

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH METOD PRO STUDIUM BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK VE VODÁCH

THE USAGE OF SEPARATION METHODS FOR RESEARCH OF BIOLOGICALLY ACTIVE
SUBSTANCES IN WATERS

TEZE DISERTAČNÍ PRÁCE
THESIS OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Ing. LUCIE VYDROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2011

KLÍČOVÁ SLOVA:

REZIDUA, BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY, ANALGETIKA, POVRCHOVÁ VODA, ODPADNÍ VODA, SEPARAČNÍ METODY, EXTRAKCE SPE, HPLC/MS, TANDEMOVÁ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.

KEY WORDS:

RESIDUES, BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS, ANALGESICS, SURFACE WATER, WASTE WATER, SEPARATION METHODS, EXTRACTION SPE, HPLC/MS, TANDEM MASS SPECTROMETRY.

Disertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího disertační práce a děkana FCH VUT.

**Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118
612 00 Brno**

ISBN (80-214-)
ISSN (1213-4198)

OBSAH

ÚVOD	3
1 ANALGETIKA	5
1.1 Mechanismus účinku	5
1.2 Biotransformace léčiv	5
1.3 Cyklus léčiv v životním prostředí	5
1.4 Léčiva v čistírnách odpadních vod	6
1.5 Metody stanovení analgetik – antipyretik	6
1.5.1 Odběry vzorků vody	7
1.5.2 Úprava vzorku	7
1.5.3 Separace pomocí HPLC (vysokoučinné kapalinové chromatografie)	7
1.5.4 Detektory	7
2 VYBRANÉ PODSTATNÉ VÝSLEDKY DISERTAČNÍ PRÁCE	9
2.1 Experimentální část	9
2.1.1 Odpadní voda	9
2.1.2 Povrchová voda	9
2.1.3 Identifikace a kvantifikace analytů ve vodách z ČR	10
2.1.4 Identifikace a kvantifikace analytů ve vodách z řeky Thurso	10
2.1.5 Identifikace a kvantifikace analytů ve vzorcích povrchové a mořské vody odebraných na Taiwanu	10
2.2 Výsledky a diskuze	11
2.2.1 Reálné vzorky povrchové a odpadní vody odebrané v České republice	11
2.2.2 Reálné vzorky povrchové vody odebrané ve Skotsku	13
2.2.3 Reálné vzorky povrchové vody odebrané na Taiwanu	14
2.3 Porovnání získaných výsledků s publikovanými údaji	16
3 ZÁVĚR	19
4 ŽIVOTOPIS	21
5 ABSTRAKT	23
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	24

ÚVOD

Vzhledem ke vzrůstajícímu zájmu veřejnosti o ochranu životního prostředí je v posledních letech věnována zvýšená pozornost tzv. „novým“ environmentálním polutantům. Jsou to chemické látky, které jsou uvolňovány do životního prostředí řádově již desítky let, avšak sledování jejich osudu a působení na přírodu je prováděno intenzivně až v posledních letech. Mezi tyto látky je nezbytné zařadit také léčiva. Vzrůstající spotřeba léků způsobená především vlivem civilizačních nemocí a zvyšující se životní úroveň, se kterou úzce souvisí také prodlužující se průměrná délka života, měla za následek zvýšenou poptávku po nových a účinnějších lécích. Stále běžnější je rovněž aplikace různých potravinových doplňků. Tento trend vede nejen k nadměrnému užívání syntetických farmak i fytofarmak, ale zejména ke zvýšení množství jejich odpadu a k jejich průniku do složek životního prostředí.

Léčiva se mohou do životního prostředí dostávat v původní nebo pozměněné formě různými cestami. Největším zdrojem kontaminace léčivy je odpadní voda, a proto vzrůstá potřeba regulace množství léčiv přítomných v odpadních vodách. Bylo již potvrzeno, že běžnými biologickými čistícími procesy používanými v čistírnách odpadních vod jsou tyto látky vesměs velmi těžce odbouratelné, a proto často pronikají přes čistírny odpadních vod do vod povrchových. Mezi jednu z nejužívanějších skupin léčiv patří nesteroidní protizánětlivé léky nacházející se ve zvýšeném množství v každé domácnosti, a to především proto, že je možné je užívat i bez lékařského předpisu; v důsledku toho se jejich spotřeba každým rokem zvyšuje.

Je proto velmi důležité kontrolovat výskyt léčiv v odpadních vodách, které jsou prioritním zdrojem kontaminace životního prostředí těmito specifickými polutanty. Vyčištěné odpadní vody se vesměs vypouštějí zpět do povrchových vod. Léčiva jako biologicky aktivní látky se následně mohou kumulovat v dalších složkách životního prostředí, kde mohou závažným způsobem ovlivňovat přírodní ekosystémy. Ve vodě může kromě toho docházet k vzájemným kontraindikacím, protože se ve vodě převážně nachází směs všech druhů používaných léčiv vyznačujících se možnými vedlejšími účinky. Proto je nezbytné vyvíjet nové a ekonomicky výhodné technologické postupy pro jejich odstraňování, a to již v průběhu čistícího procesu na čistírnách odpadních vod. S novými technologickými postupy úzce souvisí také moderní, přesnější a správnější analytické metody, které jsou schopny stanovit velmi nízké koncentrace těchto látek. Uvedené metody lze aplikovat nejen na ověření účinnosti všech stupňů čištění využívaných v rámci čistícího procesu, ale zejména na sledování distribuce reziduí léčiv do jednotlivých složek životního prostředí.

1 ANALGETIKA

Analgetika tvoří skupinu látek, které sice tlumí pocit bolesti, avšak výrazně neovlivňují smyslové vnímání a vědomí. Rovněž neléčí přímo příčinu onemocnění. Jejich podávání snižuje zátěž a stres organismu způsobený zánětem, bolestí nebo zvýšenou teplotou. Většina analgetik má protizánětlivý a antipyretický účinek.

Analgetika je možno rozdělit podle míry a mechanismu účinku na:

- ❖ Narkotická, zvaná též anodyna nebo opioidní analgetika, které ve vyšších dávkách vyvolávají kromě potlačení bolesti také spánek nebo ztrátu vědomí,
- ❖ Analgetika – antipyretika; díky protizánětlivým účinkům je tato skupina často nazývána nesteroidními protizánětlivými látkami (NSAID – *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs*).¹

1.1 MECHANISMUS ÚČINKU

Hlavním mechanismem protizánětlivého působení NSAID je inhibice syntézy prostaglandinů (PG). Největší význam mají prostaglandiny třídy PGE₂, které mají vliv na zvýšení vaskulární permeability a citlivosti periferních nociceptorů, dále ovlivňují působení bradykininu a histaminu, čímž vzniká zánět a bolest. Dále byla také prokázána zvýšená exprese PGE₂, a to v centrální nervové soustavě jako reakce na periferní zánět, která zvyšuje citlivost k bolesti. Proto lze hovořit o centrálním i periferním účinku nesteroidních antirevmatik.²

1.2 BIOTRANSFORMACE LÉČIV

Četné terapeuticky využívané látky se v organismu chemicky mění, a proto podléhají biotransformaci. Tyto chemické změny jsou většinou provázeny snížením účinnosti a zvýšením rozpustnosti ve vodě. Ta usnadňuje vylučování ledvinami.³

Každá tkáň má určitou schopnost metabolizovat léčiva, avšak hlavním orgánem metabolismu léčiv jsou játra. Značnou aktivitu vykazují i další tkáně: gastrointestinální trakt, plíce, kůže, ledviny. Po perorálním podání se mnoho léčiv beze změny vstřebává z tenkého střeva a portálním řečištěm se transportuje do jater, kde dochází k rozsáhlým metabolickým přeměnám.

V poslední době se objevuje stále více důkazů o tom, že metabolismus léčiv a jiných cizorodých látek nemusí být vždy tak neškodným biochemickým dějem, který vede k detoxikaci a eliminaci sloučeniny. U některých látek se již prokázalo, že se metabolicky transformují na reaktivní meziprodukty, které jsou toxické pro různé orgány.⁴

1.3 CYKLUS LÉČIV V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Přesné množství farmak uvolňovaných do prostředí není známo, a to v důsledku jejich emisí do životního prostředí. Velkým zdrojem léčiv pro odpadní vody jsou nemocnice, protože zde může docházet k úniku těchto kontaminujících látek přímo do kanalizace, bez předchozího průchodu čističkou.⁵

Čistírný odpadních vod jsou považovány za hlavní zdroje kontaminace vod farmaky. Komunální odpadní vody mohou obsahovat nejen přečištěné nebo neutralizované vody z nemocnic a farmaceutického průmyslu, ale také průsaky ze skládek. Jsou přímým zdrojem reziduí léčiv a kromě toho obsahují i jiné biologicky účinné látky, jejich metabolity a ve vodě rozpustné konjugáty.⁶ Monitorování rizika spojeného s průnikem těchto látek do životního prostředí,

rozšiřující se zejména v posledních letech, se provádí pomocí moderních analytických metod, případně prostřednictvím ekotoxikologických studií.⁷

Léčiva jsou vyvíjena tak, aby ovlivňovala biochemické a fyziologické funkce živých systémů. Tyto biologicky aktivní látky znamenají zdravotní rizika a nebezpečí nejen pro lidi, ale také pro terestrický a vodní ekosystém. Mají vliv např. na poměr počtu narozených samců a samic, feminizaci samců, změny v biochemických cyklech způsobujících nevylíhnutí larev; kromě toho se podílí na různých anatomických deformacích, pozměnění růstu rostlin a dalších nežádoucích změnách živých organismů.^{8,9}

Díky svým vlastnostem (polarita, perzistence, rozpustnost ve vodě, apod.) jsou tyto biologicky aktivní látky schopny procházet čistírnami odpadních vod; nelze však je biologickým čištěním zcela odstranit, a proto unikají do vodních ekosystémů.¹⁰

Po zjištění přítomnosti léčiv ve vodách jim začala být věnována větší pozornost, a to jako novým kontaminantům životního prostředí. Jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou předpokladem pro možnou perzistenci v půdách. Do půdy se dostávají zejména používáním kontaminované chlévské mrvy a kalů z čistíren odpadních vod (ČOV), které jsou často aplikovány jako hnojiva. Vázání a mobilita těchto látek je dána povahou půd. Jejich nízká adsorpce v kalech nebo půdách může způsobit znečištění povrchových a podzemních vod. Některé z nich podléhají částečné nebo úplné biodegradaci, díky které vznikají neznámé metabolity, méně nebo více biologicky aktivní, v porovnání s původní formou.¹¹ Rovněž není dosud známo, jaký vliv mají tyto látky na rostliny.¹²

1.4 LÉČIVA V ČISTÍRNÁCH ODPADNÍCH VOD

Čištění odpadních vod představuje v současné době závažný environmentální problém, který je nutné urychleně řešit. Stále je ještě v provozu velké množství ČOV, které nesplňují současná kritéria na kvalitu vypouštěné vyčištěné vody. Část z nich je technologicky nedostačující, avšak vyskytují se rovněž takové, jejichž špatná funkčnost je způsobená neodborným provozováním. Jednou z příčin nesprávné funkce ČOV může být také přítomnost látek, které nepříznivě působí na mikroorganismy zabezpečující biologický proces čištění odpadních vod. Existuje široké spektrum látek, které mohou takto působit.¹³ Mezi látky narušující proces čištění patří bezesporu léčiva.¹⁴

Tyto biologicky aktivní látky se nejvíce eliminují v biologickém stupni čištění, a to při aerobní a anaerobní degradaci. Tuto technologickou operaci zajišťuje aktivovaný kal. Aktivovaným kalem nazýváme směsnou kulturu bakterií.¹⁵

Běžnými úpravami prováděnými v ČOV nelze v některých případech odstranit z vody všechny organické složky. Metody, které by z odpadní vody úplně odstranily veškerá léčiva, se teprve rozvíjejí. Bylo již zjištěno, že při odstraňování léčiv z vody by mohla být účinná membránová filtrace nebo oxidace.^{16,17}

1.5 METODY STANOVENÍ ANALGETIK – ANTIPYRETIK

Vlastnímu stanovení analytů ve vzorcích vody předchází jejich odběr a úprava vzorku, jako je např. filtrace nebo extrakce sledovaných látek z dané matrice.

1.5.1 Odběry vzorků vody

Jedním z nejdůležitějších kroků při stanovování polutantů v životním prostředí je reprezentativní odběr reálného vzorku a jeho správné skladování po dobu jeho uchovávání před započítáním vlastní analýzy. Chyby vzniklé v této fázi nelze již většinou napravit.¹⁸

Vhodný způsob odběru se volí podle druhu vzorkované vody, místa a bodu odběru a také podle druhu vodního útvaru, kterým může být pramen, studna, vodní tok, vodní nádrž, potrubí, úpravárenský nebo čistírenský reaktor. Množství odebíraného vzorku je stanoveno na základě potřebného objemu pro analýzu, které musí být předem experimentálně ověřeno pomocí pilotní studie.¹⁹

1.5.2 Úprava vzorku

Prvním krokem po odběru vzorků a převozu do laboratoře je jejich filtrace přes skleněný filtr, aby se odstranily hrubé nečistoty a suspendovaná hmota. Zpracování by mělo být provedeno v rozmezí 24–48 hodin po odběru, aby nedošlo k degradaci zjišťovaných analytů. Během vzorkování se může měřit pH.

Dalším krokem úpravy je extrakce, která se volí podle charakteru matrice a analytu. Nejčastěji používanou metodou aplikovanou při stanovení léčiv je extrakce tuhým sorbentem. Důvodem je to, že ve srovnání s ostatními postupy je tato metoda rychlá, je při ní nízká spotřeba rozpouštědla a velmi nízké riziko znečištění vzorku.²⁰

1.5.3 Separace pomocí HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie)

Chromatografie je separační metoda, jejímž základním principem je rozdělení složek. Je to metoda umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Analyt se rozděluje mezi dvě fáze, a to mobilní a stacionární. K rozdělení dochází na základě fyzikálně-chemických interakcí mezi složkou a mobilní fází, složkou a stacionární fází a rovněž mezi stacionární a mobilní fází.²¹ Mobilní fáze přechází přes fázi stacionární, ve které mohou být složky vzorku zachyceny a zdrženy. Složky, které jsou stacionární fází poutány silněji, jsou zdrženy déle; tímto způsobem se složky od sebe separují.

1.5.4 Detektory

Při detekci separovaných látek se využívají jejich obecné nebo specifické vlastnosti, které je umožní selektivně stanovit. Detektory ve spojení s HPLC by měly mít vysokou citlivost, vysokou selektivitu, nízký šum základní linie, rychlou odezvu, široký lineární rozsah, nízký mrtvý objem, možnost použití gradientu a měly by poskytovat potřebné informace o sledovaných analytech.

Spektrofotometrický detektor, ve spojení s HPLC, patří k nejpoužívanějším v analýze léčiv. Je relativně jednoduchý, spolehlivý a lze jím detekovat velký počet chemických substancí, kompatibilně s gradientovou elucí. Základním požadavkem je nízká absorpance mobilní fáze při použité vlnové délce nastavené na detektoru.^{21,22}

Spojením hmotnostního detektoru (*Mass Spectrometry* – MS) s HPLC získáme vysoce selektivní a citlivou metodu, která je vhodná zejména k identifikaci a strukturní analýze ionizovatelných látek. Vzorek je analyzován na základě rozdělení iontů podle hodnoty poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Při spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí se ionizace provádí za atmosférického tlaku.^{23,24} Sprejové ionizační techniky jsou tři: ionizace elektrosprejem (*Electrospray Ionization* – ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku

(*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* – APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (*Atmospheric Pressure Photo Ionization* – APPI).²⁵

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů podle poměru m/z . Kvalitu tohoto rozdělení ovlivňuje jeho rozlišovací schopnost. Jsou známy různé typy analyzátorů a výběr vhodného typu závisí vždy na charakteru sledovaných analytů. Při sledování léčiv je nejčastěji používaným analyzátozem trojitý kvadrupól, případně iontová past, jejichž výhodou je možnost MS^n nebo analyzátor doby letu.²⁶

2 VYBRANÉ PODSTATNÉ VÝSLEDKY DISERTAČNÍ PRÁCE

V této kapitole jsou uveřejněny pouze vybrané výsledky. Do závěru jsou pak shrnuty všechny výsledky předložené disertační práce.

2.1 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Sledovanou matricí byla voda, která je nejčastěji postižená znečištěním biologicky aktivními látkami, mezi které patří také léčiva. Sledovány byly dva druhy vody, a to voda odpadní a voda povrchová.

2.1.1 Odpadní voda

Odpadní voda byla odebírána z velkokapacitní čistírny odpadních vod v Brně - Modřicích. Odběry vody byly prováděny na přítoku a na odtoku. Byl odebírán tzv. slévaný 24 hodinový vzorek z přítoku a na odtoku z ČOV. Slévaný vzorek byl získáván pomocí automatického vzorkovacího zařízení, které pravidelně v dvouhodinových intervalech odebralo daný objem přitékající odpadní vody. Velikost objemu byla závislá na velikosti přítoku v daném časovém intervalu. Získané objemy byly po 24 hodinách slity a promíchány. Tím byla zajištěna vysoká reprezentativnost odebraného vzorku. Stejný způsobem byl získán i vzorek na odtoku z ČOV. Zadrž této velkokapacitní čistírny odpadních vod je 24 hodin. Vzorky odpadních vod byly odebírány během dubna, června a července 2010.

2.1.2 Povrchová voda

V České republice byla voda odebírána z řeky Křetínky, která protéká krajinou v okresech Svitavy a Blansko. V povodí Křetínky se nachází obce, které dosud nejsou vybaveny kanalizačními systémy napojenými na čističku odpadních vod. Komunální odpadní vody jsou sváděny do žump a septiků, které často prosakují, případně jsou vybaveny trativody nebo přímo ústí do koryt vodních toků protékajících těmito obcemi. Tento fakt patří k základním problémům velké části regionu. Kvalitu vod tohoto regionu rovněž ovlivňují odpadní vody z malých průmyslových závodů nebo zemědělských podniků.²⁷ Vzorky povrchových vod z řeky Křetínky byly odebírány v měsících dubnu a srpnu 2010, a to v katastrálním území obcí Svojanov a Předměstí.

Ve Skotsku byly vzorky povrchové vody odebírány z řeky Thurso. Délka toku této řeky je 40 km. Jedná se o lososovou řeku, která se ve městě Thurso vlévá do Atlantického oceánu. Podél jejího toku je řada usedlostí, vesnice Halkirk a město Thurso. Velkým problémem v jejím povodí je to, že vzhledem k charakteru osídlení povodí řeky, shromažďuje většina domácností odpadní vody v septicích, které následně ústí do řeky. Obec Halkirk má sice vlastní čistírnu odpadních vod, avšak její odtok rovněž ústí do recipientu. V této oblasti je velmi rozšířena zemědělská činnost, zejména chov ovcí a skotu.^{28,29} Vzorkování řeky Thurso bylo prováděno v měsíci červnu 2009.

Poslední vzorky povrchových vod byly odebírány na Taiwanu v řekách Yanshuei, Erren, Agongdian a kanálu v Tainanu. Řeky pramení v oblastech Tainan a Kaohsiung, kterými protékají a u města Tainan se vlévají do Jihočínského moře. V oblasti Tainan, kterou všechny sledované řeky protékají většinou svého toku, žije téměř 2 miliony obyvatel. Kromě toho je zde velmi rozšířené zemědělství, zejména pěstování rýže a také rozvinutý průmysl. Zdejší povrchové vody jsou často znečištěny úniky odpadních vod různého charakteru.³⁰ Proto je zde velmi vysoká

pravděpodobnost kontaminace těchto vod analyty typu biologicky aktivních látek a xenobiotik. Vzorkování Taiwanských řek bylo prováděno v měsíci listopadu 2010.

2.1.3 Identifikace a kvantifikace analytů ve vodách z ČR

Reálné vzorky byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr (MS), s ionizací elektrosprejem (ESI) a iontovou pastí (IT) jako analyzátozem. Ionizace byla prováděna jak v pozitivním, tak také v negativním módu.

Optimalizace chromatografických podmínek byla provedena pomocí UV-VIS detektoru typu DAD na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18 s velikostí částic 5 μm a rozměry 4,6 $\times$ 150 mm, Agilent, jejíž nejvyšší pracovní teplota je 60 $^{\circ}\text{C}$.

Analyty byly kvantifikovány metodou externí kalibrace, tzn. s využitím vícebodové kalibrační křivky, sestavené pro každý sledovaný analyt. Jako vnitřní standardy byly použity Ibuprofen-D3 a Atenolol-D7.

Analýza byla prováděna na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18 s velikostí částic 3,5 μm a rozměry 2,1 $\times$ 150 mm, Agilent, jejíž nejvyšší pracovní teplota je 60 $^{\circ}\text{C}$.

2.1.4 Identifikace a kvantifikace analytů ve vodách z řeky Thurso

Reálné vzorky odebrané na řece Thurso byly analyzovány rovněž metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Detektorem byl v tomto případě hmotnostní spektrometr, s ionizací elektrosprejem, avšak jako analyzátor zde byl použit trojitý kvadrupól (QqQ). Ionizace byla prováděna pouze v negativním módu, a to vzhledem k charakteru sledovaných látek. Vzhledem k počtu sledovaných analytů a matici bylo použito MRM (Multiple Reaction Monitoring) skenování. Pro analýzu byla zvolena kolona C18 Luna[®], 250 mm $\times$ 10 mm, velikost částic 10 μm , Phenomenex.

Kvantifikace analytů byla provedena metodou externí kalibrace, s využitím vícebodové kalibrační křivky, sestavené pro každý hodnocený analyt. Sledované látky byly identifikovány srovnáním hmotnostních spekter se spektry standardů.

2.1.5 Identifikace a kvantifikace analytů ve vzorcích povrchové a mořské vody odebraných na Taiwanu

Metoda kapalinové chromatografie (LC) s hmotnostním spektrometrem (MS) jako detektorem byla použita také pro analýzu reálných vzorků odebraných na území Taiwanu v oblastech Tainan a Kaohsiung. Ionizace byla prováděna elektrosprejem a jako analyzátor byl použit trojitý kvadrupól (QqQ). Analyty byly ionizovány pouze v negativním módu. Bylo použito MRM (Multiple Reaction Monitoring).

Pro analýzu byla zvolena kolona Kinetex PFP, velikost 100 $\times$ 2,1 mm, velikost částic 2,6 μm , Phenomenex.

Kvantifikace analytů byla provedena metodou standardního přídatku, pro každý sledovaný analyt. Sledované analyty byly identifikovány srovnáním hmotnostních spekter se spektry standardů.

2.2 VÝSLEDKY A DISKUZE

2.2.1 Reálné vzorky povrchové a odpadní vody odebrané v České republice

Pro vyhodnocení koncentrací v reálných vzorcích byla využita vícebodová kalibrační křivka, která byla měřena spolu s každou sadou reálných vzorků. Ke všem hodnoceným reálným vzorkům byly také přidávány deuterované vnitřní standardy – atenolol-d7 a ibuprofen-d3. Voda z každého odběru byla zpracována třikrát a v Tab. 1: jsou uvedeny průměrné hodnoty z těchto tří měření.

V každém odběru byl stanoven kofein, a to ve vysokých koncentracích. Jeho výskyt nesouvisí přímo s užíváním léčivých přípravků, ale také s konzumací nápojů a potravin, ve kterých je kofein rovněž obsažen. Jeho vysoká koncentrace však může ovlivnit působení dalších sledovaných látek, které jsou ve vodě přítomny, na celý vodní ekosystém, a to ve vztahu k jeho stimulujícím účinkům.

Během odběrů byly v řece detekovány všechny sledované analyty v různých koncentracích. Bylo prokázáno, že ve vzorcích odebraných na vzorkovacím místě Svojanov byly koncentrace nižší než ve vzorcích odebraných v Předměstí. Toto zjištění zcela odpovídá charakteru toku a kromě toho je zde patrný vliv obce na kvalitu vody v řece.

Výjimkou je kyselina salicylová, jejíž koncentrace byla ve dvou případech vyšší ve vzorcích z odběrového místa Svojanov. Vysvětlením může být také to, že její molekula je součástí huminových kyselin a v rámci chemických reakcí probíhajících ve vodním ekosystému mohlo dojít k jejímu uvolnění.

Tab. 1: Koncentrace sledovaných analytů v řece Křetince ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)

Křetínka	5.4.	11.4.	18.4.	26.7.	9.8.	11.8.	16.8.	19.8.	23.8.
Svojanov/Předměstí									
Paracetamol S	<LOD	51,78	<LOD	<LOD	46,78	<LOD	158,6	<LOD	<LOD
Paracetamol P	<LOD	165,2	<LOD	<LOD	126,6	50,64	439,3	<LOD	<LOD
K. salicylová S	<LOD	597,4	<LOD	<LOD	36,36	<LOD	597,4	66,08	<LOD
K. salicylová P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	68,57	<LOD	83,15	45,46	<LOD
Kofein S	21769	27477	80802	49978	17333	13888	45619	72158	12289
Kofein P	25121	32703	87964	50124	77420	44167	75406	50286	16685
Naproxen S	2377	1905	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	625,9	<LOD	38,51
Naproxen P	5229	1495	<LOD	<LOD	<LOD	154,1	<LOD	<LOD	1145
Ketoprofen S	1214	132,6	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ketoprofen P	659,0	21,48	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	70,16
Diklofenak S	10043	1048	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Diklofenak P	26738	653,0	<LOD	282,5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ibuprofen S	3713	7199	<LOD	<LOD	287,1	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ibuprofen P	14609	8157	<LOD	<LOD	404,4	<LOD	670,3	<LOD	<LOD
K. mefenamová S	41,85	78,57	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K. mefenamová P	53,03	81,45	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Koncentrace v reálných vzorcích odpadních vod byla opět vyhodnocena pomocí metody externí kalibrace. Kalibrační křivka byla i v tomto případě sestavována s každou sadou reálných vzorků. Rovněž byly ke všem měřeným reálným vzorkům přidány deuterované vnitřní standardy, atenolol-d7 a ibuprofen-d3.

Tab. 2: *Koncentrace sledovaných analytů v odpadní vodě (ng · l⁻¹)*

ČOV	20.4.	21.4.	22.4.	27.4.	28.4.	15.6.	16.6.
Přítok/Odtok							
Paracetamol P	<LOD	<LOD	216,8	<LOD	<LOD	705,3	<LOD
Paracetamol O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	563,9	<LOD
K. salicylová P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K. salicylová O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kofein P	7566	3183	10106	1138	2482	713,7	61246
Kofein O	450,5	283,9	1291	236,1	411,1	0,0	919,8
Naproxen P	7621	7634	384,2	<LOD	<LOD	622,7	<LOD
Naproxen O	3495	6992	<LOD	<LOD	<LOD	2242	<LOD
Ketoprofen P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1427	<LOD
Ketoprofen O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Diklofenak P	23166	26568	<LOD	<LOD	<LOD	549,5	<LOD
Diklofenak O	16411	18754	<LOD	<LOD	<LOD	5021,2	<LOD
Ibuprofen P	431,0	452,8	<LOD	<LOD	<LOD	932,3	289,4
Ibuprofen O	141,2	103,5	<LOD	<LOD	<LOD	1410	<LOD
K. mefenamová P	33,60	33,51	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K. mefenamová O	56,41	45,24	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	17.6.	23.6.	24.6.	29.6.	30.6.	1.7.	13.7.
Paracetamol P	<LOD	<LOD	2635	760,3	534,9	345,0	210,9
Paracetamol O	<LOD	<LOD	99,60	<LOD	30,21	192,1	192,1
K. salicylová P	<LOD	<LOD	143,8	138,7	<LOD	<LOD	<LOD
K. salicylová O	<LOD	<LOD	181,2	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kofein P	37186	33508	7387	9280	40589	13034	11718
Kofein O	1098	581,6	178,5	134,2	820,3	916,0	916,0
Naproxen P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Naproxen O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ketoprofen P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ketoprofen O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Diklofenak P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Diklofenak O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ibuprofen P	13882	6326	29563	583,1	<LOD	822,1	643,9
Ibuprofen O	<LOD	5562	4772	1855	<LOD	236,8	176,0
K. mefenamová P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	23,73
K. mefenamová O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	25,01
	14.7.	15.7.	20.7.	21.7.	22.7.	28.7.	29.7.
Paracetamol P	<LOD	<LOD	<LOD	184,4	87,18	<LOD	1772
Paracetamol O	<LOD	<LOD	<LOD	15,13	<LOD	<LOD	133,5
K. salicylová P	<LOD	50,49	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K. salicylová O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kofein P	30637	9540	43739	8795	12673	16103	88647
Kofein O	301,3	187,7	485,9	84,95	<LOD	9,853	<LOD

Naproxen P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Naproxen O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ketoprofen P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ketoprofen O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Diklofenak P	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Diklofenak O	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ibuprofen P	<LOD	<LOD	1647	1275	52158	<LOD	<LOD
Ibuprofen O	<LOD	<LOD	1545	724,4	943,9	<LOD	<LOD
K. mefenamová P	25,39	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
K. mefenamová O	23,65	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

Výsledky analýz odpadní vody jsou kompletně prezentovány v tabulce (Tab. 2:). Stejně jako u povrchové vody, také ve všech vzorcích odpadní vody se vyskytoval kofein. Přestože byl detekován i na odtoku z čistírny odpadních vod, jeho koncentrace byla mnohonásobně nižší. Účinnost čištění v ČOV v Brně – Modřicích byla v případě eliminace tohoto analytu 95,38 %.

Nejčastěji detekovaným analgetikem byl ibuprofen, což odpovídá ověřenému poznatku, že patří mezi nejoblíbenější preparáty z této farmaceutické skupiny. Účinnost odstranění byla v tomto případě 65,66 %. Ve dnech 15. 6. a 29. 6. 2010 byla koncentrace na odtoku vyšší než na přítoku. Tuto odchylku je možné vysvětlit následovně: zádrž čistírny odpadních vod je 24 hodin, a proto vysoká koncentrace patrně souvisela s koncentrací tohoto analytu ve dnech 14. 6. a 28. 6. 2010. V tyto dny však vzorky nebyly odebírány.

Paracetamol, který rovněž patří mezi velmi často využívané preparáty, byl detekován v deseti případech. Účinnost čistírny odpadních vod při odstranění paracetamolu z odpadní vody byla 74,81 %.

2.2.2 Reálné vzorky povrchové vody odebrané ve Skotsku

Na území Velké Británie byly odebírány vzorky povrchové vody z řeky Thurso, která protéká skotskou vysočinou. Celkem bylo provedeno pět odběrů říční vody. Pro první tři odběry byla využita tři vzorkovací místa v okolí výpusti z místní čistírny odpadních vod. V případě posledních dvou odběrů bylo začleněno ještě jedno odběrové místo. Tento vzorkovací bod byl zařazen z důvodu zjištění možné kontaminace říční vody vodou z poškozeného potrubí.

Při vyhodnocení koncentrací v reálných vzorcích byla opět využita metoda externí kalibrace, tj. vícebodová kalibrační křivka.

V rámci prováděného experimentu bylo prokázáno, že v řece Thurso byly ve všech vzorcích detekovány kyselina salicylová, ketoprofen a kyselina mefenamová. Současně bylo zjištěno, že koncentrace kyseliny salicylové byly výrazně vyšší než koncentrace ostatních sledovaných analgetik. Možné vysvětlení je následující: voda z řeky Thurso vykazuje velmi vysoký obsah huminových kyselin, v jejichž molekulových strukturách je zakomponována také kyselina salicylová. Vlivem různých fyzikálně-chemických vlivů se tato kyselina může z molekul huminových kyselin uvolňovat. Vysoký výskyt huminových kyselin ve skotských řekách je běžný jev, neboť území, jimiž protékají, je tvořeno rašeliníšti. Kromě již deklarovaných analgetik byly rovněž detekovány naproxen, ibuprofen a diklofenak.

Analýza vody odebrané z dodatečně přidaného odběrového místa pro poslední dva vzorkovací dny potvrdila, že říční voda byla kontaminována vodou z potrubí obsahující všechna sledovaná léčiva. Výsledky provedených analýz jsou zpracovány do Tab. 3:.

Tab. 3: *Koncentrace sledovaných analytů v řece Thurso ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)*

Analyt	2. 6. 2009	4. 6. 2009	8. 6. 2009	10. 6. 2009	12. 6. 2009
Kys. salicylová (Sa)					
Nad potokem	226,9	137,9	148,4	214,3	174,8
Most	257,7	196,6	148,4	208,4	182,1
Pod potokem	224,3	164,9	223,1	182,4	146,8
Potrubí	x	x	x	201,0	260,7
Naproxen (Na)					
Nad potokem	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Most	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Pod potokem	<LOD	<LOD	<LOD	68,28	61,00
Potrubí	x	x	x	3875	3982
Ketoprofen (Ke)					
Nad potokem	23,04	32,72	32,04	27,96	29,28
Most	26,40	33,64	39,80	35,60	37,20
Pod potokem	23,72	30,92	39,12	24,36	29,72
Potrubí	x	x	x	30,08	65,80
Diklofenak (Di)					
Nad potokem	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Most	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Pod potokem	<LOD	<LOD	31,80	<LOD	<LOD
Potrubí	x	x	x	225,1	210,2
Ibuprofen (Ib)					
Nad potokem	<LOD	21,40	14,84	17,68	199,4
Most	32,08	<LOD	4,840	10,00	45,12
Pod potokem	<LOD	47,00	13,12	22,80	42,64
Potrubí	x	x	x	2210	2545
Kys. mefenamová (Mef)					
Nad potokem	26,44	30,40	27,00	29,40	37,72
Most	27,32	28,44	26,68	26,52	26,52
Pod potokem	27,56	31,56	34,76	28,28	26,76
Potrubí	x	x	x	193,3	183,6

2.2.3 Reálné vzorky povrchové vody odebrané na Taiwanu

Na Taiwanu byly provedeny odběry vzorků povrchové vody ze tří řek (Yanshuei, Erren, Agongdian) a z kanálu ve městě Tainan, který obsahoval také vodu mořskou. Vzorky vody byly odbírány postupně po proudu až k místu, kde se řeky vlévaly do moře. Bylo zjišťováno, jak se mění koncentrace daných analytů v průběhu toku. Celkem bylo analyzováno 23 vzorků vody.

U každého vzorku byla změřena také salinita; jejíž hodnoty jsou uvedeny v Tab. 4:. Z naměřených hodnot je patrné, že se v blízkosti ústí řek do moře již jednalo o vodu brakickou. Kanál ve městě Tainan obsahoval rovněž vodu brakickou.

Tab. 4: Hodnoty salinity pro jednotlivá odběrová místa

Agongdian	A1	A2	A3	A4	x	x	x	x
Salinita (g/l)	0	1,1	0,9	6,7	x	x	x	x
Kanál v Tainanu	C1	C2	C3	C4	C5	x	x	x
Salinita (g/l)	3,2	16,8	23,0	24,4	30,2	x	x	x
Erren	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Salinita (g/l)	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,1	12,2	21,4
Yanshuei	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	x	x
Salinita (g/l)	0	0,2	0,1	5	8,3	24,4	x	x

Tab. 5: Koncentrace sledovaných analytů ve vzorcích odebraných na Taiwanu ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)

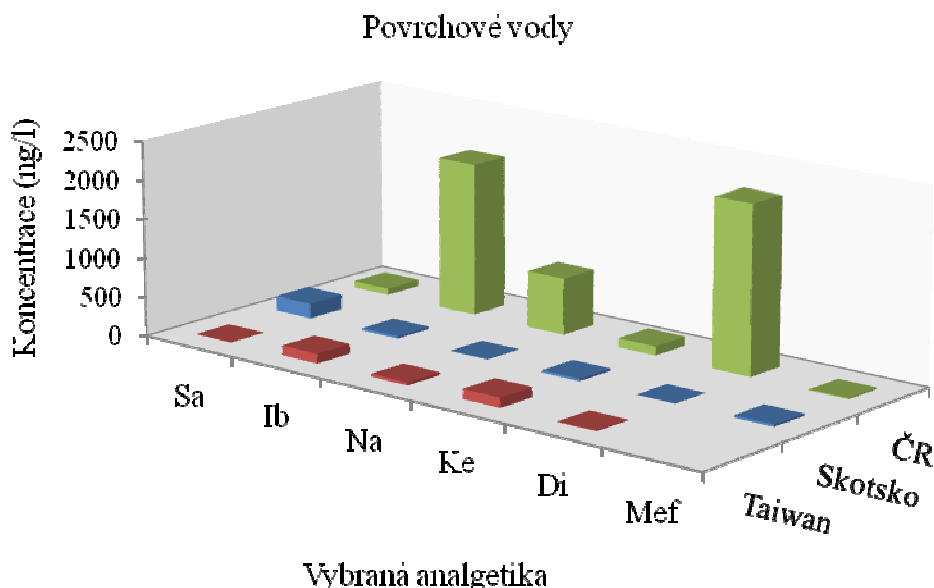
c ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)	Sa	lb	Na	Ke	Di
Agongdian					
A1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
A2	16,53	446,7	47,00	101,0	8,767
A3	< LOD	346,7	162,7	149,7	22,03
A4	4,730	242,7	113,3	200,0	8,700
Kanál v Tainanu					
C1	1,403	177,3	71,67	55,33	16,87
C2	8,567	182,7	13,03	57,00	1,220
C3	7,100	125,7	28,67	71,33	1,057
C4	5,233	95,00	11,43	< LOD	0,7233
C5	2,747	19,70	1,723	< LOD	< LOD
Erren					
E1	6,867	4,467	< LOD	24,23	< LOD
E2	12,13	40,33	< LOD	190,3	1,090
E3	13,57	15,27	< LOD	< LOD	< LOD
E4	10,57	62,33	6,733	215,3	6,767
E5	10,40	92,00	3,700	226,0	11,97
E6	2,387	200,3	41,67	48,00	19,03
E7	6,867	54,00	5,767	210,7	1,707
E8	7,933	75,67	13,83	142,7	0,1283
Yanshuei					
Y1	9,567	37,00	6,933	< LOD	< LOD
Y2	5,300	62,33	12,13	160,3	6,933
Y3	1,733	76,67	< LOD	< LOD	3,567
Y4	1,453	145,3	79,00	106,7	31,53
Y5	8,267	163,7	36,00	87,00	15,50
Y6	8,233	73,67	21,10	< LOD	0,9533

Hodnocená léčiva byla detekována ve všech vzorcích o různých koncentracích. Nejvyšších hodnot koncentrace dosahoval ibuprofen, který je celosvětově velmi často užívaným analgetikem. Druhou nejvyšší koncentraci měl ketoprofen.

Výsledky provedených analýz jsou shrnuty v Tab. 5:.

2.3 POROVNÁNÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ S PUBLIKOVANÝMI ÚDAJI

V posledních letech se řada odborníků z oblasti environmentální analýzy zaměřila na stanovení různých druhů léčiv ve vodách. K rozšíření poznatků v této oblasti přispěla také moderní přístrojová technika umožňující stanovení až ultrastopových koncentrací sledovaných analytů. Rozšíření stávajících postupů se uskutečnilo i v oblasti preanalytických metod. Znamená to, že máme k dispozici různé postupy pro jejich izolaci ze základní matrice a také se odlišují používané analytické postupy vesměs náležící do separačních metod. Proto je nezbytné, abychom při porovnání získaných údajů z dané oblasti vzaly v úvahu i odlišnost použitých analytických postupů, které mohou značně ovlivnit získaná data. Celosvětově lze také hovořit o odlišnostech v používání léčivých přípravků v různých zemích.



Obr. 1: Porovnání naměřených koncentrací sledovaných analgetik pro Taiwan, Skotsko a Českou republiku

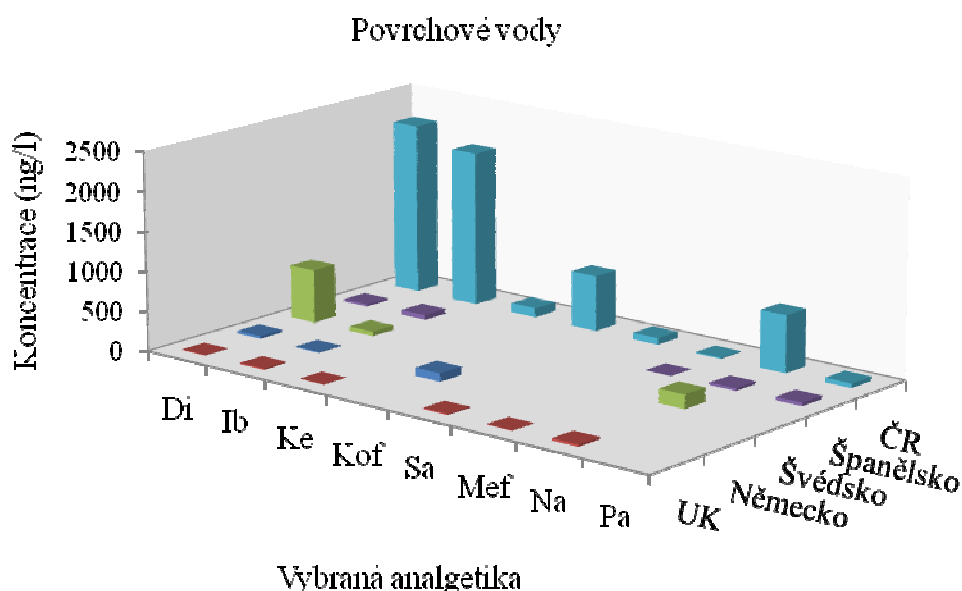
Na Obr. 1: jsou porovnány zjištěné koncentrace analgetik prokázané ve vzorcích povrchových vod ze všech oblastí sledovaných v průběhu řešení disertační práce. Porovnání může být ovlivněno také tím, že nebyly používány naprosto shodné analytické postupy a přístroje pro vlastní stanovení metodou LC/MS. Lišily se také způsoby izolace analytů z matrice, způsoby extrakce, typy SPE kolonek i vlastní pracovní postup. Rovněž byly použity rozdílné analytické koncovky a odlišovaly se podmínky separace těchto analytů. Kapalinová chromatografie byla prováděna na různých kolonách a rozdílné byly také typy hmotnostních detektorů. Velký vliv může mít také to, že rozdíl v užívání těchto typů léčiv je v Evropě a v Asii pravděpodobně značně odlišný.

Závěrem je proto nutné říci, že pouhé porovnání získaných experimentálních dat bez zohlednění použitého analytického postupu je obtížné a nelze ho považovat za zcela správné.

Na Obr. 2: jsou znázorněny koncentrace sledovaných nesteroidních protizánětlivých léčiv zjištěné v jiných zemích Evropy.^{31, 32, 33, 34} Z obrázku je patrné, že v řece z České republiky byly detekovány mnohonásobně vyšší koncentrace těchto polutantů. Pro použité grafické znázornění musela být koncentrace kofeinu uvedena v $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Tab. 6: Koncentrace vybraných analgetik, pro různé země, v povrchových vodách ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)

Analyt/Stát	Di	Ib	Ke	Kof	Sa	Mef	Na	Pa
UK ³¹	8	18	4	x	14	5	29	x
Německo ³²	33	11	x	104	x	x	x	x
Švédsko ³³	669	56	x	x	x	x	177	x
Španělsko ³⁴	29	60	x	x	x	3	33	42
ČR	2154	1947	117	697	83	14	721	58



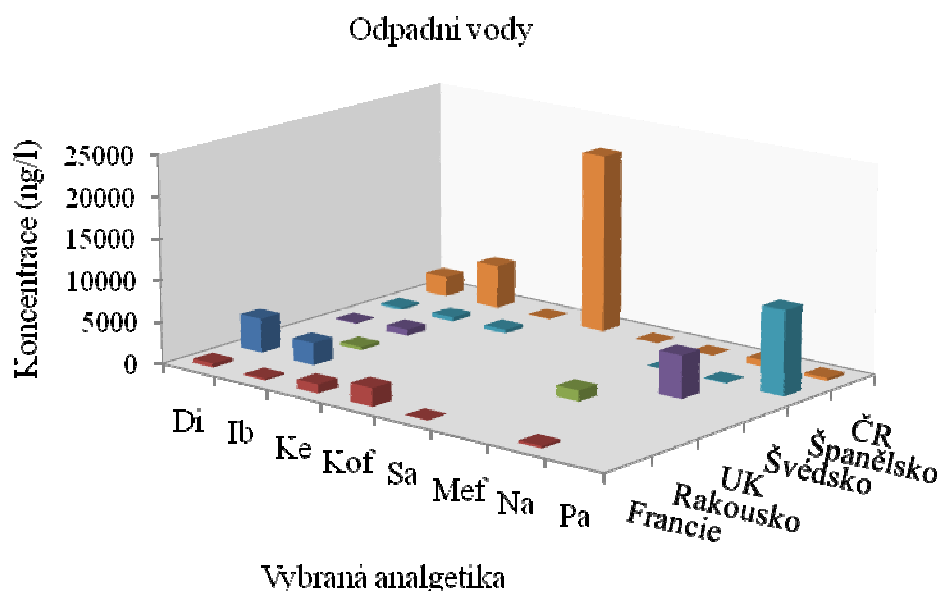
Obr. 2: Grafické znázornění koncentrací vybraných analgetik, pro různé země, v povrchových vodách

V rámci České republiky se stanovením léčiv v životním prostředí zabývají na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích na Fakultě rybářství a ochrany vod, a to ve spolupráci s Výzkumným ústavem rybářským a hydrobiologickým. Hodnotí především vliv léčiv na biotické složky vodního prostředí, a to zejména na ryby. Výskyt značného počtu organických polutantů přítomných v povrchových vod monitorovali pomocí pasivních vzorkovačů POCIS. Sledovali několik lokalit v České republice, a to Příbram, Chomutov, Pacov, Brloh a Prachatice. Ze skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv se zaměřili pouze na diklofenak. V některých místech odběrů byla koncentrace tohoto analgetika pod mezí detekce a nejvyšší koncentrace dosahovaly hodnot 600ng/POCIS.³⁵

Při srovnání zjištěných koncentrací ve vzorcích odpadních vod s ostatními evropskými státy jsou data velmi podobná, v některých případech jsou i příznivější pro Českou republiku. Pouze koncentrace kofeinu jsou výrazně vyšší. ^{36, 37, 38 , 33, 34}

Tab. 7: Koncentrace vybraných analgetik, pro různé země, v odpadních vodách ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$)

Analyt	Di	Ib	Ke	Kof	Sa	Mef	Na	Pa
Francie ³⁶	486	219	1081	2213	52	x	289	x
Rakousko ³⁷	4114	2679	x	x	x	x	x	x
UK ³⁸	x	405	x	x	x	1327	x	x
Švédsko ³³	111	751	x	x	x	x	5153	x
Španělsko ³⁴	250	516	451	x	x	5	99	10194
ČR	2394	5191	68	21394	16	6	774	355



Obr. 3: Grafické znázornění koncentrací vybraných analgetik, pro různé země v odpadních vodách

3 ZÁVĚR

Předmětem zájmu předložené disertační práce bylo získání poznatků z oblasti průniku reziduí léčiv do životního prostředí. Toto téma se během posledních let stalo předmětem celosvětového zájmu. Konkrétně byla pozornost zaměřena na sledování nesteroidních protizánětlivých léčiv a jejich pronikání do odpadních a povrchových vod, a to nejen v České republice, ale také ve Skotsku a na Taiwanu. Podle toho je tato práce také členěna.

Jako analytická metoda pro sledování vybraných analgetik ve vodách byla zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s detekcí diodovým polem (DAD), případně ve spojení s hmotnostním spektrometrem (MS).

Pro extrakci byla využita extrakce pevnou fází (SPE), s použitím různých sorbentů a různých pracovních podmínek.

V rámci experimentů prováděných v České republice byla provedena optimalizace chromatografických podmínek pomocí UV-VIS detektoru typu DAD na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18 s velikostí částic $5\mu\text{m}$ a rozměry $4,6 \times 150\text{ mm}$. Dané podmínky se však ukázaly jako nevyhovující při analýzách reálných vzorků. Při nich byl využit jako detektor hmotnostní spektrometr, s ionizací pomocí elektrospreje a analyzátozem byla iontová past. Při použití daného druhu detekce je vhodnější pracovat s nižšími průtoky mobilní fáze, a proto byly chromatografické podmínky optimalizovány také pro kolonu Zorbax Eclipse XDB-C18 s velikostí částic $3,5\mu\text{m}$ a rozměry $2,1 \times 150\text{ mm}$, která díky jemnějším částicím pracuje s menšími průtoky.

Dalším krokem bylo nalezení optimálních podmínek pro extrakci sledovaných léčiv z vodné matrice. Bylo použito několik typů SPE kolonek s různými druhy sorbentů a také byly vyzkoušeny různé postupy extrakce na pevnou fází. V rámci experimentů byla rovněž věnována pozornost závislosti sorpce daných analytů na pH. Výťažnosti extrakce byly ověřeny na dvou koncentračních úrovních, a to pro koncentrace očekávané v reálných vzorcích.

Pro sledované analyty byly stanoveny mez detekce a mez stanovitelnosti použité analytické metody a byla vypočtena nejistota stanovení.

Na území České republiky byly hodnoceny dva typy vod, a to voda odpadní a povrchová. Odpadní voda byla odebírána ve velkokapacitní čistírně odpadních vod v Brně – Modřicích, v intervalu od dubna do července 2010. Odebírán byl tzv. 24 hodinový slévaný vzorek, který byl dostatečně reprezentativní pro danou analýzu. Povrchová voda byla odebírána z řeky Křetínky. Zde byla zvolena dvě vzorkovací místa, Svojanov a Předměstí. Cílem výběru vzorkovacích míst bylo zjistit, jaký vliv má obec Svojanov na kvalitu říční vody.

Nejčastěji se vyskytujícím analytem byl kofein, jehož koncentrace byly vesměs nejvyšší. Tento analyt nepatří mezi analgetika, avšak byl zařazen mezi sledované látky, protože je často používán pro rychlejší nástup účinku léčivých přípravků na bázi analgetik. Jeho vysoké koncentrace ve vodě však mohly souviset zejména s vysokou spotřebou nápojů popř. potravin, ve kterých je kofein obsažen. Jeho vysoký obsah ve vodě však může ovlivňovat působení ostatních léčiv ve vodním ekosystému. Nejvíce se v odpadních vodách vyskytoval ibuprofen, který je u nás patří mezi oblíbená analgetika. V říční vodě byly během vzorkovacího intervalu postupně detekovány všechny sledované látky, včetně často se vyskytujícího kofeinu.

Druhá část disertační práce byla zpracována v rámci pracovní stáže na Environmental Research Institute ve městě Thurso, ve Skotsku. Tato stáž byla uskutečněna v rámci mezinárodního programu Socrates – Erasmus. Také zde byla pozornost směřována do oblasti výskytu léčiv v povrchových vodách. Rovněž na tomto pracovišti musela být vzhledem k odlišné přístrojové technice provedena optimalizace použitého analytického postupu. V prvním kroku byly

optimalizovány chromatografické podmínky s použitím kolony C18 Luna[®], 250 × 10 mm a velikostí částic 10 µm. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem, analyzátozem byl trojitý kvadrupól. Při detekci sledovaných léčiv v reálných vzorcích byla použita tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) a MRM (multiple reaction monitoring) mód, který umožnil přesné a správné stanovení analytů ve směsi.

Při hledání optimálního postupu extrakce bylo také posouzeno více druhů sorbentů a rozdílné postupy pro sorpci prováděnou při různém pH. Následně byla stanovena výtěžnost extrakce. Pro sledované analyty byly rovněž stanoveny mez detekce a mez stanovitelnosti použité analytické metody.

Ve Skotsku byly odebírány vzorky povrchové vody z řeky Thurso, která protéká skotskou vysočinou. Na řece byla vybrána tři odběrová místa, v závislosti na poloze čistírny odpadních vod pro město Halkirk. V průběhu provádění experimentu přibýlo ještě čtvrté odběrové místo, protože bylo objeveno možné bodové znečištění říční vody vodou odpadní, a to z porušeného potrubí. Odběry vzorků byly prováděny v měsíci červnu roku 2009.

Ve všech odebraných vzorcích se vyskytovala kyselina salicylová, a to v poměrně vysokých koncentracích. Tento jev však může souviset s vysokým obsahem huminových kyselin v řece Thurso, v jejichž molekulových strukturách je obsažena struktura kyseliny salicylové, která se působením různých fyzikálně-chemických vlivů na huminové kyseliny může uvolňovat. Kromě toho se v odebraných vzorcích velmi často vyskytoval ketoprofen, dále kyselina mefenamová a ibuprofen. Ve vzorcích, které byly odebrány z dodatečně zařazeného vzorkovacího bodu, byla stanovena všechna sledovaná analgetika, a to ve velmi vysokých koncentracích. To potvrdilo domněnku, že se jedná o prioritní zdroj znečištění vodního toku.

Poslední část disertační práce byla měřena na Taiwanu, v rámci stáže, která byla uskutečněna díky rozvojovým programům MŠMT 2010 (RP) a mobilitnímu stipendijnímu fondu VUT v Brně (MSF). Stáž byla uskutečněna na National Sun Yat-sen University, ve městě Kaohsiung. Téma této disertační práce odpovídalo místnímu výzkumnému záměru, a proto bylo pokračováno v již ověřených postupech. Pro analýzy vybraných analgetik byla opět použita kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem. Separace vybraných analytů byla provedena pomocí kolony Kinetex PFP, velikost 100 × 2,1 mm, velikost částic byla 2,6 µm. Ionizace byla prováděna opět pomocí elektrospreje a analyzátozem byl v tomto případě rovněž trojitý kvadrupól. Pro identifikaci a kvantifikaci sledovaných analytů v reálných vzorcích vody byla aplikována tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) a MRM (multiple reaction monitoring) mód, který umožňuje přesné a správné stanovení analytů ve směsi. U všech odebraných vzorků z této oblasti byla měřena salinita, neboť odebrané vzorky obsahovaly nejen vodu z řek, ale také vodu mořskou.

Pro extrakci byly využity kolony Oasis[®] HLB Cartridge, Waters; v rámci těchto experimentů nebyla prováděna úprava pH vzorků. V rámci tohoto experimentu byly také stanoveny mez detekce a mez stanovitelnosti použité analytické metody pro všechny sledované analyty.

Na Taiwanu byly provedeny odběry vzorků povrchové vody ze tří řek (Yanshuei, Erren, Agongdian) a z kanálu ve městě Tainan, který obsahoval převážně mořskou vodu. Uvedené řeky protékají oblastí Tainan a Kaohsiung. Na každé řece bylo provedeno několik odběrů, a to v různých místech, podél jejich toku. Nejčastěji se vyskytujícím analgetikem byl ibuprofen, který měl také nejvyšší koncentrace, čímž bylo potvrzeno, že je celosvětově nejvíce aplikovaným analgetikem.

4 ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ INFORMACE

ADRESA Ing. Lucie Vydrová
Předměstí, 33, 569 92, Svojanov
TELEFON 605 571 903
E-MAIL lucka.vydrova@centrum.cz
NÁRODNOST Česká
DATUM NAROZENÍ 9.2.1982, Brno

VZDĚLÁNÍ

2007–dosud VUT v Brně, Fakulta chemická, doktorské studium
Státní doktorská zkouška
Téma disertační práce: Využití separačních metod pro studium biologicky
aktivních látek ve vodách
2001–2007 VUT v Brně, Fakulta chemická, magisterské studium
Státní zkouška
Téma diplomové práce: Stanovení reziduí tetracyklinu a chlortetracyklinu v
odpadních vodách
1997–2001 Střední průmyslová škola textilní, Brno
Maturitní zkouška
1988–1997 Základní škola, Brno

DOPLŇKOVÉ

VZDĚLÁNÍ

10.–14. 9. 2007 8. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, Lednice
8.–11. 10. 2007 Analýza organických látek - kurz
Prosinec 2007 Aktuální evropská legislativa v potravinářství a životním prostředí - kurz
31. 1. 2008 Vzdělávací seminář SPME a GC, VŠCHT Praha
12. 3. 2008 seminář LC/MS/MS v analýze malých molekul, Applied Biosystems, Brno
Příprava vzorku a jejich chromatografická analýza, Ústav analytické chemie
AV ČR, Brno
10. 4. 2008
12. 2. 2009 Vzdělávací seminář SPME a GC, VŠCHT Praha

ZAHŘANIČNÍ STÁŽE

Březen–Červen 2009 Pracovní stáž na Environmental Research Institute, Thurso, Scotland
Stanovení reziduí léčiv v povrchových vodách metodou LC/MS
Reference: Dr. Kenneth Boyd
e-mail: Kenneth.Boyd@thurso.uhi.ac.uk
Září–Prosinec 2010 Stáž na National Sun Yat-sen University, Kaoshiung, Taiwan
Stanovení reziduí léčiv v povrchových vodách metodou LC/MS
Reference: prof. Chon-Lin Lee
e-mail: linnohc@mail.nsysu.edu.tw

VĚDECKÉ AKTIVITY

2008, Brno	4th Meeting on Chemistry and Life
2008, Brno	37th Conference Drug Synthesis and Analysis
2008, Taormina, IT	Complex Systems and Changes: Water and Life
2009, Limognes, FR	EMEC10
2009	Řešení projektu v rámci FRVŠ: Stanovení reziduí léčiv a degradačních produktů polymerů v biotických složkách životního prostředí
2010, Praha	MSB 2010

JAZYKOVÉ ZNALOSTI

Anglický jazyk - aktivní
Německý jazyk - pokročilý

5 ABSTRAKT

Léčiva patří mezi biologicky aktivní látky, které se odlišují různými funkčními skupinami, fyzikálně-chemickými a biologickými vlastnostmi. Tyto chemické látky, v současnosti zařazované mezi „nové“ kontaminanty, se kumulují v různých složkách životního prostředí. Do životního prostředí se dostávají v průběhu jejich průmyslové výroby, dále v důsledku používání v léčebných zařízeních nebo v domácnostech.

Protože se jedná o látky biologicky aktivní, mohou v různých složkách životního prostředí negativně ovlivňovat zde probíhající procesy. Léčiva se vyznačují po chemické stránce vesměs odlišnou strukturou, a proto jsou často rozdělována nejen podle struktury, ale zejména podle jejich účinku na živé organismy.

Na základě posouzení množství používaných léčiv v České republice lze konstatovat, že nejčastěji používanými léčivy jsou nesteroidní protizánětlivé léky patřící do skupiny analgetik. Důvodem jejich velkého rozšíření je především to, že téměř všechny si lze zajistit bez lékařského předpisu. Vybraná analgetika byla sledována nejen v odpadních vodách odebraných z velkokapacitní čistírny odpadních vod situované v Brně – Modřicích, ale také v povrchové vodě z povodí řeky Křetínky, kde byla odebírána ze dvou odběrových míst. Kontaminace povrchových vod léčivy typu analgetik byla hodnocena nejen v České republice, ale také v povodí řeky Thurso ve Skotsku a na Taiwanu.

Pro extrakci sledovaných reziduí z matrice byla ve všech případech použita extrakce pevnou fází (SPE). Jako analytická koncovka byla pro experimenty prováděné v České republice aplikována vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s detekcí diodovým polem (DAD) nebo hmotnostní spektrometrie (MS). Pro experimenty hodnocené ve Skotsku a na Taiwanu byla rovněž použita kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Metoda HPLC/MS umožňuje zjišťovat hodnocené analyty i ve velmi nízkých koncentracích ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$).

V rámci prováděných experimentů byla většinou identifikována a následně kvantifikována všechna sledovaná analgetika, a to jak v odpadních vodách, tak také z povodí řeky Křetínky v České republice. Totéž lze konstatovat také pro nálezy zjištěné v povrchových vodách v povodí řeky Thurso ve Skotsku a v povodí tří řek na Taiwanu a zjištěné koncentrace analgetik v povrchových vodách z různých světových lokalit byly porovnány.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Hampl, F., Rádl, S., Paleček, J.: *Farmakochemie*. 2. rozšířené vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2007. 450s. ISBN 978-80-7080-639-5.
- ² Trnavský, K., Dostál, C. a kol.: *Klinická revmatologie*. 1. vyd. Praha: Avicem, zdravotnické nakladatelství, n.p. 1990. 440s. ISBN 80-201-0038-5.
- ³ Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007. 372s. ISBN 978-80-247-1672-5.
- ⁴ Bertram, G., Katzung, G.: *Základní a klinická farmakologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská, s. r. o., 2006. 1106 s. ISBN 80-7319-056-7.
- ⁵ Gomez, M., J., Petrovic, M., Fernandez-Alba, A., R., Barcelo, D.: 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*, 2005, vol. 1114, pp. 224–233.
- ⁶ Christensen, A., M., Markussen, B., Baun, A., Halling-Sørensen, B.: Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges. *Chemosphere*, 2009, vol. 77, pp. 351-358.
- ⁷ Gibson, R., Becerril-Bravo, E., Silva-Castro, V., Jiménez, B.: Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1169, pp. 31-39.
- ⁸ Watts, M., Pascoe, D., Kathleen, C.: Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, vol. 54, pp 207-215.
- ⁹ Ferrari, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A., Garric, J.: Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, vol. 55, pp. 359-370.
- ¹⁰ Balcioglu, I., A., Otker, M.: Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by O₃ and O₃/H₂O₂ processes. *Chemosphere*, 2003, vol. 50, issue 1, pp. 85–95.
- ¹¹ Beausse, J.: Selected drugs in solid matrices: A review of environmental occurrence, determination and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, vol. 23, pp. 753-761.

-
- ¹² Rosal, R., Rodríguez, A., Perdigón-Melón, J.A., Mezcua, M., Hernando, M.D., Letón, P., García-Calvo, E., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R.: Removal of pharmaceuticals and kinetics of mineralization by O₃/H₂O₂ in a biotreated municipal wastewater. *Water research*, 2008, vol. 42, pp. 3719- 3728.
- ¹³ Gašpariková, E., Bodík, I., Dančová, L.: Vliv dezinfekčního prostředku na aktivovaný kal. *Vodní hospodářství*, 2005, roč. 55, č. 6, s.162–164. ISSN 1211-0760.
- ¹⁴ Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D.: Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem*, 2007, vol. 387, pp. 1225–1234.
- ¹⁵ Chudoba, J., Dohányos, M., Wanner, J.: *Biologické čištění odpadních vod*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1991. 468 s. ISBN 04-609-91.
- ¹⁶ Snyder, S., A., Adham, S., Redding, A., M., Cannon, F., S., DeCarolis, J., Oppenheimer, J., Wert, E., C., Yoon, Y.: Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination*, 2007, vol. 202, pp. 156–181.
- ¹⁷ Sharma, V., K.: Oxidative transformations of environmental pharmaceuticals by Cl₂, ClO₂, O₃, and Fe(VI): Kinetics assessment. *Chemosphere*, 2008, vol. 73, pp. 1379-1386.
- ¹⁸ Horáková, M., a kol.: *Analytika vody*. 2. vyd. dotisk. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2007. 335 s. ISBN 978-80-7080-520-6.
- ¹⁹ <http://en.wikipedia.org/wiki/Caffeine> [cit. 18. 11. 2009].
- ²⁰ Díaz-Cruz, M., S., López de Alda, M., J., Barceló, D.: Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, vol. 22, No. 6, pp. 340–351.
- ²¹ Sommer, L. a kol.: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTUM, 2000, 347s. ISBN 80-214-1742-0.
- ²² Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264s. ISBN 80-246-0852-9.
- ²³ Holčápek, M., Jandera, P.: Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*, 1998, vol. 92, str. 278–286.
- ²⁴ Vřešťál, J. a kol.: *Hmotnostní spektrometrie*. 2. doplněné vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 114 s. ISBN 80-210-2283-3.
- ²⁵ Holčápek, M.: Sprejové ionizační techniky: ESI, APCI, APPI. 8. ročník *Školy hmotnostní spektrometrie, sborník přednášek*, 2007.
- ²⁶ https://www.vutbr.cz/elearning/file.php/95522/MS_03.pdf [cit. 30. 9. 2010].

-
- ²⁷ <http://kretin.eu/?MI=18> [cit. 21. 10. 2010].
- ²⁸ <http://www.thursoriver.co.uk> [cit. 21. 10. 2010].
- ²⁹ http://en.wikipedia.org/wiki/River_Thurso [cit. 21. 10. 2010].
- ³⁰ <http://www.taipeitimes.com/News/feat/archives/2005/04/17/2003250886/2> [cit. 20. 12. 2010].
- ³¹ Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R., M., Guwy, A., J.: The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2008, vol. 74, pp. 1299 – 1312.
- ³² Weigel, S., Kallenborn, R., Hühnerfuss, H.: Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1023, pp. 183–195.
- ³³ Zorita, S., Boyd, B., Stig, J., Yilmaz, E., Svensson, C., Mathiasson, L., Bergström, S.: Selective determination of acidic pharmaceuticals in wastewater using molecularly imprinted solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta*. 2008, vol. 626, pp. 147-154.
- ³⁴ Gros, M., Petrović, M., Barceló, D.: Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*. 2006, vol. 70, pp. 678–690.
- ³⁵ Randák, T., a kol.: Výzkum vlivu polutantů přítomných ve vodním prostředí na ryby. *Antropogenní tlaky na stav půd, vodní zdroje a vodní ekosystémy v české části mezinárodního povodí Labe*, zpráva za rok 2010, 2010, Vodňany, pp.16.
- ³⁶ Togola, A., Budzinski, H.: Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 2008, vol.1177, pp. 150 – 158.
- ³⁷ Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H.: Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*. 2005, vol. 39, pp. 4797–4807.
- ³⁸ Nebot, C., Gibb, S., W., Boyd, K., G.: Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, vol. 598, pp. 87-94.