

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

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

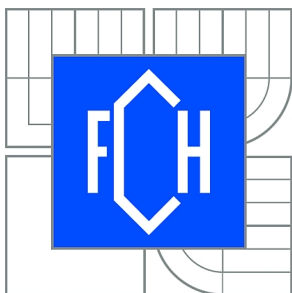
Ing. LUCIE VYDROVÁ

BRNO 2011



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

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. LUCIE VYDROVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0031/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Ing. Lucie Vydrová	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (P2805)	
Studijní obor:	Chemie životního prostředí (2805V003)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.	
Konzultanti:		

Název dizertační práce:

Využití separačních metod pro studium biologicky aktivních látek ve vodách

Zadání dizertační práce:

- zpracování rešerše na téma průniku reziduí léčiv do složek životního prostředí
- provést výběr analytů na bázi léčiv, které budou ve vodách stanovovány
- provést výběr a optimalizaci separačních metod používaných pro stanovení vybraných léčiv v povrchových vodách
- optimalizovaný preanalytický a analytický postup aplikovat pro stanovení analgetik
- zhodnocení získaných výsledků a jejich zpracování do publikací

Termín odevzdání dizertační práce: 10.1.2011

Dizertační práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

Ing. Lucie Vydrová
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

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 odebrané 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 také 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 řekách Erren, Agongdian, Yanshuei a kanálu ve městě Tainan na Taiwanu a zjištěné koncentrace analgetik v povrchových vodách z různých světových lokalit byly porovnány.

Klíčová slova: Rezidua, biologicky aktivní látky, analgetika, povrchová voda, odpadní voda, separační metody, extrakce SPE, HPLC/MS, tandemová hmotnostní spektrometrie.

ABSTRACT

Pharmaceuticals are biological active compounds with different functional groups, physico-chemical and biological properties. These chemical compounds are called as “new contaminants” which cumulate in various environmental components. These contaminants input to environment from industrial processes, hospitals and health care institutions or household sources and these pollutants can to negatively interact with environmental components.

Pharmaceuticals are separated according to structure and their effects to live organisms. On the basis of drug consumption in Czech Republic the non-steroidal anti-inflammatory drugs are the most using pharmaceuticals, because these drugs can be obtain without prescriptions. The choosing analgesics for study were monitored in waste water from waste waters treatment plant (WWTP Brno – Modřice) and in surface water from two sampling sites of river Kretinka. Pharmaceuticals were monitored in surface waters in Czech Republic, in Scotland (river Thurso) and in Taiwan (river Erren, Agongdian, Yanshuei and canal of Tainan)

Solid phase extraction (SPE) is used for extraction of study pharmaceutical from water system. The high performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detection or mass spectrometry was used for determination of drugs in surface waters from Czech Republic. The water samples from Scotland and Taiwan were analysed and the high performance liquid chromatography with mass spectrometry (HPLC/MS) was used for determination of pharmaceuticals. The method of HPLC/MS enables the determination of study compounds in the very low range of concentrations ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$).

All monitored pharmaceuticals were identified and quantified in water samples from river Kretinka in Czech Republic, river Thurso (Scotland) and rivers Erren, Agongdian, Yanshuei and canal of Tainan in Taiwan and the obtained data were compared.

Key words: Residues, biological active compounds, analgesics, surface water, waste water, separation methods, extractions SPE, HPLC/MS, tandem mass spectrometry.

VYDROVÁ, L. *Využití separačních metod pro studium biologicky aktivních látek ve vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 118 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis doktoranda

Poděkování:

Děkuji paní Prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za vedení dizertační práce a účinnou pomoc při jejím dokončování, dále děkuji Doc. Ing. Josefu Čáslavskému CSc. za odborné rady při řešení experimentální části z oblasti hmotnostní spektrometrie a rovněž dalším pracovníkům ÚCHTOŽP VUT. Kromě toho rovněž děkuji Ing. Haně Alexové a Mgr. Aleně Sýkorové ze studijního oddělení Fakulty chemické za pomoc při realizaci zahraničních stáží. Mé díky patří také mým zahraničním vedoucím za rady a pomoc při řešení dílčích problémů. Děkuji také mé rodině a všem přátelům za všeobecnou podporu.

OBSAH

1. ÚVOD.....	10
2. ANALGETIKA	11
2.1. Bolest	11
2.2. Historie analgetik	11
2.3. Rozdělení analgetik.....	13
2.4. Mechanismus účinku	14
2.5. Distribuce léčiv v organismu	15
2.6. Biotransformace léčiv	17
2.7. Cyklus léčiv v životním prostředí	18
2.8. Léčiva v čistírnách odpadních vod	19
2.9. Deriváty p-aminofenolu.....	21
2.9.1. Paracetamol (acetaminofen).....	21
2.9.1.1. Definice.....	21
2.9.1.2. Vlastnosti	21
2.9.1.3. Příprava.....	21
2.9.1.4. Farmakokinetika	22
2.9.1.5. Indikace.....	22
2.9.1.6. Nežádoucí účinky	22
2.10. Deriváty kyseliny salicylové.....	22
2.10.1. Kyselina salicylová.....	22
2.10.1.1. Definice.....	23
2.10.1.2. Vlastnosti	23
2.10.1.3. Příprava.....	23
2.10.2. Kyselina acetylsalicylová	23
2.10.2.1. Definice.....	23
2.10.2.2. Vlastnosti	24
2.10.2.3. Příprava.....	24
2.10.2.4. Farmakokinetika	24
2.10.2.5. Indikace.....	24
2.10.2.6. Nežádoucí účinky	24
2.11. Deriváty kyseliny propionové.....	25
2.11.1. Ibuprofen.....	25
2.11.1.1. Definice.....	25
2.11.1.2. Vlastnosti	25
2.11.1.3. Příprava.....	25
2.11.1.4. Farmakokinetika	26
2.11.1.5. Indikace.....	26
2.11.1.6. Nežádoucí účinky	26
2.11.2. Ketoprofen	26
2.11.2.1. Definice.....	26
2.11.2.2. Vlastnosti	27
2.11.2.3. Příprava.....	27
2.11.2.4. Farmakokinetika	27

2.11.2.5. Indikace.....	28
2.11.2.6. Nežádoucí účinky.....	28
2.11.3. Naproxen.....	28
2.11.3.1. Definice.....	28
2.11.3.2. Vlastnosti	28
2.11.3.3. Příprava.....	28
2.11.3.4. Farmakokinetika	29
2.11.3.5. Indikace.....	29
2.11.3.6. Nežádoucí účinky.....	29
2.12. Deriváty kyseliny octové	29
2.12.1. Diklofenak	29
2.12.1.1. Definice.....	30
2.12.1.2. Vlastnosti	30
2.12.1.3. Příprava.....	30
2.12.1.4. Farmakokinetika	30
2.12.1.5. Indikace.....	30
2.12.1.6. Nežádoucí účinky.....	31
2.13. Deriváty kyseliny anthranilové	31
2.13.1. Kyselina mefenamová	31
2.13.1.1. Definice.....	31
2.13.1.2. Vlastnosti	31
2.13.1.3. Příprava.....	31
2.13.1.4. Farmakokinetika	32
2.13.1.5. Indikace.....	32
2.13.1.6. Nežádoucí účinky.....	32
2.14. Kofein.....	32
2.14.1.1. Definice.....	32
2.14.1.2. Vlastnosti	32
2.14.1.3. Příprava.....	32
2.14.1.4. Farmakokinetika	32
2.14.1.5. Indikace.....	33
2.14.1.6. Nežádoucí účinky.....	33
2.15. Metody stanovení analgetik – antipyretik.....	33
2.15.1. Odběry vzorků vody	33
2.15.2. Kontaminace vzorku.....	34
2.15.3. Úprava vzorku	34
2.15.3.1. Extrakce na tuhém sorbentu	35
2.15.4. Separace pomocí HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie).....	36
2.15.4.1. Vlastní metoda	37
2.15.4.2. Detektory.....	38
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	42
3.1. Hodnocená environmentální matrice	42
3.1.1. Odpadní voda	42
3.1.2. Povrchová voda.....	42
3.1.2.1. Křetínka	42
3.1.2.2. Řeka Thurso	43

3.1.2.3. Řeky Yanshuei, Erren, Agongdian a kanál v Tainanu	44
3.2. Přístroje, zařízení, software	45
3.2.1. Příprava a extrakce vzorků	45
3.2.2. Kapalinová chromatografie	46
3.2.3. Software pro zpracování a prezentaci dat	46
3.3. Používané chemikálie a standardy	46
3.3.1. Chemikálie	46
3.3.2. Standardy sledovaných léčiv + vnitřní standardy (abecedně seřazeno)	47
3.4. Pracovní postupy	47
3.4.1. Odběry vzorků	47
3.4.2. Příprava vzorků a izolace analytů	50
3.4.3. Identifikace a kvantifikace analytů v odpadní vodě a v povrchové vodě z řeky Křetínky	51
3.4.4. LC/MS podmínky pro stanovení analytů v odpadní vodě a povrchové vodě z řeky Křetínky	52
3.4.4.1. Chromatografické podmínky	52
3.4.4.2. Nastavení hmotnostního spektrometru	53
3.4.5. Identifikace a kvantifikace analytů v povrchové vodě z řeky Thurso	53
3.4.6. LC/MS podmínky pro stanovení analytů v povrchové vodě z řeky Thurso	54
3.4.6.1. Chromatografické podmínky	54
3.4.6.2. Nastavení hmotnostního spektrometru	54
3.4.7. Identifikace a kvantifikace analytů ve vzorcích povrchové a mořské vody odebraných na Taiwanu	55
3.4.8. LC/MS podmínky pro stanovení analytů v povrchové a mořské vodě z odběrových lokalit na Taiwanu	56
3.4.8.1. Chromatografické podmínky	56
3.4.8.2. Nastavení hmotnostního spektrometru	56
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	58
4.1. Stanovení chromatografických podmínek na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series s detektorem diodového pole; pro experimenty prováděné v České Republice	58
4.1.1. Stanovení diklofenaku a ketoprofenu	58
4.1.2. Stanovení kyseliny salicylové a naproxenu	59
4.1.3. Stanovení diklofenaku, ibuprofenu, ketoprofenu, kyseliny mefenamové, kyseliny salicylové, naproxenu a paracetamolu	60
4.2. Využití hmotnostní detekce pomocí hmotnostního spektrometru Agilent 6320 Series, Ion Trap LC/MS (Česká Republika)	63
4.2.1. Sledované analyty a jejich hmotnostní spektra (řazeno dle t_R)	63
4.3. Spojení HPLC/MS pro stanovení léčiv	68
4.4. Optimalizace extrakce pevnou fází pro sledované analyty (experiment prováděný v České Republice)	69
4.4.1. Stanovení diklofenaku a ketoprofenu	70
4.4.2. Stanovení kyseliny salicylové a naproxenu	70
4.4.3. Stanovení diklofenaku, ibuprofenu, ketoprofenu, kyseliny mefenamové, kyseliny salicylové, naproxenu a paracetamolu	70
4.5. Stanovení léčiv v reálných vzorcích odebraných v České Republice	80

4.6. Stanovení chromatografických podmínek pro kapalinový chromatograf Alliance 2695 HPLC, Waters, pro experimenty prováděné ve Skotsku	83
4.7. Podmínky hmotnostní detekce pomocí hmotnostního spektrometru Waters Micromass® Quattro Micro™ detector, Waters (Skotsko).....	83
4.8. Optimalizace extrakce pevnou fází pro sledované analyty (v rámci experimentu prováděného ve Skotsku).....	84
4.9. Stanovení léčiv v reálných vzorcích odebíraných ve Skotsku.....	88
4.10. Nastavení chromatografických podmínek na kapalinovém chromatografu Agilent 1200 module, Agilent, pro experimenty prováděné na Taiwanu.....	93
4.12. Extrakce pevnou fází, použita při experimentech prováděných na Taiwanu	94
4.13. Stanovení léčiv v reálných vzorcích povrchových vod odebraných na Taiwanu	95
4.14. Porovnání získaných výsledků s publikovanými údaji	100
5. ZÁVĚR.....	103
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	106
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	113
8. SEZNAM PŘÍLOH	114
9. PŘÍLOHY	115

1. 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 v České Republice rovněž aplikace různých potravinových doplňků. Tento trend vede nejen k nadměrnému užívání syntetických farmak i fytofarmak, ale zejména ke zvýšení množství jejich odpadu a s tím souvisejícím průnikem do složek životního prostředí.

Léčiva se mohou do životního prostředí dostávat v původní nebo pozměněné formě různými cestami. Největším již prokázaným 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 a to přes čistírny odpadních vod, po vypuštění přečištěných odpadních vod z recipientu do povrchových vod. Mezi jednu z nejužívanějších skupin léčiv patří nesteroidní protizánětlivé léky nacházející se ve zvýšeném množství v každé domácnosti. Důvodem je především to, že je možné si tato léčiva obstarat 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 velkým počtem možných vedlejších účinků, 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.

2. ANALGETIKA

2.1. Bolest

Každý člověk se setkává s bolestí již od narození. Jedná se o nepříjemný, v krajních případech až nesnesitelný subjektivní smyslový pocit, vyvolaný poraněním nebo průběhem choroby. Bolest vzniklá na základě těchto faktorů je označována jako fyziologická bolest (nocicepce). Bolest je však možno také pociťovat rovněž jako emoční odezvu.

Bolest lze dělit na:

- ❖ Akutní – intenzivní, krátkodobá, dobře lokalizovatelná, příčiny lze ve většině případů snadno identifikovat. Je dobře potlačitelná analgetiky.
- ❖ Chronickou – má delší trvání, než by odpovídalo danému typu zranění nebo poškození. Díky tomu ztrácí smysl varovného signálu. Tato bolest je hůře potlačitelná.¹

Jiný způsob dělení je podle místa vzniku bolesti:

- ❖ Somatická – vycházející z pohybového aparátu, povrchu hlavy a kůže.
- ❖ Viscerální – vycházející z vnitřních orgánů a cév.²

Bolest má zejména ochranný význam; znamená to, že signalizuje nebezpečí poškození organismu. Vznik vjemu bolesti způsobují nocireceptory (receptory bolesti). Jsou to volná zakončení specializovaných neuronů, která reagují na mechanická, termická i chemická podráždění, dále na tkáňové působky (prostaglandiny, histamin, serotonin aj.) uvolňující se ze tkání postižených zánětem. Vzniklý signál je přenášen do mozku, který jej vyhodnotí jako bolest.

Léčba bolesti (algeziologie) patří mezi hlavní léčebné úkony v medicíně. K jejímu potlačení slouží právě analgetika.¹

2.2. Historie analgetik

Lidská populace je od počátku sužována celou řadou nemocí a lidé se vždy pokoušeli bojovat proti utrpení, bolestem a smrti. V rámci archeologických nálezů byly objeveny nejen lebky se zcela zhojenými trepanacemi, ale dokonce i lebky, na nichž byly úspěšně prováděny opakované trepanace ve větších časových odstupech. První písemné zmínky o léčbě bolesti pocházejí ze starověkých kultur. Dochovaly se například papyry ze starého Egypta nebo mezopotamské hlíněné destičky zpravující další generace o léčbě bolesti v daném časovém období. Bolest zde byla spojována s hněvem božstev.³

Nesteroidní antirevmatika jsou používána k léčebným účelům již přes dva tisíce let, tj. od doby, odkdy je znám analgetický a antipyretický účinek extraktů vrbové kůry.⁴

V 17. a 18. století byl oblíbeným prostředkem proti zánětům chinin z kůry chinovníku; první zprávy o účinnosti vrbových extraktů však přišly až v 18. století. Nejstarší zprávy jsou od Edwarda Stoneho (léčil pacienty se zimnicí). Kyselina salicylová byla syntetizována pro komerční účely v roce 1874; první klinickou zkoušku provedl roku 1876 skotský lékař Thomas McLagan, který kyselinou salicylovou léčil revmatickou horečku. Nevýhodou bylo, že velké dávky kyseliny salicylové byly nepříjemné na chuť a dráždily a poškozovaly zažívací trakt.⁵

Tento problém byl vyřešen v roce 1898, kdy německá firma Bayer začala vyrábět kyselinu acetylsalicylovou pod názvem Aspirin. Kyselina acetylsalicylová má relativně slabý

analgetický a antiflogistický účinek, a proto je k dosažení klinické účinnosti zapotřebí dosti vysokých dávek podávaných v krátkých časových intervalech. Hlavní érou rozvoje této skupiny léčiv byla druhá polovina minulého století. V roce 1952 bylo vyrobeno antiflogistikum – phenylbutazon, který však byl pro časté a závažné nežádoucí účinky postupně vytlačen novějšími, výhodnějšími léčivými substancemi. V šedesátých letech začal být aplikován ještě indometacin se silným analgetickým a antiflogistickým účinkem a ibuprofen, který měl ve srovnání s předchozími látkami podstatně lepší snášenlivost. V současné době patří ibuprofen, a to ve většině zemí světa, mezi nejčastěji předepisovaná antirevmatika. Je třicetkrát účinnější než aspirin. V sedmdesátých letech byl do praxe rovněž uveden diklofenak a také první antirevmatikum se středně dlouhým biologickým poločasem eliminace – naproxen, který bylo možné podávat jen ve dvou denních dávkách.⁶ V roce 1971 popsali sir J. Vane (Obr. 1) mechanismus účinku NSAID, za což obdržel v roce 1982 Nobelovu cenu.⁴



Obr. 1 Sir John R. Vane⁷

Prvním antirevmatikem s dlouhým biologickým poločasem eliminace byl piroxicam, zajišťující účinnost po celých 24 hodin při jedné denní dávce.⁶ V roce 1991 byly popsány dvě izoformy cyklooxygenázy – COX I a COX II a o několik let později byly uvedeny do praxe některé nové selektivnější inhibitory COX II.⁴

Tabulka 1 Historie analgetik⁸

Rok	Léčivo
1898	kyselina acetylsalicylová
1952	fenylbutazon
1963	indometacin
1969	ibuprofen
70. léta 20. století	diklofenak, naproxen
80. léta 20. století	piroxikam, ketoprofen
90. léta 20. století	nabumeton, aceklofenak
1995-2000	inhibitory COX II

2.3. Rozdělení analgetik

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, která 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

Narkotická analgetika jsou agonisty opioidních receptorů v mozku. Nejznámějšími a zároveň nejstaršími silnými analgetiky jsou přírodní morfiny izolované z opia. Jejich hlavní nevýhodou, a to přírodních i synteticky vyrobených, je vznik tolerance a možné závislosti na těchto látkách. Proto je jejich výroba, distribuce a podávání pod přísnou kontrolou (Zákon o návykových látkách 167/1998 Sb. a jeho novela č.141/2009 Sb.).^{1,9}

Z přírodních látek sem patří morfin, což je prostředek pro tišení silných bolestí, kodein, jehož analgetická účinnost je sice nižší, avšak je méně návykový a má schopnost potlačovat kašlací reflex; proto bývá součástí různých antitusik. Hlavním zdrojem těchto látek je makovina, ze které se účinné látky získávají extrakcí. Z makoviny je dále možné získat také thebain, který je surovinou pro přípravu polosyntetických morfinů, kterými jsou například ethylmorfin (antitusické působení), diamorfin, oxymorfon, oxykodon a další.¹

Analgetika – antipyretika je dále možné rozdělit podle chemické struktury na:

- ♦ Deriváty anilinu – klasickým a nejpožívanějším zástupcem této skupiny je paracetamol, v USA známý pod názvem acetaminofen (Panadol).
- ♦ Deriváty kyseliny salicylové – jsou to účinná antipyretika, která mají také mírný analgetický a protizánětlivý účinek. Samotná kyselina salicylová se dnes používá v omezené míře, především ve formě solí. Jejím nejrozšířenějším derivátem je kyselina acetylsalicylová (Aspirin, Acylpyrin).

- ♦ Deriváty anthranilové kyseliny (fenamáty) – u těchto látek převládá analgetický a protizánětlivý účinek. Nevýhodou jsou vedlejší účinky ovlivňující zejména gastrointestinální trakt. Zástupcem je např. kyselina mefenová (Mefenacit).
- ♦ Arylalkanové kyseliny – patří k nejrozšířenějším protizánětlivým látkám. Do této skupiny patří diklofenak (Voltaren), ibuprofen (Brufen, Ibalgin, Nurofen), naproxen (Nalgesin S) a ketoprofen (Ketofen).
- ♦ Deriváty pyrazolonu a pyrazolidionu – prvním léčivem byl fenazon (Antipyrin), který byl hojně využíván jako analgetikum a antipyretikum. Rovněž je používán jako intermediát pro syntézy dalších pyrazolonů např. propyfenazonu (Lardon), nebo je součástí kombinovaných přípravků, mezi které patří Valetol.
- ♦ Oxikamy – jedná se o poměrně novou skupinu nesteroidních protizánětlivých látek. Jejich výhodou je to, že mají vysokou účinnost a dlouhý biologický poločas rozpadu. Nejznámějším zástupcem je např. piroxikam (Reumador). Tyto látky jsou dostupné také ve formě mastí a gelů pro místní aplikaci.
- ♦ Inhibitory COX II – tato skupina představuje poslední generaci protizánětlivých látek, s účinkem zaměřeným pouze na místo zánětu. Klasickým preferenčním inhibitorem COX II je nimesulid (Nimesil). Nevýhodou jsou nežádoucí účinky na játra; proto se nesmí v některých zemích (USA) používat, případně je jeho použití omezeno na pacienty starší 12 let.¹

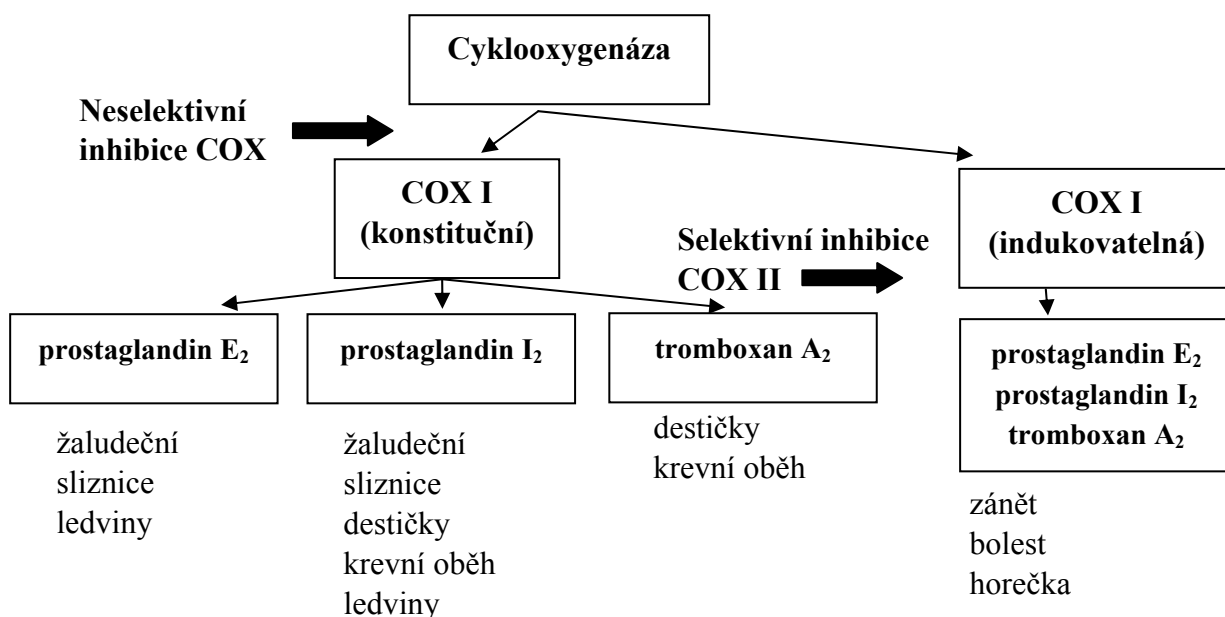
2.4. Mechanismus účinku

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. Kromě toho 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.

Prostaglandiny vznikají z kyseliny arachidonové, což je nenasycená mastná kyselina, která tvoří celé buněčné membrány. Kyselina arachidonová je metabolizována pomocí enzymu cyklooxygenázy na prostaglandiny. Ty jsou vytvářeny i v místě zánětu a jsou zdrojem lokálních projevů zánětu, jako je hyperémie, otok, zvýšená teplota, bolestivost apod.. Nesteroidní protizánětlivé léky inhibují aktivitu cyklooxygenázy a tím i přeměnu kyseliny arachidonové.¹⁰ Prostaglandiny mohou být vytvářeny také za fyziologických podmínek a podílejí se na celé řadě důležitých fyziologických funkcí, jako je např. ochrana žaludeční sliznice, regulace mikrocirkulace v ledvinách, regulace agregace destiček atd. Deplece těchto tzv. konstitučních prostaglandinů pak vede k nežádoucím projevům léčby antirevmatiky (NSAID gastropatie, nefropatie aj.).⁴

Dalším významným objevem v historii NSAID byl v osmdesátých letech objev dvou izoform cyklooxygenázy, cyklooxygenázy I (COX I) a cyklooxygenázy II (COX II). COX I produkují za normálních okolností buňky žaludeční sliznice, střev, ledvin a krevních destiček trvale. Proto se nazývá konstitutivní. Prostaglandiny, které tu vznikají, mají důležité fyziologické funkce potřebné k zachování integrity organismu. COX II je syntetizován zejména v místě zánětu mikrořady, synoviocyty a endotelovými buňkami, a to po jejich expozici

některým z protizánětlivých cytokinů. Vznik COX II se dá pokládat za součást koordinovaného procesu probíhajícího v buňce, který je odpovědí na infekci nebo trauma.



Obr. 2 Úloha COX I a COX II při syntéze prostaglandinů⁸

Různá NSAID inhibují v různém poměru oba izoenzymy, z čehož se odvíjí i jejich antiflogistický, resp. analgetický účinek i četnost a závažnost nežádoucích účinků. Bezpečné antirevmatikum by mělo maximálně blokovat COX II a syntézu prozánětlivých prostaglandinů, zatímco COX I by měla být ovlivněna jen minimálně a syntéza konstitučních prostaglandinů by měla zůstat neovlivněna. Všechna dosud používaná analgetika inhibovala obě izoformy cyklooxygenázy, i když v rozdílném poměru.

Důležitou vlastností NSAID je dobrá rozpustnost v tucích a vazba na plazmatické bílkoviny. Po perorálním podání se velmi rychle absorbují. Výborně se vážou na albumin, s jehož pomocí jsou transportovány v organismu. Do postižené tkáně pronikají otvory mezi endotelovými buňkami, případně pasivní difúzí přes buňky. Za normálních okolností tekutina volně proniká mezi endotelovými buňkami, avšak bílkoviny pronikat nemohou. Při zánětu se v důsledku zvýšení cévní permeability tyto otvory zvětší a rozšíří a spolu s tekutinou přecházejí do extracelulárního prostoru i NSAID.¹¹

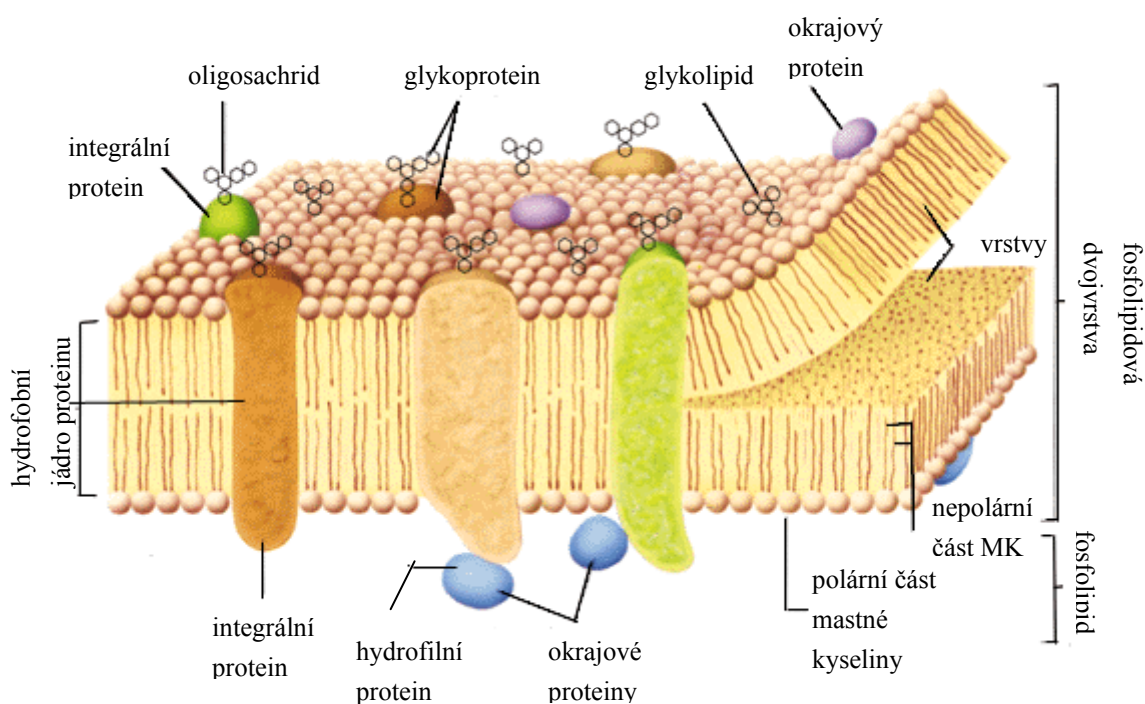
2.5. Distribuce léčiv v organismu

Léčiva zpravidla dosahují cílového orgánu krevní cestou. Proto se musí dostat především do krve, a to obvykle do venózního řečiště. Možné však jsou různé přívodní (aplikační) cesty. Účinná látka se může podávat také intravenózně. V tomto případě přechází bezprostředně do krevního řečiště, zatímco při subkutánním (podkožním) případně intramuskulárním (nitrosvalovém) podání se musí z daného místa dostat do krve teprve difúzí. Mnohem častěji se proto volí jednoduché podání ústy – perorální; takto podané léčivo se resorbuje sliznicí trávicího ústrojí a následně přechází do krevního řečiště. Nevýhodou této aplikační cesty je to,

že účinná látka musí před vstupem do velkého krevního oběhu projít nejdříve játry (systémem *vény portae*).¹²

Biologické odpovědi obvykle závisí na přeměně absorbované látky v aktivní metabolit. Metabolity jsou často farmakodynamicky méně aktivní než mateřské léčivo a některé z nich mohou být dokonce neúčinné. Jiné produkty však biotransformací získávají větší aktivitu nebo toxické vlastnosti, včetně účinků cytotoxických, mutagenních, teratogenních nebo karcinogenních.¹³

Účinek léčiv je často posuzován podle jejich zásahu do buněčných funkcí. Místem působení mohou být receptory, jejichž úkolem je zachytit signál mediátorů nebo transmitterů. Buněčné funkce ovlivňuje i změna aktivity zabudovaných membránových transportních systémů. Látky mohou zasáhnout přímo do nitrobuněčných pochodů látkové přeměny, např. inhibicí některého enzymu (inhibitory fosfodiesterázy) případně aktivací enzymu (organické nitráty); kromě toho může léčivo ovlivňovat i pochody v buněčném jádře (např. poškození DNA určitými cytostatiky). Na rozdíl od látek působících na složky buněčné membrány zvenčí musí látky působící v buněčném nitru proniknout buněčnou membránou. Buněčnou membránu tvoří v podstatě fosfolipidová dvojvrstva – „*bilayer*“, tloušťky asi 5 nm (Obr. 3), do níž jsou zabudovány proteiny (integrální membránové proteiny, např. receptory nebo transportní proteiny). Hydrofobní fosfolipidové membrány představují téměř neproniknutelnou bariéru pro polární a zejména pro nabitě částice, neboť zabraňují jejich difúzi. Nepolární částice naproti tomu mohou membránou proniknout snáze. To má velký význam pro resorpci, distribuci i eliminaci léčiv. Schopnost překonat lipidovou dvojvrstvu je předpokladem pro resorpci léčiv, jejich proniknutí do buňky, buněčných organel a překonání hematoencefalické bariéry.¹²



Obr. 3 Fosfolipidová dvojvrstva¹⁴

Látky mohou membránou prostoupit různými způsoby:

- ❖ *Difúze* – lipofilní látky mohou z extracelulárního prostoru proniknout do membrány, nahromadit se v ní a odtamtud vystoupit do cytozolu. Směr i rychlost prostupu membránou závisí na poměru koncentrací v kapalných prostředích a v membráně. Čím větší je koncentrační spád (koncentrační gradient), tím více léčiva difunduje za časovou jednotku (Fickův zákon).¹²
- ❖ *Aktivní transport* – některá léčiva prostupují membránovou bariérou nezávisle na svých fyzikálně-chemických vlastnostech, zejména na lipofilitě, protože využívají transportních systémů. Předpokladem je, aby transportovaná látka měla afinitu k transportnímu systému a transportní systém mohl takto navázanou látku přenést na druhou stranu membrány. Aktivní transport se děje za spotřeby energie proti koncentračnímu gradientu. Usnadněný transport se uskutečňuje ve směru gradientu.¹²

Distribuce léčiva je umožněna různými způsoby. Po resorpci se léčivo dostane do krve, ze které může pronikat do tkání. Distribuce se může omezit jenom na mimobuněčný prostor (tj. krevní plazmu a intersticiální prostor), nebo se odtud dále rozšíří také do intracelulárního prostoru. Některá léčiva se mohou velmi silně vázat na tkáňové struktury.¹²

2.6. 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.¹²

Každá tkáň má určitou schopnost metabolizovat léčiva, avšak hlavním orgánem metabolismu léčiv jsou játra. Značnou aktivitu vykazují i další tkáně: gastrointestinální trakt, plíce, kůže a 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. Tento proces se nazývá „efektem prvního průchodu játry“. Některá perorálně podaná léčiva se metabolizují výrazněji v tlustém střevě než v játrech. Zde se nacházejí mikroorganismy, pomocí kterých mohou probíhat biotransformace. Navíc některá léčiva mohou být změněna nebo rozložena žaludeční šťávou (např. penicilin), trávicími enzymy (např. polypeptidy, jako je insulin) nebo enzymy působícími ve stěně střeva.¹³

Přestože biotransformace léčiv *in vivo* může probíhat spontánně nekatalyzovanými chemickými reakcemi, většina reakcí je katalyzována specifickými buněčnými enzymy. Na subcelulární úrovni jsou tyto enzymy lokalizovány v endoplazmatickém retikulu, mitochondriích, cytoplazmě, lysozomech a dokonce také v obalu jádra nebo v plazmatické membráně.¹²

Protože dobrá řiditelnost koncentrace léčiva je možná jen při rychlé eliminaci, mají mnohá léčiva v molekule záměrně slabé místo, např. esterickou vazbu. Ta se v organismu enzymaticky štěpí. Hydrolytické rozštěpení léčiva spolu s oxidací, redukcí, alkylací a dealkylací patří k reakcím první fáze biotransformace. Do této fáze počítáme všechny metabolické pochody spojené se změnami v molekule původního léčiva. Při reakcích druhé fáze vznikají konjugáty nebo konjugované produkty, a to buď z původní molekuly léčiva, nebo z jeho metabolitu, který vznikl reakcí fáze I, tj. konjugací s kyselinou glukuronovou nebo sírovou. Metabolity, které vzniknou rozštěpením esteru, však nemusí být zásadně zcela neúčinné. V některých

případech se účinné látky přivádějí do organismu ve formě esterů buď z toho důvodu, aby se usnadnil jejich vstup do organismu, případně aby se dosáhlo lepší snášenlivosti sliznicemi trávicího ústrojí. Samotné estery jsou v těchto případech neúčinné, účinný je naopak produkt hydrolýzy. Podává se proto prekurzor, předstupeň účinné látky, ze kterého hydrolýzou v krvi teprve vznikne účinná molekula. Některá léčiva obsahující v molekule amidovou vazbu se mohou hydrolyzovat a takto také inaktivovat peptidázami.¹²

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 by vedl k detoxikaci a eliminaci sloučeniny. U některých látek se již prokázalo, že se metabolicky transformují na reaktivní meziprodukty, které jsou toxické pro různé orgány.¹³

2.7. Cyklus léčiv v životním prostředí

Se zvyšujícím se počtem státních zdravotnických zařízení a ordinací soukromých lékařů narůstá také spotřeba léčiv. S tím souvisí nárůst a množství odpadů s obsahem léčiv majících vysoké environmentální riziko. Přesné množství farmak uvolňovaných do prostředí není známo, a to v důsledku jejich emisí do životního prostředí. Velkým zdrojem léčiv vyskytujících se v odpadních vodách jsou nemocnice, protože zde může docházet k úniku těchto kontaminujících látek přímo do kanalizace, bez předchozího průchodu čističkou.¹⁵

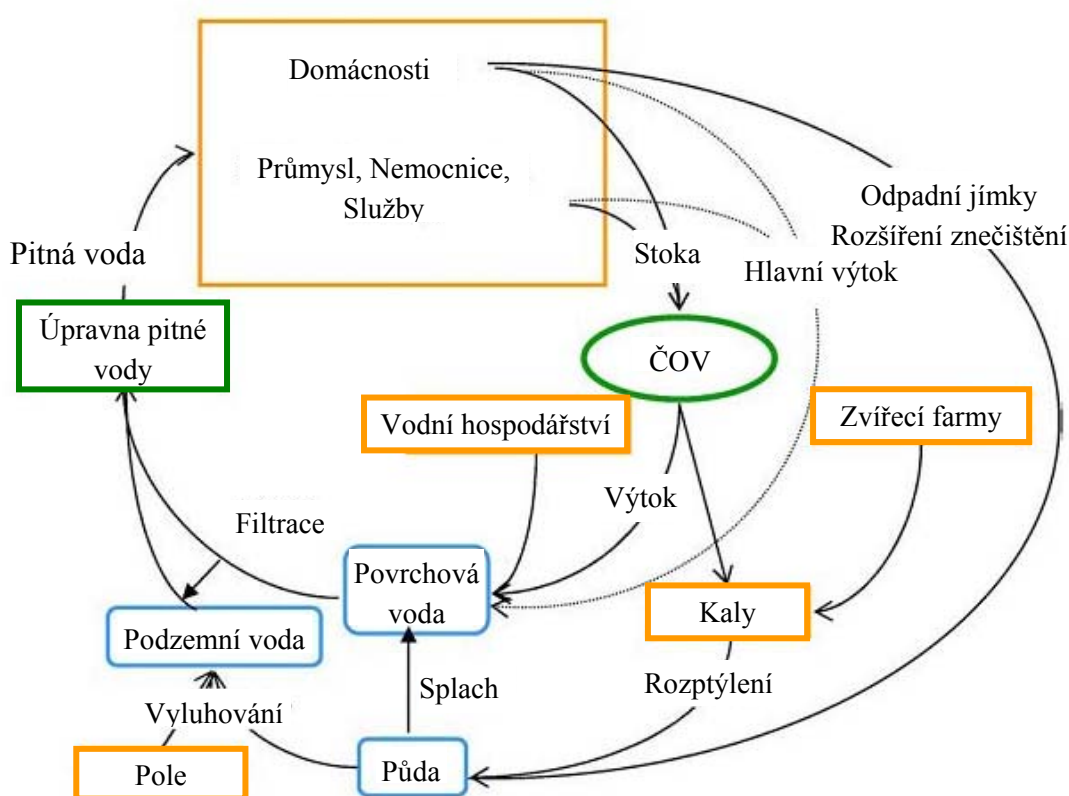
Čistírny odpadních vod jsou považovány za hlavní zdroje kontaminace vod farmaky. Komunální odpadní vody mohou obsahovat nejen přečištěné nebo neutralizované vody z nemocnic a farmaceutického průmyslu, ale také průsaky ze skládek. Jsou přímým zdrojem reziduí léčiv a obsahují i jiné biologicky účinné látky, jejich metabolity a ve vodě rozpustné konjugáty.¹⁶ 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. Rozvoj v této oblasti je způsoben také celosvětovým nedostatkem pitné vody a z toho plynoucím požadavkem na úpravu odpadní vody až na vodu pitnou.¹⁷

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 a změny v biochemických cyklech způsobujících nevylíhnutí larev; kromě toho se podílí na různých anatomických deformacích, pozměnění růstu rostlin a dalších nežádoucích změnách živých organismů.^{18,19}

Díky svým vlastnostem (polarita, perzistence, rozpustnost ve vodě, apod.) jsou tyto biologicky aktivní látky schopny procházet čistírnami odpadních vod; nelze je však biologickým čištěním zcela odstranit, a proto unikají do vodních ekosystémů.²⁰ Výskyt těchto znečišťujících látek v ošetřených vodách omezuje také jejich opakované použití v různých aplikacích, protože dostupnost kvalitní vody je zásadním problémem pro udržitelný hospodářský rozvoj.²¹ Problémem však není pouze jejich perzistence. Účinné látky obsažené v léčivech, která mají naopak krátký poločas rozpadu, mohou mít rovněž velký vliv na životní prostředí, na které mohou negativně působit, i když jejich krátký poločas rozpadu již neumožní stanovit jejich rozpady.²²

Léčiva používaná ve veterinární medicíně se v životním prostředí šíří v důsledku aplikace hnoje nebo močůvky na zemědělskou půdu nebo přímou depozicí pocházející od léčených pasoucích se zvířat.²³ Bylo zjištěno, že léčení hospodářských zvířat diklofenakem mělo vliv na úmrtnost supů v jihovýchodní Asii.²²

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 kalcích nebo půdách může způsobit znečištění povrchových a podzemních vod. U některých z nich může docházet k částečné nebo úplné biodegradaci, díky které vznikají neznámé metabolity, méně nebo více biologicky aktivní, v porovnání s původní formou.²⁴ Rovněž není dosud známo, jaký vliv mají tyto látky na rostliny.²²



Obr. 4 Cyklus léčiv v životním prostředí

Koloběh léčiv v životním prostředí je znázorněn na obrázku (Obr. 4). Kromě této „vodní“ cesty je možná distribuce i prostřednictvím potravního řetězce. Ačkoliv je jejich koncentrace ve vodách natolik nízká, že nezpůsobuje přímé toxické riziko ($\text{ng} - \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), nebylo dosud prokázáno, jaká mají rezidua léčiv účinky na organismy, pro něž nebyla určena.¹⁵

2.8. 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 způsobena 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.²⁵ Mezi látky narušující proces čištění patří bezesporu léčiva.

Léčiva jsou po podání vstřebána organismem a jsou předmětem metabolických reakcí, jako je hydroxylace nebo štěpení. Významné množství léčiv však odchází z organismu močí nebo výkaly v nezměněné formě. Některé metabolity mohou být přeměněny zpět na aktivní formu léčiva.²⁶

V zemích západní Evropy jsou některé farmaceutické produkty používány v množství větším než 100 tun za rok. Mezi nejčastěji se vyskytující léky v odpadních, ale také povrchových vodách, patří aspirin, ibuprofen, diklofenak, paracetamol (NSAID), kyselina klofibrová, gemfibrozil (lipidové regulátory), karbamazepin (antiepileptikum), fluoxetin (antidepresivum) a 17 β -ethynylestradiol (steroidní hormon). Především v odpadních vodách můžeme také nacházet kofein, který povzbuzuje metabolismus a ovlivňuje centrální nervovou soustavu; proto je často přidáván do finální lékové formy z důvodu zvýšení účinnosti léčivé látky. Jeho vysoká koncentrace je způsobena také vysokou spotřebou kávy.²⁶

Vzhledem k tomu, že nesteroidní protizánětlivá léčiva jsou vesměs kyselého charakteru (pKa od 4,1 do 4,9), vyskytují se v neutrálním prostředí ve formě iontů a v důsledku toho se neabsorbují na kal a zůstávají ve vodné fázi.²⁶ 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. Nejčastěji se v něm vyskytují následující rody: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Chromobacterium*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*), *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Lophomonas* aj. Kromě různých druhů bakterií mohou být v aktivovaném kalu v menším množství přítomny také houby, plísně a kvasinky. V aktivovaném kalu se často vyskytují rovněž vláknité mikroorganismy, např. *Leptomit*, *Leucotrix*, *Nocardia*, *Beggiatoa*, *Flexibacter* a další.²⁷

K abiotickým transformacím farmaceutických výrobků v odpadních a povrchových vodách dochází pomocí hydrolýzy a fotolýzy jen částečně, neboť tyto látky jsou vůči těmto mechanismům poměrně odolné. Proto jsou rozsahy výše specifikovaných reakcí považovány za zanedbatelné. Primární cestou je přímá a nepřímá fotolýza. Při přímé fotolýze dochází k absorpci přímého slunečního světla na dané xenobiotikum. U nepřímé fotolýzy je možné využít přírodní fotosenzibilizátory, kterými jsou například dusičnany nebo huminové kyseliny. Působením slunečního záření na tyto látky může docházet ke vzniku silných oxidačních produktů, jakými jsou hydroxylové radikály a singletový kyslík.

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.

Membránová filtrace je rovněž důležitá jako předúprava pro další procesy, kterými jsou reverzní osmóza, nanofiltrace, elektrodialýza a filtrace přes aktivní uhlí; tyto procesy jsou čím dál více používány pro úpravu povrchových vod a k odstraňování rozpuštěných organických nečistot. V současnosti se ukazuje, že membránové technologie mohou být vysoce účinné při odstraňování nově vznikajících kontaminantů. Absorpční a retenční schopnosti těchto metod se však s provozním časem snižují. Nahromaděná organická hmota způsobuje často ucpání filtrů. Tyto procesy jsou však při čištění odpadních vod velmi finančně nákladné a používají se především při úpravě pitné vody.^{28,29}

Používání chemických oxidantů před nebo po biologickém stupni čištění může být vhodným řešením pro úpravu vody. Léčiva lze selektivně oxidovat na snadno biologicky rozložitelné a méně toxické sloučeniny. K oxidaci se často používá chlor, chloritany, chloristany a ozon. V posledních letech se začínají využívat také železitany, protože mají vysoký oxidačně-redukční potenciál v kyselém prostředí.²⁹

Ozon je velmi silné oxidační činidlo, které reaguje dvěma způsoby, a to přímou nebo nepřímou reakcí, které probíhají současně. Nepřímá reakce je založena na vysoké reaktivitě hydroxylových radikálů, které nereagují specificky, kdežto přímá reakce ozonu je více závislá na struktuře daného reaktantu. Použití ozonu během prováděných předúprav má způsobit hydrolýzu a částečnou oxidaci organických látek.^{29,30}

2.9. Deriváty p-aminofenolu

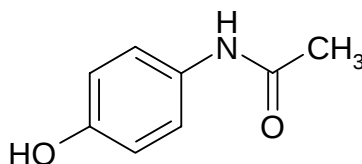
2.9.1. Paracetamol (acetaminofen)

Paracetamol je aktivní metabolit fenacetinu, který je odpovědný za jeho analgetický účinek. Je to slabý inhibitor prostaglandinů a nemá významný protizánětlivý účinek.¹³

Paracetamol byl vyvinut a testován v roce 1983 firmou Bayer. Přesto, že byl účinným analgetikem a antipyretikem, byl jeho vývoj odložen, neboť se vyskytlo podezření, že poškozuje krevní barvivo – hemoglobin. V roce 1950 byl F. B. Flinkem a B. Brodiem z Galské a Kolumbijské univerzity znovu přezkoušeno jeho působení. Bylo prokázáno, že toto léčivo hemoglobin nepoškozuje a dříve pozorované změny byly pravděpodobně způsobeny nečistotami přítomnými v preparátu.³¹

2.9.1.1. Definice

N-(4-hydroxyfenyl)acetamid (Obr. 5); $C_8H_9NO_2$; M_r 151,16; CAS 103-90-2³²



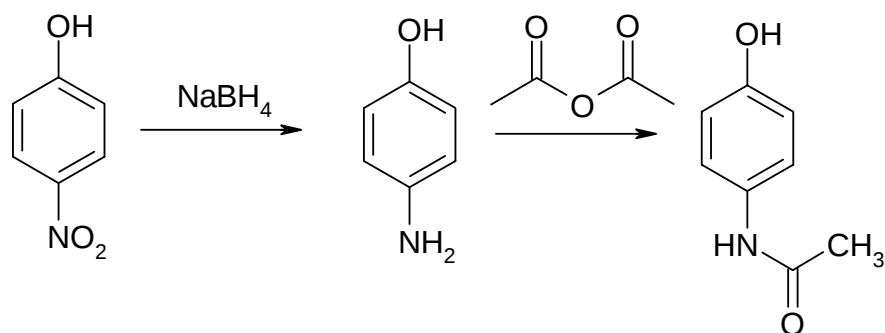
Obr. 5 Paracetamol

2.9.1.2. Vlastnosti

Je to bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v 96% ethanolu, velmi těžce rozpustný v dichlormethanu.³² Bod tání je 168 °C.³³

2.9.1.3. Příprava

Paracetamol může být snadno připraven v laboratoři nitrací fenolu dusičnanem sodným (v této reakci je fenol silně aktivován, a proto stačí pouze mírné podmínky). Je zapotřebí oddělit požadovaný p-nitrofenol od o-nitrofenolu, který je vedlejším produktem; jeho odstranění se provádí destilací s vodní parou. Následnou reakcí je redukce nitro skupiny tetrahydroboritanem sodným. Výsledný p-aminofenol je pak acetylován acetanhydridem. (Obr. 6).³³



Obr. 6 Laboratorní příprava paracetamolu

2.9.1.4. Farmakokinetika

Paracetamol se aplikuje perorálně. Jeho adsorpce závisí na rychlosti vyprázdnění žaludku a nejvyšší koncentrace v krvi se objevují během 30–60 min. Je mírně vázán na bílkoviny plazmy a částečně je metabolizován jaterními mikrosomálními enzymy a přeměněn na paracetamol sulfát a glukuronid, které nejsou farmakologicky aktivní. Hlavním metabolitem je *N*-acetyl-*p*-benzochinon, který je vysoce aktivní a ve vysokých koncentracích toxický pro játra i ledviny. Biologický poločas rozpadu je 2–3 hodiny a téměř ho neovlivňují ledviny. V případě toxických koncentrací nebo jaterních onemocnění se tato doba může prodloužit až dvojnásobně nebo i více.¹³

2.9.1.5. Indikace

Svémi analgetickými a antipyretickými účinky je paracetamol srovnatelný s kyselinou acetylsalicylovou, liší se však absencí protizánětlivého účinku. Neinhibuje trombocyty a neovlivňuje hladinu kyseliny močové. Je vhodný u mírných až středně silných bolestí, např. u bolesti hlavy. Není vhodný pro léčení zánětlivých stavů, avšak může být použit jako pomocné analgetikum. Je vhodný pro pacienty, kteří mají alergii na kyselinu acetylsalicylovou popř. salicyláty, kde je jeho použití výhodnější vzhledem ke zdravotnímu stavu pacienta.¹³

2.9.1.6. Nežádoucí účinky

U terapeutických dávek může dojít ke zvýšení jaterních enzymů; to však není doprovázeno žloutenkou a po ukončení léčby je tento stav reverzibilní. Při vyšších dávkách se vyskytují závratě, podráždění a dezorientace. Při požití 15 g paracetamolu může dojít ke smrti, která je způsobena těžkou hepatotoxicitou a centrální lobulární nekrózou, někdy provázenou akutní nekrózou ledvinných tubulů. Mezi příznaky provázející poškození jater patří nauzea, zvracení, průjem a bolesti břicha. Paracetamol může vzácně poškozovat ledviny bez současného poškození jater; to se může vyskytnout dokonce po běžných dávkách. Pro terapii předávkování se používá acetylcystein.¹³

2.10. Deriváty kyseliny salicylové

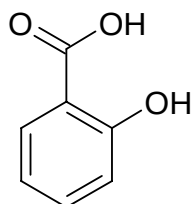
2.10.1. Kyselina salicylová

V 5. století př. n. l. byl řeckým lékařem Hippokratem užíván k tišení bolesti a snižování horečky odvar z kůry vrby bílé (*Salix alba*). V roce 1828 byl z vrbové kůry extrahován *salicin*, a to německým farmakologem J. Buchnerem. Salicin měl však vedlejší účinky, byl velmi

hořký, dráždil žaludek a často způsoboval průjmy, někdy dokonce smrt. V roce 1859 byla německým chemikem H. Kolbem objevena levná výroba kyseliny salicylové, a to syntézou z fenolu. Od té doby začala být kyselina salicylová používána jako protirevmatický a protihorečnatý lék, přestože stejně jako salicin dráždila trávicí trakt, a to z důvodu značné kyselosti.³⁴

2.10.1.1. Definice

Kyselina 2-hydroxybenzoová (Obr. 7); $C_7H_6O_3$; M_r 138,12; CAS 69-72-7³⁵



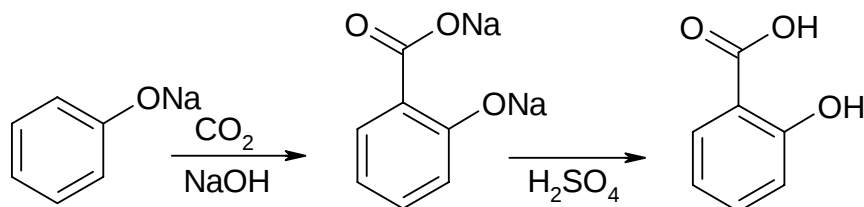
Obr. 7 Kyselina salicylová

2.10.1.2. Vlastnosti

Téměř bílý až bílý krystalický prášek nebo bílé, případně bezbarvé jehlicové krystaly. Je těžce rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v 96% ethanolu, mírně rozpustná v dichlormethanu.³⁵ Bod tání je 159 °C.³⁶

2.10.1.3. Příprava

Salicylát sodný je komerčně připravovaný z fenolátu sodného v přítomnosti oxidu uhličitého za vysokého tlaku (100 atm) a vysoké teploty (390 K) – Kolbe-Schmittova reakce. Následným okyslením kyselinou sírovou získáme kyselinu salicylovou (Obr. 8).³⁶



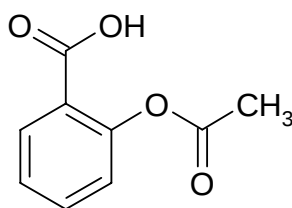
Obr. 8 Příprava kyseliny salicylové

2.10.2. Kyselina acetylsalicylová

V roce 1897 vyrobil německý chemik F. Hoffmann, pracující v německé firmě Bayer, pomocí esterifikace fenolické hydroxyskupiny derivát kyseliny salicylové. Takto připravená kyselina acetylsalicylová měla mnohem méně vedlejších účinků. Kyselina acetylsalicylová se tak stala první syntetickou účinnou látkou přítomnou v lécivech.³⁴

2.10.2.1. Definice

Kyselina 2-acetoxybenzoová (Obr. 9); $C_9H_8O_4$; M_r 180,16; CAS 50-78-2³⁵



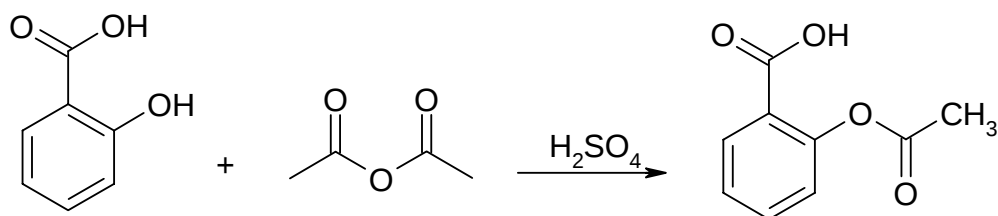
Obr. 9 Kyselina acetylsalicylová

2.10.2.2. Vlastnosti

Téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je těžce rozpustná ve vodě a dobře rozpustná v 96% ethanolu. Teplota tání asi 143 °C (stanovení v kovovém bloku).³⁵

2.10.2.3. Příprava

Kyselina acetylsalicylová je syntetizována esterifikací kyseliny salicylové acetanhydridem. Získáme aspirin a kyselinu octovou, která je považována za vedlejší produkt této reakce. Jako katalyzátor je použito malé množství kyseliny sírové, případně kyseliny fosforečné (Obr. 10).³⁷



Obr. 10 Příprava aspirinu

2.10.2.4. Farmakokinetika

Kyselina acetylsalicylová se metabolizuje na kyselinu octovou a salicylát (sériový poločas 15 min.). Salicyláty jsou rychle absorbovány ze žaludku a proximální části tenkého střeva. Vrcholné hladiny v plazmě jsou dosaženy během 1–2 hodin. Salicylát se váže na albumin. Salicyláty mohou být vyloučeny nezměněny, avšak metabolické cesty pro rozklad se stávají nasycenými, jestliže celková dávka přesáhne 600 mg salicylátu. Při zvýšených dávkách se poločas eliminace zvyšuje ze 3 až 5 hodin (600 mg · den⁻¹) na 12 až 16 hodin (více než 3,6 g · den⁻¹).¹³

2.10.2.5. Indikace

Je velmi účinná při snižování mírně až středně silných bolestí. Také snižuje zvýšenou teplotu, normální tělesnou teplotu však ovlivňuje jen nepatrně. Snížení teploty může být provázeno profúzním pocením. Obvykle je prodávána v kombinaci s dalšími analgetiky.

Podávání kyseliny salicylové snižuje výskyt srdečních příhod. Podle epidemiologických studií snižuje dlouhodobé užívání aspirinu v nízkých dávkách výskyt karcinomu tlustého střeva.¹³

2.10.2.6. Nežádoucí účinky

Při obvyklých dávkách může způsobovat žaludeční nevolnost, a proto se doporučuje požití po jídle a důkladné zapití vodou. Podávání kyseliny salicylové je běžně provázeno malým zvýšením krevních ztrát stolicí.

Po podání vyšších dávek může vzniknout tzv. salicylismus, který se projevuje zvracením, hučením v uších, snížením sluchu a závratěmi. Tyto projevy po snížení dávky vymizí. Při ještě vyšších dávkách dochází k prohloubenému dýchání, které je vyvoláno přímým působením na míchu.¹³

Inhibice syntézy prostaglandinů může velmi snížit prokrvení ledvin a vyvolat jejich selhání. Dále se může vyvinout zadržení vody a chloridu sodného, což způsobuje přírůstek hmotnosti a může vyvolat edémy. Ve vysokých koncentracích může kyselina acetylsalicylová vyvolat také poruchy jaterních funkcí. V průběhu těhotenství se nesmí podávat dlouhodobě a ve vysokých dávkách.³⁸

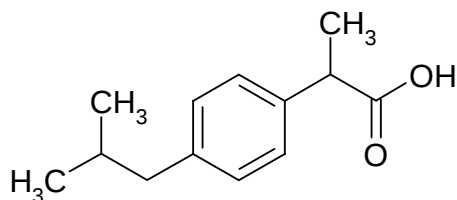
2.11. Deriváty kyseliny propionové

2.11.1. Ibuprofen

Ibuprofen je jednoduchý derivát fenylpropionové kyseliny.¹³ Syntézu poprvé popsal doktor S. Adams, který byl v padesátých letech dvacátého století vedoucím vědeckého výzkumu u společnosti *Boots Pure Drug Company*. Zabýval se nalezením protizánětlivého léku pro pacienty s revmatickou artritidou. Výsledkem byl ibuprofen tišící bolesti mnohem silněji než kyselina acetylsalicylová, s menším množstvím vedlejších účinků. Patentován byl v roce 1961.³⁹

2.11.1.1. Definice

Kyselina (2*RS*)-2-(4-isobutylfenyl)propanová (Obr. 11); C₁₃H₁₈O₂; M_r 206,28; CAS 15687-27-1³⁵



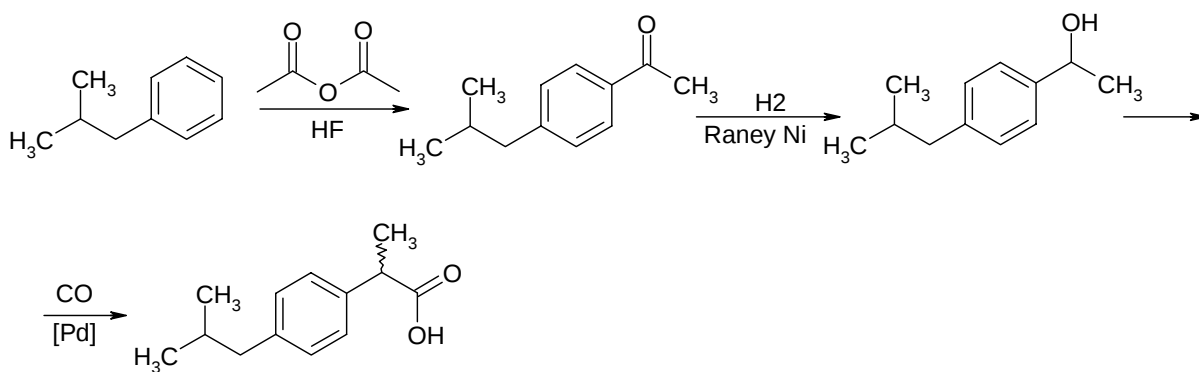
Obr. 11 Ibuprofen

2.11.1.2. Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, popř. bezbarvé krystaly. Je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v methanolu a dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitů.³⁵ Bod tání 76 °C.³⁹

2.11.1.3. Příprava

Původní syntéza společnosti *Boots* obsahovala šest dílčích kroků. Nyní je používán jednodušší postup, který obsahuje pouze tři kroky. Po jednoduché acetylaci následuje hydrogenace za přítomnosti Raney niklu jako katalyzátoru. Získaný alkohol je karbonylací, za přítomnosti paladia jako katalyzátoru, převeden na kyselinu (*RS*)-2-(4-isobutylfenyl)propanovou (Obr. 12).³⁹



Obr. 12 Příprava ibuprofenu

2.11.1.4. Farmakokinetika

Ibuprofen se aplikuje perorálně. Z více než 99 % se váže na proteiny, je rychle vyloučen a nejvyšší koncentrace v krvi jsou většinou během 1–2 hodin. Je metabolizován játry a jen málo látky je vyloučeno nezměněno.¹³

2.11.1.5. Indikace

Při dávkách okolo 2400 mg/den má odpovídající protizánětlivý účinek jako 4 g kyseliny acetylsalicylové. Předepisován je však zejména v nižších dávkách, při kterých má však účinek analgetický, nikoliv protizánětlivý. Pokud je aplikován ve formě krému nebo gelu, je vstřebáván do vazivového obalu svalů a do svalu.¹³

2.11.1.6. Nežádoucí účinky

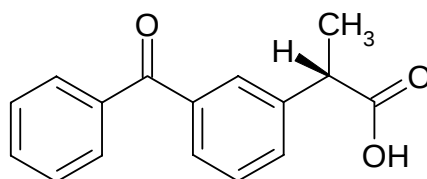
Po podání se mohou vyskytovat gastrointestinální příznaky, které je možné ovlivnit potravou. Dalšími negativními příznaky pak mohou být vyrážky, svědění, ušní šelesty, závratě, bolesti hlavy, pocity úzkosti, aseptická meningitida a zadržování tekutin. Vzácně se mohou vyskytnout hematologické účinky (agranulocytóza, plastická anémie) nebo účinky na ledviny (selhání ledvin, intersticiální nefritida, nefrotický syndrom). Byl popsán i výskyt hepatitidy.¹³

2.11.2. Ketoprofen

Je to derivát kyseliny propionové.¹³ Poprvé byl syntetizován francouzskou chemickou a farmaceutickou společností Rhone-Poulenc v roce 1968.

2.11.2.1. Definice

Kyselina (2RS)-2-(3-benzoylphenyl)propanová (Obr. 13); $C_{16}H_{14}O_3$; M_r 254,28; CAS 22071-15-4³⁵



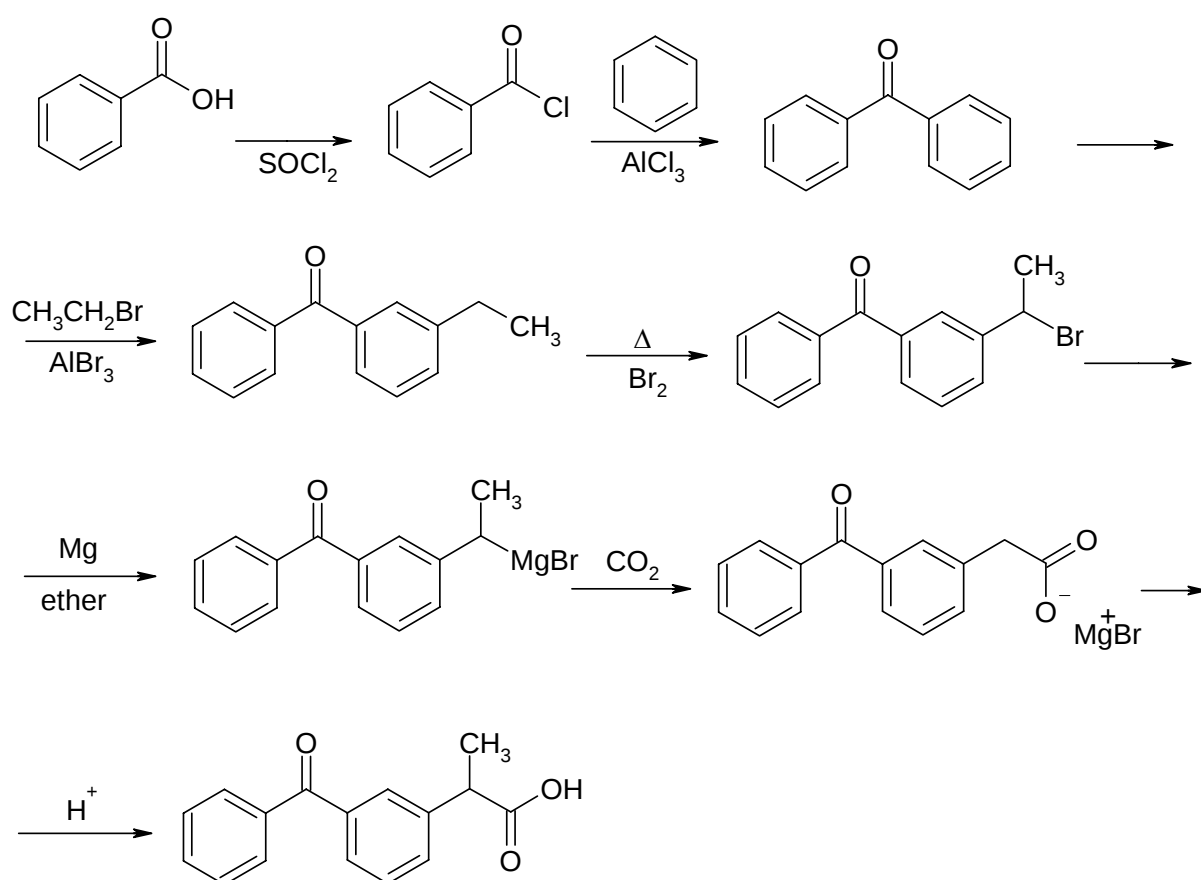
Obr. 13 Ketoprofen

2.11.2.2. Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, 96% ethanolu a v dichlormethanu.³⁵

2.11.2.3. Příprava

Ketoprofen se připravuje z kyseliny benzoové v sedmi krocích. Prvním krokem je sulfochlorace, kterou se kyselina benzoová převede na benzoyl chlorid. Pak následuje Friedel-Craftsova acylace; získaný benzofenon se převede na ethylbenzofenon, který se za vysoké teploty radikálově převede na brommethylderivát, který reaguje s kovovým hořčíkem v bezvodém etheru. Produktem je pak Grignardovo činidlo, které se ve dvou krocích převede na ketoprofen (Obr. 14).⁴⁰



Obr. 14 Příprava ketoprofenu

2.11.2.4. Farmakokinetika

Ketoprofen se aplikuje perorálně, případně ve formě mastí nebo gelu na postižené místo. Inhibuje nejen cyklooxygenázu, ale také lipoxxygenázu. Je to racemát, který se rychle absorbuje, poločas eliminace je 1–3 hodiny. Metabolizován je v játrech. Přestože má dvojitý účinek na prostaglandiny a leukotrieny, nebyla u něj pozorována větší účinnost, než u ostatních nesteroidních protizánětlivých látek.¹³

2.11.2.5. Indikace

Při léčbě revmatoidní artritidy, osteoartrózy, dny a dalších bolestivých stavů je účinnost ketoprofenu v dávkách 100–300 mg/den srovnatelná s ostatními používanými analgetiky a antirevmatiky.¹³

2.11.2.6. Nežádoucí účinky

Nejčastěji se mohou vyskytnout nevolnosti, nadýmání, bolesti břicha, průjem, zácpa, poruchy trávení, zvracení, černá stolice, zvracení krve, opakovaný zánět tlustého střeva a vředový zánět sliznice dutiny ústní. Výskyt zánětu žaludku je méně častý. Stejně jako u celé skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv jsou i u ketoprofenu často pozorovány bolesti hlavy, závratě, ospalost, deprese, nespavost, nervozita, bušení srdce, vyrážky, zčervenání kůže, svědění, kopřivka nebo závažné projevy přecitlivělosti, jako jsou anafylaktická reakce a astmatický záchvat.

Vzácná je porucha činnosti jater nebo ledvin, zrychlená srdeční činnost, porucha zraku a ušní šelesty (zvonění v uších), citlivost na světlo, prudké puchýřnaté onemocnění, kožní bulózní reakce nebo toxická epidermální nekrolýza a poruchy krevního obrazu.

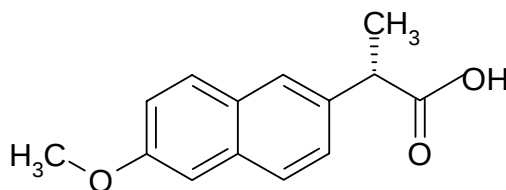
Při užívání ketoprofenu může dojít ke zhoršení stavu pacientů s vysokým krevním tlakem a ke zvýšení rizika vzniku otoků na končetinách a k srdečnímu selhání.⁴¹

2.11.3. Naproxen

Je naftylpropanová kyselina; jedná se o racemát, přičemž (+)-(S)-stereoizomer je 28krát účinnější než R izomer. V mnoha zemích je vydáván pouze na lékařský předpis. Na trh byl uveden v roce 1976 pod obchodním názvem Naprosyn, sodná sůl naproxenu potom v roce 1980 jako Anaprox. V roce 1994 byl Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) zařazen mezi volně prodejné léky. Ve Velké Británii se mezi volně prodejné léky zařadil až v roce 2008, v Kanadě až v červenci 2009, s výjimkou provincií Britské Kolumbie, Quebecu, Newfoundlandu a Labradoru.⁴²

2.11.3.1. Definice

Kyselina (2S)-2-(6-methoxynaftalen-2-yl)propanová (Obr. 15); C₁₄H₁₄O₃; M_r 230,26; CAS 22204-53-1³²



Obr. 15 Naproxen

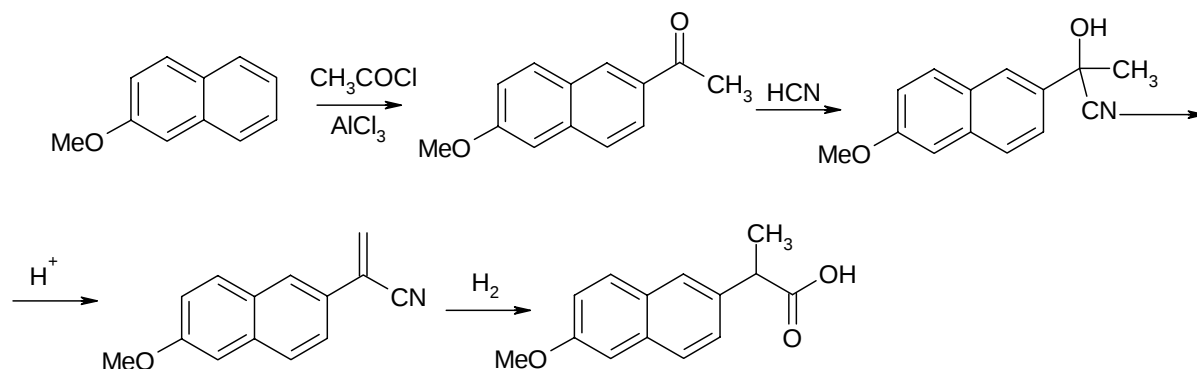
2.11.3.2. Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v 96% ethanolu a methanolu.³² Bod tání je v rozmezí 157–158 °C.⁴³

2.11.3.3. Příprava

Při přípravě se vychází z methoxynaftalenu, ze kterého se Friedel-Craftsovou acylací získá methyl(6-methoxy-2-naftyl)keton, ze kterého v prostředí kyseliny kyanovodíkové vznikne

2-hydroxy-2-(6-methoxy-2-naftyl)propannitril. Ten přejde v kyselém prostředí na 6-methoxy-2-naftylpropennitril a hydrolýzou s následnou hydrogenací je získán naproxen (Obr. 16).⁴⁴



Obr. 16 Příprava naproxenu.

2.11.3.4. Farmakokinetika

Maximální koncentrace v plazmě je po 2 až 4 hodinách, a to v závislosti na požití potravy. Jídlo zpomaluje absorpci, ale nezmenšuje její rozsah. Po opakovaném perorálním podání dojde k ustálení stavu po 4 až 5 dávkách (2 až 3 dny). Biologický poločas naproxenu je 12 až 15 hodin a není závislý na hladině v krevní plazmě ani na dávkování.^{45,46}

2.11.3.5. Indikace

Mírní bolest, horečku a zánět. Je možné ho užívat také u zánětlivých a degenerativních onemocnění kloubů, jako je revmatoidní artritida, juvenilní idiopatická artritida, artróza, ankylozující spondylitida a dna; důležitý je při léčbě některých gynekologických bolestivých stavů.^{45,46}

2.11.3.6. Nežádoucí účinky

Při užívání naproxenu se mohou vyskytnout gastrointesticiální poruchy, jako jsou bolesti břicha, zvracení, nevolnost, průjem, větry, zácpa, dále závratě, samovolné točení hlavy ke světlu, únava, poruchy spánku, hučení nebo šelesty v uších, případně oteklé nohy. Tyto účinky jsou ve většině případů mírného charakteru. Vzácně by se mohly vyskytnout také otoky obličeje, krvácení z trávicího ústrojí, kopřivka, astmatický záchvat, ztráta vědomí, černá stolice obsahující krev, zvracení krve, zánět žaludku, nový nástup zánětu tlustého střeva nebo Crohnovy choroby a vředový zánět sliznice ústní dutiny. Zřídka byly pozorovány kožní reakce, jako je například tvorba puchýřů.^{45,46}

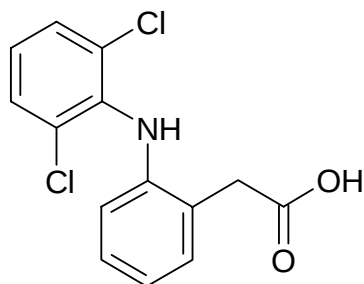
2.12. Deriváty kyseliny octové

2.12.1. Diklofenak

Diklofenak byl poprvé syntetizován firmou Ciba-Geigy (nyní Novartis) v roce 1973. V roce 1979 se dostal na trh ve Velké Británii. Je dodáván jako sodná nebo draselná sůl.⁴⁷

2.12.1.1. Definice

Kyselina 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyloctová (Obr. 17)



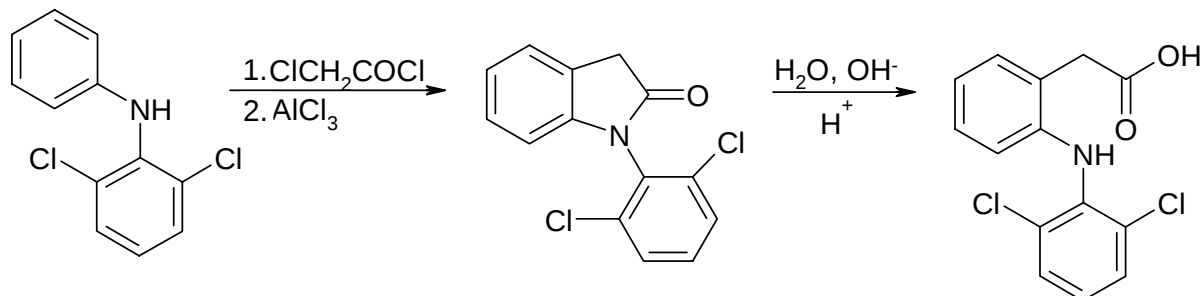
Obr. 17 Diklofenak

2.12.1.2. Vlastnosti

Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický, slabě hygroskopický prášek. Mírně rozpustný ve vodě, snadno v methanolu, dobře rozpustný v 96% ethanolu a těžce rozpustný v acetonu.³⁵

2.12.1.3. Příprava

Při přípravě se vychází z N-(2,6-dichlorfenyl)fenylaminu, který je acylován chloracetylchloridem; následuje Friedel-Craftsova acylace, jejímž produktem je laktam. Ten je hydrolyzován v alkalickém prostředí a vzniká diklofenak (Obr. 18).¹



Obr. 18 Příprava diklofenaku

2.12.1.4. Farmakokinetika

Diklofenak ruší v těle tvoření a účinek chemických přenašečů, které jsou významné pro rozvoj zánětu a pro vznik bolesti. Působí také na krevní destičky, čímž omezuje vznik krevních sraženin. Nejvyšší hladinu v krvi dosahuje za 2–3 hodiny a jeho účinek přetrvává několik hodin.^{48,49}

2.12.1.5. Indikace

Diklofenak je aplikován při akutních zánětech kloubů, záchvatu dny, při chronických zánětech kloubů (např. chronické polyartritidě nebo revmatoidní artritidě), při zánětlivých a revmatických onemocněních páteře, dále u bolestí degenerativních postižení kloubů a páteře (tzv. artrózy a spondylartrózy), při revmatických onemocněních měkkých tkání a při bolestivých porážkových nebo pooperačních otocích nebo při zánětech.^{48,49}

2.12.1.6. Nežádoucí účinky

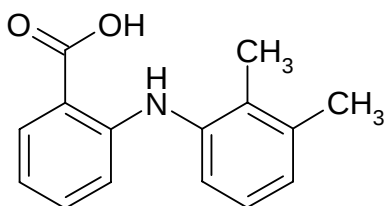
Užívání diklofenaku může vyvolat žaludeční a střevní potíže (nechutenství, nevolnost, zvracení a průjem, nadýmání a křeče v břiše). Mohou se vyskytnout bolesti hlavy, podrážděnost, nespavost, únava, závratě a ojediněle také smyslové křeče (nejasné nebo dvojité vidění, hučení v uších). Při dlouhodobějším užívání by mohlo dojít až k vypadávání vlasů. Přecitlivělost na diklofenak se projevuje kožními změnami, svěděním, vyrážkami a kopřivkou. Vzácně se mohou objevit záněty ústní sliznice, jazyka a sliznice jícnu. U pacientů s vysokým krevním tlakem může ve výjimečných případech docházet k zadržování vody v těle a ke vzniku otoků. Ojediněle se může vyvinout porucha činnosti ledvin nebo jater spojená s otoky, s přítomností krve v moči, zánětem jater se žloutenkou nebo bez ní. Diklofenak je určen pro dospělé a mladistvé od 15 let, dětem nad 6 let se smí diklofenak podávat pouze na doporučení lékaře.^{48,49}

2.13. Deriváty kyseliny anthranilové

2.13.1. Kyselina mefenamová

2.13.1.1. Definice

Kyselina 2-(2,3-dimethylfenyl)amino]bezoová; $C_{15}H_{15}NO_2$; M_r 241,28; CAS 61-68-7.

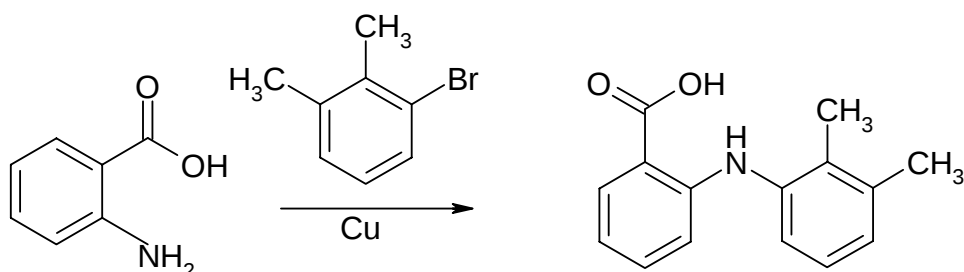


2.13.1.2. Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý mikrokrytalický prášek. Prakticky nerozpustná ve vodě, těžce rozpustná v 96% ethanolu a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů. Je polymorfní.³⁵

2.13.1.3. Příprava

Substitucí kyseliny anthranilové s brombenzenem vzniká kyselina mefenamová. Tato reakce je katalyzována mědí.¹



Obr. 19 Příprava kyseliny mefenamové

2.13.1.4. Farmakokinetika

Inhibuje COX a fosfolipázu A₂. Vrcholné hladiny v plazmě jsou za 30–60 minut a plazmatický biologický poločas je poměrně krátký (1–3 hod.).¹³

2.13.1.5. Indikace

Kyselina mefenamová je s největší pravděpodobností méně účinná než kyselina acetylsalicylová. Prokazatelně je však mnohem více toxická a proto by neměla být užívána delší dobu než jeden týden. Zvyšuje účinek antikoagulancií.¹³

2.13.1.6. Nežádoucí účinky

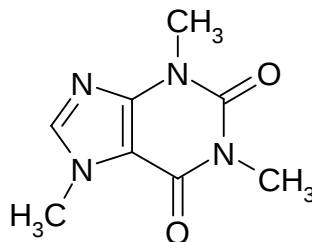
Má stejné nežádoucí účinky jako ostatní nesteroidní protizánětlivé látky. Jejich výskyt je však pravděpodobnější.¹³

2.14. Kofein

Kofein patří do skupiny psychostimulancií – psychotrofik, což jsou látky stimulující centrální nervovou soustavu. Podporují zejména stav bdělosti a psychickou i fyzickou odolnost organismu při únavě, čímž také nepřímo zlepšují náladu. Mezi nejznámější přírodní psychostimulancia patří deriváty xanthinu, což je kofein, theofylin a theobromin, které jsou obsaženy v kávě, čaji a kakau.

2.14.1.1. Definice

1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-2H-purin-2,6(1H)-dion (Obr. 20); C₈H₁₀N₄O₂; M_r 194,19; CAS 58-08-2³⁵



Obr. 20 Kofein

2.14.1.2. Vlastnosti

Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, případně bílé nebo téměř bílé krystaly. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný ve vroucí vodě. Těžce rozpustný je v 96% ethanolu. Rozpouští se v koncentrovaných roztocích alkalických benzoanů a salicylanů. Snadno sublimuje.³⁵ Teplota tání je 234–235 °C.⁵⁰

2.14.1.3. Příprava

Relativně čistý kofein byl poprvé syntetizován v roce 1819 německým chemikem F. F. Rungem. Kofein lze také syntetizovat z dimethylmočoviny a kyseliny malonové.⁵⁰

2.14.1.4. Farmakokinetika

Je rychle resorbován z trávicího traktu. Přednostně působí na mozkovou kůru.³⁸

2.14.1.5. Indikace

Používá se k překonání únavy a jako pomocná látka obsažená v mnoha lécích za účelem urychlení jejich účinku.³⁸

2.14.1.6. Nežádoucí účinky

Při chronickém užívání této účinné látky obsažené v čaji nebo kávě nebylo prokázáno poškození organismu. Pouze při nadměrných dávkách nebo u obzvlášť citlivých jedinců se může objevit nervozita, případně anxiózní neuróza, nespavost aj.³⁸

2.15. 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.

2.15.1. Odběry vzorků vody

Jedním z nejdůležitějších kroků při zjišťování obsahu polutantů v životním prostředí je reprezentativní odběr reálného vzorku a jeho správné skladování, a to po dobu jeho uchovávání, před započítím vlastní analýzy. Chyby vzniklé v této fázi již nelze většinou napravit.⁵¹

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.

Vzorky jsou většinou odebírány do skleněných (sodno-vápenato-křemičité obalové sklo, popř. borokřemičité sklo nebo plastových vzorkovnic (polyethylen, polytetrafluoroethylen, polyvinylchlorid, polyethylentereftalát); při stanovení fotochemicky nestálých látek se používají tmavé vzorkovnice.⁵¹ Někteří výrobci nabízejí i jednorázové vaky, které jsou výhodné zejména při vzorkování vod obsahujících prioritní polutanty, u kterých by dekontaminace vzorkovnic byla časově i finančně náročná.⁵²

Před použitím je důležité vzorkovnice, a to i nové, důkladně vymýt. Čisticí prostředek se volí podle charakteru stanovovaných analytů. Běžně se používá kyselina chlorovodíková, zředěná v poměru 1 : 3 a voda s detergentem. Po čištění musí vždy následovat důkladný výplach destilovanou nebo deionizovanou vodou.⁵¹

Vzorek je možné odebírat přímo do vzorkovnice nebo se může použít vzorkovač. Jsou to přístroje a zařízení, s jejichž pomocí je možné jednorázově nebo opakovaně odebrat vzorek i z míst, která jsou nepřístupná – hlubinné vzorkovače, nebo vzorkovače bez přítomnosti obsluhy – automatické vzorkovače. Výhodou je zejména opakovatelnost a také možnost odebírat vzorek nepřetržitě, a to v přesně daných intervalech. Při použití automatického vzorkovače je důležité, aby byl sací koš umístěn ve středu toku a ve vhodné hloubce tak, aby nenasával sedimenty ze dna ani plovoucí materiál vyskytující se na povrchu toku.^{51,52}

V případě, že je vzorkována odpadní voda, je vzorek většinou odebírán na přítoku a odtoku z čistírny odpadních vod, popř. po jednotlivých technologických operacích. Vzorky odpadní vody jsou odebírány na přítoku i odtoku během 24 hod v pravidelných časových intervalech.^{53,54}

Po odběru jsou vzorky uloženy ve tmě při 4 °C až do dalšího zpracování. Teplota a temno jsou důležité pro zabránění biodegradace a fotodegradace vzorku.⁵⁴

2.15.2. Kontaminace vzorku

Jako kontaminace vzorku je označována přítomnost látek, které se náhodně dostaly ke vzorku během vzorkovacího nebo analytického procesu. Z toho vyplývá, že následná měření mohou sice ukázat složení vzorku v době měření, avšak nedokážou stanovit koncentraci analytu ve vzorku odpovídající původní době odběru vzorku. Vzorky mohou být kontaminovány několika způsoby, a to v různých částech vzorkovacího a analytického procesu. Kontaminace může nastat v místě odběru vzorků, dále při manipulaci se vzorky, při jejich konzervaci, adjustaci, uložení nebo transportu do laboratoře. Po předání odebraného vzorku do laboratoře je možné ho kontaminovat při uložení, manipulaci, zpracování, případně i při vlastním analytickém procesu.⁵⁵

Možné způsoby kontaminace vzorků:

- ❖ Kontaminace odběrovým zařízením – velmi častý způsob kontaminace. Vzorkovací zařízení může být vyrobeno z nevhodného materiálu, který může přímo kontaminovat vzorek látkou obsaženou v tomto materiálu, nebo může jít o křížovou kontaminaci, která je způsobena nevhodným nebo nedostatečným vyčištěním vzorkovacího zařízení.
- ❖ Při kontaminaci prostřednictvím vzorkovnic bylo zjištěno, že lineární PE, polykarbonáty a teflony různých typů mohou být zdrojem kontaminace těžkými kovy. Proto je pro laboratorní činnost, v rámci které se hodnotí přítomnost těžkých kovů, doporučena metoda čištění zahrnující promytí kyselinou chlorovodíkovou a dusičnou (obě kyseliny jsou použity následně za sebou). Skleněné vzorkovnice jsou používány pro ukládání vzorků pevných, kapalných a pastovitých (kalů), a to pro analýzy organických látek.
- ❖ Uvolnění kontaminantu metodou čištění, která je příliš „agresivní“, popřípadě sám čisticí prostředek může být kontaminantem.
- ❖ Kontaminace vzorků při uložení nebo transportu difúzí přes vzorkovnici. K této kontaminaci může dojít v případě, kdy jsou společně uloženy vzorky s vysokou a nízkou koncentrací.
- ❖ Kontaminace během přípravy a zpracování vzorků v laboratoři – každým manipulačním krokem se zvětšuje možnost kontaminace, ať už se jedná o extrakci, zakoncentrování nebo dělení vzorku. Počet možných kontaminací se zvyšuje se zvyšujícím se počtem kroků nezbytných pro zpracování vzorku.⁵⁵

2.15.3. 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. Může se použít extrakce na tuhém sorbentu (*Solid Phase Extraction* – SPE), extrakce z kapaliny do kapaliny (*Liquid-Liquid Extraction* – LLE), gelová permeační chromatografie (*Gel Permeation Chromatography* – GPC) a semi-preparativní vysokoúčinná kapalinová chromatografie. 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.⁵⁶

2.15.3.1. Extrakce na tuhém sorbentu

Extrakce tuhou fází je jednostupňová metoda, při které dochází k rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze, a to mezi kapalinu a tuhou fází. Tato metoda je velmi využívána při stanovení různých skupin léčiv v biologickém materiálu nebo ve vodách. Extrakce tuhým sorbentem je alternativou k extrakci kapalina-kapalina, u které se mohou vyskytovat problémy s tvorbou emulzí, s odpařováním velkých objemů rozpouštědel, s odpady toxických rozpouštědel apod.⁵⁷

Princip extrakce tuhým sorbentem je následující: roztok analytu se přivede do kontaktu s tuhým sorbentem, který silně sorbuje sledovaný analyt, avšak ostatní složky roztoku sorbuje co nejméně. Po oddělení sorbentu a roztoku může být izolovaný analyt uvolněn buď zahřátím nebo elucí rozpouštědlem. V případě desorpce rozpouštědlem je vzorek nanesen na kolonku, která je následně promyta a analyt se desorbuje vhodným rozpouštědlem. Zakoncentrování analytu může být provedeno odpařením rozpouštědla do sucha a následným opětovným rozpuštěním analytu v malém, předem definovaném množství rozpouštědla. Určitý podíl z takto upraveného vzorku (cca 1–10 %) je kvantitativně převeden do vialek pro další stanovení plynovou nebo kapalinovou chromatografií. Určitou nevýhodou může být malé množství analytu, které se dostane do analytické kolony (cca 10 %).

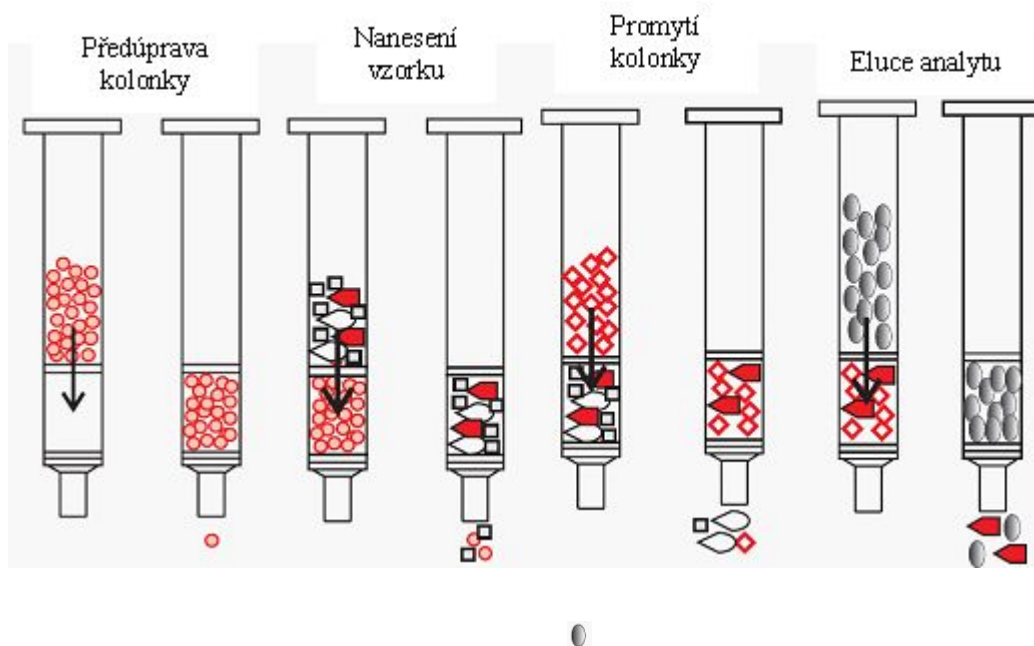
K extrakci tuhým sorbentem lze použít také tzv. vsádkovou metodu, která je založena na míchání roztoku analytu se sorbentem a následném odfiltrování sorbentu; u tohoto postupu lze rovněž použít dynamické uspořádání.

Při dynamickém uspořádání protéká roztok vzorku přes sorpční kolonku, ve které jsou řádově miligramy až gramy vhodného sorbentu. Průtok vzorku je umožněn buď gravitací, nebo pozitivním tlakem (čerpádlem, injekční stříkačkou), případně negativním tlakem (připojeným vakuem). Sorpční kolonky s různými sorbenty se od sebe výrazně neliší, obvykle mají délku okolo 10–20 mm; jejich vnitřní průměr je 2–4,6 mm a jsou naplněny sorbentem o velikosti částic 20–50 µm.⁵⁸ Předností uvedené metody je to, že kolonka může být použita k operacím jako je čištění látky, zakoncentrování stopových množství látek, výměně rozpouštědel (analyt je převeden z jedné specifické matrice do jiné, např. z vodné do organické), derivatizaci (analyt je zachycován na sorbent, převeden na derivát a následně eluován). Sorpční kolonky je možné nahradit extrakčními disky. Tyto disky představuje síťka z teflonu nebo ze skelných vláken, do které je zakotveno asi 90 hmotnostních % silikagelu modifikovaného skupinami C18 nebo C8, popř. hydrofobního kopolymeru. Průměry extrakčních disků se pohybují v rozmezí od 4 mm, pro vzorek o objemu asi 1 ml, do 90 mm, a to pro větší objemy. Tloušťka disků je 0,5 mm a jejich předností je rychlost, s jakou je možno prolévat vzorek diskem o velké ploše.⁵⁸

Sorbenty jsou nejčastěji na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Na povrchové silanolové skupiny se chemicky navazují skupiny různých vlastností, které rozhodují o vlastnostech sorbentu. Při separaci využíváme různé mechanismy zachycování látek spočívající především v odlišných molekulárních interakcích mezi analytem a sorbentem. Jsou to především van der Waalsovy síly, vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce, kation-aniontové interakce aj.⁵⁹

Extrakce je složena z těchto několika kroků (Obr. 21):

- ❖ Příprava vzorku – fyzikální a chemické vlastnosti vzorku by měly podporovat zadržení vzorku v kolonce.
- ❖ Aktivace sorbentu – jedná se o smáčení fáze vázané na silikagelu matricí vzorku. Smáčivost je zajištěna solvatací. U některých sorbentů je tento krok vynecháván.
- ❖ Předrovnovážná úprava kolonky – jde o nasycení kolonky čistým rozpouštědlem analytu. Ustaví se rovnováha mezi sorbentem v kolonce a tímto rozpouštědlem. Předrovnovážná úprava se volí podle charakteru a vlastností extrahovaného analytu tak, aby byl co nejlépe zadržován v kolonce.
- ❖ Aplikace vzorku – analyt je z větší části oddělen od matrice vzorku.
- ❖ Promytí sorbentu – slouží k odstranění nežádoucích složek z vázaných fází bez toho, že by byl eluován analyt. U málo zadržovaného analytu může být tento krok vynechán a sorpční kolonka se zbaví zbytku vody sušením pomocí průchodu plynu kolonkou.
- ❖ Eluce koncentrovaného analytu – zpětné získání analytu se provádí promytím kolonky rozpouštědlem, které eluuje analyty z vázaných fází. Průtok kolonkou by neměl být příliš rychlý, aby se důkladně vymyl všechny analyt.⁵⁹ U analgetik se ve většině případů používá čistý methanol.^{60,61}



Obr. 21 Postup extrakce na tuhém sorbentu; $\blacksquare$ – matrice, $\bullet$ – nečistota, stanovovaný analyt, $\circ$ – rozpouštědlo A, $\blacklozenge$ – rozpouštědlo B, rozpouštědlo C⁶²

2.15.4. Separace pomocí HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie)

Chromatografie je separační metoda, jejímž základním principem je dělení složek. Je to metoda umožňující kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Analyt se rozděljuje 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.⁶³ 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.

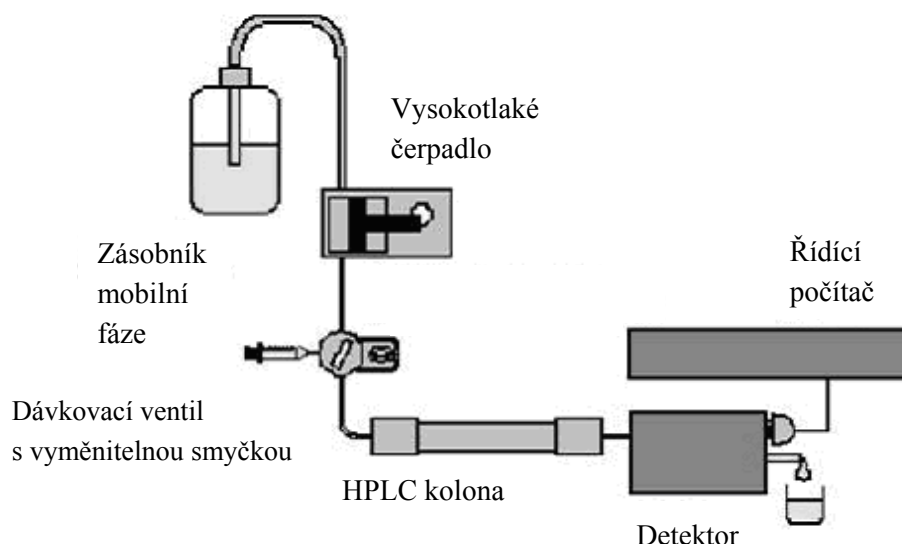
2.15.4.1. Vlastní metoda

Kapalinová chromatografie se vesměs používá k separaci směsí látek, které jsou netěkavé, popř. málo těkavé, termicky labilní; lze ji využít rovněž k separaci iontů a látek vysokomolekulárních, polárních a nepolárních. Důležitou roli zde hraje kapalná mobilní fáze, která značně ovlivňuje retenci jednotlivých složek směsi a z toho plynoucí rozdělení. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) je separační metoda, při které jsou používány kolony s vhodnou stacionární fází. Tyto stacionární fáze by měly být voleny tak, aby umožnili rychlou separaci složitých směsí, a to s vysokým rozlišením zón. Stacionární fáze je tvořena velmi malými částicemi (2–10 µm) homogenní náplně. Účinnost kolon se pohybuje v rozsahu 30 000–90 000 teoretických pater na metr. Vzhledem k velikosti částic je zapotřebí vysokého tlaku, aby mohla kolonou protékat mobilní fáze. Proto bývala dříve tato metoda označována jako vysokotlaká kapalinová chromatografie.⁶³

Mezi hlavní výhody kapalinové chromatografie patří to, že k dělení látek je možno využít všechny vratné dvoufázové separační mechanismy, jako jsou adsorpce, iontová výměna, rozdělování mezi dvě nemísitelné kapaliny, případně pronikání molekul z volné mobilní fáze do stejné kapalné fáze, která je uzavřena v pórech tuhé stacionární fáze (např. u gelové chromatografie). Tato široká škála mechanismů dává možnost naleznout dostatečně selektivní a účinný chromatografický systém pro sledovaný analyt, pomocí kterého lze dosáhnout i potřebného rozlišení.^{64,65}

V kapalinové chromatografii má značný význam také chromatografie na obrácených fázích (*Reversed-Phase Liquid Chromatography* – RPLC), která vyjadřuje, že mobilní fáze je polárnější (např. acetonitril nebo methanol a voda) a stacionární fáze je méně polární (alkyly vázané na silikagel). V počátcích chromatografie bylo toto uspořádání opačné (mobilní fáze nepolární, stacionární fáze polární); byl to tzv. systém s normálními fázemi. Dnes je tento systém používán v omezené míře.⁶⁵ Retenční časy analytů jsou ovlivněny rozpustností v různých polárních fázích.⁶⁶

Kapalinový chromatograf je tvořen zásobníky mobilní fáze, směšovacím zařízením, čerpadlem, dávkovacím zařízením, kolonou a detektorem (Obr. 22).



Obr. 22 Schéma kapalinového chromatografu⁶⁷

Mobilní fáze je nejčastěji tvořena acetonitrilem, methanolem nebo vodou.⁶³ Může být použit také acetonitril s přídavkem octanu amonného, kyseliny mravenčí, kyseliny octové nebo kyseliny fosforečné.^{60,61,68} Mobilní fáze může mít stále stejné složení, tzv. izokratická eluce, nebo se její složení může v průběhu měření měnit. Potom se jedná o tzv. gradientovou eluci; tato eluce se hojně využívá pro stanovení léčiv ve vodách. Pro řízení gradientu je důležité směšovací zařízení, které se programuje.⁶⁹

Následně je směs čerpána pístovými čerpadly do kolony. Čerpadla musí zajišťovat kontinuální a bezpulzní tok mobilní fáze celým systémem. Mohou dosahovat průtoku od mikrolitrů do desítek mililitrů za minutu; kolísání průtoku by mělo být menší než 1 %, při tlaku 80 až 120 MPa. Jedním z požadavků na čerpadla je inertnost materiálu, který přichází do kontaktu s kapalinou.⁶³

Vzorek může být dávkován pomocí různých dávkovacích systémů; nejčastěji jsou používány dávkovací kohout (čtyřcestný nebo šesticestný) nebo autosampler. Základními požadavky jsou vysoká přesnost, správnost a reprodukovatelnost nástřiků.⁶³

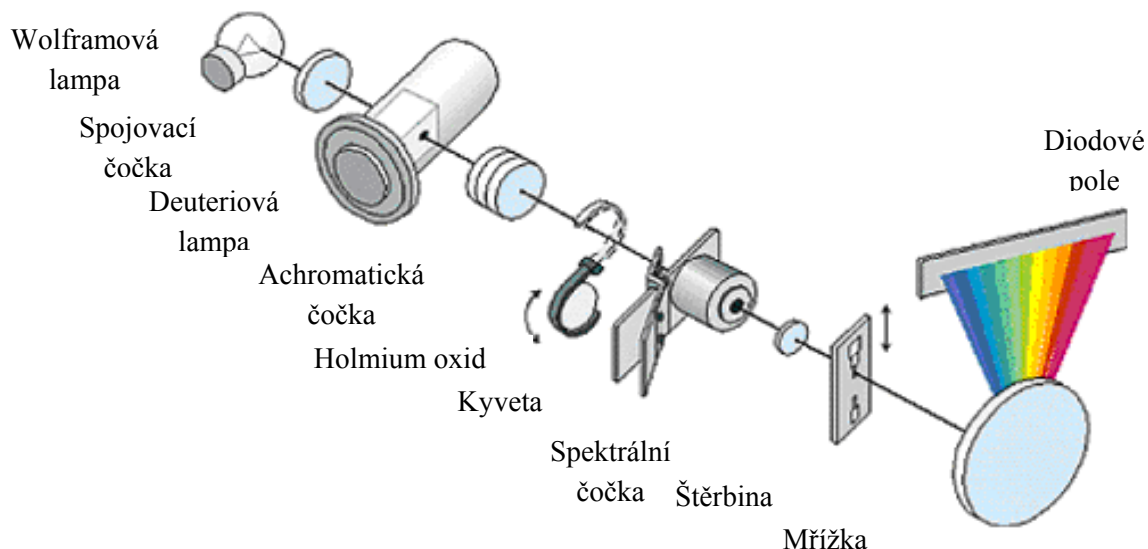
V HPLC se používají náplňové kolony, které se liší délkou, vnitřním průměrem, náplní a mají zásadní význam pro úspěšnou analýzu. Kolony mohou být nerezové, skleněné nebo plastové. Pro ochranu kolony je možné použít předkolonu, která chrání kolonu před nečistotami pocházejícími ze vzorku.^{63,64}

2.15.4.2. 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 informace o struktuře daných analytů.

Spektrofotometrický detektor ve spojení s HPLC, patří k nejpoužívanějším postupům v analýze léčiv. Je relativně jednoduchý, spolehlivý a lze jím detekovat velký počet látek, kompatibilně s gradientovou elucí. Základním požadavkem je nízká absorbance mobilní fáze při použité vlnové délce nastavené na detektoru. Detektor pracuje v ultrafialové a viditelné oblasti. Může mít pevnou vlnovou délku (254 nm), u složitějších detektorů je možné nastavení

vlnové délky pomocí monochromátoru; nejdokonalejší detektor může proměřit absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek pomocí diodového pole (*Diode Array Detector – DAD*). Jeho detekční limit je až $10^{-10} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, citlivost a selektivita je pro různé látky různá a při zvolené vlnové délce závisí na velikosti molárního absorpčního koeficientu.^{63,65,70}



Obr. 23 Optický systém DAD detektoru⁷¹

Fluorimetrický detektor je jeden ze selektivních a velmi citlivých detektorů. Jeho nevýhodou je však omezení pouze na ty látky, které mají přirozenou fluorescenci nebo je lze na fluoreskující deriváty převést. Používá se při stopových analýzách látek v komplikovaných matricích, např. při sledování léčiv a jejich metabolitů, při analýze aminokyselin a složek nukleových kyselin.^{63,64}

Elektrochemické detektory patří mezi selektivní detektory. Jsou založeny buď na měření vodivosti (pro látky iontové) nebo elektrického proudu odpovídajícího oxidaci nebo redukci analytů. Vedle selektivity se u tohoto detektoru dosahuje i velké citlivosti, zejména v oxidačním módu. Jejich nevýhodou je to, že se nedají použít při gradientové eluci. Jsou velmi citlivé na nečistoty přítomné v mobilních fázích. Využívají se zejména při analýze aromatických aminů a fenolů v environmentálních a biologických vzorcích.^{63,70}

Spojením hmotnostního detektoru (*Mass Spectrometry – MS*) s HPLC získáme vysoce selektivní a citlivou metodu, která je vhodná 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.^{72,73} 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*).⁷⁴

Podstatou elektrospreje je to, že eluent z HPLC prochází kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (3 – 5 kV). Následně dochází ke vzniku mikrokapiček, které po rozprášení na výstupu z kapiláry nesou na povrchu náboj. Vlivem odpařování rozpouštědla se zvýší hustota povrchového náboje a dojde k tzv. Coulombické explozi. Opakováním tohoto

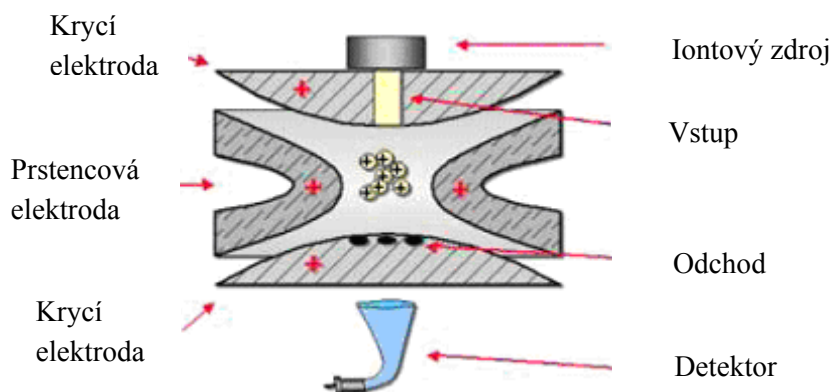
děje vzniknou kvazimolekulární ionty. Po ionizaci se ionty dostanou do hmotnostního analyzátoru, dojde k separaci hmotnostním filtrem a k vlastní detekci.⁷⁴

Při chemické ionizaci za atmosférického tlaku je na výbojovou elektrodu vloženo vysoké napětí (3 – 4 kV), tím vzniká koronový výboj, kterým jsou nejprve ionizovány molekuly mobilní fáze a poté jsou ionizovány molekuly analytu prostřednictvím ion-molekulárních reakcí reakčního plynu. Vzniklé ionty jsou pak elektrodami usměrněny do analyzátoru, přičemž protiproud sušícího plynu slouží k rozbití případných nekovalentních klastrů.⁷⁴

Jako zdroj UV záření při fotoionizaci za atmosférického tlaku je používána kryptonová výbojka s energií fotonů 10 a 10,6 eV. Tato energie je větší než ionizační energie nepolárních organických molekul, ale menší než ionizační energie složek mobilní fáze nebo vzdušného kyslíku, a proto dochází k selektivní ionizaci analytu a ne mobilní fáze.⁷⁴

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů podle poměru m/z . Kvalitu tohoto rozdělení ovlivňuje 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. Každý z vyjmenovaných analyzátorů má své výhody i nevýhody.⁷⁵

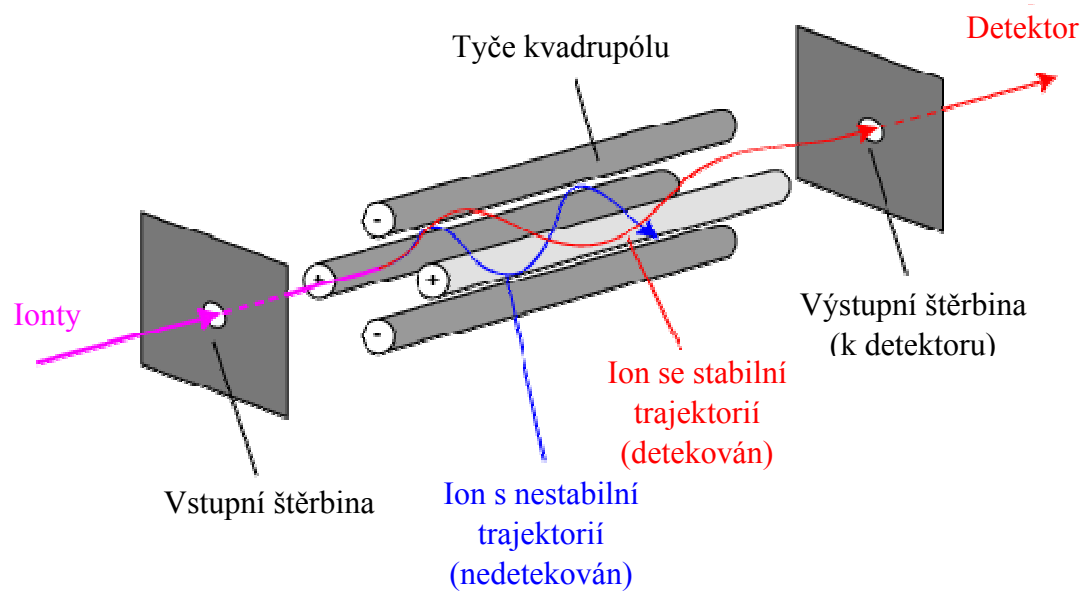
Iontová past (Obr. 24) pracuje v cyklickém režimu, což znamená, že si ionty napouští, uchovává a skenuje. Její nevýhodou je možnost vzniku prostorového náboje, nižší efektivita záchytu iontů při napouštění, nižší efektivita ejekce iontů při skenování, nízkoenergetická kolizní aktivace při MS/MS a také pravidlo 30:70, díky němuž není možné vidět fragmenty, které mají hmotnost menší, než 30% prekursoru, což může hrát podstatnou roli v identifikaci analytu.⁷⁵



Obr. 24 Schéma iontové pasti⁷⁶

Kvadrupól je analyzátor, který obsahuje čtyři tyče, na něž je vloženo stejnosměrné a radiofrekvenční napětí. Tyče orientované proti sobě jsou elektricky propojené. Napětí vytváří elektromagnetické pole a pro danou amplitudu prostupují mezi tyčemi pouze ionty daného m/z až do detektoru. Ostatní ionty jsou vybity mimo tento prostor (Obr. 25).⁷⁷ Trojitý kvadrupól je pravděpodobně nejčastěji používaný přístroj pro MS/MS detekci. Jedná se o tři po sobě jdoucí kvadrupóly, přičemž druhý neslouží k rozdělení iontů podle m/z , ale má funkci kolizní cely, kde dochází k fragmentaci iontů.^{78,79}

Poslední jmenovaný – analyzátor doby letu nám může teoreticky poskytnout neomezený rozsah m/z ; je dokonalý zejména pro pulsní ionizaci, kdy je pro jeden puls zaznamenáno celé spektrum; je vysoce citlivý, ale jeho pořizovací náklady jsou vysoké.⁷⁵



Obr. 25 Schéma jednoduchého kvadrupólu⁸⁰

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Hodnocená environmentální matrice

Sledovanou maticí 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.

3.1.1. Odpadní voda

Odpadní voda byla odebírána z velkokapacitní čistírny odpadních vod v Brně Modřicích. Ta slouží pro čištění odpadních vod z města Brna (cca 500 000 obyvatel) a širokého okolí. Kromě města Brna jsou na ČOV napojeny také města Kuřim a městská část Brno–Modřice, dále obce Želešice, Česká u Brna, Šlapanice, Šlapanice-Bedřichovice, Ostopovice, Moravské Knínice, Lipůvka, Podolí, Ponětovice a Rozdrojovice. Maximální přípustné množství přitékající odpadní vody je $4\,222\text{ l} \cdot \text{s}^{-1}$. V případě vyššího průtoku vody vlivem deště je voda kumulována v dešťové nádrži a po skončení dešťové události je přečerpávána zpět na ČOV.⁸¹ 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 na přítoku 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.

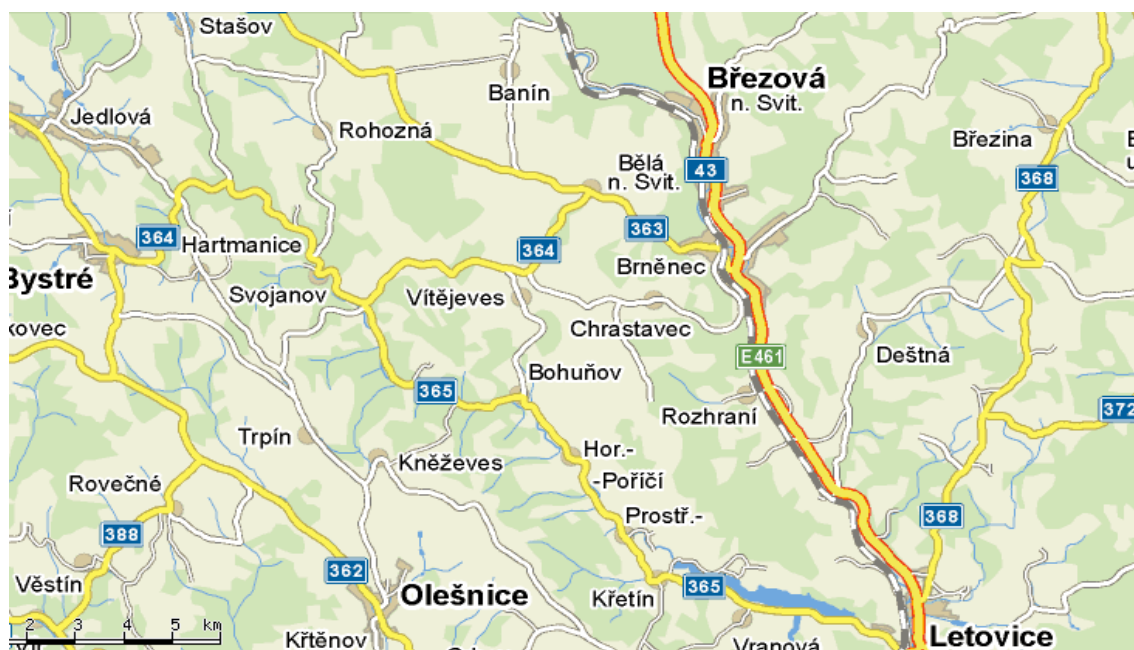
3.1.2. Povrchová voda

3.1.2.1. Křetínka

Řeka Křetínka protéká krajinou v okresech Svitavy a Blansko v České Republice. Řeka je dlouhá 29 km a na jejím toku bylo vybudováno vodní dílo Letovice. Křetínka pramení v Třebovském mezihoří, 150 m severně od obce Stašov. Následně řeka protéká sevřeným údolím podél komunikace směrem na Hamry. V místě napojení komunikace ze Stašova na komunikaci z Poličky se do Křetínky vlévá z pravé strany Bysterský potok. Dále řeka protéká obcemi Svojanov, Předměstí a Dolní Lhota, kde se do Křetínky vlévá z pravé strany Kavinský potok. Dalšími vesnicemi na toku řeky Křetínky jsou Hutě, Bohuňov, Horní Poříčí, Prostřední Poříčí, Dolní Poříčí a Křetín, kde se nachází počátek vzdušného vodního nádrže. Na pravé straně přehrady leží Vranová a na opačném břehu Lazinov. Tři kilometry pod hrází přehrady se Křetínka vlévá do řeky Svitavy. Z povodí řeky, které má rozlohu $127,4\text{ km}^2$, přitéká nad přehradní hrází do Křetínky celkem 26 pravostranných přítoků a 21 levostranných přítoků, z nichž je největší Rohozenský potok. Pod hrází má Křetínka ještě dva menší pravostranné přítoky. V povodí Křetínky se nachází mimo již zmíněné obce obec Bystré, Dolní Jedlová, Hartmanice, Hlásnice, Trpín, Kněževy, Jobova Lhota, Veselka, Vřesice, Starý Svojanov a Rohozná.^{82,83}

Komunální odpadní vody z těchto obcí ležících v okolí toku patří k základním problémům velké části regionu. Místní obce 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 obcemi. Vybudovat čističku odpadních vod je v současnosti povinností pro

všechny obce s počtem obyvatel nad 1200. Menší obce mají do roku 2012 výjimku k vypouštění odpadních vod do vodních toků a čističku nemusí budovat. Na území povodí Křetínky je ČOV pouze ve městě Bystré, která byla vybudována v roce 1996; díky ní došlo k výraznému zlepšení čistoty vody v Bysterském potoce. Kvalitu vod tohoto regionu rovněž ovlivňují odpadní vody z malých průmyslových závodů nebo zemědělských podniků.⁸³



Obr. 26 Mapa znázorňující povodí Křetínky

3.1.2.2. Řeka Thurso

Pramen této řeky je v jezeře Loch Rumsdale v oblasti Caithness, na Skotské vysočině v Anglii. Od svého pramene až po jezero Loch More je známá jako Strathmoské vody. Z jezera Loch Rumsdale teče jihovýchodním směrem a po zhruba 4 km do ní přitéká Glut Water; po dalších 7 km severovýchodním směrem přitéká do jezera Loch More.^{84,85} Délka toku 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.



Obr. 27 Povodí řeky Thurso

3.1.2.3. Řeky Yanshuei, Erren, Agongdian a kanál v Tainanu

Tyto řeky se nacházejí na území Taiwanu. 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.⁸⁶ Proto je zde velmi vysoká pravděpodobnost kontaminace těchto vod analyty typu biologicky aktivních látek a xenobiotik. Nejdelší ze sledovaných řek je řeka Erren, jejíž délka je 63,2 km. Další řeky mají kratší délku toku, a to řeka Yanshuei má délku toku 41,3 km a Agongdian 31,9 km.⁸⁷ Dále byly odebrány vzorky vody z kanálu, v němž byla voda brakická. Kanál byl uměle vybudovaný během japonské koloniální okupace Taiwanu (1895 – 1945). Kanál navrhl Kutai Matsumoto a byl dokončen roku 1926. Jeho součástí je také přístav, který tvoří jednu z hlavních dominant města Tainanu.⁸⁸⁻⁸⁹

Obr. 28 znázorňuje mapu Taiwanu s oblastmi Tainanu a Kaohsiungu, kde byly vzorky odebrány.



Obr. 28 Mapa Taiwanu s jeho oblastmi⁹⁰

3.2. Přístroje, zařízení, software

3.2.1. Příprava a extrakce vzorků

- ❖ Analytické váhy HR-120, A&D Instruments, Japonsko
- ❖ pH metr InoLab WTW series, Nameko, ČR
- ❖ SPE extraktor Baker, model spe-12G, s vakuovou pumpou, Barmany Co., USA
- ❖ Přístroj EVATERM pro sušení dusíkem, LABICOM s.r.o., ČR
- ❖ Rotační vakuová odparka Rotavapor[®] R-205 s vyhřívanou lázní B-409 a elektronickým spínačem vakua V-800, Büchi Labortechnik AG, Švýcarsko
- ❖ Konduktometr Cond 330i, Německo
- ❖ SPE kolonky Oasis[®] HLB Cartridge, Waters, USA
- ❖ SPE kolonky Strata X, Phenomenex, USA
- ❖ Filtry:
 - ◆ Cronus syringe filters, PTFE, 13 mm, 0,45 µm
 - ◆ LUT Syringe filters LUT, PTFE, 13mm, 0,22µm
- ❖ Filtry ze skleněných mikrovláken GF/C Whatman[®], průměr 47 mm, Whatman, International Ltd Maidstone, Anglie
- ❖ Filtry ze skleněných mikrovláken GF/F Whatman[®], průměr 47 mm, Whatman International Ltd Maidstone Anglie
- ❖ Běžné laboratorní vybavení analytické laboratoře

3.2.2. Kapalinová chromatografie

- ❖ Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, Agilent, USA
- ❖ Vakuová odplynovací jednotka HP 1100, příkon 30 VA
- ❖ Detektor diodového pole (DAD) – zdroj světla deuteriová (UV) a wolframová (VIS a blízké IČ) lampa, 1024 fotodiod, vlnový rozsah 190-950 nm, programovatelná šířka štěrbin 1–16 nm
- ❖ Hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series, Ion Trap LC/MS, USA
- ❖ Infuzní pumpa kdS 9100, kdScientific, USA
- ❖ Kapalinový chromatograf Alliance 2695 HPLC, Waters, Manchester, Anglie
- ❖ Hmotnostní spektrometr Waters Micromass[®] Quattro Micro[™] detector, Waters; Manchester, Anglie
- ❖ Kapalinový chromatograf Agilent 1200 module, Agilent, Palo Alto, CA, USA
- ❖ Hmotnostní spektrometr Sciex API 4000, Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
- ❖ Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, velikost 4,6 × 150 mm, velikost částic 5 μm, Agilent, USA
- ❖ Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, velikost 2,1 × 150 mm, velikost částic 3,5 μm, Agilent, USA
- ❖ Kolona C18 Luna[®], velikost 250 × 10 mm, velikost částic 10 μm, Phenomenex, Macclesfield, Anglie
- ❖ Kolona Kinetex PFP, velikost 100 × 2,1 mm, velikost částic 2,6 μm, Phenomenex, Torrance, CA, USA

3.2.3. Software pro zpracování a prezentaci dat

- ❖ Microsoft[®] Office Word 2007, Microsoft Corporation, USA
- ❖ Microsoft[®] Office Excel 2007, Microsoft Corporation, USA
- ❖ Adobe[®] Photoshop[®] CS2 9.0, Adobe, USA
- ❖ HP ChemStation pro LC/MSD, Rev. B.01.03, Agilent, USA
- ❖ Agilent 6300 Series Ion Trap LC/MS System Software, Version 6.2 (2008)
 - ◆ QuantAnalysis for 6300 Series Ion Trap LC/MS Version 2.0, Bruker Daltonik GmbH
 - ◆ DataAnalysis for 6300 Series Ion Trap LC/MS Version 4.0, Bruker Daltonik GmbH
- ❖ Masslynx TM NT software, Waters, Milford, MA, USA
- ❖ MDL ISIS[™]/Draw 2.5, MDL Information Systems, Inc., USA

3.3. Používané chemikálie a standardy

3.3.1. Chemikálie

Acetonitril, Chromasolv pro LC, Sigma - Aldrich, Německo

Deionizovaná voda upravená přístrojem Mili-Q Academic firmy Milipore o specifické vodivosti 0,055 μS·cm⁻¹ při teplotě 24°C

Dihydrogenfosforečnan draselný, Fluka, Německo

Ethanol, LiChrosolv, Merk, Německo

Ethylacetát pro HPLC, Lach - Ner, s.r.o., Česká Republika

Hydrogenfosforečnan draselný, Fluka, Německo

Kyselina fosforečná, Penta, Česká Republika

Kyselina chlorovodíková 36%, Penta, Česká Republika
Kyselina mravenčí, Riedel – de Haen, Sigma – Aldrich, GmbH, Německo
Kyselina sírová, Lach – Ner, s.r.o., Česká Republika
Methanol pro HPLC, Chromservis s.r.o., Česká Republika
Octan amonný p.a., Fluka, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Německo

3.3.2. Standardy sledovaných léčiv + vnitřní standardy (abecedně seřazeno)

Diklofenak, sodná sůl, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
Ibuprofen, sodná sůl, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
Ketoprofen ($\geq 98\%$), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
Kofein, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
Kyselina mefenamová, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
Kyselina salicylová ($\geq 99\%$), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
Naproxen (99,9%), VETRANAL[®], Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
Paracetamol (99%), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

Atenolol-D7 ($\geq 95\%$), Fluka, Švýcarsko
Ibuprofen-D3 ($\geq 98\%$), Fluka, Švýcarsko

3.4. Pracovní postupy

3.4.1. Odběry vzorků

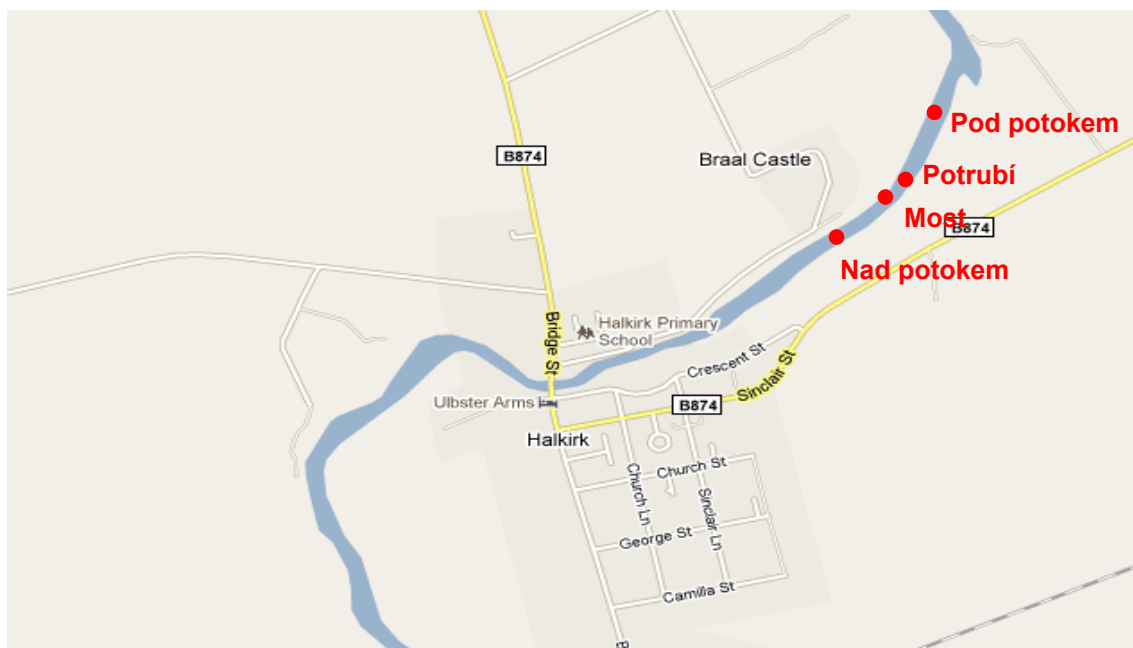
Vzorky odpadních vod byly odebírány během dubna, června a července 2010. Jednalo se o odběry z přítoku a odtoku velkokapacitní čistírny odpadních vod v Brně – Modřicích. Vzorky byly odebírány pomocí automatického vzorkovače, díky němuž byl získán slévaný 24 hodinový vzorek. Odebraný vzorek byl ihned zpracován (3×250 ml). Pro přepravu do laboratoře byly použity tmavé skleněné vzorkovnice (objem 1 litr).

Vzorky povrchových vod z řeky Křetínky byly odebírány v měsících dubnu a srpnu 2010, a to v katastrálním území obcí Svojanov a Předměstí. První odběrové místo bylo zvoleno v místě, kde řeka vtéká do obce. Druhý odběrový bod byl vybrán v místě, ve kterém řeka protékla nejvíce obydlenou oblastí a vlévá se do ní potok protékající obcí Starý Svojanov. Vzorky byly odebírány do tmavých, skleněných lahví o objemu 2,5 litru. Zpracování vzorků proběhlo do 24 hodin po odběru; do té doby byly vzorky uskladněny v lednici při 4°C.



Obr. 29 Odběrová místa na Křetince

Vzorkování řeky Thurso bylo prováděno v měsíci červnu 2009. Celkem zde bylo provedeno pět odběrů. První tři odběry se uskutečnily na místech označených „Nad potokem“, „Most“, „Pod potokem“. Lokalizace byla zvolena podle polohy čistírny odpadních vod pro městečko Halkirk, kde žije přibližně 1000 obyvatel.⁹¹ Lokalita „Nad potokem“ je místo nad výpustí přečištěné vody do řeky Thurso, lokalita „Most“ je místo těsně před zaústěním výpustního potoka do řeky. Lze se domnívat, že zde již může docházet k průsakům přečištěné vody do řeky. Lokalita „Pod potokem“ je označení místa, kde vodní tok již obsahuje přečištěnou vodu vypuštěnou z čistírny odpadních vod. Ke zbylým odběrům přibyl v průběhu pokusu ještě čtvrté odběrové místo, „Potrubí“. Tento vzorkovací bod byl zařazen z důvodu zjištění úniku vody z daného potrubí do řeky. Vzorky byly odebírány do skleněných vzorkovnic a ihned po odběru byly zpracovány.



Obr. 30 Vzorkovací místa na řece Thurso



Obr. 31 Znáznornění vzorkovacích míst a polohy ČOV v rámci vzorkování řeky Thurso

Vzorkování Taiwanských řek bylo prováděno v měsíci listopadu 2010. Vzorky byly odebírány ze tří řek a také z kanálu, ze kterého byla odebírána mořská voda.

Na řece Yainshuei bylo provedeno šest odběrů po celé délce jejího toku. Řeka Erren byla vzorkována na osmi místech. Tato řeka je z námi sledovaných Taiwanských řek nejdelší a má celkem 5 přítoků. Třetí sledovanou řekou v dané oblasti byla řeka Agongdian, z níž byly odebrány celkem čtyři vzorky. Posledním posuzovaným místem byl kanál s mořskou vodou, kde bylo provedeno celkem pět odběrů. Sumárně bylo v Taiwanu odebráno 23 vzorků, které obsahovaly říční i mořskou vodu. Vzorky byly odebírány do skleněných vzorkovnic a před dalším zpracováním byly uskladněny v temnu při teplotě 4°C.



Obr. 32 Znáznornění vzorkovacích míst v oblasti Tainan a Kaohsiung

3.4.2. Příprava vzorků a izolace analytů

Prvním krokem úpravy všech vzorků byla vždy filtrace, která byla prováděna z důvodu odstranění suspendovaných látek, které by komplikovaly další preanalytickou úpravu.

Odpadní voda byla filtrována nejprve přes papírový filtr a následně přes filtr ze skleněných mikrovláken, s použitím vodní vývěvy. Voda povrchová a voda mořská byla filtrována pouze přes filtr ze skleněných mikrovláken.

Sledované analyty byly izolovány metodou extrakce na pevné fázi (SPE). Objemy odebírané odpadní i povrchové vody byly zvoleny na základě předem provedené pilotní studie. Pro extrakci odpadní vody byl použit objem 250 ml, ze kterého bylo získáno 400 µl vzorku, následně rozpuštěného v methanolu. Pro vodu povrchovou byl zvolen objem 500 ml, z něhož bylo získáno 200 µl vzorku rozpuštěného v methanolu.

Postup pro extrakci byl následující:

- ◆ Aktivace kolonky 5 ml methanolu
- ◆ Promytí 3 ml 0,01M HCl
- ◆ Nanesení vzorku (pH 2)
- ◆ Promytí 3 ml miliQ vody
- ◆ Sušení proudem vzduchu
- ◆ Eluce 5 ml methanolu
- ◆ Sušení N₂ do sucha, popř. odpaření pomocí rotační vakuové odparky
- ◆ Opětovné rozpuštění odparku v methanolu

Tento postup úpravy byl použit pro vody z České Republiky (SPE kolonky Oasis[®] HLB Cartridge) a Skotska (SPE kolonky Strata X).

U vod odebraných na Taiwanu byla kromě filtrace proměřena také salinita, aby byl přesně znám charakter odebraného vzorku, tj., zda se jedná o vodu říční, brakickou nebo mořskou. Poté následovala extrakce pevnou fází. Bylo použito 300 ml odebrané vody, z níž byl získán 1ml vzorku ve směsi methanol : mili Q voda (2 : 1). Zde byly použity SPE kolonky Oasis[®] HLB Cartridge.

Extrakce byla provedena následujícím postupem:

- ◆ Aktivace 6 ml methanolu
- ◆ Promytí 6 ml miliQ vody
- ◆ Sušení kolonky
- ◆ Nanesení vzorku
- ◆ Promytí 6 ml miliQ vody
- ◆ Sušení proudem vzduchu
- ◆ Eluce 6 ml methanolu
- ◆ Sušení N₂ do sucha, a to na vodní lázni při teplotě 38 °C
- ◆ Opětovné rozpuštění odparku ve směsi methanol : voda (2 : 1)

3.4.3. Identifikace a kvantifikace analytů v odpadní vodě a v povrchové vodě z řeky Křetínky

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. U kofeinu a atenololu-D7 byla provedena tandemová MS detekce, kterou umožnily vlastnosti daných analytů.

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 × 150 mm, Agilent, jejíž nejvyšší pracovní teplota je 60 °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.

Sledované látky (Tabulka 2) byly identifikovány srovnáním hmotnostních spekter se spektry standardů, pro kvantifikaci bylo využito údajů odečtených z kalibrační křivky.

Tabulka 2 Sledované analyty v odpadní vodě a povrchové vodě z řeky Křetínky

Analyt	Typ ionizace	Sledovaná hmota
Diklofenak	negativní	294
Ibuprofen	negativní	161
Ketoprofen	negativní	209
Kofein	pozitivní	138 (MS2)
Kyselina mefenamová	negativní	240
Kyselina salicylová	negativní	137
Naproxen	negativní	185
Paracetamol	negativní	150
Atenolol-D7	pozitivní	230 (MS2)
Ibuprofen-D3	negativní	208

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 °C.

Tato kolona může pracovat v širokém rozmezí pH od 2 do 9. Při volbě nízkého pH (2–3) mají píky optimální tvar pro všechny typy sloučenin. Pokud se použije pH ve střední oblasti (6–8), jsou zbytky silanolů více aktivní a může docházet ke chvostování píků. Tomuto jevu se dá zabránit vazbou a dvojitým „zavíčováním“ konců („extra Densely Bonded and double endcapped“). Jedná se o zaručený způsob, jak pokrýt co největší počet aktivních silanolů. Výsledkem je lepší tvar píků sloučenin v rozsahu pH 2–9.⁹²

Před kolonu byl předsazen in-line filtr (2 μm), a to z důvodu ochrany kolony a prodloužení doby její životnosti.

3.4.4. LC/MS podmínky pro stanovení analytů v odpadní vodě a povrchové vodě z řeky Křetínky

3.4.4.1. Chromatografické podmínky

- ❖ Mobilní fáze: methanol + 10 mM amonium acetát
- ❖ Nástřík: 3 μl
- ❖ Průtok: 0,15 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$
- ❖ Teplota kolony: viz. Tabulka 3
- ❖ Vlnová délka: 230 nm
- ❖ Délka analýzy: 50 min – 32 min vlastní analýza, 18 min promývání
- ❖ Gradient: viz. Tabulka 4

Tabulka 3 Teplotní gradient

Čas (min)	Teplota (°C)
0	25
10	40
15	40

Tabulka 4 Průběh gradientu mobilní fáze

Čas (min)	MeOH (%)	10 mM CH ₃ COONH ₄ (%)
0	35	65
7	50	50
15	50	50
20	70	30
25	80	30

3.4.4.2. Nastavení hmotnostního spektrometru

- ❖ Tlak zmlžovače: 20 psi
- ❖ Průtok sušícího plynu: 600 l · hod⁻¹
- ❖ Teplota sušícího plynu: 350 °C
- ❖ Napětí na kapiláře: 3500 V
- ❖ Rozsah skenovaných hmot: 50-350 m/z
- ❖ Ionizační mód: pozitivní, negativní

3.4.5. Identifikace a kvantifikace analytů v povrchové vodě 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. Podmínky analýzy byly zvoleny na základě zpracované literární rešerše.^{93,94,95,96} Optimalizace detektoru byla provedena pomocí roztoků standardů v methanolu ($c = 1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Pro analýzu byla zvolena kolona C18 Luna[®], 250 mm × 10 mm, velikost částic 10 μm , Phenomenex. Tato kolona vyniká především svoji účinností, vysokým rozlišením a optimálním tvarem píků. Důležitou vlastností je to, že zde prakticky neexistují volné silanolové skupiny, a to díky vysokému pokrytí silikagelu nepolární fází a eliminací zbytku volných skupin tzv. endcappingem. Pracovní rozsah kolony je v oblasti pH 1,5 až 10,0 a její předpokládaná životnost je více než 1000 hodin.⁹⁷

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 z kalibrační křivky. Pro kvantifikaci bylo využito údajů odečtených z kalibrační křivky.

Tabulka 5 Sledované analyty v povrchové vodě z řeky Thurso

Analyt	Prekurzorový ion (m/z)	Produkovaný ion (m/z)
Diklofenak	294	250
		214
Ibuprofen	205	161
Ketoprofen	253	209
		197
Kyselina mefenamová	240	196
Kyselina salicylová	137	92
		64
Naproxen	229	186
		170

3.4.6. LC/MS podmínky pro stanovení analytů v povrchové vodě z řeky Thurso**3.4.6.1. Chromatografické podmínky**

- ❖ Mobilní fáze: methanol + 10 mM amonium acetát
- ❖ Nástřik: 20 μ l
- ❖ Průtok: 0,2 ml $\cdot$ min⁻¹
- ❖ Teplota kolony: 40 °C
- ❖ Délka analýzy: 33 min
- ❖ Gradient: viz. Tabulka 6

Tabulka 6 Průběh gradientu mobilní fáze

Čas (min)	CH ₃ COONH ₄ (%)	MeOH (%)
0	70	30
25	2	98
26	2	98
28	70	30
33	70	30

3.4.6.2. Nastavení hmotnostního spektrometru

- ❖ Průtok sušícího plynu: 256 l $\cdot$ hod⁻¹
- ❖ Teplota sušícího plynu: 200 °C
- ❖ Napětí na kapiláře: 5000 V
- ❖ Skenovací mód: MRM
- ❖ Ionizační mód: negativní

Tabulka 7 Nastavení MS pro jednotlivé analyty

Analyt	Prekurzorový ion (m/z)	Produkovaný ion (m/z)	MS-Parametry	
			Cone voltage (V)	Collision (eV)
Diklofenak	294,0	250,0	10	10
		214,0	10	10
Ibuprofen	205,0	161,2	10	10
Ketoprofen	253,0	209,2	15	10
		197,2	15	10
Kyselina mefenamová	240,0	196,2	25	20
Kyselina salicylová	137,0	92,9	30	15
		64,2	30	15
Naproxen	229,0	186,2	15	10
		170,2	15	10

3.4.7. 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 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) skenování, a to vzhledem k matici a počtu sledovaných analytů. Podmínky analýzy byly zvoleny na základě provedené literární rešerše.^{93,94,98,99} Optimalizace detektoru byla provedena pomocí roztoků standardů ve směsi methanol : voda (2 : 1) ($c = 1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Pro analýzu byla zvolena kolona Kinetex PFP, velikost $100 \times 2,1 \text{ mm}$, velikost částic $2,6 \mu\text{m}$, Phenomenex. Tato kolona má vynikající vlastnosti. Částice v koloně Kinetex nejsou zcela porézní, difuze analytů tedy neprobíhá celou částicí, ale pouze v povrchové vrstvě, jejíž tloušťka je $0,35 \mu\text{m}$. Tento rychlejší přenos hmoty má za následek ostré píky a vyšší účinnost kolony. Pracovní rozsah kolony je v oblasti pH 1.5 až 8. Pracovní tlak může být až 1000 bar.¹⁰⁰

Kvantifikace analytů byla provedena metodou standardního přídavku, pro každý sledovaný analyt. Sledované látky byly identifikovány srovnáním hmotnostních spekter se spektry standardů, pro kvantifikaci bylo využito údajů odečtených z kalibrační křivky.

Tabulka 8 *Analyty sledované v povrchové a mořské vodě odebrané na Taiwanu*

Analyt	Prekurzorový ion (m/z)	Produkovaný ion (m/z)
Diklofenak	294,0	250,0
		214,0
Ibuprofen	205,0	161,0
		158,9
Ketoprofen	252,9	209,2
Kyselina salicylová	136,7	93,2
		65,1
Naproxen	228,9	184,9
		169,9

3.4.8. LC/MS podmínky pro stanovení analytů v povrchové a mořské vodě z odběrových lokalit na Taiwanu

3.4.8.1. Chromatografické podmínky

- ❖ Mobilní fáze: 0,1% HCOOH v deionizované vodě + 0,1% HCOOH v acetonitrilu
- ❖ Nástřik: 20 μ l
- ❖ Průtok: 0,3 $\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$
- ❖ Teplota kolony: 25 $^{\circ}\text{C}$
- ❖ Délka analýzy: 11 min
- ❖ Gradient: viz. Tabulka 9

Tabulka 9 *Průběh gradientu mobilní fáze*

Čas (min)	0,1% HCOOH v DI vodě	0,1% HCOOH v acetonitrilu
0	50	50
0,1	50	50
2	5	95
6	5	95
6,2	50	50
11	50	50

3.4.8.2. Nastavení hmotnostního spektrometru

- ❖ Průtok sušícího plynu: 60 $\text{l} \cdot \text{hod}^{-1}$
- ❖ Teplota sušícího plynu: 550 $^{\circ}\text{C}$
- ❖ Napětí na kapiláře: 5000 V
- ❖ Skenovací mód: MRM
- ❖ Ionizační mód: negativní

Tabulka 10 Nastavení MS pro jednotlivé analyty

Analyt	Prekurzorový ion (m/z)	Produkovaný ion (m/z)	MS-Parametry	
			Cone voltage (V)	Collision (eV)
Diklofenak	294,0	250,0	10	15
		214,0	10	25
Ibuprofen	205,0	161,0	10	10
		158,9		13
Ketoprofen	252,9	209,2	10	10
Kyselina salicylová	136,7	93,2	10	20
		65,1	10	40
Naproxen	228,9	184,9	10	10
		169,9	10	17

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Stanovení chromatografických podmínek na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series s detektorem diodového pole; pro experimenty prováděné v České Republice

Pro správnou identifikaci a kvantifikaci sledovaných analytů je důležité správné nastavení přístroje a vhodné zvolení mobilní fáze. Optimální nastavení bylo zjišťováno pomocí roztoků standardů. Tyto roztoky byly připraveny rozpuštěním standardů daných analytů v methanolu. Koncentrace těchto pracovních roztoků byla $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Injektováno bylo $5 \mu\text{l}$ roztoku standardu. Při optimalizaci byla použita kolona Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, velikost $4,6 \times 150 \text{ mm}$, velikost částic $5 \mu\text{m}$, Agilent.

Sledované nesteroidní protizánětlivé látky byly pořizovány postupně, a proto i hledání vhodných podmínek bylo prováděno v několika fázích.

4.1.1. Stanovení diklofenaku a ketoprofenu

Při optimalizaci byly použity vlnové délky 275 nm (diklofenak) a 254 nm (ketoprofen), neboť při těchto vlnových délkách dosahují sledované látky svého absorpčního maxima.

V prvním kroku byla hledána vhodná mobilní fáze.

Byly vyzkoušeny tyto možnosti:

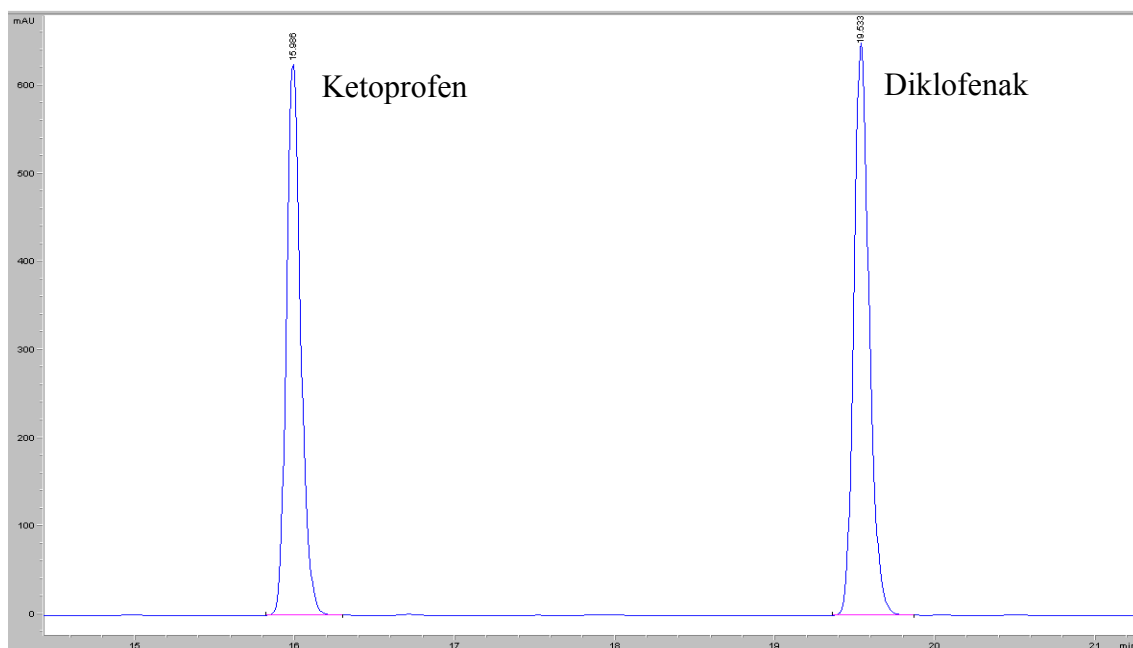
- ♦ 5mM HCOOH + ACN
- ♦ 0,1% HCOOH + ACN
- ♦ 0,05 M KH_2PO_4 + ACN
- ♦ 0,025 M KH_2PO_4 + ACN

Jako optimální byla vybrána kombinace 0,1% HCOOH + ACN; při použití této mobilní fáze byly píky sledovaných látek dostatečně ostré a souměrné. Nevhodnost použití mobilních fází s dihydrogenfosforečnanem draselným se projevila vysrážením KH_2PO_4 v acetonitrilu, a to při určitém poměru složení těchto mobilních fází, což znemožňovalo analýzu.

Vzhledem k parametrům kolony byl průtok mobilní fáze nastaven na 1 ml/min a teplota kolony pro analýzu byla stanovena na 20°C . Při analýze byla použita gradientová eluce. Jako nejvhodnější byl vybrán gradient, při kterém se měnilo složení mobilní fáze po dobu 40 min., kdy na začátku analýzy bylo složení MF 10 % ACN a 90 % 0,1% HCOOH a na konci odpovídalo 100 % ACN. Doba analýzy však byla poměrně dlouhá a proto z důvodu celkového zkrácení doby analýzy byl zvolen gradient, který uvádí Tabulka 11.

Tabulka 11 Průběh gradientu pro diklofenak a ketoprofen

Čas (min)	HCOOH (%)	ACN (%)
0	90	10
25	16,7	83,3



Obr. 33 Chromatogram diklofenaku a ketoprofenu při optimálních podmínkách

4.1.2. Stanovení kyseliny salicylové a naproxenu

Kyselina salicylová má absorpční maximum při 235 nm a naproxen při 230 nm; proto byla vybrána vlnová délka 230 nm pro hledání vhodných parametrů pro analýzu těchto léčiv.

Opět bylo ověřeno několik mobilních fází. Mobilní fáze složená z kyseliny sírové (pH 2,1) + ACN nebyla vhodná, protože zde docházelo k chvostování píku kyseliny salicylové. Další varianta mobilní fáze byla 0,01 M HCOOH + ACN; problémem u této mobilní fáze byla sestupná tendence základní linie chromatogramu. Třetí ověřovanou mobilní fází byla 0,1% H₃PO₄ + ACN. Tato mobilní fáze poskytla píky, které měly optimální tvar. Důležité bylo také nastavení gradientu mobilní fáze, což znázorňuje Tabulka 12.

Průběh analýzy je ovlivněn také teplotou a průtokem mobilní fáze.

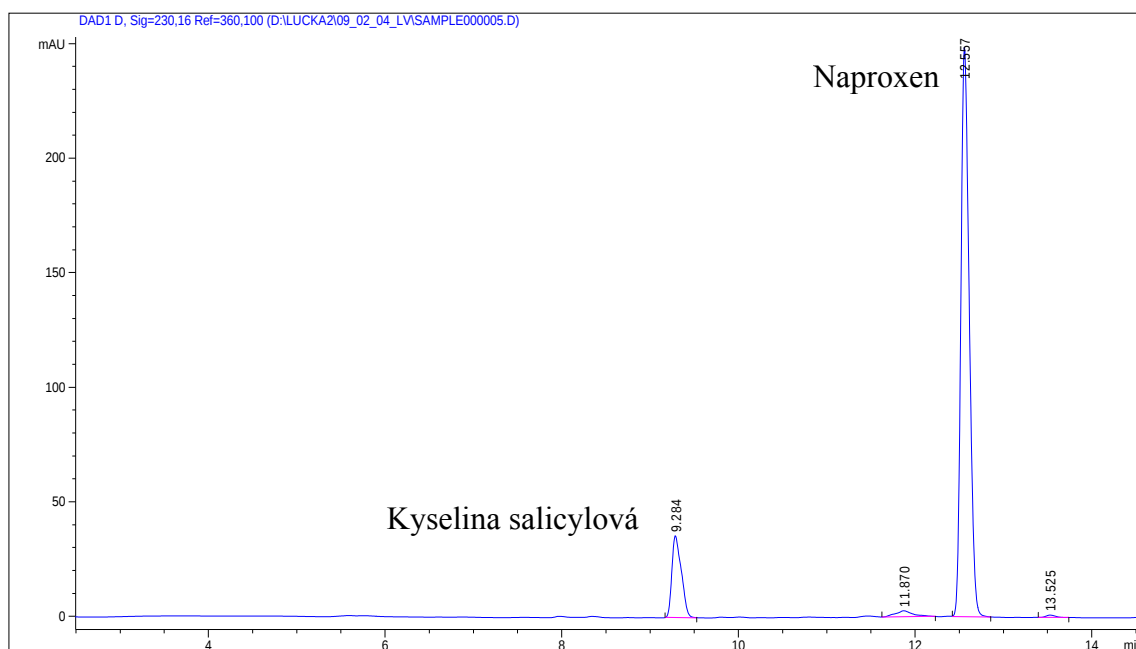
V tomto případě byly použity tyto varianty teploty: 15 °C, 20 °C a 25 °C. I v tomto případě byla za optimální zvolena teplota 20 °C, protože při 15 °C se prodlužuje doba analýzy, aniž by byl ovlivněn tvar píků, ve srovnání s teplotou 20 °C; při 25 °C nemají píky optimální tvar.

Průtok byl nastaven na 1 ml · min⁻¹, neboť při vyšším průtoku docházelo ke chvostování píků a při nižším průtoku se výrazně prodlužuje doba analýzy.

Při nastavení těchto parametrů analýzy byly získány píky optimálního tvaru, retenční časy byly 9,284 min pro kyselinu salicylovou a 12,557 min pro naproxen.

Tabulka 12 Průběh gradientu pro kyselinu salicylovou a naproxen

Čas (min)	H ₃ PO ₄ (%)	ACN (%)
0	90	10
20	0	100



Obr. 34 Chromatogram kyseliny salicylové a naproxenu při optimálních podmínkách

4.1.3. Stanovení diklofenaku, ibuprofenu ketoprofenu, kyseliny mefenamové, kyseliny salicylové, naproxenu a paracetamolu

Při hledání optimálních podmínek pro všechna výše specifikovaná analgetika byla nejprve proměřena absorpční spektra jednotlivých analytů, aby mohly být vybrány vhodné vlnové délky pro další optimalizaci podmínek. Byly zvoleny tyto vlnové délky 230, 254 a 260 nm, a to na základě absorpčních maxim, které uvádí Tabulka 13.

Jako mobilní fáze byl zvolen methanol a 10mM amonium acetát, a to z důvodu následné detekce pomocí hmotnostního spektrometru.

Tabulka 13 Absorpční maxima sledovaných analytů

Analyt	A max (nm)
Diklofenak	230
Ibuprofen	220
Ketoprofen	260
Kofein	275
Kyselina mefenamová	210, 290
Kyselina salicylová	230, 295
Naproxen	230
Paracetamol	254

Nejprve byly jednotlivé analyty stanoveny při teplotě 25 °C. Bylo zjištěno, že ketoprofen a naproxen mají téměř stejný t_R a v důsledku toho se jejich píky překrývají, což je pro detekci pomocí DAD nežádoucí. Proto byl upravován gradient, teplota analýzy a průtok mobilní fáze. Bylo zjištěno, že při teplotě 40 °C a úpravě gradientu dojde k dostatečné separaci ketoprofenu a naproxenu. Vystane však problém s kyselinou salicylovou a paracetamolem, jejichž píky se při této teplotě překrývají. Vzhledem k dostatečné vzdálenosti mezi problematickými

retenčními časy byl zvolen teplotní gradient, v rámci kterého pro časový interval, ve kterém jsou eluovány paracetamol a kyselina salicylová, je vhodná teplota 25 °C a v časovém intervalu eluce ketoprofenu a naproxenu byla použita teplota 40 °C (Tabulka 14).

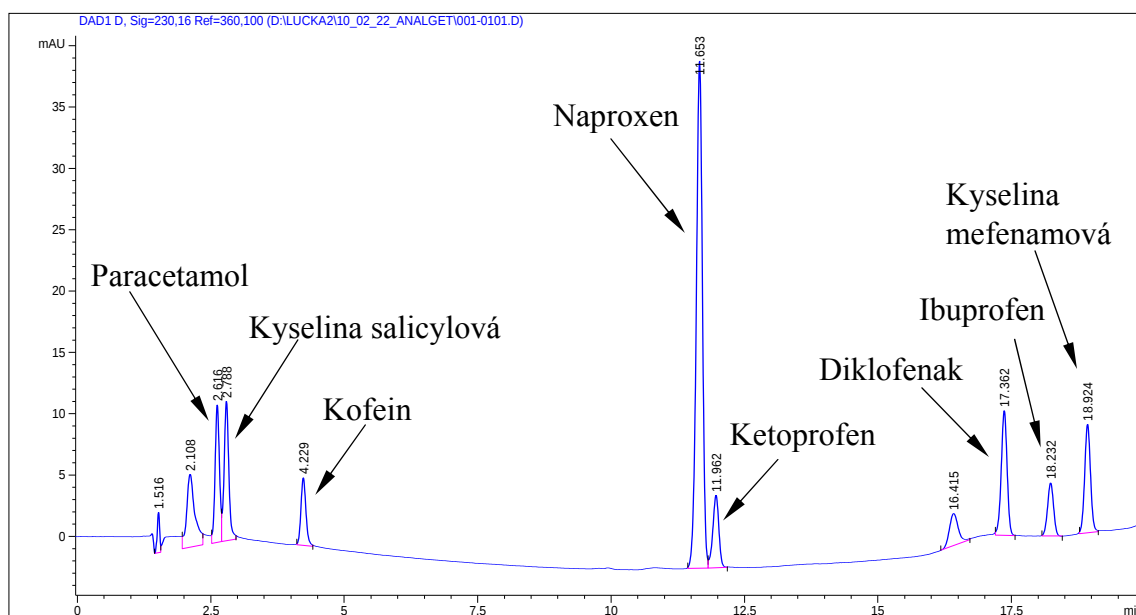
Tabulka 14 Teplotní gradient

Čas (min)	Teplota (°C)
0	25
3,5	40
8	40

Pokud pracujeme s kolonou ZORBAX Eclipse XDB-C18, velikost 4,6 × 150 mm, velikost částic 5 µm, Agilent, byl jako nejvhodnější zvolen průtok 1 ml · min⁻¹.

Tabulka 15 Průběh gradientu mobilní fáze pro kolonu Zorbax Eclipse XDB-C18 s velikostí částic 5 µm

Čas (min)	CH ₃ COONH ₄ (%)	MeOH (%)
0	30	70
9,23	50	50
10	50	50
20	70	30

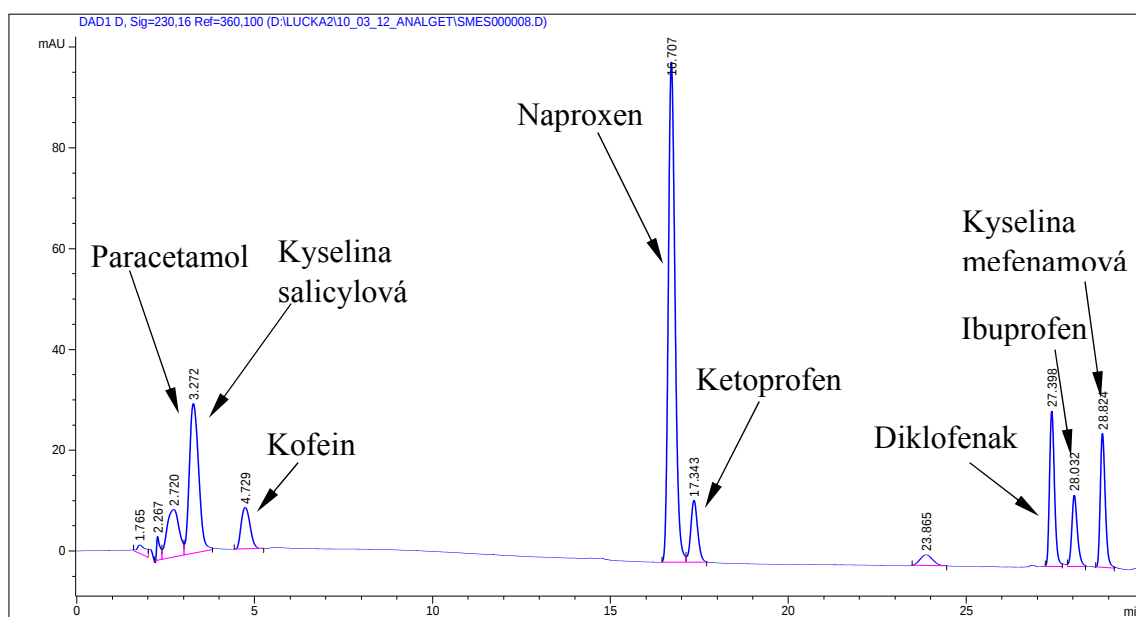


Obr. 35 Chromatogram sledovaných nesteroidních protizánětlivých léčiv a kofeinu na koloně s částicemi 5 µm

DAD detekce byla využita zejména pro optimalizaci metody a následné stanovení výtěžností při extrakci pevnou fází. Zde byla optimální kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, velikost 4,6 × 150 mm, velikost částic 5 µm, Agilent, pro kterou jsou optimální průtoky kolem 1 ml · min⁻¹. Při stanovení nesteroidních protizánětlivých léčiv v reálných vzorcích byl však jako detektor použit výhradně hmotnostní spektrometr. I pro tento druh detekce je možné pracovat

s průtokem mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, a to vzhledem k tomu, že ionizace byla prováděna pomocí elektrospreje; výrazně by se však zvýšily provozní náklady. Z tohoto důvodu byly chromatografické podmínky optimalizovány také pro kolonu Zorbax Eclipse XDB-C18 s velikostí částic $3,5 \mu\text{m}$ a rozměry $2,1 \times 150 \text{ mm}$, Agilent, která díky jemnějším částicím pracuje s menšími průtoky. Při separaci pomocí kolony s částicemi $3,5 \mu\text{m}$ má i nepatrná změna průtoku velký vliv na celý průběh analýzy. Optimální průtok byl v tomto případě $0,15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, při kterém celá analýza trvala 32 minut.

Se změnou velikosti částic bylo nutné upravit také gradient mobilní fáze i teplotní gradient. Byly vyzkoušeny různé kombinace složení methanolu a 10mM amonium acetátu. I přesto došlo v případě použití této kolony k překrytí píků paracetamolu a kyseliny salicylové. Retenční časy jednotlivých analytů uvádí Tabulka 16. Vzhledem k tomu, že tato kolona byla používána ve spojení s hmotnostní detekcí, neměl tento fakt žádný vliv na konečné stanovení. Jako nejlepší byly vyhodnoceny gradienty uvedené v kapitole 3.4.4.1 (Tabulka 4).



Obr. 36 Chromatogram sledovaných nesteroidních protizánětlivých léčiv a kofeinu na koloně s částicemi $3,5 \mu\text{m}$

Tabulka 16 Sledované analyty a jejich retenční časy

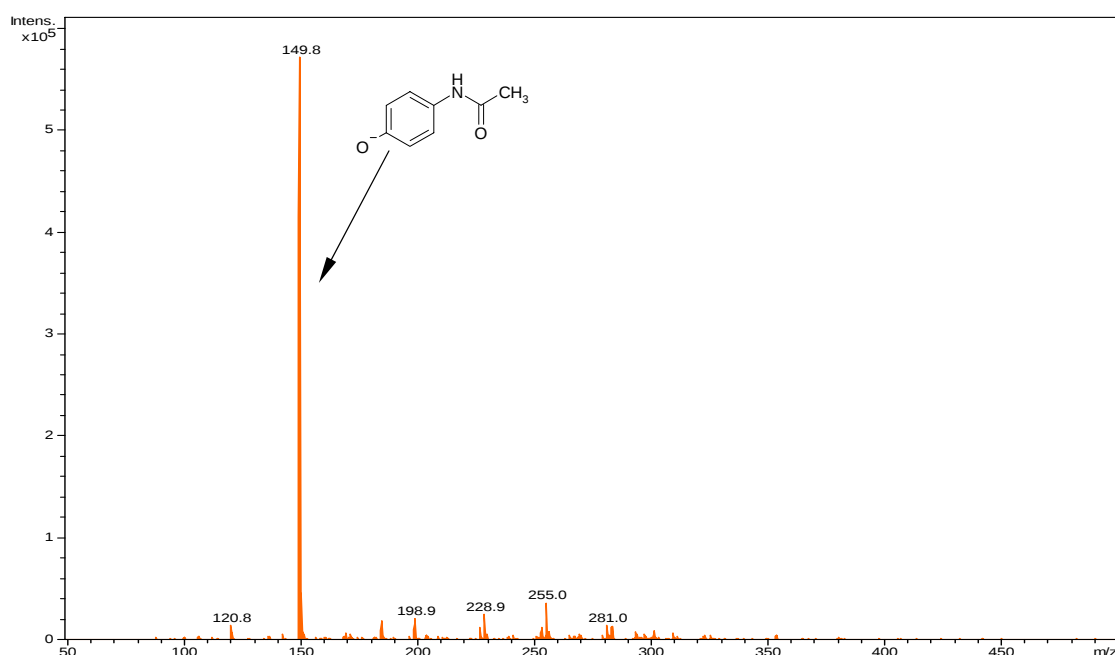
Analyt	t_R (min)
Diklofenak	27,4
Ibuprofen	28,0
Ketoprofen	17,3
Kofein	4,7
Kyselina mefenamová	28,8
Kyselina salicylová	3,3
Naproxen	16,7
Paracetamol	3,3

4.2. Využití hmotnostní detekce pomocí hmotnostního spektrometru Agilent 6320 Series, Ion Trap LC/MS (Česká Republika)

Pro hmotnostní detekci sledovaných analytů byl použit hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series, Ion Trap LC/MS, se sférickou iontovou pastí jako analyzátozem; iontovým zdrojem byl elektrosprej. Výhodou iontové pasti je to, že umožňuje MS^n . Prvním krokem, v rámci prováděných experimentů, bylo proměření všech hmotnostních spekter sledovaných analytů a deuterovaných vnitřních standardů metodou přímé infuze. Koncentrace zkušebních roztoků standardů byla $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; standardy byly připraveny ve směsi methanol:voda (80:20) z důvodu lepší ionizace. Všechny sledované analyty byly proměřeny jak v pozitivním tak také v negativním ionizačním módu. Na základě získaných výsledků byl pro každý analyt zvolen vhodný ionizační mód.

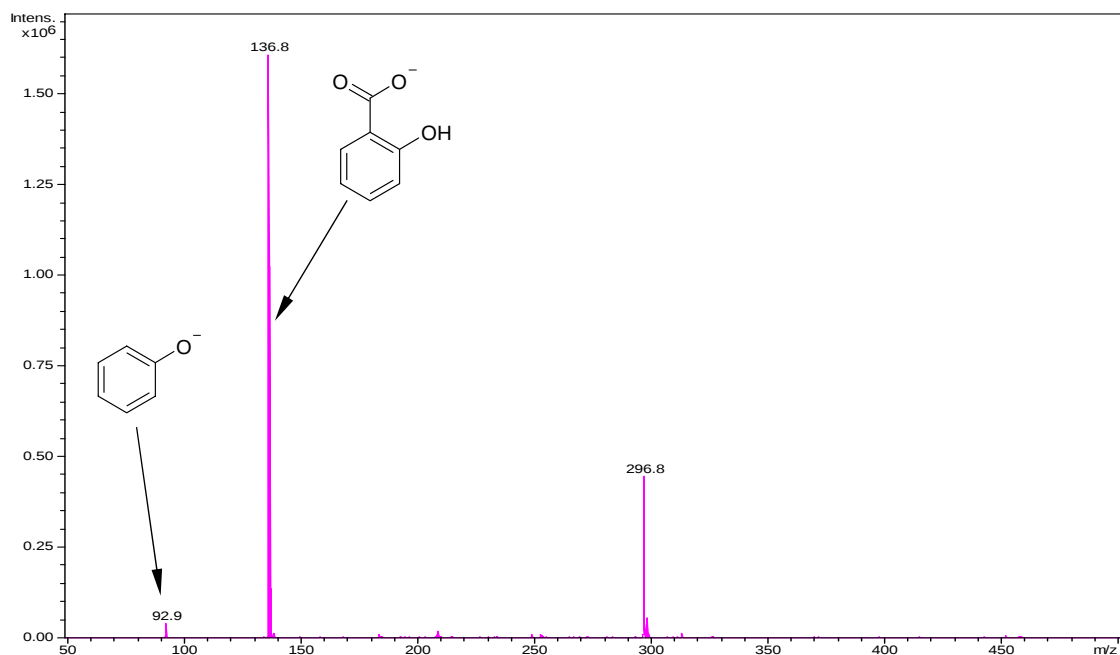
4.2.1. Sledované analyty a jejich hmotnostní spektra (řazeno dle t_R)

Na obrázku Obr. 37 je zobrazeno hmotnostní spektrum paracetamolu (M_r 151,2). Vzhledem k použití negativního ionizačního módu byl nalezen molekulový iont m/z 149,8. Charakter spektra nám umožňuje u tohoto analytu použít tandemovou hmotnostní spektrometrii; ve stejném t_R byla eluována také kyselina salicylová, jejíž vlastnosti neumožňují MS^2 , a proto nebylo k tomuto kroku přistoupeno.



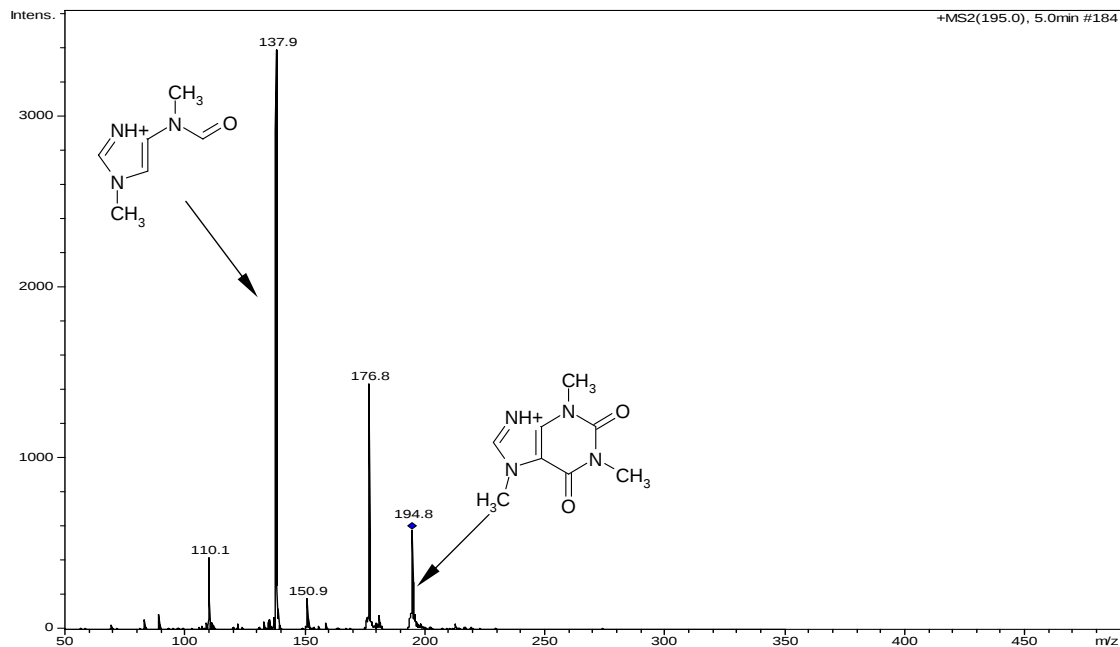
Obr. 37 Hmotnostní spektrum paracetamolu

Hmotnostní spektrum kyseliny salicylové (měřeno v negativním ionizačním módu) představuje její molekulový iont m/z 136,8 a také fragment m/z 92,9. Výskyt fragmentu už při použití jednoduchého MS svědčí o nestabilitě tohoto analytu. Tato vlastnost neumožnila MS^2 , protože by došlo k úplnému rozložení sledovaného léčiva.



Obr. 38 Hmotnostní spektrum kyseliny salicylové

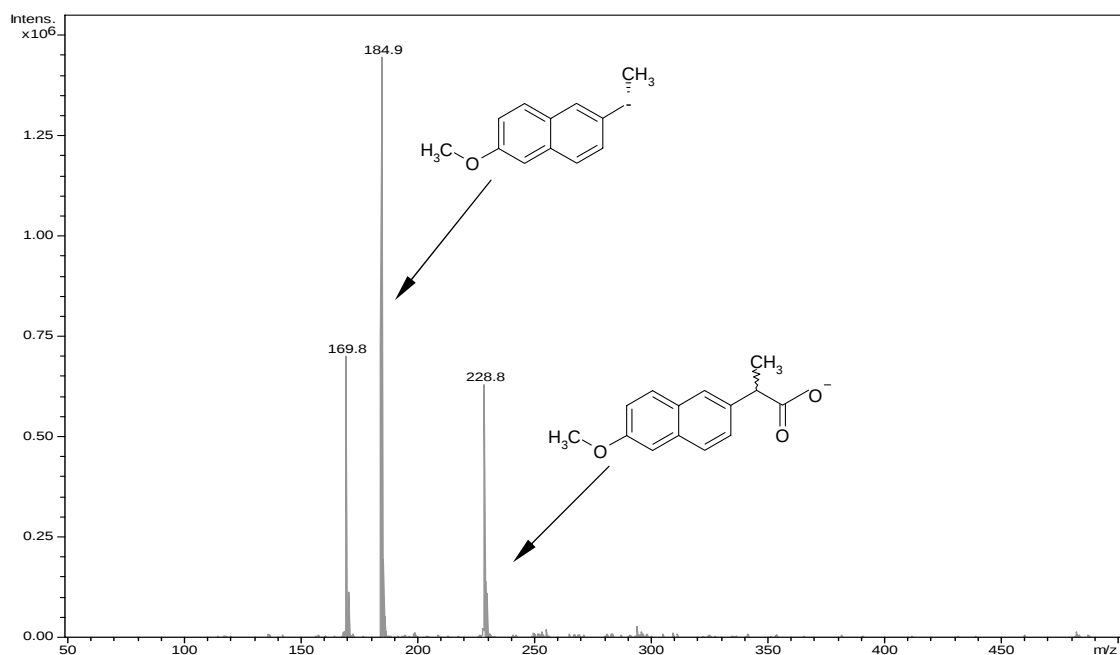
Dalším sledovaným analytem byl kofein. Pro kofein byl použit pozitivní ionizační mód a vzhledem k jeho stabilitě bylo využito tandemové hmotnostní spektrometrie (MS²). Výsledkem bylo hmotnostní spektrum (Obr. 39), na kterém je zřetelně vidět jak původní molekulový iont (m/z 194,8), tak iont dceřiný (m/z 137,9).



Obr. 39 Hmotnostní spektrum kofeinu

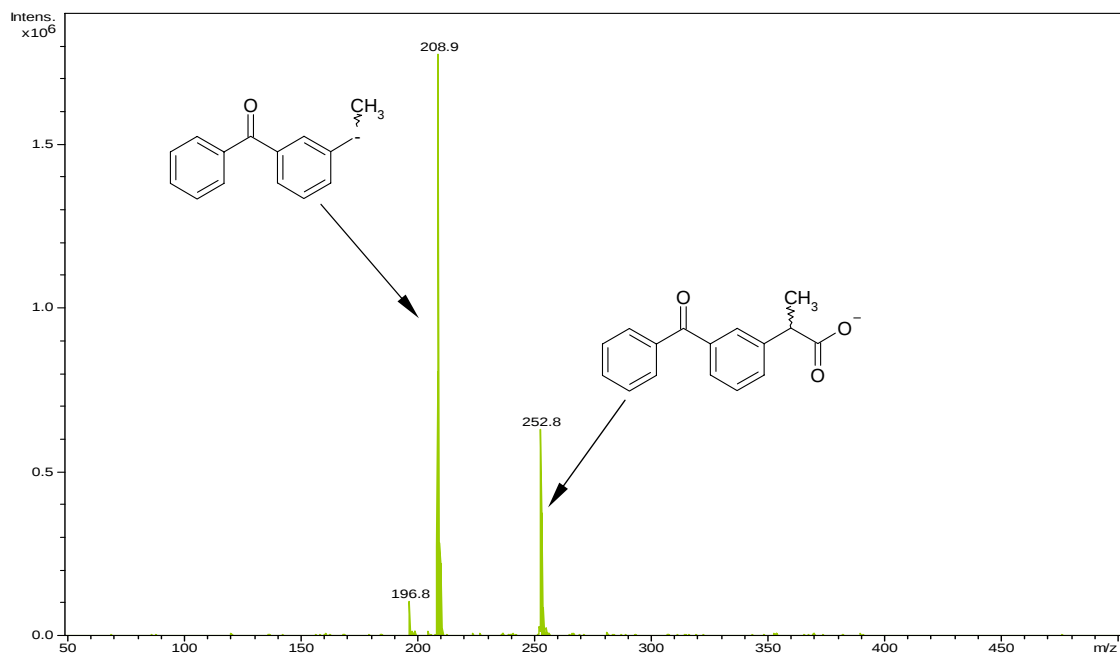
Pro naproxen byla zvolena negativní ionizace a v získaném hmotnostním spektru (Obr. 40) se už při měření pomocí jednoduchého MS vyskytl fragment (m/z 184,9) tohoto analytu (m/z 228,8). Tento fragment měl mnohem větší intenzitu než původní molekulový iont, a proto

byl následně hledanou hmotou při všech dalších analýzách zaměřených na identifikaci naproxenu ve sledovaných maticích.



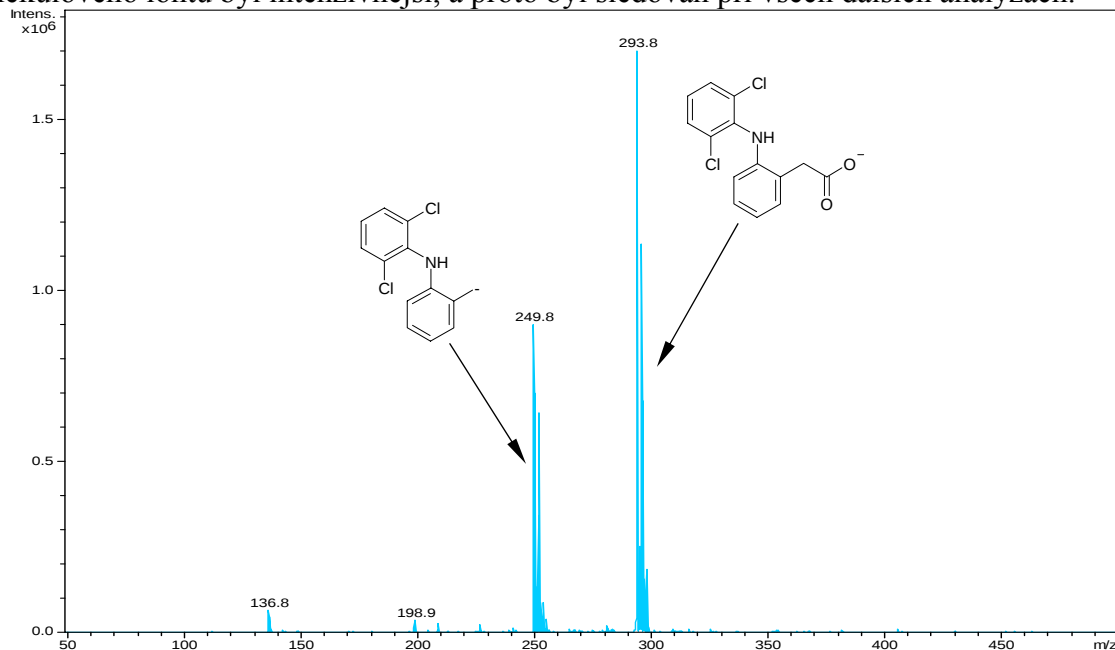
Obr. 40 Hmotnostní spektrum naproxenu

Pro identifikaci ketoprofenu v negativním ionizačním módu byla využita jednoduchá MS; v tomto případě bylo získáno spektrum s molekulovým (m/z 252,8) i dceřiným iontem (208,9). Tento dceřiný iont měl mnohem silnější signál, a proto byl zvolen pro identifikaci ketoprofenu i při všech ostatních analýzách.



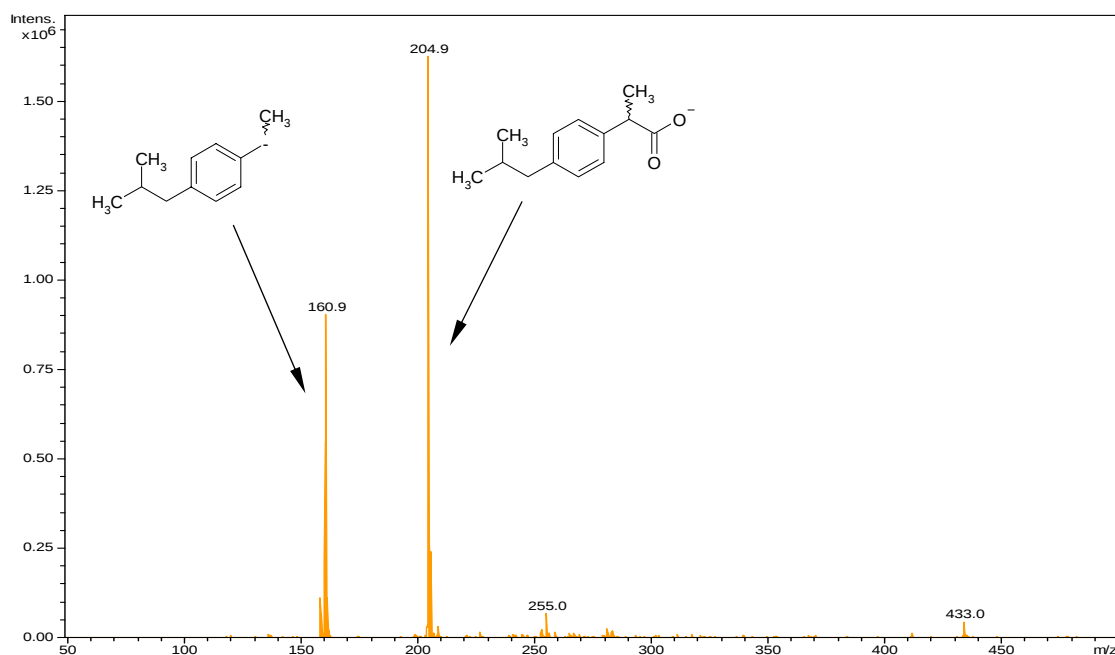
Obr. 41 Hmotnostní spektrum ketoprofenu

Hmotnostní spektrum diklofenaku (Obr. 42) naměřené v negativním ionizačním módu má dva silné signály patřící molekulovému iontu (m/z 293,8) a fragmentu (m/z 249,8). Signál molekulového iontu byl intenzivnější, a proto byl sledován při všech dalších analýzách.



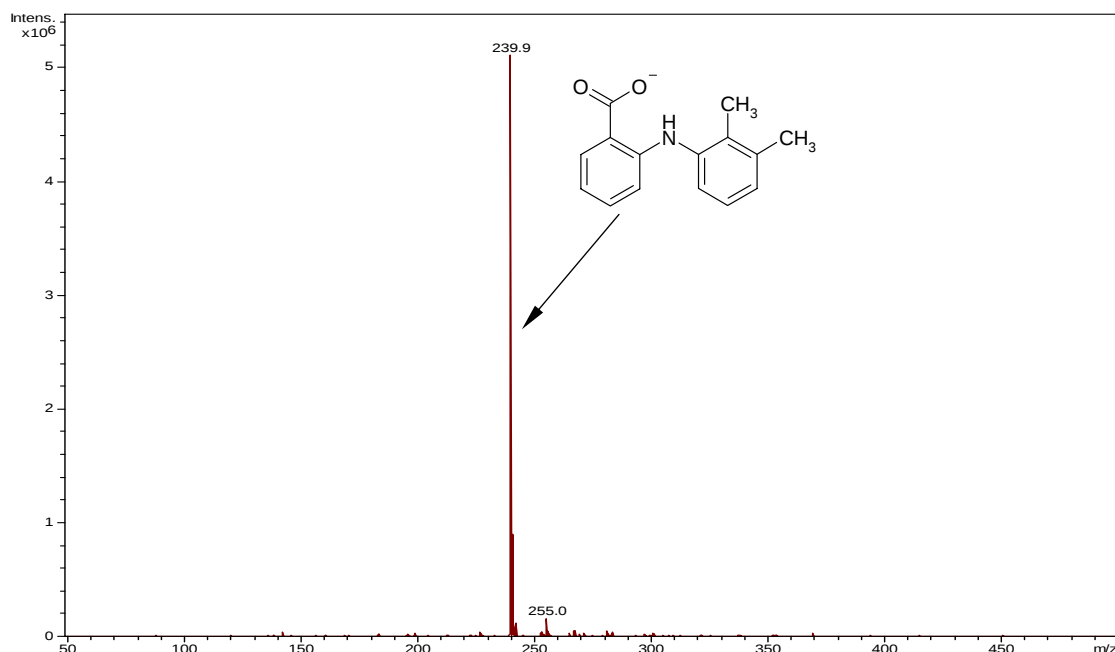
Obr. 42 Hmotnostní spektrum diklofenaku

V hmotnostním spektru ibuprofenu (negativní ionizace) jsou opět prezentovány jak molekulový iont (m/z 204,9), tak také jeho fragment (m/z 160,9). Přestože je intenzivnější signál molekulového iontu než jeho fragmentu, muselo být v dalším stanovení přistoupeno k detekci fragmentu. Tento krok byl zvolen z důvodu složitosti matrice. Vzhledem k předpokládanému zvýšenému výskytu tohoto analgetika v reálných vzorcích by však neměl být problém s jeho detekcí.



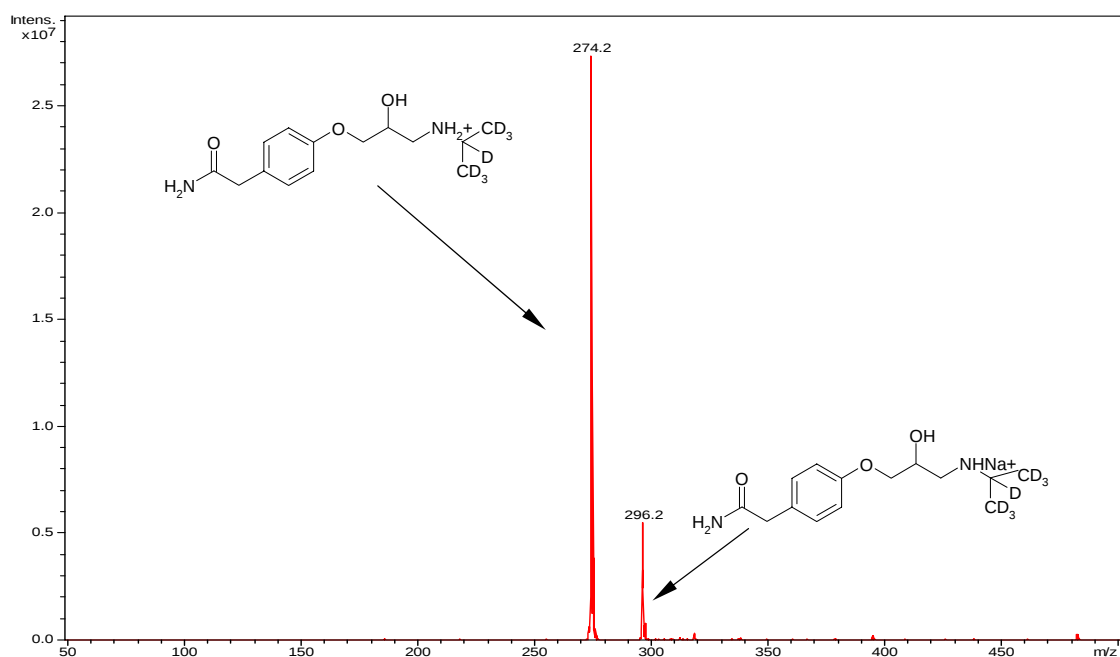
Obr. 43 Hmotnostní spektrum ibuprofenu

Kyselina mefenamová byla rovněž měřena v negativním ionizačním módu, a to jednoduchou MS; výsledkem bylo hmotnostní spektrum, které obsahovalo pouze molekulový iont kyseliny mefenamové (m/z 239,9). Byla aplikována tandemová hmotnostní spektrometrie, ale už při pouhé izolaci dané hmoty výrazně poklesla intenzita signálu a rovněž intenzita fragmentu byla výrazně nižší. Proto byla v dalších analýzách používána výhradně jednoduchá MS.



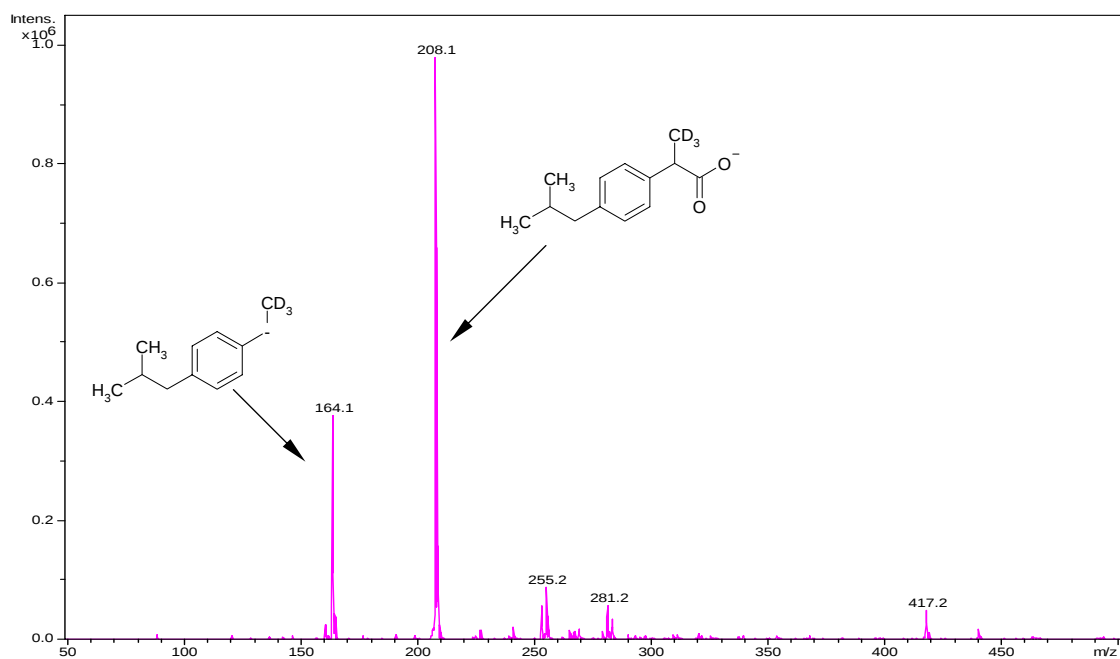
Obr. 44 Hmotnostní spektrum kyseliny mefenamové

Atenolol-D7 je deuterovaný vnitřní standard používaný pro ionizaci v pozitivním módu. V jeho hmotnostním spektru (Obr. 45) jsou zřetelně vidět dva signály; jeden patří molekulovému iontu $[M+H]^+$ a druhý patří aduktu $[M+Na]^+$. Molekulový iont m/z 274,2 měl vysokou intenzitu a proto bylo přistoupeno k MS^2 detekci.



Obr. 45 Hmotnostní spektrum atenololu-D7

Pro ionizaci prováděnou v negativním módu byl jako vnitřní standard zvolen deuterovaný ibuprofen-D3. Po jednoduché MS ionizaci bylo získáno spektrum obsahující jak molekulový iont (m/z 208,1), tak i jeho fragment (m/z 164,1). Při následujících analýzách byly pro zajištění správnosti sledovány obě hmoty.



Obr. 46 Hmotnostní spektrum ibuprofenu-D3

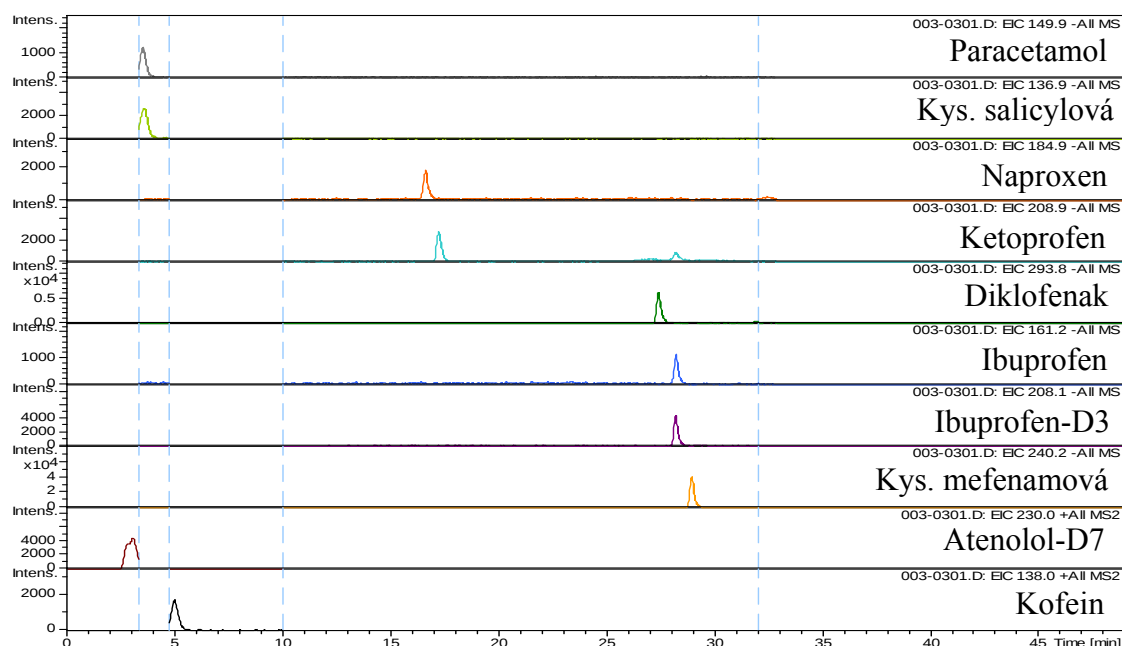
4.3. Spojení HPLC/MS pro stanovení léčiv

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí nám umožnilo provést analýzu směsi vybraných léčiv a identifikaci jejich jednotlivých složek.

Chromatografické podmínky byly optimalizovány pomocí DAD detektoru, a to pro dvě kolony ZORBAX Eclipse XDB-C18 lišící se rozměry a velikostmi částic.

V dalším kroku byla provedena optimalizace hmotnostního spektrometru metodou přímé infuze standardních roztoků. Pomocí tohoto postupu byly identifikovány hmoty pro sledování daných analytů. Sledovaná analgetika mají kyselý charakter, a proto byl zvolen negativní ionizační mód. Pro tyto analyty však nebylo možné použít tandemovou HPLC-MS/MS, neboť ve většině případů docházelo k jejich fragmentaci již při použití MS, popřípadě po izolaci jejich molekulových iontů došlo k velkému poklesu intenzit signálů. Stejný problém se vyskytl také u fragmentů. Z tohoto důvodu byla pro sledovaná analgetika a vnitřní standard ibuprofen-D3 použita pouze metoda HPLC-MS. Kofein, který patří mezi látky stimulující centrální nervovou soustavu a je často přidáván k analgetikům z důvodu rychlejšího průběhu jejich účinku, byl analyzován v pozitivním ionizačním módu. Vzhledem k jeho stabilitě a dobrému signálu byla v tomto případě použita tandemová hmotnostní spektrometrie HPLC-MS/MS. Pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie byl detekován také zvolený vnitřní standard pro pozitivní ionizaci, atenolol-D7.

Vzhledem k tomu, že byla použita jak pozitivní, tak negativní ionizace, byly pro detekci pomocí MS nastaveny časové segmenty podle retenčních časů sledovaných analytů. Podle toho, jaký analyt se vyskytoval v daném časovém segmentu, byla ionizace nastavena na pozitivní nebo negativní mód. Byl získán chromatogram, který je prezentován na níže uvedeném obrázku (Obr. 47).



Obr. 47 Chromatogram s extrahovanými hmotami sledovaných analytů

4.4. Optimalizace extrakce pevnou fází pro sledované analyty (experiment prováděný v České Republice)

Pro dosažení efektivní izolace daných sloučenin musela být optimalizována také extrakce. Stejně jako u optimalizace chromatografických podmínek byla optimalizace extrakce SPE prováděna postupně podle přístupu ke sledovaným léčivům. Izolace analytů byla ověřena na modelových vzorcích připravených rozpuštěním standardů v miliQ vodě.

4.4.1. Stanovení diklofenaku a ketoprofenu

Základním předpokladem úspěšné extrakce je vhodně zvolený sorbent. Proto byly ověřovány různé typy kolonek. V tomto případě se jednalo o kolonky ENVI-18, Oasis HLB a LC-SAX. Kolonka ENVI-18 je naplněna sorbentem obsahujícím polymerně vázanou okta-decylovou fází¹⁰¹, Oasis HLB obsahuje kopolymer divinylbenzen/N-vinylpyrrolidin¹⁰². Třetí kolonka byla iontově-výměnná kolonka LC-SAX, která obsahuje polymerně vázaný quarterní amin.¹⁰³

Pro vybrané sorbenty byly optimalizovány pracovní postupy. Na iontově-výměnné kolonce nebyla sledovaná analgetika vůbec sorbována. Kolonky ENVI-18 a Oasis HLB měly srovnatelné výsledky, přičemž kolonka Oasis HLB měla vyšší výtěžnost, a proto byla zvolena jako vhodná pro extrakci vybraných analytů. Výtěžnosti byly vyhodnoceny pomocí externí kalibrace, tj. prostřednictvím vícebodové kalibrační křivky sestavené pro každý hodnocený analyt. Při níže uvedeném postupu se výtěžnosti diklofenaku pohybovaly v intervalu 70,97 % – 74,89 % a ketoprofenu v rozmezí 73,28 % – 78,97 %.

Postup pro extrakci byl následující:

- ◆ Aktivace 6 ml methanolu
- ◆ Promytí 5 ml miliQ vody
- ◆ Nanesení vzorku (pH 7)
- ◆ Promytí 1,5 ml miliQ vody
- ◆ Sušení proudem vzduchu
- ◆ Eluce 2×4 ml methanolu
- ◆ Sušení N₂ do sucha
- ◆ Opětovné rozpuštění odparku v 1ml methanolu

4.4.2. Stanovení kyseliny salicylové a naproxenu

Na základě výsledků získaných v rámci optimalizace vhodného postupu pro SPE, nebyla u diklofenaku a ketoprofenu ověřována iontově-výměnná kolonka LC-SAX, ale pouze kolonky ENVI-18 a Oasis HLB. I v tomto případě bylo aplikováno několik pracovních postupů, z nichž byl vybrán ten, při němž byly výtěžnosti nejvyšší. Pro extrakci byla, a to na základě provedených experimentů, zvolena kolonka Oasis HLB; postup byl víceméně stejný jako při stanovení diklofenaku a ketoprofenu, pouze při aktivaci byla kolonka promyta místo miliQ vody 0,01M HCl a pH vzorku bylo upraveno na hodnotu 2. Úprava pH byla provedena za účelem zabránění disociace kyseliny salicylové. I v tomto případě byla použita pro vyhodnocení externí kalibrace, tj. pro každý sledovaný analyt byla sestavena vícebodová kalibrační křivka. Pro kyselinu salicylovou se výtěžnosti pohybovaly v rozmezí 68,50 % – 96,69 % a pro naproxen v intervalu 78,70 % – 83,94 %.

4.4.3. Stanovení diklofenaku, ibuprofenu, ketoprofenu, kyseliny mefenamové, kyseliny salicylové, naproxenu a paracetamolu

Při optimalizaci extrakce pro všechna sledovaná analgetika se vycházelo z již dříve zjištěných a ověřených parametrů. Na základě toho byla rovnou použita kolonka Oasis HLB, která měla nejlepší výsledky v rámci provedené pilotní studie. Vzhledem k většímu počtu analytů byla výtěžnost posuzována při různých hodnotách pH vzorků, a to při pH 2, 4 a 7.

Sledované analyty mají kyselé charakter, a proto byly zvoleny nižší hodnoty pH, které by měly zabránit případné disociaci a současně by měly podpořit jejich zachycování na filtru.

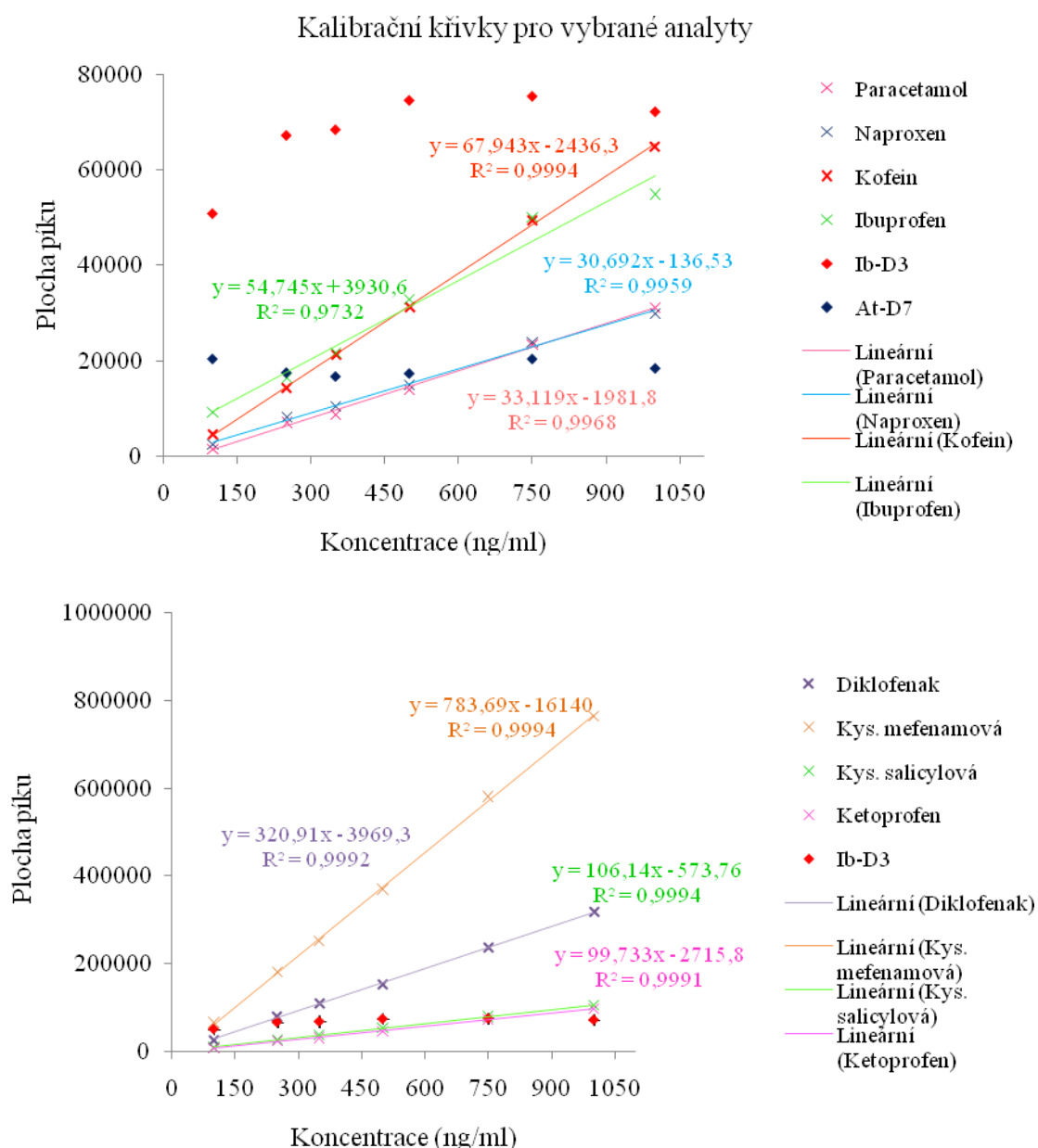
Tabulka 17 Výtěžnosti sledovaných analytů při pH 7, 4 a 2

		pH 7		pH 4		pH 2	
	Počáteční koncentrace (µg/ml)	Výsledná koncentrace (µg/ml)	Výtěžnost (%)	Výsledná koncentrace (µg/ml)	Výtěžnost (%)	Výsledná koncentrace (µg/ml)	Výtěžnost (%)
Paracetamol	5	3,965	79,30	3,265	65,31	3,217	64,33
	5	3,831	76,61	3,165	63,31	3,679	73,58
	5	4,215	84,31	3,427	68,54	3,215	64,31
	5	4,310	86,20	3,820	76,40	3,013	60,25
	5	3,763	75,25	3,125	62,49	3,842	76,85
	Průměr	4,017	80,33	3,360	67,21	3,393	67,86
Kyselina salicylová	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,345	86,89
	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,444	88,87
	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,225	84,49
	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	5,077	101,5
	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,356	87,12
	Průměr	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	4,489	89,78
Kofein	5	3,265	65,31	3,521	70,43	4,521	90,43
	5	3,654	73,08	3,698	73,96	4,989	99,77
	5	3,035	60,71	3,046	60,91	4,689	93,79
	5	3,325	66,51	3,954	79,08	4,913	98,26
	5	3,127	62,53	3,995	79,90	5,124	102,5
	Průměr	3,281	65,63	3,643	72,86	4,847	96,95
Naproxen	5	3,924	78,47	3,965	79,31	3,698	73,97
	5	3,216	64,31	4,313	86,25	3,915	78,30
	5	3,659	73,18	4,213	84,27	4,126	82,51
	5	3,255	65,09	3,645	72,90	4,065	81,30
	5	3,900	77,99	3,951	79,02	3,895	77,89
	Průměr	3,590	71,81	4,018	80,35	3,940	78,80
Ketoprofen	5	3,664	73,28	4,132	82,63	4,138	82,76
	5	3,846	76,92	3,994	79,87	4,339	86,77
	5	3,745	74,89	4,283	85,66	4,599	91,98
	5	3,454	69,07	4,072	81,44	4,103	82,06
	5	3,563	71,27	3,989	79,77	4,214	84,28
	Průměr	3,654	73,09	4,094	81,87	4,278	85,57
Diklofenak	5	3,588	71,76	4,071	81,42	4,527	90,54

	5	3,650	72,99	4,290	85,79	4,702	94,03
	5	3,549	70,97	4,511	90,21	4,508	90,16
	5	3,745	74,89	4,188	83,76	4,289	85,78
	5	3,564	71,28	4,310	86,21	4,612	92,25
	Průměr	3,625	72,50	4,274	85,48	4,528	90,55
Ibuprofen	5	3,268	65,35	4,531	90,61	3,075	61,49
	5	3,503	70,05	4,266	85,31	4,048	80,95
	5	3,582	71,64	4,145	82,89	3,347	66,94
	5	3,742	74,83	4,379	87,58	3,730	74,59
	5	3,554	71,08	4,251	85,03	3,614	72,28
	Průměr	3,529	70,59	4,314	86,28	3,563	71,25
Kyselina mefenamová	5	3,215	64,30	3,021	60,43	3,325	66,50
	5	3,054	61,09	2,658	53,17	3,214	64,28
	5	3,124	62,47	2,773	55,46	2,981	59,62
	5	2,265	45,30	3,033	60,67	3,312	66,25
	5	2,723	54,46	2,521	50,43	3,155	63,10
	Průměr	2,876	57,52	2,802	56,03	3,198	63,95

Jak je patrné z uvedených výsledků (Tabulka 17), nejvhodnějším pH pro extrakci hodnocených biologicky aktivních látek bylo pH 2. Vhodná volba optimálního pH nejvíce ovlivnila extrakci kyseliny salicylové, která se při vyšších hodnotách pH na kolonce nesorbovala.

Následně byly pro lepší posouzení výtěžnosti zvoleny dvě koncentrační úrovně, a to 250 a 1000 ng/ml. Pro vyhodnocení byla opět použita externí kalibrace, tj. vícebodová kalibrační křivka pro každý hodnocený analyt.



Obr. 48 Kalibrační křivky sledovaných analytů a vnitřních standardů

Tabulka 18 Výtěžnosti modelových vzorků sledovaných analytů při koncentraci $250 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$

	Počáteční koncentrace (ng/ml)	Výsledná koncentrace (ng/ml)	Výtěžnost (%)	N(R) _T (%)	N _{CT} (%)
Paracetamol	250,0	198,6	79,44	5,935	10,11
	250,0	186,1	74,44	7,379	11,02
	250,0	176,5	70,60	8,487	11,79
	250,0	182,9	73,16	7,748	11,27
	250,0	179,5	71,80	8,141	11,55
	250,0	192,3	76,92	6,663	10,56
	250,0	195,1	78,04	6,339	10,36
	250,0	187,4	74,96	7,228	10,92
Kys. salicylová	250,0	219,4	87,76	3,533	11,28
	250,0	218,8	87,52	3,603	11,30
	250,0	190,4	76,16	6,882	12,73
	250,0	230,8	92,32	2,217	10,94
	250,0	221,4	88,56	3,302	11,21
	250,0	220,5	88,20	3,406	11,24
	250,0	217,2	86,88	3,787	11,36
	250,0	220,3	88,12	3,429	11,25
Kofein	250,0	203,6	81,44	5,358	16,42
	250,0	213,6	85,44	4,203	16,08
	250,0	245,3	98,12	0,543	15,53
	250,0	223,1	89,24	3,106	15,83
	250,0	231,2	92,48	2,171	15,67
	250,0	245,1	98,04	0,566	15,53
	250,0	250,6	100,24	-0,069	15,52
	250,0	251,4	100,56	-0,162	15,52
Naproxen	250,0	243,2	97,28	0,785	2,224
	250,0	241,5	96,60	0,981	2,300
	250,0	235,9	94,36	1,628	2,642
	250,0	241,5	96,60	0,981	2,300
	250,0	238,9	95,56	1,282	2,444
	250,0	240,7	96,28	1,074	2,341
	250,0	243,8	97,52	0,716	2,200
	250,0	241,6	96,64	0,970	2,295
Ketoprofen	250,0	232,9	93,16	1,975	7,961
	250,0	226,4	90,56	2,725	8,180
	250,0	251,4	100,56	-0,162	7,714
	250,0	224,6	89,84	2,933	8,251
	250,0	245,6	98,24	0,508	7,729
	250,0	237,5	95,00	1,443	7,846
	250,0	241,3	96,52	1,005	7,778

	250,0	239,1	95,64	1,259	7,815
Diklofenak	250,0	245,6	98,24	0,508	15,91
	250,0	232	92,80	2,078	16,04
	250,0	198,7	79,48	5,924	16,97
	250,0	202,9	81,16	5,439	16,81
	250,0	241,4	96,56	0,993	15,94
	250,0	234,3	93,72	1,813	16,01
	250,0	223,5	89,40	3,060	16,20
	250,0	243,6	97,44	0,739	15,92
Ibuprofen	250,0	240,6	96,24	1,085	26,48
	250,0	168,7	67,48	9,388	28,08
	250,0	234,4	93,76	1,801	26,52
	250,0	187,5	75,00	7,217	27,43
	250,0	250,7	100,28	-0,081	26,46
	250,0	242,3	96,92	0,889	26,48
	250,0	239,1	95,64	1,259	26,49
	250,0	236,7	94,68	1,536	26,51
Kys. mefenamová	250,0	183,2	73,28	7,713	12,29
	250,0	176,2	70,48	8,522	12,82
	250,0	186,1	74,44	7,379	12,09
	250,0	170,5	68,20	9,180	13,26
	250,0	185,3	74,12	7,471	12,14
	250,0	169,9	67,96	9,249	13,31
	250,0	167,3	66,92	9,549	13,52
	250,0	165,4	66,16	9,769	13,68

Tabulka 19 Výtěžnosti modelových vzorků sledovaných analytů při koncentraci 1000 ng · ml⁻¹

	Počáteční koncentrace (ng/ml)	Výsledná koncentrace (ng/ml)	Výtěžnost (%)	N(R) _T (%)	N _{CT} (%)
Paracetamol	1000	789,6	78,96	6,074	10,20
	1000	836,1	83,61	4,731	9,459
	1000	721,3	72,13	8,045	11,48
	1000	851,2	85,12	4,295	9,248
	1000	891,1	89,11	3,144	8,773
	1000	754,2	75,42	7,096	10,84
	1000	651,4	65,14	10,06	12,97
	1000	726,8	72,68	7,887	11,37
Kys. salicylová	1000	921,4	92,14	2,269	4,844
	1000	879,1	87,91	3,490	5,522
	1000	889,1	88,91	3,201	5,345
	1000	854,7	85,47	4,194	5,992
	1000	900,0	90,00	2,887	5,162
	1000	897,6	89,76	2,956	5,201
	1000	896,9	89,69	2,976	5,213
	1000	891,3	89,13	3,137	5,307
Kofein	1000	984,2	98,42	0,456	13,90
	1000	974,9	97,49	0,725	13,91
	1000	982,1	98,21	0,517	13,90
	1000	864,5	86,45	3,912	14,43
	1000	976,5	97,65	0,678	13,91
	1000	899,8	89,98	2,893	14,19
	1000	1091	109,1	-2,621	14,14
	1000	998,7	99,87	0,038	13,89
Naproxen	1000	951,6	95,16	1,397	8,792
	1000	978,3	97,83	0,626	8,703
	1000	943,7	94,37	1,625	8,831
	1000	985,1	98,51	0,430	8,691
	1000	1081	108,1	-2,330	8,988
	1000	975,4	97,54	0,710	8,709
	1000	987,2	98,72	0,370	8,688
	1000	1016	101,6	-0,471	8,693
Ketoprofen	1000	996,7	99,67	0,095	8,529
	1000	923,2	92,32	2,217	8,812
	1000	1073	107,3	-2,107	8,785
	1000	973,0	97,30	0,779	8,564
	1000	980,8	98,08	0,554	8,546
	1000	965,3	96,53	1,002	8,587
	1000	976,1	97,61	0,690	8,556

	1000	983,4	98,34	0,479	8,542
Diklofenak	1000	803,1	80,31	5,684	25,67
	1000	805,4	80,54	5,618	25,65
	1000	1059	105,9	-1,703	25,09
	1000	874,4	87,44	3,626	25,29
	1000	694,6	69,46	8,816	26,54
	1000	807,6	80,76	5,554	25,64
	1000	803,4	80,34	5,675	25,66
	1000	806,1	80,61	5,59741	25,647
Ibuprofen	1000	1030	103,0	-0,866	14,54
	1000	843,5	84,35	4,518	15,20
	1000	1017	101,7	-0,491	14,52
	1000	914,0	91,40	2,483	14,73
	1000	875,8	87,58	3,585	14,95
	1000	886,2	88,62	3,285	14,88
	1000	890,5	89,05	3,161	14,86
	1000	936,2	93,62	1,84175	14,6312
Kys. mefenamová	1000	689,1	68,91	8,975	10,88
	1000	752,3	75,23	7,150	9,430
	1000	693,1	69,31	8,859	10,78
	1000	712,8	71,28	8,291	10,32
	1000	683,4	68,34	9,139	11,01
	1000	701,5	70,15	8,617	10,59
	1000	695,4	69,54	8,793	10,73
	1000	699,6	69,96	8,6718	10,6298

Pro všechny sledované analyty a pro obě koncentrační hladiny byly vypočteny směrodatné odchylky. Pro výpočet relativních směrodatných odchylek (RSD) bylo využito vzorce (1), kde σ_n je směrodatná odchylka a $\bar{x}$ značí aritmetický průměr.

$$\text{RSD} (\%) = \frac{2 \cdot \sigma_n \cdot 100}{\bar{x}} \quad (1)$$

Rovněž byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti. Pro jejich výpočet byl použit šum základní linie. Jako mez detekce (LOD) je určena taková koncentrace sledovaného analytu, jejíž odezva na detektoru bude mít poměr signálu k šumu větší než 3. Pro výpočet byl využit vztah (2).

$$\text{LOD} (\text{ng/ml}) = \frac{c(\text{ng/ml})}{S/N} \cdot 3 \quad (2)$$

Mez stanovitelnosti (LOQ) je taková koncentrace sledovaného analytu, jejíž odezva na detektoru bude mít poměr signálu k šumu větší než 10. Tento metrologický parametr byl vypočten ze vztahu (3).

$$\text{LOQ} (\text{ng/ml}) = \frac{c(\text{ng/ml})}{S/N} \cdot 10 \quad (3)$$

Pro zhodnocení vlivu chyb celého analytického postupu byla použita metoda hodnocení nejistoty – postup „shora – dolů“.

Byla vypočtena nejistota výtěžnosti ($N(R)_T$), podle vzorce (4), kde R_T je výtěžnost analytu.

$$N(R)_T (\%) = \frac{0,5 \cdot (100 - R_T)}{\sqrt{3}} \quad (4)$$

Kromě toho byla podle vzorce (5) vypočtena kombinovaná nejistota analytického postupu (N_{CT}), kde RSD je relativní směrodatná odchylka a $N(R)_T$ je nejistota výtěžnosti.

$$N_{CT} (\%) = \sqrt{\text{RSD}^2 + N(R)_T^2} \quad (5)$$

Tabulka 20 Základní statistické údaje a meze detekce a stanovitelnosti pro sledovaná léčiva

	Paracetamol	Kys. salicylová	Kofein	Naproxen	Ketoprofen	Diklofenak	Ibuprofen	Kys. mefenamová
Průměrná výtěžnost pro 250 ng · ml ⁻¹	74,92	86,94	93,20	96,36	94,94	91,10	90,00	70,20
Průměrná výtěžnost pro 1000 ng · ml ⁻¹	77,77	89,13	97,14	98,98	98,39	83,17	92,42	70,34
Relativní směrodatná odchylka pro 250 ng · ml ⁻¹	7,670	11,64	18,08	2,506	18,11	18,11	29,77	8,399
Relativní směrodatná odchylka pro 1000 ng · ml ⁻¹	79,36	19,07	67,48	42,96	41,96	104,1	67,07	21,62
R.S.D. (%) pro 250 ng · ml ⁻¹	8,190	10,71	15,52	2,080	15,91	15,91	26,46	9,572
R.S.D. (%) pro 1000 ng · ml ⁻¹	20,41	4,280	13,89	8,680	8,528	25,03	14,51	6,147
průměrná ztráta na vzorek (ng · ml ⁻¹) pro 250 ng · ml ⁻¹	62,70	32,65	17,01	9,112	12,65	22,25	25,00	74,51
průměrná ztráta na vzorek (ng · ml ⁻¹) pro 1000 ng · ml ⁻¹	222,3	108,7	28,56	10,21	16,06	168,3	75,85	296,6
rozptyl pro 250 ng · ml ⁻¹	51,48	118,6	286,0	5,494	73,30	287,1	775,4	61,72
rozptyl pro 1000 ng · ml ⁻¹	5511	318,2	3984	1615	1540	9479	3936	409,0
LOD (ng · ml ⁻¹)	37,97	42,40	12,49	93,33	25,96	4,540	30,64	1,355
LOQ (ng · ml ⁻¹)	126,6	141,3	41,65	883,3	86,53	30,64	102,1	4,515

4.5. Stanovení léčiv v reálných vzorcích odebraných v Česká Republice

V rámci této studie byla sledována léčiva ve dvou typech vody, a to ve vodě povrchové a ve vodě odpadní.

Reálné vzorky povrchové vody byly odebírány z řeky Křetínky, a to na dvou vzorkovacích místech (Svojanov a Předměstí). Vzorky byly odebírány v časovém intervalu od dubna do srpna 2010. Pro vyhodnocení koncentrací v reálných vzorcích byla využita vícebodová kalibrační křivka, která byla měřena spolu s každou sadou reálných vzorků. Ke všem měřeným reálným vzorkům byly také přidávány deuterované vnitřní standardy – atenolol-d7 a ibuprofen-d3. Voda z každého odběru byla zpracována třikrát a v Tabulka 21 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.

Tabulka 21 Koncentrace sledovaných analytů v řece Křetínce ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)

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

Reálné vzorky odpadní vody byly odebírány z velkokapacitní čistírny odpadních vod v Brně – Modřicích, na přítoku a na odtoku. Vzorkování probíhalo v časovém horizontu od dubna do července 2010. Odebírány byly 24 hodinové slévané vzorky.

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

Tabulka 22 Koncentrace sledovaných analytů v odpadní vodě ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)

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 (Tabulka 22). 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 odstranění tohoto analytu při čištění v ČOV v Brně – Modřicích byla v případě tohoto analytu 95,38 %.

Nejčastěji detekovaným analgetikem byl ibuprofen, což odpovídá ověřenému poznatku, že patří mezi nejoblíbenější preparáty z této farmaceutické skupiny. Účinnost odstranění v důsledku čištění na ČOV 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: zadrž čistírny odpadních vod je 24 hodin, a proto vysoká koncentrace může souviset 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 %.

Přestože byla předpokládána přítomnost kyseliny salicylové, tento analyt nebyl téměř vůbec detekován. Vysvětlením může být to, že se kyselina salicylová vzhledem ke své nestabilitě pravděpodobně rozpadla v rámci procesů probíhajících v odpadní vodě, nebo naopak vytvořila složitější sloučeniny typu chelátu.

4.6. Stanovení chromatografických podmínek pro kapalinový chromatograf Alliance 2695 HPLC, Waters, pro experimenty prováděné ve Skotsku

Aby byly sledované analyty správně identifikovány a kvantifikovány, je velmi důležité správné nastavení přístroje a vhodné zvolení mobilní fáze. Optimalizace nastavení byla provedena pomocí roztoků standardů. Tyto roztoky byly připraveny rozpuštěním standardů hodnocených analytů v methanolu. Koncentrace těchto pracovních roztoků byla $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a injektováno bylo 20 μl roztoku standardu. Optimalizace byla provedena pro kolonu C18 Luna[®], 250 $\times$ 10 mm, velikost částic 10 μm , Phenomenex.

Nejprve byla vybrána vhodná mobilní fáze.

Za účelem optimalizace byly ověřovány následující mobilní fáze:

- ♦ 0,1% HCOOH + methanol
- ♦ MiliQ voda + methanol
- ♦ 10mM amonium acetát + methanol

Výsledky prokázaly, že optimální mobilní fáze byla dvousložková kombinace 10mM amonium acetát + methanol, neboť odezva detektoru měla v případě použití této mobilní fáze největší hodnotu. Aby bylo dosaženo, co nejlepší separace sledovaných látek byla při analýze použita gradientová eluce (Tabulka 23). Protože byl jako detektor použit hmotnostní spektrometr, byl průtok mobilní fáze 0,2 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Teplota kolony byla 40 $^{\circ}\text{C}$.

Tabulka 23 Průběh gradientu mobilní fáze.

Čas (min)	10mM CH ₃ COONH ₄ (%)	Me OH (%)
0	70	30
25	2	98
26	2	98
28	70	30
33	70	30

4.7. Podmínky hmotnostní detekce pomocí hmotnostního spektrometru Waters Micromass[®] Quattro Micro[™] detector, Waters (Skotsko)

Sledované analyty byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru Waters Micromass[®] Quattro Micro[™] detector, s trojitým kvadrupólem jako analyzátozem; iontovým zdrojem byl elektrosprej.

Nejprve byly optimalizovány parametry hmotnostního spektrometru pro každý sledovaný analyt. Toto bylo provedeno přímou infuzí standardních roztoků. Vzhledem k charakteru sledovaných látek, jejichž molekuly obsahovaly kyselý vodík, byla zvolena negativní ionizace. Pro detekci sledovaných léčiv v reálných vzorcích byla použita tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), MRM (multiple reaction monitoring) mód, který umožňuje velmi přesné a citlivé stanovení analytů ve směsi.

Tabulka 24 Optimální nastavení hmotnostního spektrometru pro dané analyty

Analyt	t_R (min)	Prekursorový ion (m/z)	Produkovaný ion (m/z)	MS-Parametry	
				Cone voltage (V)	Collision (eV)
Diklofenak	20,98	294	250	10	10
			214	10	10
Ibuprofen	22,20	205	161,2	10	10
Ketoprofen	16,27	253	209,2	15	10
			197,2	15	10
Kyselina mefenamová	22,18	240	196,2	25	20
Naproxen	15,86	229	186,2	15	10
			170,2	15	10
Kyselina salicylová	4,15	137	92,9	30	15
			64,2	30	15

4.8. Optimalizace extrakce pevnou fází pro sledované analyty (v rámci experimentu prováděného ve Skotsku)

V rámci prováděného experimentu byla prostřednictvím pilotní studie posouzena vhodnost tří kolonek typu Strata. Kolonka Strata screen – A byla naplněna aniontově výměnným sorbentem, která měl být podle výrobce vhodný zejména pro kyselá léčiva, přičemž pH roztoků bylo pomocí HCl nastaveno na hodnoty 2 a 4. Dalším ověřovaným typem sorbentu byla kolonka Strata screen – C. Sorbent byl v tomto případě kationtově výměnný a podle výrobce vhodný pro léčiva zásaditého charakteru. Sorpce byla prováděna při pH 6 a 7. Poslední testovanou byla kolonka Strata X, u které je sorbentem polymerní reverzní fáze. Tento sorbent byl testován pro pH 2, 4, 6 a 7. Postup pro extrakci byl následující:

- ◆ Aktivace 6 ml methanolu
- ◆ 3 ml mili Q vody (pH 2, 4, 6, 7)
- ◆ Nanesení vzorku (pH 2, 4, 6, 7)
- ◆ Promytí 3 ml mili Q vody
- ◆ Sušení proudem vzduchu
- ◆ Eluce 6 ml methanolu
- ◆ Odpaření na rotační vakuové odparce
- ◆ Rozpuštění v 1ml methanolu

Izolace analytů byla ověřována pomocí modelových vzorků, připravených rozpuštěním standardů v miliQ vodě ($c = 150 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Výtěžnosti byly vyhodnoceny metodou externí kalibrace, tj. vícebodovou kalibrační křivkou.

Z porovnání hodnot výtěžností pro jednotlivé sorbenty a různé hodnoty pH (Tabulka 25), jednoznačně vyplývá, že nejlepšího výsledku bylo dosaženo při použití SPE kolonky Strata X obsahující jako sorbent polymerní reverzní fázi. Současně bylo zjištěno, že optimální pH pro toto stanovení je pH 2, protože při tomto pH je dosaženo optimální výtěžnosti pro všechna sledovaná analgetika.

Tabulka 25 Výtěžnosti sledovaných analytů pro různé sorbenty a pH

SPE	Strata screen A pH 2	Strata screen A pH 4	Strata screen C pH 6	Strata screen C pH 7	Strata X pH 2	Strata X pH 4	Strata X pH 6	Strata X pH 7
Sa (%)	10,63	<LOD	<LOD	<LOD	71,90	6,844	7,962	6,501
Ke (%)	67,77	74,61	30,32	27,67	74,84	76,52	77,58	73,70
Na (%)	72,88	22,02	2,317	4,527	82,39	105,0	115,1	104,4
Mef (%)	36,72	55,95	50,49	56,19	48,16	45,52	50,71	49,25
Ib (%)	27,56	30,57	13,67	15,11	58,64	102,1	96,75	98,09
Di (%)	63,15	91,52	63,08	72,42	71,41	70,77	81,73	79,47

Výtěžnost byla ověřena pomocí deseti pracovních roztoků, a to pro každý sledovaný analyt. Kromě toho byly vypočítány základní statistické údaje (Tabulka 27), tj. relativní směrodatná odchylka podle vzorce (1), meze detekce (2) a meze stanovitelnosti (3) podle vzorců uvedených v kapitole 4.4.3. Za účelem přesnosti a správnosti optimalizovaného analytického postupu byla použita metoda hodnocení nejistoty – postup „shora – dolů“. Byla vypočtena nejistota výtěžnosti ($N(R)_T$), podle vzorce (4) z kapitoly 4.4.3 a dále byla podle vzorce (5) (kapitola 4.4.3) vypočtena kombinovaná nejistota analytického postupu (N_{CT}).

Tabulka 26 Výtěžnosti modelových vzorků sledovaných analytů při koncentraci 0,15 mg · ml⁻¹

	Počáteční koncentrace (mg/ml)	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)	$N(R)_T(\%)$	$N_{CT}(\%)$
Kys. salicylová	0,15	0,1730	115,3	-4,428	27,45
	0,15	0,1586	105,8	-1,661	27,15
	0,15	0,1180	78,66	6,159	27,79
	0,15	0,1663	110,8	-3,128	27,28
	0,15	0,1610	107,3	-2,114	27,18
	0,15	0,1556	103,8	-1,086	27,12
	0,15	0,1626	108,4	-2,416	27,20
	0,15	0,1202	80,12	5,739	27,70
	0,15	0,1382	92,15	2,266	27,19
	0,15	0,1292	86,16	3,995	27,39
Naproxen	0,15	0,1316	87,75	3,535	13,53
	0,15	0,1222	81,46	5,352	14,12
	0,15	0,1248	83,20	4,850	13,94
	0,15	0,1296	86,37	3,935	13,64
	0,15	0,1106	73,75	7,576	15,10
	0,15	0,1270	84,69	4,419	13,79
	0,15	0,1160	77,32	6,546	14,61
	0,15	0,1113	74,22	7,442	15,03
	0,15	0,1210	80,64	5,588	14,21
	0,15	0,1329	88,63	3,282	13,47

Ketoprofen	0,15	0,1313	87,57	3,590	11,07
	0,15	0,1261	84,04	4,608	11,44
	0,15	0,1273	84,83	4,378	11,35
	0,15	0,1327	88,50	3,320	10,99
	0,15	0,1388	92,52	2,160	10,70
	0,15	0,1362	90,77	2,664	10,81
	0,15	0,1331	88,70	3,261	10,97
	0,15	0,1157	77,11	6,606	12,39
	0,15	0,1228	81,86	5,237	11,71
	0,15	0,1315	87,70	3,551	11,06
Diklofenak	0,15	0,1328	88,54	3,308	14,82
	0,15	0,1285	85,67	4,137	15,03
	0,15	0,1326	88,39	3,350	14,83
	0,15	0,1380	91,97	2,317	14,63
	0,15	0,1317	87,80	3,523	14,87
	0,15	0,1435	95,66	1,252	14,50
	0,15	0,1609	107,2	-2,091	14,60
	0,15	0,1521	101,4	-0,403	14,45
	0,15	0,1445	96,35	1,053	14,48
	0,15	0,1393	92,87	2,058	14,59
Ibuprofen	0,15	0,1010	67,34	9,427	18,86
	0,15	0,1171	78,06	6,335	17,52
	0,15	0,1073	71,56	8,211	18,29
	0,15	0,1241	82,76	4,977	17,08
	0,15	0,1096	73,08	7,772	18,09
	0,15	0,1061	70,74	8,448	18,39
	0,15	0,1196	79,75	5,846	17,35
	0,15	0,0987	65,81	9,871	19,09
	0,15	0,0978	65,22	10,04	19,18
	0,15	0,1111	74,06	7,489	17,97
Kys. mefenamová	0,15	0,0879	58,61	11,95	15,34
	0,15	0,0822	54,83	13,04	16,20
	0,15	0,0831	55,38	12,88	16,08
	0,15	0,0828	55,23	12,92	16,11
	0,15	0,0821	54,72	13,07	16,23
	0,15	0,0805	53,68	13,37	16,47
	0,15	0,0916	61,10	11,23	14,79
	0,15	0,0833	55,53	12,84	16,04
	0,15	0,0793	52,87	13,60	16,66
	0,15	0,0896	59,72	11,63	15,09

Tabulka 27 Základní statistické údaje a meze detekce a stanovitelnosti

	Kys. salicylová	Naproxen	Ketoprofen	Diklofenak	Ibuprofen	Kys. mefenamová
Průměrná výtěžnost	98,85	81,80	86,36	86,36	67,21	51,83
Relativní směrodatná odchylka	0,020	0,008	0,007	0,010	0,009	0,004
R.S.D (%)	27,10	13,06	10,48	14,44	16,34	9,62
Průměrná ztráta na vzorek (ng · ml ⁻¹)	1,152	9,112	13,64	13,64	32,79	48,17
Rozptyl	$3,6 \cdot 10^{-4}$	$5,8 \cdot 10^{-5}$	$4,1 \cdot 10^{-5}$	$9,2 \cdot 10^{-5}$	$7,2 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
LOD (ng · ml ⁻¹)	5,842	22,92	5,051	8,993	5,967	0,451
LOQ (ng · ml ⁻¹)	19,47	76,39	16,84	29,98	19,89	1,503

4.9. Stanovení léčiv v reálných vzorcích odebíraných 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. Vzorky byly odebírány v měsíci červnu roku 2009. Vzorky byly zpracovány ihned po odběru. Pro analýzu vody z každého odběrového místa bylo použito 3×250 ml odebrané vody.

Tabulka 28 Koncentrace sledovaných analytů v řece Thurso ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)

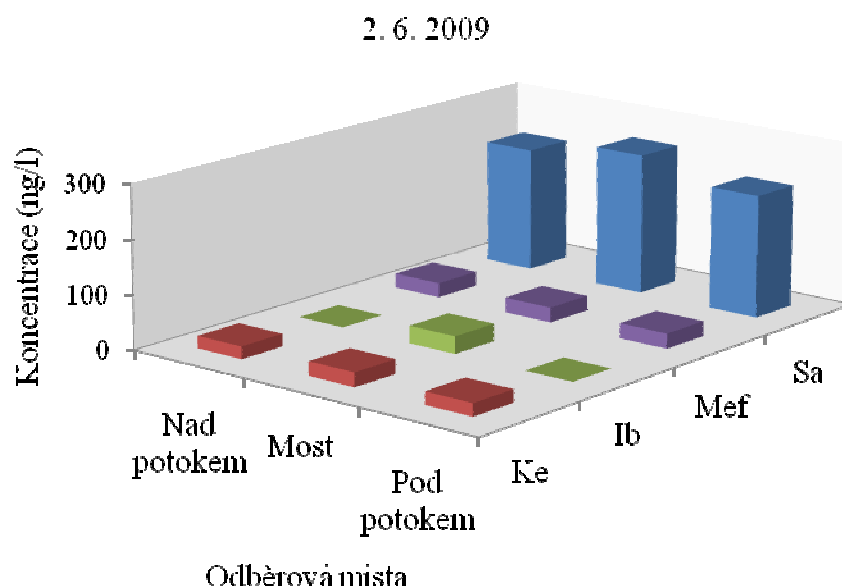
Analyt	2. 6. 2009	4. 6. 2009	8. 6. 2009	10. 6. 2009	12. 6. 2009
Kys. salicylová (Sa)					
Nad potokem	226,9	137,9	148,4	214,3	174,8
Most	257,7	196,6	148,4	208,4	182,1
Pod potokem	224,3	164,9	223,1	182,4	146,8
Potrubí	x	x	x	201,0	260,7
Naproxen (Na)					
Nad potokem	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Most	<LOD	<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

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

V rámci prováděného experimentu bylo prokázáno, že ve vodě z řeky 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.

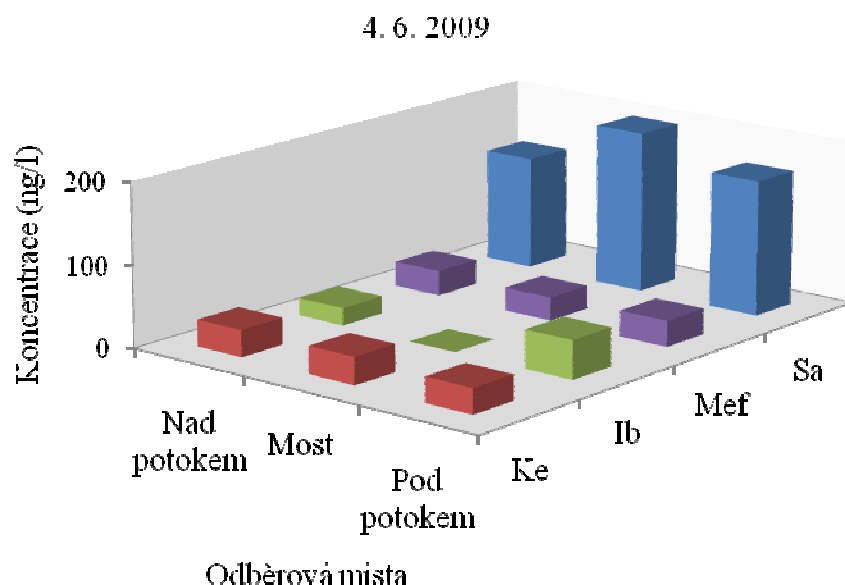
Analýza vody odebrané z dodatečně přidaného odběrového místa pro poslední dva vzorkovací dny potvrdila, že říční voda byla kontaminována vodou z potrubí obsahující všechna sledovaná léčiva. Výsledky provedených analýz jsou zpracovány do Tabulka 28.

Na Obr. 49 je pomocí sloupcového grafu zobrazen obsah sledovaných analgetik ve vzorcích, které byly odebrány 2. 6. 2009. Při tomto odběru byly ve vodě identifikovány a následně stanoveny čtyři analgetika ze sledované skupiny, a to ketoprofen, ibuprofen, kyselina mefenamová a kyselina salicylová. Nejvyšší koncentrace bylo dosaženo v případě kyseliny salicylové, což nemusí souviset přímo s její aplikací jako léku, jak již bylo vysvětleno výše. Ketoprofen a kyselina mefenamová se v daných vzorcích vyskytovaly ve srovnatelných koncentracích na všech odběrových místech. Z toho je možné usuzovat, že je řeka kontaminována výše proti toku a čistírna odpadních vod nepřispívá ke zvýšení koncentrace léčiv jako biologicky aktivních látek obsažených ve vodě. Posledním stanoveným analgetikem byl ibuprofen, který byl detekován pouze ve vzorku odebraném u mostu.



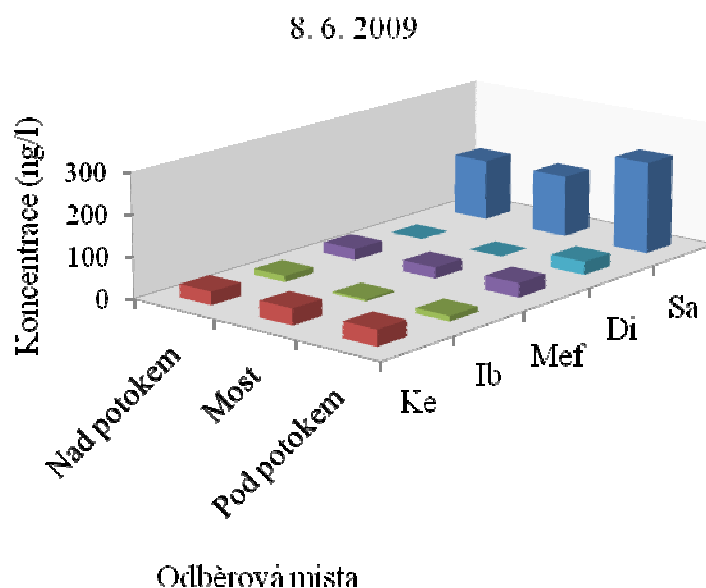
Obr. 49 Grafické znázornění kontaminace říční vody ve vzorcích z 2. 6. 2009

Ve vzorcích vody odebraných 4. 6. 2009 (Obr. 50) byla detekována stejná analgetika jako v odběru z 2. 6. 2009. I obsah těchto léčiv v povrchové vodě byl srovnatelný. Pouze v případě ibuprofenu došlo ke změně spočívající v tom, že na odběrových místech „nad potokem“ a „pod potokem“ bylo toto analgetikum také detekováno. Protože se jeho koncentrace zvýšila, je možné, že v čistírně odpadních vod nebyl ibuprofen zcela odstraněn a při vypouštění z recipientu se dostal zpět do řeky Thurso. Pod mezí detekce byl v rámci tohoto odběru ve vzorku odebraném u „mostu“.



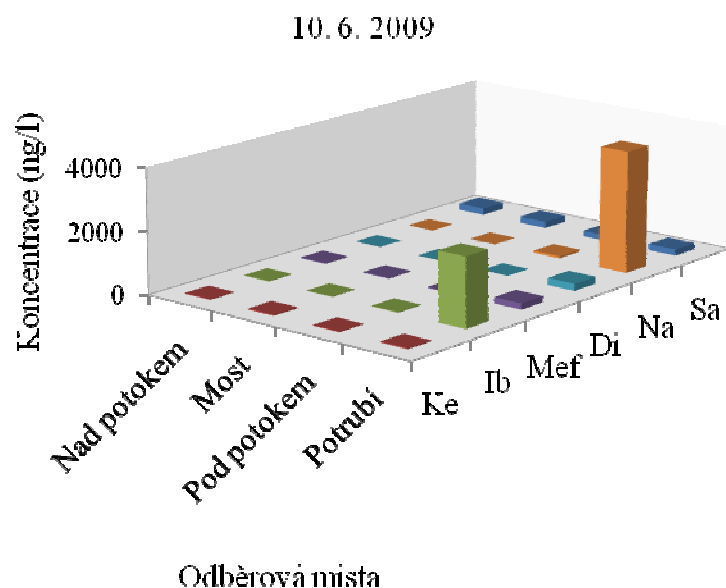
Obr. 50 Grafické znázornění kontaminace říční vody ve vzorcích z 4. 6. 2009

V odebraných vzorcích povrchové vody, které byly provedeny 8. 6. 2009, byl nově analyzován také diklofenak, a to ve vzorcích odebraných na odběrovém místě „pod potokem“. Tím byl potvrzen předpoklad, že diklofenak je velmi těžce odstranitelná biologicky aktivní látka, a to ve většině čistíren odpadních vod lišících se různou technologií. Kromě diklofenaku byly v rámci tohoto odběru ve vodě opět detekovány, a to v nejvyšší koncentraci kyselina salicylová, dále ketoprofen, kyselina mefenamová a ibuprofen.



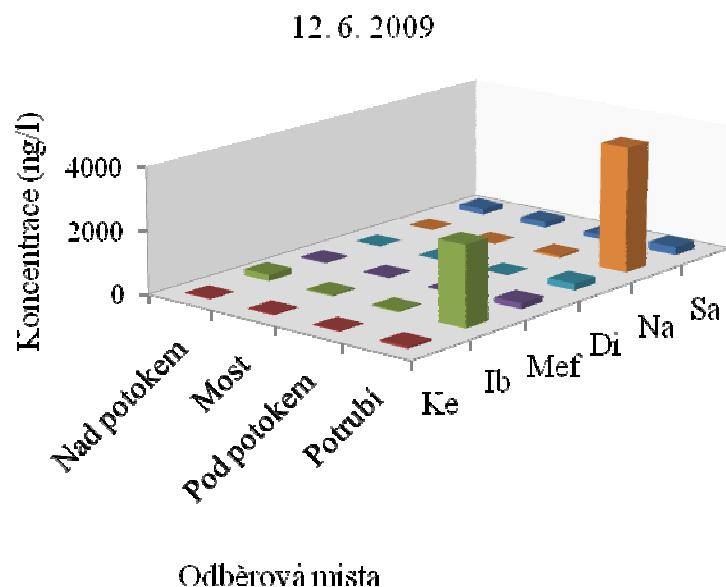
Obr. 51 Grafické znázornění kontaminace říční vody ve vzorcích z 8. 6. 2009

Při odběru vzorků prováděných 10. 6. 2009 bylo nalezeno v břehu řeky místo, kam vedlo potrubí, které bylo poškozeno a pravděpodobně z něj unikala odpadní voda do sledovaného toku. Toto místo bylo zvoleno jako další odběrový bod na řece Thurso a dvakrát zde byl proveden odběr povrchové vody. Při analýze těchto vzorků povrchové vody bylo zjištěno, že v ní byla detekována všechna sledovaná analgetika, a to ve vyšších koncentracích, než byla detekována v dřívějších odběrech na ostatních vzorkovacích místech. Poprvé zde byl detekován také naproxen, a to ve velmi vysoké koncentraci, v porovnání s ostatními sledovanými léčivy. Druhou nejvyšší koncentraci při tomto odběru vykazoval ibuprofen. Na základě zhodnocení tohoto dílčího experimentu lze konstatovat, že tato analgetika patří k velmi často aplikovaným léčivům na území Skotska.



Obr. 52 Grafické znázornění kontaminace říční vody ve vzorcích z 10. 6. 2009

Poslední odběr byl proveden dne 12. 6. 2009, a to na všech čtyřech vzorkovacích místech. Stejně jako u předešlého odběru byly nejvyšší koncentrace všech sledovaných analytů ve vzorcích vody odebraných na vzorkovacím místě „potrubí“. Nejvyšší koncentrace byla i v tomto případě prokázána u naproxenu a ibuprofenu.



Obr. 53 Grafické znázornění kontaminace říční vody ve vzorcích z 12. 6. 2009

4.10. Nastavení chromatografických podmínek na kapalinovém chromatografu Agilent 1200 module, Agilent, pro experimenty prováděné na Taiwanu

Analgetika byla také zjišťována ve vodách odebíraných na Taiwanu. Hodnocené analyty léčiv jako biologicky aktivních látek byly ve vzorcích taiwanských vod identifikovány a kvantifikovány pomocí kapalinového chromatografu Agilent 1200 module, Agilent. Správné nastavení použitého přístroje a zejména výběr optimální mobilní fáze byl proveden s využitím poznatků zpracované literární rešerše a na základě předchozích experimentů a pilotních studií, na které bylo navázáno.^{104,105,106,107} Pro analýzy byla zvolena kolona Kinetex PFP, velikost $100 \times 2,1$ mm, velikost částic $2,6\mu\text{m}$, Phenomenex.

Jako mobilní fáze byla použita 0,1% HCOOH v deionizované vodě + 0,1% HCOOH v acetonitrilu.

Sledované analyty byly nejlépe separovány gradientovou elucí (Tabulka 29). Optimální průtok mobilní fáze byl $0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, v závislosti na vlastnostech kolony a použitém typu detekce. Teplota kolony byla 25°C .

Tabulka 29 Průběh gradientu mobilní fáze

Čas (min)	0,1% HCOOH v DI vodě	0,1% HCOOH v acetonitrilu
0	50	50
0,1	50	50
2	5	95
6	5	95
6,2	50	50
11	50	50

4.11. Podmínky hmotnostní detekce pomocí hmotnostního spektrometru Sciex API 4000, Applied Biosystems, pro experimenty prováděné na Taiwanu

Hmotnostní spektrometr Sciex API 4000, s trojitým kvadrupólem jako analyzátozem, byl použit pro detekci analgetik v reálných vzorcích vod. Iontovým zdrojem byl v tomto případě elektrosprej.

Parametry hmotnostního spektrometru byly optimalizovány pro každý sledovaný analyt, a to pomocí přímé infuze standardních roztoků. Molekuly sledovaných látek obsahovaly kyselý vodík, a proto byla zvolena negativní ionizace, při které je tento vodík odštěpen. Pro detekci sledovaných léčiv v reálných vzorcích vody byla použita tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) a MRM (multiple reaction monitoring) mód, který umožňuje velmi přesné a správné stanovení analytů ve směsi.

4.12. Extrakce pevnou fází, použita při experimentech prováděných na Taiwanu

Pro extrakci sledovaných analytů byly použity SPE kolonky Oasis[®] HLB Cartridge, Waters. Postup extrakce byl následující:

- ◆ Aktivace 6 ml methanolu
- ◆ 6 ml miliQ vody
- ◆ Sušení kolonky
- ◆ Nanesení vzorku
- ◆ Promytí 6 ml miliQ vody
- ◆ Sušení proudem vzduchu
- ◆ Eluce 6 ml methanolu
- ◆ Sušení N₂ do sucha, na vodní lázni při 38 °C
- ◆ Opětovné rozpuštění odparku ve směsi methanol : voda (2 : 1)

Upravené vzorky byly uskladněny při teplotě -15°C v mrazícím boxu až do provedení vlastní analýzy.

Pro všechna sledovaná analgetika byla vypočtena meze detekce (2) a mez stanovitelnosti (3) podle vzorců prezentovaných v kapitole 4.4.3. viz. Tabulka 30.

Tabulka 30 Meze detekce a stanovitelnosti pro analgetika sledovaná na Taiwanu

Analyt	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
Diklofenak	5,787	19,79
Ibuprofen	12,88	39,68
Ketoprofen	15,64	49,32
Kyselina salicylová	25,44	78,64
Naproxen	18,33	57,43

4.13. Stanovení léčiv v reálných vzorcích povrchových vod odebraných 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. Po odběru byly vzorky skladovány v temnu při teplotě 4 °C až do dalšího zpracování, přičemž se každý vzorek analyzoval vždy třikrát (3×300 ml). Prezentované výsledky představují průměr ze tří stanovení.

U každého vzorku byla změřena také salinita; její hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 31. 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.

Tabulka 31 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

Koncentrace sledovaných analytů v reálných vzorcích byly zjišťovány pomocí metody standardního přídávku; ke každému vzorku byl přidáván 1ml standardního roztoku o koncentraci $100 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

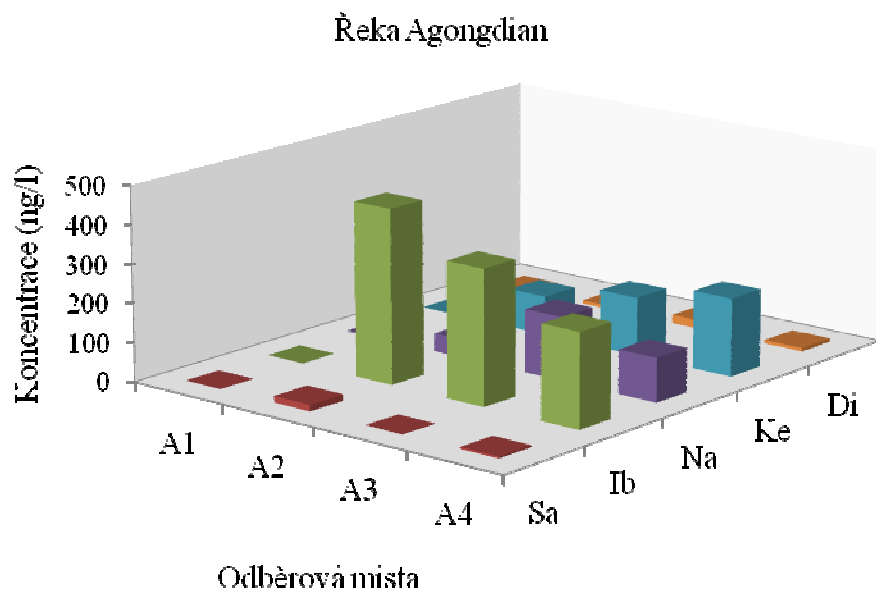
Hodnocená léčiva byla detekována ve všech odebraných vzorcích. Nejvyšších hodnot koncentrace dosahoval ibuprofen, který je celosvětově velmi často užívaným analgetikem. Druhou nejvyšší koncentraci měl ketoprofen.

Výsledky provedených analýz jsou shrnuty v Tabulka 32.

Tabulka 32 *Koncentrace sledovaných analytů ve vzorcích odebraných na Taiwanu ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)*

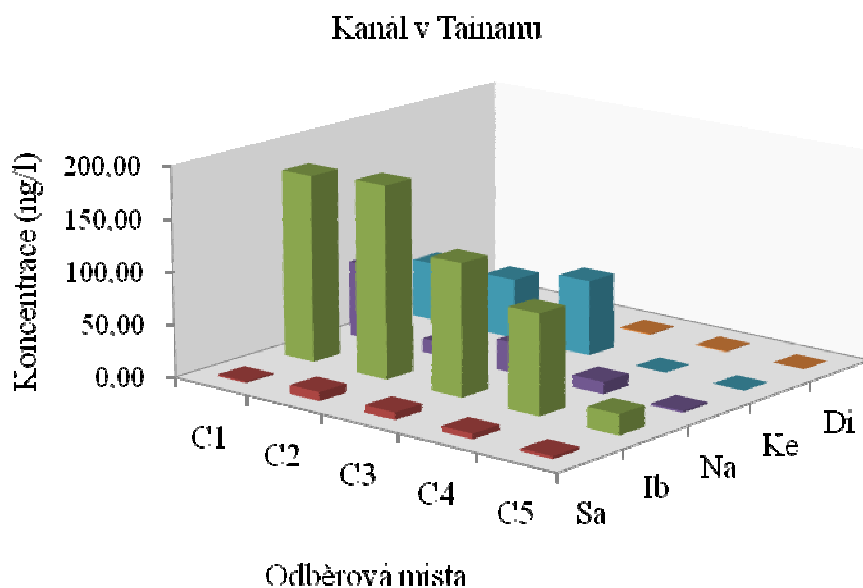
c ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)	Sa	Ib	Na	Ke	Di
Agongdian					
A1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
A2	16,53	446,7	47,00	101,0	8,767
A3	< LOD	346,7	162,7	149,7	22,03
A4	4,730	242,7	113,3	200,0	8,700
Kanál v Tainanu					
C1	1,403	177,3	71,67	55,33	16,87
C2	8,567	182,7	13,03	57,00	1,220
C3	7,100	125,7	28,67	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

Na řece Agongdian byly provedeny 4 odběry vzorků. V prvním odběru byly všechna sledovaná léčiva pod mezí detekce použité metody. Tento odběr byl proveden pod přehradou na této řece. Při druhém odběru byla detekována všechna léčiva, přičemž nejvyšší koncentraci měl při tomto odběru ibuprofen. Ve třetím odběru nebyla detekována kyselina salicylová; příčinou by mohlo být, že vzorek byl odebírán v místě, nad kterým se do sledované řeky vlévá jiný tok a voda tak mohla být naředěná. Naproti tomu diklofenak a naproxen měly ve vodě z této odběrové lokality nejvyšší koncentraci, což může souviset také s již zmíněným tokem, který mohl obsahovat tyto analyty, což mohlo mít za následek výrazné zvýšení jejich koncentrací.



Obr. 54 Grafické znázornění koncentrace sledovaných analgetik v řece Agongdian

Z Tainanského kanálu bylo odebráno celkem pět vzorků z různých míst. Odběr C1 byl proveden na slepém rameni tohoto kanálu a byly zde detekovány všechny sledované analyty, přičemž nejvyšší koncentraci měl ibuprofen. Ve vzorcích z odběrových míst C2 a C3 se opět vyskytovala všechna sledovaná léčiva. Naproti tomu ve vzorku z místa C4 nebyl detekován ketoprofen, stejně jako ve vzorku z místa C5, kde byla hodnota pod mezí detekce také v případě diklofenaku. Toto bylo zřejmě způsobeno velkým naředěním vody z kanálu mořskou vodou, a to vzhledem k poloze odběrových míst. Obecně lze konstatovat, že čím blíže byla odběrová místa ústí do moře, tím nižší byly koncentrace sledovaných analgetik ve vzorcích.



Obr. 55 Grafické znázornění koncentrace sledovaných analgetik v Tainanském kanálu

Druhou řekou, kde byly odebírány vzorky, byla řeka Erren. Na této řece bylo odebráno celkem osm vzorků vody, z nichž odběrová lokalita označená jako E6 byla situována na jednom z přítoků této řeky.

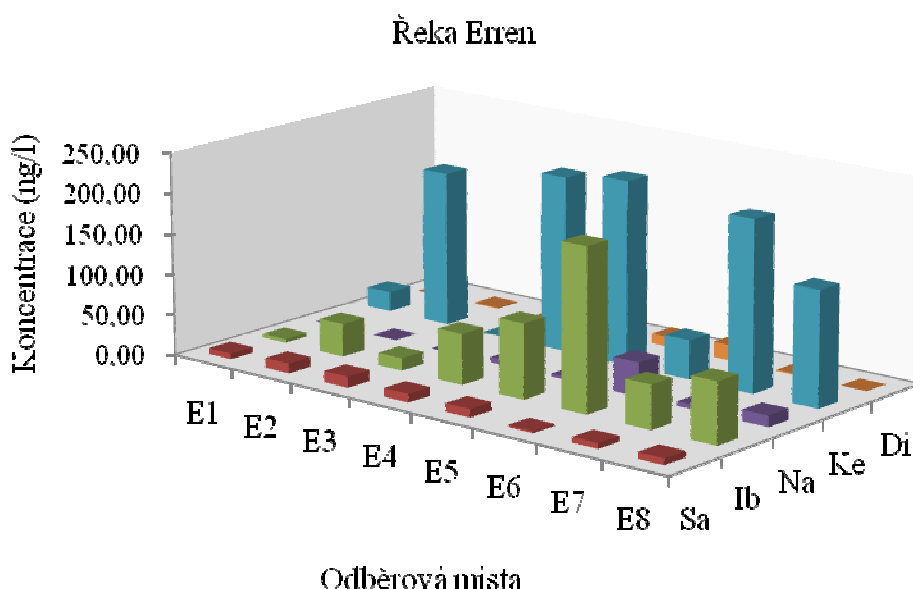
Kyselina salicylová se vyskytovala ve všech odebraných vzorcích. Její koncentrace byla ve vzorcích odebraných v místech E2 až E5 řádově stejná. Ve vzorku E7 byla její koncentrace nižší, což může souviset s naředěním vodou pocházející z jednoho z přítoků, který se do řeky vléval nedaleko místa odběru vzorku. Ve vzorku odebraném v posledním přítoku řeky Erren byla koncentrace kyseliny salicylové nejnižší. Také v posledním odběru byla koncentrace pravděpodobně nižší vlivem naředění vody vodou z jiného toku.

Ibuprofen jako další sledované analgetikum se rovněž vyskytoval ve všech odebraných vzorcích. Nejnižší koncentrace byla prokázána v prvním odběru. Koncentrace dále kolísala, a to v závislosti na přítocích, přičemž nejvyšší koncentrace byla stanovena ve vzorku z odběrového místa E6 (přítok).

Naproxen byl naproti tomu identifikován teprve až ve čtvrtém odebraném vzorku. Jeho koncentrace se v oblasti mezi místy E4 a E5 snížila téměř o polovinu. V tomto úseku nemá řeka Erren žádný přítok, a proto může být možným vysvětlením patrně částečný rozklad tohoto analgetika vlivem fyzikálně-chemických a biologických procesů probíhajících v řece. Nejvyšší koncentrace naproxenu byla opět ve vzorku odebraném z místa E6.

Ketoprofen dosahoval v této řece nejvyšších koncentrací ze všech sledovaných analytů. Pouze v místě odběru E3 byla hodnota jeho koncentrace pod mezí detekce, zřejmě v důsledku naředění vody.

Diklofenak jako poslední sledované analgetikum nebyl detekován v prvním a ve třetím odběru. Změny koncentrací odpovídaly charakteru toku, tj., že koncentrace se postupně zvyšovala od vzorku odebraného z místa E7, potom klesla (pravděpodobné ovlivnění naředěním vody z přítoku); v posledním odebraném vzorku byla jeho koncentrace nejnižší, zde se však již jednalo o vodu brakickou, díky blízkému ústí řeky do moře a odebraný vzorek byl již značně naředěn vodou mořskou.



Obr. 56 Grafické znázornění koncentrace sledovaných analgetik v řece Erren

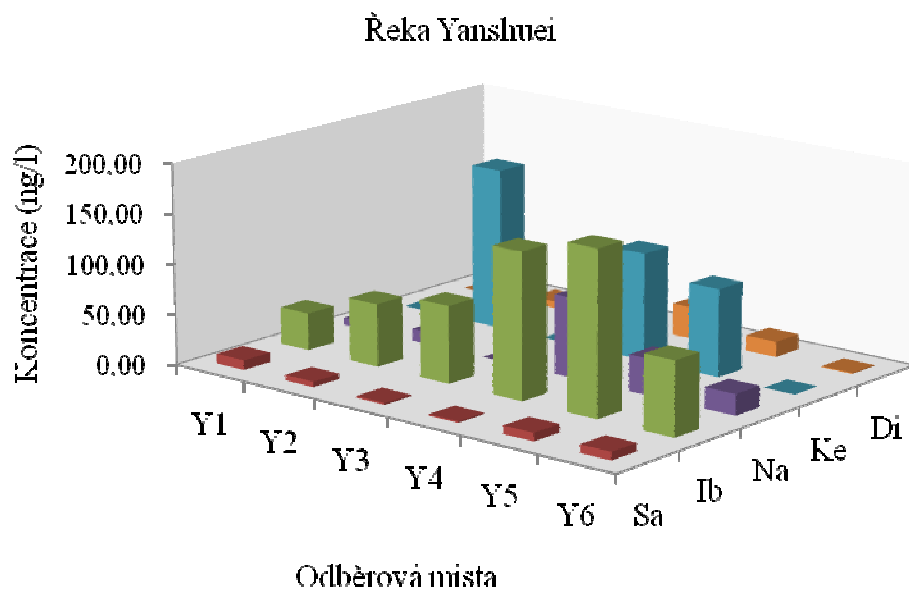
Třetí a poslední řekou, na jejímž toku byly odebírány vzorky, byla řeka Yanshuei, kde bylo provedeno celkem šest odběrů vzorků vody. Jedno odběrové místo bylo opět na jednom z přítoků této řeky.

Ve všech odebraných vzorcích byla detekována kyselina salicylová a ibuprofen. Nejvyšší koncentrace kyseliny salicylové byla v prvním odběru, dále pak její koncentrace klesala a až v posledních dvou odběrech se opět zvýšila. Možné vysvětlení opět souvisí s charakterem toku, neboť druhý odběrový bod byl v místě soutoku. Nízká koncentrace kyseliny salicylové mohla být proto způsobena naředěním vody v hlavním toku. Koncentrace ibuprofenu se postupně v průběhu toku zvyšovala, pouze v posledním odebraném vzorku opět klesla; jak již bylo řečeno, zde se opět jednalo o vodu brakickou, z čehož vyplývá, že voda byla naředěna vodou mořskou.

Naproxen nebyl detekován ve třetím odběru, tj. na přítoku do řeky Yanshuei. Koncentrace naproxenu se v hlavním toku zvyšovala až do místa pátého odběru, kde byla nakonec zjištěna nejnižší koncentrace. I v tomto případě si můžeme tento pokles vysvětlit částečným rozkladem v důsledku působení fyzikálně-chemických a biologických procesů probíhajících v řece.

Ketoprofen nebyl detekován v prvním odběru, v přítoku a v posledním odběru. Tyto údaje zcela korespondují s charakterem toku. Na ostatních místech se koncentrace v průběhu toku snižovala, z čehož vyplývá, že místo kontaminace bylo pravděpodobně mezi vzorkovacími body Y1 a Y2.

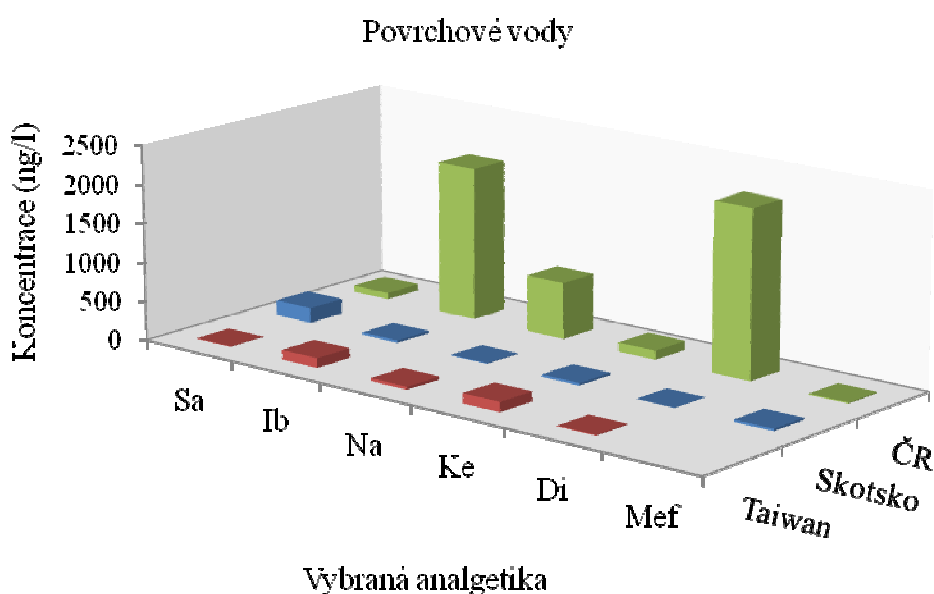
Diklofenak nebyl detekován ve vzorku vody z prvního odběrového místa. Dále jeho koncentrace postupně rostla a to až do pátého odběrového místa, kde koncentrace začala klesat. Vzhledem k tomu, že v tomto úseku řeky není již žádný přítok, zřejmě došlo k částečné degradaci sledovaného analgetika.



Obr. 57 Grafické znázornění koncentrace sledovaných analgetik v řece Yanshuei

4.14. Porovnání získaných výsledků s publikovanými údaji

V posledních letech se na celém světě 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. 58 Porovnání naměřených koncentrací sledovaných analgetik pro Taiwan, Skotsko a Českou Republiku

Na Obr. 58 jsou porovnány zjištěné koncentrace analgetik kvantifikované ve vzorcích povrchových vod ze všech oblastí sledovaných v průběhu řešení disertační práce. Porovnání není úplně přesné, protože nebyly používány naprosto shodné analytické postupy a způsoby detekce pro vlastní stanovení metodou LC/MS. Lišily se také postupy 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. Také se lze domnívat, že rozdíl v užívání těchto typů léčiv je v Evropě a v Asii pravděpodobně značně odlišný.

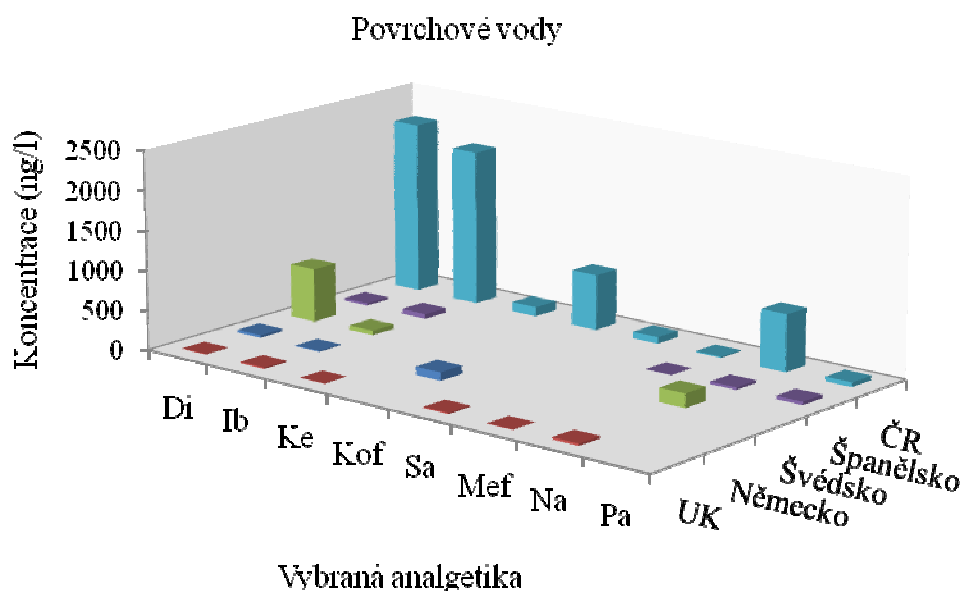
Závěrem je proto nutné říci, že pouhé porovnání získaných experimentálních dat bez zohlednění použitého analytického postupu je v oblasti stopové analýzy obtížné a nelze ho považovat za zcela správné.

Na Obr. 59 jsou znázorněny koncentrace sledovaných nesteroidních protizánětlivých léčiv zjištěné v jiných zemích Evropy. ^{108, 109, 98, 110} Z obrázku je patrné, že v řece Křetince z České Republiky byly detekovány mnohonásobně vyšší koncentrace těchto polutantů. Pro použité grafické znázornění musela být koncentrace kofeinu uvedena v $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Tabulka 33 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 ¹⁰⁸	8	18	4	x	14	5	29	x
Německo ¹⁰⁹	33	11	x	104	x	x	x	x
Švédsko ⁹⁸	669	56	x	x	x	x	177	x
Španělsko ¹¹⁰	29	60	x	x	x	3	33	42
ČR	2154	1947	117	697	83	14	721	58

Z hodnot uvedených v této tabulce vyplývá, že v ČR byly nejvyšší koncentrace prokázány u všech hodnocených analgetik.



Obr. 59 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. Tomuto tématu se zde věnuje řešitelský kolektiv pod vedením Ing. Tomáše Randáka, Ph.D. Zabývají se zejména vlivem léčiv na biotické složky vodního prostředí, a to zejména na ryby. Výskyt daných polutantů povrchových vod monitorovali pomocí pasivních vzorkovačů POCIS. Sledovali několik lokalit v České Republice, a to ve městech a obcích Příbram, Chomutov, Pacov, Brloh a Prachatice. Ze skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv se zaměřili pouze na diklofenak.

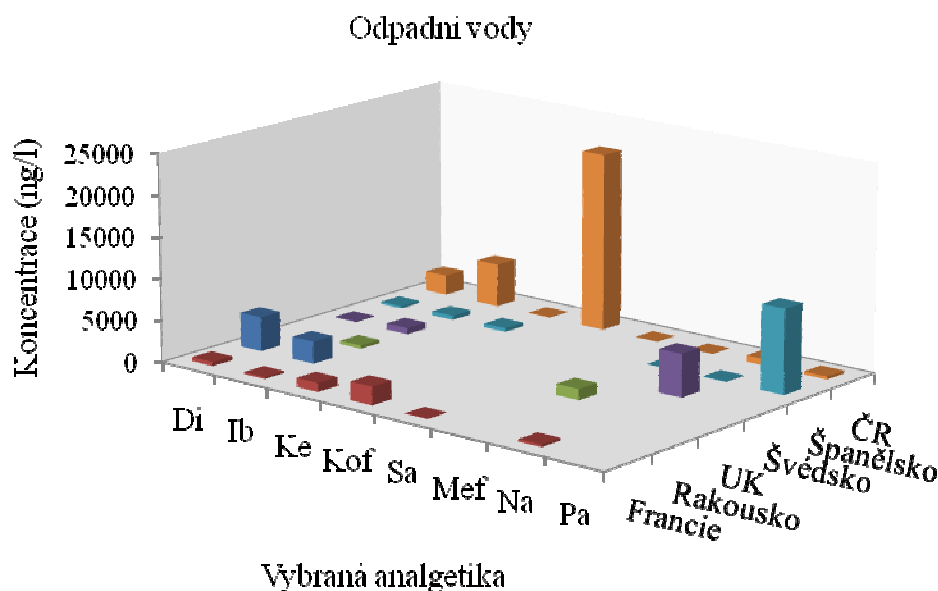
V některých místech odběrů byla koncentrace tohoto analgetika pod mezí detekce a nejvyšší koncentrace dosahovaly hodnot 600ng/POCIS.¹¹¹

Při srovnání zjištěných koncentrací ve vzorcích odpadních vod s ostatními evropskými státy byla vesměs zjišťována velmi podobná data, v některých případech jsou i příznivější pro Českou Republiku. Pouze koncentrace kofeinu jsou v České Republice výrazně vyšší. ^{112, 113, 93, 98, 110}

Tabulka 34 Koncentrace vybraných analgetik, pro různé země, v odpadních vodách (ng·l⁻¹)

Analyt	Di	Ib	Ke	Kof	Sa	Mef	Na	Pa
Francie ¹¹²	486	219	1081	2213	52	x	289	x
Rakousko ¹¹³	4114	2679	x	x	x	x	x	x
UK ⁹³	x	405	x	x	x	1327	x	x
Švédsko ⁹⁸	111	751	x	x	x	x	5153	x
Španělsko ¹¹⁰	250	516	451	x	x	5	99	10194
ČR	2394	5191	68	21394	16	6	774	355

Z Tabulka 34 vyplývá, že vyšší hodnoty analgetik v odpadní vodě než v České Republice, byly prokázány u diklofenaku (Rakousko 4114 ng·l⁻¹), Ketoprofenu (Francie 1081 ng·l⁻¹ a Španělsko 451 ng·l⁻¹), kyseliny mefenamové (UK 1327 ng·l⁻¹), Naproxenu (Švédsko 5153 ng·l⁻¹) a paracetamolu (Španělsko 10 194 ng·l⁻¹). Pro optimální způsoby posouzení by však bylo nutné znát kapacitu ČOV, použité technologie a přibližné množství léčiv se sledovanými účinnými látkami.



Obr. 60 Grafické znázornění koncentrací vybraných analgetik, pro různé země v odpadních vodách

5. 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 μ m a rozměry 4,6 $\times$ 150 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 μ m a rozměry 2,1 $\times$ 150 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 meze detekce a mez stanovitelnosti použité analytické metody a byla vypočtena nejistota stanovení.

Na území České Republiky byly sledovány 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 Křetinky. Zde byla volena 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. Nejčastěji se vyskytujícím analgetikem v odpadních vodách byl ibuprofen, což potvrdilo předpoklad, že je pravděpodobně nejčastěji používaným preparátem. V říční vodě byly během vzorkovacího intervalu postupně detekovány všechny sledované látky. Nejčastěji se opět vyskytoval kofein.

Druhá část disertační práce byla prováděna, a to 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 a jako analyzátor 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 mobilitního stipendijního 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 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 citlivé 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 kolonky Oasis[®] HLB Cartridge, Waters; v rámci těchto experimentů nebyla prováděna úprava pH vzorků.

Pro všechny sledované analyty detekované v rámci tohoto experimentu byly rovněž stanoveny mez detekce a mez stanovitelnosti použité analytické metody.

Na Taiwanu byly provedeny odběry vzorků povrchové vody ze tří řek (Yanshuei, Erren, Agongdian) a z kanálu ve městě Tainan, který obsahoval rovněž 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. Druhou nejvyšší koncentraci ve vzorcích odebraných z povodí tří řek na Taiwanu měl ketoprofen.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- ¹ Hampl, F., Rádl, S., Paleček, J.: *Farmakochemie*. 2. rozšířené vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2007. 450s. ISBN 978-80-7080-639-5.
- ² Květina, J., Herink, J., Vopršalová, M. *Základy farmakologie 2. díl: Speciální farmakologie nervstva, kardiovaskulární soustavy, dýchacího systému, ledvin*. 1. vyd. Brno: Ediční středisko VFU Brno, 1999. 193 s. ISBN 80-85114-45-3.
- ³ Janáčková, L.: *Bolest a její zvládání*. 1. vyd. Praha: Portál, 2007. 200s. ISBN 978-80-7367-210-2
- ⁴ Pavelka, K. a kol.: *Farmakoterapie revmatických onemocnění*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005. 436s. ISBN 80-247-0459-5
- ⁵ Mann, J.: *Jedy, drogy, léky*. 1. vyd. Praha: Academia, 1996. 203s. ISBN 80-200-0508-0.
- ⁶ <http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2002/5-2002/Nesteroidni-antirevmatika-v-terapii-revmatickych-onemocneni/e-9k-9v-g2.magarticle.aspx> [cit. 20. 10. 2009].
- ⁷ http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1982/ [cit. 21. 10. 2009].
- ⁸ http://www.pace.cz/go/archiv_p0202_1 [cit. 11. 11. 2009].
- ⁹ <http://www.mzcr.cz> [cit. 22. 10. 2009].
- ¹⁰ Trnavský, K., Dostál, C. a kol.: *Klinická revmatologie*. 1. vyd. Praha: Avicem, zdravotnické nakladatelství, n.p. 1990. 440s. ISBN 80-201-0038-5
- ¹¹ Pavelka, K., Rovenský, J. a kol.: *Klinická revmatologie*. 1. vyd. Praha: Galén. 2003. 952s. ISBN 80-7262-174-2
- ¹² Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007. 372s. ISBN 978-80-247-1672-5.
- ¹³ Bertram, G., Katzung, J.: *Základní a klinická farmakologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská, s. r. o., 2006. 1106 s. ISBN 80-7319-056-7.
- ¹⁴ <http://chaitali80.tripod.com/> [cit. 5. 11. 2009].
- ¹⁵ 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.
- ¹⁶ 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.
- ¹⁷ 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.

-
- ¹⁸ 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.
- ¹⁹ 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.
- ²⁰ 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.
- ²¹ 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.
- ²² Petrović, M., Barceló, D.: *Comprehensive analytical chemistry*. 1.vyd Oxford: Elsevier. 2007, 564 s. ISBN 978-0-444-53052-3
- ²³ Jørgensen, S., E., Halling-Sørensen, B.: Drugs in the environment. *Chemosphere*, 2000, vol. 40, issue 7, pp 691–699.
- ²⁴ Beausse, J.: Selected drugs in solid matrices: A review of enviromental occurence, determination and properties of pronicpal substances. *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, vol. 23, pp. 753-761.
- ²⁵ 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.
- ²⁶ Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D.: Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem*, 2007, vol. 387, pp. 1225–1234.
- ²⁷ Chudoba, J., Dohányos, M., Wanner, J.: *Biologické čištění odpadních vod*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1991. 468 s. ISBN 04-609-91.
- ²⁸ Snyder, S., A., Adham, S., Redding, A., M., Cannon, F., S., DeCarolís, 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.
- ²⁹ Sharma, V., K.: Oxidative transformations of environmental pharmaceuticals by Cl₂, ClO₂, O₃, and Fe(VI): Kinetics assessment. *Chemosphere*, 2008, vol. 73, pp. 1379-1386.
- ³⁰ Carbala, M., Manterola, G., Larrea, L., Ternes, T., Omil, F., Lema, J., M.: Influence of ozone pre-treatment on sludge anaerobic digestion: Removal of pharmaceutical and personal care products. *Chemosphere*, 2007, vol. 67, pp. 1444–1452.
- ³¹ Stone, T., Darlingtonová, G.: *Léky, drogy, jedy*. 1. vyd. Praha: Academia, 2003. 440s. ISBN 80-200-1065-3.
- ³² *Český lékopis 2009*, 3. díl. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009. 1280s. ISBN 978-80-247-2994-7
- ³³ <http://en.wikipedia.org/wiki/Paracetamol> [cit. 5. 11. 2009].

-
- ³⁴ http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_acetylsalicylov%C3%A1 [cit. 4. 11. 2009].
- ³⁵ *Český lékopis 2009*, 2. díl. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009. 1504s. ISBN 978-80-247-2994-7
- ³⁶ http://en.wikipedia.org/wiki/Salicylic_acid [cit. 5. 11. 2009].
- ³⁷ http://en.wikipedia.org/wiki/Acetylsalicylic_acid [cit. 5. 11. 2009].
- ³⁸ Lüllmann, H., Mohr, K., Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. 728 s. ISBN 80-247-0836-1.
- ³⁹ <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ibuprofen#Historie> [cit. 10. 11. 2009].
- ⁴⁰ www.rsu.edu/faculty/kvoska/oc2/KS.ppt [cit. 10. 11. 2009].
- ⁴¹ <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0076653> [cit. 12. 11. 2009].
- ⁴² <http://en.wikipedia.org/wiki/Naproxen> [cit. 12. 11. 2009].
- ⁴³ <http://chemicaland21.com/lifescience/phar/NAPROXEN.htm> [cit. 12. 11. 2009].
- ⁴⁴ chemweb.ucc.ie/courses/PF1001/PF2001%20Naproxen.pdf [cit. 18. 11. 2009].
- ⁴⁵ <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0055634> [cit. 18. 11. 2009].
- ⁴⁶ Příbalová informace: *Nalgesin S*. KRKA ČR, s.r.o., Sokolovská 79/192, 186 00 Praha 8, Česká Republika. Datum poslední revize textu 2. 4. 2008.
- ⁴⁷ <http://en.wikipedia.org/wiki/Diclofenac> [cit. 18. 11. 2009].
- ⁴⁸ <http://www.sukl.cz/download/pil/PI11464.doc> [cit. 18. 11. 2009].
- ⁴⁹ Příbalová informace: *Myogit*® 25. PRO.MED.CS Praha a.s., Telčská 1, 140 00 Praha 4, Česká Republika. Datum poslední revize textu 9. 3. 2005.
- ⁵⁰ <http://en.wikipedia.org/wiki/Caffeine> [cit. 18. 11. 2009].
- ⁵¹ Horáková, M., a kol.: *Analytika vody*. 2. vyd. dotisk. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2007. 335 s. ISBN 978-80-7080-520-6.
- ⁵² Povýšilová, M.: Odběry vzorků z čistíren odpadních vod. *Odběry vzorků, sborník přednášek z kurzu*, 2. upravené a doplněné vydání, 2006, Český Těšín: 2 THETA, s.265-267. ISBN 80-86380-33-5.
- ⁵³ Yang, S., Cha, J., Carlson, K.: Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chromatography A*, 2005, vol. 1097, issues 1-2, pp. 40–53.
- ⁵⁴ Lindberg, R.: Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*, 2004, vol.57, pp. 1479–1488.
- ⁵⁵ http://vscht.cz/uchop/udalosti/skripta/vzorkovani/Vzorkovani_070104_4.pdf [cit. 20. 11. 2009].

-
- ⁵⁶ 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.
- ⁵⁷ Seiler, J., P.: Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology – can the two be connected? *Toxicologi Letters*, 2002, vol. 131, pp. 105–115.
- ⁵⁸ Popl, M., Fährnich, J.: *Analytická chemie životního prostředí*. 4. vyd. Praha: VŠCHT, 1999. 218s. ISBN 80-7080-336-3.
- ⁵⁹ www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf [cit. 20. 11. 2009].
- ⁶⁰ Farré, M., Gros, M., Hernández, B., Petrovic, M., Hancock, P., Barceló, D.: Analysis of biologically active compounds in water by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications In Mass Spectrometry*. 2008, vol. 22, pp. 41–51.
- ⁶¹ Grujić, S., Vasiljević, T., Laušević, M.: Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009, vol. 1216, pp. 1989–2000.
- ⁶² www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf [cit. 2. 3. 2010].
- ⁶³ Sommer, L. a kol.: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, 347s. ISBN 80-214-1742-0.
- ⁶⁴ Karlíček, R. a kol.: *Analytická chemie pro farmaceuty*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2001, 281 s. ISBN 80-246-0348-9.
- ⁶⁵ Holzbecher, Z., Churáček, J., a kol.: *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1987, 664s. ISBN 04-612-87.
- ⁶⁶ Ternes, T., A.: Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends in analytical chemistry*, 2001, vol. 20, No.8.
- ⁶⁷ http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm [cit. 20. 11. 2009].
- ⁶⁸ Lacey, C., McMahon, G., Bones, J., Barron, L., Morrissey, A., Tobin, J.M.: An LC–MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta*. 2008, vol. 75, pp. 1089–1097.
- ⁶⁹ Vítečková, H.: *Stanovení reziduí léčiv v odpadních vodách metodou HPLC*. Brno, 2006. Diplomová práce na VUT, FCH, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí.
- ⁷⁰ Štulík, K. a kol.: *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264s. ISBN 80-246-0852-9.
- ⁷¹ http://faf.vfu.cz/fytochem/hplc_gc.pdf. [cit. 24. 11. 2009].
- ⁷² Holčápek, M., Jandera, P.: Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy*, 1998, vol. 92, str. 278–286.
- ⁷³ Vřešťál, J. a kol.: *Hmotnostní spektrometrie*. 2. doplněné vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 114 s. ISBN 80-210-2283-3.

-
- 74 Holčapek, M.: Sprejové ionizační techniky: ESI, APCI, APPI. 8. ročník *Školy hmotnostní spektrometrie, sborník přednášek*, 2007.
- 75 https://www.vutbr.cz/elearning/file.php/95522/MS_03.pdf [cit. 30. 9. 2010].
- 76 <http://faf.vfu.cz/fytochem/Hmotnostn%C3%AD%20spektroskopie.pdf>. [cit. 1. 4. 2007].
- 77 Holčapek, M.: Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Sborník přednášek kurzu HPLC/MS*. 1. vyd. Pardubice: Ediční středisko Univerzity Pardubice, 2001. 191 s. ISBN 80-7194-390-8.
- 78 Ardrey, R., E.: *Liquid chromatography – Mass spectrometry: An Introduction*. University of Huddersfield, Huddersfield, UK: Wiley, 2003. 276s. ISBNs: 0-471-49799-1 (HB); 0-471-49801-7 (PB).
- 79 http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_43.htm [cit. 4. 3. 2010].
- 80 <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/quad-massspec.html> [cit. 4. 3. 2010].
- 81 <http://www.bvk.cz/o-spolecnosti/odvadeni-a-cistení-odpadnich-vod/cov-brno-modrice/> [cit. 21. 10. 2010]
- 82 <http://kretin.eu/?MI=18> [cit. 21. 10. 2010].
- 83 Krbcová, Š.: *Komplexní fyzickogeografická charakteristika povodí Křetínky*. Olomouc, 2006. Bakalářská práce na Univerzitě Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra geografie.
- 84 <http://www.thursoriver.co.uk> [cit. 21. 10. 2010].
- 85 http://en.wikipedia.org/wiki/River_Thurso [cit. 21. 10. 2010].
- 86 <http://www.taipeitimes.com/News/feat/archives/2005/04/17/2003250886/2> [cit. 20. 12. 2010].
- 87 Chang, B., V., Yu, C., H., Yuan, S., Y.: Degradation of nonylphenol by anaerobic microorganisms from river sediment. *Chemosphere*. 2004. vol. 55, pp. 493-500.
- 88 <http://www.taiwan.com.au/Envtra/SouthWest/Tainan/report20.html> [cit. 20. 12. 2010].
- 89 <http://ims.tncc.gov.tw/tour/english/active/webcam.asp> [cit. 20. 12. 2010].
- 90 http://www.orientaltravel.com/taiwan_map.jpg [cit. 20. 12. 2010].
- 91 <http://www.thisishalkirk.co.uk/> [cit. 27. 10. 2010].
- 92 <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/consumables/columns/lcandle-ms/zorbaxeclipsexdb/pages/default.aspx> [cit. 28. 10. 2010].
- 93 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.
- 94 Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R., M., Guwy, A., J.: Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-

-
- electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2008. vol. 391, pp. 1293-1308
- ⁹⁵ 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.
- ⁹⁶ Lacey, C., McMahon, G., Bones, J., Barron, L., Morrissey, A., Tobin, J., M.: An LC/MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta.* 2008, vol. 75, pp. 1089-1097.
- ⁹⁷ <http://chromservis.cz/item/LUNA-phase?lang=SK> [cit. 2. 11. 2010].
- ⁹⁸ 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.
- ⁹⁹ Lacey, C., McMahon, G., Bones, J., Barron, L., Morrissey, A., Tobin, J., M.: An LC/MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta.* 2008, vol. 75, pp. 1089-1097.
- ¹⁰⁰ <http://www.phenomenex.com/cms400min/product.aspx?id=1083> [cit. 20. 12. 2010].
- ¹⁰¹ <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/> [cit. 16. 11. 2010].
- ¹⁰² http://www.younglin.com/brochure_pdf/waters/HLB.pdf [cit. 16. 11. 2010].
- ¹⁰³ <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/> [cit. 16. 11. 2010].
- ¹⁰⁴ Yu-Chen Lin, A., Panchangam, S., C., Huan-Yo, C.: Implications of human pharmaceutical occurrence in the Sindian river of Taiwan: A strategic study of risk assessment. *Journal of Environmental Monitoring.* 2010, vol. 12, pp. 261 – 270.
- ¹⁰⁵ Richardson, B., J., Lam, P., K., S., Martin, M.: Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China. *Marine Pollution Bulletin.* 2005, vol. 50, pp. 913 – 920.
- ¹⁰⁶ Wang-Ching, L., Hsing-Chang, C., Wang-Hsien, D.: Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2005, vol. 1065, pp. 279 – 285.
- ¹⁰⁷ Kyungho, C., Younghee, K., Jeongim, P., Chan, K., P., Min, Y., K., Hyun, S., K., Pangyi, K.: Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Science of The Total Environment.* 2008, vol. 405, pp. 120 – 128.
- ¹⁰⁸ 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.

-
- 109** 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.
- 110** 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.
- 111** 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.
- 112** Togola, A., Budzinski, H.: Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 2008, vol.1177, pp. 150 – 158.
- 113** 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.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

NSIAD	Nesteroidní protizánětlivá léčiva
COX	Cyklooxygenáza
PG	Prostaglandiny
ČOV	Čistírna odpadních vod
PE	Polyethylen
SPE	Extrakce pevnou fází
LLE	Extrakce kapalina - kapalina
GPC	Gelová permeační chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
RPLC	Chromatografie na obrácených fázích
DAD	Detektor diodového pole
MS	Hmotnostní spektroskopie
ESI	Elektrosprej
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
m/z	Poměr hmotnosti a náboje
MRM	Multiple Reaction Monitoring
ACN	Acetonitril
V	Volt
eV	Elektronvolt
Mr	Molární hmotnost
t _R	Retenční čas
IT	Iontová past
QqQ	Trojité kvadrupól
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit stanovitelnosti
RSD	Relativní směrodatná odchylka
P	Přítok
O	Odtok
S	Svojanov
P	Předměstí
N(R) _T	Nejistota výtěžnosti
N _{CT}	Kombinovaná nejistota analytického postupu
Sa	Kyselina salicylová
Ib	Ibuprofen
Na	Naproxen
Ke	Ketoprofen
Di	Diklofenak
Mef	Kyselina mefenamová
Kof	Kofein

A1-A4	Vzorkovací místa na řece Agongdian
C1-C5	Vzorkovací místa na Kanálu v Tainanu
E1-E8	Vzorkovací místa na řece Erren
Y1-Y6	Vzorkovací místa na řece Yanshuei

8. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1 Životopis

Příloha č. 2 Publikační činnost a absolvování kurzy

Příloha č. 1

Životopis

OSOBNÍ INFORMACE

ADRESA	Ing. Lucie Vydrová
TELEFON	Předměstí, 33, 569 92, Svojanov
E-MAIL	+420 605 571 903
NÁRODNOST	lucka.vydrova@centrum.cz
NAROZENÁ	Česká
	9.2.1982 v Brně

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 Téma diplomové práce: Stanovení reziduí tetracyklinu a chlortetracyklinu v odpadních vodách
1997–2001	Střední průmyslová škola textilní, Brno
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
10.4.2008	Příprava vzorku a jejich chromatografická analýza, Ústav analytické chemie AV ČR, Brno
12.2.2009	Vzdělávací seminář SPME a GC, VŠCHT Praha

ZAHRANIČNÍ 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 – mírně pokročilý

Příloha č. 2

Publikační činnost

10/07 – DETERMINATION OF SELECTED ANTIBIOTICS AND DEGRADATION PRODUCTS IN WASTE WATER ; M. Vávrová, J. Čáslavský, L. Vydrová, H. Vítečková, R. Opatřilová; Book of abstracts of the 14th symposium on environmental pollution and its impact on life in the Mediterranean region with focus on environment and health, 10. – 14. October, 2007, Seville, Spain, ss.324, 2007. ISBN 9788484742142

05/08 – DETERMINATION OF TETRACYCLINES AND SULFONAMIDES IN WASTE WATER – H. Vítečková, L. Vydrová, M. Vávrová, L. Mravcová; 32nd International Symposium on Capillary Chromatography and 5th GC x GC symposium, May 26-30, 2008, Riva del Garda, Italy, ss. 328

09/08 DETERMINATION OF ANTIBIOTICS IN WASTEWATERS (in Czech); H. Vítečková, L. Vydrová, M. Vávrová; 37th Conference Drug Synthesis and Analysis 2008, 8 – 10 September, 2008, Brno, Chem. Papers, vol. 102, s179–s264, 2008 ISSN 0009-2770

09/08 DETERMINATION OF PHARMACEUTICALS IN WATER BY SPE AND HPLC – DAD; L. Vydrová, M. Vávrová, H. Vítečková; 37th Conference Drug Synthesis and Analysis 2008, 8 – 10 September, 2008, Brno, Chem. Papers, vol. 102, s179–s264, 2008 ISSN 0009-2770

09/08 ANTIBIOTICS IN THE ENVIRONMENT; H. Vítečková, L. Vydrová, D. Velebová, M. Vávrová, L. Mravcová, 4th Meeting on Chemistry and Life, 9 – 11 September, 2008, Brno, Chem. Papers, vol. 102, ss 511–513, 2008. ISSN 1803-2389

ASSESSMENT OF SULFATHIAZOLE IN WASTEWATER; H. Vítečková, M. Vávrová, L. Nová, L. Vydrová; Fresenius Environmental Bulletin, 2008, pp. 1846–851, ISSN:1018-4619

Absolvované kurzy a školení:

10. - 14. září 2007 8. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, Lednice

8.- 11.10. 2007 kurz Analýza organických látek, Pohořelice

prosinec 2007 kurz celoživotního vzdělávání Aktuální evropská legislativa v potravinářství a životním prostředí, VUT Brno

31.1.2008 vzdělávací seminář SPME a GC, VŠCHT Praha

12.3.2008 seminář LC/MS/MS v analýze malých molekul, Applied Biosystems

10. 4. 2008 Příprava vzorku a jejich chromatografická analýza, Ústav analytické chemie AV ČR, Brno

29. - 31. 10. 2008, Complex Systems and Changes: Water and Life, Taormina, Sicily (Italy)

12. 2. 2009, Vzdělávací seminář SPME a GC, VŠCHT Praha