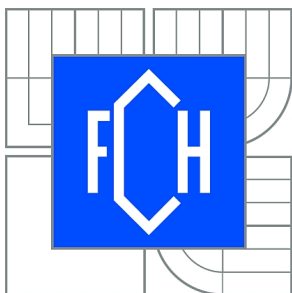


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

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 KAPILÁRNÍ ZÓNOVÉ ELEKTROFORÉZY PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH ANALGETIK VE VODÁCH

USE OF CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS FOR DETERMINATION OF SELECTED
ANALGETICS IN WATER

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. LUKÁŠ ČAPKA

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-DIZ0048/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	Ing. Lukáš Čapka	
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 kapilární zónové elektroforézy pro stanovení vybraných analgetik ve vodách

Zadání dizertační práce:

Výběr vhodných léčiv pro analýzu a výběr odběrových lokalit
Vypracování vhodné techniky pro separaci a zakoncentrování analytů; optimalizace metody
Provádění odběrů na ČOV; stanovení analytů v modelových a reálných vzorcích vod
Zhodnocení získaných výsledků
Vypracování dizertační práce

Termín odevzdání dizertační práce: 30.8.2011

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

Ing. Lukáš Čapka
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2008

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V posledních letech se z hlediska environmentální analýzy stala na celém světě velmi populární otázka průniku reziduí léčiv do složek životního prostředí. Tyto kontaminanty patří mezi biologicky aktivní látky, odlišující se svými fyzikálně-chemickými a biologickými vlastnostmi, vykazující vysoký sklon k bioakumulaci. Do životního prostředí pronikají zejména se stále zvyšující se spotřebou, případně také nesprávnými postupy při jejich likvidaci. Mezi nejčastěji využívaná farmaka patří léky proti bolesti – analgetika a z této skupiny tzv. nesteroidní protizánětlivé látky. Důvodem jejich často nadměrného užívání je jejich snadná dostupnost. Z této velmi obsáhlé skupiny látek byla pro monitoring vybrána léčiva diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, kyselina salicylová, naproxen a paracetamol, jelikož jsou jako účinné látky obsažené v nejvíce používaných preparátech. Sledovanou matricí byla odpadní voda ze dvou čistíren odpadních vod (ČOV), odebíraná na přítoku a odtoku, aby mohly být porovnány nejenom rozdílné koncentrace cílových analytů, ale zejména zjištěna účinnost jejich odstranění, a to v závislosti na použitých technologiích čištění. Pro extrakci sledovaných kontaminantů byla využita extrakce pevnou fází (SPE) a jako analytická koncovka kapilární zónová elektroforéza (CZE) s detekcí diodovým polem (DAD). V rámci experimentu byla identifikována a následně kvantifikována všechna sledovaná analgetika, a to jak na přítoku, tak i odtoku ČOV; bylo potvrzeno, že se tyto polutanty dostávají do povrchových vod i do dalších složek životního prostředí.

KLÍČOVÁ SLOVA

léčiva, analgetika, nesteroidní protizánětlivé látky, odpadní voda, extrakce tuhou fází, kapilární zónová elektroforéza

ABSTRACT

From viewpoint of environmental analysis in the whole world became popular in the latest years the question of drugs' breakthrough to the component of environment. These contaminants belong to the biological active compounds, with different physical-chemical and biological properties and evince great tendency to bioaccumulation. They penetrate to the environment because of their increasing of usage and wrong techniques of liquidation. The most often use drugs are preparations against pain – analgetics, and from this category there are non-steroidal anti-inflammatory drugs. The frequent usage of this compounds relate to their easy accessibility. From this large group of compounds was chosen for monitoring: diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, salicylic acid, naproxen and acetaminophen; because they include in favorite preparations. The monitoring matrix was the wastewater from two waste water treatment plants (WWTP). The sampling was performed in inflow and outflow because the comparing of concentration of selected contaminants and discovering of efficiency of removing the pollutants reliance on treatment technology. For extraction of selected contaminants was used solid phase extraction (SPE) and for determination was used capillary zone electrophoresis (CZE) with diode array detection (DAD). There was identified and quantified all of selected analgetics in inflow and so in outflow of WWTP. That means, this pollutants infuse into surface water and then into other components of environment.

KEYWORDS

pharmaceuticals, analgetics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, wastewater, solid phase extraction, capillary zone electrophoresis

ČAPKA, L. *Využití kapilární zónové elektroforézy pro stanovení vybraných analgetik ve vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 136 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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 odborné vedení dizertační práce a dalším pracovníkům a doktorandům ÚCHTOŽP za pomoc při řešení dílčích problémů. Dále děkuji zaměstnancům firmy Brněnské vodárny a kanalizace a.s. za pomoc při odběrech vzorků, zejména panu Bc. Robertu Hrazdilovi za poskytnuté informace a materiály.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Léčiva	10
2.1.1 Základní pojmy	10
2.1.2 Názvosloví	11
2.1.3 Historie.....	11
2.2 Biomembrány	14
2.2.1 Význam biomembrán.....	14
2.2.2 Molekulové složky biomembrán.....	15
2.2.3 Molekulová organizace a její vlastnosti.....	15
2.2.4 Biomembránový transport	16
2.3 Osud léčiva v organismu	19
2.3.1 Penetrace do organismu	19
2.3.2 Distribuce v organismu	19
2.3.3 Mechanismy účinku léčiv	20
2.4 Léčiva v povrchových a odpadních vodách.....	21
2.4.1 Aspekty biotransformace léčiv	21
2.4.2 Zdroje průniku léčiv do životního prostředí	22
2.4.3 Osud léčiva v životním prostředí	24
2.4.4 Perzistence léčiv v životním prostředí	26
2.5 Analgetika.....	27
2.5.1 Vnímání bolesti.....	27
2.5.2 Analgetika-antipyretika (NSAIDs)	28
3 ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ LÉČIV	37
3.1 Vzorkování	37
3.1.1 Obecné problémy vzorkování	37
3.1.2 Kontaminace vzorků	37
3.1.3 Vzorkování povrchových vod.....	38
3.1.4 Konvenční odběr vzorku.....	39
3.1.5 Pasivní vzorkování.....	40
3.2 Extrakce.....	56
3.2.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE).....	56
3.2.2 Extrakce pevnou fází (SPE)	56
3.3 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	60
3.3.1 Princip metody	60

3.3.2 Uspořádání metody	63
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	68
4.1 Používané přístroje a zařízení	68
4.2 Software pro zpracování a prezentaci dat.....	68
4.3 Používané chemikálie a standardy	68
4.3.1 Chemikálie	68
4.3.2 Standardy léčiv.....	68
4.4 Sledovaná matrice.....	69
4.4.1 Odpadní voda z ČOV do 10 000 EO	69
4.4.2 Odpadní voda z velkokapacitní ČOV	69
4.5 Stanovované analyty a jejich vlastnosti.....	70
4.5.1 Kyselina salicylová	70
4.5.2 Kyselina acetylsalicylová.....	70
4.5.3 Paracetamol.....	70
4.5.4 Diklofenak.....	70
4.5.5 Ibuprofen.....	71
4.5.6 Ketoprofen	71
4.5.7 Naproxen.....	71
4.6 Pracovní postupy	71
4.6.1 Výběr vhodných NSAIDs pro analýzu	71
4.6.2 Stanovení optimálních podmínek pro CZE analýzu	74
4.6.3 Ověření stability vybraných analytů	81
4.6.4 Výpočet kalibračních křivek a limitů detekce a stanovitelnosti	83
4.6.5 Optimalizace extrakce pevnou fází pro vybrané analyty	85
4.6.6 Odběry vzorků	89
4.6.7 Úprava vzorků.....	89
4.6.8 Extrakce tuhými fázemi	90
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	92
5.1 Stanovení vybraných léčiv v reálných vzorcích	92
5.1.1 Stanovení NSAIDs na ČOV do 10 000 EO	92
5.1.2 Stanovení NSAIDs na velkokapacitní ČOV	102
5.1.3 Srovnání vybraných ČOV při odbourávání sledovaných analytů.....	111
5.2 Porovnání získaných dat s publikovanými údaji.....	112
6 ZÁVĚR	114
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	115
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	124

9 SEZNAM PŘÍLOH	128
10 PŘÍLOHY	129
10.1 Příloha 1: Přístroj pro CZE.....	129
10.2 Příloha 2: Zařízení pro SPE	130
10.3 Příloha 3: Schéma kanalizační sítě vedoucí na ČOV Brno-Modřice.....	131
10.4 Příloha 4: Příklad elektroforegramu odpadní vody na přítoku ČOV....	132
10.5 Příloha 5: Příklad elektroforegramu odpadní vody na odtoku z ČOV..	133
10.6 Příloha 6: Životopis	134
10.7 Příloha 7: Vědecké aktivity.....	135
10.8 Příloha 8: Publikační činnost.....	136

1 ÚVOD

Během posledních několika let se nejen u nás, ale na celém světě stala velmi populární otázka ochrany životního prostředí. Z hlediska environmentální analýzy se začaly sledovat nové kontaminanty, které se však již velmi dlouhou dobu dostávají do složek životního prostředí. Mezi tyto polutanty patří biologicky aktivní látky. Tato skupina látek má neblahý vliv na celý ekosystém, zejména z důvodu bioakumulace v nejrůznějších složkách životního prostředí. Do této skupiny patří i léčiva, u kterých prokazatelně stoupá spotřeba, a to v důsledku neustále se zvyšující životní úrovně. Se zvyšující se spotřebou léčiv však také vzrůstá koncentrace odpadních produktů, kam mohou tyto látky pronikat jak v původní, tak v metabolizované formě.

Mezi jedny z nejpoužívanějších léčiv patří skupina nesteroidních protizánětlivých látek, také někdy nazývaná analgetika-antipyretika. Tyto přípravky jsou velmi oblíbené zejména proto, že velké procento z nich lze zakoupit volně bez lékařského předpisu. V domácnostech se tak mohou nacházet i v nadměrných množstvích a po uplynutí expirační doby se pak často nespřícně likvidují. Dostávají se do odpadní vody, která je největším prokázaným zdrojem kontaminace životního prostředí. Během posledních let bylo vybudováno nebo zrekonstruováno velké množství čistíren odpadních vod. Problematicky se projevují používané technologie, které jsou nedokonalé při odbourávání této skupiny biologicky aktivních látek. Ty totiž nejsou z odpadní vody zcela odstraněny a neblaze působí na biologické procesy při čištění. Proto se potom dostávají do recipientu, povrchových vod a dále do různých složek životního prostředí.

Pokud je prokazatelná zvyšující se spotřeba těchto látek a jejich následný průnik do ekosystému, je naprosto nezbytné tyto polutanty neustále monitorovat a vyvíjet nové a dokonalejší metody pro jejich stanovení. Kapilární zónová elektroforéza je metoda poměrně instrumentálně nenáročná a rychlá. Velkou výhodou, a to v porovnání s chromatografickými metodami, je velmi malá spotřeba vzorku a chemikálií. S tím souvisí nejenom nižší finanční náklady, ale zejména možnost vyššího zakoncentrování vzorku do menšího objemu při extrakci, čímž lze docílit nižších limitů detekce. Cílem této práce je optimalizovat tuto metodu tak, aby bylo možné ji použít na sledování cílových analytů ve vodním ekosystému.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Léčiva

2.1.1 Základní pojmy

Léčivo tvoří léčivá látka, směs léčivých látek nebo léčivý přípravek (1). Podrobná definice je uvedena v zákonu č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech).

Léčivými látkami se rozumějí látky přírodního nebo syntetického původu s farmakologickým nebo imunologickým účinkem nebo látky ovlivňující metabolismus. Tyto látky slouží k prevenci, léčení a zmírnění chorob, k diagnostice a k ovlivňování fyziologických funkcí (2).

Léčivým přípravkem se rozumí látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že působí léčivě nebo má preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat (3). Humánní léčivé přípravky jsou určeny k podání lidem, veterinární léčivé přípravky k podání zvířatům.

Pomocné látky léčiv jsou složky léčivých přípravků bez vlastního léčebného účinku. Umožňují a usnadňují však výrobu, přípravu, uchovávání a aplikaci léčivých přípravků, případně mohou příznivě ovlivňovat farmakokinetické vlastnosti, tj. biologickou dostupnost přítomných léčivých látek.

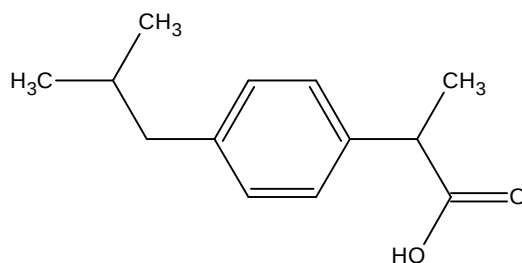
Léková forma představuje způsob úpravy léčiva do formy vhodné pro léčebné použití. Léková forma musí být přizpůsobená požadované cestě přívodu léčiva do organismu a musí respektovat jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Podle způsobu podání se lékové formy dělí na enterální (podávané prostřednictvím trávicí trubice) a parenterální (podávané mimo trávicí trubici). Nejobvyklejší enterální cesta podání je ústy (per os). Takto se podávají např. tablety, dražé (potahované tablety), prášky v kapslích, roztoky, suspenze a emulze. Konečníkem (per rectum) se podávají čípky. Parenterální lékové formy jsou injekce, infúze, inhalované plyny nebo aerosoly a zevně podávané zásypy, masti, pasty, krémy, pěny, náplasti aj. Vazbou léčiva na vhodnou matici, např. na některé polymery, lze docílit jeho postupného uvolňování v průběhu delšího časového intervalu, tzv. protražovaného účinku léčiva (2).

Máme-li tedy léčivý přípravek o určité lékové formě, je připraven ke svému zamýšlenému použití, tj. podání pacientovi. Pokud je podán správným způsobem, jak bylo zamýšleno výrobcem, stává se v tomto okamžiku lékem (1).

Proléčiva (profarmaka, prodrugs) jsou neúčinné prekurzory, ze kterých vznikají účinné látky teprve metabolickými pochody v organismu. Hlavním důvodem přípravy proléčiv je modifikace nevhodných vlastností některých léčiv, kterými mohou být např. jejich příliš malá nebo naopak velká rozpustnost a z ní vyplývající omezená dostupnost pro cílové tkáně, dále nespecifický účinek, malá stabilita, dráždivost, nepříjemná chuť nebo zápach apod. (2).

2.1.2 Názvosloví

Každé syntetické léčivo je chemická sloučenina, kterou můžeme pojmenovat systematickým názvoslovím podle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry – Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii). Tyto názvy se však v praxi nepoužívají, neboť bývají příliš dlouhé a málo přehledné. Proto má každé léčivo tzv. generický název či INN (International Non-Proprietary Name), který nejčastěji vzniká zkrácením názvu systematického. Generický název je evidován Světovou zdravotnickou organizací (WHO – World Health Organization) a pod tímto názvem lze údaje o příslušném léčivu vyhledat nejen ve farmaceutické literatuře, např. v lékopisech, nýbrž i v literatuře chemické, jako jsou např. Chemical Abstracts. Různé farmaceutické společnosti vyrábějí totéž léčivo pod různými obchodními názvy (trade names); tyto názvy představují obchodní značku, která bývá předmětem chránění. Jako příklad lze uvést analgetikum a protizánětlivou látku ibuprofen (Obr. 1). Její systematický název je kyselina ($\pm$) 2-(4-isobutylfenyl)propanová a na trhu se prodává pod nejrozličnějšími obchodními názvy: AKTREN, BRUFEN, DOLGIT, EXNEUTRAL, IBUMERCK, MOTRIN, NUROFEN a mnohé další (2).



Obr. 1: Vzorec ibuprofenu

2.1.3 Historie

V průběhu historie prodělal způsob získávání léčiv pozoruhodný vývoj. Na jeho počátku byla léčiva připravována výhradně z přírodních zdrojů a vznikala na základě zkušeností lidového léčitelství. Na jeho konci jsou průmyslově vyráběná chemoterapeutika definovaného složení a účinku. Moderní chemoterapeutika jsou výsledkem racionálního výběru prováděného v rámci cíleného farmaceutického výzkumu a představují většinu z léčiv užívaných v současné době.

V tzv. etapě přírodních léčiv bylo empiricky, metodou pokus-omyl, nashromážděno obrovské množství poznatků o účincích různých přírodních látek na lidský organismus. Jednalo se přitom nejen o účinky léčivé. Bylo objeveno i psychotropní působení různých materiálů: omamné účinky opia, psychostimulační účinky listů koky aj. Byly získány a využívány také poznatky toxikologické, např. znalost tzv. šípových jedů – kurare. Tato etapa, charakterizovaná výhradním používáním přírodních materiálů k přípravě léků, trvala v Evropě zhruba do 16. století. Léčiva pocházející z této etapy se často označují jako léčiva první generace (2).

První cílená léčba chemickými prostředky byla Paracelsem propagovaná (a snad i vyvinutá) „šedá masť“ na syfilitické vředy. Jejím základem byla suspenze rtuti v sádle. Dnes víme, že působila především celkově; rtuť se přes rány částečně vstřebala a baktericidně působila na

Pokrok, ke kterému došlo v oblasti experimentální chemie na přelomu 18. a 19. století, umožnil izolaci řady organických látek obsažených v přírodním materiálu. Jednou z největších osobností uvedeného období byl Scheele, který získal v čistém stavu např. glycerol, kyselinu benzoovou, jablečnou, vinnou a močovou. Velkým přínosem pro rozvoj farmaceutické chemie byla izolace alkaloidu morfinu z opia, kterou provedl roku 1803 Sertürner.

COC1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)C(CO)[C@H]3CC[C@H](C=C)N3
$$\begin{array}{ccccccc} \text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} & \xrightarrow{\text{Cl}_2} & \text{CH}_3\text{CHO} & \xrightarrow{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} & \text{H}_3\text{C}-\text{CH} & \xrightarrow{\text{Cl}_2} & \\ & & & & \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \end{array} & & \\ & & & & \text{semiacetal} & & \\ & & & & & & \\ \xrightarrow{\text{Cl}_2} & & \text{Cl}_3\text{C}-\text{CH} & \xrightarrow{\text{H}_2\text{SO}_4} & \text{Cl}_3\text{C}-\text{C} & \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} & \text{Cl}_3\text{C}-\text{CH} \\ & & \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{OC}_2\text{H}_5 \end{array} & & \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} \end{array} & & \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{array} \\ & & \text{semiacetal chloral} & & \text{chloral} & & \text{chloralhydrát} \end{array}$$

12

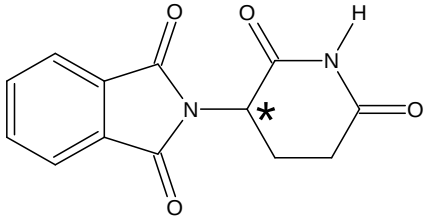
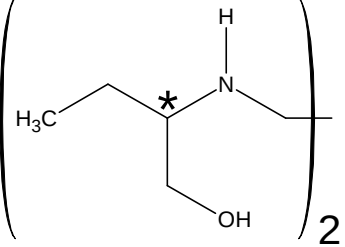
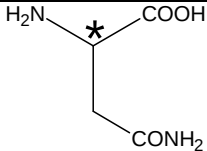
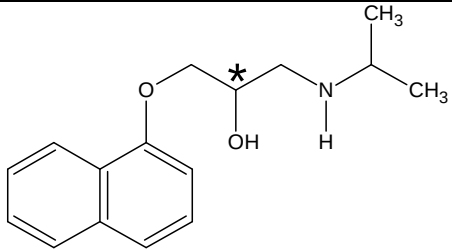
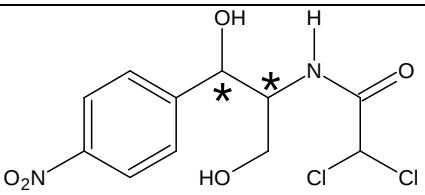
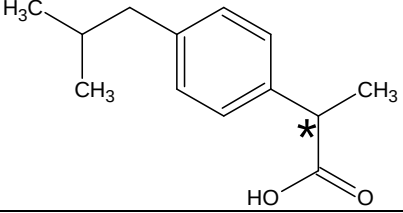
Snaha o zjednodušení struktury léčiv a jejich obměny vedla v řadě případů k rozpoznání tzv. nepostradatelného, neboli esenciálního strukturního fragmentu molekuly, který určuje biologickou aktivitu látek. Látky, které vznikly cílenou obměnou struktury sloučenin přírodního, případně syntetického původu o známém biologickém účinku, se považují za léčiva třetí generace (2).

Rozvoj biochemie ve 20. století významně ovlivnil i vývoj léčiv. Biochemie umožnila vysvětlit podstatu transportu, distribuce, metabolismu a vylučování léčiv z organismu. V řadě případů se podařilo odhalit též strukturu receptorů, tj. specializovaných vazebných míst v buňce, která po interakci s látkami komplementárních chemických struktur navozují charakteristickou odpověď organismu. Vznikl nový vědní obor zvaný farmakologie, který se zabývá vzájemnými interakcemi léčiva a organismu.

Ve 2. polovině 20. století se začal rozvíjet obor, v literatuře často označovaný jako QSAR (Quantitative structure-activity relationship). Znalost vztahů mezi strukturou chemických látek a jejich biologickou aktivitou by teoreticky umožňovala predikovat biologickou aktivitu i u těch látek, které dosud nebyly syntetizovány, a takto racionalizovat proces vyhledávání nových léčiv, pesticidů, herbicidů apod. Farmaka, jejichž struktura byla navržena s využitím korelačních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou sloučenin, se označují jako léčiva čtvrté generace.

Na rozdíl od té části farmaceutického výzkumu, která se zabývá vyhledáváním nových biologicky aktivních látek, doznala oblast hodnocení a testování nových léčiv nejpodstatnějších změn teprve v posledních desetiletích. Tragické případy poškození pacientů vyvolané nepoznanými vedlejšími účinky léků, vedly ke značnému zpřísnění testování nových potenciálních léčiv a ke zpřísnění jejich schvalovacího řízení. Asi nejznámějším případem léčiva s nežádoucími vedlejšími účinky bylo hypnotikum thalidomid, uvedené na trh jako racemát v první polovině 50. let 20. století. Jeden ze stereoizomerů uvedené látky má prokázané teratogenní účinky (2). V následující tabulce jsou uvedeny některé další příklady stereoizomerů a jejich vlastnosti.

Tab. 1: Vliv struktury chirálních sloučenin na biologickou aktivitu (6)

Thalidomid		<i>R</i> - neteratogenní <i>S</i> - extrémně teratogenní
Ethambutol		<i>R,R</i> - způsobuje oslepnutí <i>S,S</i> - tuberkulostatikum
Asparagin		<i>R</i> - sladký <i>S</i> - hořký
Propranolol		<i>R</i> - kontraceptivum <i>S</i> - antihypertenzivum, anti-arytmikum
Chloramfenikol		<i>R,R</i> - antibiotikum <i>S,S</i> - inaktivní
Ibuprofen		používá se racemát, avšak pouze (<i>S</i>)-enantiomer má protizánětlivý účinek

2.2 Biomembrány

2.2.1 Význam biomembrán

Biologické membrány jsou plošné organizované nadmolekulové struktury o tloušťce 4 až 13 nm, které jsou nepostradatelné pro život. Existují různé typy membrán, lišících se ve struktuře i funkcích; přesto však mají řadu společných vlastností. Nejvíce je prostudována vnější membrána všech buněk, často nazývaná (cyto) plasmová (nebo buněčná) membrána. Tvoří fázové rozhraní mezi buňkou a jejím okolím. Je to ochranná bariéra, která propouští z prostředí do buňky jen některé látky a současně dovozuje vylučovat některé buněčné produkty a potřebné látky v buňce zadržovat. Má proto rozhodující úlohu při výměně látek mezi

buňkou a okolím a při udržování konstantnosti vnitřního prostředí buňky. Z hlediska transportní funkce lze biomembrány charakterizovat jako bariéry omezující volnou difuzi látek. Nejde však o nepropustné stěny, ale o vysoce selektivní permeabilní předěly, regulující molekulové a iontové složení vnitrobuněčného prostředí (7).

2.2.2 Molekulové složky biomembrán

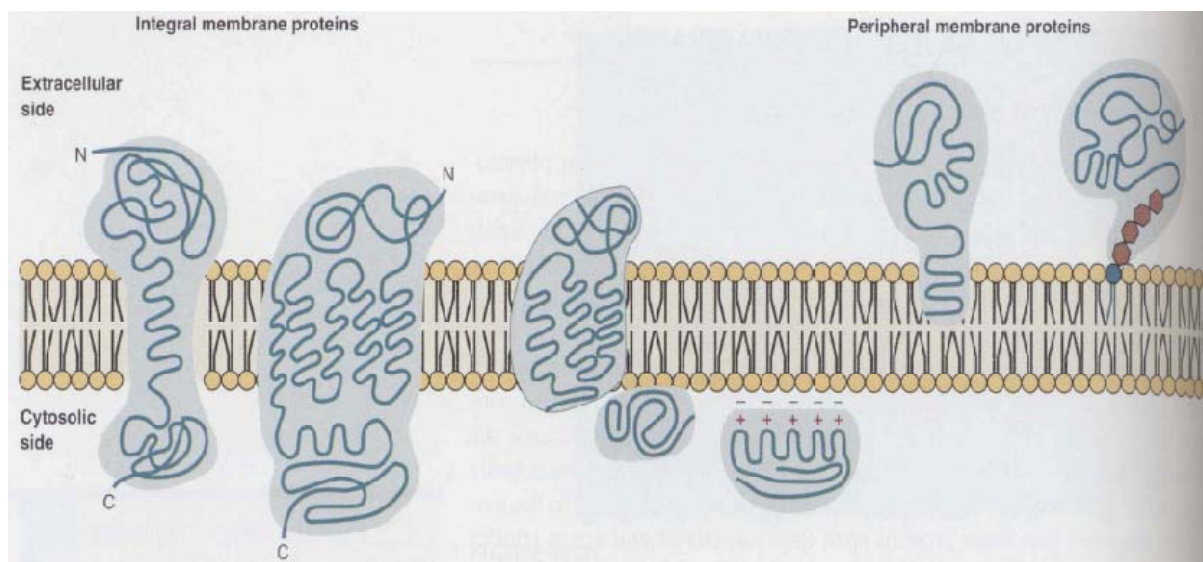
Z chemického hlediska jsou buněčné membrány struktury zbudované z molekul lipidů, bílkovin a sacharidů, které jsou v organizovaném uspořádání udržovány nekovalentními interakcemi. Z fyzikálního hlediska to jsou dvojrozměrné kapaliny. Již v roce 1925 E. Gorter a F. Grendl navrhli za základní prvek tzv. lipidovou dvojvrstvu, v níž jsou molekuly polárních lipidů uspořádány tak, že v obou monomolekulových vrstvách jsou dlouhé osy molekul kolmé na rovinu dvojvrstvy. Přitom polární části molekul každé monovrstvy jsou orientovány směrem ven, tj. vně, resp. dovnitř buňky, a jsou v kontaktu s vodným prostředím. Nepolární části lipidových molekul pak směřují dovnitř dvojvrstvy, takže nejsou v dotyku s vodou a rozpuštěnými látkami; tvoří hydrofobní fázi separující dva vodné roztoky (Obr. 4).

Lipidová dvojvrstva ideálně splňuje požadavky kladené na membrány. Je nepropustná pro ionty a většinu polárních molekul, dále je kapalná, takže může sloužit jako rozpouštědlo pro membránové bílkoviny, samovolně zacelí vzniklý otvor a umožňuje splnutí membrán, když se dvě buňky spojují v jedinou (7).

2.2.3 Molekulová organizace a její vlastnosti

Postupně bylo navrženo několik modelů uspořádání molekul lipidů a bílkovin v membránách. Ukázalo se, že membrány nemají jednotnou strukturu. Pro mnohé z nich jsou vhodné modely s bimolekulovou lipidovou vrstvou, do níž jsou vklíněny, nebo kterou prostupují molekuly bílkovin. V některých membránách však tvoří základ skelet bílkoviny a lipidy jen obklopují tyto stavební složky.

Ke konci padesátých let 20. století se zvýšila rozlišovací schopnost elektronové mikroskopie do té míry, že umožnila přímý pohled na strukturu membrán a vytvoření dnes obecně přijímané představy o stavbě membrán. Zdůrazňuje dynamický charakter jejich organizace: membrány jsou pojímány jako dvourozměrné roztoky orientovaných globulárních bílkovin a lipidů. Model, který nejlépe vystihuje tuto koncepci, je v případě cytoplasmových membrán tzv. model tekuté (fluidní) mozaiky, vytvořený S. Singerem a G. Nicolsonem v roce 1972 (Obr. 4) (7).



Obr. 4: Struktura biomembrány (8)

2.2.4 Biomembránový transport

Jedna z nejdůležitějších funkcí většiny membrán je funkce transportní. Membrány zajišťují nejen přísun živin do buňky a odstraňování odpadních produktů metabolismu z buňky, ale přispívají i k udržení optimálních osmotických poměrů v buňkách a mezibuněčných prostorech a vytvářejí a udržují potřebné chemické a elektrochemické gradienty.

Přestup látek přes membránu může probíhat různými mechanismy. Jsou závislé na složení a strukturách biologických membrán a na povaze přenášovaných látek (na jejich velikosti, polaritě, náboji). V zásadě můžeme různé mechanismy membránového transportu rozdělit do dvou skupin – na nespecifickou permeaci a na specifický transport (Obr. 5) (7).

2.2.4.1 Nespecifická permeace

Způsob transmembránového pohybu, který není specificky katalyzován bílkovinami, je obecně nazýván nespecifická permeace (prostup) nebo, vzhledem ke kinetickému popisu, prostá difúze. Je to soubor pochodů, jimiž se rozpouštěné látky (ionty nebo nenabitě molekuly) dostávají z jedné strany membrány na druhou bez potřeby dodání energie nad energii představovanou rozdílem chemických nebo elektrochemických potenciálů dané látky na obou stranách membrány.

Přenos látek prostou difúzí může probíhat různými způsoby:

- Rozpouštěním v membránových lipidech a redistribucí na druhé straně membrány (Takto prostupuje řada organických molekul, včetně většiny chemoterapeutik a plyny rozpouštěné ve vodě: O_2 , N_2 , H_2 , CO_2)
- Prostup nepravidelnostmi v uspořádání lipidů (tímto mechanismem přechází asi 5–15 % translokovaného množství vody)
- Průtok skutečnými póry v membráně (v membráně, která se stále vlní, vznikají s polčasem 1 μs drobné póry o průměru kolem 0,3 nm)

- Pohyb hydrofilními kanálky vyplněnými vodou (tvoří je bílkoviny a mohou jimi procházet ve vodě rozpuštěné látky) (7)

2.2.4.2 *Specifický přenašečový transport*

Základním mechanismem je pohyb zprostředkovaný bílkovinným přenašečem. Ten rozezná přenášenou látku, naváže ji a přenesení (sám nebo prostřednictvím dalších bílkovin) prostorem membrány a na jejím opačném povrchu ji z vazby uvolní. Vazebných míst je na přenašeči konečný počet, takže při tomto typu transportu pozorujeme proces sycení, kompetici i inhibici, jako v kinetice účinku enzymů. Bílkovinné přenašeče většinou nejsou pohyblivé, ale jsou to transmembránové bílkoviny a fungují změnou konformace vazebného místa. Změnou polohy jednoho nebo dvou aminokyselinových zbytků se vazebné místo „otevřít“ na jedné nebo druhé straně membrány.

Membránové přenašeče, které nevyžadují dodání energie, bývají nazývány permeasy. Nemají vliv na směr průchodu – ten je dán koncentračním spádem transportované látky (pouze zvyšují rychlost přenosu: je asi 100 až 1000krát větší než při prosté difúzi; hovoříme o usnadněné (zprostředkované, katalyzované) difúzi; naopak, když stejný nosič může v opačném směru přenášet jinou látku, mluvíme o výměnné difúzi).

Při nespecifické permeaci i zprostředkované difúzi probíhá látkový tok přenášených látek do prostředí o jejich nižší koncentraci, tj. ve směru poklesu jejich chemického (v případě iontů přesněji elektrochemického) potenciálu. Hovoříme proto o tzv. pasivním transportu. Častější je však případ opačný, tj. přenos v obráceném směru, proti koncentračnímu gradientu (proti poklesu chemického potenciálu), označovaný jako aktivní transport (Obr. 5).

Pro aktivní transport tedy není rozhodující gradient chemického potenciálu přenášené látky (ten může být kladný, nulový nebo záporný), nýbrž odlišný mechanismus přenosu, zahrnující dodání energie. Její potřebné množství vystihuje Nernstova rovnice:

$$\Delta G_{trans} = -RT \ln \frac{C_{out}}{C_{in}}, \quad (Rov. 1)$$

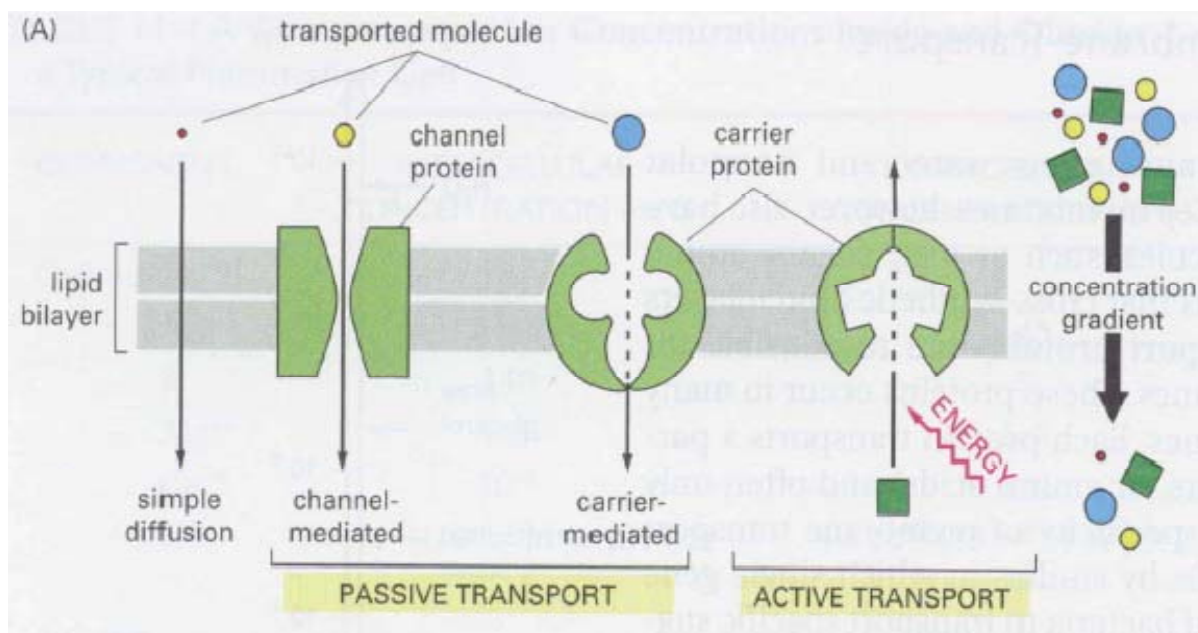
kde C značí koncentraci přenášené látky.

Energie může být získána hydrolytickým štěpením molekul s vysokým obsahem energie (ATP), dále oxidací substrátu, dekarboxylací oxokyseliny a výjimečně pohlcením fotonu (známe jen u bakteriorhodopsinu ze slanomilných bakterií). Ve všech těchto případech hovoříme o primárním aktivním transportu.

Některé transportní systémy používají energii gradientů iontů H^+ nebo Na^+ , které jsou současně s transportem udržovány nějakým primárním přenašečovým mechanismem (ATPasou, oxidací apod.). Tento způsob přenosu nazýváme sekundární aktivní transport.

Aktivní transport některých látek může být spojen s jejich enzymovou přeměnou. Na jedné straně vstupují do membrány, v ní proběhne jejich přeměna a na druhé straně vystupují v jiné

formě – jako produkt reakce (často jde o fosforylaci). Tento druh přenosu bývá nazýván skupinová translokace (7).



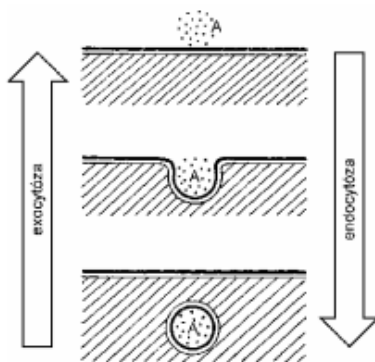
Obr. 5: Membránový transport (8)

2.2.4.3 Pinocytóza

Molekuly příliš velké pro průchod kanály nebo póry, jako jsou molekuly bílkovin a nukleových kyselin, nejsou přenášeny pomocí nosičů. Pro jejich průchod membránou užívají buňky buď složitý proces vstřebávání, označovaný jako pinocytóza, nebo speciální systémy, užívající enzymy. Pinocytóza zahrnuje lokální přestavbu membrány – odděluje se její část za tvorby váčku obalujícího přenášenou látku. Jsou-li tyto váčky transportovány z media od buňky, hovoříme o endocytóze, v případě přenosu z cytoplazmy ven z buňky, o exocytóze (Obr. 6). Pinocytózou však nejsou transportovány jen makromolekuly biopolymerů, ale i různé malé molekuly, jako jsou neurotransmitery nebo malé molekuly a ionty rozváděné v organismu, vázané na makromolekulové nosiče (7).

2.2.4.4 Fagocytóza

Jedná se o druh endocytózy, prostřednictvím které jsou pohlcovány větší částice. Plazmatická membrána vytváří výběžky (panožky), které obklopí částici a uzavřou ji do měchýřku (9). Fagocytóza nastává pouze ve specializovaných buňkách, jako jsou makrofágy a granulocyty, kde jsou pohlcovány např. viry, bakterie, buňky a jejich zlomky. V tomto ohledu jsou makrofágy extrémně aktivní, mohou za hodinu strávit 25 % svého objemu (10).



Obr. 6: Endocytóza a exocytóza (11)

2.3 Osud léčiva v organismu

2.3.1 Penetrace do organismu

Cesty vstupu (penetrace) cizorodých látek do organismu jsou různé. Nejčastější je vstup zažívacím traktem, méně častý pokožkou (dermální způsob), sliznicí a plyné látky a aerosoly vstupují do organismu respiračním systémem (inhalace). Ve výjimečných případech, např. při zraněních nebo při některých aplikacích léků, může dojít k průniku nitrožilnímu, nitrosvalovému nebo podkožnímu. Po vstupu do organismu a vstřebání (resorpci) dochází k jejich interakcím se složkami organismu. Přitom probíhající procesy lze obecně rozdělit do dvou fází: farmakokinetické, zahrnující osud farmaka *in vivo* až k dosažení místa účinku a farmakodynamické, tj. více nebo méně specifická reakce farmaka s receptory v místě působení, které vede prostřednictvím řetězce biochemických reakcí k vyvolání odpovídajícího biologického (farmakologického) účinku (7).

2.3.2 Distribuce v organismu

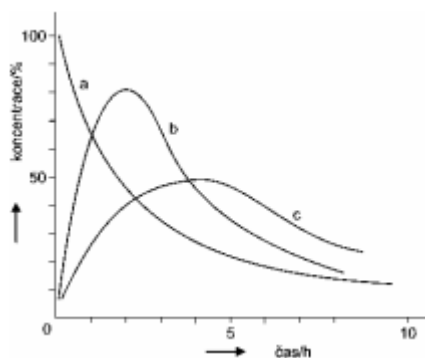
Interakce léčivo-organismus jsou poměrně komplikované a představují soubor propojených a vzájemně podmíněných procesů. Distribuci léčiva v organismu významně ovlivňuje jeho vazba na proteiny krevní plasmy. Pevnost této vazby vyjadřuje hodnota rovnovážné konstanty K :

$$K = \frac{c_{LP}}{c_L \cdot c_P}, \quad (\text{Rov. 2})$$

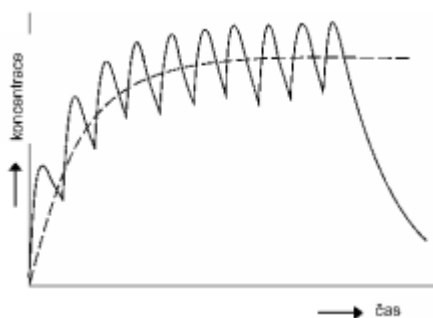
kde c_L je rovnovážná koncentrace volného léčiva, c_P – rovnovážná koncentrace volného proteinu a c_{LP} rovnovážná koncentrace komplexu léčivo-protein.

Léčivo vyskytující se ve volné formě je v organismu většinou vystaveno působení nespecifických enzymových reakcí, při kterých dochází k jeho přeměnám (biotransformaci, metabolismu) na látky lépe rozpustné ve vodě, a proto schopné vyloučení (exkrece) z organismu. Při biotransformaci mohou vznikat metabolity, které vykazují stejný farmakologický účinek jako původní látka. Metabolická přeměna však může vést také ke vzniku neúčinné látky (inaktivace, detoxikace) nebo naopak ke vzniku látky účinnější (aktivace). Jsou však známy i případy, kdy metabolickými přeměnami vzniká látka toxická, případně výrazně toxičtější než látka

původní (např. přeměna methanolu na formaldehyd). Jen výjimečně nedochází v organismu k biotransformaci látek. Biotransformace je většinou dvoustupňový proces. V první fázi probíhá oxidace, redukce nebo hydrolyza za vzniku metabolitů, které jsou převážně polárnější a proto lépe rozpustné v tělních tekutinách než původní látka. V druhé fázi probíhají konjugací (syntetické) reakce s endogenními produkty normálního metabolismu a vzniklý konjugát, který je ve vodě rozpustný, se vylučuje převážně močí, stolicí a potem (2).



Obr. 7: Závislost koncentrace látky v krvi na čase (koncentrace je udána v % výchozího stavu). (a) – jednorázové intravenózní podání, (b) a (c) – jednorázové perorální podání (12)



Obr. 8: Typický průběh závislosti koncentrace léčiva v krvi na čase při opakovaném podání (13)

2.3.3 Mechanismy účinku léčiv

2.3.3.1 Specifické mechanismy účinků léčiv

Účinek léčiv je důsledkem jejich interakcí se specifickými biopolymery (nejčastěji proteiny) v organismu, tzv. receptory. Navázání léčiva na receptor je ve většině případů zprostředkován různými typy slabých interakcí. V první fázi se převážně uplatňují atraktivní elektrostatické síly: ion-ion, ion-dipól apod. V následující fázi dochází k orientaci molekuly léčiva a jejímu konformačnímu přizpůsobení tvaru receptoru; nakonec dochází k fixaci na receptor prostřednictvím vodíkových můstků, CT-interakcí, hydrofobních interakcí a van der Waalsových sil. Výsledkem je vznik komplexu s minimálním obsahem Gibbsovy energie. Na uvedený proces lze rovněž pohlížet jako na vznik supramolekulární struktury koordinací ligandu (léčiva) k receptoru.

Vazba léčiva k receptoru je provázena změnami konformace biopolymeru, které mění celou řadu jeho vlastností, a tak zahajují sled biochemických pochodů vedoucích k buněčné odezvě. Velice často vazba jednoho ligandu na specifické místo molekuly proteinu ovlivňuje vazbu jiného ligandu na zcela jiném místě téže molekuly proteinu. V takovém případě hovoříme o allosterické interakci. Allosterický efekt představuje významný prvek regulace a přenosu signálu od receptoru směrem k systémům odpovědným za buněčnou odezvu.

Přírozenými ligandy receptorů v organismu jsou různé endogenní látky, jako hormony, neurotransmitery, autakoidy (tzv. lokální hormony působící pouze v místě svého vzniku) apod. Látky, které po navázání na receptor vyvolávají podobné účinky jako přírozené ligandy, nazýváme agonisty příslušného endogenního působení. Látky, které naopak brání těmto účinkům, nazýváme jejich antagonisty (2).

2.3.3.2 Nespecifické mechanismy účinku léčiv

Některé typy léčiv působí nespecificky a jejich účinek vyplývá pouze z obecných fyzikálně-chemických vlastností. Jedná se především o inhalační anestetika, která se díky své lipofilitě rozpouští v neuronálních membránách, mění jejich fyzikálně-chemické vlastnosti, a tak ovlivňují přenos nervového vzruchu. Jako další příklady lze uvést látky upravující pH žaludečních šťáv (antacida), látky mechanicky kryjící povrch (cytoprotektiva), absorbenty apod. (2).

2.4 Léčiva v povrchových a odpadních vodách

V posledních letech se rapidně zvýšilo užívání farmaceutických a hygienických přípravků. Ročně je celosvětově vyprodukováno několik kilotun běžných nesteroidních antiflogistik, jako je např. ibuprofen (14). Léčiva, která po požití projdou trávicím traktem, vstupují do čistíren odpadních vod a touto cestou se tak dostávají do vodního ekosystému a vodního hospodářství. Pokud jsou tyto farmaceutické výrobky biologicky aktivní, mají negativní vliv na vodní i suchozemské ekosystémy a mívají tendenci k bioakumulaci (15). Jiné cesty průniku léčiv do životního prostředí vznikají již při samotné výrobě a rovněž při neodborné likvidaci nepoužitých nebo prošlých léků (16). Dalším problémem je to, že vysoké procento léčiv je z těla vyloučeno v nemetabolizované formě a vstupuje do odpadních vod jako biologicky aktivní látky, jejichž environmentální dopad není dosud jednoznačně objasněn. Dalšími procesy se mohou tyto látky sorbovat do půdních sedimentů nebo se mohou částečně rozdělit mezi vodnou a organickou fázi a vstupovat tak do potravního řetězce (17).

2.4.1 Aspekty biotransformace léčiv

Nemetabolizovaná léčiva patří mezi nejhůře biologicky odbouratelné látky v životním prostředí (18). Mnoho těchto látek je perzistentních a lipofilních a jsou schopné prostupovat biomembránami, což jim umožní provést specifické biologické funkce (15). Většina farmak vstupujících do cílového organismu projde určitým stupněm metabolické přeměny (17). Obecně by se dalo říci, že tím, jak metabolické procesy zvyšují rozpustnost těchto látek ve vodě, usnadňují současně exkreci a minimalizují tak jejich potenciální toxicitu. V opačném případě, tj. kdy se molekuly stávají více hydrofobními, brzdí se tím také jejich exkrece (19). Není ovšem pravidlem, že metabolické přeměny vždy snižují toxicitu léčiva. Tento fakt upozorňuje především na skutečnost, že zkoumání účinků látek pouze ve formě, ve které vstupují

2.4.2 Zdroje průniku léčiv do životního prostředí

```
graph TD
    HL[Humánní léčiva] --> EN[Exkrementy z nemocnic]
    HL --> ED[Exkrementy z domácností]
    HL --> LO[nepoužitý materiál]
    EN --> KOVK[Komunální odpadní vody]
    ED --> KOVK
    LO --> DO[Domácí odpad]
    KOVK --> ZP[Závlahová pole]
    KOVK --> ČOV[Čistírna odpadních vod]
    ČOV --> ČK[Čistírenský kal]
    ČK --> PVP[Povrchové vody]
    DO --> ÚO[Úložiště odpadu]
    ÚO --> PVP
    ÚO --> PV[Podzemní vody]
    HL --> VHL[Veterinární léčiva]
    VHL --> EX[Exkrementy]
    EX --> H[Hnojivo]
    H --> P[Půda]
    P --> PVP
    P --> PV
    PVP --> PV
    PV --> PVP
    PV --> PVV[Pitná voda]
    PVV -.-> PVV
    AK[Akvakultury] --> PVP
    PP[Podniky produkující léčiva] --> PVP
```

2.4.2.1 Kontaminace z podniků vyrábějících léčiva

22

2.4.2.2 Kontaminace ze zemědělství

Zemědělská farmaka bývají používána v mnoha rozličných aplikacích, jako stimulanty růstu u dobytka, kokcidistatika u drůbeže, přídavky do krmiva na rybích farmách, jako veterinární farmaceutické prostředky nebo jako pesticidy (15). Mezi nejčastěji používané substance patří několik druhů antibiotik, dále směsi těžkých kovů a hormony. Antibiotika jsou rozsáhle používána v živočišné výrobě, kde přináší okamžitý komerční přínos. Například profylaktické užívání antibiotik minimalizuje ztráty způsobené chorobami a kontaminace je přípustná díky vysoké hustotě zemědělské výroby (24).

Léčiva používaná v zemědělském průmyslu vstupují do životního prostředí prostřednictvím zvířecích exkrementů přímo nebo při jejich aplikaci jako hnojiva (25). V každém případě antibiotika přechází rovnou ze zvířat do životního prostředí, a to bez možné transformace na méně aktivní metabolity v čistírnách odpadních vod. Biodegradace probíhající v zažívacím traktu zvířat připadá sice v úvahu, avšak platí pouze pro omezené množství látek. Bylo dokázáno, že 30–90 % podané dávky antibiotik vstupuje do životního prostředí v nezměněné podobě (15).

Dalším problémem souvisejícím s užíváním léčiv v zemědělství je vývoj postupné rezistence mikroorganismů na antibiotika. Rezistence vzniká třemi mechanismy: plynulým vystavením organismu reziduům léčiv v potravinách, přenosem rezistentních genů mezi zvířecí a lidskou mikroflórou a přenosem rezistentních genů v ekosystému přímou kontaminací a potravními řetězci (26). Rezistence vůči antibiotikům je schopnost mikroorganismů cíleně odolávat účinkům antibiotik. Následkem toho se stávají terapeutické prostředky běžně používané proti patogenním organismům neefektivními. Tento jev je přirozená obranná reakce mikroorganismů na nehostinné přírodní podmínky. Ovšem v případě, kdy jsou antibiotika nevhodně používána (vysoké dávky, nedodržení intervalu dávkování a doby léčby), může se rezistence vůči nim stávat nepřírozeně vysoká (27).

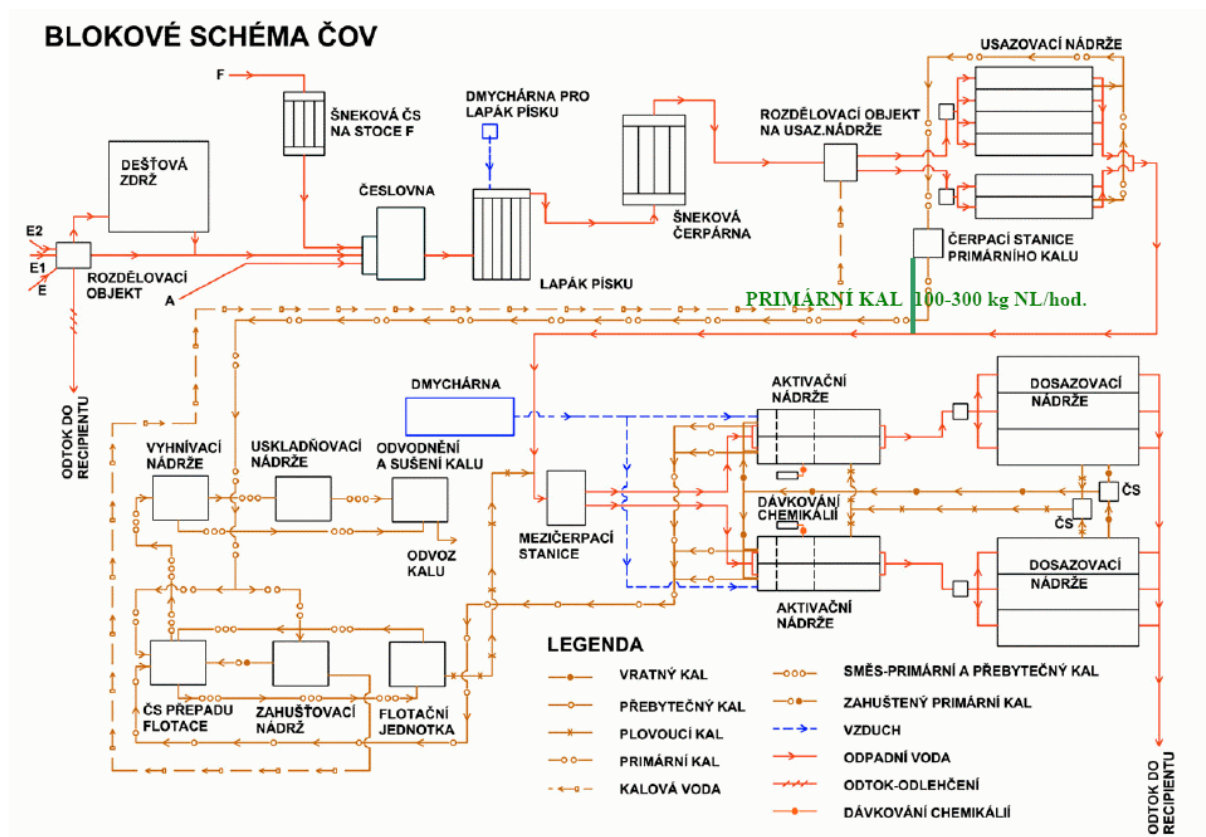
2.4.2.3 Kontaminace z čistíren odpadních vod a ze skládek odpadů

Existují dva hlavní zdroje humánních léčiv, které se nacházejí v odpadech ČOV. Jsou to léčiva a jejich metabolity pocházející z domácností a od pacientů z nemocnic, klinik nebo jiných lékařských zařízení, a to buď jako aplikovaná nebo nevyužitá (23). Rozdíl mezi oběma typy spočívá v tom, že nepoužitá léčiva vstupují do ČOV v jejich účinné formě díky tomu, že se vyhnula potenciální biotransformaci uvnitř těla (23).

Nespočet farmak, zahrnujících analgetika, stimulanty, nesteroidní antiflogistika, karbamazepin, atorvastatin, gemfibroxil a estradiol, bylo identifikováno v odpadech z čistíren odpadních vod v rozmezí hodnot od ng.l^{-1} do $\mu\text{g.l}^{-1}$ (17). Tyto koncentrace se nalézají v odtokových vodách navzdory různým stupňům čištění a poukazují na skutečnost, že tradiční metody čištění odpadních vod, jako mikrobiální degradace s koagulací nebo flokulací, neposkytují dostatečnou záruku odstranění těchto kontaminantů (18).

2.4.3 Osud léčiva v životním prostředí

2.4.3.1 Čistírny odpadních vod: procesy a provozní podmínky



Obr. 10: Schéma ČOV Modřice (28)

V čistírnách odpadních vod působí proti dalšímu šíření kontaminace léčivy dva hlavní procesy: adsorpce/absorpce a biodegradace (29).

Adsorpce má za následek odstranění léčiv buď pomocí koloidně zachycených částic, nebo sedimentací do kalu (30). Je závislá přímo na hydrofobních a elektrostatických interakcích mezi léčivem a částicemi nebo mikroorganismy a dále, a to v mnohem větší míře, na provozních podmínkách v ČOV, jako jsou pH a hydraulický retenční čas. Polární léčiva (ibuprofen, naproxen, diklofenak, indomethacin), jejichž hodnoty pK_a se pohybují v rozmezí od 4,1 do 4,9, se ve vodě nachází hlavně v disociovaném stavu a vykazují tak malou tendenci k sorbování do kalu.

Proces koagulace, popř. flokulace, jakožto sekundární stupeň čištění, může být účinný v případě odstraňování kontaminantů z volné vody, avšak nemusí nutně snižovat potenciální ohrožení životního prostředí těmito kontaminanty. Čistírenský kal s vysokým obsahem organických látek je dle příslušných nařízení, která upravují nakládání s odpady, skládkován. Následným vymýváním se však kontaminanty mohou dostávat zpět do vodního prostředí (27).

Biodegradace, zprostředkovaná působením mikroorganismů, je jeden ze dvou způsobů biotransformace probíhající na čistírnách odpadních vod (23). Je to primární proces k odstra-

nění rozpuštěných látek, který probíhá buď aerobně, za pomoci aktivovaného kalu, nebo anaerobně, díky vyhnívání (31). Biodegradace je závislá na faktorech přímo souvisejících se životním prostředím (teplota a pH), mikrobiálním složením, chemickými vlastnostmi výsledných sloučenin a provozními podmínkami čistírny. Např. když poklesne pH, adsorpce mnoha polárních disociovaných nesteroidních antiflogistik může vzrůstat díky snížení jejich potenciálu pro biodegradaci. Míra biodegradace může být rovněž ovlivněna hydraulickým retenčním časem (30). Mikrobiální aktivita je citlivá na velké množství různých fyzikálních a chemických podmínek prostředí a na přítomnost nebo naopak absenci toxických činitelů. Podmínky prostředí ovlivňují rychlost mikrobiální degradace kontaminantů působením na druh a rychlost metabolické aktivity mikroorganismů. Komunální odpady často obsahují relativně vysoké koncentrace antibiotik a desinfekčních prostředků. Koncentrace antibiotik v ČOV může dosahovat až $50 \mu\text{g.l}^{-1}$. Bylo prokázáno, že koncentrace desinfekčního prostředku benzochloridu byla v odpadu z nemocnic cca 6 mg.l^{-1} a amonných iontů, obsažených v komunálním odpadu, v rozmezí 0,05 až $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (17). Tyto sloučeniny jsou speciálně určeny k potlačení růstu mikroorganismů. V tomto případě může mikrobiální inhibice vést k poklesu organismů v provozních podmínkách čistírny a k následnému poklesu účinnosti čištění (32).

Proces oxidace, prováděný buď chemicky, nebo pomocí UV záření, který bývá zahrnutý v posledním terciárním stupni čištění, je spíše než na toxikologická rizika spojená s léčivý zaměřen na odstraňování patogenních organismů. V podstatě však může mít i opačný efekt, a to v případě, že produkty oxidace mohou vykazovat ještě vyšší toxicitu než primární sloučeniny (23).

2.4.3.2 Účinnost odstranění

Nejběžnějším způsobem detekce léčiv v prostředí je měření jejich koncentrací na přítoku do ČOV a na odtoku z ČOV. Tato metoda však nebyla standardizována, a tak se výsledky velmi liší v závislosti na použitých konstrukčních a čistících technologiích, hydraulickém retenčním čase, ročním období, počasí a technikách měření (33). Měření koncentrace kontaminantů na přítoku a odtoku za standardizovaných podmínek může být i zavádějící. Zaprvé, léčiva mohou být sice z odtoku odstraněna, avšak jsou často pouze přesunuta do komponentů kalu. Z druhé se neuvažuje s produkty degradace. Tyto produkty mohou obsahovat stejně nebezpečné nízkomolekulární látky nebo konjugáty biotransformace, které mohou být následně dekonjugovány a uvolněny jako původní sloučeniny (34). Navzdory všem různým technikám, ovlivňujícím přítomnost léčiv v prostředí, je některé sloučeniny nadmíru obtížné odstranit (17).

2.4.3.3 Sklárky odpadů a zařízení na likvidaci pevných odpadů

Komunální sklárky odpadů zahrnují nejenom odpady z domácností, ale i různá komerční rezidua, jako je kal z místních čistíren odpadních vod. Jsou to právě domácnosti a kaly z čistíren, které figurují jako dva hlavní zdroje léčiv na skládkách (35). Jak již bylo zmíněno, farmaka mají tendenci k akumulaci a zakoncentrování se mezi částicemi kalů, takže skládkování těchto kalů může poté vést k tomu, že hlavní zdroje léčiv, což jsou odpady z domácností, vystřídají přímo samotné sklárky odpadů (34).

2.4.4 Perzistence léčiv v životním prostředí

Perzistence chemikálií v životním prostředí je dána fotostabilitou sloučeniny, rychlostí biotransformace, schopností vázat a adsorbovat se a také schopností transportu mezi vodním a terestrickým prostředím (36). Z těchto důvodů je perzistence úzce spojena se strukturou sloučeniny, což zahrnuje chemickou stabilitu a rozdělení. Toto spojení vedlo ke zjištění, že hydrofobní chemikálie mají tendenci k vyšší perzistenci. Původně byl zastáván názor, že do budoucna většina léčiv hydrofilních a biodegradabilních, nebude moci dojít k trvalé perzistenci v životním prostředí. Nejnovější průzkumy však poukázaly, pokud se týče environmentální perzistence, na nové skutečnosti. Tyto názory zahrnují jiné faktory než rozdělení podle hydrofobnosti, při definici perzistence. Jednak nejsou všechny sloučeniny snadno degradovatelné (35) a dalším velkým problémem je to, že léčiva jsou vypouštěna do životního prostředí průběžně, vytváří si tzv. pseudoperzistenci, takže nakonec i hydrofilní a biodegradabilní sloučeniny se mohou stát perzistentními polutanty. V neposlední řadě je nutno si uvědomit, že přeměněné produkty mohou být životnímu prostředí buď stejně nebo ještě mnohem více nebezpečné než původní látky (23).

2.4.4.1 Hydrofobnost a koeficient K_{OW}

Hydrofobnost je měřena na základě distribuce mezi oktanolem a vodou, neboli pomocí rozdělovacího koeficientu. Hodnoty tohoto parametru ovlivňují ostatní důležité ekotoxikologické vlastnosti kontaminantů, mezi něž patří biodostupnost, biokoncentrace a bioobohacování.

Rozdělovací koeficient D_{OW} udává podíl koncentrace dané sloučeniny v n-oktanolu (náhrada lipidů) a ve vodě při rovnovážném stavu. To znamená, že chemikálie s $D_{OW} < 1$ se neochotně sorbují na organické částice a tím vykazují malou schopnost biokoncentrace, na rozdíl od látek s $D_{OW} > 1$, které mají přesně opačné vlastnosti. Když se rozdělovací koeficient upraví tak, že se dále uvažuje pouze s neionizovanými látkami, používá se parciální rozdělovací koeficient K_{OW} . Parametry $\log K_{OW}$ jsou více zaběhnuté než $\log D_{OW}$ a bývají také označovány jako $\log P$. Vzhledem k tomu, že mnoho léčiv se vyskytuje v ionizovaném stavu, $\log D_{OW}$ může být lepším indikátorem stupně rozpustnosti než $\log K_{OW}$, protože uvažuje obě formy látky, ionizovanou i neutrální (20).

2.4.4.2 Biodostupnost

Environmentální biodostupnost je definovaná jako schopnost části kontaminantů, nacházejících se v půdě a ve vodě, být dostupná pro potenciální příjem do tkání organismů během celoživotní expozice (37). Předpokládá se, že koncentrace kontaminantů v rybách je závislá na koncentraci ve vodě podle modelu $\log K_{OW}$. Pokud se vyskytne odchylka, může být způsobena změnou biodostupnosti, naznačující místní specifické rozdíly v bioakumulačním modelu (38). Biodostupnost je zčásti určena sorpční kinetikou dané sloučeniny, mobilitou mezi jednotlivými složkami životního prostředí a degradabilitou, jenž jsou střídavě závislé na fyzikálně-chemických vlastnostech látky, jako je sorpční koeficient K_d , přenos náboje, vodíkové můstky a hydrofobní síly (39). Biodostupnost je také ovlivňována velikostí částic, množstvím organické hmoty, dobou zdržení a obsahem jílu, vlhkostí a přítomností kovů v půdě (36). Vzhledem k tomu, že biodostupnost má značný vliv při vystavení necílových organismů farmaceutickým výrobkům, je to hodnota důležitá pro hodnocení rizik. Obecně lze říci, že slou-

čeniny s nízkou polaritou a vysokou hodnotou $\log K_{OW}$, mají vyšší tendenci k sorbování se na půdní částice (40).

2.4.4.3 Biokoncentrace

Biokoncentrace nastává, pokud je příjem kontaminantů z vody vyšší než exkrece. Je často vyjádřena pomocí biokoncentračního faktoru (BCF), což je vztah mezi koncentrací chemikálie v organismu a ve vodě při rovnováze (41). Byla nalezena korelace mezi BCF a $\log K_{OW}$, kterou lze vyjádřit vztahem:

$$\log(\text{BCF}) = 0,79 \log K_{OW} - 0,4 \quad (\text{Rov. 3})$$

Koncentrace léčiv ve vodě je primárně řízena molekulovým parciálním koeficientem ($\log K_{OW}$) a působí tak na rychlost příjmu chemikálií z vody do organismu. Všeobecně platí, že příjem je vyšší u hydrofilních sloučenin (42).

2.4.4.4 Bioobohacování

Bioobohacování je v podstatě bioakumulace kontaminantů, která roste směrem k vrcholu potravního řetězce díky přenosu reziduí škodlivin z nižších organismů, které jsou potravou pro organismy postavené výše v potravním řetězci (43). Bioobohacování může být popsáno na základě fugacity. Fugacita je tendence chemikálie přecházet ze stávající fáze a reprezentuje hnací sílu pasivního transportu mezi různými fázemi, které mají odlišnou fugacitní kapacitu (44). Bioobohacování může hrát rozhodující roli v transportu chemikálií s pomalým rozpouštěním ze sedimentů, a to díky jejich vychytávání benthickými organismy a následnou predací vyššími organismy (45).

2.5 Analgetika

Analgetika jsou látky, které snižují až potlačují pocit bolesti, aniž by však výrazně ovlivňovaly smyslové vnímání a vědomí. Přestože analgetika neléčí příčinu onemocnění, jejich podávání může významně napomáhat vlastnímu léčení tím, že snižují zátěž a stres organismu způsobený bolestí, zánětem a zvýšenou teplotou (2). Dělíme je na silně účinná, označovaná jako opioidní analgetika (anodyna) a analgetika-antipyretika, která současně působí centrálním i periferním mechanismem. Jejich účinek není tak silný jako u opioidních analgetik, ale kromě analgetického účinku snižují i zvýšenou tělesnou teplotu a mají rovněž protizánětlivé účinky. Tato velká skupina farmak se dnes nejčastěji označuje jako nesteroidní protizánětlivé látky (NSAIDs) (13).

2.5.1 Vnímání bolesti

Bolest je komplexní subjektivní fenomén, jenž je definován jako nepříjemný smyslový a emoční prožitek, který je spojen se skutečným nebo potenciálním poškozením tkání, případně je popisován pojmy typickými pro taková poškození. Bolest je nejčastější příčinou, která přivádí pacienta k lékaři. Je doprovázena afektivní odpovědí i odezvou vegetativní, případně motorickou. Z obecně biologického hlediska má bolest nezastupitelnou roli, neboť varuje organismus před poškozením a signalizuje onemocnění.

Proces vnímání bolesti zahrnuje složku algognostickou (percepce a lokalizace) a složku algothymickou (psychická a emocionální), která je hlavní příčinou utrpení nemocného. V centrální nervové soustavě i perifériích se nacházejí opioidní receptory, jejichž stimulace vede k nejsilnějšímu analgetickému účinku. Nesteroidní protizánětlivé látky blokují především tvorbu eikosanoidů (prostaglandiny a deriváty odvozené od kys. arachidonové), které mají prozánětlivé účinky a podporují vnímání bolesti. Základem antipyretického účinku je inhibice syntézy prostaglandinů v hypotalamu. Analgeticky působí i antidepressiva, která blokují zpětný příjem neurotransmitterů do nervových zakončení. Přerušení vedení vzruchů senzitivními nervy vyřazuje vnímání bolesti (lokální anestetika).

Pro skupinu NSAIDs se někdy používají názvy, které přímo nesou terapeutické použití dané skupiny, jako nesteroidní antirevmatika, antiflogistika a antiuratika (léčiva dny). K odlišení NSAIDs od opioidních analgetik, které vedou k lékové závislosti, se někdy používá pojmu neopiodní analgetika nebo nenarkotická analgetika, což je protikladem nesprávného názvu pro opioidní látky – narkotická analgetika (13).

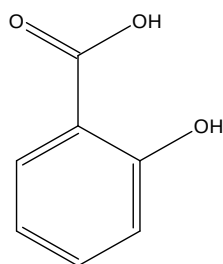
2.5.2 Analgetika-antipyretika (NSAIDs)

Hlavním představitelem této skupiny i standardem pro srovnání je kyselina acetylsalicylová (aspirin). V současnosti existuje několik desítek NSAIDs, z nichž asi dvacet tvoří hlavní komponenty stovek hromadně vyráběných léčivých přípravků tlumících bolest. Existuje i mnoho kombinovaných přípravků, kde i adjuvantní lék může nejen příznivě ovlivnit terapeutický účinek, ale také zesílit nežádoucí účinky.

Jde o látky spadající do mnoha odlišných chemických skupin. Většinu jejich (i nežádoucích) účinků lze vysvětlit stejným mechanismem jako jejich terapeutické účinky. Kyselina acetylsalicylová (ASA) a další NSAIDs inhibují cyklooxygenázu (COX); ve vyšších koncentracích inhibují i řadu dalších enzymů (podílejí se na vzniku některých nežádoucích účinků). Účinek některých látek je např. omezen jen na místa s nízkým obsahem peroxidů. To vysvětluje antipyretický účinek paracetamolu jeho působením v hypothalamu, ale chybění jeho periferního protizánětlivého účinku ve tkáních. Trombocyty jsou obzvláště citlivé k účinkům ASA (nemají schopnost regenerace COX). Tohoto efektu se využívá k prevenci agregačních funkcí krevních destiček (13).

2.5.2.1 Salicyláty

Přestože bylo do léčby horečky, bolestí a zánětu zavedeno mnoho nových látek, zůstala ASA v těchto indikacích nejvíce předepisovaným lékem. Kyselina salicylová (o-hydroxybenzoová) (Obr. 11) je základní chemickou strukturou, od níž jsou odvozeny další salicyláty.



Obr. 11: Vzorec kyseliny salicylové

Salicyláty se dobře absorbují ze žaludku a tenkého střeva. Během 30 minut dochází k hladinám, které se již projeví terapeutickými účinky. Maximální hladina salicylátů v krvi bývá obvykle dosažena asi za 2 hodiny po perorálním (p.o.) podání přípravku. Rektální absorpce je pomalejší než po p.o. aplikaci. Salicyláty se metabolizují a konjugují v játrech. Vylučování probíhá močí, převážně jako kyselina salicylová a její konjugáty (13).

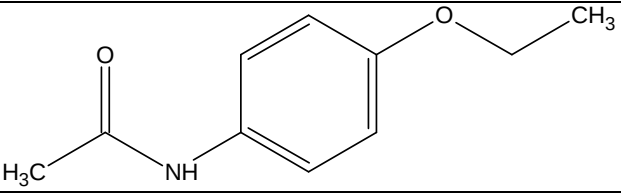
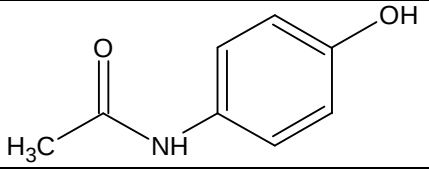
Tab. 2: Salicyláty (v prvním sloupci je název léčiva, ve třetím příklady léků) (2)

kyselina acetylsalicylová		Acylpyrin, Aspirin
diflunisal		Dolobid

2.5.2.2 Anilinové deriváty

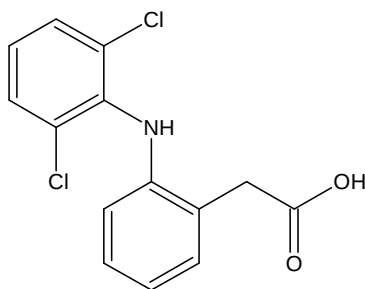
Fenacetin a jeho aktivní metabolit paracetamol (syn. acetaminofen) mohou být použity jako alternativní prostředky místo ASA v analgeticko-antipyretických indikacích. Jejich použití je především vhodné v situacích, kdy ASA vyvolá zažívací potíže a zvýšené krvácení. Obě látky však nemají dostatečně silné protizánětlivé účinky, a proto nemohou být v této indikaci samostatně použity. Paracetamol má menší toxicitu než fenacetin, a proto je základní látkou této skupiny (13).

Tab. 3: Anilinové deriváty (2)

fenacetin		Algena, Mironal, Dinyl, Sedolor
paracetamol		Paralen, Panadol

2.5.2.3 Deriváty kyseliny fenyloctové

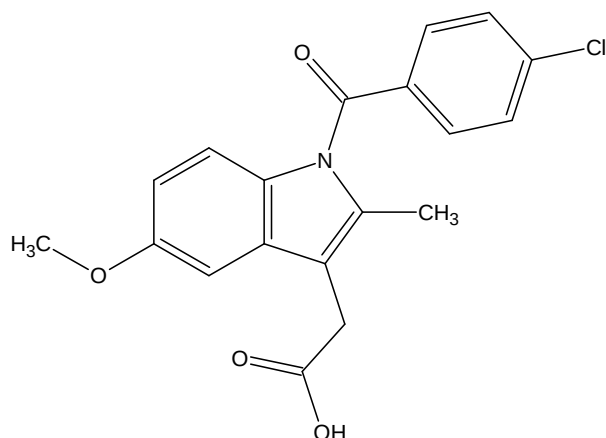
Diklofenak je strukturálně blízký fenamátům. Jeho účinnost je větší než u ASA a srovnatelná nebo dokonce také větší než u indometacinu nebo naproxenu. Používá se jak při akutních stavech, tak dlouhodobě. Rychle a úplně se absorbuje z trávicího traktu (GIT), vrchol plazmatické hladiny je za 2–3 hodiny. Metabolizuje se v játrech hydroxylací a konjugací a vylučuje se močí a žlučí (13). Jako příklad vyráběného léku lze uvést např. Voltaren (2).



Obr. 12: Vzorec diklofenaku

2.5.2.4 Deriváty kyseliny indoloctové

Indometacin (obsažen v lécích jako: Indren, Metindol, Indomet) (2) má výrazné protizánětlivé i analgeticko-pyretické účinky, které jsou podobné salicylátům. Jde o velmi silný inhibitor COX, což má za následek rozvoj mnoha nežádoucích účinků typických pro NSAIDs. Z těchto důvodů a díky vysokému výskytu interakcí s jinými léky se používá jen ve speciálních indikacích. Dalšími léčivými patřícími do této skupiny jsou: tropesin, tolmetin, etodolak a sulindak) (13).



Obr. 13: Vzorec indometacinu

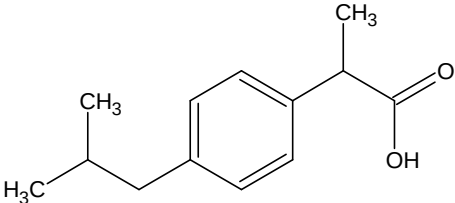
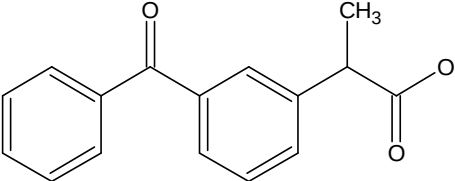
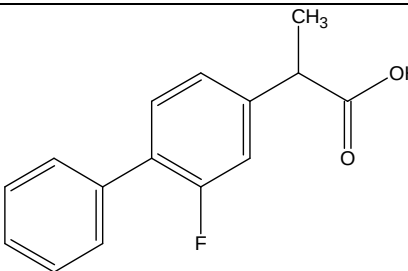
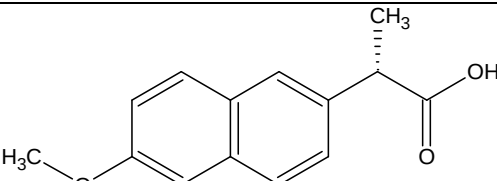
2.5.2.5 Deriváty kyseliny propionové

Látky této skupiny jsou většinou lépe snášeny než ASA nebo indometacin a inhibují kromě COX také migraci a funkce leukocytů.

Ibuprofen je dobře účinná a současně dobře snášená NSAID. V nižších dávkách má výraznější protizánětlivé než analgetické účinky. Používá se k léčbě zánětlivých a degenerativních kloubních chorob, jako analgetikum u dysmenorhey i u bolestí zubů. Pro dobré antipyretické účinky je vhodný i u horečnatých onemocnění. Podobné vlastnosti jako ibuprofen má i indoprofen.

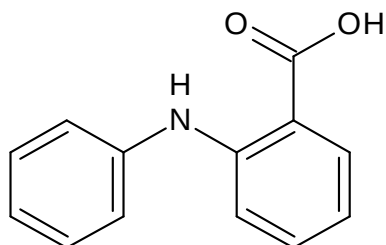
Řada dalších derivátů kys. propionové se užívá v podobných indikacích jako ibuprofen: ketoprofen, flurbiprofen, naproxen (má delší poločas eliminace než předchozí látky a lze jej proto podávat jen dvakrát denně) a tiaprofen, který je dalším relativně dobře snášeným derivátem s určitými ochrannými účinky na kloubní chrupavky (13).

Tab. 4: Deriváty kyseliny propionové (2)

ibuprofen		Brufen, Brufalgin, Dolgit, Nurofen
ketoprofen		Orudis, Ketofen, Meprofen
flurbiprofen		Ansaid, Froben
naproxen		Naprosyn, Naxen

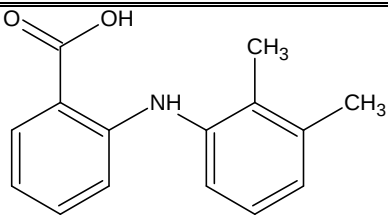
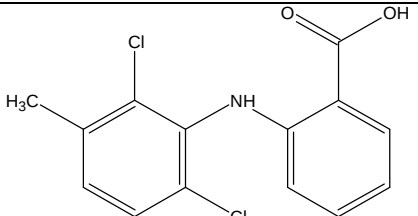
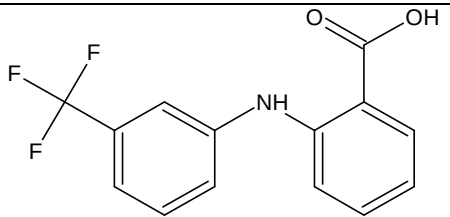
2.5.2.6 Deriváty kyseliny fenamové

Do této skupiny léčivých látek se řadí látky odvozené od kyseliny fenylantranilové (fenamáty). Patří sem kyselina mefenamová, meklofenamová, flufenamová, etofenamová a tolfenamová, která je u nás nejčastěji užívanou látkou ze skupiny fenamátů. Některé deriváty se podávají i místně. K většímu jejich terapeutickému rozšíření nedošlo pro častý výskyt nežádoucích účinků (dráždění GIT, nauzea, bolesti v epigastriu, ulcerace a průjemy) (13).



Obr. 14: Vzorec kyseliny fenamové

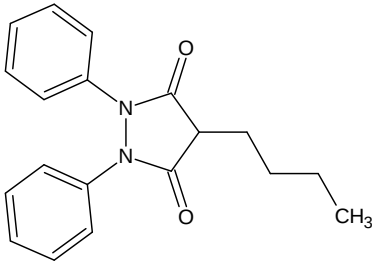
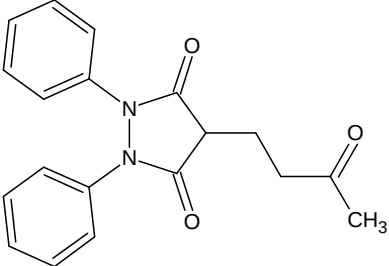
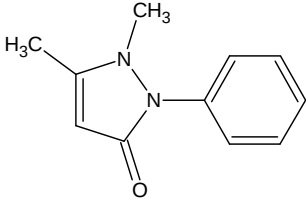
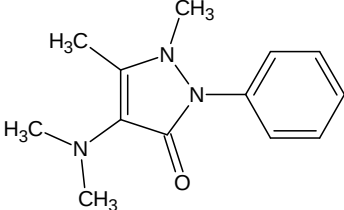
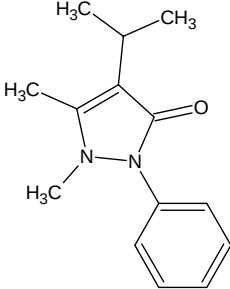
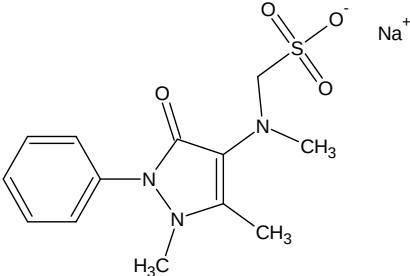
Tab. 5: Deriváty kyseliny fenamové (2)

kyselina mefenamová		Mefenacid, Parkemed
kyselina meklofenamová		Meclomen
kyselina flufenamová		Ansatin, Meralen

2.5.2.7 Pyrazolony

Pyrazolové deriváty mají dobré analgetické účinky, pro svou toxicitu jsou však v těchto indikacích opuštěny a používají se především krátkodobě pro své protizánětlivé účinky. V této indikaci je nejdůležitější látkou fenylobutazon a jeho deriváty. Pyrazolony se však stále vyskytují v některých složených analgeticko-antipyretických přípravcích (13).

Tab. 6: Pyrozolony (2)

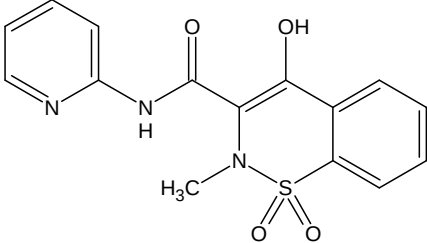
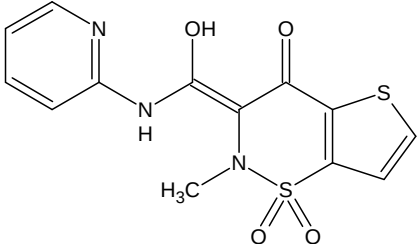
fenylbutazon		Butacote, Butazolidin
kebuzon		Ketazon
fenazon		Antipyrin, Felsol
aminofenazon		Pyramidon
propyfenazon		Laradon, Pireuma, Valetol, Saridon
metamizol		Novalgin, Novamisulfon

2.5.2.8 Oxikamy

Hlavními představiteli enolových kyselin, označovaných jako oxikamy, jsou piroxikam a novější tenoxikam. Inhibují aktivaci neurotrofů, čímž se zesiluje jejich protizánětlivý úči-

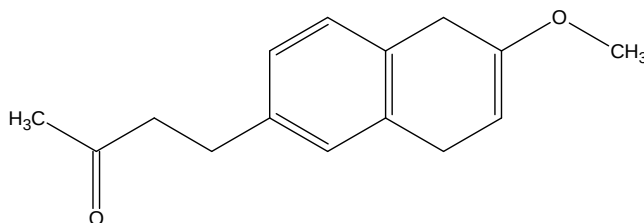
nek. Další jejich výhodou je dlouhý poločas eliminace, který umožňuje podávání látky jen jednou denně (13).

Tab. 7: Oxikamy (2)

piroxikam		Felden, Arthremin
tenoxicam		Liman, Tilcotil, Mobiflex, Dolmen

2.5.2.9 Alkalony

Nabumeton (Obr. 15) je „prolátka“, jež se jaterní biotransformací mění na 6-methoxy-2-naftyloctovou kyselinu (6MNAA), která je účinným inhibítozem COX. Má dobré protizánětlivé účinky při relativně nízké toxicitě díky selektivní inhibici COX-2 (13).



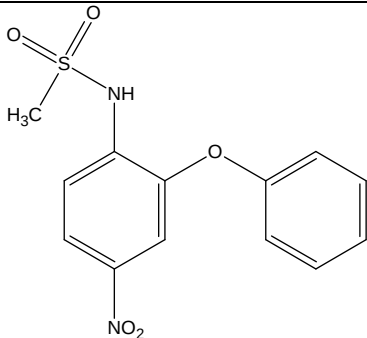
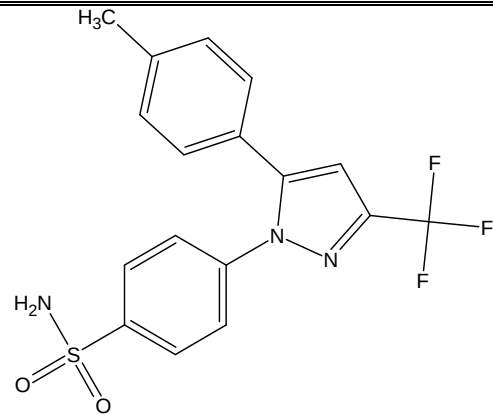
Obr. 15: Vzorec nabumetonu

2.5.2.10 Sulfonanilidy

Nimesulid (metansulfoanilid) je novodobá látka se selektivním účinkem na COX-2 a dalšími účinky, které zesilují protizánětlivé působení. Kromě snížení nadprodukce eikosanoidů v místě zánětu blokuje tato látka tvorbu volných radikálů a zároveň působí také jako jejich lapač („scavenger“). Dalším jeho účinkem je snížení uvolňování enzymů z neutrofilů, které poškozují pojivovou tkáň a chrupavku. Látka se dobře vstřebává po p.o. podání a nemá významnější nežádoucí účinky.

Celecoxib je nedávno zavedený perorálně účinný selektivní inhibitor cyklooxygenázy-2. Používá se k symptomatické léčbě zánětu a bolesti při osteoartróze nebo revmatoidní artritidě (13).

Tab. 8: Sulfonanilidy (2)

nimesulid		Algolide, Folid, Eudolene, Mesulid, Nimesil
celecoxib		Celebrex

3 ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ LÉČIV

3.1 Vzorkování

Vzorkování je postup činností vedoucích k odběru reprezentativního vzorku. Volba takového postupu (tj. výběru schématu a způsobu odběru vzorků) se odvíjí od účelu vzorkování, charakteru vzorkovaného materiálu, způsobu jeho ložení, popř. od technologického procesu vzniku materiálu, jeho transportu, manipulace s materiálem a závisí rovněž na ukazatelích, které mají být posuzovány. Při rozhodování může být volba postupu ovlivněna homogenitou, stabilitou materiálu, požadavky na spolehlivost výsledných dat, náklady na pořízení vzorku, bezpečnostními podmínkami vzorkování, dále dostupností a kvalitou odběrového zařízení, způsobem jeho dekontaminace a zásadami pro jeho použití. Smyslem vzorkování (a následných zkoušek na vzorku) je definovat, ověřovat, popř. kontrolovat platnost určitého tvrzení, předpokladu apod. (46).

3.1.1 Obecné problémy vzorkování

Při odběru vzorků je třeba si uvědomit, že nejběžnější příčiny nepřesností při vzorkování zemín, kapalin a kalů jsou ztráty těkavostí, biodegradací, oxidací a redukcí. Nízká teplota snižuje ztráty, ale zmrazení pevných vzorků obsahujících vodu může způsobit jejich odplynění, rozbití vzorků nebo i rozdělení nemísitelných fází. Anaerobní vzorky nesmí přijít do styku se vzduchem, některé kontaminanty mohou při narušení změnit chemické složení (oxidace, rozklad, aj.), jiné mohou být dokonce i výbušné. Další problémy vznikají při uchovávání vzorku před analýzou. Největší problémy vznikají při odběru a manipulaci se vzorky těkavých kontaminantů. Proto se musí učinit nezbytná bezpečnostní opatření a zvolit vhodný způsob vzorkování. Obecně by měl být vzorek okamžitě po odběru přemístěn do vzorkovnice s minimálním volným prostorem (head-space) a neprodyšně uzavřen. Vzorky musí být ihned ochlazeny a udržovány v chladu až do doby analýzy.

Analýza by měla být provedena v nejkratším možném termínu. Jestliže je nutno vzorek před analýzou upravovat (např. extrakcí, loužením apod.), tak tyto operace je třeba provést co nejdříve po odběru a takto získané vzorky stabilizovat (změnou pH, přidávkou činidla, zmrazením, atd.) do doby analýzy. Extrakt je však možno skladovat v chladničce pouze po předepsanou dobu. Do laboratoře dopravíme celý počet odebraných vzorků najednou, nebo alespoň větší část (46).

3.1.2 Kontaminace vzorků

Většina činností v rámci vzorkování a analytiky životního prostředí nabízí mnoho možností kontaminace původního vzorku (47). Kontaminací většinou rozumíme něco, co je náhodně přidáno ke vzorku během vzorkovacího či analytického procesu. Z toho vyplývá, že následná měření mohou ukázat složení vzorku v době měření, nicméně nedokážou postihnout stav vzorkované matrice v době odběru vzorku. Kontaminace vzorku může pocházet z mnoha zdrojů. Je proto nutno pro její kontrolu určit jednotlivé zdroje kontaminace odpovídající použitým metodám. Vzorky ze životního prostředí mohou být kontaminovány mnoha způsoby na mnoha bodech vzorkovacího a analytického procesu. Kontaminace může nastat v lokalitě při odběru vzorků, při manipulaci se vzorky, při jejich konzervaci, adjustaci, uložení či transportu

do laboratoře. Po příchodu do laboratoře je možná kontaminace při uložení, manipulaci, zpracování, stejně tak jako při vlastním analytickém procesu.

Kontaminace odběrovým zařízením je velmi častým způsobem kontaminace mnoha typů vzorků životního prostředí. Buď je vzorkovací zařízení zhotoveno z nevhodného materiálu, který přímo kontaminuje vzorek látkou obsaženou v tomto materiálu, nebo může jít o křížovou kontaminaci způsobenou nevhodným nebo nedostatečným čištěním vzorkovacího náčiní.

Dalším možným zdrojem kontaminace jsou používané vzorkovnice: bylo prokázáno, že jak lineární PE, polykarbonáty, tak také teflony různých typů mohou být zdrojem kontaminace těžkými kovy. Proto se k ukládání vzorků pevných, kapalných a pastovitých (kalů), a to pro analýzy organických látek, doporučuje používat skleněné vzorkovnice.

Doporučený způsob čištění vzorkovnic pro minimalizaci stop organických látek zahrnuje vymytí detergenty nebo kyselinami, oplach vodou bez obsahu organických látek a následné sušení v peci (sušárně). Při rozvažování vhodného postupu čištění je nezbytné zahrnout do úvah všechny typy analýz, kterým bude vzorek (případně subvzorek) z dané vzorkovnice podroben. Čištění vhodné pro jeden typ analýzy (analytu) může být nedostačující nebo dokonce kontaminující pro jiný typ analýzy kontaminantu. Může jít o uvolnění kontaminantu metodou čištění, která je příliš „silná“, nebo naopak čisticí prostředek může být sám o sobě kontaminantem.

Další možnou cestou kontaminace je kontaminace vzorků při uložení nebo transportu difúzí skrze vzorkovnici. Týká se to například vzorků s vysokou a nízkou koncentrací uložených společně (v blízkosti). Variantou je transport vzorků spolu s koncentrovaným kontaminantem (analytem).

Během přípravy a zpracování vzorků v laboratoři se zvyšuje počet možností kontaminace s každým manipulačním krokem, ať se již jedná o extrakci, prekoncentraci, nebo dělení vzorku. Každý krok související se zpracováním vzorků proto zvyšuje riziko jejich kontaminace.

Carry-over a paměťové efekty způsobené následnou analýzou různě koncentrovaných vzorků jsou velmi častou příčinou kontaminace v plynové i kapalinové chromatografii, při spektrometrických metodách, stejně tak jako kontaminace způsobená přenosem analytů nástřikovým zařízením (stříkačkou, pipetou apod.). Kontaminace vyčištěného zařízení je též možná například kontaktem s krytem analytického přístroje, rukou apod. (46).

3.1.3 Vzorkování povrchových vod

Kapaliny jsou díky jejich skupenství relativně dobře odebíratelné, nicméně získání reprezentativního vzorku je výrazně obtížnější. Hustota, rozpustnost, teplota, proudění a množství ostatních mechanismů zapříčiňuje změny ve složení jak v čase, tak i v prostoru (46). Většinou je nutné vzorkovat na více místech a potom smícháním získat průměrný vzorek, nebo analýzou většího počtu vzorků získat informace o distribuci analytu v celém vzorkovaném objemu (48). Vzorky je možno odebírat ručně nebo automatickými vzorkovači.

Ruční odběry se vyznačují většinou minimálními náklady na vzorkování. Lidský faktor je klíčovým k provedení úspěšných odběrů, případně naopak k zanesení chyby při jakémkoliv programu manuálního vzorkování. Tento typ vzorkování je velmi vhodný pro odběr malého množství vzorků, nicméně se vzrůstajícím počtem vzorků (rutinní dlouhodobé odběry, popř. velké objemy) narůstá časová i finanční náročnost.

Automatické vzorkovače jsou výhodnější kvůli efektivitě nákladů, víceúčelovosti, spolehlivosti, zvýšeným možnostem, větší vzorkovací četnosti a přizpůsobivosti vzorkování specifickým požadavkům (např. povolení na vypouštění vod). Jsou dostupné s mnoha různými úrovněmi složitosti, odolnosti a užitných vlastností a samozřejmě nákladů. Nicméně žádné automatické zařízení není zatím ideálně vhodné pro všechny situace.

Výběr typu a materiálu vzorkovnice je velmi důležitým kritériem pro zachování a udržení kvality odebraného, transportovaného a uloženého vzorku. Výběr vzorkovnice závisí na typu matrice, potenciálních kontaminantech (analytech), které mohou přicházet do úvahy, požadovaných analytických metodách a vnitřních předpisech laboratoře pro zajištění kvality.

Výběr vhodného materiálu vzorkovnice pomůže zajistit, že budou zachovány jak fyzikální, tak chemické parametry původního odebraného vzorku. Pro odběr potenciálně nebezpečných vzorků je často vhodným materiálem vzorkovnice sklo, protože je inertní k většině materiálů. Plastové kontejnery nejsou z pohledu většiny vzorků doporučeny, protože existuje nebezpečí úniku plastifikátorů nebo těžkých kovů do vzorku (neboli kontaminace vzorku materiálem vzorkovnice). V případě vzorků obsahujících silné zásady, případně roztoky kyseliny fluorovodíkové, mohou být vhodnější plastové vzorkovnice, neboť skleněný materiál může být těmito roztoky narušován a mohou se vytvářet sorpční místa na povrchu vzorkovnice; v horším případě může dojít k zamrznutí zábrusů nebo k úplné destrukci vzorkovnice. Barva vzorkovnice může záviset na použité analytické metodě. Kdekoliv je to možné, měl by být použit hnědý obal, který vylučuje, případně výrazně snižuje rozklad nebo změny vlastností vzorku způsobené působením světla (příp. jiné barvy plnicí tento účel). Pokud nejsou barevné vzorkovnice k dispozici, je třeba vzorky chránit před působením světla při všech manipulacích s nimi, tj. při transportu, uložení apod. (46).

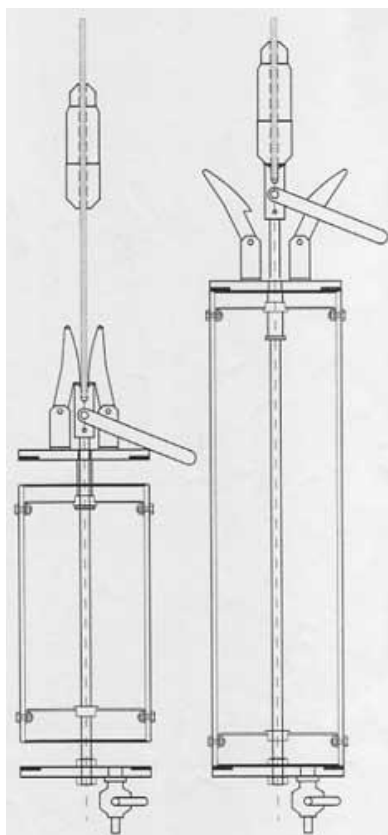
3.1.4 Konvenční odběr vzorku

Konvenční odběr vzorku, v některých literárních pramenech označovaný jako bodový odběr, je klasický způsob vzorkování, kdy je vzorek odebrán v určitém okamžiku a na konkrétním místě. Problematická zůstává interpretace těchto odběrů, kdy jsou pro charakterizaci stavu lokality používána data ze vzorků odebraných v jednom místě a v jednom okamžiku. Je zřejmé, že interpretace takových výsledků může být často zavádějící. Je to způsobeno nepravidelností v přísunu sledovaných látek, které často vstupují do média buď nárazově nebo periodicky (49).

U velkých i malých toků musíme počítat s tím, že ve vodě budou přítomny tuhé suspendované částice (plaveniny), na jejichž povrchu může být značná část přítomných kontaminantů sorbována. Volba odběrového místa je většinou dána požadavkem prokázat znečištění pocházející z určitého zdroje. Potom je třeba vzorkovat nad a pod zdrojem znečištění, nad a pod soutokem dvou toků apod. Přitom je nutné si pamatovat, že k dokonalému promísení může dojít

i několik kilometrů pod soutokem nebo pod přítokem odpadních vod. U toků musíme počítat s nehomogenitou v příčném profilu a s negativním vlivem břehů. Doporučuje se vzorkovat blízko středu proudu (u větších toků např. z mostu) s otevřenou vzorkovnicí orientovanou proti směru proudu (48). Pro běžný fyzikálně-chemický rozbor se vzorky přepravují a skladují v polyethylenových, polypropylenových, polykarbonátových nebo skleněných vzorkovnicích umístěných v chladicí brašně (49).

Stojatými vodami jsou rybníky a přehradní nádrže. Zatímco většina rybníků je mělkých, nádrže dosahují hloubek až několik desítek metrů. Ve vodách nádrží vždy dochází k výškovému rozvrstvení (vertikální stratifikaci) (48). Pro tento typ vzorkování je normou dán přesný popis metodiky horizontálního a vertikálního vzorkování. Pro zónační odběry jsou využívány hloubkové odběrové zařízení (Obr. 16) (49).



Obr. 16: Hloubkový vzorkovač – objem 6 litrů (50)

3.1.5 Pasivní vzorkování

Metoda pasivního vzorkování byla poprvé využita k semikvantitativnímu stanovení oxidu uhelnatého v ovzduší v roce 1927 (51) a v roce 1973 ke kvantitativnímu stanovení oxidu dusičitého (52) a oxidu sírového (53). Tyto studie popisují jedny z prvních aplikací pasivních vzorkovačů v environmentální analýze. Od roku 1927 bylo publikováno mnoho dalších prací zabývajících se vývojem a použitím nových typů pasivních vzorkovačů pro různé skupiny polutantů v odlišných složkách životního prostředí.

Pasivní vzorkování může být definováno jako vzorkování, které je založené na volném toku molekul ze vzorkovaného média do média sběrného, na základě rozdílu chemických potenciálů analytu v těchto médiích. Volný tok sloučenin probíhá do doby dosažení rovnováhy v celém systému, případně do doby, kdy je proces vzorkování ukončen operátorem (54). V prvním případě dosažení rovnováhy se koncentrace látky ve vzorkovači s narůstající dobou expozice již nemění. Hodnota rovnovážné koncentrace analytu pro daný typ vzorkovače může být stanovena na základě distribučního poměru mezi jednotlivými médii, nebo pomocí kalibračního experimentu v laboratoři. Ve druhém případě již závisí množství sorbovaných analytů na koncentraci ve vzorkovaném médiu a na době expozice. Průměrnou koncentraci zkoumané látky ve vzorkovaném médiu za určité časové období potom můžeme jednoduše stanovit, pokud známe vztah mezi vzorkovací rychlostí a množstvím polutantu zachycené vzorkovačem.

Při pasivním vzorkování musí být splněny následující podmínky:

- analyty zachycené ve sběrném médiu nesmějí unikat ze vzorkovače, pokud jejich koncentrace v okolí klesne na nulovou hodnotu
- vzorkovací rychlost (množství analytu zachycené vzorkovačem za jednotku času, při konst. koncentraci) musí být konstantní během celého vzorkování (55).

3.1.5.1 Pasivní vzorkovače rovnovážné

Rovnovážné pasivní vzorkovače mají poměrně malou kapacitu sorbentu, což je dáno menším objemem sběrného média. Proto se doba expozice pohybuje od několika minut do maximálně několika hodin. Během tohoto procesu dochází k ustálení rozdělovací rovnováhy analytu mezi maticí vzorku a pevnou fází. Molekuly zkoumané látky jsou zachyceny přímo sběrným médiem ze vzorkovaného prostředí a díky tomu nemusejí během transportu překonávat žádnou difuzní bariéru. Počet molekul, které přejdou do pevné fáze, je přímo úměrný rozdělovacímu koeficientu, objemu pevné fáze a koncentraci analytu ve vzorku. Tento způsob vzorkování, prováděný pomocí mikroextrakčních technik, není proto příliš vhodný pro získání průměrných koncentrací za delší časové období (56).

SPME (Solid Phase Microextraction)

Mikroextrakce tuhou fází byla vyvinuta v roce 1989 na univerzitě ve Waterloo v Kanadě výzkumným kolektivem profesora Pawliszyna (57). Jedná se o metodu, která vznikla modifikací extrakce pevnou fází (SPE – Solid Phase Extraction). Tato technika představuje revoluční postup přípravy především organických vzorků k analýze bez použití rozpouštědel, kdy dochází k extrakci a zakonzentrování v jednom kroku a nevyžaduje proto složitou instrumentaci (58).

Při vzorkování se vlákno z taveného křemene, potažené vrstvou chemicky vázané polymerní fáze (v některých případech ve směsi s pevným adsorbentem), ponoří do kapalného vzorku, nebo se umísí nad kapalnou vzorek, do prostředí nasyceného těkavými analyty (head-space). Podle povahy vrstvy jsou složky vzorku na vlákno buď absorbovány (polymerní vrstva) nebo adsorbovány (pevná fáze). Po ustavení rovnováhy se vlákno vytáhne ze vzorkované matrice a vloží přímo do injekčního prostoru plynového chromatografu, kde jsou zachycené analyty

tepelně desorbovány. Pro stanovení látek pomocí kapalinové chromatografie se exponované vlákno umístí do speciálního adaptéru, kde dochází k desorpci pomocí mobilní fáze (59).

Metoda SPME významně redukuje čas potřebný pro přípravu vzorků a minimalizuje použití rozpouštědel. Vlákna jsou opakovatelně použitelná a vhodná pro celou řadu analytů, díky široké nabídce stacionárních fází. (Tab. 9).

Tab. 9: Přehled SPME vláken (60)

Stacionární fáze	Tloušťka vrstvy [μm]	Určeno pro chromatografii	Doporučené analyty
PDMS	100	GC/HPLC	těkavé látky
	30	GC/HPLC	nepolární, středně těkavé látky
	7	GC/HPLC	slabě pol. až nepol. stř. těk. látky
PDMS/DVB	65	GC	polární látky
	60	HPLC	obecné použití
PA	85	GC/HPLC	polární, středně těkavé látky
CAR/PDMS	75	GC	stopové koncentrace těkavých látek
CW/DVB	65	GC	polární látky
CW/TPR	50	HPLC	povrchově aktivní látky
DVB/CAR/PDMS	50/30	GC	těkavé a stř. těkavé látky (C3–C20)

SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction)

Extrakční zařízení se skládá z magnetického míchadélka, vloženého do skleněného pouzdra, které je potaženo vrstvou polymerní stacionární fáze (PDMS) o tloušťce jednoho milimetru (Obr. 17).

Použití PDMS jako sorpčního média má několik výhod:

- analyty jsou pohlceny nebo rozpuštěny v objemu PDMS vrstvy (tzn. nejsou sorbovány na aktivní povrch) a degradace nestabilních analytů je tedy velice nepatrná
- vlivem slabých interakcí PDMS s molekulami analytů jsou sloučeniny desorbovány při nižší teplotě, což minimalizuje ztráty termolabilních látek
- sorpční kapacita PDMS pro danou sloučeninu není ovlivňována přítomností většího množství vody nebo dalších analytů, protože jednotlivé sloučeniny mají vlastní rozdělovací rovnováhy mezi polymerní fází a matricí
- během degradace PDMS vznikají charakteristické silikonové fragmenty, které lze jednoduše rozlišit, kdežto produkty rozpadu u organických adsorbentů mohou interferovat při kvantitativní analýze neznámých látek (61)



Obr. 17: Schéma zařízení pro SBSE (62)

Během vlastní aplikace je extraktor vložen do vzorku vody a zapne se míchání. Doba míchání se pohybuje od zhruba 30 do 240 min a objem PDMS vrstvy závisí na délce použitého míchadla. Pro vzorky o objemu 1 až 50 ml je vhodné míchadélko o délce 10 mm, pro vzorky s větším objemem (100–250 ml) se používá délka 40 mm. Po ukončení extrakce je míchadélko uzavřeno do skleněné vialky a vloženo do zařízení pro termální desorpci zachycených analytů, které je propojeno s plynovým chromatografem (62).

3.1.5.2 Pasivní vzorkovače integrativní

Integrativní pasivní vzorkovače můžeme definovat jako zařízení schopná pohlcovat analyty z plynné nebo kapalné fáze, přičemž je tento proces řízen fyzikálními procesy, jako jsou difúze vrstvou kapaliny nebo permeace přes neporézní membránu. Tato bariéra, která odděluje vzorkovací a sběrné médium, je rozhodující pro rychlost příjmu molekul analytů vzorkovačem, což má zásadní význam při kvantitativním vyhodnocení. Další faktory, které v tomto případě mohou být minimalizovány nebo úplně eliminovány, jsou únik sběrného média ze vzorkovače a vliv vnějších podmínek (teplota, vlhkost atd.). V obou případech je pro transport hnací silou rozdíl chemických potenciálů na obou stranách bariéry (63).

Sledovaná látka difunduje k povrchu sorbujícího materiálu vlivem gradientu koncentrace. Na povrchu sorbentu je zachycena na základě chemické reakce nebo fyzikální adsorpce. Po ukončení vzorkovacího procesu je látka desorbována a následovně stanovena (64). Detekce je pak prováděna dostatečně citlivými analytickými metodami; podle potřeb lze využít spektrofotometrii, kapalinovou, plynovou nebo tenkovrstvou chromatografii, hmotnostní spektroskopii nebo elektrochemické metody. Existuje také skupina vzorkovačů, která umožňuje tzv. přímý odečet. Jedná se o zařízení, ve kterých při reakci polutantu s absorpčním činidlem dojde ke vzniku barevného produktu. Na vzorkovači je umístěna barevná stupnice, ze které se pak podle odstínu a délky expozice dá velmi jednoduše určit koncentrace polutantu.

Významnou vlastností integrativních pasivních vzorkovačů je také skutečnost, že poskytují časově vyváženou odezvu po celou dobu expozice. Ta se nejčastěji pohybuje v rozmezí několika dnů až měsíců, přičemž v jejím průběhu není dosaženo rovnovážné koncentrace mezi vzorkovaným a sběrným médiem pro daný analyt (63).

Integrativní pasivní vzorkování, kdy dochází k přenosu hmoty, můžeme popsat pomocí 1. Fickova zákona (1955). Za předpokladu lineárního koncentračního gradientu je množství analytů M , transportovaných během doby difúze t , dáno vztahem:

$$M = U \times t = \frac{DA}{L} C_0 t, \quad (\text{Rov. 4})$$

kde U je rychlost difúze [mol.s^{-1}], D je difúzní koeficient molekul analytu [$\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$], A je plocha difúzní bariéry [cm^2], L je délka difúzní dráhy [cm] a C_0 je koncentrace analytu ve vzorkovaném médiu [mol.cm^{-3}].

Výraz DA/L vyjadřuje objem vzorku vyextrahovaný vzorkovačem za jednotku času neboli tzv. vzorkovací rychlost R_s [$\text{cm}^3.\text{min}^{-1}$], která je charakteristická pro každou sloučeninu a typ vzorkovače. Jestliže známe přesné rozměry vzorkovače (A , L), můžeme vypočítat koncentraci analytu ve vzorkovaném médiu C_0 podle rovnice výše a hodnoty difúzních koeficientů nalézt v literatuře. Údaje pocházejících z různých zdrojů se však často neshodují a také jejich závislost na teplotě není vždy přesně definována. Dalším problémem je, že účinnost vzorkovače dosahuje sta procent pouze v ideálním případě. Z těchto důvodů je tedy vhodnější provést laboratorní kalibrační experimenty pro každý typ vzorkovače.

Pokud je rychlost příjmu polutantů řízena permeací molekul přes polopropustnou membránu, může být 1. Fickův zákon popsán podle vztahu:

$$M = \frac{D_p A}{L_M} p_1 t, \quad (\text{Rov. 5})$$

kde A je plocha permeační bariéry [cm^2], D_p je koeficient permeability daného analytu [$\text{cm}^2.\text{min}^{-1}$], L_M je tloušťka membrány [cm] a p_1 je parciální tlak analytu v blízkosti vnějšího povrchu membrány.

Pomocí Henryho zákona můžeme jednoduše převést parciální tlak analytu na jeho koncentraci ve vzduchu podle vztahu:

$$p_1 = aC_0, \quad (\text{Rov. 6})$$

kde a je Henryho konstanta. Za předpokladu konst. teploty, kdy D_p , A , L_M jsou konstanty, získáme vztah ve tvaru:

$$M = \frac{D_p A a}{L_M} C_0 t = \frac{1}{k} C_0 t, \quad (\text{Rov. 7})$$

kde k představuje tzv. kalibrační konstantu, která je určitá pro daný analyt a permeační vzorkovač. Úpravou vztahu dostaneme tvar pro výpočet koncentrace analytu ve vzorkovaném prostředí (56).

$$C_0 = \frac{Mk}{t} \quad (\text{Rov. 8})$$

Časová odezva pasivního vzorkovače je udávána rychlostí transportu látek přes difúzní nebo permeační bariéru. Závisí na hodnotách difúzních a permeačních koeficientů jednotlivých sloučenin v prostředí bariéry (65). Časová odezva difúzního vzorkovače je definována podle vztahu:

$$t_r = \frac{L^2}{2D}, \quad (\text{Rov. 9})$$

kde t_r vyjadřuje dobu setrvání molekul látky v difúzní zóně.

Časovou odezvu permeačního vzorkovače popisuje podobný vztah:

$$t_r = \frac{L_M^2}{6D_p} \quad (\text{Rov. 10})$$

Hodnoty koeficientů permeability sloučenin jsou o několik řádů nižší než hodnoty jejich difúzních koeficientů ve vzorkovaném prostředí. Časové odezvy vzorkovačů s dostatečně tenkou polopropustnou membránou (méně než 100 μm) jsou velmi krátké (v řádu sekund).

Velmi důležitou veličinou při pasivním vzorkování je teplota. Difúzní koeficient molekul analytu narůstá se zvyšující se teplotou, a tak roste i hodnota vzorkovací rychlosti difúzního vzorkovače. Vliv teploty na vzorkovací rychlost vzorkovače s permeační bariérou je nižší. Závislost standardního koeficientu permeability D_p popisuje vztah:

$$D_p = D_p^0 \exp\left(-\frac{E_p}{RT}\right), \quad (\text{Rov. 11})$$

kde E_p je aktivační energie permeace, která je dána součtem rozpouštěcího tepla analytu v materiálu membrány (ΔH) a jeho difúzní aktivační energií (E_D) podle vztahu (55):

$$E_p = \Delta H + E_D \quad (\text{Rov. 12})$$

Vzorkování pomocí pasivních vzorkovačů se prudce rozvíjí, a proto roste snaha o vývoj nových a dokonalejších typů pro vzorkování různých skupin polutantů v různých složkách životního prostředí. Z těchto důvodů jsou tyto vzorkovače velmi rozmanité konstrukce, a to v závislosti na principu vzorkování a vzorkovaném médiu.

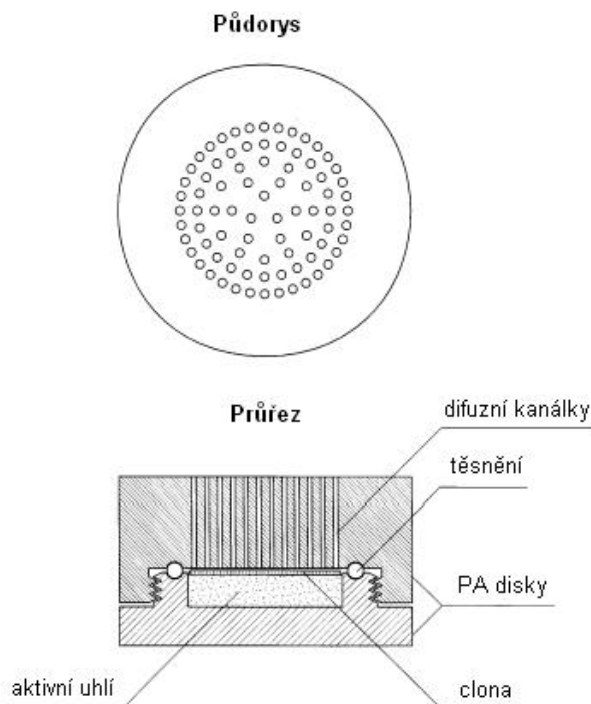
3.1.5.2.1 Difúzní pasivní vzorkovače

Vzorkovače plněné sorbentem

Difúzní vzorkovač plněný sorbentem byl navržen pro stanovení stopových koncentrací organických polutantů ve vodě (66). Tento vzorkovač (Obr. 18) s průměrem 5 cm se skládá ze dvou akrylových disků, které jsou k sobě sešroubovány a uzavřeny těsněním. Difúzní cesty se skládají ze 72 otvorů o průměru 1 mm a délce 1 cm a jsou soustředěny do středu horního disku. Spodní disk, umístěný pod difúzními otvory, obsahuje prostor s 1,5 g granulovaného aktivního uhlí. Mezi disky je umístěna clona, která brání vypadávání aktivního uhlí přes otvory difúzních kanálků.

Optimální doba expozice se pohybuje v rozmezí 5 až 50 dní. Během této doby může být dosaženo adsorpční rovnováhy, avšak velmi malé rozměry difúzních otvorů limitují adsorbované množství, proto nedochází k chybné odezvě vzorkovače. Po ukončení expozice jsou zachycené polutanty extrahovány z tuhého sorbentu, například sirouhlíkem v případě xylenu, nebo dichlormethanem v případě atrazinu, po dobu 30 až 60 minut. Poté jsou vysušeny síranem sodným a následně analyzovány. Během 10 denní expozice je dosaženo detekčních limitů v jednotkách ppb, což poskytuje dostatečnou citlivost pro mnoho aplikací. Pasivní vzorkovač

plněný sorbentem byl s úspěchem použit jak při vzorkování vody, tak při vzorkování polutantů v ovzduší (67).



Obr. 18: Pasivní vzorkovač plněný sorbentem podle Di Giana (67)

V roce 1997 byl představen obdobný typ pasivního vzorkovače plněný sorbentem pro vzorkování organických polutantů ve vodě. Tento typ vzorkovače využívá jako sorbent silikagel a XAD-amberlit a byl představen ve dvou modifikacích (68):

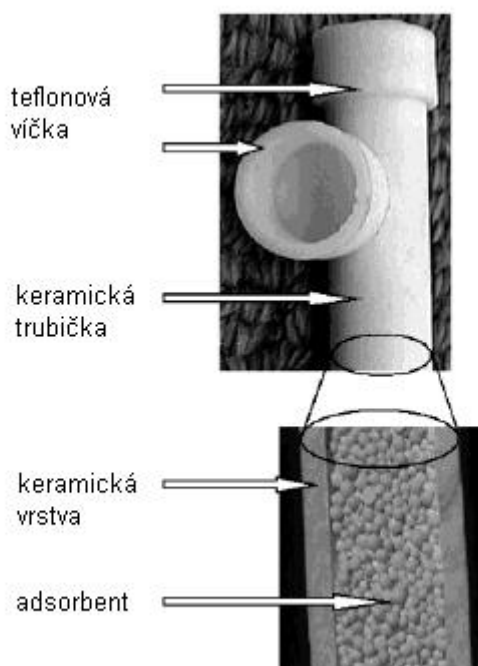
- akumulace pomocí stálé difúze přes membránu do adsorpčního činidla (podle 1. Fickova zákona)
- akumulace pomocí nestálé difúze ve vodou nasycené a zhuštěné vrstvě adsorpčního činidla (podle 2. Fickova zákona)

V prvním případě se analyt sorbuje lineárně v závislosti na čase, v případě druhém se množství polutantů zvyšuje s druhou odmocninou času. Obě metody jsou založeny na předpokladu, že nedochází k rovnováze mezi vodou a vrstvou adsorpčního činidla (67).

Další modifikací difúzního vzorkovače je varianta, kde difúzní bariéru tvoří keramická trubička, která je naplněna polymerním sorbentem na bázi kopolymeru styren-divinylbenzen (Obr. 19). Tato trubička je na každém konci uzavřena teflonovým víčkem. Tokem vody přes keramickou vrstvu obsahující adsorbent jsou polutanty v této vrstvě akumulovány vlivem difuze. Analyty jsou sorbovány lineárně s časem, v závislosti na koncentračním gradientu a celkovém transportním koeficientu přes keramickou vrstvu. Použití keramického materiálu s vysokou porozitou dovoluje poměrně rychlý difúzní tok molekul; další jeho výhodou je také inertnost, díky níž nedochází k adsorpci organických látek během permeace. V opačném pří-

padě by se zvýšila doba potřebná k průniku molekul ze vzorkovaného prostředí do adsorpční náplně vzorkovače.

Použitý adsorpční materiál na bázi kopolymeru styren-divinylbenzen se ukázal být vhodným sorbentem pro zachycení látek, jako jsou např. benzen, toluen, ethylbenzen, xylen a jeho izomery, naftalen a alkylnaftalen (69).



Obr. 19: Pasivní vzorkovač podle Martina (69)

3.1.5.2.2 Permeační pasivní vzorkovače

Vzorkovače plněné rozpouštědlem

V roce 1980 byl ve Velké Británii popsán jednoduchý vzorkovač tvořený váčkem ze syntetického polymeru (regenerovaná celulóza, polyvinylchlorid, polytetrafluorethylen), který byl naplněn nepolárním organickým rozpouštědlem. Vzorkování je založeno na snaze systému dosáhnout rovnováhy, při které rozpuštěná látka difunduje ze vzorkovaného prostředí přes membránu do organického rozpouštědla. Difuze membránou je podobná transportu biomembránami a organické rozpouštědlo je akumulovalo obdobně jako lipidy v organismech (70).

Další vzorkovač tohoto typu byl navržen o sedm let později. Byl tvořen hydrofilním váčkem z regenerované celulózy a jako náplň byl použit hexan. Svoje uplatnění našel ve vzorkování nepolárních organických polutantů ve vodách. Při difuzi přecházejí rozpuštěné látky z donorní části (vodní prostředí) do akceptorní (membrána-organická náplň) vlivem koncentračního gradientu podle 1. Fickova zákona (71).

Membrány jsou často vyráběné ze syntetických polymerů, jako je např. regenerovaná celulóza a acetát celulózy; protože jsou méně náročné na zpracování, jsou odolné vůči působení organických látek a mohou být použity v širokém rozmezí pH (od hodnot 2 až po 8). Bohužel tyto sloučeniny nejsou výrazněji chemicky ani tepelně odolné, mohou se stát předmětem bakteriálního rozkladu a navíc byly prokázány jejich reakce s několika organickými rozpouštědly. Vhodným řešením tohoto problému bylo použití polopropustné membrány vyrobené z nepolárního syntetického materiálu, například polyethylenu nebo polypropylenu, který je všeobecně odolnější a méně biodegradabilní.

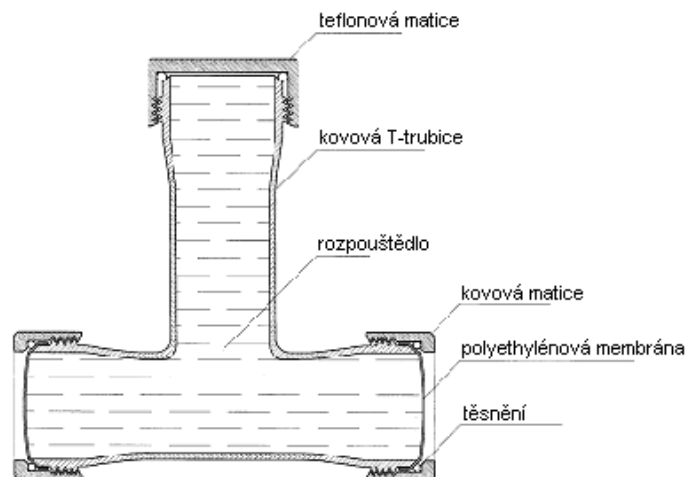
Tento typ vzorkovače umožňuje přímou analýzu organického rozpouštědla ihned po ukončení expozice. Jeho největší nevýhodou může být průnik hexanu přes nepolární membránu do okolního prostředí v průběhu vzorkování, z důvodu nízké molekulové hmotnosti (72).

Jednou z dalších variant byl vzorkovač z polyethylenové trubičky, kde byl jako náplň použit isooktan; trubička se vložila do ochranného koše a byla po dobu tří týdnů umístěna ve vodním prostředí. Během expozice přecházejí hydrofobní sloučeniny, jako jsou např. chlorované pesticidy, ze vzorkovaného prostředí do vzorkovače (73).

PISCES (Passive in situ Concentration/Extraction Sampler)

Tento typ vzorkovače (Obr. 20) je po naplnění organickým rozpouštědlem (hexan) hermeticky uzavřen. Doba expozice bývá zpravidla několik dní. K transportu polutantů z vodního prostředí přes membránu dochází vlivem difuze. Rozpouštědlo přitom pomalu difunduje do okolního prostředí, čímž zamezuje znečišťování a vzniku biotické vrstvy na povrchu membrány. Tento proces nemá vliv na příjem analytů z vody, protože difuzní proces je řízen koncentračním gradientem mezi polutanty rozpuštěnými ve vodě a v organickém rozpouštědle. Příjem analytů je ovlivněn pouze v případě dosažení rovnováhy voda-organické rozpouštědlo.

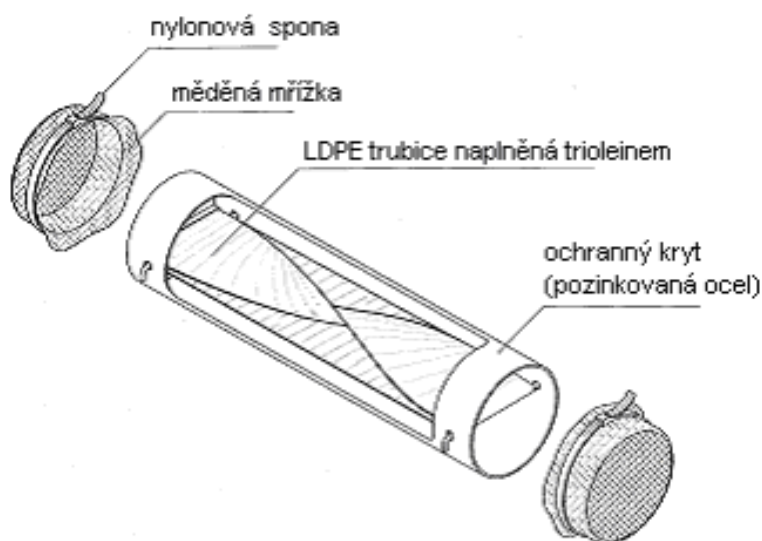
PISCES je metoda vhodná pro vzorkování stopových koncentrací organických polutantů, jako jsou například polychlorované bifenylly (PCB) ve vodním prostředí. Velkou výhodou je zakoncentrování polutantů přímo v organickém rozpouštědle, což usnadňuje přepravu vzorků do laboratoře, protože tím odpadá manipulace s velkými objemy vody. Obsah polutantů lze stanovit přímou analýzou, např. chromatograficky (74).



Obr. 20: Schéma pasivního vzorkovače PISCES (74)

SPM (Semipermeable Membrane)

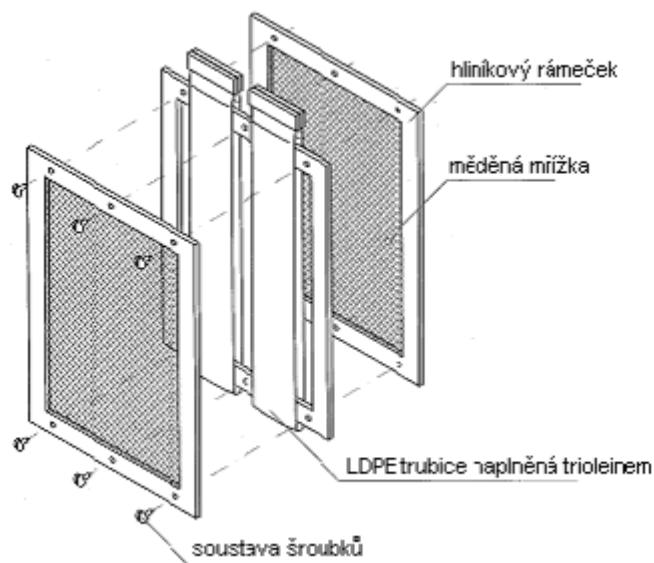
Zařízení SPM bylo vytvořeno pro selektivní dialýzu lipofilních organických polutantů. Je tvořeno plochou polyethylenovou trubičkou, naplněnou vhodnou lipofilní látkou (triolein) (Obr. 21) (75). Před každým použitím se na 24 hodin ponoří do kádinky s cyklopentanem a potom znovu promyje. Před vzorkováním se potřebně natvaruje a následně je na jednom konci zatavena. Takto zatavená se vloží do skleněného válce s PTFE uzávěrem, kterým se uzavře (76).



Obr. 21: Schéma pasivního vzorkovače SPM (75)

Při dialýze je obsah tuku zredukován na 1–5 %, což je ovlivněno celkovou dobou procesu, druhem tuku a použitými rozpouštědly. Výsledný dialyzát obsahuje lipofilní organické sloučeniny s relativní molekulovou hmotností menší než 600 Da. Tato technika může být s výhodou použita pro čištění vzorků s obsahem látek s vysokou relativní molekulovou hmot-

ností, které jsou obtížně odstranitelné (např. dehet, celulóza, buničina, tkáně a sedimenty) (77).



Obr. 22: Příklad jiného uspořádání vzorkovače SPM (78)

MESCO (Membrane Enclosed Sorptive Coating)

V roce 2001 byl představen nový typ vzorkovače pod označením MESCO, který je určen pro integrativní vzorkování hydrofobních perzistentních polutantů ve vodě (79). Tento vzorkovač je založen na technice zakoncentrování rozpuštěných organických sloučenin z vodné matrice absorpcí do vrstvy PDMS nanesené na povrchu magnetického míchadla. To je vloženo do dialyzní trubičky, která je vyrobena z regenerované celulózy a naplněna destilovanou vodou. Oba konce trubičky jsou uzavřeny svorkou, přičemž míchadlo se může uvnitř volně pohybovat (80).

Ke zvýšení selektivity extrakce dále přispívá:

- oddělení rozpuštěných molekul z koloidů během jejich difúze přes dialyzní membránu
- selektivní extrakce cílových hydrofobních analytů z vnitřního vodního roztoku pomocí PDMS sorbentu.

Výhodou této metody je využití tepelné desorpce zachycených analytů ve spojení on-line s kapilární GC/MS systémem. Kladnou vlastností je rovněž použití membrány z regenerované celulózy, která je schopna propouštět nepochybně i polární organické látky. Dalším pozitivem je také možnost opakovatelného použití magnetického míchadla, v případě, že nedojde k jeho poškození, např. během expozice nebo termodesorpce. Vzorkovače jsou malé a nevyžadují složitou instrumentaci při aplikaci v terénu (81).

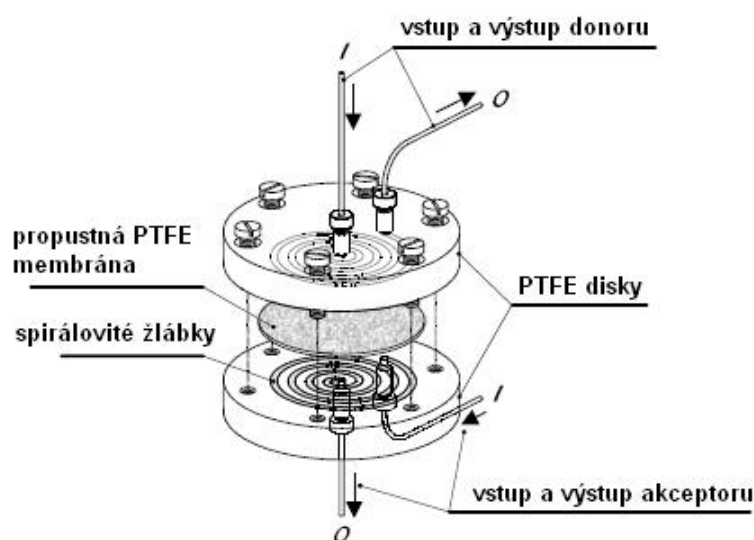
Pasivní vzorkovač MESCO byl úspěšně aplikován při stanovení pesticidů, polychlorovaných bifenylovů a polycyklických aromatických uhlovodíků ve vodách (79).

SLM (Supported Liquid Membrane Device)

Pasivní vzorkovač SLM je založen na principu difuze přes tetlonovou membránu, která odděluje dva vodné roztoky. Dochází proto k transportu iontů ze zásobního roztoku (donor) do vymývacího (akceptor). Membrána je naimpregnována organickým rozpouštědlem a vložena mezi dva disky vyrobené z PTFE (Obr. 23). V těchto discích jsou spirálovité žlábký tvarované do průtokového kanálku na obou stranách membrány. Průtokový systém umožňuje nezávislé čerpání vodného roztoku přes každý z kanálků. Vhodným výběrem roztoků mohou být sloučeniny extrahovány nejprve z donorového roztoku do kapalně organické membrány a následně vyextrahovány do roztoku akceptorového (82).

Technika kapalně membrány je v několika směrech podobná dialýze a potřebné vybavení je dokonce totožné. Avšak na rozdíl od dialýzy, kde jsou analyty nejprve rozpuštěny v čistém rozpouštědle, které je následně odpařeno, metoda kapalně membrány přináší možnost zakoncentrování. Obě techniky mají různou citlivost, protože dialýza principiálně odděluje malé molekuly analytu od makromolekul, kdežto SLM navíc ještě umožňuje zakoncentrování podobných skupin analytů. Další velkou výhodou metody SLM je minimální použití organických rozpouštědel. Průtokový systém také umožňuje jednoduchou automatizaci techniky a její přímé spojení s dalšími metodami zpracování vzorků a také s finálním krokem analýzy. Jedná se o obzvláště vhodný postup při zpracování většího množství vzorků.

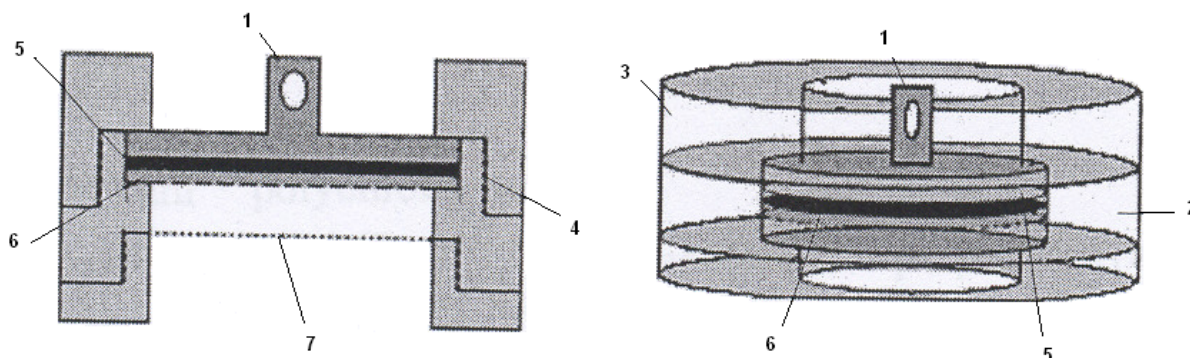
Extrakce pomocí techniky SLM se využívá pro různé druhy environmentálních a biologických vzorků, a to jako selektivní a účinná metoda pro předúpravu určitých typů analytů (81). Jako příklady lze uvést např. zakoncentrování analytů ze složitých matic jako jsou krevní plasma, moč, nebo hnojiva (82), případně pro stanovení stopových množství herbicidů v přírodních vodách (83).



Obr. 23: Schéma pasivního vzorkovače SLM (84)

Vzorkovače plněné pevným sorbentem

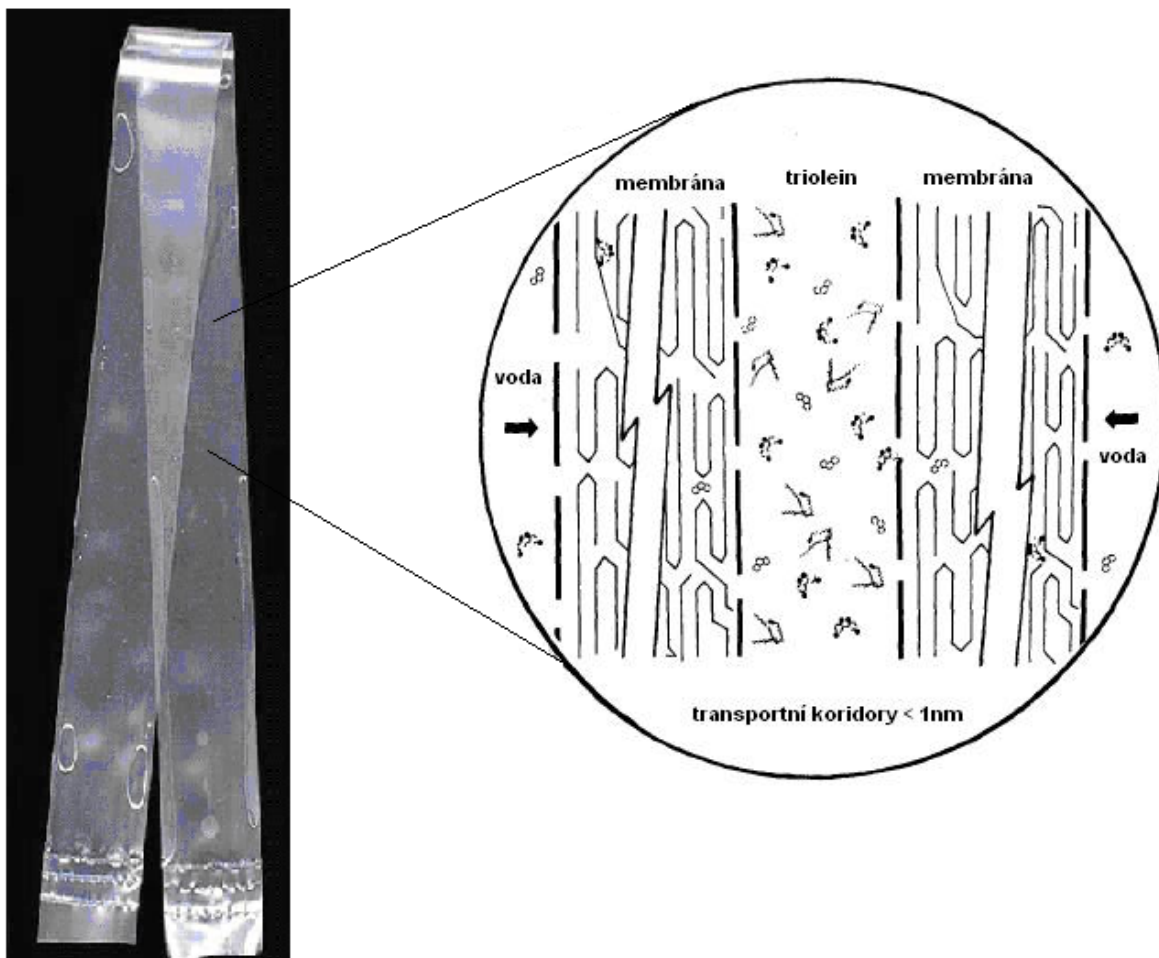
Vzorkovače se skládají z předního a zadního dílu, mezi nimiž je upevněna membrána a pevná fáze (Obr. 24). Všechny komponenty jsou spojeny voděodolným šroubovým závitem, jenž umožňuje jednoduché vložení nebo vyjmutí sorbentu a membrány. Proti poškození je povrch chráněn nerezovým sítkem. Během expozice je zařízení zavěšeno na nylonovém provázku a celý vzorkovač je ponořen pod hladinou tak, aby membrána směřovala ke dnu. Tato poloha minimalizuje shromažďování částic sedimentu na povrchu polymerní vrstvy (85).



Obr. 24: Schéma vzorkovače plněného sorbentem (1–místo pro uchycení, 2,3–přední a zadní část vzorkovače, 4–závit, 5–sorbent, 6–membrána, 7–nerezové síto) (84)

SPMD (Semipermeable Membrane Device)

Pasivní vzorkovač na bázi semipermeabilní membrány s lipidickou náplní je v současné době jedna z nejpoužívanějších technik vzorkování vody. SPMD je obdobou membránových vzorkovačů plněných nepolárním organickým rozpouštědlem. Náhradou tohoto rozpouštědla nepolární látkou vyšší molekulové hmotnosti bylo dosaženo snížení úniku náplně během vzorkování. Jako náplně se používá triolein. Proces zakoncentrování analytů v náplni vzorkovače v podstatě napodobuje biokoncentraci lipofilních polutantů z vodního prostředí do tukové tkáně vodních živočichů. Membrány jsou vyrobeny z polyethylenu o nízké hustotě (LDPE) a jsou považovány za neporézní a neproniknutelné, avšak v jejich stěnách se nacházejí dutiny vzniklé náhodným termálním pohybem polymerních řetězců, které umožňují transport organických polutantů skrz membránu. Vzhledem k jejich hydrofobním vlastnostem pronikají přes membránu pouze lipofilní látky, zatímco voda společně s polárními sloučeninami a ionty je odpuzována (Obr. 25) (86).



Obr. 25: Schéma membrány SPMD (84)

Metoda SPMD může být použita ke vzorkování vzduchu, povrchové i podzemní vody, půdy nebo sedimentů. Pro vzorkování se obvykle používá vzorkovací koš, který zabraňuje mechanickému poškození. Tento koš s otvory, kterými volně proudí kapalina, je rozdělen do pater a membrány jsou v těchto patrech umístěny pomocí háčků a pružin (Obr. 26). Celý systém pak může být uchycen pomocí lanek na plováky, které slouží pro biologický monitoring (86).



Obr. 26: Patro vzorkovače SPMD s napnutou membránou (84)

SPMD-S (Semipermeable Membrane Device – Solid)

Tento typ vzorkovače byl poprvé použit v roce 1992 ke zhodnocení kontaminace půdy polychlorovanými bifenoly. Vzorkovač se skládal z ploché PE trubičky o nízké hustotě a jako náplň byly použity dva sorbenty – C_{18} silikagel a XAD-4 (87).

O tři roky později byl použit vzorkovač obdobné konstrukce s náplní C_{18} k zakoncentrování PCB z půdy. Protože se vychází z předpokladu, že kontaminanty jsou vzorkovačem pohlcovány především z půdního vzduchu, hraje při akumulaci sloučenin nejdůležitější roli jejich těkavost (88).

TRIMPS (Trimethylpentane solvent passive samplers)

Pasivní vzorkovače tohoto typu se skládají z polyethylenové membrány o nízké hustotě a z náplně 2,2,4-trimethylpentanu, popř. směsi 1-dodekanol a 2,2,4-trimethylpentan, 3:2 (89). Výhodou této metody je to, že teplota a průtok vody nijak neovlivňují rychlost absorpce; na rozdíl od SPMD vzorkovačů nedochází k růstu perifytonu na povrchu membrány. Další výhodou je to, že před analytickou koncovkou není nutné přečištění vzorkovaného média a ani žádný dialytický postup. Naopak nevýhodou je uvolňování rozpouštědla do okolního prostředí.

POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler)

Pasivní vzorkovače POCIS jsou zařízení určené ke sledování koncentrací hydrofilních polutantů, které by mohly být akutně toxické, např. potenciální endokrinní disruptory. Jedná se zejména o pesticidy a farmaceutika. Tyto sloučeniny se nacházejí celosvětově v četných ekosystémech, kde bylo prokázáno mnoho jejich negativních účinků.

Polární organické chemikálie (POC) jsou ve vodě dobře rozpustné a jejich extrakce a následná detekce je velmi obtížná. POCIS je metoda dobře reprodukovatelná a umožňuje zakoncentrování i ultrastopových koncentrací analyzovaných látek. Velkou výhodou je univerzálnost celého systému, kdy do jednoho koše (Obr. 28) můžeme umístit dohromady vzorkovací patrony

SPMD i POCIS, čímž roste možnost použití této techniky pro stanovení širšího spektra polutantů (90).



Obr. 27: Nosič se třemi disky systému POCIS (84)



Obr. 28: Vzorkovací koš s nosičem POCIS (84)

3.1.5.2.3 Ostatní pasivní vzorkovače

Do této skupiny pasivních vzorkovačů patří většinou konstrukčně velmi jednoduchá a levná zařízení, jejichž princip je založen na difuzi molekul analytů ze vzorkovaného média do média sběrného, a to na základě rozdílu chemických potenciálů v obou fázích. Sběrné médium však není odděleno od okolního prostředí žádnou difuzní bariérou v podobě přesně vymezené polopropustné membrány nebo objemu určitého rozpouštědla. Nicméně jejich schopnost efektivně zakoncentrovat perzistentní organické polutanty ze vzorkovaného prostředí je srovnatelná s ostatními typy pasivních vzorkovačů (84).

Pasivní vzorkovač na bázi silikonové gumy

Vzorkovač tohoto typu je založen na obdobném principu jako vzorkování pomocí SPMD. V praxi se jedná o kousek silikonové gumy (SS), který je vložen do vzorkovaného média (sediment, voda), kde jsou molekuly analytů rozděleny mezi vzorkovanou matici a silikonem a po uplynutí doby expozice se změří jejich koncentrace (84).

3.2 Extrakce

Extrakce je separační metoda, při které přechází složka ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze (rozpouštědla). Extrakční metody jsou vhodné zejména při zpracování tepelně labilních látek, protože se dají provádět, na rozdíl od destilace nebo sublimace, za normálních teplot nebo v chladu. Pro popis používáme nejčastěji Nernstův zákon:

$$K_N = \frac{(c_x)_E}{(c_x)_R}, \quad (\text{Rov. 13})$$

kde $(c_x)_E$ a $(c_x)_R$ označují rovnovážnou koncentraci (látkovou nebo hmotnostní) rozpuštěné látky X v extrakčním činidlu a roztoku. Je-li m_0 a m_1 hmotnost rozpuštěné látky před a po extrakci a jsou-li V_E a V objemy extrakčního činidla a roztoku, pak platí (91):

$$m_1 = m_0 \frac{V}{V + K_N V_E}. \quad (\text{Rov. 14})$$

3.2.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction – LLE) představuje nejjednodušší techniku frakcionace, přečištění a zkoncentrování cílových analytů surového extraktu, případně může představovat první extrakční krok u kapalného vzorku. Tato metoda je založena na rozdělování rozpuštěných analytů (analytu) mezi dvě v podstatě nemísitelná rozpouštědla; prvním bývá v převažujícím počtu případů voda, ve druhém odpovídající, dostatečně nemísitelná organická rozpouštědla (92).

3.2.2 Extrakce pevnou fází (SPE)

Extrakce pevnou fází (solid phase extraction) je technika přípravy vzorků, jejíž význam neustále roste. Při použití SPE se lze vyhnout řadě problémů, které jsou již tradičně spojovány s další metodou přípravy vzorků, tj. s extrakcí kapalina-kapalina. Nejdůležitější výhodou, v porovnání s touto metodou je snížení spotřeby organických rozpouštědel, která jsou často řazena mezi látky toxické, ničící ozónovou vrstvu, ale i jinak nebezpečné (93).

Metoda je založena na rovnovážné distribuci analytu mezi vodu a tuhou fází, přičemž rovnováha je posunuta ve prospěch tuhé fáze. Používá se v případech, kdy koncentrace polutantů ve vodě je nižší, než je mez stanovitelnosti použité analytické metody, nebo když vysoká koncentrace interferujících látek znemožňuje přímé stanovení (48).

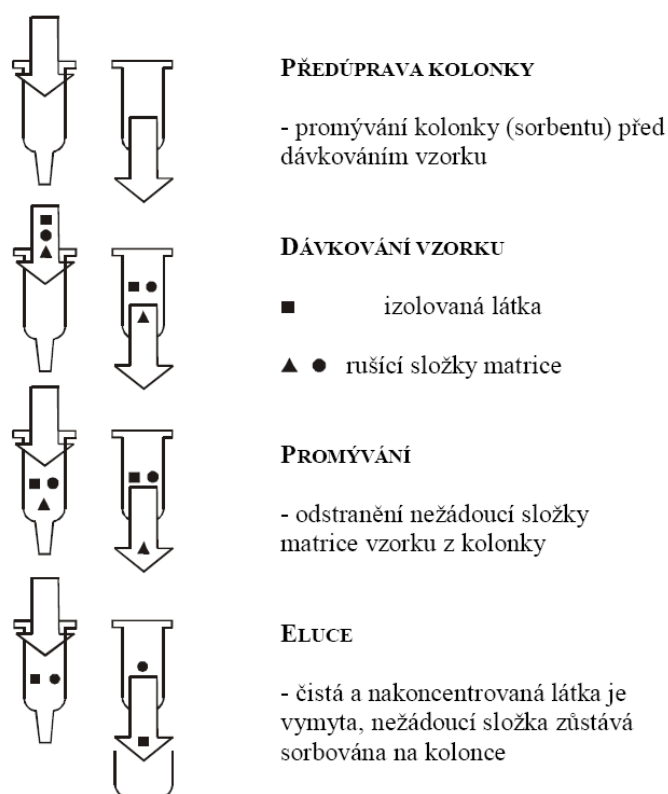
Princip extrakce pevným sorbentem spočívá v tom, že roztok analytu ve vodě se přivede do kontaktu s pevným sorbentem, který silně sorbuje analyt, ale v míře co nejmenší ostatní složky roztoku. Po oddělení sorbentu od roztoku je zachycený analyt uvolněn buď zahřátím, nebo elucí rozpouštědlem. K extrakci pevným sorbentem lze použít jak uspořádání statické, tj. míchání roztoku analytu se sorbentem a odfiltrování sorbentu, tak i uspořádání dynamické. V tomto provedení protéká roztok vzorku přes sorpční kolonku malých rozměrů, která obsahuje řádově miligramy až gramy vhodného sorbentu. Průtok vzorku je umožněn buď gravitací, nebo pozitivním tlakem na vstupu kolonky (čerpádlem, injekční stříkačkou), případně ne-

gativním tlakem (připojeným vakuem na jejím výstupu). V současných aplikacích převládá dynamické uspořádání (48).

3.2.2.1 Sorpční kolonky

Hlavním prvkem v dynamickém uspořádání je sorpční kolonka, která má obvykle délku 10 až 20 mm, vnitřní průměr 2–4,6 mm a je naplněna sorbentem o velikosti částic 20–50 μm . I když tato kolonka může plnit současně několik funkcí, jejím hlavním úkolem je zkoncentrování analytu. Proces extrakce se skládá z těchto kroků:

- 1) Aktivace sorbentu – solvatace fáze vázané na povrchu sorbentu, aktivace měniče iontů apod., s následným vymytím přebytku činidla. U některých sorbentů je tento krok vynechán.
- 2) Aplikace vzorku – analyt je z větší části oddělen od matrice vzorku.
- 3) Promytí sorbentu – slouží k odstranění interferujících složek bez toho, že by byl eluován analyt. U málo zadržovaného analytu může být tento krok vynechán a sorpční kolonka se zbaví zbytku vody profoukáním plynem.
- 4) Desorpce koncentrovaného analytu – desorpční techniky.
- 5) Regenerace sorbentu – v řadě případů se nevyžaduje; kolonky jsou často konstruovány pro jedno použití (48).



Obr. 29: Schéma průběhu SPE (94)

Místo sorpční kolonky je možné použít extrakční disk, což je síťka z teflonu nebo ze skelných vláken, ve které je zakotveno asi 90 % hmotnosti silikagelu modifikovaného skupinami C₁₈ nebo C₈, popř. hydrofobního kopolymeru (48).

Před výběrem vhodného sorbentu je třeba zjistit co nejvíce dat o vzorku, tzn. uvážit vlastnosti matrice a analytu, a na základě těchto znalostí potom zvolit typ fáze a velikost kolonky (Tab. 10) (93).



Obr. 30: SPE kolonky se sorbentem (93)

Množství sorbentu, které má být použito, se řídí poměrně jednoduchými pravidly:

- obrácené a normální fáze, adsorbenty – obsah analytů, které mají být zachyceny by neměl být větší než 5 % hmotnosti sorbentu
- iontoměniče – je třeba počítat s iontově výměnnou kapacitou sorbentu (93)

Tab. 10: Pravidla pro volbu velikosti kolonky nebo průměru disku

Množství vzorku	Velikost kolonky (průměr disku)	Množství sorbentu
< 1 ml	1 ml	50 mg / 100 mg
1 ml – 250 ml, pomalá extrakce	3 ml	500 mg
1 ml – 250 ml, rychlá extrakce	6 ml	500 mg
10 ml – 250 ml, velká kapacita sorbentu	6, 12, 20, 60 ml	1, 2, 10 g
< 1 ltr	6, 12, 20, 60 ml	1, 2, 10 g
100 ml – 1 ltr	47 mm disk	–
> 1 ltr, velká kapacita sorbentu	90 mm disk	–

3.2.2.2 Typy sorbentů

Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii, a proto i používané sorbenty jsou vlastně velice podobné. Používají se chemicky obrácené vázané fáze na bázi silikagelu, normální fáze a iontově výměnné fáze, ale i celá řada dalších sorbentů (Tab. 11) (93).

Aktivní uhlí je používáno pro sorpci z vody poměrně málo. U některých látek (např. fenolů) dochází částečně k nevratné sorpci s předpokládanou tvorbou pryskyřic. Aktivní uhlí má výbornou schopnost zachycovat aromatické uhlovodíky, chlorované aromatické uhlovodíky apod. Při zachytu polycyklických aromatických uhlovodíků z vody dosahují hodnoty distribučních konstant $K_D > 10^8 \text{ l.kg}^{-1}$. Problémy nevratné sorpce se vyskytují i v těchto případech (48).

Silikagel modifikovaný alkylsilany a polymerní sorbenty mají podobný charakter jako aktivní uhlí. Přednostně se sorbují nepolární nebo málo polární analyty, zatímco disociované složky jsou zadržovány minimálně. Povrchově vázané alkylsilany silně zadržují složky s dlouhými alkanickými řetězci, avšak polymerní sorbenty na bázi styrenu a divinylbenzenu zadržují nejvíce aromatické analyty. Pro sorpci polycyklických aromátů z vody jsou polymerní sorbenty jen o málo méně účinné než aktivní uhlí. Přitom voda má na nich malou retenci a dá se snadno odstranit. Jejich další výhodou spočívá v tom, že na rozdíl od modifikovaného silikagelu nejsou poškozovány mobilními fázemi v širokém rozmezí pH. Tato vlastnost je také důležitá při zakoncentrování složek, které ve vodě disociují. Disociaci kyselých látek potlačujeme přidáním kyseliny; u látek bazických upravujeme pH roztoku analytu do oblasti alkalické. Polymerní sorbenty mají význam pro koncentrování látek bazických, protože modifikované silikagely jsou nestabilní již při $\text{pH} = 8,0$.

Měníče iontů jsou sorbenty, které obsahují funkční skupiny iontové povahy s nábojem. Tyto sorbenty zadržují z roztoku ionty s opačným nábojem, než je náboj funkční skupiny iontoměniče. Pro separaci protonizovaných bazí se používají měniče kationtů obsahující funkční skupiny se záporným nábojem, jako např. $-\text{SO}_3^-$. Měníče kationtů tohoto typu jsou v literatuře označovány jako silné a ve firemních názvech se u nich objevuje zkratka SCX (strong cation exchanger). Slabé měniče kationtů nesou nejčastěji skupiny $-\text{COO}^-$. Ke zkoncentrování disociovaných kyselin z vodných roztoků užíváme měniče aniontů, které nesou funkční skupiny $-\text{NR}_3^+$ (silné měniče aniontů SAX), nebo $-\text{NH}_2$ (slabé měniče aniontů WAX). Nosičem funkčních skupin může být buď kopolymer styren-divinylbenzen, nebo silikagel. Měníče iontů na polymerních nosičích mají vyšší kapacitu (až 5 mmol.g^{-1}) a lepší chemickou odolnost, avšak jejich mechanické vlastnosti nebývají nejlepší. Také mění svůj objem s tím, jak se mění jejich nabobtnání v různých mobilních fázích. Problémy s rychlostí difuze uvnitř částic jsou stejné jako u polymerních sorbentů. Měníče iontů na bázi silikagelu s navázanými iontovými skupinami mají vynikající mechanické vlastnosti a jsou vhodné pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. Jejich kapacita je v porovnání s předchozím typem nižší (do 1 mmol.g^{-1}); chemicky jsou stálé pouze v rozmezí $\text{pH} 2-8$. Pro extrakci pevným sorbentem jsou vhodnější měniče iontů s funkčními skupinami na polymerních nosičích, neboť mají větší kapacitu (48).

Tab. 11: Příklady použití jednotlivých typů sorbentů (94)

Princip	Adsorbent	Vzorek	Eluční rozpouštědlo
Nepolární extrakce	C18, C8, fenyl, CN	PAH, PCB, pesticidy, antibiotika, aflatoxiny, kofein, nikotin, vitamíny	hexan, dichlormethan, acetonitril, alkoholy
Polární extrakce	silikagel, NH ₂ , CN, OH	antibiotika, pesticidy, steroidy, vitamíny, aflatoxiny	di- a trichlormethan, ethylacetát, alkoholy, voda
Kationtová výměna	silně kyselý katex (SA)	aminokyseliny, chlorofyl, PCB	kyseliny, roztoky solí, puify
Aniontová výměna	bazický anex (SB, NH ₂ , DMA)	organické kyseliny, kofein, sacharin	zásady, roztoky solí, puify
Extrakce ve směsném modu	CN/SiOH, NH ₂ /C18, SA/SiOH	PAH z půdy a vody, PCB z odpadních olejů, tělní tekutiny	chloroform, aceton, ethylacetát, methanol
Nepolární extrakce na polymeru	PS-DVB kopolymer	fenoly a pesticidy z vody, PAH z olejů	ethylacetát, methanol, acetonitril

3.3 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Základem elektromigračních metod je pohyb elektricky nabitých částic v důsledku působení elektrického pole. Částice s kladným nábojem (kationty) se pohybují směrem k negativně nabitě elektrodě (katodě) a částice s negativním nábojem (anionty) se současně pohybují směrem opačným, protože jsou přitahovány kladně nabitou elektrodou a odpuzovány katodou. Neutrální částice nejsou přitahované ani odpuzované. Rozdílná pohyblivost různých druhů částic a elektrokinetické jevy jsou základním principem jejich separace elektromigračními separačními technikami, jako jsou např. elektroforéza, izoelektrická fokusace a izotachoforéza (95).

Kapilární zónová elektroforéza se v analytické praxi prosazuje nejenom svojí experimentální jednoduchostí, rychlostí a snadností, s níž lze nastavit nebo změnit experimentální podmínky, ale zejména rozmanitými možnostmi použití, jako je například oblast chirální separace.

Nejpoužívanější verzí CZE je tzv. elektroforéza ve volném roztoku (free solution electrophoresis). Ostatní varianty jsou zaměřeny na zvláštní skupiny sloučenin, případně na speciální typy analýz (96).

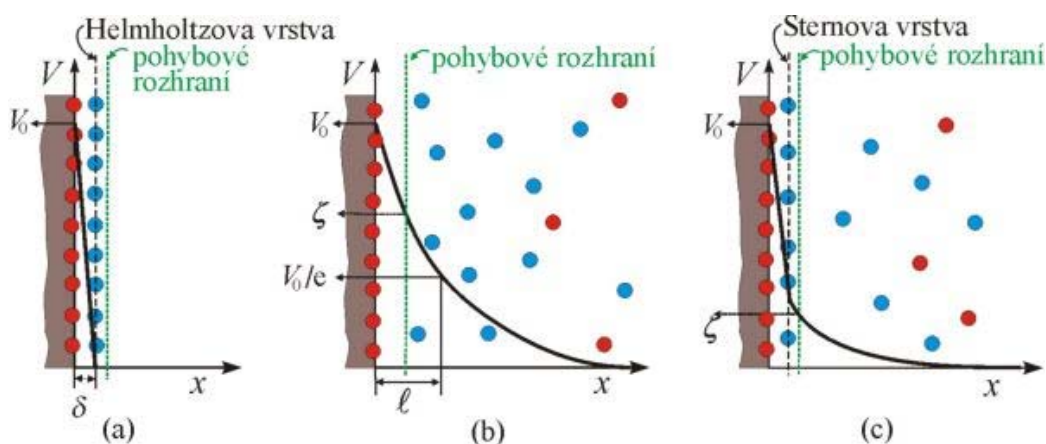
3.3.1 Princip metody

Elektroforéza je orientovaný pohyb iontů v roztoku, který je způsobený vnějším elektrickým polem. K vyvolání tohoto fyzikálního procesu, pohybu iontů vůči rozpouštědлу, stačí ponořit do roztoku elektrolytu dvě elektrody a vložit na ně elektrické napětí. Po vložení stejnosměrného napětí se rychlost elektroforetického pohybu ustaví řádově během 10^{-13} s (96).

Teoretickým předpokladem, nezbytným pro vývoj technik na oddělování analytů na základě různé rychlosti pohybu elektricky nabitých částic (ionty, koloidy, micely) účinkem elektrického pole, jsou poznatky z elektrochemie a koloidiky.

Na povrchu pevné fáze, která je ve styku s roztokem elektrolytu (i když tato fáze není elektrodou), se mohou adsorbovat částice rozpouštědla; podle charakteru a velikosti elektrického náboje, uplatňujícího se u povrchu, dochází k polární sorpci iontů z roztoku elektrolytu. Náboj na povrchu musí být vyvážený opačným nábojem okolního prostředí a elektroneutralitu systému vysvětluje představa elektrické dvojvrstvy (Obr. 31). Část náboje přilne k tuhému povrchu, který není tak rozptylován tepelným pohybem. Této části dvojvrstvy odpovídá potenciálový rozdíl ψ . Druhá (tzv. difúzní část) dvojvrstvy je pohyblivá a přísluší jí tzv. elektrokinetický potenciál ζ (zeta-potenciál). Jeho přítomnost je podmínkou vzniku elektrokinetických jevů. Celkový potenciálový spád v obou vrstvách $E = \psi + \zeta$ má Nernstovský charakter.

Každé porušení rozložení elektrického náboje (struktury elektrické dvojvrstvy) na tuhém povrchu způsobuje elektrokinetický jev: elektroforézu a elektroosmózu (vyvolané elektrostatickými silami) nebo proudový a sedimentační potenciál (vlivem mechanických sil) (95).



Obr. 31: Modely elektrické dvojvrstvy: (a) Helmholtzův model, (b) Gouy-Chapmanův model, (c) Sternův model (97)

3.3.1.1 Elektromigrace

Elektromigrace je transport iontů ve směru gradientu elektrického napětí. Síla F_1 , která nutí ionty migrovat k opačně nabitě elektrodě, je daná součinem náboje iontu ze a intenzity elektrického pole U/l :

$$F_1 = zeU/l, \quad (\text{Rov. 15})$$

kde z je nábojové číslo iontu, e je elementární náboj, U je napětí vkládané na elektrody a l je jejich vzdálenost.

Působení elektrického pole na krátký čas vyvolá rovnoměrně zrychlený pohyb iontu k příslušné elektrodě. Pohyb iontu je brzděný silou tření F_2 , která je úměrná rychlosti pohybu iontu

v . Za předpokladu, že Stokesův vztah pro kulová tělesa s poloměrem r a rychlostí v můžeme použít i v mikroskopickém měřítku, lze zapsat:

$$F_2 = 6\pi r\eta v, \quad (\text{Rov. 16})$$

kde η je vizkozita prostředí.

Síly F_1 a F_2 působí proti sobě a tak je rychle dosaženo stavu, kdy se celková síla působící na iont rovná nule a výsledkem je konstantní rychlost pohybu iontu:

$$v = zeU/l6\pi r\eta \quad (\text{Rov. 17})$$

Rychlost pohybu iontů v elektrickém poli o jednotkové intenzitě (1 Vm^{-1}) se nazývá (efektivní) iontová pohyblivost (mobilita) μ :

$$\mu = ze/6\pi r\eta \quad (\text{Rov. 18})$$

3.3.1.2 Elektroforéza

Stálá elektroforetická rychlost $v_{ef,i}$, kterou se i -té částice pohybují v homogenním elektrickém poli k elektrodě s opačným nábojem je podle výše uvedených rovnic přímo úměrná gradientu potenciálu a efektivní elektroforetické pohyblivosti:

$$v_{ef,i} = \mu_{ef,i}(U/l), \quad (\text{Rov. 19})$$

přičemž elektroforetická pohyblivost je přímo úměrná velikosti náboje částice q_i a nepřímo úměrná jejímu poloměru r_i a vizkozitě η okolního prostředí (tlumivého roztoku):

$$\mu_{ef,i} = q_i/(6\pi\eta r_i). \quad (\text{Rov. 20})$$

Elektroforetická pohyblivost vypočítaná podle této rovnice je pro reálné koncentrované roztoky nadhodnocená, protože se neuvažuje brzdící účinek iontové atmosféry protiiontů, nebo elektrické dvojvrstvy opačně nabitých částic, putujících opačným směrem (95).

Rychlost iontu vyjádřená v m.s^{-1} , která byla vyvolána elektrickým polem o intenzitě 1 V.m^{-1} je velmi malá, a proto se obvykle udává v jednotkách $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Při takovém vyjádření jsou mobility nízkomolekulárních, plně disociovaných iontů i jejich polymerů zpravidla v rozmezí 20–80 jednotek. Výrazně vyšší jsou pouze hodnoty mobilit hydroxylového iontu ($\mu = -205,5$) a protonu ($\mu = 362,5$) (96).

3.3.1.3 Elektroosmóza

Jev elektroosmózy se uplatňuje rozhodující mírou v kapilárních elektroforetických technikách používajících křemenné kapiláry malých průměrů (typicky 20 až 200 μm).

Na povrchu skleněných a křemenných kapilár se smáčením vodou vytvářejí silanolové skupiny, které po disociaci nesou záporný náboj (pH prostředí nesmí být příliš nízké). V důsledku

toho vzniká při povrchu elektrická dvojvrstva, jejíž statickou část tvoří kationty umístěny těsně při stěnách kapiláry (95). Elektrické pole, které působí elektroforetický pohyb iontů, uvádí do pohybu také kationty v tenké difuzní části elektrické dvojvrstvy v základním elektrolytu; ty svým jednosměrným pohybem strhávají celou vrstvu roztoku s přebytkem kladného náboje. Viskozitou vody se tento jednosměrný pohyb přenáší od stěny kapiláry k jejímu středu. V tenké kapiláře se tak uvede do pohybu všechna kapalina – vznikne elektroosmóza. Rychlost elektroosmotického toku vzrůstá jen do vzdálenosti, kde difuzní část dvojvrstvy končí, a dále se jeho rychlost nemění. Tím vzniká, pro elektroforézu typický, plochý pístový profil. Rychlost toku v_{eo} je úměrná intenzitě elektrického pole, které na něj působí. Obdobně jako při elektroforetickém pohybu platí:

$$v_{eo} = \mu_{eo}E \quad (\text{Rov. 21})$$

Elektroosmotický koeficient μ_{eo} představuje rychlost elektroosmotického toku kapaliny, udanou v m.s^{-1} , v elektrickém poli o intenzitě 1 V.m^{-1} . Tento tok je důsledkem pohybu iontů v elektrickém poli. Proto jsou velikosti μ a μ_{eo} srovnatelné.

Celková rychlost pohybu iontu separační kapilárou je superpozicí elektroforetického pohybu iontu vůči kapalině a elektroosmotického toku této kapaliny kapilárou. Existence elektroosmózy v separačních systémech CZE umožňuje v jednom experimentu vzájemně rozdělit a detekovat kationty, anionty a elektricky nenabitě složky vzorku jako neseparovanou skupinu. Pořadí eluce kationtů, aniontů a nenabitých sloučenin i míra vzájemného rozdělení iontů téže polaritě závisí na uspořádání a podmínkách separace. Elektroosmóza má vliv na rychlost i účinnost separací. Zásadním způsobem ovlivňuje selektivitu separací i výsledné rozlišení migrujících zón (96).

3.3.1.4 Efektivní mobilita

Jen zanedbatelná část sloučenin jsou indiferentní silné elektrolyty, které se v roztoku plně štěpí na ionty, jež neinteragují s žádnou složkou roztoku. Zkušenost ukázala, že sloučeniny, které podléhají dostatečně rychlým vratným rovnováhám, jako jsou např. acidobazické rovnováhy, nelze elektroforeticky rozdělit tak, aby každá z koexistujících forem vytvořila vlastní zónu. Koexistující formy migrují společně ve směsné zóně, která se chová jako zóna nabitého individua. Mobilita takové směsné zóny nikdy nevybočí z oboru vymezeného extrémními mobilitami koexistujících forem a vždy závisí na relativním zastoupení koexistujících forem. Tuto zkušenost vyjadřuje Tiseliov koncept efektivní iontové mobility:

$$\mu_{eff} = \sum_i \mu_i x_i, \quad (\text{Rov. 22})$$

kde μ_i je mobilita i -té koexistující formy sloučeniny a x_i je její molární zlomek (96).

3.3.2 Uspořádání metody

V uspořádání kapilární zónové elektroforézy jsou drátové platinové elektrody umístěny v oddělených, zpravidla stejně velkých elektrodových prostorech, o objemu mezi 1–20 ml. Větší objem elektrodové kapaliny zlepšuje stálost jejího pH a složení během analýz. Až na výjimky se používají kapiláry z vysoce čistého křemene pro optická vlákna (fused silica), které pro-

pouští UV světlo. Celková délka kapiláry L se volí podle potřeb analýzy s přihlédnutím ke konstrukčním požadavkům přístroje. Nejčastěji je v rozmezí 25–100 cm, světlost kapiláry je obvykle v rozmezí 50–100 μm . Vnější průměr kapilár používaných v komerčních přístrojích bývá 360 μm .

Standardní a dominantní detekční technikou je UV-VIS fotometrie a její varianty. Ve vnějším polyimidovém pokrytí kapiláry, které zlepšuje její mechanické vlastnosti, se zhotovuje detekční okénko pro světelný paprsek procházející kapilárou radiálně. Vzdálenost okénka od vstupu do kapiláry vymezuje separační (efektivní) délku kapiláry l , která je důležitá pro výsledné rozlišení migrujících zón.

Standardním prostředím elektroforetické separace je tlumivý vodný roztok o koncentraci 5–100 mmol.l^{-1} , k němuž jsou podle potřeb analýzy přidány další složky (základní elektrolyt – BGE), kterým se plní elektrodové prostory i kapilára. Zpravidla nejvhodnější, a také nejčastěji používané, jsou uni-univalentní pufrы. Zcela nevhodné jsou pro elektroforetické účely pufrы univerzální. Podle potřeb analýzy je pH základního elektrolytu voleno zpravidla v rozsahu 2–10 (96).

3.3.2.1 Kapilára

Křemen jako základní materiál byl pro výrobu elektroforetických kapilár zvolen proto, že dokonale propouští UV světlo. Při tažení kapiláry za vysokých teplot se z povrchu křemene kvantitativně odštěpí adsorbovaná i chemisorbovaná voda. Vzniklé siloxanové skupiny reagují se vzdušnou vlhkostí za vzniku několika typů silanolových skupin. Ve vodných roztocích je tento proces rychlejší a jeho rychlost roste s pH roztoku. Silanolové skupiny jsou různě kyselé, některé z nich disociují již při $\text{pH} = 2$. Počet disociovaných skupin roste s pH a křemen tak získává negativní náboj, jehož velikost roste s pH roztoku i s dobou, po niž je křemen ve styku s vodným roztokem. V alkalických roztocích, přibližně od $\text{pH} = 10$, je hydrolýza siloxanových vazeb tak silná, že křemen začíná depolymerizovat. Přitom se odštěpuje částečně disociovaná kyselina křemičitá a na povrchu křemene zůstávají pouze silanolové skupiny.

K odstranění obtíží, které při elektroforetických separacích působí časově proměnný povrchový náboj, se křemenná kapilára před prvním použitím upravuje (aktivuje), zpravidla půlhodinovým promytím 1 M NaOH nebo KOH. Hydroxidem o koncentraci 0,1–1 M se kapilára promývá vždy, změní-li svoje vlastnosti, např. proto, že se nasorbují bílkoviny nebo kationtové analyty. Dobu promytí je nutno zjistit empiricky. Několikaminutové promytí po každé analýze bývá někdy doporučováno pro zlepšení reprodukovatelnosti analýz. To platí zejména při analýzách reálných vzorků se složitými maticemi neznámého složení (96).

3.3.2.2 Dávkování vzorku

Standardním způsobem dávkování, který nemění složení vzorku, je jeho vtlačování do kapiláry rozdílem tlaků na vstupu a výstupu kapiláry (hydrodynamické dávkování). Objem nadávkovaného vzorku závisí na jeho viskozitě, na světlosti a délce kapiláry, na rozdílu vstupního a výstupního tlaku a na době dávkování.

Rozdíl tlaků na vstupu a výstupu kapiláry lze nejspíše vyvolat jejich umístěním od různé výšky. Dávkovacím tlakem pak je hydrostatický tlak, který je úměrný rozdílu výšek hladin kapaliny mezi vstupem a výstupem kapiláry. Dávkování se zahájí ponořením vstupu kapiláry do dávkovaného vzorku a ukončí jeho vyjmutím. Samovolnému výtoku vzorku z kapiláry brání povrchové napětí. Tento způsob dávkování je velmi reprodukovatelný. Konstantní rozdíl výšek je lehce realizovatelný, dobu dávkování lze přesně kontrolovat a pokud lze rozdíl výšek vstupu a výstupu kapiláry měnit, pak i mimořádně flexibilní. Klade však omezující nároky na konstrukci držáku, resp. kazety kapiláry i na termostatovací systém. Proto výrobci komerčních přístrojů zpravidla preferují dávkování konstantním přetlakem na vstupu do kapiláry nebo podtlakem na jejím výstupu.

Při elektromigračním dávkování je ve vzorku pomocná dávkovací elektroda, na kterou se po známou dobu vloží stejnosměrné napětí vhodné velikosti a polarity. Analyzované ionty migrují ze vzorku do kapiláry, přičemž jejich nadávkované množství závisí jak na jejich koncentraci ve vzorku, tak také na jejich mobilitě. Elektromigrační dávkování proto kvantitativní zastoupení iontových analytů mění (96).

3.3.2.3 Elektromigrační transport

Napětí vložené na kapiláru se podél ní samovolně rozloží tak, aby v každém průřezu protékal stejný proud. Je-li elektrická vodivost vzorku a základního elektrolytu stejná, bude gradient napětí, který určuje rychlosti pohybu všech složek roztoku (a tím při daném složení roztoku i protékající proud) v obou částech kapiláry stejný.

Má-li vzorek elektrickou vodivost nižší, je gradient napětí (intenzita el. pole) v zóně vzorku vyšší než v části kapiláry se základním elektrolytem. Iontové složky se proto v zóně vzorku pohybují rychleji než v základním elektrolytu. To platí jak pro složky vzorku, tak pro složky BGE, které do zóny vzorku proniknou svým elektromigračním transportem. Proto zóna s odlišnou vodivostí během analýzy nezaniká a při absenci elektroosmózy se její poloha v kapiláře nemění.

Na rozhraní méně vodivé zóny vzorku a BGE se v tomto případě iontové složky vzorku koncentrují. Jejich zóny se proto na počátku analýzy zkrátí (zaostřování zón, zone stacking). Zkoncentrování i zkrácení zón analytů je určeno poměrem vodivostí BGE a vzorku. Vyšší gradient napětí v zóně vzorku vede k vyšší produkci tepla v této zóně. Při extrémně nízké elektrické vodivosti vzorku může teplota vzrůst až k bodu varu vody.

Dlouhé zóny nízkovodivých vzorků měřitelně mění potenciální gradient podél kapiláry, a tedy i rychlosti migrace analytů. Jinak řečeno, při dávkování velkých objemů vzorků s velmi nízkou elektrickou vodivostí se rychlost migrace analytů mění v závislosti na vodivosti dávkovaného vzorku a na délce jeho zóny v kapiláře. Dávkování takovýchto vzorků je proto zcela nevhodné. Nízkou vodivost lze zvýšit přidávkem libovolného indifferntního elektrolytu.

Bude-li mít vzorek vyšší elektrickou vodivost než základní elektrolyt, a to třeba proto, že obsahuje značnou koncentraci iontů, které jsou stanovovány (iontová matrice), probíhají procesy opačné. V jejich důsledku se zóny iontových analytů na začátku analýzy prodlužují a jejich koncentrace klesá (rozostřování zón, zone destacking).

Elektrická vodivost vzorku je proto parametrem, který je nutno znát a v případě potřeby vhodně upravit. Není-li možné vodivost vzorku dostatečně snížit, je nutno buď akceptovat sníženou účinnost separace nebo zvýšit elektrickou vodivost BGE. Nejvýhodnější v tomto případě bývá zvýšit koncentraci pufru (96).

3.3.2.4 Účinnost separace

Dominantním mechanismem rozmývání zón analytů během transportu kapilárou je podélná difúze. Difúzní koeficient je v kapalinách velmi nízký a klesá s velikostí molekuly (molekulovou hmotností) analytu. Při dobrém termostátování kapiláry a jejím dostatečně vysokém elektrickém odporu lze použít vyššího pracovního napětí, které dobu analýzy zkrátí a tím sníží rozmýtlí zón.

Významnou charakteristikou CZE je proto velmi vysoká účinnost separací, která řádově převyšuje dosažitelnou účinnost separací kapalinovou chromatografií. Při analýzách nízkomolekulárních iontů a ionizovatelných sloučenin lze i při běžných analýzách v krátkých kapilárách dosahovat účinnosti nad 50 000 teoretických pater. Při analýzách makromolekul v dlouhých kapilárách jsou možné účinnosti řádu 10^6 teoretických pater. K jejich dosažení je nutné, aby časová konstanta detekčního zařízení byla nejvýše 0,1 vteřiny (při dělení v krátkých kapilárách až o řád nižší), a aby zóna vzorku, jehož elektrická vodivost se prakticky neliší od el. vodivosti BGE, obsadila nejvýše několik desetin procenta separační délky kapiláry.

Celková délka zóny v kapiláře, a tedy i její šířka na záznamu analýzy, je součtem délky této zóny na začátku analýzy a jejího prodloužení během analýzy. Pro uchování vysoké účinnosti analýz se proto doporučuje, aby délka zóny vzorku v kapiláře nepřesáhla 1–2 mm. Objem kapiláry světlosti 75 μm a délky 50 cm je téměř přesně 1 μl . Objem vzorku dávkovaný do této kapiláry, který vytvoří zónu 1–2 mm dlouhou, je proto 2–4 nl. Z toho vyplývá, že 1 μl vzorku by proto měl teoreticky vystačit alespoň na 250 vysokoúčinných analýz (96).

3.3.2.5 Detekce

Dominantní detekční technikou v současné analytické praxi je optická detekce. K minimalizaci detekčního zkreslení, a s tím spojenou vysokou účinností analýz, napomáhá využití části separační kapiláry jako detekční cely. Čím kratší část kapiláry je takto využita, tím méně zkresluje detekce tvar zón. Pro běžnou UV nebo UV-VIS detekci se délka kapiláry, která slouží jako detekční cela, pohybuje v řádu desetin milimetru. Laserovým technikám stačí úsek podstatně kratší.

Používané detektory se svou koncepcí, základními vlastnostmi i možnostmi použití, kvalitativně neliší od detektorů pro HPLC. Maximální optická dráha je dána průměrem kapiláry, který, a to až na výjimky, nepřevyšuje 0,1 mm. Citlivost fotometrické detekce je proto zhruba o dva řády nižší než v HPLC. V praxi je tato nevýhoda do jisté míry vyvážena pomalým snižováním koncentrace zóny během analýzy i možností zkoncentrovat zónu na počátku analýzy. Do optického systému detektoru nebo do držáku kapiláry kvalitního přístroje je vždy zabudována křemenná čočka, která zvyšuje světelný tok minimální plochou detekční cely (96).

Mezi další používané detektory patří fluorescenční (FLD) a hmotnostní detektor (MS).

3.3.2.6 Vyhodnocení záznamu

Teorie kapilární zónové elektroforézy vychází z implicitního předpokladu pohybu iontů v elektrickém poli konstantní intenzity, tj. z předpokladu konstantní rychlosti migrace iontů kapilárou. Jedinou měřitelnou veličinou, která charakterizuje pohyb zón analytů kapilárou, je doba jejich migrace od vstupu do kapiláry po detekční okénko (t_m) a veličin s tímto časem související nebo z něj odvozené, např. délkové údaje v záznamu analýzy. Podíl l/t_m udává makroskopickou (zdánlivou) rychlost elektroforetického pohybu zóny kapilárou, v_{app} , kterou vyvolalo napětí vložené na kapiláru. Mobilitu, která této zdánlivé rychlosti formálně odpovídá (zdánlivá mobilita, μ_{app}) lze zjistit z migračního času zóny (t_m), z napětí vloženého na elektrody (V), z celkové délky kapiláry (L) a z její separační (efektivní) délky (migrační dráhy analytu, l).

$$\mu_{app} = \frac{1}{t_m} \cdot \frac{L \cdot l}{V} \quad (Rov. 23)$$

Interpretace výsledků zdánlivé mobility vyžaduje informace, které nelze získat z parametrů zóny analytu. Byla-li zaregistrována zóna nenabitě sloučeniny, lze z jejího migračního času (t_0) vypočítat rychlost elektroosmotického toku. Pro určení elektroosmotického koeficientu μ_{eo} se do rovnice dosadí t_0 místo t_m . K rozhodnutí, zda rozdíl ($\mu_{app} - \mu_{oe}$) představuje iontovou nebo efektivní mobilitu, je třeba znát složení a pH základního elektrolytu a pK_a migrující sloučeniny (96).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Používané přístroje a zařízení

- kapilární zónová elektroforéza Agilent CE s DAD, Agilent Technologies, Německo
- dvoupaprskový UV/VIS spektrofotometr Unicam UV 500, Thermo Spectronic, USA
- analytické váhy HR–120, A&D Instruments, Japonsko
- pH metr InoLab WTW series, Nameco, ČR
- ultrazvuková vodní lázeň Teson 4, Tesla, ČR
- SPE manifold s nástavcem pro odpařování pod dusíkem, Sigma-Aldrich, Německo
- SPE kolonky Oasis HLB, Waters, USA
- automatické míchadlo Autovortex SA6, Stuart Scientific, Velká Británie
- běžné laboratorní vybavení

4.2 Software pro zpracování a prezentaci dat

- Microsoft Office Word 2007 (Microsoft Corporation, USA)
- Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA)
- ACD ChemSketch, verze 5.12 (Advanced Chemistry Development, Inc.)
- Agilent 3D-CE ChemStation (Agilent Technologies, Německo)

4.3 Používané chemikálie a standardy

4.3.1 Chemikálie

- Deionizovaná voda upravená přístrojem Milli-Q Academic, Millipore, USA
- Kyselina chlorovodíková 35%, p.a., Penta, ČR
- Hydroxid sodný, p.a., Lachema, ČR
- Methanol, p.a., Penta, ČR
- Mesityloxid, pro syntézu, Merck, ČR
- Tetraboritan sodný (dekahydrát), p.a., Onex chemie, ČR
- Octan amonný, p.a., Sigma-Aldrich, Německo
- Amoniak, 25–26% vodný roztok, p.a., Lachema, ČR

4.3.2 Standardy léčiv

- Kyselina salicylová, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina acetylsalicylová, Sigma-Aldrich, Německo
- Paracetamol (acetaminofen), Sigma-Aldrich, Německo
- Diklofenak – sodná sůl, Sigma-Aldrich, Německo
- Ibuprofen – sodná sůl, Sigma-Aldrich, Německo
- Ketoprofen, Sigma-Aldrich, Německo
- Naproxen, Sigma-Aldrich, Německo

4.4 Sledovaná matrice

Sledovanou maticí byla odpadní voda odebíraná na ČOV. U těchto druhu vod je předpokládána největší míra znečištění biologicky aktivními látkami, tj. i léčiv. Voda byla na ČOV odebírána jak na přítoku, tak na odtoku, a to za účelem porovnání účinnosti odbourání cílových analytů.

Dalším sledovaným kritériem bylo posouzení vlivu technologie čištění na odbourání léčiv. Z toho důvodu byly vybrány dvě ČOV s rozdílnou kapacitou ekvivalentních obyvatel (EO).

4.4.1 Odpadní voda z ČOV do 10 000 EO

Vybraná čistírna byla projektována pro 6 990 EO (současná kapacita je 5 250 EO) a jsou na ni napojeny dvě menší obce. Průměrný přítok činí $73,6 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ a maximální $95 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. Zádrž čistírny je cca 2 dny, v závislosti na množství přitékající odpadní vody. Z hlediska technologie čištění se jedná o mechanicko-biologickou ČOV s dlouhodobou aktivací a aerobní stabilizací kalu v oběhové nádrži. Je určena pro čištění splaškových a srážkových odpadních vod komunálního charakteru. Mechanická část je tvořena jemnými česlemi, lapákem písku a dešťovou zdrží, biologickou tvoří dvojice oběhových nádrží a čtveřice dosazovacích nádrží. Kalovou koncovku reprezentuje dvojice uskladňovacích nádrží a strojní odvodnění stabilizovaného kalu.

Pokud bychom charakterizovali tyto odpadní vody, jedná se (kromě srážkových vod) především o vody splaškové a z části o vody technologické, pocházející z menších podniků. Vzhledem ke sledovaným analytům je však nutné zmínit, že v obcích se nachází zdravotnická zařízení, především zdravotní středisko a soukromá poliklinika (98).

4.4.2 Odpadní voda z velkokapacitní ČOV

Další vybranou čistírnou byla velkokapacitní ČOV v Brně-Modřicích, navržená pro 630 tis. EO s průměrným přítokem $7 020 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ (max přítok $15 199 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$). Tato čistírna slouží pro čištění odpadních vod z města Brna a širokého okolí (Kuřim, Modřice, Želešice, Česká u Brna, Šlapanice, Šlapanice-Bedřichovice, Ostopovice, Moravské Knínice, Lipůvka, Podolí, Ponečovice a Rozdrojovice) (Příloha 3). V případě vyššího přítoku, např. za deště, se voda nejprve kumuluje v dešťové zdrži s kapacitou $10 500 \text{ m}^3$ a teprve po skončení dešťové události je přečerpávána zpět na ČOV. Zádrž čistírny je 24 hodin. Mechanickou část čistírny tvoří: lapák hrubého šterku, jemné česle, lapák písku (se separací tuku) a šest usazovacích nádrží. Biologická část je tvořena dvěma aktivačními nádržemi, které lze provozovat samostatně nebo společně. Voda je přiváděna nejprve do anaerobní nádrže s funkcí defosfatace, následně do oběhové anoxické nádrže s funkcí předřazené denitrifikace. Posledním stupněm aktivace je oxická část s jemnobublinou aerací rozdělená na provzdušňovanou a neprovzdušňovanou zónu. Z aktivačních nádrží postupuje směs do šesti dosazovacích nádrží. Přebytečný aktivovaný kal je zpracováván v kalovém hospodářství, které tvoří zahušťovací nádrž primárního kalu, floatační zahušťovač pro biologický kal, homogenizační, vyhnívací a uskladňovací nádrže, zařízení na odvodňování kalu a sušárna kalu. Bioplyn, produkovaný při vyhnívání kalu, je odváděn z vyhnívacích nádrží, kumulován ve dvou membránových plynojemech a poté využíván pro výrobu elektrické energie a tepla v kogeneračních jednotkách (28).

4.5 Stanovované analyty a jejich vlastnosti

4.5.1 Kyselina salicylová

- CAS 69-72-2
- $C_7H_6O_3$
- 2-hydroxybenzoová kyselina
- $M_r = 138,1207$
- $pK_a = 2,97$
- rozpustnost ve vodě: $2,24 \text{ g.l}^{-1}$
- $\log K_{OW} = 2,4$
- teplota tání: $158 \text{ }^\circ\text{C}$

4.5.2 Kyselina acetylsalicylová

- CAS 50-78-2
- $C_9H_8O_4$
- 2-(acetyloxy)benzoová kyselina
- $M_r = 180,1574$
- $pK_a = 3,49$
- rozpustnost ve vodě: $4,6 \text{ g.l}^{-1}$
- $\log K_{OW} = 1,4$
- teplota tání: $135 \text{ }^\circ\text{C}$

4.5.3 Paracetamol

- CAS 103-90-2
- $C_8H_9NO_2$
- *N*-(4-hydroxyfenyl)acetamid
- $M_r = 151,1626$
- $pK_a = 9,38$
- rozpustnost ve vodě: 14 g.l^{-1}
- $\log K_{OW} = 0,4$
- teplota tání: $169\text{--}170,5 \text{ }^\circ\text{C}$

4.5.4 Diklofenak

- CAS 15307-86-5
- $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$
- 2-{2-[(2,6-dichlorofenyl)amino]fenyl}octová kyselina
- $M_r = 296,149$
- $pK_a = 4,15$
- rozpustnost ve vodě: 50 g.l^{-1}
- $\log K_{OW} = 3,9$
- teplota tání: $283\text{--}285 \text{ }^\circ\text{C}$

4.5.5 Ibuprofen

- CAS 15687-27-1
- $C_{13}H_{18}O_2$
- 2-(4-(2-methylpropyl)fenyl)propanová kyselina
- $M_r = 206,2808$
- $pK_a = 4,91$
- rozpustnost ve vodě: 49 mg.l^{-1}
- $\log K_{OW} = 3,6$
- teplota tání: $75\text{--}77^\circ\text{C}$

4.5.6 Ketoprofen

- CAS 22071-15-4
- $C_{16}H_{14}O_3$
- 2-(3-benzoylfenyl)propanová kyselina
- $M_r = 254,2806$
- $pK_a = 4,45$
- rozpustnost ve vodě: 51 mg.l^{-1}
- $\log K_{OW} = 3,2$
- teplota tání: 94°C

4.5.7 Naproxen

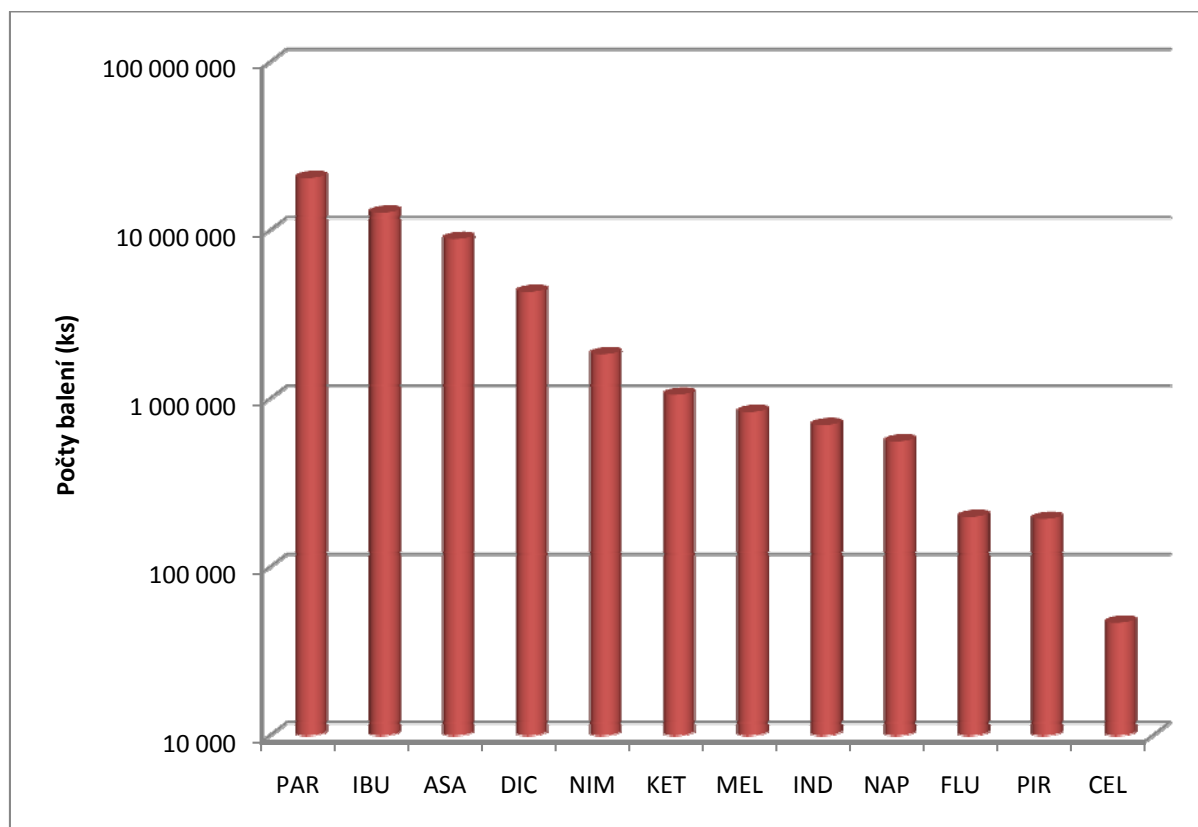
- CAS 22204-53-1
- $C_{14}H_{14}O_3$
- 2-(6-methoxynaftalen-2-yl)propanová kyselina
- $M_r = 230,2592$
- $pK_a = 4,15$
- rozpustnost ve vodě: $15,9 \text{ mg.l}^{-1}$
- $\log K_{OW} = 2,8$
- teplota tání: 153°C (99)

4.6 Pracovní postupy

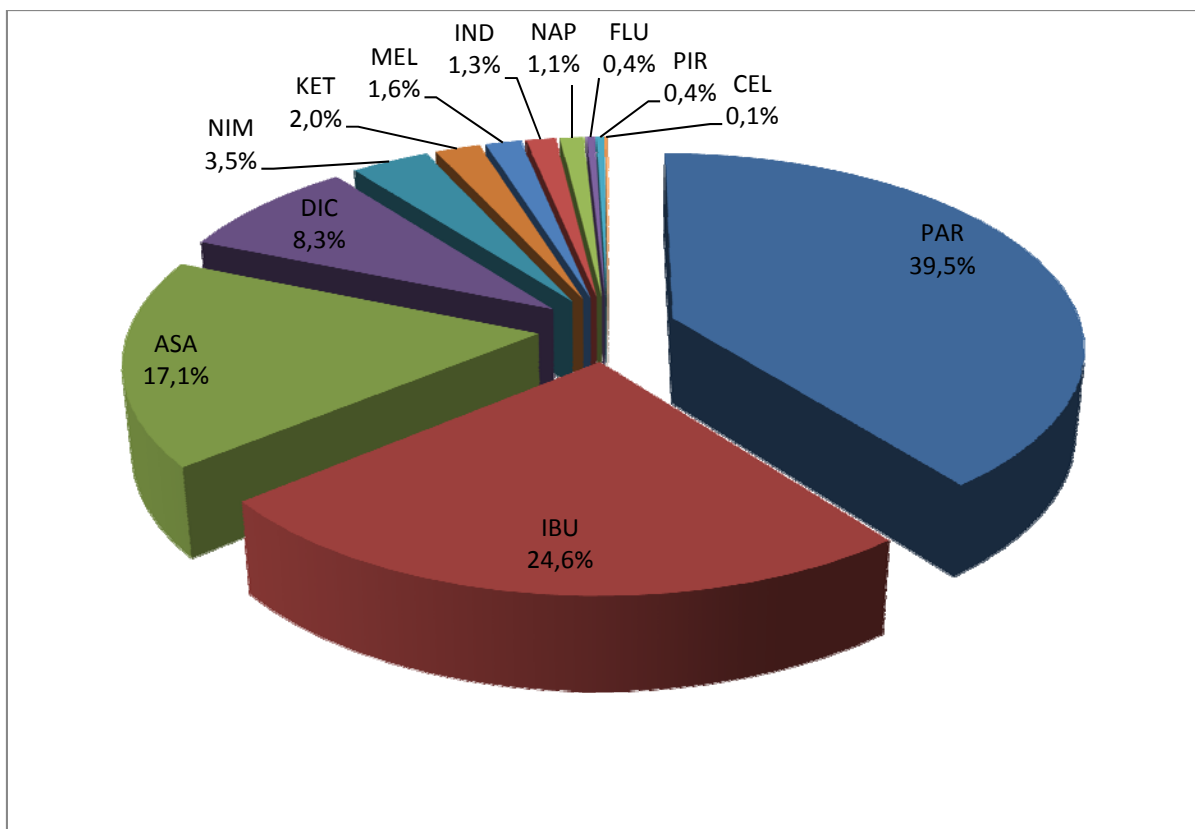
4.6.1 Výběr vhodných NSAIDs pro analýzu

Výše uvedená analgetika-antipyretika byla vybrána na základě zpráv Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL), jakožto léčiva obsažená v nejčastěji prodávaných přípravcích pro potlačení bolesti. Údaje byly zpracovány za období let 2008–2010, a to vždy po každém čtvrtletí. Získané hodnoty informují o distribuci léčivých přípravků lékárnám, jiným zdravotnickým zařízením a prodejcům vyhrazených léčiv (Obr. 32). Z těchto zpráv vyplývá, že nejčastěji distribuovanými NSAIDs v České republice jsou: paracetamol (PAR), ibuprofen (IBU), kyselina acetylsalicylová (ASA) a diklofenak (DIC); jenž dohromady tvoří asi 90% podíl z celkového objemu této skupiny látek. Zbýlých 10 % tvoří další používaná analgetika-antipyretika: ketoprofen (KET), naproxen (NAP), flurbiprofen (FLU), nimesulid (NIM), celekoxib (CEL), meloxicam (MEL), piroxikam (PIR) a indometacin (IND) (Obr. 33). Dalším

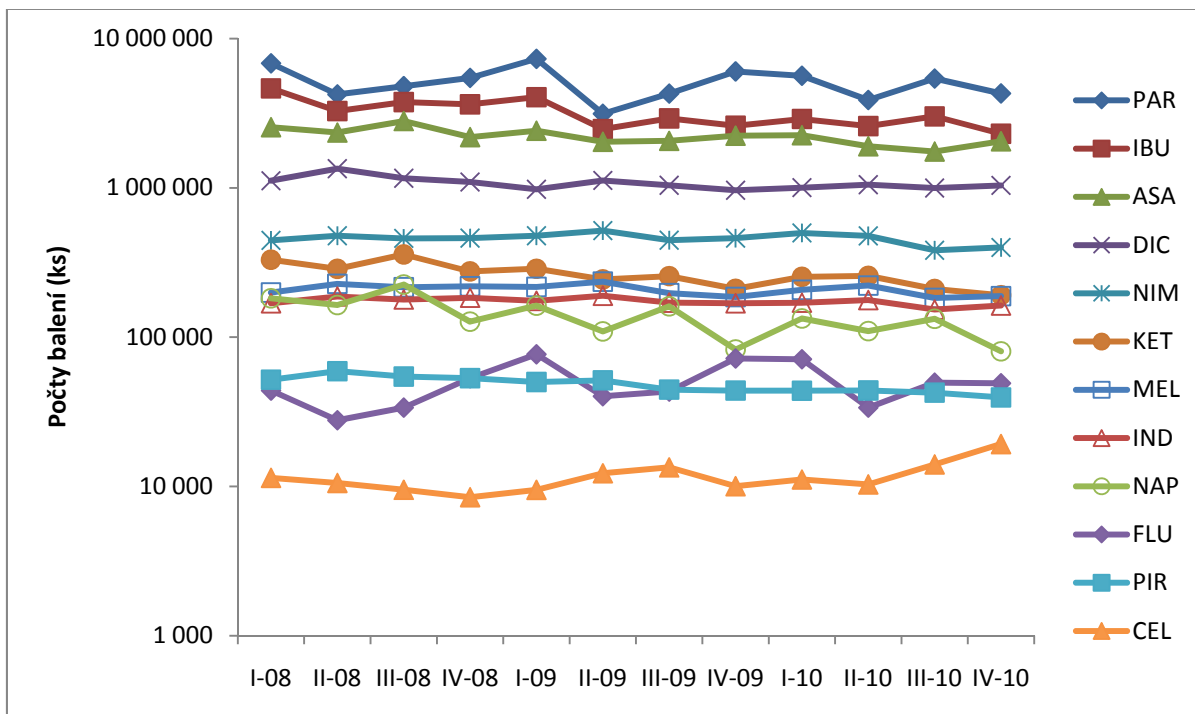
důležitým zjištěním je, že se distribuce jednotlivých látek v průběhu let 2008–2010 nijak výrazně nemění (Obr. 34), tudíž lze předpokládat konstantní spotřebu těchto léčiv také u odběratelů. K vybraným typům analgetik byla také přiřazena kyselina salicylová (SAL), jelikož se jedná o degradační produkt kyseliny acetylsalicylové.



Obr. 32: Distribuce vybraných NSAIDs v letech 2008–2010



Obr. 33: Distribuce vybraných NSAIDs v letech 2008–2010 v procentech



Obr. 34: Distribuce vybraných NSAIDs za jednotlivá čtvrtletí v letech 2008–2010

4.6.2 Stanovení optimálních podmínek pro CZE analýzu

4.6.2.1 Optimalizace vhodné vlnové délky pro detekci jednotlivých analytů

Aby bylo dosaženo co nejlepších podmínek pro správnou identifikaci a kvantifikaci zkoumaných analytů, bylo nutné nejprve zjistit jejich absorpční maxima. K tomuto účelu byly připraveny roztoky jednotlivých NSAIDs ve vodě o koncentraci 100 mg.l^{-1} (navážka nejprve rozpuštěna v malém množství methanolu a poté doplněna Milli-Q vodou na požadovaný objem). Tyto roztoky byly proměřeny na UV/VIS spektrofotometru v rozsahu vlnových délek 190–600 nm, což je měřicí rozsah přístroje pro CZE. Z měření vyplynulo, že absorpční maxima téměř všech analytů se pohybují okolo hodnoty 200 nm, pouze u naproxenu je $\lambda_{\text{max}} = 231 \text{ nm}$ (Tab. 12). Nad vlnovou délku 350 nm všechny analyty již téměř neabsorbovaly.

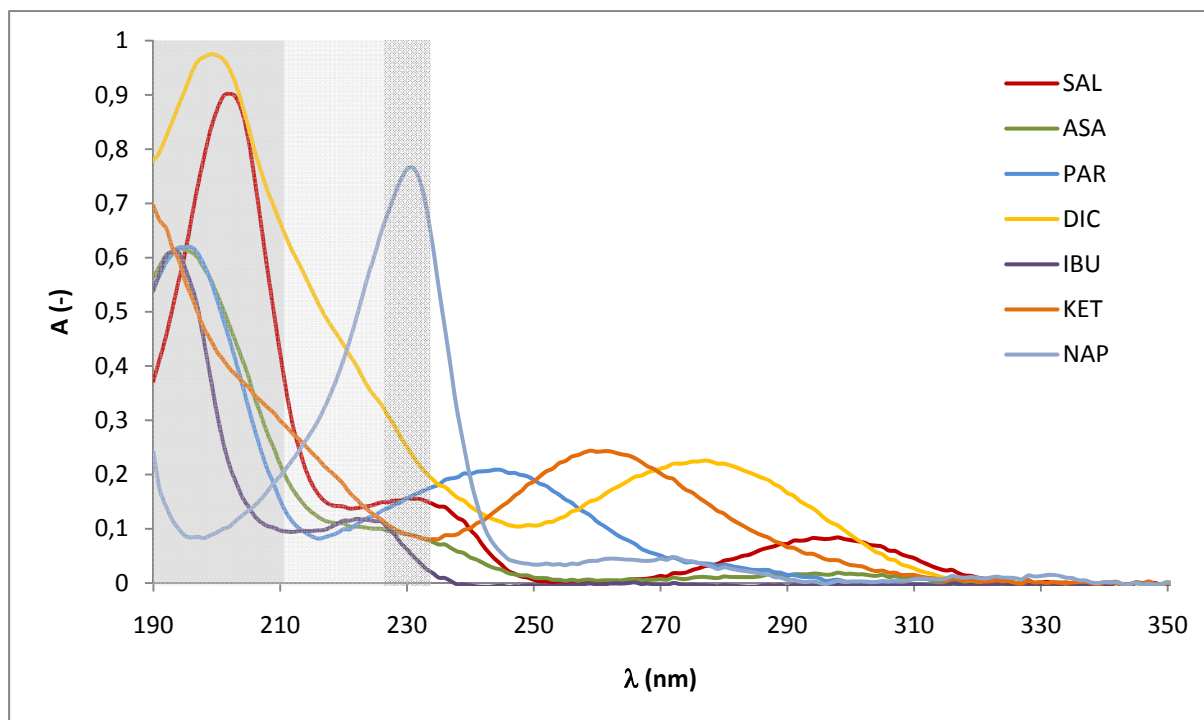
Protože přístroj Agilent CE poskytuje možnost programovatelné výstupní šířky štěrbin (BW) v rozsahu 2–80 nm, nabízí se při detekci využití dvou variant (Obr. 35):

- 1) Detekční vlnová délka: 210 nm, BW = 40 nm (pro všechny analyty)
- 2) Kombinace dvou detekčních vlnových délek: $\lambda_1 = 200 \text{ nm}$, BW = 20 nm (pro analyty: SAL, ASA, PAR, DIC, IBU, KET); $\lambda_2 = 230 \text{ nm}$, BW = 10 nm (pro NAP)

Do softwaru přístroje byly zadány obě tyto varianty pro další optimalizaci.

Tab. 12: Naměřená absorpční maxima jednotlivých analytů

analyt	SAL	ASA	PAR	DIC	IBU	KET	NAP
λ_{max} [nm]	202	194	195	199	193	190	231



Obr. 35: Srovnání absorpčních spekter jednotlivých analytů

4.6.2.2 Výběr vhodných separačních podmínek

Důležitým faktorem při výběru vhodných separačních podmínek jsou fyzikálně-chemické vlastnosti analytů, zejména disociační konstanta. Hodnoty pK_a (Tab. 13) se u vybraných léčiv pohybují v rozmezí hodnot 3–5, pouze u paracetamolu se jedná o hodnotu 9,38. Tento rozdíl vyplývá z odlišnosti v chemické struktuře, kde paracetamol, jako jediný z vybraných sloučenin, neobsahuje karboxylovou skupinu.

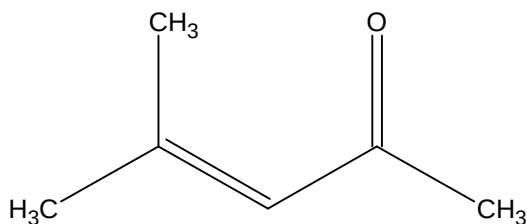
Tab. 13: Hodnoty pK_a vybraných analytů (99)

analyt	SAL	ASA	DIC	NAP	KET	IBU	PAR
pK_a	2,97	3,49	4,15	4,15	4,45	4,91	9,38

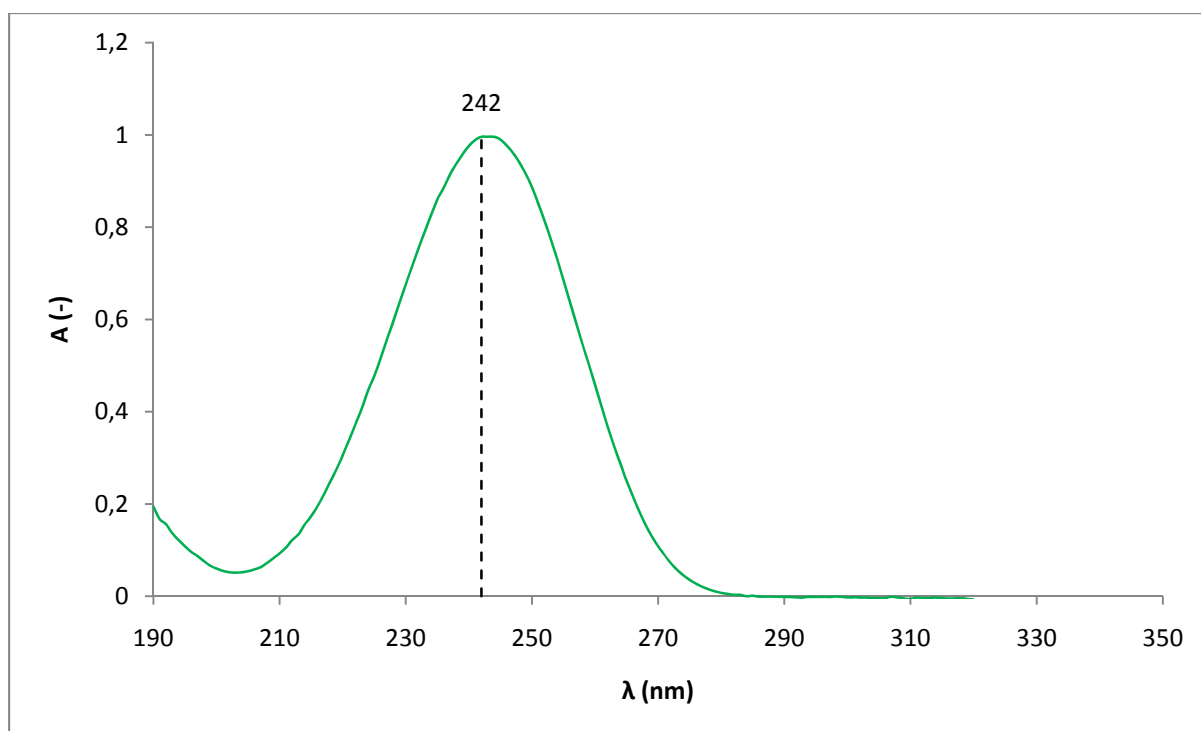
Na základě těchto údajů lze, a to za vhodných podmínek, elektroforeticky separovat vybrané analyty jako záporně nabitě částice. Vzhledem k hodnotám pK_a , je nutno volit pH základního elektrolytu tak vysoké, aby došlo k dostatečné disociaci jednotlivých sloučenin v roztoku. Na základě toho se nejvíce jako vhodné, při použití běžných křemenných kapilár, zvolit negativní polaritu pro separaci aniontů, protože při vyšších hodnotách pH dochází k urychlení elektroosmotického toku (EOF), který tak působí proti směru separačního módu.

Vhodnějším řešením je proto při vyšším pH volba pozitivní polarity, kdy dochází k separaci kladných i záporně nabitých částic. V tomto případě je také nutné vždy znát rychlost EOF, ze které je potom možné vypočítat mobility jednotlivých píků a určit konkrétní analyt.

Rychlost elektroosmózy je možno zvýraznit přidávkou neutrálního markeru, na který přímo nepůsobí aplikované elektrické napětí, a pohybuje se pouze rychlostí EOF. Pro všechna měření byl jako marker zvolen mesityloxid (Obr. 36), jenž absorbuje UV záření ve vybraném rozmezí vlnových délek (Obr. 37).



Obr. 36: Vzorec mesityloxiidu

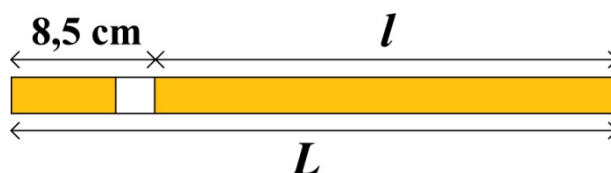


Obr. 37: Absorpční spektrum mesityloxidu

4.6.2.3 Volba vhodného základního elektrolytu a separační délky kapiláry

Volba základního elektrolytu vycházela z předpokladu, že budou všechny analyty separovány současně a tudíž je nutno, vzhledem ke zjištěným hodnotám pK_a , volit elektrolyt s dostatečnou tlumivou kapacitou v bazické oblasti pH. Z těchto důvodů byl jako BGE vybrán borátový pufr (vodný roztok tetraboritanu sodného). Tabelovaná hodnota pK_a tohoto tlumivého roztoku, zjištěná pomocí analytických tabulek, je 9,24 a požadovaná hodnota pH se dá upravit přidáním hydroxidu sodného.

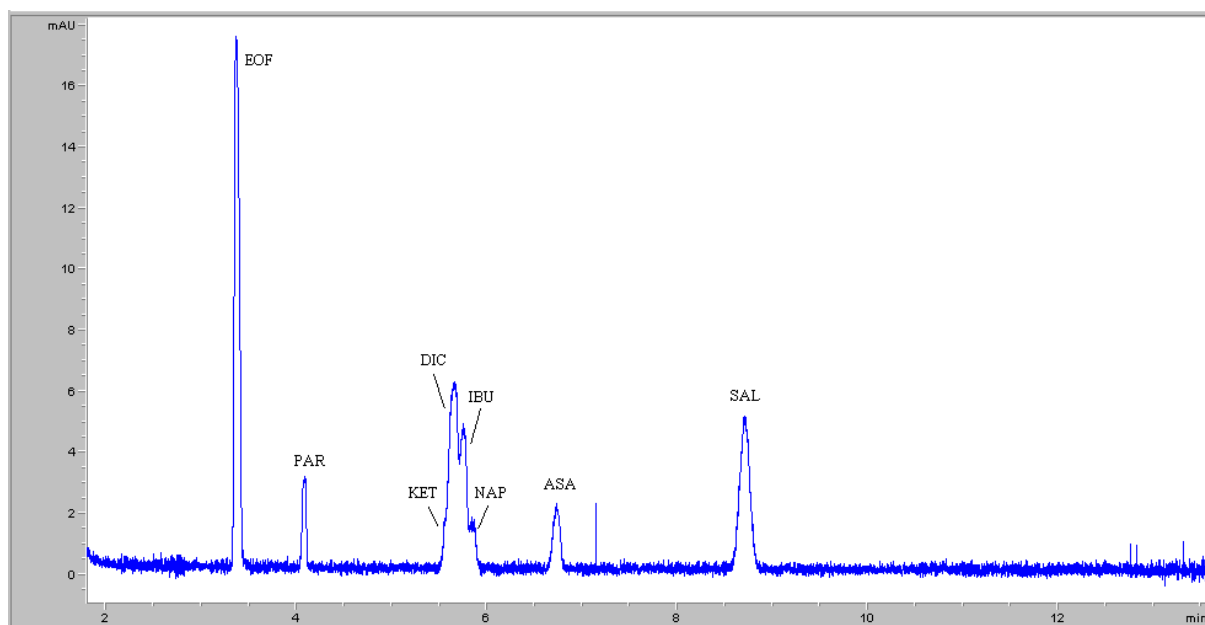
Pro analýzu byla použita křemenná kapilára s vnitřním průměrem $ID = 75 \mu m$, jejíž délka byla postupně během optimalizace upravována. Detekční okénko pro DAD bylo vytvořeno odstraněním polyimidového povlaku ve vzdálenosti 8,5 cm od konce kapiláry (Obr. 38).



Obr. 38: Schéma separační délky kapiláry

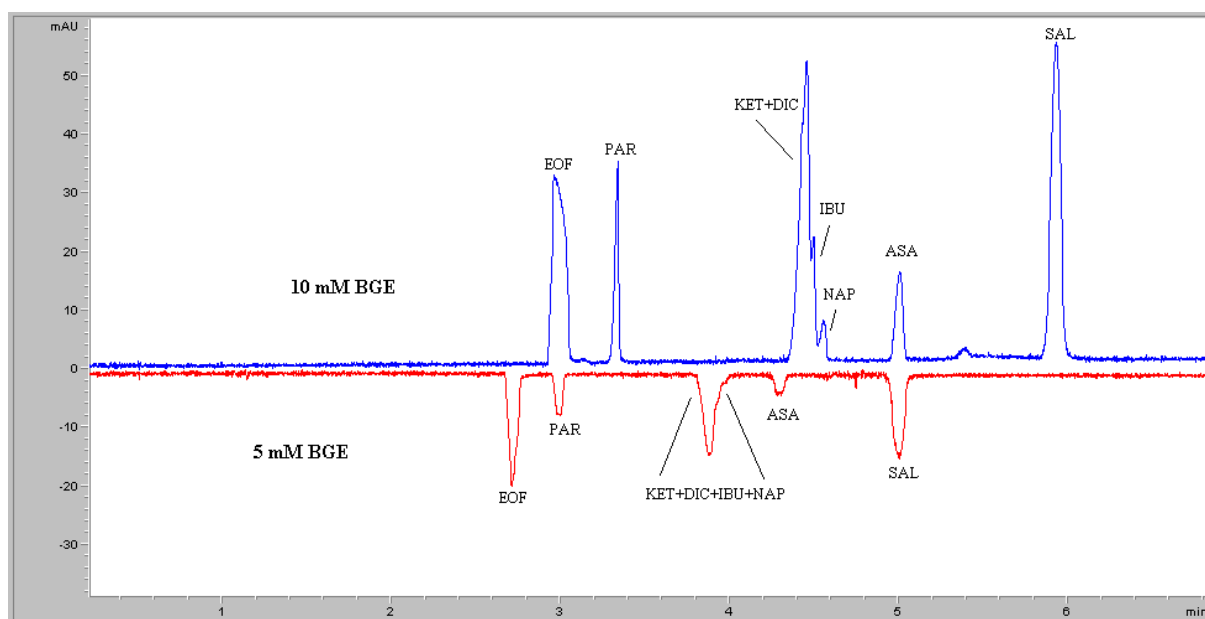
Pro první měření byla připravena kapilára se separační délkou $l = 50,7 \text{ cm}$ a BGE o koncentraci 20 mmol.l^{-1} . Při dávkování vzorku byl zvolen způsob přetlaku na vstupu s nastavením 50 mbar po dobu 5 vteřin, teplota kapiláry pro analýzu byla stanovena na 25°C a pracovní napětí 25 kV (100).

Nejprve byly vybrané analyty dávkovány postupně, aby v následujících měřeních byla možná jejich identifikace ve směsném vzorku podle migračních časů respektive mobilit (Obr. 39). K těmto účelům byly využity připravené roztoky standardů léčiv o koncentracích 100 mg.l^{-1} .



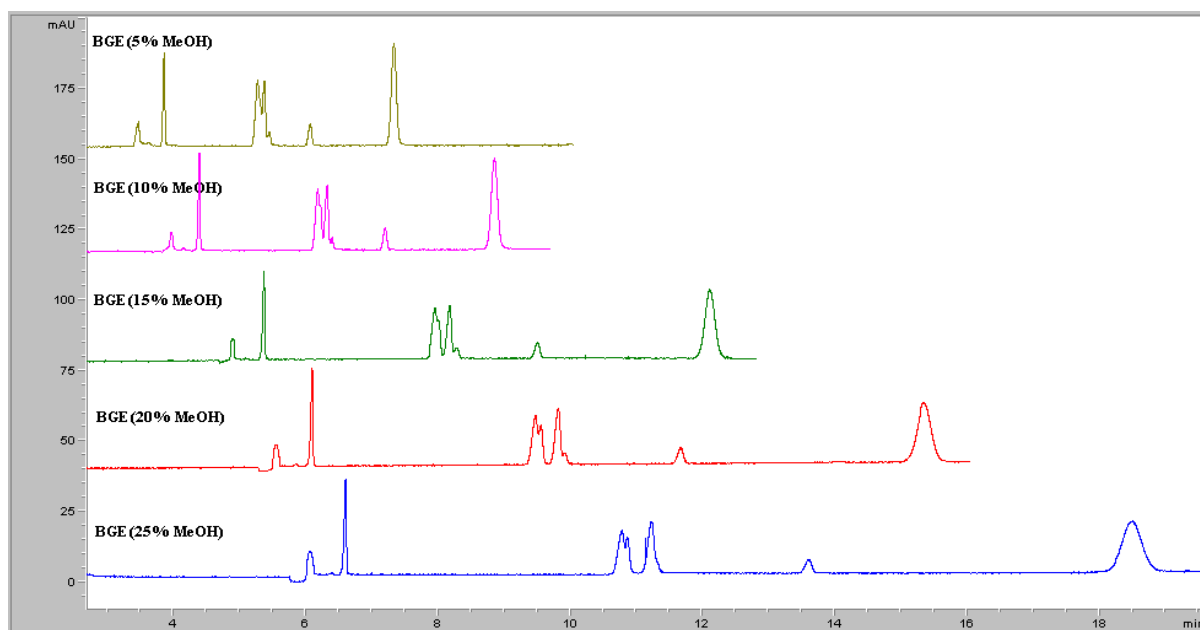
Obr. 39: Elektroforegram směsi léčiv ($c_{\text{BGE}} = 20 \text{ mmol.l}^{-1}$)

Postupným dávkováním bylo zjištěno, že analyty k detektoru migrují v pořadí: PAR, KET, DIC, IBU, NAP, ASA, SAL; přičemž ale vzniká směšná zóna KET+DIC+IBU+NAP. Pro další měření byl proto základní elektrolyt postupně rozředěn na koncentrace 10 a 5 mmol.l^{-1} (Obr. 40).

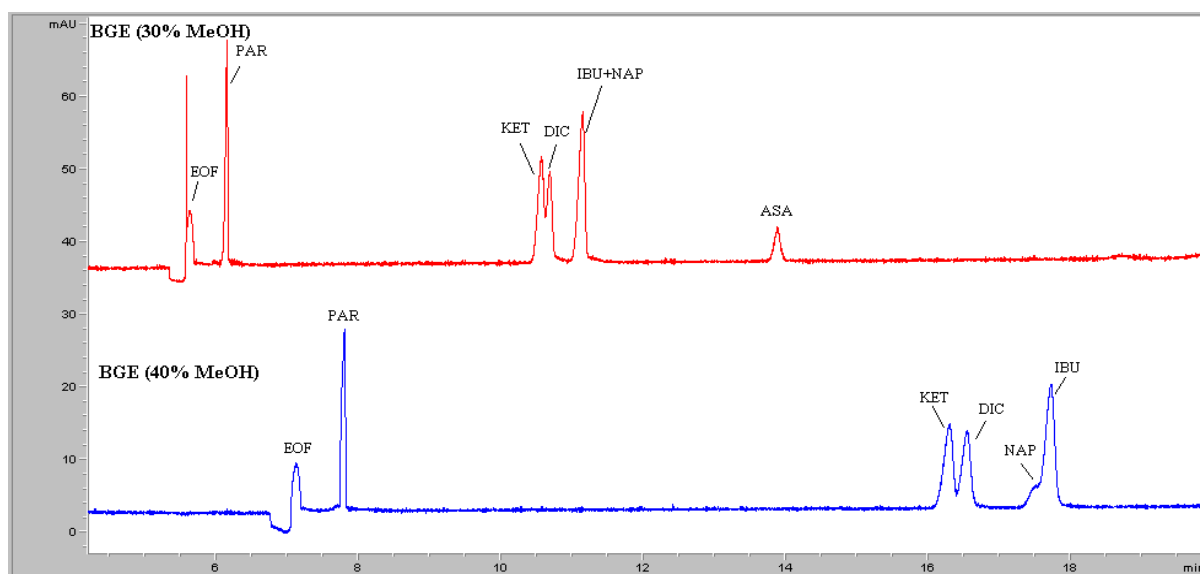


Obr. 40: Elektroforegramy směsi léčiv s různými koncentracemi BGE

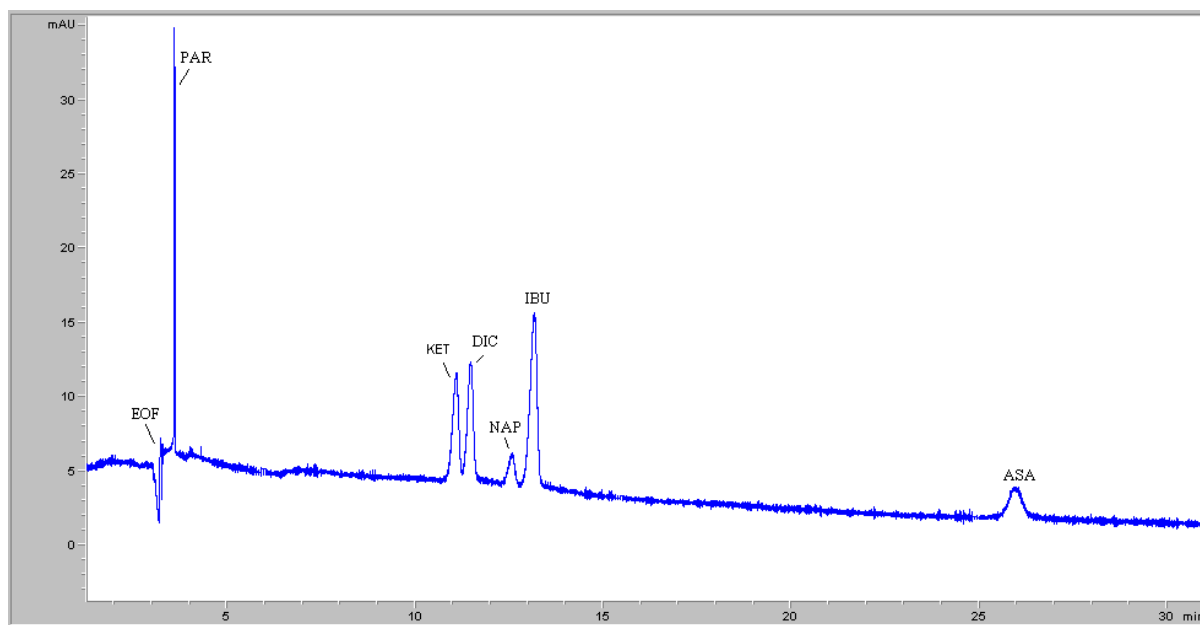
Další možností jak odseparovat analyty ve společné zóně je úprava základního elektrolytu přidavkem jiného rozpouštědla (101). Objemové koncentrace methanolu byly postupně zvyšovány v následujících krocích: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 a 50 %. V elektroforegramu bylo sledováno jednak postupné zpomalování EOF, což vedlo k prodloužení doby analýzy, ale také rozdílná pohyblivost jednotlivých složek ve směsné zóně. Dobře pozorovatelná byla především migrace naproxenu, díky různým detekčním a vlnovým délkám. Tímto způsobem bylo možné od sebe částečně odseparovat analyty KET, DIC a IBU (Obr. 41). Se zvyšujícími se přidavky methanolu začal naproxen migrovat opačným směrem vůči ostatním analytům a pohyboval se tedy stále ve směsné zóně s ibuprofenem (Obr. 42). Společnou zónu IBU+NAP se podařilo rozdělit až po přidavku 50 % methanolu (Obr. 43), kdy však doba analýzy byla již tak dlouhá, že docházelo ke značnému rozmytí zón ASA a SAL.



Obr. 41: Elektroforegramy směsi léčiv s BGE obsahujícím 5–25 % methanolu



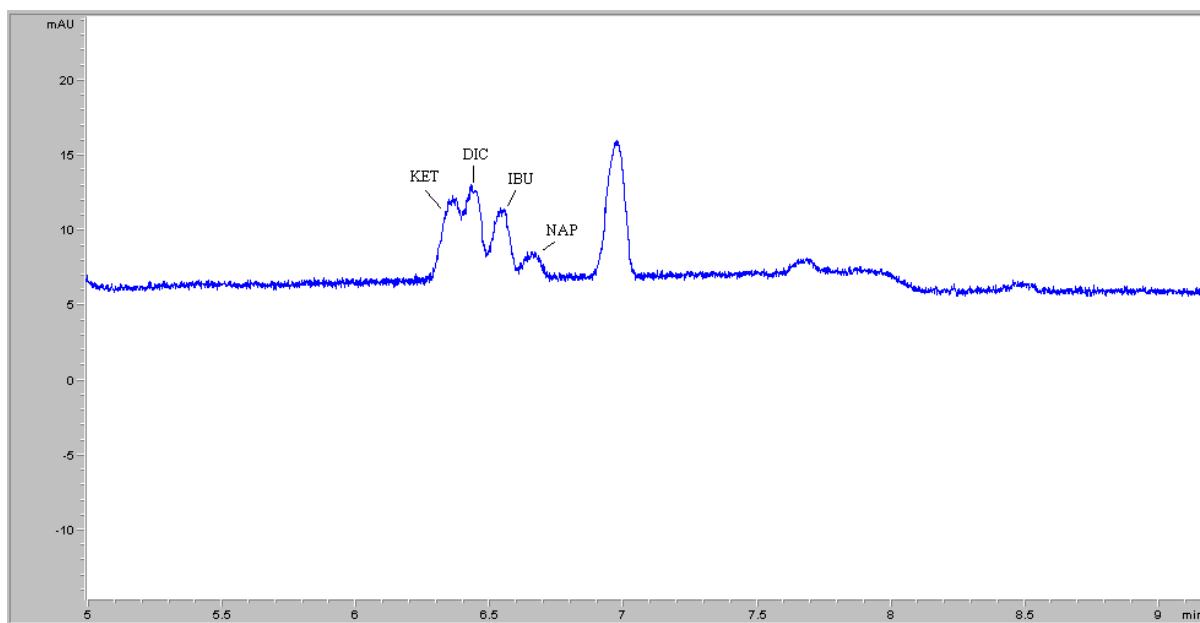
Obr. 42: Elektroforegramy směsi léčiv s BGE obsahujícím 30 a 40 % methanolu



Obr. 43: Elektroforegram směsi léčiv s BGE obsahujícím 50 % methanolu

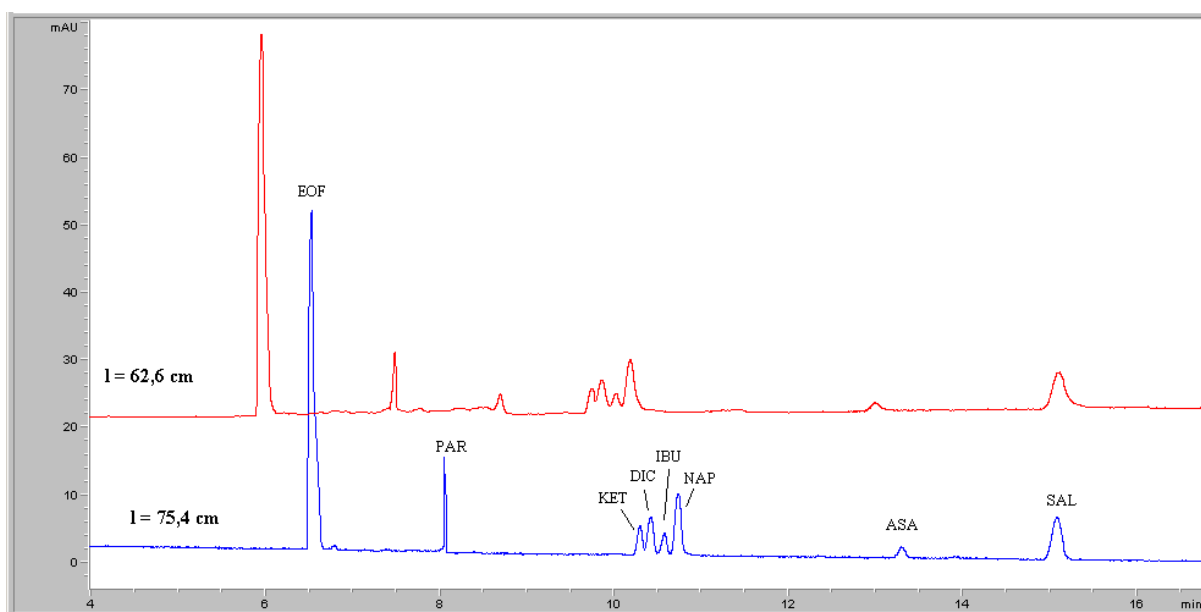
Z naměřených hodnot vyplývá, že pokud by objem methanolu v základním elektrolytu byl dostatečně vysoký, došlo by natolik ke zpomalení elektroosmotického toku, že by bylo možné na systém aplikovat opačnou (negativní) polaritu, a tím zkrátit dobu analýzy (102). Proto byl připraven tlumivý roztok se složením 50 mmol.l^{-1} octan amonný + $13,75 \text{ mmol.l}^{-1}$ hydroxid amonný v methanolu o $\text{pH} = 8,32$ (103). Při analýze bylo aplikováno napětí 30 kV s negativní polaritou, na kapiláře se separační délkou 50,7 cm. Jednotlivá léčiva byla detekována v jiném pořadí, než u vodného roztoku tetraboritanu sodného, avšak i v tomto případě vznikala podobná směšná zóna.

Výhodnější variantou, jak od sebe při analýze oddělit jednotlivá léčiva, se proto ukázala úprava separačních podmínek za použití tlumivého roztoku tetraboritanu sodného ve vodném prostředí. Jak vyplynulo z prvních měření, snižování koncentrace základního elektrolytu, a tedy urychlování EOF, mělo sice kladný vliv na dobu analýzy, avšak negativní na rozdělení směšné zóny. Nabízela by se proto možnost koncentraci BGE zvýšit. Při této variantě však také dochází k nárůstu elektrického odporu kapiláry, vedoucí k zahřívání elektrolytu a tudíž k vyšší difúzi všech složek. Jinou možností, jak se tomuto efektu částečně vyhnout, je zvýšení pH BGE. Proto byl připraven 25 mmol.l^{-1} roztok tetraboritanu sodného a jeho pH postupně upravováno přidávkou $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ roztoku hydroxidu sodného z $\text{pH} = 9,13$ až po $\text{pH} = 10$, což se v elektroforegramu pozitivně projevilo (Obr. 44).



Obr. 44: Elektroforegram směsné zóny léčiv s úpravou BGE na $pH = 10$

Aby došlo k úplnému oddělení všech složek ve směsné zóně, bylo přikročeno k prodloužení separační délky kapiláry. Ta byla postupně prodlužována na 62,6 a 75,4 cm (Obr. 45). Tím bylo docíleno požadovaného rozdělení všech analytů při zachování ostrých zón a krátkého času analýzy.



Obr. 45: Elektroforegramy směsi léčiv s použitím různě dlouhých kapilár

4.6.2.4 Nastavení optimálních parametrů metody

Při používání nepokrytých křemenných kapilár je důležité upravit před vlastním měřením její vnitřní povrch tak, aby došlo k deprotonizaci silanolových skupin a vznikl tak záporný náboj

na stěně kapiláry. Proto před začátkem každé série měření byla kapilára promývána 30 minut $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ roztokem hydroxidu sodného.

Před každým měřením byla provedena prekondicionace kapiláry postupným promýváním: 1 minutu $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ hydroxidem sodným, 1 minutu Milli-Q vodou a 3 minuty základním elektrolytem. Po skončení analýzy byla kapilára promyta 1 minutu Milli-Q vodou.

Optimální parametry metody pro CZE:

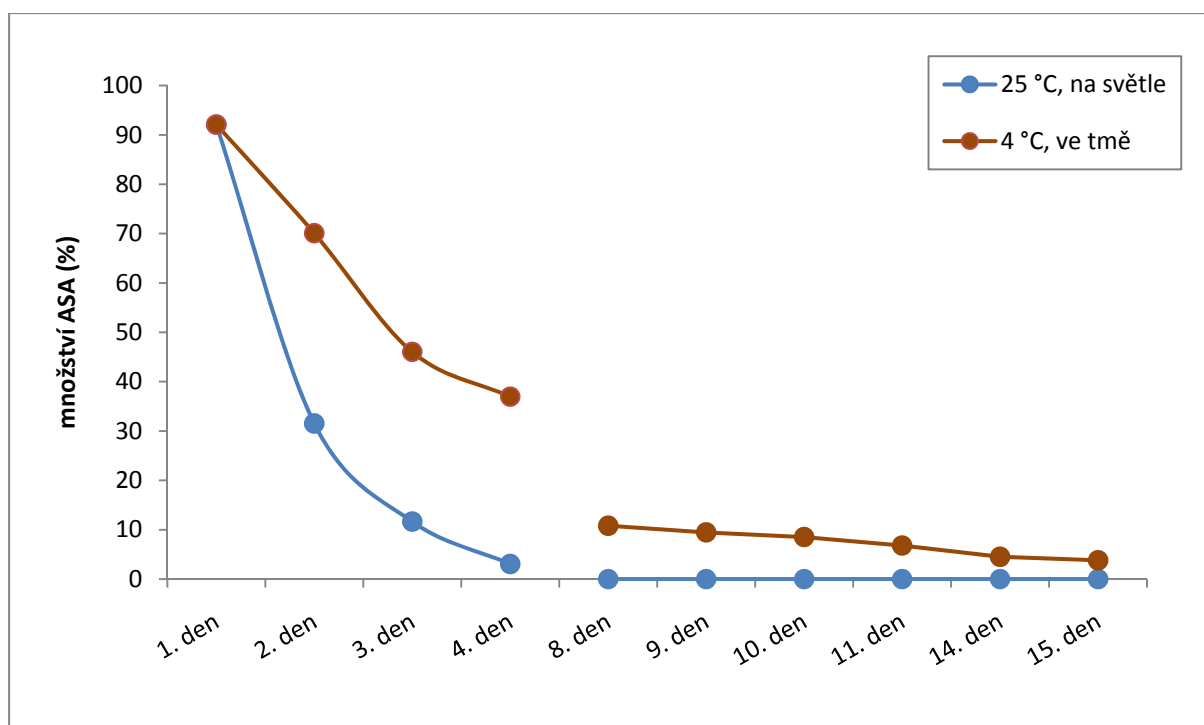
- základní elektrolyt: vodný roztok tetraboritanu sodného o koncentraci 25 mmol.l^{-1} , upraven $0,5\text{M}$ roztokem hydroxidu sodného na $\text{pH} = 10$
- kapilára: křemenná nepokrytá, $ID = 75 \text{ }\mu\text{m}$, $L = 83,5 \text{ cm}$, $l = 75,4 \text{ cm}$
- pracovní napětí: 30 kV , pozitivní polarita
- teplota kapiláry: $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- detekční vlnové délky: 210 nm ($BW = 40 \text{ nm}$), 200 nm ($BW = 20 \text{ nm}$), 230 nm ($BW = 10 \text{ nm}$)
- nástřik vzorku: hydrodynamicky, přetlakem na vstupu, 50 mbar , 5 s
- doba analýzy: 25 minut

4.6.3 Ověření stability vybraných analytů

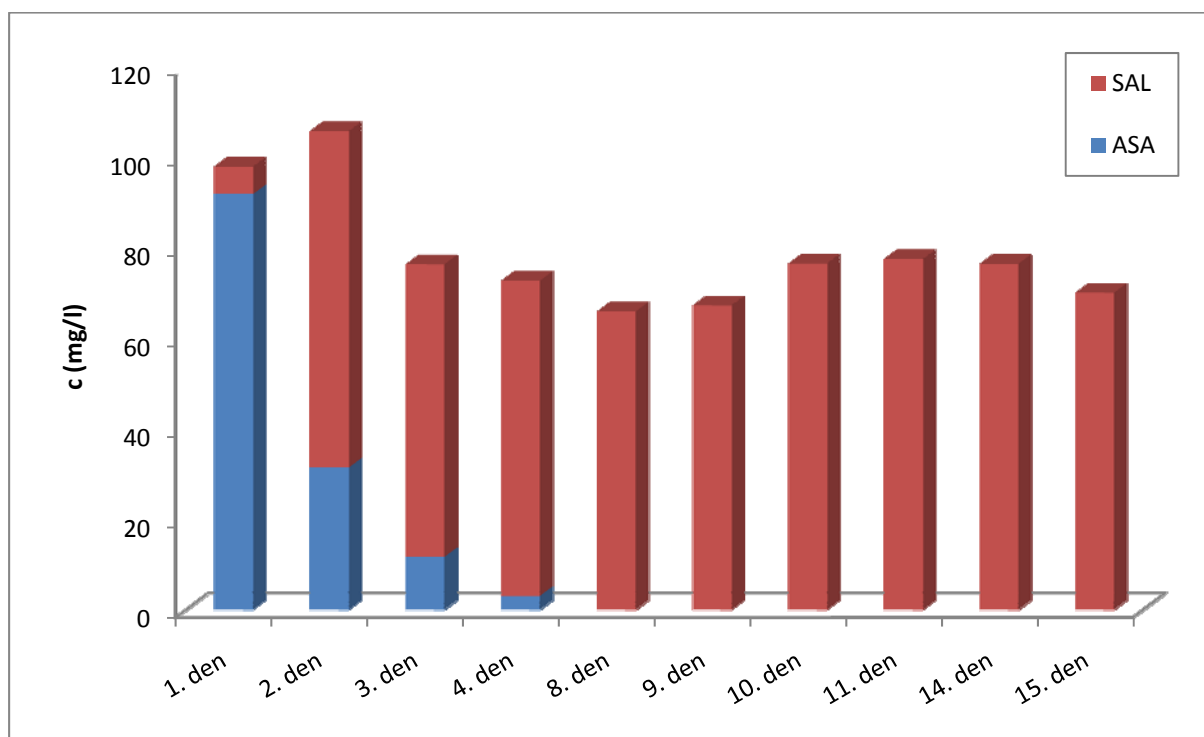
Během optimalizace podmínek separace byl, také mimo jiné, při po sobě jdoucích měření pozorován zřetelný úbytek kyseliny acetylsalicylové ve směsném vzorku a zároveň postupný nárůst koncentrace kyseliny salicylové. Tato skutečnost poukazuje na značnou nestabilitu ASA a její zřejmou degradaci, při níž jako produkty reakce vznikají kyseliny salicylová a octová (104). Z tohoto důvodu bylo nutné ověřit stabilitu jednotlivých léčiv při jejich dlouhodobějším skladování.

Výrazná nestabilita ASA oproti ostatním léčivům byla pozorována nejenom při jejím umístění na stole v laboratoři za běžných podmínek, ale také při skladování v lednici (Obr. 46). Byl připraven roztok ASA o koncentraci 100 mg.l^{-1} , ve kterém byla během několika dnů sledována koncentrace ASA i SAL (Obr. 47). Čerstvý roztok byl ihned analyzován a již v tomto roztoku bylo naměřeno určité množství kyseliny salicylové. Z těchto měření proto vyplývá, že nestabilita ASA znemožňuje její kvantifikaci ve vzorku, a proto byla ze skupiny vybraných analytů vyloučena. V reálných vzorcích bude následně stanovován pouze její přímý metabolit, kyselina salicylová.

Při splnění podmínek uchování roztoků v dostatečném chladu a tmě lze s ostatními roztoky bez problémů pracovat po dobu několika dnů bez pozorovatelného úbytku jednotlivých analytů.



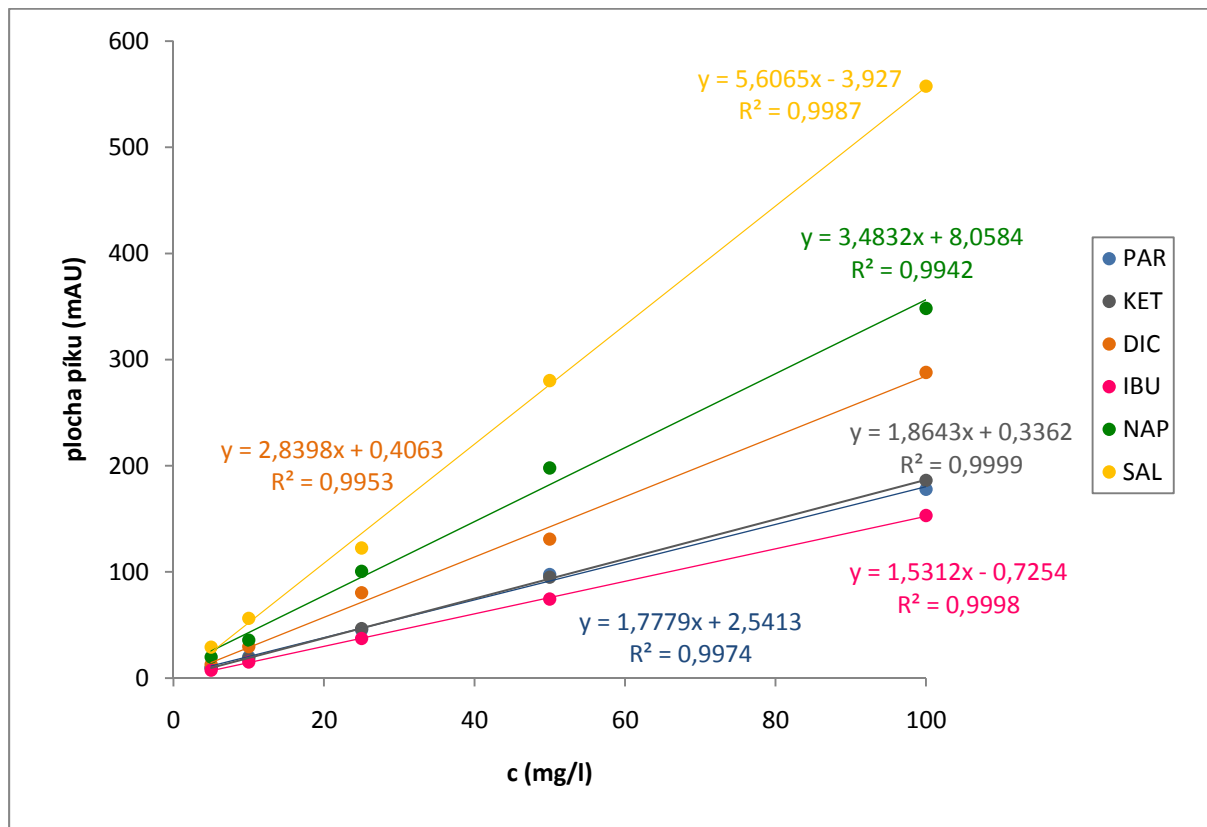
Obr. 46: Rozpad kyseliny acetylsalicylové po dobu 15 dnů



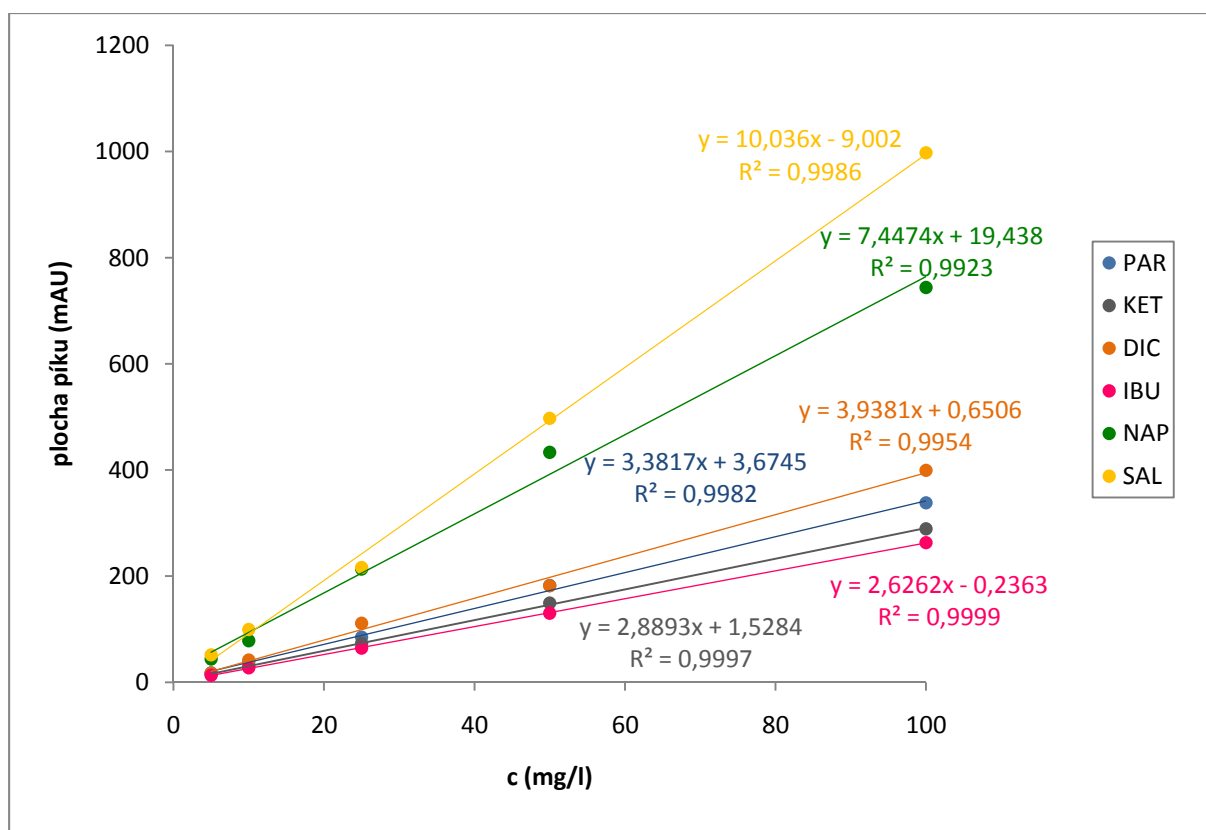
Obr. 47: Poměr ASA a SAL v roztoku kyseliny acetylsalicylové po dobu 15 dnů za běžných laboratorních podmínek (25 °C)

4.6.4 Výpočet kalibračních křivek a limitů detekce a stanovitelnosti

Pro výpočet kalibračních křivek bylo připraveno 5 roztoků v koncentračním rozpětí 5–100 mg.l⁻¹. Vyhodnocení bylo provedeno pro zvolené detekční vlnové délky: 210 nm (Obr. 48) a 200 + 230 nm (Obr. 49).



Obr. 48: Kalibrační křivky pro detekci při 210 nm



Obr. 49: Kalibrační křivky pro detekci při 200 nm a 230 nm (pro NAP)

Pro všechny analyty byly dále vypočítány limity detekce a stanovitelnosti pro obě varianty detekčních vlnových délek (Tab. 14) podle rovnic:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot h}{a} \quad (\text{Rov. 24})$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot h}{a} \quad (\text{Rov. 25})$$

kde h značí výšku šumu základní linie a a je směrnici kalibrační křivky.

Tab. 14: Limity detekce a stanovitelnosti pro stanovované analyty (v $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)

	PAR	KET	DIC	IBU	NAP	SAL
LOQ₂₁₀	1,91	4,31	2,94	4,33	2,32	1,78
LOD₂₁₀	0,57	1,29	0,88	1,30	0,70	0,53
LOQ₂₀₀	1,54	4,27	3,28	3,90	1,67	1,54
LOD₂₀₀	0,46	1,28	0,98	1,17	0,50	0,46

Z uvedených hodnot vyplývá, že všechna následující měření budou vyhodnocována z druhé varianty detekce, tj., že analyty PAR, KET, DIC, IBU a SAL při vlnové délce 200 nm a analyt NAP a neutrální marker mesityloxid při vlnové délce 230 nm.

Dále byly vypočteny hodnoty mobilit (μ_{eff}) jednotlivých analytů (Tab. 15). Jako vstupní data byly použity migrační časy analytů, naměřené při výpočtu kalibračních křivek, s koncentrací nejbližší mezi detekce.

Tab. 15: Vypočítané hodnoty mobilit stanovovaných analytů

analyt	PAR	KET	DIC	IBU	NAP	SAL
$\mu_{\text{eff}} [10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	-15,0	-24,6	-24,7	-25,1	-26,6	-36,8

4.6.5 Optimalizace extrakce pevnou fází pro vybrané analyty

Optimalizace podmínek SPE byla provedena v několika krocích na modelových vzorcích, připravených rozpuštěním standardů léčiv v Milli-Q vodě.

4.6.5.1 Výběr vhodného sorbentu

Extrakčních kolonek pro SPE existuje celá řada, a to jednak podle typu sorbentu, případně pocházejících od různých výrobců. Pro tyto účely byly jako nejvhodnější varianta zvoleny kolonky Oasis HLB (hydrophilic-lipophilic-balanced reversed-phase sorbent) od firmy Waters, s objemem 3 cm³ (105). Sorbent u těchto kolonek je tvořen kopolymerem *N*-vinylpyrrolidon-divinylbenzen s parametry:

- specifický povrch: 810 m².g⁻¹
- velikost pórů: 80 Å
- pórovitost: 1,3 cm³.g⁻¹
- velikost částic: 30–60 µm.

Spojením dvou monomerů, lipofilního divinylbenzenu a hydrofilního *N*-vinylpyrrolidonu, tak umožňuje extrahovat širokou škálu analytů s vysokou účinností kolonky (106).

Postup při extrakci byl zvolen následující (105):

- aktivace 6 ml methanolu
- promytí 6 ml Milli-Q vody
- nanesení vzorku
- promytí 6 ml Milli-Q vody
- sušení podtlakem vzduchu (10 min), přetlakem dusíku (5 min)
- eluce 6 ml methanolu
- sušení přetlakem dusíku (do sucha)
- rozpuštění odparku v 0,3 ml BGE

4.6.5.2 Ověření účinnosti SPE kolonek

Z důvodu rozdílných fyzikálně-chemických vlastností analytů bylo nutné jako první zjistit optimální hodnotu pH, při které budou léčiva účinně zachycována na sorbentu. K tomuto účelu bylo připraveno 9 směsných roztoků o koncentracích 20 µg.l⁻¹ a objemu 100 ml. Tyto roztoky byly, pomocí 0,1 mol.l⁻¹ kyseliny chlorovodíkové a 0,1 mol.l⁻¹ hydroxidu sodného, na-

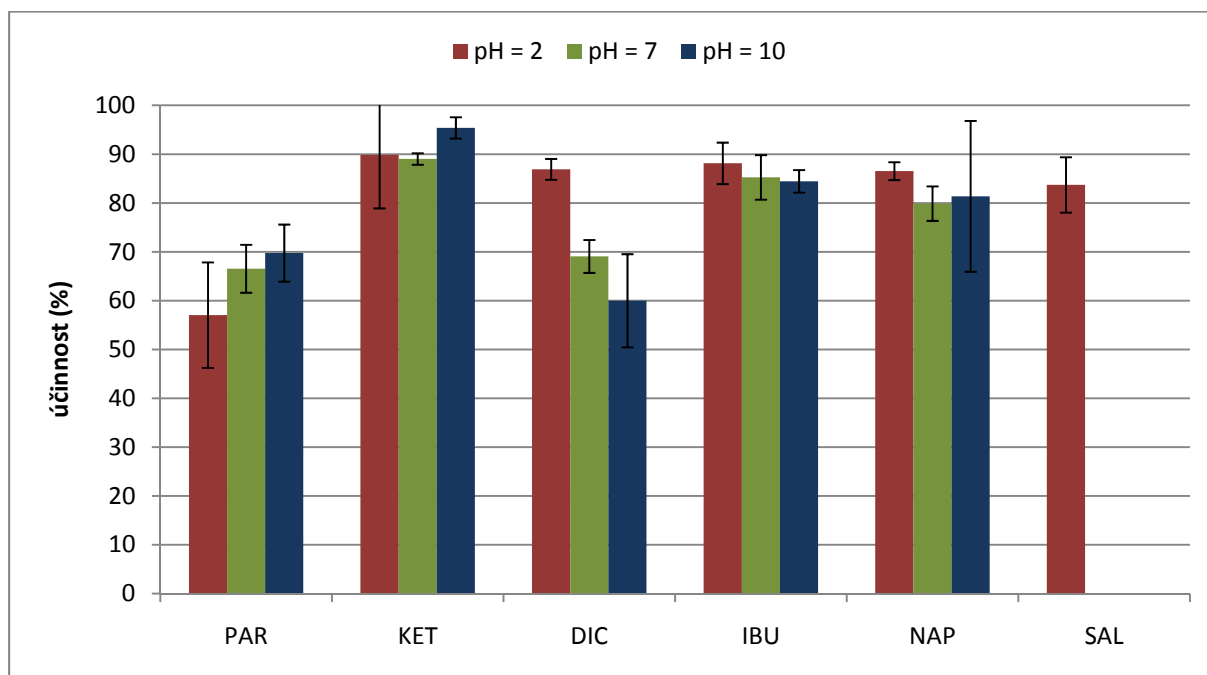
staveny na hodnoty pH = 2, 7 a 10. V každé sadě měření bylo také upraveno pH Milli-Q vody pro předúpravu a promývání sorbentu.

Po provedení extrakce pevnou fází byly roztoky proměřeny na CZE a vyhodnoceny pomocí kalibračních křivek. Dále byla u všech vzorků vypočítána hodnota relativní směrodatné odchylky (RSD) pomocí rovnice:

$$\text{RSD (\%)} = \frac{2 \cdot \sigma \cdot 100}{\bar{\varnothing}} \quad (\text{Rov. 26})$$

kde σ značí směrodatnou odchylku a $\bar{\varnothing}$ aritmetický průměr naměřených koncentrací. Tyto hodnoty byly kvůli přehlednosti zaznačeny do grafů v podobě chybových úseček.

Vliv pH je nejvýrazněji pozorovatelný u kyseliny salicylové (Obr. 50, Tab. 16), kde při hodnotách 7 a 10 docházelo k tak nízkému zachycování analytu na sorbentu, že se naměřené koncentrace již pohybovaly pod limitem detekce. Všechna další měření byla tedy prováděna již s úpravou vzorku a promývací Milli-Q vody na hodnotu pH = 2.



Obr. 50: Vliv pH na účinnost SPE

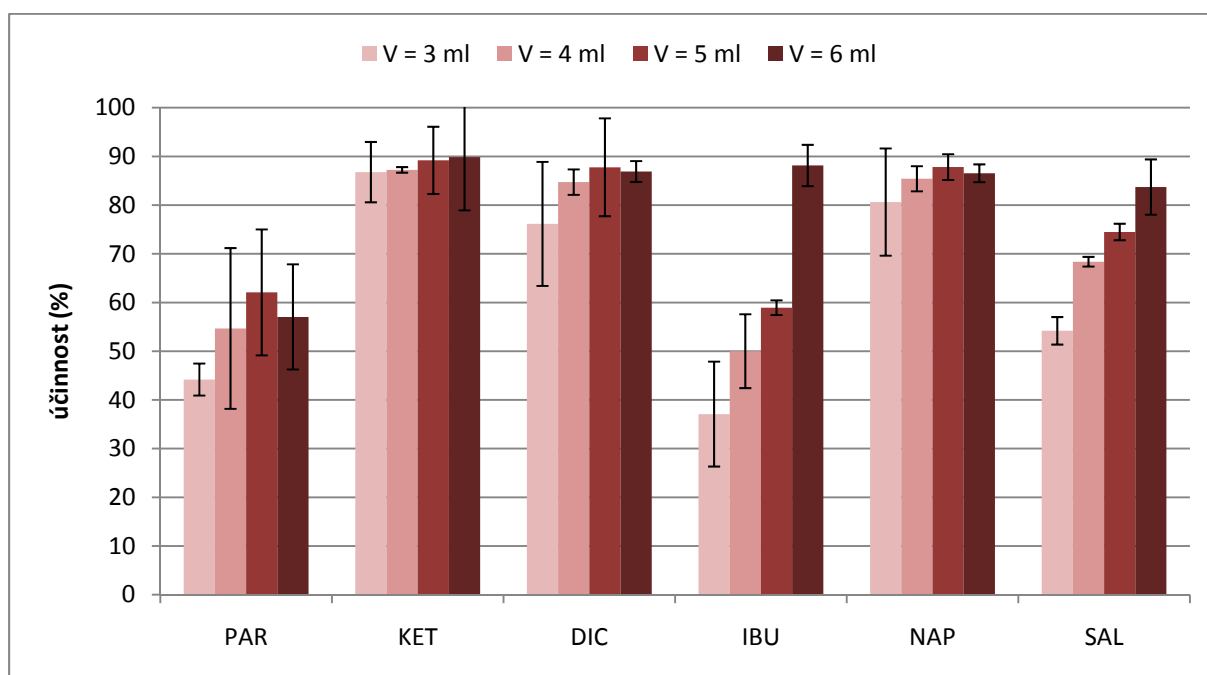
Tab. 16: Vliv pH na účinnost SPE

účinnost [%]	PAR	KET	DIC	IBU	NAP	SAL
pH = 2	57,04	89,86	86,89	88,13	86,54	83,71
pH = 7	66,55	89,02	69,07	85,25	79,88	–
pH = 10	69,75	95,40	59,98	84,45	81,38	–

Z hlediska co nejefektivnějšího zakoncentrování analytů je výhodné finální rozpouštění ve velmi malém objemu BGE. Důsledkem toho je použití co nejmenších vialek, u nichž je však

nezbytné zvážit optimální objem elučního činidla při SPE. V dalším měření byl proto vyzkoušen vliv množství methanolu, použitého při eluci, na účinnost extrakce. Dávkované objemy činily 3, 4, 5 a 6 ml. Extrahovány byly opět roztoky o koncentracích $20 \mu\text{g.l}^{-1}$ a objemu 100 ml.

Z výsledků vyplynulo, že použití menšího množství methanolu vede k neúplnému vymytí analytů ze sorbentu a tudíž při následujících měření bylo pracováno s 10 ml vialkami a objemem elučního činidla 6 ml. Při tomto množství se pohybují hodnoty účinnosti nad 83 % (Obr. 51, Tab. 17), kromě paracetamolu (57,04 %), jenž se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi od ostatních analytů více odlišuje.



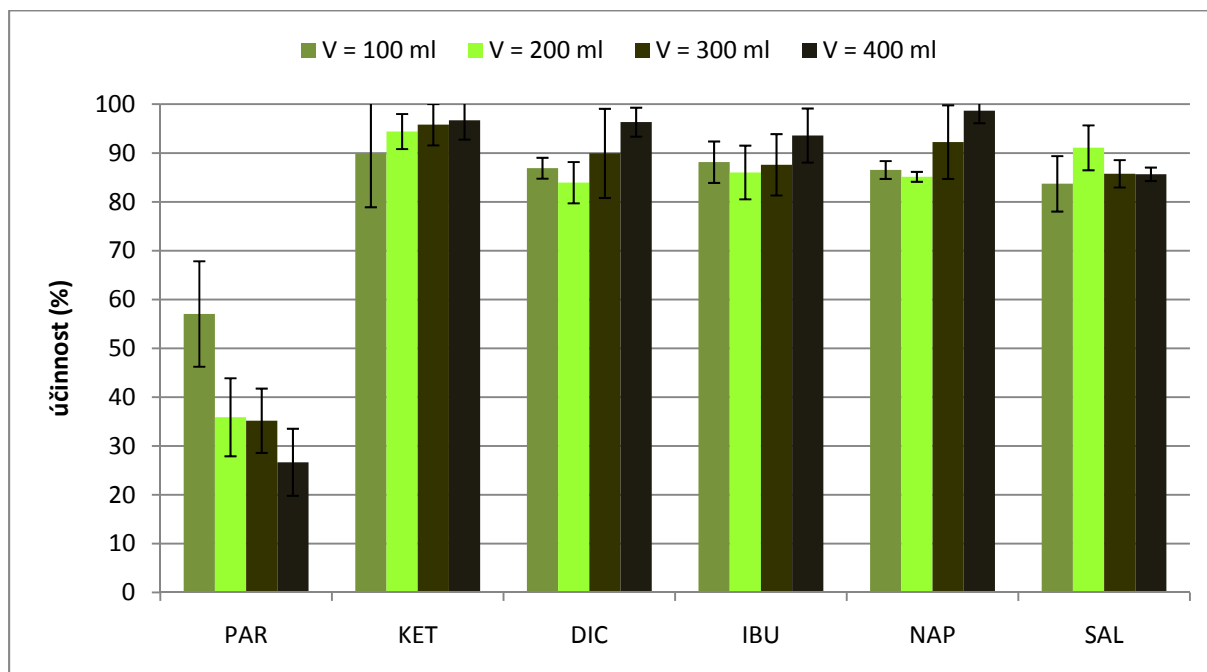
Obr. 51: Vliv objemu elučního činidla na účinnost SPE

Tab. 17: Vliv objemu elučního činidla na účinnost SPE

účinnost [%]	PAR	KET	DIC	IBU	NAP	SAL
$V = 3 \text{ ml}$	44,18	86,77	76,14	37,09	80,62	54,19
$V = 4 \text{ ml}$	54,66	87,23	84,72	50,00	85,41	68,37
$V = 5 \text{ ml}$	62,07	89,19	87,76	58,93	87,81	74,47
$V = 6 \text{ ml}$	57,04	89,86	86,89	88,13	86,54	83,71

Stanovované analyty se v odpadních vodách ČR pohybují v koncentracích řádově jednotek až desítek $\mu\text{g.l}^{-1}$ (105). Vypočítané limity detekce metody jsou v rozmezí $0,46\text{--}1,28 \text{ mg.l}^{-1}$. Aby bylo možné analyty stanovit v reálných vzorcích, musí být během extrakce minimálně 500× zakoncentrovány. Proto bylo v dalších měření ověřeno, zda nebude docházet při větších objemech vzorku k postupnému vymývání analytů ze sorbentu. Původní řada 100 ml byla proto rozšířena o další tři, s objemy 200, 300 a 400 ml, vždy s koncentrací analytů $20 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Postupné zvyšování objemu vzorku se negativně projevilo pouze u paracetamolu (Obr. 52, Tab. 18), kde při použití 400 ml došlo k poklesu účinnosti extrakce na 26,67 %. U ostatních analytů k zásadním změnám nedocházelo, spíše bylo pozorováno mírné zvyšování účinnosti.



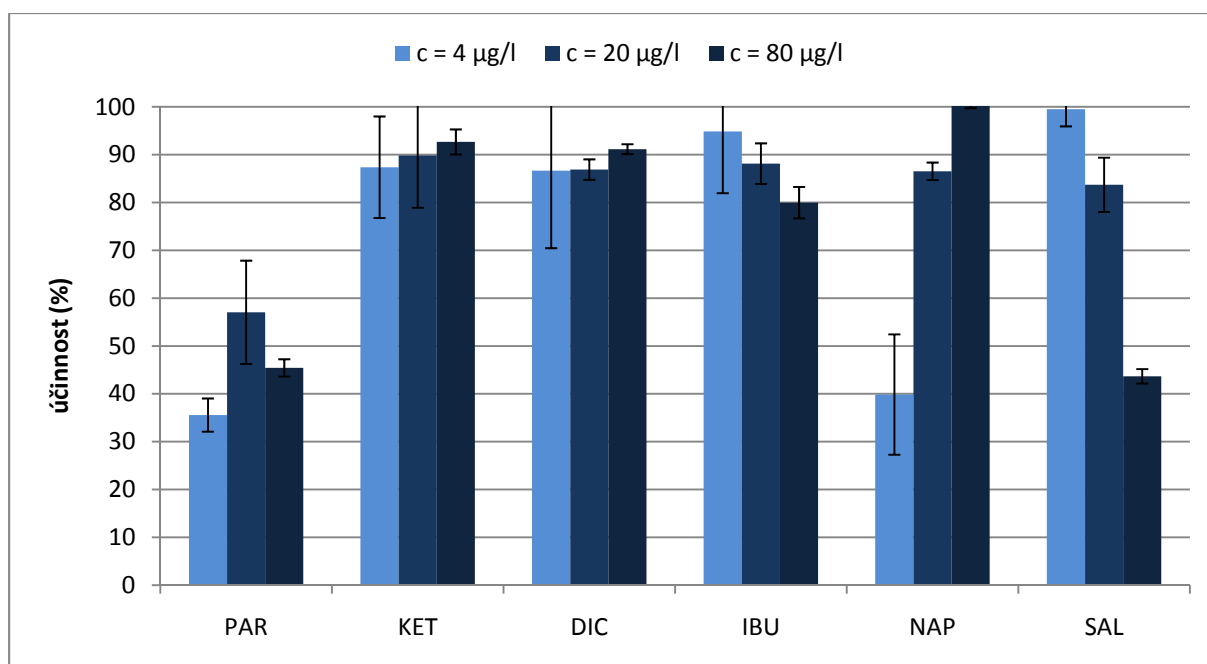
Obr. 52: Vliv objemu vzorku na účinnost SPE

Tab. 18: Vliv objemu vzorku na účinnost SPE

účinnost [%]	PAR	KET	DIC	IBU	NAP	SAL
$V = 100 \text{ ml}$	57,04	89,86	86,89	88,13	86,54	83,71
$V = 200 \text{ ml}$	35,90	94,41	83,94	86,03	85,13	91,08
$V = 300 \text{ ml}$	35,19	95,81	89,94	87,61	92,25	85,76
$V = 400 \text{ ml}$	26,67	96,69	96,34	93,59	98,68	85,66

Posledním krokem optimalizace metody bylo porovnání extrakcí různých koncentračních hladin analytů za ideálních podmínek. Použity byly roztoky s koncentracemi 4, 20 a 80 $\mu\text{g.l}^{-1}$ o objemech 200 ml.

Pozorovatelné rozdíly byly zejména u analytů NAP a SAL. U naproxenu bylo, a to při nárůstu jeho koncentrace ve vzorku, vidět postupné zvyšování, naopak u kyseliny salicylové postupný pokles účinnosti extrakce (Obr. 53, Tab. 19).



Obr. 53: Porovnání účinnosti SPE při různých koncentračních hladinách analytů

Tab. 19: Porovnání účinnosti SPE při různých koncentračních hladinách analytů

účinnost [%]	PAR	KET	DIC	IBU	NAP	SAL
$c = 4 \text{ } [\mu\text{g.l}^{-1}]$	35,56	87,38	86,66	94,87	39,85	99,50
$c = 20 \text{ } [\mu\text{g.l}^{-1}]$	57,04	89,86	86,89	88,13	86,54	83,71
$c = 80 \text{ } [\mu\text{g.l}^{-1}]$	45,42	92,67	91,16	79,97	102,59	43,67

4.6.6 Odběry vzorků

Vzorky odpadních vod byly odebírány během června – srpna 2011 na přítoku a odtoku dvou ČOV. V případě velkokapacitní čistírny bylo k odběru použito automatického vzorkovače, díky němuž byl získán slévaný 24hodinový směsný vzorek, který byl odebírán každý den v 6 hodin ráno. U čistírny do 10 000 EO byl odebírán prostý jednorázový vzorek vždy mezi 9–11 ranní hodinou. Vzorky byly před zpracováním uchovávány v lednici, při teplotě 4 °C. Pro přepravu do laboratoře byly v obou případech použity tmavé skleněné vzorkovnice o objemu 1 litr, umístěné v přenosné lednici s pasivním chlazením. Zpracování vzorku proběhlo vždy nejpozději do 2 dnů po jeho odběru.

4.6.7 Úprava vzorků

4.6.7.1 Filtrace

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 za sníženého tlaku filtrována přes papírové filtry pomocí Büchnerovy nálevky, odsávací baňky a vodní vývěvy. U vzorků z přítoku byly postupně použity filtrační papíry Mu-

nkrell Filtrak s označením 388 a 390, čímž bylo zajištěno dostatečné přečištění vzorku a zároveň zachována potřebná rychlost filtrace. U odtokových vzorků byl použit pouze filtr 390.

4.6.7.2 Úprava pH

Po přefiltrování byla následně u všech vzorků změřena a zaznamenána hodnota pH. Pro následující preanalytický postup, extrakci tuhou fází, bylo pomocí koncentrované kyseliny chlorovodíkové upraveno pH všech vzorků na hodnotu 2, jak vyplynulo z optimalizace této metody. Vzorky odpadní vody byly poté rozděleny po 3 × 300 ml do uzavíratelných skleněných nádob.

4.6.8 Extrakce tuhou fází

Při optimalizaci SPE na kolonkách Oasis HLB byl postup upraven na následující verzi:

- aktivace sorbentu 6 ml methanolu
- promytí 6 ml Milli-Q vody (pH = 2)
- nanesení 300 ml vzorku (pH = 2)
- promytí 6 ml Milli-Q vody (pH = 2)
- sušení podtlakem vzduchu (10 min), přetlakem dusíku (5 min) (Obr. 54)
- eluce 6 ml methanolu (Obr. 55)
- sušení přetlakem dusíku (do sucha)
- rozpuštění odparku v 0,3 ml BGE



Obr. 54: Proces sušení SPE kolonek dusíkem s využitím speciálního nástavce



Obr. 55: Eluce analytů ze sorbentu SPE kolonek

Tímto postupem bylo dosaženo 1 000násobného zakoncentrování a celá metoda tedy dosáhla následujících mezí detekce a stanovitelnosti:

Tab. 20: Hodnoty LOD a LOQ pro optimalizovanou metodu (v $\mu\text{g.l}^{-1}$)

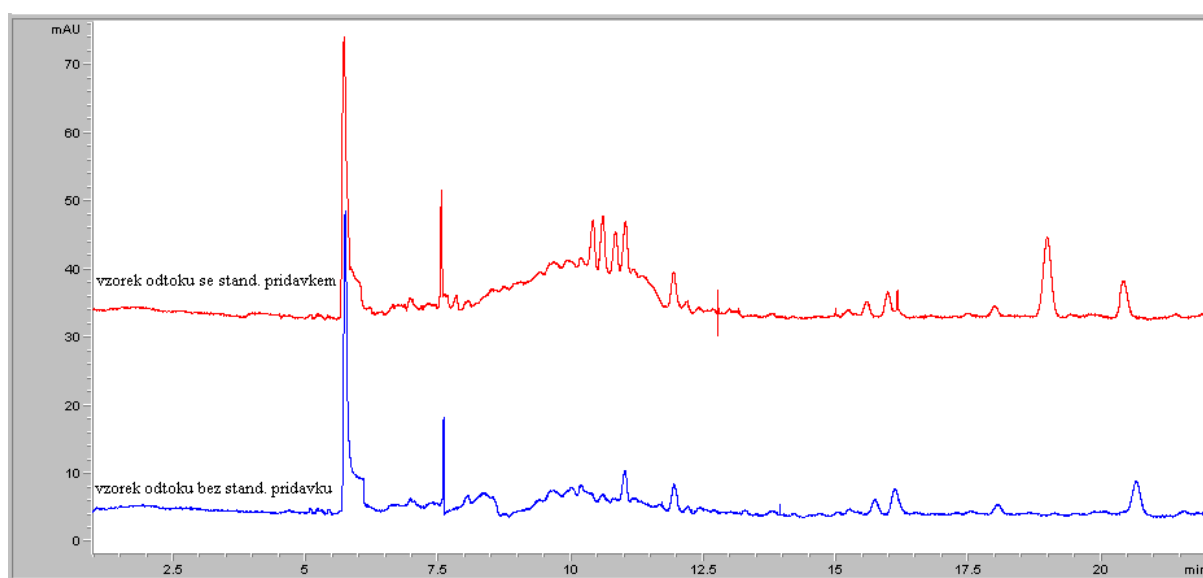
	PAR	KET	DIC	IBU	NAP	SAL
LOQ	1,54	4,27	3,28	3,90	1,67	1,54
LOD	0,46	1,28	0,98	1,17	0,50	0,46

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Stanovení vybraných léčiv v reálných vzorcích

V rámci této práce byla sledována vybraná analgetika na dvou různých čistírnách odpadních vod a to jak na přítoku, tak i na odtoku. Vzorky byly odebírány v průběhu měsíců června, července a srpna 2011. Pro vyhodnocení byla využita vícebodová kalibrační křivka. Pro snadnější identifikaci analytů bylo pro rozpouštění odparku po SPE využito roztoku základního elektrolytu se standardním přídavkem všech stanovovaných léčiv o koncentraci 5 mg.l^{-1} . Tento roztok byl vždy samostatně proměřen spolu se sadou vzorků odpadní vody tak, aby bylo možné z kalibrační křivky odečíst vždy přesnou hodnotu koncentrace všech analytů (Obr. 56). Voda z každého odběru byla zpracována třikrát a poté vypočítána průměrná hodnota koncentrace každého analytu.

Během odběrů byly detekovány všechny sledované analyty v různých koncentracích.



Obr. 56: Srovnání elektroforegramů odpadní vody se standardním přídavkem a bez něj

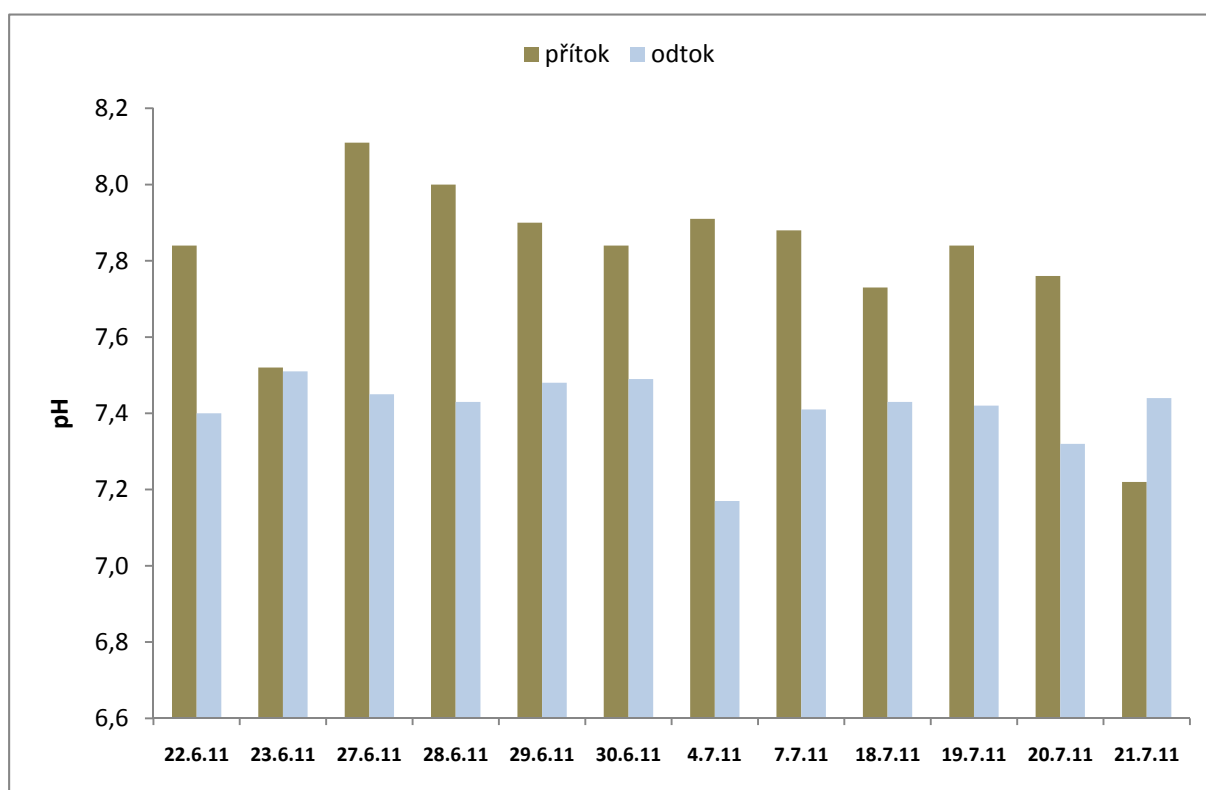
5.1.1 Stanovení NSAIDs na ČOV do 10 000 EO

Na vybrané čistírně bylo odebráno celkem 24 vzorků, během měsíců června a července roku 2011. Ve vzorcích byla nejprve změřena hodnota pH (a poté podle vypracovaného postupu vyhodnoceny koncentrace sledovaných analytů. Kromě toho byla sledována účinnost ČOV při odbourávání kontaminantů. Při vyhodnocení bylo nutné zohlednit dobu zdržení odpadní vody, která činí cca 2 dny. Z toho důvodu bylo možné vyhodnotit účinnost ČOV pouze u některých vzorků.

Tab. 21, Obr. 57) a poté podle vypracovaného postupu vyhodnoceny koncentrace sledovaných analytů. Kromě toho byla sledována účinnost ČOV při odbourávání kontaminantů. Při vyhodnocení bylo nutné zohlednit dobu zdržení odpadní vody, která činí cca 2 dny. Z toho důvodu bylo možné vyhodnotit účinnost ČOV pouze u některých vzorků.

Tab. 21: Hodnoty pH vzorků z ČOV do 10 000 EO

datum odběru	22.6.	23.6.	27.6.	28.6.	29.6.	30.6.
pH přítoku	7,84	7,52	8,11	8,00	7,90	7,84
pH odtoku	7,40	7,51	7,45	7,43	7,48	7,49
datum odběru	4.7.	7.7.	18.7.	19.7.	20.7.	21.7.
pH přítoku	7,91	7,88	7,73	7,84	7,76	7,22
pH odtoku	7,17	7,41	7,43	7,42	7,32	7,44



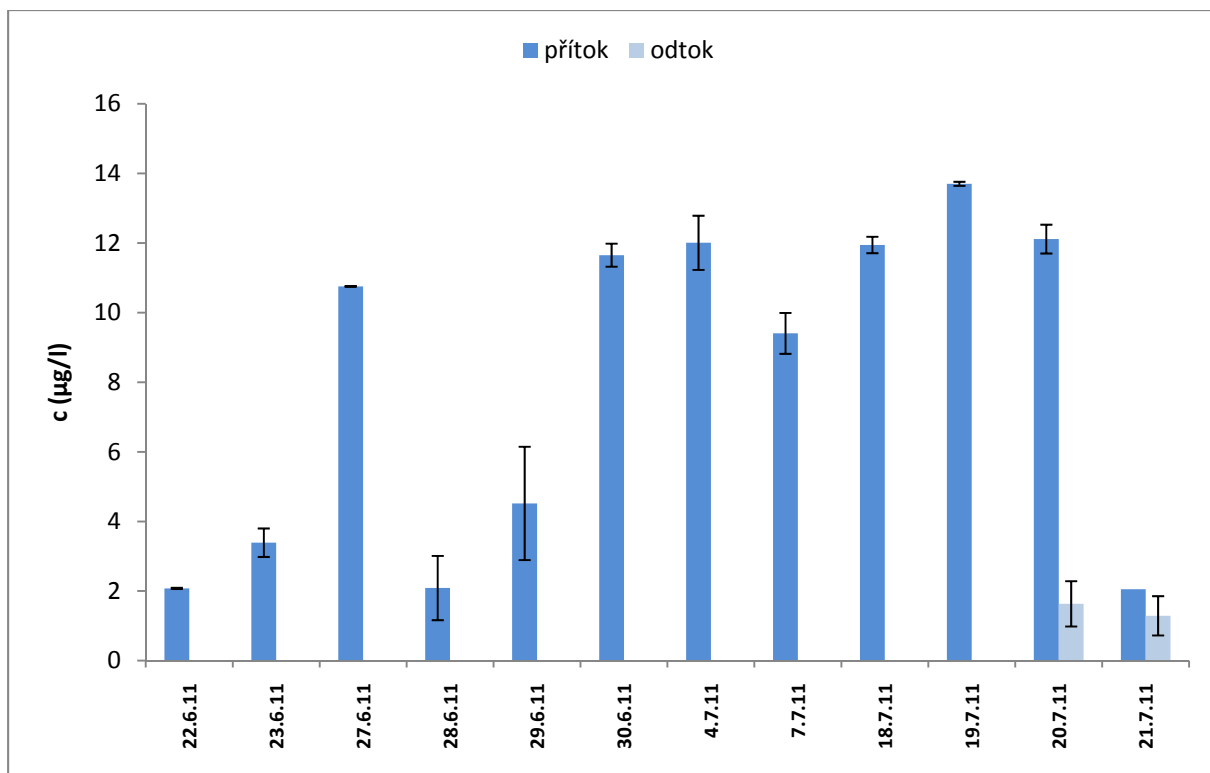
Obr. 57: Hodnoty pH vzorků z ČOV do 10 000 EO

Z výsledků vyplývá, že hodnoty pH na přítoku se pohybovaly v rozmezí 7,22–8,11 a hodnoty na odtoku v rozmezí 7,17–7,51. Jedná se tedy o hodnoty v neutrální až mírně bazické oblasti.

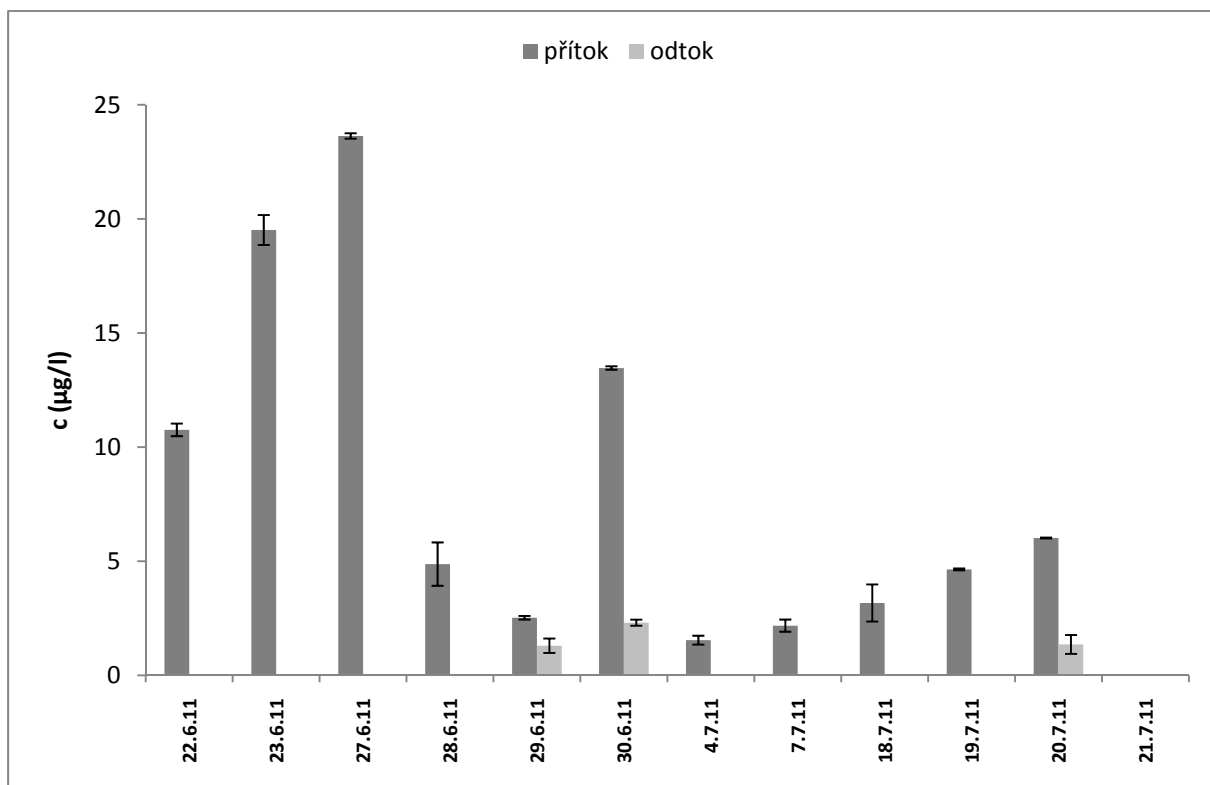
Výsledky analýz odpadní vody jsou kompletně prezentovány v Tab. 22 a kvůli přehlednosti také v následujících grafech. Protože byl každý vzorek proměřen třikrát, bylo možné vypočítat také relativní směrodatnou odchylku pro jednotlivá měření, která je v grafu uvedena jako chybová úsečka.

Tab. 22: Koncentrace sledovaných NSAIDs v $\mu\text{g.l}^{-1}$ na přítoku a odtoku ČOV do 10 000 EO

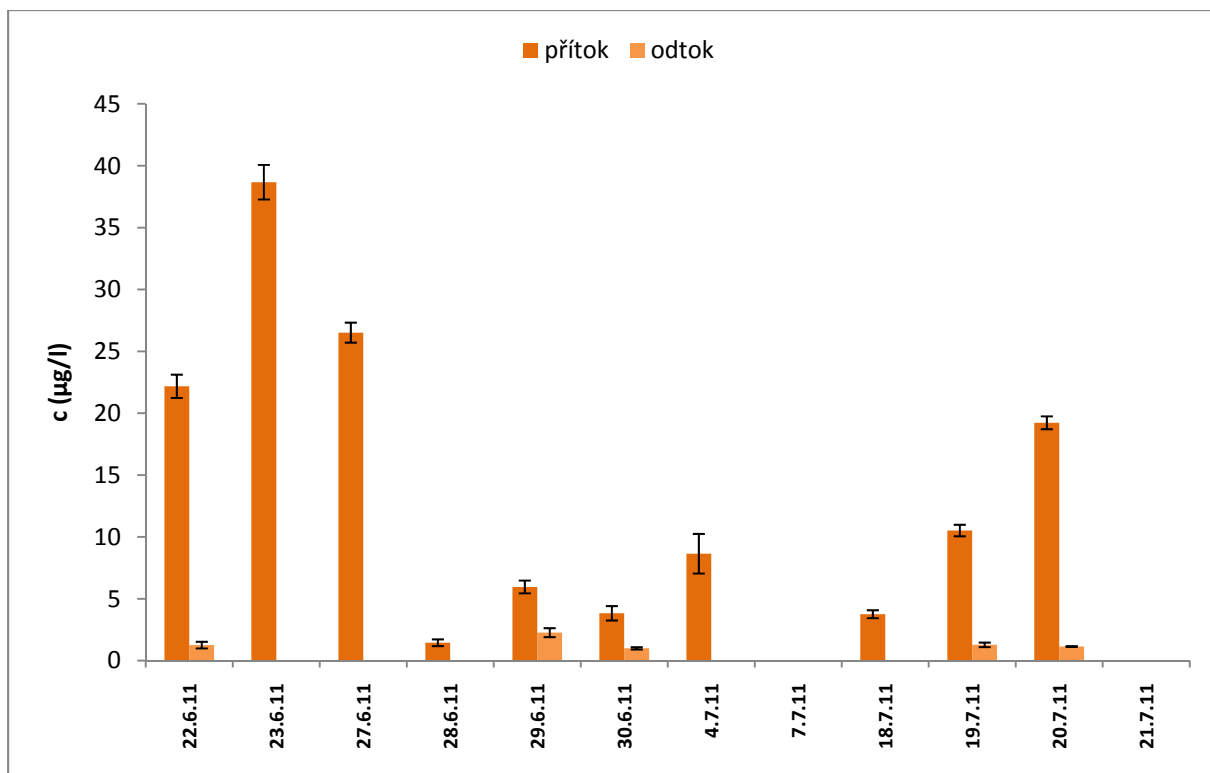
datum odběru	22.6.		23.6.		27.6.		28.6.	
	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok
PAR	2,08	< LOD	3,39	< LOD	10,76	< LOD	2,09	< LOD
KET	10,76	< LOD	19,52	< LOD	23,64	< LOD	4,87	< LOD
DIC	22,18	1,26	38,67	< LOD	26,51	< LOD	1,45	< LOD
IBU	54,77	3,32	57,37	1,46	45,19	< LOD	26,43	< LOD
NAP	1,56	< LOD	8,89	< LOD	< LOD	< LOD	1,43	< LOD
SAL	55,82	< LOD	64,40	< LOD	30,54	< LOD	53,52	< LOD
datum odběru	29.6		30.6.		4.7.		7.7.	
	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok
PAR	4,52	< LOD	11,65	< LOD	12,01	< LOD	9,41	< LOD
KET	2,52	1,30	13,47	2,31	1,54	< LOD	2,18	< LOD
DIC	5,96	2,26	3,83	0,99	8,64	< LOD	< LOD	< LOD
IBU	16,64	1,44	18,18	< LOD	48,58	2,74	14,28	< LOD
NAP	8,57	0,99	2,88	1,08	9,07	0,68	12,05	0,55
SAL	53,66	2,39	42,18	1,37	54,04	1,69	45,51	0,75
datum odběru	18.7.		19.7.		20.7.		21.7.	
	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok
PAR	11,95	< LOD	13,70	< LOD	12,11	1,63	2,05	1,29
KET	3,17	< LOD	4,64	< LOD	6,02	1,36	< LOD	< LOD
DIC	3,76	< LOD	10,52	1,28	19,23	1,14	< LOD	< LOD
IBU	41,46	2,25	42,39	1,68	17,83	< LOD	2,59	< LOD
NAP	4,30	< LOD	7,79	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
SAL	34,95	0,93	39,74	0,81	62,80	1,04	5,07	1,30



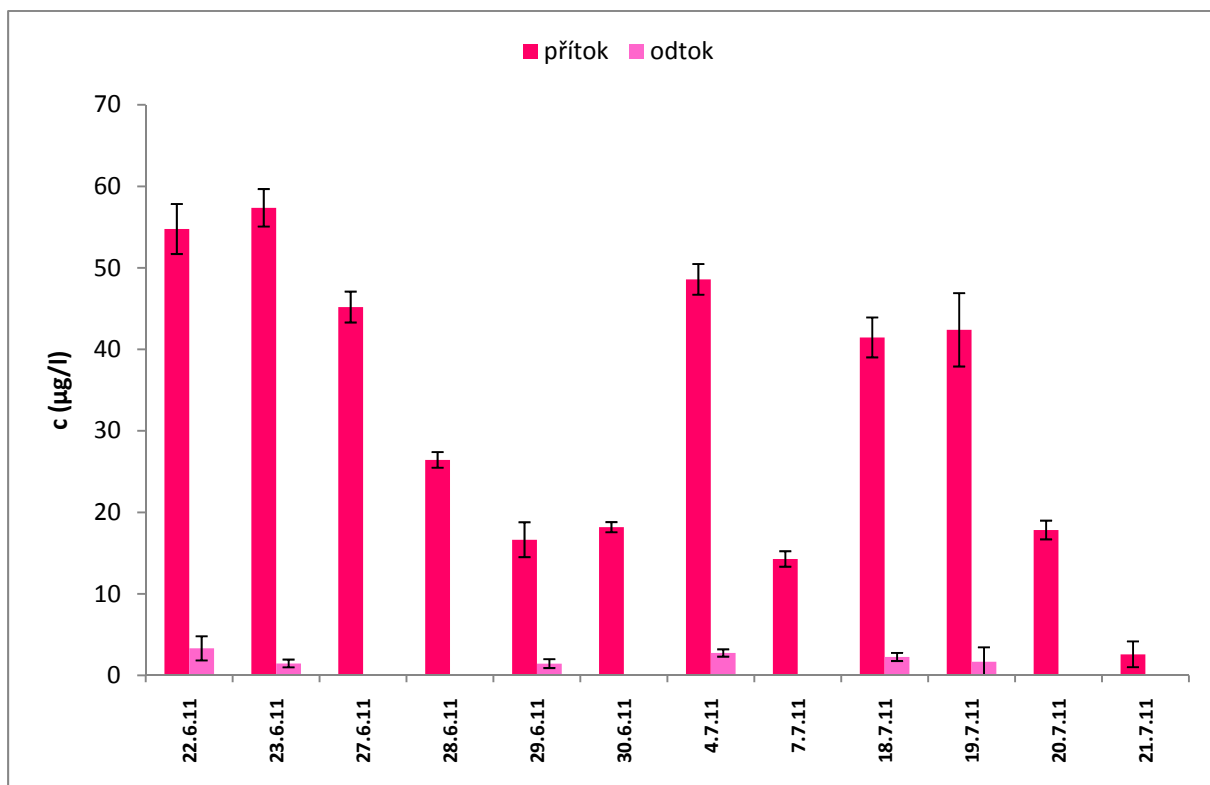
Obr. 58: Koncentrace paracetamolu na ČOV do 10 000 EO v $\mu\text{g.l}^{-1}$



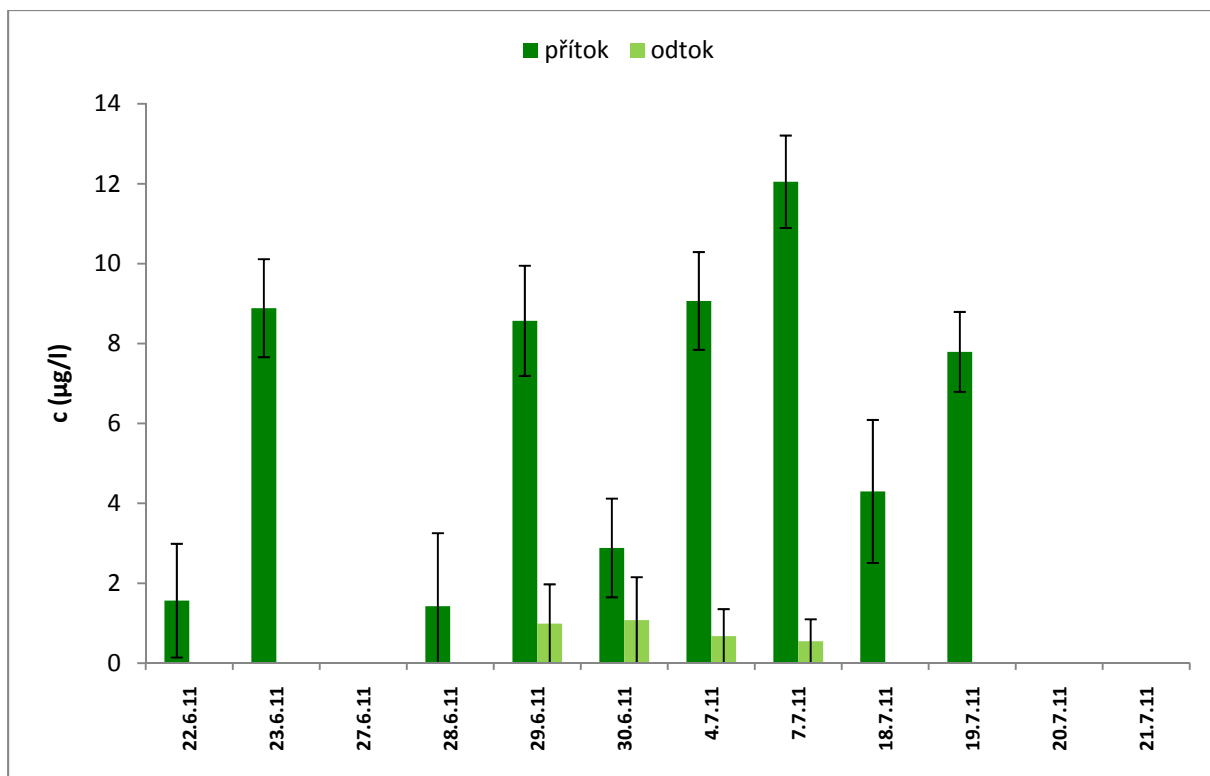
Obr. 59: Koncentrace ketoprofenu na ČOV do 10 000 EO v $\mu\text{g.l}^{-1}$



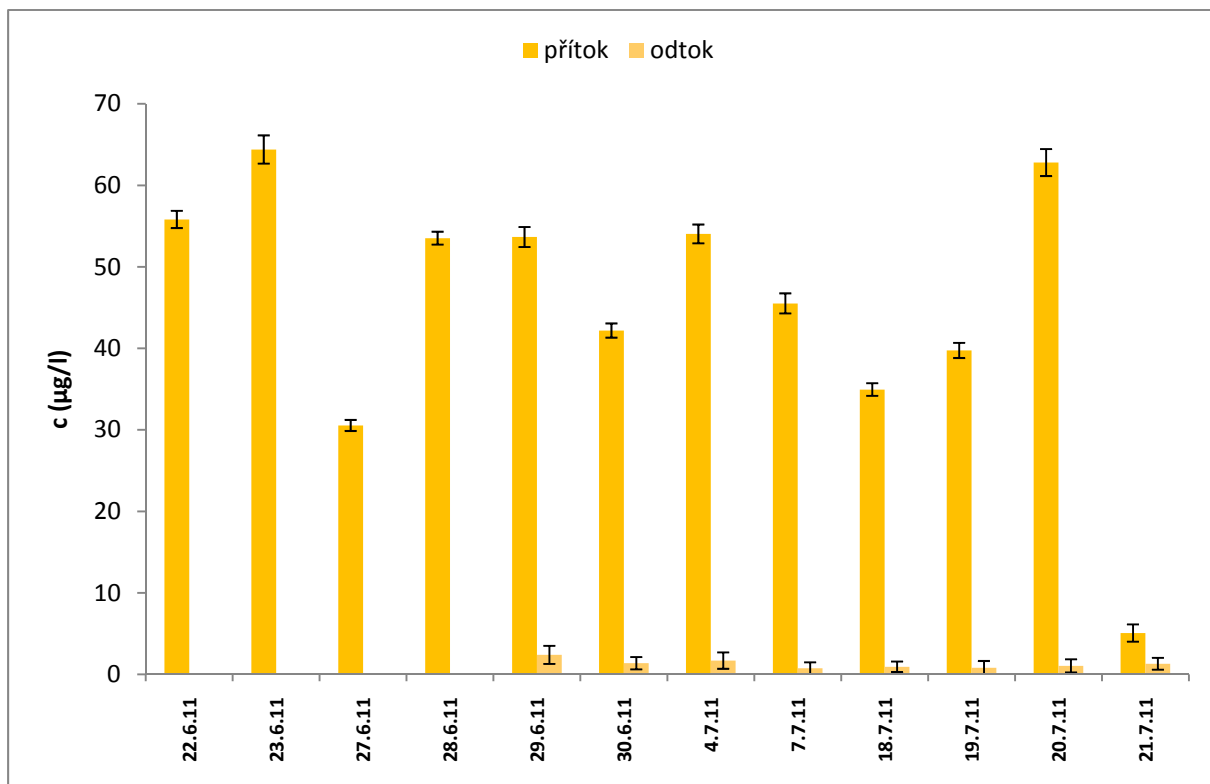
Obr. 60: Koncentrace diklofenaku na ČOV do 10 000 EO v $\mu\text{g.l}^{-1}$



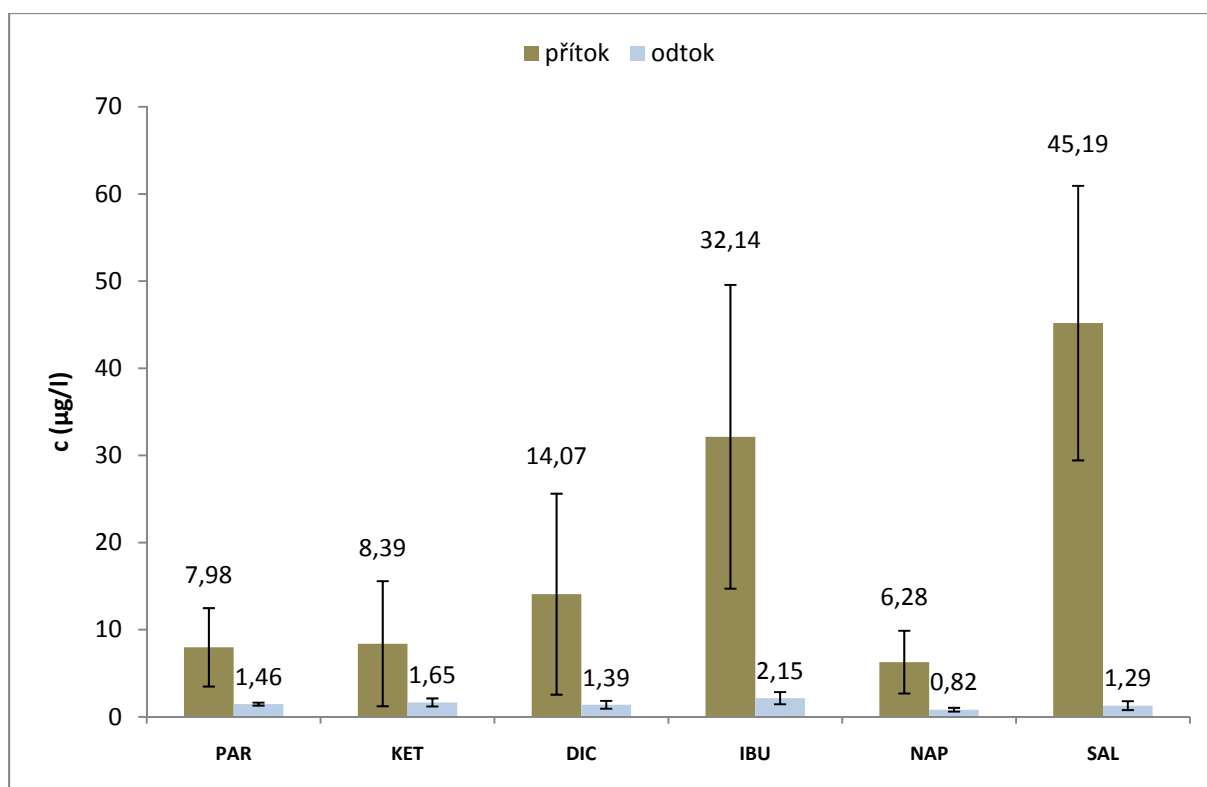
Obr. 61: Koncentrace ibuprofenu na ČOV do 10 000 EO v $\mu\text{g.l}^{-1}$



Obr. 62: Koncentrace naproxenu na ČOV do 10 000 EO v $\mu\text{g.l}^{-1}$



Obr. 63: Koncentrace kyseliny salicylové na ČOV do 10 000 EO v $\mu\text{g.l}^{-1}$



Obr. 64: Průměrné koncentrace jednotlivých analytů na ČOV do 10 000 EO

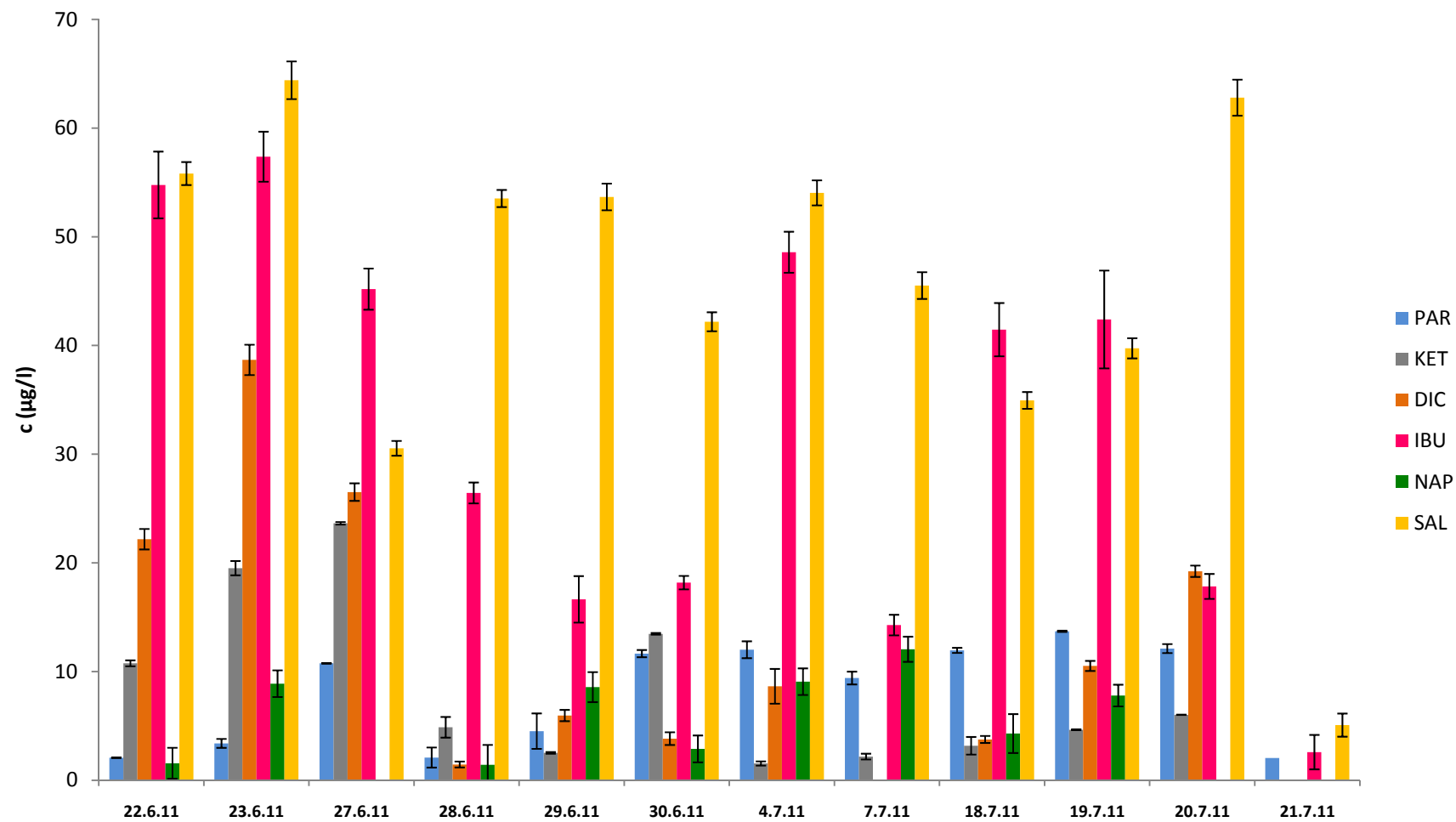
Z výsledků měření vyplývá, že nejčastěji detekovanými analyty na přítoku ČOV byla kyselina salicylová ($45,19 \mu\text{g.l}^{-1}$) a ibuprofen ($32,14 \mu\text{g.l}^{-1}$), což odpovídá získaným údajům ze SÚKL (Obr. 33), podle kterých patří mezi nejoblíbenější preparáty z této farmaceutické skupiny látek. Jako další by se měl, na základě těchto údajů, pohybovat ve vyšších koncentracích i paracetamol. U tohoto analytu však nebylo při skupinovém stanovení dosaženo potřebných hodnot účinnosti extrakce. Další možností je, že je tato látka velmi dobře odbouratelná již při samotném metabolismu, případně následném postupném rozkladu v odpadní vodě, a to ještě před přítokem na ČOV.

Při studiu účinnosti ČOV při odbourávání sledovaných analytů (Tab. 23) bylo zjištěno, že nejlépe odbouratelnými analyty jsou ibuprofen, kyselina salicylová a paracetamol, u kterých bylo dosaženo průměrné hodnoty nad 90 %. U ketoprofenu, diklofenaku a naproxenu se průměrné hodnoty pohybovaly mezi 70–80 %. Je však nutno dodat, že ve většině případů se hodnoty koncentrací na odtoku pohybovaly pod mezí detekce nebo těsně nad ní. Nízké koncentrace všech analytů na přítoku, zjištěné dne 21. 7., lze vysvětlit rozředěním odpadní vody již v kanalizaci vodou srážkovou, v důsledku vydatného deště.

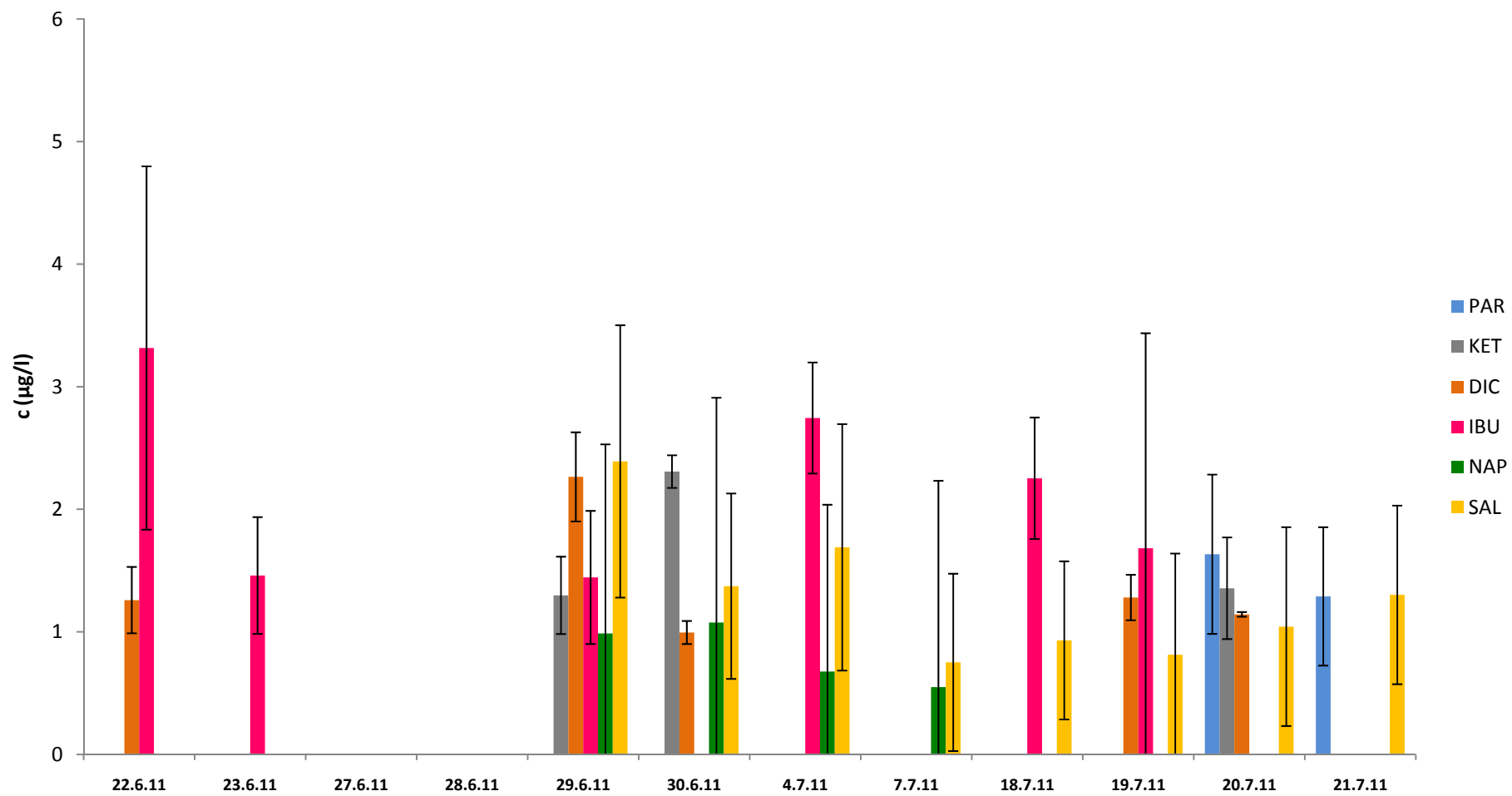
Na Obr. 65a Obr. 66 jsou kompletně prezentovány naměřené koncentrace analytů na přítoku resp. odtoku ČOV do 10 000 EO.

Tab. 23: Účinnost ČOV do 10 000 EO při odbourávání cílových analytů (v %)

datum odběru	27.6.	28.6.	18.7.	19.7.
PAR	≈ 100	≈ 100	86	91
KET	95	53	57	≈ 100
DIC	91	31	70	≈ 100
IBU	97	≈ 100	≈ 100	≈ 100
NAP	< LOD	25	≈ 100	≈ 100
SAL	92	97	97	97



Obr. 65: Koncentrace sledovaných analytů na přítoku ČOV do 10 000 EO



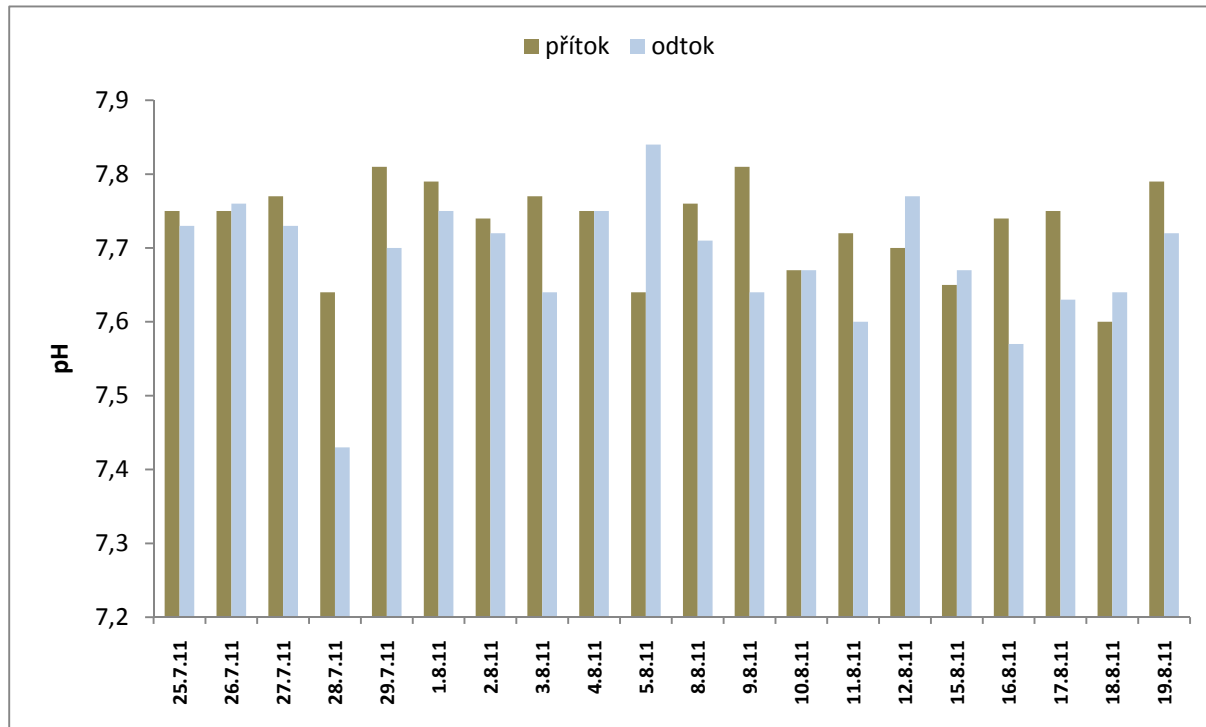
Obr. 66: Koncentrace sledovaných analytů na odtoku ČOV do 10 000 EO

5.1.2 Stanovení NSAIDs na velkokapacitní ČOV

Na velkokapacitní ČOV Brno-Modřice bylo odebráno celkem 40 vzorků, a to během měsíců července a srpna roku 2011. Ve vzorcích byla opět nejprve změřena hodnota pH (Tab. 24, Obr. 67) a dále bylo postupováno podle optimalizované metody. Byly vyhodnoceny koncentrace sledovaných analytů na přítoku i na odtoku, a vypočítána účinnost ČOV při odbourávání kontaminantů.

Tab. 24: Hodnoty pH vzorků z velkokapacitní ČOV

datum odběru	25.7.	26.7.	27.7.	28.7.	29.7.
pH přítoku	7,75	7,75	7,77	7,64	7,81
pH odtoku	7,73	7,76	7,73	7,43	7,70
datum odběru	1.8.	2.8.	3.8.	4.8.	5.8.
pH přítoku	7,79	7,74	7,77	7,75	7,64
pH odtoku	7,75	7,72	7,64	7,75	7,84
datum odběru	8.8.	9.8.	10.8.	11.8.	12.8.
pH přítoku	7,76	7,81	7,67	7,72	7,70
pH odtoku	7,71	7,64	7,67	7,60	7,77
datum odběru	15.8.	16.8.	17.8.	18.8.	19.8.
pH přítoku	7,65	7,74	7,75	7,60	7,79
pH odtoku	7,67	7,57	7,63	7,64	7,72



Obr. 67: Hodnoty pH vzorků z velkokapacitní ČOV

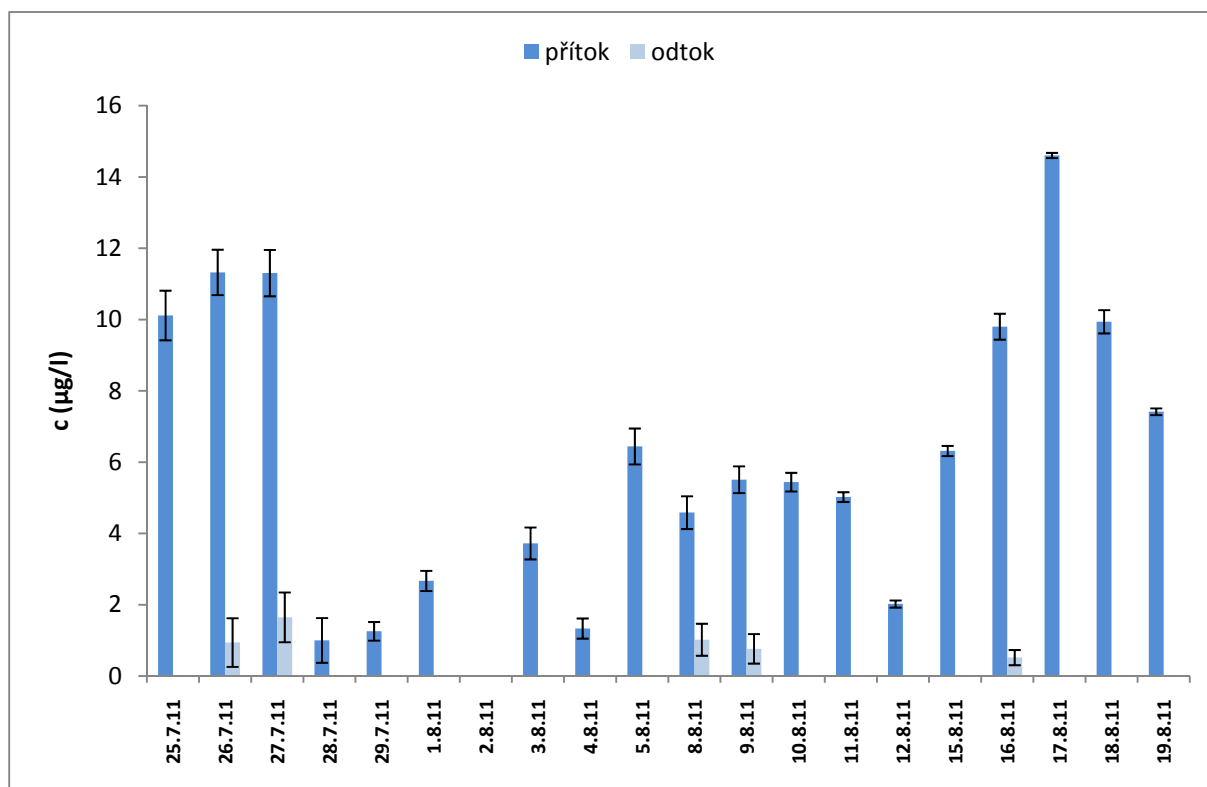
Z výsledků vyplývá, že hodnoty pH na přítoku se pohybovaly v rozmezí 7,60–7,81 a hodnoty na odtoku v rozmezí 7,43–7,84. Jedná se tedy opět o hodnoty v neutrální až mírně bazické oblasti.

Výsledky analýz odpadní vody z velkokapacitní ČOV jsou kompletně prezentovány v Tab. 25 a následujících grafech.

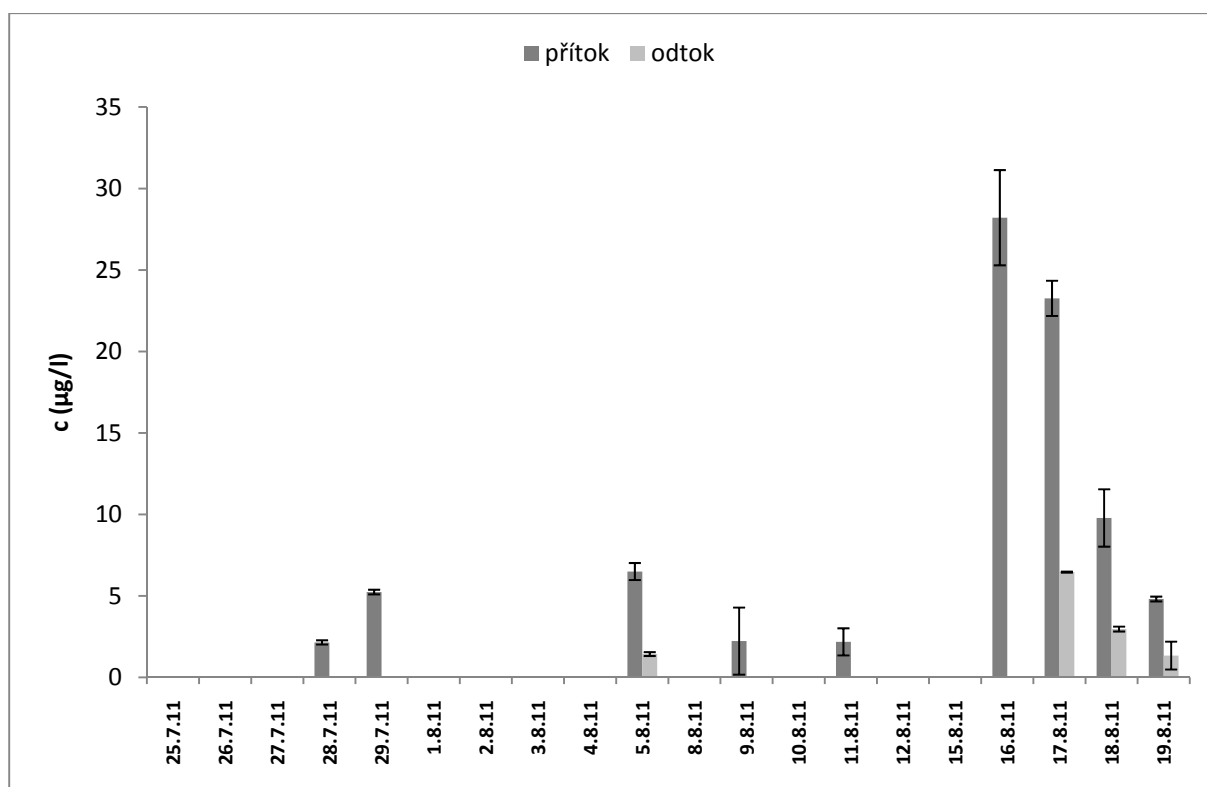
Tab. 25: Koncentrace sledovaných NSAIDs v $\mu\text{g.l}^{-1}$ na přítoku a odtoku velkokapacitní ČOV

datum odběru	25.7.		26.7.		27.7.		28.7.	
	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok
PAR	10,12	< LOD	11,33	0,94	11,31	1,65	1,00	< LOD
KET	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2,15	< LOD
DIC	8,92	1,09	5,94	1,02	1,36	< LOD	1,59	< LOD
IBU	20,79	< LOD	21,16	< LOD	18,59	< LOD	10,94	< LOD
NAP	1,95	1,22	1,04	0,51	< LOD	0,52	< LOD	< LOD
SAL	30,38	2,77	28,98	1,46	23,64	1,09	13,60	< LOD
datum odběru	29.7.		1.8.		2.8.		3.8.	
	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok
PAR	1,26	< LOD	2,67	< LOD	< LOD	< LOD	3,72	< LOD
KET	5,24	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
DIC	9,46	< LOD	6,39	1,72	5,89	2,17	1,55	1,36
IBU	17,91	< LOD	27,02	1,37	21,74	< LOD	20,68	< LOD
NAP	< LOD	< LOD	3,71	2,35	1,44	1,30	0,61	< LOD
SAL	21,29	< LOD	40,27	3,53	30,21	2,72	42,80	2,44
datum odběru	4.8.		5.8.		8.8.		9.8.	
	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok
PAR	1,34	< LOD	6,44	0,73	4,59	1,02	5,51	0,77
KET	< LOD	< LOD	6,50	1,43	< LOD	< LOD	2,23	< LOD
DIC	2,40	< LOD	5,03	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
IBU	24,33	< LOD	25,85	< LOD	16,50	< LOD	14,67	1,19
NAP	< LOD	< LOD	0,66	0,65	< LOD	< LOD	1,14	< LOD
SAL	41,15	2,23	26,73	< LOD	5,58	< LOD	17,37	< LOD
datum odběru	10.8.		11.8.		12.8.		15.8.	
	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok
PAR	5,44	< LOD	5,02	< LOD	2,02	< LOD	6,32	< LOD
KET	< LOD	< LOD	2,18	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
DIC	8,01	1,52	6,20	2,08	2,30	< LOD	< LOD	1,09
IBU	26,50	1,28	42,32	1,68	27,26	1,41	20,84	< LOD
NAP	1,68	< LOD	2,00	0,65	5,68	1,06	3,89	1,26
SAL	34,74	0,90	35,67	1,49	25,41	0,97	15,59	< LOD

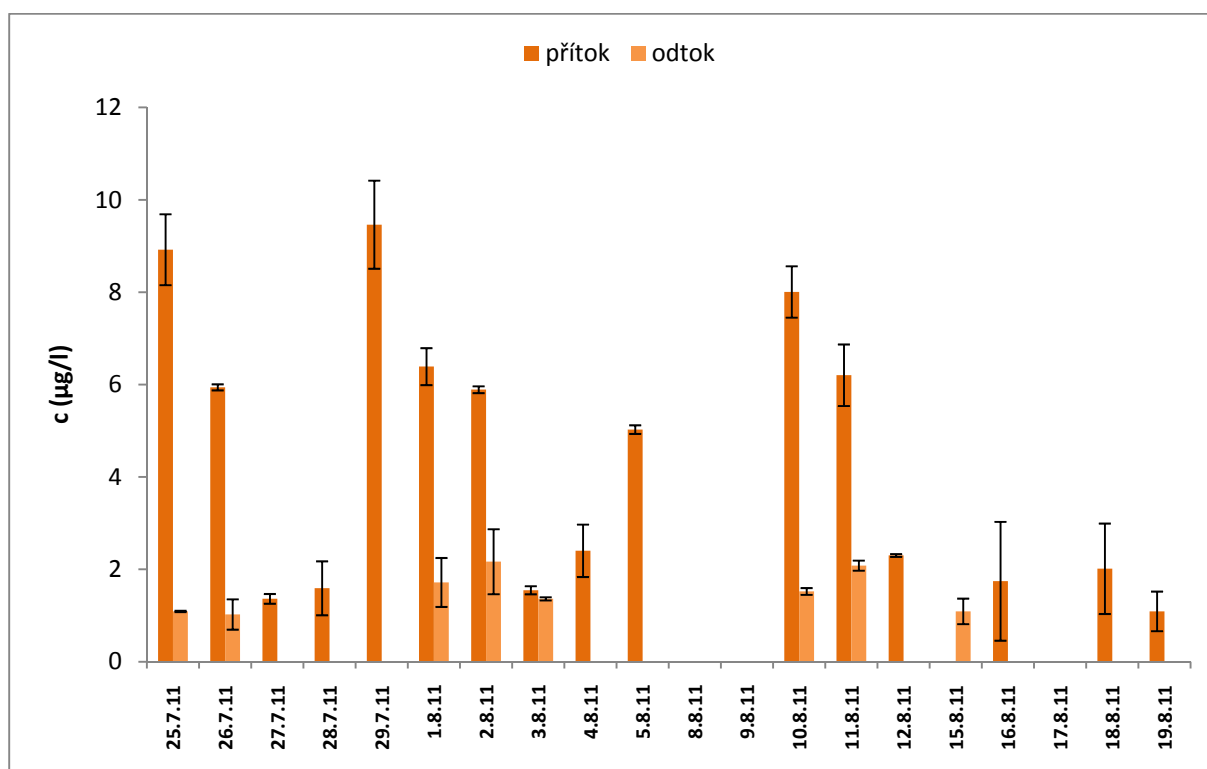
datum odběru	16.8.		17.8.		18.8.		19.8.	
	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok
PAR	9,80	0,52	14,61	< LOD	9,94	< LOD	7,42	< LOD
KET	28,21	< LOD	23,26	6,46	9,78	2,97	4,81	1,34
DIC	1,74	< LOD	< LOD	< LOD	2,01	< LOD	1,09	< LOD
IBU	35,42	1,31	12,57	2,75	26,34	1,18	30,82	2,12
NAP	5,75	0,75	14,48	0,59	5,04	2,19	9,87	0,52
SAL	20,76	0,47	30,06	< LOD	44,15	< LOD	35,94	< LOD



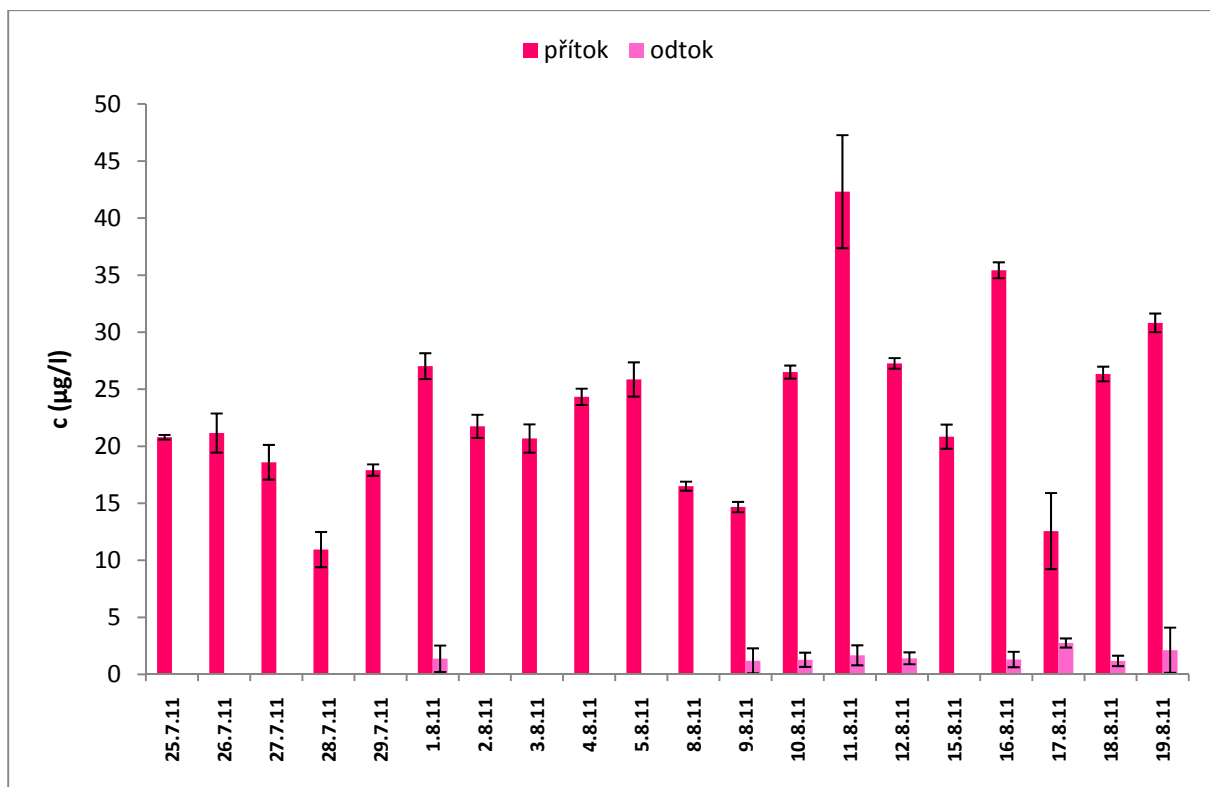
Obr. 68: Koncentrace paracetamolu na velkokapacitní ČOV v $\mu\text{g.l}^{-1}$



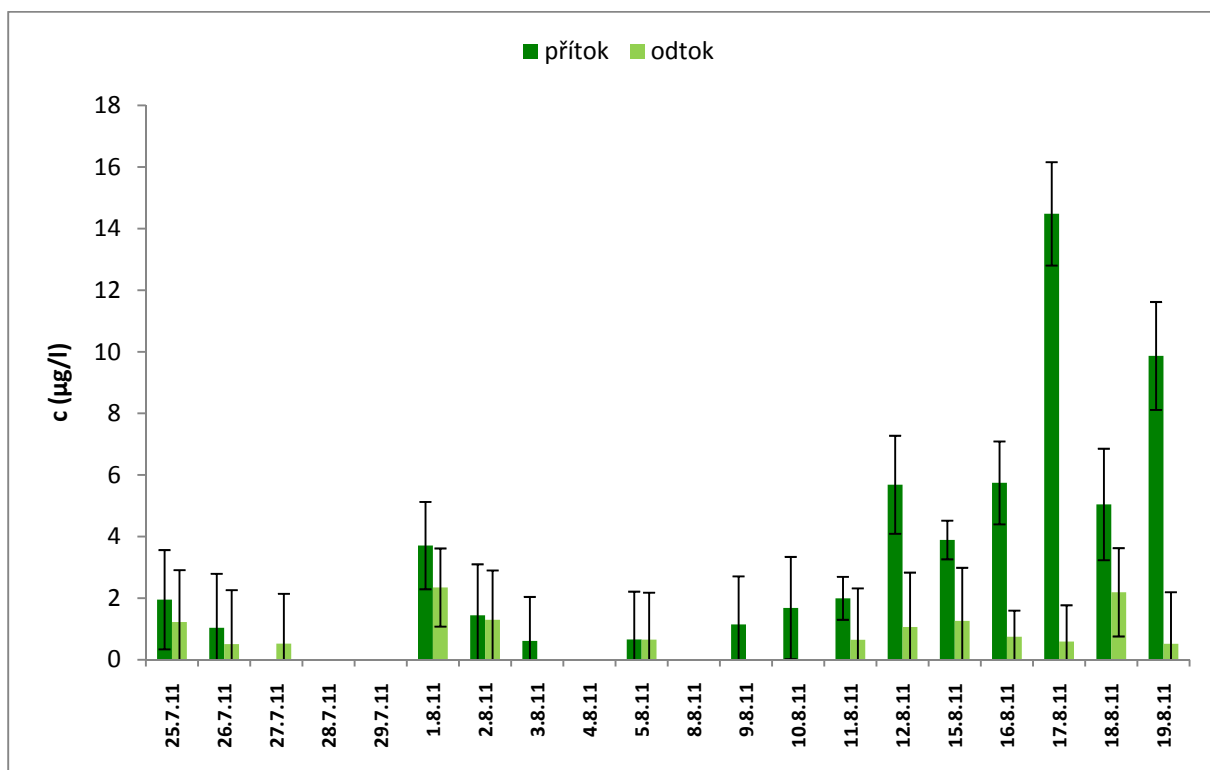
Obr. 69: Koncentrace ketoprofenu na velkokapacitní ČOV v $\mu\text{g.l}^{-1}$



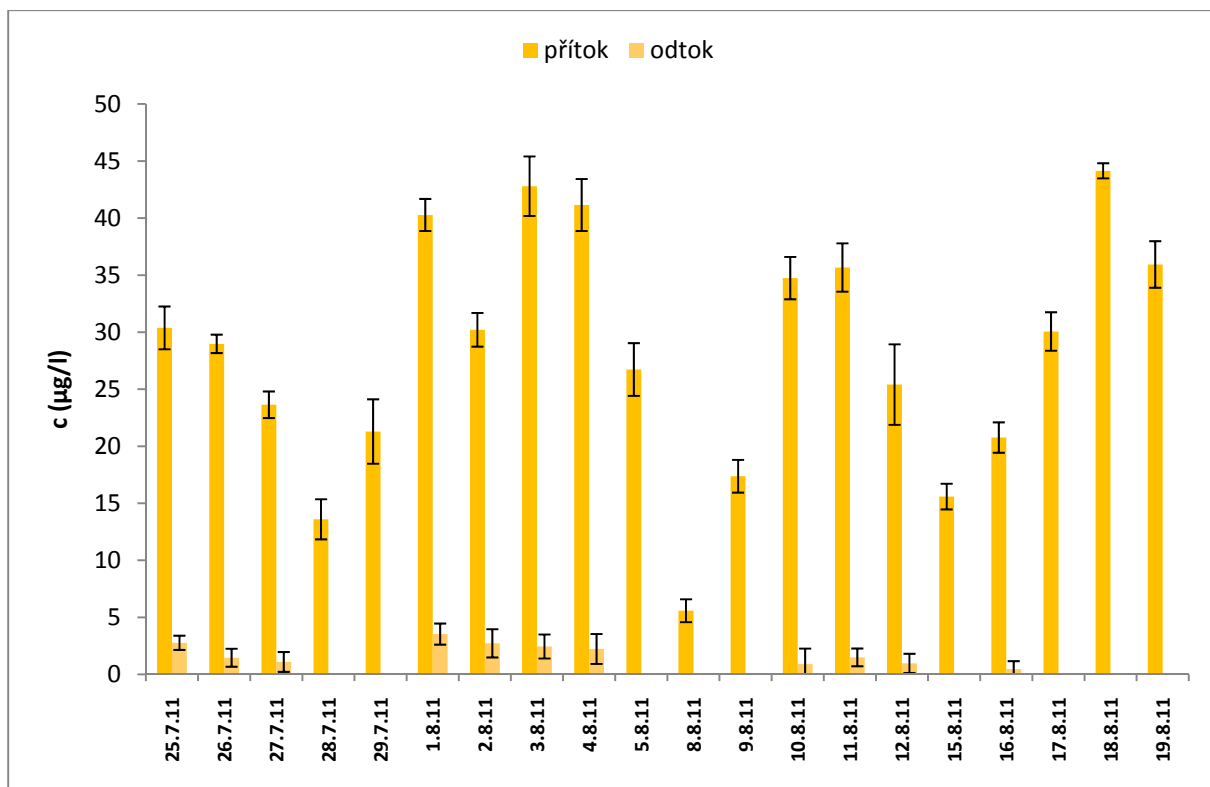
Obr. 70: Koncentrace diklofenaku na velkokapacitní ČOV v $\mu\text{g.l}^{-1}$



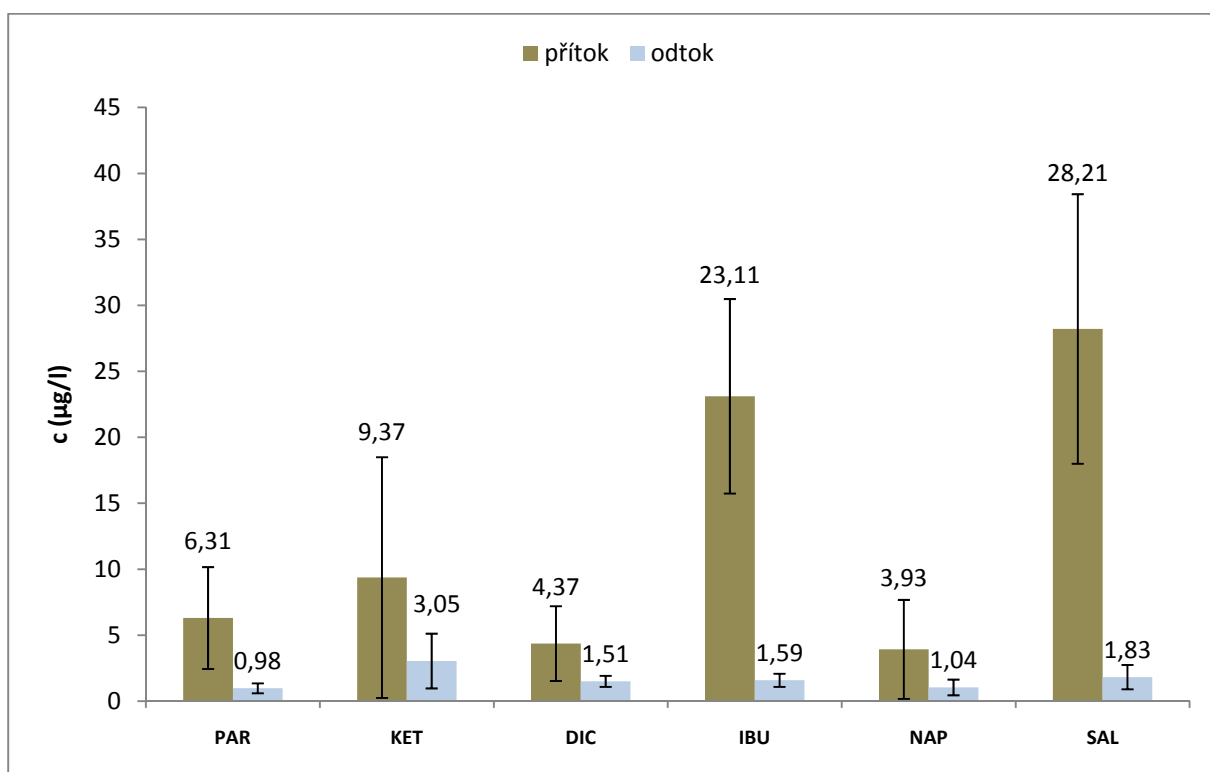
Obr. 71: Koncentrace ibuprofenu na velkokapacitní ČOV v $\mu\text{g.l}^{-1}$



Obr. 72: Koncentrace naproxenu na velkokapacitní ČOV v $\mu\text{g.l}^{-1}$



Obr. 73: Koncentrace kyseliny salicylové na velkokapacitní ČOV v $\mu\text{g.l}^{-1}$



Obr. 74: Průměrné koncentrace jednotlivých analytů na velkokapacitní ČOV

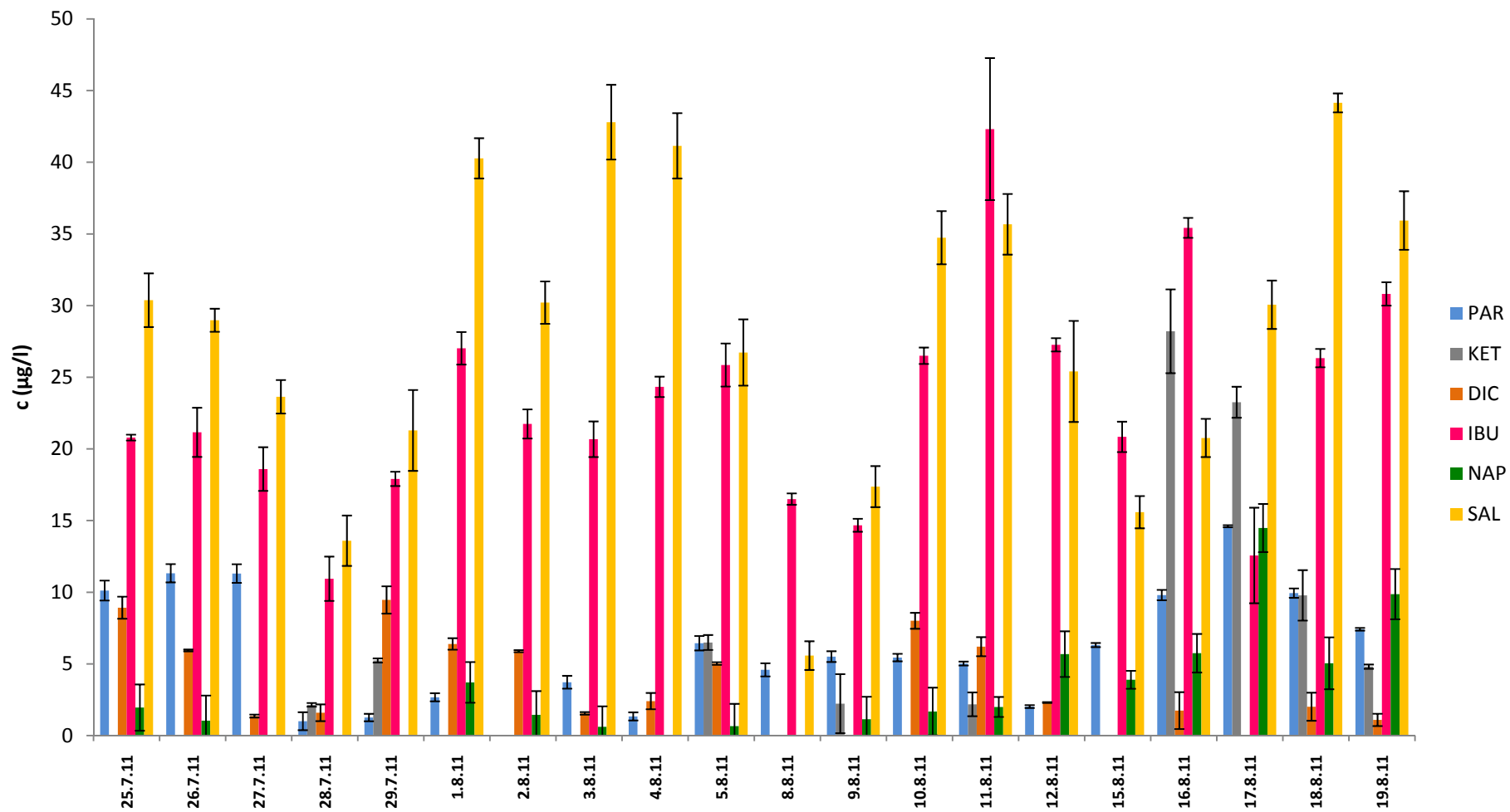
Z výsledků vyplývá, že nejčastěji detekovanými analyty na přítoku ČOV byly opět kyselina salicylová ($28,21 \mu\text{g.l}^{-1}$) a ibuprofen ($23,11 \mu\text{g.l}^{-1}$). Ostatní sledovaná analgetika se průměrně

pohybují pod koncentrací $10 \mu\text{g.l}^{-1}$. Při studiu účinnosti ČOV (Tab. 26) bylo zjištěno, že u všech sledovaných analytů kromě naproxenu se průměrná hodnota odbourání pohybuje nad 90 %. Koncentrace naproxenu se na přítoku pohybují okolo hodnoty $4 \mu\text{g.l}^{-1}$, avšak účinnost jeho odbourání často klesala až k 50 %. Potvrdil se tedy fakt z měření na menší ČOV, že se jedná o kontaminant poměrně těžko odbouratelný.

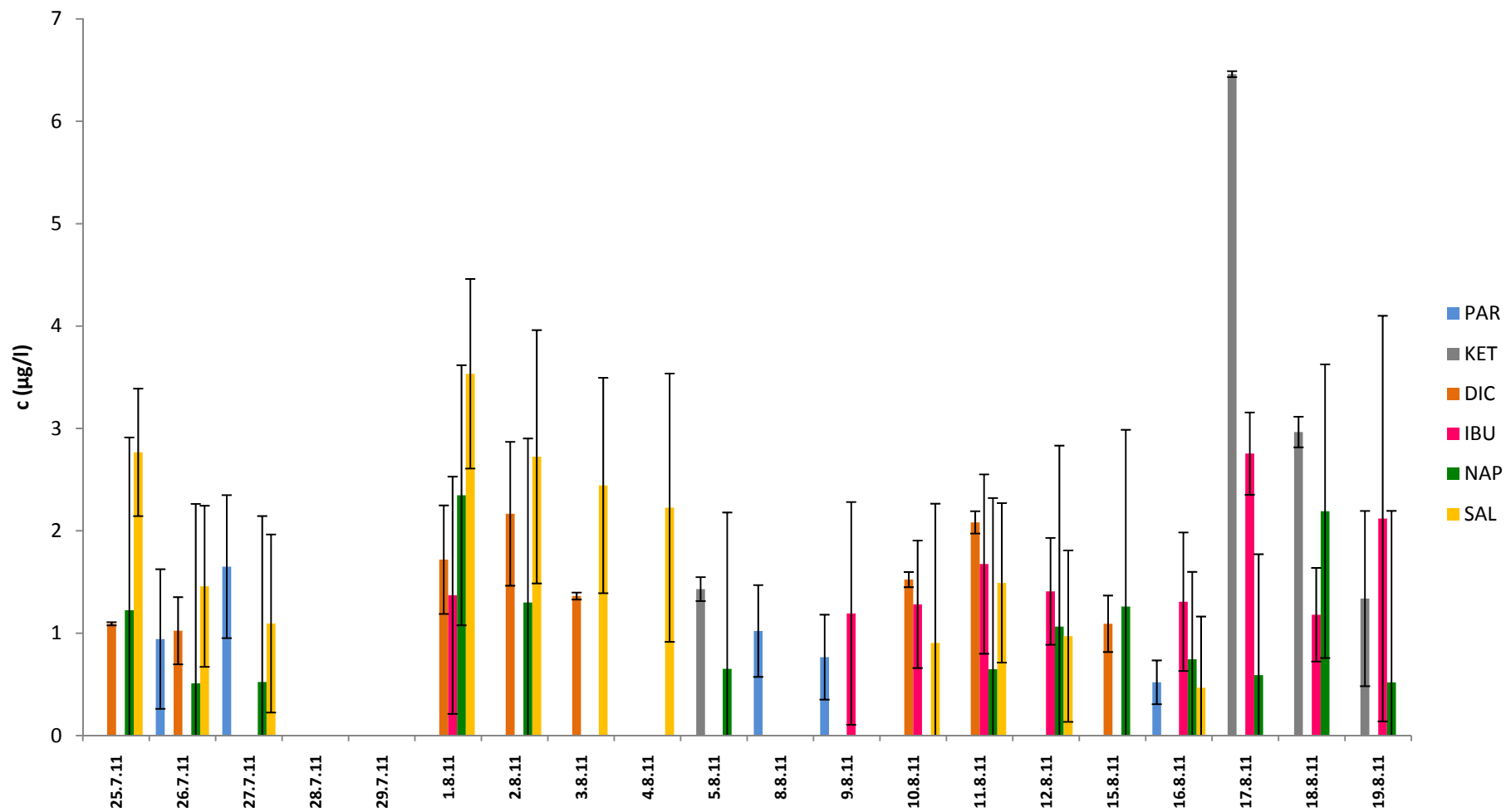
Na Obr. 75 a Obr. 76 jsou kompletně prezentovány naměřené koncentrace analytů na přítoku resp. odtoku velkokapacitní ČOV.

Tab. 26: Účinnost velkokapacitní ČOV při odbourávání cílových analytů (v %)

datum odběru	25.6.	26.6.	27.6.	28.6.	1.8.	2.8.	3.8.	4.8.
PAR	91	85	≈ 100	≈ 100	≈ 100	< LOD	≈ 100	≈ 100
KET	< LOD	< LOD	< LOD	≈ 100	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
DIC	89	≈ 100	≈ 100	≈ 100	66	77	≈ 100	≈ 100
IBU	≈ 100	≈ 100	≈ 100	≈ 100	≈ 100	≈ 100	≈ 100	≈ 100
NAP	74	50	< LOD	< LOD	65	≈ 100	≈ 100	< LOD
SAL	95	96	≈ 100	≈ 100	93	92	95	≈ 100
datum odběru	8.8.	9.8.	10.8.	11.8.	15.8.	16.8.	17.8.	18.8.
PAR	83	≈ 100	≈ 100	≈ 100	92	≈ 100	≈ 100	≈ 100
KET	< LOD	≈ 100	< LOD	≈ 100	< LOD	77	87	86
DIC	< LOD	< LOD	74	≈ 100	< LOD	≈ 100	< LOD	≈ 100
IBU	93	91	94	97	94	92	91	92
NAP	< LOD	≈ 100	61	47	81	90	85	90
SAL	≈ 100	95	96	97	97	≈ 100	≈ 100	≈ 100



Obr. 75: Koncentrace sledovaných analytů na přítoku velkokapacitní ČOV



Obr. 76: Koncentrace sledovaných analytů na odtoku z velkokapacitní ČOV

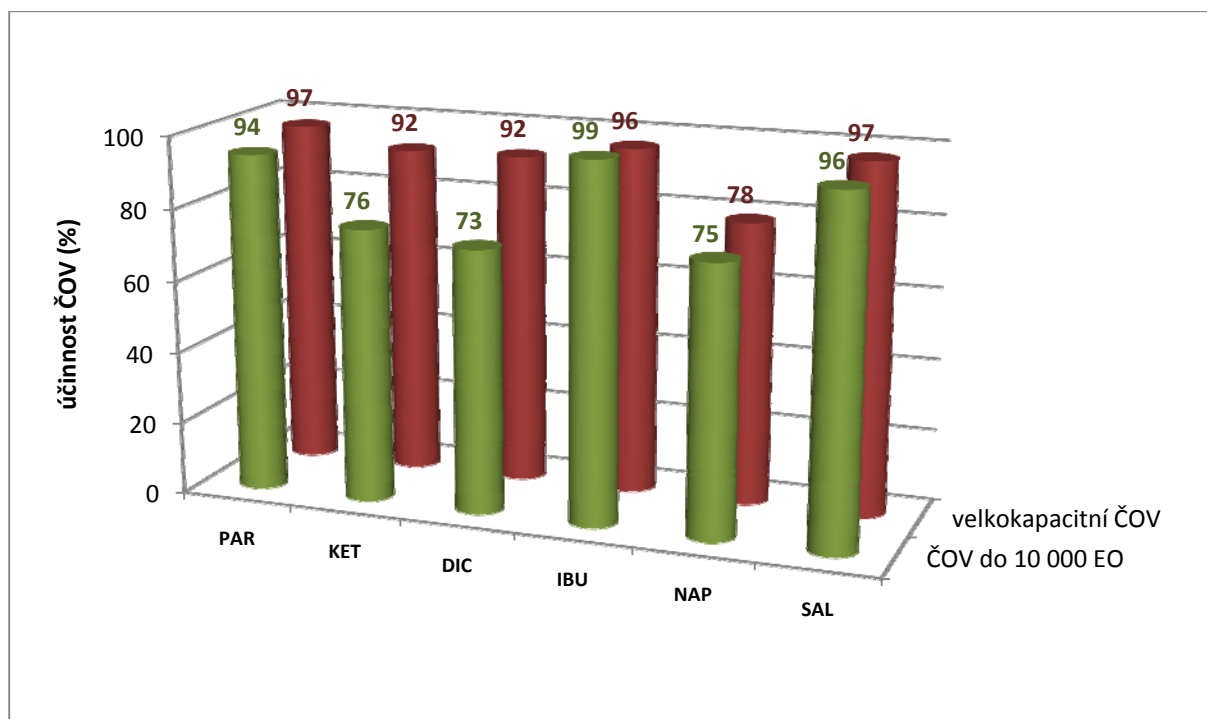
5.1.3 Srovnání vybraných ČOV při odbourávání sledovaných analytů

Při porovnání dvou různých ČOV je třeba zvážit několik různých faktorů. Prvním z nich je charakteristika přitékající odpadní vody. V obou případech se jedná z větší míry o komunální splaškové vody, převážně doplněné o průmyslovou odpadní vodu, ovšem s téměř 100násobně rozdílnými objemy na přítoku.

Dalším velkým rozdílem mezi čistírnami je použitá technologie. U menší čistírny je zcela vynechán mechanický stupeň čištění pomocí usazovacích nádrží. Lze tedy předpokládat, že u velkokapacitní ČOV je část kontaminantů odbourána již při tomto procesu, a odchází tak z odpadní vody spolu s primárním kalem. U velkokapacitní čistírny je rovněž mnohem propracovanější biologický stupeň čištění.

V neposlední řadě je třeba zmínit rozdílnou dobu zdržení odpadní vody na ČOV. U velkokapacitní je tato doba 24 hodin, kdežto u menší čistírny je to asi 2 dny, v závislosti na přítoku.

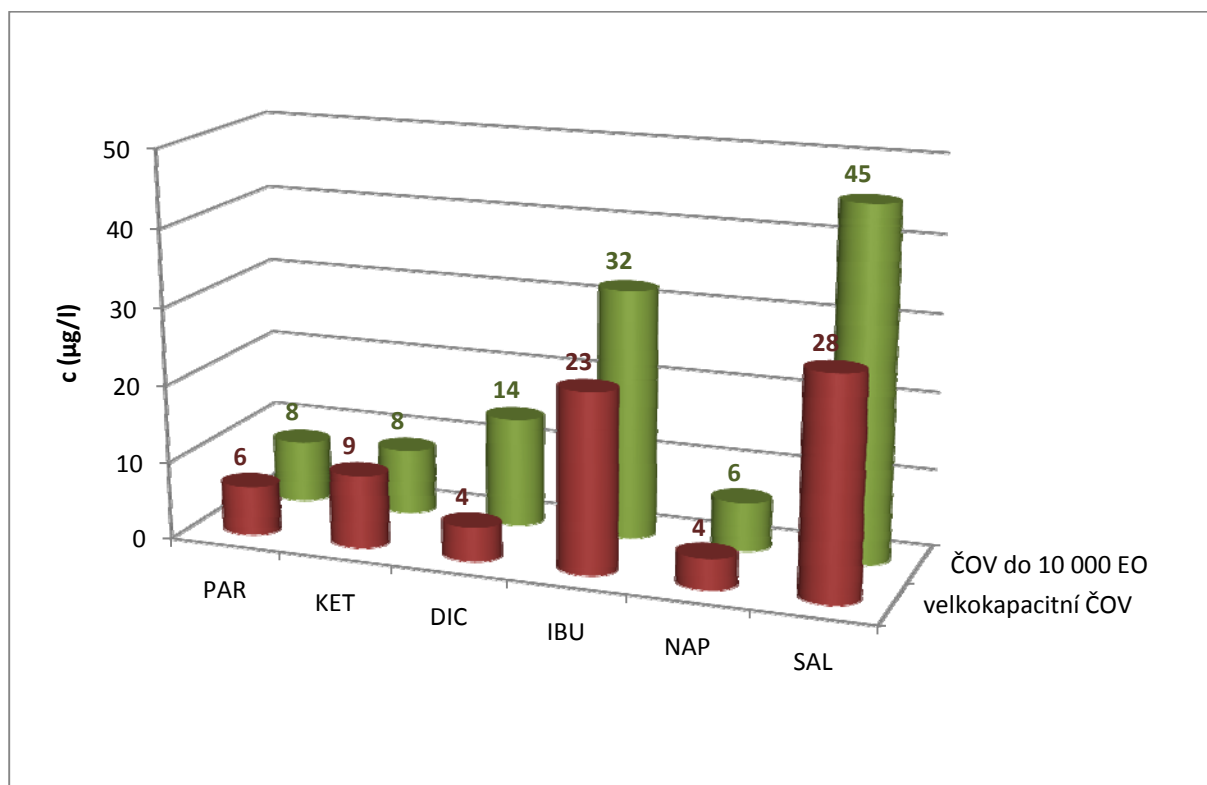
Všechny tyto faktory se ve výsledku, ve větší či menší míře, promítanou na účinnost odbourání kontaminantů z odpadní vody. Na Obr. 77 je zobrazena rozdílná účinnost dvou vybraných ČOV při odbourávání sledovaných analytů. Z grafu je patrné, že analyty paracetamol, ibuprofen a kyselina salicylová jsou snadno odbouratelné na obou typech ČOV. U ketoprofenu a diklofenaku je vidět mírný pokles účinnosti na velkokapacitní ČOV, ovšem na menší čistírně již dochází ke značnému snížení. Poslední sledovaný analyt, naproxen, je ze všech nejhůře odbouratelný, a to na obou vybraných čistírnách.



Obr. 77: Srovnání účinnosti dvou různých ČOV

Při sledování koncentrací jednotlivých analgetik v přítokové odpadní vodě bylo zřejmé podobné procentuální zastoupení. Nejčastěji detekovanými kontaminanty byly v obou případech

kyselina salicylová a ibuprofen (Obr. 78). Ostatní analyty byly obsaženy v nižších koncentracích.



Obr. 78: Srovnání koncentrací sledovaných analytů na přítoku dvou vybraných ČOV

Z naměřených hodnot vyplývá, že z vybraných analytů, jsou ty pro léčebné účely nejčastěji používané, zároveň i nejlépe odbouratelné. Další analgetika, zejména naproxen, patří sice mezi méně využívaná léčiva (Obr. 32, Obr. 78), jejichž koncentrace v odpadní vodě se většinou pohybuje v jednotkách $\mu\text{g.l}^{-1}$. Zato jsou však hůře odbouratelná na ČOV, a proto lze předpokládat jejich zvýšený průnik do povrchových vod.

5.2 Porovnání získaných dat s publikovanými údaji

V rámci výzkumného záměru, kde je část řešené problematiky spojená se stanovením léčiv v životním prostředí, se touto oblastí výzkumu zabývá na Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí Fakulty chemické VUT v Brně řešitelský kolektiv pod vedením prof. RNDr. Milady Vávrové, CSc. Problémem výskytu analgetik v povrchových a odpadních vodách se ve své dizertační práci zabývala rovněž Ing. Lucie Vydrová, Ph.D. Zvolenou metodou byla v tomto případě vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem. Monitorovány byly povrchové a odpadní vody v České republice, ve Skotsku a na Taiwanu. Naměřené průměrné koncentrace vybraných analgetik v odpadní vodě v ČR uvádí následující tabulka.

Tab. 27: Koncentrace vybraných analgetik v odpadní vodě (HPLC/MS) (105)

analyt	PAR	KET	DIC	IBU	NAP	SAL
c [ng.l⁻¹]	355	68	2394	5191	774	16

Dalším členem řešitelského kolektivu, který se zabývá stanovením analgetik ve vodách, je Ing. Petr Lacina, který jako analytickou koncovku využívá dvoudimenzionální plynovou chromatografii (GC×GC) s hmotnostním detektorem doby průletu (TOF). Pomocí této separační metody byly naměřeny následující koncentrace vybraných analgetik na velkokapacitní ČOV Brno-Modřice během listopadu 2010, jež uvádí následující tabulka.

Tab. 28: Koncentrace vybraných analgetik v odpadní vodě (GC×GC/TOF) (107)

	c [μg.l⁻¹]
PAR	1,1–20,1
KET	0,4–3,8
DIC	3,7–17,1
IBU	13,2–45,9
NAP	0,5–3,4
SAL	20,2–51,9

Při porovnání dat naměřených pomocí GC×GC/TOF a CZE lze vidět velmi podobné hodnoty koncentrací v přítokové odpadní vodě z ČOV Brno-Modřice, a to i přes to, že byly vzorky odebírány v různých časových obdobích.

Problematikou stanovení léčiv ve vodách se zabývají odborníci z oblasti environmentální analýzy na celém světě, a proto již byla publikována celá řada odborných článků na toto téma. Pro stanovení této skupiny kontaminantů jsou neustále vyvíjeny jednak nové separační, ale i předseparační metody pro úpravu, přečištění a zakoncentrování těchto analytů v reálných vzorcích odpadních i povrchových vod.

Celosvětově patří analgetika bezpochyby k nejčastěji užívaným léčivům, avšak vzhledem k různě rozvinutému farmaceutickému průmyslu, distribučním firmám a dodavatelům, jsou v jednotlivých zemích konkrétní léčiva různě procentuálně zastoupená. Koncentrace vybraných léčiv uvádí následující tabulka.

Tab. 29: Koncentrace analgetik v odpadní vodě pro různé země (v ng.l⁻¹)

	PAR	KET	DIC	IBU	NAP	SAL
Francie (108)	–	1 081	486	219	289	52
Rakousko (109)	–	–	4 114	2 679	–	–
Velká Británie (110)	–	–	–	405	–	–
Švédsko (111)	–	–	111	751	5 153	–
Španělsko (112)	10 194	451	250	516	99	–

6 ZÁVĚR

Předložená dizertační práce byla zaměřena na sledování vybraných léčiv ve vodách a jejich průnik do životního prostředí. Toto téma je celosvětově velmi aktuální, a proto bylo cílem práce vypracovat novou a rychlejší metodu pro stanovení těchto specifických kontaminantů. Konkrétními léčivy byla zvolena skupina analgetik, nazývaná nesteroidní protizánětlivé látky, a to z důvodu jejich časté a nadměrné konzumace.

Analytickou metodou pro stanovení vybraných analgetik byla zvolena kapilární zónová elektroforéza s detekcí diodovým polem. Pro extrakci a zakoncentrování analytů byla využita extrakce pevnou fází s použitím speciálního sorbentu, tvořeného kopolymerem s hydrofilní a lipofilní částí.

V první části experimentu byla nejprve vybrána vhodná analgetika pro analýzu, podle závěrečných zpráv Státního ústavu pro kontrolu léčiv za poslední tři roky. Podle těchto údajů a také již na ústavu realizovaných dalších měření byla vybrána tato léčiva: diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, kyselina salicylová, naproxen a paracetamol.

V dalším kroku byly optimalizovány podmínky pro separaci vybraných analytů na kapilární zónové elektroforéze, za použití nepokryté křemenné kapiláry s vnitřním průměrem 75 μm . Po optimalizaci metody byly pro všechny analyty změřeny kalibrační křivky a vypočítány meze detekce a stanovitelnosti.

Aby bylo dosaženo co nejvyšší účinnosti při zakoncentrování analytů během extrakce, byla také optimalizována metoda SPE. Během experimentu byla věnována pozornost vlivům pH, objemům vzorku a elučního činidla a také porovnání účinnosti na třech koncentračních hladinách.

Zkoumanou matricí byla odpadní voda odebíraná ze dvou čistíren odpadních vod, a to nejen z důvodu porovnání koncentrací zkoumaných analytů, ale také z důvodu porovnání účinností dvou rozdílných technologií čištění. Vzorky byly odebírány během měsíců června až srpna roku 2011 a byly vyhodnoceny koncentrace sledovaných analytů na přítoku a odtoku ČOV.

Nejčastěji vyskytujícím se analytem v odpadní vodě na obou čistírnách byly kyselina salicylová a ibuprofen. Ostatní analyty byly také obsaženy, avšak v nižších koncentracích. To plně potvrzuje fakt, že tato léčiva patří k nejčastěji užívaným.

Při sledování vlivu technologií používaných v čistírnách na odbourání sledovaných kontaminantů byl pozorován rozdíl mezi oběma ČOV během odstranění ketoprofenu a diklofenaku. Zatímco u velkokapacitní čistírny se účinnost pohybovala nad 90 %, u ČOV do 10 000 EO tato klesla až k 70 %. Analyty paracetamol, ibuprofen a kyselina salicylová byly na obou čistírnách odstraněny z více jak 90 %, na rozdíl od naproxenu, kde se účinnost na obou čistírnách pohybovala kolem 70 %.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Léčivo. [Online] 2 13, 2008. [Cited: 2 21, 2008.] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Léčivo>.
2. **Hampl, F., Paleček, J.** *Farmakochemie*. Praha : VŠCHT v Praze, 2002. ISBN 80-7080-495-5.
3. Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů. § 1, odst. 1, písm. a).
4. **Lefnerová, D., Šimůnek, J.** *Antibiotika: Doplnkový text z mikrobiologie pro studium výživy člověka*. Masarykova univerzita. Brno : s.n., 2005.
5. Postup při výrobě chloralhydrátu. [Online] 2006. [Cited: 2 23, 2008.] http://www.eurochem.cz/polavolt/org/obory/farmacie/uvod/sedativa/vzorke/schema_c.gif.
6. **Friedl, Z.** *Vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou: Struktura molekul a jejich biologické vlastnosti*. VUT v Brně. Brno : s.n., 2006. Přednáška.
7. **Vodrážka, Z.** *Biochemie*. Praha : Academia, 1999. 80-200-0600-1.
8. **Voet, D., Voet, J. G.** *Biochemistry*. 3. vydání. s.l. : John Wiley and Co., 2004. Vol. 1.
9. Membránový transport: Příručka pro učitele. Buňka - interaktivní výuková aplikace. [Online] 2006. [Cited: 2 29, 2008.] www.sszdra-karvina.cz/bunka/bi/met/mtra.pdf.
10. **Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.** *Harperova Biochemie*. Jinočany : Nakladatelství H+H, 2002. 80-7319-013-3.
11. **Vodrážka, Z., Krechl, J.** *Bioorganická chemie*. Praha : SNTL, 2002.
12. **Kuchař, M., Rejholec, V.** *Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou*. Praha : Academia, 1987.
13. **Hynie, S.** *Farmakologie v kostce*. Praha : Triton, 2001. 80-7254-181-1.
14. **Cleuvers, M.** Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2004, Vol. 59, pp. 309-315.
15. **Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lansky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lutzhoft, H. C., Jorgensen, S. E.** Occurrence, Fate, and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment. *Chemosphere*. 1998, Vol. 36, p. 2.
16. **Boxall, A., Breton, R.** Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Regulatory Drivers and Research Needs. *QSAR and Combinational Science*. 2003, Vol. 22, p. 3.

17. **Kümmerer, K.** Drugs in the Environment: Emission of Drugs, Diagnostic Aids and Disinfectants into Wastewater by Hospitals in Relation to Other Sources. *Chemosphere*. 2001, Vol. 45, pp. 6-7.
18. **Steuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L. P., Holten Lutzhoft, H. C., Halling-Sorensen, B.** Environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals in Denmark After Normal Therapeutic Use. *Chemosphere*. 2000, Vol. 40, p. 7.
19. **Vermeulen, N. P. E.** Role of metabolism in chemical toxicity. In *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, C Ionnides. 1996.
20. **Cunningham, V.** Special Characteristics of Pharmaceuticals Related to Environmental Fate, In *Pharmaceuticals in the environment: Sources, Fate, Effects and Risks*. *Springer*. 2, 2004, Vol. 2.
21. **Sumpter, J. P.** Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. *Toxicology Letters*. 1998, Vols. 102-103.
22. **Heberer, T.** Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*. 2002, Vol. 131, pp. 5-17.
23. **Daughton, C. G., Ternes, T.** Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agent sof subtle chase? *Environmental Health Perspectives*. 6, 1999, Vol. 107, pp. 907-938.
24. **McEwen, S., Fedorka-Cray, P.** Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Disease*. 2002, Vol. 34, pp. 93-106.
25. **Koschorreck, J., Koch, C., Ronnefahrt, I.** Environmental risk assissment of veterinary medicinal products in the EU – a regulatory perspective. *Toxicology Letters*. 2002, Vol. 131, pp. 117-124.
26. **Teuber, M.** Spread of antibiotik resistance with food-borne pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1999, Vol. 56, pp. 755-763.
27. **Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U.** Detection of antibiotik-resistant bakteria and thein resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*. 2003, Vol. 43, pp. 325-335.
28. ČOV Modřice. [Online] 7 21, 2005. [Cited: 3 17, 2008.]
<http://www.bvk.cz/ipublisher/files/COV%20Modrice%20-%20technicky%20popis.pdf?show=dbfil&id=102>.
29. **Fent, B., Paxeus, N., Giudice, R. L., Pollio, A., Garric, J.** Ecotoxicological impal of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, Vol. 55, pp. 359-370.

30. **Bendz, D., Paxeus, N. A., Ginn, T. R., Loge, F. J.** Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study. Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*. 2005, Vol. 122, pp. 195-204.
31. **Fent, B., Weston, A., Caminada, D.** Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 2005, Vol. 76, pp. 122-159.
32. **Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S. A., Ternes, T. A.** Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*. 2005, Vol. 336, pp. 155-170.
33. **Stumpf, M., Ternes, T. A., Wieken, R. D., Rodrigues, S. V., Baunamm, W.** Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of the Total Environment*. 1999, Vol. 225, pp. 135-141.
34. **Redderesen, K., Heberer, T., Dunnbier, U.** Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground and drinking water. *Chemosphere*. 2002, Vol. 49, pp. 539-544.
35. **Metzger, J. W.** Drugs in municipal landfills and landfill leachates In Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. [ed.] K. Kümmerer. *Springer*. 2004.
36. **Diaz-Cruz, M., de Alda, M., Barcelo, D.** Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003, Vol. 22, pp. 340-351.
37. **Belfroid, A. C., Sijm, D. T. M., van Gestel, C. A. M.** Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environmental Review*. 1996, Vol. 4, pp. 276-299.
38. **Kristensen, P., Tyle, H.** The assessment of bioaccumulation. [book auth.] Loskill R. Nagel R. *Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the Assessment*. Weinheim : VCH Publishers, 1991.
39. **Dorado, J., Almendros, G.** Assessment of molecular descriptors involved in the sorptive interactions of phenoxy-carboxylic acid. *Toxicology and Environmental Chemistry*. 2001, Vol. 84, pp. 21-32.
40. **Beausse, J.** Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004, Vol. 23, pp. 753-761.
41. **Oppenhuizen, A.** Bioconcentration and biomagnification: is a direction necessary? [book auth.] Loskill R. Nagel R. *Bioaccumulation in aquatic systems*. Weinheim : VCH Publishers, 1991.

42. **Gobas, F. A. P. C., Zhang, X., Wells, R.** Gastrointestinal magnification: the mechanism of biomagnification and food chain accumulation of organic chemicals. *Environmental Science and Technology*. 1993, Vol. 27, pp. 2855-2863.
43. Biomagnification. [Online] 12 16, 2006. [Cited: 3 19, 2008.] <http://toxics.usgs.gov/definitions/biomagnification.html>.
44. **Clark, T., Clark, K., Paterson, S., Mackay, C., Nostrom, R. J.** Wildlife monitoring, modelling and fugacity. *Environmental Science and Technology*. 1988, Vol. 22, pp. 120-127.
45. **Farrington, J. W.** Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Environmental Health Perspectives*. 1991, Vol. 90, pp. 75-84.
46. **Janků, J., Čermák, J.** *Vzorkování odpadů*. Praha : VŠCHT v Praze, 2006.
47. **Crepin, J., Johnson, R. L.** *Soil sampling and methods of analysis*. s.l. : Carter R. M., editor, Lewis publishers, 1993. ISBN 0-87371-861-5.
48. **Popl, M.** *Analytická chemie životního prostředí*. Praha : VŠCHT v Praze, 1999. 4. přeprac. vyd.. ISBN 8070803363.
49. **Ocelka, T., Kočí, V., Kochánková, L.** Semipermeabilní membrány - popis perspektivy metodiky monitorování persistentních organických polutantů v povrchových vodách a vodárenských zdrojích. *Vodní hospodářství*. 2001, Vol. 12.
50. Opting servis. [Online] 2009. [Cited: 6 4, 2009.] http://www.optingservis.cz/labor_tech/images/860_01.jpg.
51. **Gordon, C.S., Lowe, J.T.** *US Patent*. 1,644,014 10 4, 1927.
52. **Palmer, E. D., Gunnison, A. F.** Personal monitoring device for gaseous contaminants. *Am Ind Hyg Assoc J*. 34, 1973, Vol. 2, pp. 78-81.
53. **Reiszner, K. D., West, P. W.** Collection and determination of sulfur dioxide incorporating permeation and West-Gaeke procedure. *Environ. Sci. Technol.* 7, 1973, pp. 526-532.
54. **Čáslavský, J.** *Pasivní vzorkování organických polutantů v životním prostředí*. VUT v Brně. Brno : s.n., 2005. Přednáška.
55. **Gorecki, T., Namiesnik, J.** Passive sampling. *Trends in Analytical Chemistry*. 21, 2002, Vol. 4.
56. **Kotlaříková, P.** *Vzorkování organických polutantů v životním prostředí*. VUT v Brně. 2004. Dizertační práce.

57. **Belardi, R. P., Pawliszyn, J. B.** The application of chemically modified fused-silica fibres in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Pollut. Res. J. Canada*. 1989, Vol. 23, p. 179.
58. **Arthur, C. L., Potter, D. W., Buchholz, K. D., Motlang, S., Pawliszyn, J.** Environmental analysis of organic compounds in water using solid phase microextraction. *Environ. Sci. Technol.* 1992, Vol. 26, pp. 979-983.
59. **Klouda, P.** *Moderní analytické metody*. Ostrava : Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 2. upr. vyd.. ISBN 80-86369-07-0.
60. **Procházková, D.** Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy*. 2002, Vol. 96, pp. 827-852.
61. **Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C.** Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *J. Microcolumn Sep.* 11, 1999, 10, pp. 737-747.
62. **Sandra, P., Baltussen, E., David, F., Hoffmann, A.** Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) applied to Environmental Aqueous samples. *Gerstel, AppNote*. 2000, 2.
63. **Molín, R., Příbyl, R.** Pasivní dozimetrie. *Chemické listy*. 1998, Vol. 92, pp. 784-788.
64. **Mulik, J. D., Lewis, R. G., McClenny, W. A.** Modification of a high efficiency passive sampler to determinate nitrogen dioxide or formaldehyde in air. *Anal. Chem.* 1989, Vol. 61, pp. 187-189.
65. **Kozdron-Zabiegala, B., Namiesnik, J., Przyjazny, A.** Use of passive dosimeters for evaluation of the quality of indoor and outdoor air. *Indoor Environment*. 1995, Vol. 4, pp. 189-203.
66. **Di Giano, F. A., Elliot, D., Leith, D.** Application of passive dosimetry for detection of trace organic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 22, 1988, pp. 1365-1367.
67. **Kot, A., Zabiegala, B., Namiesnik, J.** Passive sampling for long term monitoring of organic pollutants in water. *Trends in Analytical Chemistry*. 19, 2000, pp. 446-459.
68. **Grathwohl, P., Schiedek, T., Gottlieb, J.** *Field screening Europe*. Dordrecht : Kluwer, 1997. p. 33.
69. **Martin, H., Patterson, B. M., Davis, G. B.** Field trial of contaminant groundwater monitoring. Comparing time-integrating ceramic dosimeters and conventional water sampling. *Environ. Science and Technol.* 37, 2003, pp. 1360-1364.
70. **Byrne, B. A., Aylott, R. L.** *British Patent*. 1,566,253 1980.

71. **Sodergren, A.** Monitoring of persistent, lipophilic pollutants in water and sediment by solvent filled dialysis membranes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 19, 1990, pp. 143-149.
72. **Kisso, Y.** Factors affecting adsorption of organic solutes on cellulose acetate in an aqueous solution system. *Chromatographia*. 22, 1986, pp. 55-58.
73. **Peterson, S. M., Apte, S. C., Batley, G. E., Coade, G.** Passive sampler for chlorinated pesticides in estuarine waters. *Chem. Speciation. Bioavailabil.* 7, 1995, pp. 83-88.
74. **Litten, S., Mead, B., Hassett, J.** Application of passive samplers (PISCES) to locating a source of PCBs on the Black River, New York. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1993, pp. 639-647.
75. **Huckins, J. N., Tubergen, M. W., Lebo, J. A., Gale, R. W., Schwarz, T. R.** Polymeric Film Dialysis in Organic Solvent Media for Cleanup of Organic Contaminants. *Journal of Assoc. of Official Anal. Chemists*. 73, 1990, pp. 290-293.
76. **Bergqvist, P. A., Strandberg, B., Rappe, C.** Lipid removal using semipermeable membranes (SPMs) in PCDD and PCDF analysis of fat rich environmental samples. *Chemosphere*. 38, 1999, pp. 933-943.
77. **Meadows, J., Tillitt, D., Huckins, J., Schroeder, D.** Large-scale dialysis of sample lipids using a semipermeable membrane device. *Chemosphere*. 26, 1993, pp. 1993-2006.
78. **Ellis, G. S., Huckins, J. N., Rostad, C. E., Schmitt, C. J., Petty, J. D., MacCarthy, P.** Evaluation of lipid-containing semipermeable membrane devices for monitoring organochlorine contaminants in the upper Mississippi river. *Environ. Toxicol. and Chem.* 14, 1995, Vol. 11, pp. 1875-1884.
79. **Vrana, B., Popp, P., Paschke, A., Schuurmann, G.** Membrane enclosed sorptive coating an integrative passive sampler for monitoring organic contaminants in water. *Anal. Chem.* 73, 2001, pp. 5191-5200.
80. **Weinnrich, L., Vrana, B., Popp, P., Lorenz, W.** Development of an integrative passive sampler for the monitoring of organic water pollutants. *J. Environ. Monit.* 5, 2003, pp. 813-822.
81. **Namiesnik, J., Zabiegala, B., Kot-Wasik, A., Partyka, M., Wasik A.** Passive sampling and/or extraction techniques in environmental analysis a review. *Anal. Bional. Chem.* 381, 2005, pp. 279-301.
82. **Audunsson, G.** Determination of low parts per billion levels of amines in urine by liquid membrane sample cleanup directly coupled to a gas liquid chromatography. *Anal. Chem.* 60, 1988, pp. 1340-1347.
83. **Chimuka, L., Cukrowska, E., Jonsson, J. A.** Why liquid membrane extraction is an attractive alternative in sample preparation. *Pure Appl. Chem.* 76, 2004, pp. 707-722.

84. **Prokeš, R.** *Využití pasivních vzorkovačů pro měření kontaminace povrchových vod.* 2006. Diplomová práce.
85. **Kingston, J. K., Greenwood, R., Mills, G. A., Morrison, G. M., Persson, L. B.** Development of a novel passive sampling system for the time averaged measurement of a range of organic pollutants in aquatic environments. *J. Environ. Monitor.* 2, 2000, pp. 487-498.
86. **Huckins, J. N., Manuweera, G. K., Petty, J. D., Mackay, D., Lebo, J. A.** Lipid-containing semipermeable membrane devices for monitoring organic contaminants in water. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1993, pp. 2489-2496.
87. **Zabik, J. M., Aston, L. S., Seiber, J. N.** Rapid characterization of pesticide residues in contaminated soils by passive sampling devices. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1992, pp. 765-770.
88. **Johnson, K. A., Naddy, R. B., Weisskopf, C. P.** Passive sampling devices for rapid determination of soil contaminant distributions. *Toxicol. and Environ. Chemistry.* 51, 1995, pp. 31-44.
89. **Rose, G., Kibria, G.** Pesticide Monitoring in Goulburn-Murray Water's Irrigation Supply Channels Covering the Six Irrigation Areas. *2004-2005 Irrigation Season Study Report.* State of Victoria and Goulburn-Murray Rural Water Authority (G-MW) : Department of Primary Industries, 2005.
90. **Alvarez, D. A., Cranor, W. L., Huckins, J. N., Clark, R. C., Perkins, S.** Assessment of organic contaminants in integrative samplers from Chesapeake bay tributaries. *USGS/Columbia Environmental Research Center, Final Report.* Columbia, MO : s.n., 2004.
91. Metody získávání a izolace sloučenin 2. (Extrakce). [Online] 1999. [Cited: 4 16, 2008.] <http://chemlinkcz.cz/clanky/metody-ziskavani-a-izolace-sloucenin-2-extrakce>.
92. **Klejdus, B.** *Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu.* 2004. Habilitační práce.
93. Extrakce na tuhou fázi. [Online] 2003. [Cited: 4 16, 2008.] www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf.
94. **Coufal, P.** *Extrakce.* Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Praha : s.n., 2006. Přednáška.
95. **Čákr, M., Sádecká, J.** Elektromigrační metody. [book auth.] M. Čákr. *Elektroanalytické metody.* Český Těšín : Ing. Václav Helán, 2001.
96. **Vespalec, R.** Analytické separace kapilární zónovou elektroforézou ve volném roztoku. [book auth.] M. Čákr. *Elektroanalytické metody.* Český Těšín : Ing. Václav Helán, 2001.

97. Modely elektrické dvojvrstvy. *Vydavatelství VŠCHT Praha*. [Online] 7 28, 2005. [Cited: 11 24, 2009.] http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/modely_elektricke_dvojvrstvy.html.
98. **Hrazdil, R.** *Čištění odpadních vod na čistírně do 10 000 EO*. Mendelova univerzita v Brně. 2010. Bakalářská práce.
99. DrugBank. [Online] 6 13, 2005. [Cited: 2 2, 2011.] <http://www.drugbank.ca>.
100. **Aurora-Prado, M. S., et al.** Comparison Between Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography for the Determination of Diclofenac Sodium in a Pharmaceutical Tablet. *Journal of AOAC International*. 2002, Vol. 85, 2, pp. 333-341.
101. **Yen-Ling, C., Shou-Mei, W.** Capillary zone electrophoresis for simultaneous determination of seven nonsteroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceuticals. *Anal Bioanal Chem*. 2005, Vol. 381, pp. 907-912.
102. **Fillet, M., Bechet, I., Piette, V., Crommen, J.** Separation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis using nonaqueous electrolytes. *Electrophoresis*. 1999, Vol. 20, pp. 1907-1915.
103. **Cherkaoui, S., Veuthey, J.** Development and robustness testing of a nonaqueous capillary electrophoresis method for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Chromatography A*. 2000, Vol. 874, pp. 121-129.
104. **A. Silva, E. M., A. Melo, D. M., Moura, M. F. V., Farias, R. F.** An investigation about the solid state thermal degradation of acetylsalicylic acid: polymer formation. *Thermochimica Acta*. 2004, Vol. 414, 1, pp. 101-104.
105. **Vydrová, L.** *Využití separačních metod pro studium biologicky aktivních látek ve vodách*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. Dizertační práce.
106. Oasis HLB Sample Extraction Products 4/98. *Waters*. [Online] 5 1998. [Cited: 3 15, 2011.] http://www.younglin.com/brochure_pdf/waters/HLB.pdf.
107. **Lacina, P., Mravcová, L., Vávrová, M.** *The use of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometric detection for the assessment of drug residue contamination of wastewater and surface water*. Brno : BUT, Faculty of Chemistry, 2011.
108. **Togola, A., Budzinski, H.** Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 2008, Vol. 1177, pp. 150-158.
109. **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.

110. **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.

111. **Zorita, S., Boyd, B., Stig, J., Yilmaz, E., Svensson, C., Mathiasson, L., Bergstrom, S.** Selective determination of acidic pharmaceuticals in wastewater using molecularly imprinted solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta*. 2008, Vol. 626, pp. 147-154.

112. **Gros, M., Petrovic, M., Barcelo, 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.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

6MNAA	Kyselina 6-methoxy-2-naftyloctová
ASA	Kyselina acetylsalicylová
ATP	Adenosintrifosfát
BCF	Biokoncentrační faktor
BGE	Background electrolyte (základní elektrolyt)
BW	Bandwidth (šířka výstupní štěrby monochromátoru)
CAR	Carboxen
CAS	Chemical Abstracts Service (společnost s databázemi chemických látek)
CEL	Celecoxib
COX	Cyklooxygenáza
CW	Carbowax
CZE	Capillary zone electrophoresis (kapilární zónová elektroforéza)
ČOV	Čistírna odpadních vod
ČR	Česká Republika
DIC	Diklofenak
D_{ow}	Rozdělovací koeficient voda/oktanol
DVB	Divinylbenzen
EO	Ekvivalent obyvatel
EOF	Elektroosmotický tok
FLD	Fluorescence detector (fluorescenční detektor)
FLU	Flurbiprofen
GC	Gas chromatography (plynová chromatografie)
GIT	Gastrointestinal tract (trávicí ústrojí)
HLB	Hydrophilic-lipophilic-balanced reversed phase sorbent (sorbent obsahující hydrofilní a lipofilní reverzní fáze)

HPLC	High performance liquid chromatography (vysoce účinná kapalinová chromatografie)
IBU	Ibuprofen
ID	Inner diameter (vnitřní průměr)
IND	Indometacin
INN	International Non-Proprietary Name (generické názvy léčiv)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii)
K_d	Sorpční koeficient
K_D	Distribuční konstanta
K_{OW}	Parciální rozdělovací koeficient voda/oktanol
KET	Ketoprofen
LDPE	Low density polyethylen (nízkotlaký polyethylen)
LLE	Liquid-liquid extraction (extrakce kapalina-kapalina)
LOD	Limit of detection (limit detekce)
LOQ	Limit of quantification (limit stanovitelnosti)
$\lambda_{\max}$	Vlnová délka, při níž analyt dosahuje absorpčního maxima
MEL	Meloxicam
MESCO	Membrane Enclosed Sorptive Coating
Milli-Q	Ultra čistá voda
MS	Mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
μ_{eff}	efektivní mobilita
NAP	Naproxen
NIM	Nimesulid
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs (nesteroidní protizánětlivé látky)
PAH	Polyaromatic hydrocarbons (polyaromatické uhlovodíky)

PAR	Paracetamol
PCB	Polychlorované bifenyly
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
PIR	Piroxikam
PISCES	Passive in situ Concentration/Extraction Sampler
pK_a	Disociační konstanta
POC	Polar Organic Chemical (polární organické látky)
POCIS	Polar Organic Chemical Integrative Sampler
PTFE	Polytetrafluorethylen (teflon)
QSAR	Quantitative structure-activity relationship (kvantitativní vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou)
RSD	Relative standard deviation (relativní směrodatná odchylka)
SAL	Kyselina salicylová
SAX	Strong anion exchanger (silný aniontový iontoměnič)
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SCX	Strong cation exchanger (silný kationtový iontoměnič)
SLM	Supported Liquid Membrane Device
SPE	Solid phase extraction (extrakce pevnou fází)
SPM	Semipermeable Membrane (polopropustná membrána)
SPMD	Semipermeable Membrane Device
SPMD-S	Semipermeable Membrane Device – Solid
SPME	Solid phase microextraction (mikroextrakce pevnou fází)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TOF	Time of flight (hmotnostní analyzátor doby průletu)
TPR	Templated resin (podkladová pryskyřice)

UV	Ultrafialová oblast spektra
VIS	Viditelná oblast spektra
WAX	Weak anion exchanger (slabý aniontový iontoměnič)
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)

9 SEZNAM PŘÍLOH

10.1 Příloha 1: Přístroj pro CZE

10.2 Příloha 2: Zařízení pro SPE

10.3 Příloha 3: Schéma kanalizační sítě vedoucí na ČOV Brno-Modřice

10.4 Příloha 4: Příklad elektroforegramu odpadní vody na přítoku ČOV

10.5 Příloha 5: Příklad elektroforegramu odpadní vody na odtoku z ČOV

10.6 Příloha 6: Životopis

10.7 Příloha 7: Vědecké aktivity

10.8 Příloha 8: Publikační činnost

10 PŘÍLOHY

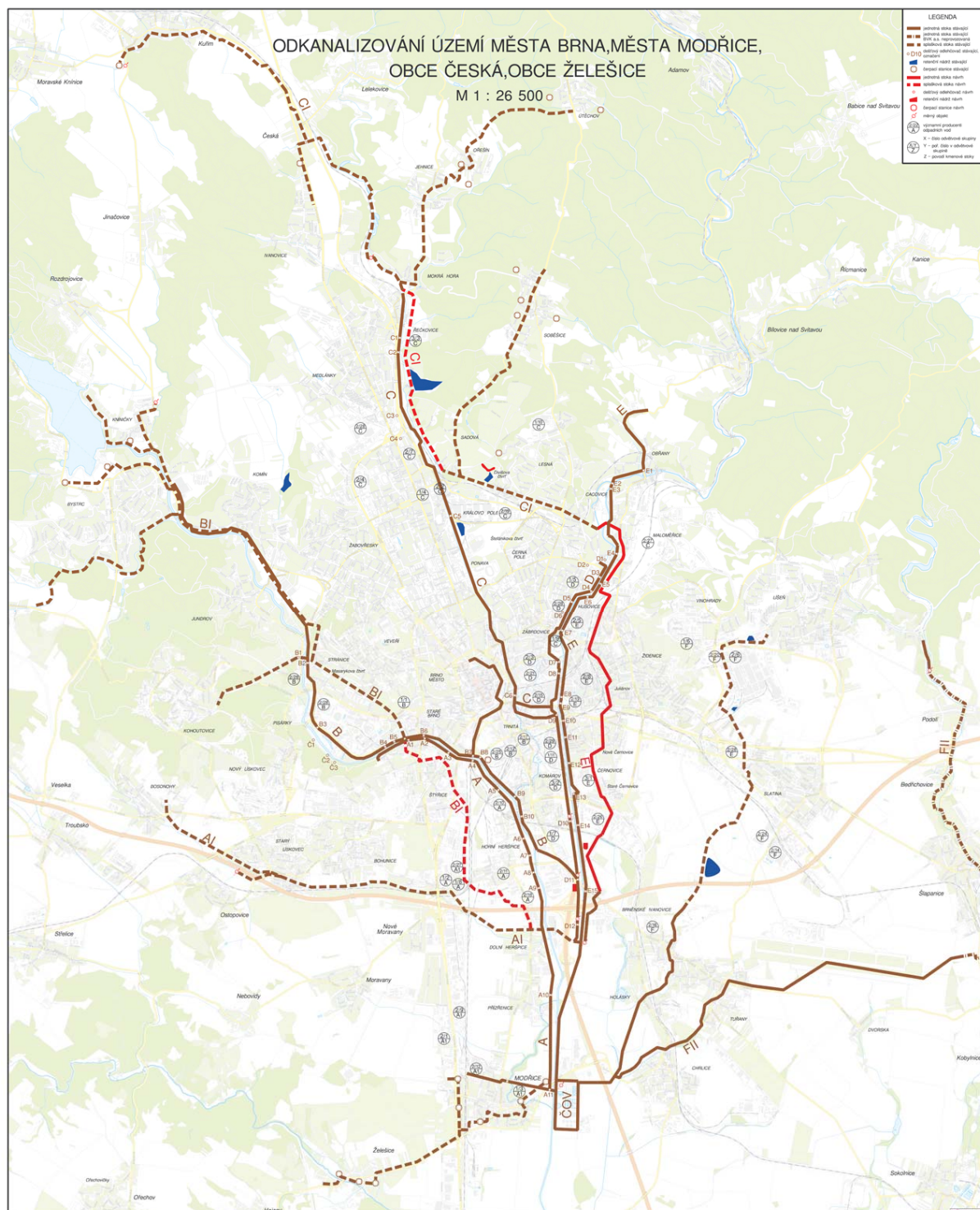
10.1 Příloha 1: Přístroj pro CZE



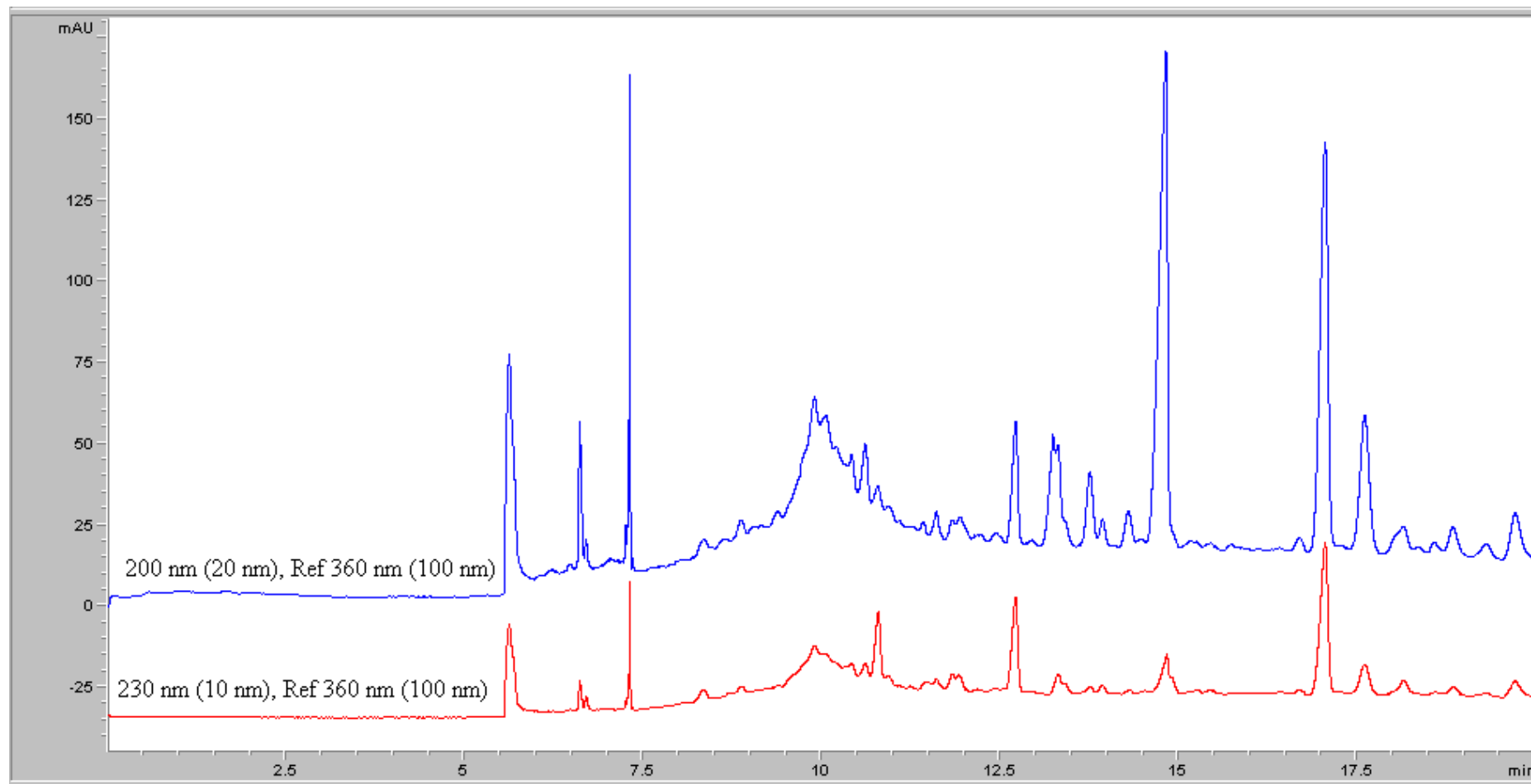
10.2 Příloha 2: Zařízení pro SPE



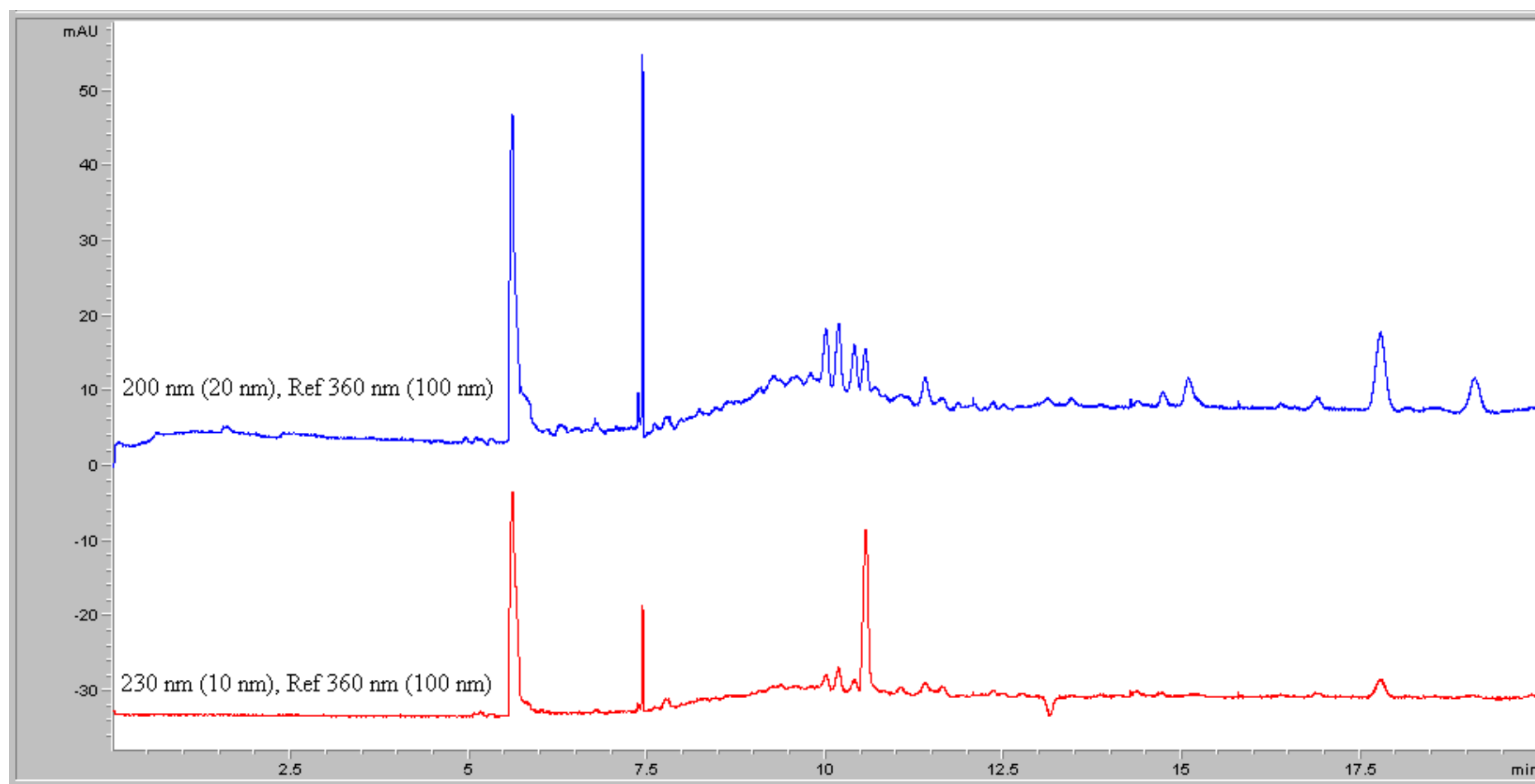
10.3 Příloha 3: Schéma kanalizační sítě vedoucí na ČOV Brno-Modřice



10.4 Příloha 4: Příklad elektroforegramu odpadní vody na přítoku ČOV



10.5 Příloha 5: Příklad elektroforegramu odpadní vody na odtoku z ČOV



10.6 Příloha 6: Životopis

OSOBNÍ INFORMACE

Jméno a příjmení	Ing. Lukáš Čapka
Adresa	Malinovského 296, 667 01 Židlochovice
Datum narození	18. 8. 1984
E-mail	tched@email.cz
Telefon	723 344 798

VZDĚLÁNÍ

2008–2011	VUT v Brně, Fakulta chemická, obor Chemie životního prostředí, doktorské studium Státní doktorská zkouška Téma dizertační práce: Využití kapilární zónové elektroforézy pro stanovení vybraných analgetik ve vodách
2003–2008	VUT v Brně, Fakulta chemická, obor Chemie a technologie ochrany životního prostředí, magisterské studium Téma diplomové práce: Využití spektrofotometrie pro stanovení reziduí léčiv ve vodách
1995–2003	Gymnázium T.G.M., Hustopeče
1990–1995	Základní škola, Židlochovice

JAZYKOVÉ ZNALOSTI

Anglický jazyk	Středně pokročilý
Německý jazyk	Středně pokročilý

DALŠÍ DOVEDNOSTI

Pokročilá znalost kancelářského balíku Microsoft Office, psaní všemi deseti, řidičský průkaz sk. B.

10.7 Příloha 7: Vědecké aktivity

2009, Praha	Účast na konferenci pořádané VŠCHT v Praze ve spolupráci se Sig-mou Aldrich: Nové poznatky v chromatografii
2010, Brno	Účast na semináři SPE, Chromservis
2011, Brno	Hlavní řešitel projektu FRVŠ: Stanovení léčiv znečišťujících životní prostředí a jejich ekotoxikologické hodnocení
2011, Brno	Účast na konferenci: 3. workshop EnviroPoint, Ovzduší 2011
2011, Brno	Aktivní účast na mezinárodní konferenci: 5th Meeting on Chemistry and Life, konané ve dnech 14.–16. září 2011 na FCH VUT v Brně
2011, Ioannina, GR	Aktivní účast na mezinárodní konferenci: MESAEP, 16th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region, konané ve dnech 24.–27. září v Ioannině – Greece

10.8 Příloha 8: Publikační činnost

Čapka, L., Lacina, P., Vávrová, M. Optimalizace extrakce pevnou fází vybraných nesteroidních protizánětlivých látek s využitím kapilární zónové elektroforézy. *Chemické listy*. Přijato k publikování.

Čapka, L., Zlámalová Gargošová, H., Urbánková, L., Vávrová, M. Využití UV/VIS spektrofotometrie pro stanovení diklofenaku. *Chemické listy*. V recenzním řízení.

Lacina, P., Čapka, L., Vydrová, L., Vávrová, M. Aplikace CZE, HPLC a GC při analýze vybraných léčiv z vodného prostředí a jejich porovnání. *Chemické listy*. V recenzním řízení.

Čapka, L., Lacina, P., Vávrová, M. Development and optimisation of SPE/CZE method for the analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs from water. *Chemické listy*. 2011, Vol. 105, pp. 960.

Čapka, L., Lacina, P., Vávrova, M. Optimisation of solid phase extraction of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs by capillary zone electrophoresis. *16th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region*. Ioannina. 2011.