

Optimalizace metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrickou detekcí pro analýzu tetracyklinových antibiotik ve vybraných matricích

Bc. Tomáš Šopík

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tomáš Šopík**
Osobní číslo: **T13971**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Optimalizace metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí pro analýzu tetracyklinových antibiotik ve vybraných matricích**

Zásady pro vypracování:

1. Zpracovat literární rešerši na téma stanovení tetracyklinových antibiotik, z matrice živočišného původu, metodou kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí.
2. Optimalizovat a validovat metodu UPLC-MS/MS pro stanovení tetracyklinu, chlortetracyklinu hydrochloridu, doxycyklinu hydrochloridu a oxytetracyklinu hydrochloridu.
3. Danou metodu aplikovat na stanovení možných reálných vzorků.
4. Obdržené výsledky zpracovat a interpretovat v diplomové práci.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Odborné vědecké články (Web of Science, PUBMED), odborná vědecká literatura.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Lucie Vydrová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2015

Ve Zlíně dne 10. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Šopík Tomáš

Obor: Inženýrství ochrany životního prostředí

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně
15.5.2015

.....
Šopík Tomáš

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce požít na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V této diplomové práci byla vytvořena multireziduální metoda stanovení tetracyklinu, chlortetracyklinu hydrochloridu, oxytetracyklinu hydrochloridu a doxycyklinu hydrochloridu v mléce pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí (UPLC-MS/MS).

Pro izolaci vybraných reziduí z matrice (mléka) byla použita kapalinová extrakce s kyselinou trichloroctovou a McIlvainovým pufrům. Vzorek byl centrifugován a supernatant byl přečištěn použitím extrakce pevnou fází (SPE) s kolonkami OASIS[®] HLB.

Vzorky byly analyzovány pomocí UPLC-ESI-MS/MS v módu skenování více fragmentových hmot (MRM). UPLC separace byla provedena na koloně C18 (3 x 50 mm, 1,8 μm) s reverzní fází za použití gradientové eluce mobilní fází sestávající se z acetonitrilu a 20 mM kyseliny mravenčí. K detekci tetracyklinových antibiotik byl využit kvadrupólový hmotnostní spektrometr, přičemž ionizace byla prováděna elektrosprejem v pozitivním módu. Konfirmační metoda má přijatelné detekční limity a vybrané tetracykliny mohou být detekovány v koncentraci reziduí mezi 3,40-11,50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Metoda je validována v souladu s Evropskými požadavky na veterinární rezidua léčiv podle rozhodnutí komise 2002/657/ES. Výtěžnosti tetracyklinů v mléce byly v rozmezí od 80,2 do 93,8 % s relativní směrodatnou odchylkou ne větší než 7,3 % pro koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Stabilita tetracyklinů byla kontrolována za různých podmínek skladování při -8, +4 a +20 °C (a to jak za přístupu tak nepřístupu světla). Ve skutečnosti, tetracykliny nejsou stabilní molekuly a jejich epimerizace byla také hodnocena v této práci.

Klíčová slova: environmentální analýza, tetracyklinová antibiotika, rezidua, extrakce SPE, ultraúčinná kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie, UPLC-MS/MS

ABSTRACT

A Ultra Performance Liquid Chromatography/tandem mass spectrometric (UPLC-MS/MS) multiresidue method for the simultaneous quantitative determination of tetracycline, chlortetracycline hydrochloride, oxytetracycline hydrochloride and doxycycline hydrochloride in milk has been in this Master's thesis developed.

For the isolation of the selected residues from the matrix (milk) was used liquid extraction with trichloroacetic acid and McIlvaine buffer. The sample was centrifuged and solid-phase extraction (SPE) with an OASIS[®] HLB column was used to clean up the sample extracts.

The samples were analysed by UPLC-ESI-MS/MS with instrument operated in Multiple Reaction Monitoring (MRM) acquisition mode. The UPLC separation was performed on a reversed-phase C18 (3 x 50 mm, 1,8 µm) column using gradient elution with a mobile phase consisting of acetonitrile and 20 mM formic acid. The tetracycline analytes were detected with a quadrupole mass spectrometer using positive ion electrospray ionisation. The confirmatory method has acceptable detection limits and the choicely selected tetracyclines can be detected at a residue concentration between 3,40 and 11,50 µg·l⁻¹.

The method is validated according to the European requirements for veterinary drug residues according to commission decision 2002/657/ES. The recovery of tetracyclines from milk ranged from 80,2 to 93,8 % with relative standard deviations no larger than 7,3 % for concentration 100 µg·l⁻¹.

The stability of tetracyclines was checked under various storage conditions at -8, +4 and +20 °C (both under dark and light exposures). Indeed, tetracyclines are not stable molecules and the epimerization phenomenon was evaluated in this work.

Keywords: environmental analysis, tetracyclines antibiotic, residues, extractions SPE, Ultra-High Performance Liquid Chromatography, Tandem Mass Spectrometry, UPLC-MS/MS

Rád bych poděkoval vedoucí své diplomové práce Ing. Lucii Vydrové, Ph.D. za ochotu, čas a odborné vedení při zpracování této diplomové práce.

Také bych rád poděkoval řediteli Ústavu technologie potravin doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za ochotu a čas, jenž mi věnoval, a také za poskytnutý spotřební materiál.

Rád bych poděkoval i Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové za umožnění využití prostorů laboratoře na pavilonu U3, odborné rady a pomoc v laboratoři.

Motto:

Any sufficiently advanced technology is indistinguishable from magic.

Sir Arthur Charles Clark.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně 15.5.2015

.....

podpis

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 12 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 13 |
| 1 ANTIBIOTIKA | 14 |
| 1.1 AKTINOBAKTERIE | 14 |
| 1.1.1 Streptomycety | 14 |
| 1.2 DĚLENÍ ANTIBIOTIK..... | 14 |
| 1.3 ÚČINEK ANTIBIOTIK | 15 |
| 1.3.1 Spektrum účinku | 15 |
| 1.4 MECHANISMUS ÚČINKU..... | 15 |
| 1.5 TETRACYKLINOVÁ ANTIBIOTIKA | 16 |
| 1.5.1 Historie | 16 |
| 1.5.2 Vlastnosti..... | 16 |
| 1.5.3 Komplexační vlastnosti..... | 17 |
| 1.5.4 Syntéza | 18 |
| 1.5.5 Mechanismus působení | 18 |
| 1.5.6 Spektrum účinku | 18 |
| 1.5.7 Rezistence na tetracykliny..... | 19 |
| 1.5.7.1 Snížená intracelulární akumulace | 19 |
| 1.5.7.2 Ribozomální ochranné proteiny..... | 19 |
| 1.5.7.3 Enzymatická inaktivace tetracyklinu | 19 |
| 1.5.7.4 Změna cílového místa..... | 20 |
| 1.5.8 Toxicita | 20 |
| 1.5.9 Rozdělení tetracyklinů | 20 |
| 1.5.9.1 Chlortetracyklin | 21 |
| 1.5.9.2 Oxytetracyklin | 22 |
| 1.5.9.3 Tetracyklin | 22 |
| 1.5.9.4 Demeklocyklin..... | 23 |
| 1.5.9.5 Rolitetracyklin | 24 |
| 1.5.9.6 Lymecyklin | 25 |
| 1.5.9.7 Klomocyklin | 25 |
| 1.5.9.8 Metacyklin | 26 |
| 1.5.9.9 Doxycyklin..... | 27 |
| 1.5.9.10 Minocyklin | 27 |
| 1.5.10 Koloběh tetracyklinů v životním prostředí | 28 |
| 2 ANALYTICKÝ POSTUP STANOVENÍ TETRACYKLINŮ | 30 |
| 2.1 ODBĚR VZORKU A JEHO ÚPRAVA | 30 |
| 2.2 EXTRAKCE | 35 |
| 2.2.1 Extrakce pevnou fází..... | 35 |
| 2.2.2 Afinitní chromatografie..... | 37 |
| 2.3 SEPARACE ANALYTU | 38 |
| 2.3.1 Kapalinová chromatografie..... | 38 |
| 2.3.1.1 Instrumentace..... | 38 |
| 2.3.1.2 Pumpy | 39 |
| 2.3.1.3 Dávkovací zařízení | 39 |
| 2.3.1.4 Analytická kolona | 39 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.3.1.5 | Teplota kolony | 41 |
| 2.3.1.6 | Mobilní fáze | 41 |
| 2.3.1.7 | Průtoková rychlost | 42 |
| 2.3.1.8 | Detektor | 42 |
| 2.3.1.9 | Chromatogram | 42 |
| 2.3.2 | Kapilární elektroforéza..... | 43 |
| 2.4 | DETEKCE TETRACYKLINOVÝCH ANTIBIOTIK..... | 44 |
| 2.5 | HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE..... | 46 |
| 2.5.1 | Instrumentace | 46 |
| 2.5.2 | Iontové zdroje..... | 46 |
| 2.5.2.1 | Chemická ionizace za atmosférického tlaku..... | 47 |
| 2.5.2.2 | Elektrosprej | 48 |
| 2.5.2.3 | Fotoionizace za atmosférického tlaku..... | 48 |
| 2.5.3 | Hmotnostní analyzátory | 49 |
| 2.5.3.1 | Kvadrupólový analyzátor..... | 49 |
| 2.5.3.2 | Iontová past..... | 50 |
| 2.5.3.3 | Průletový analyzátor | 51 |
| 2.5.3.4 | Tandemová hmotnostní spektrometrie..... | 52 |
| 2.5.4 | Detektor Iontů | 53 |
| 2.5.5 | Hmotnostní spektrum | 53 |
| II | PRAKTICKÁ ČÁST | 54 |
| 3 | CÍLE PRÁCE | 55 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 56 |
| 4.1 | POUŽITÉ PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A SOFTWARE..... | 56 |
| 4.1.1 | UPLC-MS/MS systém pro analýzu..... | 56 |
| 4.1.2 | Zařízení a materiál použitý pro extrakci vzorků | 56 |
| 4.1.3 | Použité chemikálie | 56 |
| 4.1.4 | Použité standardy | 57 |
| 4.1.5 | Software použitý pro zpracování a prezentaci dat | 57 |
| 4.2 | PRACOVNÍ POSTUPY | 58 |
| 4.2.1 | Příprava roztoků pro extrakci tetracyklinů z mléka | 58 |
| 4.2.2 | Příprava standardů..... | 58 |
| 4.2.3 | Příprava vzorků a izolace analytů | 59 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUZE..... | 60 |
| 5.1 | OPTIMALIZACE HMOTNOSTNÍ DETEKCE PRO VYBRANÉ TETRACYKLINY..... | 60 |
| 5.1.1 | Optimalizace stanovení Tetracyklinu..... | 62 |
| 5.1.1.1 | Pozitivní ionizace..... | 62 |
| 5.1.1.2 | Negativní ionizace | 66 |
| 5.1.2 | Optimalizace stanovení Chlortetracyklinu | 67 |
| 5.1.2.1 | Pozitivní ionizace..... | 67 |
| 5.1.2.2 | Negativní ionizace | 69 |
| 5.1.3 | Optimalizace stanovení Oxytetracyklinu | 70 |
| 5.1.3.1 | Pozitivní ionizace..... | 70 |
| 5.1.3.2 | Negativní ionizace | 72 |
| 5.1.4 | Optimalizace stanovení Doxycyklinu | 73 |
| 5.1.4.1 | Pozitivní ionizace..... | 73 |
| 5.1.4.2 | Negativní ionizace | 75 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 5.1.5 | Tandemová hmotnostní spektrometrie | 76 |
| 5.2 | OPTIMALIZACE KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE PRO VYBRANÉ TETRACYKLINY | 81 |
| 5.2.1 | Výběr mobilní fáze..... | 81 |
| 5.2.2 | Optimalizace teploty analytické kolony..... | 81 |
| 5.2.3 | Optimalizace elučního gradientu..... | 82 |
| 5.2.4 | Optimalizace průtoku mobilní fáze..... | 84 |
| 5.2.5 | Optimalizace teploty iontového zdroje | 87 |
| 5.3 | KALIBRACE | 88 |
| 5.4 | STABILITA ROZTOKŮ TETRACYKLINŮ | 91 |
| 5.4.1 | Tvorba 4-epitetracyklinů | 91 |
| 5.4.2 | Tvorba degradačních produktů | 95 |
| 6 | ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ | 96 |
| 6.1 | OPTIMALIZACE EXTRAKCE | 96 |
| 6.1.1 | Výtěžnost Extrakce | 98 |
| | ZÁVĚR | 103 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 105 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ | 121 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 126 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 128 |
| | SEZNAM PŘÍLOH..... | 130 |

ÚVOD

Farmaka jsou dnes považována za moderní environmentální polutanty. Mezi nejčastěji monitorovaná léčiva patří protizánětlivé léky, analgetika, steroidní hormony a antibiotika. Přítomnost antibiotik v prostředí v nízkých koncentracích po dlouhou dobu, představuje riziko toxicity nejen pro člověka, ale také pro mikroorganismy a řasy. Bakteriální rezistence je další závažný problém. Mezi antibiotika patří například tetracyklinová antibiotika.

Tetracykliny jsou širokospektrální antibiotika používaná u lidí a ve veterinárním lékařství pro léčbu infekčních chorob. Do životního prostředí tato farmaka pronikají v průběhu jejich průmyslové výroby, která neustále roste, následně při používání v domácnostech, nemocnicích, veterinárních klinikách a farmách, kde jsou přidávána do krmiv. Jejich nadužívání v zájmu ochrany zdraví lidí a zvířat vede k jejich vylučování z organismu stolicí a močí v jejich původní formě anebo jako jejich primární metabolity. Tímto se dostávají přímo do environmentu, nebo putují až do čistírny odpadních vod (ČOV). Většina ČOV, ale není schopna účinně odstranit tetracykliny, stejně tak jako ostatní farmaka, a proto je potřeba vyvinout alternativní postupy k jejich odstranění z vody. Jejich rezidua proto nacházíme jak v matricích biologického, tak anorganického původu.

Pro stanovení tetracyklinových antibiotik lze použít několik specifických metod, lišících se náročností a přístrojovým vybavením. Je ovšem potřeba, aby tyto analytické metody byly schopné detekovat velmi nízké koncentrace. Pro jejich separaci po přečištění a zakoncentrování z různorodých matric se nejčastěji využívá metod kapilární elektroforézy a kapalinové chromatografie. K detekci se nejčastěji používají fluorescenční detektory a hmotnostní spektrometry. Univerzální a velmi citlivou metodou, v praxi nejčastěji používanou, je spojení vysoceúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ANTIBIOTIKA

Antibiotika jsou „chemické látky mikrobiálního původu mající schopnost zabíjet nebo omezovat v růstu bakterie a jiné mikroorganismy“^[1]. Takto prvně definoval antibiotika v roce 1945 Americký profesor, mikrobiolog na Univerzitě Rutgers Dr. Selman Abraham Waksman (1888-1973).^[1-3] Dnes jsou antibiotika definována jako přírodní sloučeniny produkovaná hlavně mikroorganismy anebo sloučeniny, získané chemickou nebo mikrobiologickou modifikací přírodních sloučenin.

Antibiotika jsou považována z fyziologického hlediska za tzv. sekundární metabolity, které produkují hlavně bakterie, plísně a aktinomycety.^[2]

1.1 Aktinobakterie

Aktinomycety (*Actinobacteria*) jsou významným kmenem skupiny Gram pozitivních bakterií, které mají schopnost tvořit mycelium a rozmnožovat se sporama.^[4, 5] Jsou chemoorganotrofní, fakultativně anaerobní a metabolismus mají převážně fermentativní.^[6] Do skupiny aktinomycet náleží např. čeledi: *Actinomycetaceae*, *Actinoplanaceae*, *Dermatophilaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae* a *Streptomyetaceae*.^[2, 7]

1.1.1 Streptomycety

Streptomyces je rod aerobních heterotrofních bakterií, které jsou nejvýznamnějšími producenty antibiotik a současně i velmi důležitými půdními mikroorganismy.^[2] *Streptomyces* produkují např. erythromycin, oxytetracyklin, aminomycin, rodomycin, streptomycin, penicillin a další farmaka.^[4, 6, 8, 9] Tetracykliny mohou být snadno a levně izolovány fermentací.^[3]

1.2 Dělení antibiotik

Antibiotika dělíme podle jejich chemické struktury do několika skupin. Jejich molekuly obsahují aminokyseliny, D-enantiomery nekódovaných aminokyselin, sacharidy a jejich deriváty, steroidní skelet, purinové a pyrimidinové nukleosidy. Rozlišujeme tedy antibiotika betalaktamová, amfenikolová, tetracyklinová, aminoglykosidová, makrolidová, linkosamidová, polypeptidová, glykopeptidová a ostatní.^[10] Dále můžeme antibiotika dělit podle jejich účinku.

1.3 Účinek antibiotik

Rozlišujeme dvojí účinek antibiotik:^[2, 10-12]

- a) bakteriostatický - antibiotika svým působením inhibují růst mikroorganismů a jejich terapeutická účinnost závisí na spoluúčasti obranných mechanismů organismu,
- b) bakteriocidní - antibiotika mají takový účinek, který bakterie přímo usmrcuje.

1.3.1 Spektrum účinku

Souhrn mikroorganismů, na které dané antibiotikum svými účinky negativně působí, se nazývá spektrum jeho účinnosti. Rozlišujeme látky s úzkým, rozšířeným a širokým spektrem účinku.^[2, 10, 13]

1.4 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku antibiotik je různý a liší se podle skladby a velikosti molekuly antimikrobní látky, přičemž látky se stejnou strukturou mají identický způsob účinku. Antibiotikum se váže na citlivé místo v buňce, označované jako cílová struktura a tím jí zabraňuje v její funkci. Rozlišujeme tyto mechanismy účinku: syntéza buněčné stěny^[2, 4, 6, 10, 12-18], bílkovin^[2, 4, 6, 10, 12-18] a nukleových kyselin^[2, 4, 6, 10, 12-18], poškozování integrity cytoplazmatické membrány^[2, 4, 6, 10, 12-16] a inhibice syntézy kyseliny listové.^[10, 12, 15, 16]

Inhibičním mechanismem syntézy buněčné stěny účinkují β -laktamová, glykopeptidová antibiotika, aj., která se vážou na enzymy syntetizující peptidoglykan buněčné stěny. Buňky s poškozenou buněčnou stěnou jsou neschopné odolávat osmotickému tlaku a následně lyzují.

- např.: penicilin, vankomycin a cykloserin

Při biosyntéze bílkovin zasahují antibiotika svým účinkem nejčastěji při procesu translace, a to ve fázi elongace. Místem účinku jsou zpravidla ribozomy, u nichž dochází k vazbě antibiotik buďto na podjednotky 30S nebo 50S.

- např.: tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, linkosamidy, diterpeny, aminocyklitoly a amfenikoly

Syntézu nukleových kyselin inhibují chinolony a účinnější fluorchinolony. Jejich účinek spočívá v navázání se na gyrázu a topoizomerázu IV, které se podílejí na syntéze DNA.

- inhibitory RNA-polymerázy; např. ansamyciny a rifamycin
- inhibitory DNA-gyrázy; např. aminoglykosidy, chinolony, novobiocin, ciprofloxacin, norfloxacin a nalidixová kyselina

Při mechanismu poškozování integrity cytoplazmatické membrány projdou molekuly antibiotik mureinovou vrstvou, naruší danou membránu a cytoplazma začne unikat ven z bakteriální buňky, která následně hyne.

- např.: polymyxiny, azoly, tyrocidin a gramicidin

Kyselina listová je nezbytná pro biochemické reakce v buňce, zejména při tvorbě nukleových kyselin. Inhibicí její produkce se bakterie dále nemohou množit.

- např.: sulfonamidy a trimethoprim

1.5 Tetracyklinová antibiotika

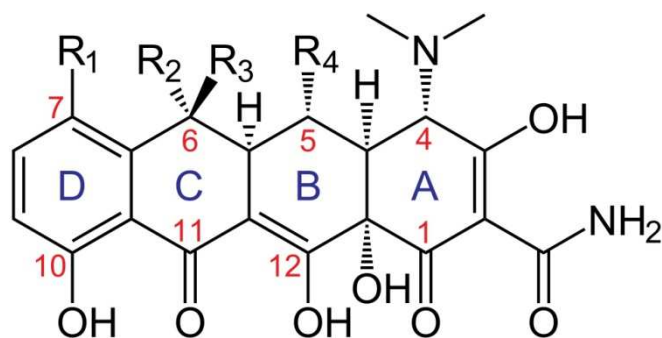
Zkráceně tetracykliny, představují velkou skupinu látek se společnou základní strukturou a společným širokým spektrem účinnosti. Působí primárně bakteriostaticky proti intracelulárním gramnegativním a grampozitivním bakteriím.^[3, 14, 16, 19-25] Tetracykliny snadno pronikají do tělesných tkání, a proto mohou působit proti případným patogenům.^[19] Tetracykliny první generace jsou metabolickými produkty rodu bakterií *Streptomyces*, druhé generace jsou již semisyntetické látky od nich odvozené.

1.5.1 Historie

Zásadní objevy v oblasti tetracyklinových antibiotik spadají do období let 1948 až 1954. První známý tetracyklin byl objeven Benjaminem Duggarem, který studoval mikroorganismus *Streptomyces aureofaciens*. Tento mikrob vylučoval zlatavě zbarvenou látku, která měla antibiotické vlastnosti. Tuto látku, antibiotikum, nazval aureomycin, dnes známé jako chlortetracyklin. Z příbuzného mikroorganismu *S. rimosus* byl o několik let později izolován oxytetracyklin a o něco později byl ze *S. aureofaciens* získán tetracyklin.^[26-28]

1.5.2 Vlastnosti

Z chemického hlediska mají tetracykliny hydronaftacenovou kostru, tj. tato antibiotika mají ve své molekule 4 vzájemně spojené šestičlenné kruhy s různými substituenty, jako jsou -H, -OH a -CH₃.^[2, 17]

Obr. 1 Obecná struktura tetracyklinů^[29]

Z obecné struktury tetracyklinů uvedené na Obr. 1, můžeme pozorovat poměrně složité stereochemické uspořádání molekul, které obsahuje až 6 chirálních center na uhlících 4, 4a, 5, 5a, 6 a 12a.^[3]

Ve vodném prostředí může za určitých okolností docházet k negativním změnám ve struktuře těchto látek. Mohou vytvářet epitetracykliny, které jsou jejich analoga s jiným prostorovým uspořádáním. Jsou-li tetracykliny, v silně kyselém prostředí, dochází ke vzniku anhydrotetracyklinů, α -apotetracyklinu a β -apotetracyklinů. Ke vzniku isotetracyklinů a ketotetracyklinů dochází v zásaditém prostředí.^[30, 31]

Volné tetracykliny jsou žluté, na světlo citlivé, krystalické amfoterní látky hořké chuti. Barevnost jim uděluje chromoforní uspořádání na C1–C4 a C7–C12 uhlíku. Mohou tvořit soli s bázemi i kyselinami díky svému amfoternímu charakteru, ten je dán přítomností kyselých fenolických, enolických skupin a bazické dimethylamino skupiny. Rozpustnost je největší v alkoholech (methanol a ethanol), a dalších organických rozpouštědlech (ethylacetát, aceton a acetonitril).^[32] Mají nízkou rozpustnost ve vodě, lépe jsou rozpustné ve formě hydrochloridů.^[30] Tyto roztoky jsou kyselé, při silně kyselém pH jsou nejstálejší (výjimka chlortetracyklin) a v alkalické oblasti se poměrně rychle inaktivují.^[17, 20]

Tetracykliny mají tři disociační konstanty odpovídající přítomnosti hydroxylové skupiny v poloze 3 ($pK_a \approx 3,3$), dimethylamino skupiny v poloze 4 ($pK_a \approx 7,5$) a hydroxylové skupiny v pozici 12 ($pK_a \approx 9,4$).^[30, 32]

1.5.3 Komplexační vlastnosti

Tetracykliny vytvářejí stabilní nerozpustné komplexy s vícemocnými kationty (např. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$), čímž se inaktivují.^[20, 21] V krevní plazmě se pohybují jako cheláty kovových iontů, hlavně Ca^{2+} a Mg^{2+} , čímž mohou sloužit jako sekundární přenašeče

a ovlivňovat procesy v buňce (sekrece procesů, aktivace receptoru, inhibice buněčného dělení a metabolické reakce). Tvoří lipofilní komplexy, ionofory.^[33] Tato chelatační vlastnost může nepříznivě ovlivnit jejich absorpci a bakteriální účinek.^[17, 20, 21, 30, 34, 35]

1.5.4 Syntéza

Biosyntéza tetracyklinových antibiotik vychází z acetyl-CoA přes malonyl-CoA a jejich úplnou syntézu popsal R. B. Woodward se spolupracovníky.^[36-38] Laboratorní syntéza si vyžádala nemalé úsilí, právě díky jejich chemické strukturální složitosti. Je známa příprava tetracyklinu z D-glukosaminu, obsahující 34 kroků, která má ale pouze 0,002 % výnos. Lepší výnos, 1,1 %, lze dosáhnout syntézou z kyseliny benzoové v 17 krocích.^[39] Dnes jsou tetracykliny produkovány výhradně biotechnologickou cestou produkce.

1.5.5 Mechanismus působení

Tetracykliny pronikají do mikrobů difúzí přes buněčnou stěnu a přes cytoplazmatickou membránu se do bakteriální buňky dostávají aktivním transportem.^[14, 20] Po vstupu do buňky se tetracykliny reverzibilně navážou na receptor 30S podjednotky bakteriálního ribozomu. Jejich účinek spočívá v potlačení syntézy bílkovin inhibicí vazby aminoacyl-tRNA na akceptorové místo komplexu mRNA + ribozom.^[3, 9, 17, 20, 24, 26, 28, 37, 40-45] Dochází také k narušení tvorby polyribosomů.^[6] Tímto zabraňují připojení aminokyseliny na rostoucí peptid a znemožňují veškerý chod bakteriální buňky. Jedná se o tzv. bakteriostatická antibiotika nezávislá na koncentraci, nýbrž na čase expozice.^[17, 43] Tetracykliny mají při delším podávání tlumivý vliv na tvorbu protilátek, zvláště pak typu IgG a IgM.^[46]

1.5.6 Spektrum účinku

Tetracykliny jsou účinné vůči širokému spektru Grampozitivních a Gramnegativních bakterií včetně anaerobů, rickettsií, chlamydií, mykoplazmat a působí i proti některým prvokům, např. amébám.^[13, 20, 22-24, 42, 43, 47, 48] Nepůsobí však na mikroby rodu *Pseudomonas* a *Proteus*, většina *Staphylococcus* je také rezistentní.^[23, 47]

Mezi citlivé Grampozitivní bakterie s malým počtem rezistentních kmenů patří druhy *Bacillus anthracis*, *Actinomyces israelii* a *Listeria monocytogenes*.

Mezi citlivé Gramnegativní bakterie patří druhy *Chlamyda psittaci*, *Borrelia burgdorferi*, *Leptospira* spp., *Treptonema* spp., *Francisella tularensis*, *Brucella* spp., *Yersinia pestis*, *Rickettsia* spp., *Vibrio cholerae* a *Neisseria gonorrhoeae*.^[17]

1.5.7 Rezistence na tetracykliny

Od zavedení tetracyklinů do praxe se vyvinula u velkého počtu bakteriálních kmenů rezistence vůči těmto antibiotikům, a proto je v dnešní době rezistence na tetracykliny limitujícím faktorem pro jejich použití v praxi. Lze počítat s přibližnou 50 % rezistencí bakteriálních rodů stafylokoků, streptokoků, pneumokoků, enterokoků či *Escherichia coli*.^[24, 43] Předpokládá se, že hlavní podíl genů zodpovědných za rezistenci na tetracykliny se vyskytuje v elementu s názvem transpozon 10 (*Tn10*) v plazmidu R100-1 bakteriální buňky.^[49] Byly popsány čtyři mechanismy rezistence vůči tetracyklinům:^[3, 20, 24, 50, 51]

1.5.7.1 Snížená intracelulární akumulace

Snížená intracelulární akumulace je způsobená buď sníženým vstupem látky do buňky, anebo zvýšenou expulzí látky aktivním transportem, popř. proteinovou pumpou. Protein této efluxní pumpy, většinou umístěné v lipidové dvojvrstvě s hydrofilními amino konci vyčnívajícími do periplazmatického a cytoplazmatického prostoru, má jednoduchý, zato velice účinný mechanismus. Tetracykliny se vážou na hořčnatý kationt a následně je tento kationtový komplex vypuzen z buňky proti koncentračnímu gradientu výměnou za proton. Tyto efluxní proteiny jsou kódovány pomocí plazmidů Gramnegativních bakterií, díky čemuž se snadno dále přenášejí transdukci nebo konjugací.

1.5.7.2 Ribozomální ochranné proteiny

Protekcí ribozomů rozumíme ochranu před vazbou tetracyklinů, která je způsobena cytoplazmatickými proteiny, které interferují s vazbou tetracyklinů na ribozom. Mechanismus těchto proteinů je funkční jak in vivo, tak in vitro, na rozdíl od působení efluxních proteinů, které vyžadují k funkci nedotčené membrány. Mezi nejvíce rozšířené ochranné proteiny patří Tet (M) a Tet (O).

1.5.7.3 Enzymatická inaktivace tetracyklinu

Enzymatická inaktivace antibiotika probíhá pomocí enzymu *tet* (X). Mechanismus účinku spočívá v ireverzibilní hydroxylaci tetracyklinů v pozici C11a za přítomnosti NADPH a O₂. Produktem reakce je vysoce nestabilní a rychle rozkladu podléhající neenzymatická

dekompozice při fyziologickém pH. Přidáním hydroxylové skupiny na C11a, *tet* (X) narušuje komplex antibiotika-Mg²⁺ a způsobuje inaktivaci sloučeniny.

1.5.7.4 *Změna cílového místa*

Změnou cílového místa dochází pomocí jednobodové mutace na 16S RNA sekvenci, kdy je zaměněna báze cytosinu za guanin. Tato rezistence byla pozorována pouze u bakteriálního druhu *Escherichia coli* v ekvivalentní pozici 1058 báze v sekvenci DNA, čímž dochází k neefektivitě působení tetracyklinů.

1.5.8 **Toxicita**

Tetracyklinová antibiotika jsou relativně netoxická, avšak vykazují i řadu nežádoucích vedlejších účinků. K nejzávažnějším patří deformace kostí a zubů, následkem chelace s vápníkem, někdy dochází i k inhibici jejich růstu. Z tohoto důvodu je nevhodné jejich dlouhodobé podávání dětem mladším 6 let nebo těhotným ženám.^[12, 13, 17, 23, 24, 35, 42, 43, 45, 47, 48, 52] Při podávání v dětství způsobí také žluté až hnědé zbarvení skloviny trvalých zubů.^[43, 53, 54] Dále mohou vyvolat pigmentaci kůže, závrať, zvracení, poškození nehtů a jater.^[17, 20, 21, 43, 45, 48] Snadno přestupují do lipofilních tkání, tělních tekutin s výjimkou mozkomíšního moku a prostupují placentou do plodu. Vyšší koncentrace tetracyklinů je obsažena v kůži, nehtech, očním bělmu, spojivkách, slzách, mateřském mléku a slinách.^[45] Vylučují se žlučí a močí, ale také mateřským mlékem. Většina vykazuje nefrotoxicitu.^[46] Reakce přecitlivělosti na tetracykliny (léková horečka, kožní vyrážky) nejsou obvyklé. Většina nežádoucích účinků je vyvolána přímým toxickým působením látky anebo postižením mikrobiální flóry.

1.5.9 **Rozdělení tetracyklinů**

Tetracykliny můžeme rozdělit do tří skupin, podle jejich farmakokinetických a antibakteriálních vlastností.^[55]

- I. První skupina obsahuje starší tetracykliny, které mají snížené absorpční vlastnosti a jsou méně lipofilní (lépe pronikají do tukových tkání) než tetracykliny v druhé skupině. Všechny se podávají orálně, kromě rolitetracyklinu.
 - chlortetracyklin, oxytetracyklin, tetracyklin, demeklocyklin, rolitetracyklin, lymecyklin, klomocyklin a metacyklin

- II. Tetracykliny v této skupině se absorbují lépe a jsou 3 až 5 krát více lipofilní, než první skupina. Podávají se orálně a nitrožilně.
- doxycyklin a minocyklin
- III. Tato skupina zahrnuje vývojové aminomethylcykliny, které podléhají výzkumu a klinickým testům. Oproti předchozím tetracyklinům jsou účinné proti bakteriím s již získanou rezistencí.^[56]
- tigecyklin

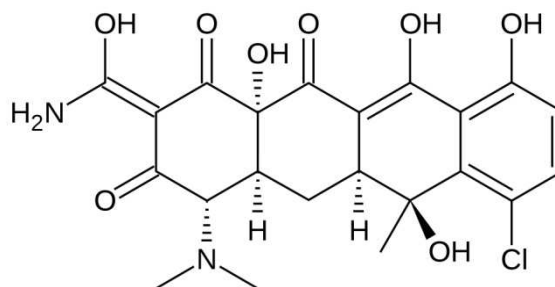
1.5.9.1 Chlortetracyklin

Chlortetracycline, (Aureomycin, latinsky *Chlortetracyclinum*), je širokospektrální antibiotikum objevené roku 1945, jako první známé tetracyklinové antibiotikum. Ve své molekule obsahuje atom chlóru. Chlortetracyklin je přirozeným produktem některých kmenů aktinomycet *Streptomyces aureofaciens*.^[2, 14, 36, 50]

Chlortetracyklin (7-Chlortetracyklin) je žlutý krystalický prášek, bez zápachu, stabilní na vzduchu, ale na světle se pomalu rozkládá. Ve formě hydrochloridu je rozpustný v alkalických hydroxidech a uhličitanech, nepatrně rozpustný ve vodě a alkoholech a prakticky nerozpustný v acetonu, chloroformu a diethyletheru.^[57] Používá se ve veterinární medicíně k léčbě mastitid a poporodních infekcí skotu, infekcí dýchací a trávicí soustavy telat, prasat a drůbeže a při infekčních onemocnění. Je také součástí krmiv pro prasata jako růstový stimulant.^[58]

Tab. 1 Charakteristika Chlortetracyklinu.^[59, 60]

| Chlortetracyklin | Registrační číslo CAS | Sumární vzorec | Molární hmotnost | Biologický poločas |
|------------------|-----------------------|---|-----------------------------|--------------------|
| | 57-62-5 | C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈ | 478,880 g·mol ⁻¹ | 6 - 9 h |



Obr. 2 Strukturální vzorec Chlortetracyklinu.^[59]

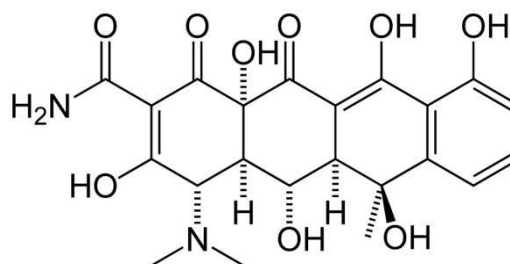
1.5.9.2 Oxytetracyklin

Oxytetracycline, (Terramycin, latinsky *Oxytetracyclinum*), je širokospektrální tetracyklinové antibiotikum produkované určitými kmeny mikroorganismu *Streptomyces rimosum*, objevené roku 1948.^[2, 14, 36, 50] Vlastnostmi se jedná o žlutou krystalickou látku velmi těžce rozpustnou ve vodě, ale rozpustnou ve zředěných kyselých a alkalických roztocích.^[57] Oxytetracyklin nedosahuje absorpční úrovně tetracyklinu, přičemž se vstřebá asi jen 58 % podané dávky. Lepšího vstřebávání se docílí s malým kvantem jídla. Velmi dobře proniká do žluče, lymfatických uzlin a ledvin. Jeho spektrum účinku je stejné jako u tetracyklinu, dále se používá proti listerióze, mykoplazmatům, tularémii, brucelózy, aj. Jeho negativní vlastností je, že při delším podávání se tlumí tvorba protilátek.^[46] Používá se jako růstový stimulant v krmných směsích.^[58]

Oxytetracyklin hydrochlorid je hygroskopický žlutý krystalický prášek, který je snadno rozpustný ve vodě a mírně rozpustný v 96 % lihu. Jeho roztok se ve vodě stáním kalí vlivem vysrážení oxytetracyklinu.^[57] Při teplotě nad 180 °C nebo vystavený přímému slunečnímu světlu se rychle rozkládá, viz kapitola 5.4.2.

Tab. 2 Charakteristika Oxytetracyklinu.^[61, 62]

| Oxytetracyklin | Registrační číslo CAS | Sumární vzorec | Molární hmotnost | Biologický poločas |
|----------------|-----------------------|---|-----------------------------|--------------------|
| | 79-57-2 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ | 460,434 g·mol ⁻¹ | 6 - 8 h |



Obr. 3 Strukturální vzorec Oxytetracyklinu.^[61]

1.5.9.3 Tetracyklin

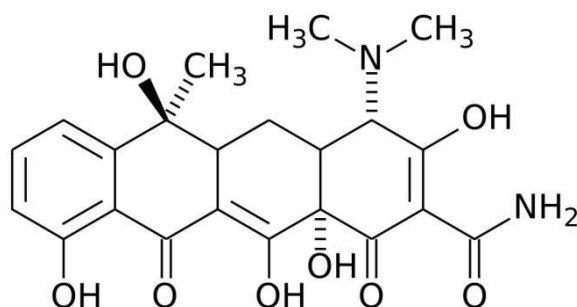
Tetracycline, (Achromycin, latinsky *Tetracyclinum*) je semisyntetické antibiotikum, objevené roku 1953. Jedná se o širokospektré antibiotikum, izolované jako produkt *Streptomyces rimosus*, *S. aureofaciens* a *S. viridofaciens*.^[10, 50] Byl také připraven

semisyntézou z chlortetracyklinu a oxytetracyklinu.^[28, 46] Používá v humánní i veterinární medicíně. Jeho účinek spočívá v navázání se na 16S rRNA malé podjednotky ribozomu, inhibuje syntézu bílkovin.^[41] Na vzduchu je stabilní, ale na přímém slunečním světle se rozkládá. V roztocích s pH pod 2 ztrácí svou biologickou aktivitu. Vlastnostmi je tetracyklin žlutý krystalický prášek, který je dobře rozpustný v 96 % lihu, methanolu, zředěných kyselých a alkalických roztocích a mírně rozpustný v acetonu. Je velmi těžce rozpustný ve vodě, lépe ve formě hydrochloridu a prakticky nerozpustný v etheru.^[57]

Po perorální aplikaci se vstřebává dobře, lépe ale s tekutinami, ovocem či zeleninou, nebo na lačno.^[46] Z trávicího traktu dobře a rychle a prostupuje do tkání, orgánů a tělních tekutin.^[14] Jeho spektrum účinku se vztahuje na kmeny *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, *Actinomyces israelii*, *Arachnia propionica*, *Chlamydia* spp., aj.^[46]

Tab. 3 Charakteristika Tetracyklinu.^[63, 64]

| Tetracyklin | Registrační číslo CAS | Sumární vzorec | Molární hmotnost | Biologický poločas |
|-------------|-----------------------|---|-----------------------------|--------------------|
| | 60-54-8 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | 444,435 g·mol ⁻¹ | 8 - 11 h |



Obr. 4 Strukturální vzorec Tetracyklinu.^[63]

1.5.9.4 Demeklocyklin

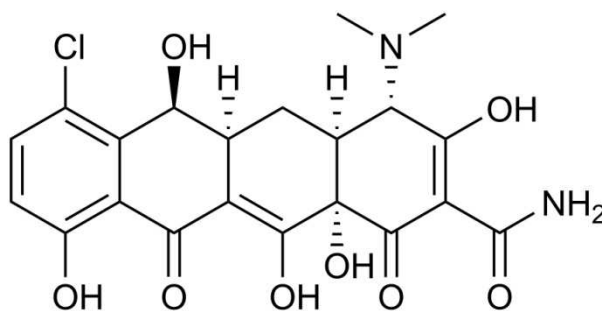
Demeclocycline, (Declomycin, latinsky *Demeclocyclinum*) je antibiotikum získané z kmene *Stereptomyces aureofaciens*. Jedná se o demetylchlor-tetracyklin, který má asi dvakrát vyšší účinek než tetracyklin. Vzhledem k resistenci bakterií je dnes zřídka používán k léčbě různých bakteriálních infekcí, je ale široce používán při léčení hyponatremie (nízká koncentrace sodíku v krvi), v důsledku syndromu nepřiměřené

sekrece antidiuretického hormonu (*SIADH*). Má stejný způsob účinku, ale nižší toxicitu než tetracyklin.^[50]

Demekloxyklin (6-Demethyl-7-chlortetracyklin), objevený roku 1957 vykazuje po perorální aplikaci velmi dobré a rychlé vstřebávání. Stejně jako tetracyklin se dobře a rychle vstřebává z trávicího traktu a prostupuje z tělních tekutin do tkání a orgánů.^[46]

Tab. 4 Charakteristika Demekloxyklinu.^[65, 66]

| Demekloxyklin | Registrační číslo CAS | Sumární vzorec | Molární hmotnost | Biologický poločas |
|---------------|-----------------------|---|-----------------------------|--------------------|
| | 127-33-3 | C ₂₁ H ₂₁ ClN ₂ O ₈ | 464,853 g·mol ⁻¹ | 10 - 17 h |



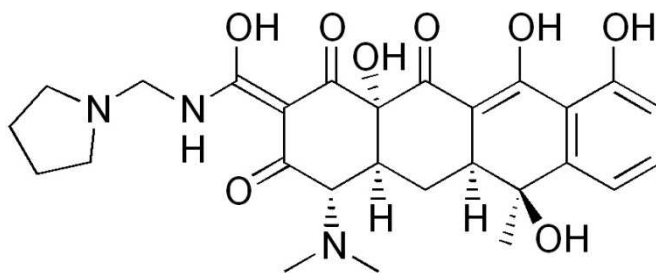
Obr. 5 Strukturální vzorec Demekloxyklinu.^[65]

1.5.9.5 Rolitetracyklin

Rolitetracycline, (Reverin, latinsky *Rolitetracyclinum*), podává se injekčně. Zkrácený chemický název rolitetracyklinu je 2-*N*-Pyrrolidinomethyltetracyklin, byl připraven roku 1958 jako první semisyntetické tetracyklinové antibiotikum. Používá se v případech, které vyžadují vysoké koncentrace, nebo je-li perorální podání nepraktické.^[67]

Tab. 5 Charakteristika Rolitetracyklinu.^[67, 68]

| Rolitetracyklin | Registrační číslo CAS | Sumární vzorec | Molární hmotnost | Biologický poločas |
|-----------------|-----------------------|---|-----------------------------|--------------------|
| | 751-97-3 | C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₈ | 527,566 g·mol ⁻¹ | 12 -25 h |

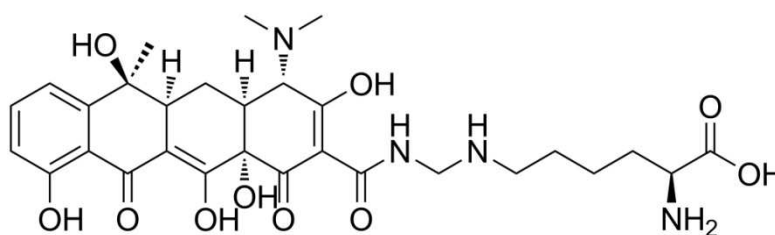
Obr. 6 Strukturální vzorec Rolitetraacyklinu^[68]

1.5.9.6 *Lymecyklin*

Lymecycline, (Tetralysal, latinsky *Lymecyclinum*), byl syntetizován roku 1961 jako 2-*N*-Lysinomethyltetraacyklin. Je přibližně 5000 krát více rozpustný než tetracyklin a je jedinečný mezi tetracykliny v tom, že je absorbován aktivním procesem přes střevní stěnu, s využitím stejně rychlého a účinného mechanismu, který využívají sacharidy. Je na rozdíl od tetracyklinu rozpustný při všech fyziologických hodnotách pH.^[69]

Tab. 6 Charakteristika Lymecyklinu.^[69, 70]

| Lymecyklin | Registrační číslo CAS | Sumární vzorec | Molární hmotnost | Biologický poločas |
|------------|-----------------------|--|----------------------------|--------------------|
| | 992-21-2 | C ₂₉ H ₃₈ N ₄ O ₁₀ | 602,63 g·mol ⁻¹ | 10 h |

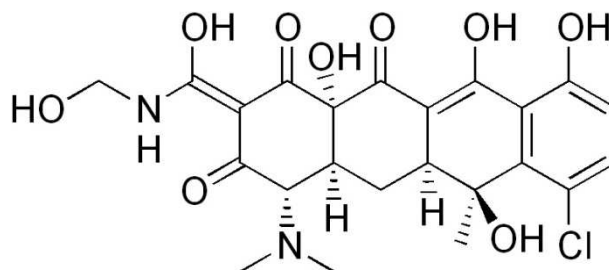
Obr. 7 Strukturální vzorec Lymecyklinu.^[69]

1.5.9.7 *Klomocyklin*

Clomocycline, (Megaclor, latinsky *Clomocyclinum*), byl syntetizován roku 1963 jako *N*-Methylol-7-chlortetraacyklin.^[71] Toto antibiotikum je běžně předepisováno lékaři při infekcích a léčbě akné. Také se používá při léčbě kapavky, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, malárie a k léčbě Lymeské boreliózy.^[72]

Tab. 7 Charakteristika Klomocyklinu.^[72, 73]

| Klomocyklin | Registrační číslo CAS | Sumární vzorec | Molární hmotnost | Biologický poločas |
|-------------|-----------------------|---|-----------------------------|--------------------|
| | 1181-54-0 | C ₂₃ H ₂₅ ClN ₂ O ₉ | 508,905 g·mol ⁻¹ | 10 - 15 h |

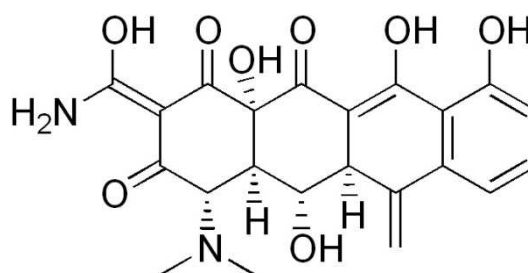
Obr. 8 Strukturální vzorec Klomocyklinu.^[73]

1.5.9.8 Metacyklin

Metacycline, (Rondomycin, latinsky *Metacyclinum*) je tetracyklinové antibiotikum se zkráceným názvem 6-Methylen-5-hydroxytetracyklin, syntetizovaného roku 1965. Používá jako prekurzor v průmyslové syntéze doxycyklin hyklátu (C₂₂H₂₄N₂O₈ HCl·0,5 H₂O·0,5 C₂H₆O). Bývá zaměňován s antibiotikem meticilinem.^[74] Perorálně je výborně vstřebatelný, lépe než základní tetracykliny, má vyšší aktivitu než tetracyklin. Vzhledem k jeho dlouhému sérovému poločasu a menšímu počtu vedlejších účinků a nižší toxicitou je upřednostňován před tetracyklinem.^[46]

Tab. 8 Charakteristika Metacyklinu.^[74, 75]

| Metacyklin | Registrační číslo CAS | Sumární vzorec | Molární hmotnost | Biologický poločas |
|------------|-----------------------|---|-----------------------------|--------------------|
| | 914-00-1 | C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₈ | 442,419 g·mol ⁻¹ | 16 - 22 h |

Obr. 9 Strukturální vzorec Metacyklinu.^[74]

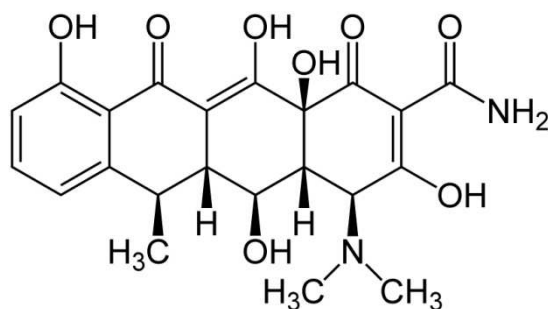
1.5.9.9 Doxycyklin

Doxycycline, (Vibramycin, latinsky *Doxycyclinum*) patří do druhé generace připravené v polovině sedmdesátých let a stalo se jedním z hlavních klinicky užívaných tetracyklinových antibiotik.^[14] Jeho spektrum účinku je analogické tetracyklinu, jeho účinek je ale podstatně vyšší (až 8krát). Není nefrotoxický.^[46]

6-Deoxy-5-hydroxytetracyklin je polosyntetická forma tetracyklinu, který má déletrvající účinek než přírodní forma tetracyklinu. Byl syntetizován roku 1967.^[19] Ve většině případů je preferován před tetracyklinem a minocyklinem.^[21] Doxycyklin má nejdokonalejší vstřebávání ze všech tetracyklinů a je po perorálním podání téměř absolutní, přičemž jakákoliv potrava nemá podstatný význam. Tato skutečnost je velmi výhodná, při podávání se mohou konzumovat ovocné šťávy pro tlumení možných vedlejších příznaků.^[46]

Tab. 9 Charakteristika Doxycyklinu.^[76, 77]

| Doxycyklin | Registrační číslo CAS | Sumární vzorec | Molární hmotnost | Biologický poločas |
|------------|-----------------------|----------------------|---|--------------------|
| | 564-25-0 | $C_{22}H_{24}N_2O_8$ | $444,435 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ | 15-25 h |



Obr. 10 Strukturální vzorec Doxycyklinu.^[76]

1.5.9.10 Minocyklin

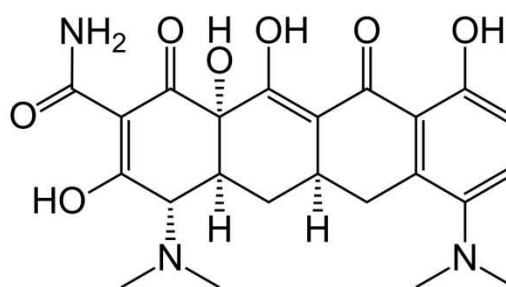
Minocycline, (Minocin, latinsky *Minocyclinum*) je polosyntetická forma tetracyklinu, které má širší spektrum než ostatní členové skupiny.^[19] Minocyklin dosahuje vysokých hladin v slzách a slinách, takže je vhodný pro eradikaci nosičství meningokoků. Minocyklin je účinný proti bakteriálním kmenům (zvláště *Staphylococcus aureus*), které získaly vůči základním tetracyklinům rezistenci.^[14] Minocyklin (7-Dimethylamino-6-demethyl-6-

deoxytetracyklin) byl syntetizován roku 1972. Je dobře rozpustný ve vodě a proto použitelný pro injekční aplikaci.^[78]

Minocyklin vykazuje analogii s doxycyklinem, jeho vstřebávání je velmi dobré (více než 90 %). Má dobrý průnik do lipofilních tkání jako je prostata, mozek, a centrální nervový systém, dále proniká velmi dobře žlučí, do jater a ledvin. Ničí velký počet bakteriálních patogenů (speciálně např. ty, které přenášejí klíšťata). Mezi nežádoucími účinky patří závrať, zbarvení kůže a autoimunitní poruchy.^[46]

Tab. 10 Charakteristika Minocyklinu.^[79, 80]

| Minocyklin | Registrační číslo CAS | Sumární vzorec | Molární hmotnost | Biologický poločas |
|------------|-----------------------|---|----------------------------|--------------------|
| | 10118-90-8 | C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₇ | 457,477g·mol ⁻¹ | 11 - 22 h |



Obr. 11 Strukturální vzorec Minocyklinu.^[79]

1.5.10 Koloběh tetracyklinů v životním prostředí

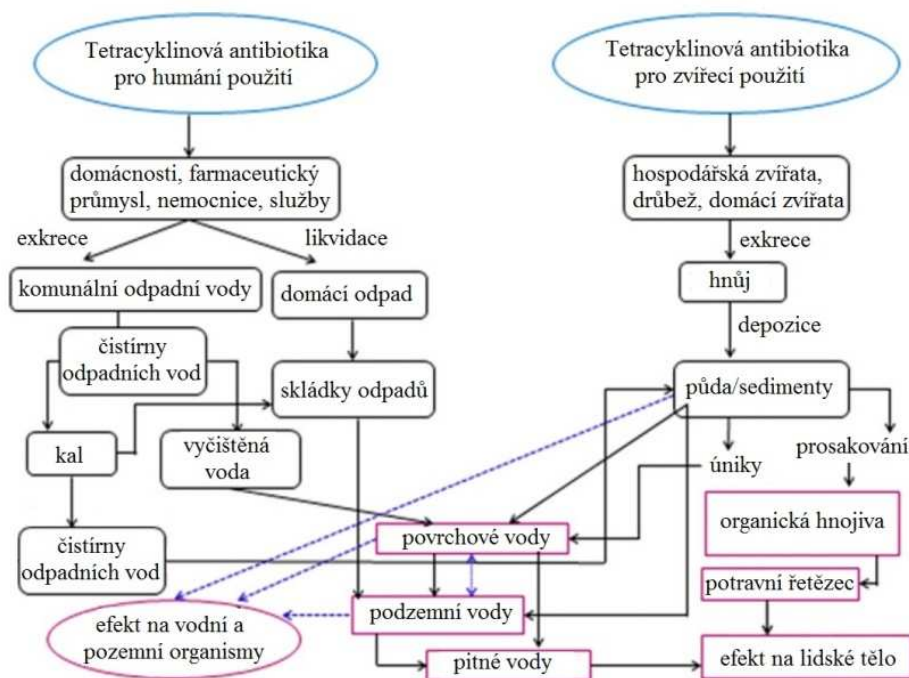
Během několika posledních let vedlo použití léčiv v medicíně pro zachování lidského zdraví a zdraví zvířat k jejich nežádoucí akumulaci a persistenci v životním prostředí.^[81]

Tetracykliny jsou běžně užívány pro veterinární účely, terapii člověka, v zemědělství jako doplňkové látky a navíc se dávají zvířatům jako růstové stimulanty.^[82] Díky jejich nižší ceně, vyšší antimikrobní aktivitě je v Evropě ročně spotřebováno na veterinární terapii více než 2 500 tun tetracyklinů.^[83]

Po příjmu organismem jsou tetracykliny absorbovány a podléhají metabolickým reakcím. Jejich rezidua se následně dostávají do svaloviny, tkání a mléka, ale největší podíl je z těla vyloučen.^[34] Po vyloučení z organismu se dostávají do odpadních vod a procházejí přes

čistící proces čistíren odpadních vod. Vzhledem k jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem jsou to látky stabilní, obtížně oxidovatelné konvenčními postupy a resistantní vůči biodegradaci.^[81] Na výtoku jsou tedy většinou nezměněny. Následně dochází tomu, že se z čistírny stává významný bodový zdroj znečištění životního prostředí.^[30] Nedávné studie potvrdili nálezy reziduí tetracyklinů v různých typech vod (odpadních, povrchových a podzemních) a pevných látkách (kaly, zeminy a sedimenty).^[81-84]

Nadužívání antibakteriálních léků, jako jsou tetracykliny, může v živočišné výrobě vést k přítomnosti reziduí v požitelných tkáních, mléku, anebo vejcích. Expozice člověka k těmto lékům prostřednictvím spotřeby těchto potravin může vést k alergickým reakcím.^[25] Jejich výskyt vede k nepříznivým dopadům na životní prostředí, včetně vzniku rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům. Léčiva, tedy i tetracykliny, jsou často označovány jako nové kontaminanty životního prostředí. Jedním z nejdůležitějších zdrojů tetracyklinů jsou odpadní vody a také výtoky čističek odpadních vod, které podle fyzikálně-chemických vlastností mohou dále pronikat vodním prostředím, nebo se absorbovat v sedimentech.^[34] Cyklus tetracyklinů v životním prostředí zobrazuje schéma na Obr. 12.



Obr. 12 Cyklus tetracyklinů v prostředí^[81]

2 ANALYTICKÝ POSTUP STANOVENÍ TETRACYKLINŮ

Pro všechny chemické analýzy je potřeba, aby byl analyt v přijatelné kvalitě vhodný pro instrumentální použití.^[85] Tetracyklinová antibiotika jsou sledována v moči po terapeutickém užití, dále pak jako rezidua ve svalovině, mléku, medu, vodách apod. Povaha matrice výskytu léčiva tedy určuje způsob odběru, úpravy a skladování vzorku před analýzou, kdy je vždy potřeba získat reprezentativní vzorek. Obecný analytický postup stanovení tetracyklinových antibiotik zahrnuje tyto kroky: odběr vzorku a úprava vzorků, extrakci analytu z matrice a zakoncentrování, přečištění a finální úprava, separaci analytu a detekci analytu.

2.1 Odběr vzorku a jeho úprava

Obecný postup pro nakládání se vzorkem po jeho reprezentativním odběru většinou zahrnuje uchování v chladu, popř. jeho zmražení, není-li vzorek ihned analyzován. Je-li potřeba, je vzorek přímo při odběru zfiltrován, např. u říčních vod.

Po převozu do laboratoře je vzorek homogenizován, alikvotní podíl analyzován a zbytek uskladněn. Pro zvýšení analytického signálu je ve většině případů ke vzorku přidáno známé množství tetracyklinů, popř. jiného interního standardu. Následuje extrakce, přečištění a zakoncentrování, nejčastěji extrakcí pevnou fází. Výsledný eluent obsahuje rezidua analytu a organické rozpouštědlo, které je odpařeno. Zakoncentrované analyty jsou rozpuštěny v mobilní fázi a nastříknuty do kapalinového chromatografu.

Jednotlivé postupy úpravy z vybraných matric jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11 Postup úpravy vzorků před analýzou z vybraných matic

| Vzorek | TCA | Odběr / uchovávání | + TCA | IS | Extrakce / Přechištění | Vysušení eluátu | Filtrace | Zdroj |
|--------------------|--|---|----------|--------------------|--|--|--|--------------------|
| mléko | TC, OTC, CTC, DC, MC, MTC + epimery | - 20 °C | + / - | DMC / - | Na ₂ EDTA + CCl ₃ CO ₂ H (< pH) / CCl ₃ CO ₂ H + oxalátový pufr (pH 4) / McIlvain pufr + Na ₂ EDTA; centrifugování; SPE: Oasis® HLB / CarboGraph 4 | vodní lázeň 35 / 40 °C, proud N ₂ | PTFE (0,45 μm) / celulózový (0,2 μm) | [78, 86- 88] |
| vejce / žloutek | TC, OTC, CTC, DC, MC, MTC, DMC | - 18 °C; TFA (deproteinace žloutku) | + | colchic ine / - | CCl ₃ CO ₂ H + oxalátový pufr (pH 4) / Na ₂ EDTA; centrifugování; SPE: Li-Chrolut RP-18 / Discovery / Nexus | vodní lázeň 35 / 40 °C, proud N ₂ | Papírový / PTFE | [78, 89] |
| med | TC, OTC, CTC, DC, MC, + epimery | + 4 °C | - | DMC / - | oxalátový pufr (pH 4); sukcinátový pufr (pH 4) + Na ₂ EDTA; CH ₃ COONa (pH 4,5); centrifugování; SPE: Oasis® HLB / Strata-X | 40 °C, proud N ₂ / tlak | skelná vlákna; nylonový (0,20 / 0,45 μm) | [90- 92] |

Vysvětlivky: TCA - Tetracyklinová antibiotika; TC - Tetracyklin, OTC - Oxytetracyklin, CTC - Chlortetracyklin, DC - Doxycyklin,
MC - Minocyclin, MTC - Methacyclin, DMC - Demeklocyclin, TCA-HCl - tetracyklinové antibiotikum hydrochlorid; TFA - kys.
tri fluoroctová; + TCA - přidávek tetracyklinových antibiotik, + přidán, - nepřidán; IS - interní standard, OLEA - oleandomycin;
ACN - acetonitril; PLE - extrakce kapalinou podporovaná tlakem; UAE - Extrakce ultrazvukem; PTFE - Polytetrafluorethylen

Tab. 11 Postup úpravy vzorků před analýzou z vybraných matic - pokračování

| Vzorek | TCA | Odběr / uchovávání | + TCA | IS | Extrakce / Přečištění | Vysušení eluátu | Filtrace | Zdroj |
|----------------|---|-----------------------|----------|--------------------|--|---|----------------------|-----------------|
| kuřecí maso | TC, OTC, CTC, DC, MC, MTC, DMC, OTC-HCL, CTC-HCI | rozemletí - 18 °C | + | colchic ine / - | CCl ₃ CO ₂ H + oxalátový pufr (pH 4) / McIlvaine-Na ₂ EDTA (pH 4,0) / ACN + citrát + MgCl ₂ ; centrifugování + n-Pentan / - ; SPE: Li-Chrolut RP-18 / Discovery / Nexus | vodní lázeň 35 / 40 °C, proud N ₂ / odparka | nylonový (0,2 µm) | [89, 93, 94] |
| hovězí maso | TC, OTC, CTC, DC, + epimery | rozemletí - 20 °C | + / - | MTC / - | CCl ₃ CO ₂ H; McIlvaine-Na ₂ EDTA (pH 4,0); centrifugování; SPE: Oasis® HLB | proud N ₂ | PTFE (0,45 µm) | [86, 95] |
| krevey | TC, OTC, CTC, DC | rozemletí - 18 °C | - | - | McIlvaine-Na ₂ EDTA (pH 4,0); centrifugování | proud N ₂ | PTFE (0,45 µm) | [96] |
| rybí maso | TC, OTC, CTC | rozemletí | - | - | Na ₂ EDTA + MeOH + H ₂ O; centrifugování | data nejsou k dispozici | PP (0,45 µm) | [97] |

Vysvětlivky: TCA - Tetracyklinová antibiotika; TC - Tetracyklin, OTC - Oxytetracyklin, CTC - Chlortetracyklin, DC - Doxycyklin,
MC - Minocyklin, MTC - Methacyklin, DMC- Demeklocyklin, TCA-HCl - tetracyklinové antibiotikum hydrochlorid; TFA - kys.
trifluoroctová; + TCA - přídavek tetracyklinových antibiotik, + přidán, - nepřidán; IS - interní standard, OLEA - oleandomycin;
ACN - acetonitril; PLE - extrakce kapalinou podporovaná tlakem; UAE - Extrakce ultrazvukem; PTFE - Polytetrafluorethylen

Tab. 11 Postup úpravy vzorků před analýzou z vybraných matic - pokračování

| Vzorek | TCA | Odběr / uchovávání | + TCA | IS | Extrakce / Přechištění | Vysušení eluátu | Filtrace | Zdroj |
|---------------|--|---|----------|---------------------------|---|----------------------------|---|--------------------|
| říční voda | TC, OTC, CTC, DC, MC, MTC | vzorkovnice (tmavé); filtrace; 4 °C / -20 °C | + / - | DMC / simato ne / - | Na ₂ EDTA + HCl (pH 2,5 - 3); Na ₂ EDTA + H ₂ SO ₄ (pH < 3), SPE: Oasis® HLB / Oasis® MAX | proud N ₂ | skelná vlákna (1,2 / 0,2 µm) nylonový (0,45 µm) | [84, 98, 99] |
| půda | TC, OTC, CTC, DC, + epimery | vyсуšení; síťování | - | DMC / - | PLE (Na ₂ EDTA) / PLE (MeOH + C ₆ H ₈ O ₇); LLE (heptan); SPE: SAX-HLB / Strata-X | proud N ₂ | data nejsou k dispozici | [100, 101] |
| hnůj | TC-HCL, OTC- HCL, CTC, DC- HCL | - 20 °C | - | OLEA / - | PLE (C ₆ H ₈ O ₇ → MeOH + C ₆ H ₈ O ₇) / McIlvaine-Na ₂ EDTA (pH 4,0); LLE (heptan); centrifugování; SPE: Waters Sep-Pak C ₁₈ / SAX-HLB | data nejsou k dispozici | skelná vlákna (0,6 µm) / Whatman 5 | [82, 102] |

Vysvětlivky: TCA - Tetracyklinová antibiotika; TC - Tetracyklin, OTC - Oxytetracyklin, CTC - Chlortetracyklin, DC - Doxycyklin, MC - Minocyklin, MTC - Methacyklin, DMC- Demekloxyklin, TCA-HCl - tetracyklinové antibiotikum hydrochlorid; TFA - kys. trifluoroctová; + TCA - přídavek tetracyklinových antibiotik, + přidání, - nepřidání; IS - interní standard, OLEA - oleandomycin; ACN - acetonitril; PLE - extrakce kapalinou podporovaná tlakem; UAE - Extrakce ultrazvukem; PTFE - Polytetrafluorethylen

Tab. 11 Postup úpravy vzorků před analýzou z vybraných matic - pokračování

| Vzorek | TCA | Odběr / uchovávání | + TCA | IS | Extrakce / Přečištění | Vysušení eluátu | Filtrace | Zdroj |
|-----------------|---|----------------------------|----------|---------------|---|--|----------------------------|---------------|
| krmná směs | TC-HCl, OTC-HCl, CTC-HCl, DC-HCl | rozmělnění | + | - | ACN + C ₆ H ₅ O ₇ ³⁻ (pH 3); centrifugování UAE: CH ₃ OH/CH ₃ N / McIlvaine-Na ₂ EDTA (pH 4,6); centrifugování; SPE: Oasis [®] HLB | proud N ₂ | nylonový (0,45 μm) | [25, 103] |
| sérum prasat | TC-HCL, MC-HCL | data nejsou k dispozici | + | DMC | H ₃ PO ₄ ; SPE: Oasis [®] HLB | termoreaktor 40 °C, proud N ₂ | data nejsou k dispozici | [104] |
| moč | TC, OTC, CTC | data nejsou k dispozici | + / - | DMC / - | Na ₂ EDTA + HCl (pH 4) / KH ₂ PO ₄ ; SPE: Oasis [®] HLB | rotační odparka | nylonový (0,22 μm) | [105, 106] |

Vysvětlivky: TCA - Tetracyklinová antibiotika; TC - Tetracyklin, OTC - Oxytetracyklin, CTC - Chlortetracyklin, DC - Doxycyklin,
MC - Minocyclin, MTC - Methacyklin, DMC - Demeklocyklin, TCA-HCl - tetracyklinové antibiotikum hydrochlorid; TFA - kys.
trifluoroctová; + TCA - přidávek tetracyklinových antibiotik, + přidán, - nepřidán; IS - interní standard, OLEA - oleandomycin;
ACN - acetonitril; PLE - extrakce kapalinou podporovaná tlakem; UAE - Extrakce ultrazvukem; PTFE - Polytetrafluorethylen

2.2 Extrakce

Nejčastěji se používají extrakce z vodné fáze, kde se jako extrakční činidlo primárně používá směs McIlvaina pufru (*směs kyseliny citronové s hydrogenfosforečnanem disodným*) s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (Na_2EDTA , $pH\ 4$). Většina extrakcí z vodné fáze byla prováděna v kyselých podmínkách za použití kyselin chlorovodíkové, chloristé a kyseliny fosforečné.^[32] Dále lze použít jako extrakční rozpouštědla sukcinátový a acetátový pufr.^[87] Ačkoliv jsou tetracykliny dobře rozpustné v alkoholech, používají se zřídka (např. *MeOH* pak již nemůže být použit jako solvent při přečištění metodou *SPE*).^[32] Nedostatek extrakčních metod může být vysvětlen skutečností, že vzorky tetracyklinů, např. v krmivech, jsou velmi složité a mají variabilní matrice, přičemž některé složky se snadno extrahují společně s analyty. Navíc, tetracykliny podléhají chelaci s přechodnými kovovými ionty, jako je měď a zinek, které se přirozeně vyskytují v matricích. Problém může být částečně eliminován přidáním chelatačních činidel, jako je například *EDTA*, kyselina šťavelová a citrónová, které zabraňují kovovým iontům v chelaci s analyty.^[25, 32, 107]

Hladiny koncentrací léčiv obecně jsou ve vodných vzorcích většinou příliš nízké, z tohoto důvodu není možné přímé vstříkávání vzorků do chromatografického systému. Proto je nezbytné vzorky před analýzou zakoncentrovat.

2.2.1 Extrakce pevnou fází

Při extrakci pevnou fází/sorbentem (*Solid Phase Extraction, SPE*) dochází k rovnovážnému rozdělení analytu mezi kapalinu a pevnou fází. Tento typ extrakce se používá jako alternativa ke klasické extrakci kapalina - kapalina (*Liquid-liquid extraction, LLE*), která narozdíl od *SPE* spotřebuje při extrakci velké objemy rozpouštědel. Princip extrakce pomocí *SPE* spočívá na účinné sorpci analytu z vodného vzorku do pevného sorbentu, ostatní komponenty vzorku by se měly sorbovat v míře co nejmenší. Sorpční kolonka obsahuje vhodný sorbent v množství řádově miligramů až gramů a průtok vzorku je umožněn buď gravitací, přetlakem na vstupu (čerpadlem, injekční stříkačkou) nebo podtlakem na výstupu (vakuum). Zachycený analyt se pak uvolní ze sorbentu zahřátím anebo elucí vhodným rozpouštědlem.^[108, 109] Selektivita sorbentu závisí na přitažlivých silách mezi analyty a funkčními skupinami na povrchu sorbentu. Sorbent může interagovat s analytem na základě hydrofobní interakce (nepolární - nepolární,

van der Waalsovy síly), hydrofilní (polární - polární, vodíkové vazby, dipól - dipól, dipól-indukovaný dipól), kationtové - aniontové a selektivní interakce antigen - protilátka.^[108, 110] Tetracykliny obsahují různé funkční skupiny na aromatickém jádru, a proto můžeme použít různé typy sorbentů SPE kolonek, jako je C₁₈H₃₇ polymerický sorbent s reverzní fází pro nepolární část aromatického kruhu tetracyklinů. Na fenylový sorbent se snadno váže D kruh. Karbonylové, hydroxylové a amino skupiny se pak vážou na aminopropyl a kyano sorbenty SPE kolonek. Bez ohledu na zvolený sorbent SPE kolonky, je třeba věnovat pozornost schopnosti tetracyklinů vázat se na sorbent různými interakcemi.^[32]

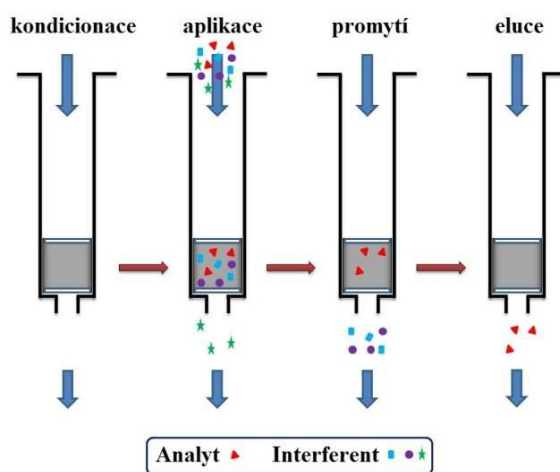
Pro extrakci tetracyklinů tuhou fází jsou používány například sorbenty na bázi silikagelu^[111] s navázanými skupinami: Li-Chrolut RP-18^[87, 89], Discovery DSC-18^[87, 89, 112], Varian SPE C18^[93], Sep-Pak C18^[84], Phenomenex SPE C18-E^[96] nebo na bázi iontoměničů^[111] ISOLUTE SAX^[101, 102] a Oasis[®] MAX^[98]. Kolonky na polymerní^[111] bázi: Oasis[™] HLB^[25, 84, 86, 88, 91, 92, 95, 98-105, 113-116], Strata-X[™] SPE^[90, 101] a Nexus Varian^[87, 89]. Také je možné použít kolonky na bázi grafitovaného uhlíku^[111] Resprep CarboPrep SPE^[78].

Vlastní extrakci, zobrazenou na Obr. 13, lze rozdělit do několika částí: kondicionace sorbentu, aplikace vzorku, promytí sorbentu, sušení kolonky a eluce analytu.^[108]

- a) *Kondicionace sorbentu* - Jedná se o kondicionaci měničů iontů nebo solvataci skupiny vázané na povrchu sorbentu a úpravu prostředí pro vlastní vzorek. Pro stanovení tetracyklinů je vhodná kondicionace roztokem methanolu^[78, 102], dále směsí methanol/voda^[84, 86, 91-93, 101, 103, 104], methanol/methylenchlorid^[78], methanol/methylenchlorid/voda^[98], methanol/HCl/voda^[95, 99, 105, 113, 116], methanol/voda/kyselina trichloroctová^[88] nebo methanol/kyselina citrónová^[100], popř. methanol/voda/octan sodný^[90].
- b) *Aplikace vzorku* - Při tomto kroku je definovaný objem analytu (10 - 40 ml) promýván kolonkou rychlostí od 0,5 - 20 ml·min⁻¹ ^[78, 84, 98-102, 105, 113].
- c) *Promytí sorbentu* - Dochází k vymytí zbytků matrice vzorku a k odstranění interferujících složek bez eluce analytu. Jako promývací činidlo se často využívá voda^[84, 88, 90, 91, 93, 95, 98, 99, 101, 102, 113], methanol^[78, 101, 104, 116], methanol/voda^[84, 86, 92, 105], methanol/methylenchlorid^[78], kyselina citrónová^[100].
- d) *Sušení kolonky* - Tato část je prováděna, pokud se eluční rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku. Kolonky se vysušují vakuem^[84, 88, 91, 92, 99-102, 112], nebo proudem dusíku^[78, 98, 116].

- e) *Eluce analytu* – Jedná se v podstatě o selektivní desorpci analytů z pevné fáze. Používají se roztoky methanolu^[78, 84, 86, 88, 95, 98-102, 104, 105, 113, 116] a etylacetátu^[112], nebo směsi methanolu a etylacetátu^[93], popř. methanol a kyselina šťavelová^[84].

Po eluci jsou analyty často zakonzentrovány odpařením rozpouštědla za tepla v atmosféře plynného dusíku na určitý objem, popř. do sucha^[84, 86, 88, 91-93, 95, 98, 104, 116], nebo odpařením v odparce^[90, 91, 101, 112, 117]. Poté jsou analyty znovu rozpuštěny v malém množství methanolu^[86] anebo mobilní fáze^[84, 95, 116], popř. směsi roztoků methanol/voda^[78, 92, 98, 101], methanol/HCl^[112], methanol/voda/kyselina mravenčí^[88], voda/oleandomycin^[100], ACN/voda^[105] nebo oxalátový pufr/ACN^[91].



Obr. 13 Postup při extrakci pevnou fází^[108]

2.2.2 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie se liší od jiných chromatografických metod v tom, že vhodnou stacionární fází můžeme specificky zachytit buď jednu, nebo několik složek matrice. Následně je analyt získán elucí vhodným rozpouštědlem.^[118] Pro stanovení tetracyklinů jsou využívány metody afinitní chromatografie kovových komplexů (*Metal chelate affinity chromatography, MCAC*)^[92, 119], která využívá komplexační vlastnosti tetracyklinů s kovovými ionty a umožňuje další přečištění. Vizuální sledování obsahu tetracyklinů v extraktu nadávkovaném do kolony lze sledovat pomocí měděných iontů (vzniká modrý komplex).^[32] Méně používaná je metoda afinitní chromatografie s imobilizovaným iontem kovu (*Immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC*^[119]).

2.3 Separace analytu

Nejpoužívanějšími metodami jsou separace pomocí kapalinové chromatografie (*Liquid Chromatography, LC*) a kapilární elektroforézy (*Capillary Electrophoresis, CE*). *CE* byla použita k analýze mnoha tříd antibiotik a stala účinnou alternativní metodou k *HPLC*.^[112, 117] Před nástřikem na analytickou kolonu je ovšem nutné vzorek přefiltrovat.

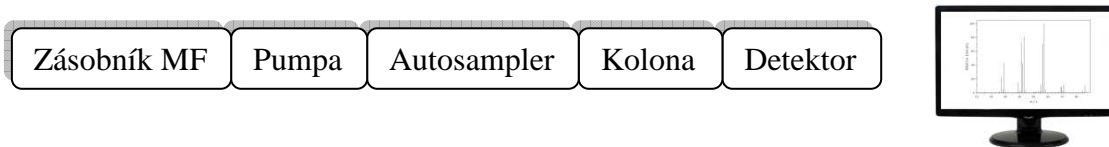
2.3.1 Kapalinová chromatografie

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*) je separační analytická metoda využívající vysokého tlaku k eluci mobilní fáze skrze kolonu obsahující drobné částice stacionární fáze, díky kterým dochází k vysokému rozlišení separace. V průběhu analýzy se molekuly analytu pohybují určitou rychlostí, přičemž kontinuálně migrují mezi mobilní a stacionární fází. Proto o separaci složek ve vzorku rozhoduje nejen jejich interakce se stacionární fází, ale také velmi výrazně použitá mobilní fáze^[110]. Mezi výhody této metody patří její široká oblast použitelnosti: lze analyzovat ionty, látky polární a nepolární, tepelně nestabilní, málo těkavé a vysokomolekulární.^[120] Celkově lze pomocí *HPLC* separovat cca 80 % veškerých známých látek.^[109] Výsledným záznamem je chromatogram.

Separace analytu jsou ovlivňovány vlastnostmi analyzovaných látek a jejich interakcemi s mobilní a stacionární fází, typu použité stacionární fáze, složení mobilní fáze, typu kolony, dávkovacího zařízení, průtoku a teplotě.

2.3.1.1 Instrumentace

Schematický diagram je zobrazen na Obr. 14, který se skládá ze zásobníku mobilní fáze (MF), pumpa, injektoru (autosampler), kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení.



Obr. 14 Schéma kapalinového chromatografu^[vytvořeno autorem, MS Paint & MS Word]

2.3.1.2 *Pumpy*

HPLC systém obsahuje čerpadla, která čerpají do kolony pístovým nebo membránovým mechanismem mobilní fáze.^[110] Pumpy jsou konstruovány tak, aby průtok mobilní fáze byl stálý a bez pulsů.^[85] Jsou zhotoveny z nerezové oceli, keramiky nebo plastu.

Součástí pump je směšovací zařízení, pomocí kterého můžeme měnit složení mobilní fáze v průběhu analýzy. Zůstává-li složení stejné, jedná se izokratickou eluci, nebo se složení mění, tj. roste síla mobilní fáze - gradientová eluce.^[121] Gradientová eluce se používá u analýz komplexních vzorků s velkým počtem analytů lišících se retenčním časem. Mezi výhody pak patří lepší rozlišení a citlivost pro píky, mezi nevýhody nutnost ekvilibrace kolony a tím pádem delší doba analýzy. Dále je zde přítomno odplyňovací zařízení.

2.3.1.3 *Dávkovací zařízení*

Nástřik na začátek kolony musí být proveden co nejrychleji, aby nebyl narušen plynulý průtok mobilní fáze. Používají se injekční zařízení zhotovená z inertních materiálů (nerezová ocel, titan, některé polymery), která jsou ovládána manuálně nebo automaticky. Dalším způsobem je obtokový dávkovací kohout (smyčka) o definovaném objemu.^[85, 121]

2.3.1.4 *Analytická kolona*

Kolona je zhotovena z nerezové oceli, hliníku, mědi, skla nebo z plastu PEEK, délky až 25 cm, vnitřního průměru až 5 mm. Stacionární fáze je v koloně udržována pomocí porézních disků. Jedná se o speciální náplň, tvořené stejnosměrnými kulovými částicemi o průměru 1,7 až 10 μm .^[120]



Obr. 15 Analytická kolona a předkolony^[vytvořeno autorem, Rhinoceros 4.0]

Pro ochranu kolony a prodloužení její životnosti před případnými nečistotami a nerozpuštěnými látkami se používá tzv. předkolona (*guard column*), která má stejnou stacionární fázi jako analytická kolona.^[85, 122] Další možností ochrany je použití in-line

filtrů, pracujících na principu filtrace mobilní fáze skrze porézní materiál o velikosti pórů přibližně 0,5 μm .^[120]

Kapalinová chromatografie aplikovaná při stanovení tetracyklinů je prováděna v systému obrácených fází (*Reversed Phase, RP*), která je charakteristická vyšší polaritou mobilní fáze oproti fázi stacionární. Použitá stacionární fáze je v kontaktu s mobilní fází a mezi nimi dochází k postupnému zadržování analytu a následné separaci. Kolony jsou náplňové a jejich uspořádání a velikost náplně hraje významnou roli při separaci.^[109] Velikost částecek hraje důležitou roli, přičemž menší velikost vede k vyššímu počtu teoretických pater, vyššímu tlaku, kratší době analýzy a menšímu detekčnímu limitu.^[122]

Analytické kolony doporučené k separaci tetracyklinů obsahují převážně stacionární fázi na bázi silikagelu nebo silikagelu s navázanými funkčními skupinami. Nejčastěji se jedná o oktadecyl (Si-C₁₈H₃₇, viz Tab. 12) Xterra MS^[99-102, 113], Discovery HS F5^[123], Hypersil HyPurify Elite^[78], Altima^[88], MediterraneanTM Sea^[97], ACQUITY UPLC BEH^[98, 105], Atlantis dC^[91], COSMOSIL 5C-MS-II^[92], Pursuit a Polaris^[93], LUNA^[95, 116], Inertsil-ODS3^[87, 96, 124], Kromasil^[89], Synergi Fusion-RP^[90], Thermo^[25]. Oktyl (Si-C₈H₁₇, viz Tab. 13) SunFire^{TM[92]}, Hypersil^{TM[86]} a SymetryShield^{TM[104]}. Dále lze využít silikagel s fenyl skupinou ZORBAC Eclipse XDB-Phenyl^[94], nebo amino skupinou Kromasil 100-5NH₂^[84].

Tab. 12 Charakteristika nejpoužívanějších C₁₈ kolon

| Zdroj | Šířka [mm] | Délka [mm] | Velikost náplně [μm] |
|-------------------------|------------|------------|-----------------------------------|
| [58, 96, 117] | 4,6 | 250 | 5,0 |
| [84, 95, 107, 123, 125] | 4,6 | 150 | 5,0 |
| [82, 97] | 2,1 | 150 | 5,0 |
| [78, 88, 91] | 2,1 | 150 | 3,0 |
| [92, 100-102, 113] | 2,1 | 100 | 3,5 |
| [99, 105] | 2,1 | 50 | 2,5; 1,7 |

Tab. 13 Charakteristika nejpoužívanějších C₈ kolon

| Zdroj | Šířka [mm] | Délka [mm] | Velikost náplně [μm] |
|-------|------------|------------|-----------------------------------|
| [86] | 4,6 | 250 | 5,0 |
| [104] | 3,0 | 150 | 5,0 |
| [92] | 2,1 | 150 | 3,5 |

2.3.1.5 Teplota kolony

Teplota kolony je volena v závislosti na vlastnostech kolony a analytů, přičemž je běžně volena laboratorní teplota. S rostoucí teplotou obvykle roste i účinnost kolony díky klesající viskozitě mobilní fáze, která zlepšuje přenos hmoty.^[110] Dochází ke snížení požadovaného tlaku, tím se umožní vyšší průtok, který vede k rychlejším analýzám. Zvýšená teplota může působit negativně na analyty, které se mohou rozkládat a tenzí par rozpouštědel mohou vznikat bubliny.^[118] Pro stanovení tetracyklinů je obvykle volena teplota kolony v rozmezí od 13 °C až 40 °C.

Tab. 14 Nejpoužívanější teploty kolon při analýze

| Zdroj | Teplota [°C] |
|------------------------------------|--------------|
| [99, 100, 102, 113] | 13-15 |
| [78, 87, 88, 91, 92, 95, 101, 123] | laboratorní |
| [93, 97, 99] | 25 |
| [84, 90, 94, 98] | 30 |

2.3.1.6 Mobilní fáze

Použitá mobilní fáze není inertní a podílí se na separačním procesu. Změny složení mobilní fáze jsou prakticky neomezené. Těmito změnami ve složení lze následně ovlivnit pH a iontovou sílu rozpouštědla. Aby se daný analyt nevyskytoval v disociované formě, musí pH mobilní fáze dosahovat hodnoty minimálně dvě jednotky od hodnoty pKa daného analytu, přičemž jsou efektivní v rozmezí ± 1 pH od jejich hodnoty pKa.^[118] Dále jsou mobilní fáze charakterizovány selektivitou a polaritou.^[109] Jako mobilní fáze se používají ve většině případů směsi dvou mobilních fází, popř. tří, přičemž jedna je vodná fáze s obsahem kyseliny, obvykle v koncentraci 20-80 mM a další jsou již polární organické rozpouštědla. Nejčastěji se používají směsi^[78, 82, 100-102, 113, 115] methanolu s kyselinou mravenčí. Dále acetonitrilu a kyseliny mravenčí^[93, 99, 105, 115], popř. s methanolem^[88, 91, 119]. Směs^[104] methanolu s acetonitrilem a vodou. Methanol s acetonitrilem a vodou s kyselinou triflouroctovou^[113, 126]. Kyselina šťavelová s acetonitrilem^[87, 89, 115, 123], popř. tato směs s methanolem^[86, 90, 92, 95, 119]. Kyselina citrónová s butanolem^[25] nebo s acetonitrilem^[84, 107]. Směs^[58] metanolu, acetonitrilu a foforečnanového pufru. Analýza residuů tetracyklinů může být problém, jelikož tetracykliny mají tendenci tvořit komplexy s kovovými ionty a vázat se na silanolové skupiny křemíkových materiálů, jako jsou kolony C₈ a C₁₈. Tomuto lze zabránit přidáním chelatačních činidel do mobilních fází.^[92, 93]

2.3.1.7 Průtoková rychlost

Průtokové rychlosti mobilní fáze kolonou jsou závislé na použité koloně (průměru, velikosti částic) a běžně se pro analýzu teracyklinů používají průtoky v rozmezí od 0,15 ml/min do 1,65 ml/min. Vyšším průtokem mobilní fáze lze značně zkrátit dobu analýzy, přičemž výška patra vzroste jen 2krát až 10krát nad optimální hodnotu.^[120]

Tab. 15 Nejčastěji používané průtokové rychlosti mobilní fáze

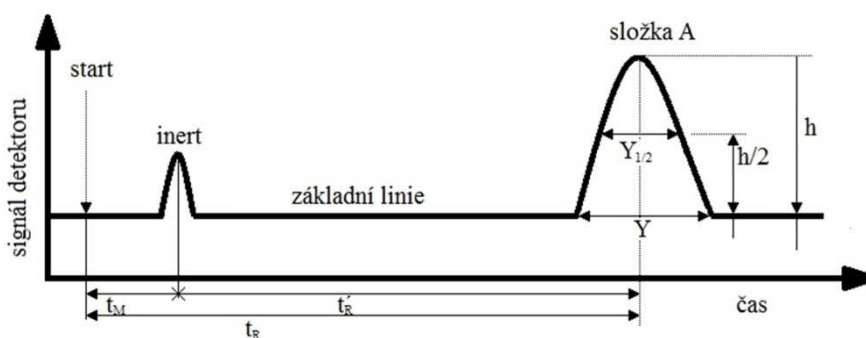
| Zdroj | Průtok [ml/min] |
|-----------------------------|-----------------|
| [25, 98-101] | 0,20 |
| [88, 92, 100, 103, 113] | 0,25 |
| [91, 93, 97] | 0,30 |
| [78, 84, 86, 116, 123, 124] | 1,00 |

2.3.1.8 Detektor

Detektory musejí být selektivní pro analyt a málo citlivé na mobilní fázi. Nejpoužívanějšími detektory jsou fotometrický, refraktometrický a fluorescenční.^[121] Výhodné je použití hmotnostního spektrometru jako detektoru.

2.3.1.9 Chromatogram

Ideální chromatogram vzniklý eluční metodou pro inert a složku A je zobrazen na Obr. 16. Účinnost separace popisuje šířka píku v základně (Y) nebo šířka píku v polovině výšky ($Y_{1/2}$), kvantitativní zastoupení složky plocha píku (A), popř. výška píku (h).



Obr. 16 Chromatogram při eluční metodě^[vytvořeno autorem; MS Paint]

Molekula složky A stráví v koloně vlivem adsorpce, iontové výměny a chemické afinity určitou dobu, která se nazývá retenční čas (t_R). Tuto dobu dělíme na čas, který molekula setrvá v mobilní fázi – mrtvý retenční čas (t_M) a čas strávený ve stacionární fázi - redukovaný retenční čas (t'_R).

$$t_R = t_M + t'_R \quad /2-1/$$

Ani v koloně, která má velký počet teoretických pater, nemusí dojít k dokonalé separaci dvou složek. K vyjádření s jakou účinností se od sebe separují složky 1 a 2 se používá veličina rozlišení ($R_{1,2}$):

$$R_{1,2} = \left| \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5 \cdot (Y_1 + Y_2)} \right| \quad /2-2/$$

Kde t_R jsou retenční časy složek 1 a 2; Y šířky píků složek 1 a 2 v základně.

2.3.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (*Capillary Electrophoresis, CE*) patří mezi separační metody, které využívají dvou elektrokinetických jevů – elektroforézy a elektroosmózy. Princip elektroforézy spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, které je vytvářeno vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. V kapilární elektroforéze je vzorek dávkován do kapiláry s elektrolytem, která je vedena přes detektor. Detektory jsou založeny na sledování absorpce ultrafialového záření a většinou využívají detektor diodového pole (*Diode Array Detector, DAD*).^[110]

Citlivost metody *CE-DAD* je špatná v důsledku omezení objemu dávkovaného vzorku a krátké délky detekčního okna. Za účelem splnění požadavku stopové nebo ultrastopové analýzy, bylo vyvinuto mnoho on-line metod pro zakoncentrování jako jsou *field-amplified sample stacking with electromigration injection (FASS-EMI)* a *transient ITP (tITP)*. Pro zvýšení citlivosti kapilární elektroforézy lze použít různé detektory včetně *MS*, laserem indukované fluorescence (*LIF*), elektrochemické (*EC*) a chemiluminiscenční (*CL*).^[112] Fyzikálně-chemické vlastnosti tetracyklinů, zejména jejich iontový charakter, rozpustnost ve vodě a více ionizačních míst je činí vhodnými pro elektroforetickou analýzu. *CE* získala na důležitosti jako analytický nástroj s vysokou účinností a rozlišením a kompatibilitou s různými detekčními systémy. Oproti metodě *HPLC* má v porovnání nižší spotřebu vzorku a rozpouštědel.^[117, 127] Tetracykliny jsou schopny být pozitivně nabity při nízkém pH. Použití metody *HPCE* je tedy výhodné.^[114, 128]

2.4 Detekce tetracyklinových antibiotik

Pro stanovení tetracyklinů ve vzorcích byly vyvinuty různé postupy, mohou být využity metody mikrobiologického přístupu, imunologických testů a instrumentální.^[112, 117]

Metody založené na mikrobiální inhibici jsou relativně pomalé, necitlivé a nespecifické na tetracykliny, kdežto imunologické metody poskytují dostatečnou selektivitu a citlivost, i když nejsou schopny detekovat všechny důležité tetracykliny používaných ve veterinární medicíně.^[129] Obě metody jsou ale finančně a časově nákladné. Oproti tomu chromatografické metody, jako je *HPLC* a *UPLC*, poskytují citlivost a specificitu stanovení pro tetracykliny, ačkoliv mají některé nevýhody, např. vysoká cena, potřeba vysoce kvalifikovaných pracovníků, požadavek na speciální zařízení a extrakční metody.

Mezi postupy pro stanovení tetracyklinů založených na měření emitovaného záření patří metody fluorescence^[130], luminiscence^[129] bakteriálních kmenů *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* a *Photobacterium luminescens*, časově podmíněná luminiscence (*Time-Resolved Luminescence, TRL*)^[131] a chemiluminiscenční metoda^[132-134]. Z imunologických metod lze použít pro stanovení tetracyklinů v medu metodu *ELISA*.^[135]

Chromatografické postupy jsou většinou založeny na kapalinové chromatografii s hmotnostní detekcí (*MS*), popřípadě tandemové hmotnostní detekci (*LC-MS/MS*). Při porovnávání metod pro analýzu antibiotik pomocí *GC-MS* a *LC-MS/MS* bylo prokázáno, že metoda *LC-MS/MS* je selektivnější a má nižší limity detekce.^[136] Tato metoda je také většinou metodou první volby při analýze tetracyklinů.^[84] Použití hmotnostního detektoru je ale finančně nákladné a proto byly publikovány metody analýzy kapalinové chromatografie s reverzní fází (*RPLC*) s různými detektory, jako jsou pro UV spektrofotometrii detektor diodového pole (*DAD*)^[25, 58, 84, 86, 87, 89, 90, 92, 95, 104, 107, 113, 117, 125, 127], fluorimetrický (*FL*)^[84, 86, 92, 94] a Rayleighova rezonančního rozptylu (*RRS*)^[90]. Levnější detektory *DAD* a *FL* postrádají ale dostatečnou citlivost, je-li vzorek ve složitější matrici. Naproti tomu *LC-ESI-MS/MS* má dobrou citlivost pro vzorky stopovým množstvím tetracyklinů a proto se této metodě dává přednost.^[92] K propojení *LC* a *MS* dochází většinou pomocí ionizace elektrosprejem (*ESI*⁺), tj. pracuje v pozitivním módu a chemické ionizace za atmosférického tlaku (*APCI*).

Pro analýzu tetracyklinů lze kromě *ESI* a *APCI* použít další ionizační metody jako je např. ionizace urychlenými atomy (*FAB*) spojená s tenkovrstvou chromatografií (*TLC*), *particle beam - negative chemical ionization (PB-NCI)* a *Collisionally Activated Decomposition*

Mass Analyser Ion Kinetic Energy Spectrometry (CAD MIKES). Metoda *CAD MIKES* poskytuje vysokou citlivost a rychlou analýzu, není však moc rozšířená a tedy je její praktická aplikace omezená. *TLC-FAB-MS* lze použít pro všechny typy vzorků, ale nedá se použít ke kvantitativní analýze. Pro analýzu tetracyklinů lze tedy doporučit pro dobrou selektivitu, citlivost a reprodukovatelnost *PB-NCI*, *APCI* a *ESI-MS/MS*.^[126]

Tetracykliny lze také analyzovat elektrochemickou oxidací stanovením voltamperometricky skleněnou uhlíkovou elektrodou (*GCE*)^[116], puslní amperometrií s bórovou elektrodou dopovanou diamantem (*BDD*)^[96], niklem implantovaným do tenkovrstvé bórové elektrody dopované diamantem (*Ni-DIA*)^[124] a bismutovou filmovou elektrodou (*BiFE*)^[137]. Bylo dokázáno, že lze zvýšit odezvu signálu tetracyklinů při elektrochemické oxidaci použitím vícevrstevných uhlíkových elektrod modifikovaných nanotrubicemi.^[116] Dále bylo zjištěno, že použití *Ni-DIA* elektrod pro elektroanalýzu tetracyklinů se dosahuje vyšší citlivosti oproti *BDD* a uhlíkovým elektrodám se skelnými vlákny.^[124]

Pro stanovení tetracyklinů v lidské moči se osvědčila metoda extrakce pevnou fází s ultraúčinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrem vybaveným kvadrupólem s analyzátozem doby letu *SPE-UPLC-QToF-MS*, která je selektivní, má dobrou výtěžnost, přesnost a správnost. Metodu ultraúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (*UPLC-MS/MS*) lze také použít pro stanovení stopových množství tetracyklinů v lidské moči.

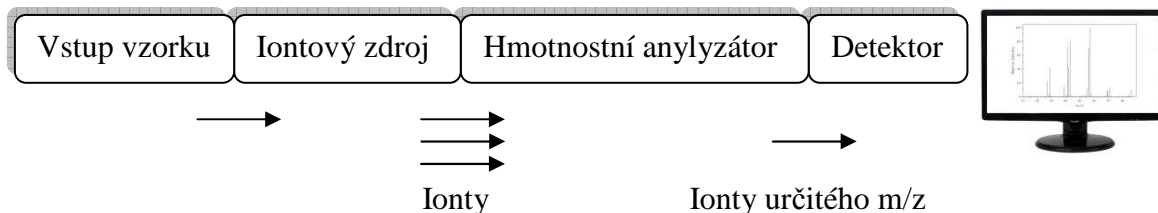
Tetracykliny patří do významné skupiny kontaminantů životního prostředí. Pro jejich analýzu v environmentálních vzorcích existuje několik metod. Metodou první volby pro stanovení těchto analytů je tedy kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (*LC-MS*) nebo kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (*LC-MS/MS*). Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu tetracyklinů pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (*LC-MS/MS*).

2.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (*Mass Spectrometry, MS*) je fyzikálně-chemická separační technika, umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzu tuhých, kapalných a plyných vzorků. Podstatou této metody je separace molekulových iontů a fragmentů analyzované látky, které vznikly například ionizací molekul nevratným odštěpením valenčních elektronů v magnetickém poli.^[138] Vzniklé ionty se následně separují podle hodnoty podílu jejich hmotnosti a náboje m/z .^[85, 110, 139, 140] Základními kroky jsou: odpaření vzorku, ionizace, akcelerace iontů do hmotnostního analyzátoru, separace iontů hmotnostním filtrem a detekce iontů.

2.5.1 Instrumentace

Hmotnostní spektrometr obsahuje součásti uvedené na Obr. 17 (vstup vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a vyhodnocovací zařízení). Zařízení pracuje za stálého vakua, přičemž pumpy běží kontinuálně tak, aby nevznikala vně zařízení vlhkost a nedocházelo ke vzájemným kolizím iontů.



Obr. 17 Schéma hmotnostního spektrometru^[vytvořeno autorem, MS Paint & MS Word]

2.5.2 Iontové zdroje

Hmotnostní spektrometr nám poskytuje informace týkající se pouze nabitých částic.^[141] Nezbytnou podmínkou analýzy je převedení zkoumaného analytu (organické, nebo anorganické molekuly) na ionizovanou formu, k tomu slouží iontový zdroj. Ionizace analytu (M) se provádí přidáním, nebo odejmutím elektronu [$M^{+\bullet}$, $M^{\bullet-}$]. Takto vzniklé ionizované formy mají stejnou molekulovou hmotnost jako původní molekula v důsledku zanedbatelně malé hmotnosti elektronu. Další způsobem ionizace analytu je přidání nebo odebrání vhodně nabitého prvku (např. H^+), který dává s analytem adukty [$M+H$]⁺ nebo [$M-H$]⁻. Takto vzniklé ionty mají odlišnou molekulovou hmotnost od původního analytu.^[109] Rozlišujeme tedy pozitivní a negativní ionizaci, přičemž v praxi se většinou

využívá ionizace pozitivní, která je více účinná. Obecný ionizační proces vystihuje rovnice /2-3/[¹⁴⁰], kde dochází k absorpci energie atomem nebo molekulou A.

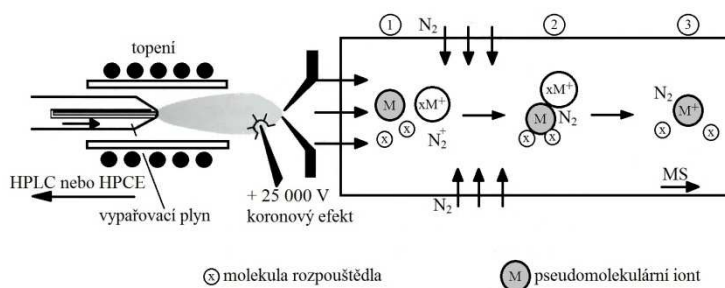


Je-li dodaná energie dostatečně velká, dojde k vypuzení elektronu z molekulárního orbitalu A a vzniká pozitivní iont A^+ . V případě uchování energie v A^+ může docházet k rozštěpení vazeb, která vede ke vzniku iontu B^+ a fragmentu C. Iont B^+ se může dále fragmentovat.

K ionizačním metodám patří např.: ionizace elektronem (EI), chemická ionizace (CI), laserová desorpce za účasti matrice (MALDI) a indukčně vázané plazma (ICP).^[142] Mezi ionizační metody, které se používají ve spojení s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií, patří ionizace za atmosférického tlaku (APCI), ionizace elektrosprejem (ESI), a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).

2.5.2.1 Chemická ionizace za atmosférického tlaku

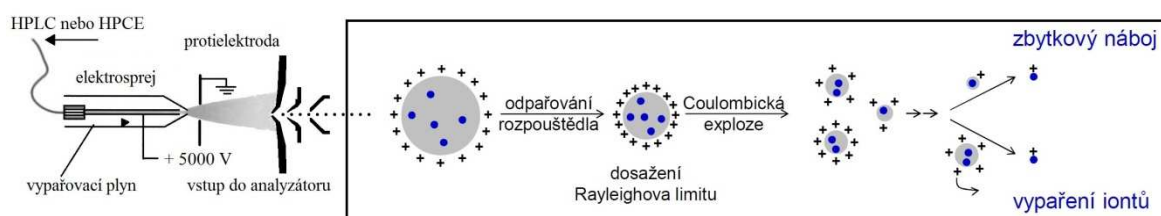
Chemická ionizace za atmosférického tlaku (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*) je metoda tvorby iontů kombinací vypařování za vysoké teploty (≈ 450 °C) a elektrického výboje (≈ 5 kV) za současného zmlžování. Jedná se o měkkou ionizační metodu a spektrum obsahuje většinou molekulové nebo pseudomolekulové ionty.^[143] Zdrojem elektronů je fólie ^{63}Ni , nebo dneska častěji korona nabitá jehly vytvořená přivedením vysokého napětí. Roztok analytu je přiveden do zahřátého rozprašovače a přeměněn v mlhu, která je unášena reakčním médiem (N_2) skrze koronu. V koruně jsou z plynu tvořeny primární ionty ($\text{N}_2^{+\bullet}$, $\text{O}_2^{+\bullet}$, $\text{H}_2\text{O}^{+\bullet}$), které reagují kolizemi s molekulami rozpouštědla a tvoří ionty H_3O^+ . Ionizace analytu probíhá skrze elektronový přenos nabitých iontových molekul plynu. Metodou APCI lze analyzovat pouze malé molekuly v rozmezí 1000 - 1500 Da, v důsledku tepla potřebného k vypařovacímu procesu v rozprašovači.^[144]



Obr. 18 Schéma chemická ionizace za atmosférického tlaku^[185]

2.5.2.2 Elektrosprej

Elektrosprej (*Electrospray Ionization, ESI*) je v současnosti nejpoužívanějším kvantovým zdrojem sprejových ionizačních technik, která se používá v kombinaci *LC-MS*. Ionizace probíhá za atmosférického tlaku, jedná se o měkkou ionizační metodu.^[143] Eluát prochází po výstupu z chromatografické kolony kapilárou, na které je vloženo napětí (typicky 2,5 - 4 kV), takže malé kapičky, které vznikají na výstupu z kapiláry, nesou vlivem vysokého gradientu elektrického pole kladný nebo záporný náboj podle polarity vloženo napětí na kapiláru. Malé kapičky (až nanometrické) produkované elektrosprejem pomocí elektrického pole mají vysoký náboj, který zabraňuje jejich vzájemnému shlukování a zároveň podporuje vlastní disperzi jednotlivých kapiček. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšení velikosti kapiček a tím ke zvýšení hustoty povrchového náboje, až nakonec kapičky dosáhnou tzv. Rayleighův nestabilní stav a podléhají sérii coulombických fůzí. Rozpadem na menší kapičky se uvolní protonovaný molekulární iont $[M + H]^+$ v pozitivní ionizaci, nebo deprotonovaný molekulární iont $[M - H]^-$ v negativní ionizaci. Fragmentované ionty bývají většinou málo intenzivní nebo zcela chybí. Náboj a velikost kapičky lze do jisté míry ovlivnit hodnotou napětí a průtoků pracovních plynů.^[85, 144]



Obr. 19 Schéma ionizace elektrosprejem^[85, 143]

2.5.2.3 Fotoionizace za atmosférického tlaku

Fotoionizace za atmosférického tlaku (*Atmospheric Pressure Photoionization, APPI*) je metoda ionizace, která zahrnuje absorpci energie ze zdroje ultrafialového záření. Ionizace je zprostředkována fotony, s energií 10 eV, emitovanými kryptonovou výbojkou ve vakuu. Energie fotonu ionizuje molekuly, které mají ionizační energii menší než 10 eV, tedy většinu analytů, ale přitom nedochází k ionizaci použitého plynu a mobilní fáze. Jedno fotonová ionizace probíhá podle následujícího schématu:



Alternativní ionizace může nastat pomocí nosného plynu, např. dusíku, který silně absorbuje UV záření:



Pro analyty je ionizační energie v rozmezí 7 - 10 eV, kdežto nosné plyny mají ionizační energie větší, viz Tab. 16. Proto analyty můžou být selektivně ionizovány bez interference ionizovaných molekul nosného plynu. Tuto metodu lze použít pro ionizaci velmi nepolárních nebo labilních sloučenin.^[144]

Tab. 16 Ionizační energie nejpoužívanějších nosných plynů pro MS

| Název prvku | Ionizační potenciál [eV] |
|-------------|--------------------------|
| Vodík | 13,6 |
| Dusík | 14,5 |
| Argon | 15,7 |
| Helium | 24,5 |

Nejvíce používaným typem ionizace je ESI^[58, 78, 88, 91-93, 97-102, 105, 112, 115, 126] a APCI^[123, 126].

2.5.3 Hmotnostní analyzátory

Role hmotnostního analyzátoru v hmotnostně spektrometrické technice je separace molekulárních iontů (M^+), $[M + H]^+$, $[M + Na]^+$ popř. $[M + K]^+$ a fragmentovaných iontů za vysokého vakua na základě různých fyzikálních principů, podle jejich poměru m/z .^[140, 144] Jako hmotnostní analyzátory se ve spojení s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií používají kvadrupóly, iontové pasti a analyzátory doby letu. Mezi další patří magnetický hmotnostní analyzátor, iontový cyklotron a orbitrap.

2.5.3.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor (*Quadrupole Mass Filter, QMF*), také kvadrupólový filtr tvoří čtyři paralelní tyče s dokonale vodivým povrchem. Protilehlé tyče jsou elektricky spojeny a na každou dvojici je vloženo stejnosměrné kladné a záporné napětí a složka vysokofrekvenčního napětí:^[142, 144]

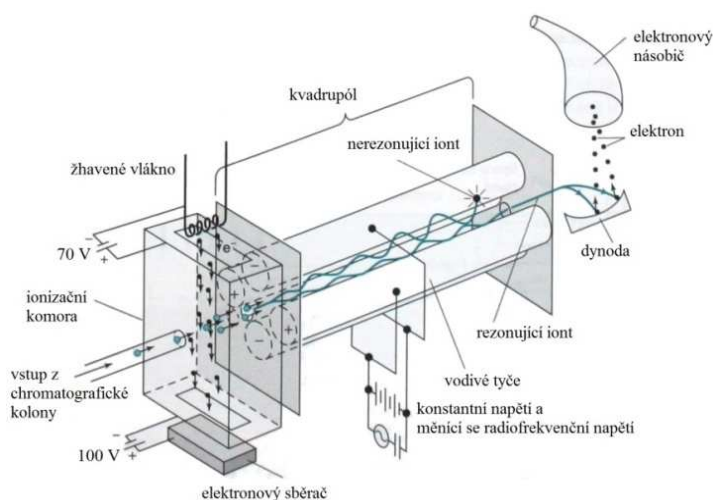
$$U + V_0 \cos \omega t \quad (\omega = 2\pi f; U/V_0 < 1) \quad /2-7/$$

Ionty vstupující do kvadrupólu se pohybují po vlnité trajektorii okolo osy x mezi jednotlivými elektrodami. Tento pohyb se dá popsat tzv. Mathieu diferenciální rovnicí, kde (x a y) jsou koordináty ve směru kolmém na osu x kvadrupólu, (e) je elementární náboj, (m) hmotnost hmoty a ($2r$) vzdálenost mezi protilehlými tyčemi:

$$\ddot{x} + 2e/mr^2 (U + V_0 \cos \omega t)x = 0 \quad /2-8/$$

$$\ddot{y} - 2e/mr^2 (U + V_0 \cos \omega t)y = 0 \quad /2-9/$$

Řešením rovnic (/2-8/ a /2-9/) dostaneme specifickou dráhu iontu s daným m/z v elektrickém poli kvadrupólu. Ionty nemající specifický poměr m/z mají nestabilní trajektorii a jsou neutralizovány při dopadu na jednu z tyčí kvadrupólu a tím pádem se nedostanou na detektor. Tedy při daném poměru U/V_0 procházejí filtrem pouze ionty určitého oboru hmotností a tento obor je tím užší a rozlišovací schopnost filtru tím větší, čím je poměr U/V_0 větší.^[120] Plynulými změnami složek napětí a frekvenčního pole se dosáhne rychlého skenu v širokém rozmezí m/z .^[142] Jeho uplatnění je dáno jeho schopností skenovat hmotnostní spektra v rozmezí 20 - 2000 Da velmi rychle během několika sekund.^[144]



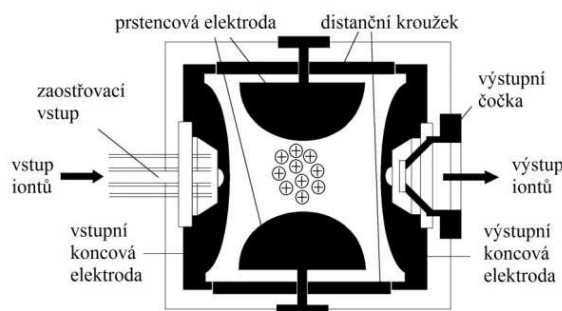
Obr. 20 Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru s elektronovou ionizací^[122]

2.5.3.2 Iontová past

Iontová past (*Ion Trap Analyzer, QIT*) vychází technologicky z kvadrupólu, ale namísto čtyř tyčí je zde kruhová elektroda a dvě koncové elektrody, které mají otvory pro ionty

vstupující do pasti a vystupující na detektor. Na kruhovou elektrodu je přivedeno radiofrekvenční napětí generující kvadrupolární pole uvnitř pasti, koncové elektrody jsou uzemněny. V pracovním módu jsou ionty přiváděny do pasti nejprve ochlazeny tlumícím plynem (např. He), čímž se docílí nízkoenergetické kolize, které termálně ochladí ionty a zmenší jejich kinetickou energii.^[145] Ionty jsou v pasti udržovány oscilací pomocí vysokofrekvenčního napětí, které je nutí stabilně oscilovat podle tzv. sekulární frekvence. Amplituda oscilací rozhoduje o poměru m/z , které budou z pasti zdrženy. Stabilita iontu závisí na jeho hmotnosti (m), náboji (z), velikosti pasti (r), oscilační frekvenci (w) a amplitudě napětí na elektrodě (V). Závislost pohybu iontu na těchto parametrech popisuje^[144]:

$$qz = 4eV/mr^2w^2 \quad /2-10/$$



Obr. 21 Schéma iontové pasti^[146]

2.5.3.3 Průletový analyzátor

Průletový analyzátor (*Time-of-flight Analyzer, ToF*) separuje urychlené ionty na základě jejich odlišné rychlosti.^[145] Když jsou ionty rozdílných molekulových hmotností urychleny stejným napětím (U), všechny získají stejnou velikost kinetické energie (E_{kin})^[142] Podle rovnice kinetické energie (/2-11/) je rychlost v (/2-12/) iontu o hmotnosti (m) a počtu nábojů (z) akcelerován potenciálem (V):

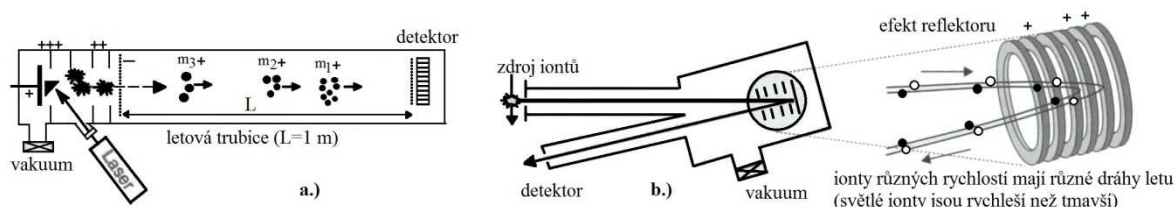
$$E_{kin} = zeU = \frac{1}{2}mv^2 \quad /2-11/$$

$$v = (2zeV/m)^{1/2} \quad /2-12/$$

Rychlost iontu je závislá na hmotnosti a proto ionty urychlené krátkým pulsem s rozdílnou hmotností (m_1, m_2, m_3, \dots), se dostanou na detektor v rozdílných časech (t) závislých na jejich rychlostech (v_1, v_2, v_3, \dots):

$$t = (m/z)/(2eV)^{1/2} \quad /2-13/$$

Čas, který iont potřebuje k dosáhnutí detektoru je roven odmocnině z m/z , proto platí čím větší molekulový iont, tím déle letí na detektor.^[144] Průletový hmotnostní analyzátor je schopen analyzovat iontové pulsy velmi rychle (až 50 000 spekter/s) a proto je používán v monitorování reakční kinetiky.^[140]



Obr. 22 Schéma analyzátoru ToF (a.) a jeho modifikace s reflektorem Re-ToF (b.)^[85]

Tab. 17 Srovnání hmotnostních analyzátorů podle jejich přesnosti, rozsahu a dosažitelného rozlišení^[142]

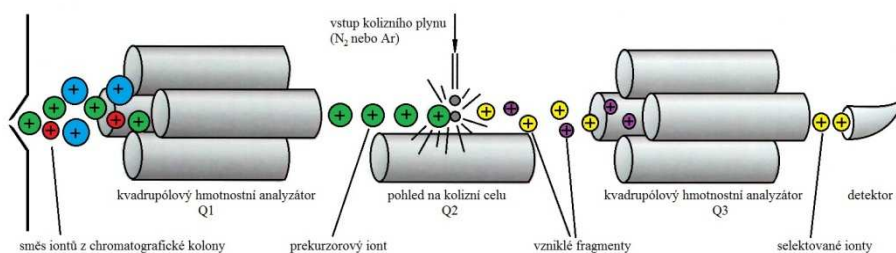
| Typ analyzátoru | Přesnost [ppm] | Rozsah [m/z] | Rozlišení [m/z] |
|----------------------------|----------------|--------------|-----------------|
| Sektorové pole (B, E, ...) | < 5 | 10 000 | 30 000 |
| Kvadrupól (QMF) | 100 | 4 000 | 4 000 |
| Iontová past (QIT) | 100 | 6 000 | 10 000 |
| Průletový (ToF) | 200 | > 300 000 | 8 000 |
| Reflektronový (Re-ToF) | 5 - 10 | 10 000 | 15 000 |
| Orbitrap | 2 - 5 | 6 000 | 150 000 |
| Cyklotron (ICR) | < 2 | 10 000 | > 150 000 |

2.5.3.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometry mohou být spojeny jako tandemové (*MS/MS*). Příkladem je trojitý kvadrupól (*Triple Quadrupole, QqQ*), který prvním kvadrupólem izoluje prekurzor, druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela a třetí kvadrupól analyzuje vzniklé fragmenty. Pro tandemovou hmotnostní analýzu rozlišujeme dva přístupy:

Tandem-in-space, kde přístroj obsahuje dva odlišné na sobě nezávislé spektrometry, od sebe fyzicky oddělené. Například sektorová pole, *QqQ* a *QqToF*.

Tandem-in-time, zde separace iontů probíhá na jednom místě a mohou probíhat několikanásobné separační kroky v průběhu času. Využívá se u *FTICR* a *QIT*.

Obr. 23 Schéma tandemové hmotnostní spektrometrie^[122]

2.5.4 Detektor Iontů

Vzhledem k přísnému požadavku pro vysokou citlivost a malý šum se jako detektory iontů v hmotnostní spektrometrii používá limitovaný počet detekčních technik. Je to dáno proudem, který chceme detekovat a většinou má hodnotu 10^{-9} A a méně.^[140] Iontové detektory převádějí proud dopadajících iontů na proud elektronů.

Faradayova miska (*Faraday cup detector*) je jednoduchý detektor, který tvoří dynoda miskovitého tvaru s povrchem z BeO nebo GaP. Dopad iontu způsobí vyražení elektronu z povrchu, který dopadá na anodu. Zesilovač zesiluje vzniklý elektrický proud, ale jeho šum omezuje citlivost tohoto detektoru.^[110]

Elektronový násobič (*Electron multiplier detector*) je dnes nejpoužívanějším jedno-kanálovým detektorem, který tvoří série až 20 elektrod nebo dynod.^[140] Když na první dynodu dopadne iont, dojde k vyražení elektronu, který je urychlen elektrickým potenciálem na další dynodu. Každý elektron svým nárazem vyrazí nové elektrony, které jsou znova urychleny na další dynodu. Tento kaskádovitý efekt proběhne přes všechny dynody a poskytne 10^6 až 10^8 násobný proud.

2.5.5 Hmotnostní spektrum

V hmotnostní spektrometrii se jako hmotnostní spektrum označuje zápis zastoupení jednotlivých rozlišených iontových druhů, charakterizovaných měrným nábojem, tedy poměrem náboje částice k její hmotnosti, častěji však poměrem hmotnosti:náboj. Hmotnost částice se obvykle vyjadřuje v atomových hmotnostních jednotkách u, popř. Da (Dalton). Náboj se udává počtem elementárních nábojů, které částice nese ($Q = z_i e$). Za předpokladu, že $z_i = 1$, je poměr $\{m\}_u / z_i e$ přímo roven relativní atomové resp. molekulové hmotnosti dané částice. Schématicky se hmotnostní spektrum znázorňuje rovnoběžnými úsečkami, jejichž poloha určuje hmotnost a délka zastoupení, vztažené k nejčetnějšímu iontovému druhu spektra.^[120]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- I. Zpracování literární rešerše výskytu a analýzy tetracyklinových antibiotik.
- II. Optimalizace a validace metody UPLC – MS/MS pro tetracyklinová antibiotika:
 - Tetracyklin (TC),
 - Chlortetracyklin hydrochlorid (CTC),
 - Oxytetracyklin hydrochlorid (OTC) a
 - Doxycyklin hydrochlorid (DC).
- III. Analýza možných reálných vzorků a jejich vyhodnocení.
- IV. Zhodnocení výsledků a přínosu práce.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje, chemikálie a software

4.1.1 UPLC-MS/MS systém pro analýzu

Vysoceúčinný kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000, Německo

Hmotnostní spektrometr API 2000 od firmy AB Sciex, USA

Analytická kolona s předkolonou ZORBAC RRHD Eclipse Plus C18 (3 x 50 mm, 1,8 µm), Agilent Technologies, USA

Generátor dusíku NM20Z, Peak Scientific

4.1.2 Zařízení a materiál použitý pro extrakci vzorků

Centrifuga EBA 21, Hettich

SPE Vacuum manifold, 12 positions set, Phenomenex

Membránová vývěva N86KN.18/IP20, KNF Neuberger GmbH

SPE Oasis[®] HLB 6cc (200 mg) Extraction cartridges, Waters, USA

pH metr CyberScan pH 510, Eutech Instruments

Běžné vybavení analytické laboratoře

4.1.3 Použité chemikálie

Methanol HPLC grade, Fischer Scientific

Acetonitril CHROMASOLV[®] Plus, for HPLC, ≥ 99,9 % - Sigma-Aldrich

Kyselina mravenčí CHROMASOLV[®], for LC-MS, ≥ 98 % - Sigma-Aldrich

Milli-Q voda upravená přístrojem The aquaMAX[™] Ultra 370 Series

Kyselina trichloroctová, p.a., Sigma-Aldrich

Kyselina citrónová, monohydrát, p.a., Sigma-Aldrich

Hydrogenfosforečnan disodný, dihydrát, p.a., Sigma-Aldrich

Chelaton III (disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové), p.a., Sigma-Aldrich

4.1.4 Použité standardy

Tetracyklin (*TC*), ≥ 98 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Chlortetracyklin hydrochlorid (*CTC*), ≥ 75 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Oxytetracyklin hydrochlorid (*OTC*), ≥ 95 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Doxycyklin hydrochlorid (*DC*), ≥ 98 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

4.1.5 Software použitý pro zpracování a prezentaci dat

Analyst[®] Software, AB Sciex, USA

Dionex[™] Chromeleon[™] 6.8 Chromatography Data System from Thermo Fisher Scientific, USA

Microsoft[®] Office Word 2010, Microsoft Corporation, USA

Microsoft[®] Office Excel 2010, Microsoft Corporation, USA

Microsoft[®] Office Paint, Microsoft Corporation, USA

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Příprava roztoků pro extrakci tetracyklinů z mléka

Pro srážení makromolekul v mléce byl připraven roztok 20 % kyseliny trichloroctové v Milli-Q vodě (w/v).

Pro extrakci analytů byl připraven McIlvain pufr; 1 litr; pH 3,5

- kyselina citrónová 11,8 g
- hydrogenfosforečnan disodný dihydrát 13,72 g
- Na₂EDTA 33,62 g

4.2.2 Příprava standardů

Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním naváženého množství standardů v MeOH na přibližnou koncentraci 1 - 2 mg·ml⁻¹. Skutečná koncentrace byla přepočítána vzhledem k čistotě analytů a navážce. Z důvodů poklesů intenzit byly zásobní roztoky každé 3 měsíce připravovány čerstvé. Veškeré roztoky připravené v MeOH byly skladovány v mrazničce zabalené v alobalu.

Pro optimalizaci MS a LC-MS byly použity pracovní standardy o koncentraci 1 a 5 µg·ml⁻¹, které byly připraveny ředěním zásobních roztoků do směsi MeOH a 0,1% HCOOH v poměru 1:1. Pracovní standardy byly připravovány čerstvé, vždy před plánovanými 2 týdenními experimenty.

Pro přípravu kalibračních roztoků byly připraveny nejprve ředěním zásobních roztoků standardy s koncentrací 5 µg·ml⁻¹ v roztoku MeOH. Dalším ředěním do MeOH vznikly kalibrační roztoky o koncentraci 25; 50; 100; 250 a 500 ng·ml⁻¹. Skladovány byly v ledničce při 4 °C bez přístupu světla, stejně jako pracovní roztoky.

Stabilita připravených roztoků byla zkoumána v závislosti na čase, viz kapitola 5.4.

4.2.3 Příprava vzorků a izolace analytů

Extrakční postup analytů z mléka byl převzat a upraven z validační práce Cinquina, A. L., *et al.*^[86]

Do 50 ml polypropylénové centrifugační zkumavky bylo k alikvotu 5 ml homogenizovaného a pasterizovaného mléka přidáno známé množství tetracyklinových antibiotik. Naspikovaný vzorek byl vortexován po dobu 1 min pro dokonalou distribuci analytů v matrici. Následně byly přidány 2 ml 20 % kyseliny trichloroctové a vzorek byl třepán 5 minut. Po přidavku 20 ml McIlvain pufru byla směs vortexována po dobu 1 min a centrifugována při 6000 rpm po dobu 15 minut.

Postup pro extrakci na tuhou fázi (SPE kolonky Oasis[®] HLB) byl následující:

- Postupná aktivace kolonky 3 ml MeOH a 2 ml Milli-Q vody
- Aplikace supernatantu; 1,5 ml·min⁻¹
- Promytí 4 ml Milli-Q vody
- Sušení 1 min do sucha proudem vzduchu
- Eluce TCAs 3 ml MeOH

Zakoncentrování proběhlo v termobloku při 40 °C pod proudem dusíku do sucha. Residua byla rozpuštěna v 1 ml MeOH a do doby analýzy byly skladovány v mrazničce. Před injektováním do UPLC systému byly vzorky filtrovány přes Nylonový filtr (0,22 µm; průměr 13 mm).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

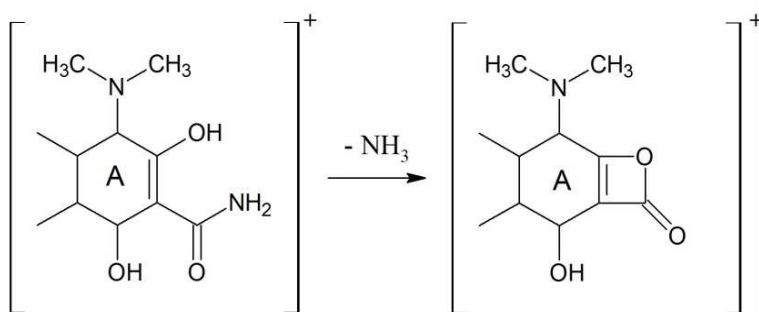
5.1 Optimalizace hmotnostní detekce pro vybrané tetracykliny

Před analýzou reálných vzorků z biogenních matric bylo nutné optimalizovat nejprve hmotnostní spektrometr, tj. vhodně nastavit parametry.

Standardní roztoky tetracyklinových antibiotik byly dávkovány do MS pomocí přímého nástřiku. V rámci optimalizace byla využita pouze jednoduchá hmotnostní spektrometrie pro základní nastavení přístroje. Poté bylo nastavení jen lehce upraveno pro využití tandemové hmotnostní spektrometrie. Měření probíhalo v MRM módu (*Multiple Reaction Monitoring*). Průtok byl nastaven na hodnotu $3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Z provedené rešerše bylo zjištěno, že Tetracyklin a Oxytetracyklin v pozitivním ESI MS módu poskytují protonovaný molekulární iont $[\text{M}+\text{H}]^+$, který byl vždy zvolen jako prekurzor. Dále byly přítomny produktové ionty, které vykazovaly ztrátu 18 Daltonů (*Da*), jež odpovídaly neutrální ztrátě molekuly H_2O ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$) a následně iont s další neutrální ztrátou molekuly NH_3 ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3+\text{H}]^+$) odpovídající celkové ztrátě 35 *Da*.

Ačkoliv nejvíce bazickým místem těchto antibiotik je dimethyl aminová skupina, dominantní ztráta protonovaných molekul při nízkých kolizních energiích je právě zmiňované odštěpení vody a amoniaku. Ke ztrátě vody dochází za přítomnosti hydroxylové skupiny v poloze C-6 obecné struktury TCAs (viz Obr. 1). K odštěpení amoniaku dochází z karboxy-amidové skupiny v poloze A-2 podle navrhovaného reakčního schématu uvedeného na Obr. 24.



Obr. 24 Reakční schéma odštěpení NH_3 z iontu $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ ^[78]

Chlortetracyklin a Doxycyklin v pozitivním ESI MS módu poskytují jako prekurzor také protonovaný molekulární iont $[\text{M}+\text{H}]^+$. Produktové ionty vykazovaly ztrátu 17 anebo

35 Da, jež odpovídaly neutrální ztrátě NH_3 ($[\text{M}-\text{NH}_3+\text{H}]^+$) a s následnou neutrální ztrátou molekuly H_2O ($[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3+\text{H}]^+$).

Veškeré nalezené a identifikované exaktní hmoty se shodují s těmi v provedené rešerši. Jejich sumarizace a celočíselné molekulové hmotnosti jsou uvedeny v Tab. 18, stejně tak jsou pro zjednodušení uváděny i popisky spekter.

Tab. 18 Pozorované ionty tetracyklinových antibiotik při optimalizaci MS (Q1)

| Analyt | Prekurzorový iont [m/z] | Produktový iont [m/z] | Odštěpení |
|--------|-------------------------|-----------------------|--|
| TC | 445 | 427 | $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ |
| | | 410 | $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3+\text{H}]^+$ |
| CTC | 479 | 462 | $[\text{M}-\text{NH}_3+\text{H}]^+$ |
| | | 444 | $[\text{M}-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ |
| OTC | 461 | 443 | $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ |
| | | 426 | $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3+\text{H}]^+$ |
| DC | 445 | 428 | $[\text{M}-\text{NH}_3+\text{H}]^+$ |
| | | 410 | $[\text{M}-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ |

V rámci optimalizace tetracyklinů byly měněny parametry MS při přímém nástřiku:

| | | |
|---|---------------------------------------|----------------------------------|
| IS - <i>IonSpray Voltage</i> | pozitivní ionizace + 4 000 až + 5 500 | [V] |
| | negativní ionizace - 4 500 až - 3 000 | [V] |
| CUR - <i>Curtain gas</i> | 10 - 30 | $[\text{l}\cdot\text{min}^{-1}]$ |
| DP - <i>Declustering potential</i> | 0 - 150 | [V] |
| CEP - <i>Collision Entrance Potential</i> | 0 - 100 | [V] |
| EP - <i>Entrance Potential</i> | 0 - 12 | [V] |
| FP - <i>Focusing Potential</i> | 50 - 370 | [V] |

Optimalizace MS pro jednotlivé tetracykliny (Tetracyklin (TC), Chlortetracyklin hydrochlorid (CTC), Oxytetracyklin hydrochlorid (OTC), Doxycyklin hydrochlorid (DC)) jsou uvedeny v jednotlivých podkapitolách 5.1.1 - 5.1.4. Cílem bylo najít právě takové podmínky, aby měl protonovaný molekulární iont $[\text{M}+\text{H}]^+$ největší intenzitu, produktové ionty $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ nebo $[\text{M}-\text{NH}_3+\text{H}]^+$ a $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3+\text{H}]^+$ intenzitu co nejmenší a také aby byl v pozadí co nejmenší šum.

5.1.1 Optimalizace stanovení Tetracyklinu

5.1.1.1 Pozitivní ionizace

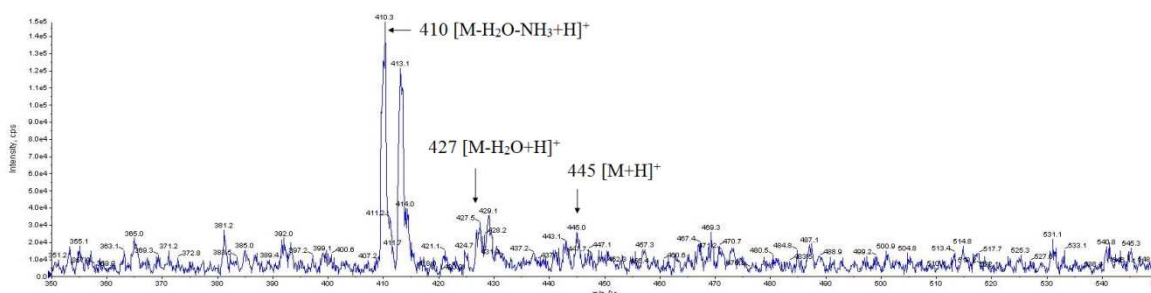
Při pozitivní ionizaci přímého nástřiku tetracyklinu o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ byla nejprve sledována intenzita signálu při změně napětí na kapiláře (IS, viz Tab. 19), ostatní parametry byly ponechány defaultně nastavené výrobcem ($\text{CUR } 10 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$, DP 80 V).

Tab. 19 Změna intenzity signálu TC [cps; 10^3] při změně IS

| IS [V] \ [m/z] | 5500 | 5250 | 5000 | 4750 | 4500 | 4250 | 4000 |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 410 | 190 | 150 | 160 | 160 | 160 | 130 | 110 |
| 427 | 41 | 39 | 27 | 40 | 32 | 24 | 32 |
| 445 | 47 | 35 | 30 | 34 | 26 | 23 | 29 |

poznámka: cps - count per second; veškeré hodnoty jsou uvedeny na exponent 10^3

Z Tab. 19 lze vyčíst, že se snižujícím se napětím klesá intenzita signálu. Pro další experimenty bylo ponecháno nastavení +4500 V z důvodu porovnání s negativní ionizací.



Obr. 25 Hmotnostní spektrum TC $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (IS +4500 V)

Na Obr. 25 je uvedeno profilové hmotnostní spektrum tetracyklinu při pozitivní ionizaci. Ve spektru lze obtížně identifikovat iont s 445 m/z (Da). Také jsou zde dva produktové ionty 427 m/z a 410 m/z. Iont 410 má ze všech detekovaných iontů tetracyklinu největší intenzitu při daných experimentálních podmínkách. Nastavení doporučené výrobcem nebylo optimální, jelikož při daném nastavení byly upřednostňovány produktové ionty.

Dalším měněným parametrem byl průtok plynu (CUR, viz Tab. 20), dusíku, jenž napomáhá odpařování rozpouštědla z vytvořených kapiček v elektrospreji. Zvýšení průtoku v tomto případě nevedlo ke zvýšení intenzity signálu. Snížení šumu na pozadí nebylo v těchto experimentech pozorováno, a proto nebyl podrobněji tento parametr zkoumán a bylo pro pozdější měření použito nastavení doporučené výrobcem.

Tab. 20 Změna intenzity signálu TC [cps; 10^3] při změně CUR

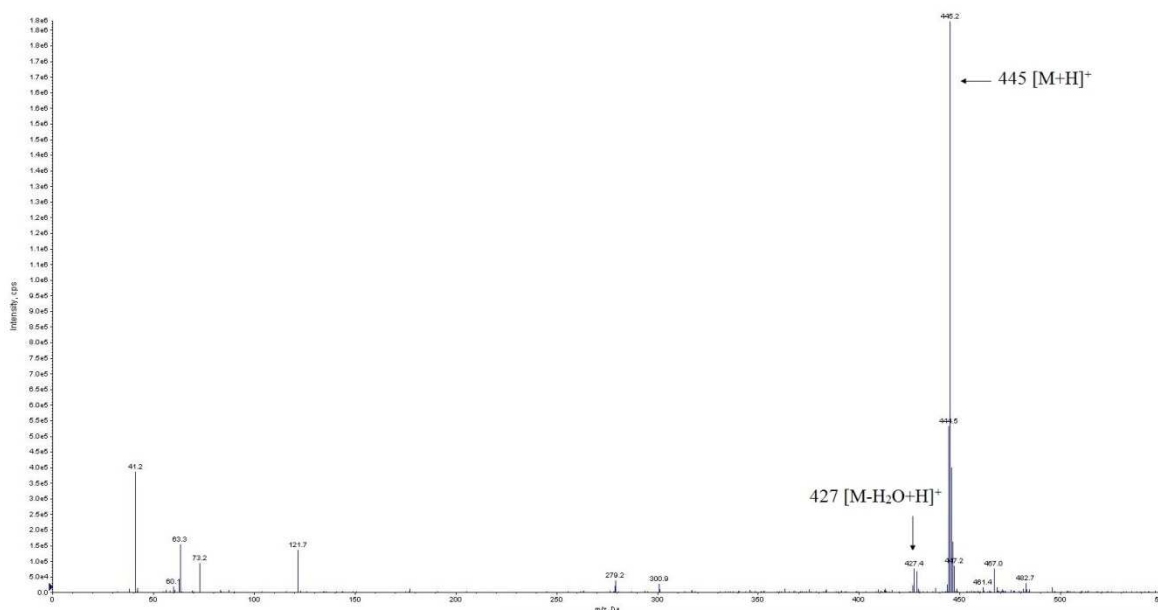
| CUR [$\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$] | 10 | 12 | 14 | 16 | 20 |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| [m/z] | | | | | |
| 410 | 160 | 140 | 140 | 130 | 110 |
| 427 | 32 | 31 | 30 | 30 | 26 |
| 445 | 26 | 26 | 21 | 18 | 20 |

Velmi důležitým měněným parametrem byl deklasterační potenciál (DP, Tab. 21), jenž značí rozdíl potenciálu mezi clonami, *skimmer cone* a *orifice plate*. Čím vyšší napětí, tím vyšší je fragmentace analytu ve prospěch produktových iontů uvedených v Tab. 18. Z podmínek nastavení přístroje výrobcem je ve spektru (Obr. 25) vidět že dochází k příliš velké tvorbě produktových iontů v neprospěch prekurzoru, hmota 445 m/z. Proto byl tento parametr zkoumán postupným snižováním od hodnoty doporučované výrobcem, 80 V, až na hodnotu 5 V. Naměřené hodnoty intenzit sledovaných iontů při daném nastavení deklasteračního potenciálu je uvedeno v Tab. 21.

Můžeme si povšimnout, že optimální hodnota deklasteračního potenciálu leží mezi 20 ($5,3\cdot 10^5$ cps) a 10 V ($5,0\cdot 10^5$ cps) pro nejintenzivnější signál hmoty 445 m/z. Bylo tedy žádoucí podrobnější zkoumání, uvedené v podkapitole 5.1.5.

Tab. 21 Změna intenzity signálu TC [cps; 10^3] při změně DP

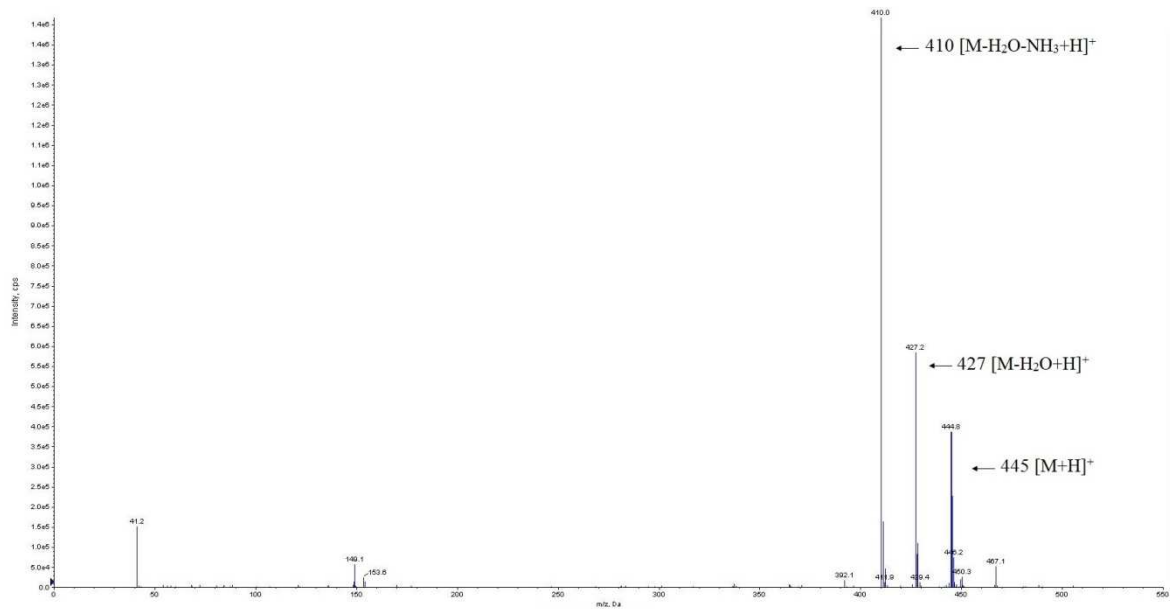
| DP [V] \ [m/z] | 80 | 60 | 40 | 20 | 10 | 5 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 410 | 160 | 320 | 450 | 170 | 55 | 35 |
| 427 | 32 | 66 | 180 | 180 | 130 | 88 |
| 445 | 26 | 45 | 180 | 530 | 500 | 480 |



Obr. 26 Hmotnostní spektrum TC $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (IS +4500 V, DP 10 V)

Na Obr. 26 je uvedeno čárové profilové hmotnostní spektrum tetracyklinu ($5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) při pozitivní ionizaci s nízkou hodnotou deklasteračního potenciálu. Ve spektru je patrný základní pík spektra prekurzorového iontu s 445 m/z s největší intenzitou při daných experimentálních podmínkách. Také je zde patrný produktový iont s 427 m/z . Ve spektru jsou také přítomny ionty 467 a 483 m/z , oba s velmi nízkými intenzitami. Tyto ionty mohou patřit aduktům tetracyklinu $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a $[\text{M}+\text{K}]^+$.

Pro porovnání je na Obr. 27 uvedeno hmotnostní spektrum tetracyklinu při vyšší hodnotě deklasteračního potenciálu. Ve spektru jdou jednoznačně určit všechny hledané ionty: 410, 427 a 445 m/z.

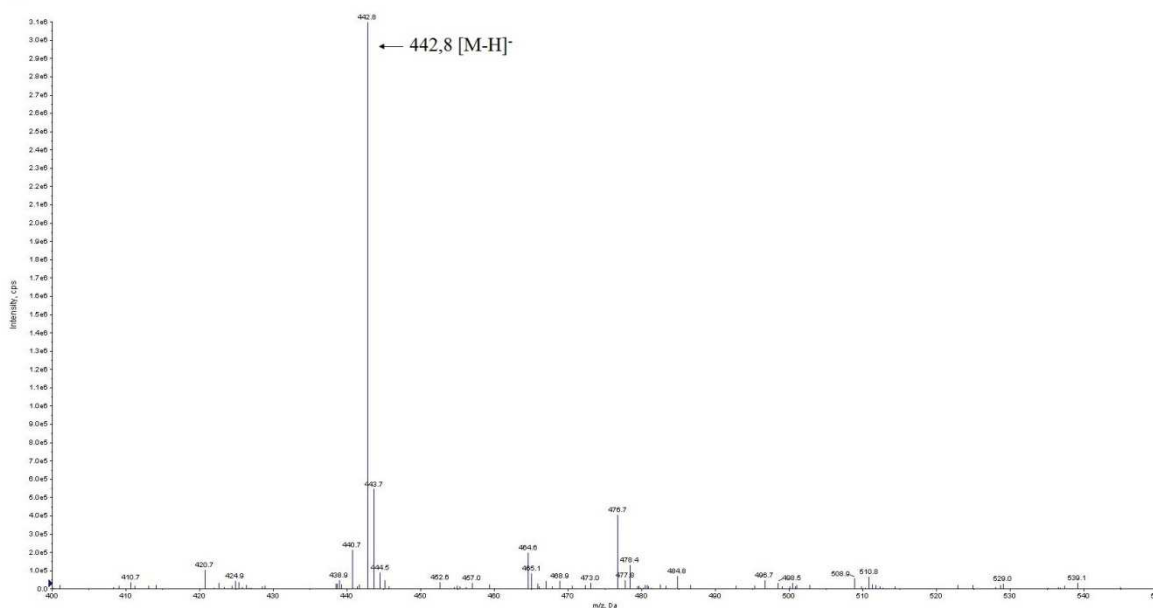


Obr. 27 Hmotnostní spektrum TC $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (IS +4500 V, DP 40 V)

5.1.1.2 Negativní ionizace

Pro srovnání s ionizací pozitivní byla změřena i negativní ionizace. V praxi se pro detekci těchto antibiotik ale negativní ionizace nevyužívá, a proto byla optimalizace provedena v ESI^+ módu (literatura poskytuje velké množství dat, a to spekter jak základních sloučenin tak i MS/MS fragmentů).

V negativní ionizaci byly hledány exaktní hmoty iontu $[M-H]^-$. V hmotnostním spektru zobrazeném na Obr. 28 lze snadno identifikovat základní pík spektra s 442,8 m/z, který patří deprotonovanému molekulárnímu iontu tetracyklinu. Ostatní ionty, které mohly vzniknout odštěpením molekul amoniaku nebo vody, nebyly za daných podmínek nastavení přístroje ve spektru identifikovány.

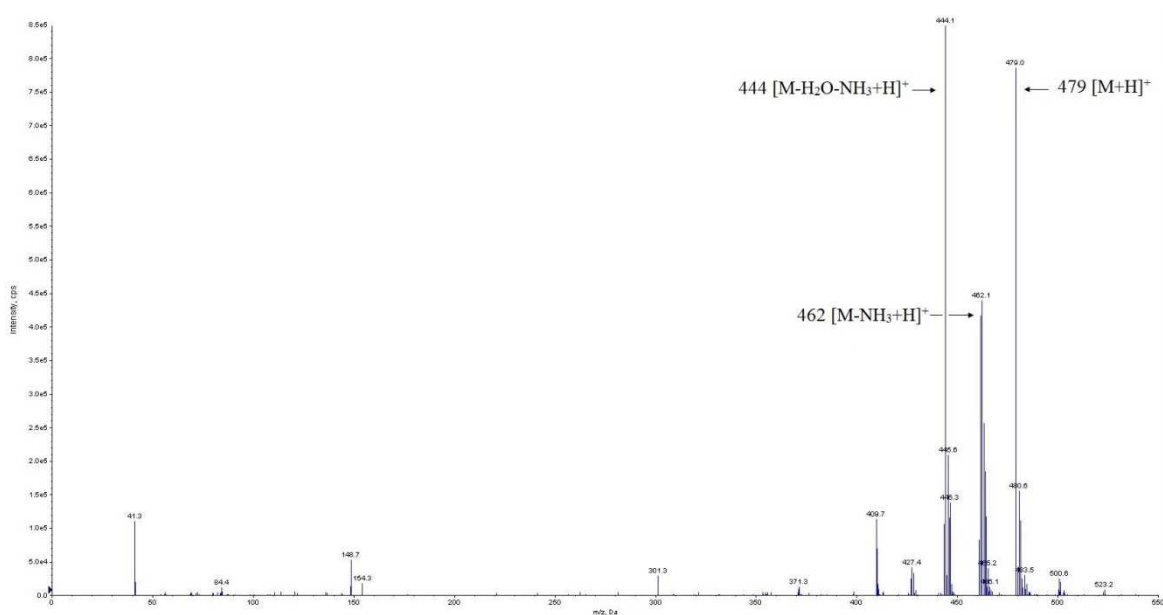


Obr. 28 Hmotnostní spektrum TC 1 mg·l⁻¹ (IS -4500 V, DP 10 V)

5.1.2 Optimalizace stanovení Chlortetracyklinu

5.1.2.1 Pozitivní ionizace

Při pozitivní ionizaci přímého nástřiku chlortetracyklinu byla také sledována intenzita signálu při změně napětí na kapiláře (IS), ostatní parametry byly ponechány defaultně nastavené výrobcem jako v předchozím případě při optimalizaci tetracyklinu. Z naměřených dat byla pozorována snižující se intenzita signálu se snižujícím se napětím.



Obr. 29 Hmotnostní spektrum CTC 5 mg·l⁻¹ (IS + 4500 V, DP 40V)

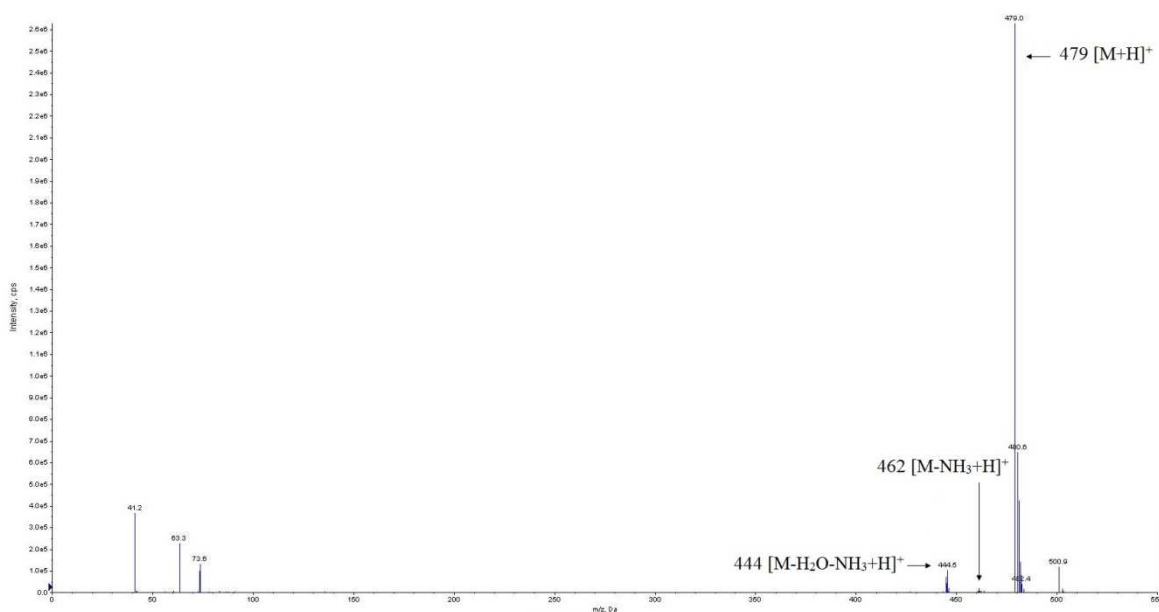
Na Obr. 29 je uvedeno pro lepší přehlednost hmotnostní spektrum chlortetracyklinu o koncentraci 5 mg·l⁻¹ při pozitivní ionizaci. Ve spektru lze snadno identifikovat prekurzorový iont s 479 m/z. Také jsou zde dva produktové ionty 462 m/z a 444 m/z vzniklé postupným odštěpováním amoniaku a vody z prekurzorového iontu. Iont 501 m/z může opět jako v případě tetracyklinu patřit aduktu chlortetracyklinu [M+Na]⁺.

Změny intenzit signálu sledovaných iontů při změně deklasteračního potenciálu jsou uvedeny v Tab. 22, kde je viditelné, že nižší napětí vedlo ke snížení intenzit produktových iontů ve prospěch zvýšení intenzity iontu prekursoru, hmota 479 m/z. Stejně jako v předchozím případě můžeme soudit, že optimální hodnota deklasteračního potenciálu může být v rozsahu 20 a 10 V (intenzity $4,4 \cdot 10^5$ cps a $4,6 \cdot 10^5$ cps).

Tab. 22 Změna intenzity signálu CTC [cps; 10^3] při změně DP

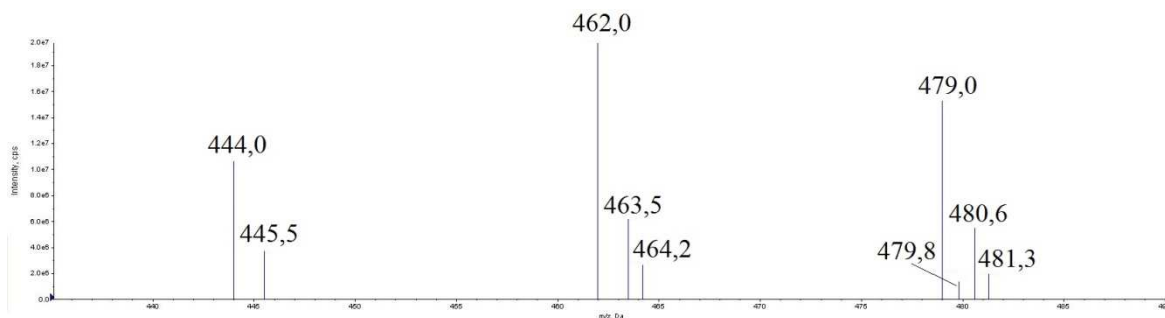
| DP [V] \ [m/z] | 80 | 60 | 40 | 20 | 10 | 5 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 444 | 120 | 230 | 250 | 74 | 23 | 20 |
| 462 | 67 | 140 | 240 | 120 | 47 | 32 |
| 479 | 18 | 49 | 240 | 440 | 460 | 360 |

Na Obr. 30 je uvedeno hmotnostní spektrum, které bylo měřeno s vyšší koncentrací analytu při hodnotě deklasteračního potenciálu 10 V. Ve spektru je patrný základní pík spektra patřící prekursorovému iontu 479 m/z. Produktové ionty 462 a 444 m/z jsou ve spektru přítomny, ale dosahují velmi nízkých intenzit.



Obr. 30 Hmotnostní spektrum CTC $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (IS +4500 V, DP 10 V)

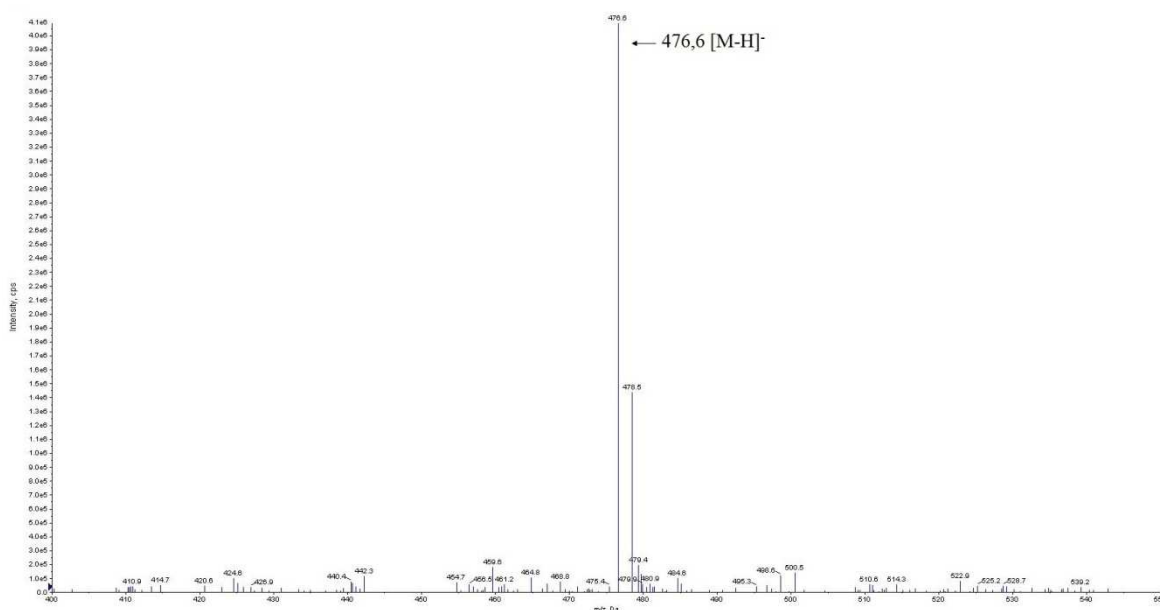
V hmotnostních spektrech stanovovaných tetracyklinů byly pozorovány hmoty a na ně vázané hmoty o jednotky m/z vyšší. Tyto hodnoty odpovídají izotopickým píkům ukazujícím na přítomnost dvou uhlíků ^{13}C a kyslíku ve formě ^{16}O , ^{17}O a ^{18}O . Tento trend je patrný na hmotnostním spektru chlortetracyklinu (Obr. 31) a dále pak na spektrech jednotlivých teracyklinů v příloze.



Obr. 31 Hmotnostní spektrum CTC 5 mg·l⁻¹ (detail pozorovaných hmot)

5.1.2.2 Negativní ionizace

Negativní ionizace chlortetracyklinu je zobrazena na Obr. 32. V uvedeném hmotnostním spektru byl identifikován základní pík spektra s 476,6 m/z , který patří deprotonovanému molekulárnímu iontu chlortetracyklinu, tedy $[\text{M-H}]^-$.

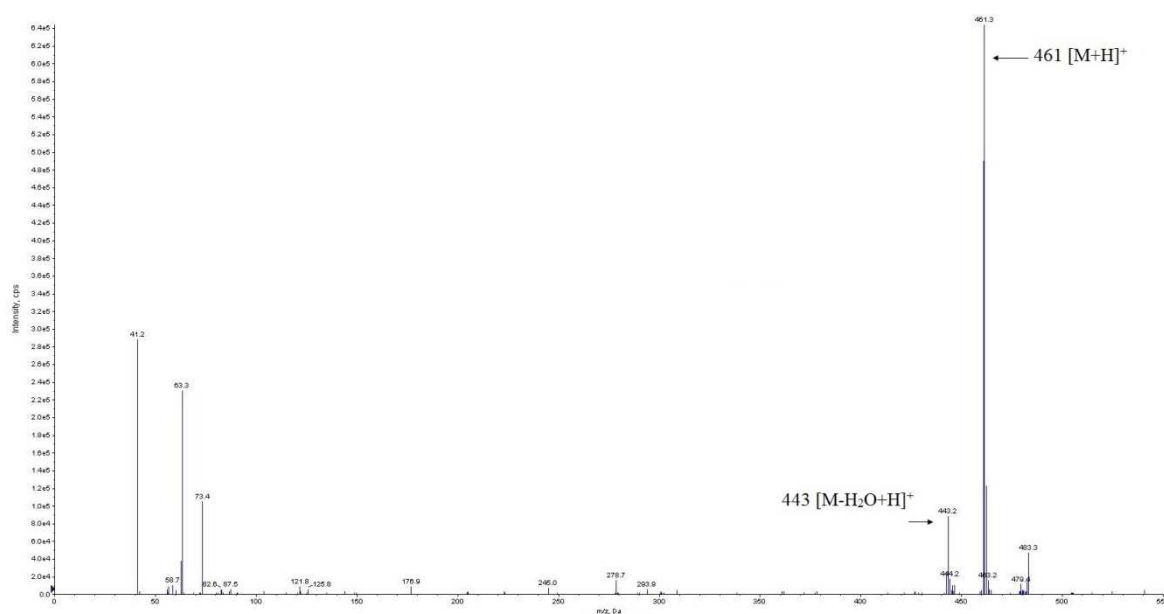


Obr. 32 Hmotnostní spektrum CTC 5 mg·l⁻¹ (IS -4500 V, DP 10 V)

Tab. 23 Změna intenzity signálu OTC [cps; 10^3] při změně DP

| DP [V] \ [m/z] | 80 | 60 | 40 | 20 | 10 | 5 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 426 | 100 | 290 | 400 | 140 | 57 | 30 |
| 443 | 30 | 60 | 150 | 160 | 110 | 74 |
| 461 | 20 | 37 | 140 | 380 | 410 | 360 |

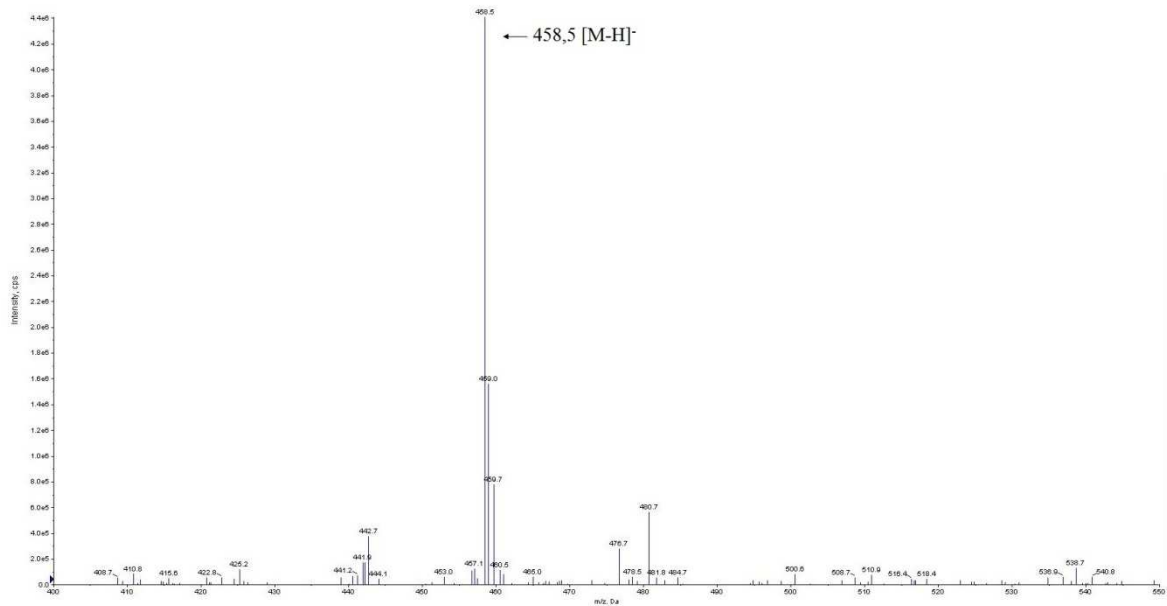
Hmotnostní spektrum oxytetracyklinu, při nižší hodnotě deklasteračního potenciálu je uvedeno na Obr. 34, kde lze snadno identifikovat základní pík spektra prekurzorového iontu 461 m/z. Ve spektru je také identifikovatelný iont 443 m/z a možný adukt $[M+Na]^+$ s 483 m/z.



Obr. 34 Hmotnostní spektrum OTC 5 mg·l⁻¹ (IS +4500 V, DP 10 V)

5.1.3.2 Negativní ionizace

Na Obr. 35 je pro srovnání s pozitivní ionizací ionizace negativní. Ve spektru je patrný signál hmoty výrazně převyšující šum s 458,5 m/z, který patří deprotonovanému molekulárnímu iontu oxytetracyklinu, $[M-H]^-$.



Obr. 35 Hmotnostní spektrum OTC 5 mg·l⁻¹ (IS -4500 V, DP 10 V)

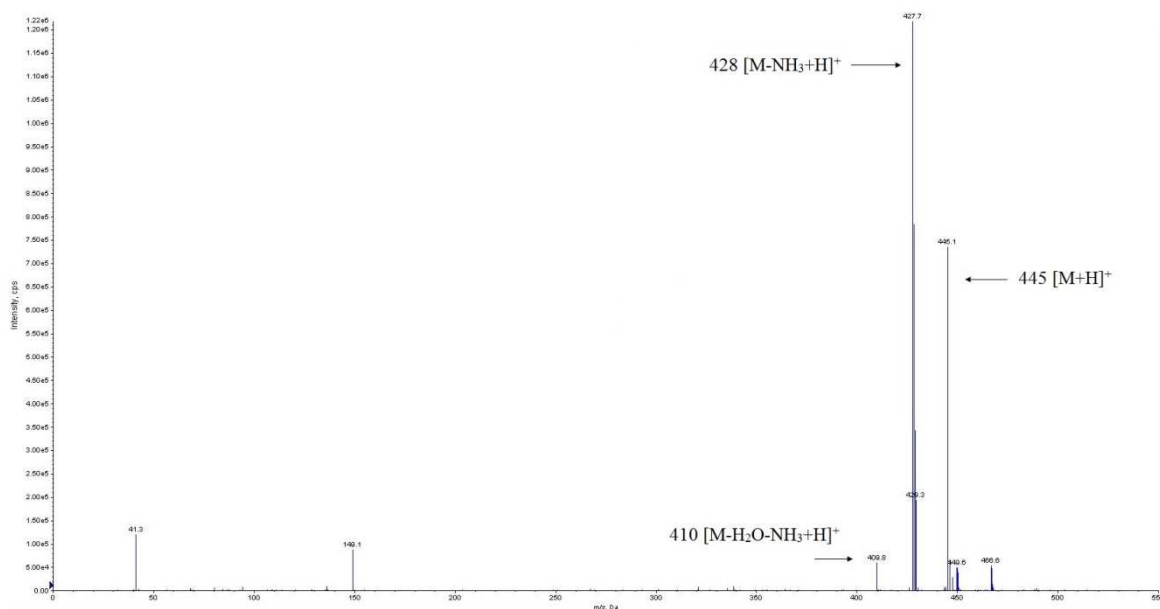
5.1.4 Optimalizace stanovení Doxycyklinu

5.1.4.1 Pozitivní ionizace

Intenzity sledovaných iontů při pozitivní ionizaci přímého nástřiku doxycyklinu o koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ jsou uvedeny v Tab. 24, kde si můžeme povšimnout změny intenzity oproti ostatním analytům. Doxycyklin totiž v pozitivní ionizaci netvoří intenzivní signál pro hmotu 410 m/z ($[M-H_2O-NH_3+H]^+$), ale pro hmotu 428 m/z ($[M-NH_3+H]^+$), viz Obr. 36.

Tab. 24 Změna intenzity signálu DC [cps; 10^3] při změně IS

| IS [V] \ [m/z] | 5500 | 5250 | 5000 | 4750 | 4500 | 4250 | 4000 |
|----------------|------|------|------|------|------|------|------|
| 410 | 15 | 20 | 48 | 47 | 41 | 41 | 44 |
| 428 | 330 | 310 | 240 | 260 | 260 | 240 | 230 |
| 445 | 50 | 69 | 44 | 40 | 39 | 48 | 51 |



Obr. 36 Hmotnostní spektrum DC $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (IS + 4500 V, DP 40V)

Na Obr. 36 je uvedeno profilové hmotnostní spektrum doxycyklinu, v jehož spektru je snadno identifikovatelný prekurzorový iont s 445 m/z. Také lze identifikovat dva

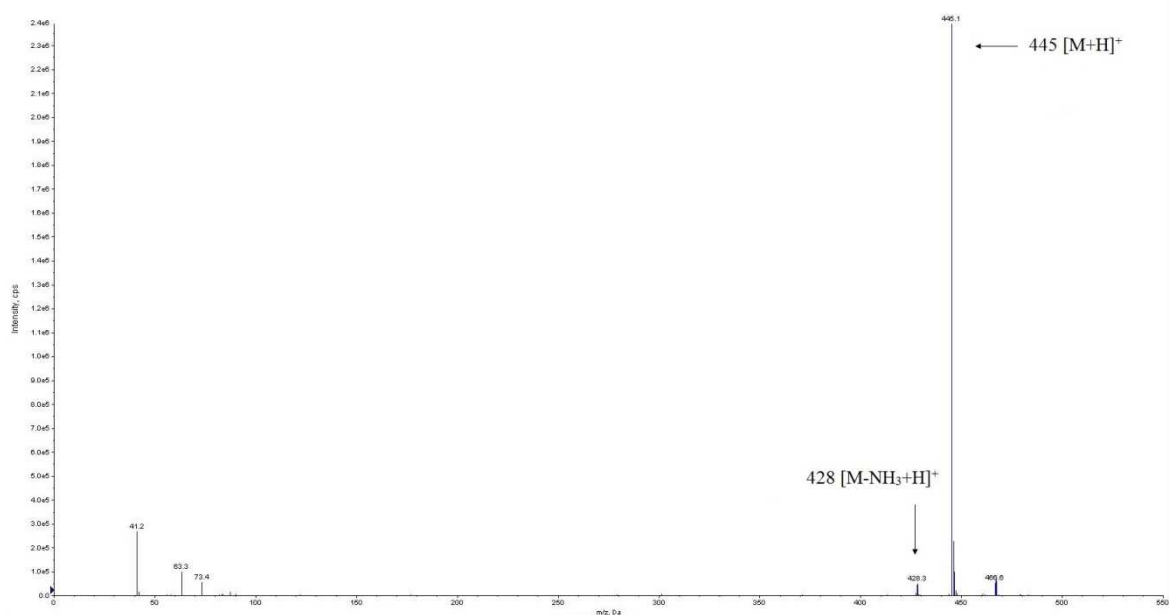
produktové ionty 410 m/z a 428 m/z, který má ze všech detekovaných iontů největší intenzitu při daných podmínkách, tedy iont vzniklý odštěpením amoniaku z prekurzorového iontu. Iont 410 m/z má ovšem i přes koncentraci standardu $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, velmi nízkou intenzitu. Tato skutečnost byla v očekávání, jelikož tato hmota nebyla potvrzována ve většině případů v provedené rešerši. Je to z důvodu že doxycyklin neobsahuje hydroxylovou skupinu v poloze C-6 a tedy nedochází k odštěpování vody. Ačkoliv při vyšší koncentraci, $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, je možné daný iont nalézt. Ve spektru je také iont s 467 m/z, který může patřit aduktu doxycyklinu $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Naměřené intenzity doxycyklinu při změně deklasteračního potenciálu jsou uvedeny v Tab. 25, kde se snižujícím se napětím se mění poměr intenzit ve prospěch hmoty 445 m/z. Optimální hodnota pro nejintenzivnější signál prekurzoru, hmoty 445 m/z, je přibližně v rozmezí hodnot 20 a 10 V, s intenzitami $7,2\cdot 10^5$ cps pro koncentraci $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab. 25 Změna intenzity signálu DC [cps; 10^3] při změně DP

| DP [V] \ [m/z] | 80 | 60 | 40 | 20 | 10 | 5 |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 410 | 41 | 59 | 41 | 10 | 11 | 10 |
| 428 | 260 | 630 | 940 | 340 | 160 | 89 |
| 445 | 39 | 97 | 330 | 720 | 720 | 610 |

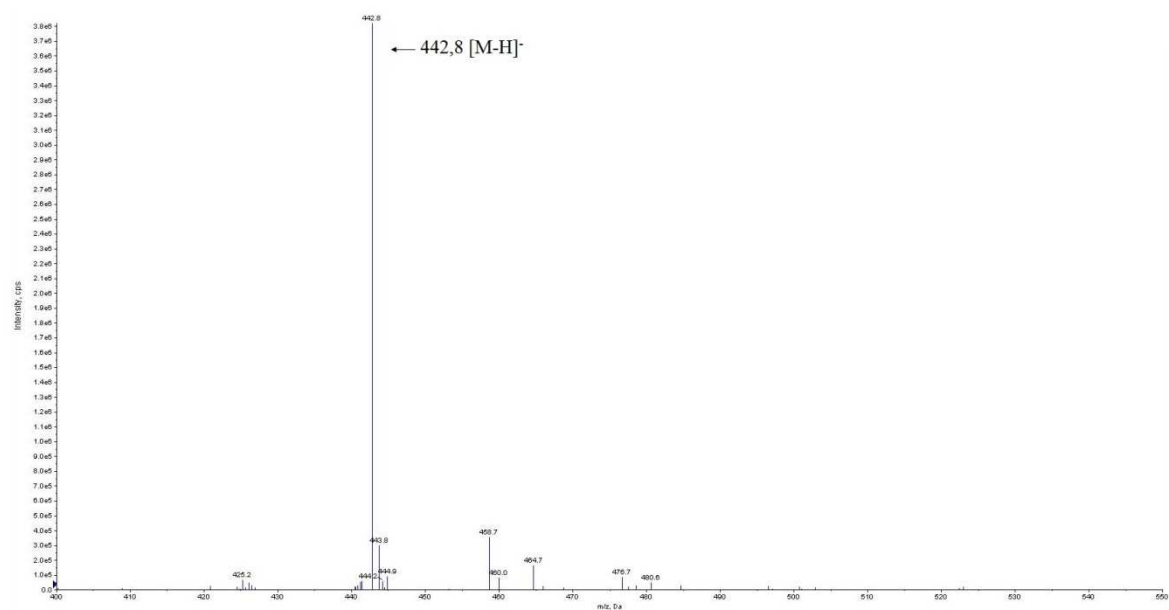
Na Obr. 37 je uvedeno hmotnostní spektrum doxycyklinu při nastavení deklasteračního potenciálu 10 V. Při tomto nastavení lze snadno identifikovat základní pík spektra, patřící prekurzorovému iontu doxycyklinu s 445 m/z. Produktový iont 428 m/z lze ve spektru identifikovat, ačkoliv má velmi nízkou intenzitu signálu.



Obr. 37 Hmotnostní spektrum DC 5 mg·l⁻¹ (IS +4500 V, DP 10 V)

5.1.4.2 *Negativní ionizace*

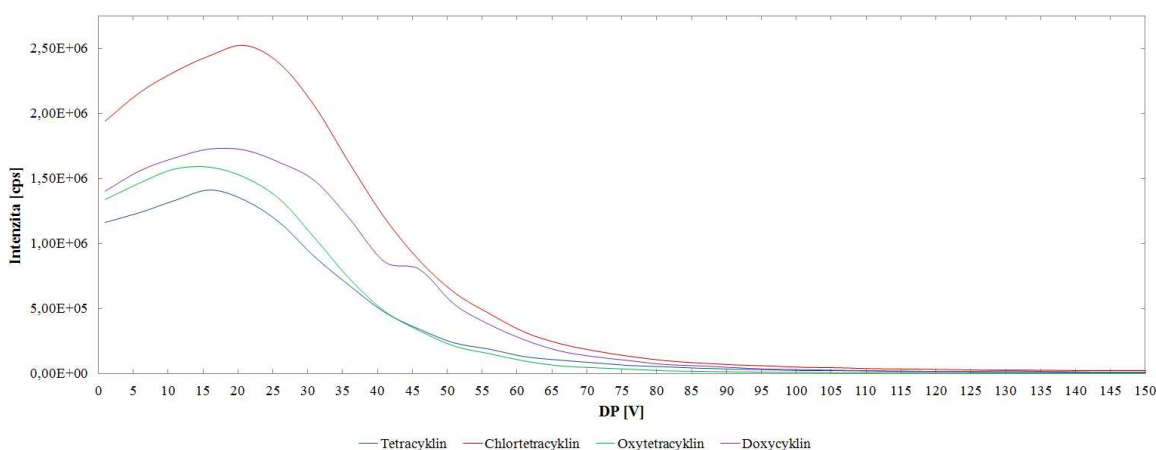
Pro srovnání s ionizací pozitivní byla změřena i ionizace negativní, zobrazena na Obr. 38. Jediný výrazný signál hmoty s 442,8 m/z patří deprotonovanému molekulárnímu iontu doxycyklinu, tedy $[M-H]^-$.



Obr. 38 Hmotnostní spektrum DC 5 mg·l⁻¹ (IS -4500 V, DP 10 V)

5.1.5 Tandemová hmotnostní spektrometrie

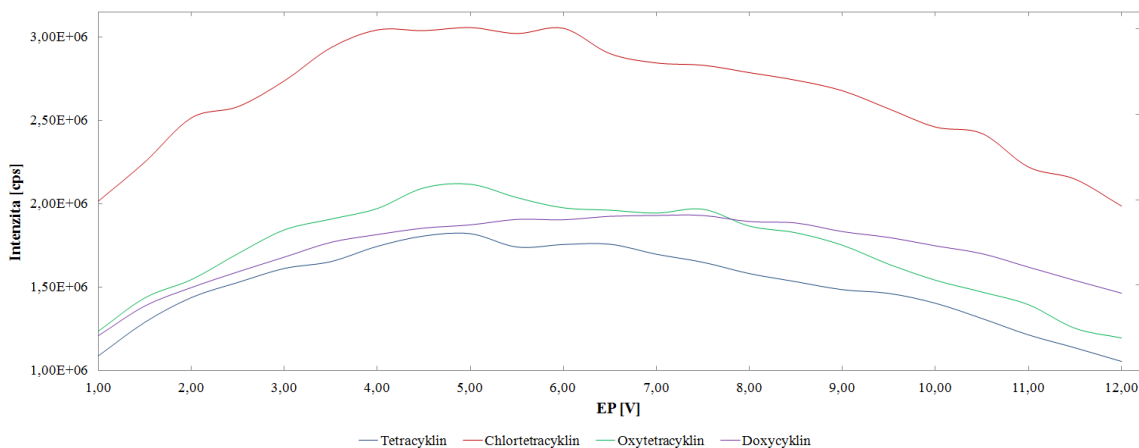
Dalším krokem optimalizace hmotnostního spektrometru probíhala v MS/MS módu. Pro potřeby analýzy bylo ovšem nejprve nutné najít takové podmínky, aby měl prekurzorový iont $[M+H]^+$ co nejintenzivnější signál. Vliv pro tuto podmínku má deklasterační potenciál (*DP, Declustering Potential*), vstupní potenciál (*EP, Entrance Potential*) a zaostřovací potenciál (*FP, Focusing Potential*).



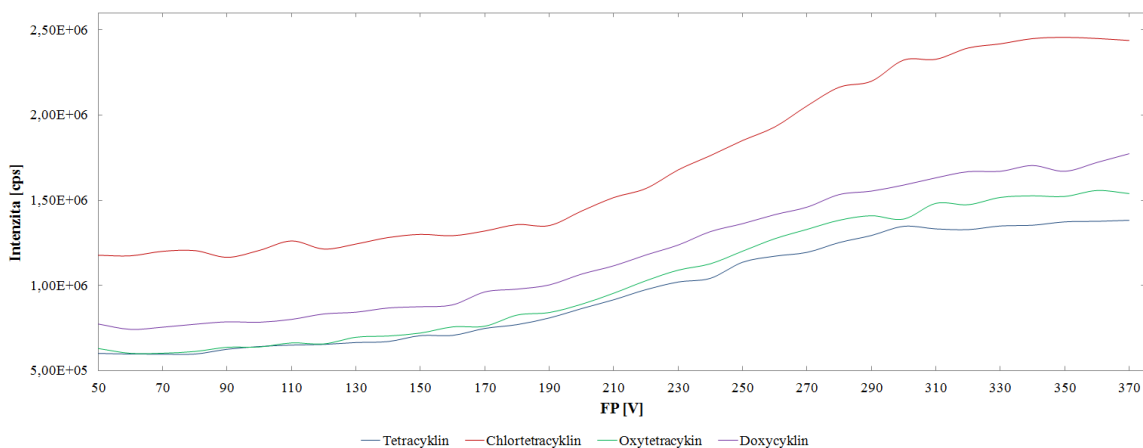
Obr. 39 Intenzity signálů analytů při změně deklasteračního potenciálu.

Optimální hodnota deklasteračního potenciálu (viz Obr. 39) pro nejintenzivnější signál prekurzorového iontu $[M+H]^+$ tetracyklinu, oxytetracyklinu a doxycyklinu je 16 V a pro chlortetracyklin 21 V. Jelikož byly analyty stanovovány společně, v rámci kompromisu byla zvolena hodnota deklasteračního potenciálu 16 V, při které chlortetracyklin vykazuje vyšší intenzity než zbývající analyty.

Parametr EP, vstupní potenciál, usměřňuje ionty skrze vysokotlakou oblast nultého kvadrupólu a většinou nabývá hodnot +10 V pro pozitivní ionty a -10 V pro ionty v negativní ionizaci. Ovlivňuje všechna ostatní napětí v přístroji při optimalizaci a má tedy významný dopad na optimalizaci sloučeniny. Optimální hodnota vstupního potenciálu pro nejintenzivnější signál byla naměřena pro tetracyklin, oxytetracyklin a chlortetracyklin 5,00 V a pro doxycyklin 7,00 V (viz Obr. 40). Výsledná hodnota vstupního potenciálu byla zvolena 5,00 V, při které mají všechny analyty 100 % intenzitu signálu a doxycyklin 97 % intenzitu signálu.



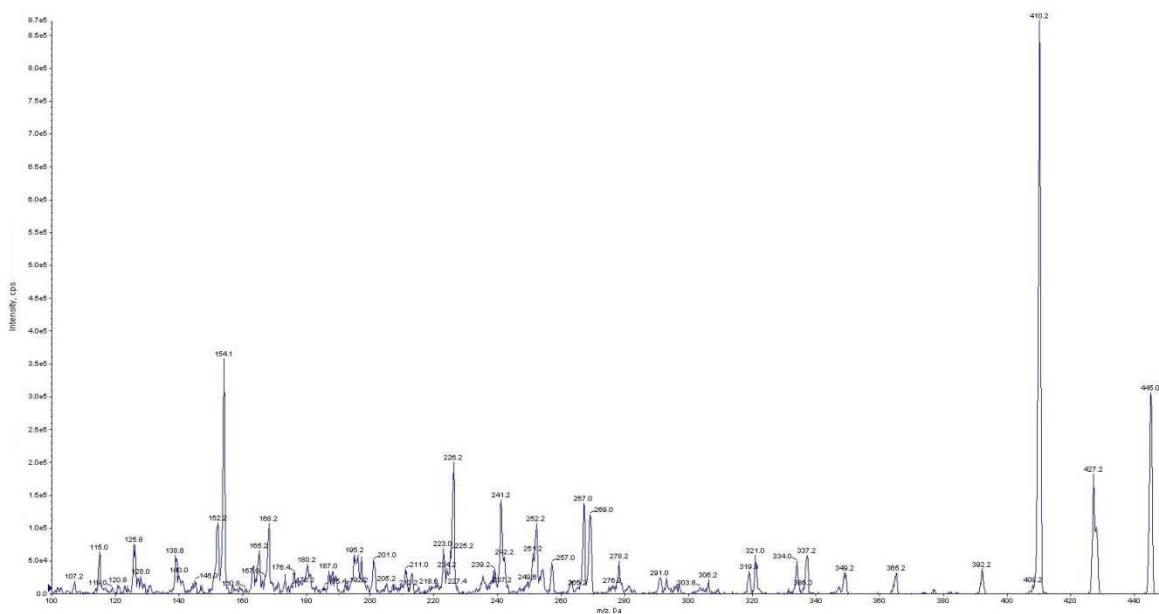
Obr. 40 Intenzity signálů analytů při změně vstupního potenciálu.



Obr. 41 Intenzity signálů analytů při změně zaostřovacího potenciálu.

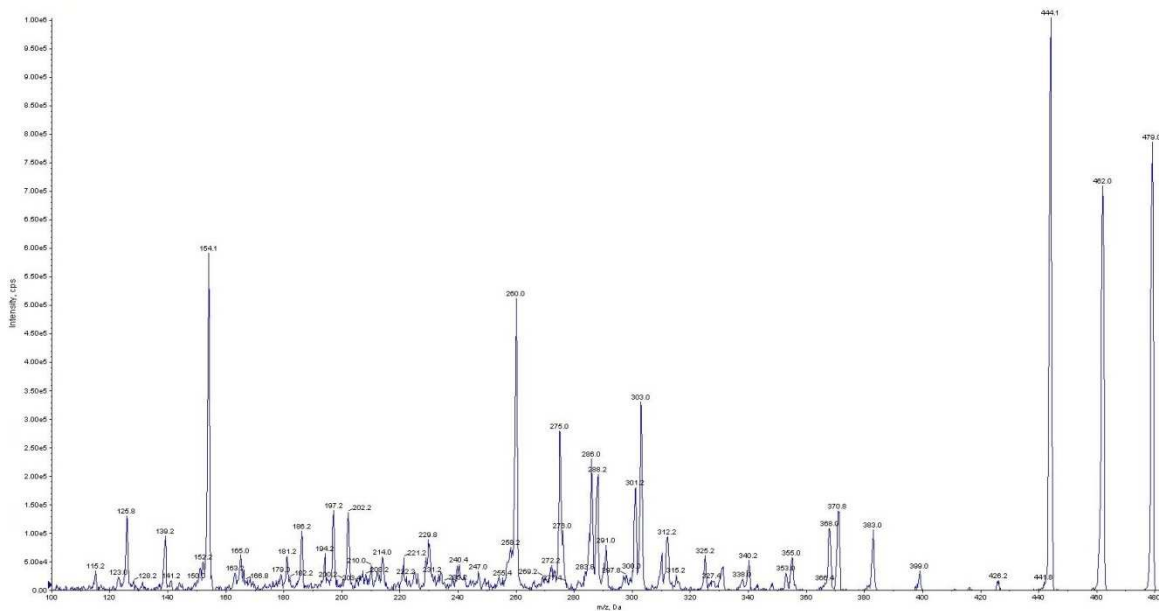
Posledním měřeným parametrem, který má vliv na intenzitu prekursorového iontu analytů, je zaostřovací potenciál FP, uveden na Obr. 41. Optimální hodnota pro tetracyclin a doxycyclin je 370 V, pro chlortetracyclin 350 V a pro oxytetracyclin 360 V. V rámci kompromisu byla zvolena hodnota 370 V (CTC 99,3 % a OTC 98,8 % intenzity).

Po změření optimálních parametrů pro maximalizaci intenzity prekursorových iontů bylo v programu Analyst pomocí MS/MS analýzy sledována fragmentace a porovnávány intenzity jednotlivých fragmentů. Veškeré fragmenty analytů jsou uvedeny na Obr. 42- Obr. 45. Podle nařízení evropské komise 96/23/EC^[147] jsou v příloze č. 1 vyžadovány detekcí hmotnostní spektrometrií těchto antibiotik alespoň 3 identifikační body (IPs). V této práci byly použity celkem 4 identifikační body, prekursor pro identifikaci analytů (1 IP) a dva produktové ionty (každý 1,5 IPs).



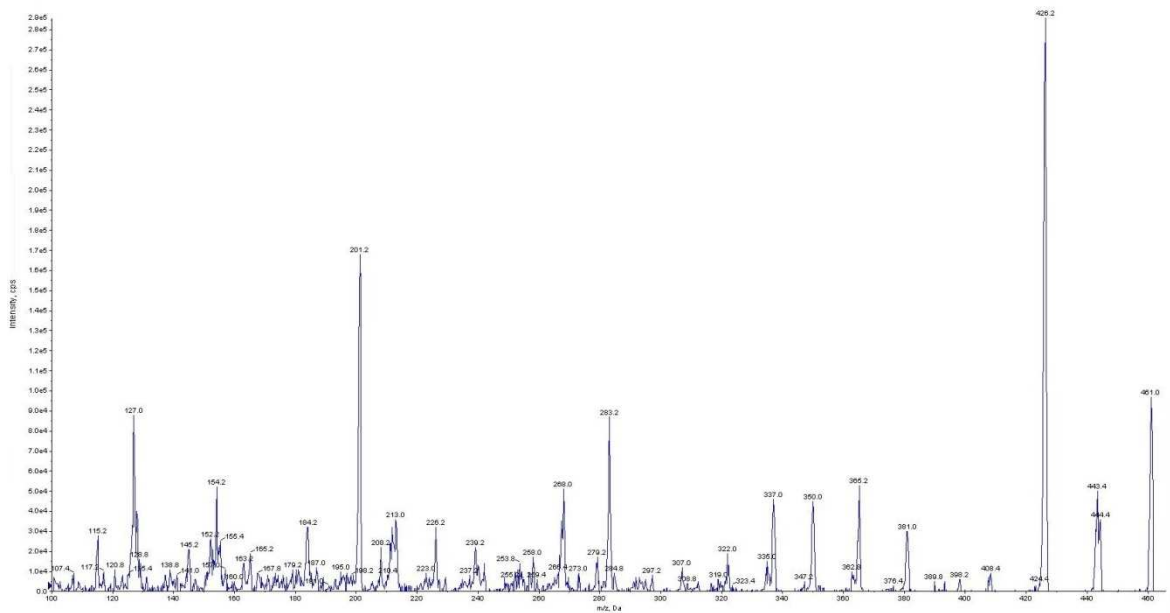
Obr. 42 Fragmenty prekurzorového iontu tetracyklinu s m/z 445,042

Na Obr. 42 je spektrum s fragmenty tetracyklinu. Pro detekci byly vybrány 2 produktové ionty: 410,169 m/z, který byl použit pro kvantifikaci a 154,104 m/z pro identifikaci.



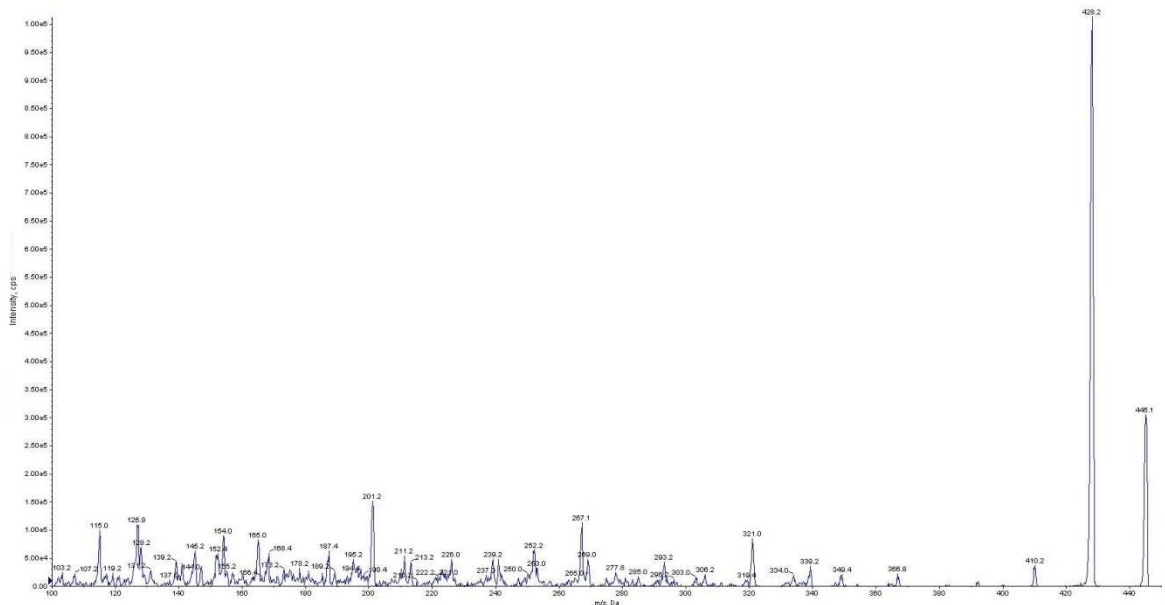
Obr. 43 Fragmenty prekurzorového iontu chlortetracyklinu s m/z 479,039

Ve spektru uvedeném na Obr. 43 je více intenzivních fragmentů chlortetracyklinu, než v případě tetracyklinu. Pro kvantifikaci byl vybrán iont 444,104 m/z a iont 154,118 m/z byl použit pro identifikaci sloučeniny.



Obr. 44 Fragmenty prekurzorového iontu oxytetracyklinu s m/z 461,069

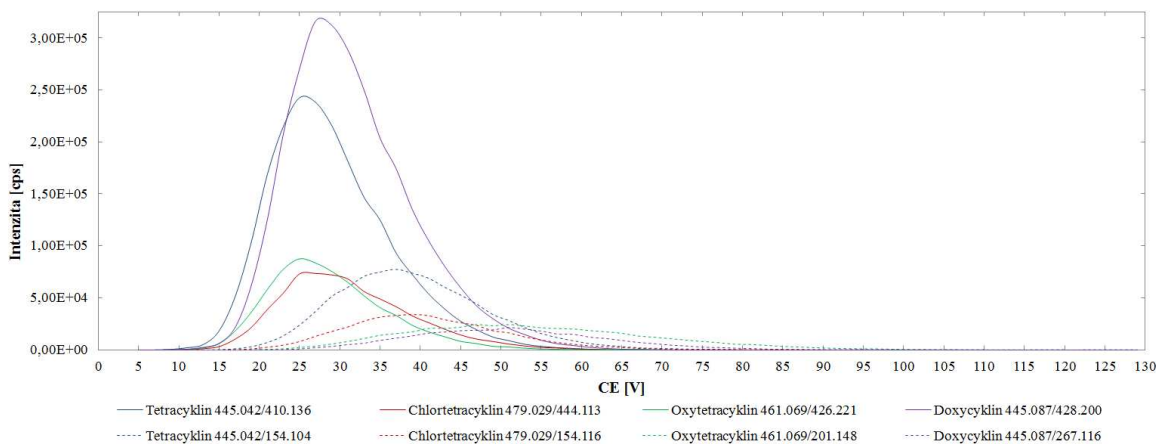
Spektrum oxytetracyklinu na Obr. 44 zobrazuje fragmenty, z nichž byl vybrán pro kvantifikaci iont 426,221 m/z a pro potvrzení dané sloučeniny iont 201,148 m/z.



Obr. 45 Fragmenty prekurzorového iontu doxycyclinu s m/z 445,087

Pro kvantifikaci doxycyclinu byl použit iont s 428,200 m/z a iont 267,116 m/z pro identifikaci. Spektrum na Obr. 45 obsahuje nízké intenzity ostatních iontů, lze tedy předpokládat velmi nízký detekční limit u tohoto antibiotika.

Při MS/MS analýze docházelo ke vzniku velkého množství fragmentů a pro každý z nich bylo potřeba najít nejvhodnější parametr kolizní energie (*CE*, *Collision Energy*) a výstupní potenciál z kolizní cely (*Collision Cell Exit Potencial*, *CXP*).



Obr. 46 Intenzity signálů vybraných produktových iontů analytů při změně kolizního potenciálu.

Na Obr. 46 je uvedena grafická závislost intenzit vybraných produktových iontů analytů při změně kolizní energie. Tento parametr ovlivňuje potenciál mezi nultým kvadrupólem (Q0) a kolizní celou (Q2). Využívá se pouze u skenů typu MS/MS a vyjadřuje množství energie, kterou získají prekurzorové ionty, když akcelerují do kolizní cely, kde kolidují s molekulami kolizního plynu a již vytvořenými fragmenty. Pro analýzu v módu MS/MS byla zvolena hodnota CE 25,0 V.

Je-li použit mód měření MS pomocí prvního (Q1) a třetího (Q3) kvadrupólu, vložené napětí ke kolizní cele je RO2 (*collision cell rod offset*) a určuje parametr vstupního kolizního potenciálu (*CEP*, *Collision Entrance Potential*). Při těchto skenech nedochází k fragmentaci, a proto tento parametr optimalizuje nejintenzivnější signál prekurzorového iontu $[M+H]^+$, který je pro tetracyklin a chlortetracyklin 24 V, oxytetracyklin a doxycyklin 22 V. V rámci kompromisu může být zvolena hodnota 22 V, při které mají tetracyklin a chlortetracyklin přibližně 99 % intenzitu signálu.

Optimalizovaný parametr výstupního potenciálu z kolizní cely je pro tetracyklin a oxytetracyklin 32 V, chlortetracyklin a doxycyklin 34 V. V rámci kompromisu byla zvolena hodnota CXP 32,0 V.

5.2 Optimalizace kapalinové chromatografie pro vybrané tetracykliny

Při spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem bylo nutné zvolit vhodnou mobilní fázi pro eluční gradient a následně optimalizovat parametry, které mohou mít významný vliv na výsledný tvar a intenzitu peaků jednotlivých analytů: teplota analytické kolony, průtok mobilní fáze a teplota iontového zdroje.

5.2.1 Výběr mobilní fáze

Bruno, *et al.*^[78] ve své práci zkoumal vliv nepoužívanějších organických fází, methanolu a acetonitrilu na intenzitu píků. Z výsledků jeho měření vyplývá, že nahrazením methanolu acetonitrem dochází až k zdvojnásobení intenzit u všech analytů. Ke stejnému závěru došel i Jia, *et al.*^[98]. Pro vlastní stanovení byla jako mobilní fáze zvolena směs 0,1% kyseliny mravenčí a acetonitrilu.

5.2.2 Optimalizace teploty analytické kolony

Na základě provedené rešerše bylo zjištěno, že pro stanovení tetracyklinů se volí teplota analytické kolony v rozmezí 15-40 °C, kapitola 2.3.1.5. Experiment byl naplánován pro každý analyt zvlášť, měřením metodou LC-MS, s teplotou vzrůstající po 5 °C s použitým gradientem A, viz kapitola 5.2.3, podle práce Boscher, *et al.*^[103]. Retenční časy a intenzity píků jsou uvedeny v Tab. 26.

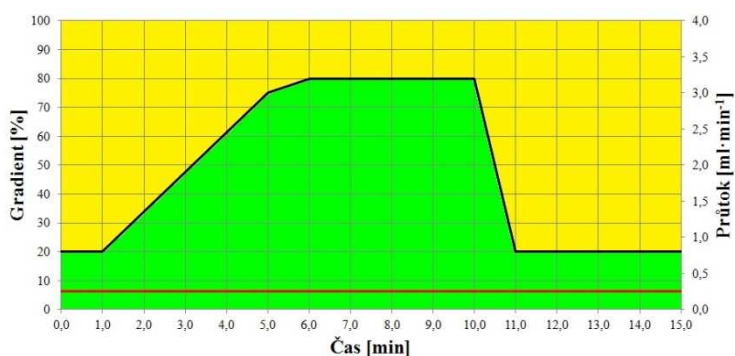
Tab. 26 Závislost retenčních časů a intenzit píků tetracyklinů při změně teploty analytické kolony při optimalizaci LC-MS

| Analyt | | Teplota [°C] | | | | | |
|--------|-----------------------------------|--------------|-------------|------|------|------|------|
| | | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |
| OTC | Retenční čas [min] | 1,83 | 1,78 | 1,72 | 1,67 | 1,63 | 1,58 |
| | Intenzita [cps; 10 ⁵] | 53 | 65 | 49 | 40 | 35 | 60 |
| TC | Retenční čas [min] | 2,41 | 2,23 | 2,20 | 2,11 | 2,02 | 1,94 |
| | Intenzita [cps; 10 ⁵] | 140 | 95 | 120 | 110 | 100 | 98 |
| CTC | Retenční čas [min] | 4,11 | 4,05 | 3,99 | 3,91 | 3,82 | 3,71 |
| | Intenzita [cps; 10 ⁵] | 280 | 240 | 260 | 190 | 150 | 130 |
| DC | Retenční čas [min] | 4,29 | 4,24 | 4,19 | 4,14 | 4,08 | 4,00 |
| | Intenzita [cps; 10 ⁵] | 150 | 100 | 100 | 78 | 64 | 46 |

Z naměřených hodnot lze jednoznačně pozorovat snižující se retenční časy při vyšší teplotě analytické kolony. Můžeme konstatovat, že zvýšením teploty lze tedy dosáhnout snížení délky analýzy. K eluci analytů dochází v pořadí oxytetracyklin, tetracyklin, chlortetracyklin a doxycyklin tak, jak je zmiňováno ve validačních pracích různých autorů. Nejpozději se eluuje doxycyklin a jeho retenční čas se zkrátil o 17,4 vteřiny při změně teploty z 15 na 40 °C. Se zvyšováním teploty byla ale pozorována signifikantní ztráta intenzit odezvy detektoru, v případě doxycyklinu o 70 %. Kvůli požadavku na nízký detekční limit byla zvolena teplota analytické kolony 15 °C.

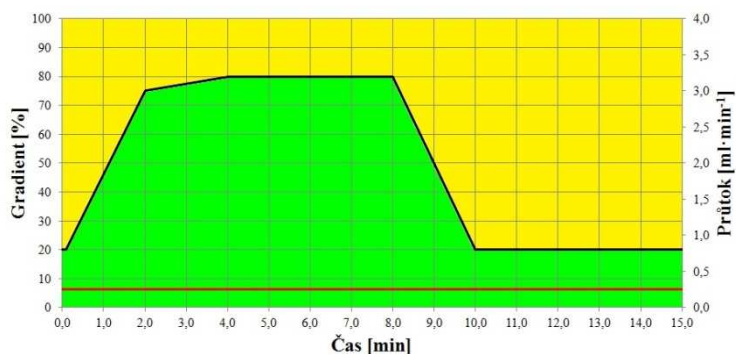
5.2.3 Optimalizace elučního gradientu

Průběh elučního gradientu může ovlivnit retenční čas, intenzitu píku a jeho tvar. Na Obr. 47-Obr. 49 jsou zobrazeny průběhy použitých elučních gradientů. Žlutá barva značí 0,1% kyselinu mravenčí, barva zelená pak poměr acetonitrilu. Aktuální průtok mobilní fáze v průběhu eluce je zobrazen červenou přímkou, 250 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.



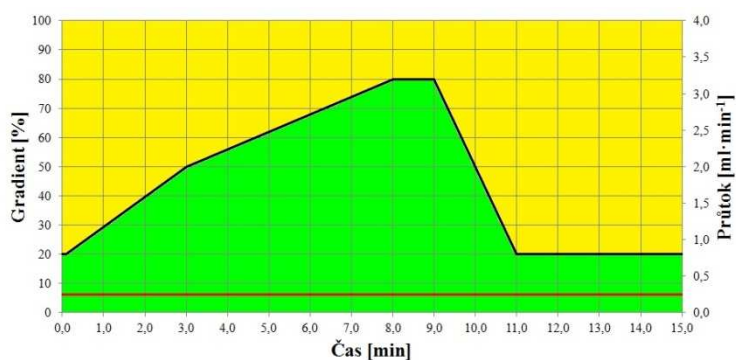
Obr. 47 Průběh elučního gradientu A

Eluční gradient A, Obr. 47, byl převzat z práce Boscher *et al*^[103] a upraven vzhledem k použité koloně na celkový čas analýzy 15 minut. K eluci analytů docházelo v rozmezí retenčních časů od 1,83 - 4,29 min.



Obr. 48 Průběh elučního gradientu B

Další zkoušený gradient je zobrazen na Obr. 48, který se liší od elučního gradientu A rychlým nástupem acetonitrilu. Díky zvyšující se eluční síle byly analyty eluovány od 1,82 min do 2,84 min.



Obr. 49 Průběh elučního gradientu C

Opakem ke gradientu B s rychlým nástupem acetonitrilu, je na Obr. 49 zobrazen průběh gradientu C s pozvolným vzrůstem poměru organické fáze. Díky použitému gradientu byly analyty eluovány v 1,82 - 3,59 min.

Veškeré naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 27, ze kterých lze usoudit, že změna gradientu neměla vliv na eluci oxytetracyklinu a ani ve větší míře na tetracyklin. Z pohledu retenčních časů je třeba posuzovat zbylé dva analyty, tedy chlortetracyklin a doxycyklin.

Tab. 27 Závislost retenčních časů a intenzit píků tetracyklinů na typu gradientu

| Analyt | | Eluční gradient | | |
|--------|-----------------------------------|-----------------|-------------|-------------|
| | | A | B | C |
| OTC | Retenční čas [min] | 1,83 | 1,82 | 1,83 |
| | Intenzita [cps; 10 ⁵] | 15 | 21 | 26 |
| TC | Retenční čas [min] | 2,35 | 2,35 | 2,39 |
| | Intenzita [cps; 10 ⁵] | 29 | 85 | 69 |
| CTC | Retenční čas [min] | 4,12 | 2,79 | 3,42 |
| | Intenzita [cps; 10 ⁵] | 110 | 320 | 190 |
| DC | Retenční čas [min] | 4,29 | 2,84 | 3,59 |
| | Intenzita [cps; 10 ⁵] | 21 | 31 | 19 |

V gradientové eluci platí, že čím vyšší eluční síla, tím se analyty eluují dříve. V případě gradientu s rychlým nástupem acetonitrilu, gradient B, byl chlortetracyklin eluován v čase 2,79 min a doxycyklin v čase 2,84 min. Tyto dva analyty velmi blízko sebe, z principu skenování hmot pomocí MRM skenu víme, že detektor analyzuje jednotlivé hmoty zvlášť, a proto separace podle retenčních časů není nezbytná. Při použití tohoto gradientu bylo dosahováno také nejvyšších intenzit analytů, v tabulce vyznačeno tučným písmem. Výjimku tvoří pouze oxytetracyklin, jenž měl nejvyšší intenzitu u gradientu C. Vzhledem k nízkým retenčním časům a vyšším intenzitám byl zvolen gradient B.

5.2.4 Optimalizace průtoku mobilní fáze

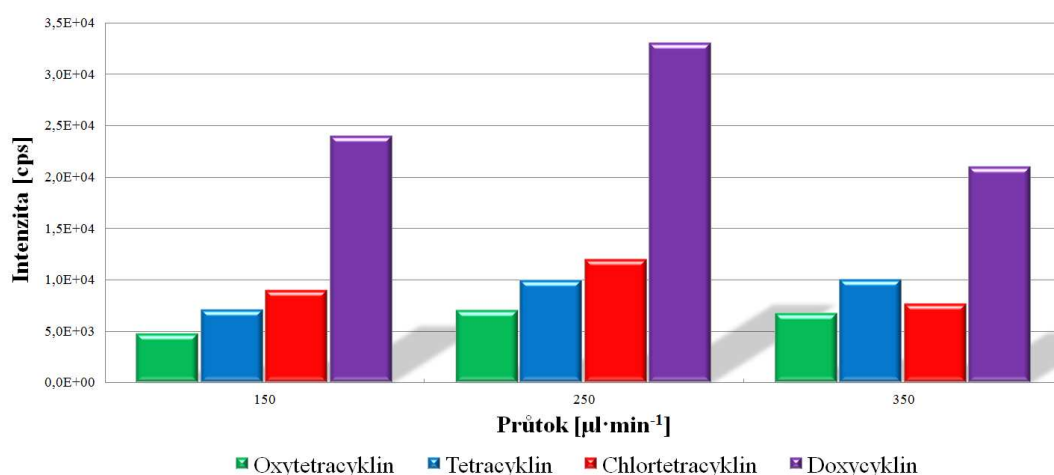
S použitým gradientem B byl pro analýzu optimalizován průtok mobilní fáze. Nejprve byl zkoušen průtok 350 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, který byl poté snižován až na hodnotu 150 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Průtok měl významný vliv na intenzitu signálu analytů, Obr. 50 a jejich výsledný tvar píků, Obr. 51.

Při použití průtoku 150 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ byly analyty eluovány v čase 2,98 - 4,40 min, tvar píků ale nebyl reprezentativní. Nebyly ostré, ani symetrické a navíc při nízkých retenčních časech

se eluovaly jako dlouhé a široké píky. Tato okolnost, zřídka uvedená v literatuře, komplikuje kvantifikaci TCA.

Při vyšším průtoku, $250 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ byly analyty eluovány v čase 1,80 - 2,88 min a bylo dosahováno nejvyšších intenzit signálů. Oxytetracyklin a tetracyklin, tedy analyty elující se při nízkých retenčních časech měly ale stále široké základny píků.

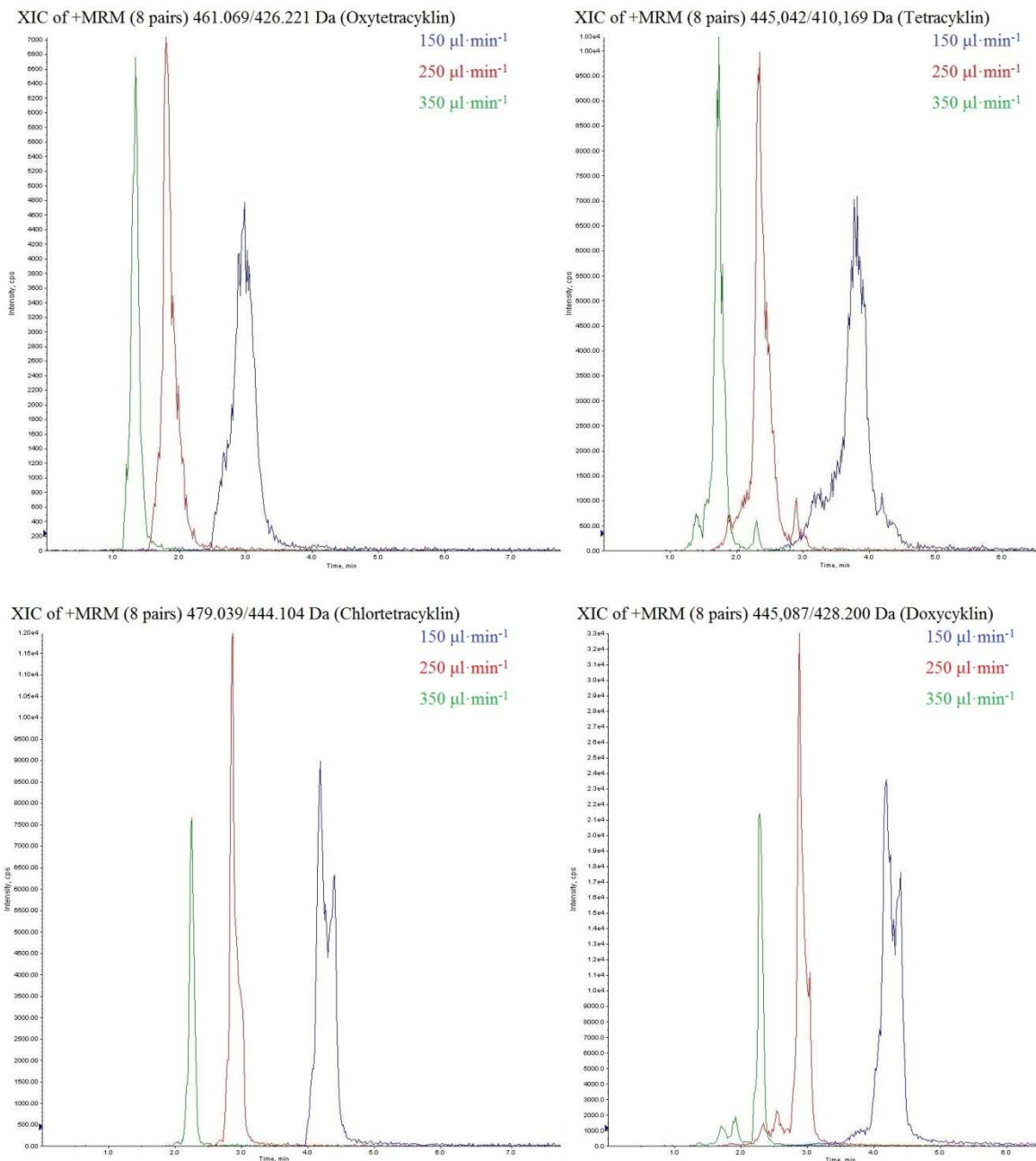
Zvýšením průtoku na hodnotu $350 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ měly píky analytů nižší intenzity, ale symetričtější tvary. K eluci docházelo v rozmezí 1,34 - 2,28 min.



Obr. 50 Závislost intenzit analytů na aktuálním průtoku mobilní fáze

Několik autorů v provedené rešerši zmiňovalo skutečnost, že eluce tetracyklinů z kolony plněné materiálem na bázi křemíku s reverzní fází jako ostré a symetrické píky je obtížný analytický úkol. TCA mohou tvořit komplexy s kovovými ionty, a kromě toho tyto sloučeniny obsahují aminové skupiny, schopné interagovat specificky se silanolovými skupinami. V důsledku toho může přítomnost kovových iontů, anebo zbytky nezreagovaných silanolových skupin na povrchu chemicky modifikovaného oxidu křemičitého mít za následek rozmyté píky pro TCA. Dokonce i při použití dobře zakončených C-18 kolon získaných z vysoce čištěného oxidu křemičitého. [78, 88, 99]

Bruno, *et al.* [78] použili pro zmírnění tohoto efektu roztok $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2EDTA , kterým důkladně promyli LC kolonu. Tímto způsobem odstranili stopy kovových iontů z chemicky modifikovaných křemičitých povrchů a díky tomu byly píky tetracyklinů úzké a ostré.



Obr. 51 Tvary píků analytů při změně průtoku mobilní fáze

Na Obr. 51 jsou uvedeny jednotlivé analyty, $5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, měřeny při teplotě analytické kolony $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ metodou LC-MS/MS při třech různých průtocích mobilní fáze. Je patrné, že nižší průtok měl za následek hůře kvantifikovatelné píky vzhledem k jejich nesymetričnosti. Při vyšším průtoku, $350\text{ }\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, bylo dosahováno reprezentativnějších píků, a proto byl tento průtok zvolen pro analýzu. Použitý gradient B byl vzhledem k průtoku upraven na celkový čas analýzy 10 minut.

5.2.5 Optimalizace teploty iontového zdroje

Posledním optimalizovaným parametrem byla teplota iontového zdroje (TEM, Tab. 28), která může mít významný vliv na rozklad analytu a intenzitu signálu. Operační teplota by měla být vždy nastavena vzhledem ke složení a průtoku mobilní fáze. Neoptimálnější je stav, kdy teplota a průtok plynu umožní odpaření kapaliny před dosažením clony (*curtain plate*). Nejprve byla zkoušena teplota 400 °C doporučována výrobcem a následně teplota o 50 °C nižší a vyšší.

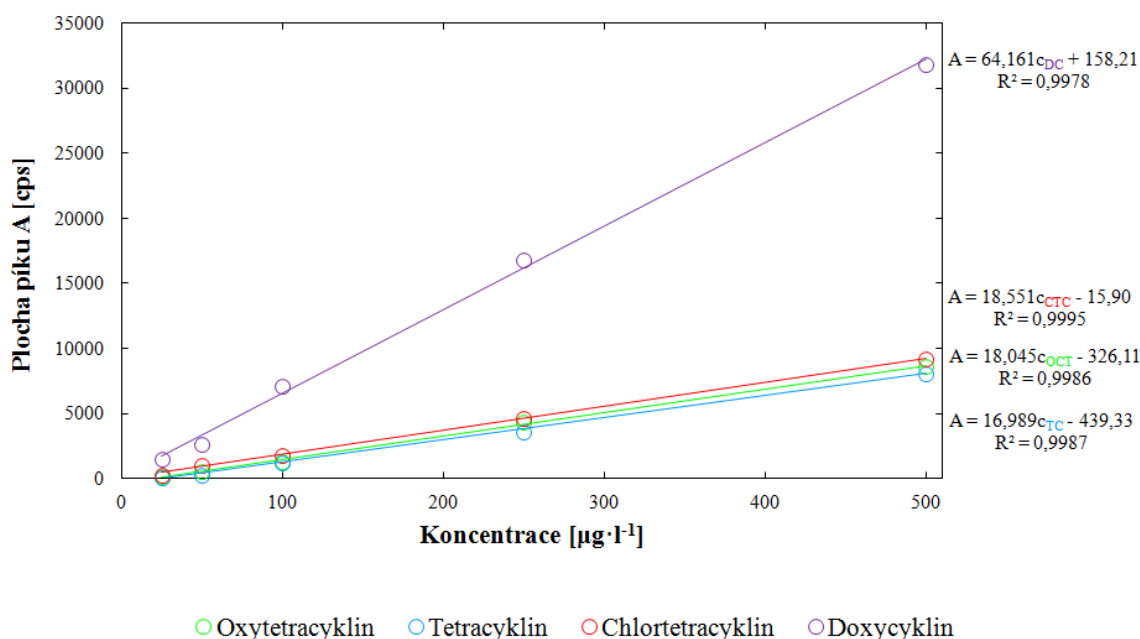
Tab. 28 Změna intenzit signálů [%] při změně TEM

| TEM [°C] | 350 | 400 | 425 | 450 | 475 |
|------------------|-------|-------|-------|--------------|--------------|
| Analyt | | | | | |
| Oxytetracyklin | 67,44 | 81,40 | 69,77 | 100,0 | 86,05 |
| Tetracyklin | 68,75 | 95,31 | 93,75 | 100,0 | 95,31 |
| Chlortetracyklin | 71,43 | 71,43 | 90,48 | 100,0 | 86,05 |
| Doxycyklin | 70,69 | 93,10 | 89,66 | 93,10 | 100,0 |

Při snížení teploty iontového zdroje bylo pozorováno snížení intenzit analytů, vyjma chlortetracyklinu. Naopak zvýšení teploty vedlo k intenzivnějším signálům. Pro potvrzení optimální hodnoty byla změřena teplota ± 25 °C od hodnoty 450 °C, kde pouze doxycyklin vykazoval vyšší intenzity. V rámci kompromisu byla proto zvolena teplota iontového zdroje 450 °C.

5.3 Kalibrace

Rozsah kalibrace pro analýzu tetracyklinů byl převzat podle provedené rešerše v závislosti na jejich výskytu v plánovaných analyzovaných biologických matricích moči^[105, 106] a mléce^[78, 88]. Pětibodová kalibrační závislost byla měřena metodou UPLC-MS/MS v rozmezí koncentrací 25 až 500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Obsah sledovaných analytů byl vyhodnocen pomocí lineární regrese.



Obr. 52 Kalibrační přímky vybraných tetracyklinů (koncentrace 25 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 250 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

Důležitými parametry při validaci analytické metody jsou limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ).^[148]

Mez detekce je nejnižší výsledek měření pro daný analytický postup a analyt, který může být na dané hladině významnosti přijat za odlišný od hodnoty získané stejným analytickým postupem při použití materiálu, který daný analyt neobsahuje. Obecně se jako mez detekce uvažuje tři krát poměr signál šum, podle rovnice /5-14/.

Mez stanovitelnosti je pak nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty. Vyjadřuje se jako desetinásobek poměru signálu a šumu a vypočítá se dle rovnice /5-15/.

$$LOD = \frac{c}{H/s} \cdot 3 \quad /5-14/$$

$$LOQ = \frac{c}{H/s} \cdot 10 \quad /5-15/$$

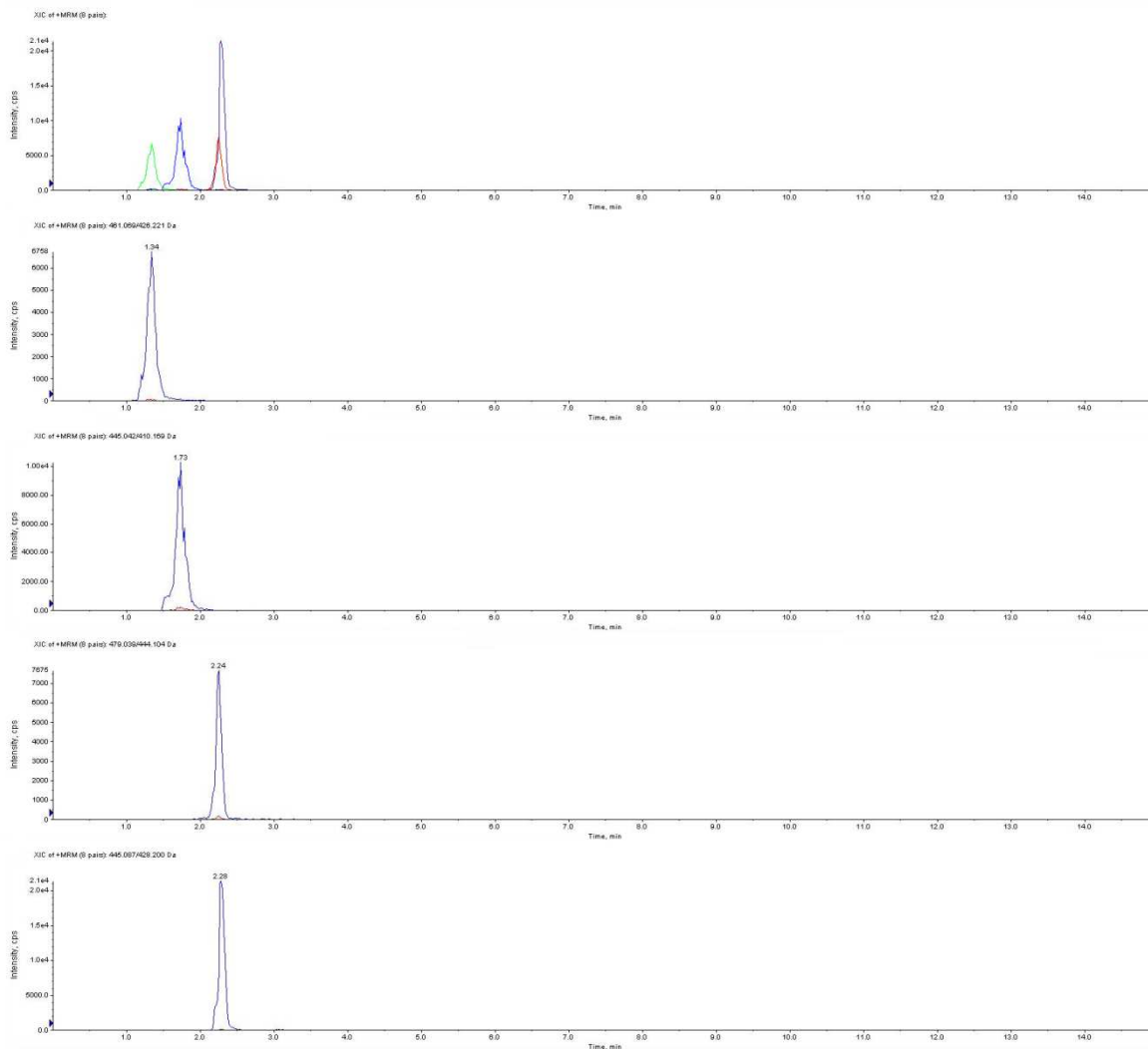
kde: c je koncentrace analytu, H je úroveň signálu analytu a s je úroveň šumu

Linie šumu byla odečtena ze spektra směsi tetracyklinů o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a byla určena na hodnotu 8,33 cps.

Tab. 29 Mez detekce a stanovitelnosti u vybraných tetracyklinů

| Analyt | LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] |
|------------------|--|--|
| Oxytetracyklin | 9,96 | 33,20 |
| Tetracyklin | 11,50 | 38,32 |
| Chlortetracyklin | 7,86 | 26,22 |
| Doxycyklin | 3,40 | 11,32 |

Při použití metody HPLC-ESI-MS/MS (QqQ) pro analýzu tetracyklinu, chlortetracyklinu, oxytetracyklinu a doxycyklinu dosahovali vybraní autoři těchto limitů detekce: 1; 3; 2; $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [101], 2; 7; 0,5; $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [78], 7,5; 25; 7,5; $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [88] (DC nestanovován). Tyto vytvořené metody, včetně metody vytvořené v rámci diplomové práce dosahují přijatelných detekčních limitů. Nejnižších hodnot detekčních limitů bylo dosaženo v práci zabývající se analýzou tetracyklinů v moči metodou UPLC-ESI-QToF autorů Hua Jin, *et al.* [105] Jejich hodnoty byly: 0,138; 0,122; 0,089 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, DC nebyl v této práci stanovován.



Obr. 53 Chromatogram směsi vybraných tetracyklinových antibiotik (koncentrace standardu $5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$)

Na Obr. 53 je zobrazen UPLC-ESI-MS/MS chromatogram směsi vybraných tetracyklinových antibiotik oxytetracyklinu ($t_R = 1,34 \text{ min}$; $461,069/426,221 \text{ Da}$), tetracyklinu ($t_R = 1,73 \text{ min}$; $445,042/410,169 \text{ Da}$), chlortetracyklinu ($t_R = 2,24 \text{ min}$; $479,039/444,104 \text{ Da}$) a doxycyklinu ($t_R = 2,28 \text{ min}$; $445,087/428,200 \text{ Da}$). Pod souhrnícím zobrazením píků jsou jednotlivé analyty zobrazeny zvlášť. Ze záznamu je patrné že dochází ke koeluci dvou analytů. Na analýzu v módu +MRM koeluce ovšem nemá podstatný vliv. Tento nepatrný nedostatek by bylo možné odstranit použitím jiné kolony s větším počtem teoretických pater.

5.4 Stabilita roztoků tetracyklinů

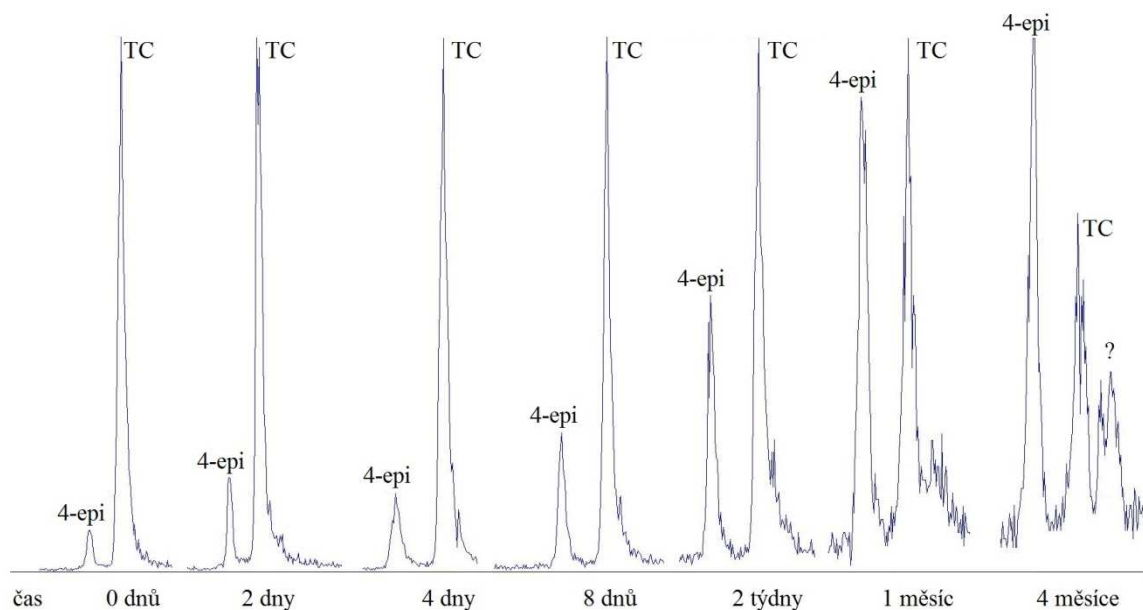
Stabilita roztoků tetracyklinů je silně závislá na pH roztoku. V kyselém prostředí dochází k jejich dehydrataci za vzniku anhydrotetracyklinů. Zředěné kyseliny rovněž podporují epimeraci a dochází ke změně konfigurace na chirálním uhlíku C-4 za vzniku 4-epitetracyklinů a 4-epianhydrotetracyklinů. Připravené standardy roztoků v MeOH měly pH pro tetracyklin, chlortetracyklin, oxytetracyklin a doxycyklin 6,7; 3,5; 3,1 a 3,5. Ve směsi MeOH a 0,1% HCOOH v poměru 1:1 bylo pH 3,16; 3,15; 3,15; 3,15. Tudíž by podle dostupných literárních poznatků měly vznikat jiné formy těchto léčiv, zvláště pak ve vodném prostředí. S touto degradační změnou je také spojen pokles intenzity původní sloučeniny. Proto byla stabilitě tetracyklinů věnována pozornost v průběhu jejich skladování.

Byly prováděny dva testy připravených roztoků tetracyklinů v závislosti na čase a experimentálních podmínkách prostředí. První test byl zaměřen na roztoky uložené v lednici při +4 °C a mrazničce při -8 °C za nepřístupu světla, test druhý naopak na roztoky volně uložené na světle a v teple z důvodu urychlení degradace.

5.4.1 Tvorba 4-epitetracyklinů

Tetracykliny jsou citlivé na konformační degradace jejich 4-epimerů. Tato konverze může nastat ve vodném prostředí, ale také v biologických matricích při přípravě vzorků a také jako variace funkce pH a teploty. Tetracykliny a jejich 4-epimery mají stejnou molekulovou hmotnost a elementární kompozici, ale s rozdílnou orientací $-N(CH_3)_2$ skupiny v pozici 4. K epimerizaci může také docházet v poloze 6. Tyto dva epimery jsou mikrobiologicky aktivní, pravděpodobně díky přeměně zpět na příslušný tetracyklin. Z provedené literární rešerše^[88, 91, 98] bylo zjištěno, že k eluci těchto epimerizačních forem dochází před původní sloučeninou, a proto je možné na základě rozdílných retenčních časů a shodných molekulových hmotností identifikovat jak původní sloučeninu, tak i případný epimer.

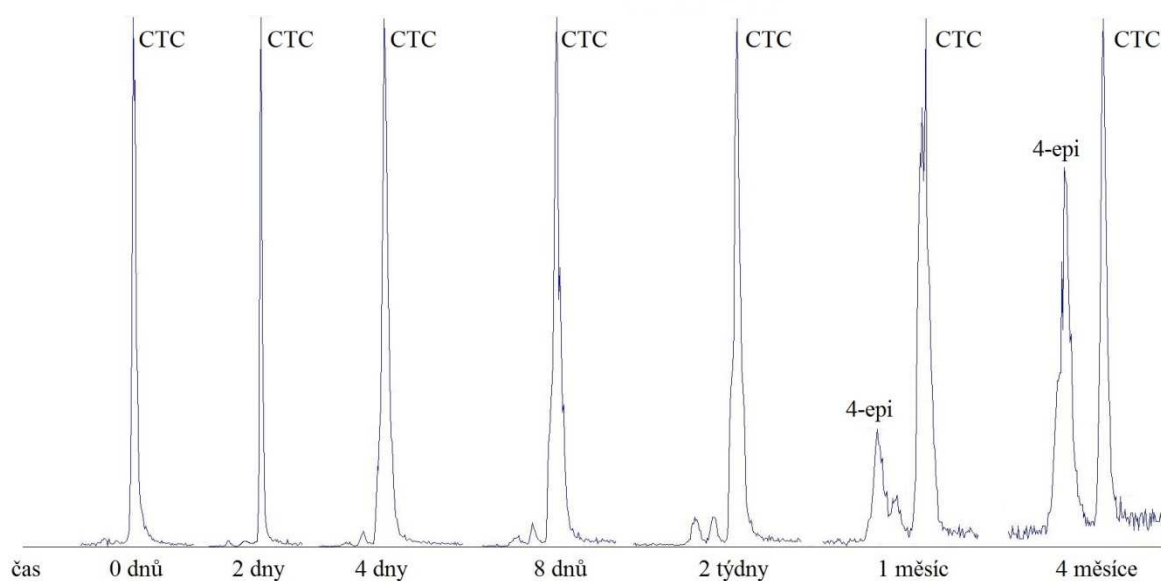
Měření byla prováděna v den přípravy roztoků, a pak následně den druhý, čtvrtý, osmý a čtrnáctý. S delším odstupem byly roztoky změřeny po 1 a 4 měsících, tak jak je zobrazeno na Obr. 54-Obr. 57.



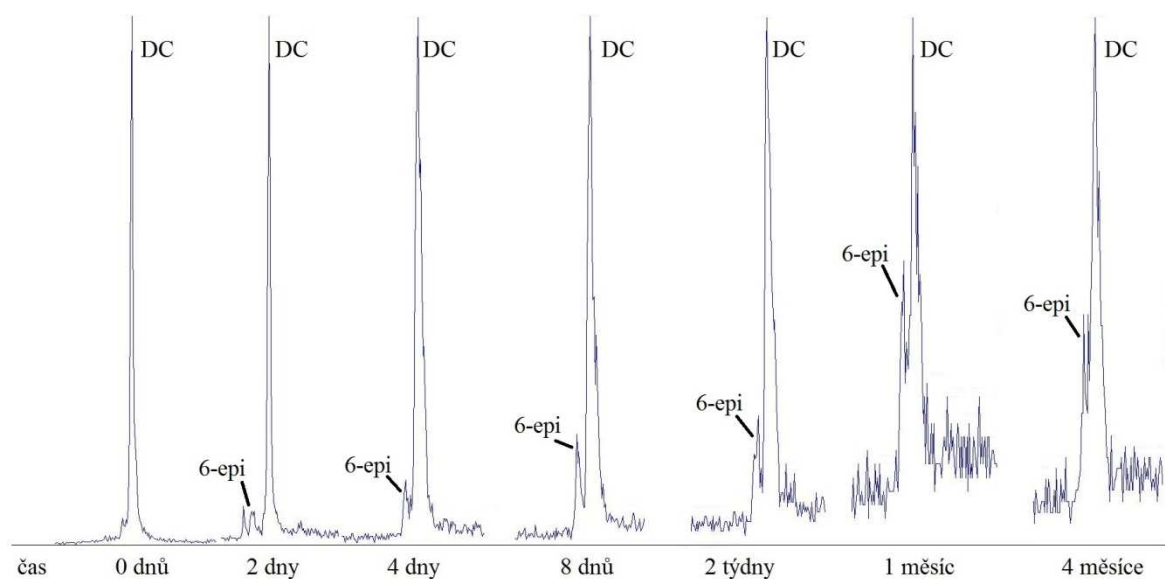
Obr. 54 Stabilita tetracyklinu v čase (směs MeOH a 0,1% HCOOH; 1:1)

Na Obr. 54 je zobrazena stabilita tetracyklinu v závislosti na čase v připravené směsi MeOH a 0,1% HCOOH v poměru 1:1, tedy ve vodném prostředí. Tetracyklin byl určen na základě retenčních časů a pík eluující se před ním by mohl být právě 4-epitetracyklin, tak jak je uváděno v provedené rešerši. Již v den přípravy byl na chromatogramu viditelný pravděpodobně možný pík formy 4-epi, o kterém lze tvrdit, že až do 4 dne měl přibližně stejnou intenzitu. Po uplynutí doby větší jak jeden týden měl daný pík intenzivní signál, který se po jednom měsíci téměř rovnal intenzitě původní sloučeniny. Po čtyřech měsících byl zaznamenán v chromatogramu pík eluující se po tetracyklinu, znázorněný otazníkem. O jakou formu tetracyklinu by se mohlo jednat, nebylo v provedené rešerši dohledáno, ačkoliv měl daný pík shodnou molekulovou hmotnost.

Na Obr. 55 je zobrazena stabilita chlortetracyklinu v závislosti na čase ve vodném prostředí. Po dvou týdnech byly identifikovány dva zřetelné píky, které se eluovaly před původní sloučeninou a měli shodné molekulové hmotnosti. Bližším zkoumáním bylo zjištěno, že druhý pík obsahoval také stopy tetracyklinu. Chlortetracyklin se jevil stabilnější a až po uplynutí doby jednoho měsíce byl znatelný pravděpodobně možný výskyt píku 4-epichlortetracyklinu.

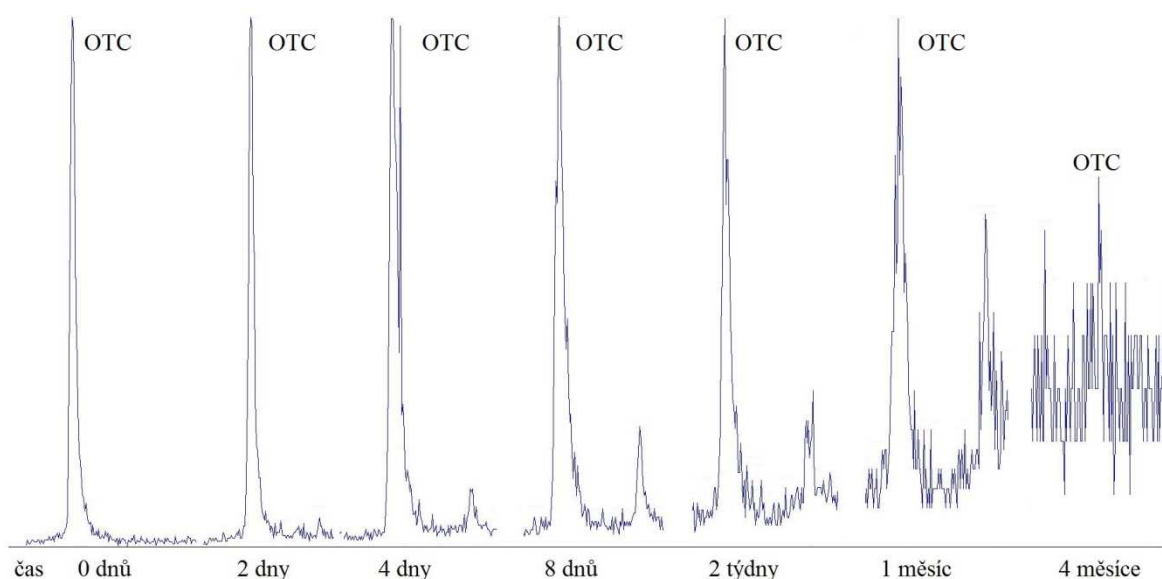


Obr. 55 Stabilita chlortetracyklinu v čase (směs MeOH a 0,1% HCOOH; 1:1)



Obr. 56 Stabilita doxycyklinu v čase (směs MeOH a 0,1% HCOOH; 1:1)

Stabilita doxycyklinu a jeho možného výskytu epimeru v poloze C-6 ve vodném prostředí je zobrazena na Obr. 56. S postupem času se intenzita tohoto epimeru zvyšovala v porovnání s intenzitou původní sloučeniny. Jiné epimery a degradační produkty nebyly pozorovány.



Obr. 57 Stabilita oxytetracyklinu v čase (směs MeOH a 0,1% HCOOH; 1:1)

Na Obr. 57 je uvedena stabilita oxytetracyklinu ve vodném prostředí. Od 4. dne byl zaznamenán pík eluující se po analytu. O jakou jeho formu se jedná, nebylo v provedené rešerši dohledáno. Ze všech analytů se navíc oxytetracyklin jevil jako nejméně stabilní, jelikož po 4 měsících již nemohl být kvantifikovatelný.

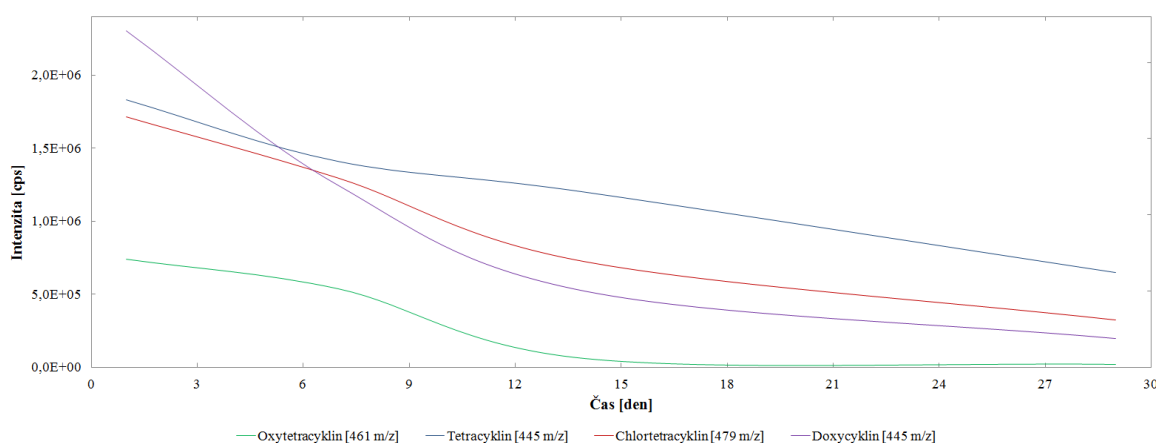
Měřením připravených standardů bylo pozorováno, že tetracykliny nejsou stabilní sloučeniny a postupem času docházelo ve vodném prostředí k jejich transformační přeměně na jiné formy, pravděpodobně 4-epitetracykliny a 6-epitetracyklin v případě doxycyklinu. V této souvislosti bylo pozorováno snížení intenzit původních sloučenin. Zdali se opravdu jedná o 4-epitetracykliny, popř. jiné formy těchto léčiv, nelze s jistotou potvrdit, jelikož nebyly k dispozici v této práci dané standardy. Z výsledků těchto měření bylo potvrzeno, že dochází k degradaci tetracyklinů.

Zásobní roztoky tetracyklinů připravené rozpuštěním v MeOH a skladované v mrazničce, zabalené v alobalu nevykazovaly po dobu sledování transformační přeměny, jak tomu bylo v případě pracovních roztoků přiravených do směsi MeOH a 0,1% HCOOH. Toto pozorování souhlasí s tvrzením autorů Khong Seu-Ping, *et. al.*^[91] kteří skladováním roztoků při -20 °C pozorovali epimerizaci menší než 5 %. Také poukázali na rapidní izomerizaci u tetracyklinu a chlortetracyklinu skladovaného při +4 °C v temnu, anebo při +20 °C na světle. Po 11 týdnech naměřili přibližně 60 % relativní intezity epimerů k původní sloučenině.

5.4.2 Tvorba degradačních produktů

Dalším testem zkoumání stability připravených roztoků byly testy zaměřené na pozorování intenzit iontů při jednoduché hmotnostní spektrometrii vznikajících degradačních produktů roztoků tetracyklinů ve směsi MeOH a 0,1% HCOOH v poměru 1:1 při +20 °C za přístupu světla. U všech analytů bylo pozorováno snížení intenzit, viz Obr. 58, a zvýšení relativních intenzit iontů, které mohly vzniknout rozpadem sloučeniny.

Při optimalizovaném nastavení přístroje byly pozorovány tyto ionty pro všechny sledované analyty 301, 63 a 41 m/z. U chlortetracyklinu byl pozorován navíc iont 445 m/z, který mohl vzniknout odštěpením molekuly Cl, a mohlo tedy dojít k přeměně na tetracyklin. Pro porovnání byl změněn deklasterační potenciál na hodnotu 40 V a byly pozorovány ionty: 301, 149 a 41 m/z. K těmto iontům u tetracyklinu přibyl iont 154 m/z, u chlortetracyklinu 410 a 154 m/z a u oxytetracyklinu ion 413 m/z.



Obr. 58 Intenzity tetracyklinů při degradačním testu

Na Obr. 58 jsou zobrazeny intenzity tetracyklinů v čase. Z výsledků měření vyplývá, že již po uplynutí doby jednoho měsíce byly intenzity signálů sloučenin v pořadí oxytetracyklin, tetracyklin, chlortetracyklin a doxycyklin 97, 64, 81 a 91 % nižší oproti intenzitě původních signálů (měřeno v den přípravy).

6 ANALÝZA REÁLNÝCH VZORKŮ

Podávání tetracyklinů mléčnému skotu je převážně zaměřena proti respiračním chorobám u mladých zvířat a u dojnic při léčbě hovězí mastitidy. Po podání jsou TCA přítomny jak v mléce, tak i v jejich mase. Nerespektují-li zemědělci doporučené ochranné lhůty, jsou rezidua těchto antibiotik a jejich epimerů přítomny v mléce na trhu, kde mohou vyvolat toxické nebo hypersenzitivní reakce u citlivých jednotlivců a také přenos rezistentních bakterií z potravin na lidi.

6.1 Optimalizace extrakce

V zájmu ochrany spotřebitelů před expozicí reziduím tetracyklinů v požitelných tkáních živočišného původu byly stanoveny v Evropské Unii maximální limity reziduí (*MRL, maximum residue limit*). „MRL hodnoty pro oxytetracyklin, tetracyklin a chlortetracyklin v mléce jsou $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a vztahují jako suma příslušného antibiotika a jeho 4-epimeru. Pro doxycyklin, jehož užívání není dovoleno u skotu chovaného pro mléko, není stanovena hodnota MRL v mléce.“^[149]

Proto, aby bylo dosaženo dobré izolace vybraných tetracyklinů z matrice, byla optimalizována extrakce tuhou fází. Nejprve bylo zkoušeno více extrakčních postupů, které se lišily použitými extrakčními činidly. Extrakční postup převzatý z práce De Ruyck, Hendrik a De Ridder, Herman^[88] neobsahoval přídavek Na_2EDTA . Je možné se domnívat že docházelo k chelaci k Ca^{2+} , K^+ , Na^+ ionty, které jsou v dané matrici přítomny. Tento chelatační efekt mohl způsobit nízké výtěžnosti (TC 20,8 %; CTC 69,2 %; OTC 27,5 % a DC 13,3 %) s porovnáním s extrakčním postupem převzatým z práce Cinquina, A. L, *et al.*^[86]. V tomto postupu byl přidáván McIlvainův pufr (pH 3,5), který obsahuje přídavek Na_2EDTA . Z porovnaných extrakčních postupů bylo usouzeno, že přídavek Na_2EDTA poskytuje vyšší výtěžnosti a proto byl tento extrakční postup zvolen pro tuto práci.

V rámci stanovení výtěžností převzatého extrakčního postupu tetracyklinů z mléka (polotučné mléko s obsahem 1,5 % tuku) na kolonkách Oasis[®] HLB (hydrofilně-lipofilní vlastnosti) byly zkoušeny 2 koncentrační hladiny, 50 a $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Výtěžnosti byly vypočteny pomocí externí kalibrace, tzn. metodou vícebodové kalibrační křivky, každý finální extrakt vytvořeného pseudoreálného vzorku z kolonky byl změřen tři krát. Pro sledované analyty byla vypočtena výtěžnost R_f (%) podle uvedeného vzorce /6-16/, relativní směrodatná odchylka RSD podle /6-17/, nejistota výtěžnosti $N(R)_T$ (%) (/6-18/).

Pro hodnocení vlivu chyb celého analytického postupu byl použit vzorec /6-19/ pro výpočet kombinované nejistoty analytického postupu N_{CT} (%), tedy metody hodnocení nejistoty postupem "shora - dolů".

Výtěžnost (Recovery, R_f) je podíl množství analytu přítomného v analyzovaném vzorku zkoušeného materiálu nebo přidaného k němu, který je extrahován a podrobován měření.

$$R_f = \frac{c_{abs}}{c_{ref}} \cdot 100 \quad /6-16/$$

kde: c_{abs} je pozorovaný obsah (množství, koncentrace), c_{ref} je skutečná hodnota obsahu (množství, koncentrace)

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \cdot \frac{100}{\bar{x}}} \quad /6-17/$$

kde: x_i je jednotlivá hodnota souboru, \bar{x} je aritmetický průměr, N je rozsah základního souboru, n je rozsah výběrového souboru

Nejistota měření (*Uncertainty of Measurement*) je parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, které by mohly být důvodně přisuzovány měřené veličině.

$$N(R)_T(\%) = \frac{0,5 \cdot (100 - R_T)}{\sqrt{3}} \quad /6-18/$$

kde: R_T je výtěžnost analytu

$$N_{CT}(\%) = \sqrt{RSD^2 + N(R)_T^2} \quad /6-19/$$

kde: RSD je relativní směrodatná odchylka a $N(R)_T$ je nejistota výtěžnosti^[148]

6.1.1 Výtěžnost Extrakce

Tab. 30 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro tetracyklin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

| Analyt | Počáteční koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výtěžnost [%] | RSD [%] | $N(R)_T$ [%] | N_{CT} [%] |
|-------------|---|--|---------------|-------------|--------------|--------------|
| Tetracyklin | 100 | 85,3 | 85,3 | 1,61 | 4,24 | 4,53 |
| | 100 | 95,0 | 95,0 | 1,52 | 1,45 | 2,10 |
| | 100 | 92,7 | 92,7 | 3,99 | 2,12 | 4,52 |
| | 100 | 92,3 | 92,3 | 4,00 | 2,22 | 4,58 |
| | 100 | 96,5 | 96,5 | 3,69 | 1,00 | 3,82 |
| | 100 | 96,8 | 96,8 | 0,41 | 0,93 | 1,01 |
| | 100 | 89,4 | 89,4 | 1,26 | 3,06 | 3,31 |
| | 100 | 94,9 | 94,9 | 1,68 | 1,48 | 2,24 |
| | 100 | 103 | 103 | 1,39 | -0,74 | 1,57 |
| | 100 | 90,2 | 90,2 | 1,02 | 2,82 | 3,00 |
| | Průměr | 93,6 | 93,6 | 93,6 | 2,06 | 1,86 |

Tab. 31 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro tetracyklin (50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

| Analyt | Počáteční koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výtěžnost [%] | RSD [%] | $N(R)_T$ [%] | N_{CT} [%] |
|-------------|---|--|---------------|-------------|--------------|--------------|
| Tetracyklin | 50 | 35,9 | 73,9 | 4,74 | 7,58 | 8,94 |
| | 50 | 38,7 | 79,5 | 1,96 | 5,93 | 6,24 |
| | 50 | 44,4 | 88,1 | 2,26 | 3,45 | 4,12 |
| | 50 | 43,5 | 86,4 | 7,43 | 3,93 | 8,41 |
| | 50 | 46,3 | 91,9 | 1,52 | 2,34 | 2,79 |
| | 50 | 43,4 | 89,2 | 3,99 | 3,12 | 5,06 |
| | 50 | 42,5 | 87,5 | 2,37 | 3,62 | 4,33 |
| | 50 | 46,2 | 95,0 | 2,16 | 1,44 | 2,60 |
| | 50 | 43,4 | 89,3 | 1,73 | 3,08 | 3,54 |
| | 50 | 41,2 | 84,7 | 3,39 | 4,43 | 5,58 |
| | Průměr | 43,3 | 87,9 | 87,9 | 2,98 | 3,48 |

poznámka: výtěžnost kolonky č. 1 byla $<LOQ$ pro TC, CTC a OTC, aproto nebyla zahrnuta do průměru

Tab. 32 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro chlortetracyklin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

| Analyt | Počáteční koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výtěžnost [%] | RSD [%] | $N(R)_T$ [%] | N_{CT} [%] |
|------------------|--|---|------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Chlortetracyklin | 100 | 88,7 | 88,7 | 2,87 | 3,27 | 4,36 |
| | 100 | 97,3 | 97,3 | 4,42 | 0,79 | 4,49 |
| | 100 | 96,8 | 96,8 | 7,21 | 0,92 | 7,27 |
| | 100 | 95,3 | 95,3 | 6,64 | 1,34 | 6,77 |
| | 100 | 95,1 | 95,1 | 1,44 | 1,41 | 2,01 |
| | 100 | 94,8 | 94,8 | 0,38 | 1,51 | 1,55 |
| | 100 | 94,8 | 94,8 | 2,22 | 1,51 | 2,68 |
| | 100 | 95,0 | 95,0 | 1,84 | 1,45 | 2,35 |
| | 100 | 86,1 | 86,1 | 0,43 | 4,02 | 4,04 |
| | 100 | 94,0 | 94,0 | 2,87 | 3,27 | 4,36 |
| | Průměr | 93,8 | 93,8 | 93,8 | 2,84 | 1,80 |

Tab. 33 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro chlortetracyklin (50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

| Analyt | Počáteční koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výtěžnost [%] | RSD [%] | $N(R)_T$ [%] | N_{CT} [%] |
|------------------|--|---|------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Chlortetracyklin | 50 | 24,1 | 47,8 | 7,47 | 15,1 | 16,8 |
| | 50 | 34,5 | 68,7 | 4,45 | 9,0 | 10,1 |
| | 50 | 33,1 | 66,3 | 4,95 | 9,7 | 10,9 |
| | 50 | 30,6 | 61,4 | 1,90 | 11,1 | 11,3 |
| | 50 | 27,7 | 55,5 | 5,28 | 12,9 | 13,9 |
| | 50 | 39,6 | 78,6 | 3,49 | 6,17 | 7,09 |
| | 50 | 32,2 | 64,1 | 3,07 | 10,4 | 10,8 |
| | 50 | 41,8 | 83,1 | 3,82 | 4,89 | 6,20 |
| | 50 | 36,8 | 73,1 | 4,33 | 7,77 | 8,90 |
| | 50 | 35,0 | 69,6 | 3,55 | 8,78 | 9,47 |
| | Průměr | 34,6 | 68,9 | 68,9 | 3,87 | 8,97 |

Tab. 34 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro oxytetracyklin (100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

| Analyt | Počáteční koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výtěžnost [%] | RSD [%] | $N(R)_T$ [%] | N_{CT} [%] |
|----------------|--|---|------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Oxytetracyklin | 100 | 87,8 | 87,8 | 4,02 | 3,51 | 5,33 |
| | 100 | 85,6 | 85,6 | 3,55 | 4,17 | 5,48 |
| | 100 | 87,4 | 87,4 | 6,96 | 3,64 | 7,85 |
| | 100 | 98,5 | 98,5 | 6,28 | 0,44 | 6,29 |
| | 100 | 95,2 | 95,2 | 4,10 | 1,39 | 4,33 |
| | 100 | 94,5 | 94,5 | 3,50 | 1,60 | 3,84 |
| | 100 | 91,1 | 91,1 | 2,37 | 2,57 | 3,50 |
| | 100 | 94,0 | 94,0 | 1,44 | 1,72 | 2,25 |
| | 100 | 98,0 | 98,0 | 2,41 | 0,57 | 2,47 |
| | 100 | 95,1 | 95,1 | 1,34 | 1,42 | 1,95 |
| | Průměr | 92,7 | 92,7 | 92,7 | 3,60 | 2,10 |

Tab. 35 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro oxytetracyklin (50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

| Analyt | Počáteční koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výtěžnost [%] | RSD [%] | $N(R)_T$ [%] | N_{CT} [%] |
|----------------|--|---|------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Oxytetracyklin | 50 | 30,9 | 58,6 | 4,22 | 11,9 | 12,7 |
| | 50 | 35,0 | 66,4 | 3,15 | 9,7 | 10,2 |
| | 50 | 42,8 | 81,2 | 4,43 | 5,43 | 7,01 |
| | 50 | 47,2 | 89,5 | 9,19 | 3,02 | 9,68 |
| | 50 | 41,6 | 78,9 | 0,49 | 6,09 | 6,11 |
| | 50 | 41,5 | 75,8 | 3,33 | 6,99 | 7,74 |
| | 50 | 38,7 | 70,7 | 1,94 | 8,46 | 8,68 |
| | 50 | 36,8 | 67,2 | 1,16 | 9,46 | 9,54 |
| | 50 | 36,3 | 66,3 | 3,78 | 9,73 | 10,4 |
| | 50 | 34,0 | 62,1 | 1,99 | 10,9 | 11,1 |
| | Průměr | 39,3 | 73,1 | 73,1 | 3,27 | 7,76 |

Tab. 36 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro doxycyklin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

| Analyt | Počáteční koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výtěžnost [%] | RSD [%] | $N(R)_T$ [%] | N_{CT} [%] |
|------------|--|---|------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Doxycyklin | 100 | 78,9 | 78,9 | 2,26 | 6,08 | 6,49 |
| | 100 | 86,9 | 86,9 | 7,32 | 3,79 | 8,24 |
| | 100 | 78,1 | 78,1 | 2,44 | 6,32 | 6,77 |
| | 100 | 80,7 | 80,7 | 4,09 | 5,56 | 6,91 |
| | 100 | 75,7 | 75,7 | 6,82 | 7,01 | 9,78 |
| | 100 | 81,8 | 81,8 | 3,95 | 5,25 | 6,56 |
| | 100 | 78,3 | 78,3 | 1,86 | 6,27 | 6,54 |
| | 100 | 82,0 | 82,0 | 2,42 | 5,20 | 5,74 |
| | 100 | 78,3 | 78,3 | 1,41 | 6,26 | 6,41 |
| | 100 | 81,3 | 81,3 | 3,63 | 5,39 | 6,50 |
| | Průměr | 80,2 | 80,2 | 80,2 | 3,62 | 5,71 |

Tab. 37 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro doxycyklin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)

| Analyt | Počáteční koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výsledná koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | Výtěžnost [%] | RSD [%] | $N(R)_T$ [%] | N_{CT} [%] |
|------------|--|---|------------------|-------------|-----------------|-----------------|
| Doxycyklin | 50 | 18,9 | 30,4 | 4,30 | 20,1 | 20,5 |
| | 50 | 39,5 | 76,2 | 2,75 | 6,88 | 7,41 |
| | 50 | 31,0 | 59,6 | 4,86 | 11,7 | 12,6 |
| | 50 | 29,2 | 59,0 | 2,59 | 11,8 | 12,1 |
| | 50 | 23,6 | 47,6 | 2,18 | 15,1 | 15,3 |
| | 50 | 39,5 | 76,0 | 2,64 | 6,9 | 7,4 |
| | 50 | 37,8 | 72,8 | 1,70 | 7,9 | 8,0 |
| | 50 | 41,9 | 80,7 | 3,83 | 5,6 | 6,8 |
| | 50 | 45,8 | 88,2 | 3,58 | 3,4 | 4,9 |
| | 50 | 39,6 | 76,3 | 8,32 | 6,8 | 10,8 |
| | Průměr | 36,4 | 70,7 | 70,7 | 3,61 | 8,45 |

V Tab. 38 je uvedeno pro přehlednost shrnutí průměrných hodnot výtěžností R_f (%), relativních směrodatných odchylek RSD (%), nejistot $N(R)_T$ (%), kombinovaných nejistot N_{CT} (%), limitu detekce LOD a limitu kvantifikace LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) pro tetracyklin, chlortetracyklin, oxytetracyklin a doxycyklin.

Tab. 38 Shrnutí výtěžností, relativních směrodatných odchylek, nejistot, kombinovaných nejistot, LOD a LOQ pro vybrané tetracykliny

| | Tetracyklin | Chlortetracyklin | Oxytetracyklin | Doxycyklin |
|--|-------------|------------------|----------------|------------|
| R_f 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [%] | 93,6 | 93,8 | 92,7 | 80,2 |
| R_f 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [%] | 87,9 | 68,9 | 73,1 | 70,7 |
| RSD 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [%] | 2,06 | 2,84 | 3,60 | 3,62 |
| RSD 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [%] | 2,98 | 3,87 | 3,27 | 3,61 |
| $N(R)_T$ 100 [%] | 1,86 | 1,80 | 2,10 | 5,71 |
| $N(R)_T$ 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [%] | 3,48 | 8,97 | 7,76 | 8,45 |
| N_{CT} 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [%] | 3,07 | 3,75 | 4,33 | 6,99 |
| N_{CT} 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [%] | 4,74 | 9,85 | 8,95 | 9,48 |
| LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | 11,50 | 7,86 | 9,96 | 3,40 |
| LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] | 38,32 | 26,22 | 33,20 | 11,32 |

Z naměřených hodnot v Tab. 38 můžeme konstatovat, že převzatý a upravený extrakční postup poskytuje přijatelné hodnoty výtěžností pro všechny vybrané tetracykliny na zkoušené koncentrační hladině 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, a to platí i pro tetracyklin při zvolené koncentraci 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Ostatní analyty měly hodnoty výtěžností při nižší koncentraci přibližně 70 %. Je možné se domnívat, že tyto nízké koncentrace mohly být ovlivněny maticí vzorku. Také byla při měření pseudoreálných vzorků při koncentraci 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pozorována opětovná nesymetrie píků u tetracyklinu a oxytetracyklinu, která zvláště u oxytetracyklinu mohla způsobit nižší výtěžnost danou horším odečtem plochy píku. Proto bylo usouzeno, že i koncentrace má významný vliv na tvar píku v porovnání s vyšší stanovovanou koncentrací a dále pak např. s obsahem analytů ve standardech při optimalizaci LC-MS/MS. Tuto nesymetrii by bylo možné upravit vyšším nástřikem na kolonu, díky kterému lze zvýšit aktuální obsah stanovovaných analytů.

Relativní směrodatné odchylky nebyly v průběhu měření větší než 9,2 % a průměrné hodnoty ne větší než 3,9 % pro obě zvolené koncentrační hladiny výtěžností.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu UPLC-MS/MS pro analýzu tetracyklinových antibiotik tetracyklinu, chlortetracyklinu hydrochloridu, oxytetracyklinu hydrochloridu a doxycyklinu hydrochloridu. Separace byla prováděna pomocí ultraúčinného kapalinového chromatografu Dionex Ultimate 3000 (Německo) na analytické koloně ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (3 x 50 mm, 1,8 μm), Agilent Technologies (USA). Jako analytická koncovka byl zvolen kvůli nízkému detekčnímu limitu tandemový hmotnostní spektrometr API 2000 od firmy AB Sciex (USA).

Optimálním nastavením UPLC-ESI-MS/MS pro současnou analýzu vybraných tetracyklinových antibiotik bylo:

- Mobilní fáze 0,1 % kyselina mravenčí (A) a acetonitril (B) v poměru určeném elučním gradientem:
 - 80A:20B (0-0,1 min),
 - 80A:20B na 25A:75:B (0,1-2 min),
 - 25A:75B na 20A:80B (2-3 min),
 - 20A:80B (3-5,5 min),
 - 20A:80B na 80A:20B (5,5-7 min),
 - 20A:80B (7-10 min).
- Průtok mobilní fáze 0,350 ml·min⁻¹.
- Dávkovaný objem na kolonu 5 μl .
- Teplota autosampleru 7 °C.
- Teplota analytické kolony 15 °C.
- Pozitivní ionizace (ESI⁺) a skenovací mód MRM.
- Hodnota deklasteračního potenciálu (DP) 16,0 V; fokusačního potenciálu (FP) 370,0 V; vstupního potenciálu (EP) 5,0 V; kolizní energie (CE) 25,0 V; výstupní potenciál z kolizní cely (CXP) 32,0 V; napětí iontového zdroje 5250 V a teplota iontového zdroje 450 °C. Ostatní parametry byly ponechány jako defaultně nastavené a doporučované výrobcem.

Za těchto podmínek byly retenční časy u vybraných tetracyklinů: oxytetracyklin 1,34 min, tetracyklin 1,73 min, chlortetracyklin 2,24 min a doxycyklin 2,28 min.

Vytvořenou metodu lze použít pro potvrzení přítomnosti vybraných tetracyklinů v různých environmentálních matricích s přijatelnými detekčními a kvantifikačními limity v pořadí pro tetracyklin, chlortetracyklin, oxytetracyklin a doxycyklin 11,50; 7,86; 9,96; 3,40 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a 38,32; 26,22; 33,20 a 11,32 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro detekci analytů bylo využito celkem 4 identifikačních bodů, tak jak je vyžadováno detekcí hmotnostní spektrometrií těchto antibiotik v příloze č. 1 podle nařízení evropské komise 96/23/EC.

Optimalizovaný extrakční postup poskytuje přijatelné hodnoty výtěžností pro tetracyklin 93,6 %, chlortetracyklin 93,8 %, oxytetracyklin 92,7 % a doxycyklin 80,2 % při zvolené koncentrační hladině 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato hodnota je také stanovena Evropskou Unií jako maximální limit reziduí (MRL) pro oxytetracyklin, tetracyklin a chlortetracyklin v mléce a vztahuje se jako suma příslušného antibiotika a jeho 4-epimeru. Proto je možné vytvořenou metodu použít i pro kvantifikaci MRL hodnot tetracyklinů v mléce.

Tetracykliny se používají ve veterinární medicíně pro léčbu např. hovězí mastitidy. Kontaktovaní chovatelé ale v době realizace diplomové práce svoje zvířata, skot chovaný pro mléko, neléčili tetracykliny. Proto nebylo možné získat reálné vzorky pro analýzu a výsledky z měření reálných vzorků, které budou k dispozici v budoucnu, nemohly být zahrnuty do této diplomové práce. Výsledky měření z optimalizace a výtěžností budou použity pro publikaci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **SEVILLA-SANTOS, Patrocínio.** *The Antibiotic And Antitumor Activities Of Selected Philippine Thallophytes.* Transactions of the National Academy of Science and Technology, Volume 4. Issue 2937. 1982. Pages 118-62.
2. **KLABAN, Vladimír.** *Ekologie mikroorganismů: ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů.* 1. vyd. Praha: Galén, c2011, ix, 549 s. ISBN 978-80-7262-770-7.
3. **ZAKERI, Bijan a WRIGHT, Gerard D.** *Chemical Biology of Tetracycline Antibiotics.* Biochemistry and Cell Biology. Volume 86. Issue 2. April 2008. Pages 124-36. DOI: 10.1139/O08-002. ISSN: 0829-8211.
4. **ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila.** *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologu.* Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008, 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
5. **DEÁK, Tibor a FARKAS, József.** *Microbiology of thermally preserved foods: canning and novel physical methods.* Lancaster, PA: DEStech Publications, c2013, xv, 318 s. ISBN 978-1-60595-033-4.
6. **ROZSYPAL, Stanislav.** *Obecná bakteriologie.* 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981, 749 s. ISBN 14-549-81.
7. **VOTAVA, Miroslav.** *Lékařská mikrobiologie speciální.* Brno: Neptun, 2003, xxii, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
8. **LEE, Y.** *Microbial biotechnology: principles and applications.* 3rd ed. Singapore: World Scientific, c2013, xvi, 877 s. ISBN 978-981-4366-82-3.
9. **GLICK, Bernard R, Jack J, PASTERNAK a Cheryl L, PATTEN.** *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA.* 4th ed. Washington: ASM Press, c2010, xvii, 1000p. ISBN 978-1-55581-498-4.
10. **DOBROVOLNÁ, Lucie.** *Biochemické aspekty užívání antibiotik.* [online]. 2010 [cit. 2014-03-29]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta. Vedoucí práce Petr Ptáček. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/220879/pedf_b/>.
11. **KOOLMAN, Jan a RÖHM, Klaus-Heinrich.** *Barevný atlas biochemie.* 1. české vyd. Praha: Grada, 2012, xiv, 498 s. ISBN 978-80-247-2977-0.
12. **POSPÍŠILOVÁ, Veronika.** *Vážíme si antibiotik?* [online]. 2007 [cit. 2014-03-30]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Lenka Dostalová Kopečná. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/101142/lf_b/>.

13. **HAMPL, František, RÁDL, Stanislav a PALEČEK, Jaroslav.** *Farmakochemie*. 2., rozš. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007, 448 s. ISBN 978-80-7080-639-5.
14. **VAŇKOVÁ, Kateřina.** Problémy rezistence k penicilinovým a tetracyklinovým antibiotikům. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2009. 55 s. Vedoucí bakalářské práce Černíková Michaela, MVDr. Ph.D.
15. **ŘEZÁČOVÁ, Petra.** Mechanismy rezistence k antimikrobiálním látkám u gramnegativních bakterií. [online]. 2013 [cit. 2014-03-30]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Petra Myšková. Dostupné z: <<http://is.muni.cz/th/>>.
16. **DOBROVOLNÁ, Lucie.** Tvorba učebního materiálu v rámci mezipředmětových vazeb pro téma antibiotika. [online]. 2012 [cit. 2014-04-15]. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Pedagogická fakulta. Vedoucí práce Petr Ptáček. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/220879/pedf_m/>.
17. **HAMBÁLKOVÁ, Kateřina.** Odstraňování mikropolutantů při úpravě pitné vody. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 70 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Petr Dolejš, CSc. Dostupné z <https://www.vutbr.cz/studium/zaverecne-prace?zp_id=2784>.
18. **SCHINDLER, Jiří.** *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 223 s. ISBN 978-80-247-3170-4.
19. **BETSY, Tom a KEOGH, James Edward.** *Microbiology demystified*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, c2012, xxii, 291 s. ISBN 978-0-07-176109-3.
20. **KATZUNG, Bertram G.** *Základní a klinická farmakologie*. Vyd. v ČR 2., V H & H 2. Jinočany: H & H Vyšehradská, 2006, 1106 s. ISBN 80-7319-056-7.
21. **GALLAGHER, Jason C a MACDOUGALL, Conan.** *Antibiotics: simplified*. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett Publishers, c2009, ix, 158 s. ISBN 978-0-7637-5959-9.
22. **Tetracyclines.** Nursing. Volume 14. Issue 146. January 1984. Pages 46. ISSN:0360-4039
23. **HYNIE, Sixtus.** *Farmakologie v kostce*. 2. vyd. Praha: TRITON, 2001, 520 s. ISBN 80-7254-181-1.
24. **KRPALOVÁ, Iveta.** *Antibiotická rezistence u mikroorganismů významných v kosmetických prostředcích*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta

- technologická, 2012. 54 s. Vedoucí bakalářské práce Buňková Leona, doc. RNDr. Ph.D.
25. **PATYRA, Ewelina, KOWALCZYK, Ewelina a KWIATEK, Krzysztof.** *Development and Validation Method for the Determination of Selected Tetracyclines in Animal Medicated Feedingstuffs with the Use of Micellar Liquid Chromatography.* Analytical and Bioanalytical Chemistry. Volume 405. Issue 21. August 2013. Pages 6799-6806. DOI:10.1007/s00216-013-7117-5. ISSN:1618-2650.
 26. **PATRICK, Graham L. a SPENCER, John.** *An introduction to medicinal chemistry.* 4th ed. New York: Oxford University Press, c2009, xxii, 752 s. ISBN 978-0-19-923447-9.
 27. **LEVY, Stuart B.** *Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc.* Vyd. 1. Praha: Academia, 2007, 312 s. ISBN 978-80-200-1485-6.
 28. **NELSON, Mark L a LEVY, Stuart B.** *The History of the Tetracyclines.* Annals of the New York Academy of Sciences. Volume 1241. Issue 1. December 2011. Pages 17-32. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x. ISSN:1749-6632.
 29. **Tetracyclines.** Wikipedia, the free encyclopedia. [cit. 2014-7-11]. „*Tetracycline ABCD num*“ od NEUROtiker – Vlastní dílo. Licencováno pod Public domain via Wiki-media Commons - Dostupné z WWW: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tetracycline_ABCD_num.svg#mediaviewer/Soubor:Tetracycline_ABCD_num.svg>.
 30. **LISÁ, Hana.** *Problematika stanovení reziduí léčiv v odpadních vodách.* Brno: Vysoké učení, Fakulta chemická, 2011. 145 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studium/zaverecne-prace?zp_id=41920>.
 31. **CLIVE, D. L. J.** *Chemistry of Tetracyclines: Quarterly Reviews.* Chemical Society. Volume 22. Issue 4435. June 1968. Pages 232-60. DOI: 10.1039/QR9682200435. ISSN:0009-2681.
 32. **ANDERSON, Collin R, RUPP, Heidi S a WU, Wen-Hsin.** *Complexities in Tetracycline Analysis—chemistry, Matrix Extraction, Cleanup, and Liquid*

- Chromatography*. Journal of Chromatography A. Volume 1075. Issue 1. May 2005. Pages 23-32. DOI:10.1016/j.chroma.2005.04.013. ISSN:0021-9673.
33. **SAPADIN, Allen N a FLEISCHMAJER, Raul**. *Tetracyclines: Nonantibiotic Properties and Their Clinical Implications*. Journal of the American Academy of Dermatology. Volume 54. Issue 2. February 2006. Pages 258-265. DOI:10.1016/j.jaad.2005.10.004. ISSN:0190-9622.
34. **SVOBODOVÁ, Julie**. *Metody analýzy léčiv v environmentálních matricích*. [online]. 2008 [cit. 2014-03-30]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Zdeněk Šimek. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/176754/prif_b/>.
35. **SMILACK, Jerry D**. *The Tetracyclines*. *Mayo Clinic Proceedings*. Volume 74. Issue 7. July 1999. Pages 727-9. Review. DOI:10.4065/74.7.727. ISSN:0025-6196.
36. **ČERVINKA, Otakar**. *Chemie organických sloučenin (2. Díl)*. 1. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1987, 1052 s. ISBN 04-630-87.
37. **ŠKÁRKA, Bohumil a FERENČÍK, Miroslav**. *Biochémiá*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1983, 635 s.
38. **PICKENS, Lauren B a TANG, Yi**. *Decoding and Engineering Tetracycline Biosynthesis*. *Metabolic Engineering*. Volume 11. Issue 2. March 2009. Pages 69-75. DOI:10.1016/j.ymben.2008.10.001. ISSN:1096-7184.
39. **CHAREST, Mark G, SIEGEL, Dionicio R a MYERS, Andrew G**. *Synthesis of (-) tetracycline*. *Journal of the American Chemical Society*. Volume 127. Issue 23. May 2005. Pages 8292-3. DOI: 10.1021/ja052151d. ISSN: 0002-7863.
40. **BERG, Jeremy M., et al**. *Biochemistry*. 7th international ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2012, xxxii, 1098, [78] s. ISBN 978-1-4292-7635-1.
41. **CLARK, David P a PAZDERNIK, Nanette Jean**. *Molecular biology*. 2nd ed. Waltham: Academic Press, c2013, xv. 907 s. ISBN 978-0-12-378594-7.
42. **LÜLLMANN, Heinz, Klaus, MOHR a HEIN, Lutz**. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 4., české. Praha: Grada, 2012, xiv, 366 s. ISBN 978-80-247-3908-3.

43. **DAŇKOVÁ, Tereza.** *Potravinové interakce v rámci antibiotické terapie.* [online]. 2014 [cit. 2014-03-30]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Ondřej Zendulka. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/359104/lf_b/>.
44. **HALAŠKOVÁ, Kateřina.** *Rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám.* [online]. 2011 [cit. 2014-03-30]. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Ivan Rychlík. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/323633/prif_b/>.
45. **TSANKOV, Nikolai, BROSHILOVA, Valentina a KAZANDJIEVA, Jana.** *Tetracyclines in Dermatology.* Clinics in Dermatology. Volume 21. Issue 1. January-February 2003. Pages 33-9. DOI:10.1016/S0738-081X(02)00324-3. ISSN:0738-081X.
46. **Hejzlar, Miroslav.** *Antibiotika v praxi.* 2. vyd., přeprac. a rozš., (V nakl. Makropulos 1.) Praha: Galén, 1995. 499 s. tab. ISBN:80-901776-4-6.
47. **BENEŠ, Jiří.** *Infekční lékařství.* 1. vyd. Praha: Galén, c2009, xxv, 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.
48. **MARTÍNKOVÁ, Jiřina.** *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů.* 1. vyd. Praha: Grada, 2007, 379 s. ISBN 978-80-247-1356-4.
49. **CHOPRA, I. a HOWE, T. G. B..** *Bacterial Resistance to the Tetracyclines.* Microbiological Reviews. Volume 42. Issue 4. December 1978. Pages 707-24. ISSN:0146-0749.
50. **CHOPRA, I. a ROBERTS, M.** *Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance.* Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR. Volume 65. Issue 2. June 2001. Pages 232-60. DOI: 10.1128/mmbr.65.2.232-260.2001. ISSN:1092-2172.
51. **ROTHSTEIN, D. M., et al.** *Detection of Tetracyclines and Efflux Pump Inhibitors.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Volume 37. Issue 8. August 1993. Pages 1624-9. DOI:10.1128/AAC.37.8.1624. ISSN:0066-4804.
52. **LOCHMANN, Otto.** *Nežádoucí účinky antiinfekčních léčiv.* Vyd. 1. V Praze: Triton, 2008, 243 s. ISBN 978-80-7387-073-7.
53. **RENSON, C. E.** *Tetracyclines in Teeth.* British Medical Journal. Volume 2. Issue 6091. October 1977. Pages 892-2. ISSN:0007-1447.

54. **LÜLLMANN, Heinz, MOHR, Klaus a WEHLING, Martin.** *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání.* Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, 725 s. ISBN 80-247-0836-1.
55. **AGWUH, Kenneth N a MACGOWAN, Alasdair.** *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Tetracyclines Including Glycylcyclines.* The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Volume 58. Issue 2. August 2006. Pages 256-65. DOI: 10.1093/jac/dkl224. ISSN:1460-2091.
56. **CHOPRA, I.** *Glycylcyclines: Third-generation Tetracycline Antibiotics.* Current Opinion in Pharmacology. Volume 1. Issue 5. October 2001. Pages 464-9. DOI:10.1016/s1471-4892(01)00081-9. ISSN:1471-4892.
57. **Český lékopis.** Příloha k vyhlášce č. 1/1998 Sb. [Online] [cit. 2014-10-11]. Dostupné z WWW: < <http://www.lekopis.cz/> >
58. **JEONG, Joonseon, at al.** *Degradation of Tetracycline Antibiotics: Mechanisms and Kinetic Studies for Advanced Oxidation/reduction Processes.* Chemosphere. Volume 78. Issue 5. January 2010. Pages 533-40. DOI:10.1016/j.chemosphere.2009.11.024. ISSN:0045-6535.
59. **Chlortetracycline.** Wikipedia, the free encyklopedia. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Chlortetracycline> >.
60. —. ChemSpider chemical database. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10469370> >.
61. **Oxytetracycline.** Wikipedia, the free encyklopedia. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Oxytetracycline> >.
62. —. The DrugBank database. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00595> >.
63. **Tetracycline.** Wikipedia, the free encyklopedia. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Tetracycline> >.
64. —. The DrugBank database. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00759> >.
65. **Demeclocycline.** Wikipedia, the free encyklopedia. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Demeclocycline> >.

66. —. The DrugBank database. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00618> >.
67. **Rolitetracycline**. The DrugBank database. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01301> >.
68. —. Wikipedia, the free encyclopedia. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Rolitetracycline> >.
69. **Lymecycline**. Wikipedia, the free encyclopedia. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Lymecycline> >.
70. —. The DrugBank database. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00256> >.
71. **Clomocycline**. The Human Metabolome Database (HMDB). [online]. [cit. 2014-4-13]. Dostupné z WWW: < <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB14596> >.
72. —. The DrugBank database. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00453> >.
73. —. Wikipedia, the free encyclopedia. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Clomocycline> >.
74. **Metacycline**. Wikipedia, the free encyclopedia. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Methacycline> >.
75. —. ChemSpider chemical database. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10468596> >.
76. **Doxycycline**. Wikipedia, the free encyclopedia. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Doxycycline> >.
77. —. The DrugBank database. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00254> >.
78. **BRUNO, Federica, et al.** *An Original Approach to Determining Traces of Tetracycline Antibiotics in Milk and Eggs by Solid-phase Extraction and Liquid Chromatography/mass Spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry. Volume 16. Issue 14. June 2002. Pages 1365-76. DOI:10.1002/rcm.724. ISSN:0951-4198.

79. **Minocycline**. Wikipedia, the free encyclopedia. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Minocycline> >.
80. —. The DrugBank database. [Online] [cit. 2014-4-2]. Dostupné z WWW: < <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01017> >.
81. **DAGHRIR, R a DROGUI, P.** *Tetracycline Antibiotics in the Environment: A Review*. Environmental Chemistry Letters. Volume 11. Issue 3. September 2013. Pages 209-27. DOI:10.1007/s10311-013-0404-8. ISSN:1610-3653.
82. **ARIKAN, Osman A, et al.** *The Fate and Effect of Oxytetracycline During the Anaerobic Digestion of Manure from Therapeutically Treated Calves*. Process Biochemistry. Volume 41. Issue 7. July 2006. Pages 1637-43. DOI:10.1016/j.procbio.2006.03.010. ISSN:1359-5113.
83. **VITVAROVÁ, Alena.** *Stanovení léčiv v odpadních vodách*. [online]. 2013 [cit. 2014-03-30]. Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jitka Bečanová. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/270294/prif_m/>.
84. **LI, Ruiping, et al.** *Hydrophilic Interaction Chromatography Separation Mechanisms of Tetracyclines on Amino-bonded Silica Column*. Journal of Separation Science. Volume 34. Issue 13. July 2011. Pages 1508-16. DOI:10.1002/jssc.201100130. ISSN:1615-9306.
85. **ROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC.** *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2007, xxiii, 574 s. ISBN 978-0-470-85903-2.
86. **CINQUINA, A.L, et al.** *Validation of a High-performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline and Doxycycline in Bovine Milk and Muscle*. Journal of Chromatography a. Volume 987. Issue 1. February 2003. Pages 227-33. DOI:10.1016/S0021-9673(02)01446-2. ISSN:0021-9673.
87. **SAMANIDOU, Victoria F, NIKOLAIDOU, Konstantina I a PAPADOYANNIS, Ioannis 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. Volume 30. Issue 15. October 2007. Pages 2430-9. DOI:10.1002/jssc.200700057. ISSN:1615-9306.
88. **DE RUYCK, Hendrik a DE RIDDER, Herman.** *Determination of Tetracycline Antibiotics in Cow's Milk by Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM. Volume 21. Issue 9. April 2007. Pages 1511-20. DOI:10.1002/rcm.2991. ISSN:1097-0231.
89. **NIKOLAIDOU, Konstantina I, SAMANIDOU, Victoria F a PAPADOYANNIS, Ioannis N.** *Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Seven Tetracycline Antibiotics Residues in Chicken Muscle and Egg Yolk According to 2002/657/EC.* Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. Volume 31. Issue 14. July 2008. Pages 2141-58. DOI:10.1080/10826070802225445. ISSN:1082-6076.
90. **WANG, Li-Feng, PENG, Jing-Dong a LIU, Li-Min.** *A Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography Coupled with Resonance Rayleigh Scattering Detection for the Determination of Four Tetracycline Antibiotics.* Analytica Chimica Acta. Volume 630. Issue 1. October 2008. Pages 101-6. DOI:10.1016/j.aca.2008.09.066. ISSN:0003-2670.
91. **KHONG, Seu-Ping, HAMMEL, Yves-Alexis a GUY, Philippe A.** *Analysis of Tetracyclines in Honey by High-performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry.* Rapid Communications in Mass Spectrometry. Volume 19. Issue 4. February 2005. Pages 493-502. DOI:10.1002/rcm.1814. ISSN:0951-4198.
92. **LIU, Yan, et al.** *Determination of Tetracyclines in Honey Using Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorbance Detection and Residue Confirmation by Mass Spectrometry.* Chinese Journal of Chemistry. Volume 25. Issue 9. September 2007. Pages 1294-9. DOI:10.1002/cjoc.200790240. ISSN:1001-604X.
93. **UEKANE, TM, NETO, FRA a GOMES, LNF.** *Development and Validation of a Method for the Analysis of Tetracyclines in Chicken-muscle by Liquid Chromatography-electrospray-mass Spectrometry in Tandem (Lc-esi-ms/ms).* Quimica Nova. Volume 34. Issue 1. 2011. Pages 43-8. DOI:10.1590/S0100-40422011000100009. ISSN:1678-7064

94. **SCHNEIDER, Marilyn J, et al.** *Simultaneous Determination of Fluoroquinolones and Tetracyclines in Chicken Muscle Using HPLC with Fluorescence Detection.* Journal of Chromatography B. Volume 846. Issue 1. February 2007. Pages 8-13. DOI:10.1016/j.jchromb.2006.08.005. ISSN:1570-0232.
95. **CRISTOFANI, Elisa, et al.** *A Confirmatory Method for the Determination of Tetracyclines in Muscle Using High-performance Liquid Chromatography with Diode-array Detection.* Analytica Chimica Acta. Volume 637. Issue 1-2. April 2009. Pages 40-6. DOI:10.1016/j.aca.2008.10.029. ISSN:0003-2670.
96. **CHAROENRAKS, Thiraporn, et al.** *Analysis of Tetracycline Antibiotics Using HPLC with Pulsed Amperometric Detection.* Analytical Sciences : The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry. Volume 21. Issue 3. March 2005. Pages 241-5. DOI:10.2116/analsci.21.241. ISSN:0910-6340.
97. **CHÁFER-PERICÁS, Consuelo, et al.** *Multiresidue Determination of Antibiotics in Aquaculture Fish Samples by HPLC-MS/MS.* Aquaculture Research. Volume 41. Issue 9. August 2010. Pages 217-25. DOI:10.1111/j.1365-2109.2010.02504.x. ISSN:1355-557X.
98. **JIA, Ai, et al.** *Simultaneous Determination of Tetracyclines and Their Degradation Products in Environmental Waters by Liquid Chromatography–electrospray Tandem Mass Spectrometry.* Journal of Chromatography a. Volume 1216. Issue 22. May 2009. Pages 4655-62. DOI:10.1016/j.chroma.2009.03.073. ISSN:0021-9673.
99. **YANG, Shinwoo, CHA, Jongmun a CARLSON, Kenneth.** *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. Volume 18. Issue 18. August 2004. Pages 2131-2145. DOI:10.1002/rcm.1598. ISSN:0951-4198.
100. **JACOBSEN, Anne Marie, et al.** *Simultaneous Extraction of Tetracycline, Macrolide and Sulfonamide Antibiotics from Agricultural Soils Using Pressurised Liquid Extraction, Followed by Solid-phase Extraction and Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry.* Journal of Chromatography. a. Volume 1038. Issue 1-2. June 2004. Pages 157-70. DOI:10.1016/j.chroma.2004.03.034. ISSN:0021-9673.

101. **ANDREU, Vicente, et al.** *Determination of Tetracycline Residues in Soil by Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Volume 349. Issue 5. July 2009. Pages 1329-39. DOI:10.1007/s00216-009-2635-x. ISSN:1618-2650.
102. **JACOBSEN, Anne a HALLING-SØRENSEN, Bent.** *Multi-component Analysis of Tetracyclines, Sulfonamides and Tylosin in Swine Manure by Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Volume 384. Issue 5. March 2006. Pages 1164-74. DOI:10.1007/s00216-005-0261-9. ISSN:1618-2650.
103. **Boscher, Aurore, et al.** *Development of an a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuff by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography. Volume 1217. Issue 41. October 2010. Pages 6394-404. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.08.024. ISSN:0021-9673.
104. **CHENG, Y, PHILLIPS, D a NEUE, U.** *Simple and Rugged SPE Method for the Determination of Tetracycline Antibiotics in Serum by HPLC Using a Volatile Mobile Phase*. Chromatographia. Volume 44. Issue 3. February 1997. Pages 187-90. DOI:10.1007/BF02466454. ISSN:0009-5893.
105. **JIN, Hua, et al.** *Trace Analysis of Tetracycline Antibiotics in Human Urine Using UPLC–QToF Mass Spectrometry*. Microchemical Journal. Volume 94. Issue 2. March 2010. Pages 139-47. DOI:10.1016/j.microc.2009.10.010. ISSN:0026-265X.
106. **WEIMANN A, BOJESEN G.** *Analysis of tetracyclines in raw urine by column-switching high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B. Volume 721. Issue 1. January 1999. Pages 47-54. DOI:10.1016/S0378-4347(98)00459-9. ISSN:0378-4347.
107. **KISHIDA, Kunihiro.** *Simplified Extraction of Tetracycline Antibiotics from Milk Using a Centrifugal Ultrafiltration Device*. Food Chemistry. Volume 126. Issue 2. May 2011. Pages 687-90. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.11.021. ISSN:0308-8146.

108. **Calderon, de Azevedo Leonardo.** *Chromatography – The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. 1st ed. Croatia: InTech Prepress, 2012. 438s. ISBN 978-953-51-0813-9.
109. **ŠTULÍK, Karel.** *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
110. **KLOUDA, Pavel.** *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
111. **HENNION, M C.** *Solid-phase Extraction: Method Development, Sorbents, and Coupling with Liquid Chromatography*. *Journal of Chromatography*. a. Volume 856. Issue 1-2. September 1999. Pages 3-54. DOI:10.1016/S0021-9673(99)00832-8. ISSN:0021-9673.
112. **WANG, Shufang, YANG, Ping a CHENG, Yiyu.** *Analysis of Tetracycline Residues in Bovine Milk by CE-MS with Field-amplified Sample Stacking. Electrophoresis*. Volume 28. Issue 22. November 2007. Pages 4173-9. DOI:10.1002/elps.200700276. ISSN:1522-2683.
113. **SANDERSON, Hans, et al.** *Dissipation of Oxytetracycline, Chlortetracycline, Tetracycline and Doxycycline Using HPLC-UV and LC/M Under Aquatic Semi-field Microcosm Conditions*. *Chemosphere*. Volume 60. Issue 5. July 2005. Pages 619-29. DOI:10.4103/0250-474X.110599. ISSN:0045-6535.
114. **TONG, Jing, et al.** *Simultaneous Determination of Five Tetracycline and Macrolide Antibiotics in Feeds Using HPCE*. *Journal of Separation Science*. Volume 32. Issue 1. December 2009. Pages 4254-60. DOI:10.1002/jssc.200900415. ISSN:1615-9306.
115. **PETROVIĆ, Mira, et al.** *Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Pharmaceutical Residues in Environmental Samples. A Review*. *Journal of Chromatography a*. Volume 1067. Issue 1. March 2005. Pages 1-14. DOI:10.1016/j.chroma.2004.10.110. ISSN:0021-9673.
116. **VEGA, D, et al.** *Voltammetry and Amperometric Detection of Tetracyclines at Multi-wall Carbon Nanotube Modified Electrodes*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Volume 389. Issue 1. October 2007. Pages 951-8. DOI:10.1016/j.arabjc.2012.04.009. ISSN:1618-2650.
117. **LEE, Kyung-Sun, et al.** *Electrophoretic Total Analysis of Trace Tetracycline Antibiotics in a Microchip with Amperometry*. *Electrophoresis*.

- Volume 30. Issue 1. September 2009. Pages 3219-3227.
DOI:10.1002/elps.200900117. ISSN:1522-2683.
118. **MEYER, Veronika R.** *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 3rd ed., [online]. New York: John Wiley & Sons, 2004. 338 s. ISBN 0-471-98373-X. Dostupné z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9780470688427> >.
119. **OKA, Hisao, ITO, Yuko a MATSUMOTO, Hiroshi.** *Chromatographic Analysis of Tetracycline Antibiotics in Foods*. *Journal of Chromatography a*. Volume 882. Issue 1. June 2000. Pages 109-33. DOI:10.1016/S0021-9673(99)01316-3. ISSN:0021-9673.
120. **ZÝKA, Jaroslav.** *Analytická příručka*. 4., upravené vyd. Praha: SNTL, 1988, 1 sv. (678, 831 s.).
121. **SKOOG, Douglas A, F HOLLER a Steven L CROUCH.** *Principles of instrumental analysis*. 6th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole, c2007, xv, 1039 s. ISBN 978-0-495-01201-6.
122. **HARRIS, Daniel C.** *Quantitative chemical analysis*. 8th ed. New York: W.H. Freeman and Company, c2010, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 978-1-4292-1815-3.
123. **Supelco Applications Dev G.** *LC/MS Compatible Conditions for the Analysis of Tetracycline Antibiotics*. *Lc Gc North America*. Volume 2152. Issue 6. June 2003. Pages 52. ISSN:1527-5949.
124. **TREETEPVIJIT, Surudee, et al.** *Use of Nickel Implanted Boron-doped Diamond Thin Film Electrode Coupled to HPLC System for the Determination of Tetracyclines*. *Talanta*. Volume 68. Issue 4. February 2006. Pages 1329-35. DOI:10.1016/j.talanta.2005.07.047. ISSN:0039-9140.
125. **DE RUYCK, Hendrik.** *Development of Confirmatory Methods and Disposition of Some Veterinary Drugs in Food*. [online]. 2003 [cit. 2014-04-21]. Doctoral dissertation. Universiteit GENT, Faculty of Bioscience Engineering. Promoter Andr Hyughebaert. Available from: <<http://hdl.handle.net/1854/LU-521757>>.
126. **OKA, H, et al.** *Mass Spectrometric Analysis of Tetracycline Antibiotics in Foods*. *Journal of Chromatography. a*. Volume 812. Issue 1-2. July 1998. Pages 309-19. DOI:10.1016/S0021-9673(97)01278-8. ISSN:0021-9673.

127. **CASADO-TERRONES, Silvia, et al.** *Determination of Tetracycline Residues in Honey by CZE with Ultraviolet Absorbance Detection*. Electrophoresis. Volume 28. Issue 16. August 2007. Pages 2082-7. DOI:10.1002/elps.200600614. ISSN:1522-2683.
128. **PESEK, J J a MATYSKA, M T.** *Separation of Tetracyclines by High-performance Capillary Electrophoresis and Capillary Electrochromatography*. Journal of Chromatography. a. Volume 736. Issue 1-2. June 1996. Pages 313-20. DOI:10.1016/0021-9673(95)01316-4. ISSN:0021-9673.
129. **KURITTU, J, KARP, M a KORPELA, M.** *Detection of Tetracyclines with Luminescent Bacterial Strains*. Luminescence. The Journal of Biological and Chemical Luminescence. Volume 15. Issue 5. September 2000. Pages 291-7. DOI:10.1002/1522-7243(200009/10)15:5<291. ISSN:1522-7235.
130. **GONG, Zhilong a ZHANG, Zhujun.** *Determination of Tetracyclines with a Modified β -cyclodextrin Based Fluorosensor*. Analytica Chimica Acta. Volume 351. Issue 1. September 1997. Pages 205-10. DOI:10.1016/S0003-2670(97)00343-7. ISSN:0003-2670.
131. **SCHNEIDER, Marilyn J a CHEN, Guoying.** *Time-resolved Luminescence Screening Assay for Tetracyclines in Chicken Muscle*. Analytical Letters. Volume 37. Issue 10. July 2004. Pages 2067-78. DOI:10.1081/AL-200026679. ISSN:0003-2719.
132. **KACZMAREK, Malgorzata a LIS, Stefan.** *Chemiluminescence Determination of Tetracyclines Using Fenton System in the Presence Europium(III) Ions*. Analytica Chimica Acta. Volume 639. Issue 1. April 2009. Pages 96-100. DOI:10.1016/j.aca.2009.02.047. ISSN:0003-2670.
133. **ZHENG, Xingwang, MEI, Yang a ZHANG, Zhujun.** *Flow-injection Chemiluminescence Determination of Tetracyclines with in Situ Electrogenerated Bromine as the Oxidant*. Analytica Chimica Acta. Volume 440. Issue 2. August 2001. Pages 143-9. DOI:10.1016/S0003-2670(01)01050-9. ISSN:0003-2670.
134. **GUO, Zhiyong a GAI, Panpan.** *Development of an Ultrasensitive Electrochemiluminescence Inhibition Method for the Determination of Tetracyclines*. Analytica Chimica Acta. Volume 688. Issue 2. March 2011. Pages 197-202. DOI:10.1016/j.aca.2010.12.043. ISSN:0003-2670.

135. **JEON, Moonsun a RHEE PAENG, Insook.** *Quantitative Detection of Tetracycline Residues in Honey by a Simple Sensitive Immunoassay.* Analytica Chimica Acta. Volume 626. Issue 2. September 2008. Pages 180-5. DOI:10.1016/j.aca.2008.08.003. ISSN:0003-2670.
136. **TERNES, T. A, et al.** *Methods for the Determination of Neutral Drugs as Well as Betablockers and β 2-sympathomimetics in Aqueous Matrices Using GC/MS and LC/MS/MS.* Fresenius' Journal of Analytical Chemistry. Volume 362. Issue 3. October 1998. Pages 239-40. DOI:10.1007/s002160051083. ISSN:0937-0633.
137. **SATTAYASAMITSATHIT, Sirilak, THAVARUNGKUL, Panote a KANATHARANA, Proespichaya.** *Bismuth Film Electrode for Analysis of Tetracycline in Flow Injection System.* Electroanalysis. Volume 19. Issue 4. Februar 2007. Pages 502-5. DOI:10.1002/elan.200603726. ISSN:1040-0397.
138. **HOLZBECHER, Závíš a Jaroslav CHURÁČEK.** Analytická chemie. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 663 s.
139. **VONDRÁK, Dalibor a Jaroslav VULTERIN.** Analytická chemie. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985, 262 s.
140. **GOUW, T.** *Guide to modern methods of instrumental analysis.* New York: Wiley-Interscience, 1972, xii, 495 s.
141. **MILATA, Viktor a Peter SEGŁA.** *Spektrálne metódy v chémii.* Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2004, 327 s. ISBN 8022720496.
142. **SCHALLEY, Christoph A a Andreas SPRINGER.** *Mass spectrometry and gas-phase chemistry of non-covalent complexes.* Hoboken, New Jersey: Wiley, c2009, xvi, 571 s. ISBN 978-0-470-13115-2.
143. **HOLČAPEK, Michal.** *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze.* Hmotnostní analyzátory. Univerzita Pardubice [online]. 2012 [cit. 2015-01-02]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/03_HmotnostniAnalyzatory.pdf
144. **FAY, Laurent B a Martin KUSSMANN.** *Mass spectrometry and nutrition research.* Cambridge: RSC Publishing, c2010, xix, 339 s. ISBN 978-1-84973-036-5.
145. **NELMS, Simon M.** *Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook.* 1st pub. Oxford: Blackwell, c2005, xv, 485 s. ISBN 1-4051-0916-5.

146. **Gobezie, Reuben, Millett, et al.** *Proteomics: Applications to the Study of Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis*. J Am Acad Orthop Surg. Volume 14. Issue 6. January 2006. Pages 325-32. ISSN:1067-151X.
147. **ROZHODNUTÍ KOMISE** ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků. (oznámeno pod číslem K(2002) 3044). (Text s významem pro EHP). *2002/657/ES*. Úřední věstník Evropských společenství. 17.8.2002; L221: 8-36
148. **CHROMÝ, Vratislav, Luděk DOHNAL, Alena FISCHEROVÁ, Eva KLOKOČNÍKOVÁ, Josef KRATOCHVÍLA, Zdenek KUBÍČEK, Miloš POLLAK, Milena RIKANOVÁ, Petr SCHNEIDERKA, Luděk ŠPRONGL, Dana TRÁVNÍČKOVÁ a Jan VILÍMEC.** *Management kvality v analytické a klinické chemii*. první vydání. Brno: Masarykova univerzity, Brno, PřF, Ústav chemie, 2009. 215 s. ISBN 978-80-903732-6-6.
149. **NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 37/2010** ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu (poslední změna NAŘÍZENÍM KOMISE (EU) 2015/446 ze dne 17. března 2015). (Text s významem pro EHP). Úřední věstník Evropské unie. 20.1.2010; L 15/2

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|------------|--|
| acetyl-CoA | Acetyl coenzyme A / Acetylkoenzym A |
| ACN | Acetonitrile / Acetonitril |
| APCI | Atmospheric Pressure Chemical Ionization / chemická ionizace za atmosférického tlaku |
| APPI | Atmospheric Pressure Photoionization / fotoionizace za atmosférického tlaku |
| BDD | Boron-Doped Diamond electrodes / bórová elektroda dopovaná diamantem |
| BiFE | Bismuth Film Electrode / bismutová filmová elektroda |
| CAD MIKES | Collisionally Activated Decomposition Mass Analyser Ion Kinetic Energy Spectrometry |
| CE | Capillary Electrophoresis / kapilární elektroforéza |
| CEP | Collision Entrance Potential / vstupní kolizní potenciál |
| CI | Chemical Ionization / chemická ionizace |
| CL | Chemical Luminescence / chemiluminiscenční detektor |
| CSI | ColdSpray Ionization / ionizace sprejem za studena |
| CTC | Chlortetracycline / Chlortetracyklin |
| CUR | Curtain gas / průtok odpařovacího plynu |
| CXP | Collision Cell Exit Potential / výstupní potenciál z kolizní cely |
| Da | Dalton |
| DAD | Diode Array Detector / detektor diodového pole |
| DC | Doxycycline / Doxycyklin |
| DMC | Demeclocycline / Demeklocyklin |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid / Deoxyribonukleová kyselina |
| DP | Declustering potential / Deklasterační Potenciál |
| EC | Electrochemical Detector / elektrochemický detektor |

| | |
|----------|---|
| EI | Electron Ionization / ionizace elektronem |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay |
| EP | Entrance Potential / vstupní potenciál |
| ESI | Electrospray Ionization / ionizace elektrosprejem |
| FAB | Fast Atom Bombardment / ionizace urychlenými atomy |
| FASS-EMI | field-amplified sample stacking with electromigration injection |
| FD | Field Desorption / desorpce polem |
| FL | Fluorimetric detector / fluorimetrický detektor |
| FP | Focusing Potential / zaostřovací potenciál |
| FTICR | Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry |
| GC | GAS Chromatography / plynová chromatografie |
| GC-MS | Gas chromatography–mass spectrometry / plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí |
| GCE | Glassy Carbon Electrode / skleněná uhlíková elektroda |
| HPLC | High-performance liquid chromatography / vysoko účinná kapalinová chromatografie |
| ICP | Inductively Coupled Plasma / indukčně vázané plazma |
| IgG | Immunoglobulin G / Imunoglobulin G |
| IgM | Immunoglobulin M / Imunoglobulin M |
| IMAC | Immobilized metal ion affinity chromatography / chromatografie s imobilizovaným iontem kovu |
| IP | Identification Point / identifikační bod |
| IS | Internal Standard / interní standard |
| LC | Liquid Chromatography / kapalinová chromatografie |
| LIF | Laser Induced Fluorescence / laserem indukovaná fluorescence |
| LLE | Liquid liquid extraction / extrakce kapalina kapalina |

| | |
|-----------------------|--|
| LOD | limit of detection / limit detekce |
| LOQ | limit of quantification / limit kvantifikace |
| m/z | mass-to-charge ratio / poměr hmotnosti-náboj |
| (M+H) ⁺ | protonated molecular ion / protonovaný molekulární iont |
| (M-H) ⁻ | deprotonated molecular ion / deprotonovaný molekulární iont |
| MALDI | Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization / laserová desorpce za účasti matrice |
| malonyl-CoA | Malonyl coenzyme A / malonyl koenzym A |
| MC | Minocycline / Minocyklin |
| MCAC | Metal chelate affinity chromatography / afinitní chromatografie kovových komplexů |
| MF | Mobile Phase / Mobilní Fáze |
| MRM | Multiple Reaction Monitoring / skenování více fragmentových hmot |
| MS | Mass Spectrometry / hmotnostní spektrometrie |
| MS/MS | Tandem mass spectrometry / tandemová hmotnostní spektrometrie |
| MTC | Methacycline / Methacyklin |
| N(R) _T (%) | uncertainty recovery / nejistota výtěžnosti |
| NADPH | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate / Nikotinamidadenindinukleotidfosfát |
| N _{CT} (%) | uncertainty of an analytical procedure / kombinovaná nejistota analytického postupu |
| Ni-DIA | Nickel-implanted Boron-Doped Diamond thin film electrode / nikel implantovaný do tenkovrstvé bórové elektrody dopované diamantem |
| OLEA | Oleandomycin / Oleandomycin |
| OTC | Oxytetracycline / Oxyteracyklin |
| PB-NCI | Particle Beam - Negative Chemical Ionization |
| PEEK | Polyether ether ketone / Polyetherketonová vlákna |

| | |
|----------------|---|
| PI mode | Positive mode / pozitivní mód |
| PLE | Pressurized Liquid Extraction / kapalinová extrakce podporovaná tlakem |
| PTFE | Polytetrafluoroethylene / Polytetrafluorethylen |
| Q0 | Zero Quadrupole / nultý kvadrupól |
| Q1 | First Quadrupole / první kvadrupól |
| Q2 | Second Quadrupole / druhý kvadrupól |
| Q3 | Third Quadrupole / třetí kvadrupól |
| QIT | Ion Trap Analyzer / iontová past |
| QMF | Quadrupole Mass Filter / kvadrupólový analyzátor |
| QqQ | Triple Quadrupole / trojitý kvadrupól |
| QToF | Quadrupole Time-of-flight Analyzer / kvadrupól s analyzátozem doby letu |
| Re-ToF | Reflectron Time of Flight / průletový analyzátor s reflektorem |
| R _f | Recovery / výtěžnost |
| RNA | Ribonucleic acid / Ribonukleová kyselina |
| RO2 | collision cell rod offset |
| RP | Reversed Phase / reverzní fáze |
| RRS | Resonance Rayleigh Scattering / Rayleighův rezonanční rozptyl |
| RSD | Relative Standard Deviation / relativní směrodatná odchylka |
| SIADH | Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone secretion / syndrom nepřiměřené sekrece antidiuretického hormonu |
| SIMS | Secondary Ion Mass Spectrometry / hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů |
| SPE | Solid Phase Extraction / extrakce pevnou fází |
| TC | Tetracycline / Tetracyklin |
| TCA | Trichloroacetic acid / kyselina trichloroctová |
| TCAs | Tetracycline Antibiotics / Tetracyklinová antibiotika |

| | |
|---------|---|
| TCA-HCL | Tetracycline Antibiotics-hydrochloride / tetracyklinové antibiotikum hydrochlorid |
| TEM | Temperature of ion source / teplota iontového zdroje |
| TFA | Trifluoroacetic acid / kyselina trifluoroctová |
| tITP | transient ITP stacking |
| TLC | Thin Layer Chromatography / tenkovrstvá chromatografie |
| ToF | Time-of-flight Analyzer / průletový analyzátor |
| TRL | Time-Resolved Luminescence / časově podmíněná luminiscence |
| tRNA | transfer RNA / transferová RNA |
| UAE | Ultrasonic-Assisted Extraction / Extrakce Ultrazvukem |
| UPLC | Ultra-performance liquid chromatography / ultraúčinná kapalinová chromatografie |
| UV | Ultraviolet / Ultrafialové |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Obr. 1 Obecná struktura tetracyklinů ^[29] | 17 |
| Obr. 2 Strukturní vzorec Chlortetracyklinu. ^[59] | 21 |
| Obr. 3 Strukturní vzorec Oxytetracyklinu. ^[61] | 22 |
| Obr. 4 Strukturní vzorec Tetracyklinu. ^[63] | 23 |
| Obr. 5 Strukturní vzorec Demekloxyklinu. ^[65] | 24 |
| Obr. 6 Strukturní vzorec Rolitetracyklinu ^[68] | 25 |
| Obr. 7 Strukturní vzorec Lymecyklinu. ^[69] | 25 |
| Obr. 8 Strukturní vzorec Klomocyklinu. ^[73] | 26 |
| Obr. 9 Strukturní vzorec Metacyklinu. ^[74] | 26 |
| Obr. 10 Strukturní vzorec Doxycyklinu. ^[76] | 27 |
| Obr. 11 Strukturní vzorec Minocyklinu. ^[79] | 28 |
| Obr. 12 Cyklus tetracyklinů v prostředí ^[81] | 29 |
| Obr. 13 Postup při extrakci pevnou fází ^[108] | 37 |
| Obr. 14 Schéma kapalinového chromatografu ^[vytvořeno autorem, MS Paint & MS Word] | 38 |
| Obr. 15 Analytická kolona a předkolony ^[vytvořeno autorem, Rhinoceros 4.0] | 39 |
| Obr. 16 Chromatogram při eluční metodě ^[vytvořeno autorem; MS Paint] | 42 |
| Obr. 17 Schéma hmotnostního spektrometru ^[vytvořeno autorem, MS Paint & MS Word] | 46 |
| Obr. 18 Schéma chemická ionizace za atmosférického tlaku ^[85] | 47 |
| Obr. 19 Schéma ionizace elektrosprejem ^[85, 143] | 48 |
| Obr. 20 Schéma kvadrupólového hmotnostního analyzátoru s elektronovou ionizací ^[122] | 50 |
| Obr. 21 Schéma iontové pasti ^[146] | 51 |
| Obr. 22 Schéma analyzátoru ToF (a.) a jeho modifikace s reflektorem Re-ToF (b.) ^[85] | 52 |
| Obr. 23 Schéma tandemové hmotnostní spektrometrie ^[122] | 53 |
| Obr. 24 Reakční schéma odštěpení NH ₃ z iontu [M+H] ⁺ ^[78] | 60 |
| Obr. 25 Hmotnostní spektrum TC 1 mg·l ⁻¹ (IS +4500 V) | 62 |
| Obr. 26 Hmotnostní spektrum TC 5 mg·l ⁻¹ (IS +4500 V, DP 10 V) | 64 |
| Obr. 27 Hmotnostní spektrum TC 5 mg·l ⁻¹ (IS +4500 V, DP 40 V) | 65 |
| Obr. 28 Hmotnostní spektrum TC 1 mg·l ⁻¹ (IS -4500 V, DP 10 V) | 66 |
| Obr. 29 Hmotnostní spektrum CTC 5 mg·l ⁻¹ (IS + 4500 V, DP 40V)..... | 67 |
| Obr. 30 Hmotnostní spektrum CTC 5 mg·l ⁻¹ (IS +4500 V, DP 10 V)..... | 68 |

| | |
|---|----|
| Obr. 31 Hmotnostní spektrum CTC 5 mg·l ⁻¹ (detail pozorovaných hmot)..... | 69 |
| Obr. 32 Hmotnostní spektrum CTC 5 mg·l ⁻¹ (IS -4500 V, DP 10 V)..... | 69 |
| Obr. 33 Hmotnostní spektrum OTC 5 mg·l ⁻¹ (IS +4500 V, DP 40 V)..... | 70 |
| Obr. 34 Hmotnostní spektrum OTC 5 mg·l ⁻¹ (IS +4500 V, DP 10 V)..... | 71 |
| Obr. 35 Hmotnostní spektrum OTC 5 mg·l ⁻¹ (IS -4500 V, DP 10 V)..... | 72 |
| Obr. 36 Hmotnostní spektrum DC 5 mg·l ⁻¹ (IS + 4500 V, DP 40V)..... | 73 |
| Obr. 37 Hmotnostní spektrum DC 5 mg·l ⁻¹ (IS +4500 V, DP 10 V)..... | 75 |
| Obr. 38 Hmotnostní spektrum DC 5 mg·l ⁻¹ (IS -4500 V, DP 10 V)..... | 75 |
| Obr. 39 Intenzity signálů analytů při změně deklasteračního potenciálu. | 76 |
| Obr. 40 Intenzity signálů analytů při změně vstupního potenciálu. | 77 |
| Obr. 41 Intenzity signálů analytů při změně zaostřovacího potenciálu..... | 77 |
| Obr. 42 Fragmenty prekurzorového iontu tetracyklinu s m/z 445,042..... | 78 |
| Obr. 43 Fragmenty prekurzorového iontu chlortetracyklinu s m/z 479,039 | 78 |
| Obr. 44 Fragmenty prekurzorového iontu oxytetracyklinu s m/z 461,069..... | 79 |
| Obr. 45 Fragmenty prekurzorového iontu doxycyklinu s m/z 445,087..... | 79 |
| Obr. 46 Intenzity signálů vybraných produktových iontů analytů při změně kolizního potenciálu. | 80 |
| Obr. 47 Průběh elučního gradientu A | 82 |
| Obr. 48 Průběh elučního gradientu B | 83 |
| Obr. 49 Průběh elučního gradientu C | 83 |
| Obr. 50 Závislost intenzit analytů na aktuálním průtoku mobilní fáze | 85 |
| Obr. 51 Tvary píků analytů při změně průtoku mobilní fáze | 86 |
| Obr. 52 Kalibrační přímky vybraných tetracyklinů (koncentrace 25 μg·l ⁻¹ , 50 μg·l ⁻¹ , 100 μg·l ⁻¹ , 250 μg·l ⁻¹ , 500 μg·l ⁻¹) | 88 |
| Obr. 53 Chromatogram směsi vybraných tetracyklinových antibiotik (koncentrace standardu 5 mg·l ⁻¹) | 90 |
| Obr. 54 Stabilita tetracyklinu v čase (směs MeOH a 0,1% HCOOH; 1:1)..... | 92 |
| Obr. 55 Stabilita chlortetracyklinu v čase (směs MeOH a 0,1% HCOOH; 1:1) | 93 |
| Obr. 56 Stabilita doxycyklinu v čase (směs MeOH a 0,1% HCOOH; 1:1)..... | 93 |
| Obr. 57 Stabilita oxytetracyklinu v čase (směs MeOH a 0,1% HCOOH; 1:1)..... | 94 |
| Obr. 58 Intenzity tetracyklinů při dekadačním testu | 95 |

SEZNAM TABULEK

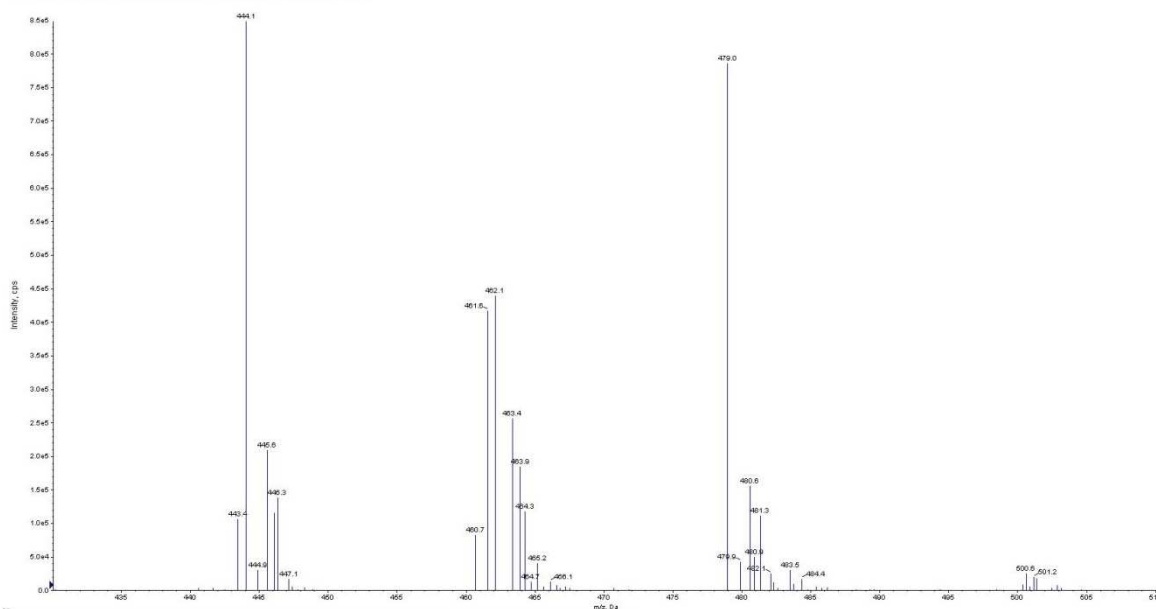
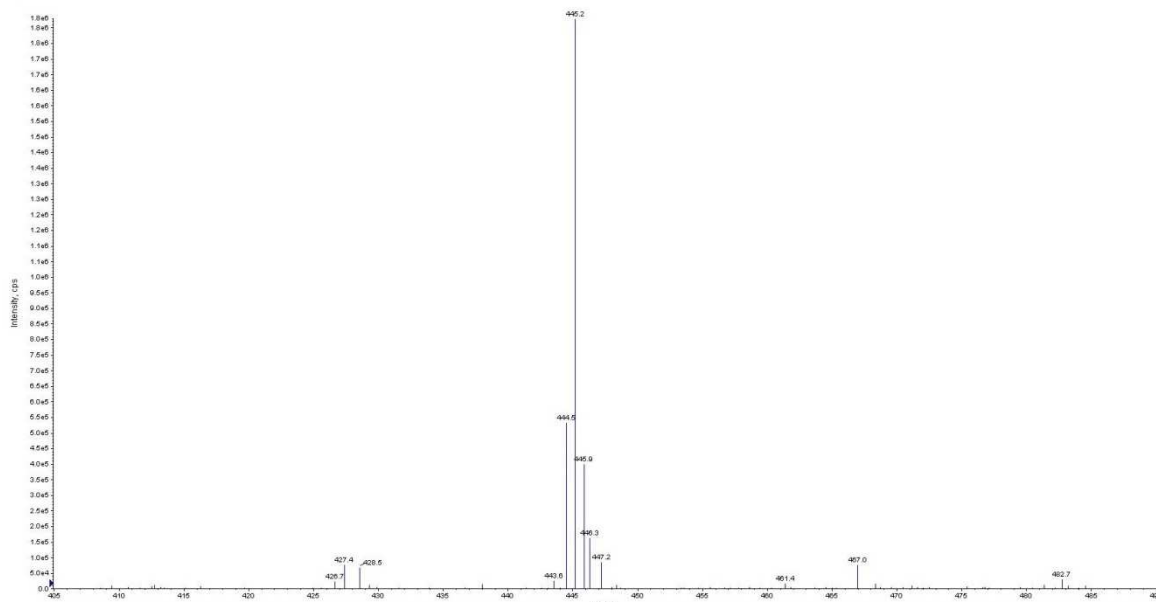
| | |
|--|----|
| Tab. 1 Charakteristika Chlortetracyklinu. ^[59, 60] | 21 |
| Tab. 2 Charakteristika Oxytetracyklinu. ^[61, 62] | 22 |
| Tab. 3 Charakteristika Tetracyklinu. ^[63, 64] | 23 |
| Tab. 4 Charakteristika Demekloxyklinu. ^[65, 66] | 24 |
| Tab. 5 Charakteristika Rolitetracyklinu. ^[67, 68] | 24 |
| Tab. 6 Charakteristika Lymecyklinu. ^[69, 70] | 25 |
| Tab. 7 Charakteristika Klomocyklinu. ^[72, 73] | 26 |
| Tab. 8 Charakteristika Metacyklinu. ^[74, 75] | 26 |
| Tab. 9 Charakteristika Doxycyklinu. ^[76, 77] | 27 |
| Tab. 10 Charakteristika Minocyklinu. ^[79, 80] | 28 |
| Tab. 11 Postup úpravy vzorků před analýzou z vybraných matric..... | 31 |
| Tab. 12 Charakteristika nejpoužívanějších C ₁₈ kolon | 40 |
| Tab. 13 Charakteristika nejpoužívanějších C ₈ kolon..... | 40 |
| Tab. 14 Nejpoužívanější teploty kolon při analýze | 41 |
| Tab. 15 Nejčastěji používané průtokové rychlosti mobilní fáze | 42 |
| Tab. 16 Ionizační energie nejpoužívanějších nosných plynů pro MS | 49 |
| Tab. 17 Srovnání hmotnostních analyzátorů podle jejich přesnosti, rozsahu a dosažitelného rozlišení ^[142] | 52 |
| Tab. 18 Pozorované ionty tetracyklinových antibiotik při optimalizaci MS (Q1) | 61 |
| Tab. 19 Změna intenzity signálu TC [cps; 10 ³] při změně IS..... | 62 |
| Tab. 20 Změna intenzity signálu TC [cps; 10 ³] při změně CUR..... | 63 |
| Tab. 21 Změna intenzity signálu TC [cps; 10 ³] při změně DP..... | 64 |
| Tab. 22 Změna intenzity signálu CTC [cps; 10 ³] při změně DP | 68 |
| Tab. 23 Změna intenzity signálu OTC [cps; 10 ³] při změně DP | 71 |
| Tab. 24 Změna intenzity signálu DC [cps; 10 ³] při změně IS | 73 |
| Tab. 25 Změna intenzity signálu DC [cps; 10 ³] při změně DP..... | 74 |
| Tab. 26 Závislost retenčních časů a intenzit píků tetracyklinů při změně teploty analytické kolony při optimalizaci LC-MS | 81 |
| Tab. 27 Závislost retenčních časů a intenzit píků tetracyklinů na typu gradientu..... | 84 |
| Tab. 28 Změna intenzit signálů [%] při změně TEM | 87 |
| Tab. 29 Mez detekce a stanovitelnosti u vybraných tetracyklinů..... | 89 |

| | |
|--|-----|
| Tab. 30 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro tetracyklin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) | 98 |
| Tab. 31 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro tetracyklin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) | 98 |
| Tab. 32 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro chlortetracyklin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) | 99 |
| Tab. 33 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro chlortetracyklin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) | 99 |
| Tab. 34 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro oxytetracyklin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) | 100 |
| Tab. 35 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro oxytetracyklin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) | 100 |
| Tab. 36 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro doxycyklin ($100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) | 101 |
| Tab. 37 Výtěžnost, relativní směrodatná odchylka, nejistota a kombinovaná nejistota pro doxycyklin ($50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) | 101 |
| Tab. 38 Shrnutí výtěžností, relativních směrodatných odchylek, nejistot, kombinovaných nejistot, LOD a LOQ pro vybrané tetracykliny | 102 |

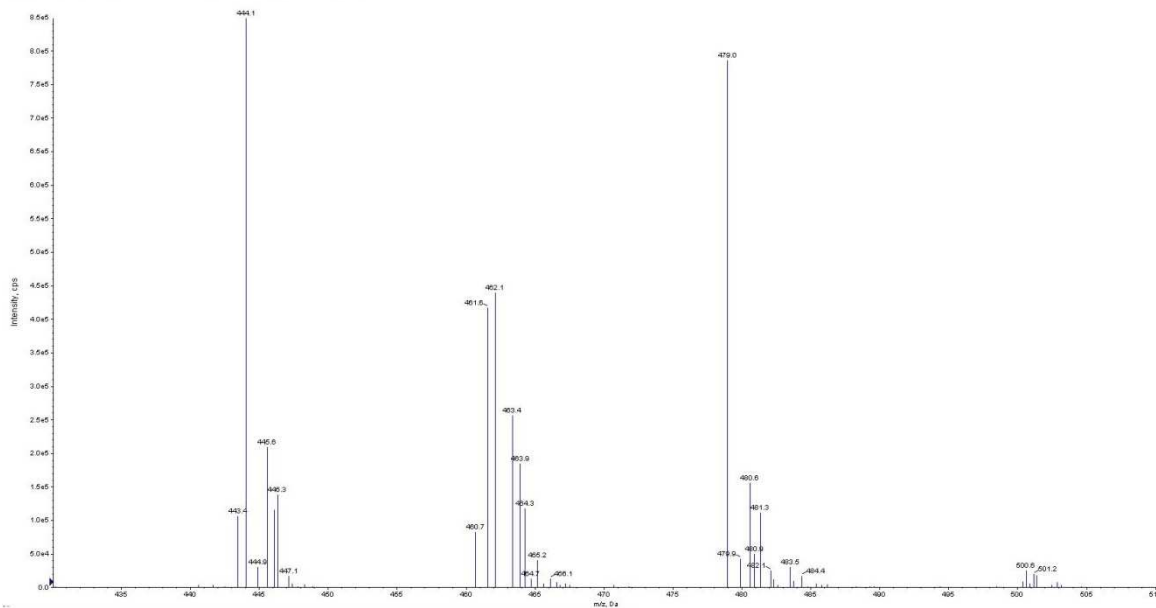
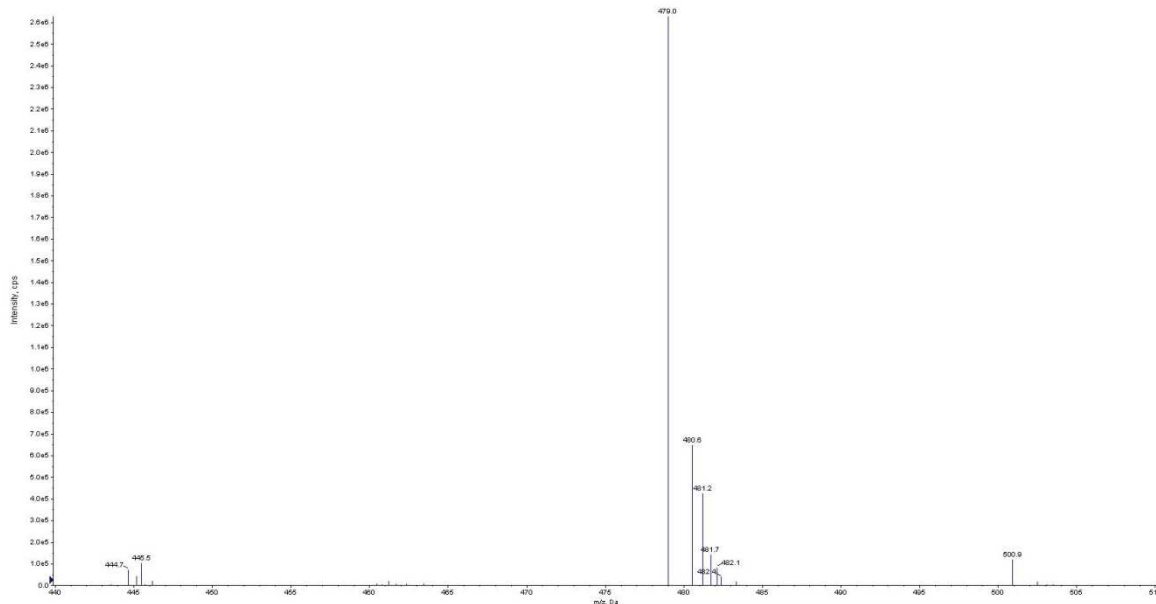
SEZNAM PŘÍLOH

- P I Detail pozorovaných hmot tetracyklinu (deklasterační potenciál 16 a 40 V)
- P II Detail pozorovaných hmot chlortetracyklinu (deklasterační potenciál 16 a 40 V)
- P III Detail pozorovaných hmot oxytetracyklinu (deklasterační potenciál 16 a 40 V)
- P IV Detail pozorovaných hmot doxycyklinu (deklasterační potenciál 16 a 40 V)

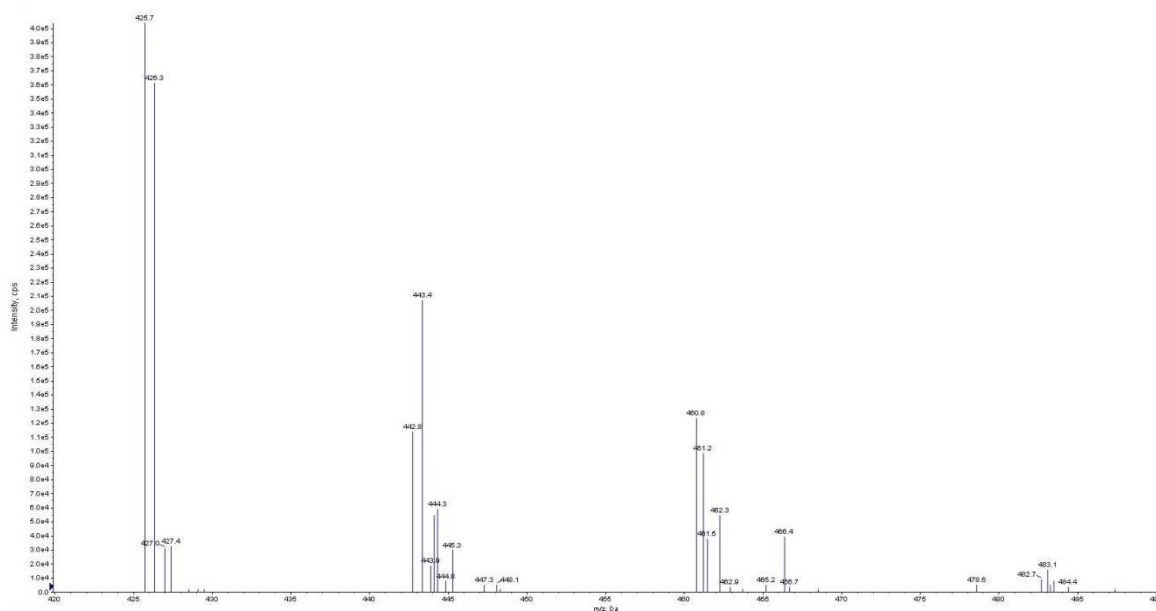
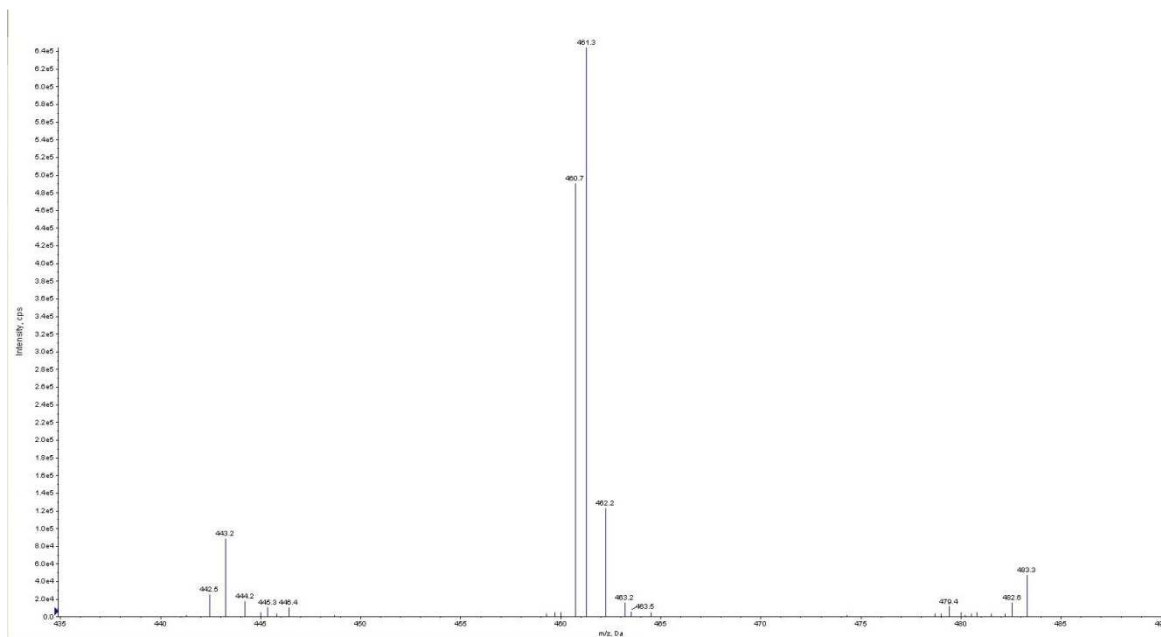
PŘÍLOHA P I: DETAIL POZOROVANÝCH HMOT TETRACYKLINU (DEKLASTERAČNÍ POTENCIÁL 16 A 40 V)



PŘÍLOHA P II: DETAIL POZOROVANÝCH HMOT CHLORTETRACYKLINU (DEKLASTERAČNÍ POTENCIÁL 16 A 40 V)



PŘÍLOHA P III: DETAIL POZOROVANÝCH HMOT OXYTETRACYKLINU (DEKLASTERAČNÍ POTENCIÁL 16 A 40 V)



PŘÍLOHA P IV: DETAIL POZOROVANÝCH HMOT DOXYCYKLINU (DEKLASTERAČNÍ POTENCIÁL 16 A 40 V)

