



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ**

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

**DISTRIBUCE LÉČIV V ČISTÍRNÁCH ODPADNÍCH
VOD**

DISTRIBUTION OF PHARMACEUTICALS IN WASTEWATER TREATMENT PLANTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lenka Šilhánková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0927/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Lenka Šilhánková	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Distribuce léčiv v čistírnách odpadních vod

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování rešerše
2. Výběr analytů ze skupiny léčiv - betablokátorů
3. Výběr čistíren odpadních vod s různou technologií
4. Odběry vzorků vody
5. Zpracování a interpretace výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Lenka Šilhánková
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se zabývá aktuálním tématem – distribucí léčiv v odpadních vodách, u nichž byla prokázána toxicita na necílové organismy. Konkrétně řeší výskyt farmak ze skupiny beta-blokátorů, která se hojně podávají při léčbě hypertenze a dalších kardiovaskulárních onemocněních. Jako zástupci byly vybrány acebutolol, atenolol a bisoprolol, jejichž schopnost eliminace byla pozorována u tří čistíren odpadních vod (ČOV) s různou technologií čištění a rozdílným počtem ekvivalentních obyvatel.

Pro dané analyty byla optimalizována metoda UHPLC s UV/VIS detekcí s využitím diodového pole (DAD). Rovněž byla část práce věnována optimalizaci izolace a zakoncentrování vzorku.

Popsaná metoda nebyla ovšem vhodná pro analýzu reálných vzorků odpadní vody, protože ve většině případů nebyl překročen limit kvantifikace, nebo dokonce limit detekce. Proto by bylo dobré analyzovat daná léčiva metodou s vyšší citlivostí, např. pomocí hmotnostního detektoru.

Získaná data nenesou vypovídající informace o účinnosti ČOV. Pouze v jediném případě bylo na odtoku detekováno konkrétní množství acebutololu. Na základě dosud provedené analýzy nelze jednoznačně konstatovat, zda kvalita vypouštěné vody z pohledu výskytu léčiv je optimální.

ABSTRACT

This bachelor's thesis deals with a trending topic – wastewater distribution of pharmaceuticals proven to be toxic to non-target organisms – specifically, the occurrence of beta-blockers, plentifully used in treating hypertension and other cardiovascular diseases, is discussed. Members of this group, Atenolol, Acebutolol and Bisoprolol were chosen for closer study. The elimination of these chemicals was observed in three wastewater treatment plants (WWTP) with different treatment technologies and various number of population equivalents.

For said analytes, UHPLC with UV/VIS detection using diode array detector (DAD) method was optimised. A part of this thesis also deals with optimization of isolation and concentrating the analytes.

Unfortunately, the described method was not suitable for real sample analysis, because in most samples, the limit of quantification or even the limit of detection was not exceeded. It would be best for an analytical method with higher sensitivity, e. g. mass detector, to be used.

The data gained in this experiment do not hold any informational value about the effectiveness of WWTP, as the exact amount of Acebutolol in effluent was measured only in one case. Based on the to-date executed analysis, it is impossible to conclude whether the quality of the treated water, concerning the content of aforementioned pharmaceuticals, is in any way ideal.

KLÍČOVÁ SLOVA

Léčiva, beta-blokátory, životní prostředí, odpadní voda, čistírny odpadních vod, extrakce tuhou fází, UHPLC, detekce UV/VIS s DAD

KEYWORDS

Pharmaceuticals, beta-blockers, environment, waste water, wastewater treatment plants, solid phase extraction, UHPLC, UV/VIS detection with DAD

ŠILHÁNKOVÁ, L. *Distribuce léčiv v čistírnách odpadních vod*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 53 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat ÚCHTOŽP, za umožnění práce ve svých laboratořích. Jmenovitě bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za nesmírnou podporu, odborné vedení a cenné rady při řešení problémů. Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. a Ing. Tereze Švestkové za jejich vstřícnost a obětavou pomoc.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Léčiva	9
2.1.1 Obecné informace	9
2.1.2 Farmakodynamika léčiv	9
2.1.2.1 Cíle působení léčiv	9
2.1.3 Beta-blokátory	10
2.1.3.1 Rozdělení	11
2.1.3.2 Atenolol	12
2.1.3.3 Bisoprolol	12
2.1.3.4 Acebutolol	13
2.1.4 Léčiva v životním prostředí	14
2.1.4.1 Beta-blokátory v životním prostředí	15
2.2 Čištění odpadních vod	16
2.2.1 Odpadní vody	16
2.2.2 Městské a splaškové odpadní vody	16
2.2.3 Kapacita čistíren odpadních vod	17
2.2.4 Postupy čištění odpadních vod	17
2.2.4.1 Aerobní procesy	18
2.2.4.2 Anaerobní procesy	18
2.2.4.3 Porovnání aerobních a anaerobních procesů	19
2.2.4.4 Terciární čištění	19
2.2.5 Léčiva v odpadních vodách	20
2.3 Analýza léčiv v odpadních vodách	21
2.3.1 Odběr, konzervace a skladování vzorků	21
2.3.2 Úprava vzorku	22
2.3.2.1 Extrakce tuhou fází	22
2.3.3 Chromatografie	23
2.3.3.1 Kapalinová chromatografie	25
2.3.3.2 Detektory kapalinové chromatografie	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1 Cíl	29
3.2 Použité přístroje a pomůcky	29
3.2.1 Extrakce tuhou fází	29
3.2.2 Kapalinová chromatografie	29
3.2.3 Ostatní přístroje a pomůcky	29
3.3 Chemikálie a standardy	30
3.3.1 Chemikálie	30
3.3.2 Standardy	30
3.4 Sledovaná matrice	30
3.4.1 ČOV v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno	30
3.4.2 ČOV Mikulov	31

3.4.3	ČOV Brno-Modřice	32
3.5	Pozorované analyty	32
3.6	Pracovní postup.....	32
3.6.1	Odběr vzorků.....	32
3.6.2	Předúprava vzorku a extrakce tuhou fází.....	33
3.6.3	Stanovení vybraných analytů pomocí kapalinové chromatografie.....	34
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	35
4.1	Optimalizace chromatografických podmínek.....	35
4.1.1	Pufr jako součást směsi mobilní fáze – optimalizace pH	35
4.1.2	Optimalizace gradientu mobilní fáze	35
4.1.3	Vliv nástřiku, průtok mobilní fáze, vlnová délka a teplota kolony	36
4.2	Kvantifikace beta-blokátorů	37
4.2.1	Kalibrační křivka	37
4.2.2	Limit detekce a limit kvantifikace	39
4.3	Optimalizace extrakce tuhou fází.....	39
4.4	Reálné vzorky odpadní vody	40
4.4.1	Matriční efekt	40
4.4.2	Výsledky	41
4.4.3	Zhodnocení účinnosti čistíren	41
5.	ZÁVĚR	42
6.	SEZNAM CITOVANÝCH ZDROJŮ	43
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	50
8.	PŘÍLOHY.....	51

1. ÚVOD

S rozvojem vědy a růstem lidské populace je neodmyslitelně spjata i zvyšující se výroba a spotřeba léčiv. Na trh jsou uváděny stále nové medikamenty, jež musí být před tím podrobeny nemalému množství testů. Jsou popsána jejich působení, bezpečnost, nežádoucí účinky, toxicita, popř. farmakokinetické vlastnosti.

Domníváme se, že s vývojem nových léčiv by se měla věnovat pozornost také jejich osudu po vyloučení z organismu. Je prokázáno, že účinné látky (nebo jejich degradované produkty) odchází z těla spolu s exkrementy. Ačkoliv splaškové vody prochází procesem čištění, řada látek je perzistentního charakteru, takže běžné čistírny odpadních vod efektivně nedokážou s tímto problémem bojovat. Z toho vyplývá, že vyčištěná voda se zbytky neodstraněných látek je dále vypouštěna do povrchových toků.

Jak mohou být léčiva nebezpečná? V posledních letech jsou rezidua léčiv v životním prostředí velmi diskutovanou otázkou. Z hlediska ekotoxikologie se působením na necílové organismy bioakumulují v jejich tělech, a to i ve velmi nízkých koncentracích, a mohou tak nepříznivě ovlivňovat fyziologické funkce. Za zmínku stojí také fakt, že povrchové vody se infiltrují do podzemních vod, které slouží spolu s vodami povrchovými jako zdroj k úpravě pitné vody. Ovšem nebudme až tak skeptičtí. Existuje řada abiogenních faktorů, které v přírodě napomáhají k úspěšnému odstranění farmak i jiných látek.

Shrnutím výše zmíněných poznatků se postupně klade větší důraz na účinnost čistíren odpadních vod. Není divu, protože tento faktor je zcela zásadní pro udržení kvality povrchových vod. Vzhledem k dostupným známým technologiím se bude pravděpodobně další výzkum zabývat aplikací terciárního čištění, které by mělo eliminovat většinu perzistentních látek. Překážkou tak zatím zůstávají vysoké pořizovací i provozní náklady.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Léčiva

2.1.1 Obecné informace

Podle Zákona č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících (zákon o léčivech), ve znění pozdějších předpisů § 2 odst. 1 se definuje léčivý přípravek takto:

„*Léčivým přípravkem se rozumí*

- a) látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat, nebo*
- b) látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat či podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy či ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, nebo za účelem stanovení lékařské diagnózy.“ [1]*

Léky jsou směsi, jejichž součástí je účinná látka (léčivo) a další složky bez léčebných účinků, tzv. pomocné látky. Léčivá látka může být přírodního nebo syntetického charakteru a měla by mít farmakologický nebo imunologický efekt, popřípadě působit na metabolické pochody. Záměr komponovat léčivo s pomocnými látkami spočívá především ve snadnějším zacházení s lékem, neboť účinná dávka léčiva může být velmi nízká. Mezi další výhody patří vylepšení chuti sirupů, případně příznivý vliv na farmakokinetické vlastnosti, zabývající se osudem léčiva v organismu [2, 3, 4].

Léky mohou mít různou lékovou formu (např. pilulka, mast, injekce), která je závislá na způsobu podání a cestě do organismu. Z tohoto hlediska je podstatné dbát zřetel na jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Obvyklá podoba léků pro příjem ústy má formu pevných nebo potahovaných tablet, kapslí nebo roztoků. Pro podávání konečníkem se využívají čípky. Léky lze podávat i jinými způsoby než jen trávící trubicí. Nitrožilní cestou jsou aplikovány injekce a infuze, pro zevní použití slouží různé masti, krémy, náplasti atp. Mezi další možnosti patří například inhalace plynu [3, 4].

2.1.2 Farmakodynamika léčiv

Farmakodynamika je vědní obor z oblasti farmakochemie. Zabývá se problematikou procesu účinku léčiva na organismus. Pro porozumění této oblasti je nezbytné se nejdříve seznámit s obecnými principy biochemických mechanismů probíhajících v těle [4].

2.1.2.1 Cíle působení léčiv

Receptory jsou specifické skupiny molekul, které se nachází na povrchu buněk. Význam těchto biopolymerů spočívá v interakci s příslušným hormonem. Pokud se hormon vyskytuje v krvi a setká se se „svým“ receptorem, dochází k následným chemickým reakcím a v důsledku toho ke změnám v buňce. Hormonům obvykle náleží pouze jeden receptor. Jedná se o velmi specifické makromolekuly, které do sebe zapadají podobně jako zámek a klíč. Mohou být tak unikátní, že působí pouze v určitých orgánech nebo buňkách. Avšak u některých hormonů lze pozorovat vliv na skupinu podobných receptorů. Mezi takové patří například adrenalin a noradrenalin. Obdobným způsobem jako hormony plní svou funkci také neurotransmitery, pouze s rozdílem, že jsou vylučovány nervovými buňkami. Tímto

způsobem mezi sebou komunikují nervy navzájem, případně přenáší informaci tkáním. Díky tomu je organismus schopen rychlé reakce a člověk tak dokáže například ovládat své prsty při hře na hudební nástroj [2].

Úmyslem využívat léčiva je jejich schopnost fixovat se na cílový receptor a obsadit tak prostor určený primárně hormonům nebo neurotransmiterům. Podobně jako tyto tzv. endogenní látky, musí i léčivo splňovat komplementaritu pro párování s receptorem. Nutným předpokladem je proto správná prostorová struktura. Navázání na konkrétní místo se pak uskutečňuje pomocí slabých vazebných interakcí. Výsledkem je změna konformace receptoru, která ovlivňuje jeho vlastnosti. Rovněž dochází k transportu signálu prostřednictvím biochemických reakcí, což postupně vede k buněčné odezvě [4].

Jak již bylo popsáno, endogenní látky jsou přirozené ligandy receptorů. Vedle nich existují tzv. agonisté vyvolávající podobné efekty. Naproti tomu tzv. antagonisté hrají hlavní roli v blokaci účinků endogenních působků i agonistů [4].

Noradrenalinové receptory

Sympatické nervy slouží v organismu k řízení činnosti žláz a skupiny hladkých svalů. Sem zařazujeme svaly srdce, žaludku a střev; tj. svaly, které nemůžeme ovlivňovat vlastní vůlí. Správnou funkcí sympatik se uvolňuje neurotransmitter noradrenalin. Jeho úkolem je působení na α -receptory a β -receptory, souhrnně označované jako adrenergní receptory (také adrenoreceptory). Účinkem noradrenalinu na α -receptory dochází ke stahu svaloviny cév, což vede ke zvýšení krevního tlaku. β -Receptory fungují obráceně a napomáhají tak k uvolňování cévních svalů a zároveň ke zvýšení frekvence a síly srdečních stahů. Kromě toho ovlivňují zvýšení hladiny cukru v krvi a tlumení aktivity střev. Efekty adrenalinu a noradrenalinu můžeme regulovat léčivy, tzv. alfa- nebo beta-blokátory, a to na základě toho, na který receptor působí [2].

2.1.3 Beta-blokátory

Beta-blokátory jsou antagonistická léčiva β -adrenergních receptorů. Je to skupina farmak, která je určena k léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Více jak polovinu století se uplatňují v terapii hypertenze a anginy pectoris, podávají se však také při léčbě srdečního selhání nebo glaukomu [5, 6].

Léčebné účinky jsou dány především blokací β_1 -receptorů, které se nachází zejména v srdci, ale také v gastrointestinálním traktu, ledvinách a tukových buňkách. Blokací β_2 -receptorů dochází naopak k výskytu typických vedlejších účinků. Tyto receptory můžeme nalézt v bronchiálním traktu, cévách, děloze, pankreatu, játrech a ve žlázách s vnitřní sekrecí [7].

Jedním ze základních atributů beta-blokátorů je jejich lipofilita nebo hydrofilita. Dlouhý časový interval farmakodynamického účinku je u lipofilních beta-blokátorů způsoben schopností zadržovat se ve tkáních. Vlastnost pronikat membránou dává možnost dostat se do centrální nervové soustavy (CNS) a blokovat tak β_1 -receptory. Výsledkem je zlepšení antiarytmického efektu. Mezi lipofilní zástupce patří carvedilol, metoprolol, betaxolol a timolol. Naopak hydrofilní beta-blokátory se z tkání vymývají rychle, avšak dlouhodobě působí v plazmě. Vzhledem k nemožnosti průniku do CNS nedochází k vedlejším účinkům

jako je nespavost nebo deprese. Typickými představiteli jsou atenolol a sotalol. Existuje však také skupina vykazující charakter jak lipofilní, tak i hydrofilní. Do této skupiny patří pindolol a bisoprolol [7].

2.1.3.1 Rozdělení

Beta-blokátory můžeme klasifikovat podle jejich aktivity na β_1 - nebo β_2 -receptory do dvou skupin:

1. **Neselektivní** – typická je vazba jak na β_1 -, tak i na β_2 -receptory.
2. **Selektivní** – primárně účinkují na β_1 -receptory, avšak ve vyšších dávkách mají vliv také na β_2 -receptory.

Každá výše zmíněná kategorie se dále rozděluje podle toho, zda má schopnost vykazovat vnitřní sympatomimetickou aktivitu (ISA) či nikoliv. Tato vlastnost se vyznačuje částečně beta-agonistickou aktivitou, takže pokles srdeční frekvence a minutového objemu není tak výrazný. Někdy se ještě uvádí samostatná skupina beta-blokátorů s vazodilatačními účinky [5, 7].

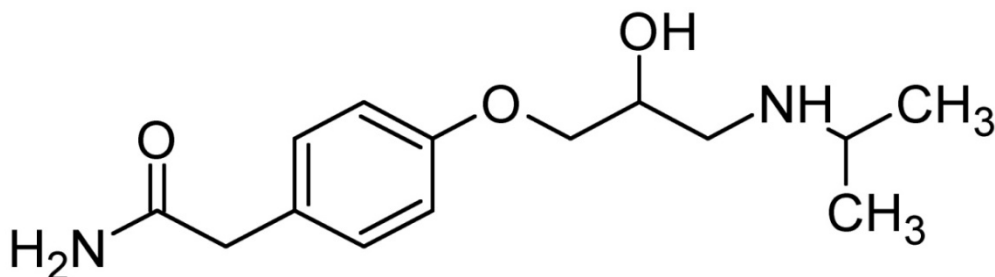
Tabulka 2.1 Rozdělení β -blokátorů a jejich účinky [7].

Charakteristika		Léčivo	Účinek
neselektivní	bez ISA	metipranolol	krátkodobý, dnes málo užívaný u HT
		sotalol	hlavně jako antiarytmikum
	s ISA	bopindolol	v léčbě HT mladších jedinců a sportovců
		pindolol	stejně jako bopindolol
selektivní	bez ISA	atenolol	hlavně u HT
		betaxolol	v léčbě HT a AP
		bisoprolol	hlavně v léčbě CHSS a po IM
		esmolol	injekční jako antiarytmikum
		metoprolol tartát	dnes hlavně forma SR u HT, po IM, AP
		metoprolol sukcinát	forma ZOK u CHSS
		nebivolol	v léčbě CHSS
		talinolol	sporadicky předepisován u HT
	s ISA	acebutolol	v léčbě HT a AP
se stimulací β_2	celiprolol	v léčbě HT a AP	
beta- i alfa-blokátory	s vazodilatačním účinkem	carvediol	v léčbě CHSS
		labetalol	není registrován v ČR
HT = hypertenze, AP = angina pectoris, IM = infarkt myokardu, CHSS = chronické selhání, SR = slow release, ZOK = zero order kinetics (kinetika nultého řádu)			

2.1.3.2 Atenolol

Tabulka 2.2 Atenolol – vlastnosti [8, 9].

Registrační číslo	CAS 29122-68-7
Systematický název	(R,S)-4-[2-(2-hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)- -fenyl]acetamid
Sumární vzorec	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃
Molární hmotnost	266,34
Rozpustnost	▪ neomezeně rozpustný v methanolu ▪ rozpustný v kyselině octové, DMSO ▪ mírně rozpustný ve vodě ▪ těžce rozpustný v dichlormethanu ▪ nerozpustný v acetonitrilu, chloroformu, ethylesteru kyseliny octové, etheru
Rozdělovací koeficient log K _{ow}	0,16
Disociační konstanta pK _a	9,6
Vlastnosti	bílý nebo téměř bílý prášek
Farmakokinetika	▪ téměř nedochází k metabolickým produktům ▪ 90 % vylučováno ledvinami v původní podobě



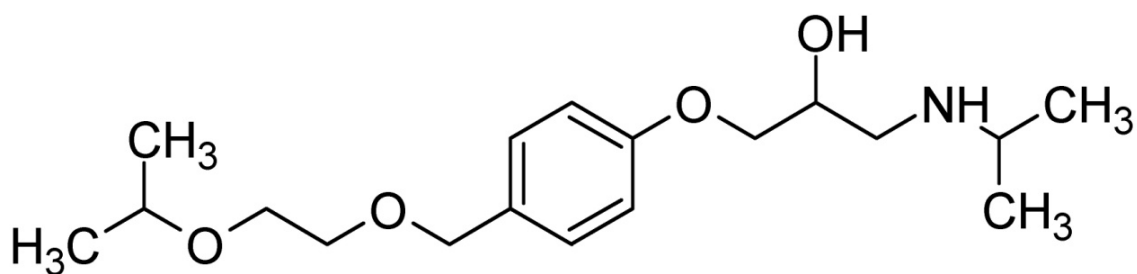
Obrázek 2.1 Atenolol – strukturní vzorec.

2.1.3.3 Bisoprolol

Tabulka 2.3 Bisoprolol – vlastnosti [8, 10].

Registrační číslo	CAS 66722-44-9
Systematický název	1-(isopropylamino)-3-[4-(2-isopropoxyethoxymethyl) fenoxy]propan-2-ol
Sumární vzorec	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄
Molární hmotnost	325,44
Rozpustnost*	▪ velmi dobře rozpustný ve vodě a methanolu ▪ dobře rozpustný v ethanolu a chloroformu
Rozdělovací koeficient log K _{ow}	1,87
Disociační konstanta pK _a	9,67
Vlastnosti	bílá krystalická látka
Farmakokinetika	▪ vznik inaktivních metabolitů z 50%

* bisoprolol fumarát

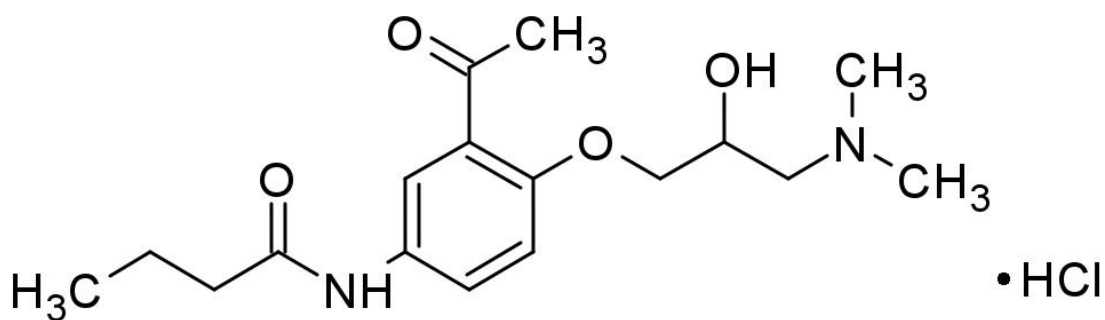


Obrázek 2.2 Bisoprolol – strukturní vzorec.

2.1.3.4 Acebutolol

Tabulka 2.4 Acebutolol hydrochlorid – vlastnosti [8, 11].

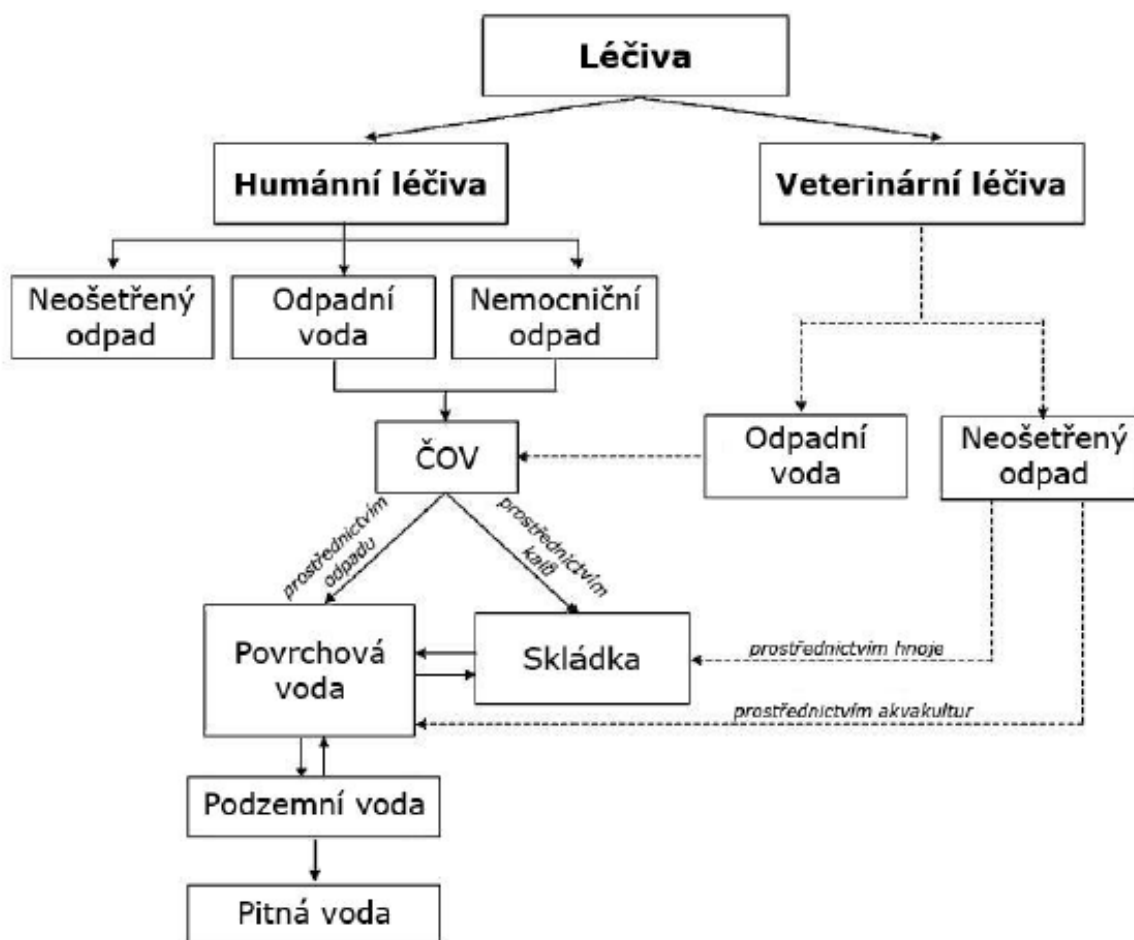
Registrační číslo	CAS 34381-68-5
Systematický název	(R,S)-N-isopropyl-N- {[3-(2-acetyl-4-butyrylamino fenoxy)-2-hydroxy]propyl} amoniumchlorid
Sumární vzorec	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₄ · HCl
Molární hmotnost	372,89
Rozpustnost	▪ snadno rozpustný ve vodě a v 96% ethanolu ▪ těžce rozpustný v acetonu a dichlormethanu ▪ nerozpustný v etheru
Rozdělovací koeficient log K_{ow}	1,77
Disociační konstanta pK_a	9,2
Vlastnosti	bílý krystalický prášek
Farmakokinetika	většina látky je metabolizována v játrech na aktivní diacetolol



Obrázek 2.3 Acebutolol hydrochlorid – strukturní vzorec.

2.1.4 Léčiva v životním prostředí

Produkce i spotřeba léčiv prokazatelně roste, což vede k vyššímu zájmu o problematiku jejich výskytu v životním prostředí. Jednou z hlavních příčin je vylučování reziduí z organismu. Následně se tyto látky dostávají splaškovou vodou do čistíren odpadních vod, kde nemusí dojít k jejich odstranění. Léčiva, která projdou procesem čištění, jsou dále spolu s vodou vypouštěna do povrchových toků. Tímto způsobem je proto možné kontaminovat nejen akvatické prostředí, ale také půdu, popř. ovzduší. Pronikání léčiv do životního prostředí se děje i jinými způsoby. Příčinou může být nesprávné nakládání s odpady (vyhazování nevyužitého léku do odpadkového koše), průsaky ze skládek, hnojení zemědělské půdy čistírenským kalem, nebo také odpadní voda pocházející z různých zdrojů [12].



Obrázek 2.4 Způsoby pronikání léčiv do životního prostředí [13, 14].

V analyzovaných vodách byly prostřednictvím různých výzkumných studií stanoveny koncentrace léčiv, vesměs v rozmezí ng/l až µg/l. Je nutno zmínit, že tato množství jsou závislá na ročním období, fyzikálně-chemických vlastnostech analytů, účinnosti odstranění v ČOV, faktoru zředění vodního toku a dalších. Zmíněné koncentrace jsou však velmi nízké, aby představovaly akutní riziko. U některých léčiv byl však zjištěn vyšší ekotoxikologický potenciál, případně byla prokázána bioakumulace v organismech. Ve studii pocházející ze severní Ameriky byla prokázána bioakumulace diltiazemu, léku užívaného při hypertenzi, a to v tělech ryb a vodních ptáků. K vyšetření byla použita plazma těchto živočichů, kteří se vyskytovali v kontaminovaných vodních tocích za odtokem z ČOV. Bylo zjištěno, že

koncentrace diltiazemu v plazmě ryb byla 21,6krát vyšší než ve vodě. Koncentrace v případě ptačího druhu orlovce říčního byla v porovnání s rybami převyšena ještě 4,71krát. Je však nutno upozornit na to, že výsledky této práce se lišily s ohledem na sledované lokality, druhy ryb a konkrétní individua [15, 16, 17, 18].

Mnoho farmak je vůči životnímu prostředí perzistentní. Například antiepileptikum karbamazepin přetrvává v půdě po dobu téměř 40 dní beze změn. Odtud proniká do zemědělských plodin a akumuluje se zejména v jejich listech. Důvod, proč expozice těchto látek vůči necílovým organismům je téměř konstantní, může zapříčinit především jejich nepřetržité užívání pacienty [18].

Santos et al. (2012) do své souborné práce shrnuli pozorování osudu léčiv v akvatickém prostředí; ke zpracování použili údaje ze 183 článků publikovaných v období 1996–2009. Z údajů vyplývá, že k nejčastěji analyzovaným léčivům v životním prostředí patří antibiotika, nesteroidní protizánětlivé látky, hypolipidemika, antiepileptika, pohlavní hormony, antihypertenzivní látky zahrnující beta-blokátory a další [14].

2.1.4.1 Beta-blokátory v životním prostředí

Podle meziročního čtvrtletního srovnání pro rok 2014–2016, vydaného Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL), bylo v ČR distribuováno každoročně 12–13 milionů kusů balení léků určených pro kardiovaskulární systém, což odpovídá 18–20 % z celkového množství balení. Z výše uvedeného dále vyplývá, že množství dodaných balení beta-blokátorů činí každoročně pro první kvartál asi 2 miliony, tj. přibližně 66 milionů doporučené denní dávky. Tyto hodnoty však nepopisují reálnou spotřebu léků pacienty. Naproti tomu odhadovaná spotřeba beta-blokátorů v Německu činí každoročně asi 100–250 tun. Zmiňovaný údaj pochází z roku 2005 [19, 20].

Využití těchto léčiv není určeno pouze pro humánní účely, můžeme se s nimi setkat také ve veterinární medicíně. Kromě toho slouží některým sportovcům jako nelegální doping. Při tak hojně spotřebě je prokázán výskyt nejen v ČOV, ale také v povrchových vodách. Například v tureckých řekách byly stanoveny koncentrace v rozmezí 2,3–122 ng/l pro atenolol a 19,3–561 ng/l pro propranolol [19, 21].

Rovněž byl prokázán ekotoxikologický efekt u některých druhů organismů. Sladkovodní ryba medaka japonská byla vystavena po dobu dvou týdnů účinkům 500 µg/l propranololu. Během této doby došlo ke snížení tempa růstu. Dále byly shledány změny v hladinách steroidů v plazmě samců i samic, a to již při koncentraci nižší jak 1 µg/l. Takto nízké dávky vedly rovněž k nižší produkci jiker. Na druhou stranu, akutní expozice pstruha duhového propranololem (70,9 µg/l) neprokázala snížení tepové frekvence [14].

Další dopady negativního působení beta-blokátorů na necílové organismy byly popsány ve studii, která pojednává o vystavení plže písečníka novozélandského účinkům solatolu o koncentracích 0,05 µg/l, 1,0 µg/l a 6,5 µg/l. Autoři studie očekávali snížení počtu embryí, zpomalení růstu dospělců a menší velikost narozených jedinců. Kromě toho byl přepokládán rovněž konstantní trend úmrtnosti. Oproti hypotéze se po 56 dnech výrazně zvýšilo množství embryí; při koncentraci 0,05 µg/l solatolu byl 107% nárůst v porovnání s plží ve standardních podmínkách. Pro koncentraci 1,0 µg/l tento nárůst činil 73 %, při vyšších dávkách nebyly zpozorovány žádné změny [22].

2.2 Čištění odpadních vod

2.2.1 Odpadní vody

Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon), ve znění pozdějších předpisů § 38 odst. 1 a 2, definuje odpadní vodu takto:

„(1) *Opadní vody jsou vody použité v obytných, průmyslových, zemědělských, zdravotnických a jiných stavbách, zařízeních nebo dopravních prostředcích, pokud mají po použití změněnou jakost (složení nebo teplotu), jakož i jiné vody z těchto staveb, zařízení nebo dopravních prostředků odtékající, pokud mohou ohrozit jakost povrchových nebo podzemních vod. Odpadní vody jsou i průsakové vody z odkališť, s výjimkou vod, které jsou zpětně využívány pro vlastní potřebu organizace a vod, které odtékají do vod důlních, a dále jsou odpadními vodami průsakové vody ze skládek odpadu.*

(2) (...) *Za odpadní vody se dále nepovažují srážkové vody z dešťových oddělovačů, pokud oddělovač splňuje podmínky, které stanoví vodoprávní úřad v povolení. Odpadními vodami nejsou ani srážkové vody z pozemních komunikací, pokud je znečištění těchto vod závadnými látkami řešeno technickými opatřeními podle vyhlášky, kterou se provádí zákon o pozemních komunikacích.*“ [23]

Na základě původu a zdroje znečištění dělíme odpadní vody na:

- **splaškové vody** – jsou to odtoky z domácností, stravovacích zařízení, ubytování
- **průmyslové odpadní vody** – jedná se o vodu znečištěnou výrobním procesem
- **městské odpadní vody** – odtékají veřejnou kanalizací; jejich součástí jsou splaškové vody míšené nejčastěji s průmyslovými odpadními vodami;
- aj.

Vzhledem k jejich zdroji se koncentrace látek v nich obsažených mohou výrazně lišit a mohou mít podstatný vliv na fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti nebo na bakteriologický charakter vody. Tento fakt je velmi důležitý pro správné navržení vhodné technologie ČOV [24].

2.2.2 Městské a splaškové odpadní vody

Pokud se v obci nenachází žádný průmysl, lze městské odpadní vody nahradit názvem vody splaškové. Významným charakterem splaškové vody je její poměrně konstantní složení. Hlavním zdrojem znečištění jsou tuhé fekálie a moč, odkud se do vody dostávají především organické látky. Jedná se zejména o sacharidy a jejich produkty, lipidy (včetně mastných kyselin) a aminokyseliny. Značná část znečištění pochází také z pracích a čisticích prostředků (zde můžeme uvést tensidy, mýdla, fosforečnany a další), včetně zbytků potravin a tuků. Nesmíme opomenout ani množství rozličných mikroorganismů přispívajících k hygienické závadnosti vody [24].

Zavedenou jednotkou, vyjadřující koncentraci znečištění odpadní vody, se rozumí tzv. ekvivalentní obyvatel (EO). Označuje průměrné denní znečištění jedním obyvatelem, které odpovídá 60 g BSK₅. V následující *Tabulce 2.5* je prezentováno množství a druh znečištění jedincem a odpovídající hodnoty ukazatele BSK₅. Zmíněné údaje se vztahují na střední Evropu, avšak pro konkrétní města mohou být výrazně odlišná [25, 26].

Tabulka 2.5 Specifické znečištění – průměrné denní znečištění jedním obyvatelem za jeden den a k nim odpovídající hodnoty BSK₅. Všechny hodnoty uvedené v tabulce jsou vyjádřeny v gramech [25].

Látky	Anorganické	Organické	Veškeré	BSK ₅
nerozpuštěné	15	40	55	30
▪ usaditelné	10	30	40	20
▪ neusaditelné	5	10	15	10
rozpuštěné	75	50	125	30
veškeré	90	90	180	60

Jak již bylo zmíněno, součástí městské odpadní vody bývá i podíl vody z průmyslu. Ta se však vyznačuje rozmanitým chemickým složením (převládají organické nebo anorganické látky). Na podkladě těchto údajů lze konstatovat, že složení městské odpadní vody je závislé nejen na vyskytující se průmyslu v okolí, avšak záleží také na denní i roční době, životní úrovni obyvatelstva a dalších faktorech. V tomto případě pro návrh správně pracující ČOV je nutné důkladně zanalyzovat vzorek odpadní vody a věnovat náležitou pozornost zejména všem důležitým ukazatelům (BSK₅, CHSK, atd.) [24, 27].

2.2.3 Kapacita čistíren odpadních vod

Nařízení vlády č. 401/2015 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, klasifikuje kapacitu ČOV podle počtu EO.

1. < 500 EO
2. 500–2000 EO
3. 2 001–10 000 EO
4. 10 001–100 000 EO
5. > 100 000 EO

K zařazení čistírny do konkrétní kategorie je nezbytné sledovat maximální průměrné týdenní zatížení na přítoku během roku. Z nasbíraných dat jsou vyloučeny hodnoty získané při neobvyklých situacích, přívalových deštích a povodních [28].

2.2.4 Postupy čištění odpadních vod

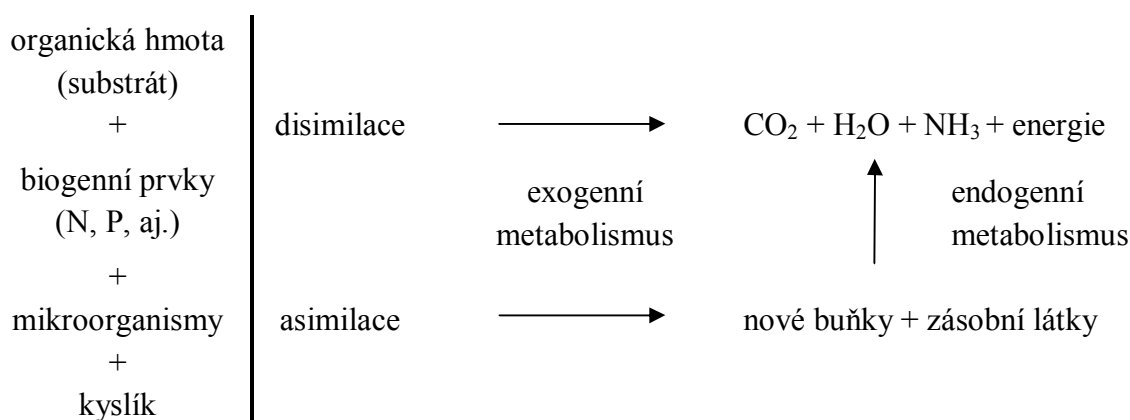
Surová voda přicházející kanalizací do ČOV je nejdříve podrobena mechanické separaci. Ta zahrnuje odstranění hrubších nečistot na česlích a oddělení těžšího materiálu pomocí lapáků písku. V této části lze také separovat tuky. Posledním stupněm první fáze je sedimentace probíhající v usazovacích nádržích. Mechanické předčištění má důležitý význam jednak z hlediska ochrany ČOV před poruchami, jednak jsme schopni tímto způsobem odstranit přibližně 30 % organických látek [25, 26].

Následuje fáze biologického čištění, která má podstatný význam pro odstranění organického znečištění. Pro vlastní chod jsou využívány mikroorganismy (tzv. aktivovaný kal), které rozkládají a přeměňují organické látky na vločky, tzn. využívají je pro stavbu

buněčné hmoty a procesu rozmnožování. Povrch vzniklých vloček je důležitý pro další sorpci a koagulaci látek přítomných v odpadní vodě. Tímto způsobem se odstraňují nejen nerozpuštěné, ale i rozpuštěné látky nezbytné pro různé enzymatické dráhy mikroorganismů. Na základě vstupních podmínek a následných dějů rozdělujeme biologické čištění na aerobní a anaerobní procesy [25, 26, 29].

2.2.4.1 Aerobní procesy

Pro správnou činnost čištění aerobním procesem je nutná přítomnost vzduchu, konkrétně molekulárního kyslíku. Bakterie rozkládající organické sloučeniny spotřebovávají kyslík a vlastními biochemickými pochody čerpají následně energii pro svůj život. Výsledným produktem je proto uvolněný CO_2 přeměněný z výchozích organických látek. Redukcí kyslíku potom dostáváme vodu. Nedílnou součástí pro nárůst a vznik nových buněk je přítomnost anorganických biogenních prvků [29].



Obrázek 2.5 Schéma procesu rozkladu organických látek pomocí mikroorganismů v aerobním prostředí [29].

Pro biologické čištění aktivovaným kalem je nejdříve nutná samotná aktivace. Ta probíhá v aktivační nádrži, která je intenzivně provzdušňována. Mísením odpadní vody s recirkulovaným aktivovaným kalem vznikají již výše zmíněné vločkové agregáty, které jsou tvořené buněčným dentritem bakterií; mohou však obsahovat i další organismy (houby, kvasinky) nebo koloidní nerozpuštěné látky obsažené ve vodě [26, 29].

Vysoká koncentrace aktivovaného kalu je zásadní pro celkovou rychlost rozkladu organické hmoty. Řešení bylo nalezeno v recirkulaci aktivovaného kalu z dosazovací nádrže umístěné za aktivační nádrží. Většina kalu je tímto způsobem vrácena zpět a přebytečné množství se po usazení odčerpává k dalšímu zpracování [24, 26].

2.2.4.2 Anaerobní procesy

Na základě souboru několika druhů anaerobních bakterií dochází k následným a navzájem propleteným biochemickým pochodům, během nichž se v anaerobním prostředí rozkládají původní organické látky na výsledné produkty CH_4 a CO_2 . Průběh anaerobního rozkladu je poměrně složitý a musí být udržován v dynamické rovnováze. Bez ní dochází k poklesu efektivity celého děje. Rychlost a stabilita procesu je výrazně ovlivněna teplotou, hodnotou pH a koncentrací inhibujících a toxických látek [30].

2.2.4.3 Porovnání aerobních a anaerobních procesů

Z energetického i ekonomického hlediska se jeví jako úspornější proces anaerobního čištění. Jak ukazuje *Tabulka 2.6*, energie uložená v bioplynu může sloužit jako úsporný zdroj pro chod čistírny [29].

Tabulka 2.6 Energetická bilance pro aerobní a anaerobní proces. Porovnání využitelné volné energie [29].

	spotřeba na syntézu biomasy	ztráta ve formě tepla	energie v bioplynu
aerobní proces	60 %	40 %	–
anaerobní proces	5–7 %	3–5 %	90 %

Výhody při použití anaerobních technologií:

- **Spotřeba energie** – aerobní procesy jsou energeticky nevýhodné, protože aerace vyžaduje zdroj energie. Naproti tomu při anaerobním čištění dochází ke vzniku bioplynu, který může být dále využíván.
- **Množství biomasy** – pouze 5 % uhlíku je přeměněno na biomasu, zbylých 95 % je produkováno ve formě bioplynu. Následná stabilizace kalu je z pohledu energie skromná a ne vždy nutná.

Výhody aerobních procesů:

- **Reakční rychlost** – vzhledem ke skutečnosti, že rychlost růstu anaerobních mikroorganismů je delší, je tím ovlivněna celková reakční rychlost procesu. V takovém případě je potom nutno počítat také s většími objemy reaktorů, což není u aerobního čištění nutné.
- **Senzitivita** – řada provedených studií poukazuje na vysokou citlivost anaerobních čistících metod, neboť existuje široká škála toxických anorganických i organických látek (např. těžké kovy, amoniak, chlorfenoly) inhibujících tento proces [29, 31, 32].

Ačkoliv redukce stejného množství znečištění je u anaerobní technologie vždy levnější, v praxi se využívá buď v případě vysokého organického znečištění na vstupu, nebo v případě jiných problémů znemožňujících použití aerobního čištění [30].

2.2.4.4 Terciární čištění

Terciární čištění slouží k dalšímu snižování koncentrací polutantů vyskytujících se ve vodě. Existuje řada procesů, avšak jejich výběr závisí na konkrétních látkách, které mají být eliminovány. Tímto způsobem můžeme odstranit rozpuštěné organické sloučeniny, rozpuštěné nutriety (fosfor a dusík) nebo těžké kovy. Metoda pracuje s filtry (pískový, uhlíkový), případně může využívat elektrodialýzu, reverzní osmózu nebo ionexy. Mezi způsoby terciárního čištění patří také použití chemických aditiv, tj. koagulantů (např. síran hlinitý), nebo oxidačních činidel (ozon, peroxid vodíku). Přestože tato metoda čištění je schopna odstranit více jak 95 % kontaminantů, není v praxi tak často využívána, protože jednotlivé procesy mohou být značně finančně náročné [33].

V areálu ČOV Brno-Modřice jsou v rámci projektu LIFE2Water testovány pilotní jednotky s využitím sonolýzy ozonu, ultrafiltrace a kombinace mikrofiltrace s UV zářením.

Ze získaných dat bude vyhodnocena účinnost eliminace průmyslových látek (bisfenol A, nonylfenoly atd.), pesticidů, vybraných léčiv a bakterií fekálního znečištění. Výsledky tohoto projektu by měly být prezentovány v druhé polovině června 2016 [34].

2.2.5 Léčiva v odpadních vodách

Rezidua léčiv se do odpadních vod dostávají každý den. Ať už se jedná o původní formu nebo degradovaný produkt metabolického procesu, významným zdrojem znečištění je lidský organismus. Jako další zdroje kontaminace však nesmíme opomenout ani odpadní vody ze zdravotnických zařízení nebo z průmyslové produkce. ČOV tak hrají důležitou roli při eliminaci těchto látek z vody a zamezují jejich dalšímu šíření do životního prostředí. Předpokládá se, že pro správné odstranění reziduí je důležitá sorpce na aktivovaný kal a biodegradační procesy [12].

Sorpce na aktivovaný kal je mechanismus, který může být ovlivňován několika způsoby. V prvním případě se jedná o absorpci. Dochází tak k hydrofobním interakcím alifatických a aromatických skupin látek s lipofilními buněčnými membránami mikroorganismů, případně s lipidickými frakcemi nerozpuštěných látek. Druhou možností je adsorpce, při které dochází k vzájemnému působení kladně nabitých částic a záporně nabitých povrchů mikroorganismů aktivovaného kalu, a to v důsledku působení elektrostatických sil. Naproti tomu účinnost biodegradačních procesů je úzce spjata s vlastnostmi biomasy, charakterem sloučenin a také provozními parametry ČOV (zejména aplikovanou technologií založenou na množství přebytečného kalu) [35].

Výskyt konkrétních léčiv v odpadních vodách je závislý zejména na jejich častém užívání pacienty. Z posbíraných dat pocházejících z téměř 80 článků vyplývá, že nejvyšší koncentrace na přítoku do ČOV byly prokázány u ibuprofenu (až 373 $\mu\text{g/l}$). Tyto výsledky se shodují s nejnovějšími analýzami SÚKL, z nichž vyplývá, že ibuprofen je nejvíce distribuované léčivo podle kusů balení [20, 35].

Z prezentované studie dále vyplynulo, že přítomnost léčiv na přítoku městských odpadních vod se obecně pohybovala v řádech 10^{-3} – 10^2 $\mu\text{g/l}$ i více. V porovnání s koncentracemi vyšetřovaných látek na odtoku nedocházelo vždy k účinnému odstranění během čisticích procesů [35].

V publikované švýcarské studii byl pozorován vliv použité technologie ČOV na účinnost eliminace atenololu. Nejvýraznější pokles koncentrace atenololu na odtoku se v tomto případě projevil u čistírny využívající pískový filtr k terciárnímu čištění [6].

Narvaez a Jimenez (2012) zpracovali do své publikace údaje o výskytu léčiv přítomných v odpadních vodách z ČOV a jejich dopadu na životní prostředí. Bylo zjištěno, že některé čistírny nemají účinné postupy pro eliminaci léčiv (atenolol, metoprolol, diklofenak aj.) z odpadních vod. U těchto specifikovaných látek bylo prokázáno, že vzhledem ke koncentraci na vstupu do čistírny bylo odstraněno pouze 10 % účinných látek. Pro jiné ČOV však byla zjištěna vysoká účinnost při odstranění propanololu, která dosahovala až 96 % [15].

2.3 Analýza léčiv v odpadních vodách

2.3.1 Odběr, konzervace a skladování vzorků

Vzorkování odpadních vod je prováděno z různých důvodů. Může se jednat o sledování dodržování limitů vypouštěného znečištění, dále stanovení koncentrací kontaminantů, zatížení čistírny nebo pozorování vstupních a výstupních hodnot sledovaných léčiv. Získaná data mohou přispět k tomu, že může být předcházeno problémům s řízením kvality čištění na dané ČOV, lze vyhodnocovat čisticí účinnost, eventuálně posuzovat vliv ČOV na znečištění životního prostředí [36].

Reprezentativnost je jednou z nejdůležitějších vlastností každého vzorku. Snahou je vždy získat objektivní obraz, který zaručuje pravděpodobnost rozložení pozorovaného znaku, která odpovídá tomuto poměru v celé vyšetřované matici. Špatným provedením vzorkování nebo konzervace dochází k chybám, které jsou již většinou nevratné. Proto je nutné věnovat této části komplexního analytického procesu největší pozornost. Před samotným odběrem vzorku je zapotřebí vědět, jaké analyty budou sledovány. Na základě toho je vhodné sestavit si plán celého procesu, zahrnující správně zvolený typ vzorkovnic, transport a uchování; pouze takto lze předcházet možným chybám [37].

S ohledem na vlastnosti vyšetřovaných látek se vzorky odebírají do skleněných (obvykle sodno-vápenato-křemičitých) nebo plastových (PE, PTFE, PVC, PET) vzorkovnic, popř. je použito přímo odběrového zařízení. Klasický odběr vody může mít dvě podoby. V prvním případě hovoříme o vzorku prostém, který byl odebrán jednorázově a nahodile. Druhou variantou jsou vzorky směsného typu, jimiž se rozumí více vzorků získaných v určitém časovém intervalu, a které byly smíseny ve shodném poměru. Poměrem je myšlen shodný objem jednotlivých vzorků nebo objemy úměrné průtokům. Výběr místa (bod odběru) vychází z plánu vzorkování. Přednost se dává místům, kde je voda dobře promíchávána a nedochází tak k vertikální stratifikaci [36, 37].

Protože velká část analytů podléhá změnám, je kladen důraz na co možná nejkratší dobu mezi odběrem a vlastní analýzou. V praxi není vždy jednoduché splnit tento požadavek; proto je třeba omezit problémy způsobené rozkladem látek. Pro tyto účely se využívá především zchlazení vzorku, úprava pH nebo přidavek konzervačních činidel [37].

Vhodným vzorkováním, konzervací i postupem pro vypracování celého programu se v ČR zabývají české technické normy. V následujícím přehledu uvádíme normy obecného charakteru včetně norem vztahujících se k odpadním vodám:

- ČSN EN ISO 5667-1 (757051) Jakost vod - Odběr vzorků - Část 1: Návod pro návrh programu odběru vzorků a pro způsoby odběru vzorků.
- ČSN EN ISO 5667-3 Kvalita vod - Odběr vzorků - Část 3: Konzervace vzorků vod a manipulace s nimi.
- ČSN ISO 5667-10 (757051) Jakost vod. Odběr vzorků. Část 10: Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod.
- ČSN ISO 5667-14 (757051) Jakost vod - Odběr vzorků - Část 14: Pokyny k zabezpečování jakosti odběru vzorků vod a manipulace s nimi.

2.3.2 Úprava vzorku

Úprava vzorku před samotnou analýzou je nedílnou součástí každého stanovení. Tento krok je téměř samozřejmostí v souvislosti s jeho znečištěním (vzorek odpadní vody), případně vzhledem k jeho komplexnímu složení. Součástí procesu úpravy může být přímo i následná izolace a zakoncentrování analytu. Poslední dva kroky jsou velmi důležité pro stanovení nízkých až stopových množství analyzovaných látek. Vzhledem k tomu byly vyvinuty metody založené na extrakci vzorku [38].

2.3.2.1 Extrakce tuhou fází

Při analýze vzorků ze životního prostředí je hlavním záměrem environmentální analýzy především snížení množství použitých organických rozpouštědel během extrakce, dále zmenšení velikosti přístrojového zařízení, redukce jednotlivých operací apod. V dnešní době se pro tyto účely nejčastěji používá extrakce tuhou fází (*SPE - Solid Phase Extraction*). Tato metoda eliminuje nevýhody extrakce kapalina-kapalina (objem použitého organického rozpouštědla, možnost tvorby emulzí, toxický odpad, cena, čas atd.). Velkou předností SPE je vyšší účinnost zakoncentrování a možnost práce v terénu [38, 39].

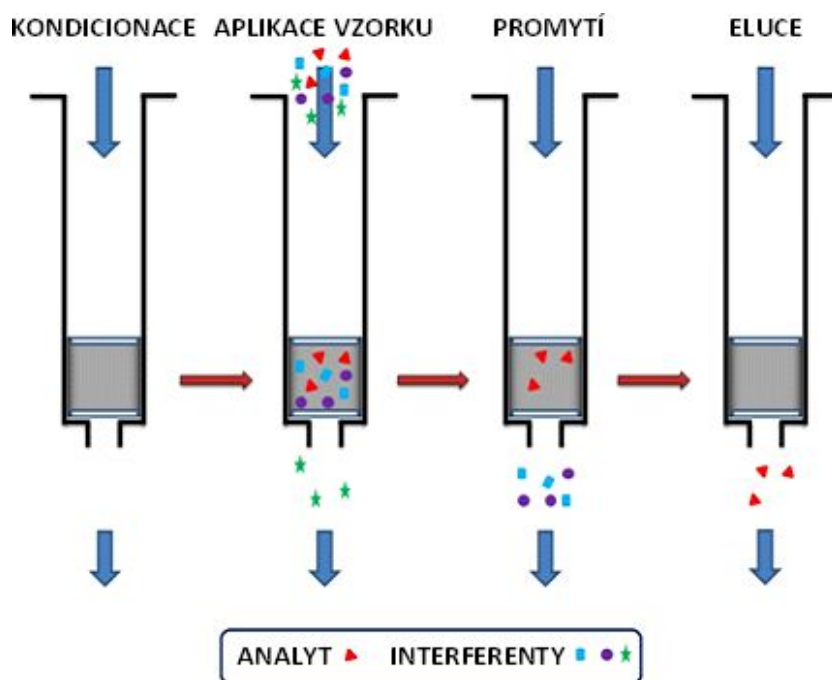
Sorbenty používané pro SPE jsou naplněny do polypropylenových kolonek, které mají svrchu i zespodu umístěnou fritku, aby tuhá fáze nepropadla ven. Druhou variantou jsou disky, v nichž je sorbent protkán se skleněnými nebo PTFE vlákny. Nejčastěji se jako sorbent používá silikagel a jeho různé modifikace, dále alumina, florisil, aktivní uhlí, porézní grafit, TiO_2 a ZrO_2 . Důležitou úlohu sehrávají také polymery. Jako hlavní zástupce kopolymerů lze uvést především poly(styren-divinylbenzen), poly(N-vinylpyrrolidin-divinylbenzen) nebo poly(methakrylát-divinylbenzen). Nesmíme však zapomenout ani na sorbenty pracující na principu iontové výměnných fází (ionexy) a na molekulárně vtištěné polymery (MIPs). Výběr kolony s vhodným sorbentem záleží na vlastnostech analytu, sorbentu, ale také na její ceně [39, 40].

Díky interakcím probíhajícím mezi vzorkem, tuhou fází a použitým rozpouštědlem, se na sorbent naváží pouze složky se silným vzájemným působením a zbylé vytečou ven spolu s organickým rozpouštědlem. Analyt je možno eluovat z kolony buď tepelnou desorpcí s následnou analýzou na plynovém chromatografu, nebo pomocí rozpouštědla o vyšší eluční síle. Po zakoncentrování jej můžeme analyzovat metodou plynové nebo kapalinové chromatografie (problematika vzájemných interakcí je více popsána v kapitole 2.3.3 *Chromatografie*) [38, 39].

Celý postup SPE může být popsán následujícími kroky:

1. **Kondicionace vhodným rozpouštědlem** – aktivace sorbentu.
2. **Aplikace vzorku** – analyt se v kontaktu se sorbentem zachytí a tím se oddělí od většiny matrice.
3. **Promytí sorbentu** – nebo také **eluze interferentů** je krok, při němž se odstraní nečistoty a analyt se takto dále zakoncentrovává. Volba rozpouštědla je závislá na nerozpustnosti analytu.
4. **Desorpce analytu** – viz výše.

Pro zvýšení průtoku sorpční kolonkou se využívá přetlak na vstupu nebo podtlak na výstupu [38, 39].



Obrázek 2.6 Průběh extrakce tuhou fází [41]. Upraveno.

Výběr kolonek pro beta-blokátory

V poslední době se kolonky s náplní modifikovaného silikagelu C18 pro kardiovaskulární léčiva využívají jen zřídka. V mnoha studiích se dává přednost novým polymerním sorbentům složených z lipofilního (divinylbenzen) a hydrofilního monomeru, např. Oasis® HLB nebo Strata X. Rovněž byl sledován vliv hodnoty pH (4; 7,5; 10) na výtěžnost beta-blokátorů na kolonce Oasis® HLB. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší výtěžnosti (více jak 60 %) bylo dosaženo při pH 10. Naopak nejnižší účinnost vykazovala kolonka v kyselé oblasti (méně jak 10 %) [42].

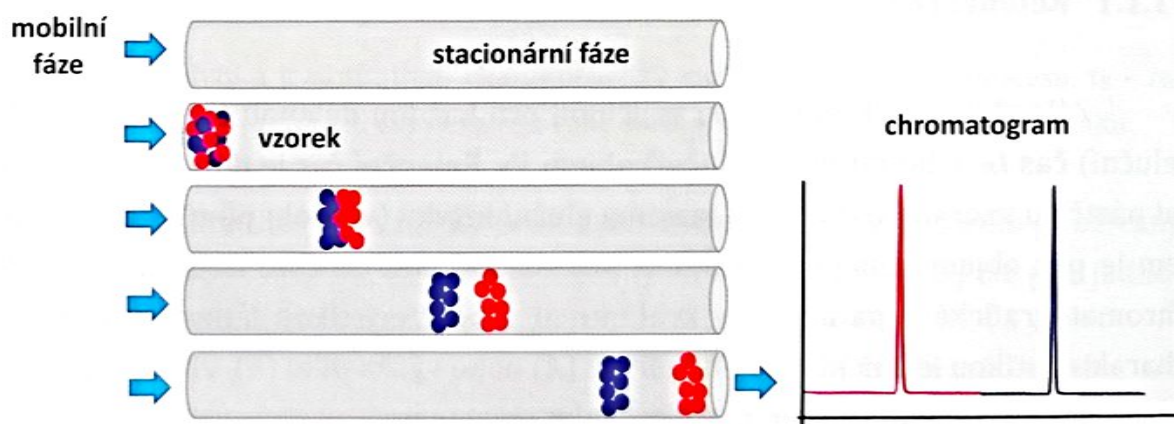
Porovnáním publikací z této vědní oblasti bylo potvrzeno, že kolonky Oasis® HLB opravdu patří mezi ty nejvhodnější. Vysoká výtěžnost se také potvrdila u kolonek s ionexy (Oasis® MCX). Rovněž bylo zjištěno, že některé beta-blokátory se nejlépe zachycují na sorbentech na bázi MIPs [6, 16, 21, 35, 43].

2.3.3 Chromatografie

Ačkoliv byla chromatografie poprvé popsána a použita ve 20. století ruským botanikem Cvětem, můžeme se s tímto procesem běžně setkávat i v přírodě, kde probíhá samovolně [44, 45, 46].

Obecným principem chromatografie je separace složek obsažených ve vzorku mezi dvě fáze, a to na základě různé afinity ke stacionární fázi (viz níže). Pro detailnější porozumění tohoto mechanismu je důležité představit si na pohled rovnovážný systém, který je rozdělen na dvě fáze, v němž jednotlivé částice (molekuly, ionty) mezi sebou neustále interagují (adsorpce, chemisorpce, uplatnění intermolekulárních sil), porušují rovnováhu ve fázích a za účelem vyrovnání koncentračního gradientu opět difundují. Tyto přechody jsou náhodné a

strávený čas molekul v každé fázi je rozdílný. Při zachování jednotných podmínek je však v daném časovém intervalu průměrná doba výskytu složky v každé fázi neměnná. Tento fakt je nepostradatelný pro průběh chromatografického procesu [44, 46, 47].



Obrázek 2.7 Princip separace dvou látek v koloně chromatografu [48].

Jak již bylo zmíněno, nedílnou součástí chromatografie je přítomnost dvou fází s fázovým rozhraním. Fáze se od sebe liší ve svých fyzikálních i chemických vlastnostech. První fáze se nazývá mobilní neboli pohyblivá. Její skupenství může být kapalné, plynné, popř. tekutina v nadkritickém stavu. Skupenství druhé fáze, která je naopak stacionární (nepohyblivá), se vyskytuje v rozličných formách. Jedná se především o pevné částice velikosti v rozmezí mikrometrů (zde platí, že čím menší částice jsou, tím účinnější je i separace). Další možností podoby sorbentu (stacionární fáze) je např. využití tenkých filmů kapaliny nanesených z vnitřní strany kapiláry [47, 49, 50].

Rozdělení chromatografie lze posuzovat z více hledisek. Základní přehled je prezentován v následující *Tabulce 2.7*.

Tabulka 2.7 Přehled nejdůležitějších chromatografických technik [50].

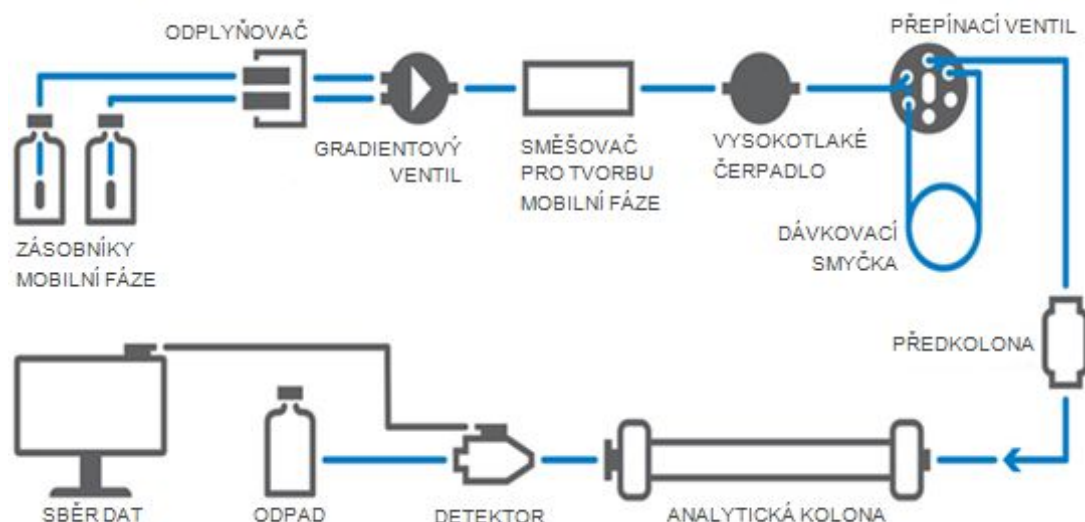
Fáze mobilní	Fáze stacionární	Chromatografická technika	Užívaný symbol
plyn (plynová chromatografie)	kapalina	plynová rozdělovací chromatografie	GLC
	tuhá látka	plynová adsorpční chromatografie	GSC
kapalina (kapalinová chromatografie)	kapalina	kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
		gelová permeační chromatografie	GPC
	tuhá látka	kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
		iontová chromatografie	IEC

2.3.3.1 Kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography*) a ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*Ultra-High Performance Chromatography*) využívají k separaci směsí látek kapalinu jako mobilní fázi. Chromatografická kolona obsahuje stacionární fázi, která by měla mít určité parametry, zejména být chemicky a tepelně stabilní. Reakce, případně rozpustnost v mobilní fázi je zcela nepřipustná, neboť by mohlo dojít ke snížení citlivosti detekce a selektivity stacionární fáze. Běžně používanými náplněmi bývají anorganické oxidy (silikagel, Al_2O_3 , TiO_2), modifikovaný silikagel (např. oktadecylsilikagel C_{18}), polymerní a hybridní stacionární fáze nebo porézní grafitový uhlík a jeho modifikace [48].

Výhodou, a také hlavním důvodem aplikace této metody je použitelnost pro separaci málo těkavých a netěkavých látek, dále potom její využití pro teplotně nestálé vzorky. HPLC a UHPLC jsou vhodné jak pro analýzu polárních, tak také nepolárních látek. Mezi další přednosti kapalinové chromatografie patří možnost ovlivnění retence složek daného vzorku použitím rozpouštědla (popř. jeho směsi) o různé polaritě. Mobilní fáze může separovat jednotlivé složky směsi na základě konstantního složení (tzv. isokratická eluce), nebo lze v průběhu analýzy programově měnit její složení a tím zvyšovat sílu eluce (tzv. gradientová eluce). Isokratická eluce se využívá především v případě podobných fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých složek analytu. Pokud však mají analyzované složky obsažené ve vzorku své fyzikálně-chemické vlastnosti rozdílné, dává se přednost eluci s gradientovým průběhem. Povaha mobilní fáze může mít značný vliv na rychlost analýzy, šířku piků i na kapacitu separace, tj. množství piků, které lze v daném časovém úseku rozdělit až na základní linii [47, 48, 49].

V poslední době je nezbytným požadavkem šetrnost k životnímu prostředí, a to nejen v analytické chemii. Při použití HPLC se spotřebovává relativně vysoké množství organického rozpouštědla, a také celá metoda klade vyšší nároky na čas separace. Z tohoto důvodu byla vyvinuta metoda UHPLC. Aparatura se liší ve velikosti částic sorbentu (ty se pohybují v řádu 1,5–2 μm), délce použité kolony (50 až 150 mm), s vnitřním průměrem obvykle 2,1 mm. Vzhledem ke snížení průtoku v koloně bylo nutné zvýšit tlak až na 100 MPa a více, v porovnání s běžným tlakem 30–40 MPa u HPLC. K tomuto účelu slouží robustní čerpadla. Tato tzv. zelená metoda se vyznačuje nejen nižšími nároky na použítá rozpouštědla, ale zároveň zvyšuje citlivost aparatury, účinnost a umožňuje lepší rozlišení separovaných analytů, což má obrovský význam při stanovení nízkých koncentrací látek [48, 51].



Obrázek 2.8 Obecné schéma HPLC [52]. Upraveno.

2.3.3.2 Detektory kapalinové chromatografie

Ihned za kolonu, v níž se jednotlivé složky od sebe separují, je připojen detektor. Jeho úkolem je detekovat analyt a převést jej na měřitelný signál. Signál je nejprve zesílen a následně je odeslán k dalšímu zpracování. Požadavky na kvalitní detektor jsou rozmanité, uvádíme však především vysokou citlivost, spolehlivost, nízkou selektivitu, snahu rozlišit mobilní fázi od signálu analytu a další [47, 49].

Pro kapalinovou chromatografii se využívají různé detektory. V následujícím přehledu uvádíme ty nejvýznamnější z nich [44, 47, 50].

Fotometrické a spektrofotometrické detektory

Patří mezi nejpoužívanější detektory. Princip je stejný jako u UV/VIS spektrofotometrie. Původní signál I_0 je určen pomocí referenční kyvety, kterou žádný analyt neprochází. Pokles signálu I pak detekuje přítomnost látky, která absorbuje elektromagnetické záření v oblasti vlnové délky detektoru [38].

Protože velké množství rozpouštědel v mobilní fázi neabsorbuje záření v UV/VIS oblasti (nebo jen velmi málo), zvyšuje se tím výrazně citlivost tohoto detektoru. Protikladem je oblast infračerveného záření, kde je míra absorpce záření rozpouštědel vysoká, a proto je jejich využitelnost v kapalinové chromatografii téměř mizivá. Detektory jsou vybaveny průtokovou celou, která z hlediska analytických potřeb musí mít malý objem a velkou optickou dráhu, aby byla citlivost co nejvyšší [44, 49, 50].

Na základě výběru vlnové délky lze rozčlenit zmíněné detektory do čtyř typů:

- **Detektory s pevně danou vlnovou délkou** – zdrojem záření bývá nízkotlaká rtuťová výbojka, jejíž emisní čára má vlnovou délku 253,7 nm. Dalším zdrojem, využívajícím se u těchto typů detektorů, může být nízkotlaká zinková výbojka (operující s vlnovou délkou 212 nm), nebo nízkotlaká kadmiová výbojka (monochromatické záření odpovídající 225 nm).
- **Detektory s předem měnitelnou vlnovou délkou** – vzhledem k možné výměně interferenčních filtrů se nabízí možnost operovat s rozdílnými, předem nabízenými vlnovými délkami.

- **Detektory s programovatelnou vlnovou délkou** – výhodou využití těchto zařízení je možnost změny vlnové délky během analýzy. Zdroj emituje polychromatické záření, z něhož potom monochromátor vybírá konkrétní vlnovou délku vhodnou k detekci, zpravidla v rozsahu 190–700 nm. Některé typy detektorů se vyznačují vlastností skenovat spektra látek. V takovém případě musí být zastaven tok mobilní fáze. Existují však i rychle skenující spektrofotometrické přístroje pracující během nepřerušného toku. Další varianta představuje detektory měřící více vlnových délek najednou, maximálně však čtyři.
- **Detektory s fotodiodovým polem (*diode array detektor, DAD*)** – při kontinuálním toku mobilní fáze je zaznamenávání signálu v celé oblasti spektra zajištěno fotodiodovým polem.

Princip DAD

Zdroj produkuje záření, které prochází optickými prvky a měrnou celou, kde dochází k zeslabení zářivého toku absorpcí. Spektrum záření je rozloženo pomocí holografické mřížky a dopadá na diodové pole. Jedná se o malou křemíkovou destičku v délce 1–2 cm, na níž je umístěno 512–1 024 plošných fotodiod. Dopadem záření na diodu vzniká fotoelektrický proud, který vybíjí kondenzátor na ni napojený. Jeho velikost je úměrná intenzitě dopadajícího zářivého toku. Proud potřebný na dobítí kondenzátorů se měří a jeho hodnoty se ukládají. Každá fotodioda slouží k detekci pouze konkrétní vlnové délky, takže celý soubor je schopen snímat spektra dílčích píků v chromatogramu. Zmíněný atribut může vést ke snadnější identifikaci eluovaných látek [38, 44, 46, 48, 50].

Luminiscenční detektory

V oborech jako je ochrana životního prostředí, kde je nutné sledovat velmi nízké (až stopové) koncentrace různých látek, hrají významnou roli detektory založené na snímání emitovaného luminiscenčního záření (zejména fluorescence nebo fosforescence). Tato metoda je vysoce selektivní, protože vlastnost luminiscence vykazují pouze určité funkční skupiny, kterým říkáme luminofory [44, 46].

Monochromatické záření prochází průtokovou celou, kde fotony dopadající na molekuly excitují elektrony ze základního energetického stavu do vyšších singletových hladin (dochází také k excitaci ze základních vibračních hladin do jejich vyšších stavů). K uvolnění energie a přechodu molekuly opět na základní stav potom dochází buď fluorescenční emisí, nebo může excitovaná molekula přejít nejdříve do tripletového stavu a posléze odsud přechodem na základní hladinu emituje fosforescenční záření. Emise zmíněných záření má vyšší vlnovou délku než excitační a tím naopak nižší energii. Část energie je nezářivá a je uvolněna během přechodů mezi vibračními hladinami. V praxi se častěji setkáváme s fluorimetrickými detektory, jelikož za normálních teplot vykazuje tuto vlastnost větší množství látek [46, 47].

Samotné čidlo musí být umístěno tak, aby nepřijímalo signály excitačního záření a zároveň aby síla emitovaného fluorescenčního záření byla co největší. Proto bývá čidlo v podobě fotoelektrického násobiče konstruováno v pravém úhlu, a to vzhledem ke směru buzeného záření [44, 50].

Hmotnostní detektor

Využití on-line spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií (také LC/MS) se stává oblíbeným zejména z hlediska výhod vysoké citlivosti detekce separovaných složek analytu spolu s jejich identifikací pomocí získaných hmotnostních spekter [38, 46, 47].

V prvním kroku dochází v iontovém zdroji k ionizaci neutrálních molekul. Pro LC/MS je využíváno tzv. měkkých ionizačních technik za atmosférického tlaku (ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku, fotoionizace za atmosférického tlaku a ionizace desorpcí laserem). Nabité částice jsou dále roztrženy podle poměru m/z (hmotnost/náboj) a urychleny v analyzátoru. Ve finální fázi dochází k detekci a zesílení signálu.

Mezi přednosti spojení LC/MS patří např.:

- detekce analytů při koeluci píků,
- informace o struktuře látky a retenční čas zvyšují jistotu její identifikace,
- analýza složitých směsí a další [48].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Cíl

Cílem bakalářské práce bylo stanovení vybraných léčiv ze skupiny beta-blokátorů v odpadních vodách pomocí metody UHPLC s DAD. Izolace analytů z matrice byla prováděna extrakcí na tuhou fázi (SPE). Byla provedena analýza reálných vzorků odpadní vody odebraných na přítoku a odtoku z čistírny. Cílem bylo rovněž zhodnotit účinnost čistícího procesu pro ČOV s různým počtem EO a různou technologií.

3.2 Použité přístroje a pomůcky

3.2.1 Extrakce tuhou fází

- SPE manifold 12G (J. T. Baker[®], USA)
- SPE kolonky:
 - Supel[™]-Select HLB 60 mg/3 ml (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo)
 - Supel[™]-Select HLB 200 mg/6 ml (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo)
 - SupelClean[™] ENVI-18 1g/6 ml (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo)
 - Oasis[®] HLB 60 mg/3 ml (Waters, USA)
 - Bakerbond[®] Octadecyl 500 mg/3 ml (J. T. Baker[®], USA)
- membránová vývěva KNF lab, LABOPORT

3.2.2 Kapalinová chromatografie

- Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity LC system (Agilent, USA)
 - Kolona ZORBAX SB-C18, Rapid Resolution HD 2,1 × 100 mm, velikost částic 1,8 μm
 - Detektor UV/VIS DAD; zdroj světla – deuteriová lampa, vlnový rozsah 190-640 nm, 1 024 fotodiod

3.2.3 Ostatní přístroje a pomůcky

- Analytické váhy HR-120-EC (A&D Instruments Ltd., Japonsko)
- Milli-Q[®] Academic (Millipore) – přístroj pro přípravu Milli-Q vody
- pH metr inoLab[®] 730 (WTW s. r. o., Německo)
- rotační vakuová odparka Rotavapor[®] R-200/205 (BÜCHI Labortechnik AG, Švýcarsko)
- EVATERM (LABICOM s. r. o., Česká republika) – přístroj pro sušení dusíkem
 - inertní plyn dusík N₂, čistota 4.7 (SIAD Czech, s. r. o.)
- Filtry
 - LUT Syringe Filter PTFE; 13 mm; 0,45 μm (LABICOM s. r. o., Česká republika)
 - Cronus Syringe Filter Nylon; 4 mm; 0,2 μm (SMI-LabHut Ltd, Velká Británie)

- filtrační papíry pro kvalitativní analýzu KA 2, průměr 150 mm (Papírna Perštejn s.r.o. Keseg & Rathouský, Česká republika)
- skleněné filtry MN GF-1, průměr 55 mm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Německo)
- běžné laboratorní vybavení

3.3 Chemikálie a standardy

3.3.1 Chemikálie

- Fosforečnan draselný kyselý p.a., Lachema n. p. Brno
- Kyselina chlorovodíková – 35 % p. a., Penta
- Hydroxid sodný p. a., Lach-Ner, s. r. o.
- Methanol CHROMASOLV[®], for HPLC, čistota $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo)
- Acetonitril HPLC gradient grade, čistota $\geq 99,9$ % (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo)

3.3.2 Standardy

- Acebutolol hydrochlorid (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo)
- Atenolol, čistota ≥ 98 %, TLC (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo)
- Bisoprolol $\geq 98,0$ % (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo)

3.4 Sledovaná matrice

Pro odběr vzorků byly vybrány tři ČOV lišící se různou kapacitu EO. Kromě toho se rovněž odlišovaly použitou technologií při čištění odpadních vod.

3.4.1 ČOV v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno

Do čistírny odpadních vod situované na území VFU Brno přitéká odpadní voda z téměř všech budov univerzity. Jejím úkolem je předčistit a dezinfikovat vodu, která je následně vypouštěna do kanalizační sítě města Brna. ČOV byla vystavěna na přelomu 60. až 70. let minulého století a k její částečné rekonstrukci došlo v roce 1992. Původní kapacita, která činila pouze 40 m³/den, byla naprosto nedostačující pro zvyšující se objem infikované vody. Na základě možného překročení limitů stanovených kanalizačním řádem města Brna, byla v letech 2009–2010 celá čistírna kompletně zrekonstruována [53, 54].

Nyní je ČOV vybavena mechanickým stupněm, který je složený z hrubého předčištění a usazovací nádrže, kde dochází k produkci primárního kalu. V biologickém stupni je voda čerpána nejprve do aktivační nádrže, která je intenzivně provzdušňována. Aktivovaný kal je dodáván z dosazovací nádrže, v níž se voda separuje od nerozpuštěných látek. Poslední část procesu je věnována dezinfekci vody chlorem, odkud dále odtéká do veřejné stokové sítě [54].

Vzniklý kal je následně podroben hygienizaci, která probíhá tak, že kal je stabilizován ve sterilizátoru při teplotě 125 °C po dobu 35 minut. Zchlazený kal je dále rovněž odváděn do kanalizační sítě [54].

3.4.2 ČOV Mikulov

Kompletní rekonstrukce mechanicko-biologické ČOV Mikulov byla provedena v letech 2007–2009. Vybudování nového provozu vedlo k modernizaci technologie a ke zvýšení kapacity čistírny na 24 850 EO. Podle kanalizačního řádu obce Mikulov, vydaného v roce 2009, bylo zatížení čistírny pouze 12 331 EO a účinnost čistírny byla 96,3 % [55, 56].

ČOV Mikulov je vybavena dvěma oběhovými aktivačními nádržemi, kde dochází ke střídání oxických a anoxických podmínek, a to na základě umístění aerátorů v nádrži. Tímto způsobem se nejdříve amoniakální dusík oxiduje na dusitany a potom až na dusičnany (proces nitrifikace v aerobním prostředí). V oblasti anoxických podmínek je postupně spotřebováván kyslík a pomocí denitrifikačních bakterií se dusitany a dusičnany redukuje na atmosférický dusík. Aby nedocházelo k případné sedimentaci aktivovaného kalu, nádrž je v neprovzdušňovaných místech vybavena ponornými vrtulovými míchadly. Voda v celém systému cirkuluje s předpokladem dlouhé doby zdržení [25, 26, 29, 55, 56].



Obrázek 3.1 Oběhové aktivační nádrže ČOV Mikulov [55].

Voda dále vtéká do dvojice dosazovacích nádrží, kde se oddělí aktivovaný kal. Sběrným potrubím je transportována pro následné terciární dočištění, které je vybavené bubnovým mikrofiltrem. Vyčištěná voda odtéká do recipientu. ČOV Mikulov je rovněž vybavena chemickým srážením fosforu a aerobní stabilizací kalu [55, 56].

3.4.3 ČOV Brno-Modřice

Pro město Brno a jeho široké okolí slouží ČOV Brno-Modřice. Z důvodu velkého přetížení a napojování dalších okolních měst a obcí byla tato čistírna v minulosti několikrát postupně rozšiřována, až v letech 2001–2004 byla zcela zrekonstruována. Čistírna je nyní projektována na 513 000 EO [57].

Přes mechanický stupeň, který se skládá z lapáku šterku, česlí, lapáku písku, separátoru tuku a usazovací nádrže, teče znečištěná voda do anaerobní nádrže, kde dochází k biologickému odbourávání fosforu, neboli k defosfataci. Dále je voda čerpána do oběhové anoxické nádrže pracující na principu předřazené denitrifikace. Následuje nádrž s rozčleněnými úseky, z nichž jedna část je vybavená jemnobublinou aerací. Pro dočištění zbytkových dusičnanů slouží přečerpávání kalu z dosazovací nádrže zpět do anoxické zóny. Voda obsahující biologicky neodbouratelný fosfor se může dočistit dávkováním síranu železitého, popř. v zimních měsících ještě v kombinaci se síranem hlinitým. Odtok z ČOV Brno-Modřice ústí do řeky Svratky [58].

3.5 Pozorované analyty

V odpadní vodě byla analyzována tři léčiva ze skupiny beta-blokátorů. Při výběru konkrétních farmak se přihlíželo především k frekvenci předepisování pacientům. Kromě toho byla dalším kritériem snaha zvolit taková léčiva, která mají různé farmakokinetické vlastnosti. Proto byly vybrány acebutolol, atenolol a bisoprolol.

Tabulka 3.1 Vylučování vybraných beta-blokátorů (acebutolol, atenolol a bisoprolol) močí a výkaly [42].

Acebutolol	30–40 % močí; 50–60 % výkaly
Atenolol	v nezměněné podobě vylučováno močí více jak 85 %
Bisoprolol	vylučován močí (50 % jako metabolity, 50 % v nezměněné formě)

3.6 Pracovní postup

3.6.1 Odběr vzorků

Jednotlivé vzorky odpadních vod na přítoku i odtoku z ČOV byly odebírány v termínu od 28. 4. až do 12. 5. 2016. Následující *Tabulka 3.2* představuje základní informace o vzorcích z daných čistíren.

Tabulka 3.2 Data odběrů a typy vzorků pro vybrané ČOV.

ČOV	Datum odběru	Typ vzorku
VFU Brno	5. 5.	prostý
Mikulov	3. 5., 4. 5.	prostý
Brno-Modřice	28. 4., 3. – 5. 5., 12. 5.	směsný

Reprezentativnost vzorku vody z ČOV Brno-Modřice byla zaručena pomocí speciálního odběrového zařízení, které odebíralo vodu v intervalu dvou hodin po dobu jednoho dne. Takto byl získán 24hodinový směsný vzorek. Vzorky z ostatních čistíren byly formou jednorázového odběru odebírány přímo do vzorkovnic.

Všechny vzorkovnice o objemu 1 litr byly vyrobeny z tmavého skla. Předpokladem k úspěšnému dosažení výsledků bylo také řádné označení všech lahví, kde na popisce byly uvedeny hodina, datum odběru a místo odběru. Po transportu byly vzorky okamžitě zpracovány; pokud to nebylo z časových důvodů možné, tak byly uloženy do lednice o teplotě 4–7 °C a zpracovány nejpozději do 24 hodin od odběru.

3.6.2 Předúprava vzorku a extrakce tuhou fází

Z důvodu obsahu nerozpuštěných látek, zahrnovala předúprava filtraci za sníženého tlaku, která byla prováděna přes skleněné filtry. U odpadní vody z přítoku byla před touto úpravou prioritně provedena ještě filtrace přes papírové filtry.

Dalším krokem byla izolace a zakoncentrování analytů pomocí SPE na kolonkách Oasis[®] HLB (Waters, USA) o objemu 3 ml a s náplní sorbentu 60 mg. Pro tento postup bylo využito poznatků získaných studiem vědeckých článků [16, 43]. Kondicionace kolonek byla provedena 6 ml methanolu a 5 ml Milli-Q vody. Objem aplikovaného vzorku závisel na jeho charakteru; pro odpadní vody z přítoku bylo použito 100 ml, zatímco pro vody z odtoku ČOV 200 ml vzorku. S ohledem na výtěžnost kolonek, která je závislá na pH, byla u reálných vzorků tato hodnota kontrolována [42]. Bylo zjištěno, že hodnota pH se u všech vzorků odpadní vody pohybovala okolo pH 7, a proto ji nebylo zapotřebí upravovat. V *Tabulce 3.3* je prezentován použitý postup pro SPE.

Tabulka 3.3 Optimalizovaný postup pro SPE.

Kondicionace	▪ 6 ml methanolu ▪ 5 ml Milli-Q vody
Aplikace vzorku	100 ml z přítoku nebo 200 ml z odtoku
Promytí	▪ 5 ml Milli-Q vody ▪ 1 ml 5% roztoku methanolu v Milli-Q
Sušení	30–35 min proudem vzduchu
Eluce	2 × 4 ml methanolu

Ze získaného eluátu bylo odpařeno rozpouštědlo pomocí rotační vakuové odparky Rotavapor[®] R-200/205 (BÜCHI Labortechnik AG, Švýcarsko) při teplotě 35 °C a tlaku 208 Pa. Odparek byl dosušen proudem inertního plynu a potom rozpuštěn v 25% roztoku methanolu v Milli-Q vodě. Z důvodu analýzy, prováděné metodou UHPLC, bylo ještě zapotřebí vzniklé roztoky přefiltrovat přes stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,45 µm a 0,2 µm.

3.6.3 Stanovení vybraných analytů pomocí kapalinové chromatografie

Finální stanovení vybraných beta-blokátorů bylo provedeno s využitím ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí typu UV/VIS-DAD na přístroji Agilent 1290 Infinity LC system (Agilent, USA). Pro danou metodu byla použita kolona ZORBAX SB-C18, Rapid Resolution HD $2,1 \times 100$ mm s velikostí částic $1,8 \mu\text{m}$.

Byla aplikována gradientová eluce s mobilní fází o složení A: 10 mM roztok pufru KH_2PO_4 , B: acetonitril. Roztok pufru byl okyselen na hodnotu pH 3 kyselinou chlorovodíkovou. Gradient mobilní fáze je prezentován v *Tabulce 3.4*. Optimalizované chromatografické podmínky jsou shrnuty v *Tabulce 3.5*.

Tabulka 3.4 Gradientová eluce.

Čas [min]	A: KH_2PO_4	B: Acetonitril
0–0,6	90	10
0,9–1,8	70	30
2–4	60	40
4,5	90	10

Tabulka 3.5 Chromatografické podmínky.

Mobilní fáze	A: 10 mM roztok KH_2PO_4 v Milli-Q vodě; pH 3 B: Acetonitril
Typ eluce	Gradientová
Nástřik	2 μl
Průtok	0,3 ml/min
Teplota kolony	35 °C
Počáteční tlak v koloně	přibližně 37,5 MPa
Vlnová délka	224 nm
Doba analýzy	4 min + 0,5 min návrat na počáteční složení mobilní fáze
Čas pro vyrovnání tlaku po analýze (post-run)	1,5 min

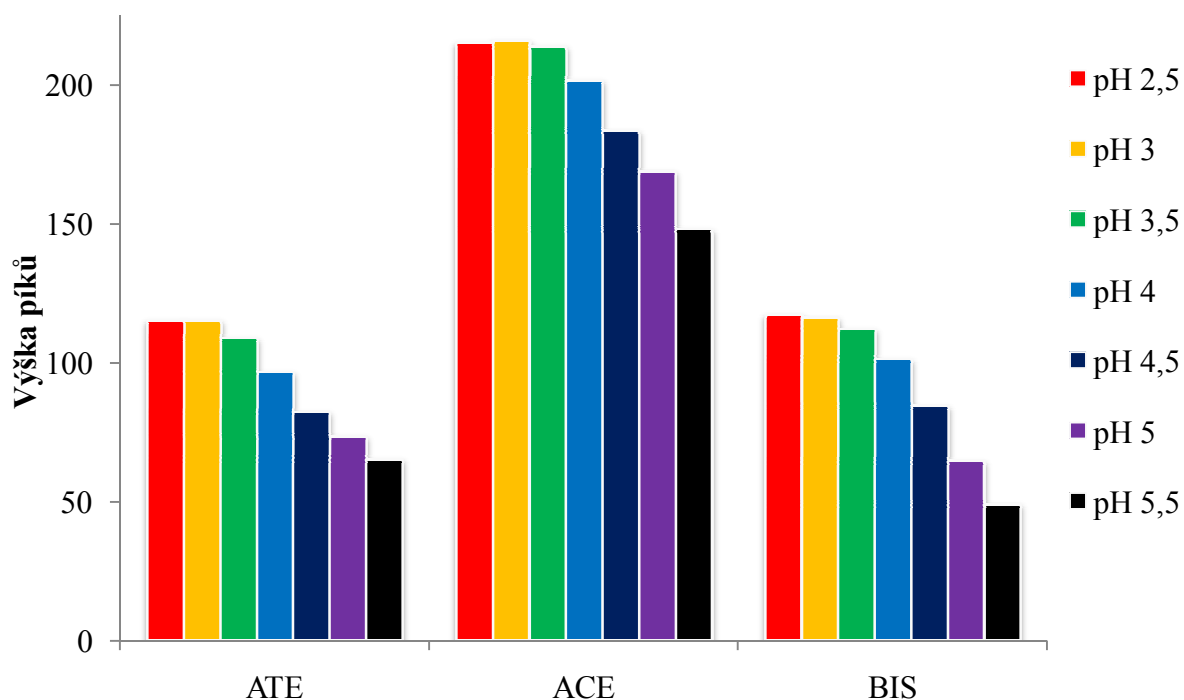
U použitých rozpouštědel, chemikálií, laboratorního vybavení ani prostředí laboratoře nebyla prokázána sekundární kontaminace beta-blokátory.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Optimalizace chromatografických podmínek

4.1.1 Pufr jako součást směsi mobilní fáze – optimalizace pH

Byl připraven 10 mM roztok pufru KH_2PO_4 v Milli-Q vodě. Požadovaných hodnot pH bylo docíleno buď okyselením kyselinou chlorovodíkovou, nebo zalkalizováním hydroxidem sodným. Byla pozorována odezva koncentrací analytů odpovídající výšce píků, a to v závislosti na pH pufru.



Graf 1 Výšky píků vybraných beta-blokátorů (atenolol – ATE, acebutolol – ACE, bisoprolol – BIS) v závislosti na pH pufru.

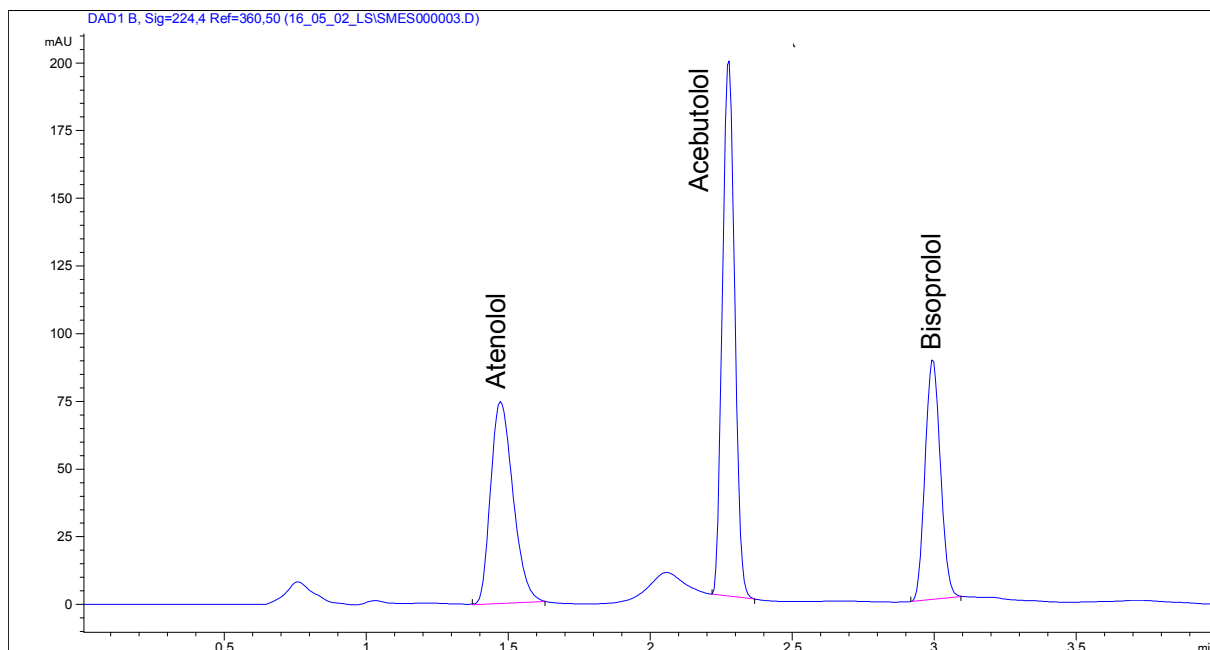
Na podkladě získaných dat lze konstatovat, že se zvyšujícím se pH pufru klesá výška jednotlivých píků, avšak jejich plocha se výrazně nemění. Výšky píků při pH 2,5 a pH 3 byly téměř shodné a prokazatelně nejvyšší. Na základě tohoto zjištění byl pro další práci zvolen pufr o hodnotě pH 3.

4.1.2 Optimalizace gradientu mobilní fáze

Gradient mobilní fáze byl zvolen s ohledem na separaci jednotlivých analytů a rychlost celé analýzy. Retenční časy jednotlivých beta-blokátorů jsou uvedeny v *Tabulce 4.1*. *Obrázek 4.1* představuje výsledný chromatogram sledovaných analytů o koncentraci 0,1 mg/ml, které byly připraveny ze standardů rozpuštěním v 25% roztoku methanolu v Milli-Q vodě.

Tabulka 4.1 Retenční časy sledovaných beta-blokátorů.

Analyt	ATE	ACE	BIS
Čas [min]	1,472	2,275	2,994



Obrázek 4.1 Chromatogram beta-blokátorů (ATE, ACE, BIS) o koncentracích 0,1 mg/ml při optimalizovaných podmínkách gradientu mobilní fáze.

4.1.3 Vliv nástřiku, průtok mobilní fáze, vlnová délka a teplota kolony

Protože změna velikosti nástřiku se odrážela pouze v konstantním zvyšování nebo snižování odezvy jednotlivých beta-blokátorů, byl zvolen optimální nástřik o objemu 2 μ l.

Průtok mobilní fáze výrazně ovlivňoval retenci píků a dobu analýzy. Při průtoku 0,1 ml/min docházelo k eluci složek v poměrně krátkém časovém rozestupu. Píky byly štíhlé a vysoké, avšak nebyly rozděleny až na základní linii. Naopak při průtoku 0,6 ml/min docházelo k rozmývání píků. Vhodný průtok s výslednou dobou analýzy 4 min byl proto 0,3 ml/min.

Vlnová délka, použitá k detekci, byla vzhledem k absorpčním maximům analytů (viz *Tabulka 4.2*) vyhovující při 224 nm. Přestože acebutolol vykazuje svoje maximum při poněkud vyšší vlnové délce (234 nm), intenzita jeho signálu byla vysoká i při vlnové délce 224 nm, která byla následně použita k analýze.

Tabulka 4.2 Absorpční maxima beta-blokátorů.

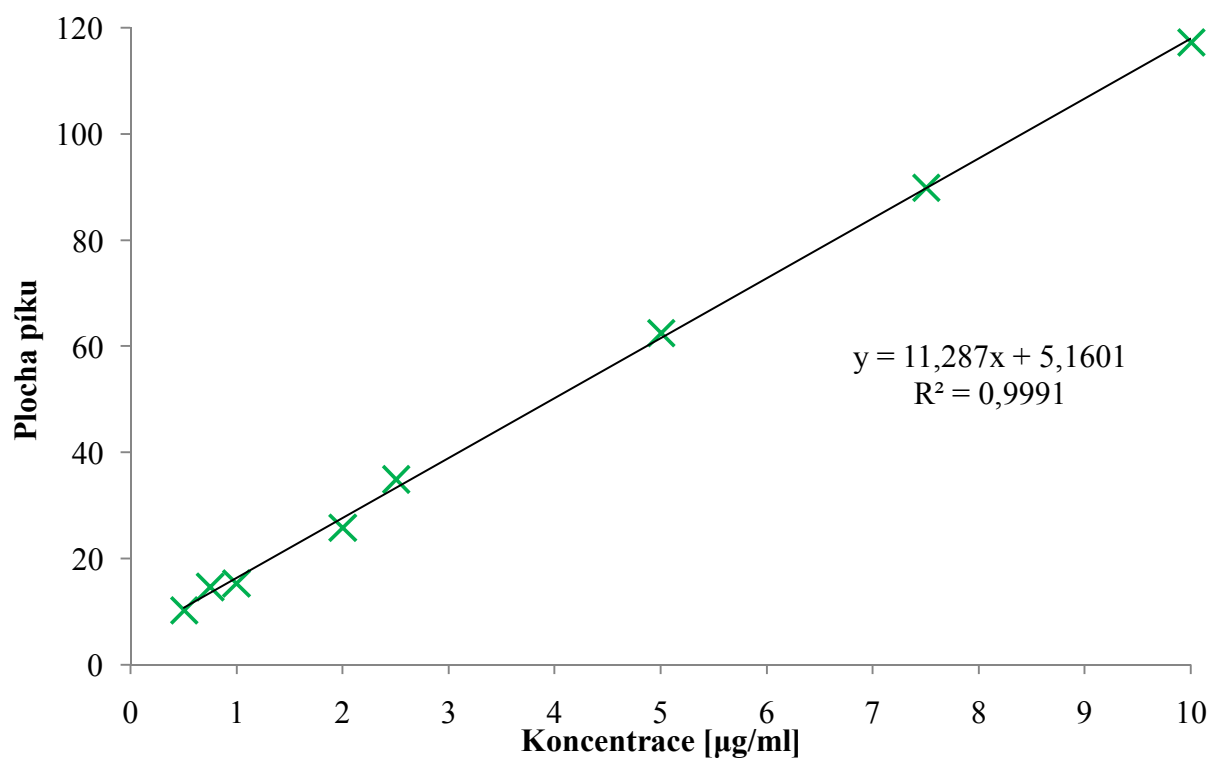
Analyt	ATE	ACE	BIS
$\lambda_{\max}$ [nm]	224	234	224

Poslední fází optimalizace bylo sledování vlivu teploty v chromatografické koloně na koncentrační odezvu. Byly ověřovány tři teploty, a to 25 °C, 35 °C a 45 °C. Bylo zjištěno, že se zvyšující se teplotou dochází k nepatrnému zvýšení a zúžení píků. Rozdíl byl však tak nepatrný, že byla ponechána teplota kolony na 35 °C.

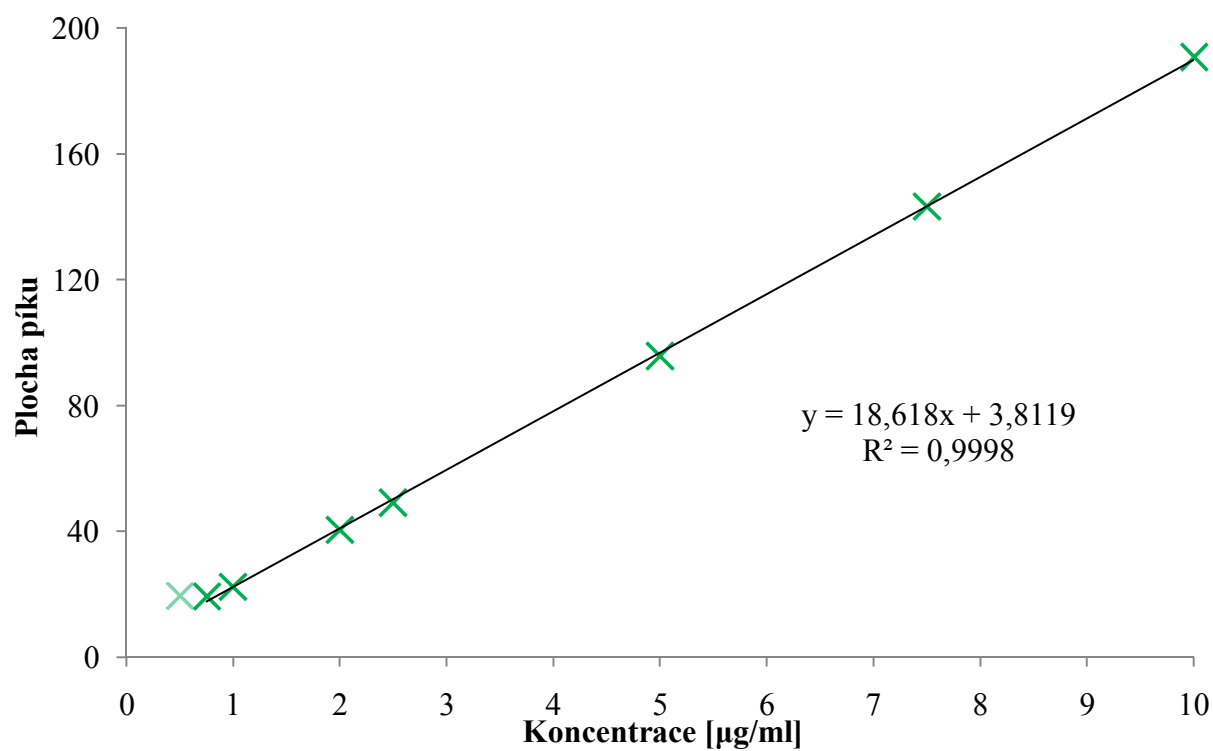
4.2 Kvantifikace beta-blokátorů

4.2.1 Kalibrační křivka

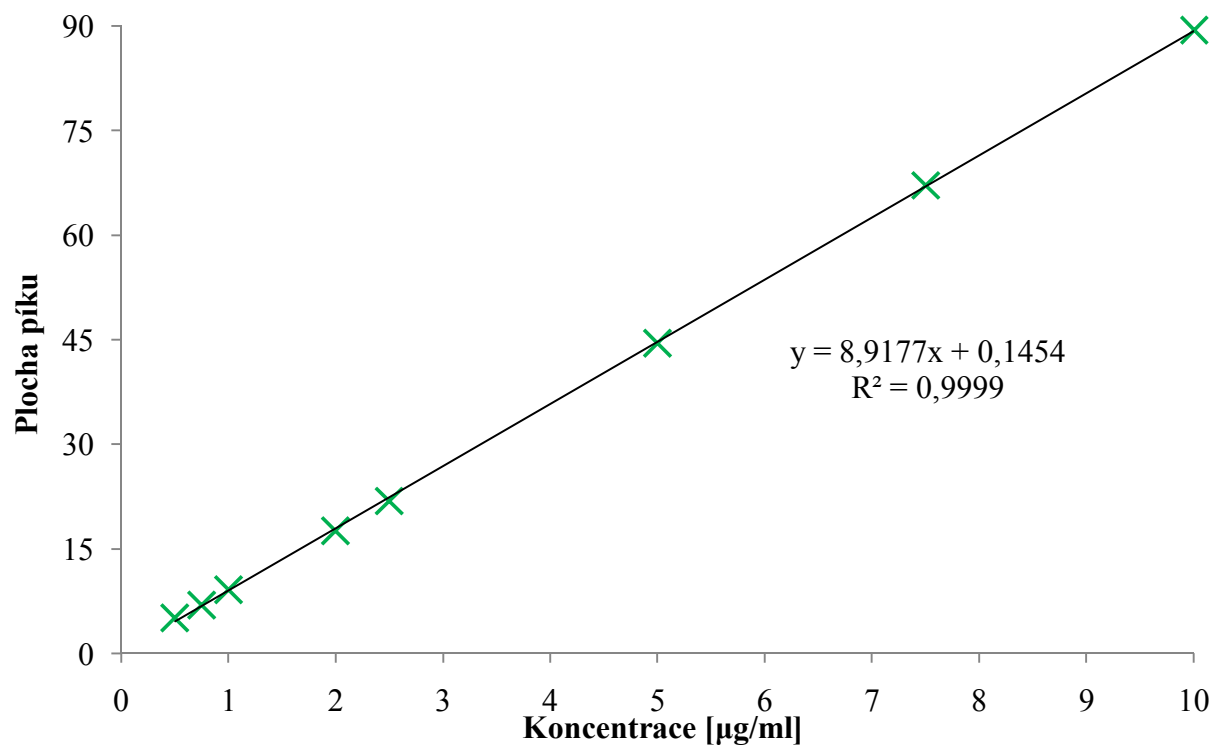
Sestrojení kalibrační křivky bylo nutným předpokladem pro kvantitativní vyhodnocení beta-blokátorů v odpadních vodách. Byly připraveny směsné vzorky o koncentracích 0,5; 0,75; 1; 2; 2,5; 5; 7,5 a 10 µg/ml, které byly následně analyzovány metodou kapalinové chromatografie. Získaná data byla vynesena do grafů závislosti plochy píků na koncentraci (Grafy 2–4).



Graf 2 Kalibrační křivka pro atenolol.



Graf 3 Kalibrační křivka pro acebutolol hydrochlorid.



Graf 4 Kalibrační křivka pro bisoprolol.

4.2.2 Limit detekce a limit kvantifikace

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byly vypočítány podle vztahu (1) a (2):

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot h_n}{m} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot h_n}{m} \quad (2)$$

kde h_n je šum na základní linii a m vyjadřuje směrnici kalibrační křivky závislosti výšky píku na koncentraci, tj. $f(c) = h$. Požadované směrnice byly odečteny z vytvořených kalibračních křivek pro všechny tři beta-blokátory, které jsou uvedeny v předchozí kapitole, a to tak, aby splňovaly podmínky zmíněné definice [59].

Tabulka 4.3 Vypočítané limity detekce a limity kvantifikace pro analyzované beta-blokátory.

	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]
ATE	0,259 0	0,863 3
ACE	0,089 6	0,298 8
BIS	0,315 8	1,053

4.3 Optimalizace extrakce tuhou fází

První krok byl věnován výběru takové kolonky, aby měla co nejvyšší schopnost zachytit sledované analyty beta-blokátorů. Výtěžnost byla pozorována u pěti druhů kolonek s rozdílnými parametry (použitý sorbent a jeho množství, popř. odlišnosti v sorbentech dodaných různými výrobci):

- Oasis[®] HLB 60 mg/3 ml (Waters, USA),
- Bakerbond[®] Octadecyl 500 mg/3 ml (J. T. Baker[®], USA),
- SupelTM-Select HLB 60 mg/3 ml (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo),
- SupelTM-Select HLB 200 mg/6 ml (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo),
- SupelCleanTM ENVI-18 1g/6 ml (Sigma-Aldrich s. r. o., Německo).

Tabulka 4.4 Výtěžnost beta-blokátorů při použití různých kolonek pro SPE vyjádřená v procentech.

Typ kolonky	Výtěžnost [%]		
	ATE	ACE	BIS
Oasis [®] HLB	95,45	92,01	89,19
Bakerbond [®] C18	95,15	90,14	91,27
Supel TM -Select HLB 60 mg	9,82	88,76	91,69
Supel TM -Select HLB 200 mg	9,02	88,50	87,79
SupelClean TM ENVI-18	35,94	7,05	n. d.

n. d. – nedetekováno

Nejvhodnějšími kolonkami pro izolaci vybraných analytů byly Oasis[®] HLB a Bakerbond[®] Octadecyl, s výtěžností pohybující se okolo 90 %. Naopak kolonky Supel[™]-Select HLB vůbec nevyhovovaly, protože ani v jednom případě u nich nepřekročila výtěžnost hranici 10 % pro atenolol, a to i přesto, že složení jejich sorbentu by mělo být obdobné jako u kolonek Oasis[®] HLB. Kolonka SupelClean[™] ENVI-18 měla v celkovém zhodnocení nejhorší výtěžnost pro všechny analyty; bisoprolol nebyl sorbován vůbec. S ohledem na vybavení laboratoře byla pro účely SPE vybrána kolonka Oasis[®] HLB 60 mg/3 ml od firmy Waters (USA).

V již dříve publikovaných člancích zaměřujících se na stanovení beta-blokátorů ve vodě nebo v moči byla zjišťována vysoká výtěžnost u zmíněné kolonky Oasis[®] HLB. Z toho důvodu ji autoři upřednostňují ve svých pracích a vesměs doporučují jako optimální při analýze beta-blokátorů [11, 16, 43].

4.4 Reálné vzorky odpadní vody

Reálné vzorky byly odebrány ze tří čistíren odpadních vod (konkrétně ČOV Brno-Modřice, ČOV Mikulov a ČOV v areálu VFU Brno) a byl u nich zjišťován výskyt vybraných beta-blokátorů na přítoku a na odtoku. Všechny reálné vzorky byly analyzovány a ke kvantifikaci analytů byla použita metoda standardního přídavku. Vyhodnocování výsledků bylo provedeno na základě sestrojených kalibračních křivek.

4.4.1 Matriční efekt

Z důvodu komplexního složení reálné odpadní vody byl posuzován vliv matrice. Do modelové odpadní vody odebrané z ČOV Brno-Modřice, obsahující nedetekovatelné množství analytů, byl přidán 1 ml roztoku připraveného ze směsi standardů o koncentraci 5 µg/ml (střední hodnota kalibrační křivky). Takto připravená odpadní voda z přítoku i z odtoku byla upravena standardním procesem a extrakt byl zakoncentrován; analýza pomocí UHPLC byla provedena shodným způsobem.

Každý vzorek byl připraven paralelně třikrát a získaná data byla zprůměrována. Matriční efekt byl vypočítán z poměru plochy píků v modelové odpadní vodě ku ploše píků standardů. V *Tabulce 4.5* jsou uvedeny výsledné hodnoty.

Tabulka 4.5 Hodnoty matričního efektu pro přítok a odtok.

	Přítok			Odtok		
	ATE	ACE	BIS	ATE	ACE	BIS
Průměrná plocha píku	59,35	84,64	31,83	52,16	86,49	29,32
Smodch. výběr	5,645	9,627	2,004	4,651	6,908	3,011
Matriční efekt [%]	105,3	97,76	83,08	92,53	99,90	76,52

Z tabulky je patrné, že v odpadní vodě odebrané na přítoku se projevil nízký matriční efekt u acebutololu a bisoprolu. V případě atenololu byl matriční efekt prokázán. V odpadní vodě odebrané na odtoku byl matriční efekt u atenololu a acebutololu nízký, zatímco u bisoprololu měl matriční efekt střední hodnotu.

4.4.2 Výsledky

Zpracovaná data jsou přehledně prezentována v *Tabulce 4.6*.

Tabulka 4.6 Údaje získané analýzou vybraných beta-blokátorů v ČOV na přítoku a odtoku.

	Datum	Koncentrace na přítoku [µg/l]			Koncentrace na odtoku [µg/l]		
		ATE	ACE	BIS	ATE	ACE	BIS
Brno-Modřice	28. 4.	< LOQ	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	3. 5.	< LOQ	6,114	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	4. 5.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	5. 5.	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
	12. 5.	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOD
Mikulov	3. 5.	< LOQ	3,219	< LOD	< LOD	1,671	< LOD
	4. 5.	< LOQ	3,739	< LOQ	< LOD	< LOQ	< LOD
VFU Brno	5. 5.	< LOQ	< LOQ	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOD

Z prezentovaných výsledků vyplývá, že ve většině případů byly koncentrace stanovovaných látek pod mezí detekce, případně pod mezí kvantifikace. Kvantifikovatelné koncentrace byly v ojedinělých případech prokázány pouze u acebutololu.

4.4.3 Zhodnocení účinnosti čistíren

Na základě provedených analýz a získaných dat nebylo možné porovnat a zhodnotit účinnost eliminace beta-blokátorů ve sledovaných ČOV. Pouze v jediném vzorku na odtoku (ČOV Mikulov) byla stanovena konkrétní číselná hodnota, což však není dostatečně vypovídající. Z prezentovaných výsledků je pouze možné předpokládat, že i přes nízké koncentrace nemusí být eliminace kardiovaskulárních léčiv z odpadních vod úspěšná.

5. ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce je zaměřena na distribuci léčiv a jejich stanovení v odpadních vodách odebraných ze tří čistíren odpadních vod s různým počtem EO a s různými technologiemi čištění. Konkrétně byla práce zaměřena na farmaka ze skupiny beta-blokátorů, tj. na léčiva hojně používaná při léčbě hypertenze a dalších kardiovaskulárních onemocnění.

Hlavním cílem práce bylo optimalizovat komplexní metodu vhodnou k analýze vybraných beta-blokátorů a na základě dosažených výsledků zhodnotit účinnost eliminace těchto specifických analytů v ČOV. Vzorky odpadních vod byly odebírány vždy na přítoku a na odtoku a z rozdílů koncentrací v nich obsažených beta-blokátorů měla být posouzena efektivita čištění těchto vod ve sledovaných čistírnách.

K finálnímu stanovení vybraných beta-blokátorů (acebutolol, atenolol a bisoprolol) se osvědčila separace pomocí metody ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) s UV-VIS detekcí, s využitím diodového pole (DAD). Tato metoda byla vybrána z důvodů nižších nároků na spotřebu organických rozpouštědel, dále vzhledem k její dobré citlivosti a také poměrně rychle probíhající analýze.

Izolace a zakoncentrování analytu bylo provedeno prostřednictvím extrakce tuhou fází (SPE). Při její optimalizaci byla porovnávána vhodnost pěti typů kolonek. Bylo prokázáno, že nejvhodnější k sorpci výše zmíněných beta-blokátorů byla kolonka se sorbentem na bázi kopolymeru nebo oktadecylsilikagelu. Vzhledem k vybavení laboratoře tyto požadavky nejlépe splňovala kolonka Oasis[®] HLB od firmy Waters (USA).

Velká pozornost byla rovněž věnována hodnotě pH pufru, který byl součástí mobilní fáze při aplikaci metody UHPLC. Porovnání bylo provedeno na základě odezvy koncentrací jednotlivých analytů, projevujících se výškou chromatografického píku. Výsledky prokázaly, že zvyšující se pH má negativní vliv na odezvu, a proto byl pro analýzu vybrán pufr s hodnotou pH 3.

Pomocí výše popsané optimalizované metody nebyly vesměs prokázány sledované analyty v reálných vzorcích odpadních vod. Bylo zjištěno, že tyto beta-blokátory se ve většině vzorků nacházely pod mezí kvantifikace, případně až pod mezí detekce. Ze získaných dat proto není možné porovnávat kvalitu procesu čištění odpadních vod. Doporučením pro další práci by pravděpodobně mohlo být využití jiné přístrojové techniky, např. LC/MS. V tomto případě by však byla nutná nová optimalizace metody, neboť použitý fosforečnanový pufr, aplikovaný v této práci, není vhodný pro hmotnostní detekci, a to z důvodu vysrážení na koloně.

Přestože provedený experiment neposkytl hodnotitelná data, sledování výskytu farmak na bázi beta-blokátorů v odpadních vodách by mělo být prováděno i nadále. Právě kvalita vypouštěné vody z ČOV může mít značný dopad na životní prostředí. S ohledem na tuto skutečnost je otázkou, zda by se danou problematikou neměla zabývat i legislativa.

6. SEZNAM CITOVANÝCH ZDROJŮ

- [1] Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech). In: *Sbírka zákonů ČR*. 6. 12. 2007. 115/2007. 378 s. Dostupný také z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378>
- [2] STONE, T a Gail DARLINGTON. *Léky, drogy, jedy*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2003. ISBN 80-200-1065-3.
- [3] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- [4] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 3., upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-875-7.
- [5] SLÍVA, Jiří a Martin VOTAVA. *Farmakologie*. Praha: Triton, 2011. Lékařské repetitorium. ISBN 978-80-7387-500-8.
- [6] ALDER, Alfredo C., Christian SCHAFFNER, Marius MAJEWSKY, Jörg KLASMEIER a Kathrin FENNER. Fate of β -blocker human pharmaceuticals in surface water: Comparison of measured and simulated concentrations in the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Water Research* [online]. 2010, **44**(3), 936-948 [cit. 2016-04-05]. DOI: 10.1016/j.watres.2009.10.002. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135409006575>
- [7] VÍTOVEC, Jiří a Jindřich ŠPINAR. Přehled současných moderních betablokátorů v léčbě kardiovaskulárních onemocnění. *Praktické lékařství*. 2008, **4**(4), 162-164. ISSN 1803-5329. Dostupné také z: www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2008/04/03.pdf
- [8] *The PubChem Project* [online]. 2016 [cit. 2016-04-27]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [9] *Český lékopis 1997* [online]. ©2002-2003 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: <http://www.lekopis.cz/>
- [10] *DrugBank* [online]. [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/>
- [11] CABAN, Magda, Piotr STEPNOWSKI, Marek KWIATKOWSKI, Joanna MASZKOWSKA, Marta WAGIL a Jolanta KUMIRSKA. Comparison of the Usefulness of SPE Cartridges for the Determination of β -Blockers and β -Agonists (Basic Drugs) in Environmental Aqueous Samples. *Journal of Chemistry* [online]. 2015, **2015**, 1-9 [cit. 2016-05-16]. DOI: 10.1155/2015/195280. ISSN 2090-9063. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/195280/>

- [12] ŠÍDLOVÁ, Petra, Radka PODLIPNÁ a Tomáš VANĚK. Cytostatická léčiva v životním prostředí. *Chemické listy*. 2011, **105**(1).
- [13] VITVAROVÁ, Alena. *Stanovení léčiv v odpadních vodách*. Brno, 2013. Diplomová práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce Jitka Bečanová.
- [14] SANTOS, Lúcia H.M.L.M., A.N. ARAÚJO, Adriano FACHINI, A. PENA, C. DELERUE-MATOS a M.C.B.S.M. MONTENEGRO. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2010, **175**(1-3), 45-95 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.100. ISSN 03043894. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389409017518>
- [15] NARVAEZ, Jhon F. a Claudio C. JIMENEZ. Pharmaceutical products in the environment: sources, effects and risks. *Vitae* [online]. 2012, **19**(1), 93-108 [cit. 2016-04-21]. ISSN 0121-4004. Dostupné z: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/view/10865>
- [16] GÓMEZ, M. J, M. PETROVIĆ, A. R. FERNÁNDEZ-ALBA a D. BARCELÓ. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1114**(2), 224-233 [cit. 2016-04-28]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16546199>
- [17] BURKINA, Viktoriia, Vladimir ZLABEK a Galia ZAMARATSKAIA. Effects of pharmaceuticals present in aquatic environment on Phase I metabolism in fish. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2015, **40**(2), 430-444 [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/j.etap.2015.07.016. ISSN 13826689. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668915300405>
- [18] ARNOLD, K. E., A. R. BROWN, G. T. ANKLEY a J. P. SUMPTER. Medicating the environment: assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. 2014, **369**(1656), 20130569-20130569 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1098/rstb.2013.0569. ISSN 0962-8436. Dostupné z: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2013.0569>
- [19] MASZKOWSKA, Joanna, Stefan STOLTE, Jolanta KUMIRSKA, et al. Beta-blockers in the environment: Part II. Ecotoxicity study. *Science of The Total Environment* [online]. 2014, **493**, 1122-1126 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.039. ISSN 00489697. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969714008948>

- [20] *Distribuce a výdej léčiv v České republice v 1. čtvrtletí roku 2016: Hodnocení vývoje dodávek léčivých přípravků podle ATC skupin*. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, 2016. Dostupné také z: <http://www.sukl.cz/informace-o-distribuci-leciv-lekarnam-jinym-zdravotnickym-22>
- [21] AYDIN, Egemen a Ilhan TALINLI. Analysis, occurrence and fate of commonly used pharmaceuticals and hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey. *Chemosphere* [online]. 2013, **90**(6), 2004-2012 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.074. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653512013136>
- [22] FEINER, Mona, Christian LAFORSCH, Thomas LETZEL a Juergen GEIST. Sublethal effects of the beta-blocker sotalol at environmentally relevant concentrations on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 2014, **33**(11), 2510-2515 [cit. 2016-05-11]. DOI: 10.1002/etc.2699. ISSN 07307268. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.2699>
- [23] Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon) ve znění pozdějších předpisů. In: *Sbírka zákonů ČR*. 28. 6. 2001. 98/2001. 117 s. Dostupný také z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2001-254>
- [24] TÖLGYESSY, Juraj. *Technológia vody, ovzdušia a tuhých odpadov*. 1. vyd. Bratislava: STU, 1994. ISBN 80-227-0619-1.
- [25] DOHÁNYOS, Michal, Nina STRNADOVÁ a Jan KOLLER. *Čištění odpadních vod*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0316-9.
- [26] DOLEJŠ, P. *Příručka pro čištění a úpravu vody*. Přerov: KEMIFLOC, 1996.
- [27] TROJAN, František. *Čištění a využití odpadních vod městských a průmyslových: učební text pro průmyslové školy stavební*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1954.
- [28] Předpis č. 401/2015 Sb., Nařízení vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech. In: *Sbírka zákonů ČR*. 14. 12. 2015. 166/2015. 69 s. Dostupný také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2015-401>
- [29] MALÝ, Josef a Jitka MALÁ. *Chemie a technologie vody*. Vyd. 1. Brno: NOEL 2000, 1996. ISBN 80-860-2013-4.
- [30] DOHÁNYOS, Michal. *Anaerobní čistírenské technologie*. Brno: NOEL 2000, c1998. ISBN 80-860-2019-3.

- [31] CHEN, Jian Lin, Raphael ORTIZ, Terry W. J. STEELE a David C. STUCKEY. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: A review. *Biotechnology Advances*. 2014, **32**(8), 1523-1534. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.005. ISSN 07349750. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975014001542>
- [32] CHEN, Ye, Jay J. CHENG a Kurt S. CREAMER. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*. 2008, **99**(10), 4044-4064. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.057. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407001563>
- [33] RADOJEVIC, Miroslav a Vladimir N. BASHKIN. *Practical environmental analysis*. 2nd ed. London: Royal Society of Chemistry, 2006. ISBN 08-540-4679-8.
- [34] *LIFE2Water* [online]. 2014 [cit. 2016-05-16]. Dostupné z: <http://www.life2water.cz/>
- [35] VERLICCHI, P., M. AL AUKIDY a E. ZAMBELLO. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of The Total Environment*. 2012, **429**, 123-155. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.028. ISSN 00489697. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969712005608>
- [36] KOTLÍK, Bohumil, Jan LANGHANS a Pavel BERNÁTH. *Vzorkování v životním prostředí: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy": modul K03 - 2015*. Český Těšín: 2 Theta, 2015. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-8537-9.
- [37] HORÁKOVÁ, Marta. *Analytika vody*. Vyd. 2., opr. a rozš. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2003. ISBN 80-708-0520-X.
- [38] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy": modul K02-2014*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014, 430 s. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [39] POPL, Milan a Jan FÄHNRIK. *Analytická chemie životního prostředí*. Vyd. 4., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1999, 218 s. ISBN 80-708-0336-3.
- [40] POOLE, C.F. a S.K. POOLE. Principles and Practice of Solid-Phase Extraction. In: PAWLISZYN, J. a H.L. LORD (eds.). *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*. Volume 2. Amsterdam: Elsevier, 2012, s. 273-299. DOI: 10.1016/B978-0-12-381373-2.10041-9. ISBN 978-0-12-387769-7.

- [41] LUCCI, Paolo, Deborah PACETTI, Oscar NUNEZ a Natale G. Current Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. CALDERON, edited by: Leonardo de Azevedo. *Chromatography - the most versatile method of chemical analysis* [online]. Rijeka: InTech, 2012 [cit. 2016-02-16]. DOI: 10.5772/47736. ISBN 9789535108139. ISSN 978-953-51-0813-9. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/chromatography-the-most-versatile-method-of-chemical-analysis/current-trends-in-sample-treatment-techniques-for-environmental-and-food-analysis>
- [42] STANKIEWICZ, Albert, Joanna GIEBUŁTOWICZ, Urszula STANKIEWICZ, Piotr WROCZYŃSKI a Grzegorz NAŁĘCZ-JAWECKI. Determination of selected cardiovascular active compounds in environmental aquatic samples – Methods and results, a review of global publications from the last 10 years. *Chemosphere*. 2015, **138**, 642-656. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.07.056. ISSN 00456535. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653515007766>
- [43] BOONJOB, Warunya, Hana SKLENÁŘOVÁ, Francisco J. LARA, Ana M. GARCÍA-CAMPAÑA a Petr SOLICH. Retention and selectivity of basic drugs on solid-phase extraction sorbents: Application to direct determination of β -blockers in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2014, **406**(17), 4207-4215 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1007/s00216-014-7753-4. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-014-7753-4>
- [44] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. 2. vyd. Praha: SNTL, 1986, 140 s.
- [45] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, s. 18. ISBN 80-7080-586-2. Dostupné také z: https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwik2pGouL_JAhUDbhQKHf9UCJkQFggfMAA&url=http%3A%2F%2Fvydavatelstv.i.vscht.cz%2Fknihy%2Fuid_isbn-80-7080-586-2%2Fpdf%2F018.pdf&usg=AFQjCNG2500l__9nGgVzvaC4jGPiQeGvTQ&bvm=bv.108538919,d.d24
- [46] CHURÁČEK, Jaroslav, Petr BOČEK, Zdeněk DEYL, Aleš HORNA, Pavel JANDERA, Jaroslav JANÁK, Josef JANČA a Robert KALVODA. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993, 387 s. ISBN 80-200-0010-0.
- [47] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie II*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.

- [48] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [49] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 263 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [50] ČŮTA, František, Miloš HEJTMÁNEK, Milan KARLÍK, Zbyněk KSANDR, Zdeněk KUČERA, Bohumil POLEJ, Milan POPL a Karel VOLKA. *Instrumentální analýza*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1986, 295 s.
- [51] CIELECKA-PIONTEK, Judyta, Przemysław ZALEWSKI, Anna JELIŃSKA a Piotr GARBACKI. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 0131n. 1., 76(21), 1429-1437 [cit. 2015-12-03]. DOI: 10.1007/s10337-013-2434-6. ISSN 00095893. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10337-013-2434-6>
- [52] HPLC Center. *IDEX Health & Science* [online]. ©2016 [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: <https://www.idex-hs.com/education-and-tools/educational-materials/hplc-center>
- [53] NĚMCOVÁ, Daniela. Novostavba Kliniky chorob prasat a rekonstrukce ČOV. *Vita Universitatis: Časopis Veterinární a farmaceutické univerzity Brno* [online]. 2009, (2), 6-7 [cit. 2016-05-01]. ISSN 1803-3830. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/informace-o-univerzite/vita-universitatis/vita-universitatis-2009.html>
- [54] LISÁ, H. *Problematika stanovení reziduí léčiv v odpadních vodách*. Brno, 2011. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Milada Vávrová.
- [55] ČOV Mikulov: Projekt Břeclavsko - část B, 25 000 EO. *Královopolská RIA* [online]. ©2007–2016 [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://www.kpria.cz/sluzby/vodni-hospodarstvi/cisticka-odpadnich-vod-mikulov/>
- [56] PROCHÁZKA, V. Kanalizační řád stokové sítě města Mikulov. In: *Vodovody a kanalizace Břeclav* [online]. 2009 [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://www.vak-bv.cz/o-spolecnosti/dokumenty-a-formulare/>
- [57] Ústní sdělení z exkurze pod vedením Ing. R. Hricha, hlavního technologa ČOV Brno-Modřice, 14. 4. 2016
- [58] ČOV Brno-Modřice. *Brněnské vodárny a kanalizace: Akciová společnost* [online]. ©2005-2016 [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://www.bvk.cz/o-spolecnosti/odvadeni-a-cisteni-odpadnich-vod/cov-brno-modrice/>

- [59] Mez detekce a mez stanovitelnosti. *HPLC* [online]. ©1999-2013 [cit. 2016-05-18].
Dostupné z: http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm

7. SEZNAM ZKRATEK

ACE	acebutolol
ATE	atenolol
BIS	bisoprolol
BSK₅	biologická spotřeba kyslíku 5denní
CNS	centrální nervová soustava
ČOV	čistírna odpadních vod
DAD	detektor diodového pole (<i>diode array detector</i>)
DMSO	dimethylsulfoxid
EO	ekvivalentní obyvatel
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
CHSK	chemická spotřeba kyslíku
ISA	vnitřní sympatomimetická aktivita (<i>intrinsic sympathomimetic activity</i>)
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (<i>liquid chromatography – mass spectrometry</i>)
LOD	limit detekce (<i>limit of detection</i>)
LOQ	limit kvantifikace (<i>limit of quantification</i>)
MIPs	molekulárně vtištěné polymery (<i>molecularly imprinted polymers</i>)
MS	hmotnostní spektrometr
PE	polyethylen
PET	polyethylentereftalát
PTFE	polytetrafluoretylen
PVC	polyvinylchlorid
SPE	extrakce tuhou fází (<i>solid phase extraction</i>)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>)
UV/VIS	spektrum v ultrafialové až viditelné oblasti

8. PŘÍLOHY



Obrázek 8.1 Extrakce tuhou fází.



Obrázek 8.2 Odpařování rozpouštědla v rotační vakuové odparce.



Obrázek 8.3 UHPLC s použitým softwarem.



Obrázek 8.4 Bod odběru vody z odtoku ČOV Modřice.



Obrázek 8.5 Bod odběru odpadní vody z přítoku ČOV Modřice.