

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Radka Chudomská

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj, optimalizace a porovnání chromatografických metod pro stanovení  
gentamicinu ve zdravotnických prostředcích

Diplomová práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Radka Chudomská**  
Osobní číslo: **C18505**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**  
Téma práce: **Vývoj, optimalizace a porovnání chromatografických metod pro stanovení gentamicinu ve zdravotnických prostředcích**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

### Teoretická část:

Fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti gentamicinu a jeho uplatnění ve zdravotnictví

Přehled chromatografických metod pro stanovení gentamicinu v biologických vzorcích

### Experimentální část:

dy a vhodné detekce pro stanovení stopových koncentrací gantopolysacharidy

Optimalizace chromatografických podmínek

Určení analytických parametrů zavedené metody

Aplikace metody pro reálné vzorky

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Jaromír Kulhánek**  
Contipro a.s.  
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. 6. 2020

Radka Chudomská

Obrovské díky patří mému odbornému konzultantovi Ing. Jaromírovi Kulhánkovi za užitečné rady v průběhu celého měření, za to, jak se mi věnoval v průběhu celého roku, a také za to, jakou měl se mnou trpělivost. Ráda bych také poděkovala vedoucímu mé diplomové práce prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za rady a pomoc s finální úpravou práce. Další poděkování patří Ing. Josefu Chmelaři, Ph.D. za možnost připravit reálné vzorky pro následné měření. V poslední řadě bych chtěla poděkovat firmě Contipro a. s. za to, že mi bylo umožněno provést měření pro diplomovou práci v jejích laboratořích a s jejím vybavením.

## **ANOTACE**

Teoretická část této diplomové práce se zabývá všeobecnými vlastnostmi gentamicinu a jeho účinky na lidský organismus. Dále je zde diskutována problematika vysokoúčinné kapalinové chromatografie a chemické derivatizace vzorků. Experimentální část je zaměřena na vývoj a optimalizaci nové metody pro stanovení gentamicinu ve zdravotnických prostředcích.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Gentamicin, aminoglykosidy, derivatizace, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## **TITLE**

Development, optimization and comparison of chromatographic methods for the determination of gentamicin in medical devices

## **ANNOTATION**

Theoretical part of this thesis deals with general characteristics of gentamicin and its effects on the human organism. Furthermore, high-performance liquid chromatography and chemical derivatization is discussed here. Experimental part is focused on development and optimization of chromatographic methods for the determination of gentamicin in medical devices.

## **KEYWORDS**

Gentamicin, aminoglycosides, derivatization, high-performance liquid chromatography

# OBSAH

SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ .....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	11
ÚVOD .....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	13
1.1 Gentamicin.....	13
1.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti.....	13
1.1.2 Použití gentamicinu .....	14
1.1.3 Účinek gentamicinu na lidský organismus .....	14
1.1.4 Toxicita gentamicinu a jeho nežádoucí účinky.....	15
1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	16
1.2.1 Separační módy HPLC .....	16
1.2.2 Základní části kapalinového chromatografu – instrumentace v HPLC .....	18
1.3 Derivatizace v kapalinové chromatografii .....	23
1.3.1 Předkolonová derivatizace.....	24
1.3.2 Postkolonová derivatizace .....	24
1.3.3 Detekční metody.....	24
1.3.4 Derivatizace gentamicinu .....	25
1.4 Přehled chromatografických metod pro stanovení gentamicinu v biologických vzorcích.....	27
1.4.1 Stanovení GMC plynovou chromatografií (GC) .....	28
1.4.2 Stanovení gentamicinu kapalinovou chromatografií (LC).....	29
2 CÍL PRÁCE .....	35
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	36
3.1 Materiál.....	36
3.1.1 Vzorky .....	36
3.1.2 Chemikálie.....	36
3.1.3 Pomůcky a přístroje .....	36
3.2 Stanovení gentamicinu metodou HPLC s hmotnostní detekcí.....	38
3.2.1 Příprava roztoků .....	38
3.2.2 Chromatografická analýza .....	39
3.3 Stanovení gentamicinu metodou HPLC s ELSD .....	40
3.3.1 Příprava roztoků .....	40
3.3.2 Chromatografická analýza .....	41
3.4 Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenem .....	43
3.4.1 Příprava roztoků .....	43
3.4.2 Derivatizační krok .....	43
3.4.3 Chromatografická analýza .....	43



3.5	Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci dansylchloridem .....	44
3.5.1	Příprava roztoků .....	44
3.5.2	Derivatizační krok .....	44
3.5.3	Chromatografická analýza .....	44
3.6	Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem .....	45
3.6.1	Příprava roztoků .....	45
3.6.2	Derivatizační krok .....	46
3.6.3	Chromatografická analýza .....	46
3.7	Příprava standardů gentamicinu pro sestavení kalibrační křivky .....	48
3.7.1	Příprava roztoků .....	48
3.7.2	Derivatizační krok .....	48
3.7.3	Chromatografická analýza .....	48
3.8	Porovnání derivatizace gentamicinu v borátovém pufru a v přítomnosti matrice nativní kyseliny hyaluronové 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem .....	49
3.8.1	Příprava roztoků .....	49
3.8.2	Derivatizační krok .....	49
3.8.3	Chromatografická analýza .....	50
3.9	Porovnání derivatizace gentamicinu v borátovém pufru a v přítomnosti matrice palmitoylhyaluronátu 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem .....	50
3.9.1	Příprava roztoků .....	50
3.9.2	Derivatizační krok .....	51
3.9.3	Chromatografická analýza .....	51
3.10	Optimalizace koncentrace 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridu v derivatizačním roztoku .....	51
3.10.1	Příprava roztoků .....	51
3.10.2	Derivatizační krok .....	52
3.10.3	Chromatografická analýza .....	52
3.11	Porovnání derivatizace gentamicinu v 50% isopropanolu a v přítomnosti matrice lauroylhyaluronátu 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem .....	52
3.11.1	Příprava roztoků .....	52
3.11.2	Derivatizační krok .....	53
3.11.3	Chromatografická analýza .....	53
3.11.4	Optimalizace objemu borátového pufru v reakční směsi .....	53
3.11.5	Optimalizace podmínek při derivatizačním kroku .....	53
3.12	Příprava reálných vzorků .....	54
3.12.1	Příprava zásobních roztoků .....	54
3.12.2	Příprava tenkých filmů s obsahem gentamicinu .....	55
3.13	Analýza reálných vzorků metodou HPLC s hmotnostní detekcí .....	55
3.13.1	Příprava roztoků a vzorků .....	55
3.13.2	Chromatografická analýza .....	56

3.14	Stanovení gentamicinu v reálných vzorcích po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem.....	56
3.14.1	Příprava roztoků a vzorků.....	56
3.14.2	Derivatizační krok .....	57
3.14.3	Chromatografická analýza .....	57
3.15	Zpracování výsledků.....	57
4	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	58
4.1	Stanovení gentamicinu metodou HPLC s hmotnostní detekcí.....	58
4.2	Stanovení gentamicinu metodou HPLC s ELSD .....	58
4.3	Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenem .....	59
4.4	Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci dansylchloridem .....	59
4.5	Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem .....	60
4.6	Reálné vzorky .....	63
4.6.1	Stanovení gentamicinu v reálných vzorcích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.....	63
4.6.2	Stanovení gentamicinu v reálných vzorcích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem.....	65
5	ZÁVĚR .....	68
	SEZNAM LITERATURY .....	69

## SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tabulka 1: Hodnoty poměru hmotnosti a náboje (m/z) molekulových iontů komponent GMC .....	40
Tabulka 2: Gradienty 1-3.....	47
Tabulka 3: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, porovnání rychlostí záznamu .....	58
Tabulka 4: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu metodou HPLC s ELSD .....	58
Tabulka 5: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem metodou HPLC s fluorescenční detekcí.....	61
Tabulka 6: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu metodou HPLC s hmotnostní detekcí .....	63
Tabulka 7: Hmotnostní procento gentamicinu v reálných vzorcích určené metodou HPLC s hmotnostní detekcí .....	64
Tabulka 8: Správnost metody HPLC s hmotnostní detekcí metodou standardních přídavek.....	64
Tabulka 9: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu ve vzorcích nativní kyseliny hyaluronové metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem .....	65
Tabulka 10: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu ve vzorcích lauroylhyaluronátu (a) a (b) metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem .....	66
Tabulka 11: Hmotnostní procento gentamicinu v reálných vzorcích určené metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem.....	66
Tabulka 12: Správnost metody HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem provedená metodou standardních přídavek .....	67
Obrázek 1: Strukturální vzorec gentamicinu .....	13
Obrázek 2: Schéma instrumentace HPLC .....	18
Obrázek 3: Strukturální vzorec 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenu .....	25
Obrázek 4: Obecné schéma reakce 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenu s aminy .....	25
Obrázek 5: Strukturální vzorec dansylchloridu .....	26
Obrázek 6: Obecné schéma reakce dansylchloridu s aminy .....	26
Obrázek 7: Struktura FMOC-Cl .....	26
Obrázek 8: Obecné schéma reakce 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridu s aminy .....	27
Obrázek 9: Chromatografický záznam komponent GMC o koncentraci 1 mg/ml .....	42
Obrázek 10: Separace komponent gentamicinu na koloně Waters Atlantis .....	47
Obrázek 11: Hyaluronát s navázanou mastnou kyselinou x .....	54
Obrázek 12: Chromatografický záznam stanovení komponent gentamicinu po derivatizaci 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenem .....	59
Obrázek 13: Chromatografický záznam stanovení komponent gentamicinu po derivatizaci dansylchloridem .....	60
Obrázek 14: Chromatografické záznamy stanovení standardů komponent gentamicinu po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem .....	60
Obrázek 15: Chromatografické záznamy stanovení komponent gentamicinu po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem metodou HPLC s fluorescenční detekcí.....	61
Obrázek 16: Chromatografické záznamy stanovení komponent gentamicinu po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem metodou HPLC s fluorescenční detekcí.....	62

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN	acetonitril
CAD	aerosolový detektor nabitých částic, z angl. charged aerosol detector
DAD	detektor s diodovým polem, z angl. diode array detector
Dns-Cl	dansylchlorid
ECD	detektor elektronového záchytu, z angl. electron capture detector
ELSD	detektor elektronového rozptylu, z angl. evaporative light Scattering detector
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzen
FITC	fluoresceinisothiokyanát
FLD	fluorescenční detektor
FMOCCl	9-fluorenylmethoxykarbonylchlorid
GC	plynová chromatografie, z angl. gas chromatography
GMC	gentamicin
GPC	gelová permeační chromatografie, z angl. gel permeation chromatography
HA	kyselina hyaluronová/hyaluronan
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie, z angl. hydrophilic interaction chromatography
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. high performance liquid chromatography
IEC	iontově-výměnná chromatografie, z angl. ion-exchange chromatography
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí, z angl. liquid chromatography-tandem mass spectrometry
mRNA	mediátorová RNA
MS	hmotnostní spektrometrie, z angl. mass spectrometry
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NPC	chromatografie na normálních fázích, z angl. normal phase chromatography
ODS	oktadecylsilikagel
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd
PDA	detektor s diodovým polem, z angl. photodiode array detector
PLGA	poly(laktid-ko-glykolidové) nanočástice
RIA	radioimunoanalýza
RID	refraktometrický detektor
RNA	ribonukleová kyselina
RP	obrácená fáze, z angl. reversed phase
RPC	chromatografie na obrácených fázích, z angl. reversed phase chromatography
SFC	superkritická fluidní chromatografie, z angl. supercritical fluid chromatography
TFA	kyselina trifluoroctová
TOB	tobramycin
tRNA	transferová RNA
UHPLC	ultra HPLC
UV/Vis	ultrafialovo-viditelný

## ÚVOD

Gentamicin (GMC) je širokospektrální antibiotikum ze skupiny aminoglykosidů používané při léčbě středně závažných až velmi závažných infekcí. I když je GMC velmi účinný lék, vyznačuje se mimo jiné i celou řadou nežádoucích účinků, jako je ototoxicita, nefrotoxicita a nejzávažnější neuromuskulární blokáda. Analýza GMC vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií je poměrně náročná, jelikož GMC neobsahuje ve své molekule chromofor ani fluorofor, tudíž nejběžnější UV detekce nepřichází v úvahu. U takových molekul se často využívá možnost provedení předkolonové či postkolonové derivatizace, jelikož vzniklé deriváty již v UV oblasti absorbují, tudíž je lze detegovat například právě UV detekcí. Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat vhodnou HPLC metodu pro stanovení tohoto antibiotika.

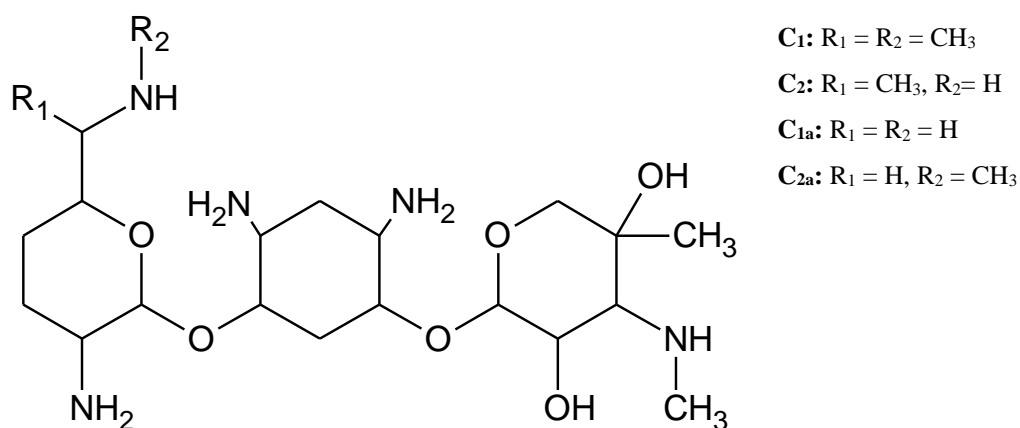
# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Gentamicin

### 1.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Lékopisný název: Gentamicin

Strukturní vzorec:



Obrázek 1: Strukturní vzorec gentamicinu

**Chemický název dle IUPAC:**

*2-[4,6-diamino-3-[3-amino-6-[1-(methylamino)ethyl]oxan-2-yl]oxy-2-hydroxycyklohexyl]oxy-5-methyl-4-(methylamino)oxan-3,5-diol*

**Sumární vzorec:** C<sub>21</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>

**M<sub>r</sub>** 477,6 g/mol

**CAS:** 1403-66-3

GMC je širokospektrální aminoglykosidové antibiotikum produkované bakteriemi *Micromonospora purpurea* nebo *Micromonospora echinospora*. Jedná se o komplex čtyř

hlavních (C1, C1a, C2 a C2a) a dalších minoritních komponent lišících se v uhlovodíkových zbytcích R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> [1], [2].

GMC je bílý amorfni prášek, který je volně rozpustný ve vodě, pyridinu, dimethylformamidu, středně rozpustný v methanolu, ethanolu, chloroformu a acetonu, a prakticky nerozpustný v benzenu či halogenovaných uhlovodících. Jeho bod tání se uvádí mezi 102 až 108 °C. Při 248 °C dochází k rozkladu gentamicinsulfátu. GMC je stabilní na světle, vzduchu a teple (v podobě gentamicinsulfátu) [2], [3].

### **1.1.2 Použití gentamicinu**

GMC je širokospektrální aminoglykosidové antibiotikum a je oblíbené pro jeho široké využití v medicíně při léčbě středně závažných, až velmi vážných bakteriálních infekcí. Je používán při léčbě sepsí a u ostatních závažných infekcí probíhajících v krevním řečišti nebo dobře prokrvených tkáních (např. u endokarditid). Proti mykobakteriím a nokardiím není účinný [4].

### **1.1.3 Účinek gentamicinu na lidský organismus**

Aminoglykosidy jsou jedny z nejpoužívanějších širokospektrálních antibiotik a obecně se řadí do skupiny antibiotik působících na ribozomy. Většina aminoglykosidů působí baktericidně, mají předvídatelnou farmakokinetiku a často mohou působit společně i s jinými typy antibiotik. Navzdory jejich potencionální toxicitě pro ledviny, ototoxicitě a bakteriální rezistenci si několik zástupců ze skupiny aminoglykosidů, včetně GMC, drží svou oblibu v medicíně již po několik desetiletí [2], [4], [5].

GMC je ze skupiny aminoglykosidů v současnosti nejvíc používaným antibiotikem. Je baktericidní, má velmi široké spektrum účinku, včetně mnohých problémových gramnegativních i grampozitivních kmenů. Baktericidní účinek GMC je rychlý a je možné ho dosáhnout bez ohledu na to, zda jsou citlivé mikroorganismy ve stádiu růstu či v klidu. Účinek GMC závisí na pH, jeho optimum je kolem 7,8, při pH 6,6 je třeba použít osminásobné a při pH 5,5 dokonce více než třicetinásobné koncentrace účinné látky, což je pro podmínky *in vivo* naprosto nereálné [4], [6].

GMC inhibuje proteosyntézu bakterií probíhající na ribozomech. Je navázán na menší 30S podjednotku ribozomu. GMC je překážkou v procesu párování jednotlivých tripletů mediátorové RNA (mRNA) a odpovídajících antikodonů transferové RNA (tRNA). Působením GMC dojde k porušení čtení informací obsažených v mRNA a současně k zablokování přesunu tRNA. Kromě toho GMC také narušuje bakteriální buněčnou membránu [4], [7].

Ionty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , chloridy, fosforečnany, sírany, dusičnany a heparin inhibují účinek GMC, je inaktivován také enzymaticky. GMC má podobný mechanismus účinku jako všechna další aminoglykosidová antibiotika [6].

#### **1.1.4 Toxicita gentamicinu a jeho nežádoucí účinky**

I když je GMC důležité baktericidní antibiotikum, má dva hlavní vedlejší účinky: nefrotoxicitu (poškozuje ledviny) a ototoxicitu (poškozuje sluch), proto je jeho užívání limitováno. Nicméně jeho baktericidní účinek závislý na koncentraci, synergismus s  $\beta$ -laktamovými antibiotiky, postantibiotický efekt a nízká cena jsou důvodem toho, proč je GMC stále hojně používán v klinické praxi [8], [9], [10].

##### **Nefrotoxicita**

GMC je buňkami proximálního tubulu reabsorbován a akumuluje se v lysozomech, kde blokuje odbourávání fosfolipidů, což vede k jejich rozpadu. To je příčinou nekrózy buněk proximálního tubulu [4], [11].

##### **Ototoxicita**

Ototoxicita je vzácný, potenciálně závažný a nevratný nežádoucí účinek, který se může vyskytnout u léčby všemi aminoglykosidovými antibiotiky. Ototoxicita ovlivňuje jak sluchovou (kochleární), tak také rovnovážnou (vestibulární) funkci ucha. Mezi symptomy patří ztráta rovnováhy, závratě, trvalá nevolnost, zvracení, nystagmus, tinitus, oboustranná ztráta sluchu začínající na vysokých frekvencích [12]. Ototoxický účinek je způsoben průnikem GMC do perilymfy středního ucha, kde poškozuje senzorický epitel kochleárního i vestibulárního ústrojí. Stejně jako nefrotoxicita také ototoxicita je kumulativní. To tedy znamená, že obtíže mohou vzniknout až týden nebo i déle od ukončení léčby GMC [4].

##### **Neuromuskulární blokáda**

Posledním, vzácným, ale také nejnebezpečnějším vedlejším účinkem léčby GMC, je neuromuskulární blokáda. Její mechanismus spočívá v tom, že dojde k zástavě uvolňování acetylcholinu na nervosvalových synapsích. Jako první pomoc při této kontraindikaci je nitrožilní podání roztoku chloridu vápenatého. Aminoglykosidová antibiotika se nedoporučují podávat osobám trpící autoimunitní chorobou *myasthenia gravis* [4], [13].



## **1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jedna z nejdůležitějších kvalitativních a kvantitativních technik běžně používaných pro stanovení farmaceutických a biologických vzorků. U metody HPLC je analyzovaný vzorek v malém množství převeden do proudu mobilní fáze a je zadržován specifickými chemickými nebo fyzikálními interakcemi na stacionární fázi. Zadržení na stacionární fázi závisí na povaze analytu a složení jak mobilní, tak i stacionární fáze. Čas, ve kterém se jednotlivé analyty uvolní ze stacionární fáze, a tudíž opustí kolonu, se nazývá retenční čas. HPLC využívá kolonu, která je naplněna mikročásticovou pevnou stacionární fází, vysokotlaké čerpadlo, které pohání mobilní fázi skrz kolonu, a detektor, který umožňuje určit retenční časy jednotlivých molekul. Retenční čas je pro každou komponentu rozdílný a závisí na specifických interakcích mezi stacionární fází, analyzovanými molekulami a užitým rozpouštědlem [14], [15].

### **1.2.1 Separální módy HPLC**

#### **Chromatografie na normálních fázích (NPC)**

Je také známa jako adsorpční chromatografie. Při NP-HPLC dochází k separaci analytů na základě jejich polarity. Tento druh chromatografie používá polární stacionární fázi a nepolární mobilní fázi. Polární analyty pomalu putují skrz chromatografickou kolonu, reagují s polární stacionární fází a jsou na ní zadržovány.

#### **Chromatografie na obrácených fázích (RPC)**

RP-HPLC využívá nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. Tento druh chromatografie funguje na principu hydrofobních interakcí, které mají za následek odpudivé síly mezi polární mobilní fází, relativně nepolárním analytem a nepolární stacionární fází. U RPC je obvykle mobilní fází směs acetonitrilu (ACN) nebo methanolu ve vodě.

#### **Gelová permeační chromatografie (GPC)**

Při gelové permeační chromatografii dochází k separaci částic vzorku na základě jejich velikosti.

#### **Iontově-výměnná chromatografie (IEC)**

IEC je chromatografický proces, při kterém dochází k separaci iontů a polárních molekul na základě jejich afinity k iontoměničce. Ionty iontoměniče jsou zaměněny za ionty vyskytující se v mobilní fázi či vzorku [14], [16].

## **Další separační módy**

Dalšími separačními módy jsou bioafinitní, chirální, hydrofilní interakční, hydrofobní interakční a superkritická fluidní chromatografie a elektrochromatografie.

### **Bioafinitní chromatografie**

Separace je založena na specifické reverzibilní interakci proteinů a ligandů. Imobilizovaný ligand specificky reaguje s proteinem, který je stanovován, zbylé látky opouští kolonu. Protein je poté eluován například změnou pH, nebo roztokem vysoce koncentrované soli [16].

### **Chirální chromatografie**

Tento druh chromatografie je vhodný pro dělení enantiomerů s použitím specifických stacionárních fází [16].

### **Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)**

Principem HILIC je separační mód podobný NP-HPLC, ale využívá polární stacionární fázi i polární mobilní fázi. Nejběžněji se využívá pro separaci vysoce polárních analytů [16].

### **Hydrofobní interakční chromatografie**

Tento separační mód je téměř shodný s RPC. Jediným rozdílem je to, že jsou pro separaci proteinů používány mobilní fáze s nízkým obsahem organického rozpouštědla a vysokou koncentrací solí. Mobilní fáze s vysokou koncentrací organických rozpouštědel používané v RPC by totiž proteiny denaturovaly [16].

### **Elektrochromatografie**

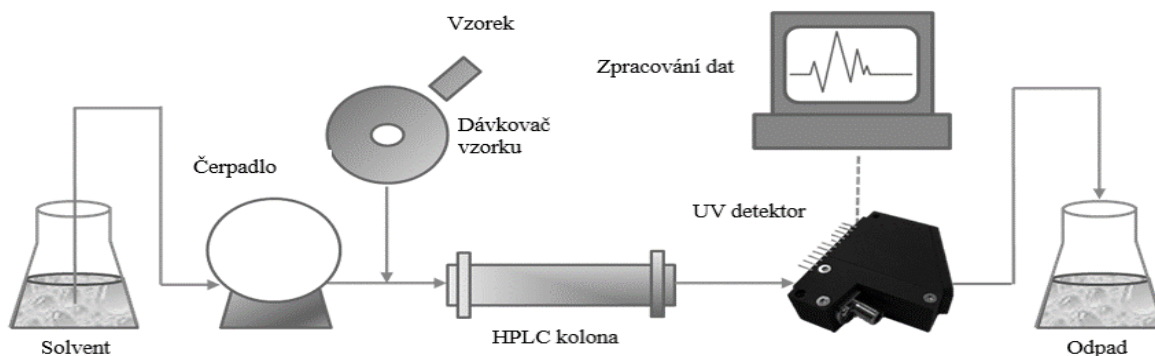
Tento mód využívá kombinace kapilární elektroforézy a HPLC. Mobilní fáze je poháněna elektrickou silou namísto mechanické pumpy [16].

### **Superkritická fluidní chromatografie (SFC)**

Tento mód je charakteristický použitím nadkritické kapaliny (nejčastěji oxid uhličitý) jako mobilní fáze. Je vhodný pro nepolární analyty. Často jsou využívány detektory pro plynovou chromatografii [16].

## 1.2.2 Základní části kapalinového chromatografu – instrumentace v HPLC

Typický HPLC systém se skládá z několika částí: čerpadla, dávkovače vzorků, kolony, detektoru a zařízení zpracovávající získaná data.



Obrázek 2: Schéma instrumentace HPLC [17]

### Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky mobilní fáze jsou nádoby vyrobené z inertního materiálu, obvykle ze silnějšího tmavého skla, které chrání mobilní fáze, jež jsou citlivé na světlo [18].

### Čerpadla mobilní fáze

Vysokotlaké čerpadlo je jednou z nejdůležitějších komponent kapalinového chromatografu, jelikož jeho výkon ovlivňuje retenční čas, citlivost detektoru i reprodukovatelnost celé analýzy. Čerpadlo musí být schopné pumpovat mobilní fázi konstantní rychlostí obvykle v rozmezí od 0,5 do 5,0 ml/min a při velmi vysokém tlaku (až 100 MPa). Průtok mobilní fáze kolonou by měl být konstantní, reprodukovatelný a bez výkyvů. Binární či kvarterní čerpadla jsou v dnešní době standardním vybavením každé moderní HPLC sestavy. Umožňují pracovat s gradientem mobilních fází, tedy mísit více mobilních fází najednou a v různém poměru (v případě binárního dvě, v případě kvarterního až čtyři) [15], [16], [18], [19], [20].

### Dávkovač vzorků

Dávkovač umožňuje přivést kapalnou vzorek na kolonu pod vysokým tlakem a v co nejkratším čase. Vzhledem k vysokým tlakům je vzorek nejčastěji dávkován smyčkovým dávkovačem, jelikož vzorek musí být na kolonu nadávkován přesně v předem definovaném objemu a také

při dávkování nesmí dojít k velké změně v průtoku mobilní fáze. Proto se v dnešní době již manuální dávkování stříkačkou téměř nevyskytuje [16], [21], [22], [23].

### **Chromatografické kolony a jejich náplně**

Na koloně probíhá celý separační proces, proto je tedy hlavní a nepostradatelnou částí celého systému. Obvykle se pracuje se 2 kolonami. Analytickou, která je odpovědná za separaci analytů, a ochrannou, která je umístěná před analytickou kolonou a chrání ji před kontaminací a značně tak prodlužuje její životnost.

Analytické HPLC kolony jsou vyrobeny z nerezové oceli a jejich vnitřní průměr je od 2,0 do 4,6 mm. Jejich délky se pohybují od 30 mm do 300 mm. Eluent běžně protéká kolonou rychlostí zhruba 1-2 ml/min [19], [24]. Kolony jsou u HPLC výhradně náplňové, porézní částice o velikosti 3-10  $\mu\text{m}$  mají nepravidelný nebo sférický tvar. Typická účinnost kolony je 40000 až 60000 teoretických pater [24]. Stacionární fáze pro HPLC jsou především chemicky modifikovaný silikagel, nemodifikovaný silikagel, nebo zesíťované kopolymery styrenu a divinylbenzenu.

Oktadecylsilikagel (ODS či C18) je v dnešní době nejoblíbenější stacionární fází, jelikož na ní může probíhat separace jak málo polárních, tak i polárních látek. Většina separací na ODS probíhá v principu chromatografie na obrácených fázích. Jako mobilní fáze jsou nejčastěji použity methanol nebo ACN s vodou či pufrem [15].

Existují dva hlavní problémy, které zkracují životnost analytické kolony. Zaprvé, některé látky se ireverzibilně vážou ke stacionární fázi a zhoršují účinnost kolony tím, že dochází k úbytku dostupné stacionární fáze. Zadruhé, nerozpustné látky dávkované spolu se vzorkem mohou analytickou kolonu ucpat. Aby došlo k minimalizaci těchto problémů, zavádí se mezi dávkovač vzorků a analytickou kolonu ochranná kolona a vzorek je před nadávkováním přefiltrován skrz filtr o porozitě obvykle 0,2  $\mu\text{m}$ . Ochranné kolony obvykle obsahují stejnou stacionární fázi jako kolony analytické, ale jsou výrazně kratší a tím levnější [24].

### **Detektory**

HPLC detektor zaznamenává koncentraci eluovaného analytu tím, že monitoruje jednu z jeho základních vlastností, jako například UV absorpenci či fluorescenci. Detektor může být univerzální pro všechny analyty nebo specifický pouze pro určité třídy analytů [16].

Ideální detektor pro HPLC by měl splňovat následující podmínky:

rychlá odezva

lineární odezva

vysoká senzitivita

nízký detekční limit

reprodukovatelná odezva

nízký vliv změny teploty nebo průtoku

univerzálnost

spolehlivost

### **Spektrofotometrický (UV/Vis) detektor**

UV/Vis absorpční detektor monitoruje absorpci UV nebo viditelného záření sledovanou látkou, jež obsahuje chromoforové skupiny nebo struktury. Jedná se o nejběžnější detektor, jelikož většina běžných analytů absorbuje v UV oblasti [16]. Spektrofotometrický detektor je založen na principu absorpce UV či viditelného záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Vyhodnocení signálu získaného z detektoru je postaveno na základě Lambert-Beerova zákona, jež vyjadřuje vzájemný vztah mezi velikostí vlastní absorpce analytu, tloušťkou květy a koncentrací analytu, tedy  $A = \epsilon \cdot l \cdot c$  [19], [25].

Existují 3 druhy UV/Vis detektorů:

#### **s fixní vlnovou délkou**

Jedná se o nejjednodušší a nejlevnější typ spektrofotometrického detektoru. Využívá optických filtrů, jež určují vlnovou délku. Volba vlnových délek je ale limitována, a to na 254, 280, 334 a 436 nm, tudíž má tento detektor v praxi velmi limitované využití [15].

#### **s variabilní vlnovou délkou**

Tento druh detektoru umožňuje detekci při jakékoliv zvolené vlnové délce. Zdrojem UV záření je deuteriová lampa (asi 190-380 nm) a Vis záření wolframová žárovka

(asi 380-800 nm), případně je detektor vybaven xenonovou lampou. Dnešní detektory jsou řízeny počítačem, a tak lze vlnovou délku měnit v průběhu separace [15], [26].

#### **s fotodiodovým polem (PDA nebo DAD detektor)**

Jedná se o spektrofotometr s fixovanou optikou a jeho detekční systém se skládá ze souboru fotodiod umístěných na silikonovém čipu. Jejich počet určuje rozlišení detektoru. Umožňuje snímat celé spektrum bez přerušení separačního procesu. Elektronické skenování, digitalizování a zpracování signálu počítačem umožňuje pořídit „snímky“ celého spektra protékajícího eluentu. Snímky jsou pořizovány a ukládány každých 0,1 s. Spektra a chromatogram mohou být zobrazeny při jakékoliv vlnové délce a zaznamenány jako 3D spektrum absorbance a vlnové délky v čase. Jednotlivá naměřená spektra mohou být následovně porovnávána s knihovnou spekter pro identifikaci látky [15], [26].

#### **Fluorescenční detektor (FLD)**

Tento detektor je extrémně citlivý, detekční limit je v řádu fg/ml. Fluorescenční detektor poskytuje odezvu pro přirozeně fluoreskující látky, jakými jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, chinoliny, steroidy a alkaloidy, a pro deriváty aminů, aminokyselin a fenolů po derivatizaci s dansylchloridem, 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem (Fmoc-Cl) a jinými derivatizačními činidly. Tento detektor je tedy selektivní, jelikož pouze malé množství analytů přirozeně fluoreskuje. Derivatizace je často komplikovaná, časově a finančně náročná [15]. Fluorescenční detektor se skládá z excitačního monochromátoru, emisního monochromátoru, průtokové cely a fotonásobiče pro zesílení emitovaných fotonů, zdrojem záření je xenonová lampa [16]. Princip fluorescenčního detektoru je následovný. Molekula absorbuje primární záření, dojde k excitaci a při návratu do původní energetické hladiny dochází k vyzaření sekundárního fluorescenčního záření, které je detekováno. Jsou tedy získány dva druhy spekter. Jak excitační, tak i emisní spektrum je charakteristické pro každou látku, takže mohou okamžitě posloužit k identifikaci jednotlivých látek ve vzorku [19].

#### **Refraktometrický detektor (RID)**

RID se asi nejvíce blíží k univerzálnímu HPLC detektoru, jelikož téměř všechny látky mění index lomu (RI) mobilní fáze. Jedná se o rozlišovací detektor, měří tedy RI eluátu v měrné cele a RI čisté mobilní fáze v porovnávací cele. RID má menší citlivost (0,01-0,1 µg) a je citlivý ke změnám teploty a průtoku mobilní fáze. Je běžně používán k detekci analytů

neobsahující chromoforní skupiny jako jsou cukry, triglyceridy, organické kyseliny a polymery. RID jsou v poslední době zdokonalovány lepším temperováním průtokové cely, tudíž nedochází k takovým teplotním změnám. Nicméně jeho nízká citlivost a nekompatibilita s gradientovou elucí jsou jeho velkými nevýhodami, proto se běžně v HPLC nepoužívá [15], [16], [19], [26].

### **Detektor elektronového rozptylu (ELSD)**

ELSD slouží k detekci látek neobsahujících žádný fluorofor či chromofor. V ELSD se zmlží eluent, dojde k vypaření mobilní fáze a měří se rozptýlené záření laserového paprsku na toku částic netěkavého analytu. Velkou výhodou ELSD oproti RID je jeho vyšší citlivost (nanogramy) a kompatibilita s gradientovou elucí. ELSD je používán pro analyty s nízkou UV absorbcí, např. cukry a triglyceridy [16]. Zvláštností ELSD oproti jiným detektorům je jeho nelineární odezva. Získaný signál je nutno před vyhodnocením zlogaritmovat.

### **Aerosolový detektor nabitých částic (CAD)**

CAD je nový univerzální detektor. Používá podobnou zmlžovací techniku jako ELSD. Zmlžený eluát přechází do evaporační komůrky, kde dojde k odpaření mobilní fáze. Kolizní komůrka obsahuje elektrodu, na níž vzniká vlivem vysokého napětí koronový výboj. Do kolizní komůrky zároveň přichází nosný plyn (dusík), který je ionizován. Ionizovaný nosný plyn přenáší náboj na analyt. Nabité částice přecházejí do kolektoru a předávají mu náboj, tím vzniká proud, který je přímo úměrný množství stanovovaného analytu. Ve srovnání s ELSD se CAD vyznačuje vyšší citlivostí, jednodušší obsluhou (snadnější optimalizace) a širším lineárním rozsahem. Jediné jeho omezení, stejně jako u ELSD, je to, že ho lze použít jen pro detekci netěkavých analytů [16].

### **Elektrochemický detektor (ECD)**

ECD měří elektrický proud generovaný elektroaktivními analyty v eluentu mezi elektrodami v průtokové cele. Poskytuje citlivou detekci katecholaminů, neurotransmiterů, redukujících cukrů, glykoproteinů a sloučenin obsahující fenolovou, hydroxylovou, amino-, diazo- nebo nitro- funkční skupinu. ECD může být amperometrického, pulzně-amperometrického nebo coulometrického typu. Elektrody jsou obvykle z uhlíku, stříbra, zlata nebo platiny [16].

### **Vodivostní detektor**

Tento detektor měří elektrickou vodivost mobilní fáze mezi dvěma elektrodami v průtokové cele. Mobilní fáze nesmí být vodivá. Jedná se o primární detektor v iontové chromatografii [16].

### **Radiometrický detektor**

Radiometrický detektor je používán k měření radioaktivity radioaktivních analytů. Většina detektorů tohoto typu je založena na technologii kapalné scintilace [16].

### **Hmotnostní spektrometr (MS)**

Hmotnostní spektrometrie je se svou excelentní citlivostí jednou z nejlepších analytických technik. V dnešní době je LC ve spojení s MS již nepostradatelnou součástí každé dobré laboratoře. Princip MS spočívá v tom, že po vstupu vzorku do přístroje dojde k odpaření mobilní fáze a stanovovaný analyt je ionizován, čímž dojde ke vzniku nabitých částic. Tyto nabitě částice jsou v hmotnostním analyzátoru děleny na základě poměru hmotnosti k náboji fragmentu ( $m/z$ ) a jsou zaznamenávány ve formě hmotnostních spekter. Každá molekula má charakteristické hmotnostní spektrum, čehož lze využít v kvalitativní i kvantitativní analýze [26].

### **Zařízení pro zpracování naměřených dat**

V dnešní době již téměř žádná HPLC sestava nefunguje bez propojení s počítačem. Počítač obsahuje firmou dodávaný software, který řídí HPLC sestavu a vyhodnocuje chromatografický záznam.

## **1.3 Derivatizace v kapalinové chromatografii**

Kapalinová chromatografie se používá pro analýzu většiny známých organických sloučenin. Proto je považována za velmi užitečnou techniku pro analýzu biologických vzorků, vzorků potravin, je také využívána v oblasti monitorování životního prostředí a farmaceutickém průmyslu. Derivatizace je často nutná ke změně retenčních charakteristik, zvýšení odezvy u různých detekčních technik, anebo k zajištění selektivní odezvy u komplexních matic. Nejčastěji používané techniky jsou předkolonová off-line a postkolonová on-line derivatizace [19], [27].



### 1.3.1 Předkolonová derivatizace

Technika derivatizace analytů před jejich přivedením do HPLC systému se nazývá předkolonová derivatizace. Předkolonová derivatizace je provedena tak, že je derivatizační činidlo smícháno s analyzovaným vzorkem, a po inkubaci je tato reakční směs se vzniklým derivátem dávkována do chromatografického systému. Jedná se tedy o off-line mód, jelikož derivatizační reakce probíhá mimo chromatografický systém. Tento způsob derivatizace je často používán, aby došlo ke zvýšení citlivosti detekce. Malé hydrofilní molekuly jsou často díky předkolonové derivatizaci přeměněny na větší a mnohem hydrofobnější sloučeniny, což významně zlepšuje jejich separaci na obrácených fázích. Vzhledem k tomu, že reakce probíhá mimo HPLC systém, je mnohem méně náročná na instrumentaci a také nejsou kladeny tak vysoké požadavky na reakční podmínky. Nevýhodou této formy derivatizace je přítomnost nadbytečného derivatizačního činidla a někdy i vznik vedlejších produktů reakce, které mohou interferovat při separaci. Důležitými aspekty této techniky jsou komplexnost reakce, stabilita vzniklých derivátů a jednoduchost přípravy [27], [28].

### 1.3.2 Postkolonová derivatizace

Postkolonová derivatizace je provedena tak, že je derivatizační činidlo zavedeno mezi kolonu a detektor. Jedná se tedy o on-line mód, jelikož derivatizační reakce probíhá poté, co analyt opustí kolonu. K reakci nejčastěji dochází v takzvané reakční cele a po proběhnutí reakce je vzniklý derivát detekován odpovídajícím detektorem, který je zařazen za reakční celu. Postkolonová technika je obvykle používána pro sloučeniny s nízkou či žádnou odezvou na zvolený systém detekce, nebo když je určitý analyt schopný poskytnout selektivní odezvu po chemické přeměně. Postkolonová derivatizace je obecně náročnější na instrumentaci, ale zároveň je přesnější. Díky tomu, že je tento typ derivatizace automatizovaný, je minimální šance vzniku hrubé chyby při dávkování derivatizačního činidla ke vzorku. Požadavky na postkolonovou derivatizaci jsou rychlost reakce do dvou minut a reprodukovatelnost [19], [27], [28].

### 1.3.3 Detekční metody

UV a fluorescenční detekce jsou nejčastěji používané detekce v HPLC, ale někdy postrádají dostatečnou citlivost nebo selektivitu pro stopovou analýzu. Stanovované analyty by měly obsahovat chromoforní nebo fluoroforní skupinu, aby mohly být detekovány. Chemická derivatizace mění látky s nízkou UV absorpcí na látky, které silně absorbují v UV nebo Vis

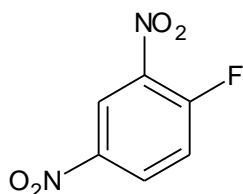
oblasti, či dokonce silně fluoreskující. Derivatizace také může zlepšit retenci a rozlišení polárních sloučenin, jelikož jejich deriváty jsou obvykle více hydrofobní [27], [29].

### 1.3.4 Derivatizace gentamicinu

Vzhledem k tomu, že GMC obsahuje aminoskupiny, jsou pro jeho derivatizaci používána stejná derivatizační činidla jako pro derivatizaci primárních a sekundárních aminů či aminokyselin. Výskyt aminoskupin je obvyklý u mnoha biologických sloučenin. Většina těchto sloučenin se projevuje slabou absorpcí v UV-Vis oblasti. Naproti tomu deriváty aminů mohou být snadno analyzovány HPLC, i když jsou přítomny ve velmi nízkých koncentracích. Primární a sekundární aminoskupiny GMC jsou obvykle derivatizovány aromatickými sloučeninami nukleofilní substitucí [27].

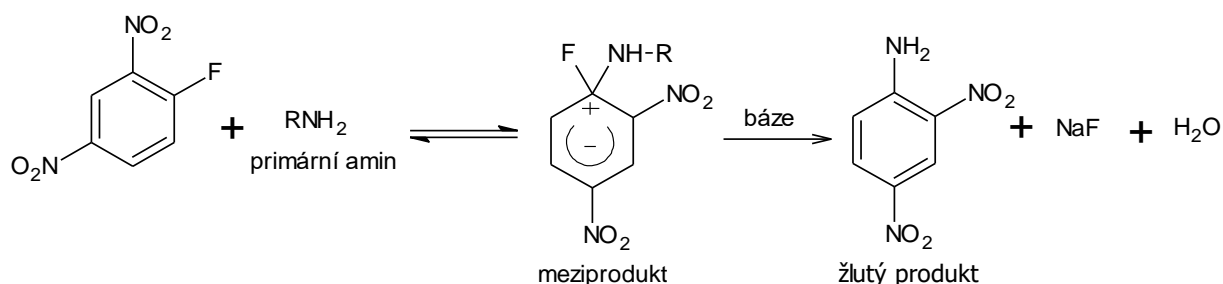
#### 1.3.4.1 Derivatizační činidla používaná při derivatizaci gentamicinu

##### 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB)



Obrázek 3: Strukturální vzorec 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenu

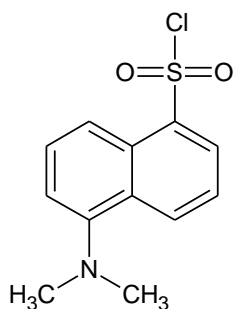
Reakce FDNB (Sangerova činidla) s primárním aminem je uvedena na obrázku 4.



Obrázek 4: Obecné schéma reakce 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenu s aminy

Vzniká sytě žlutý derivát [29], [30].

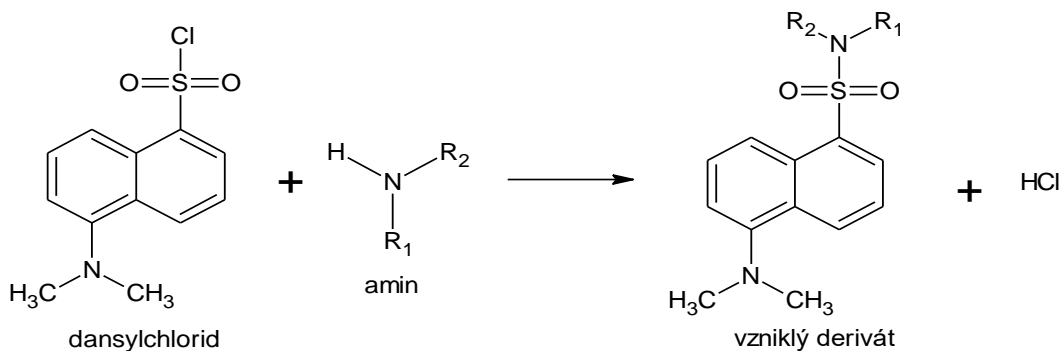
## Dansylchlorid



Obrázek 5: Strukturní vzorec dansylchloridu

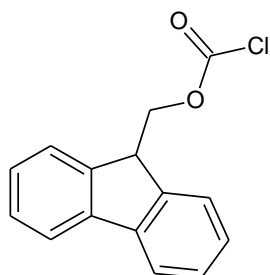
5-Dimethylaminonaphthalen-1-sulfonylchlorid, obecně dansylchlorid (Dns-Cl), je jedno z nejčastěji používaných derivatizačních činidel pro aminokyseliny. Dns-Cl lze také použít pro derivatizaci primárních a sekundárních aminů, a vzhledem k tomu, že GMC obsahuje primární i sekundární aminoskupiny, je pro jeho derivatizaci vhodný. Reakce Dns-Cl s gentamicinem probíhá v mírně zásaditém prostředí, například v prostředí borátového pufru. Menší nevýhodou je, že doba reakce je poměrně dlouhá a vyžaduje vysokou teplotu, až 100 °C [31], [32].

Reakce Dns-Cl s aminy je znázorněna na obrázku 6.



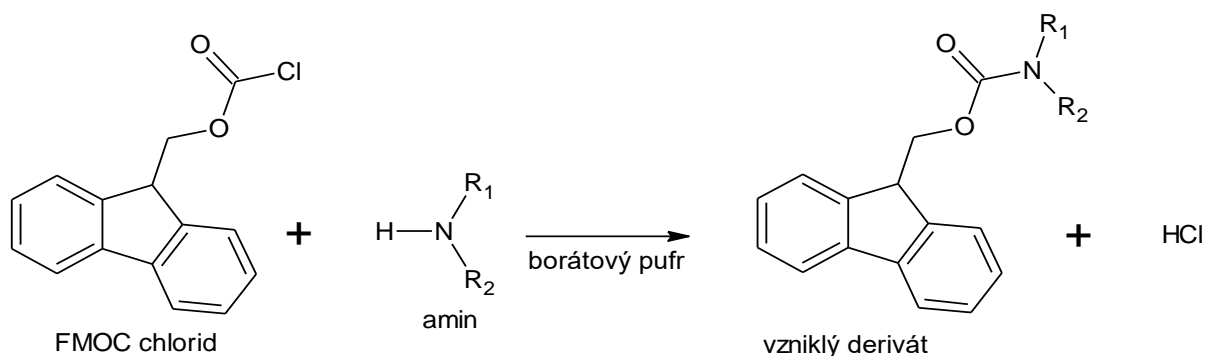
Obrázek 6: Obecné schéma reakce dansylchloridu s aminy

## 9-Fluorenylmetoxykarbonylchlorid



Obrázek 7: Struktura FMOC-Cl

FMOC-Cl reaguje s primárními a sekundárními aminy, aminokyselinami a alkoholy. Toto činidlo reaguje s aminoskupinou v přítomnosti borátového pufru za tvorby odpovídajících karbamátů. Reaktivita je kontrolována vhodným pH. Reakce aminů s FMOC-Cl je rychlá a probíhá při laboratorní teplotě. Reakce musí být zastavena přidáním přebytku neinterferujícího aminu a okyselením reakční směsi. Vzniklý karbamát je stabilní. Reakce FMOC-Cl s aminy je uvedena na obrázku 8.



Obrázek 8: Obecné schéma reakce 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridu s aminy

### Další derivatizační činidla používaná pro derivatizaci gentamicinu

Jedním z dalších činidel pro derivatizaci GMC je například *ortho*-ftaldialdehyd (OPA) [33]. OPA reaguje s primárními aminy v přítomnosti alkylthiolu, nejčastěji merkptoethanolu, za vzniku odpovídajících produktů, které fluoreskují. Toto činidlo se používá pro derivatizaci biogenních aminů, peptidů a proteinů i ve stopových množstvích. Derivatizace aminů OPA je nejčastěji postkolonová. U předkolonové derivatizace je problémem nestabilita vzniklých derivátů [29], [34], [35].

Fluoreskamin reaguje s primárními aminy za vzniku odpovídajícího fluoreskujícího derivátu. Lze ho použít jak pro předkolonovou, tak i postkolonovou derivatizaci [29], [31], [36].

Existuje velké množství dalších derivatizačních činidel používaných pro derivatizaci GMC, v této diplomové práci ale byla věnována pozornost pouze FDNB, Dns-Cl a FMOC-Cl.

## 1.4 Přehled chromatografických metod pro stanovení gentamicinu v biologických vzorcích

Aminoglykosidy jsou skupina vysoce účinných antimikrobiálních látek, která se používá k léčbě infekcí způsobených aerobními gramnegativními a některými grampozitivními bakteriemi. Chemickou strukturou, antimikrobiální aktivitou, farmakokinetickými charakteristikami a toxicitou jsou si všechny aminoglykosidy podobné. Obsahují aminocyklitol

a aminocukr připojený k ribóze. Právě díky podobnosti molekul je separace aminoglykosidových antibiotik velmi komplikovaná. Většina aminoglykosidových antibiotik je vysoce polární, odolná vůči kyselinám, zásadám, vysoké teplotě a postrádá vhodný chromofor. Pro jejich analýzu jsou využívány mnohé techniky, a to především kapalinová chromatografie, plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Vzhledem k netěkavosti, absenci chromoforu a hydrofilite aminoglykosidů, se mnohé metody přiklánějí k derivatizaci, aby byl proces separace účinnější. Derivatizační techniky mají výhodu v tom, že dojde ke zkrácení doby analýzy a snížení nákladů na instrumentaci. Na druhou stranu má derivatizace také mnoho nevýhod. Jednou z největších je nestabilita vzniklých produktů [37], [38].

### **Chromatografické metody používané pro analýzu aminoglykosidů**

#### **a) techniky pro kvalitativní použití**

Aminoglykosidy byly analyzovány v tkáních a moči různými technikami, jako jsou mikrobiologické techniky, radioenzymatické a radioimunoanalytické (RIA) techniky či papírová chromatografie. Tyto metody jsou stále používány, ale ve většině případů slouží pouze pro kvalitativní použití, jelikož jsou časově náročné. U mikrobiologických metod trvá například inkubace až 3 dny, zároveň jsou tyto metody závislé na mnoha faktorech, jako jsou teplota, pH a tloušťka agaru aplikovaného na Petriho misku. I když jsou mikrobiologické metody poměrně levné a jednoduché, jsou nepřesné [38]. RIA metody jsou ve srovnání s mikrobiologickými více účinné. Jsou citlivé a specifické, ale některé aminoglykosidy mohou navzájem interferovat. RIA technikou se dají stanovit GMC, amikacin i tobramycin. Analýza RIA metodami vyžaduje náročnou optimalizaci a je časově náročná [39].

#### **b) techniky pro kvantitativní použití**

Chromatografické metody jsou v dnešní době pro kvantitativní stanovení aminoglykosidů nepostradatelné. Nicméně díky jejich podobné struktuře a nepřítomnosti vhodného chromoforu je jejich analýza náročná.

### **1.4.1 Stanovení GMC plynovou chromatografií (GC)**

GC je nejpoužívanější technika pro analýzu těkavých a tepelně stabilních sloučenin. Přímá analýza aminoglykosidů GC je nevhodná, protože aminoglykosidy jsou hydrofilní a netěkavé. Proto musí být pro analýzu GC použita vhodná derivatizační technika, aby vzniklé deriváty byly hydrofobní a těkavé. Vzniklý derivát by měl mít ideálně podobnou, nebo blízkou příbuznou chemickou strukturu jako původní analyt. U GC analýzy jsou hlavním problémem sloučeniny

obsahující tzv. aktivní vodík ve funkčních skupinách, jako jsou -SH, -OH, -NH a -COOH, jelikož mají tendenci vytvářet intermolekulární vodíkové vazby. Tyto vodíkové vazby snižují těkavost sloučenin, také ovlivňují jejich schopnost interagovat se stacionární fází [38], [40], [41].

Mayhew a Gorbach popsali dvoukrokovou derivatizaci aminoglykosidů (včetně GMC) pro jejich analýzy v lidském séru metodou GC. Derivatizace zahrnuje silylaci hydroxylových skupin trimethylsilylimidazolem (TMSI) a acylaci aminoskupin heptafluorobutyrylimidazolem (HFBI). Vzniklé deriváty jsou stabilní a dostatečně těkavé. K detekci použili detektor elektronového záchytu (ECD). Nevýhodou této metody je použití vysoce selektivního detektoru [40].

Preu a kol. použili stejný postup jako Mayhew a Gorbach, místo ECD zvolili MS detekci [42].

Simultánní analýzou celkem 36 různých antibiotik v mase metodou GC s plamenově-ionizačním detektorem se zabývali Mineo a Kaneko [43].

#### **1.4.2 Stanovení gentamicinu kapalinovou chromatografií (LC)**

HPLC je pro analýzu GMC a aminoglykosidů nejvíce používanou analytickou technikou. Komplikací je, že ve své molekule neobsahují vhodný chromofor [38].

##### **1.4.2.1 Metody pro stanovení gentamicinu kapalinovou chromatografií bez použití derivatizace**

I když většina metod pro stanovení GMC a dalších aminoglykosidů zahrnuje předkolumnovou nebo postkolumnovou derivatizaci, je popsáno i několik metod pro jejich stanovení bez derivatizace.

Mustafa a Devi vyvinuli RP-HPLC metodu pro stanovení kanamycinu v poly(laktid-ko-glykolidových) nanočásticích (PLGA). Mobilní fází byl roztok tetraboritanu sodného s přísadkou iontově párového činidla oktansulfonátu sodného. Pro separaci byla použita kolona s vázanou reverzní fází (C18). Kanamycin byl eluován isokraticky a monitorován při 205 nm [44].

Kalyani a Rao popsali RP-HPLC pro simultánní stanovení amikacinu a cefepimu. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu, ACN a octanového pufru. Antibiotika byla separována na vázané reverzní fází (C18) a monitorována při 212 nm [45].

Dimal se také zabýval simultánním stanovením amikacinu a cefepimu [46]. Stejně jako Kalyani a Rao separoval tato antibiotika na obrácených fázích a detekoval UV detektorem (212 nm). Volil však jinou mobilní fázi, a to směs ACN a vody.

Adams a kol. publikovali HPLC metodu s ECD pro stanovení amikacinu [47]. Analyty byly separovány na polystyrendivinybenzenové stacionární fázi gradientovou elucí. Mobilní fáze byla směsí síranu sodného, oktansulfonátu sodného a fosfátového pufru. Pro zlepšení detekce byla mobilní fáze s analyty po výstupu z kolony alkalizována hydroxidem sodným.

RP-LC s použitím pulzní elektrochemické detekce se zabývali také Manyanga a kol. [48]. Vypracovali metodu pro stanovení tobramycinu. Pro separaci použili reverzní fázi (C18), eluce byla isokratická, mobilní fáze byla směs síranu sodného, sodné soli oktan-1-sulfonové kyseliny, tetrahydrofuranu a fosfátového pufru.

Brajanoski a kol. se také zabývali stanovením aminoglykosidového antibiotika metodou RP-LC, stanovovali amikacin v mozkomíšním moku. Amikacin separovali na reverzní fázi (C18). Mobilní fáze byla směsí síranu sodného, oktansulfonátu sodného, tetrahydrofuranu a fosfátový pufru. Pro zlepšení elektrochemické detekce byla mobilní fáze s analyty po výstupu z kolony alkalizována hydroxidem sodným [49].

Další metodu pro přímé stanovení aminoglykosidových antibiotik popsali Galanakis a kol. [50]. Jedná se o RP-LC metodu s ELSD. Aminoglykosidová antibiotika byla separována na reverzní fázi (C18), eluce byla isokratická, mobilní fází byla směs vody a methanolu s přídavkem perfluoropentanové kyseliny.

Liu a kol. vyvinuli HPLC metodu s ELSD pro simultánní stanovení aminoglykosidů apramycinu, neomycinu, amikacinu a GMC. Antibiotika byla separována na reverzní fázi (C18), eluce byla gradientová, mobilní fáze byla směs ACN a vody s přídavkem iontově párového činidla heptafluoromáselné kyseliny [51].

Detekce analytů obsahující slabý chromofor je problém, který se snažili vyřešit Caudron a Baghriche [52]. GMC separovali na obrácené fázi a detekovali při 215 nm. Eluce byla gradientová, mobilní fází byla směs ACN a vody s přídavkem iontově párového činidla heptafluoromáselné kyseliny.

Plozza a kol. vyvinuli metodu LC-MS/MS pro stanovení vybraných aminoglykosidů včetně GMC a jeho C1, C2 a C1a komponent v kravském mléce. Aminoglykosidy byly separovány

na reverzní fázi (C18), eluce byla gradientová, mobilní fázi byla směs ACN a vody s přidavkem iontově párového činidla heptafluoromáselné kyseliny [53].

Joseph a Rustum vyvinuli metodu RP-LC s CAD pro stanovení GMC v krému. GMC separovali na pentafluorfenylové fázi, eluce byla gradientová, mobilní fázi A byla směs ACN a vody s přidavkem kyseliny heptafluoromásledné, mobilní fázi B byla směs ACN, vody a kyseliny trifluoroctové [54].

Stanovením tobramycinu v očních kapkách se zabývali Ruckmani a kol. [55]. Potýkali se opět se stejným problémem, že tobramycin v UV oblasti téměř neabsorbuje. Mobilní fázi byla směs hydrogenfosforečnanu amonného a tetramethylammoniumhydroxidu. Tobramycin separovali na reverzní fázi (C8) a detekovali při 210 nm.

Stanovením tobramycinu se zabývali také Zhu a Wang [56]. Použili metodu ion-párové HPLC na obrácených fázích (C18) v kombinaci s RID. Jako mobilní fázi zvolili směs methanolu a vody s přidavkem iontově párující činidla kyseliny trifluoroctové.

Clarot a kol. vyvinuli pro stanovení tobramycinu metodu HPLC s ELSD. Tobramycin separovali na reverzní fázi (C18), eluce byla gradientová a mobilní fázi byla směs ACN, vody a kyseliny trifluoroctové [57].

Italští autoři v čele se Salutim vyvinuli novou metodu pro simultánní stanovení 12 různých aminoglykosidů [58]. Před vlastní analýzou extrahovali aminoglykosidy na tuhé fázi (SPE). Jako nejvhodnější stacionární fáze se ukázala HILIC. Eluce byla gradientová, mobilní fázi A byla směs kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného, mobilní fázi B byl ACN, pro detekci byl použit MS.

#### **1.4.2.2 Metody pro stanovení gentamicinu s použitím chemické derivatizace**

Stead a Richards vyvinuli pro stanovení GMC v biologických vzorcích metodu RP-LC s FLD. Komponenty GMC C1, C1a, C2, C2a derivatizovali FMOC-Cl a odpovídající deriváty separovali na reverzní fázi (C18). Mobilní fázi byla směs ACN a vody [59].

Kim a Lee vyvinuli pro stanovení aminoglykosidů metodu RP-LC s PDA. Aminoglykosidy derivatizovali fenylisokyanátem v přítomnosti triethylaminu [60]. Vzniklé deriváty separovali na obrácené fázi (C18), mobilní fázi byla směs ACN a vody s přidavkem kyseliny trifluoroctové. Pro porovnání použili také ELSD.



Simultánním stanovením amikacinu a jeho prekurzoru, kanamycinu, se zabývali Korany a kol. [61]. Amikacin a kanamycin derivatizovali činidlem složeného z vody, octanového pufru, formaldehydu a acetylacetonu. Vzniklé deriváty separovali na obrácené fázi (C18) a detekovali PDA detektorem. Eluce byla isokratická, mobilní fází byla směs ACN a octanového pufru.

Feng a kol. stanovovali amikacin po předchozí derivatizaci 1-naftylisothiokyanátem. Vzniklý derivát byl separován na reverzní fázi (C18) a monitorován při 230 nm. Mobilní fází byla směs ACN a vody. Tuto metodu lze použít také pro stanovení jiných aminoglykosidových antibiotik [62].

Indičtí autoři Chauhan a Jalalpure stanovovali amikacin v lidském séru metodou UHPLC s FLD [63]. Amikacin derivatizovali FMOC-Cl v borátovém pufru. Derivát amikacinu separovali na reverzní fázi (C18), mobilní fází byla směs ACN a vody.

Li a kol. vyvinuli a validovali metodu HPLC s UV detekcí pro stanovení stopového množství amikacinu ve vzorcích vody. Amikacin z vody extrahovali technikou SPE a derivatizovali 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoridem (CNBF) v přítomnosti triethylaminu. Vzniklý derivát byl separován na reverzní fázi (C18) a detekován při 238 nm [64].

Italky Nicoli a Santi vypracovaly metodu HPLC s UV detekcí pro stanovení amikacinu v lidské kůži [65]. Amikacin a další aminoglykosidy jsou obsaženy v mnohých antibiotických přípravcích určených pro aplikaci na kůži. Autorky odebraly malý kousek dárcovy kůže, který po dobu 20 s sušily fénem na vlasy, aby mohla být epidermis oddělena od dermis. Amikacin následně vyextrahovaly z obou kožních vrstev za různých podmínek. Amikacin derivatizovaly FDNB, derivát separovaly na reverzní fázi (C18) a detekovaly při 365 nm. Mobilní fází byla směs ACN, vody a kyseliny octové.

Kuehl a kol. vyvinuli a validovali HPLC metodu s UV detekcí pro simultánní stanovení gentamicinsulfátu a leucinu v prášku určeném k inhalaci (NanoGENT™). Gentamicinsulfát a leucin derivatizovali OPA, deriváty separovali na obrácené fázi (C18) a monitorovali při 330 nm. Mobilní fází byla směs methanolu, vody a kyseliny octové s přídavkem iontově párujícího činidla heptansulfonátu sodného [66].

Anhalt a jeho američtí kolegové vyvinuli rychlou metodu HPLC s FLD pro simultánní stanovení GMC a jeho komponent C1, C1a a C2 [67]. GMC a jeho komponenty separovali na reverzní fázi (C8). Mobilní fází byla směs síranu sodného a kyseliny octové ve vodě

s přidavkem iontově párového činidla pentansulfonátu sodného. GMC a jeho komponenty byly po výstupu z kolony derivatizovány OPA (postkolonová derivatizace).

Stanovením komponent GMC se stejně jako Anhalt a kol. zabývali Seidl a Nerad [68]. Komponenty GMC separovali na iontově-výměnné koloně a derivatizovali OPA (postkolonová derivatizace). Mobilní fází byl roztok KCl o pH 3,0.

Isoherranen a Soback vyvinuli metodu pro simultánní stanovení GMC a jeho komponent C1, C1a a C2 v plazmě a moči. Po extrakci technikou SPE, byly GMC a jeho komponenty derivatizovány FDNB [69]. Vzniklé deriváty byly separovány na reverzní fází (C18) a monitorovány při 365 nm. Mobilní fází byla směs ACN a tris [tris(hydroxymethyl)aminomethan] pufru.

Dalšími autory, kteří se zabývali předkolonovou derivatizací aminoglykosidů FDNB, jsou Tsuji a kol. Vyvinuli metodu HPLC s UV detekcí. Aminoglykosidy separovali na polární „normální“ fází (kolona LiChrosorb SI-100) a monitorovali při 350, respektive 254 nm. Mobilní fází byla směs chloroformu, tetrahydrofuranu a vody [70].

Meicheng a kol. vyvinuli metodu HPLC s UV detekcí pro simultánní stanovení gentamicinsulfátu a neomycinsulfátu. Jako derivatizační činidlo použili FMOC-Cl. Deriváty separovali na reverzní fází (C18) a monitorovali při 265 nm, mobilní fází byla směs ACN a vody [71].

Stanovením stopového množství streptomycinu v mase, mléce a medu se zabývali Edder a kol. [72]. Autoři extrahovali streptomycin technikou SPE a separovali na reverzní fází (C18). Po výstupu z kolony byl streptomycin derivatizován  $\beta$ -naftochinon-4-sulfonátem (NQS). Mobilní fází byla směs ACN a vody s přidavkem iontově párujícího činidla heptansulfonátu sodného. Derivát streptomycinu byl monitorován FLD ( $\lambda_{EX} = 260$  nm a  $\lambda_{EM} = 435$  nm).

Rychlou metodu pro simultánní stanovení kanamycinu a dibekacinu v séru metodou HPLC s FLD vyvinuli Kubo a kol. [73]. Kanamycin a dibekacin separovali na reverzní fází (C18) a po výstupu z kolony derivatizovali OPA. Mobilní fází byla směs ACN s vodou s přidavky iontově párujících činidel 1,2-ethandisulfonátu sodného a oktansulfonátu sodného.

Britští autoři v čele s Mashatem vyvinuli a validovali metodu HPLC s FLD pro stanovení tobramycinu ve vzorcích moči. Tobramycin byl derivatizován fluoresceinisothiokyanátem

(FITC) a vzniklý derivát separován na reverzní fázi (C18). Mobilní fází byla směs ACN, methanolu, kyseliny octové a vody [74].

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a validovat metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení gentamicinu v tenkých filmech kyseliny hyaluronové používaných ve tkáňovém inženýrství či chirurgii.

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Vzorky**

- kyselina hyaluronová (Contipro a.s., Dolní Dobrouč, Česká republika)
- lauroylhyaluronát (Contipro a.s., Dolní Dobrouč, Česká republika)
- palmitoylhyaluronát (Contipro a.s., Dolní Dobrouč, Česká republika)

#### **3.1.2 Chemikálie**

- 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 9-fluorenylmethoxykarbonylchlorid (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- acetonitril, UPLC grade (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francie)
- dansylchlorid (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- dekahydrát tetraboritanu sodného (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hydroxid sodný (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- isopropanol HPLC grade (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francie)
- kyselina mravenčí (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francie)
- kyselina octová (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kyselina trifluorooctová (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- L-alanin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- methanol HPLC grade (VWR International, Fontenay-sous-Bois, Francie)
- standard komponent gentamicinu C1, C2, C1a a C2a v poměru 1:1:1:1 (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokio, Japonsko)
- tobramycin (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokio, Japonsko)

#### **3.1.3 Pomůcky a přístroje**

- ACQUITY<sup>®</sup> QDa<sup>®</sup> hmotnostní detektor (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)

- analytická kolona Atlantis dC18, 100Å, 5 µm, 4,6 mm x 250 mm (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA)
- analytická kolona Jupiter® 4 µm Proteo 90 Å, 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- analytické váhy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- automatická digitální pipeta Handystep® (BrandTech Scientific, Inc., Essex, CT, USA)
- autosampler pro ACQUITY UPLC® H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
- autosampler pro Shimadzu Prominence (Shimadzu Corporation, Kjóto, Japonsko)
- dvě vysokotlaká čerpadla pro Shimadzu Prominence (Shimadzu Corporation, Kjóto, Japonsko)
- ELS detektor, model 2424 (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
- filtrační aparatura pro přípravu mobilních fází Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- filtry Nylon 66 pro injekční stříkačku, velikost pórů 0,2 µm (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- fluorescenční detektor pro Shimadzu Prominence (Shimadzu Corporation, Kjóto, Japonsko)
- HPLC řídicí jednotka pro Shimadzu Prominence (Shimadzu Corporation, Kjóto, Japonsko)
- kapalinový chromatograf ACQUITY UPLC® H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
- kapalinový chromatograf Shimadzu Prominence (Shimadzu Corporation, Kjóto, Japonsko)
- laboratorní sklo
- magnetická míchačka Cimarec™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- mikropipety (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- mikrozukmavky (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- odměrné baňky (10 ml, 100 ml, 1 l)
- odplyňovač mobilní fáze pro Shimadzu Prominence (Shimadzu Corporation, Kjóto, Japonsko)
- odstředivka Scilogex D2012 (Scilogex, Berlin, CT, USA)

- pH metr pH 8+ DHS (XS Instruments, Carpi MO, Itálie)
- horkovzdušná sušárna FN 500P (KRD, Praha, Česká republika)
- termostat kolon pro ACQUITY UPLC<sup>®</sup> H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
- termostat kolon pro Shimadzu Prominence (Shimadzu Corporation, Kjóto, Japonsko)
- ultrazvuková lázeň Elmasonic S30 (Elmasonic, Singen, Německo)
- UV detektor s proměnnou vlnovou délkou pro ACQUITY UPLC<sup>®</sup> H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA)
- vialky určené pro kapalinový chromatograf (Waters Corporation, Milford, MA, USA)

## **3.2 Stanovení gentamicinu metodou HPLC s hmotnostní detekcí**

### **3.2.1 Příprava roztoků**

#### Zásobní roztok trifluoroctové kyseliny (asi 50 mmol/l)

Roztok byl připraven zředěním 3,8 ml koncentrované trifluoroctové kyseliny (TFA) do objemu 1 l vodou pro HPLC.

#### Zásobní roztok trifluoroctové kyseliny (asi 200 mmol/l)

Roztok byl připraven zředěním 1,5 ml koncentrované TFA do objemu 100 ml vodou pro HPLC.

#### Zásobní roztoky trifluoroctové kyseliny (10, 20, 30, 70, 100 mmol/l)

Roztoky byly připraveny naředěním zásobního roztoku TFA (asi 200 mmol/l) vodou pro HPLC na požadovanou koncentraci.

#### Zásobní roztok mravenčanu amonného (asi 5 mmol/l)

Navážka 32 mg mravenčanu amonného byla rozpuštěna v 100 ml vody pro HPLC.

#### Zásobní roztok standardu komponent gentamicinu (asi 1 mg/ml)

Navážka 10 mg standardu komponent GMC byla rozpuštěna v 10 ml vody pro HPLC.

#### Zásobní roztok tobramycinu (asi 100 µg/ml)

Navážka 10 mg TOB byla rozpuštěna v 100 ml vody pro HPLC.

### Kalibrační roztoky gentamicinu (0,5, 1, 5, 10, 50 a 100 µg/ml)

Kalibrační roztoky GMC byly připraveny ředěním zásobního roztoku GMC o koncentraci asi 1 mg/ml na požadovanou koncentraci vodou pro HPLC.

## **3.2.2 Chromatografická analýza**

### **3.2.2.1 HPLC parametry**

Při prvním měření byla použita kolona Jupiter<sup>®</sup> 4 µm Proteo 90 Å, 150 x 4,6 mm. Pro analýzy byl vybrán kapalinový chromatograf ACQUITY UPLC<sup>®</sup> H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Mobilní fáze A byl roztok 50mmol/l TFA, mobilní fáze B byl 100% methanol. Mobilní fáze A a B byly míchány v poměru 92:8 (v/v). Promývacím roztokem pro oplach dávkovací jehly byl 30% isopropanol. Průtok mobilní fáze byl nastaven na hodnotu 0,8 ml/min, termostat kolon na 25 °C a vzorky byly v autosampleru chlazeny při 8 °C. Tlakové limity čerpadel mobilní fáze byly nastaveny na hodnotu 50 psi (minimální tlak) a 5000 psi (maximální tlak). Nastavení MS detektoru Acquity QDa bylo následující: pozitivního módu ionizace s napětím 0,8 kV, skenování od 280 do 1000 Da.

### **3.2.2.2 Optimalizace**

Zvolenou metodou byl analyzován slepý vzorek (voda) a standard komponent GMC o koncentraci asi 100 µg/ml. Při použití 50mmol/l TFA jako mobilní fáze došlo při nástřiku standardu k rozdělení všech čtyř komponent GMC. Při dalších analýzách byly nastaveny stejné podmínky, použity stejné vzorky, jen mobilní fáze A byla 200mmol/l TFA. Za těchto podmínek se snížila odezva a zvýšil šum detektoru. Pro následující analýzu byl jako mobilní fáze A zvolen 5mmol/l mravenčan amonný. Výsledky měření byly nepoužitelné. Při porovnání těchto 3 mobilních fází vychází nejlépe 50mmol/l TFA. Byly připraveny mobilní fáze o různé koncentraci TFA (10, 20, 30, 50, 70 a 100 mmol/l). Z výsledků všech analýz vyplývá, že nejvhodnější koncentrací TFA je 50 mmol/l. Další analýzy s touto mobilní fází proběhly v SIM (Single Ion Monitoring) módu. Hodnoty poměru hmotnosti a náboje (m/z) molekulových iontů komponent GMC jsou uvedeny v tabulce 1.



Tabulka 1: Hodnoty poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) molekulových iontů komponent GMC

<b>komponenta gentamicinu</b>	<b><math>m/z</math> iontu <math>[M+H]^+</math></b>
GMC C1	478
GMC C1a	450
GMC C2	464
GMC C2a	464

Pro kvantifikaci GMC byl jako vnitřní standard použit TOB, jelikož má podobné fyzikálně-chemické vlastnosti a podobný retenční čas. Byla analyzována směs GMC a TOB o koncentraci asi 100  $\mu\text{g/ml}$ , prvně s rychlostí záznamu 2 body za sekundu (p/s; z angl. point per second), následně rychlostí 1 p/s. Při porovnání jednotlivých chromatogramů byly píky obou látek na první pohled identické, proto bylo nutné proměřit kalibrační standardy při 1 p/s i 2 p/s a porovnat, při kterém nastavení poskytuje kalibrační závislost větší linearitu. Následně byl analyzován směsný standard GMC a TOB, který byl připraven smícháním 1 ml GMC o koncentraci 10  $\mu\text{g/ml}$  a 100  $\mu\text{l}$  TOB o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ . Byly zachovány stejné HPLC podmínky, pouze byl změněn poměr mobilních fází A a B, z 92:8 (v/v) na 90:10 (v/v). Zvýšením koncentrace methanolu došlo dle očekávání ke zkrácení doby analýzy. Opět bylo provedeno porovnání chromatografických záznamů získaných při rychlosti 1 p/s a 2 p/s.

#### **3.2.2.2.1 Kalibrační křivka**

Byly připraveny kalibrační standardy o koncentraci 0,5, 1, 5, 10, 50 a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Standardy byly proměřeny s rychlostí záznamu 1 a 2 p/s.

### **3.3 Stanovení gentamicinu metodou HPLC s ELSD**

#### **3.3.1 Příprava roztoků**

Zásobní roztok trifluoroctové kyseliny (asi 50 mmol/l)

Roztok byl připraven zředěním 3,83 ml koncentrované TFA do objemu 1 l vodou pro HPLC.

#### Zásobní roztok standardu gentamicinu (asi 1 mg/ml, asi 100 µg/ml, asi 500 µg/ml)

Navážka 10 mg GMC byla rozpuštěna v 10 ml vody pro HPLC. Roztoky GMC o koncentraci asi 500 a 100 µg/ml byly připraveny ředěním roztoku GMC (asi 1 mg/ml) vodou pro HPLC na požadovanou koncentraci.

#### Zásobní roztok standardu tobramycinu (asi 100 µg/ml)

Navážka 10 mg TOB byla rozpuštěna ve 100 ml vody pro HPLC.

#### Kalibrační roztoky GMC (10, 40, 80, 100, 300 a 500 µg/ml)

Kalibrační standardy byly připraveny ředěním zásobního roztoku GMC (1 mg/ml) vodou pro HPLC na požadovanou koncentraci.

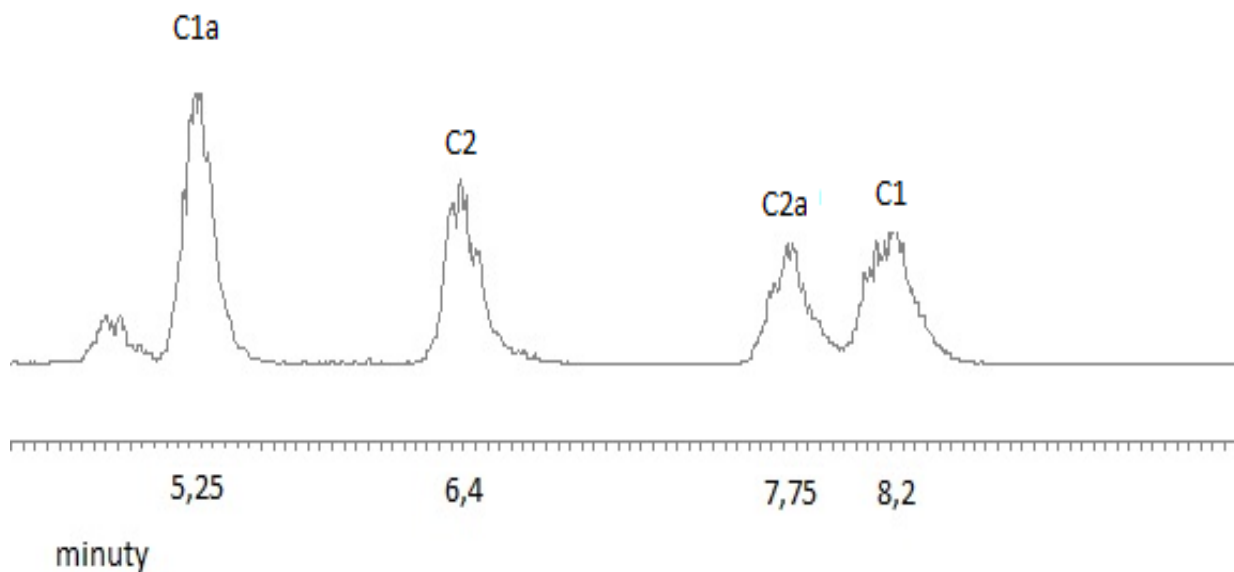
### **3.3.2 Chromatografická analýza**

#### **3.3.2.1 HPLC parametry**

Pro první analýzu byla použita kolona Jupiter<sup>®</sup> 4 µm Proteo 90 Å, 150 x 4,6 mm. Mobilní fáze A byl roztok 50mmol/l TFA, mobilní fáze B byl 100% methanol. Mobilní fáze A a B byly smíchány v poměru 90:10 (v/v). Promývacím roztokem pro oplach dávkovací jehly byl 30% isopropanol. Průtok mobilní fáze byl udržován na hodnotě 0,8 ml/min, termostat kolon byl nastaven na hodnotu 25 °C a vzorky byly v autosampleru chlazeny při 8 °C. Tlakové limity čerpadel mobilní fáze byly nastaveny na hodnotu 50 psi (minimální tlak) a 4000 psi (maximální tlak). Pro detekci byl použit ELSD, model 2424 (Waters Corporation, Milford, MA, USA), u kterého bylo nutné optimalizovat nastavení.

#### **3.3.2.2 Optimalizace**

Bylo nutné optimalizovat nastavení ELSD. Prvotní nastavení bylo následující: tlak nebulizačního plynu 50 psi, teplota plynu 60 °C, teplota nebulizéru 36 °C. Nejprve byl analyzován standard GMC o koncentraci asi 1 mg/ml. Rychlost záznamu byla nastavena na 5 p/s, zesílení 300, teplota plynu byla 60 °C a vzorek byl dávkován v objemu 10 µl.



Obrázek 9: Chromatografický záznam komponent GMC o koncentraci 1 mg/ml. HPLC podmínky: stacionární fázi byla kolona Jupiter® 4  $\mu\text{m}$  Proteo 90 Å, 150 x 4,6 mm, temperována při 25 °C, mobilní fáze A (50 mmol/l TFA) a B (100% methanol) byly smíchány v poměru 90:10 (v/v), průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min, dávkovaný objem vzorku byl 10  $\mu\text{l}$ . Nastavení ELSD: tlak a teplota nebulizačního plynu byly 50 psi a 60 °C, teplota nebulizéru 36 °C. Rychlost záznamu byla 5 p/s.

Za stejných podmínek byl analyzován vnitřní standard TOB, poté GMC i TOB s 10x nižší koncentrací (tedy 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Z výsledků analýz je patrné, že koncentrace TOB byla optimální, zato koncentrace GMC nízká. Proto byla za stejných podmínek provedena další analýza, pouze s tím rozdílem, že koncentrace GMC byla 500  $\mu\text{g/ml}$ .

V dalším kroku byly za stejných podmínek analyzovány GMC o koncentraci 500  $\mu\text{g/ml}$  a TOB o koncentraci 100  $\mu\text{g/ml}$ , pouze byla změněna rychlost záznamu z 5 na 2 p/s. Při porovnání výsledků bylo na první pohled zřejmé, že při rychlosti záznamu 2 p/s byla získána mnohem lepší odezva detektoru. Optimální koncentrace GMC byla tedy 500  $\mu\text{g/ml}$  a TOB 100  $\mu\text{g/ml}$ . Následně bylo zvýšeno zesílení ELSD z 300 na 500 a dosaženo tak vyšší citlivosti detektoru. Rychlost záznamu byla ponechána na hodnotě 2 p/s. Následně bylo dávkováno namísto 10  $\mu\text{l}$  vzorku, 20  $\mu\text{l}$ . Dle očekávání se zvýšila plocha píků.

## **3.4 Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenem**

### **3.4.1 Příprava roztoků**

#### Derivatizační roztok

K 94  $\mu$ l FDNB bylo přidáno 5 ml ACN a obsah zkumavky byl řádně promíchán.

#### Borátový pufr (asi 0,02 mol/l)

Navážka 0,7625 g dekahydrátu tetraboritanu sodného ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) byla rozpuštěna ve 100 ml vody, pH bylo upraveno na hodnotu 8,9 roztokem hydroxidu sodného (asi 10 mol/l).

#### Zásobní roztok gentamicinu v borátovém pufru (asi 1 mg/ml)

Navážka 10 mg GMC bylo rozpuštěna v 10 ml borátového pufru o koncentraci 0,02 mol/l.

### **3.4.2 Derivatizační krok**

Derivatizační reakce byla provedena smícháním 0,5 ml standardu GMC a 1,5 ml roztoku FDNB v ACN. Obsah zkumavky byl inkubován 45 minut při 100 °C. Po zchlazení na laboratorní teplotu byla směs přefiltrována do vialky skrz nylonový filtr o porozitě 0,22  $\mu$ m.

### **3.4.3 Chromatografická analýza**

#### **3.4.3.1 HPLC parametry**

Byla provedena analýza HPLC s UV detekcí s následujícími parametry. Jako stacionární fáze byla použita kolona Jupiter<sup>®</sup> 4  $\mu$ m Proteo 90 Å, 150 x 4,6 mm, mobilní fáze A (ACN) byla smíchána s mobilní fází B (0,1% kyselina mravenčí) v poměru 70:30 (v/v), průtok mobilní fáze byl udržován na hodnotě 1,2 ml/min. Termostat kolon byl nastaven na hodnotu 25 °C, vzorky byly v autosampleru chlazeny při teplotě 8 °C, na kolonu bylo dávkováno 10  $\mu$ l a deriváty byly monitorovány při 350 nm.

#### **3.4.3.2 Optimalizace**

Za nastavených podmínek nebyl GMC ani při změně poměru mobilních fází detekován, proto bylo od tohoto postupu ustoupeno.

## **3.5 Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci dansylchloridem**

### **3.5.1 Příprava roztoků**

#### Derivatizační roztok

Navážka 100 mg Dns-Cl byla rozpuštěna v 5 ml ACN.

#### Borátový pufr (asi 0,37 mol/l)

Navážka 14,1 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  byla rozpuštěna ve 100 ml vody, pH bylo upraveno na hodnotu 8,9 roztokem hydroxidu sodného (asi 10 mol/l).

#### Zásobní roztok gentamicinu (asi 1 mg/ml, asi 100 $\mu\text{g/ml}$ )

Navážka 10 mg GMC byla rozpuštěna v 10 ml borátového pufru o koncentraci 0,37 mol/l. Tento zásobní roztok GMC byl následně 10x naředěn borátovým pufrem.

#### Zásobní roztok tobramycinu (asi 1 mg/ml, asi 50 $\mu\text{g/ml}$ )

Navážka 5 mg TOB bylo rozpuštěno v 5 ml borátového pufru o koncentraci 0,37 mol/l. Tento zásobní roztok TOB byl následně 20x naředěn borátovým pufrem.

### **3.5.2 Derivatizační krok**

K 0,5 ml standardu GMC nebo TOB bylo přidáno 0,5 ml borátového pufru a 0,5 ml roztoku dansylchloridu v ACN. Směs byla inkubována 30 minut při 80 °C. Po inkubaci byl obsah zkumavky řádně promíchán na vortexu a po zchladnutí přidáno 200  $\mu\text{l}$  kyseliny octové k zastavení reakce. Obsah zkumavky byl odstředěn (15000  $\times$  g, 3 minuty, laboratorní teplota) a supernatant převeden do vialky.

### **3.5.3 Chromatografická analýza**

#### **3.5.3.1 HPLC parametry**

Byla provedena analýza HPLC s UV detekcí s následujícími parametry. Pro analýzu byla použita UPLC sestava ACQUITY H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA), pro separaci GMC a TOB byla použita kolona Atlantis dC18, 5 $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4,6 mm (Waters Corporation, Milford, MA, USA), mobilní fáze A byl ACN, mobilní fáze B 0,1% kyselina mravenčí, eluce byla isokratická. Průtok mobilní fáze byl udržován na hodnotě 1 ml/min. Teplota termostatu kolon byla nastavena na 25 °C, vzorky byly v autosampleru chlazeny při teplotě 8 °C a na kolonu bylo dávkováno 20  $\mu\text{l}$ . Deriváty GMC a TOB byly monitorovány při 330 nm.

### 3.5.3.2 Optimalizace

Při isokratickém módu, kdy mobilní fáze A a B byly smíchány v poměru 90:10 (v/v), došlo k dobrému rozdělení jednotlivých komponent GMC. Pro ověření správnosti přípravy vzorku před vlastní analýzou, především derivatizačního kroku, byly provedeny analýzy GMC o koncentracích 30, 60, a 100 µg/ml. Derivatizační krok byl proveden jiným postupem než v předchozím případě, a to smícháním 1 ml GMC o dané koncentraci s 1 ml dansylchloridu v ACN. Obsah zkumavky byl inkubován 30 minut při 80 °C, po zchladnutí bylo k směsi přidáno 200 µl kyseliny octové. Směs byla řádně promíchána na vortexu a přefiltrována do vialky skrz nylonový filtr o porozitě 0,22 µm.

## 3.6 Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem

### 3.6.1 Příprava roztoků

#### Derivatizační roztok

Navážka 3 mg FMOCl byl rozpuštěna v 10 ml ACN.

#### Borátový pufr (0,37 mol/l)

Příprava byla stejná, jak je uvedeno v kapitole 3. 5. 1

#### Zásobní roztok L-alaninu (asi 0,1 mol/l)

Navážka 89 mg L-alaninu byla rozpuštěna v 10 ml vody.

#### Zásobní roztok standardu komponent gentamicinu (asi 1 mg/ml)

Navážka 10 mg standardu komponent GMC byla rozpuštěna v 10 ml vody.

#### Roztok gentamicinu (asi 100 µg/ml)

Zásobní roztok standardu komponent GMC o koncentraci 1 mg/ml byl 10x naředěn směsí ACN a borátového pufru v poměru 1:1 (v/v).

#### Zásobní roztok tobramycinu (1 mg/ml)

Navážka 5 mg TOB byla rozpuštěna v 5 ml vody.

### **3.6.2 Derivatizační krok**

K 0,5 ml vzorku bylo přidáno 0,5 ml roztoku Fmoc-Cl v ACN. Směs byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla reakce zastavena přidáním 25  $\mu$ l roztoku L-alaninu.

### **3.6.3 Chromatografická analýza**

#### **3.6.3.1 HPLC parametry**

Pro analýzy byl použit systém ACQUITY UPLC<sup>®</sup> H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Pro separaci vzniklých derivátů byla použita kolona Jupiter<sup>®</sup> 4  $\mu$ m Proteo 90 Å, 150 x 4,6 mm, mobilní fáze A byl ACN, mobilní fáze B 0,1% kyselina mravenčí. Průtok mobilní fáze byl 1,2 ml/min, na kolonu bylo dávkováno 10  $\mu$ l vzorku, deriváty byly monitorovány při 260 nm, rychlost záznamu byla 5 p/s.

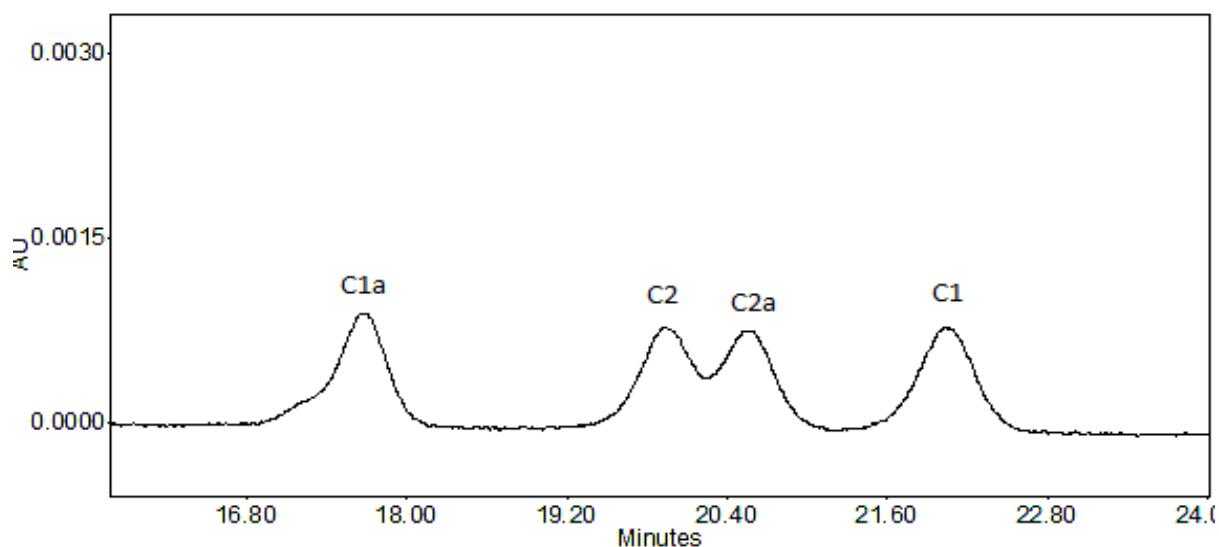
#### **3.6.3.2 Optimalizace**

Byly testovány různé poměry mobilních fází A a B, 90:10, 85:15 a 82:18 (v/v). Při poměru 90:10 (v/v) nedošlo k úplnému rozdělení jednotlivých komponent GMC, proto byl měněn poměr mobilních fází. Při poměru 85:15 (v/v) bylo rozdělení lepší, stále však deriváty komponent C2 a C2a nebyly dostatečně rozděleny, doba analýzy byla 30 minut. Při poměru 80:20 (v/v) nebyly deriváty komponent GMC detekovány, byly zadrženy na stacionární fázi, jelikož mobilní fáze obsahovala malé množství organické fáze. Isokratická eluce byla nevhodná pro separaci derivátů komponent GMC, proto byla testována eluce gradientová (tabulka 2).

Tabulka 2: Gradienty 1-3

Gradient 1
0-2 min: 80 % A
2-15 min: 80-90 % A (lineární gradient)
15-18 min: 95 % A
18-18,5 min: 95-80 % A (lineární gradient)
18,5-20 min: 80 % A
Gradient 2
0-2 min: 85 % A
2-15 min: 85-90 % A (lineární gradient)
15-18 min: 90 % A
18-18,5 min: 90-85 % A (lineární gradient)
18,5-20 min: 85 % A
Gradient 3
0-2 min: 85 % A
2-15 min: 85-88 % A (lineární gradient)
15-18 min: 88 % A
18-18,5 min: 88-85 % A (lineární gradient)
18,5-20 min: 85 % A

Jak bylo zjištěno z chromatografických záznamů, při použití všech 3 gradientových elucí (tabulka 2), nedošlo k rozdělení derivátů komponent C2 a C2a. Bylo vyzkoušeno zaměnit ACN za methanol, ale ani to nevedlo k dobrému rozdělení derivátů komponent GMC (výsledky neukázány). Z tohoto důvodu byla pro separaci derivátů komponent GMC zvolena jiná kolona, Waters Atlantis dC18, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Na této koloně se i při isokratické eluci (90:10, v/v) deriváty komponent GMC separovaly relativně dobře (obrázek 10).



Obrázek 10: Separace komponent gentamicinu na koloně Waters Atlantis dC18, 5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm, mobilní fázi byla směs acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí 90:10 (v/v)



### **3.7 Příprava standardů gentamicinu pro sestrojení kalibrační křivky**

I když byla metoda stanovení komponent GMC po derivatizaci FMOC-Cl optimalizována pro UV detekci, pro další analýzy byla použita detekce fluorescenční, protože je daleko citlivější.

#### **3.7.1 Příprava roztoků**

##### Standardy gentamicinu pro sestrojení kalibrační křivky

Standardy komponent GMC o koncentracích 0,5, 1, 5, 10, 50 a 100 µg/l byly připraveny ředěním zásobního roztoku komponent GMC o koncentraci 1 mg/ml (viz 3.6.1) na požadovanou koncentraci borátovým pufrem (viz 3.6.1).

##### Derivatizační roztok

Příprava viz kapitola 3.6.1

##### Zásobní roztok L-alaninu (asi 0,1 mol/l)

Příprava viz kapitola 3.6.1

#### **3.7.2 Derivatizační krok**

Postup je uveden v kapitole 3.6.2.

#### **3.7.3 Chromatografická analýza**

##### **3.7.3.1 HPLC parametry**

Pro separaci komponent GMC byla použita kolona Atlantis dC18, 5µm, 250 x 4,6 mm. Analýzy probíhaly na HPLC sestavě Shimadzu Prominence. Mobilní fáze A (ACN) a mobilní fáze B (0,1% kyselina mravenčí) byly smíchány v poměru 90:10 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min, na kolonu bylo dávkováno 10 µl vzorku. Termostat kolon byl nastaven na teplotu 25 °C a vzorky v autosampleru byly chlazeny při teplotě 8 °C. Deriváty komponent GMC byly monitorovány FLD ( $\lambda_{EX} = 260 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{EM} = 315 \text{ nm}$ ).

### **3.8 Porovnání derivatizace gentamicinu v borátovém pufru a v přítomnosti matrice nativní kyseliny hyaluronové 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem**

#### **3.8.1 Příprava roztoků**

##### Zásobní roztok nativní kyseliny hyaluronové (asi 1 mg/ml)

Navážka 200 mg nativní kyseliny hyaluronové (HA) byla rozpuštěna v 200 ml borátového pufru o koncentraci 0,37 mol/l.

##### Příprava roztoku gentamicinu v borátovém pufru (asi 20 µg/ml)

Navážka 2 mg standardu komponent GMC byla rozpuštěna v 100 ml borátového pufru o koncentraci 0,37 mol/l.

##### Příprava roztoku gentamicinu v matrici nativní kyseliny hyaluronové (asi 20 µg/ml)

Navážka 2 mg standardu komponent GMC byla rozpuštěna v 100 ml zásobního roztoku nativní HA.

##### Příprava tobramycinu v borátovém pufru (asi 200 µg/ml)

Navážka 2 mg TOB byla rozpuštěna v 10 ml borátového pufru o koncentraci 0,37 mol/l.

##### Příprava tobramycinu v matrici nativní kyseliny hyaluronové (asi 200 µg/ml)

Navážka 2 mg standardu TOB byla rozpuštěna v 10 ml zásobním roztoku nativní HA.

##### Borátový pufr (asi 0,37 mol/l)

viz kapitola 3.6.1

##### Derivatizační roztok

viz kapitola 3.6.1

##### Zásobní roztok L-alaninu (asi 0,1 mol/l)

viz kapitola 3.6.1

#### **3.8.2 Derivatizační krok**

K 0,5 ml GMC rozpuštěného v borátovém pufru bylo přidáno 20 µl zásobního roztoku TOB rozpuštěného v borátovém pufru a 0,5 ml roztoku FMOC-Cl v ACN nebo k 0,5 ml GMC

rozpuštěného v matrici nativní HA bylo přidáno 20 µl zásobního roztoku TOB rozpuštěného v matrici nativní HA a 0,5 ml roztoku FMOC-Cl v ACN.

Směs byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě a po inkubaci byla reakce ukončena přidáním 25 µl zásobního roztoku L-alaninu.

### **3.8.3 Chromatografická analýza**

#### **3.8.3.1 HPLC parametry**

Pro analýzy byl použit chromatografický systém Shimadzu Prominence s parametry nastavenými jako v kapitole 3.7.3.1.

## **3.9 Porovnání derivatizace gentamicinu v borátovém pufru a v přítomnosti matrice palmitoylhyaluronátu 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem**

### **3.9.1 Příprava roztoků**

Zásobní roztok palmitoylhyaluronátu (asi 1 mg/ml)

Navážka 50 mg palmitoylhyaluronátu byla rozpuštěna v 50 ml 50% isopropanolu.

Příprava roztoku gentamicinu v borátovém pufru (asi 20 µg/ml)

viz kapitola 3.8.1

Příprava roztoku gentamicinu v matrici palmitoylhyaluronátu (asi 20 µg/ml)

Navážka 1 mg GMC byla rozpuštěna v 50 ml roztoku palmitoylhyaluronátu.

Borátový pufr (asi 0,37 mol/l)

viz kapitola 3.5.1

Derivatizační roztok

viz kapitola 3.6.1

Zásobní roztok L-alaninu (asi 0,1 mol/l)

viz kapitola 3.6.1

### **3.9.2 Derivatizační krok**

K 0,5 ml GMC rozpuštěného v borátovém pufru bylo přidáno 0,5 ml borátového pufru a 0,5 ml roztoku FMOC-Cl v ACN nebo k 0,5 ml GMC rozpuštěného v matrici palmitoylhyaluronátu bylo přidáno 0,5 ml borátového pufru a 0,5 ml roztoku FMOC-Cl v ACN nebo 1 ml borátového pufru byl smíchán s 0,5 ml roztoku FMOC-Cl v ACN (slepý vzorek). Směs byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě a po inkubaci byla reakce ukončena přidáním 40  $\mu$ l zásobního roztoku L-alaninu.

### **3.9.3 Chromatografická analýza**

#### **3.9.3.1 HPLC parametry**

Deriváty byly analyzovány HPLC systémem Shimadzu Prominence s parametry nastavenými jako v kapitole 3. 7. 3. 1.

## **3.10 Optimalizace koncentrace 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridu v derivatizačním roztoku**

### **3.10.1 Příprava roztoků**

Zásobní roztok palmitoylhyaluronátu (asi 1 mg/ml)

viz kapitola 3.9.1

Zásobní roztok nativní kyseliny hyaluronové

viz kapitola 3.8.1

Roztok gentamicinu v borátovém pufru (asi 20  $\mu$ g/ml)

viz kapitola 3.8.1

Roztok gentamicinu v matrici nativní kyselině hyaluronové (asi 20  $\mu$ g/ml)

viz kapitola 3.8.1

Roztok gentamicinu v matrici palmitoylhyaluronátu (asi 20  $\mu$ g/ml)

viz kapitola 3.9.1

Borátový pufr (asi 0,37 mol/l)

viz kapitola 3.6.1

### Derivatizační roztok I

Navážka 3 mg FMOC-Cl byla rozpuštěna v 10 ml ACN.

### Derivatizační roztok II

Navážka 13 mg FMOC-Cl byla rozpuštěna v 10 ml ACN.

### Derivatizační roztok III

Navážka 26 mg FMOC-Cl byla rozpuštěna v 10 ml ACN.

### Zásobní roztok L-alaninu (asi 0,1 mol/l)

viz kapitola 3.6.1

## **3.10.2 Derivatizační krok**

K 0,5 ml vzorku GMC rozpuštěného buď v matrici palmitoylhyaluronátu, nativní HA nebo borátovém pufru bylo přidáno 0,5 ml borátového pufru a 0,5 ml derivatizačního roztoku I nebo II nebo III. Směs byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě a po inkubaci byla reakce ukončena přidáním 40 µl zásobního roztoku L-alaninu.

## **3.10.3 Chromatografická analýza**

### **3.10.3.1 HPLC parametry**

Deriváty GMC byly analyzovány HPLC systémem Shimadzu Prominence s parametry nastavenými jako v kapitole 3. 7. 3. 1.

## **3.11 Porovnání derivatizace gentamicinu v 50% isopropanolu a v přítomnosti matrice lauroylhyaluronátu 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem**

Přítomnost matrice má vliv na derivatizaci GMC FMOC-Cl, proto byla testována derivatizace GMC FMOC-Cl v matrici lauroylhyaluronátu.

### **3.11.1 Příprava roztoků**

#### Zásobní roztok lauroylhyaluronátu (asi 1 mg/ml)

Navážka 50 mg lauroylhyaluronátu byla rozpuštěna v 50 ml 50% isopropanolu.

Roztok gentamicinu v 50% isopropanolu, bez přítomnosti matrice (asi 20 µg/ml)

Navážka 2 mg standardu komponent GMC byla rozpuštěna ve 100 ml 50% isopropanolu.

Roztok gentamicinu v matrici lauroylhyaluronátu (asi 20 µg/ml)

Navážka 1 mg standardu komponent GMC byla rozpuštěna v 50 ml zásobního roztoku lauroylhyaluronátu.

Borátový pufr (asi 0,37 mol/l)

viz kapitola 3.6.1

Derivatizační roztok II

viz kapitola 3.10.1

Zásobní roztok L-alaninu (asi 0,1 mol/l)

viz kapitola 3.6.1

### **3.11.2 Derivatizační krok**

K 0,5 ml GMC v 50% isopropanolu nebo GMC v matrici lauroylhyaluronátu bylo přidáno 0,5 ml borátového pufru, 0,5 ml ACN a 0,5 ml derivatizačního činidla II, případně k 0,5 ml 50% isopropanolu nebo 0,5 ml lauroylhyaluronátu bylo přidáno 0,5 ml borátového pufru, 0,5 ml ACN a 0,5 ml derivatizačního činidla II (slepé vzorky). Směs byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě a po inkubaci byla reakce ukončena přidáním 50 µl zásobního roztoku L-alaninu.

### **3.11.3 Chromatografická analýza**

#### **3.11.3.1 HPLC parametry**

Deriváty GMC byly analyzovány HPLC systémem Shimadzu Prominence s parametry nastavenými jako v kapitole 3. 7. 3. 1.

#### **3.11.4 Optimalizace objemu borátového pufru v reakční směsi**

Byly testovány celkem 3 objemy, 500, 250 a 100 µl.

#### **3.11.5 Optimalizace podmínek při derivatizačním kroku**

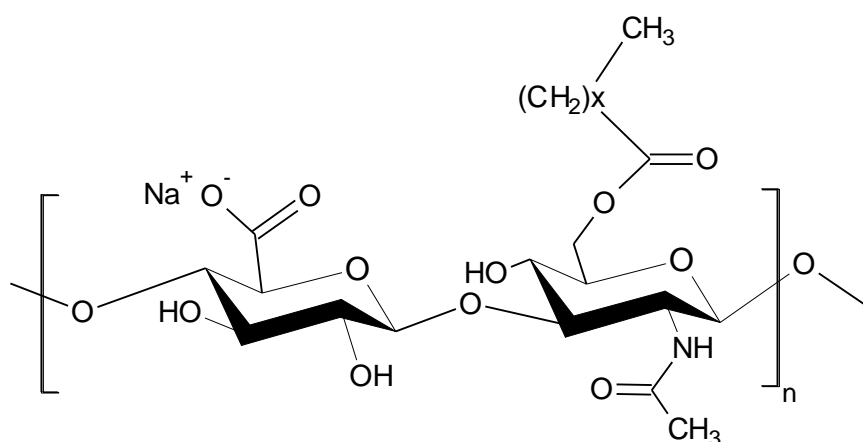
V první řadě byla prodloužena doba inkubace z 15 minut na 1 hodinu. Místo 0,5 ml borátového pufru bylo přidáváno pouze 0,1 ml, a reakce byla zastavena přidáním 50 µl roztoku L-alaninu.

Hodinová inkubace probíhala při třech různých podmínkách, při 37 °C, při laboratorní teplotě s třepáním na třepačce, a při laboratorní teplotě bez třepání.

### 3.12 Příprava reálných vzorků

Pro ověření vlivu matrice na proces derivatizace komponent GMC s FMOCl byly připraveny reálné vzorky. V těchto vzorcích byly stanovovány hladiny GMC. Reálnými vzorky byly tenké filmy hyaluronanu s přídavkem GMC, 0,5; 0,25; 0,1 hm%.

#### 3.12.1 Příprava zásobních roztoků



Obrázek 11: Hyaluronát s navázanou mastnou kyselinou  $x$ . Je zobrazeno, jak vypadají deriváty HA. Deriváty HA jsou tvořeny tak, že je na řetězec polysacharidu (HA) navázána mastná kyselina esterickou vazbou. Lauroylhyaluronát (a) a (b) se liší ve stupni substituce HA, tedy hodnotou  $n$

#### Zásobní roztok lauroylhyaluronátu (a), asi 10 mg/ml

Navážka lauroylhyaluronátu (a) byla rozpuštěna v 30% vodném isopropanolu za neustálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 18 hodin.

#### Zásobní roztok lauroylhyaluronátu (b), asi 10 mg/ml

Navážka lauroylhyaluronátu (b) byla rozpuštěna v 30% vodném isopropanolu za neustálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 18 hodin.

#### Zásobní roztok nativní kyseliny hyaluronové

Navážka HA byla rozpuštěna v 30% vodném isopropanolu za neustálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 18 hodin.

#### Zásobní roztok gentamicinu (asi 1 mg/ml)

Navážka 25 mg GMC byla rozpuštěna v 25 ml 30% isopropanolu.

### **3.12.2 Příprava tenkých filmů s obsahem gentamicinu**

K zásobním roztokům lauroylhyaluronátu (a), lauroylhyaluronátu (b) a HA bylo přidáno množství zásobního roztoku GMC odpovídající 0,5 hm%, 0,25 hm% nebo 0,1 hm%. Po smíchání polymeru s GMC byl roztok nalit do speciální cely, v které vznikl tenký film. Podrobné informace o přípravě filmů z HA a lauroylhyaluronátu jsou popsány v článku Chmelař a kol. [75].

## **3.13 Analýza reálných vzorků metodou HPLC s hmotnostní detekcí**

### **3.13.1 Příprava roztoků a vzorků**

Příprava reálných vzorků je popsána v kapitole 3. 12. Všechny reálné vzorky s obsahem komponent GMC byly naváženy v triplikátu. Navážky vzorků filmů lauroylhyaluronátu (a) a (b) byly rozpuštěny v 10% methanolu tak, aby koncentrace byla 1 mg/ml. Když byly reálné vzorky rozpuštěny v isopropanolu, nebyly komponenty GMC dobře separovány, jelikož solvent (isopropanol) měl větší eluční sílu než mobilní fáze. Filmy nativní HA byly rozpuštěny ve vodě. Všechny směsi byly míchány po dobu 3 hodin při laboratorní teplotě. Směs byla pipetována do vialek v objemu 1 ml a bylo přidáno 100  $\mu$ l vnitřního standardu (TOB) o koncentraci 10  $\mu$ g/ml.

#### Zásobní roztok TFA (asi 50 mmol/l)

Objem 3,8 ml TFA byl doplněn vodou na objem 1 l.

#### Zásobní roztok vnitřního standardu tobramycinu (asi 1 mg/ml, asi 100 $\mu$ g/ml, asi 10 $\mu$ g/ml)

Navážka 5 mg TOB byla rozpuštěna v 5 ml vody. Ředěním vodou byly připraveny roztoky o koncentraci 100 a 10  $\mu$ g/ml.

#### Zásobní roztok gentamicinu (100 $\mu$ g/ml)

Navážka 5 mg standardu komponent GMC byla rozpuštěna v 5 ml vody. Získaný roztok o koncentraci 1 mg/ml byl 10x naředěn.



### **3.13.2 Chromatografická analýza**

#### **3.13.2.1 HPLC parametry**

Připravené reálné vzorky byly analyzovány na kapalinovém chromatografu Waters Acquity UPLC<sup>®</sup> H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA) spojeném s hmotnostním detektorem ACQUITY<sup>®</sup> QDa<sup>®</sup> (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Separace probíhala na koloně Jupiter<sup>®</sup> 4  $\mu\text{m}$  Proteo 90 Å, 150 x 4,6 mm. Mobilní fáze A (50mmol/l TFA) a B (methanol) byly smíchány v poměru 90:10 (v/v). Promývacím roztokem pro oplach dávkovací jehly byl 30% isopropanol. Průtok mobilní fáze byl 0,8 ml/min. Termostat kolon byl nastaven na teplotu 25 °C, vzorky byly v autosampleru chlazeny při 8 °C. Nastavení MS detektoru Acquity QDa bylo následující: pozitivní mód ionizace s napětím 0,8 kV, SIM mód, hodnoty m/z byly stejné jako v tabulce 1.

#### **3.13.2.2 Příprava standardů pro sestrojení kalibrační křivky**

Pro kvantifikaci GMC v reálných vzorcích byla použita metoda kalibrační křivky. Byly připraveny standardy GMC o koncentraci 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### **3.14 Stanovení gentamicinu v reálných vzorcích po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem**

#### **3.14.1 Příprava roztoků a vzorků**

Připravené vzorky filmů lauroylhyaluronátu (a) i (b) byly rozpuštěny v 10% methanolu a vzorky filmů s nativní HA ve vodě, vše na výslednou koncentraci 1 mg/ml.

##### Zásobní roztok gentamicinu (asi 100 $\mu\text{g/ml}$ )

Navážka 5 mg standardu komponent GMC byla rozpuštěna v 50 ml vody. Tento zásobní roztok byl následně ředěn roztokem nativní HA nebo lauroylhyaluronátu (a) nebo (b) k přípravě standardů pro sestrojení kalibrační křivky 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

##### Roztok vnitřního standardu tobramycinu (asi 1 mg/ml, asi 100 $\mu\text{g/ml}$ )

Navážka 5 mg TOB byla rozpuštěna v 5 ml vody. Tento roztok byl 10x naředěn vodou.

##### Borátový pufr (asi 0,37 mol/l)

viz kapitola 3.6.1

## Derivatizační činidlo II

viz kapitola 3.10.1

## Zásobní roztok L-alaninu (asi 100 µg/ml)

viz kapitola 3.6.1

### **3.14.2 Derivatizační krok**

K 0,5 ml standardu (s matricí nativní HA nebo lauroylhyaluronátu) nebo reálného vzorku bylo přidáno 0,5 ml ACN, 0,1 ml borátového pufru, 0,1 ml vnitřního standardu TOB (100 µg/ml) a 0,5 ml derivatizačního činidla II. Směs byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě a reakce ukončena přidáním 50 µl zásobního roztoku L-alaninu. Všechna měření byla provedena v triplicátu.

### **3.14.3 Chromatografická analýza**

#### **3.14.3.1 HPLC parametry**

Pro analýzu byl použit HPLC systém ACQUITY UPLC<sup>®</sup> H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Pro separaci vzniklých derivátů byla použita kolona Atlantis dC18, 5µm, 250 x 4,6 mm. Mobilní fáze A (ACN) byla smíchána s mobilní fází B (0,1% kyselina mravenčí) v poměru 90:10 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min, na kolonu bylo dávkováno 10 µl vzorku. Deriváty byly monitorovány při 260 nm, rychlost záznamu byla 5 p/s.

### **3.15 Zpracování výsledků**

Pro vyhodnocení chromatogramů byl použit licencovaný software Empower 3 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) nebo LCSolution (Shimadzu Corporation, Kjóto, Japonsko). Pro zpracování a vyhodnocení naměřených dat byl použit program MS Excel.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Stanovení gentamicinu metodou HPLC s hmotnostní detekcí

Byly optimalizovány podmínky pro metodu HPLC s MS detekcí (viz kapitola 3.2). Následně byla proměřena kalibrační řada s rychlostí záznamu 1 a 2 p/s. Výsledné parametry kalibračních křivek jednotlivých komponent GMC, včetně porovnání výsledků u obou záznamových rychlostí, jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, porovnání rychlostí záznamu

komponenta	rychlost záznamu	směrnice (k)	intercept (q)	korelační koeficient (R <sup>2</sup> )
<b>GMC C1a</b>	1 p/s	0,0236	0,0283	0,9969
	2 p/s	0,0244	0,0018	0,9999
<b>GMC C2</b>	1 p/s	0,0219	0,0327	0,9935
	2 p/s	0,0229	-0,0223	0,9963
<b>GMC C2a</b>	1 p/s	0,0205	0,0099	0,9978
	2 p/s	0,0204	-0,0030	0,9995
<b>GMC C1</b>	1 p/s	0,0608	0,1369	0,9897
	2 p/s	0,0600	0,0990	0,9951

Jak je z tabulky 3 patrné, při záznamové rychlosti 2 p/s byly získány o něco lepší regresní koeficienty.

### 4.2 Stanovení gentamicinu metodou HPLC s ELSD

Byly optimalizovány podmínky pro metodu HPLC s ELS detekcí (viz kapitola 3.3). Po provedení optimalizace ELSD byla proměřena kalibrační řada pro každou z GMC komponent. Parametry kalibračních křivek jednotlivých komponent GMC jsou uvedeny v tabulce 4.

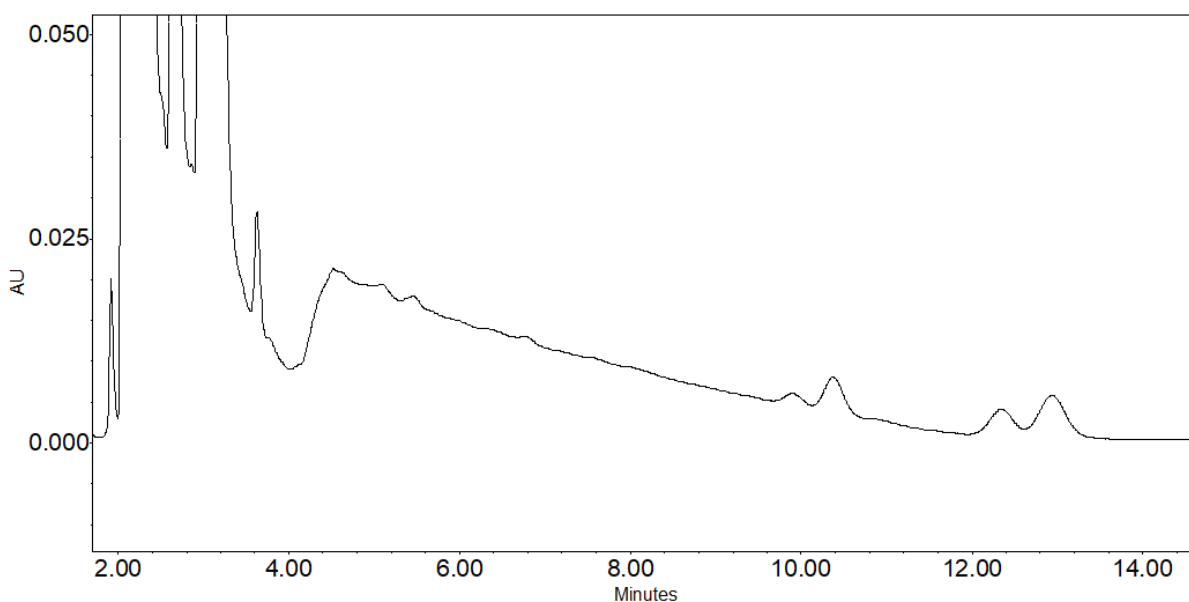
Tabulka 4: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu metodou HPLC s ELSD

komponenta	směrnice (k)	intercept (q)	korelační koeficient (R <sup>2</sup> )
<b>GMC C1a</b>	1,2344	-0,3494	0,9777
<b>GMC C2</b>	1,3514	-1,1542	0,9974
<b>GMC C2a</b>	1,5628	-1,527	0,9919
<b>GMC C1</b>	1,1641	-0,5424	0,971

Z tabulky 4 je patrné, že metoda HPLC s ELSD poskytovala dobrou linearitu, ale od jejího dalšího použití i tak bylo upuštěno a byla dána přednost HPLC metodám s derivatizací GMC.

### 4.3 Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenem

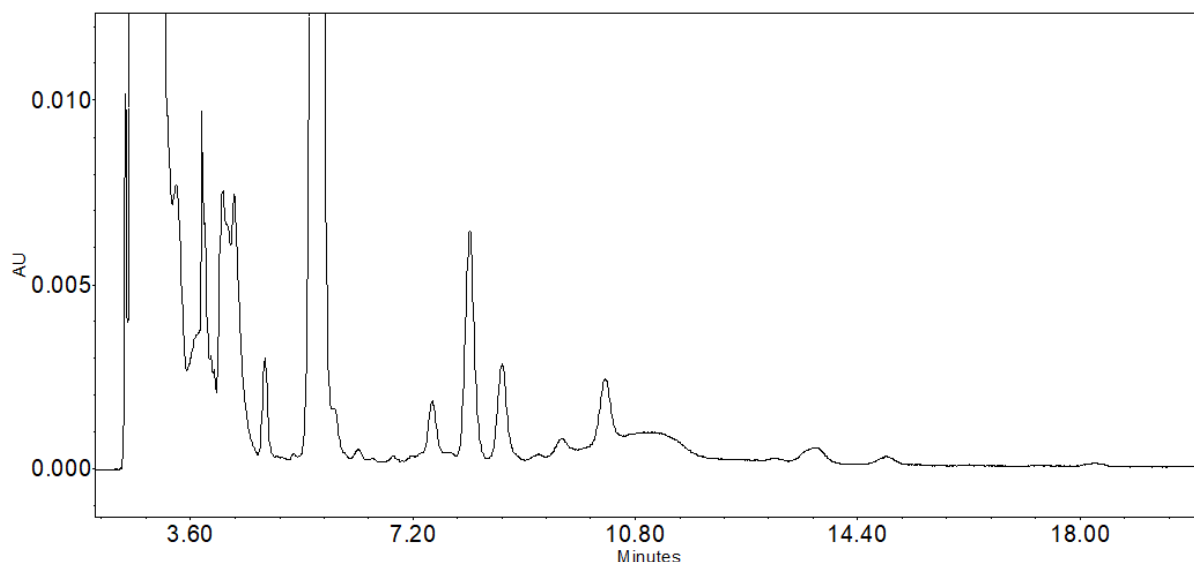
Derivatizační krok byl proveden podle Tsujihho a kol. [70], ale byl zjednodušen, tudíž je velmi pravděpodobné, že reakce neproběhla tak, jak měla. Jak lze vidět na obrázku 12, derivatizace FDNB se neosvědčila, proto bylo rozhodnuto, že nadále budou používána jiná derivatizační činidla, jelikož tato derivatizační metoda je časově náročná a vyžaduje složitější podmínky reakce, jako jsou vysoká teplota a tma.



Obrázek 12: Chromatografický záznam stanovení komponent gentamicinu po derivatizaci 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenem. HPLC parametry jsou uvedeny v kapitole 3.4.3.1.

### 4.4 Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci dansylchloridem

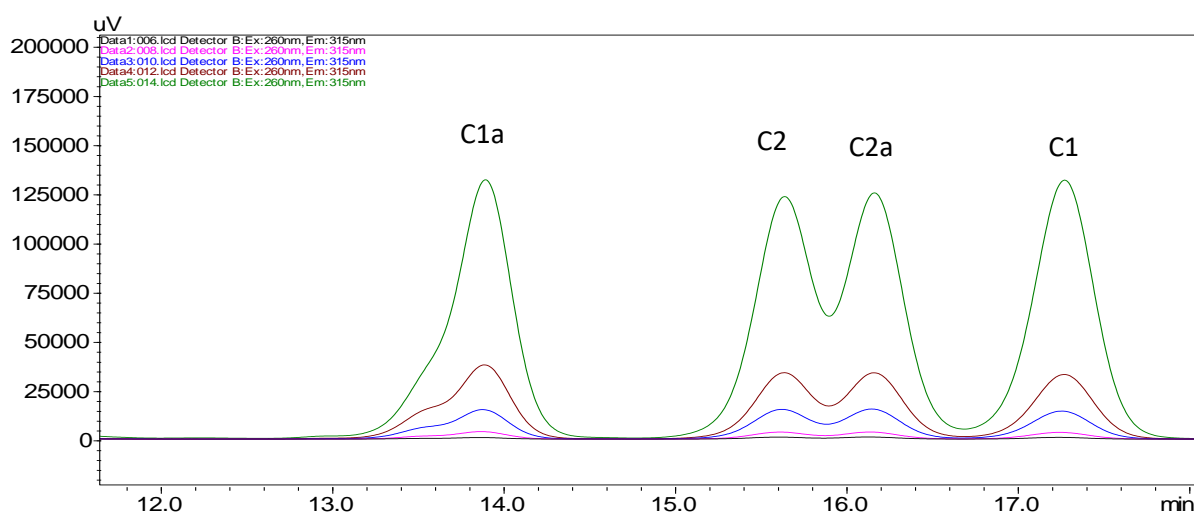
Komponenty GMC se separovaly relativně dobře, ovšem na chromatografickém záznamu byly zaznamenány další neidentifikovatelné píky, snad vedlejší produkty derivatizace (viz obrázek 13). Derivatizační krok byl proveden stejně jako v metodě čínských autorů [76]. Ti se ale věnovali stanovení neuroaktivních aminokyselin v biologických vzorcích, tudíž je možné, že tento derivatizační postup nebyl vhodný právě pro stanovování aminoglykosidových antibiotik, nebo by byla nutná další optimalizace. Také derivatizace dansylchloridem je časově náročná, a proto bylo od tohoto postupu ustoupeno.



Obrázek 13: Chromatografický záznam stanovení složek gentamicinu po derivatizaci dansylchloridem. HPLC parametry jsou uvedeny v kapitole 3.5.3.1.

#### 4.5 Stanovení gentamicinu po předchozí derivatizaci 9-fluorenylmetoxykarbonylchloridem

Postup této derivatizace byl inspirován publikací indických autorů, kteří stanovovali amikacin v lidském séru [63]. Nejprve bylo nutné optimalizovat metodu HPLC s UV detekcí (viz kapitola 3.6). Poté, co nebylo možné separovat deriváty složek GMC ani gradientovou elucí, bylo rozhodnuto použít jinou kolonu (Atlantis dC18, 5 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm od firmy Waters), která se osvědčila. V dalším kroku byla zvolena FLD, která je citlivější.



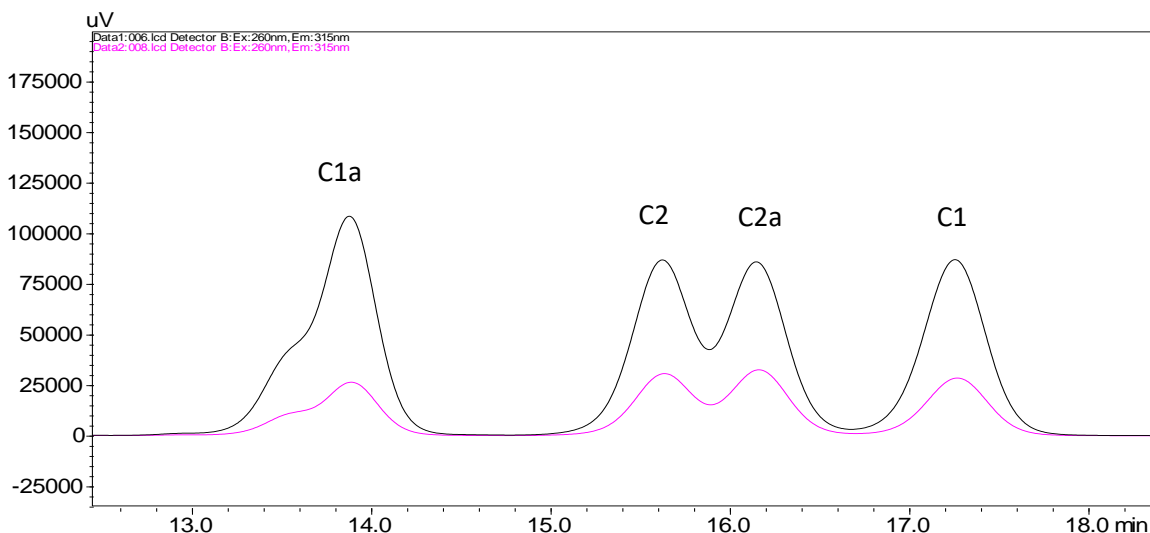
Obrázek 14: Chromatografické záznamy stanovení standardů složek gentamicinu po derivatizaci 9-fluorenylmetoxykarbonylchloridem. HPLC parametry jsou uvedeny v kapitole 3.7.3.1.

V tabulce 5 jsou uvedeny parametry kalibračních křivek jednotlivých komponent GMC.

Tabulka 5: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem metodou HPLC s fluorescenční detekcí

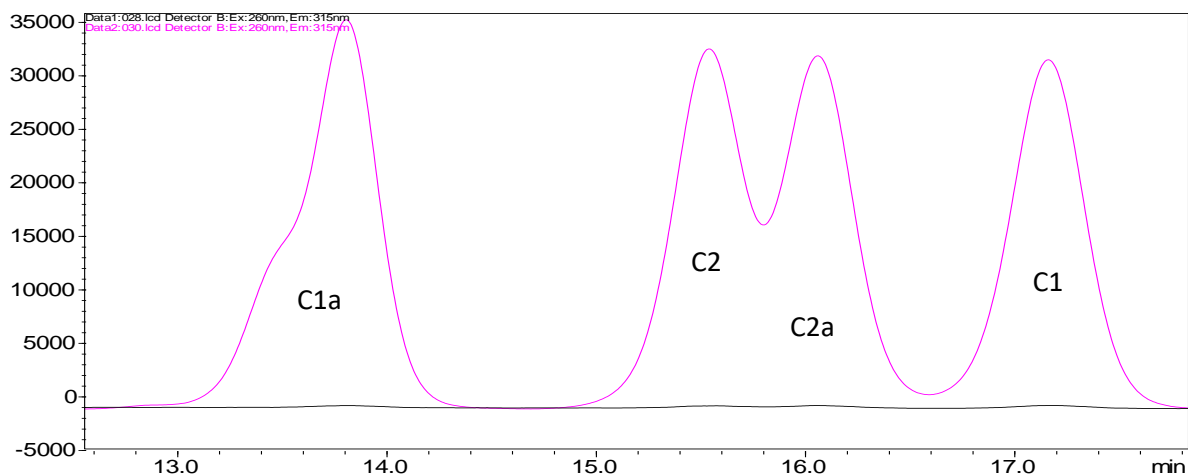
komponenta	směrnice (k)	intercept (q)	korelační koeficient ( $R^2$ )
<b>GMC C1a</b>	69113	114150	0,988
<b>GMC C2</b>	59559	74162	0,9946
<b>GMC C2a</b>	59991	69147	0,9955
<b>GMC C1</b>	67729	46542	0,9975

Na obrázku 15 jsou zobrazeny chromatografické záznamy stanovení komponent GMC, kdy derivatizace FMOC-Cl byla provedena v přítomnosti nativní HA (růžový záznam) a borátového pufru (černý záznam). Z obrázku je zřejmé, že přítomnost nativní HA významně ovlivňuje derivatizaci komponent GMC FMOC-Cl.



Obrázek 15: Chromatografické záznamy stanovení komponent gentamicinu po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Růžový záznam – derivatizace v přítomnosti nativní kyseliny hyaluronové, černý záznam – derivatizace v borátovém pufru. HPLC parametry jsou uvedeny v kapitole 3.7.3.1.

Na obrázku 16 jsou zobrazeny chromatografické záznamy stanovení komponent GMC, kdy derivatizace FMOC-Cl byla provedena v přítomnosti palmitoylhyaluronátu (růžový záznam) a borátového pufru (černý záznam). Pro derivatizaci bylo použito derivatizační činidlo II o koncentraci 5 mmol/l (viz kapitola 3.10.1). HPLC podmínky jsou popsány v kapitole 3.7.3.



Obrázek 16: Chromatografické záznamy stanovení komponent gentamicinu po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Růžový záznam – derivatizace v přítomnosti palmitoylhyaluronátu, černý záznam – derivatizace v borátovém pufru. HPLC parametry jsou uvedeny v kapitole 3.7.3.1.

Komponenty GMC rozpuštěné v borátovém pufru nebylo možné detekovat. Problémem je zřejmě velký nadbytek borátového pufru v reakční směsi. Z tohoto důvodu byla provedena optimalizace koncentrace borátového pufru i FMOC-Cl (viz kapitola 3.10).

Po optimalizaci koncentrace derivatizačního činidla FMOC-Cl bylo zjištěno, že optimální koncentrace je 5 mmol/l. Pro následující analýzy byl pro derivatizaci používán FMOC-Cl o koncentraci 5 mmol/l.

Jelikož bylo zjištěno, že přítomnost matrice má vliv na stanovení komponent GMC, byly testovány další postupy derivatizace, tentokrát v přítomnosti lauroylhyaluronátu (viz kapitola 3.11). Objem pufru použitého při derivatizaci byl optimalizován (viz kapitola 3.11.4).

Když byla provedena derivatizace s použitím borátového pufru o objemu 500  $\mu$ l, došlo k částečnému vysrážení vzorku. Bylo zjištěno, že s použitím 100  $\mu$ l borátového pufru v reakční směsi bylo dosaženo nejlepších výsledků derivatizace komponent GMC FMOC-Cl ve vzorcích rozpuštěných jak v isopropanolu, tak také v lauroylhyaluronátu.

Stále ale nebyl vyřešen problém velkých rozdílů koncentrací při stanovení komponent GMC rozpuštěného v isopropanolu a lauroylhyaluronátu (matrici). Proto byly dále optimalizovány podmínky derivatizace (viz kapitola 3.11.5).

Vyhodnocením výsledků bylo zjištěno, že prodloužením reakční doby nedošlo ke zlepšení, naopak při hodinové inkubaci bylo ve všech případech detekováno mnohem menší množství

komponent GMC než po patnáctiminutové inkubaci, z toho lze tudíž usuzovat, že delší doba inkubace mohla způsobit částečnou degradaci vznikajících produktů.

## 4.6 Reálné vzorky

### 4.6.1 Stanovení gentamicinu v reálných vzorcích metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí

Vzorky připravených tenkých filmů byly analyzovány metodou HPLC s MS detekcí (viz kapitola 3.13.2). Pro kvantifikaci a vyhodnocení opakovatelnosti metody byla připravena kalibrační řada v triplikátu. Parametry kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu metodou HPLC s hmotnostní detekcí

komponenta	kalibrace č.	směrnice (k)	intercept (q)	korelační koeficient R <sup>2</sup>
<b>GMC C1a</b>	1	0,2511	-0,1127	0,9905
	2	0,3174	-0,0960	0,996
	3	0,4236	-0,2194	0,9976
<b>GMC C2</b>	1	0,2418	-0,1197	0,9784
	2	0,2821	0,0258	0,9893
	3	0,4468	-0,2508	0,9973
<b>GMC C2a</b>	1	0,1822	-0,0892	0,9888
	2	0,2223	-0,0194	0,9972
	3	0,3568	-0,2298	0,9959
<b>GMC C1</b>	1	0,7848	-0,3509	0,9935
	2	0,9505	0,0336	0,9959
	3	1,5353	-0,7442	0,9977

Z tabulky 6 je patrné, že linearita metody HPLC-MS je přijatelná.

U každé z komponent GMC byla vypočtena průměrná hodnota hmotnostního procenta GMC. Následně byla vypočtena směrodatná odchylka, relativní směrodatná odchylka a výtěžnost hodnot získaných z 3 různých kalibrací pro zhodnocení opakovatelnosti metody (tabulka 7).



Tabulka 7: Hmotnostní procento gentamicinu v reálných vzorcích určené metodou HPLC s hmotnostní detekcí

Vzorek	Ø hm% GMC	SD (hm %)	RSD (%)
SH (0,5 hm% GMC)	0,56	± 0,03	5,3
SH (0,25 hm% GMC)	0,27	± 0,06	22,4
SH (0,1 hm% GMC)	0,12	± 0,03	21,8
LAU (a) (0,5 hm% GMC)	0,52	± 0,09	18,2
LAU (b) (0,5 hm% GMC)	0,68	± 0,04	6,2
LAU (b) (0,25 hm% GMC)	0,33	± 0,04	12,8
LAU (b) (0,1 hm% GMC)	0,13	± 0,03	21,7

*SH* = vzorek nativní kyseliny hyaluronové, *LAU (a)* = vzorek lauroylhyaluronátu (a), *LAU (b)* = vzorek lauroylhyaluronátu (b), *GMC* = gentamicin, *SD* = směrodatná odchylka, *RSD* = relativní směrodatná odchylka

Pro ověření správnosti metody HPLC-MS byla použita metoda standardního přidavku k 1 vzorku nativní HA a k 1 vzorku lauroylhyaluronátu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Správnost metody HPLC s hmotnostní detekcí metodou standardních přidavků

	Ø množství GMC [µg/ml]	výtěžnost [%]
SH + voda	5,88	
SH + GMC 2 µg/ml (teoretická hodnota)	7,88	
SH + GMC 2 µg/ml (nalezená hodnota)	11,73	148,9
LAU + voda	7,32	
LAU + GMC 2 µg/ml (teoretická hodnota)	9,32	
LAU + GMC 2 µg/ml (nalezená hodnota)	12,75	136,8

*GMC 2 µg/ml* = standardní přídavek gentamicinu, *LAU* = vzorek lauroylhyaluronátu, *SH* = vzorek nativní kyseliny hyaluronové

Jak ukazují výsledky z tabulky 8, je výtěžnost metody daleko vyšší než 100 %. I když byla kalibrace připravena ve stejné matici (derivát HA), v které byl připraven i vzorek, píky jednotlivých komponent GMC ve vzorku měly větší plochu než v kalibračních roztocích. To mohlo být způsobeno nějakou neidentifikovanou nečistotou, která se dostala do vzorku filmu během jeho přípravy a která podporuje ionizaci GMC v iontovém zdroji.

#### 4.6.2 Stanovení gentamicinu v reálných vzorcích metodou vysokoučinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem

Jelikož se metoda HPLC s hmotnostní detekcí pro stanovení GMC v reálných vzorcích neosvědčila, bylo nutné přejít na metodu HPLC s FLD, kdy je GMC derivatizován FMOOC. Příprava reálných vzorků a standardů před HPLC analýzou je popsána v kapitole 3.14.2. Byly připraveny dvě kalibrační řady, jedna s maticí nativní HA, která byla použita pro kvantifikaci hladin GMC ve vzorcích nativní HA, druhá s maticí lauroylhyaluronátu, která byla použita pro kvantifikaci hladin GMC ve vzorcích lauroylhyaluronátu (a) a (b). Parametry kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulkách 9 a 10.

Tabulka 9: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu ve vzorcích nativní kyseliny hyaluronové metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem

	kalibrace č.	směrnice (k)	intercept (q)	korelační koeficient (R <sup>2</sup> )
<b>GMC C1a</b>	1	0,0182	-0,0023	0,9984
	2	0,0205	-0,0070	0,9949
	3	0,0157	0,0021	0,9913
<b>GMC C2</b>	1	0,0119	0,0005	0,9964
	2	0,0135	-0,0023	0,9913
	3	0,0107	0,0002	0,9967
<b>GMC C2a</b>	1	0,0118	-0,0032	0,9968
	2	0,0134	-0,0047	0,9952
	3	0,0105	-0,0029	0,9968
<b>GMC C1</b>	1	0,0128	0,0018	0,9974
	2	0,0149	-0,0020	0,9892
	3	0,0117	-0,0002	0,9952

Tabulka 10: Parametry kalibračních křivek pro stanovení komponent gentamicinu ve vzorcích lauroylhyaluronátu (a) a (b) metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem

	kalibrace č.	směrnice (k)	intercept (q)	korelační koeficient (R <sup>2</sup> )
<b>GMC C1a</b>	1	0,0180	0,0046	0,9977
	2	0,0178	-0,0002	0,9959
	3	0,0137	0,0072	0,9845
<b>GMC C2</b>	1	0,0112	0,0086	0,9943
	2	0,0114	0,0037	0,9963
	3	0,0092	0,0057	0,9940
<b>GMC C2a</b>	1	0,0107	0,0076	0,9919
	2	0,0113	0,0011	0,9966
	3	0,0087	0,0050	0,9907
<b>GMC C1</b>	1	0,0120	0,0110	0,9931
	2	0,0123	0,0046	0,9980
	3	0,0101	0,0043	0,9921

V tabulce 11 jsou uvedeny hladiny GMC v reálných vzorcích.

Tabulka 11: Hmotnostní procento gentamicinu v reálných vzorcích určené metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem

Vzorek	Ø hm% GMC	SD (hm%)	RSD (%)
<b>SH 0,5 hm% GMC</b>	0,38 hm% GMC	± 0,03	7,6
<b>SH 0,25 hm% GMC</b>	0,22 hm% GMC	± 0,03	11,5
<b>SH 0,1 hm% GMC</b>	0,10 hm% GMC	± 0,03	28,7
<b>LAU (a) 0,5 hm% GMC</b>	0,44 hm% GMC	± 0,01	2,7
<b>LAU (b) 0,5 hm% GMC</b>	0,43 hm% GMC	± 0,02	5,7
<b>LAU (b) 0,25 hm% GMC</b>	0,21 hm% GMC	± 0,06	27,3
<b>LAU (b) 0,1 hm% GMC</b>	0,05 hm% GMC	± 0,01	21,6

**GMC** = gentamicin, **LAU (a)** = vzorek lauroylhyaluronátu (a), **LAU (b)** = vzorek lauroylhyaluronátu (b), **RSD** = relativní směrodatná odchylka, **SD** = směrodatná odchylka

Pro ověření správnosti metody HPLC s FLD byla použita metoda standardního přídávku (1 vzorek nativní HA a 1 vzorek lauroylhyaluronátu).

Ke 400 µl vzorku o koncentraci 1 mg/ml bylo přidáno 100 µl vody (nultý přídavek), respektive 100 µl standardu o dané koncentraci (standardní přídavek), 0,5 ml FMOC-Cl, 0,5 ml ACN, 0,1 ml borátového pufru a 0,1 ml vnitřního standardu. Po smíchání byla směs inkubována při laboratorní teplotě po dobu 15 minut a reakce byly zastaveny přidáním 40 µl zásobního roztoku L-alaninu. Výsledky správnosti metody provedenou metodou standardních přídávků jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Správnost metody HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem provedená metodou standardních přídávků

	Ø množství GMC [µg/ml]	výtěžnost [%]
<b>SH + voda</b>	4,13	
<b>SH + GMC 2 µg/ml (teoretický přídavek)</b>	6,13	
<b>SH + GMC 2 µg/ml (nalezený přídavek)</b>	6,84	111,6
<b>LAU + voda</b>	3,67	
<b>LAU + GMC 2 µg/ml (teoretický přídavek)</b>	5,67	
<b>LAU + GMC 2 µg/ml (nalezený přídavek)</b>	6,61	116,4

*GMC 2 µg/ml* = standardní přídavek gentamicinu, *LAU* = vzorek lauroylhyaluronátu, *SH* = vzorek nativní kyseliny hyaluronové

Výsledky ukazují, že linearita metody pro stanovení komponent GMC v reálných vzorcích je přijatelná, také správnost, určená metodou standardních přídávků, je v porovnání s metodou HPLC-MS daleko lepší a že matrice nemá takový vliv na stanovení GMC jako v případě metody HPLC-MS.

## 5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu kapalinové chromatografie pro stanovení gentamicinu ve vzorcích tenkých filmů kyseliny hyaluronové a jejích hydrofobních derivátů.

Byla popsána příprava reálných vzorků tenkých filmů hyaluronanu, do kterých bylo přidáno určité množství gentamicinu, a následně v nich provedena jeho kvantifikace. Cílem bylo ověřit, zda jsou vybrané metody vhodné pro stanovení gentamicinu ve vodných vzorcích, ale také v polysacharidové matrici. Bylo zjištěno, že přítomnost polysacharidové matrice má na stanovení gentamicinu velký vliv, především u metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Také metoda kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, kdy byl gentamicin derivatizován 9-fluorenylmethoxykarbonylchloridem, není zcela vhodná pro stanovení gentamicinu ve vzorcích s matricí kyseliny hyaluronové, přesto výsledky analytických parametrů byly v porovnání s metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí daleko lepší. Proto by bylo vhodné tuto metodu dále optimalizovat a validovat tak, aby byla použitelná pro stanovení složek gentamicinu ve vzorcích obsahujících kyselinu hyaluronovou a její deriváty, jež se používají například ve tkáňovém inženýrství či v chirurgii.

## SEZNAM LITERATURY

- [1] CLAROT, I, P CHAIMBAULT, F HASDENTEUFEL, P NETTER a A NICOLAS. Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1031**(1-2), 281-287 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.12.032. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967303023252>
- [2] Gentamicin. *PubChem* [online]. MD, USA: National Center for Biotechnology Information, b. r. [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/3087>
- [3] BABJUK, Jaroslav, František PERLÍK a Zdeněk ŠÍDLO. *Bioanalytika léků*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1990. ISBN 80-201-0083-0.
- [4] BENEŠ, Jiří. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018. ISBN 978-80-271-0636-3.
- [5] KOTRA, Lakshmi P., Jalal HADDAD a Shahriar MOBASHERY. Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2000, **44**(12), 3249-3256 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1128/AAC.44.12.3249-3256.2000. ISSN 1098-6596. Dostupné z: <https://AAC.asm.org/content/44/12/3249>
- [6] TREJBALOVÁ, Margita a Erich TREJBAL. *Aktuálně farmakoterapeutiká II: Antibiotiká a chemoterapeutiká*. 1. vyd. Martin: Osveta, n.p., 1988. ISBN (vaz.):.
- [7] HEJZLAR, Miroslav. *Antibiotika v praxi*. 2. přeprac. a rozš. vyd., (1. v nakl. Makropulos). Praha: Makropulos, 1995. Galén. ISBN 80-901776-4-6.
- [8] AHMED, Rebekah, Imelda HANNIGAN, Hamish MACDOUGALL, Raymond CHAN a G HALMAGYI. Gentamicin ototoxicity: a 23-year selected case series of 103 patients. *Medical Journal of Australia* [online]. 2012, **196**(11), 701-704 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.5694/mja11.10850. ISSN 0025-729X. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5694/mja11.10850>
- [9] LEBRUN, Michel, Louis GRENIER, Pierrette GOURDE, Michel BERGERON, Gaston LABRECQUE a Denis BEAUCHAMP. Effectiveness and Toxicity of Gentamicin in an Experimental Model of Pyelonephritis: Effect of the Time of Administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1999, **43**(5), 1020-1026 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1128/AAC.43.5.1020. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.43.5.1020>
- [10] HU, Yanmin, Alexander LIU, James VAUDREY et al. Combinations of  $\beta$ -Lactam or Aminoglycoside Antibiotics with Plectasin Are Synergistic against Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(2), 1-15 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1371/journal.pone.0117664. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0117664>
- [11] PAQUETTE, François, Amélie BERNIER-JEAN, Véronique BRUNETTE, Hélène AMMANN, Valéry LAVERGNE, Vincent PICHETTE, Stéphan TROYANOV a Josée BOUCHARD. Acute Kidney Injury and Renal Recovery with the Use of Aminoglycosides: A Large Retrospective Study. *Nephron* [online]. 2015, **131**(3), 153-160 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1159/000440867. ISSN 1660-8151. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/440867>

- [12] PostScript Safety: Aminoglycosides and Ototoxicity. *Greater Glasgow and Clyde Medicines* [online]. Glasgow: NHSGGC, 2012 [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: [http://www.ggcprescribing.org.uk/media/uploads/ps\\_safety/postscript\\_safety\\_aug\\_2012\\_-final.pdf](http://www.ggcprescribing.org.uk/media/uploads/ps_safety/postscript_safety_aug_2012_-final.pdf)
- [13] WARNER, Willis A. Neuromuscular Blockade Associated With Gentamicin Therapy. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* [online]. 1971, **215**(7) [cit. 2020-05-07]. DOI: 10.1001/jama.1971.03180200075022. ISSN 0098-7484. Dostupné z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1971.03180200075022>
- [14] BANSAL, V. High performance liquid chromatography: A short review. *Journal of Global Pharma Technology*. 2010, **2**(5), 22-26. ISSN 0975-8542.
- [15] KEALEY, D. a P. HAINES. *Analytical chemistry*. 1st ed. Oxford: BIOS, 2002. Instant notes series. ISBN 18-599-6189-4.
- [16] DONG, M. *Modern HPLC for practicing scientists*. 1st ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2006. ISBN 978-0-471-72789-7.
- [17] HPLC Illustration. In: *Ibsen photonics* [online]. [cit. 2018-05-18]. Dostupné z: [https://ibsen.com/wp-content/uploads/HPLC-illustration\\_T.png](https://ibsen.com/wp-content/uploads/HPLC-illustration_T.png)
- [18] KENKEL, John. *Analytical chemistry for technicians*. 3rd ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003. ISBN 1-56670-519-3.
- [19] JEFFERY, G.H. *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*. 5th ed. Harlow: Wiley, 1989. ISBN 05-824-4693-7.
- [20] AJUHA, Satinder a Michael DONG, ed. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. 1st ed. San Diego: Elsevier, 2005. ISBN 0-12-088547-6.
- [21] ROUESSAC, F. a A. ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Chichester: Wiley, 2007. ISBN 978-0-470-85903-2.
- [22] GÜNZLER, H. a A. WILLIAMS. *Handbook of analytical techniques*. 1st ed. New York: Wiley-VCH, 2001. ISBN 35-273-0165-8.
- [23] OPEKAR, F. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0553-8.
- [24] HARVEY, David. *Modern analytical chemistry*. 1st ed. Boston: McGraw-Hill, 2000. ISBN isbn0-07-237547-7.
- [25] UV/VIS HPLC detektory. *Hplc.cz* [online]. Michal Douša [cit. 2020-05-08]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/UV\\_VIS\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html)
- [26] KÜLPMANN, W. R. *Clinical toxicological analysis: procedures, results, interpretation*. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. ISBN 978-3-527-31890-2.
- [27] Derivatization Reagents: For Selective Response and Detection in Complex Matrices. In: *Sigma Aldrich* [online]. St. Louis, MO: Sigma-Aldrich Co., 2011 [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>

- [28] MEYERS, Robert A., ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. 1st ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006 [cit. 2020-05-06]. ISBN 9780470027318. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470027318>
- [29] ANDERSON, J. L., A. BERTHOD, V. PINO a A. M. STALCUP, ed. *Analytical Separation Science*. Wiley, 2012. ISBN 978-3-527-33374-5.
- [30] 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene. *PubChem* [online]. Bethesda, MD, USA: National Library of Medicine [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6264>
- [31] Derivatizace v HPLC. *Hplc.cz* [online]. [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Der/amin\\_FL.htm](http://www.hplc.cz/Der/amin_FL.htm)
- [32] Dansyl chloride. *PubChem* [online]. Bethesda, MD, USA: National Library of Medicine [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11801>
- [33] *International Journal of Pharmaceuticals Analysis* [online]. 2013, **4**(1) [cit. 2020-04-26]. ISSN 09753079.
- [34] KIJAK, Philip James, Jean JACKSON a Badar SHAIKH. Determination of gentamicin in bovine milk using liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1997, **691**(2), 377-382 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/S0378-4347(96)00445-8. ISSN 03784347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378434796004458>
- [35] O-phtalaldehyde. *PubChem* [online]. Bethesda, MD, USA: National Library of Medicine [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4807>
- [36] Fluorescamine. *PubChem* [online]. Bethesda, MD, USA: National Library of Medicine [cit. 2020-05-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/37927>
- [37] ISOHERRANEN, Nina a Stefan SOBACK. Chromatographic Methods for Analysis of Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of AOAC International*. 1999, **82**(5), 1017-1045. ISSN 1944-7922. PMID: 10513005.
- [38] SOFIQUL, ISLAM, MURUGAN V. a PREMA KUMARI. ANALYTICAL METHODS FOR THE DETERMINATION OF AMINOGLYCOSIDES ANTIBIOTICS BY CHROMATROGRAPHIC TECHNIQUE. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* [online]. 2020, **12**(4), 1-5 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.22159/ijpps.2020v12i4.36583. ISSN 0975-1491. Dostupné z: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/36583>
- [39] STEVENS, Paul et al. 125I-Radioimunoassay of amikacin and comparison with microbioassay. *The journal of antibiotics*. 1976, **29**(8), 829-832. ISSN 1881-1469.
- [40] MAYHEW, James W. a Sherwood L. GORBACH. Gas—liquid chromatographic method for the assay of aminoglycoside antibiotics in serum. *Journal of Chromatography A* [online]. 1978, **151**(2), 133-146 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)85377-7. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300853777>
- [41] ALI MOHD, Mustafa, ed. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications* [online]. 1st ed. Rijeka (Croatia): InTech, 2012 [cit. 2020-04-13]. DOI: 10.5772/2518. ISBN 978-953-51-0298-4. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/advanced-gas-chromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-and-reagents-for-gas-chromatography-analysis>



- [42] PREU, Martina, Dominique GUYOT a Michael PETZ. Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions. *Journal of Chromatography A* [online]. 1998, **818**(1), 95-108 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00537-8. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398005378>
- [43] MINEO, H. et al. An analytical study of antibacterial residues in meat: the simultaneous determination of 23 antibiotics and 13 drugs using gas chromatography. *Veterinary and human toxicology*. 1992, **34**, 393-397. ISSN 01456296.
- [44] MUSTAFA, Sanaul a V. DEVI. Liquid Chromatographic Assay for the Analysis of Kanamycin sulphate nanoparticles in Rat after intramuscular administration: Application to a Pharmacokinetic Study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* [online]. 2016, **6**(08), 57-66 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.7324/JAPS.2016.60809. ISSN 2231-3354. Dostupné z: [http://www.japsonline.com/abstract.php?article\\_id=1950](http://www.japsonline.com/abstract.php?article_id=1950)
- [45] KALYANI, Lella a Chava Venkata Nageswara RAO. Stability indicating RP-HPLC method development and validation of cefepime and amikacin in pure and pharmaceutical dosage forms. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2018, **54**(3), 1-9 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1590/s2175-97902018000317258. ISSN 2175-9790. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502018000300607&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502018000300607&lng=en&tlng=en)
- [46] DIMAL, V. M. Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Cefepime Hydrochloride and Amikacin Sulphate in Injection Dosage Form. *Journal of pharmaceutical science and bioscientific research* [online]. 2012, **2**(3), 138-143 [cit. 2020-05-06]. ISSN 2271-3681. Dostupné z: [http://www.jpsbr.org/index\\_htm\\_files/9\\_JPSBR\\_12090.pdf](http://www.jpsbr.org/index_htm_files/9_JPSBR_12090.pdf)
- [47] ADAMS, E, G VAN VAERENBERGH, E ROETS a J HOOGMARTENS. Analysis of amikacin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1998, **819**(1-2), 93-97 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00394-X. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196739800394X>
- [48] MANYANGA, Vicky, Ehab ELKADY, Jos HOOGMARTENS a Erwin ADAMS. Improved reversed phase liquid chromatographic method with pulsed electrochemical detection for tobramycin in bulk and pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2013, **3**(3), 161-167 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/j.jpha.2012.12.008. ISSN 20951779. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177912001499>
- [49] BRAJANOSKI, G, J HOOGMARTENS, K ALLEGAERT a E ADAMS. Determination of amikacin in cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2008, **867**(1), 149-152 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.03.016. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023208001876>
- [50] GALANAKIS, Evagelia G., Nikolaos C. MEGOULAS, Petr SOLICH a Michael A. KOUPPARIS. Development and validation of a novel LC non-derivatization method for the determination of amikacin in pharmaceuticals based on evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, **40**(5), 1114-1120 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.09.008. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708505006266>
- [51] LIU, Qingying, Jiufeng LI, Xuqin SONG, Meiyu ZHANG, Erfen LI, Fuming GAO a Limin HE. Simultaneous determination of aminoglycoside antibiotics in feeds using high performance liquid

- chromatography with evaporative light scattering detection. *RSC Advances* [online]. 2017, **7**(3), 1251-1259 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1039/C6RA26581B. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA26581B>
- [52] CAUDRON, E., S. BAGHRICHE, P. PROGNON a D. PRADEAU. Simultaneous Quantification of Gentamicin and Colistin Sulfate in Pharmaceuticals using Ion-Pairing and Polarity Gradient Chromatography with Low-UV Detection. *Chromatographia* [online]. 2013, **76**(13-14), 747-755 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.1007/s10337-013-2478-7. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-013-2478-7>
- [53] PLOZZA, T. et al. The confirmation and quantification of selected aminoglycoside residues in animal tissue and bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *International Food Research Journal* [online]. 2011, **18**(3), 1077-1084 [cit. 2020-04-27]. ISSN 2231 7546. Dostupné z: [http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20\(03\)%202011/\(31\)IFRJ-2010-004.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20(03)%202011/(31)IFRJ-2010-004.pdf)
- [54] JOSEPH, Arul a Abu RUSTUM. Development and validation of a RP-HPLC method for the determination of gentamicin sulfate and its related substances in a pharmaceutical cream using a short pentafluorophenyl column and a Charged Aerosol Detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2010, **51**(3), 521-531 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.09.002. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708509005330>
- [55] RUCKMANI, K. *A simple and rapid high-performance liquid chromatographic method for determining tobramycin in pharmaceutical formulations by direct UV detection* [online]. 2011, **2**(2), 117-123 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.4103/2229-4708.84455. ISSN 2229-4716. PMID: 23781441. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3658043/>
- [56] ZHU, Liang a Jingkang WANG. Fast determination of tobramycin by reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography with a refractive index detector. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* [online]. 2013, **7**(3), 322-328 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.1007/s11705-013-1348-z. ISSN 2095-0179. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11705-013-1348-z>
- [57] CLAROT, I. et al. Simultaneous quantitation of tobramycin and colistin sulphate by HPLC with evaporative light scattering detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. Elsevier, 2009, **50**, 64-67 [cit. 2020-04-27]. DOI: 10.1016/j.jpba.2009.03.013. ISSN 0731-7085. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.jpba.2009.03.013
- [58] SALUTI, G., I. DIAMANTI, D. GIUSEPPONI, L. PUCCIARINI, R. ROSSI, S. MORETTI, R. SARDELLA a R. GALARINI. Simultaneous determination of aminoglycosides and colistins in food. *Food Chemistry* [online]. 2018, **266**, 9-16 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.05.113. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618309312>
- [59] STEAD, D.A. a R.M.E. RICHARDS. Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1996, **675**(2), 295-302 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/0378-4347(95)00355-X. ISSN 03784347. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037843479500355X>
- [60] KIM, Byoung-Hyoun, Suk Chin LEE, Hye Jin LEE a Jong Hoa OK. Reversed-phase liquid chromatographic method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using pre-column derivatization with phenylisocyanate. *Biomedical Chromatography* [online]. 2003, **17**(6), 396-403 [cit. 2020-04-12]. DOI: 10.1002/bmc.254. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bmc.254>

- [61] KORANY, M. A.-T., R. S. HAGGAG, M. A. RAGAB a O. A. ELMALLAH. Liquid Chromatographic Determination of Amikacin Sulphate after Pre-Column Derivatization. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2014, **52**(8), 837-847 [cit. 2020-04-30]. DOI: 10.1093/chromsci/bmt126. ISSN 0021-9665. Dostupné z: <https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/bmt126>
- [62] FENG, C. H. et al. Trace analysis of amikacin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* [online]. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, 2001, **53**(1), 213-217 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1007/BF02490330. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02490330>
- [63] CHAUHAN, Bindiya a Sunil JALALPURE. Analysis of Amikacin in Human Serum By UHPLC With Fluorescence Detector Using Chloro-Formate Reagent With Glycine. *Pharmaceutical Methods* [online]. 2016, **7**(2), 99-103 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.5530/phm.2016.7.15. ISSN 22294708. Dostupné z: <http://phmethods.net/article/147>
- [64] LI, Deguang, Shun HE, Yufang DENG, Guanglong DING, Hanwen NI a Yongsong CAO. Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Amikacin in Water Samples by Solid Phase Extraction and Pre-column Derivatization. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2014, **93**(1), 47-52 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1007/s00128-014-1257-y. ISSN 0007-4861. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00128-014-1257-y>
- [65] NICOLI, Sara a Patrizia SANTI. Assay of amikacin in the skin by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, **41**(3), 994-997 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.12.029. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708506000355>
- [66] J KUEHL, Philip. Development and Validation of an HPLC Assay For Dual Detection of Gentamicin Sulfate and Leucine From a Novel Dry Powder For Inhalation. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques* [online]. 2012, **03**(06), 1-4 [cit. 2020-05-01]. DOI: 10.4172/2155-9872.1000152. ISSN 21559872. Dostupné z: <https://www.omicsonline.org/development-and-validation-of-an-hplc-assay-for-dual-detection-of-gentamicin-sulfate-and-leucine-from-a-novel-dry-powder-for-inhalation-2155-9872.1000152.php?aid=9861>
- [67] ANHALT, J.P., F.D. SANCILIO a T. MCCORKLE. Gentamicin C-component ratio determination by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1978, **153**(2), 489-493 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)95509-2. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300955092>
- [68] SEIDL, G. a H. P. NERAD. Gentamicin C: Separation of C1, C1a, C2, C2a and C2b components by HPLC using Isocratic ion-exchange chromatography and post-column derivatisation. *Chromatographia* [online]. 1988, **25**(3), 169-171 [cit. 2020-05-06]. DOI: 10.1007/BF02316439. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02316439>
- [69] ISOHERRANEN, Nina a Stefan SOBACK. Determination of Gentamicins C1, C1a, and C2 in Plasma and Urine by HPLC. *Clinical Chemistry* [online]. 2000, **46**(6), 837-842 [cit. 2020-05-01]. PMID: 10839773.
- [70] TSUJI, Kiyoshi, John F. GOETZ, William VAN METER a Kathy A. GUSCIORA. Normal-phase high-performance liquid chromatographic determination of neomycin sulfate derivatized with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Journal of Chromatography A* [online]. 1979, **175**(1), 141-152 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)86409-2. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300864092>
- [71] MEICHENG, Y. et al. HPLC method using pre-column derivatization for determination of the content of gentamicin sulfate and neomycin sulfate. *Chinese Journal of Clinical Pharmacy* [online]. 2004,

- 13(5), 288-291 [cit. 2020-05-04]. ISSN 1007-4406. Dostupné z: [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-LCZZ200405009.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-LCZZ200405009.htm)
- [72] EDDER, P, A COMINOLI a C CORVI. Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **830**(2), 345-351 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00917-0. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398009170>
- [73] KUBO, H, Y KOBAYASHI a T NISHIKAWA. Rapid method for determination of kanamycin and dibekacin in serum by use of high-pressure liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1985, **28**(4), 521-523 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1128/AAC.28.4.521. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.28.4.521>
- [74] MASHAT, M, H CHRYSTYN, B CLARK a K ASSI. Development and validation of HPLC method for the determination of tobramycin in urine samples post-inhalation using pre-column derivatisation with fluorescein isothiocyanate. *Journal of Chromatography B* [online]. 2008, **869**(1-2), 59-66 [cit. 2020-05-05]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.05.012. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023208003358>
- [75] CHMELARŮ, Josef, Jiří MRÁZEK, Martina HERMANNOVÁ et al. Biodegradable free-standing films from lauroyl derivatives of hyaluronan. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, **224**, 1-7 [cit. 2020-05-09]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115162. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171930829X>
- [76] KANG, Xuejun, Jing XIAO, Xiao HUANG a Zhongze GU. Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2006, **366**(1-2), 352-356 [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.1016/j.cca.2005.11.011. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898105006832>