MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

RECETOX

VÝZKUMNÉ CENTRUM PRO CHEMII ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
A EKOTOXIKOLOGII

METODY ANALÝZY LÉČIV V ENVIRONMENTÁLNÍCH MATRICÍCH

Julie Svobodová

Bakalářská práce

Vedoucí: Doc. RNDr. Zdeněk Šimek, CSc.
Konzultant: Ing. Martina Hvězdová

Brno, Česká republika, rok 2008

Prohlášení

Prohlašuji, že zadanou bakalářskou práci jsem vypracovala sama s použitím uvedené literatury.

V Brně dne 23. 5. 2008

Julie Svobodová

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu doc. RNDr. Zdeňku Šimkovi, CSc. za jeho podnětné vedení, cenné rady a odbornou pomoc.

Anotace:

Bakalářská práce obsahuje základní informace týkající se osudu, identifikace a kvantifikace léčiv v přírodních matricích. Sledována jsou léčiva vyskytující se ve vodách, sedimentech a půdách, u kterých je pravděpodobná větší kontaminace těmito látkami. Středem zájmu jsou antibakteriální léčiva, léčiva steroidní povahy, beta-blokátory a lipidové regulátory. Specificky se z půdy nebo vody izolují a extrahují metodami PLE (pressurized liquid extraction), LLE (liquid-liquid extraction) nebo SPE (solid phase extraction). K vlastní instrumentální analýze se používají chromatografické metody, především kapalinová nebo i plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. V bakalářské práci jsou uvedeny optimalizované parametry vybraných publikovaných metod.

Abstract:

The bachelor thesis includes the main information about fate, identification and quantification of drugs in environmental matrixes. Drugs are monitored in waste waters, sediments and soils, because of probably higher contamination. Antibiotics, steroids, beta-blockers and lipid-regulating agents are the centre of attention of environmental studies. Extraction methods preferably PLE (pressurized liquid extraction), LLE (liquid-liquid extraction) or SPE (solid phase extraction), are the most applied method for drug extraction and isolation from environmental matrixes. Chromatographic methods, especially liquid chromatography are used for separation of complex mixtures Liquid and/or gas chromatography combined with tandem mass spectrometry is preferred. Optimized parameters of selected published methods are presented in bachelor thesis.

OBSAH

1 Úvod **7**

2 Léčivé látky **8**

2.1 Složení a klasifikace léčiv 8

2.2 Charakteristika léčiv 9

2.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti 9

2.2.2 Degradace léčiv v prostředí 10

2.3 Osud léčiv 11

2.3.1 Výskyt a osud léčiv ve vodním prostředí 13

2.3.2 Výskyt a osud léčiv v půdě a sedimentech 14

3 Analýza léčiv **15**

3.1 Odběr a zpracování vzorků – pevné, kapalné 15

3.2 Extrakce analytu – pevné, kapalné 16

3.3 Přečištění extraktu 16

3.4 Zkoncentrování extraktu 17

3.5 Derivatizace vzorku 17

3.6 Stanovení léčiv v extraktech 17

3.6.1 Micelární kapalinová chromatografie 20

4 Antibiotika **22**

4.1 Charakteristika 22

4.1.1 Vlastnosti vybraných antibiotik 23

4.2 Antibiotika a životní prostředí 25

4.2.1 Cesta do prostředí 25

4.2.2 Antibiotika ve výtocích z ČOV a povrchové vody 25

4.2.3 Antibiotika v podzemních vodách 26

4.2.4 Toxikologické efekty na přírodu 26

4.3 Analýza tetracyklinů, makrolidů a sulfonamidů (Jacobsen, Sørensen, Ingerslev, Hansen) 26

4.3.1 Odběr a zpracování vzorku 27

4.3.2 Extrakce analytu 27

4.3.3 Přečištění extraktu 27

4.3.4 Stanovení léčiv v extraktech 27

5 Léčiva steroidní povahy **30**

5.1 Charakteristika 30

5.2 Steroidní látky a životní prostředí 31
5.2.1 Vstup do prostředí 31
5.2.2 Koncentrační hladiny v prostředí 31
5.2.3 Studium degradace a sorpce 32
5.3 Metody analýzy estrogenů a progestogenů v sedimentech a odpadních vodách 33
5.3.1 Odběr a zpracování vzorku 33
5.3.2 Extrakce analytu 33
EtOAc – ethylacetát, MeOH – methanol, Ac – acetát, DCM - dichlormethan 34
5.3.3 Přečištění extraktu 34
5.3.4 Stanovení léčiv v extraktech 34
6 Lipidové regulátory a beta-blokátory 38
6.1 Charakteristika 38
6.2 Analýza lipidových regulátorů a beta-blokátorů – LC-ESI-MS/MS 39
6.2.1 Odběr a zpracování kapalných vzorků 39
6.2.2 Analytická instrumentace 39
7 Závěr 42
8 Přílohy 43
9 Seznam literatury 55

1 Úvod

Studium výskytu léčiv a analýza jejich obsahu ve složkách životního prostředí nabývá v poslední době na významu. Produkce léčivých látek ve světě neustále roste a jejich degradační zbytky nacházíme v odpadních vodách, povrchové a podzemní vodě, půdě a sedimentech. V jaké koncentraci se léčiva v prostředí nacházejí a jaký mohou mít nepříznivý vliv na ekosystém? Od roku 1990 se začalo vyvíjet mnoho nových analytických metod k identifikaci a kvantifikaci léčiv v přírodních matricích. Většinou se jedná o koncentrace v jednotkách ng/l až μg/l. Ekotoxikologické efekty jednotlivých farmaceutik bývají specifické. Málo publikací pojednává přímo o tomto vlivu, ale většinou se jedná o narušování endokrinního systému a bioaktivity. Studium fyzikálně-chemických vlastností a degradačních procesů je klíčové pro další analýzu a předpověď chování léčiva v prostředí.

Cílem bakalářské práce je nasínit základní problematiku analýzy léčiv v životním prostředí. Jsou zde uvedeny skupiny nejčastěji sledovaných léčiv, do které zařazujeme sloučeniny s vlastností antibiotik, steroidní látky, lipidové regulátory nebo beta-blokátory. Zmíněný je jejich osud v životním prostředí, struktura, základní fyzikálně-chemické vlastnosti a možné ekotoxikologické vlivy. Jsou zde uvedeny již vyvinuté analytické metody a postupy jejich identifikace a kvantifikace v přírodních matricích. Nejčastěji se setkáváme s metodami chromatografickými - kapalinovou a plynovou chromatografií, které využívají různé typy detekce. Důležitým krokem je účinná extrakce, protože právě nízké hladiny koncentrací jsou nejčastější překážkou ve správně provedené analýze. Součástí bývá i specifické přečištění a zkoncentrování látky. Uvedeny jsou některé konkrétní příklady analytických postupů u vybraných farmaceutik.

2 Léčivé látky

Léčivými látkami se rozumějí jakékoli látky určené k tomu, aby byly součástí přípravku, který vyvolává léčivý účinek. Tento účinek je zpravidla farmakologický, imunologický nebo spočívá v ovlivnění metabolismu. [1]

2.1 Složení a klasifikace léčiv

Většina dnes používaných léčiv je syntetického původu. Jsou vyráběna ve velkém množství a jsou používána především ve farmaceutickém průmyslu. Tyto biologicky aktivní látky jsou formovány na vhodné dávky pomocí tablet, kapslí, suspenzorů, mastí a injekcí. Tato forma léků jim zajišťuje stabilitu, netoxičnost a přijatelnou formu, zajišťující biologickou dostupnost a terapeutickou aktivitu.

Léčivými látkami jsou nejčastěji čisté chemické substance. To mohou být i například předepsaným způsobem upravené suroviny přírodního původu (sušené části rostlin, silice, výtažky, atd.), které odborně označujeme jako drogy. Kromě chemicky čistých látek jsou v léčivech obsaženy také příměsi. Ty bývají klasifikovány jako organické, anorganické a jako zbytky rozpouštědel pro regulační účely. Organické příměsi mohou pocházet z výchozího materiálu (nejčastěji jsou to izomery), syntetické meziprodukty (z neúplných reakcí nebo z přebytečného množství reagentu) a rozkladné produkty, jejichž výskyt závisí na střídání reakčních podmínek (teploty, pH) nebo na podmínkách skladování (hydrolýza, oxidace,…) Anorganické příměsi mohou pocházet z výrobního procesu a jsou běžně známy a identifikovány jako reagenty, ligandy, anorganické soli, těžké kovy, katalyzátory nebo filtry. Pro pojmenovávání léčivých a pomocných látek se obvykle používá tzv. mezinárodních nechráněných názvů (INN, International Nonproprietary Name). V textu budou uvedeny názvy především české. [1]

Základní klasifikace léčiv:

- antimikrobiální látky
  - antibiotika: peniciliny, tetracykliny
  - sulfonamidy
  - chinoliny
- antiparazitní přípravky
  - kokcidiostatika (ochrana drůbeže proti kokcidióze)
  - antihelmintika (terapie helmintos - nákaze nižších parazitních červů)
  - benzimidazoly (endoparazitika)
  - probenzimidazoly (endoparazitika)

    - pyrethroidy (ektoparazitika)
- antiflogistika (protizánětlivé)
- anestetika (preparáty působící na nervovou soustavu - znecitlivující)
    - analgetika (snižují nebo potlačují vnímání bolesti)
    - antipyretika (snižují abnormálně zvýšenou tělesnou teplotu)
- transkvilizátory (preparáty působící na nervovou soustavu - uklidňující)
    - sedativa (vyvolávají snížení zvýšené dráždivosti centrální nervové soustavy)
    - analeptika (léčiva s centrálně stimulačním účinkem působící na oběhové a dýchací ústředí)
- diuretika (látky močopudné)
- hormony
- vitamíny

2.2 Charakteristika léčiv

K lepší předpovědi výskytu, chování léčiv v životním prostředí a optimalizaci analytických metod je nezbytné znát vlastnosti konkrétních farmaceutických sloučenin. Především jejich základní fyzikálně-chemické parametry a způsoby jejich degradace v životního prostředí. [2]

2.2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Většina farmaceutik je ve vodě rozpustná, biodegradabilní a má krátký poločas rozpadu. Většina substancí má kyselý charakter.

Estrogeny patří mezi hydrofobní organické sloučeniny s malou těkavostí. Jejich sorpce do půd a sedimentů je nejdůležitějším faktorem redukce koncentrace ve vodní fázi.

Důležitou roli hraje také distribuční koeficient, K_d, který je definován jako poměr koncentrace adsorbované půdou a koncentrace v roztoku po ustavení rovnováhy – tabulka č. 1. Bez ohledu na perzistenci nebo biodegradabilní faktor je u léčiv (estradiol, ciprofloxacin, erythromycin, ibuprofen, naproxen) předpokládaná adsorbce do kalů a odpadních vod. U tetracyklinů, fluorochinolonů, tylosinu a avermectinu převládá adsorpce do půd. Tyto fyzikálně-chemické parametry léčiv hrají důležitou roli v předpovědi jejich chování, akumulace do půd, či podzemních a pitných vod. [2]

Tabulka č. 1. Parametry sorpce, distribuční koeficient K_d u vybraných léčiv, l/kg [2]

Sloučenina	K_d půda-voda, A/B
estradiol	ne
tetracyklin	1140-1620
oxytetracyklin	420-1030
ibuprofen	ne
erythromycin	ne
tylosin	8,3-128
propanolol	9,6/37,6
carbamazepin	1,4-4,4
sulfathiazol	4,9
sulfamethazin	1-3,1
sulfamethoxazol	0,22/1,8
α-(*p*-chlorophenoxy)isomáselná kyselina	3,1
acetylsalicylová kys.	ne
amoxycilin	ne

A = nízký obsah organického uhlíku, vysoký obsah jílu/B = vysoký obsah organického uhlíku a nízký obsah jílu, ne = nedostupné

2.2.2 Degradace léčiv v prostředí

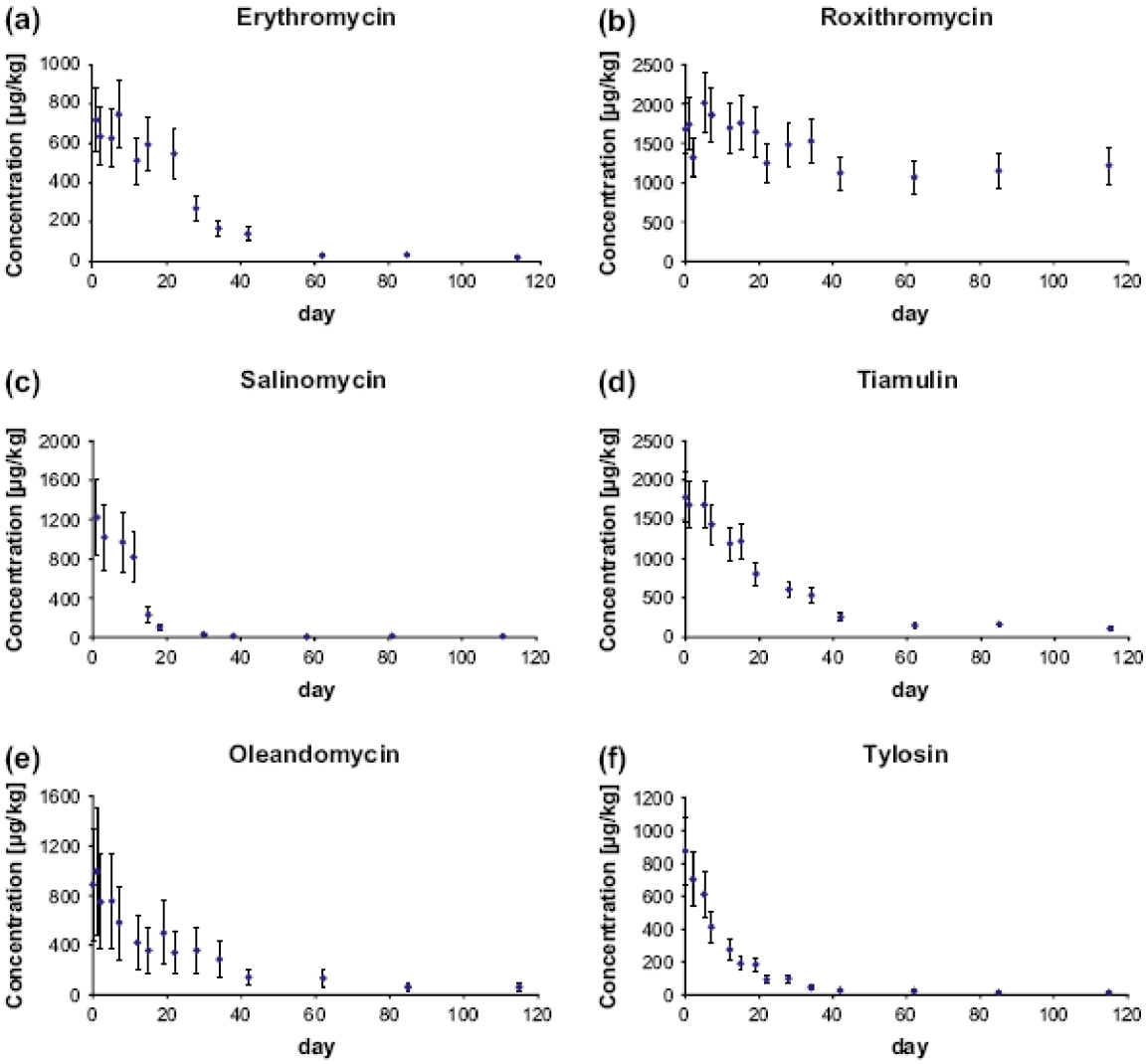
Relativně malá polarita, například estrogeních sloučenin s hodnotou K_{ow} 2,5 – 5, znamená pravděpodobnější výskyt a kumulaci v sedimentech. Rychlost degradace léčiv v sedimentech je velmi důležitou vlastností, která nám pomáhá předpokládat celkovou dobu akumulace léčiva v přírodní matrici. Mezi sloučeniny mající relativně krátký poločas rozpadu patří peniciliny a léčiva s beta-laktamovým prstencem.

U jiných léčiv (roxithromycin, sulfamethoxazol, ibuprofen, bezafibrat a EE2 (17-α-ethinylestradiol)) se předpokládá délka trvání degradace v odpadních vodách až 10 – 15 dnů. U estrogeních látek hrají důležitou roli v jejich odbourávání denitrifikační procesy. Jimi se uskutečňuje až 90 % celkové degradace. [2]

Celkově se může léčivo odstranit z vodního prostředí působením biodegradace nebo sorpcí do půd. Sorpce do půd se uskutečňuje sedimentací, tzv. sekundárním přichycením nebo pomocí fixní vrstvy.

Příklad sledování rychlosti rozpadu antibiotik během experimentální inkubace v půdě je uveden v grafech a) – f). Je zde vyjádřena závislost koncentrace [μg/kg] na čase [dny] u

vybraných šesti antibiotik. Průměrné hodnoty byly získány ze tří různých extrakcí. [3] Číselné hodnoty poločasů rozpadu u vybraných antibiotik v půdě jsou uvedeny v tabulce č. 2.



Tabulka č. 2. Poločasy rozpadu antibiotik v půdě [3[

antibiotikum	poločas rozpadu (dny)
erythromycin	20 ± 1,2
roxithromycin	>>120
salinomycin	5,0 ± 0,5
thiamulin	16 ± 0,8
oleandomycin	27± 2,5
tylosin	5,3 ± 0,4

2.3 Osud léčiv

Z celkové spotřeby léčiv připadá přibližně 14 % pro terapeutické účely v lidské a veterinární medicíně a 70 % je používáno u zvířat pro neterapeutické účely, především k podpoře růstu.

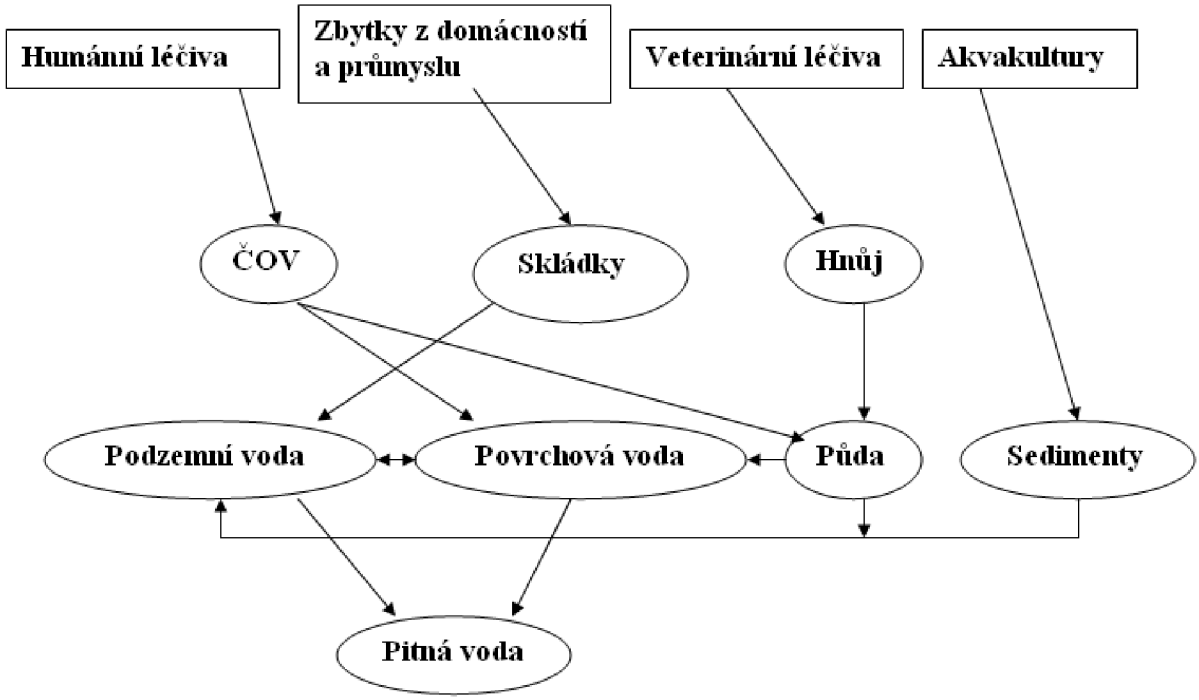
Léčiva jsou zpravidla po příjmu organismem absorbována a jsou subjektem metabolických reakcí. Rezidua léčiv se tak dostávají do svaloviny, tkání, mléka, proto se mohou nacházet také v potravinách a jejich zbytcích. Největší podíl účinných látek je však z těla organismu vyloučen. [4]

Metabolický proces vede ve většině případů k tvorbě ve vodě rozpustných produktů, které postrádají farmakologickou aktivitu. Přesto některé analýzy potvrdily negativní vlivy léčiv, která se dočasně v životním prostředí vyskytují nebo se v něm kumulují. Příčinou je, že u některých léčiv, studováno nejvíce u antibiotik, nedochází k úplnému zmetabolizování účinných látek z léčiva a součástí exkrementů je potom značné procento nepřeměněných látek, které se následně dostávají do prostředí - viz. tabulka č. 3. Některé účinné látky se aplikují přímo do životního prostředí, příkladem mohou být hojně aplikované sulfonamidy v zemědělství (Migliore et al., 1995; Boehm, 1996). [4]

Tabulka č. 3. Přibližné procentuální zastoupení některých nezmetabolizovaných léčiv v exkreci člověka [4]

substance - antibiotikum	přibližné procentuální zastoupení nepřeměněných léčiv v exkreci člověka
amoxicillin	80-90
ampicilin	30-60
penicilin V	40
erythromycin	60
roxithromycin	60
clarithromycin	60
chloramfenikol	10
chlortetracyklin	70
tetracyklin	80-90
oxytetracyklin	80

Obrázek č. 1. Schéma průniku léčiv do prostředí [5]:



2.3.1 Výskyt a osud léčiv ve vodním prostředí

Ze schématu na obrázku č. 1 vyplývá, že jedním z nejdůležitějších zdrojů farmaceutik, vyskytujících se v životním prostředí, jsou právě odpadní vody. Léčiva v nich obsažená jsou pouze částečně přeměněná na své produkty. Také výtoky z čističek odpadních vod obsahují významná množství farmaceutik a jejich metabolitů. Výtoky z ČOV (čistička odpadních vod) jsou vypouštěny do prostředí a stávají se součástí povrchových vod. Veškeré chemické látky v nich obsažené se mohou kumulovat v půdě nebo pronikají do podzemních vod. Velmi záleží na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiv, především na jejich mobilitě mezi jednotlivými druhy přírodních matric. Studium mobility léčiv z výtoků ČOV do podzemních vod jsou součástí sledování dalšího osudu léčiv v prostředí. Studie zaměřené na povahu léčiv v prostředí odhalily, že léčiva sulfamethazin, sulfamethoxazol, carbamazepin a cotinin mohou potencionálně dosáhnout podzemních vod. [6] Sulfonamidy byly dokonce detekovány v rozmezí 0,16-0,47 μg/l. Ostatní léčiva – analgetika, antiepileptika a jejich metabolity byly také nalezeny v podzemních vodách, avšak v koncentracích velmi nízkých – výrazně pod μg/l. [7]

Během poslední dekády se četné studie zabývají výskytem a osudem léčiv narušující endokrinní systém v prostředí. Naměřené hladiny jsou variabilní a závislé také na vzdálenosti od výpustí odpadních vod, na hustotě a vzdálenosti od zemědělských přívodů (živin, krmení)

a hydrologii. Humánní farmaceutika nacházená ve vodním prostředí lze rozdělit do devíti kategorií: [4]

- analgetika
- antipyretika
- antibiotika
- antiepileptická léčiva
- β -blokátory
- regulátory hladiny tuku v krvi
- kontrastní roztoky
- cytostatická léčiva
- orální kontraceptiva

2.3.2 Výskyt a osud léčiv v půdě a sedimentech

V kontrastu s akvatickým prostředím, výskyt a osud léčiv v půdě a sedimentech není tak dobře prostudován. Veterinární léčiva, včetně akvakulturních derivátů, významně přispívají k výskytu léčiv v pevných matricích díky jejich přímé aplikaci.

Současné studie se zaměřují na objasnění chování léčiv v pevných matricích, vyvíjení analytických metod, výzkum fyzikálně-chemických vlastností a koncentrace humánních a veterinárních léčiv v životním prostředí. Tato léčiva jsou příslušnými živočichy vylučována a ukládána nejčastěji na skládkách nebo hnoji. Jiná jsou do půdy přímo splachována z polí. Ke kontaminaci prostředí léčivy přispívá také pastevectví. Zbytky léčiv následně mohou vstupovat do prostředí vymýváním dešťovou vodou, vstřebáváním se do půdy. Důležitou roli pro vstřebávání hraje mobilita léčiva a schopnost ukládat se. Tyto transportní mechanismy jsou také předmětem současných studií

Osudové a degradační cesty látek v prostředí závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech sloučenin. Mobilita léčiva souvisí s jeho rozpustností ve vodě, koeficientem oktanol-voda a obsahem organického uhlíku v matrici. To nám umožňuje předpovídat výskyt léčiv v prostředí. Například sulfonamidy jsou obvykle dosti mobilní, nacházíme je tedy ve vyšší koncentraci v podzemních vodách. Naopak tetracykliny nalézáme hojně v sedimentech a půdě, protože mají silné sorpční vlastnosti a tedy tendenci akumulovat se a přetrvávat v pevných matricích.

V sorpčním mechanismu léčiv je důležitý celý komplex vlastností. Především hydrofobicita, výměna a tvorba kationtů, komplexů, a také schopnost vázat organické látky hrají důležitou roli v zadržování (uchovávání) léčiv v pevných matricích.

Sorpční charakteristika léčiv je běžně vyhodnocována z uceleného experimentálního systému, ze skupiny laboratorních pokusů.

V některých studiích byly sledovány koncentrace léčiv ve výkalech. Vyšší koncentrace byla naměřena pouze u sulfamethazinu a sulfathiazolu v rozmezí 0,10-12,4 μg/l. [4]

3 Analýza léčiv

Léčiva bývají těžko stanovitelná v komplexních matricích a jsou přítomna v široké koncentrační úrovni.

Analytické metody zahrnují tento obecný postup: odběr a úprava vzorku, extrakci, čistící procesy a vlastní instrumentální analýzu. Důležité je dosažení selektivity a senzitivity nutné pro spolehlivou analýzu. Problémem analytického stanovení léčiv v environmentálních matricích je různorodost fyzikálně-chemických vlastností u jednotlivých léčiv, složitost přírodní matrice a nutnost dosažení velmi nízkých limitů detekce. Proto dříve hojně používané spektrofotometrické metody stanovení jsou vytlačovány a nahrazovány metodami HPLC (High Performance Liquid Chromatography), které umožňují separaci látek na analytické koloně. Přestože metody HPLC odstraňují řadu problémů, je přečištění matrice vzorku, zakoncentrování extraktu nutné ke zvýšení meze stanovitelnosti. Také předkolonová nebo postkolonová derivatizace přispívá ke snadnější detekci a stanovení těchto látek. Cílem analytických metod je především optimalizace extrakčního procesu a nalezení nejlepších podmínek pro dosažení nejvyšší výtěžnosti.

3.1 Odběr a zpracování vzorků – pevné, kapalné

Vzorky vody se odebírají z podzemních vod čerpáním a z povrchových vod většinou nebývá způsob odběru specifikován. Vzorky se odebírají tak, aby byly co nejméně zakalené. Dále se přefiltrují (1μm) nebo centrifugují a uchovávají se v neprůhledných skleněných lahvičkách za snížené teploty (přibližně 4 °C). Lahvičky se předem vymývají acetonem nebo methanolem a bývají zahřáty na 280 °C z důvodu odstranění nežádoucích nečistot. Jestliže se předpokládá zvýšená koncentrace rušivých kationtů, přidává se ke vzorku vody sodná sůl EDTA (chelaton 3, tetrasodium etidronate) k vytvoření komplexu vápenatých a hořečnatých iontů (100mg na 100 ml vzorku).

Pevné vzorky se obvykle získávají z vrchního horizontu (0 – 20 cm). Buď se stírají přímo z povrchu nebo se odebírají z malých vrtů. Dále se půda vysuší na přibližně 5% vlhkost a velikost částic vzorku se upraví roztíráním, mletím nebo prosíváním sítem (2mm). Při mletí vzorku je nutné se vyhnout přehřátí vzorku. U některých vzorků je vhodné provádět lyofilizaci.

Dále je potřeba vzorky vhodně skladovat. Většina léčiv není chemicky stabilní a působením kyslíku, změny pH, světla nebo oxidačních činidel dochází k jejich degradaci, čímž dochází k úbytku obsahu těchto látek v referenčních materiálech i v přírodních matricích s časem. Proto

je při validaci metody nutné sledovat stabilitu roztoku, nejlépe ve tmě i po expozici na denním světle.

3.2 Extrakce analytu – pevné, kapalné

Extrakce z pevné fáze do kapaliny představuje jeden z kritických kroků analytického stanovení. Jako extrakční činidla se volí polární i nepolární rozpouštědla. Jejich volba závisí na vlastnostech analytu a interakci analytu s matricí. Z polárních rozpouštědel je možné uvést acetonitril, methanol a jejich vodné roztoky nebo pufry. Jedna z nejdůležitějších podmínek pro dosažení vysoké účinnosti extrakce je volba vhodného pH vzorku a extraktu (extrakčního činidla). Hodnota pH extrakčního činidla má v mnoha případech vliv na ionizaci analytu, a tak i jeho rozpustnosti v daném systému. Účinnost extrakce může být zvýšena i použitím techniky iontových párů.

Tradiční metodou pro kapalné vzorky je extrakce kapalina-kapalina LLE (Liquid-Liquid Extraction). Ta však byla postupně vystřídána metodou extrakce pevnou fází SPE (Solid Phase Extraction) pro vzorky vody. Soxhletova extrakční metoda pro pevné vzorky je nahrazována tlakovou extrakcí rozpouštědlem PLE (Pressurized Liquid Extraction). Například při extrakci antibiotik z pevné matrice byla použita i extrakce v ultrazvukové lázni (US = ultrasonication), zrychlená extrakce kapalinou (ASE = Accelerated Solvent Extraction) a různé varianty Soxhletovy extrakce.

Při extrakci kapalina-kapalina se používá systém acetonitril-voda-hexan, acetonitril-voda-petrolether (acetonitril je možné zaměnit methanolem). Kritickým bodem při tomto způsobu extrakce je koncentrace lipidu v nepolární organické fázi. Se stoupající koncentrací lipidu stoupá polarita nepolární fáze a stává se konkurenční fází k polární (vodné) fázi a může docházet k nízkým výtěžkům příslušného analytu (koncentrace tuku by neměla překročit 1 g na 25 ml rozpouštědla). Proto je nutné zbavit vzorek před extrakcí tuku. K tomuto účelu se používá i reextrakce z organického rozpouštědla do vodného pufru o daném pH. Pro zvýšení účinnosti extrakce se často pH extraktu upravuje např. citrátovým pufrem. Odstranění zbytků tuku se provádí hexanem na Soxhletově extraktoru. [8]

3.3 Přečištění extraktu

K zakoncentrování extraktů z pevných vzorků a vzorků sedimentů a jejich přečištění se používá nejčastěji extrakce na pevnou fázi SPE. Nevýhodou je složitost přírodních vzorků. Optimalizace SPE procedury může být složitější a časově náročnější než optimalizace extrakce kapalina-kapalina, protože výběr stacionární fáze a mobilní fáze je daleko širší a

proces separace má empirické zákonitosti. Existuje mnoho různých typů náplní C_{18} (organická funkční skupina oktadecyl), HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balanced kopolymer), diol SPE,…, které se používají k extrakci farmaceutických sloučenin ve výtocích z ČOV, povrchové a podzemní vodě a k přečištění preextraktů z pevných matric. Mezi nejčastěji používané patrony řadíme HLB díky stabilitě v širokému rozsahu pH. Používají se také patrony s pevnou fází MCX (Mix-mode Cation Exchange), LiChrolut EN (kopolymer ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu), nebo SAX (Strong Anion Exchange) + HLB patrony tandemové. U estrogenů následuje po přečištění silikagelem obohacení pomocí SPE na stacionární fázi C18. Eluce z těchto kolon je realizována ethyl acetátem nebo polárními rozpouštědly jako je aceton, methanol, acetonitril. [2]

3.4 Zkoncentrování extraktu

Významnou roli při zkoncentrování analytu může hrát odstraňování rozpouštědla a zahuštění extraktu na požadovaný objem. Velký vliv má jednak teplota a rovněž i přítomnost kyslíku. Proto se dává přednost vakuovému odpařování nebo odpařování pod proudem dusíku za laboratorní teploty.

3.5 Derivatizace vzorku

Derivatizační reakce vedou k tvorbě detekovatelných derivátů, zvýšení citlivosti a selektivity, zvýšení rozlišení nebo umožnění separace vůbec, a to především v plynové chromatografii (GC - gas chromatography).

Derivatizaci můžeme rozdělit podle místa derivatizační reakce:

Předkolonová derivatizace (pre-column chromatography) - chemická reakce probíhá před kolonou

Postkolonová derivatizace (post-column chromatography) - chemická reakce probíhá za kolonou

Derivatizace na koloně - chemická reakce probíhá přímo v koloně

Všechny způsoby derivatizace mají vliv na eluční charakteristiky separovaných látek (účinnost separace a dobu analýzy), ale požadavky na deriváty jsou poněkud odlišné.

3.6 Stanovení léčiv v extraktech

Primárními technikami pro analýzu léčiv v extraktech z přírodních matric při nízkých koncentracích je GC a LC (kapalinová chromatografie – liquid chromatography)

kombinovaná s UV (ultrafialová spektrometrie) a MS (hmotnostní spektrometrie – mass spectrometry) detekcí.

Pro farmaceutické účely se nejběžněji užívá LC v systému s obrácenými fázemi (RPLC – Reversed-Phase Liquid Chromatography) s oktadecyl C18 nebo oktyl C8 stacionární fází vázanou na silikagelovou matrici. Volba mobilní fáze je velmi důležitým faktorem ke zlepšení separace v RPLC. Iontově výměnná chromatografie a tzv. „size-exclusion chromatography" jsou používány k separaci iontových sloučenin a molekul, a to na bázi iontovýměnných vlastností resp. jejich molekulové hmotnosti. Unikátním bifunkčním sorbentem je materiál RAMs (Restricted Access Materials), který při chromatografii využívá rozdílu ve velikostech molekul a také obrácený retenční mechanismus.

MS je obvykle využívána k identifikaci a kvantifikaci látky nebo k potvrzení molekulové struktury. Další užívanou metodou je také MS^2 (Tandem Mass Spectrometry). LC-MS nebo LC- MS^2 jsou výhodnější než GC-MS, která často vyžaduje předchozí derivatizaci vzorku.

Z ionizačních technik používaných v LC/MS je nejužívanější ESI (Electrospray Ionisation) a APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) sloužící k protonaci nebo deprotonaci molekul. Obě techniky pracují za atmosférického tlaku a využívají zvýšené teploty k vypařování rozpouštědla a zavedení vzorku do analyzátoru. Rozdíl mezi oběma metodami je ve způsobu ionizace analytu. Často se využívají k detekci steroidních látek.

LC-MS^2 se často používá v uspořádání tzv. trojitého kvadrupolu nebo s iontovou pastí (IT = Ion Trap, iontová past). Není však úplně spolehlivou metodou pro identifikaci, protože zde vznikají odchylky vyplývající z různého způsobu rozlišení hmot.

Významnou metodou pro identifikaci léčiv v prostředí je Time-Of-Flight (TOF) MS ve spojení s LC, označovaná jako LC-TOF-MS. Tato metoda umožňuje velmi přesnou identifikaci sloučenin. [5] Méně výhodné je použití metody GC-MS, která musí následovat až po předchozí derivatizaci vzorku na silylové deriváty, ke které se využívá např. N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) a N-(terc-butyldimethylsilyl) trifluoracetamid (MTBSTFA).

Nejvhodnější metody pro analýzu termolabilních látek a polárních sloučenin jsou metody LC-MS, LC-MS/MS. Jsou více specifické a selektivní. Speciálním případem je stanovení estrogenů, kde se hojně setkáváme s metodou LC s trojitým kvadrupolem MS.

Obecně se při analýze léčiv často setkáváme s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), diodovým polem nebo fluorescencí.

V tabulce č. 3 jsou uvedena kritéria pro výběr vhodné detekce pro LC a GC doporučená kolektivem Damià Barceló, Mira Petrovic, Maria J. Lopez de Alda, M Dolores Hernando, ve

své práci zaměřené na sledování výskytu kontaminujících látek (především léčiv) v přírodních vzorcích na území Španělska. [9]

Tabulka č. 3. Kritéria pro vhodně zvolené metody pro organické zbytky a kontaminující látky. Veterinární a humánní léčiva a jiné kontaminanty. [9]

Technika měření	Použití
LC-MS nebo GC-MS	pouze, pokud následuje on-line nebo off-line chromatografická separace
LC nebo GC s IR	speciální nároky na absorpci IR
LC-full-scan DAD	speciální nároky na absorpci UV
LC-fluorescence	pouze pro molekuly vykazující nativní fluorescenci nebo ji vykazují po předchozí transformaci nebo derivatizaci
2-D TLC-full scan UV/VIS	je povinná dvou-dimensionální HPTLC a co-chromatografie
GC-ECD	pouze, pokud se použijí kolony s opačnou polaritou
LC-immunogram	pouze pokud poslední dva chromatografické systémy nebo poslední není závislý na způsobu detekce
LC-UV/VIS (jedna vlnová délka)	pouze pokud poslední dva chromatografické systémy nebo poslední není závislý na způsobu detekce

IR – infračervená spektrometrie, DAD – detekce diodovými paprsky, TLC – chromatografie na tenké vrstvě, VIS – viditelná spektrometrie, ECD - detektor elektronového záchytu

Konkrétní příklady experimentálních podmínek analýzy léčiv, metodou LC nebo GC, v pevných přírodních vzorcích jsou uvedeny v příloze č 1.

R. L. Gomes, E. Avcioglu, M. D. Scrimshaw a J. N. Lester porovnávaly metody LC/MS a GC/MS ve své práci zaměřené na analýzu estrogenních látek ve dvou různých matricích. Podle jejich výsledků je výtěžnost metody stanovení léčiv v sedimentech vyšší, pokud se používá technika LC/MS, v případě stanovení léčiv v odpadních vodách je výtěžnost vyšší při použití metody GC/MS. [10] Viz tabulka č. 5.

Tabulka č. 5. Srovnání výtěžností analýzy vzorků sedimentu a odpadní vody metodami LC/MS a GC/MS [10]

			Výtěžnost [%]			
Matrice	**technika**		**E1**	**E2**	**E3**	**EE2**
sediment	LC/MS	vzorek	76,2	65,5	52,4	78,6
		standard	15,2	13,4	3,8	15,7
	GC/MS	vzorek	23,7	43,8	38,9	71,3
		standard	3,8	5,7	4,6	13,9
odpadní voda	LC/MS	vzorek	33,1	37,2	22,2	26,8
		standard	4,5	6,4	2,0	4,5
	GC/MS	vzorek	105,7	83,1	17,8	43,6
		standard	14,2	9,1	6,9	0,9

E1 – estron, E2 – 17–β-estradiol, E3 – estriol, EE2 – 17–α-estradiol

3.6.1 Micelární kapalinová chromatografie

Micelární kapalinová chromatografie (MLC – Micellar Liquid Chromatography) je jednoduchá a spolehlivá metoda. Patří k metodám vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Lze ji použít na analýzu většiny léčiv. MLC je varianta kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi (RPLC), kde je mobilní fází vodný roztok povrchově aktivní látky o koncentraci blízké kritické micelární koncentraci (cmc). Nejvíce využívanou povrchově aktivní látkou v MLC je anionaktivní dodecylsulfát sodný (SDS = $C_{12}H_{25}OSO_3Na$). Mohou se používat i neutrální Brij-35 (polyoxyethylen-23-laurylether, CMC = 0,1, n = 40, Mr = 48000) nebo kationaktivní chlorid N-acetyltrimethylamonia. Díky širokému výběru činidel je MLC velmi univerzální technikou. Umožňuje analýzu jak hydrofilních, tak i hydrofobních látek. Při stanovení léčiv metodou MLC se často k mobilní fázi přidává organický modifikátor, kterým může být alkohol (methanol, propanol, butanol nebo pentanol) nebo acetonitril. Tyto modifikátory zesilují eluci a často zlepšují vzhled chromatografických píků. Důležitý je i výběr pH mobilní fáze. [11]

Metoda MLC byla použita pro stanovení léčiv skupiny androgenů, diuretik, antihistaminik, benzodiazepinů, β-blokátorů, kardiálních léčiv, kortikosteroidů, fenethylaminů, sulfonamidů a vitamínů rozpustných ve vodě – viz tabulka č. 6. [11]

Tabulka č. 6. MLC analýza léčiv v chromatografickém systému se stacionární fází C18 a UV detekcí: (t_a, doba analýzy) [11]. * Názvy analyzovaných látek jsou uvedeny v jazyce anglickém. České ekvivalenty byly nalezeny jen pro některé z uvedeného seznamu, proto nejsou uvedeny.

Léčivo (obecně)	konkrétní látky*	mobilní fáze metody MLC	pH	t_a [min]
Kortikosteroidy	beclomethasone, budesonide, dexamethasone, fludrocortisone, fluocinolone, hydrocortisone, triamcinolone	0,10 M SDS-4% butanol	7	12
Antihistaminika	carbinoxamine, chlorpheniramine, cyclizine, cyproheptadine, dexbrompheniramine, dexchlorpheniramine, diphenhydramine, doxylamine, pheniramine, phenyltoloxamine, pyrilamine, tripelenamine	0,15 M SDS-6% pentanol	7	9
Fenethylaminy	amphetamine, arterenol, ephedrine, phenylpherine, phenylpropanolamine, mephentermine, methoxyphenamine, pseudoephedrine, tyramine	0,15 M SDS-5% pentanol	7	9
Benzodiazepiny	bentazepam, clorazepate, diazepam, halazepam, oxazepam, pinazepam, tetrazepam	0,10 M SDS-3% butanol	3	10
Kardiální léčiva	diltiazem	0,10 M SDS-3% butanol	3	14
anticolvulsat	caramazapine	0,10 M SDS-3% butanol-triethylamin 0,1%	3	7
Sulfonamidy	sulfacetamide, sulfadiazine, sulfaguanidine, sulfamethazine, sulfamethizole, sulfamethoxazole, sulfathiazole	0,045 mM SDS-6% acetonitril	3	15
Vitamíny rozpustné ve vodě	nicotinamide, thiamide, riboflavin, pyridoxine, pyridoxamine	100 mM SDS-4% pentanol	3	12
β-blokátory	acebutolol, atenolol, carteolol, celiprolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, propanolol, timalol	150 mM SDS-15% propanol	3	15
Androgeny	danazol, methyltestosterona	40 mM SDS-2% pentanol		8
Diuretika	furosemide	60 mM SDS-8% propanol	3	6
thiazide diuretics	althiazide, bendroflumethiazide, chlorothiazide, cyclothiazide, hydrochlorothiazide, hydroflumethiazide, trichloromethazide	60 mM SDS-8% propanol	3	7
Karbamáty	carbaryl, carbofuran, desmedipham, methiocarb, propoxur	0,7 M; Brij-35	3	22

MLC – micelární kapalinová chromatografie, SDS - anionaktivní dodecylsulfát sodný, Brij-35 - polyoxyethylen-23-laurylether

4 Antibiotika

4.1 Charakteristika

Antibiotika jsou přirozené látky produkované mikroorganizmy (někdy i vyššími rostlinami či živočichy), které potlačují růst jiných organismů. K producentům antibiotik patří bakterie, houby, řasy, lišejníky aj.

Termín antibiotika původně označoval jen antimikrobiální látky produkované živými organismy, zatímco látky uměle připravené se nazývaly chemoterapeutika. Tento rozdíl se však v současnosti stírá, protože antibiotika nové generace jsou semisyntetické nebo syntetické deriváty původních účinných látek. Z širšího hlediska se proto mezi antibiotika řadí i uměle připravené substance, sulfonamidy a chinolony. Antibiotika jsou chemicky velice různorodou skupinou látek, většinou však mají molekulovou hmotnost menší než 2000 Da.

Podle chemické struktury můžeme antibiotika rozdělit do několika tříd: [12]

- Aminoglykosidy
- Amfenikoly
- Ansamyciny
- Cefalosporiny
- Diterpeny – pleuromutiliny
- Glykopeptidová antibiotika
- Karbapenemy
- Linkosamidy
- Makrolidy – erythromyciny
- Manobaktamy
- Polypeptidová antibiotika
- Chinolony
- Fluorochinony
- Streptograminy
- Sulfonamidy
- Tetracykliny

Antibiotika jsou v dnešní medicíně důležitou skupinou farmaceutik. Jsou používána k léčení a jako prevence před infekcemi jak v humánní, tak i ve veterinární medicíně. Produkce antibiotik ve světě je vysoká. V Německu se během roku 1994 vyrobilo až 1831 tun antibiotik, z toho 624 tun penicilinu samotného (Statistický úřad ve Wiesbadenu). Tato alarmující data jsou podnětem k intenzivním studiím chování antibiotik v akvatickém prostředí po mnoho dalších let. [12]

Antibiotika ve velké míře aplikují i farmáři vždy při zakládání farmy na novém místě. Také jsou využívána jako růstové regulátory, přidávají se do krmiv (ve státech EU je od roku 2006 používání antibiotické stimulace růstu zakázáno). Tyto růstové regulátory, jako je spiramycin, tylosin, carbadox, virginiamycin nebo monensin se neaplikují v lidské medicíně a jsou

podezřelé ze vzniku rezistence bakterií k jiným antibiotikům (mají schopnost transformovat genetický kód umístěný na R-plazmidu). [12]

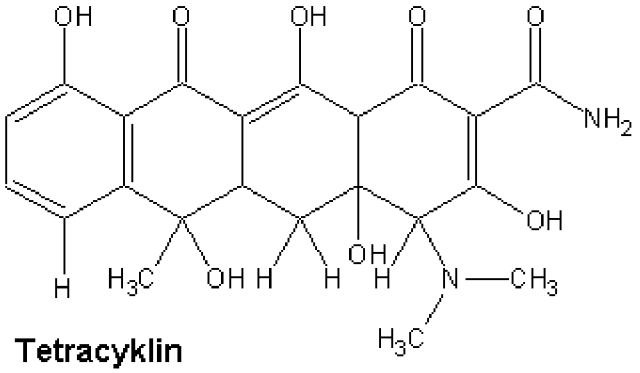
Vstup antibiotik do vodního prostředí je možný také hnojením. Potenciální riziko pro životní prostředí se zatím odhadovat nemůže, protože jsou k dispozici pouze omezené informace o rezistenci bakterií a koncentrační hladiny antibiotik v prostředí jsou nízké.

Nejvíce druhů zbytků léčiv bylo nalezeno v odpadních vodách a v povrchové vodě obsahující také antiflogistika, lipidové regulátory a beta-blokátory. (Hirsch et al., Stumpf et al., Ternes et al. 1998). Jejich koncentrace v odpadních vodách dosahuje 5 μg (Richardson a Bowron; 1985). [4]

4.1.1 Vlastnosti vybraných antibiotik

Tetracykliny

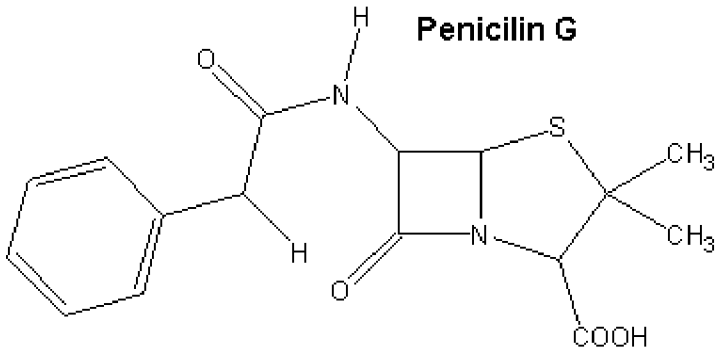
Tetracykliny mají komplexní vlastnosti. Snadno vážou vápník a podobné ionty a tak tvoří stabilní komplexy. Proto se pravděpodobně nevyskytují jako volné molekuly, ale jsou vázány na nosnou molekulu a sediment. [4]



Tetracyklin

Peniciliny

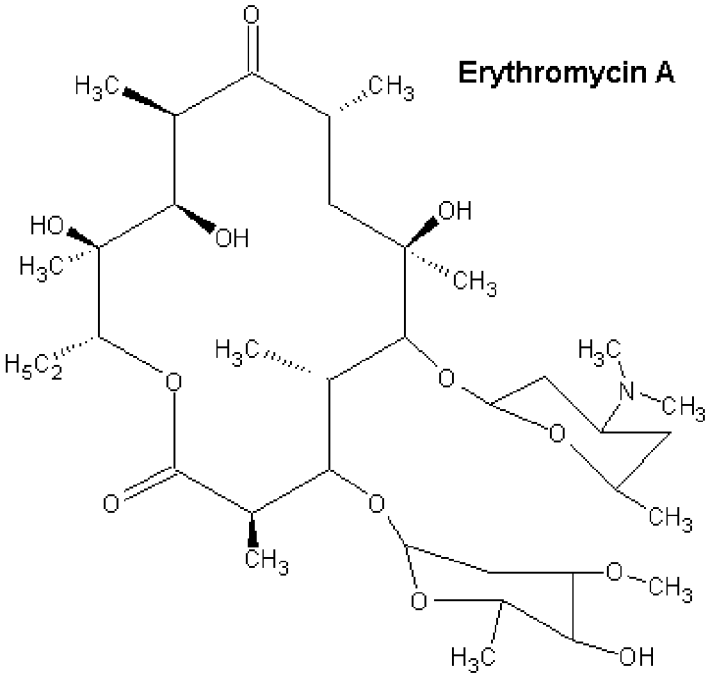
Díky chemicky nestabilnímu α-laktamovému prstenci, který je snadno náchylný k hydrolýze β-laktamázou, jsou peniciliny jednoduše eliminovány z vodního prostředí. Pro amoxicilin a ampicilin, dva často aplikované amino-peniciliny, je proto těžké najít optimální metodu extrakce, při níž by k hydrolýze nemohlo docházet. Z uvedených poznatků vyplývá, že absence penicilinu ve vodním prostředí není překvapující. [4]



Erythromycin

Erythromycin se v přírodě nevyskytuje v originální formě, ale jako degradační produkt s patrnou ztrátou jedné molekuly vody. Proto během ionizace v LC – MS bývá identifikován produkt s hmotnostním rozdílem 18 amu. [3] Experimenty jasně ukázaly, že tento proces ztráty vody nastává ve vodním prostředí v oblasti neutrálního pH. Mezi další degradační produkty erythromycinu A patří: [13]

- Erythromycin 6,9-hemiketal
- Erythromycin - enolová forma
- Anhydroerythromycin
- Erythromycin 6,9-hemiketal karboxylová kyselina
- Pseudoerythromycin 6,9-hemiketal
- Pseudoerythromycin - enolová forma



V příloze č. 2 a č. 3 jsou uvedeny strukturní vzorce degradačních produktů erythromycinu a příklad HPLC analýzy.

4.2 Antibiotika a životní prostředí

4.2.1 Cesta do prostředí

Antibiotika se do životního prostředí dostávají především prostřednictvím člověka a jeho exkretovaných metabolitů. Ty se dostávají do splašků a následně do vod. Sulfonamidy, jako sulfadimethoxin, jsou dostatečně stabilní v hnoji a jejich zbytková aktivita je využívána ke hnojení polí. Navíc antibiotika jsou intenzivně užívána při pěstování vodních kultur k prevenci vzniku infekce. Například hojně užívané jsou tetracykliny, sulfonamidy a chloramfenikol, které jsou přidávány do krmení nebo do vody. Většina nevyužitých léčiv končí v sedimentech, kde jsou buď degradována nebo se pomalu vrací zpět do povrchových vod. Čtvrtým nejdůležitějším zdrojem je průmyslová výroba.

Některé exkretované metabolity mohou byt transformovány zpět do originálního aktivního léčiva. Glukoronidy z chloramfenikolu nebo N-4-acetylsulfamethazin se zpět přeměňují na chloramfenikol a sulfamethazin

Většina adsorpcí se uskutečňuje pomocí hydrofobních interakcí. Proto lze předpokládat výskyt středně polárních antibiotik v podzemních vodách (erythromycin a tetracyklin). [4]

4.2.2 Antibiotika ve výtocích z ČOV a povrchové vody

Z výsledků analytických studií na německých řekách vyplývá, že se v povrchových vodách a výtocích z ČOV nejčastěji nachází ve zvýšené koncentraci dehydratovaný erythromycin, roxithromycin, clarithromycin, sulfamethazol a trimethoprim. Nejvyšší koncentrace byla naměřena u rozkladných produktů erythromycinu ve výtocích z ČOV, střední hodnota činila 2,5 μg/l a maximální dosažená koncentrace byla 6 μg/l. Zatímco koncentrace roxithromycinu, sulfamethoxazolu, trimethoprimu a clarithromycinu dosahovala hodnoty 1 μg/l.

Výskyt antibiotik v povrchových vodách především závisí na procentuálním zastoupení výtoků z ČOV v řekách. Z analýzy vzorků německých řek, vyplývá, že v nejmenších tocích je výskyt antibiotik největší. Např. na Urselbachu u Frankfurtu byla naměřena koncentrace erythromycinu 1,7 μg/l. [4]

Při analýze léčiv v prostředí musíme věnovat zvýšenou pozornost výskytu tetracyklinů a penicilinů. Výsledky analýz se často liší, což je způsobeno různou reaktivitou těchto antibiotik v prostředí. [4]

4.2.3 Antibiotika v podzemních vodách

Nejčastěji se sleduje obsah antibiotik v podzemních vodách v okolí farem a zavlažovaných polí. Ve většině těchto vzorků je vysoká koncentrace nitrátů dosahující až 200 mg/l.. Jiné vody však mohou obsahovat jen minimální koncentrace nitrátů. Vzorky pocházející ze zavlažovaných polí obsahují ve větší míře sulfamethoxazol, dokonce v koncentraci 0,47 μg/l (německá zemědělská oblast). Koncentrace ostatních antibiotik – dehydratovaného erythromycinu, roxithromycinu, trimethoprimu a clarithromycinu byla v rozsahu 0,24 až 0,87 μg/l. [4]

Na rozdíl od vzorků z výtoků ČOV a povrchových vod nebyly v podzemních vodách vůbec detekovány tetracykliny ani peniciliny. [4]

4.2.4 Toxikologické efekty na přírodu

Míru nebezpečného vlivu antibiotik na životní prostředí můžeme odhadovat vzhledem k množství a síle ekotoxikologického efektu ovlivňující rezistenci u bakterií.

Velké množství prací se zabývá populacemi bakterií v odpadních vodách s ohledem na rychlost eliminace patogenů a vytváření nového typu jejich rezistence. Bylo zjištěno, že více jak 70 % bakterií se stává na antibiotika necitlivé. Nejvíce patrný vznik rezistence je u penicilinu (zvláště ampicilinu), bacitracinu, tetracyklinu nebo erythromycinu.

Někteří autoři studovali rezistenci bakterií z různých oblastí akvatického systému, jako jsou jezera, řeky, podzemní vody – tyto vody byly kontaminovány ve velmi nepatrném množství. Dokonce i pitná voda obsahuje rezistentní bakterie, zde se předpokládá kontaminace výkaly. [4]

4.3 Analýza tetracyklinů, makrolidů a sulfonamidů (Jacobsen, Sørensen, Ingerslev, Hansen)

Jacobsen a spol. ve své studii s názvem *Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry* sledovali výskyt antibakteriálních látek na dvou zemědělských lokalitách v Dánsku, kde se ke hnojení používá kapalné hnojivo obsahující chlortetracyklin a tylosin. Ve své publikaci popsali metody analýzy těchto uvedených sloučenin:

CTC – chlortetracyklin

OCT – oxytetracyklin

SDZ – sulfadiazin

ERY – erythromycin

TYL A, B, C, D – tylosin

4.3.1 Odběr a zpracování vzorku

Vzorky byly odebrány ze dvou polí dánské výzkumné stanice. Byly sebrány z vrchního horizontu v hloubce 0 – 20 cm a ihned se uzavřely do tmavých nádob. Vzorky s půdou se pak vysušily na 5% vlhkost a byly prosety 2mm sítem.

4.3.2 Extrakce analytu

K extrakci byla použita metoda zrychlené extrakce rozpouštědlem (ASE 200, Dionex) v ocelové extrakční cele o objemu 33 ml. Přibližně 10 gramů vzorku půdy se smíchá s 10 gramy písku druhu Ottawa (je to standardní druh písku s kulatými zrny čistého bezbarvého křemene, (S/0365/63)) a umístí se do extrakční cely. Extrakce se provádí směsí methanolu s 0,2 mol/l citrátovým tlumičem pH 4,7 v poměru 1:1 v/v. Extrakce byla prováděna za laboratorní teploty a tlaku s ohledem na stabilitu tetracyklinů, u kterých při vyšší teplotě dochází ke změně epi- a anhydroformy. Optimální podmínky pro PLE jsou stručně shrnuty v tabulce č. 7.

4.3.3 Přečištění extraktu

K přečištění a zkoncentrování byla použita patrona s náplní SAX (Strong Anion Exchange) (500 mg sorbentu, 6 ml) a Oasis HLB patrona [poly(divinylbemzen-co-*N*-pyrrolidon), 200 mg sorbentu, 6 ml]. Patrony byly umístěny tandemově. Extrakt byl zředěn vodným roztokem methanolu (<10% v/v) a procházel oběma kolonami přibližně rychlostí 5 ml/min.

4.3.4 Stanovení léčiv v extraktech

K finální analýze metodou LC-ESI-MS-MS byla použita sestava komponent pro HPLC Agilet 1100. K hmotnostní detekci byl použit trojitý kvadrupolový detektor Sciex API 3000 vybavený zdrojem ESI. Parametry analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 7., hmotnosti výchozích látek a produktových iontů při MS/MS detekci jsou uvedeny v tabulce č. 8. a hodnoty limity detekce LOD (μg/l) a retenční čas t_R jsou v tabulce č. 9. Tato metoda byla optimalizována pro koncentrační hladiny léčiv 0,07 – 33 μg/kg v půdě.

Tabulka č. 7. Metody extrakce a analýzy antibakteriálních léčiv [14]

	Metoda I. vhodná pro tetracykliny a sulfonamidy (CTD, OTC, SDZ)	**Metoda II. vhodná pro makrolidy (TYL, ERY)**
extrakce	PLE: 1500 psi, lab. teplota, extrakční pufr: 50% methanol a 50 % 0,2 M citronová kys. (pH 4,7)	
SPE přečištění	Extrakt PLE zředěn roztokem methanolu (<10%); tandemové patrony SAX a HLB	
HPLC	Kolona: Waters Xterra MS-18, 100 mm x 2,1 mm, 3,5 μm, teplota 13 °C	
mobilní fáze	A: 5% methanol + 80 mM mravenčí kyselina	A: 20% methanol + 80 mM mravenčí kyselina
	B: 95% methanol + 80 mM mravenčí kyselina	B: 95% methanol + 80 mM mravenčí kyselina
průtok	200 μl/min	250 μl/min
gradient	0-2,5 min: 98% A;	0-2 min: 98% A;
	2,5-8 min: lineární růst k 50% A;	2-5 min: lineární růst k 30% A;
	8-23 min: 50% A;	5-15 min: 30% A;
	23-26 min: lineární pokles k 98% A;	15-17 min: lineární pokles k 96% A;
	26-30 min: 98% A	17-20 min: 96% A
zaváděný objem	5 μl	
MS-MS	MRM detekce	

SPE - solid phase extraction, PLE - pressurized liquid extraction, SAX - strong anion exchange, HLB - hydrophilic-lipophilic balanced kopolymer, MRM – multiple reaction monitoring

Tabulka č. 8. Detekce MS/MS - hmotnost výchozích látek a produktových iontů [14]

MRM	výchozí hmotnst (m/z)	produkované ionty (m/z)
chlortetracyklin (CTC)	479,0	444,2
oxytetracyklin (OTC)	461,0	426,0
sulfadiazin (SDZ)	251,3	156,0
tylosin A (TYL A)	916,0	772,0
tylosin B (TYL B)	772,0	174,0
tylosin C (TYL C)	902,5	758,5
tylosin D (TYL D)	918,0	774,0
erythromycin (ERY)	734,0	158,0

Tabulka č. 9. Limity detekce LOD (μg/l) a retenční čas t_R [14]

Sloučenina	LOD μg/l	t_R (min)
Metoda I.		
chlortetracyklin (CTC)	19,0	14,4
epi-chlortetracyklin (ECTC)	14,8	13,4
oxytetracyklin (OTC)	14,9	12,9
sulfadiazin (SDZ)	7,7	5,6
Metoda II.		
tylosin A (TYL A)	22,2	9,3
erythromycin (ERY)	8,3	9,4

5 Léčiva steroidní povahy

5.1 Charakteristika

V medicíně se stále více používají estrogenní a progestogenní léčiva – přírodní i syntetická. Větší množství farmakologicky aktivních látek každoročně více zasahuje prostředí různými cestami. Přírodní hormony jsou rychle metabolizovány v lidském těle. Orálně podávané hormonální látky jsou obvykle neúčinné nebo pouze ve vysoké koncentraci. Pro medicínské účely jsou připravovány více stabilní estrogeny. Jedním z nejdůležitějších ženských pohlavních hormonů je estradiol, který tvoří základ mnoha syntetických hormonů př.: ethynylestradiol, mestranol, valerát estradiolu,… Tyto jsou především využívány k hormonální léčbě.

Estrogeny a progestogeny se vyskytují především ve vodním prostředí. Příroda je snadno distribuuje, hromadí se v říčních sedimentech a půdě. Není jisté, jestli biologické odbourání hraje největší roli v jejich eliminaci z vodního prostředí. Rostliny je zpracovávají neúspěšně. Za hlavní mechanismus jejich eliminace z vodního prostředí se předpokládá biodegradace a sorpce. [15]

- Aplikace estrogenů

Estrogeny se používají pro čtyři hlavní účely:

1) Řízení menopauzálních a postpauzálních syndromů
2) Fyziologické nahrazení při nedostatku
3) Léčení prostaty a rakoviny prsu
4) Antikoncepce

- Aplikace progesteronů

Uplatňují se při léčení stavů infertility, endometriózy, při léčení rakoviny prsu a endometriálních rakovin. Účinné bývají samy nebo ve spojení s estrogeny (menstruační poruchy), potřeba jsou již vyšší dávky než při podávání hormonů jako antikoncepce.

Mezi sledované steroidní látky v prostředí řadíme především tyto substance, hojně se vyskytující v lidských exkrementech:

E1 - estron

E2 – 17-β-estradiol

E3 – estriol

EE (EE2) – 17-α-ethynylestradiol

DES – diethylstilbestrol

NOR – norethindron

LEV – levonorgestrel

MES – mestranol

PROG – progesteron

5.2 Steroidní látky a životní prostředí

5.2.1 Vstup do prostředí

Vliv hormonálních látek na ekosystém a zdraví člověka zvýšilo zájem o sledování jejich výskytu v přírodě. Mnoho látek s vlastnostmi steroidních hormonů nebo jejich metabolity se dostávají do prostředí a mohou mít nepříznivé efekty na volně žijící organismy a přírodu celkově.

Nejvýznamnější cestou, kterou se dostávají hormonální látky do vodního prostředí nebo potravního řetězce jsou odpadní vody, které se nešetrně vypouští rovnou do toků nebo půdy. Především lidské exkrementy obsahují nejvíce estrogenů a progestogenů. Exkrementy jsou součástí odpadních vod, ve kterých probíhají další degradační procesy, během kterých může dojít k odstranění až 85 % estradiolu, estriolu a ethenyl estradiolu, méně snadno jsou odbourávány estrony. [16] Zejména chovy ryb, skládky odpadů a hnojiva jsou nebezpečné pro kvalitu blízké podzemní vody. Jedná se hlavně o krmivo, které je rozpouštěno přímo ve vodě a obsahuje hormony. Odhaduje se, že až 70 % léčiv končí v prostředí díky chovu ryb. Zdrojem steroidních sexuálních hormonů, vstupujících do vodního prostředí, jsou také přípravky na ošetřování rostlin.

5.2.2 Koncentrační hladiny v prostředí

Mnoho studií potvrdilo výskyt estrogenů a progestogenů ve vyšší koncentraci ve vodním prostředí. Koncentrace převyšující hodnotu 1 ng/l narušuje endokrinní systém, fertilitu, feminizaci a hermafroditismus vodních organismů.

Přírodní hormony a jejich metabolity se v prostředí vyskytují vždy. Avšak v závislosti na jejich rostoucí spotřebě roste i jejich koncentrace v prostředí. Především lze tato zvýšená množství zaznamenat v odpadních vodách a kalech. Koncentrace v prostředí velmi kolísá. Obvyklé zastoupení hormonálních látek v sedimentech a odpadních vodách je v hodnotách až několika desítek ng/g. Kuster a spol. ve své práci uvádí pro sedimenty hodnotu koncentrace 22,8 ng/g a odpadní vody koncentraci 64 ng/g, přičemž se jedná o nejvyšší naměřené hodnoty

koncentrace ve španělských zemědělských oblastech, srovnané s hodnotami koncentrace těchto látek ve státech západní Evropy (Velká Británie, Portugalsko). [6] Jako další příklad lze uvést stanovení obsahu tří nejsledovanějších steroidních látek (estron, estradiol a ethynylestradiol) v sedimentech řek Nene a Lea. Největší koncentrace byly naměřeny pro estron v rozsahu 0,4 až 12,2 ng/l. Estradiol a ethynylestradiol byly nalezeny v nižší koncentraci: 0,4 - 4,3 ng/l a 0,4 - 3,4 ng/l. [17]

5.2.3 Studium degradace a sorpce

Jakmile se estrogeny a progestogeny dostanou do vodního prostředí, nastává série dalších procesů – fotolýza, biodegradace, usazování. Ukládání steroidních látek do sedimentů je díky nízké polaritě a koeficientu K_{ow} v rozmezí 10^3 a 10^5 velmi pravděpodobná. Také tomuto závěru odpovídá poměr koncentrací hormonů akumulovaných ve vodě a v sedimentech. Laboratorní výzkumy ukazují, že 13 – 92 % estrogenů, které se dostanou do vody se usadí v sedimentech. [15]

Podle K.M.Lai a kol. přechod estrogenů z vody do sedimentů je ovlivněn řadou přírodních podmínek např. obsahem solí nebo obsahem organického uhlíku. Bylo zjištěno, že nejrychlejší sorpce nastává v průběhu první půlhodiny po vstupu léčiva do prostředí. Další půlhodinu pozvolně klesá a v dalším čase se rychlost sorpce léčiva do sedimentu téměř nemění. Dále bylo zjištěno, že syntetické estrogeny (mestranol a ethynylestradiol) s vyšším K_{ow} se sorbují ve větším rozsahu než estrogeny přírodní. Také při laboratorních experimentech se slanou vodou se ukázalo, že sorpce estrogenů do půdy se výrazně zvýšila.

Například Van Emmerik a kol. se studovali závislost sorpce estrogenů na výskytu organického uhlíku v půdě. Srovnávali sorpční procesy na hydratovaném oxidu železa (goethite) a jílovitých minerálech (kaolinit, illit, montmorillonit). Závěr je takový, že sedimenty nebo půdy bohaté na obsah jílu jsou efektivnějšími sorbenty pro estradiol. Půdy chudé na jíl umožňují zpětnou desorpci estradiolu do vodního prostředí. Rychlost sorpce estrogenů do půd se uvádí přibližně 0,07 – 0,37 μg/g/h (Lai et al.) nebo také 0,002 – 0,112 μg/g/h (Casey et al.).

Koeficient K_{ow} hraje důležitou roli při odstranění hydrofobních sloučenin (např. mestranol) z vodního prostředí. V případě hydrofilních sloučenin, jako je estriol, estrony a jejich glukuronidy a sulfátové sloučeniny musíme brát v prvé řadě v úvahu biodegradaci, a s tím spojenou důležitou roli výskytu nitrifikačních bakterií, retenci usazenin, provzdušnění a teplotu. Z výzkumu vyplývá, že je estradiol ve vodě více mineralizovatelný než ethynyl estradiol nebo estron. [15]

Degradační studie prováděné se vzorky vody z pěti anglických řek ukázaly, že estradiol má poločas rozpadu 3 – 27 dní. Prvním degradačním produktem estradiolu je estron a za ním následují další. Ve vzorcích pocházejících z ústí řek byla zaznamenána menší míra degradace v důsledku vyššího obsah solí, které inhibují mikrobiální degradaci. [18]

Výsledkem obdobné studie prováděné ve vzorcích z řeky Temže jsou poločasy rozpadu ethynylestradiolu 46 dní a 17β-estradiolu 4 dny (M. Kuster, Alda, D. Barceló). Tyto údaje jsou však přibližné a byly získány za ideálních letních teplot. Za zimních podmínek by pravděpodobně hodnoty poločasů rozpadu byly dvojnásobně vyšší. U syntetických estrogenů, ethynylestradiolu a mestranolu nebyla zaznamenána po dobu pěti dnů žádná změna v koncentraci. Oproti tomu progesterony mají poločas rozpadu 48 hodin.[19] Autoři ve své studii [17] v řekách Nene a Lea uvádí pro estron poločas rozpadu 2,5 dne a 0,5 dne. Hodnoty jsou závislé na ekvivalentech sorpce a biodegradace konkrétní lokality.

Nelze jednoznačně rozhodnout, zda zásadní roli v eliminaci z vodního prostředí zastává sorpce nebo biodegradace. Jen některé studie tvrdí, že jedná-li se o odpadní vody, tak k biodegradaci nedochází a hlavním mechanismem eliminace hormonů z vodního prostředí je sorpce na částice. Desorpce je zanedbatelná, protože je 2-3krát pomalejší než sorpční procesy. [20]

5.3 Metody analýzy estrogenů a progestogenů v sedimentech a odpadních vodách

M. Kuster, M.J.L. de Alda, D. Barceló se zabývají ve své studii metodami, kterými se nejčastěji analyzují steroidní látky v půdě, sedimentech a odpadních vodách. Především se zaměřily na volné estrogeny a syntetické estrogeny, které jsou nejhojněji používané v medicíně. [15]

5.3.1 Odběr a zpracování vzorku

Vzorky sedimentu byly odebrány drapákovým vzorkovačem. Vzorky odpadní vody se získaly přefiltrováním kalu z ČOV. Nasbírané vzorky se transportovaly při teplotě do +4 °C ve tmě. U některých se provedla i lyofilizace při -20 °C. Vlhké sedimenty, u kterých se lyofilizace neprováděla, byly skladovány při teplotě – 70 °C. [15]

5.3.2 Extrakce analytu

Byla provedena extrakce podle Petrovic et al. A Céspedes et al., která využívá rozpouštědel - methanol, aceton, ethyl acetát nebo vodou s dichlormethanem v ultrazvukové lázni, jak je

uvedeno v tabulce č. 10 spolu s výtěžnostmi v extrakčním kroku (%). Vyhovující extrakční výtěžek je podle většiny případů v rozmezí 85 – 96 %. [15]

Tabulka č. 10

Výtěžnosti v extrakčním kroku (%) [15]					
analyt\metoda	sediment				odpadní voda
	EtOAc [22]	MeOH + Ac	EtOAc [23]	DCM/H_2O	MeOH + Ac
E2	95 ± 3,4		96 ± 1,2	42 - 80	
EE	95 ± 3,7		96 ± 0,6		
^{14}C-značené EE		85 ± 17			88 ± 17

EtOAc – ethylacetát, MeOH – methanol, Ac – acetát, DCM - dichlormethan

5.3.3 Přečištění extraktu

Extrakty, jak je uvedeno v tabulkách č. 12a,12b,12c, se ve většině případů přečistily metodou SPE. Pro tento účel byly použity chromatografické materiály C18 a polymerní fáze Oasis jako stacionární fáze. K případnému dalšímu přečištění se využila HPLC nebo sorbentní materiál RAMs. [15]

5.3.4 Stanovení léčiv v extraktech

Pro finální stanovení obsahu léčiv se použila metoda LC s fluorescenčním detektorem, detektor s diodovým polem a hmotnostní detektor. Vzorky vody se analyzovaly také metodou GC s hmotnostní detekcí. Podrobnosti k provedeným metodám jsou uvedeny v tabulce č. 11a,b,c . Celkové výtěžnosti analytických metod jsou v tabulce č. 12. [15]

Tabulka č. 11a. Používané metody analýzy estrogenů a progesteronů v říčních sedimentech (5 g) [15]

Substance	LOD ng/g	lyofilizace	vlhký sediment	extrakce rozpouštědlem	ultrazvuk	SPE	jiné	Prep. HPLC	Derivatizace	Detekce
E3, E2, EE, E1, DES, NOR, LEV, PROG	0,04-1	ano		25 + 15 + 15 ml MeOH:AC (1:1)	ano	(C18-kolona) 8 ml ACN				LC-DAD-MS
E3, E2, EE, E1, DES, NOR, LEV, PROG	0,5-5	ano		PLE ~ 20 ml MeOH:Ac (1:1)		(C18-kolona) 8 ml CAN	On/line SPE (RAM C4)			LC-MS
E2, E1, EE			ano	2 x 750 ml MeOH	ano	(Oasis) 3 x 5 ml MeOH, 2 x 5 ml EtOAc, 5 ml hexanu		(RP-C18), 10-100% ACN v H_2O (0,1% octová kyselina)	MSTFA	GC-MS
E2, EE, E1	0,04-5		ano	100 ml DCM:H_2O (1:1)	ano			(Spherisorbent S5ODS1), 40–100% MeOH v H_2O	MTBSTFA	GC-MS/MS
E2, EE, E1, MES	0,2-0,4	ano		4 + 3 ml MeOH + 2 x 3 ml Ac	ano	(C18-500mg), 4 x 1ml Ac	Silikagel 5-6 ml *n* -hex:Ac (65:35)	(RP-C18), ACN:H_2O (20:80)	MSTFA	GC-iontová past-MS/MS

Tabulka č. 11b. Používané metody analýzy estrogenů a progesteronů v mořských sedimentech (5 g) [15]

Substance	LOD ng/g	lyofilizace	vlhký sediment	extrakce rozpouštědlem	ultrazvuk	SPE	jiné	Prep. HPLC	Derivatizace	Detekce
E2, EE	[41,42]			2 x 20 ml EtOAc						HPLC-fluorescenční detektor

Tabulka č. 11c. Používané metody analýzy estrogenů a progesteronů v odpadních vodách (0,5 g) [15]

Substance	LOD ng/g	lyofilizace	vlhký sediment	extrakce rozpouštědlem	ultrazvuk	jiné	jiné	Prep. HPLC	Derivatizace	Detekce
E2, EE, E1, MES	1-2 ng/g	ano		4 + 3 ml MeOH + 2 x 3	ano	GPC (Biobeads SX-3), Ac: cyklohexan (1:3)	Silikagel 5-6 ml *n* -hex:Ac (65:35)		MSTFA	GC-iontová past-MS/MS

(ADS, alkyl diol silica; GPC – gel permeation chromatography (gelová permeační chromatografie); PLE, pressurized liquid extraction; RAM, restricted access material; SPE, solid phase extraction), EtOAc – ethylacetát, MeOH – methanol, Ac – acetát, DCM – dichlormethan, LOD – limit detekce [ng/g], PLE - pressurized liquid extraction

Tabulka č. 12. Celková výtěžnost analytické metody (%) [15]						
analyt\metoda	**sediment**				**vyhnilý vodárenský kal**	**aktivovaný vodárenský kal**
	LC-DAD-MS	**GC/ion tap-MS**	**LC-ESI-MS**	**RAM-LC-MS**	**GC/ion tap-MS**	**GC/ion tap-MS**
E1	102 ± 9	94 ± 37	95 ± 19	101 ± 3	77 ± 11	104 ± 11
E2	101 ± 10	97 ± 11	97 ± 15	104 ± 4	66 ± 10	73 ± 18
E3	100 ± 11		100 ± 11			
EE	99 ± 10	99 ± 23	93 ± 16	98 ± 7	57 ± 15	99 ± 25
MES		99 ± 26			71 ± 8	99 ± 12
DES	93 ± 11		88 ± 15	97 ± 6		
LEV	68 ± 9		79 ± 6	103 ± 4		
NOR	67 ± 9		66 ± 7	96 ± 2		
PROG	66 ± 10		64 ± 6	102 ± 4		
DES, diethylstilbestrol; E1, estron; E2, 17-β-estradiol; E3, estriol; EE, 17-α-ethinylestradiol; LEV, levonorgestrel; MES, mestranol; NOR, norethindron; PROG, progesteron						

6 Lipidové regulátory a beta-blokátory

6.1 Charakteristika

β-blokátory a lipidové regulátory jsou dvě hojně používané skupiny léčiv. Jen za lipidové regulátory se v USA za rok 2003 utratilo $26,1 bilionů a β-blokátory patří mezi 200 nejužívanějších léčiv v USA. Používají se k léčení např. angíny a hypertenze.

- Lipidové regulátory (α-(*p*-chlorophenoxy)isomáselná kyselina (clofibric acid), gemfibrozil, fenofibrat, bezafibrat) bývají součástí odpadních vod, byly zaznamenány i v podzemních vodách a povrchové vodě. V pitné vodě byla kyselina α-(*p*-chlorophenoxy)isomáselná detekována v koncentraci 270 ng/l (T.Herber, K. Schmidt-Bäumller, H.-J. Stan). Jsou kyselé povahy.
- β-blokátory (metopropolol, propanolol, betaxozol, bisoprolol, nadolol, atenolol, sotalol) jsou detekovány v komunálních odpadech v koncentraci nižší jak μg/l. Jsou zásadité povahy.
- Nepřímé působení těchto léčiv prostřednictvím pitné vody potencionálně ohrožuje zdraví člověka a vysoká environmentální koncentrace působí velmi negativně na vodní živočichy.

Hranice toxikologické koncentrace u metoprololu je 100 mg/l a u α-(*p*-chlorophenoxy)isomáselné kyseliny 200 mg/l. Koncentrace nižší jak 25 μg/l nemá významný ekotoxikologický účinek. [21]

Tabulka č. 13. Přehled lipidových regulátorů a beta-blokátorů

Léčivo	Chemický vzorec	Mr (g/mol)
Benzafibrat	$C_{19}H_{20}ClNO_4$	361,819
Clofibric acid	$C_{20}H_{21}ClO_3$	214,645
Gemfibrozil	$C_{15}H_{22}O_3$	250,333
Atenolol	$C_{14}H_{22}N_2O_3$	266,336
Sotalol	$C_{12}H_{20}N_2O_3S$	272,2624
Metoprolol	$C_{15}H_{25}NO_3$	267,364
Betaxolol	$C_{18}H_{29}NO_3$	307,428
Fenofibrat	$C_{20}H_{21}ClO_4$	360,831
Nadolol	$C_{17}H_{27}NO_4$	309,401
Bisoprolol	$C_{18}H_{31}NO_4$	325,443

6.2 Analýza lipidových regulátorů a beta-blokátorů – LC-ESI-MS/MS

K stanovení obsahu lipidových regulátorů a beta-blokátorů v přírodních matricích a odpadních vodách byla použita metoda LC-ESI-MS/MS. Fázové rozhraní ESI bylo optimalizováno pomocí FIA (flow injection analysis) pro všechny individuální sloučeniny v režimu PI (pozitivní ionizace) a NI (negativní ionizace). [21]

Analyzované sloučeniny:

Lipidové regulátory: α-(*p*-chlorophenoxy)isomáselná kyselina, gemfibrocil, fenofibrat, bezafibrat

β-blokátory: sotalol, atenolol, metopropolol, betaxolol

6.2.1 Odběr a zpracování kapalných vzorků

Vzorky vody se odebírají do lahví z tmavého skla vymytých čistou vodou. Odebraná voda se filtruje přes papírový filtr s nylonovou filtrační membránou s průměrem pórů 0,45 μm (Teknokroma). Vzorky se uchovávají při 4 °C před SPE extrakcí. Tím se dosáhne minimální degradace během 24 hodin.

K extrakci pevnou fází se používá chromatografická fáze C18 (Isolute SPE C18,3ml, 500 mg,) Patrony byly aktivovány 5 ml metanolu a 3 ml vody s upraveným pH. K extrakci kyselých léčiv bylo nastaveno pH vody na hodnotu 2,8 a pro zásaditá léčiva bylo pH upraveno na 10,5.

Objem vzorku extrahovaný SPE byl 100 ml, průtok vzorku při extrakci 4 ml/min. Patrona se poté 30 minut sušila vakuové sušárně tak, aby se zbavila přebytečné vody. Zadržené analyty byly eluovány 2 x 3 ml metanolu. Extrakt se odpařil v proudu dusíku a znovu rozpustil 1 ml methanolu. Před vlastní analýzou LC-MS/MS byl tento roztok přefiltrován PTFE (polytetraflueoethylen) filtrem (Millipore, Bedford, MA, USA) s průměrem pórů 0,20 μm. [21]

6.2.2 Analytická instrumentace

K LC analýze byla použita HPLC (Waters 2690, Purospher Star RP-18, 125 x 2,0 mm, 5 μm). Mobilní fázi tvoří binární směs rozpouštědel A (acetonitril) a B (voda). Rychlost průtoku byla nastavena na 0,2 ml/min. Průběh gradientnu: v první minutě je složka A 30%, v průběhu dalších osmi minut se lineárně zvyšuje procentuální zastoupení složky A z 30 % až k 90 % a a zůstává konstantní do konce analýzy. [21]

K tandemové MS byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupolem (Micromass Quattro) vybaveným elektrosprejem interferencí s negativní (NI) a pozitivní (PI) ionizací. [21]

Parametry pro analýzu kyselých farmaceutik:

Zdroj ESI a desolvatační teplota: 120°C – 370 °C, kapilární napětí 3,5 kV a napětí fragmentoru 20 V, tlak plynu (Ar) v kolizní cele 2,5 x 10^{-3} mbar.

Parametry pro analýzu zásaditých farmaceutik:

Zdroj ESI a desolvatační teplota: 80 °C a 350 °C, kapilární napětí a napětí fragmentoru 2,5 kV a 55 V, tlak plynu (Ar) v kolizní cele 2,5 x 10^{-3} mbar. Průtok plynu ve zmlžovači a desolvatačního plynu byl 109 a 510 l/h. [21]

Detekce se uskutečnila pomocí MS v režimu MRM (multiple reaction monitoring). Parametry ESI interference byly optimalizovány pomocí FIA (flow injection analysis) pro všechny sloučeniny v PI nebo NI. Deprotonované molekuly $[M - H]^-$ a $[M - 2H]^-$ o m/z 213 pro α-(*p*-chlorophenoxy)isomáselnou kyselinu, m/z 245 pro gemfibrocil a m/z pro bezafibrat byly získány v prvním kvadrupolu jako prekurzorové ionty. Protonované molekuly $[M + H]^+$ byly získány pro β-blokátory a fenofibrat a byly použity jako prekurzorové ionty v MS/MS. Podrobnosti ke konkrétnímu léčivu jsou uvedeny v tabulce č. 14 a příslušný chromatogram je v příloze č. 5. [21]

Limity detekce byly stanoveny jako trojnásobek poměru signál/šum, pro měřený soubor látek byly v rozsahu 0,017 μg/l do 1,25 μg/l. [21] Viz. tabulka č. 15.

Tabulka č. 14. Detekce, kvantifikace a potvrzení změny struktury pro β-blokátory a lipidové regulátory metodou MS – MRM [21]

Standard léčiva	výchozí látka (m/z) → produkt (m/z)	Kolizní napětí (eV)	m/z	Produkované ionty
Bezafibrat	360 → 85	14	274	$[M - H - C_4H_6O_2]^-$
			154	$[M - H - C_{12}H_{14}O_3]^-$
			85	$[C_4H_5O_2]^-$
Clofibric acid	213 → 85	14	127	$[C_6H_4ClO]^-$
			85	$[C_4H_5O_2]^-$
Gemfibrozil	249 → 121	14	121	$[M - H - C_7H_{12}O_2]^-$
Atenolol	267 → 190	25	190	$[M - H_2O - NH_3 - \text{isopropyl} + 2H]^+$
			145	$[190 - CO - NH_3]^+$
Sotalol	273 → 213	15	255	$[M - H_2O + H]^+$
			213	$[M - C_3H_9N + H]^+$
Metoprolol	268 → 159	27	159	$[C_8H_{17}NO_2]^+$
			133	$[C_6H_{15}NO_2]^+$
Betaxolol	308 → 159	29	159	$[C_8H_{17}NO_2]^+$
			133	$[C_6H_{15}NO_2]^+$
Fenofibrat	361 → 233	26	233	$[C_{13}H_{10}ClO_2]^+$

Tabulka č. 15. Výtěžnost β-blokátorů a lipidových regulátorů z obohaceného vzorku čisté vody (pro HPLC) a obohacených reálných vzorků vody (15 g/l) [21]

Léčivo	LOD (μg/l)	Výtěžnost (%)		
		čistá voda	voda z kouhoutku	říční voda
Benzafibrat	0,050	78,5	59,5	70,3
Clofibric acid	0,060	81,2	100,3	89,0
Gemfibrozil	0,090	92,3	45,2	69,2
Atenolol	0,017	80,3	58,7	48,7
Sotalol	0,018	89,7	76,2	63,2
Metoprolol	0,550	76,2	55,2	43,1
Betaxolol	0,750	52,0	40,3	42,5
Fenofibrat	1,250	60,0	49,2	45,1

7 Závěr

Bakalářská práce obsahuje základní informace týkající se identifikace a kvantifikace léčiv v přírodních matricích. Výskyt léčiv se sleduje především ve vodách a půdách, u kterých je pravděpodobná větší kontaminace těmito látkami (zemědělské a průmyslové oblasti). Soubor léčiv, která významně kontaminují složky životního prostředí, je velmi široký a jejich zastoupení v přírodních matricích je variabilní. Léčiva mohou podléhat degradaci v různých složkách životního prostředí. Produkty jejich degradace mohou mít významné toxikologické účinky.

Pro extrakci léčiv z environmentálních matric se používají metody tlakové extrakce rozpouštědlem (PLE), extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo se často setkáváme s extrakcí na pevné fázi (SPE). Pro vlastní analýzu léčiva se využívají chromatografické metody. Ve studiích, které jsou v bakalářské práci zmíněny, se setkáváme s využitím kapalinové a plynové chromatografie spojené s hmotnostní detekcí. Přitom nejčastěji se uplatňuje kapalinová chromatografie, která na rozdíl od plynové chromatografie nevyžaduje derivatizační krok a z hlediska účinnosti separace se obě metody výrazně neliší. Pro spolehlivou detekci a kvantifikaci na úrovni environmentálních koncentrací se doporučuje používat MS/MS detekci. V bakalářské práci jsou uvedeny optimalizované parametry vybraných publikovaných metod.

8 Přílohy

Příloha č. 1.

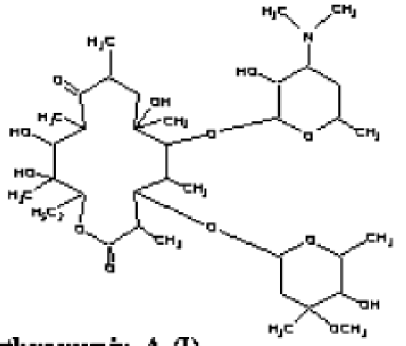
Experimentální podmínky používané v analýze léčiv metodou LC nebo GC v pevných přírodních vzorcích [8]

Léčivo	Vzorek	Kolona	Mobilní fáze	Detekce	LOD [ng/g]
tetracyklin, chlortetracyklin	nepřirozený mořský sediment	Spherisorb S3, ODS1, 150x2.1 mm	Gradient, kyselina octová (10 mM):Methanol (80:20) a Acetonitril:Methanol (80:20)	UV λ 355 nm	
				Frit FAB MS	0,01
				Particle Beam MS (-) mode/scan	1
	hnojená půda	Puresil C18, kolona 150x4,6 mm	Gradient, kyselina mravenčí (0.5%)+ammonium, acetát (1 mM)+voda (pH 2)	elektrosprej (+) mode, MS	0,001 (TC) 0,002 (CTC)
oxytetracyklin	půda	Hypersil BDS, 250x2,1 mm	acetát sodný (10 mM) + chlorid draselný (55 mM) + Na2EDTA (20 mM), pH 6,5:Methanol:voda (35:35:30)	fluorescence, λ_{exc} 390 nm, λ_{em} 390 nm	
	nepřirozený a přírodní mořský sediment	Hypersil ODS, 100x5 mm	Acetonitril:voda + Na2EDTA (1 mM) + nitrát potasia (100 mM), pH 3,2 (14:86)	UV λ 365 nm	0,1
	přírodní mořský sediment	RP-8, 254x4 mm	Methanol:Acetonitril:kyselina octová (10 mM), pH 2. (20:30:50)	UV λ 350 nm	

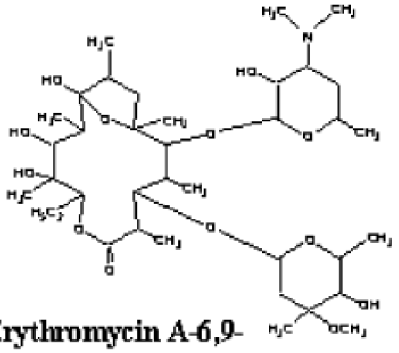
	přírodní mořský sediment	Microsorv-MV C8, 25 cm	Acetonitril, pH 3.2:kyselina octová (10 mM), pH 2. (35:65)	UV λ 365 nm	0,2
	nepřirozený mořský sediment	LiChrospher, 100-RP18, 125x4,6 mm	Acetonitril:kyselina fosforečná (20 mM), pH 2.3. (24:76)	UV λ 355 nm	0,01
	nepřirozený mořský sediment	Spherisob S3, ODS1, 150x2,1 mm	Gradient, kyselina octová (10 mM):Methanol (80:20) a Acetonitril:Methanol (80:20)	UV λ 355 nm	
				Frit FAB (-) MS-MS	0,01
				Particle Beam MS (-) mode/scan	1
	hnojená půda	Puresil C18, kolona 150x4,6 mm	Gradient, kyselina mravenčí (0.5%)+amoniak, acetát (1 mM) + voda (pH 2)	elektrosprej (+) mode, MS	0,001
Tylosin	půda	Hypersil BDS, 250x2,1 mm	amoniumacetat (10 mM):Methanol (10:90)	elektrosprej (+) mode/SIM	
	hnojená půda	Puresil C18, kolona 150x4,6 mm	Gradient, kyselina mravenčí (0.5%)+amoniak, acetát (1 mM) + voda (pH 2)	elektrosprej (+) mode, MS	0,001
Sulfadimethoxin	přírodní mořský sediment	Hypersil ODS C18 200x4,6 mm (50°C)	Acetonitril:fosfotečnan sodný (100 mM) (25.75)	UV λ 270 nm	0,05

	nepřirozený mořský sediment	Hypersil ODS, 100x4,6 mm	kyselina fosforečná (50 mM), pH 3.5+ Acetonitril (90+10):kyselina fosforečná (50 mM), pH 3.5 + Acetonitril (50+50). (50:50)	UV λ 270 nm	
	půda	LiChrospher, 100-RP-C18, 250x4,6 mm	Gradient, Methanol a kyelina fosforečná (10 mM), pH .3.0	UV λ 275 nm	
Estriol, Estradiol, Ethynyl estradiol, Estron, Diethylstilbestrol	přirozený říční sediment	LiChrospher, 100-RP-C18, 250x4 mm	Gradient, Acetonitril:voda (10:90)	elektrosprej (-) mode/SIM	0.05–1
			Gradient, Acetonitril:voda (30:70)	elektrosprej (-) mode/SIM	1–5
Estradiol, Ethynyl estradiol, Estron, Mestranol	přirozený říční sediment a kal	XTI-5 (30 m x 0.25 mm 0.25 mm)	-	GC/MS/MS (EI)	0,2-4
Norethidron, Levonorgestrel, Progesteron	přirozený říční sediment	LiChrospher, 100-RP-C18, 250x4 mm	Gradient, Acetonitril:voda (10:90)	elektrosprej (+) mode/SIM	0,04
			Gradient, Acetonitril:voda (30:70)	elektrosprej (+) mode/SIM	0,5

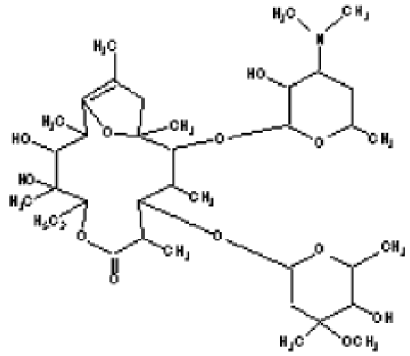
Příloha č. 2. Strukturní vzorce erythromycinu A a jeho degradačních produktů ve vodném roztoku. [13]



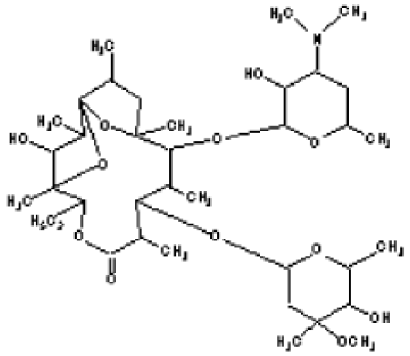
Erythromycin A (I)



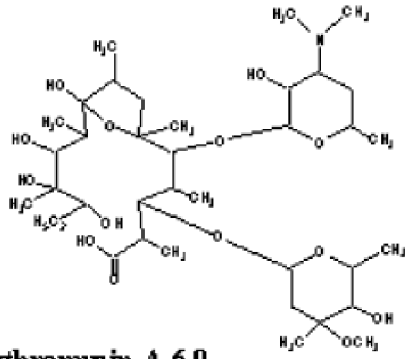
Erythromycin A-6,9-hemiketal (II)



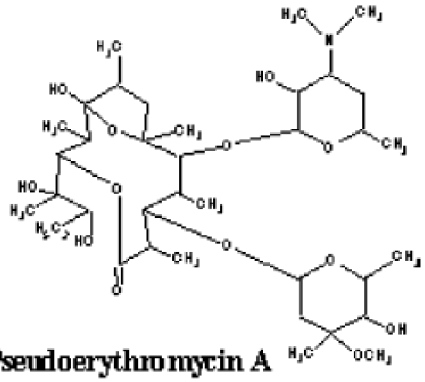
Erythromycin A enol ether (III)



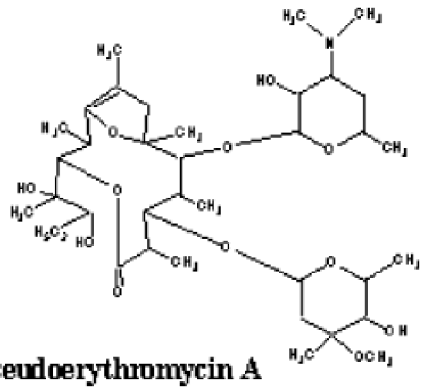
Anhydroerythromycin A (IV)



Erythromycin A-6,9-hemiketal carboxylic acid (V)

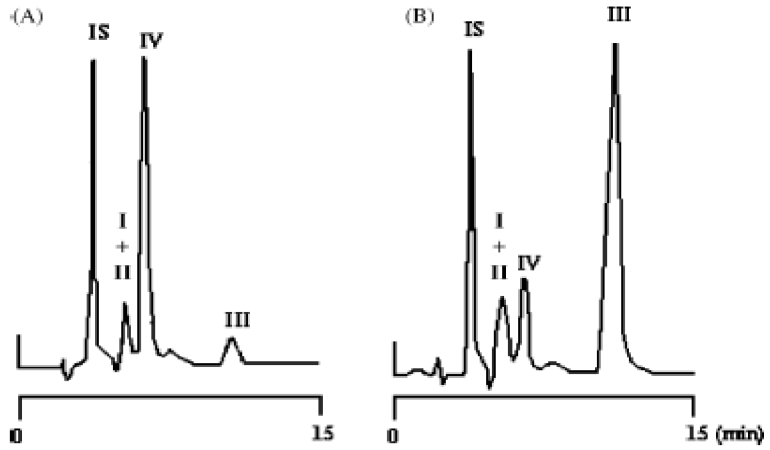


Pseudoerythromycin A 6,9-hemiketal (VI)

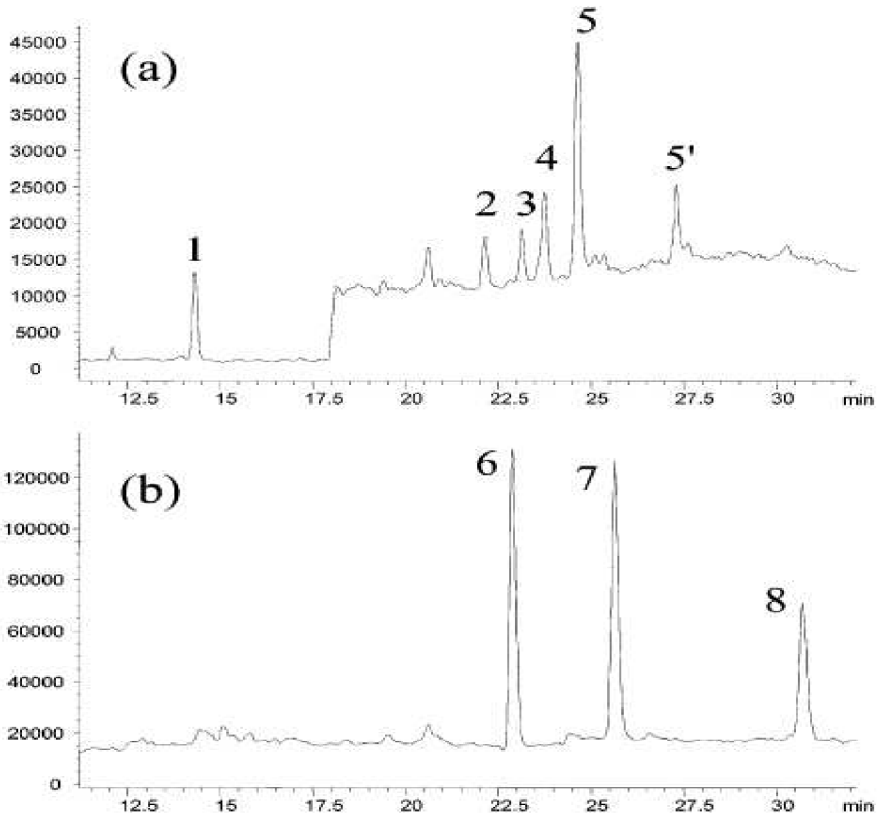


Pseudoerythromycin A enol ether (VII)

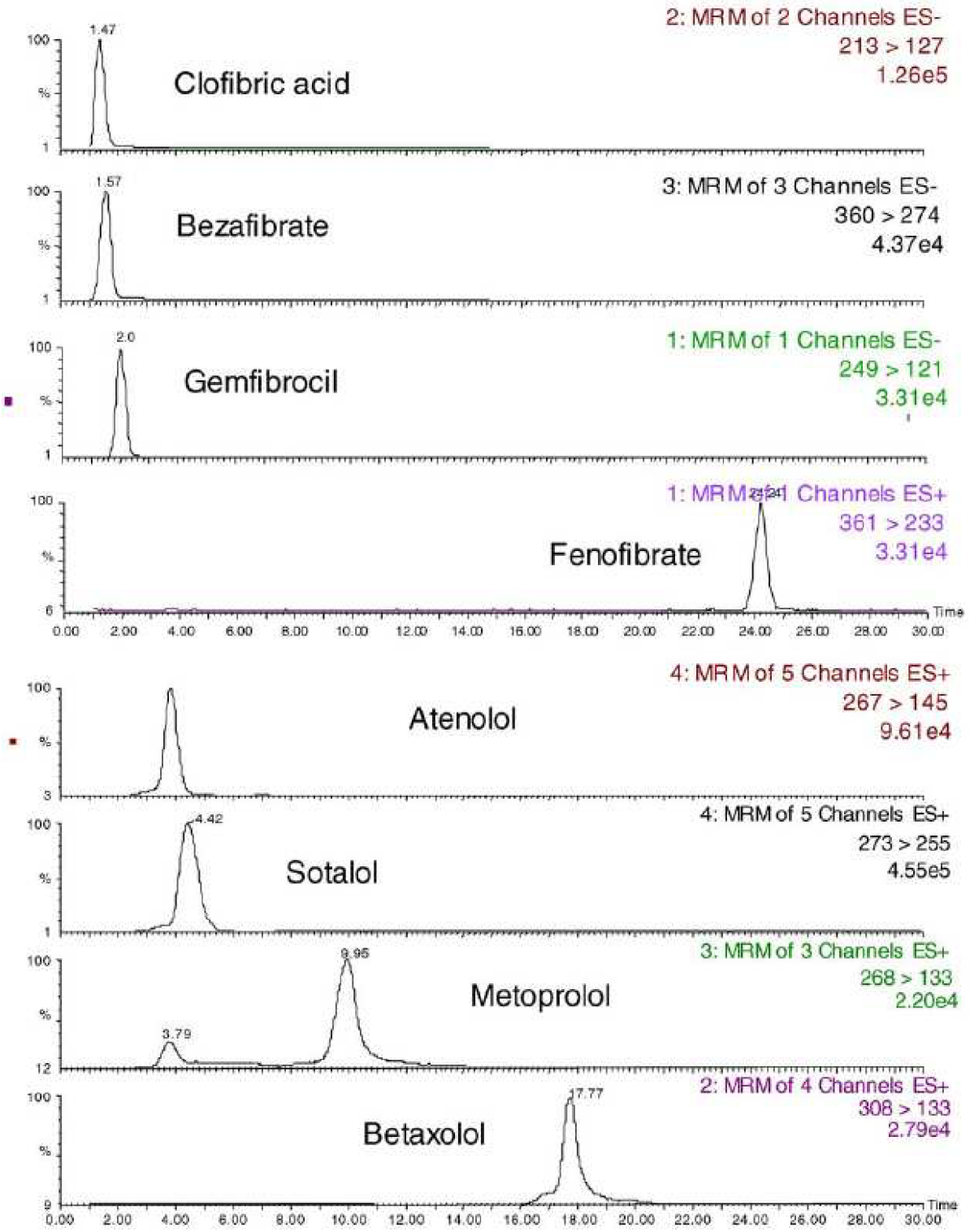
Příloha č. 3. HPLC chromatogram kysele katalyzované degradace erythromycinu A (A) a erythromycinu A v enol-formě (B) po 1-hodinové inkubaci v 0,1M pufru octanu sodného (pH 3,5) při 25°C. Píky byly kvantifikovány v přítomnosti standardu (IS), 2-hydroxykarbazol (2μg/ml). I - erythromycin A, II - erythromycin 6,9-hemiketal, III - erythromycin - enolová forma, IV - anhydroerythromycin, [13]



Příloha č. 4. Chromatogram LC-ESI-MS analýzy vzorku sedimentu (20 ng/g) v negativním režimu (a) pro estrogeny a v pozitivním režimu (b) pro progestogeny. (1) estriol, (2) estradiol, (3) ethynyl estradiol, (4) estron, (5 a 5´) diethylstilbestrol, (6) norethindron, (7) levonorgestrel, (8) progesteron.[8]

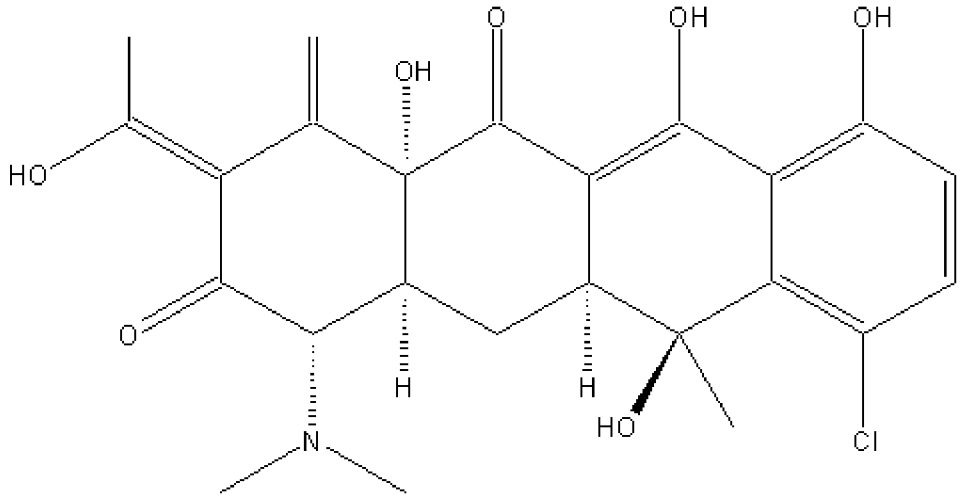


Příloha č. 5. MRM chromatogram léčiv analyzovaných v ČOV výtocích. Jednotlivé píky odpovídají: (1) clofibric acid = α-(*p*-chlorophenoxy)isomáselná kyselina, (2) bezafibrat, (3) gemfibrocil, (4) atenolol, (5) sotalol, (6) metoprolol, (7) betaxolol a (8) fenofibrat. Jednotkou časové osy x jsou minuty. [21]

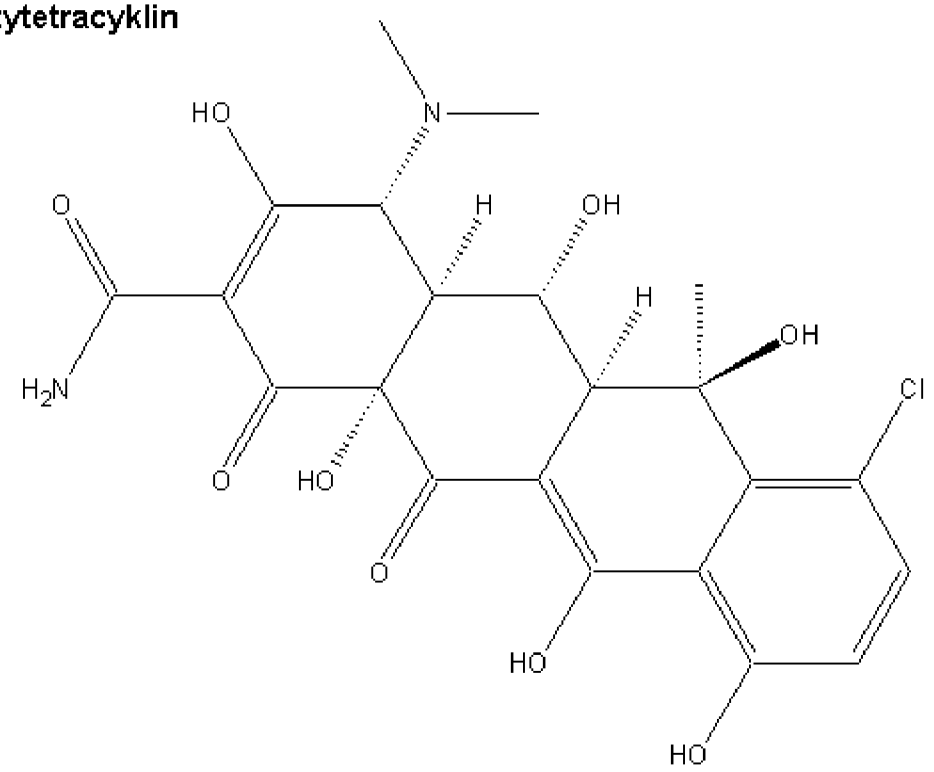


Příloha č. 6. Vzorce vybraných léčiv

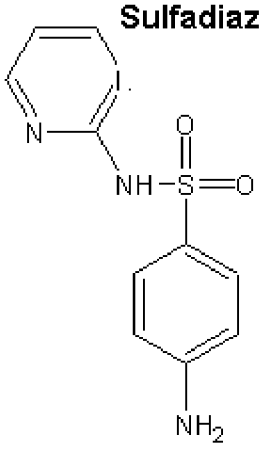
Chlortetracyklin



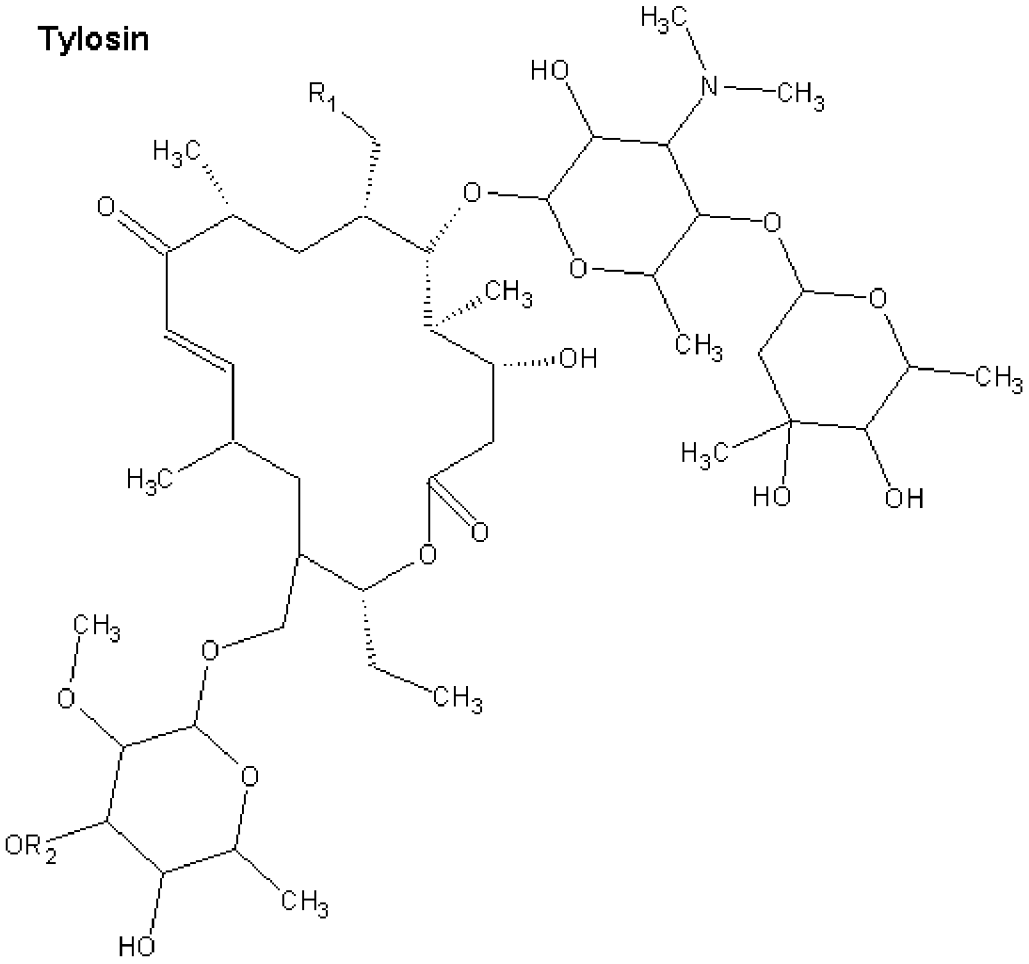
Oxytetracyklin

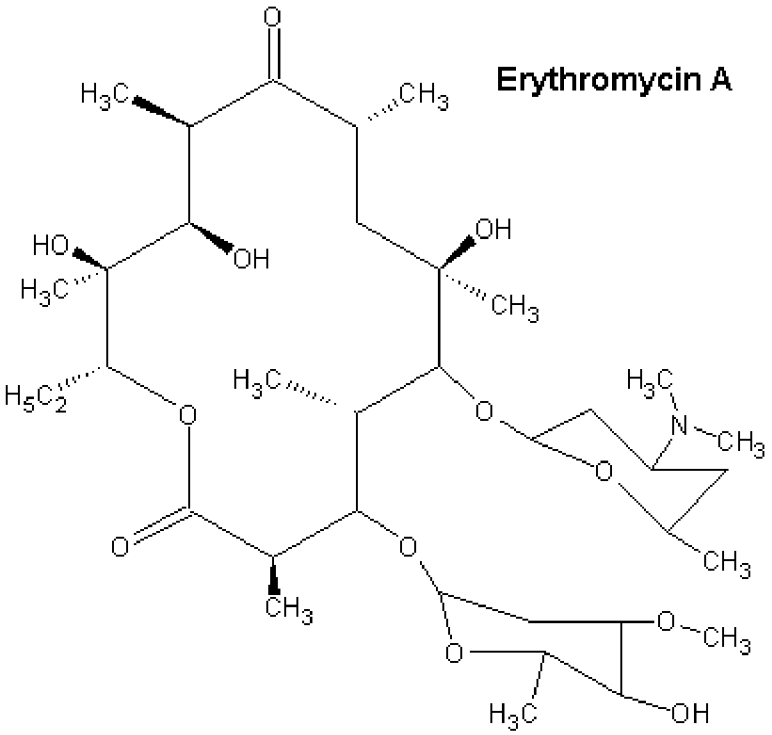


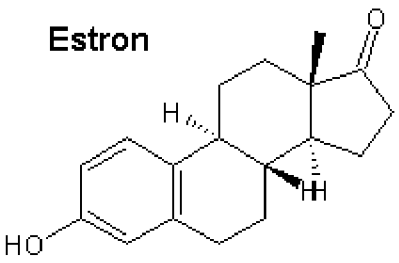
Sulfadiazin

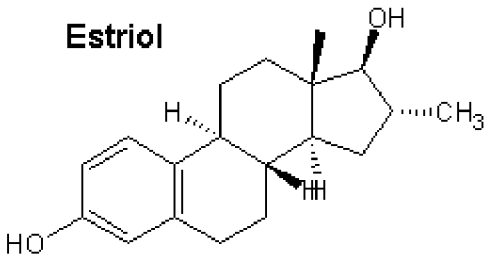


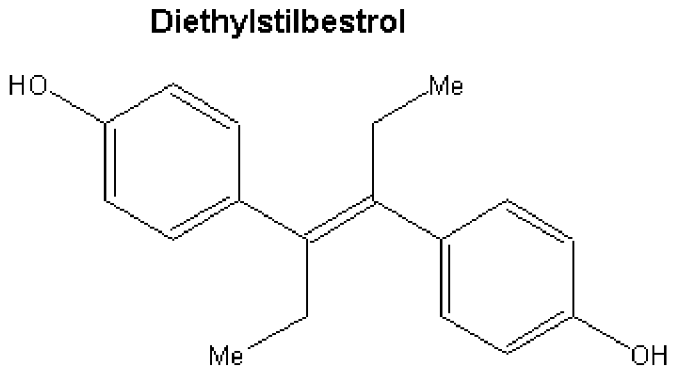
Tylosin



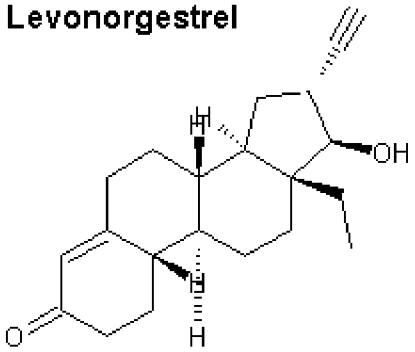

Erythromycin A
O
H3C
CH3
HO
OH
H3C
OH
CH3
H5C2
H3C
O
H3C
N
CH3
O
O
O
CH3
O
O
CH3
O
H3C
OH


Estron
O
H
HO

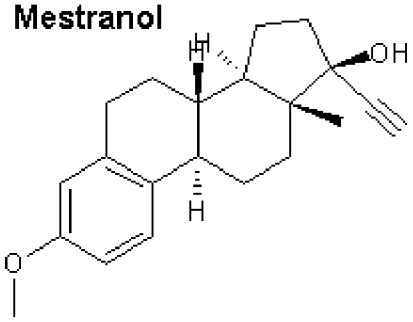

Estriol
OH
H
CH3
HO


Diethylstilbestrol
HO
Me
Me
OH

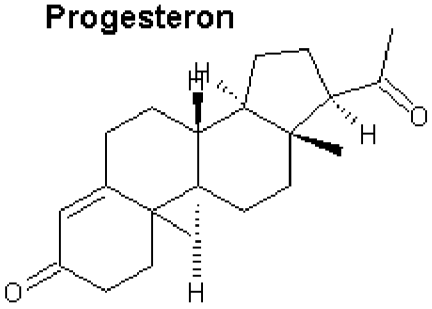
Levonorgestrel



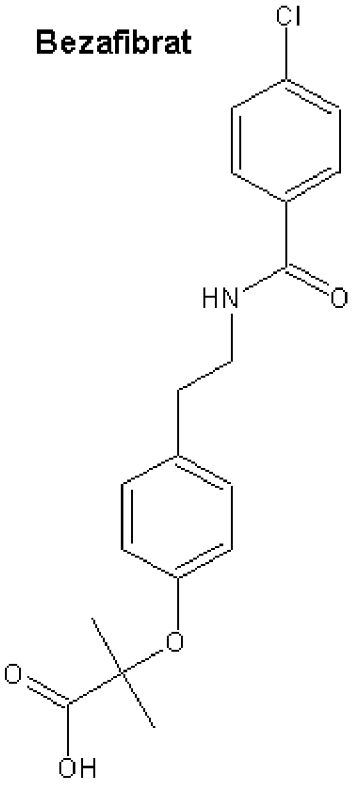
Mestranol



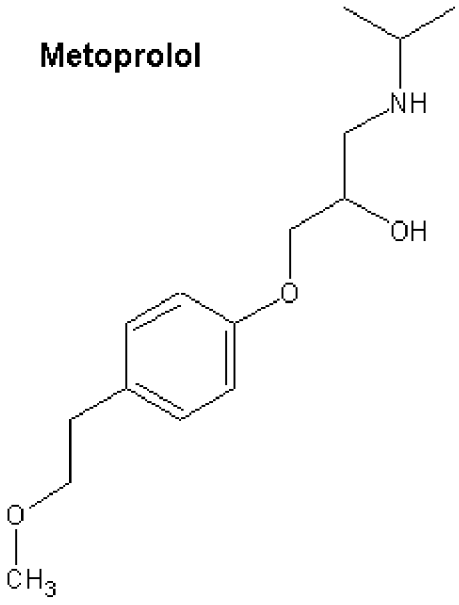
Progesteron



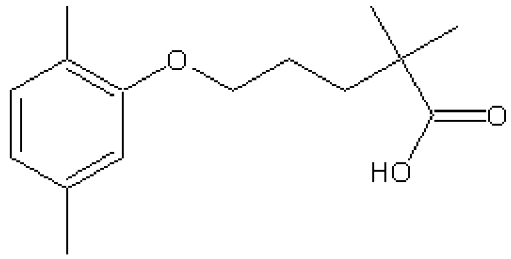
Bezafibrat



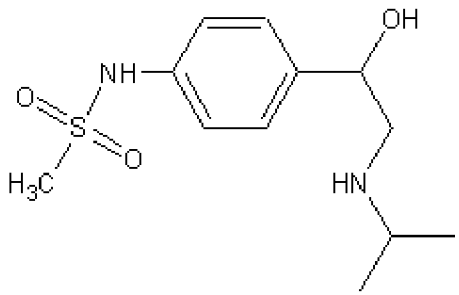
Metoprolol



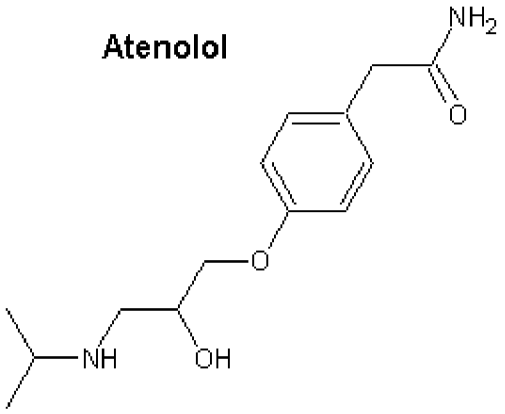
Gemfibrozil



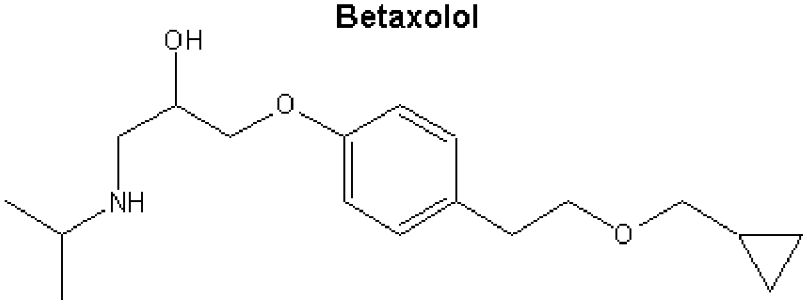
Sotalol



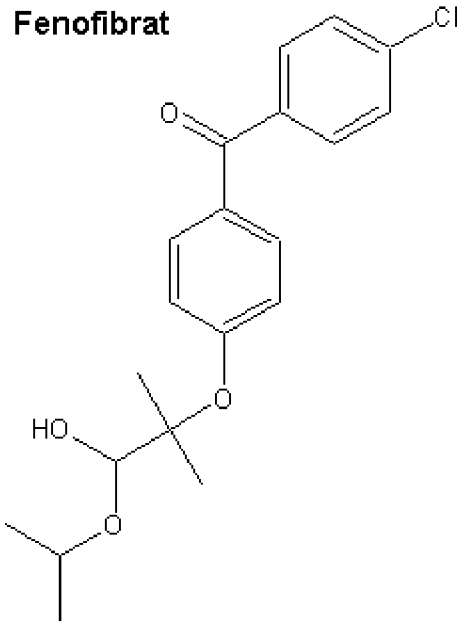
Atenolol



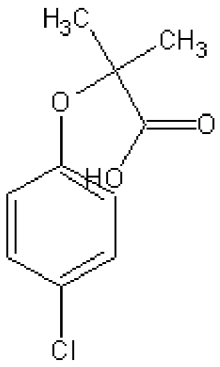
Betaxolol



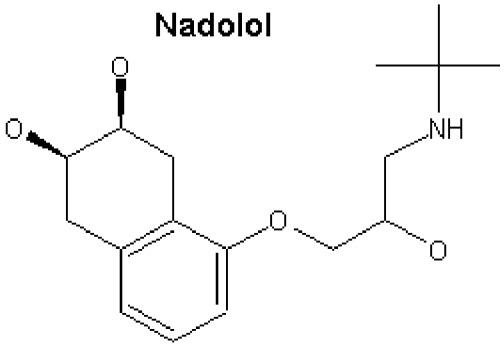
Fenofibrat



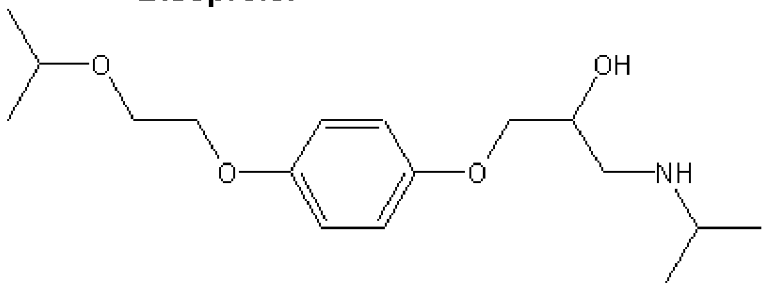
α-(p-Chlorophenoxy)iso-máselná kyselina



Nadolol



Bisoprolol



9 Seznam literatury

1) www.sweb.cz/hplc1/Vet/home.htm
2) Anne Marie Jacobsen., Bent Halling-Sørensen, Flemming Ingerslev, Steen Honoré Hansen; Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Journal of Chromatography A, 1038 (2004) 157–170
3) Michael P. Schlüsener, Kai Bester; Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil; Environmental Pollution 143 (2006) 565e571
4) Roman Hirsch, Thomas Terens, Klaus Haberer, Karl-Ludwig Kratz. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment; The Since of Total Environment 225 (1999) 109-118
5) Sung-Chul Kim, Kenneth Carlson. LC–MS^2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrice; Trends in Analytical Chemistry, Vol. 24, No. 7, 2005
6) G.E. Cordy, N.L. Duran, H. Bouwer, R.C. Rice, E.T. Furlong, S.D. Zaugg, M.T. Meyer, L.B. Barber, D.W. Kolpin; Do Pharmaceuticals, Pathogens, and Other Organic Waste Water Compounds Persist When Waste Water Is Used for Recharge?; Groundwater monitoring and remediation, Volume 24 Issue 2 Page 58-69, May 2004
7) N. Kreuzinger, M. Clara, B. Strenn, B. Vogel, Investigation on the behaviour of selected pharmaceuticals in the groundwater after infiltration of treated wastewater; Water Sci. Technol. 50 (2004) 221.
8) M. Silvia Dı´az-Cruz, Marı´a J. Lo´pez de Alda, Damia` Barcelo. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge; Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22, No. 6, 2003
9) Damià Barceló, Mira Petrovic, Maria J. Lopez de Alda, M Dolores Hernando; Recent advances in LC-MS/MS analysis of emerging contaminants in environmental symplex; IIQAB-CSIC, Departament of Environmental Chemistry, Barcelona, Spain
10) R. L. Gomes, E. Avcioglu, M. D. Scrimshaw, J. N. Lester; Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: a critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations, incorporating a case study in method development; Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No 10-11, 2004

11) Josep Estere-Romeo, Samuel Carda-Broch, Mayte Gil-Agustí, Maria Elisa Capella-Peiró, Devasish Bose; Micellar liquid chromatography for determination of drug materials in pharmaceutical preparations and biological symplex; Trands in Analytical Cemistry, Vol. 24, No. 2, 2005

12) Jaroslav Spížek, CSc.; Rezistence na antibiotika; Vesmír 78, leden 1999

13) Yong-Hak Kim, Thomas M. Heinze, Richard Beger, Jairaj V. Pothuluri, Carl E. Cerniglia; A kinetic study on the degradation of erythromycin A in aqueous solution; International Journal of Pharmaceutics 271 (2004) 63–76

14) Anne Marie Jacobsen., Bent Halling-Sørensen, Flemming Ingerslev, Steen Honoré Hansen; Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Journal of Chromatography A, 1038 (2004) 157–170

15) Marina Kuster, Maria Jose Lopez de Alda, Damia Barcelo; Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments; Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 10–11, 2004

16) A.C. Johnson, J.P. Sumpter; Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works; Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 4697

17) Richard J. Williams, Andrew C. Johnson, Jennifer J. L. Smith, Rakesh Kanda; Steroid Estrogens Profiles along River Stretches Arising from Sewage Treatment Works Discharges

18) M.D. Jurgens, R.J. Williams, A.C. Johnson, Fate and Transport of 17-β-Estradiol in Soil-Water Systéme; Environ. Sci. Technol., 37 (11), 2400 -2409, 2003T.

19) K. Norpoth, A. Nhrkorn, M. Kirchner, H. Holsen, H. Teipel; Estrogens and Progestogens in Wastewater, Sludge, Sediments and Soil; Water Pollution – Volume 2/2005

20) M.D. Jurgens, R.J. Williams, A.C. Johnson, R&D Technical Report P161, environment Agency, Bristol, UK, 1999.

21) M.D. Hernando, M. Petrovic, A.R. Fern´andez-Alba, D. Barcel´o; Analysis by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for beta-blockers and lipid-regulating agents in wastewater symplex; Journal of Chromatography A, 1046 (2004) 133–140

22) Guang-Guo Ying and Rai S. Kookana; Degradation of Five Selected Endocrine-Disrupting Chemicals in Seawater and Marine Sediment; Accepted January 20, 2003

23) Guang-Guo Ying, Rai S. Kookana, Peter Dillon; Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material; Water Research 37 (2003) 3785–3791