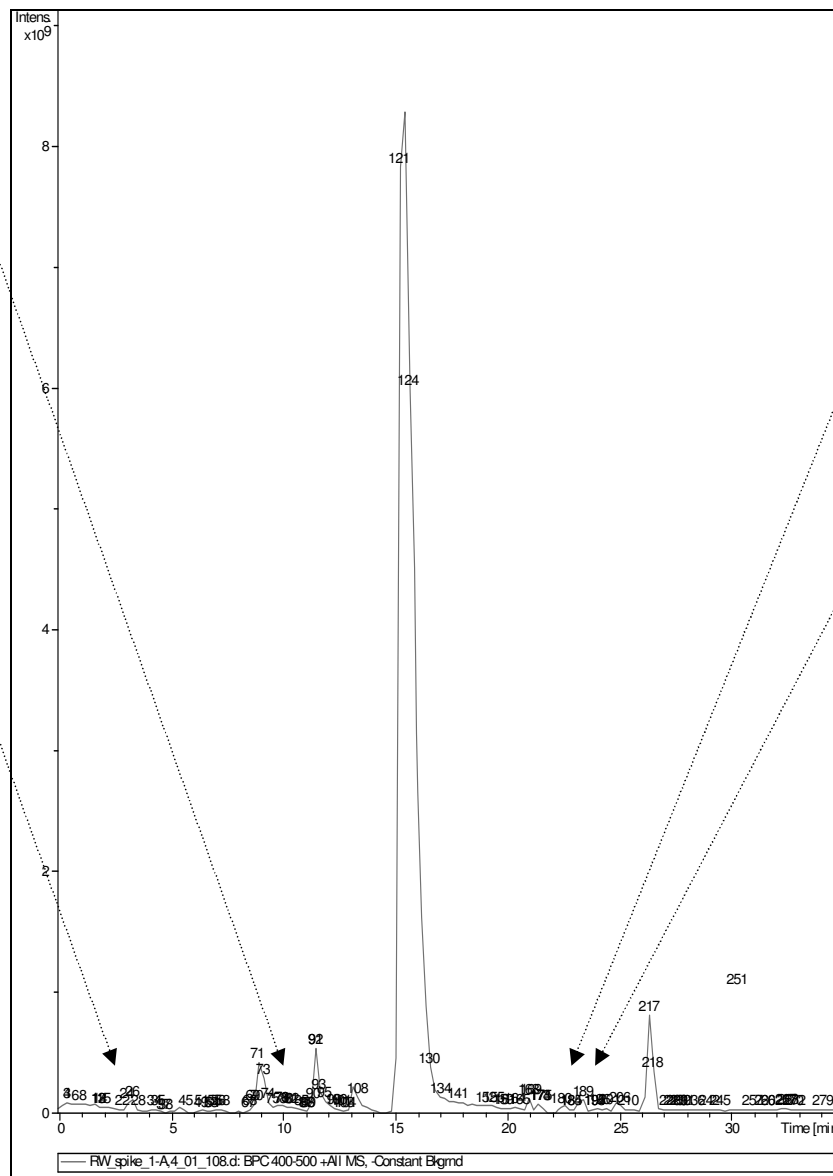
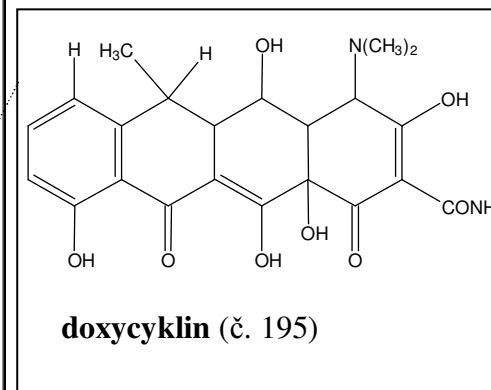
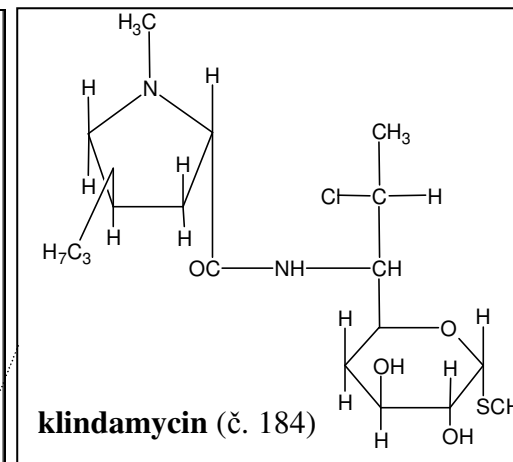
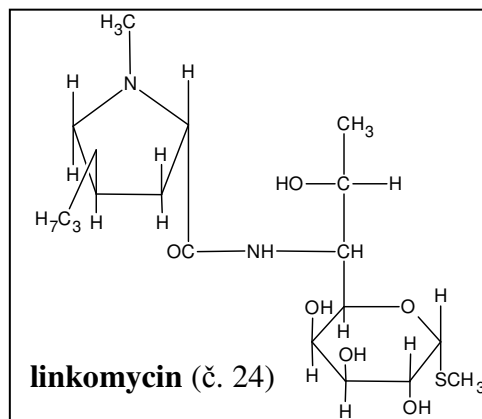
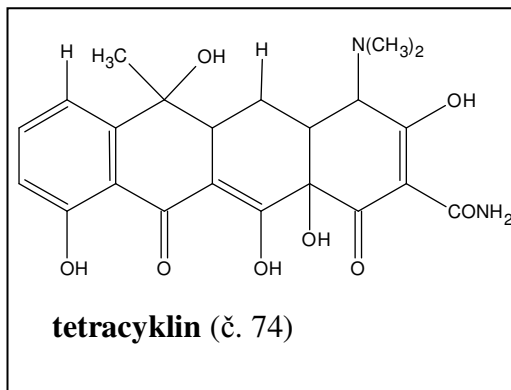
vzorek	analyt	t_R (min)	číslo komponenty v chromatogramu	správnost měření ^{XIII} (ppm)
směs std. o konc. 50 ng/L	linkomycin	3,7	15	0,0
	tetracyklin	8,1	19	0,2
	klindamycin	19,6	56	0,1
	doxycyklin	20,0	58	0,1

H₂O Vltava spike směsí ATB na konc. 50 ng/L	linkomycin	3,0	24	0,6
	tetracyklin	9,3	74	0,5
	klindamycin	22,7	184	0,7
	doxycyklin	23,8	195	0,8

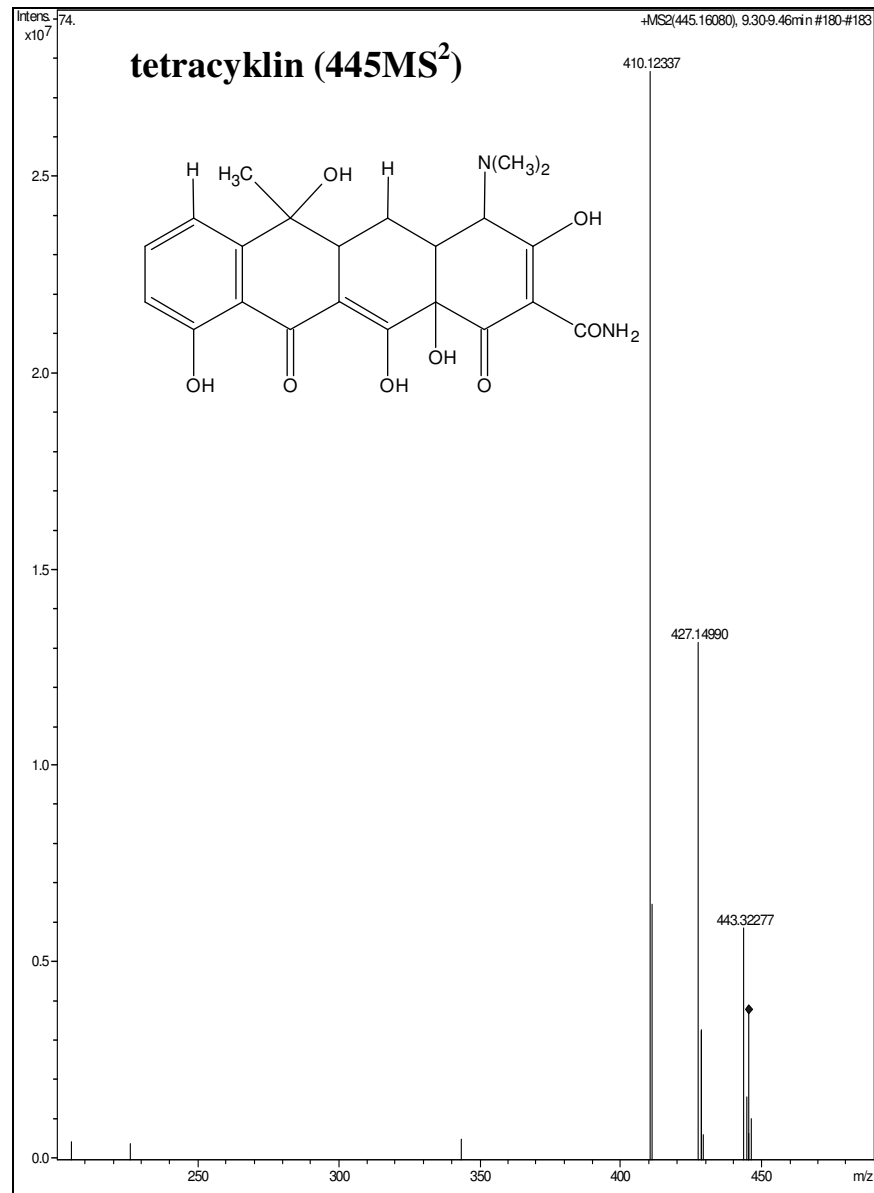
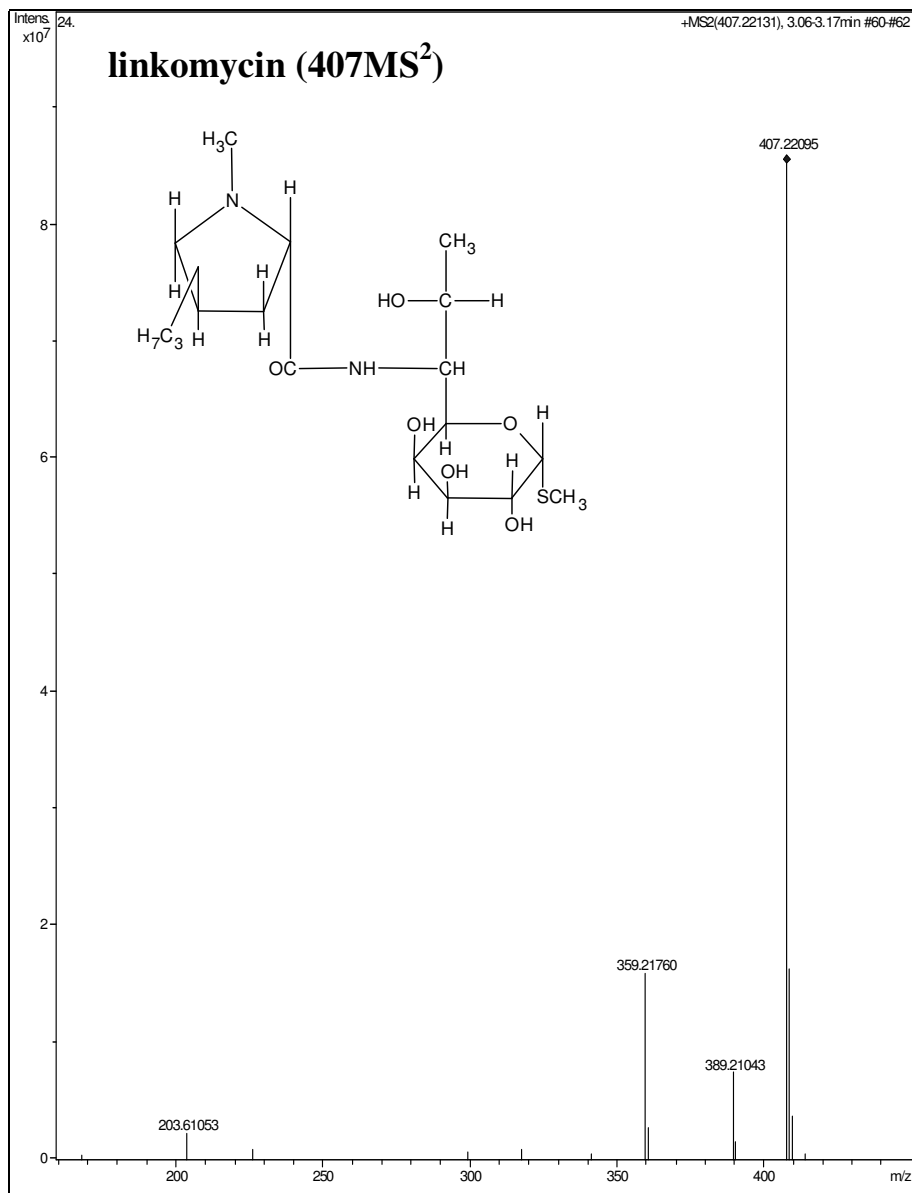
^{XIII}odchylka naměřené M_r ($M+H$)⁺ od skutečné hodnoty v jednotkách ppm



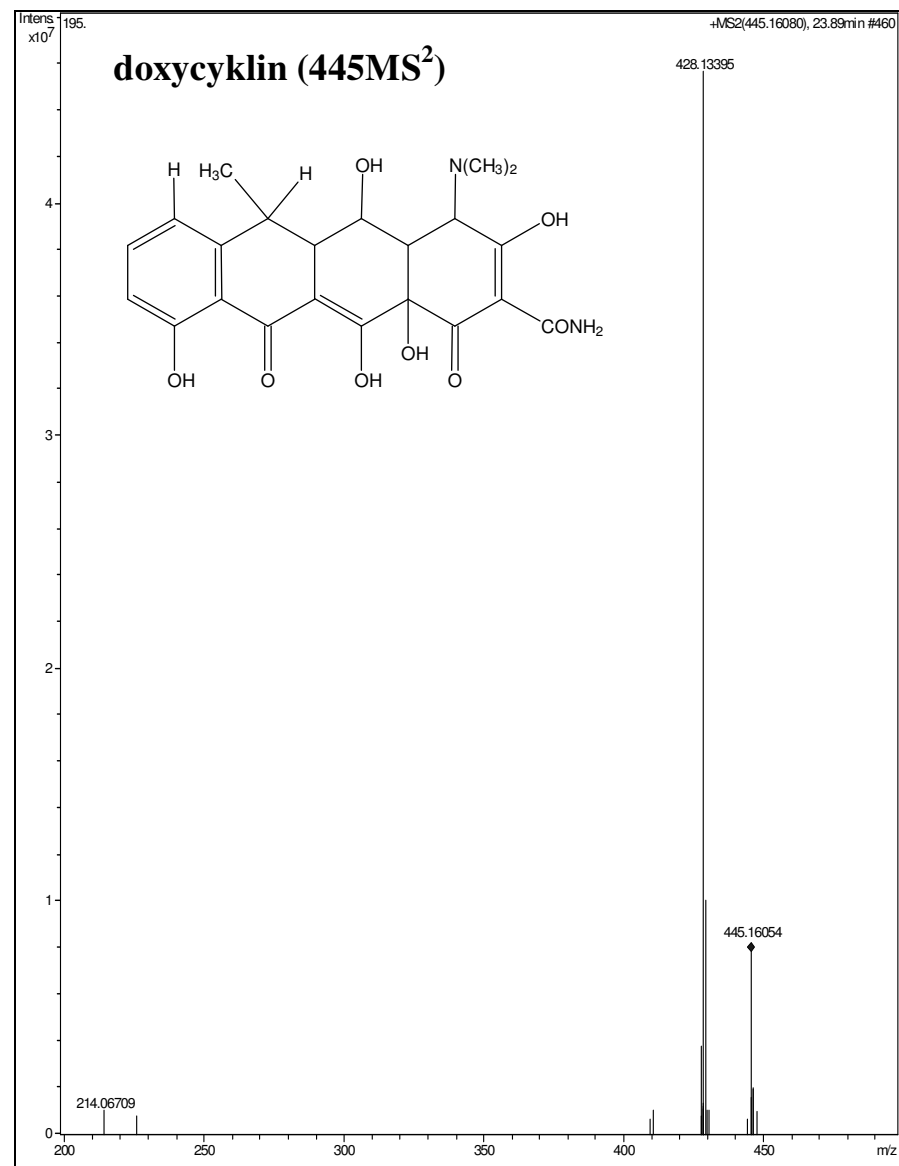
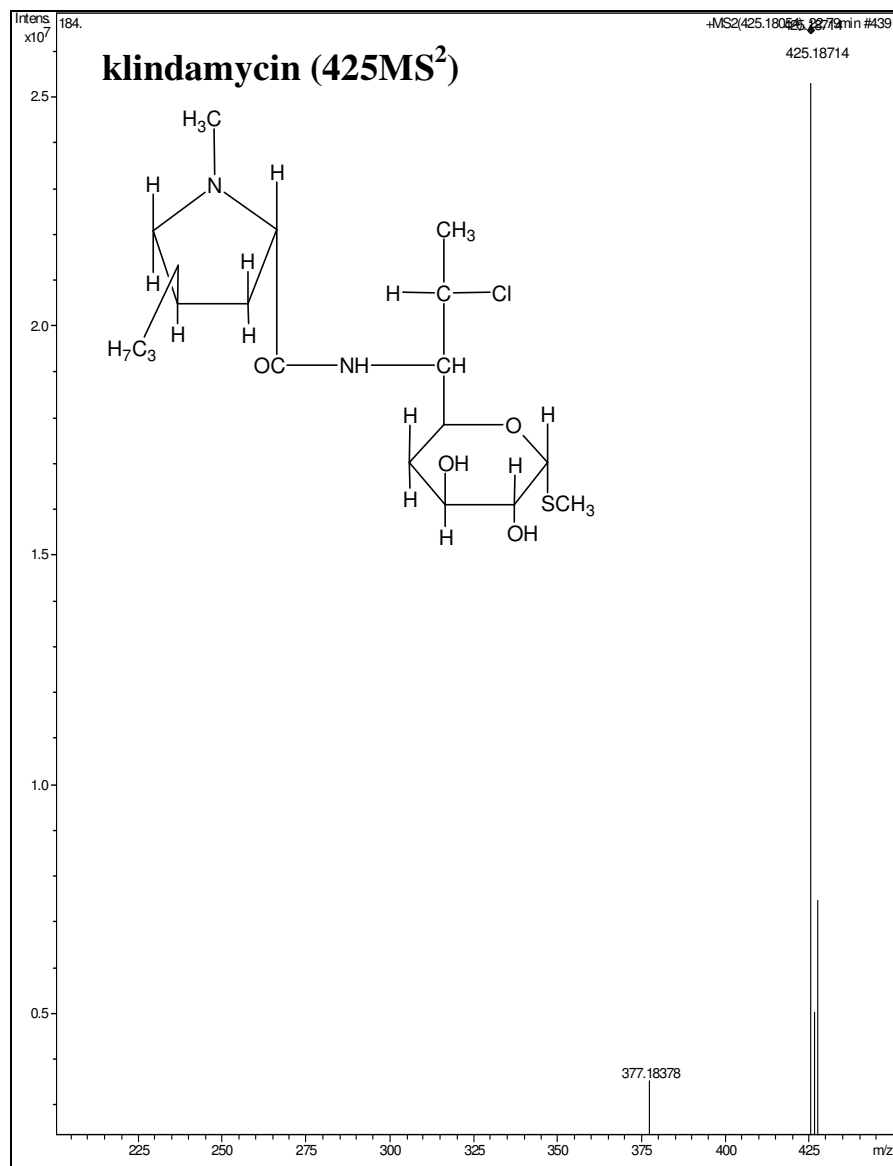
Obr. 13: HPLC-MS analýza vzorku směsi standardů o koncentraci 50 ng/mL.



Obr. 14: HPLC-MS analýza vzorku říční vody spikované směsí standardů na konečnou koncentraci 50 ng/L.



Obr. 15: Fragmentační spektra (ESI-FTMS) linkomycinu a tetracyklinu.



Obr. 16: Fragmentační spektra (ESI-FTMS) klindamycinu a doxycylinu.

7 SEZNAM LITERATURY

1. Zahradnický, J.: *Antibiotika a chemoterapeutika*, 1. vyd., Praha, SPN 1982.
2. O'Grady, F.; Lambert, H. P.; Finch, R. G.; Greenwood, D.: *Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy*, 7. vyd., New York, Churchill Livingstone 1997.
3. Martens-Lobenhoffer, J.; Banditt, P.: Sensitive and specific determination of clindamycin in human serum and bone tissue applying liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **755**, 143-149 (2001).
4. <http://www.usp.org/pdf/EN/veterinary/lincosamides.pdf> [cit. 15.2.2008].
5. Shiau-Ta, C.; Manis, J. J.; McWethey, S. J.; Patt, T. E.; Witz, D. F.; Wolf, H. J.; Wovcha, M. G.: *Fermentation, biosynthesis, and molecular genetics of linkomycin, biotechnology of industrial antibiotics*. 2. vyd., New York, Dekker 1997.
6. Cho, S. H.; Im H. T.; Park, W. S.; Ha, Y. H.; Choi, Y. W.; Lee, K. T.: Simple method for the assay of clindamycin in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detector. *Biomedical Chromatography*, **19** (10), 783-787 (2005).
7. La Follette, G.; Gambertoglio J.; White; J. A.; Khuth, D. W.; Lin, E. T.: Determination of clindamycin in plasma or serum by high-performance liquid-chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*, **431** (2), 379-388 (1998).

8. Hornedonunez, A.; Getek, T. A.; Korfmacher, W. A.; Simenthal F: High- performance liquid-chromatography of clindamycin and clindamycin phosphate with electrochemical detection. *Journal of Chromatography*, **503** (1), 217-225 (1990).
9. Martens-Lobenhoffer, J.; Banditt, P.: Sensitive and specific determination of clindamycin in human serum and bone tissue applying liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **755** (1-2), 143-149 (2001).
10. Cherlet, M.; Croubels, S.; De Backer, P.: Determination of clindamycin in animal plasma by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **31** (8), 848-853 (2002).
11. Yu, L. L.; Chao, C. K.; Liao, W. J.; Twu, T. Y.; Liu, C. M.; Yang, T. H.; Lin, E. T.: Determination of clindamycin in human plasma by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry: application to the bioequivalence study of clindamycin. *Journal of Chromatography B*, **724** (2), 287-294 (1999).
12. Targove, M. A.; Danielson, N. D.: High-performance liquid-chromatography of clindamycin antibiotics using Tris(bipyridine)-ruthenium(III) chemiluminiscence detection. *Journal of Chromatography Science*, **28** (10), 505-509 (1990).
13. Landis, J. B.; Grant, M. E.; Nelson, S. A.: Determination of clindamycin in pharmaceuticals by high-performance liquid-chromatography using ion-pair formation. *Journal of Chromatography* **202** (1), 99-106 (1980).
14. Brodasky, T. F.; Lewis, C.; Eble, T. E.: Bioautographic thin-layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in whole

- animal.1. Clindamycin in Rat. *Journal of Chromatography*, **123** (1), 33-44 (1976).
15. Thorsten, Ch.; Schneider, R. J.; Färber, H. A.; Skutlarek, D.; Goldbach, H. E.: Determination of antibiotic residues in manure, soil and surface water. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, **31** (1), 36-44 (2003).
16. Tang, H. P. O.; Ho, C.; Lai, S. S. L.: High-throughput screening for multi-class veterinary drug residues in animal muscle using liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line solid-phase extraction. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20** (17), 2565-2572 (2006).
17. Rechberger, G. N.; Fauler, G.; Windischhofer, W.; Kofeler, H.; Erwa, W.; Leis, H. J.: Quantitative analysis of clindamycin in human plasma by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry using d(1)- N-ethylclindamycin as internal standard. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17** (2), 135-139 (2003).
18. Batt, A. L.; Aga, D. S.: Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contaminatin. *Analytical Chemistry*, **77** (9), 2940-2947 (2005).
19. Olsovska, J.; Jelinkova, M.; Man, P.; Koberska, M.; Janata, J.; Flieger, M.: High-throughput quantification of lincomycin traces in fermentation broth of genetically modified *Streptomyces* spp. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, **1139** (2), 214-220 (2007).
20. Bogialli, S.; Di Corcia, A.; Lagana, A.; Mastrantoni, V.; Sergi, M.: A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolide class and lincomycin in bovine milk and yoghurt: hot water extraction followed by

- liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21** (2), 237-246 (2007).
21. Szunyog, J.; Adams, E.; Liekens, K.; Roets, E.; Hoogmartens, J.: Analysis of a formulation containing lincomycin and spectinomycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **29** (1-2), 213-220 (2002).
22. Thompson, T. S.; Noot, D. K.; Calvert, J.; Pernal, S. F.: Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1020** (2), 241-250 (2003).
23. Margosis, M.: Analysis of antibiotics by gas chromatography. I. Linkomycin. *Journal of Chromatography*, **37** (1), 46-& (1968).
24. Fang, X. M.; Liu, X. F.; Ye, J. N.; Fang, Y. Z.: Determination of lincomycin and lincomycin B in bulk drug and pharmaceutical formulations by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Analytical Letters*, **29** (11), 1975-1984 (1996).
25. Ye, Z.; Weinberg, H. S.; Meyer, M. T.: Occurrence of antibiotics in drinking water. *The Science of The Total Environment*, **225** (1-2), 109-118 (1999).
26. Krzek, J.; Kwiecien, A.; Starek, M.; Kierszniewska, A.; Rzeszutko, W.: Identification and determination of oxytetracycline, tiamulin, lincomycin, and spectinomycin in veterinary preparations by thin-layer chromatography/densitometry. *Journal of AOAC International*, **83** (6), 1502-1506 (2000).

27. Sun, X. X.; Aboul-Enein, H. Y.: Internal solid contact sensor for the determination of doxycycline hydrochloride in pharmaceutical formulation. *Talanta*, **58** (2), 387-396 (2002).
28. Ruz, N.; Zabala, M.; Kramer, M. G.; Campanero, M. A.; Dios-Vieitez, M. C.; Blanco-Prieto, M. J.: Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography - Application to particulate drug delivery systems. *Journal of Chromatography A*, **1031** (1-2), 295-301 (2004).
29. Charoenraks, T.; Chuanuwatanakul, S.; Honda, K.; Yamaguchi, Y.; Chailapakul, O.: Analysis of tetracycline antibiotics using HPLC with pulsed amperometric detection. *Analytical Science*, **21** (3), 241-245 (2005).
30. De Ruyck, H.; De Ridder, H.: Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21** (9), 1511-1520 (2007).
31. Gil, E. C.; Van Schepdael, A.; Roets, E.; Hoogmartens, J.: Analysis of doxycycline by capillary electrophoresis - Method development and validation. *Journal of chromatography A*, **895** (1-2), 43-49 (2000).
32. Van Schepdael, A.; Kibaya, R.; Roets, E.; Hoogmartens, J.: Analysis of doxycycline by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, **41** (5-6), 367-369 (1995).
33. Injac, R.; Kac, J.; Kreft, S.; Strukelj, B.: Determination of doxycycline in pharmaceuticals and human urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **387** (2), 695-701 (2007).
34. Prevosto, J. M.; Beraud, B.; Cheminel, V.; Gaillard, Y.; Mounier, C.; Chaulet, J. F.: Determination of doxycycline in human plasma and urine samples by high-

- performance liquid-chromatography–Application for drug-monitoring in malaria chemoprophylaxis. *Annales de Biologie Clinique*, **53** (1-2), 29-32 (1995).
35. Lu, H. T.; Jiang, Y.; Li, H. B.; Chen, F.; Wong, M. H.: Simultaneous determination of oxytetracycline, doxycycline, tetracycline and chlortetracycline in tetracycline antibiotics by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Chromatographia*, **60** (5-6), 259-264 (2004).
36. Granelli, K.; Branzell, C.: Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **586** (1-2), 289-295 (2007).
37. Zhang, Y. T.; Zhang, Z. J.; Sun, Y. H.: Determination of tetracyclines residues in milk using high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Acta Chimica Sinica*, **64** (24), 2461-2466 (2006).
38. Choma, I.; Grenda, D.; Malinowska, I.; Suprynowicz, Z.: Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method. *Journal of Chromatography B*, **734** (1), 7-14 (1999).
39. Choma, I.; Pilorz, K. A.: Novel application of matrix solid-phase dispersion for determination of doxycycline and flumequine residues in milk. *Journal of Chromatography & Related Technologies*, **27** (14), 2143-2151 (2004).
40. Zhao, F. N.; Zhang, X. Z.; Gan, Y. R.: Determination of tetracyclines in ovine milk by high-performance liquid chromatography with a coulometric electrode array system. *Journal of Chromatography A*, **1055** (1-2), 109-114 (2004).
41. Bajpai, A. K.; Bajpai, J.; Shukla, S.: Release dynamics of tetracycline from a loaded semi-interpenetrating polymeric material of polyvinyl alcohol and poly(acrylamide-co-styrene). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **14** (4), 347-357 (2003).

42. Samanidou, V. F.; Nikolaidou, K. I.; Papadoyannis, L. N.: Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Journal of Separation Science*, **30** (15), 2430-2439 (2007).
43. Samanidou, V. F.; Nikolaidou, K. I.; Papadoyannis, L. N.: Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. *Journal of Separation Science*, **28** (17), 2247-2258 (2005).
44. Casado-Terrones, S.; Segura-Carretero, A.; Busi, S.; Dinelli, G.; Fernandez-Gutierrez, A.: Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection. *Electrophoresis*, **28** (16), 2882-2887 (2007).
45. Pena, A.; Pelantova, N.; Lino, C. M.; Silveira, M. I. N.; Solich, P.: Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (10), 3784-3788 (2005).
46. Liu, Y.; Xu, J. Z.; Ding, T.; Li, G. H.: Determination of tetracyclines in honey using liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Chinese Journal of Chemistry*, **25** (9), 1294-1299 (2007).
47. Xiong, Y.; Zhou, H. J.; Zhang, Z. J.; He, D. Y.; He, C.: Molecularly imprinted on-line solid-phase extraction combined with flow-injection chemiluminescence for the determination of tetracycline. *Analyst*, **131** (7), 829-834 (2006).

-
48. De Ruyck, H.; De Ridder, H.; Van Renterghem, R.; Van Wambeke, F.: Validation of HPLC method of analysis of tetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to a feeding trial. *Food Additives and Contaminants*, **16** (2), 47-56 (1999).
49. Petkovska, E.; Slaveska-Raicki, R.; Rafajlovska, V.: Determination of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline in milk by TLC and column chromatography using Amberlite XAD-2. *Chemia Analityczna*, **51** (2), 275-283 (2006).
50. Yang, S. W.; Cha, J.; Carlson, K.: Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18** (18), 2131-2145 (2004).
51. <http://www.noah.co.uk/issues/briefingdoc/11-abres.htm> [cit. 7.4.2008].
52. Progress Report on Antimicrobial Resistance:
www.fedesa.be/topics/antibio/ppt/visby.ppt , FEDESA, 2001 [cit. 15.3.2008].

Poděkování

Závěrem bych ráda poděkovala RNDr. Miroslavu Fliegerovi, CSc. a RNDr. Janě Olšovské, Ph.D. z MBÚ AV ČR za vedení při práci na zadaném tématu, za užitečné rady, pomoc a trpělivost, za vytvoření dobrých pracovních podmínek i příjemné atmosféry. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Petru Novákovi, Ph.D. z MBÚ AV ČR za rady, měření a interpretaci MS spekter a Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za vedení a pomoc. Můj dík patří i mým kolegům z laboratoře, hlavně Zdeňkovi Kameníkovi a Zdeňce Křesinové, za silnou morální podporu.

Hlavně však děkuji své rodině a svým blízkým za podporu a pomoc nejen při zpracovávání této práce, ale také během celého studia.

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR (projekt č. 1M06011)