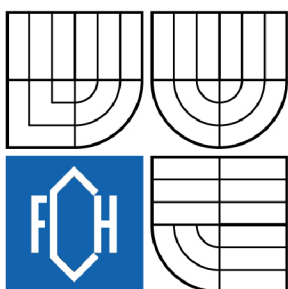


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

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 SPEKTROFOTOMETRIE PRO STANOVENÍ REZIDUÍ LÉČIV VE VODÁCH

APPLICATION OF SPECTROPHOTOMETRY FOR DETERMINATION OF DRUG RESIDUA
IN WATERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

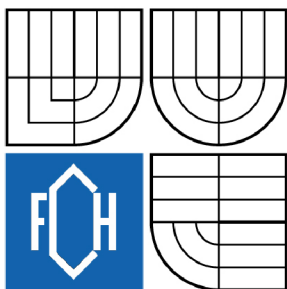
LUKÁŠ ČAPKA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2008



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0259/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka)	Čapka Lukáš	
Studijní program	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (M2805)	
Studijní obor	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí diplomové práce	MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.	
Konzultanti diplomové práce	prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.	

Název diplomové práce:

Využití spektrofotometrie pro stanovení reziduí léčiv ve vodách

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Stanovení plánu odběru vzorků vod
3. Zhodnocení získaných výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

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

Lukáš Čapka
student(ka)

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce je zaměřena na využití spektrofotometrie při stanovování reziduí léčiv v odpadních vodách. Cílem práce bylo stanovit metodické postupy pro stanovení vybraných léčiv, tj. tetracyklinu a diklofenaku na bázi UV/VIS spektrofotometrie, a to zejména ve viditelné oblasti spektra. Ověření metody bylo nezbytné pro její doporučení pro kontrolní laboratoře čistíren odpadních vod a farmaceutického průmyslu. Zkoumanou maticí byly odpadní vody z čistírny odpadních vod v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno a z velkokapacitní komunální čistírny odpadních vod v Brně, Modřicích. Pro izolaci analytů byly použity tři postupy extrakce: sonikace, extrakce na tuhou fázi a extrakce kapalina-kapalina. Spektrofotometrické stanovení tetracyklinů bylo prováděno přímo po zakoncentrování v UV oblasti spektra. Při stanovování diklofenaku bylo využito reakce s methylenovou modří, za tvorby komplexu, a následné detekce ve viditelné oblasti spektra.

ABSTRACT

Submitted diploma thesis is focused on the application of spectrophotometry for the determination of pharmaceuticals residues in waste waters. The aim of this thesis was the formulation of the methodical procedures for the determination of selected pharmaceuticals, i. e. tetracycline and diclofenac based on UV/VIS spectrophotometry, especially in visible areas of spectra. Verification of the method was necessary for the recommendation to control laboratories in waste-water treatment plants (WWTP) and pharmaceutical industry. The matrix surveyed was waste-water from WWTP in the area of University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno and from the municipal WWTP in Brno-Modrice. Three methods were used for the isolation of analytes: sonication, solid phase extraction and liquid-liquid extraction. Spectrophotometric determination of tetracyclines was realised directly after preconcentration using UV area of spectra. For the determination of diclofenac its reaction with methylene blue was used, followed by VIS-spectrophotometric determination of the resulting complex.

KLÍČOVÁ SLOVA

léčiva, spektrofotometrie, povrchové a odpadní vody

KEYWORDS

pharmaceuticals, spectrophotometry, surface water, waste water

ČAPKA, L. Využití spektrofotometrie pro stanovení reziduí léčiv ve vodách. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 87 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph. D. a prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce a dalším pracovníkům a doktorandům ÚCHTOŽP za pomoc při řešení dílčích problémů.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 TEORETICKÁ ČÁST – LÉČIVA	10
3.1 Základní pojmy	10
3.2 Názvosloví	10
3.3 Historie	11
3.4 Mechanismy transportu léčiv v organismu	14
3.4.1 Biomembrány	15
3.4.2 Prostá difúze	15
3.4.3 Pasivní transport – usnadněná difúze	15
3.4.4 Aktivní transport	15
3.4.5 Endocytóza	16
3.4.6 Exocytóza	16
3.5 Osud léčiva v organismu	17
3.6 Mechanismy účinku léčiv	18
3.6.1 Specifické mechanismy účinků léčiv	18
3.6.2 Nеспецифické mechanismy účinku léčiv	19
3.7 Rozdělení a jednotlivé typy běžných léčiv	19
3.7.1 Analgetika	19
3.7.2 Sedativa a hypnotika	22
3.7.3 Psychostimulancia	22
3.7.4 Antibakteriální chemoterapeutika	22
3.7.5 Antibiotika	24
3.8 Léčiva v povrchových a odpadních vodách	30
3.8.1 Aspekty biotransformace léčiv	31
3.8.2 Zdroje průniku léčiv do životního prostředí	31
3.8.3 Osud léčiva v životním prostředí	34
3.8.4 Perzistence léčiv v životním prostředí	36
4 METODY STANOVENÍ LÉČIV	38
4.1 Vzorkování	38
4.1.1 Obecné problémy vzorkování	38
4.1.2 Kontaminace vzorků	38
4.1.3 Vzorkovací zařízení pro kapaliny	39
4.2 Úprava vzorku	40

4.3 Extrakce.....	41
4.3.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE).....	41
4.3.2 Extrakce tuhou fází (SPE).....	41
4.3.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME).....	45
4.4 Molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti	47
4.4.1 Absorpční spektrum	48
4.4.2 Interakce molekuly s UV/VIS zářením.....	50
4.4.3 Lambert-Beerův zákon.....	50
4.4.4 Instrumentace.....	51
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	56
5.1 Používané přístroje a zařízení	56
5.2 Software pro zpracování a prezentaci dat.....	56
5.3 Používané chemikálie a standardy	56
5.3.1 Chemikálie	56
5.3.2 Standardy	56
5.4 Sledovaná matrice.....	57
5.5 Stanovované analyty a jejich vlastnosti	57
5.5.1 Tetracykliny	57
5.5.2 Diklofenak.....	58
5.6 Pracovní postupy	58
5.6.1 Odběry vzorků	58
5.6.2 Úprava vzorků a izolace sledovaných analytů.....	58
5.6.3 Identifikace a kvantifikace analytů	60
6 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	61
6.1 Stanovení tetracyklinů	61
6.1.1 Určení absorpčního maxima a výpočet kalibrační křivky	61
6.1.2 Stanovení výtěžnosti	63
6.1.3 Reálné vzorky	64
6.2 Stanovení diklofenaku	67
6.2.1 Stanovení podmínek stability komplexu.....	67
6.2.2 Stanovení optimální koncentrace methylenové modři.....	68
6.2.3 Určení absorpčního maxima a výpočet kalibrační křivky	70
6.2.4 Stanovení výtěžnosti	74
6.2.5 Reálné vzorky	75
7 ZÁVĚR.....	79

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	80
9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	86

1 ÚVOD

V posledních letech došlo k významnému vzestupu spotřeby léčiv, a to jak v humánní, tak i veterinární medicíně. Je to způsobeno také tím, že značný počet léků lze nakoupit volně, bez lékařského předpisu, což má za následek jejich neuvážené používání. Největším problémem se však posléze stává odbourávání těchto látek ve složkách životního prostředí. Do životního prostředí vstupují několika možnými cestami, jak při likvidaci prošlých nebo nepoužitých léků, tak i při jejich aplikaci a následném vylučování z organismu. Druhý případ je závažnější, protože takto se dostává velké množství léčiv do čistíren odpadních vod (ČOV), kde působí značné problémy při biologickém procesu odbourávání škodlivin. V případě, že jsou tyto farmaceutické výrobky biologicky aktivní, mají velmi neblahý vliv na vodní i suchozemské ekosystémy a zároveň se u nich uplatňuje bioakumulace, což má za následek ovlivnění nebo až poškození celého potravního řetězce. V souvislosti s těmito problémy je nutná kontrola obsahu zmíněných látek v odpadních vodách. Současně je nezbytné vyvíjet nové metodické postupy pro jejich stanovení, a to jak pro kontrolní laboratoře, tak i pro laboratoře vyššího typu. Spektrofotometrie v UV/VIS oblasti spektra, je poměrně rychlá a jednoduchá metoda, která se však vyznačuje vyšším detekčním limitem než kapalinová chromatografie. Proto je nutné ještě před vlastní detekcí zapojit do analytického postupu některou z dalších technik umožňujících zakoncentrování analytu; vhodným postupem je extrakce na tuhou fázi, při které dochází nejenom k zakoncentrování zkoumaného analytu, ale zároveň k částečnému přečištění a odstranění některých nežádoucích a interferujících balastních látek.

2 CÍL PRÁCE

Problematika přítomnosti biologicky aktivních látek v odpadních vodách se stala velmi závažnou, protože může vést až k vyblokování biologického stupně čištění těchto vod na ČOV. K biologicky aktivním látkám patří především rezidua léčiv. Protože včasné odhalení kontaminace umožňuje odstranění příčiny znečištění odpadních vod, je prvořadým úkolem zajistit jak vhodné metodické postupy pro provozní laboratoře úpraven vody a ČOV, tak rozhodčí metody pro stanovení stopových množství těchto kontaminantů. Toto téma bylo také předmětem předložené diplomové práce.

- Zpracování literární rešerše zahrnující oblast environmentální chemie i analytickou problematiku stanovení léčiv
- Na základě zpracované rešerše provést výběr vhodných preanalytických a spektrofotometrických postupů v UV/VIS oblasti
- Optimální postupy použít pro stanovení vybraných léčiv v reálných vzorcích odpadních vod
- Zhodnocení získaných výsledků

3 TEORETICKÁ ČÁST – LÉČIVA

3.1 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.(2)

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 zasypy, 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. protrahovaného účinku léčiva.(2)

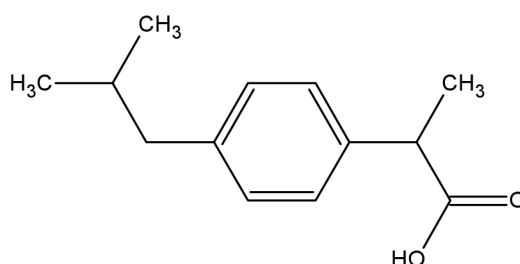
Máme-li tedy léčivý přípravek o určité lékové formě, je připraven ke svému zamýšlenému použití – podání pacientovi. Pokud je podán správným způsobem, jak bylo zamýšleno výrobcem, stává se v tomto okamžiku lékem.(1)

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, nespecifický účinek, malá stabilita, dráždivost, nepříjemná chuť či zápach apod.(2)

3.2 Názvosloví

Každé syntetické léčivo je chemická sloučenina, kterou můžeme pojmenovat systematickým názvoslovím podle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry – Meziná-

rodní 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 ochrany. Jako příklad lze uvést analgetikum a protizánětlivou látku ibuprofen (Obrázek 1). Její systematický název je kyselina (±) 2-(4-isobutylfenyl)propanová a na trhu se prodává pod nejrůznějšími obchodními názvy: AKTREN, BRUFEN, DOLGIT, EXNEUTRAL, IBUMERCK, MOTRIN, NUROFEN a mnohé další.(2)



Obrázek 1: Vzorec ibuprofenu

3.3 Historie

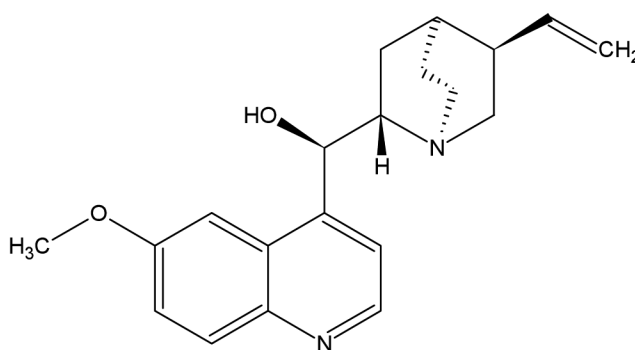
V průběhu historie prodělal způsob získávání léčiv pozoruhodný vývoj. Na jeho počátku byla léčiva připravována výhradně z přírodních zdrojů a vznikala na základě zkušeností lidového léčitelství. Na jeho konci jsou průmyslově vyráběná chemoterapeutika definovaného složení a účinku. Moderní chemoterapeutika jsou výsledkem racionálního výběru prováděného v rámci cíleného farmaceutického výzkumu a představují většinu z léčiv užívaných v současné době.(2)

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)

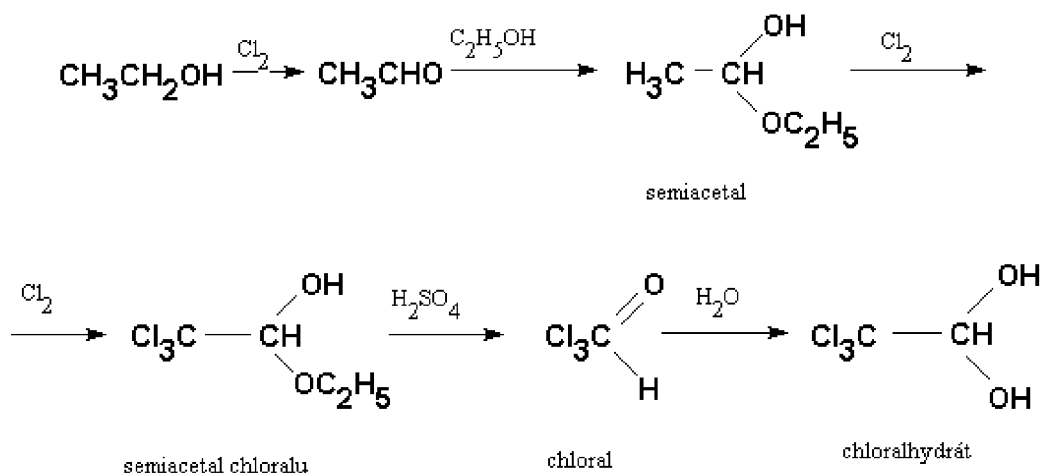
První cílená léčba chemickými prostředky byla Paracelsem propagovaná (a snad i vyvinutá) „šedá masť“ na syfilitické vředy. Jejím základem byla suspenze rtuti v sádle. Dnes víme, že působila především celkově, kdy se rtuť přes rány částečně vstřebala a baktericidně působila na spirochety. Přestože nestačila na jejich kompletní zničení, postačovala k převedení infekce na mírněji probíhající formu.(4)

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.

Bouřlivý rozvoj chemie v průběhu 19. století dal vzniknout specializovanému farmaceutickému průmyslu. Průmyslově se začalo izolovat antimalarikum a antipyretikum chinin (Obrázek 2) z kůry chininovníku. Objevila se první organická léčiva, pro jejichž struktury neexistuje v přírodě obdoba: inhalační anestetika diethylether a chloroform, sedativum a hypnotikum chloralhydrát (Obrázek 3), antipyretikum a analgetikum acetanilid – antifebrin a mnohé další. Léčiva z toho období se označují jako léčiva druhé generace.(2)



Obrázek 2: Vzorec chininu



Obrázek 3: Postup při výrobě chloralhydrátu (5)

Snaha o zjednodušení struktury léčiv a jejich obměny vedla v řadě případů k rozpoznání tzv. nepostradatelného či esenciálního strukturálního fragmentu molekuly, který určuje biologickou

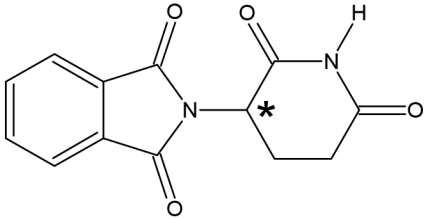
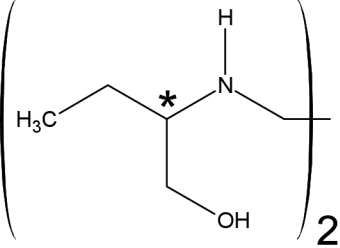
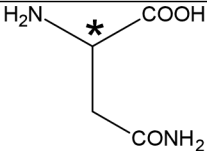
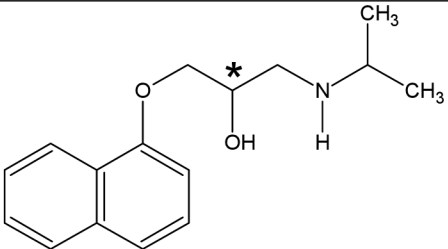
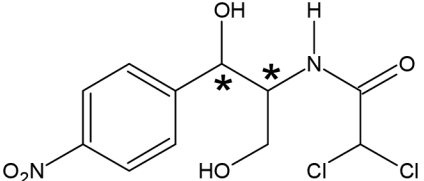
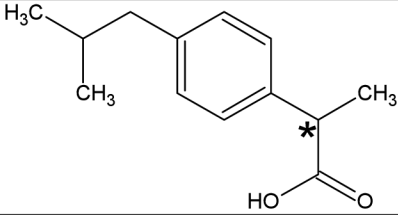
aktivitu látek. Látky, které vznikly cílenou obměnou struktury sloučenin přírodního či syntetického původu o známém biologickém účinku, se považují za léčiva třetí generace.(2)

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.(2)

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 tak 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.(2)

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 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 teratogenní účinky.(2) V následující tabulce jsou uvedeny některé další příklady stereoizomerů a jejich vlastnosti.

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

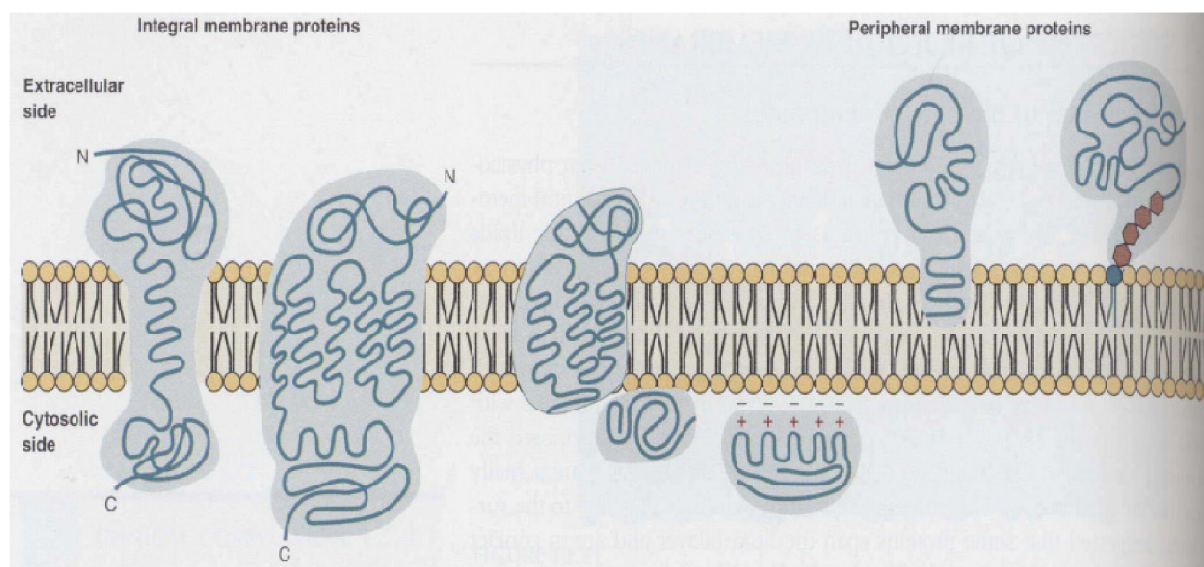
Thalidomid		<i>R</i> - ne-teratogenní <i>S</i> - extrémně teratogenní
Ethambutol		<i>R,R</i> - způsobuje oslepnutí <i>S,S</i> - tuberkulostatikum
Asparagin		<i>R</i> - sladký <i>S</i> - hořký
Propranolol		<i>R</i> - kontraceptivum <i>S</i> - antihypertenzivum, anti-arytmikum
Chloramfenikol		<i>R,R</i>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

3.4 Mechanismy transportu léčiv v organismu

Membránový transport je souborné označení dějů, při němž látky různého typu překonávají bariéru biologické membrány. Z hlediska mechanismu přenosu částic rozlišujeme transport volnou difuzí, dočasnými nebo trvalými póry, usnadněnou difuzí pomocí nízkomolekulárních nebo vysokomolekulárních přenašečů, mechanismem endocytózy nebo exocytózy. Z hlediska energetického rozeznáváme transport pasivní a aktivní. (7) (Obrázek 5)

3.4.1 Biomembrány

Membrány jsou tvořeny dvojrstvou fosfolipidů poutaných k sobě hydrofobními interakcemi. Polární, hydrofilní skupiny (tzv. „hlavy“) molekul fosfolipidů směřují vně membrány, hydrofobní alkylové řetězce jsou orientovány do nitra dvojrstvy (Obrázek 4). V této dvojrstvě jsou svými hydrofobními částmi rovněž „zakotveny“ různé proteiny, které účinkují jako enzymy, iontové kanály či pumpy, receptory apod. Membrána je útvarově dynamickým a jednotlivé molekuly se v ní mohou pomalu přemísťovat. Uvedený model membrány se často nazývá tekutou mozaikou.(2)



Obrázek 4: Struktura biomembrány (8)

3.4.2 Prostá difúze

K průchodu látek přes membránu dochází na základě koncentračního spádu, a proto přenos probíhá bez spotřeby energie. Přenášenými látkami jsou málo polární molekuly malých rozměrů nebo různé druhy plynů.(9)

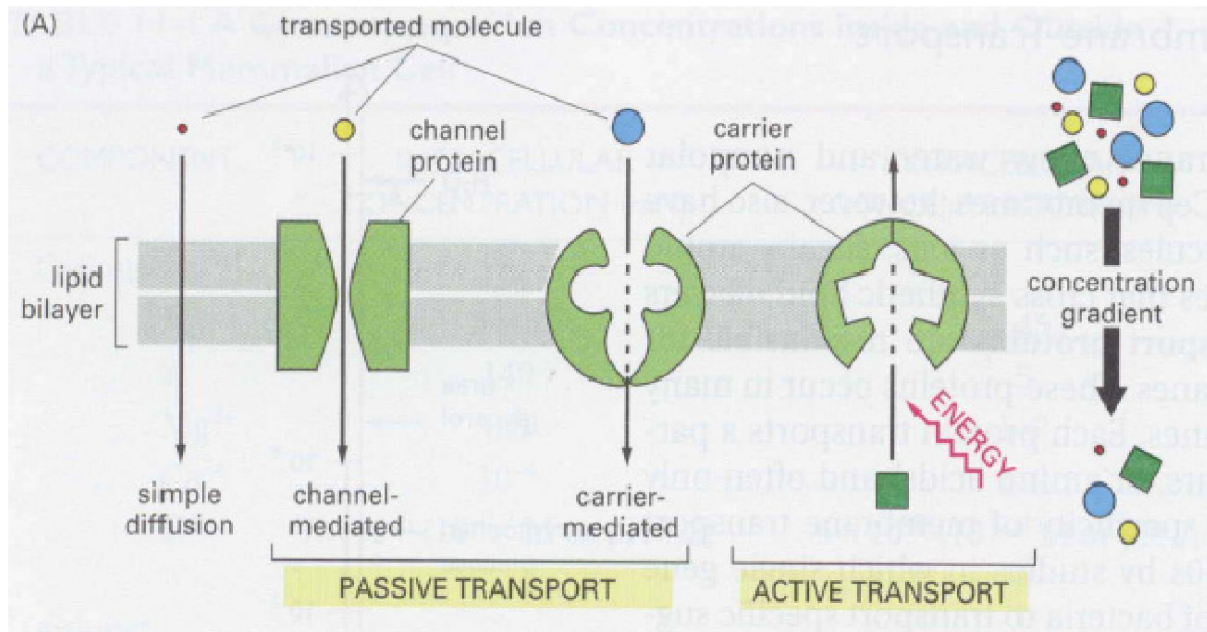
3.4.3 Pasivní transport – usnadněná difúze

Látky se pohybují ve směru koncentračního spádu bez spotřeby energie.(9) Schopnost látek překonávat membrány pasivním transportem závisí na jejich lipofilitě. Pro vyjádření míry lipofility určité látky slouží hodnota jejího rozdělovacího koeficientu v systému 1-oktanol a voda (K_{OW}). U léčiva, které je buď slabou kyselinou či zásadou, závisí rychlost jeho transportu přes lipidické membrány v organismu na stupni ionizace daném hodnotou pak příslušné konjugované kyseliny.(2)

3.4.4 Aktivní transport

Je zprostředkovaný specializovanými membránovými strukturami, jako jsou transportní proteiny, iontové kanály apod. Uvedený transport může probíhat proti koncentračnímu gradientu

a k jeho uskutečnění je obvykle nezbytná energie získávaná štěpením adenosintrifosfátu (ATP). Nezbytnou podmínkou aktivního transportu pomocí transportních proteinů je schopnost dané látky vytvořit komplex s příslušnou bílkovinou. Transport léčiv iontovými kanály je málo obvyklý. Výjimku tvoří léčiva, která jsou anorganickými iontovými sloučeninami.(2)



Obrázek 5: Membránový transport (8)

3.4.5 Endocytóza

3.4.5.1 Pinocytóza

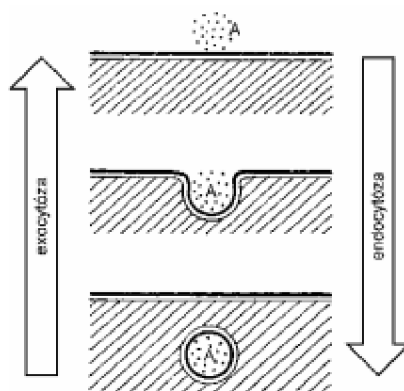
Jde o druh endocytózy (přijímání látek do buňky), kde přijímané látky jsou ve formě tekutin. Dochází k vchlípení části plazmatické membrány a vytvoření váčku, který obsahuje transportované tekutiny.(9)

3.4.5.2 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)

3.4.6 Exocytóza

Prostřednictvím exocytózy buňka vydává nepotřebné látky, které jsou uzavřené v měchýřcích ohraničených membránou. Tyto látky putují k plazmatické membráně, se kterou splynou a svůj obsah vyvrhují do okolí buňky.(9)



Obrázek 6: Endocytóza a exocytóza (10)

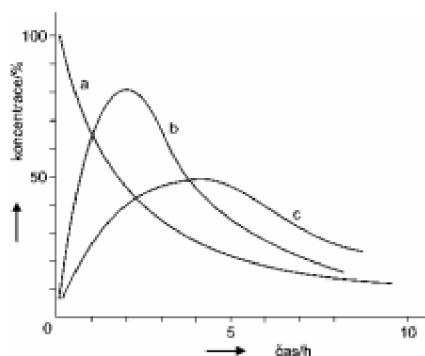
3.5 Osud léčiva v organismu

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 :

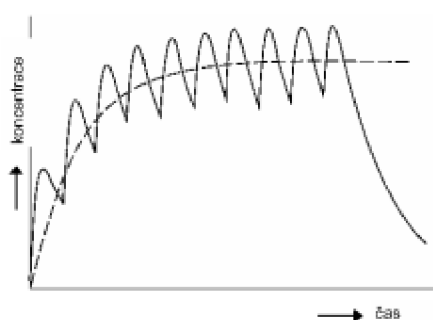
$$K = \frac{c_{LP}}{c_L \cdot c_P}, \quad (\text{Rovnice 1})$$

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

Léčivo 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 k neúčinné látce (inaktivace, detoxikace) nebo naopak k látce účinnější (aktivace). Jsou známy i případy, kdy metabolickými přeměnami vzniká látka toxická nebo 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 hydrolýza za vzniku metabolitů, které jsou obvykle polárnější a tudíž lépe rozpustné v tělních tekutinách než původní látka. V druhé fázi probíhají konjugační (syntetické) reakce s endogenními produkty normálního metabolismu a vzniklý konjugát, který je ve vodě rozpustný, se vylučuje převážně močí, stolicí a potem.(2)



Obrázek 7: Závislost koncentrace látky v krvi na čase (koncentrace je udána v % výchozího stavu). (a) – jednorázové intravenózní podání, (b) a (c) – jednorázové perorální podání (11)



Obrázek 8: Typický průběh závislosti koncentrace léčiva v krvi na čase při opakovaném podání (12)

3.6 Mechanismy účinku léčiv

3.6.1 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 a nakonec 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.(2)

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.

Přirozenými ligandy receptorů v organismu jsou různé endogenní látky, jako hormony, neurotransmitéry, autakoidy (tzv. lokální hormony působící pouze v místě svého vzniku) apod. Látky, které po navázání na receptor vyvolávají podobné účinky jako přirozené ligandy, nazýváme agonisty příslušného endogenního působku. Látky, které brání účinku endogenních působků, nazýváme jejich antagonisty.(2)

3.6.2 Nеспецифické 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)

3.7 Rozdělení a jednotlivé typy běžných léčiv

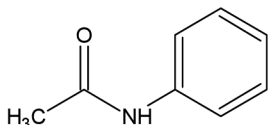
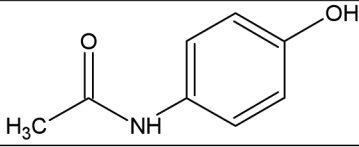
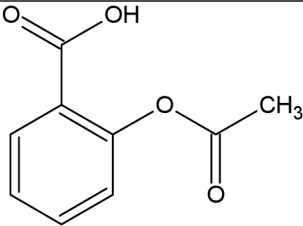
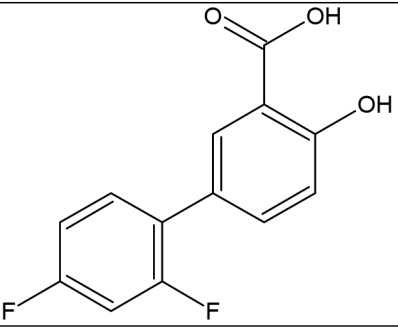
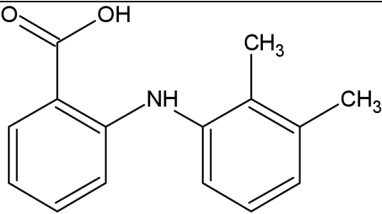
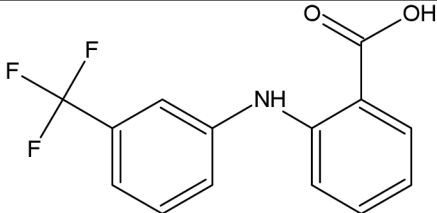
3.7.1 Analgetika

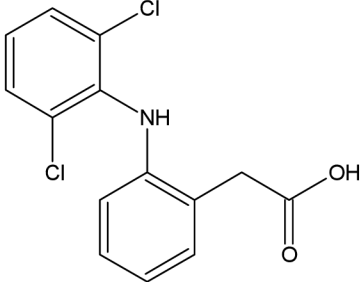
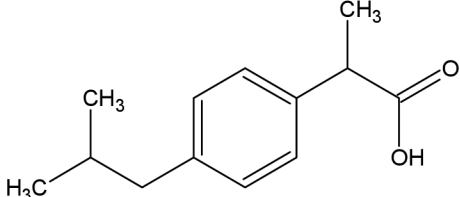
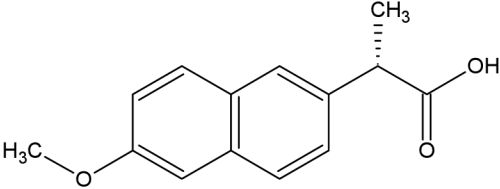
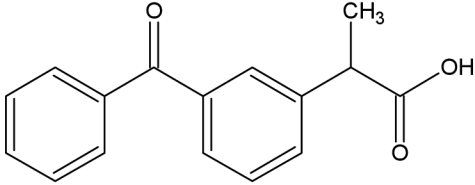
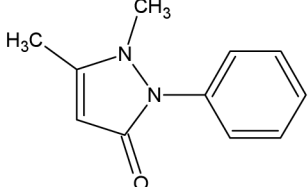
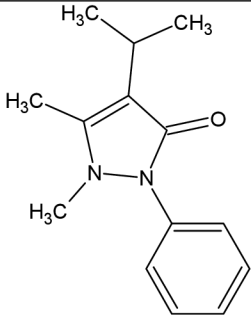
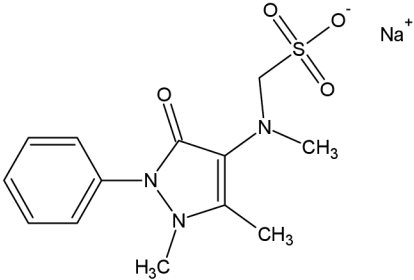
Analgetika jsou látky, které snižují až potlačují pocit bolesti, aniž by však výrazně ovlivňovaly smyslové vnímání a vědomí. Přestože analgetika neléčí příčinu onemocnění, jejich podávání může významně napomáhat vlastnímu léčení tím, že snižují zátěž a stres organismu způsobený bolestí, zánětem a zvýšenou teplotou.(2)

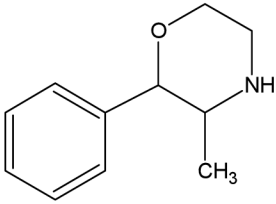
3.7.1.1 Nenarkotická analgetika

Veškerá nenarkotická analgetika (Tabulka 2) vykazují kromě analgetického rovněž antipyretický a antiflogistický účinek. Přestože mají všechna tato léčiva podobný mechanismus působení, u některých vystupují více do popředí antipyretické vlastnosti (analgetika-antipyretika) a u jiných naopak účinky protizánětlivé (nesteroidní protizánětlivé látky). Z hlediska chemické struktury lze nenarkotická analgetika rozdělit na deriváty anilinu, deriváty kyseliny salicylové, deriváty kyseliny anthranilové, deriváty 2-arylalkanových kyselin, tzv. kyselé enol-deriváty (různé typy enolizujících oxoheterocyklických sloučenin) a další.(2)

Tabulka 2: Nenarkotická analgetika (v prvním sloupci je název léčiva, v posledním příklady vyráběných léků)

Deriváty anilinu		
acetanilid		Antifebrin
paracetamol		Paralen, Panadol
Deriváty salicylové kyseliny		
acetylsalicylová kyselina		Acylpyrin, Aspirin
diflunisal		Dolobid
Deriváty anthranilové kyseliny		
mefenamová kyselina		Mefenacid, Parkemed
flufenamová kyselina		Ansatin, Meralen

Arylalkanové kyseliny		
diklofenak		Voltaren
ibuprofen		Brufen, Brufalgin, Dolgit, Nurofen
naproxen		Naprosyn, Naxen
ketoprofen		Orudis, Ketofen, Meprofen
Deriváty pyrazolu a pyrazolidionu		
fenazon		Antipyrin, Felsol
propyfenazon		Laradon, Pireuma, Valetol, Saridon
metamizol (dipyrón)		Novalgin, Novamisulfon

Arylsulfonamidy (oxikamy)		
tenoxikam		Liman, Tilcotil, Mobiflex, Dolmen

3.7.1.2 Narkotická analgetika

Narkotická analgetika (anodyna) jsou agonisty opioidních receptorů v mozku. Nejstaršími a neznámějšími silnými analgetiky jsou přírodní morfinany izolované z opia, což je zaschlá šťáva z nezralých makovic máku setého. Hlavními nevýhodami všech narkotických analgetik, ať jde o přírodní látky, jejich polysyntetická nebo zcela syntetická analoga, je vznik tolerance vůči jejich účinkům a možnost vzniku závislosti na těchto látkách. S ohledem na možné zneužívání je výroba, distribuce a podávání prakticky veškerých narkotických analgetik pod přísnou kontrolou. K dalším nežádoucím účinkům silných analgetik, zejména morfinového typu, patří ospalost, nevolnost (nauzea), zácpa a především útlum dýchání, který může vést až ke smrti.(2)

3.7.2 Sedativa a hypnotika

Léčiva z této skupiny způsobují zklidnění centrální nervové soustavy, často provázené i zmírněním stavů úzkosti. Útlum CNS způsobený vyššími dávkami sedativ navozuje stav podobný přirozenému spánku. V takovém případě pak hovoříme o hypnotikách. Neexistuje ostrá a přesně definovaná hranice mezi sedativy a hypnotiky.

Většina sedativ-hypnotik používaných v současné době obsahuje ve své molekule amidovou skupinu a rozvětvení na uhlíku v α poloze k této skupině. Z hlediska strukturního lze sedativa-hypnotika rozdělit na karbamáty, alifatické acylmočoviny (ureidy), deriváty barbiturové kyseliny, dioxipiperidiny a benzodiazepiny. V současné době patří k nejčastěji používaným sedativům-hypnotikům poslední z uvedených sloučenin, benzodiazepiny.(2)

3.7.3 Psychostimulancia

Psychostimulancia nebo též psychotonika jsou látky stimulující CNS. Udržují organismus ve stavu bdělosti, zvyšují psychickou a fyzickou odolnost (především ve fázi únavy), a tak nepřímo zlepšují náladu. Známými přírodními psychostimulancii jsou deriváty xanthinu – kofein, theofylin a theobromin obsažené v kávě, čaji, nebo kakau. Významnými syntetickými psychostimulancii jsou β -fenylaminoalkany.

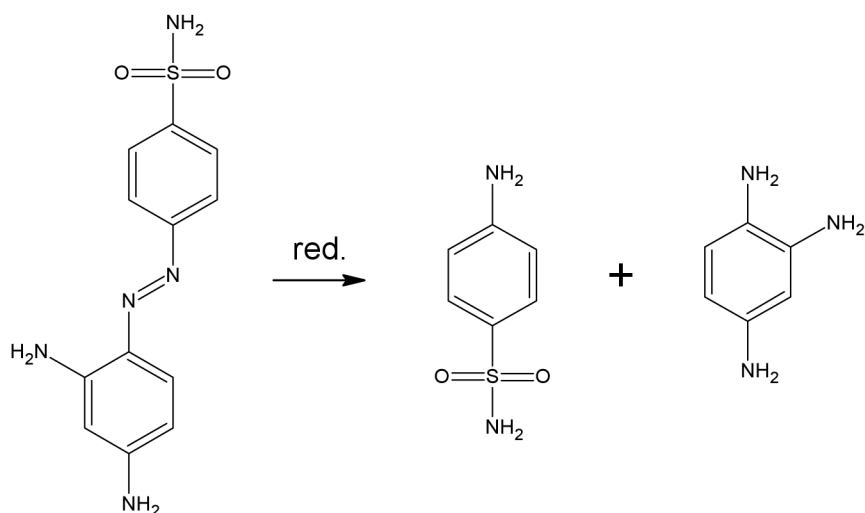
3.7.4 Antibakteriální chemoterapeutika

V současné době existuje celá řada rozmanitých strukturních typů chemoterapeutik používaných k léčení bakteriálních infekcí. K nejvýznamnějším patří především sulfonamidy a chinoliny.(2)

3.7.4.1 Sulfonamidy

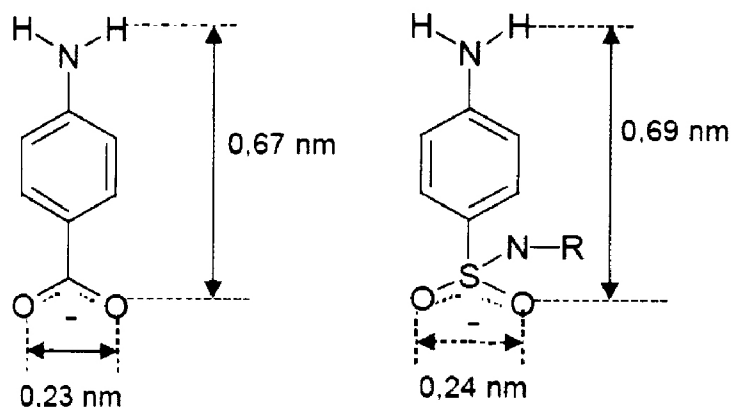
Zavedení sulfonamidů do terapeutické praxe ve druhé polovině 30. let 20. století znamenalo převrat v léčení celé řady bakteriálních infekcí. Přestože pak byly sulfonamidy poměrně krátce nato (koncem 40. a zejména pak v 50. letech) vytlačeny antibiotiky s účinností do té doby nevídanou, prožívají tato léčiva v současné době určitou renesanci. Ta souvisí se vznikem rezistence vůči mnoha antibiotikům u celé řady bakteriálních kmenů.(2)

Sulfonamidy mají původ v azobarvivech používaných na počátku 20. století k vybarvování v textilním průmyslu. Hypotéza, že při vybarvování textilních vláken se azobarviva mohou selektivně vázat na bakterie a tím působit antibakteriálně, dala G. Domagkovi podnět k takovému hodnocení.(13) Jednou z těchto látek bylo i červené barvivo Prontosil rubrum. Třebaže tato látka nebyla při testech *in vitro* účinná, vykazovala – jak bylo později zjištěno – pozoruhodnou aktivitu proti streptokokovým infekcím *in vivo*. Tento rozdíl v účinnosti byl záhy vysvětlen odbouráváním neúčinného prontosilu na antimikrobiálně účinný sulfanilamid (Obrázek 9), ke kterému v organismu dochází.(2)



Obrázek 9: Transformace prontosilu na sulfanilamid (14)

Již první studia ukázala, že základní struktura sulfanilamidu, tj. benzenový kruh v polohách 1 a 4 substituovaný sulfamoylem a primární aminoskupinou, je pro zachování antibakteriální aktivity nezbytná, neboť jeho náhrada jiným aromatickým nebo heterocyklickým systémem účinek ruší. (13) Podstata účinku sulfanilamidu spočívá v jeho strukturní podobnosti s *p*-aminobenzoovou kyselinou (PABA) (Obrázek 10), kterou mikroorganismy využívají k tvorbě kyseliny listové, potřebné pro syntézu DNA. Sulfanilamid soutěží s PABA o enzym dihydropteroátsyntetasu a vytváří nefunkční analoga kyseliny listové. Důsledkem je bakteriostatický účinek sulfanilamidu. Živočišné buňky nejsou schopny syntetizovat kyselinu listovou, jsou závislé na exogenních zdrojích, a proto nejsou vůči působení sulfonamidů citlivé.(2)



Obrázek 10: Sterická podobnost PABA se sulfonamidy (14)

V průběhu let bylo syntetizováno a testováno několik tisíc různých sulfonamidů. Do praxe bylo zavedeno cca 150 druhů těchto substancí. Veškeré strukturální modifikace byly motivovány dosažením vyšší antibakteriální účinnosti nebo širšího antibakteriálního spektra, prodloužením doby účinku apod. Základní strukturální jednotkou všech sulfonamidů je sulfanilamid. Obměny této matečné sloučeniny spočívají buď v substituci dusíkového atomu sulfonamidové skupiny (tzv. N^1 -deriváty) nebo aminoskupiny v poloze 4 (tzv. N^4 -deriváty), popřípadě v kombinaci obou možností. Převážnou většinu v současné době využívaných sulfonamidů tvoří N^1 -substituované deriváty.(2)

3.7.4.2 Chinolony

Chinolonová chemoterapeutika se používají v léčbě močových infekcí od 60. let minulého století. V průběhu posledních 25 let jsou do klinického používání zaváděny jejich deriváty se systémovým účinkem, souhrnně nazývané fluorochinolony. Současné fluorochinolony lze charakterizovat jako baktericidní přípravky se širokým antimikrobním spektrem, vysokou biologickou dostupností perorálních forem, dlouhým biologickým poločasem a dobrou snášenlivostí.

Nárůst spotřeby fluorochinolonů v nemocničním prostředí i v komunitě byl následován rychlým vzestupem a šířením rezistence mikrobů. Chinolony patří k vůbec nejrizikovějším skupinám antimikrobních léčiv, protože rezistence k nim vzniká velmi rychle, u některých původců infekcí už v průběhu léčby, a je povětšinou zkřížená mezi všemi zástupci. Proto fluorochinolony ztrácejí své postavení účinného léku pro úvodní léčbu většiny infekcí.(15)

3.7.5 Antibiotika

Antibiotika se obvykle definují jako látky produkovány mikroorganismy, zasahující do růstu jiných mikroorganismů. Od syntetických chemoterapeutik se tedy odlišují především způsobem svého vzniku. Za antibiotika se však považují i jejich analoga (např. penicilin V, ampicilin a další), získávaná syntetickými postupy ze základních látek nebo polysyntetických prekurzorů. Označení „antibiotikum“ se váže k příslušné struktuře, nikoliv k reálnému původu látky.(2)

Historie antibiotik sahá až do devatenáctého století. R. 1877 popsal L. Pasteur antagonistické působení některých anaerobních bakterií na růst bacilu *B. anthracis* a poukázal na možnost využití tohoto poznatku v medicíně. Praktickému využití prvních známých antibiotik (např. pyocyanasy z *B. pyogenes*, popsané R. Emerichem a O. Lowem r. 1894) bránila jejich toxicita. Éru antibiotik zahájil až objev penicilinu roku 1929 Alexandrem Flemingem. Trvalo však více než deset let, než byla zvládnuta jeho příprava v technologickém měřítku (H. W. Florey a E. Chain). Ve 40. a 50. letech byly učiněny další zásadní objevy v této oblasti: streptomycin (1944), bacitracin (1945), chloramfenikol (1947), chlortetracyklin (1948), erytromycin (1952) a mnoho dalších. Počet dodnes izolovaných a charakterizovaných antibiotik se odhaduje na stovky, využití v medicíně však našla pouze malá část těchto látek. Důvodem je vysoká toxicita většiny antibiotik.(2)

Hlavní indikační oblasti antibiotik jsou infekční onemocnění bakteriálního a fugálního původu; často se však též podávají jako prevence proti druhotné nákaze např. v případech těžších viróz. Antibiotika vykazují v řadě případů pozoruhodnou antimikrobiální aktivitu, a proto byla v počátcích svého používání ve 40. a 50. letech považována za zázračné a všemocné léky. Postupem doby se však objevily problémy provázející jejich nasazení. Řada pacientů vykazuje alergickou reakci na některá antibiotika (nejčastěji na peniciliny). Hlavní problém však představuje rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům.(2)

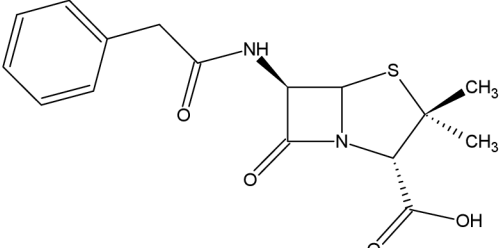
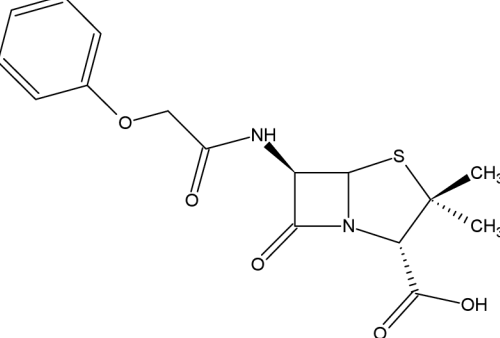
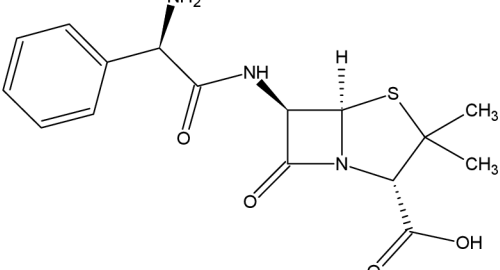
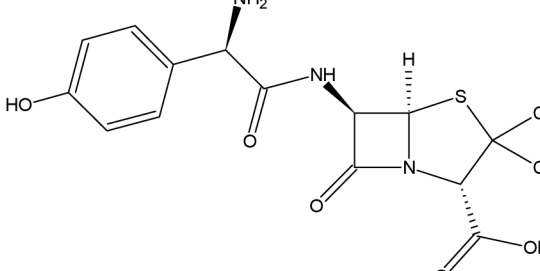
Nejdůležitější vlastností antibiotik je selektivita jejich účinku; zasahují struktury, které jsou specifické pro mikroorganismy a pacienta víceméně nepoškozují. Podle působení na bakterie se antibiotika dělí na dvě velké skupiny: baktericidní a bakteriostatická.(16) Rozdělení na bakteriostatické a baktericidní není zcela přesné, protože mnoho bakteriostatických antibiotik působí ve vyšších koncentracích rovněž baktericidně. Příkladem může být chloramfenikol u meningokokové infekce. Naopak některá baktericidní antibiotika neusmrcují určité bakterie ani ve vysokých koncentracích, jako je tomu u penicilinu G při působení na enterokoky. Jiným hlediskem je zařazení antibiotik do skupin podle farmakoterapeutického účinku: protistafylokoková, protipseudomonádová, antianaerobní, protituberkulózní aj.(17)

3.7.5.1 β -Laktamová antibiotika

Charakteristickým strukturním rysem těchto antibiotik je β -laktamový kruh kondenzovaný s heterocyklem – např. thiazolidinem (u penicilinů), dihydrothiazinem (u cefalosporinů a cefamycinů) a thiazolinem (u penemů).

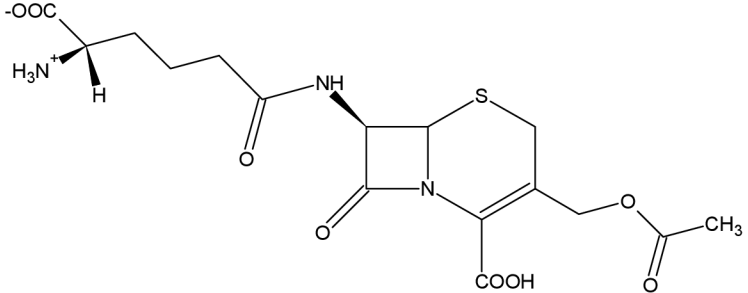
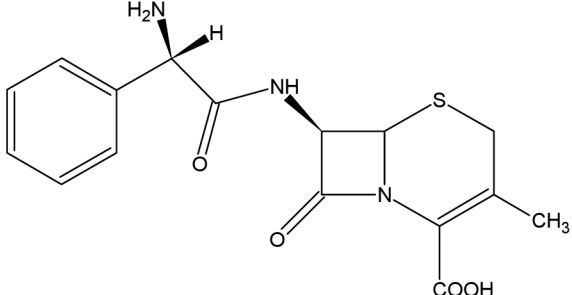
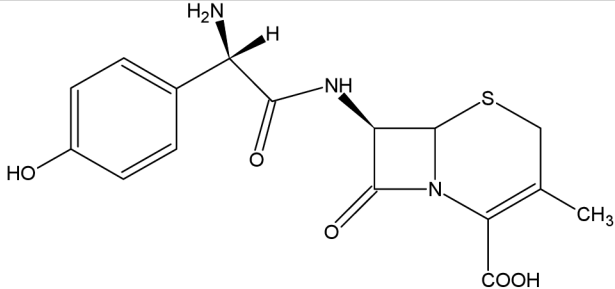
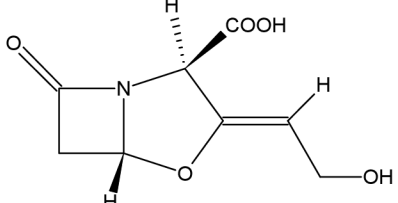
Nejdéle používanými antibiotiky jsou peniciliny (Tabulka 3), izolované z plísní *Penicillium notatum* nebo *P. chrysogenum*. Z penicilinů doznal největšího rozšíření penicilin V, především díky své stabilitě, umožňující perorální podání. Z tzv. polysyntetických penicilinů patří k nejznámějším ampicilin a amoxycilin. Peniciliny působí jako inhibitory tvorby bakteriální buněčné membrány u grampozitivních bakterií. Rezistentní kmeny bakterií rozkládají peniciliny účinkem enzymu β -laktamázy.(2)

Tabulka 3: Peniciliny

penicilin G	
penicilin V	
ampicilin	
amoxycilin	

Cefalosporiny (Tabulka 4), izolované z hub *Cephalosporium*, obsahují ve své molekule dihydrothiazinový cyklus. Jedná se rovněž o dipeptidová antibiotika biogeneticky odvozená od valinu a cysteinu. Cefalosporiny jsou účinné převážně proti gramnegativním bakteriím. Na rozdíl od penicilinů bývají odolné vůči β -laktamase. Jejich spektrum účinků a stabilita však závisí na typu substituce. Cefalosporinům jsou podobné cefamyciny produkované houbami rodu *Streptomyces*, které se od cefalosporinů liší přítomností methoxyskupiny v poloze 7.(2)

Tabulka 4: Cefalosporiny a cefamyciny

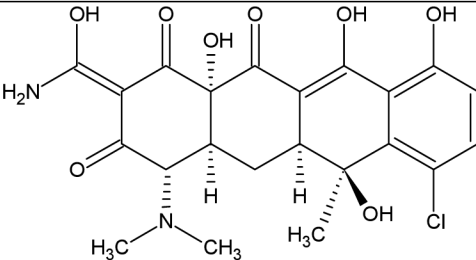
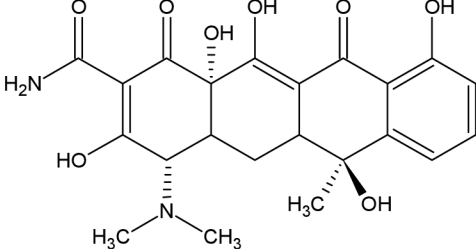
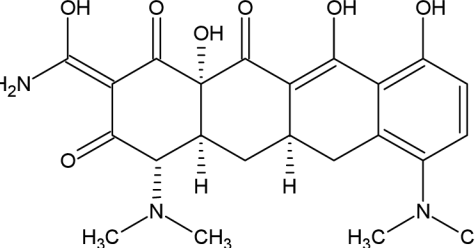
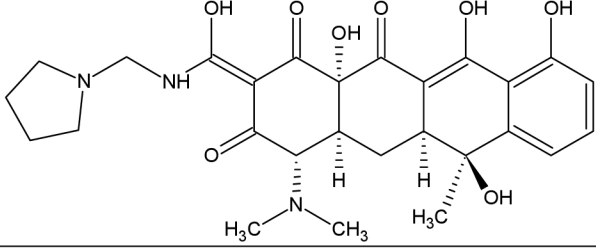
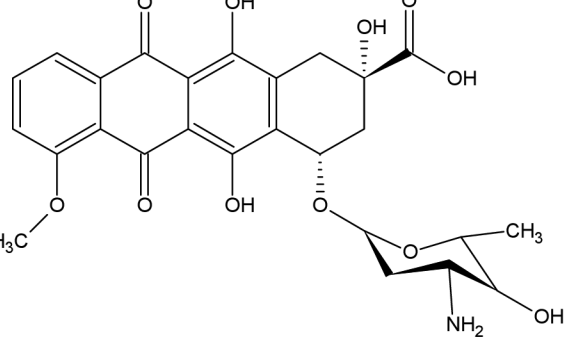
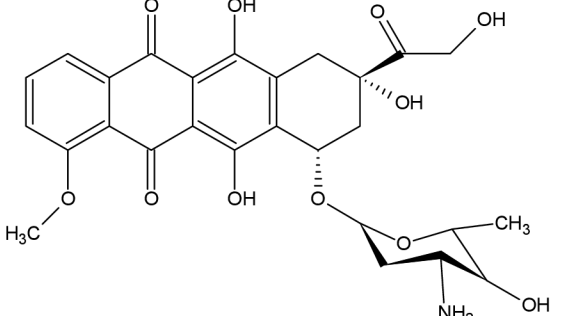
cefalosporin C	 <p>The structure shows the cefalosporin core with a 7-aminocaproyl side chain at position 7, a methyl group at position 6, and an acetoxy group at position 3. The 4-position is a carboxylic acid group.</p>
cefalexin	 <p>The structure shows the cefalosporin core with a phenylglycine side chain at position 7, a methyl group at position 6, and a carboxylic acid group at position 3.</p>
cefadroxil	 <p>The structure shows the cefalosporin core with a 4-hydroxyphenylglycine side chain at position 7, a methyl group at position 6, and a carboxylic acid group at position 3.</p>
klavulanová kyselina	 <p>The structure shows the clavulanic acid core, which is a bicyclic beta-lactam with a hydroxymethyl group at position 2 and a carboxylic acid group at position 3.</p>

3.7.5.2 Tetracykliny a anthracykliny

Tetracykliny (Tabulka 5) produkované houbami rodu *Streptomyces* jsou deriváty částečně hydrogenovaného naftacenu. Jedná se o antibiotika se širokým spektrem účinků. Působí proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, spirochétám, rickettsiím a chlamydiím. Tetracykliny však vykazují i celou řadu nežádoucích vedlejších účinků. K nejzávažnějším z nich patří deformace kostí a zubů někdy i inhibice jejich růstu.(2)

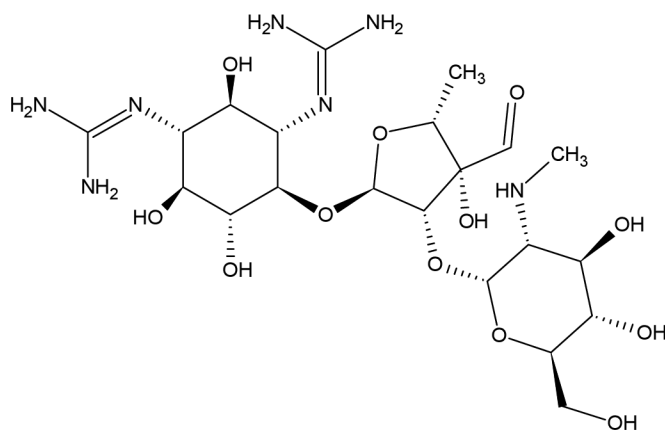
Ke skupině tetracyklinů se řadí i anthracyklinová antibiotika (Tabulka 5), izolovaná z různých druhů rodu *Streptomyces*. Anthracykliny obsahují ve své molekule kromě derivátu naftacenu (s antrachinonovým seskupením) též cukernou složku, tzv. daunosamin. Anthracykliny se používají k léčení různých nádorových onemocnění.(2)

Tabulka 5: Tetracykliny a anthracykliny

chlortetracyklin	 <p>The structure shows a tetracycline core with a chlorine atom at the 7-position and a dimethylamino group at the 4-position. The 12a-position has a methyl group and a hydroxyl group, and the 12b-position has a hydroxyl group.</p>
tetracyklin	 <p>The structure shows a tetracycline core with a dimethylamino group at the 4-position. The 12a-position has a methyl group and a hydroxyl group, and the 12b-position has a hydroxyl group.</p>
minocyclin	 <p>The structure shows a tetracycline core with dimethylamino groups at both the 4 and 7 positions. The 12a-position has a methyl group and a hydroxyl group, and the 12b-position has a hydroxyl group.</p>
rolitetracyklin	 <p>The structure shows a tetracycline core with a dimethylamino group at the 4-position and a pyrrolidine ring attached to the 2-position via an amide linkage. The 12a-position has a methyl group and a hydroxyl group, and the 12b-position has a hydroxyl group.</p>
daunomycin	 <p>The structure shows an anthracycline core with a methoxy group at the 10-position, a hydroxyl group at the 14-position, and a daunosamine sugar attached to the 13-position. The daunosamine sugar has a methyl group and a hydroxyl group at the 2-position, and an amino group and a hydroxyl group at the 3-position.</p>
doxorubicin	 <p>The structure shows an anthracycline core with a methoxy group at the 10-position, a hydroxyl group at the 14-position, and a daunosamine sugar attached to the 13-position. The daunosamine sugar has a methyl group and a hydroxyl group at the 2-position, and an amino group and a hydroxyl group at the 3-position.</p>

3.7.5.3 Aminoglykosidy

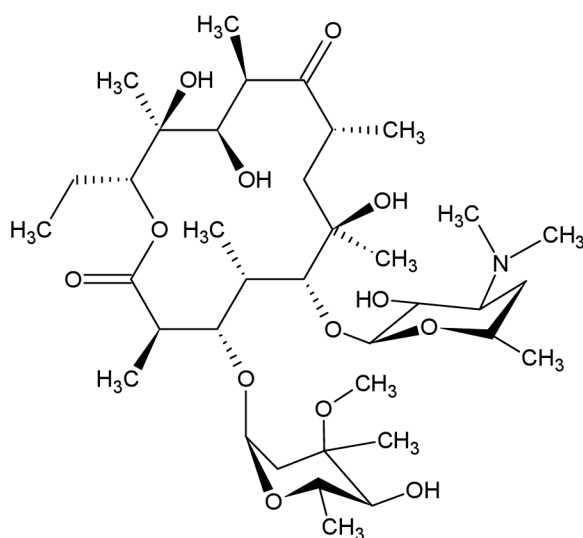
Nejznámějším zástupcem této skupiny antibiotik je streptomycin (Obrázek 11), který je produktem plísně *Streptomyces griseus*, a je účinný proti gramnegativním mikroorganismům. Patří k léčivům „první linie“ používaným proti původcům tuberkulózy (*Mycobacterium tuberculosis*).⁽²⁾



Obrázek 11: Streptomycin

3.7.5.4 Makrolidy

Makrolidy jsou charakterizovány polyfunkčním makrocyclickým laktonovým kruhem (obsahujícím obvykle 14 až 16 atomů), ke kterému jsou připojeny cukry. K nejvýznamnějším patří erythromyciny (Obrázek 12) produkované plísní *Streptomyces erythreus*. Používají se k léčení stafylokokových infekcí rezistentních vůči penicilinu a dále u pacientů s alergií na penicilin.⁽²⁾



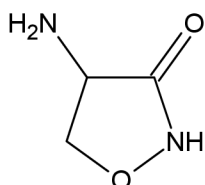
Obrázek 12: Erythromycin

3.7.5.5 Peptidová antibiotika

Jde výhradně o nízkomolekulární oligopeptidy, jejichž molekulová hmotnost nepřesahuje hodnotu 1500. Peptidová antibiotika často obsahují aminokyseliny, které se obvykle v živočišných a rostlinných proteinech nevyskytují. Vyjímkou nebývají ani aminokyseliny řady D. Součástí molekuly těchto antibiotik často bývají strukturní jednotky, které nejsou aminokyselinami. Prakticky veškerá peptidová antibiotika bývají poměrně rezistentní vůči působení proteolytických enzymů; tato skutečnost je obvykle důsledkem přítomnosti „nepřirozených“ strukturních elementů, jako jsou např. D-aminokyseliny.(2)

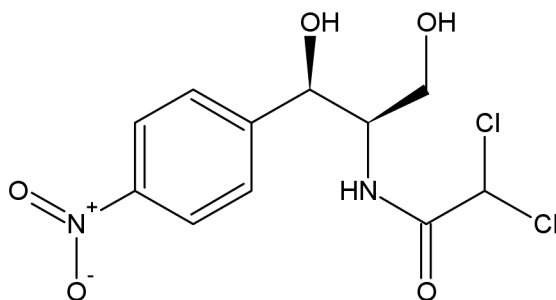
3.7.5.6 Ostatní antibiotika

Cykloserin (Obrázek 13), produkovaný plísní *Streptomyces garyphalus* nebo *Streptomyces orchideaceus*, je antibiotikum se širokým spektrem účinku. Působí na grampozitivní i gramnegativní bakterie, včetně mykobakterií; často se proto používá při léčení tuberkulózy.



Obrázek 13: Cykloserin

Chloramfenikol (Obrázek 14), původně izolovaný z plísně *Streptomyces venezuelae*, se po mnoho let používal jako širokospektrální antibiotikum účinné proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, spirochetám a rickettsiím. Pro celou řadu nežádoucích vedlejších účinků, především na kostní dřevě, je dnes jeho používání prakticky po celém světě zakázáno.



Obrázek 14: Chloramfenikol

3.8 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.(18) Léčiva, která po požití projdou trávicím traktem, vstupují do čistíren odpadních vod a touto cestou se tak dostávají do vodního ekosystému a vodního hospodářství. Pakliže jsou tyto farmaceutické výrobky biologicky aktivní, mají negativní vliv na

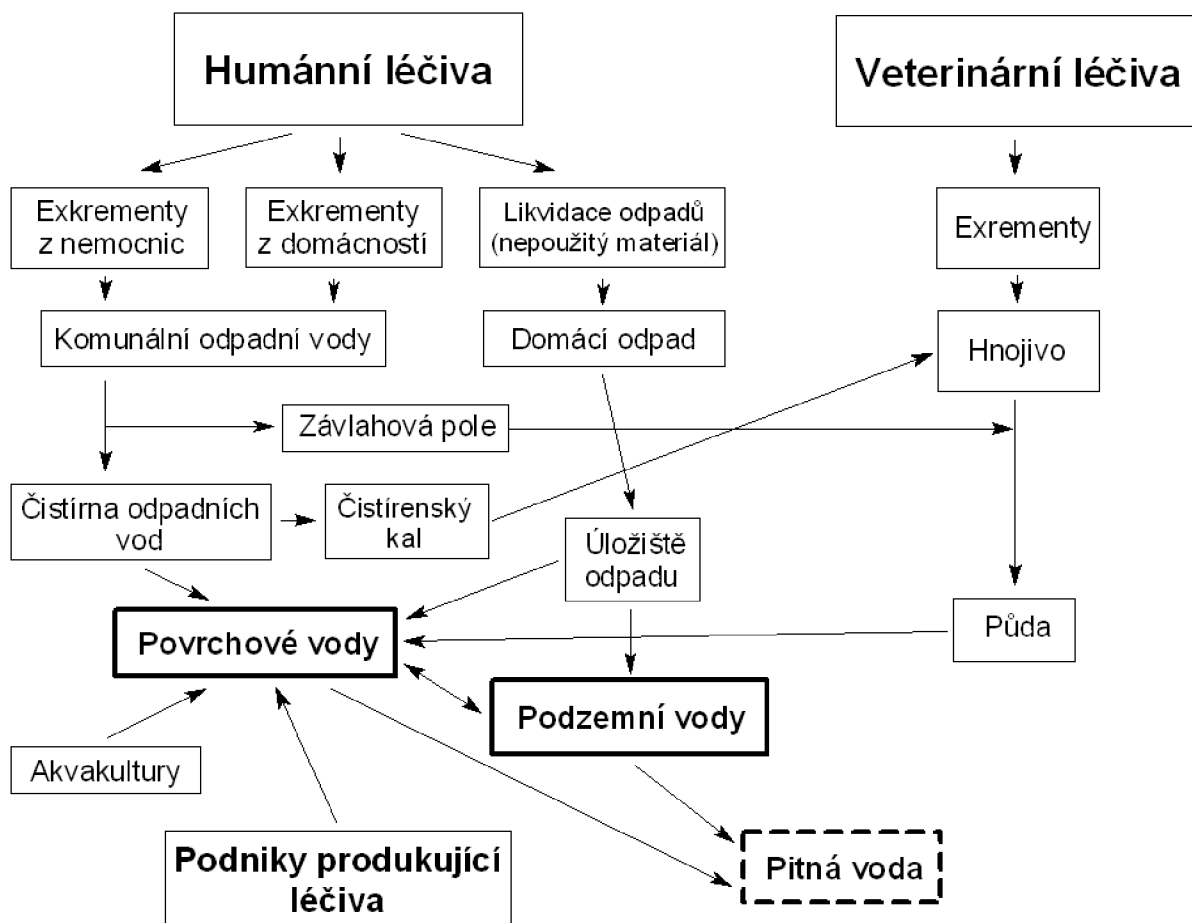
vodní i suchozemské ekosystémy a mívají tendenci k bioakumulaci.(19) Další cesty průniku léčiv do životního prostředí vznikají již při samotné výrobě a dále při neodborné likvidaci nepoužitých nebo prošlých léků.(20) Dalším problémem je, že vysoké procento léčiv je z těla vyloučeno v nemetabolizované formě a vstupuje do odpadních vod jako biologicky aktivní látky, jejichž environmentální dopad není příliš 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.(21)

3.8.1 Aspekty biotransformace léčiv

Nemetabolizovaná léčiva patří mezi nejhůře biologicky odbouratelné látky v životním prostředí.(22) Mnoho těchto látek je perzistentních a lipofilních a jsou schopné prostupovat biomembránami, což jim umožní provést specifické biologické funkce.(19) Většina farmak vstupujících do cílového organismu projde určitým stupněm metabolické přeměny.(21) Obecně by se dalo říci, že tím, jak metabolické procesy zvyšují rozpustnost těchto látek ve vodě, usnadňují exkreci a minimalizují tak jejich potenciální toxicitu. V opačném případě, čím se molekuly stávají více hydrofobními, tím se také brzdí jejich exkrece.(23) Není ovšem pravidlem, že metabolické přeměny vždy snižují toxicitu léčiva. Tento fakt upozorňuje na skutečnost, že zkoumání účinků látek pouze ve formě, ve které vstupují do organismu, je nedostatečné.(24) Další problém nastává v případě, jsou-li produkty detoxikace následně přeměňovány již mikroflórou tlustého střeva nebo mikroorganismy přítomné v kanalizačním odpadu. Tento proces přeměny se nazývá „dekonjugace“ a je patrný při detekci biologicky aktivních léčiv v odpadech z čistíren a vstupech do životního prostředí.(25)

3.8.2 Zdroje průniku léčiv do životního prostředí

Rezidua léčiv vstupují do životního prostředí třemi základními cestami (Obrázek 15): úmyslným nebo neúmyslným únikem z podniků vyrábějících léčiva, vypouštěním veterinárních nebo zemědělských farmak po terapeutickém nebo komerčním použití a průnikem humánních léčiv nejčastěji z odpadních vod.(26)



Obrázek 15: Průnik a pohyb léčiv v životním prostředí (26)

3.8.2.1 Kontaminace z podniků vyrábějících léčiva

Výrobní léčiv jsou spojeny s relativně nízkým stupněm kontaminace životního prostředí, neboť jejich odtoky bývají pečlivě monitorovány. Místní předpisy obvykle předcházejí jakýmkoli záměrným únikům kontaminovaného materiálu do životního prostředí. Pokud dojde k nehodě, znečištění do okolí bývá většinou bodové a procesy dekontaminace bývají zpravidla okamžité a efektivní.(27)

3.8.2.2 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.(19) Mezi nejčastěji používané substance patří několik druhů antibiotik, 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.(28)

Léčiva používaná v zemědělském průmyslu vstupují do životního prostředí prostřednictvím zvířecích exkrementů přímo nebo při jejich aplikaci jako hnojiva.(29) V každém případě antibiotika přechází přímo ze zvířat do životního prostředí, bez možné transformace na méně aktivní metabolity v čistírnách odpadních vod. Biodegradace přímo v zažívacím traktu zvířat připadá sice v úvahu, ale platí pouze pro omezené množství látek. Bylo dokázáno, že 30–90 % podané dávky antibiotik vstupuje do životního prostředí v nezměněné podobě.(19)

Dalším problémem souvisejícím s užíváním léčiv v zemědělství je vývoj postupné rezistence mikroorganismů na antibiotika. Rezistence vzniká třemi mechanismy: plynulým vystavením organismu reziduím léčiv v potravinách, přenosem rezistentních genů mezi zvířecí a lidskou mikroflórou a přenosem rezistentních genů v ekosystému přímou kontaminací a potravními řetězci.(30) 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, jakmile jsou antibiotika nevhodně používána (vysoké dávky, nedodržení intervalu dávkování a doby léčby), může se rezistence vůči nim stávat nepřirozeně vysoká.(31)

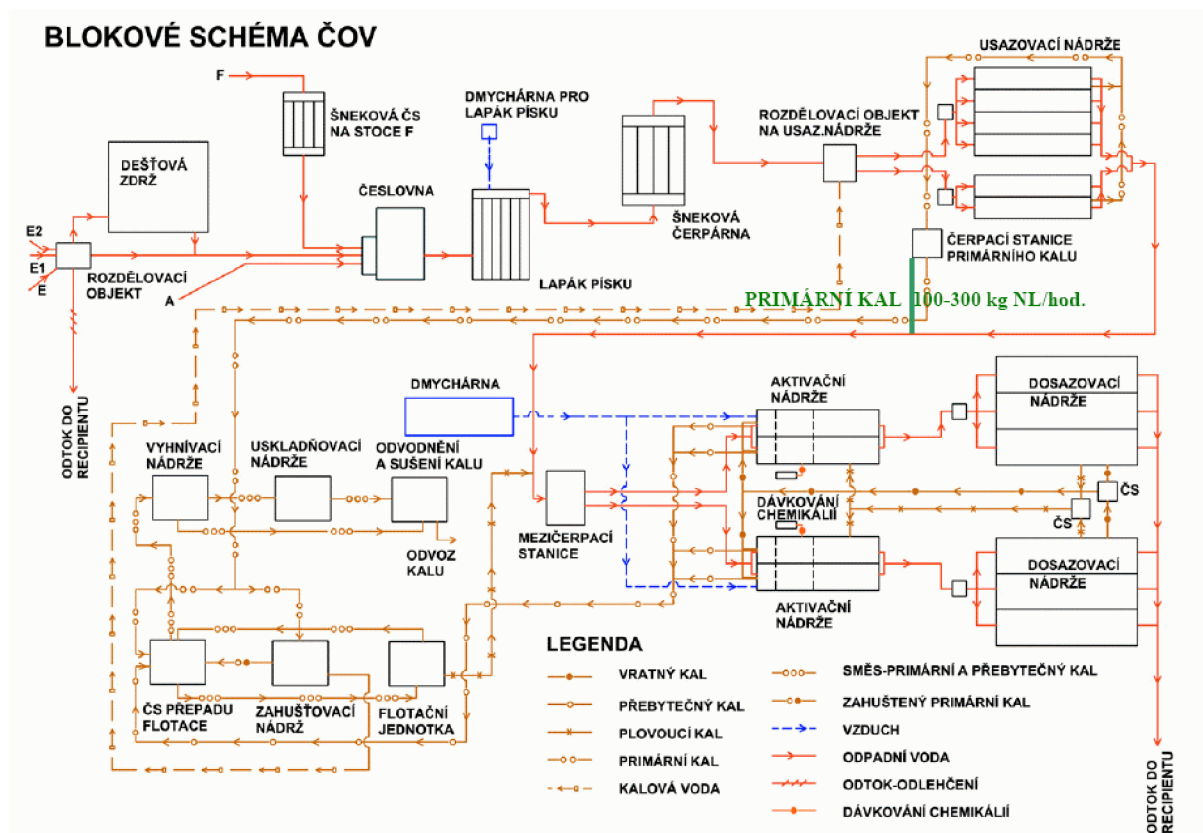
3.8.2.3 Kontaminace z čistíren odpadních vod a ze skládek odpadů

Existují dva hlavní zdroje humánních léčiv, které se nacházejí v odpadech ČOV. Jsou to použitá či nevyužitá léčiva z domácností nebo léčiva a jejich metabolity od pacientů z nemocnic, klinik nebo jiných lékařských zařízení.(27) 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.(27)

Nespočet farmak, zahrnující analgetika, stimulancia, nesteroidní antiflogistika, karbazepamin, artorvastatin, gemfibroxil a estradiol, bylo identifikováno v odpadech z čistíren odpadních vod v rozmezí hodnot od ng.l^{-1} do $\mu\text{g.l}^{-1}$.(21) 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.(22)

3.8.3 Osud léčiva v životním prostředí

3.8.3.1 Čistírny odpadních vod: procesy a provozní podmínky



Obrázek 16: Schéma ČOV Modřice (32)

V čistírnách odpadních vod působí proti dalšímu šíření kontaminace léčivy dva hlavní procesy: adsorpce/absorpce a biodegradace.(33)

Adsorpce má za následek odstranění léčiv buď pomocí koloidně zachycených částic, nebo sedimentací do kalu.(34) 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 ČOV, jako je pH a hydraulický retenční čas.(31) Polární léčiva (ibuprofen, naproxen, diklofenak, indomethacin), jejichž hodnoty pK_a se pohybují v rozmezí od 4,9 do 4,1, se ve vodě nachází hlavně v disociovaném stavu a vykazují tak malou tendenci k sorbování do kalu.(31)

Proces koagulace popř. flokulace, jakožto sekundární stupeň čištění, může být účinný v případě odstraňování kontaminantů z volné vody, ale 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.(31)

Biodegradace, zprostředkovaná působením mikroorganismů, je jeden ze dvou způsobů biotransformace probíhajících na čistírnách odpadních vod.(27) Je to primární proces k odstranění rozpuštěných látek, který probíhá buď aerobně, za pomoci aktivovaného kalu, anebo anaerobně, díky vyhnívání.(35) 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 vzrůst díky snížení jejich potenciálu pro biodegradaci. Míra biodegradace může být také ovlivněna hydraulickým retenčním časem.(34) Mikrobiální aktivita je citlivá na velké množství různých fyzikálních a chemických podmínek prostředí a 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 $50 \mu\text{g.l}^{-1}$. Koncentrace desinfekčního prostředku benzochloridu v odpadu z nemocnic byla naměřena okolo 6 mg.l^{-1} a u amonných iontů v komunálním odpadu okolo $0,05$ až $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$.(21) Tyto sloučeniny jsou speciálně určeny k potlačení růstu mikroorganismů. V tomto případě může mikrobiální inhibice vést k poklesu organismů v provozních podmínkách čistírny a následnému poklesu účinnosti čištění.(36)

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 léčivými, zaměřen na odstraňování patogenních organismů. V podstatě může mít i opačný efekt, a to v případě, že produkty oxidace mohou vykazovat ještě vyšší toxicitu než primární sloučeniny.(27)

3.8.3.2 Účinnost odstranění

Nejběžnějším způsobem detekce léčiv v prostředí je měření jejich koncentrací na vtoku a výtoku 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.(37) Měření koncentrace kontaminantů na vtoku a výtoku za standardizovaných podmínek může být i tak zavádějící. Zaprvé, léčiva mohou být sice z odtoku odstraněna, avšak jsou často pouze přesunuta do komponentů kalu. Z druhé se neuvazuje s produkty degradace. Tyto produkty mohou obsahovat stejně nebezpečné nízkomolekulární látky nebo konjugáty biotransformace, které mohou být následně dekonjugovány a uvolněny jako původní sloučeniny.(38) Navzdory všem různým technikám, ovlivňujícím přítomnost léčiv v prostředí, je některé sloučeniny nadměru obtížné odstranit.(21)

3.8.3.3 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 kal z čistíren, které figurují jako dva hlavní zdroje léčiv na skládkách.(39) Jak již bylo zmíněno, farmaka mají tendenci k akumulaci a koncentrování se mezi částicemi kalů, takže skládkování

těchto kalů může poté vést k tomu, že hlavní zdroje léčiv, což jsou odpady z domácností, vystrídají přímo samotné skládky odpadů.(38)

3.8.4 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.(40) 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. Jeden z názorů byl, že dokud bude většina léčiv hydrofilních a biodegradabilních, nebude moci dojít k trvalé perzistenci v životním prostředí. Avšak mezi vědci byly, co se týče environmentální perzistence, akceptovány nové poznatky. Tyto názory zahrnují jiné faktory než rozdělení podle hydrofobnosti při definici perzistence. Zaprvé, ne všechny sloučeniny jsou snadno degradovatelné.(39) Z druhé, léčiva jsou vypouštěna do životního prostředí průběžně, vytváří si tzv. pseudoperzistenci, takže nakonec i hydrofilní a biodegradabilní sloučeniny se mohou stát perzistentními polutanty. Zatřetí, přeměněné produkty mohou být životnímu prostředí stejně nebo ještě více nebezpečné než původní látky.(27)

3.8.4.1 Hydrofobnost a koeficient K_{OW}

Hydrofobnost je měřena na základě distribuce mezi oktanolem a vodou, neboli 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 též 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 $\log P$, protože uvažuje obě formy látky, ionizovanou i neutrální.(24)

3.8.4.2 Biodostupnost

Environmentální biodostupnost je definovaná jako schopnost části kontaminantů, nacházející se v půdě a ve vodě, být dostupná pro potenciální příjem do tkání organismů během celoživotní expozice.(41) Předpokládá se, že koncentrace kontaminantů v rybách je závislá na koncentraci ve vodě podle modelu $\log P$. Pokud se vyskytne odchylka, může být způsobena ve změně biodostupnosti, naznačující místní specifické rozdíly v bioakumulačním modelu.(42) 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.(43) Biodostupnost je také ovlivňována velikostí částic, množstvím organic-

ké hmoty, dobou zdržení a obsahem jílu, vlhkosti a kovů v půdě.(40) 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 sloučeniny s nízkou polaritou a vysokou hodnotou $\log P$, mají vyšší tendenci k sorbování se na půdní částice.(44)

3.8.4.3 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.(45) Byla nalezena korelace mezi BCF a $\log K_{OW}$, vyjádřená vztahem:

$$\log (\text{BCF}) = 0,79 \log K_{OW} - 0,4 \quad (\text{Rovnice 2})$$

Koncentrace léčiv ve vodě je primárně řízena molekulovým parciálním koeficientem ($\log P$) a působí tak na rychlost příjmu chemikálií z vody do organismu. Všeobecně platí, že příjem je vyšší u hydrofilních sloučenin.(46)

3.8.4.4 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 v potravním řetězci postavené výše.(47) 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.(48) Bioobohacování může hrát rozhodující roli v transportu chemikálií s pomalým rozpouštěním ze sedimentů díky jejich vychytávání bentickými organismy a následným lovením vyššími organismy.(49)

4 METODY STANOVENÍ LÉČIV

4.1 Vzorkování

Vzorkování je postup činností vedoucích k odběru reprezentativního vzorku. Volba vzorkovacího postupu (tj. výběru schématu vzorkování 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 vzorkování 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. Vzorkování je operací, při které získáváme informace o vzorkovaném celku pomocí výběru charakteristik celku-vzorků.(50)

4.1.1 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, přidáním 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.(50)

4.1.2 Kontaminace vzorků

Většina činností v rámci vzorkování a analytiky životního prostředí nabízí mnoho možností kontaminace původního vzorku.(51) 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 tedy nutno pro její kontrolu určit jednotlivé zdroje kontaminace odpovídající použitým metodám. Vzorky 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.(50)

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 či nedostatečným čištěním vzorkovacího náčiní.(50)

Dalším možným zdrojem kontaminace jsou používané vzorkovnice: bylo zjištěno, že jak lineární PE, polykarbonáty, tak teflony různých typů mohou být zdrojem kontaminace těžkými kovy. Proto se k ukládání vzorků pevných, kapalných a pastovitých (kalů) pro analýzu na organické látky doporučuje používat skleněné vzorkovnice.(50)

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 (či subvzorek) z dané vzorkovnice podroben. Čištění vhodné pro jeden typ analýzy (analytu) může být nedostačující či dokonce kontaminující pro jiný typ analýzy či kontaminantu. Může jít o uvolnění kontaminantu metodou čištění, která je příliš „silná“, či naopak čisticí prostředek může být sám o sobě kontaminantem.(50)

Další možnou cestou kontaminace je kontaminace vzorků při uložení či 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).(50)

Během přípravy a zpracování vzorků v laboratoři se zvyšuje počet možností kontaminace s každým manipulačním krokem, ať se již jedná o extrakci, prekoncentraci, či dělení vzorku. Každý krok související se zpracováním vzorků tedy zvyšuje riziko jejich kontaminace.(50)

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 nástříkovým zařízením (stříkačkou, pipetou apod.). Kontaminace vyčištěného zařízení je též možná například kontaktem s krytem analytického přístroje, rukou apod.(50)

4.1.3 Vzorkovací zařízení pro kapaliny

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.(50)

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 například plastifikátorů či těžkých kovů do vzorku (neboli kontaminace vzorku materiálem vzorkovnice). V případě vzorků obsahujících silné zásady či 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 či úplné destrukci vzorkovnice. Barva vzorkovnice může záviset na použité analytické metodě. Kdekoliv je možno, měl by být použit hnědý obal, který vylučuje či výrazně snižuje rozklad či změny vlastností vzorku způsobené působením světla (příp. jiné barvy plnící tento účel). Pokud nejsou barevné vzorkovnice k dispozici, je třeba vzorky chránit před působením světla při všech manipulacích s nimi, tedy při transportu, uložení apod.(50)

Kapaliny jsou díky jejich skupenství relativně dobře odebratelné, 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. Vzorkovací zařízení na odpadní vody bývá běžně konstruováno pro odběr vodných vzorků z přítokových a odtokových zdrojů daného zpracovatelského závodu. Vzorky je možno odebírat ručně či automatickými vzorkovači.(50)

4.1.3.1 Ruční odběry

Vyznačují se (většinou) minimálními náklady na vzorkování. Lidský faktor je klíčovým k provedení úspěšných odběrů či naopak 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.(50)

4.1.3.2 Automatické vzorkování

Automatické vzorkovače jsou výhodnější kvůli efektivitě nákladů, víceúčelovosti, spolehlivosti, zvýšeným možnostem, větší vzorkovací četnosti a přizpůsobivosti vzorkování specifickým požadavkům (kupř. 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.(50)

4.2 Úprava vzorku

Odebraný vzorek vody se nejprve přefiltruje přes membránový filtr (0,45 μm) pokrytý filtrem ze skelných vláken GF 8, aby se tak zabránilo ucpání membránového filtru.(52) Není vhodné použití papírových filtrů, protože by došlo k zachycení analytu ve filtru. Pokud se okamžitě nepřístupuje k extrakci, jsou vzorky skladovány při teplotě 4 °C v lednici. Je nutné zajistit, aby nedošlo k degradaci sledovaného analytu. Doporučená doba zpracování vzorků je do tří dnů.(53)

4.3 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:

$$K_N = \frac{(c_x)_E}{(c_x)_R}, \quad (\text{Rovnice 3})$$

kde $(c_x)_E$ a $(c_x)_R$ označují rovnovážnou koncentraci (látkovou nebo hmotnostní) rozpuštěné látky X v extrakčním činidle 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 (54):

$$m_1 = m_0 \frac{V}{V + K_N V_E}. \quad (\text{Rovnice 4})$$

4.3.1 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction – LLE) představuje nejjednodušší techniku frakcionace, přečištění a zkoncentrování cílových analytů surového extraktu nebo 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.(55)

4.3.2 Extrakce tuhou fází (SPE)

Extrakce tuhou 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, s extrakcí kapalina-kapalina. Nejdůležitější výhodou oproti této metodě je snížení spotřeby organických rozpouštědel, která jsou často řazena mezi látky jedovaté, ničící ozónovou vrstvu, ale i jinak nebezpečné.(56)

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.(57)

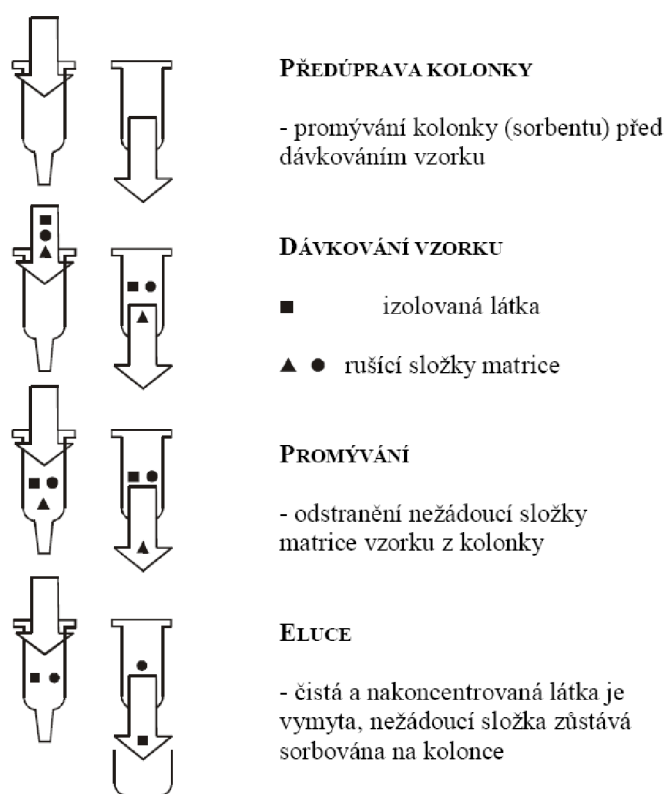
Princip extrakce tuhým sorbentem spočívá v tom, že roztok analytu ve vodě se přivede do kontaktu s tuhým sorbentem, který silně sorbuje analyt, ale v míře co nejmenší ostatní složky roztoku. Po oddělení sorbentu od roztoku je zachycený analyt uvolněn buď zahřátím, nebo elucí rozpouštědlem. K extrakci tuhým 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 (čerpádem, injekční stříkačkou), případně ne-

gativním tlakem (připojeným vakuem na jejím výstupu). V současných aplikacích převládá dynamické uspořádání.(57)

4.3.2.1 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.(57)



Obrázek 17: Schéma průběhu SPE(58)

Namísto 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.(57)

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 (Tabulka 6).(56)



Obrázek 18: SPE kolonky se sorbentem (56)

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

- a) obrácené a normální fáze, adsorbenty – obsah analytů, které mají být zachyceny by neměl být větší než 5 % hmotnosti sorbentu
- b) iontoměniče – je třeba počítat s iontově výměnnou kapacitou sorbentu (56)

Tabulka 6: 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 liter	6, 12, 20, 60 ml	1, 2, 10 g
100 ml – 1 liter	47 mm disk	–
> 1 liter, velká kapacita sorbentu	90 mm disk	–

4.3.2.2 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 (Tabulka 7).(56)

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.(57)

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, ale 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 koncentrování složek, které ve vodě disociují. Disociaci kyselých látek potlačujeme přidávkou 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 iontoměníče. 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, ale 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 nižší (do 1 mmol.g^{-1}) v porovnání s předchozím typem a jsou chemicky stálé pouze v rozmezí $\text{pH} 2-8$. Pro extrakci tuhým sorbentem jsou vhodnější měniče iontů s funkčními skupinami na polymerních nosičích, neboť mají větší kapacitu.(57)

Tabulka 7: Příklady použití jednotlivých typů sorbentů (58)

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, pufry
Aniontová výměna	bazický anex (SB, NH ₂ , DMA)	organické kyseliny, kofein, sacharin	zásady, roztoky solí, pufry
Extrakce ve smíšeném 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

4.3.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Mikroextrakce tuhou fází (solid phase microextraction) je jednoduchá a účinná sorpčně-desorpční technika zakončovaná analytu. Principem je expozice malého množství sorbentu, tj. extrakční fáze, nadbytkem vzorku.

Cílem většiny používaných metod přípravy vzorků před analýzou je získání analytu v dostatečném, detekovatelném množství, bez nežádoucích příměsí. V případě SPME jsou analyty sorbovány na vlákne, dokud není dosaženo rovnováhy.

Metoda SPME se používá jak pro stanovení kvalitativní, tak i pro stanovení kvantitativní. Přesnost a správnost výsledků je ovlivněna celou řadou faktorů. SPME metoda poskytuje lineární kalibrační křivku v širokém koncentračním rozmezí. Volbou vhodného typu vlákna lze dosáhnout reprodukovatelných výsledků i pro nízké koncentrace analytů.(59)

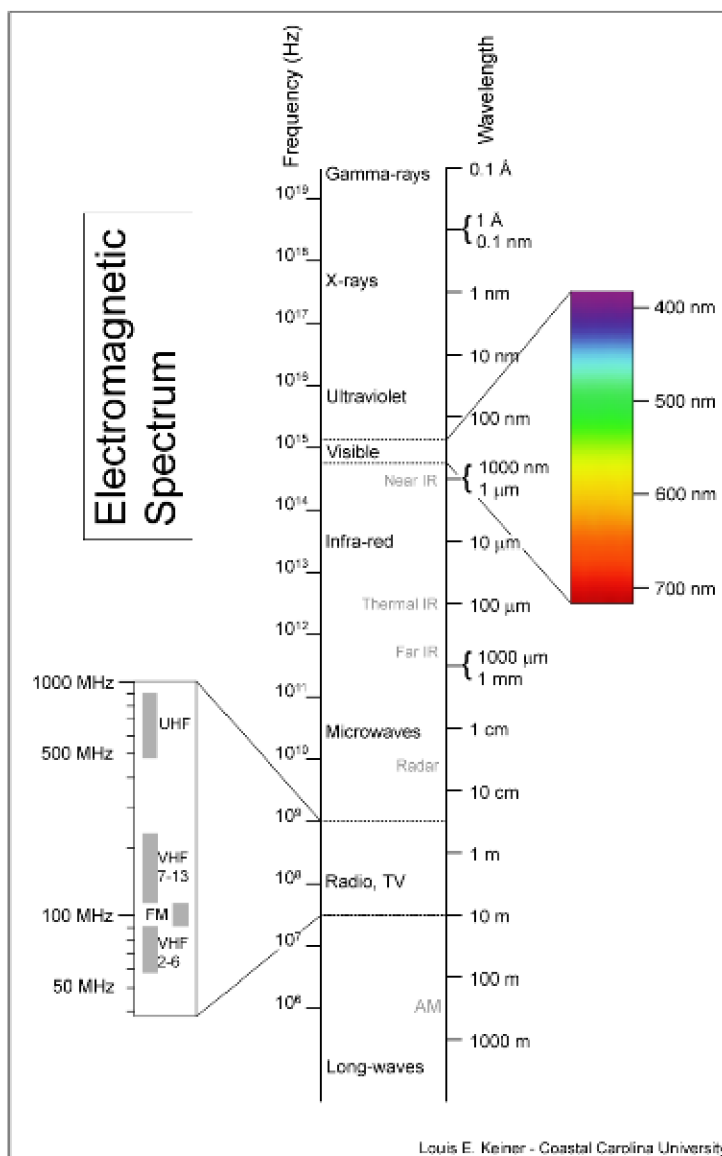
Podstatou SPME je křemenné vlákno pokryté různými typy stacionární fáze, které se liší polaritou i sorpčními vlastnostmi. Nevázané fáze jsou stabilní v organických rozpouštědlech mísitelných s vodou, ve kterých mohou slabě bobtnat. Nikdy nesmí být čištěny nepolárními organickými rozpouštědly. Vázané fáze jsou stabilní ve všech organických rozpouštědlech. V některých nepolárních rozpouštědlech mohou slabě bobtnat.(59) Chlorovaná rozpouštědla mohou rozpouštět epoxidová lepidla používaná k lepení vláken.(59) Speciální pozornost je třeba věnovat při práci s vlákny PDMS/DVB a CW/DVB. Může zde dojít i ke stažení vrstvy.(59)

Tabulka 8: Přehled SPME vláken (59)

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)

4.4 Molekulární absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti

Spektrofotometrie patří k nejvyžívanějším instrumentálním metodám v analytické praxi. Jde o optickou metodu, která je založena na sledování absorpce elektromagnetického záření z oblasti UV případně VIS (200–800 nm) molekulami analytu v roztocích. Spektrofotometrii lze použít i pro měření koncentrace plynů, ale tato oblast je odlišná od UV-VIS spektrofotometrie v roztocích.(60)



Obrázek 19: Spektrum elektromagnetického záření (61)

Tabulka 9: UV-VIS oblast elektromagnetického záření (62)

Oblast	Rozsah [nm]	
VIS	Fialová	400–420
	Indigo	420–440
	Modrá	440–490
	Zelená	490–570
	Žlutá	570–585
	Oranžová	585–620
	Červená	620–780
UV	UVA	400–315
	UVB	315–280
	UVC	280–100

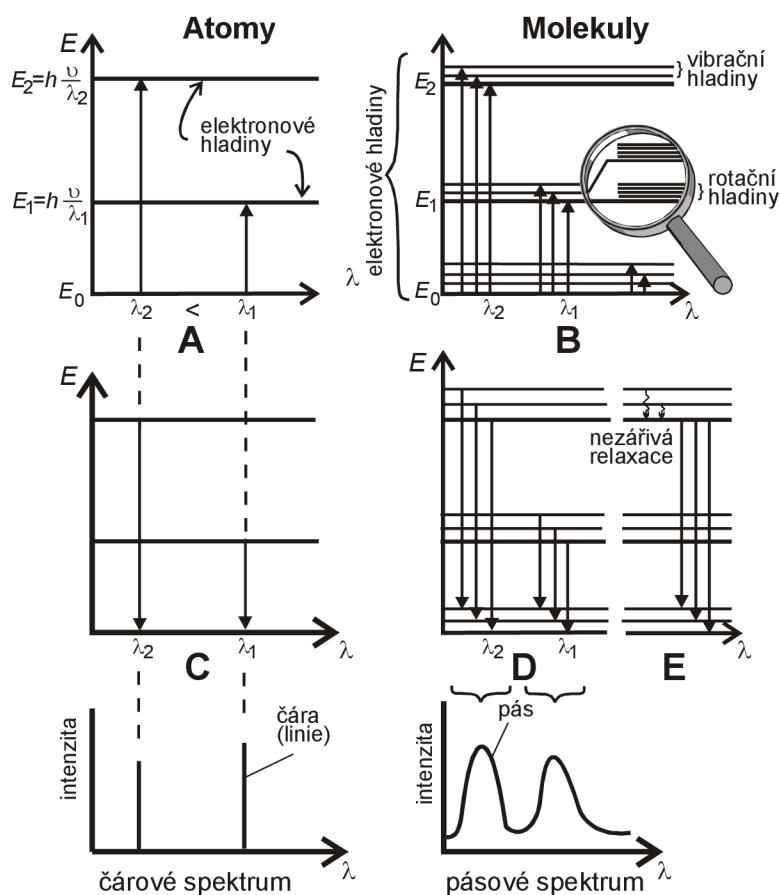
4.4.1 Absorpční spektrum

Principem spektrofotometrie je interakce mezi elektrony umístěnými ve vazebných případně nevazebných orbitalech molekuly s fotony UV-VIS záření. Energie tohoto záření excituje elektrony v těchto orbitalech do vyšší energetické hladiny, přičemž dojde k pohlcení (absorpci) určitého množství záření o konkrétní energii a tedy i o konkrétní vlnové délce. Absorbuje se vždy ta část elektromagnetického záření, která svou energii odpovídá přechodu elektronu ze základní hladiny na excitovanou hladinu.(60) Proto molekulová absorpční spektra v ultrafialové a viditelné oblasti jsou svou podstatou elektronová spektra.

Molekulové orbitály (MO) vznikají při tvorbě vazby z atomových orbitalů (AO). Ze dvou AO se vytvoří dva MO. Jeden má nižší energii než původní AO a nazývá se vazebný MO, druhý má vyšší energii, nazývá se antivazebný MO a v zápisu se označuje hvězdičkou. Vazebný elektronový pár se v základním stavu nachází ve vazebném MO. Do antivazebného MO může přejít elektron při absorpci energie, která alespoň odpovídá rozdílu energií mezi oběma MO.(63)

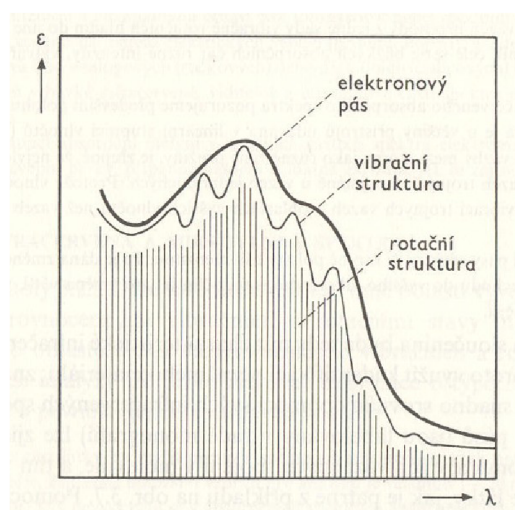
Elektronové absorpční spektrum je závislost absorbance na vlnové délce. Vzhledem k závislosti absorbance na koncentraci se pro účely srovnávání spekter používá závislost logaritmu molárního absorpčního koeficientu na vlnové délce.

Vnitřní energie molekuly je dána součtem tří druhů energií: elektronové, vibrační a rotační. Tyto energie nabývají jen určitých diskrétních hodnot odpovídajících hladinám energie. Mezi základní a excitovanou elektronovou hladinou je velký rozdíl energií ($10^2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Dostatečnou energii nesou fotony z ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra. Fotony z infračervené oblasti mají nižší energii, proto jejich absorpce již nemůže vést ke změnám elektronových stavů molekul.(63)



Obrázek 20: Srovnání atomového a molekulového absorpčního spektra (64)

Molekula se za běžných podmínek nachází na základní vibrační hladině a její elektrony nejsou excitovány. Absorbací fotonu přijme energii, která vede k přechodu elektronu na excitovanou hladinu a molekula přejde na jednu z mnoha vibračních a rotačních hladin (Obrázek 20). Tak je možná absorpce fotonů jen o málo se lišících energiích a vytváření velmi blízkých absorpčních čar ve spektru, které splývají v pás (Obrázek 21).(63)



Obrázek 21: Pásové absorpční spektrum (65)

4.4.2 Interakce molekuly s UV/VIS zářením

UV-VIS spektrofotometrie je metoda, která umožní stanovit konkrétní analyt, pokud alespoň část molekuly analytu absorbují UV nebo VIS záření. To znamená, že musí obsahovat uskupení atomů nebo funkční skupiny, které jsou za tuto absorpci zodpovědné – tzv. chromofory (Tabulka 10). Chromofory bývají buď funkční skupiny, nebo to mohou být i některé typy vazeb, např. nenasycené vazby. Takové chromofory jsou obsaženy zejména v organických látkách a můžeme přímo sledovat absorpci UV-VIS záření takovými látkami a přímo je stanovit. Spektrofotometrie se ale velmi často využívá i pro stanovení kovových iontů v roztocích. Kovy většinou nemají vhodný chromofor (s výjimkou některých barevných kovových iontů), a proto se nechají zreagovat s vhodným organickým komplexotvorným činidlem za tvorby barevného komplexu, který absorbuje VIS záření.(60)

Tabulka 10: Příklady chromoforů (62)

Chromofor	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [l.mol ⁻¹ .cm ⁻¹]	Typ přechodu
C–C	< 180	1000	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
C–H	< 180	1000	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
C=C	180	10 000	$\pi \rightarrow \pi^*$
C=C–C=C	220	20 000	$\pi \rightarrow \pi^*$
benzen	260	200	$\pi \rightarrow \pi^*$
anthracen	380	10 000	$\pi \rightarrow \pi^*$
C=O	280	20	$n \rightarrow \pi^*$
N=N	350	100	$n \rightarrow \pi^*$
N=O	660	200	$n \rightarrow \pi^*$
C=C–C=O	350	30	$n \rightarrow \pi^*$
	220	20 000	$\pi \rightarrow \pi^*$

4.4.3 Lambert-Beerův zákon

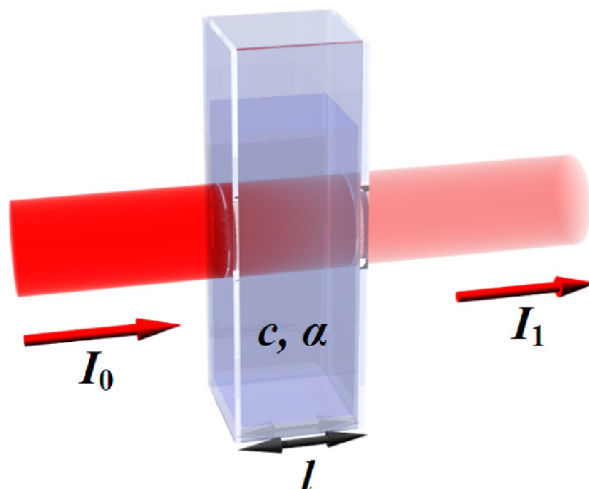
Metoda absorpční spektrofotometrie zjišťuje, pro které vlnové délky a do jaké míry vzorek pohlcuje (absorbuje) ultrafialové nebo viditelné záření. Necháme-li na vzorek dopadat monochromatické záření, poklesne v důsledku absorpce původní zářivý tok dopadajícího paprsku I_0 na nižší hodnotu I_1 .

$$\tau = \frac{I_1}{I_0} \quad (\text{Rovnice 5})$$

Poměr obou zářivých toků τ (zanedbáme-li ztráty vzniklé rozptylem a odrazem na stěnách kyvety) se nazývá propustnost (transmittance). Propustnost nezávisí na velikosti dopadajícího zářivého toku. Dekadický logaritmus převrácené hodnoty propustnosti se nazývá absorbance A :

$$A = -\log \tau \quad (\text{Rovnice 6})$$

Závislost propustnosti nebo absorbance na vlnové délce záření představuje absorpční spektrum vzorku.(66)



Obrázek 22: Prostup záření absorbujícím prostředím (67)

Absorbance roztoku absorbující látky je přímo úměrná její hmotnostní koncentraci c a tloušťce proměřované vrstvy roztoku l . Tato závislost je označována jako Lambert-Beerův zákon a je možno ji zapsat ve tvaru

$$A_{\lambda} = \alpha_{\lambda}lc \quad (\text{Rovnice 7})$$

kde α_{λ} se nazývá absorpční koeficient. Jestliže se hmotnostní koncentrace vyjádří v jednotkách g.l^{-1} a tloušťka vrstvy v cm , je rozměr absorpčního koeficientu $\text{l.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Vyjádříme-li koncentraci v jednotkách mol.l^{-1} , získáme hodnotu molárního absorpčního koeficientu ϵ_{λ} (jednotky $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Absorpční koeficient je veličina charakteristická pro danou látku v daném prostředí a podobně jako absorbance závisí na vlnové délce, při které provádíme měření.(66)

4.4.4 Instrumentace

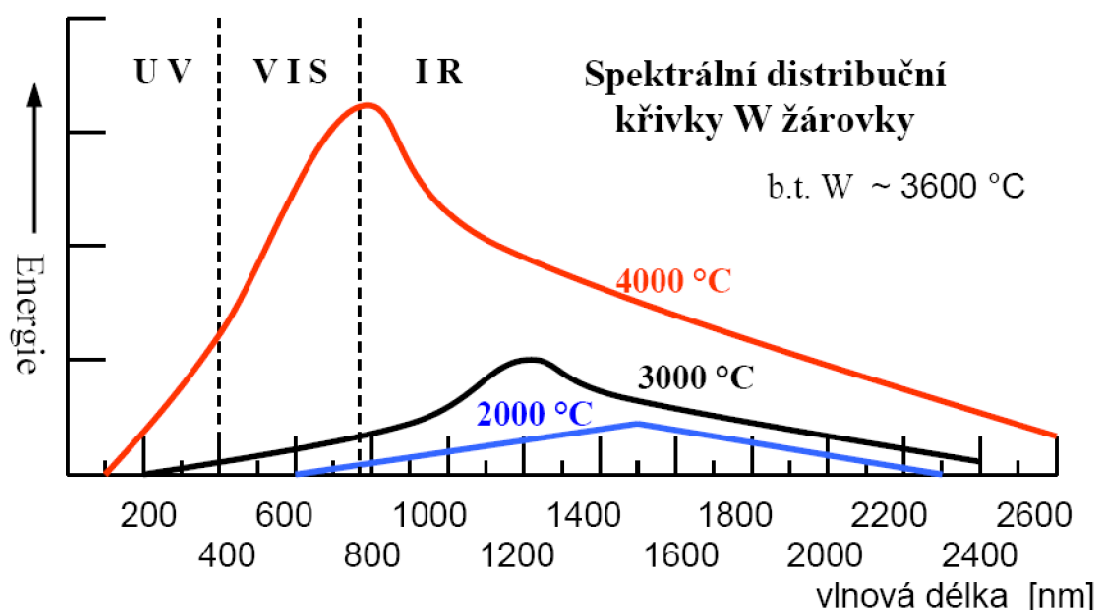
Přístroje, které se používají k měření intenzity záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti spektra se nazývají fotometry nebo spektrofotometry. Fotometry jsou jednodušší a používají k vymezení úzkého pásma vlnových délek filtry. Spektrofotometry používají mřížkový monochromátor, který dovoluje kontinuálně měnit vlnovou délku měření v širokém intervalu. Všechny fotometry a spektrofotometry sestávají ze tří základních částí: a) zdroje zářivé energie, b) filtru nebo mřížky pro izolaci úzkého pásma zářivé energie, c) detektoru měřícího zářivou energii propuštěnou vzorkem. Mezi filtr, resp. mřížku a detektor se vkládá kvyeta s roztokem měřeného vzorku.(68)

Tabulka 11: Typy květ pro UV-VIS spektrofotometrii (62)

Spektrální oblast	Materiál	Rozsah λ [nm]
UV	křemenné sklo	150–3 000
VIS	sklo	375–2 000
	plast	380–800

4.4.4.1 Zdroje záření

Nejpoužívanějším zdrojem světla je žárovka s wolframovým vláknem.(68) V přítomnosti jodu nebo bromu v plynové náplni lampy dochází při teplotě větší než 250 °C ke zplynění, k reakci s vypařeným wolframem na těkavý halogenid wolframu, který se na vlákně při vysoké teplotě znovu rozloží a halogen se opakovaně začlení do reakčního cyklu. Kvůli vysoké teplotě je obal lampy zhotoven z křemene, což má za následek posun funkce lampy ke kratším vlnovým délkám, vyšší intenzitu záření a životnost lampy.(69) Emitovaná světelná energie při žhavení vlákna na 2 000 °C téměř nezasahuje do oblasti viditelného spektra (Obrázek 23). Teprve při teplotě wolframového vlákna 3 000 °C lze použít wolframovou žárovku jako zdroj v celém rozsahu viditelného spektra. Nicméně v intervalu 400–500 nm je signál velmi slabý a bez zesilovače nepoužitelný. Při 4 000 °C je emitované záření wolframového vlákna dostatečně silné i ve střední UV oblasti spektra. Tento rozsah ale nelze použít, protože bod tání wolframu je 3 600 °C, takže žhavení wolframového vlákna nesmí překročit 3 500 °C. Za těchto okolností je emitované záření dostatečné ve viditelné oblasti, ale v blízké UV oblasti je zapotřebí použít zesilovač a pro střední UV oblast je wolframová žárovka nepoužitelná.(68)



Obrázek 23: Spektrální distribuční křivky wolframové žárovky (68)

Kromě žárovky se používají výbojky deuteriové (190 až 375 nm), xenonové a rtuťové.(68) Nízkonapěťové deuteriové výbojky používají napětí 40 V, zatímco vysokonapěťové až 2 500 V. Tlak deuteria ve výbojce je 27 až 660 Pa. Spektrum deuteriové výbojky je monotónní (bez výkyvů) v oblasti 165 až 375 nm a nazývá se kontinuum. Používá se v rozsahu od 165 nm (litý křemen) nebo 200 nm (běžný křemen). Při vlnových délkách menších než 185 nm již dochází k absorpci záření vzduchem a proto se vzdálená UV oblast ve spektrofotometrech běžné konstrukce nepoužívá.(68)

Xenonová výbojka poskytuje velmi silné světlo v blízké UV oblasti, a proto je oblíbeným zdrojem světla v rutinních analyzátoch a fluorimetrech. Výbojka používá nízké napětí, ale výboj mezi 8 mm vzdálenými wolframovými elektrodami vzniká při vysokém tlaku xenonu (1–3 MPa). Velmi intenzivní záření v IR oblasti vyžaduje, aby měla výbojka vodní plášť. V kvalitních spektrofotometrech se tento světelný zdroj nepoužívá, protože je nestabilní a s vysokým rozptylem záření.(68)

4.4.4.2 Vlnové selektory

Zdroje záření mění svou výstupní intenzitu toku s vlnovou délkou. Pro selektivitu, správnost a citlivost všech měření je nutné vybrat úzké pásmo vlnových délek, vyzařovaných ze širokospektrálního zdroje. K tomu účelu se obvykle používají interferenční filtry, které pracují na principu mnohonásobné interference mezi plochami s výbornými odrazovými vlastnostmi, nebo reflexní mřížky. Monochromátor tvoří: vstupní štěrbina vymezující svazek heterochromatického záření, mřížka jako rozptylový prvek a výstupní štěrbina, propouštějící pásmo světla blízké nominální vlnové délce.(68)

Ešeletová mřížka je skleněná deska s napařenou vrstvou kovu (Al, Cu+Sn) na jedné straně a opatřená velkým počtem tvarovaných vrypů na druhé straně. Sklo odráží i záření v daleké UV oblasti (< 100 nm). Vzdálenost mezi vrypy má být stejného řádu jako vlnová délka požadované oblasti monochromatického záření (600–1200 vrypů na mm pro UV a VIS). Na vrypech dochází k difrakci, ohybu a interferenci a monochromatické záření různých vlnových délek vychází z mřížky pod různými úhly. U tvarované mřížky se větší část energie záření soustředí do úhlu, který odpovídá zrcadlovému odrazu od plošky ešeletu, vždy pro určitou vlnovou délku a řád záření – úhel odlesku (maximální odrazivost) a je konstantou mřížky. V praxi se používají repliky primární mřížky z epoxidové pryskyřice, dodatečně aluminizované.(69)

4.4.4.3 Detektory

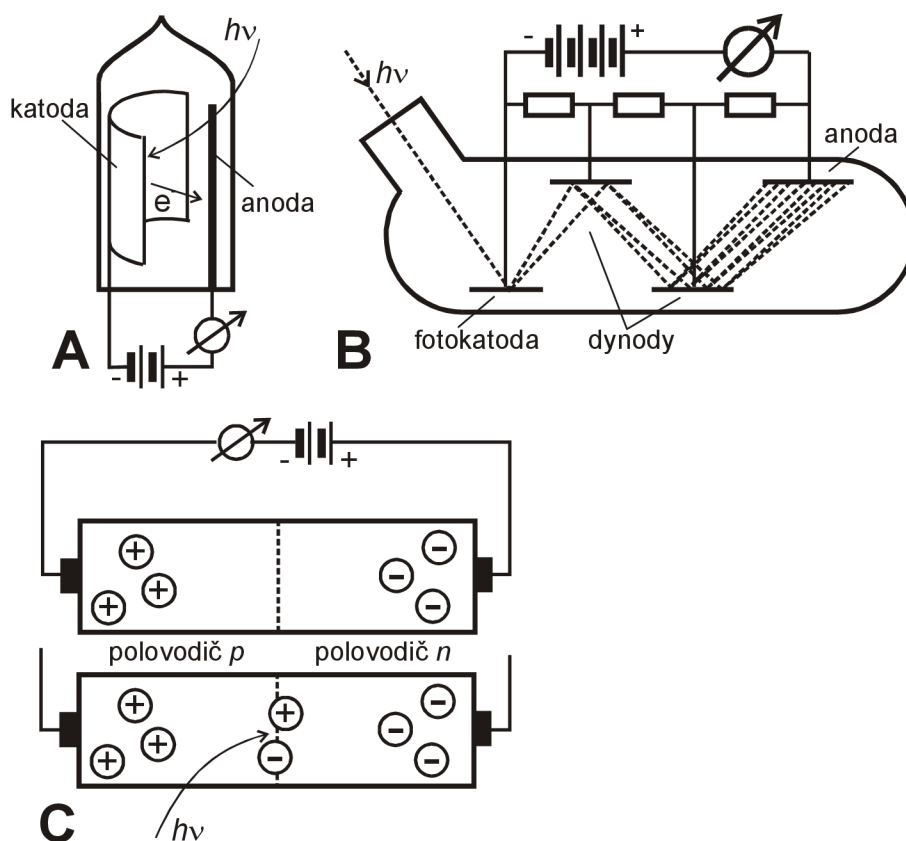
Ve spektrofotometrii UV a VIS se používají detektory fotonů. Používají se především materiály polovodičového typu, kde elektrony, excitované fotony, přecházejí do vodivostního pásu nebo do vakua.(69) Detektory tedy převádějí zářivou energii na elektrickou. K základním typům patří fotonky, fotonásobiče a diodová pole (Obrázek 24).

Ve fotonkách se elektrony uvolněné z fotokatody po dopadu fotonů pohybují k anodě účinným sacím napětím. Fotonky mohou být evakuované nebo plněné plynem. Ve vakuových fo-

tonkách je fotoelektrický proud úměrný toku záření. Jsou-li fotonky plněné plynem, mohou elektrony z katody ionizovat jeho molekuly a tím dochází k zesílení fotoelektrického proudu.

Fotonásobiče jsou uspořádány tak, že elektrony dopadnou po ozáření fotokatody na první zesilovací elektrodu (dynodu), kde je počet fotoelektronů násoben sekundární emisí. Takových dynod je ve fotonásobiči 10 i více a výsledný efekt zesílení může být i několik milionů. Takto lze měřit až 200krát slabší intenzitu světla, než v kombinaci fotonka se zesilovačem.

V detektoru diodového pole je světlo rozptylováno mřížkou na pole mnoha světlocitlivých diod a vzniká napětí, které je převedeno na digitální signál. Tyto detektory umožňují měřit současně celé spektrum. Rozlišovací schopnost jednotlivých diod je lepší než 1 nm. Analyzátoři mají 8 až 16 diod v místech, kde fixovaná mřížka odráží světlo vhodné vlnové délky. V HPLC (high performance liquid chromatography) mohou mít detektory i více než 300 diod a pracovat v rozsahu 200–700 nm. Odečítání celého spektra je extrémně rychlé (např. 12 ms).(68)

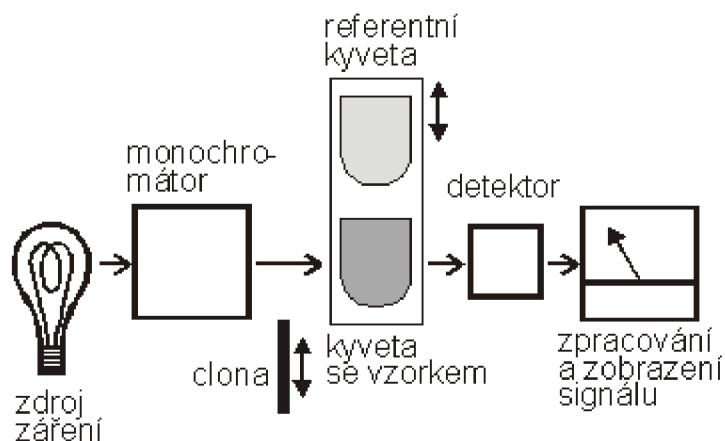


Obrázek 24: Detektory v UV-VIS spektrofotometrii: a – fotonka, B – fotonásobič, C – polovodičový detektor (64)

4.4.4.4 Základní uspořádání pro UV-VIS spektrofotometrii

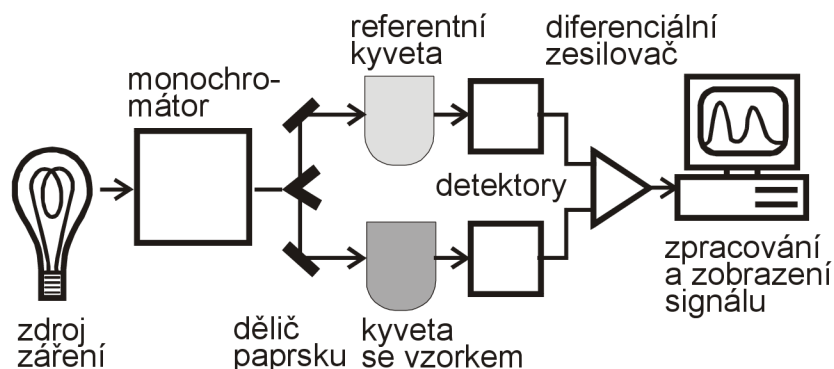
Základní uspořádání přístrojových prvků může být dvojí: jednopaprskové a dvoupaprskové. U jednopaprskových přístrojů (Obrázek 25) prochází světlo ze zdroje kondenzorovým systémem na vstupní štěrbinu monochromátoru, projde kyvetou a detekuje se např. fotonkou. Při

vlastním měření je třeba vždy nastavit vlnovou délku, poté při zakrytém detektoru nastavit polohu měřicího přístroje odpovídající 0% transmittanci, poté při zařazeném slepém vzorku nastavit polohu 100% transmittance. Pak se zařadí do chodu paprsků vlastní vzorek a odečte se absorbance (transmittance).(70)



Obrázek 25: Jednopaprskové uspořádání spektrofotometru (64)

Dvoupaprskové přístroje (Obrázek 26) se liší od předchozích tím, že oba vzorky, srovnávací i měřený, jsou proměřovány buď současně (u přístrojů „dvoupaprskových v prostoru“) nebo skoro současně (u přístrojů „dvoupaprskových v čase“). U prvního typu dopadá paprsek zvolené vlnové délky na dělič paprsků a dělí se na dva paprsky, které procházejí současně kyvetou s měřeným i referenčním vzorkem a dopadají na dvě fotony. Signál z obou fotonek se odečítá a registruje v závislosti na nastavené proměnné vlnové délce, čímž se získá vlastní absorpční spektrum. U druhého typu přístrojů dopadá paprsek z monochromátoru na rotující sektorové zrcadlo, které je nastavené tak, že buď odráží paprsek na referenční vzorek, nebo nebrání paprsku, a ten dopadá rovnou na kyvetu s měřeným vzorkem.(70)



Obrázek 26: Dvoupaprskové uspořádání spektrofotometru (64)

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Používané přístroje a zařízení

- analytické váhy HR-120, A&D Instruments, Japonsko
- pH metr InoLab WTW series, Nameco, ČR
- ultrazvuková vodní lázeň, typ Teson 4, Tesla, ČR
- SPE extraktor Alltech, model 400-1902, s vakuovou pumpou Barnat, Co. USA
- kolonky: Supelco ENVI-18, Oasis HLB
- dvoupaprskový UV/VIS spektrofotometr Helios λ , Thermo Electron Corporation, USA
- dvoupaprskový UV/VIS spektrofotometr Unicam UV 500, Thermo Spectronic, USA
- zařízení pro odpařování pod dusíkem, Evatherm, Švýcarsko
- běžné laboratorní vybavení

5.2 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.)

5.3 Používané chemikálie a standardy

5.3.1 Chemikálie

- Kyselina šřavelová (dihydrát), p.a., Lach–Ner s.r.o., ČR
- Kyselina citronová (monohydrát), p.a., Onex, ČR
- Kyselina chlorovodíková, 35%, p.a., Merci, ČR
- Hydrogenfosforečnan sodný (dodekahydrát), p.a., Lachema a.s., ČR
- Chelaton III, p.a., Lachema, ČR
- Methylenová modř, p.a., Merci, ČR
- Amoniak, 25-26% vodný roztok, p.a., Lachema, ČR
- Chlorid amonný, p.a., Lachema, ČR
- Methanol, pro chromatografii (LiChrosolv[®]), Merck KGaA, SRN
- Aceton, pro HPLC, Merck, SRN
- Ethylacetát, pro HPLC, Merck, SRN
- Chloroform, pro HPLC, Merck, SRN

5.3.2 Standardy

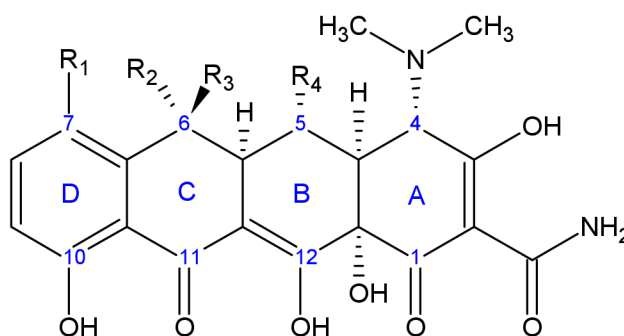
- Tetracycline, 88% čistota, Sigma – Aldrich Chemie, Německo
- Diclofenac, VFU Brno, ČR

5.4 Sledovaná matrice

Odpadní voda z ČOV Veterinární a farmaceutické univerzity Brno a z velkokapacitní ČOV Brno-Modřice, odebíraná v pravidelných intervalech na přítoku a odtoku.

5.5 Stanovované analyty a jejich vlastnosti

5.5.1 Tetracykliny



Obrázek 27: Obecný vzorec tetracyklinů

5.5.1.1 Chlortetracyklin (*Chlortetracyclini hydrochloridum*)

- $C_{22}H_{24}Cl_2N_2O_8$
- (4S,4aS,5aS,6S,12aS)-(7-chlor-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-2-karbamoyl-6-methyl-1,11-dioxo-4-naftaceny)-dimethylamoniumchlorid
- $M_r = 515,35$
- žlutý prášek
- těžce rozpustný ve vodě a v lihu 96%; rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů (71)

5.5.1.2 Tetracyklin (*Tetracyclinum*)

- $C_{22}H_{24}N_2O_8$
- (4S,4aS,5aS,6S,2aS)-4-dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naftacenkaboxamid
- $M_r = 444,44$
- žlutý krystalický prášek
- velmi těžce rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v lihu 96% a methanolu, mírně rozpustný v acetonu, prakticky nerozpustný v etheru; rozpouští se ve zředěných kyselých a alkalických roztocích (71)

5.5.1.3 Oxytetracyklin (*Oxytetracyclinum*)

- $C_{22}H_{24}N_2O_9$
- (4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-dimethylamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahydro-3,5,6,10,12,12a-hexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naftacenkarboxamid
- $M_r = 460,44$
- žlutý krystalický prášek
- velmi těžce rozpustný ve vodě, rozpouští se ve zředěných kyselých a alkalických roztocích (71)

5.5.2 Diklofenak

5.5.2.1 Sodná sůl diklofenaku (*Diclofenacum natricum*)

- $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$
- sodná sůl 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyloctové kyseliny
- $M_r = 318,13$
- bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek
- je slabě hygroskopická, mírně rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v methanolu, dobře rozpustná v lihu 96%, těžce rozpustná v acetonu a prakticky nerozpustná v etheru
- taje při asi 280 °C za rozkladu (71)

5.5.2.2 Draselná sůl diklofenaku (*Diclofenacum kalicum*)

- $C_{14}H_{10}Cl_2KNO_2$
- draselná sůl 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyloctové kyseliny
- $M_r = 334,24$
- bílý nebo slabě nažloutlý krystalický slabě hygroskopický prášek
- je mírně rozpustná ve vodě, snadno rozpustná v methanolu, dobře rozpustná v lihu 96% a těžce rozpustná v acetonu (71)

5.6 Pracovní postupy

5.6.1 Odběry vzorků

- odběrová místa: ČOV na Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno, ČOV Brno-Modřice
- odběry na přítoku a odtoku v cca půldenních intervalech (v 8 a 13 hodin) do litrových vzorkovnic z tmavého skla
- vzorky byly ihned zpracovány (3 × 200 ml), popř. skladovány v lednici do druhého dne

5.6.2 Úprava vzorků a izolace sledovaných analytů

V případě potřeby byly vzorky z přítoku ČOV přefiltrovány přes papírový filtr 0,07 mm, z důvodu odstranění hrubých nečistot, které by znemožňovaly další úpravu. Pro další analýzu

byly všechny vzorky odebrány v trojnásobném množství a z naměřených hodnot byl vypočítán aritmetický průměr.

5.6.2.1 Tetracykliny

- 200 ml vzorku bylo extrahováno 200 ml McIlvainova pufru 20 minut v ultrazvuku
- SPE na kolonkách Supelco ENVI-18:
 - promytí 4 ml methanolu
 - promytí 3 ml McIlvainova pufru
 - nanesení 400 ml extraktu vzorku
 - promytí 3 ml ultra čisté vody
 - sušení proudem vzduchu (cca 10 minut)
 - eluce 10 ml eluční směsi (cca 15 kapek/min)

McIlvainův pufr (pH = 3,8):

- 12,9 g.l⁻¹ citronové kyseliny (monohydrát)
- 30,2 g.l⁻¹ hydrogenfosforečnanu sodného (dodekahydrát)
- 37,2 g.l⁻¹ EDTA – sodná sůl (Chelaton III)
- doplněno ultra čistou vodou

Eluční směs (20 mmol.l⁻¹ šťavelová kyselina v methanolu):

- 2,5 g.l⁻¹ šťavelové kyseliny (dihydrát)
- doplněno methanolem

5.6.2.2 Diklofenak

- SPE na kolonkách Supelco ENVI-18 a Oasis HLB:
 - promytí 3 ml eluční směsi (aceton-ethylacetát, 1:1)
 - promytí 3 ml methanolu
 - promytí 3 ml ultra čisté vody (upravena kyselinou chlorovodíkovou na pH = 2)
 - nanesení 200 ml vzorku (upraven kyselinou chlorovodíkovou na pH = 2)
 - promytí 5 ml roztoku methanol-voda (2:3)
 - sušení proudem vzduchu (cca 10 minut)
 - eluce 10 ml eluční směsi (cca 15 kapek/min)
- odpaření eluční směsi pod dusíkem
- rozpuštění analytu v 10 ml ultra čisté vody
- extrakce kapalina-kapalina prováděná v dělicí nálevce:
 - 4 ml vzorku
 - 5 ml methylenové modři
 - 1 ml amonného pufru
 - 10 ml chloroformu (extrahovadlo)
 - 5 minut intenzivní vytřepávání
 - druhá extrakce se stejným objemem extrahovadla (5 min)
 - oba extrakty se smíchají

Roztok methylenové modři (1 mmol.l^{-1}):

- $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ methylenové modři
- doplněno ultra čistou vodou

Amonný pufr ($\text{pH} = 9,4$):

- 79 ml.l^{-1} hydroxidu amonného (konc.)
- $141,7 \text{ g.l}^{-1}$ chloridu amonného
- doplněno ultra čistou vodou

5.6.3 Identifikace a kvantifikace analytů

Analýza standardů a reálných vzorků byla provedena pomocí UV/VIS spektrofotometrie. Vybrané analyty byly identifikovány pomocí zjištěných poloh absorpčních maxim u standardů a jejich kvantifikace byla provedena pomocí pětibodové kalibrační křivky.

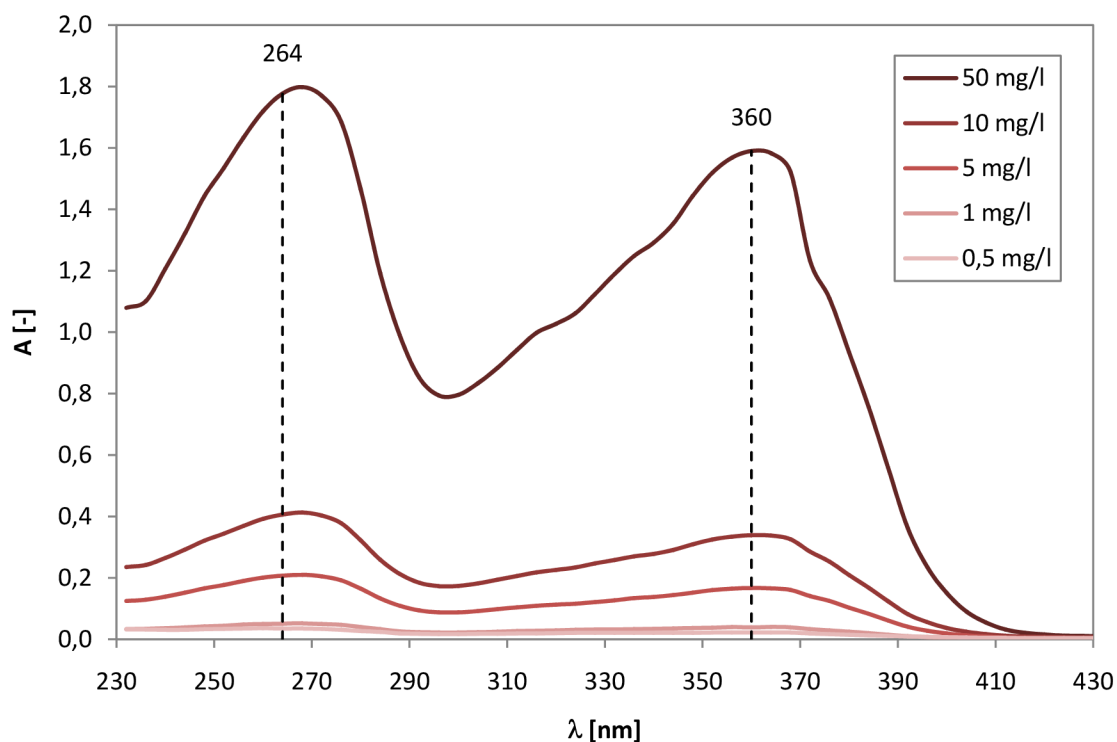
6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Stanovení tetracyklinů

6.1.1 Určení absorpčního maxima a výpočet kalibrační křivky

Protože použitá metodika není schopna rozlišit jednotlivé druhy tetracyklinů na základě jejich retenčních časů, jsou v odpadní vodě stanovovány v sumárním množství. Jako standard byl použit tetracyklin.

V prvním kroku byla proměřena absorpční spektra roztoků standardu v eluční směsi (20 mmol.l^{-1} šťavelová kyselina v methanolu) o známých koncentracích v rozpětí od $0,5$ do 50 mg.l^{-1} . Z naměřených dat byly určeny dvě absorpční maxima v UV oblasti spektra, při vlnových délkách 264 a 360 nm (Obrázek 28).

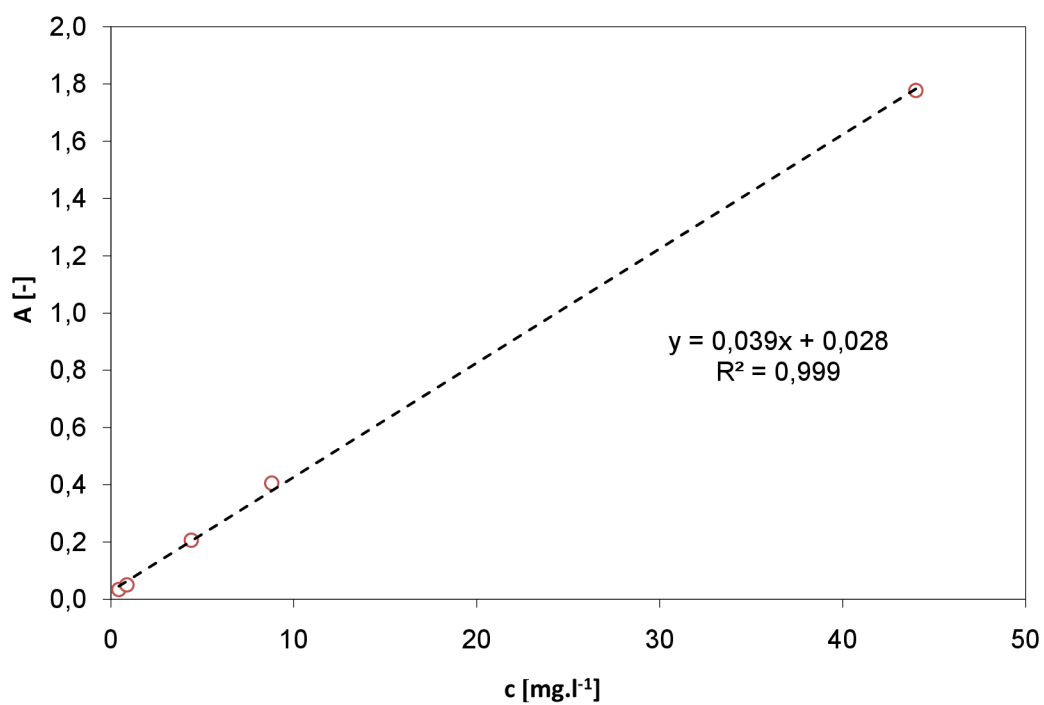


Obrázek 28: Absorpční spektra tetracyklinu

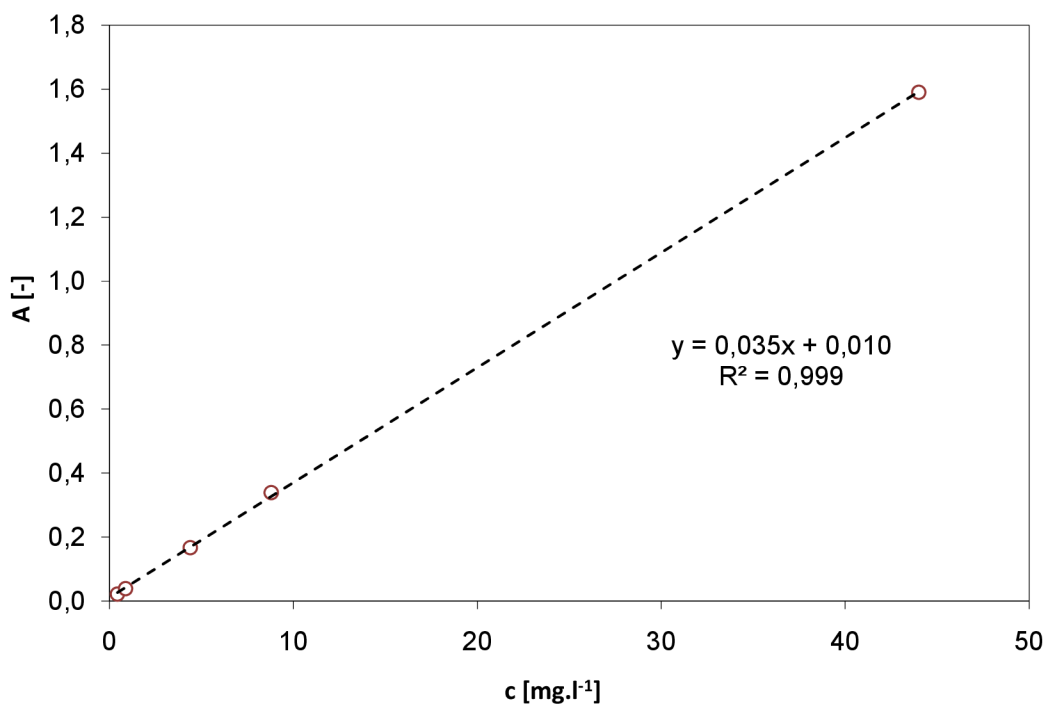
Následně byly sestrojeny kalibrační křivky tetracyklinu v hodnotách absorpčních maxim. Skutečné koncentrace, použité pro výpočet kalibrační křivky, jsou uvedené v následující tabulce.

Tabulka 12: Hodnoty absorbancí tetracyklinu použité pro kalibrační křivky

c_{TC} [mg.l ⁻¹]	A_{264}	A_{360}
0,44	0,035	0,022
0,88	0,051	0,039
4,40	0,207	0,167
8,80	0,406	0,339
44,00	1,777	1,590



Obrázek 29: Kalibrační křivka tetracyklinu při vlnové délce 264 nm



Obrázek 30: Kalibrační křivka tetracyklinu při vlnové délce 360 nm

6.1.2 Stanovení výtěžnosti

Izolace analytů byla prováděna metodou extrakce na pevnou fázi. Pro zakoncentrování pomocí SPE byly vybrány kolonky Supelco ENVI-18. Nejprve bylo nutné určit výtěžnost těchto kolonek pro další stanovení vybraných analytů. Pro vlastní stanovení výtěžnosti bylo připraveno 5 roztoků tetracyklinu v ultra čisté vodě o objemu 10 ml a koncentraci 20 mg.l⁻¹. Po zakoncentrování a následné eluci 10 ml eluční směsi byly proměřeny absorbance při vlnové délce 360 nm a z kalibrační křivky byly vypočteny koncentrace, které byly porovnány s původními koncentracemi.

Tabulka 13: Výtěžnosti SPE kolonek ENVI-18 pro tetracyklin

Číslo vzorku	Původní koncentrace [mg.l ⁻¹]	Výsledná koncentrace [mg.l ⁻¹]	Výtěžnost [%]
1	22,50	21,49	95,49
2	23,00	22,20	96,52
3	23,00	22,32	97,04
4	23,50	23,15	98,53
5	23,50	23,38	99,50

Vypočtená průměrná hodnota koncentrace tetracyklinu (\bar{x}) byla 22,51 mg.l⁻¹ a průměrná vý-
těžnost činila 97,42 %, přičemž rozptyl hodnot byl 0,47 mg.l⁻¹. Dále byly vypočteny některé
metrologické parametry, a to směrodatná odchylka (σ_n), jejíž hodnota činila 0,69 mg.l⁻¹
a relativní směrodatná odchylka (RSD) ve výši 6,10 %. Výpočet byl proveden podle vztahu:

$$RSD(\%) = \frac{2 \cdot \sigma_n \cdot 100}{\bar{x}} \quad (\text{Rovnice 8})$$

6.1.3 Reálné vzorky

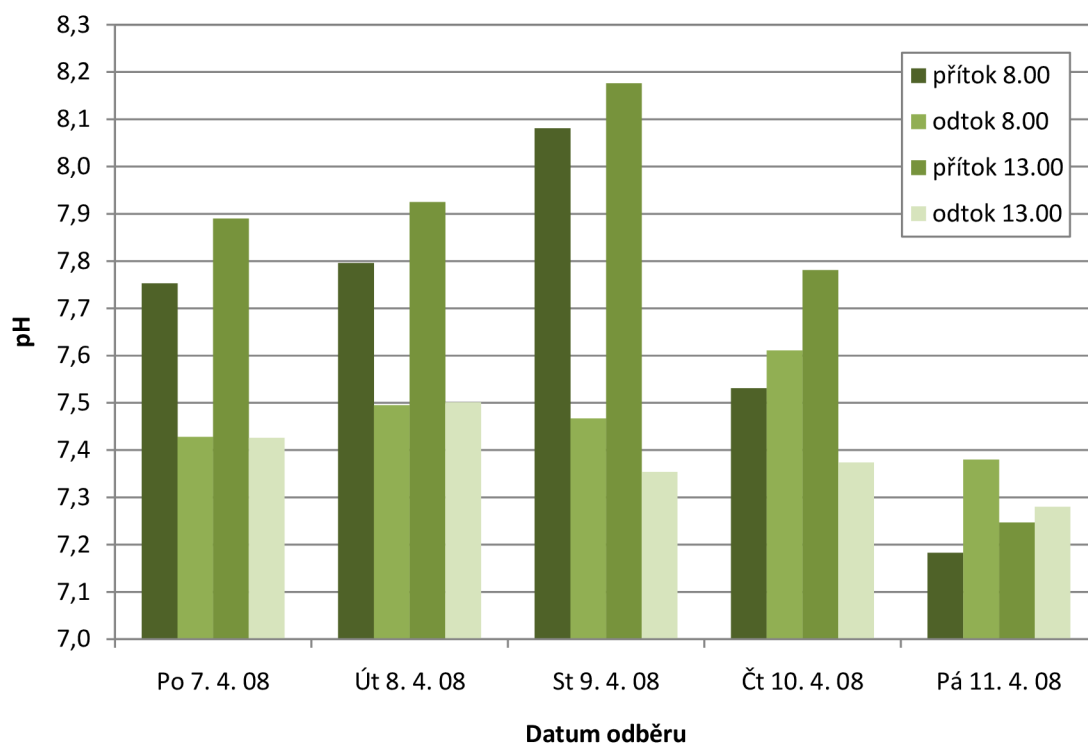
Vzorky pro stanovení tetracyklinů z odpadních vod byly odebírány na přítoku a odtoku ČOV
Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, vždy pravidelných intervalech, a to ráno v 8.00
a odpoledne ve 13.00. Takto stanovené odběry byly prováděny z důvodu ověření účinnosti
dané čistírny, jejímž úkolem je odstraňovat biologicky aktivní látky z odpadní vody, která je
po vyčištění vypouštěna do kanalizační sítě města Brna.

6.1.3.1 Měření pH

U všech odebraných vzorků odpadních vod byly proměřeny hodnoty pH. Z výsledků vyplývá
(Tabulka 14, Obrázek 31), že se hodnoty pH na odtoku i na přítoku se pohybují ve slabě alka-
lické oblasti, přičemž nejvyšší naměřená hodnota pH na přítoku činila 8,18 a nejnižší 7,18. Na
odtoku nebyly zjištěny tak velké rozdíly a hodnoty pH se pohybovaly v rozmezí 7,28–7,61.

Tabulka 14: Hodnoty pH odpadní vody na ČOV VFU

Datum odběru	pH v 8.00		pH v 13.00	
	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok
Po 7. 4. 08	7,75	7,43	7,89	7,43
Út 8. 4. 08	7,80	7,50	7,93	7,50
St 9. 4. 08	8,08	7,47	8,18	7,35
Čt 10. 4. 08	7,53	7,61	7,78	7,37
Pá 11. 4. 08	7,18	7,38	7,25	7,28



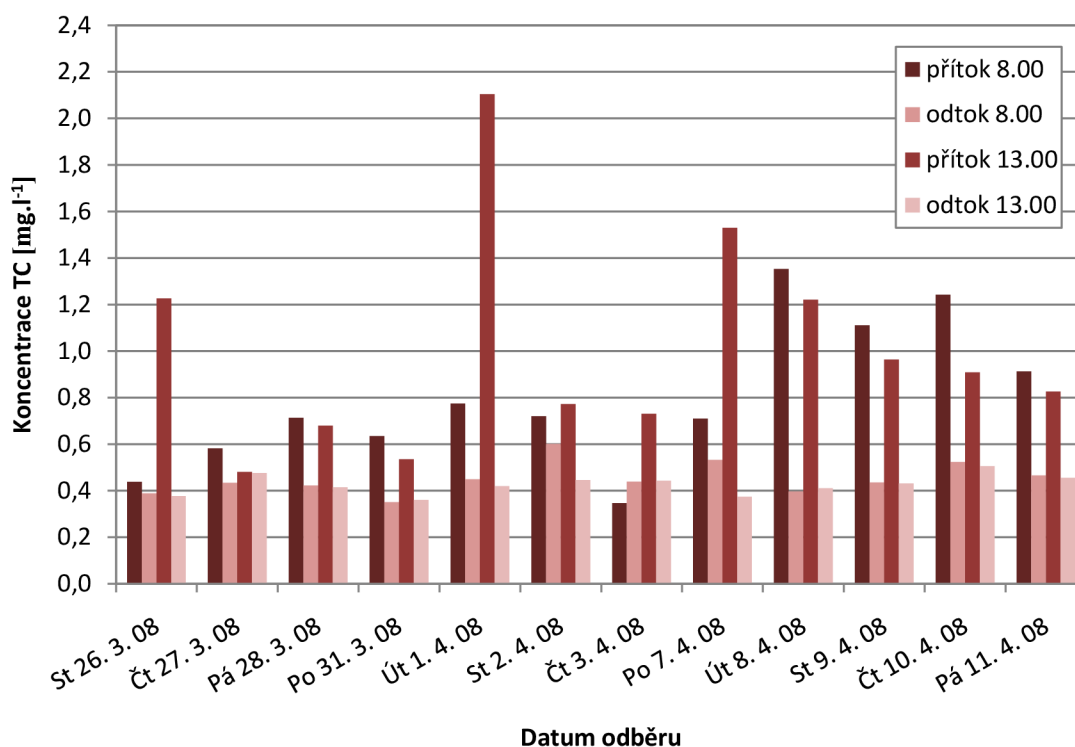
Obrázek 31: Hodnoty pH odpadní vody na ČOV VFU

6.1.3.2 Koncentrace tetracyklinů v reálných vzorcích

Pro výpočet koncentrace tetracyklinů v reálných vzorcích byla využita kalibrační křivka sestavená pro vlnovou délku 360 nm, protože při absorpčním maximu 264 nm byly naměřeny až šestinásobně vyšší hodnoty koncentrací. Tento extrémní nárůst si lze vysvětlit tím, že při této vlnové délce absorbovalo větší množství látek, přítomných v odpadní vodě.

Tabulka 15: Koncentrace tetracyklinů v odpadní vodě z ČOV VFU

Datum odběru	Koncentrace TC v 8.00 [mg.l ⁻¹]		Koncentrace TC v 13.00 [mg.l ⁻¹]	
	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok
St 26. 3. 08	0,44	0,39	1,23	0,38
Čt 27. 3. 08	0,58	0,43	0,48	0,48
Pá 28. 3. 08	0,71	0,42	0,68	0,41
Po 31. 3. 08	0,64	0,35	0,54	0,36
Út 1. 4. 08	0,77	0,45	2,10	0,42
St 2. 4. 08	0,72	0,60	0,77	0,45
Čt 3. 4. 08	0,35	0,44	0,73	0,44
Po 7. 4. 08	0,71	0,53	1,53	0,37
Út 8. 4. 08	1,35	0,40	1,22	0,41
St 9. 4. 08	1,11	0,43	0,96	0,43
Čt 10. 4. 08	1,24	0,52	0,91	0,51
Pá 11. 4. 08	0,91	0,47	0,83	0,46



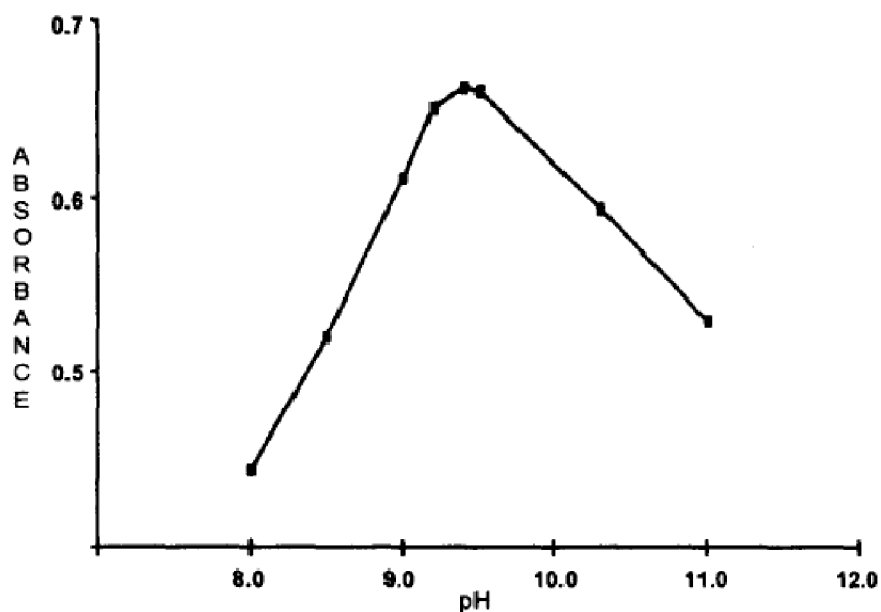
Obrázek 32: Koncentrace tetracyklinů v odpadní vodě z ČOV VFU

Hodnoty koncentrací na přítoku ČOV se pohybují v rozmezí 0,35–2,10 mg.l⁻¹, zatímco na odtoku v rozmezí 0,35–0,60 mg.l⁻¹. Na základě těchto hodnot lze konstatovat, že částečné množství tetracyklinů je na ČOV zadržováno a nepřechází tak do další kanalizační sítě.

6.2 Stanovení diklofenaku

6.2.1 Stanovení podmínek stability komplexu

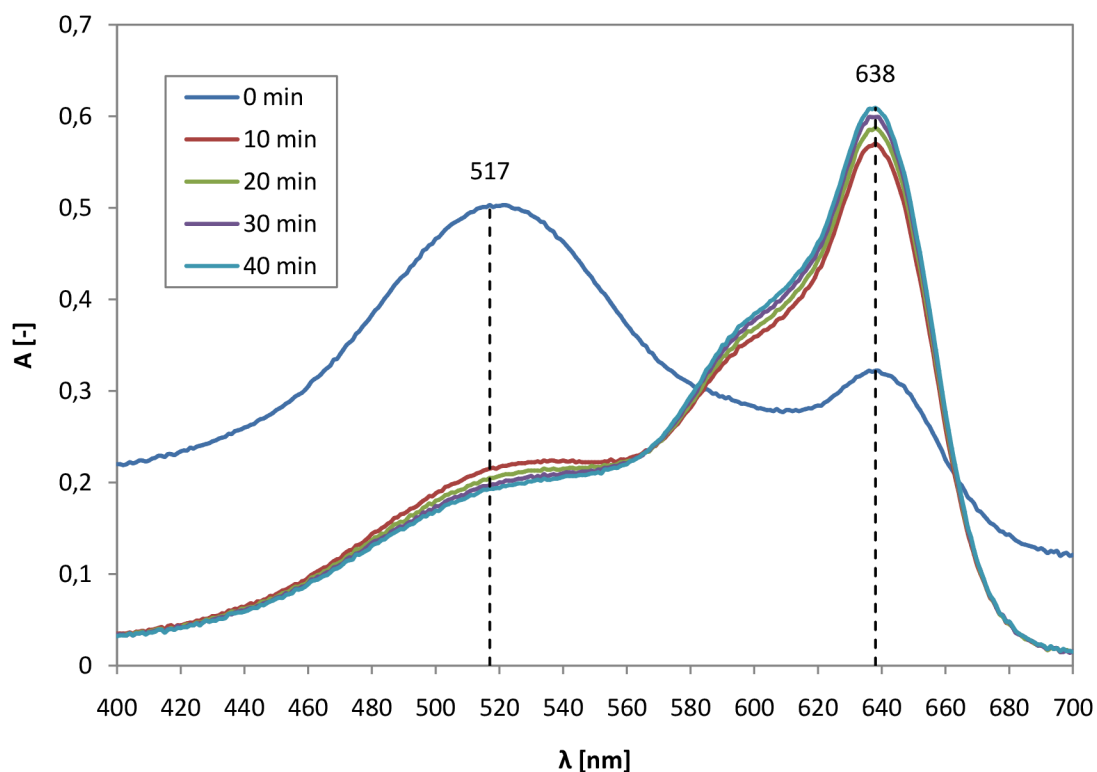
Při stanovení diklofenaku z odpadní vody bylo využito reakce s methylenovou modří za vzniku komplexu, který byl následně vytřepáván do chloroformu. Podmínky vzniku komplexu jsou silně ovlivňovány pH (Obrázek 33), a proto bylo nutné upravit všechny vzorky vody na hodnotu pH, při které nabývají absorbance maximálních hodnot.



Obrázek 33: Vliv pH na tvorbu komplexu diklofenaku s methylenovou modří (72)

Amonný pufr, který byl z důvodu stability pH přidáván ke všem vzorkům, byl připraven na hodnotu $\text{pH} = 9,4$, což odpovídá absorpčnímu maximu komplexu. Vodný roztok methylenové modří byl připraven o koncentraci 1 mmol.l^{-1} .(72)

V dalším kroku byla sledována stabilita komplexu v závislosti na čase. Po vytřepání do chloroformu se modře zbarvený komplex po určité době zbarvil do růžova. Proto bylo nutné stanovit přesné podmínky při dalším měření, aby nedocházelo ke změně zbarvení. Roztoky standardů sodné soli diklofenaku, včetně blanku, připravené o známých koncentracích byly ihned po extrakci proměřovány v celé viditelné oblasti spektra v desetiminutových intervalech. Z výsledků vyplynulo, že zásadní vliv při celém stanovení má nevázaná methylenová modř, která se v roztoku nachází ve dvou formách a vlivem záření se stabilizuje tak, že jedna z těchto forem převažuje. Při proměřování blanku byly zjištěny dvě hodnoty absorpčních maxim methylenové modří v chloroformu (Obrázek 34).

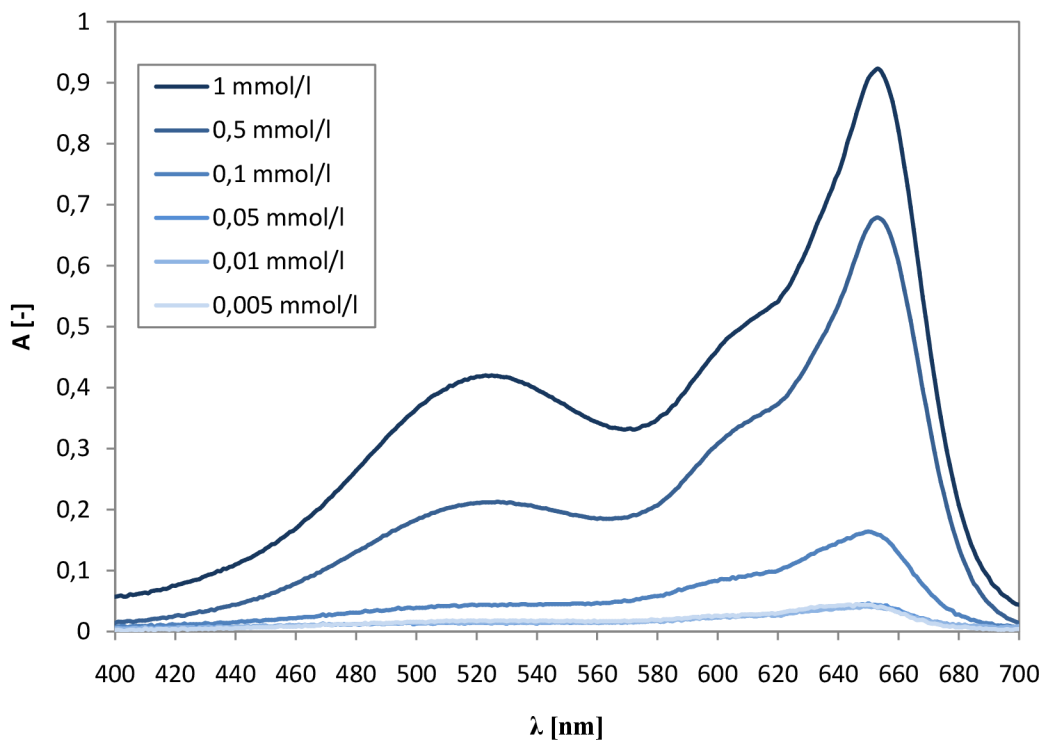


Obrázek 34: Stabilita methylenové modři v chloroformu v závislosti na čase

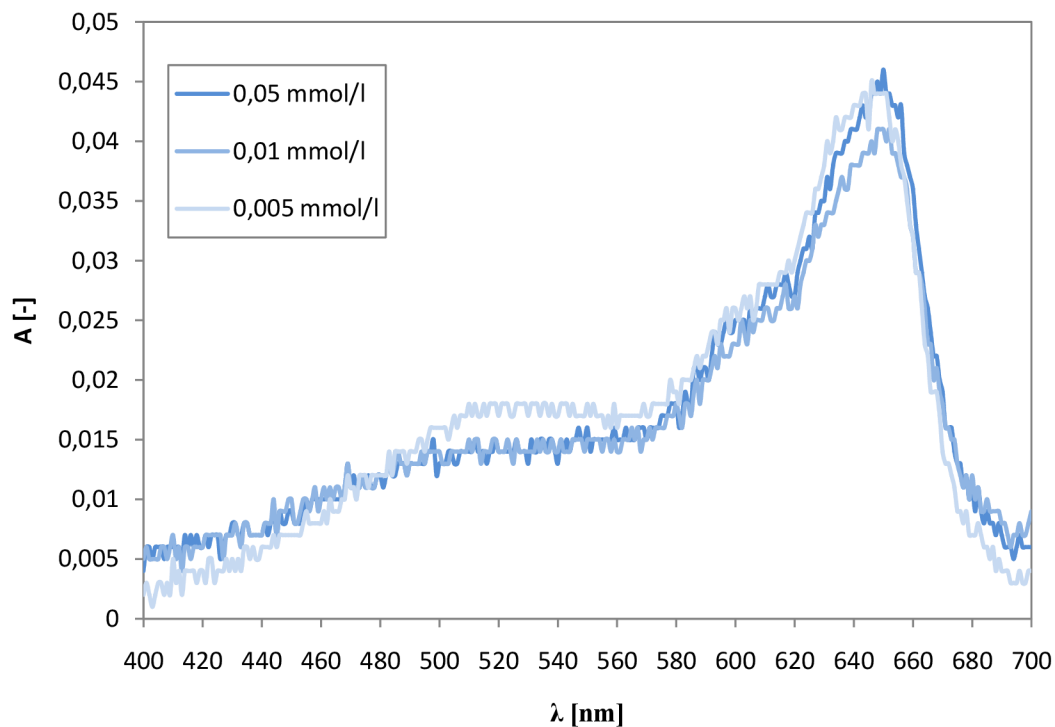
Z uvedeného grafu vyplývá, že již po 10 minutách jasně převažovala forma methylenové modři s absorpčním maximem při vlnové délce 638 nm. Proto všechna následující měření byla prováděna právě v 10. minutě po vytřepání do chloroformu.

6.2.2 Stanovení optimální koncentrace methylenové modři

Ze základního roztoku methylenové modři bylo rozředěním připraveno 5 dalších roztoků v rozsahu koncentrací od $5 \cdot 10^{-3}$ do $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$. Pro tvorbu komplexu byl použit roztok diklofenaku o koncentraci 10 mg.l^{-1} . Z naměřených dat vyplynulo, že pro tuto koncentraci diklofenaku budou nejvhodnější roztoky methylenové modři o koncentracích $0,5$ a 1 mmol.l^{-1} , protože v ostatních případech již je vybarvení komplexu velmi nevýrazné; v tomto případě se již dostáváme do oblasti velmi nízkých absorbancí a v důsledku toho se zvyšuje celkový šum pozadí. Pro další měření byly proto použity roztoky methylenové modři o koncentracích $0,5$ a 1 mmol.l^{-1} .



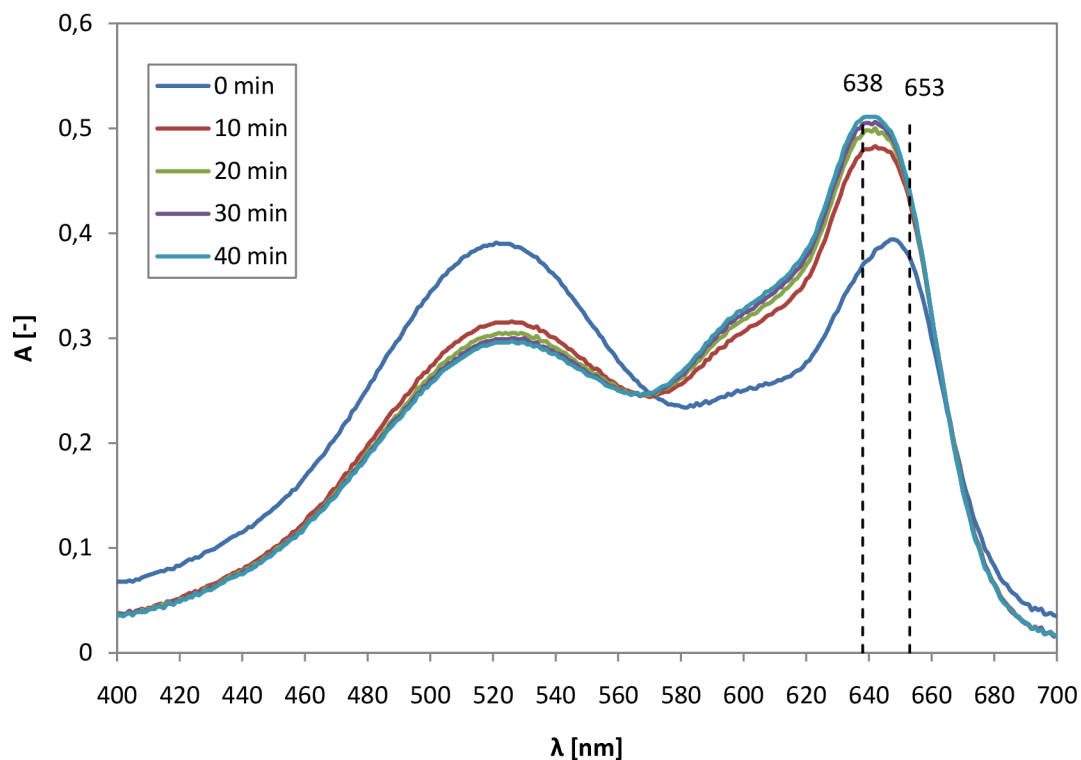
Obrázek 35: Srovnání absorpčních spekter komplexu diklofenaku ($10 \text{ mg} \cdot \Gamma^{-1}$) při různých koncentracích methylenové modři



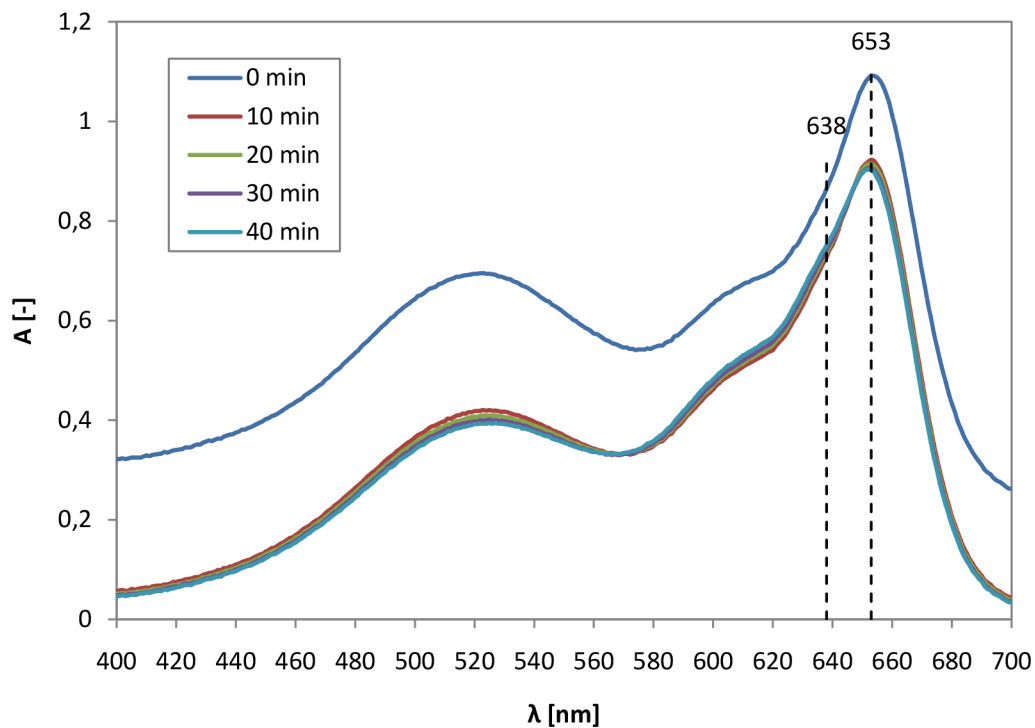
Obrázek 36: Absorpční spektra komplexu diklofenaku ($10 \text{ mg} \cdot \Gamma^{-1}$) při velmi nízkých koncentracích methylenové modři

6.2.3 Určení absorpčního maxima a výpočet kalibrační křivky

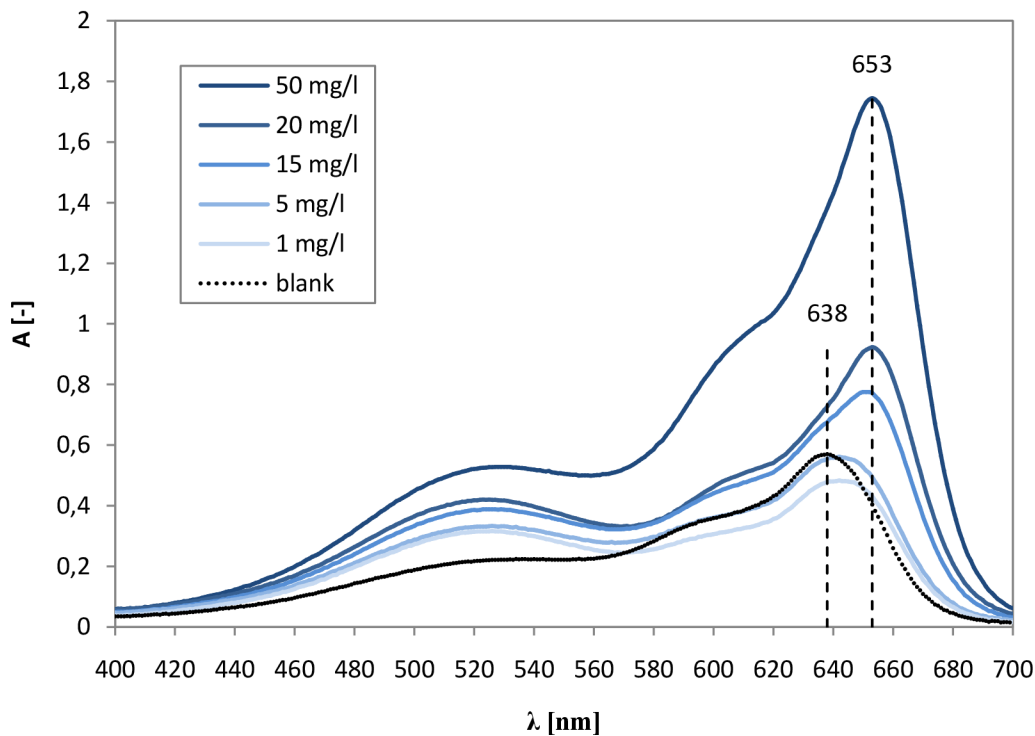
Pro stanovení absorpčního maxima komplexu diklofenaku s methylenovou modří byly připraveny roztoky standardu sodné soli diklofenaku v rozpětí koncentrací $1\text{--}50\text{ mg.l}^{-1}$. Při nižších koncentracích (Obrázek 37) je pozorovatelná zřetelná koeluce píku nevázané methylenové modří (s abs. maximem 638 nm) s píkem komplexu. Při vyšších koncentracích (Obrázek 38) již však dochází k posunu píku směrem k vyšším vlnovým délkám a za těchto podmínek je tak možné stanovit hodnotu absorpčního maxima komplexu při vlnové délce 653 nm . Kalibrační křivky byly provedeny pro koncentrace methylenové modří $0,5$ a 1 mmol.l^{-1} .



Obrázek 37: Absorpční spektrum komplexu diklofenaku (1 mg.l^{-1}) s methylenovou modří (1 mmol.l^{-1}) v závislosti na čase



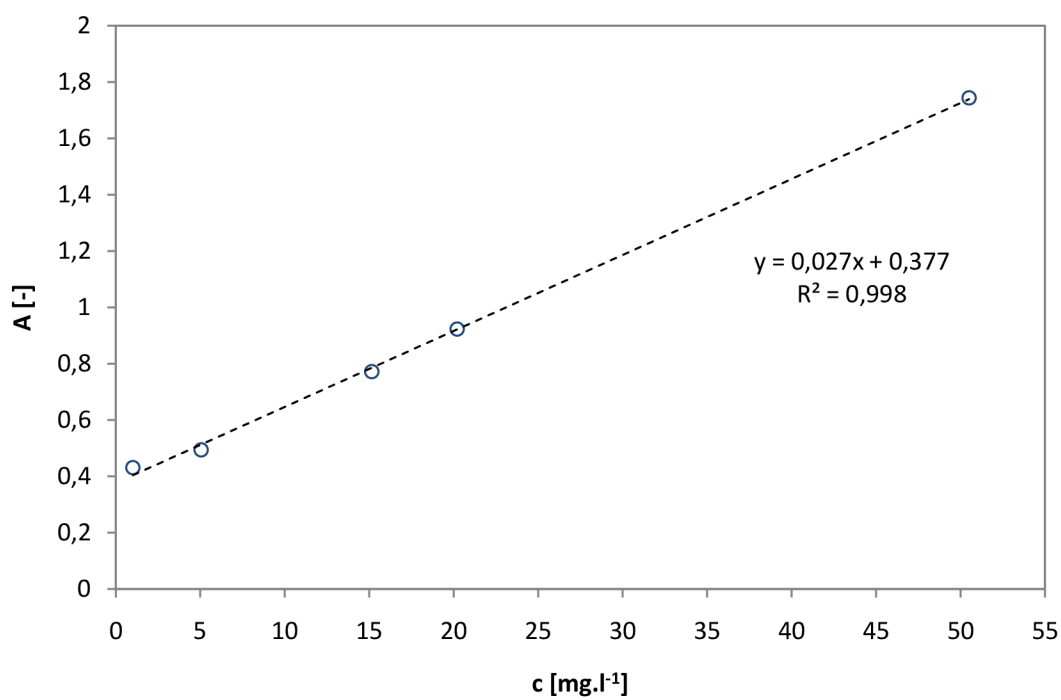
Obrázek 38: Absorpční spektrum komplexu diklofenaku (20 mg.l^{-1}) s methylenovou modří (1 mmol.l^{-1}) v závislosti na čase



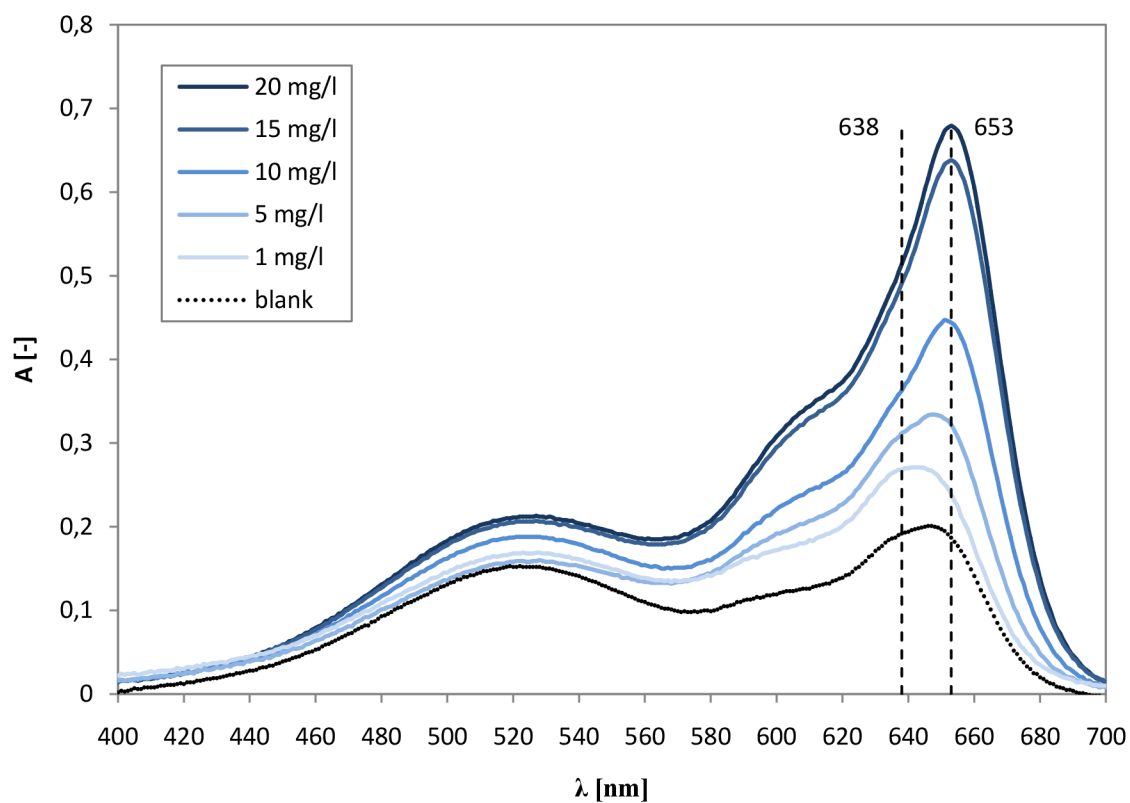
Obrázek 39: Absorpční spektra komplexu diklofenaku o různých koncentracích (methylenová modř 1 mmol.l^{-1})

Tabulka 16: Hodnoty absorbancí komplexu diklofenaku s methylenovou modří o koncentraci 1 mmol.l^{-1} použité pro kalibrační křivky

$c_{DF} [\text{mg.l}^{-1}]$	A_{653}
1,01	0,431
5,05	0,494
15,15	0,772
20,20	0,923
50,50	1,744



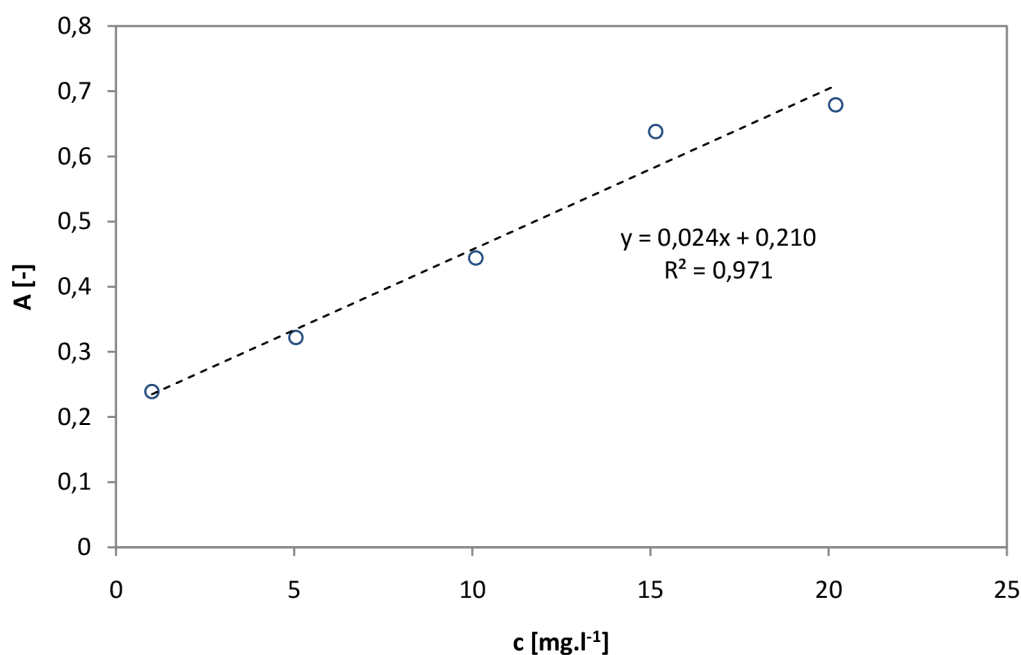
Obrázek 40: Kalibrační křivka komplexu diklofenaku s methylenovou modří 1 mmol.l^{-1}



Obrázek 41: Absorpční spektra komplexu diklofenaku o různých koncentracích (methylenová modř $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$)

Tabulka 17: Hodnoty absorbancí komplexu diklofenaku s methylenovou modří o koncentraci $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ použité pro kalibrační křivky

$c_{DF} [\text{mg.l}^{-1}]$	A_{653}
1,01	0,239
5,05	0,322
15,15	0,444
20,20	0,638
50,50	0,679



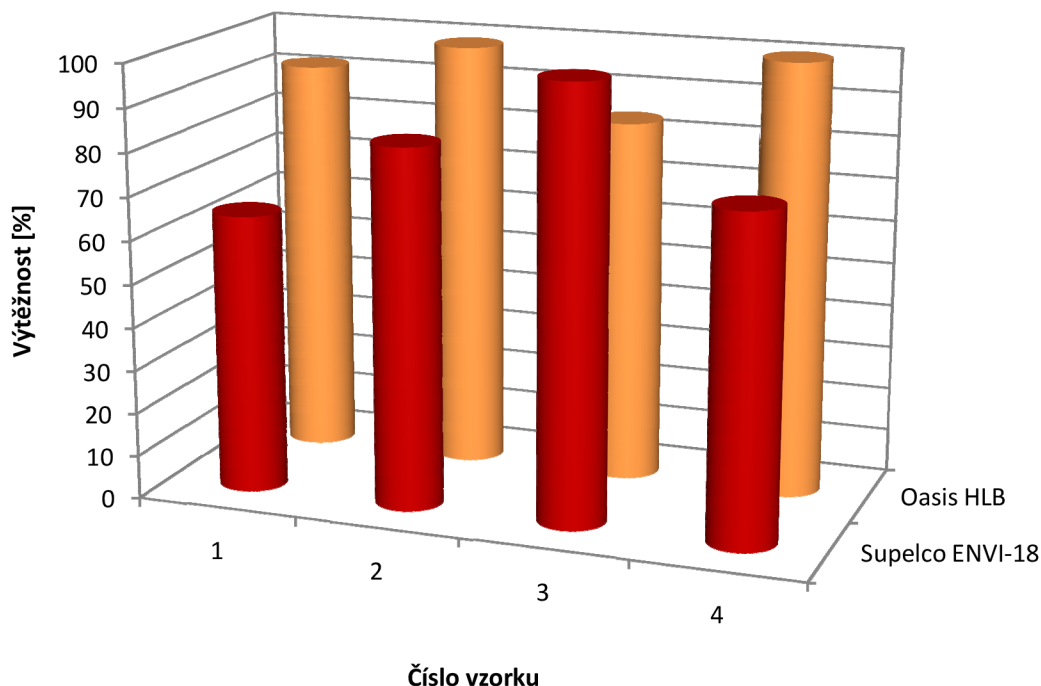
Obrázek 42: Kalibrační křivka komplexu diklofenaku s methylenovou modří 0,5 mmol.l⁻¹

6.2.4 Stanovení výtěžnosti

Stanovení výtěžnosti bylo prováděno pomocí roztoku standardu diklofenaku rozpuštěného v ultra čisté vodě. Pro izolaci diklofenaku z matrice bylo použito dvou typů kolonek, Supelco ENVI-18 a Oasis HLB, přičemž byly porovnány hodnoty výtěžnosti, a na základě získaných výsledků bylo rozhodnuto, které kolony budou dále použity pro zakoncentrování reálných vzorků odpadních vod. Pro každou sadu kolonek byly připraveny 4 roztoky standardu diklofenaku v ultra čisté vodě o koncentraci 1 mg.l⁻¹ a objemu 200 ml. Po zakoncentrování a následné eluci 10 ml eluční směsí (aceton, ethylacetát) byly vzorky za současného zahřívání při teplotě 50 °C vysušeny pod proudem dusíku a následně opět rozpuštěny v 10 ml ultra čisté vody. Pro extrakci kapalina-kapalina se odebraly 4 ml vzorku, ke kterému byla přidána methylenová modř (1 mmol.l⁻¹), amonný pufr a chloroform. Extrakty byly ihned proměřovány na UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 653 nm, přičemž pro vyhodnocení byla opět vybrána hodnota z 10. minuty měření.

Tabulka 18: Srovnání výtěžností SPE kolonek Supelco ENVI-18 a Oasis HLB pro diklofenak

Číslo vzorku	Původní koncentrace [mg.l ⁻¹]	Supelco ENVI-18		Oasis HLB	
		Výsledná koncentrace [mg.l ⁻¹]	Výtěžnost [%]	Výsledná koncentrace [mg.l ⁻¹]	Výtěžnost [%]
1	20,20	13,04	64,54	18,56	91,86
2	20,20	16,78	83,06	19,96	98,83
3	20,20	20,22	100,11	16,93	83,79
4	20,20	15,19	75,17	20,96	103,78



Obrázek 43: Srovnání výtěžností dvou typů SPE kolonek

Tabulka 19: Porovnání výsledných hodnot u obou typů kolonek

Výsledné hodnoty	Supelco ENVI-18	Oasis HLB
Prům. koncentrace [mg.l⁻¹]	16,31	19,10
Prům. výtěžnost [%]	80,72	94,56
Rozptyl [mg.l⁻¹]	6,88	2,31
Směrodatná odchylka [mg.l⁻¹]	2,62	1,52
RSD [%]	32,16	15,91

Jak je patrné z naměřených dat, vhodnějšími kolonkami pro stanovení diklofenaku se ukázaly být kolonky Oasis HLB, a to vzhledem k vyšším hodnotám výtěžnosti (94,56 %). Proto byly dále použity i k zakoncentrování sledovaných analytů v reálných vzorcích odpadních vod.

6.2.5 Reálné vzorky

Vzorky pro stanovení diklofenaku z odpadních vod byly odebírány na přítoku a odtoku ČOV Veterinární a farmaceutické univerzity Brno v jednodenních intervalech, vždy ráno v 8.00 a odpoledne v 13.00. Pro srovnání byly dále odebrány dva ranní vzorky na přítoku a odtoku ČOV Brno-Modřice.

6.2.5.1 Měření pH

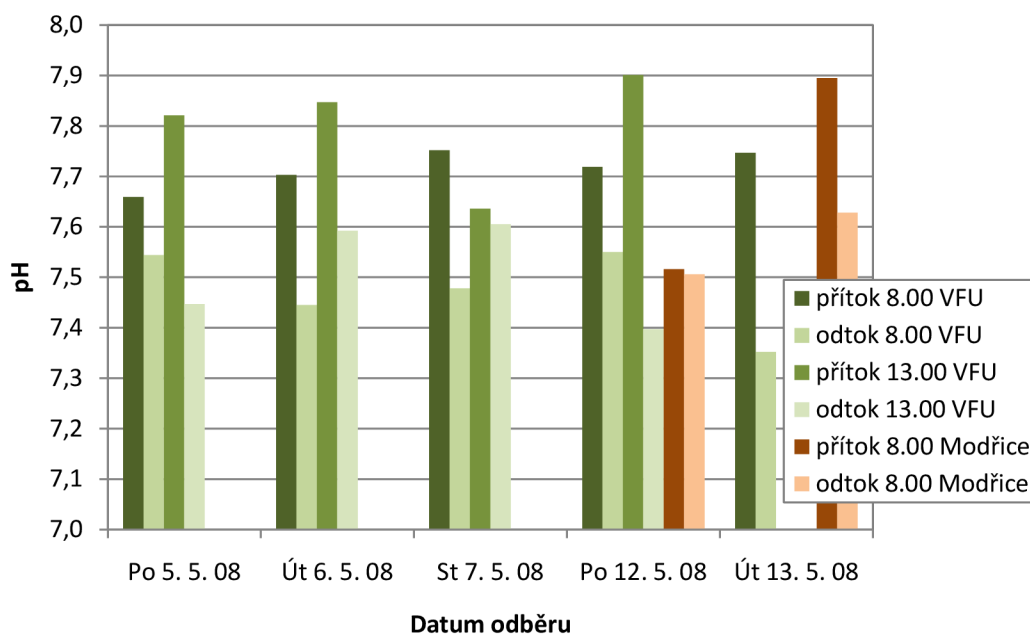
U všech odebraných vzorků odpadních vod byly proměřeny hodnoty pH. Z výsledků vyplývá (Tabulka 20, Tabulka 21 a Obrázek 44), že hodnoty pH na obou ČOV se na odtoku i na přítoku pohybují ve slabě alkalické oblasti. Nejvyšší naměřená hodnota pH na přítoku ČOV VFU činí 7,90 a nejnižší 7,64. Na odtoku se hodnoty pH pohybovaly v rozmezí 7,35–7,61.

Tabulka 20: Hodnoty pH odpadní vody na ČOV VFU

Datum odběru	pH v 8.00		pH v 13.00	
	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok
Po 5. 5. 08	7,66	7,54	7,82	7,45
Út 6. 5. 08	7,70	7,45	7,85	7,59
St 7. 5. 08	7,75	7,48	7,64	7,61
Po 12. 5. 08	7,72	7,55	7,90	7,40
Út 13. 5. 08	7,75	7,35	–	–

Tabulka 21: Hodnoty pH odpadní vody na ČOV Brno-Modřice

Datum odběru	pH v 8.00	
	Přítok	Odtok
Po 12. 5. 08	7,52	7,51
Út 13. 5. 08	7,90	7,63



Obrázek 44: Hodnoty pH odpadní vody na ČOV VFU a Brno-Modřice

6.2.5.2 Koncentrace diklofenaku v reálných vzorcích

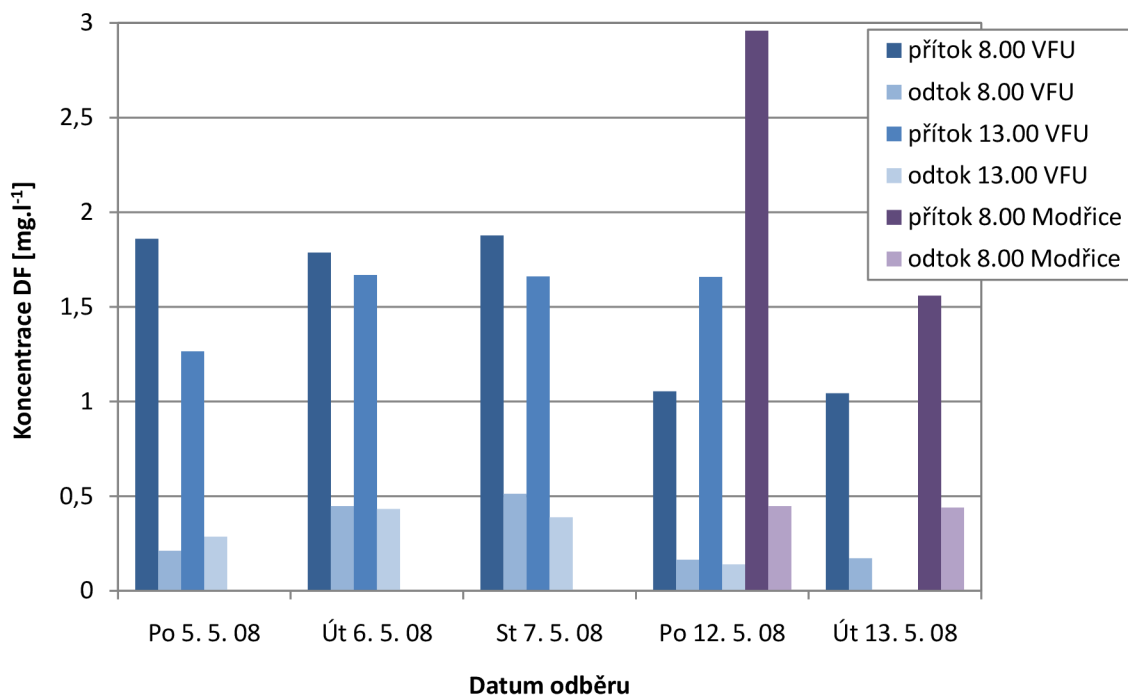
Pro výpočet koncentrace diklofenaku ve vzorcích odpadní vody z ČOV Veterinární a farmaceutické univerzity Brno byla využita kalibrační křivka sestavená pro koncentraci methylenové modři 1 mmol.l^{-1} (Tabulka 22, Obrázek 44). Protože vzorky odpadní vody z ČOV Brno-Modřice byly pro analýzu odebírány v polovičním množství, tj. místo 200 ml pouze 100 ml, byla předpokládána nižší koncentrace analytu při konečném stanovení, a proto byla pro tyto vzorky použita kalibrační křivka pro koncentraci methylenové modři $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ (Tabulka 23, Obrázek 45).

Tabulka 22: Koncentrace diklofenaku v odpadní vodě z ČOV VFU

Datum odběru	Koncentrace DF v 8.00 [mg.l^{-1}]		Koncentrace DF v 13.00 [mg.l^{-1}]	
	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok
Po 5. 5. 08	1,86	0,21	1,26	0,29
Út 6. 5. 08	1,79	0,45	1,67	0,43
St 7. 5. 08	1,88	0,51	1,66	0,39
Po 12. 5. 08	1,05	0,16	1,66	0,14
Út 13. 5. 08	1,04	0,17	–	–

Tabulka 23: Koncentrace diklofenaku v odpadní vodě z ČOV Brno-Modřice

Datum odběru	Koncentrace DF v 8.00 [mg.l^{-1}]	
	Přítok	Odtok
Po 12. 5. 08	2,96	0,45
Út 13. 5. 08	1,56	0,44



Obrázek 45: Srovnání koncentrací diklofenaku na ČOV VFU a Brno-Modřice

Hodnoty koncentrací na přítoku ČOV VFU se pohybují v rozmezí 1,04–1,88 mg.l^{-1} , zatímco na odtoku v rozmezí 0,14–0,51 mg.l^{-1} . Vzorke z ČOV Brno-Modřice ukazují na podobné hodnoty koncentrací diklofenaku jak na přítoku, tak na odtoku.

7 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na využití spektrofotometrie při stanovování reziduí léčiv v odpadních vodách. Z jednotlivých skupin léčiv byly vybrány tetracyklin a diklofenak, z důvodu jejich častého používání v humánní a veterinární medicíně. Vzorky byly odebrány z čistírny odpadních vod v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, protože se zde předpokládala zvýšená koncentrace stanovovaných léčiv. Pro srovnání byly odebrány i vzorky z velkokapacitní čistírny odpadních vod Brno-Modřice.

Cílem práce bylo stanovit metodické postupy pro stanovení vybraných léčiv, tj. tetracyklinu a diklofenaku na bázi UV/VIS spektrofotometrie, a to zejména ve viditelné oblasti spektra. Spektrofotometrické stanovení tetracyklinů bylo prováděno přímo po zakoncentrování v UV oblasti spektra. Při stanovování diklofenaku bylo využito reakce s methylenovou modří, za tvorby komplexu, a následné detekce ve viditelné oblasti spektra.

V rámci zpracované diplomové práce byly získány následující výsledky:

- Byly vypracovány techniky pro separaci a zakoncentrování reziduí léčiv z odpadních vod a vhodný analytický postup pro spektrofotometrické stanovení.
- Pro izolaci tetracyklinů bylo využito extrakce sonikací a následné přečištění a zakoncentrování na SPE kolonkách Supelco ENVI-18, s vypočtenou výtěžností 97,42 %.
- Izolace diklofenaku z odpadních vod byla provedena pomocí SPE extrakce na kolonkách Oasis HLB, přičemž byly srovnány výtěžnosti dvou typů kolonek, a to Supelco ENVI-18, kde výtěžnost činila 80,72 % a Oasis HLB, u kterých byla vypočítána hodnota 94,56 %.
- U reálných vzorků byly pozorovány několikanásobně vyšší koncentrace na přítoku ČOV než na odtoku. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že ČOV je částečné množství těchto látek schopna zadržovat, avšak určité procento i tak přechází do dalšího vodního cyklu.

Využití UV/VIS spektrofotometrie při stanovení reziduí léčiv z odpadní vody se jeví jako metoda relativně jednoduchá a rychlá. Avšak před vlastním stanovením je třeba provést několik důležitých separačních kroků pro zakoncentrování a přečištění zkoumaných analytů, z důvodu přítomnosti velkého množství interferujících látek, které mohou při konečné detekci velmi narušovat přesnost celé metody.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Léčivo. [Online] 13. 2 2008. [Citace: 21. 2 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 : autor neznámý, 2005.
5. Postup při výrobě chloralhydrátu. [Online] 2006. [Citace: 23. 2 2008.] http://www.eurochem.cz/polavolt/org/obory/farmacie/uvod/sedativa/vzorcer/schema_c.gif.
6. **Friedl, Z.** *Vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou: Struktura molekul a jejich biologické vlastnosti*. VUT v Brně. Brno, 2006. Přednáška.
7. Membránový transport. [Online] 19. 1 2008. [Citace: 29. 2 2008.] http://cs.wikipedia.org/wiki/Membránový_transport.
8. **Voet, D., Voet, J. G.** *Biochemistry*. 3. vydání. : John Wiley and Co., 2004. Sv. 1.
9. Membránový transport: Příručka pro učitele. Buňka - interaktivní výuková aplikace. [Online] 2006. [Citace: 29. 2 2008.] www.sszdra-karvina.cz/bunka/bi/met/mtra.pdf.
10. **Vodrážka, Z., Krechl, J.** *Bioorganická chemie*. Praha : SNTL, 2002.
11. **Kuchař, M., Rejholec, V.** *Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou*. Praha : Academia, 1987.
12. **Hynie, S.** *Farmakologie v kostce*. Praha : Triton, 1999.
13. **Borovanský, A., Csöllei, J.** *Farmaceutická chemie IV*. Brno : VFU, 2003. ISBN 80-7305-474-4.
14. **Farsa, O.** *Antibakteriální chemoterapeutika*. VFU. Brno, 2005. Přednáška.
15. **Nyč, O., Urbášková, P., Marešová, V., Prokeš, M., Jindrák, V., Švihovec, J., Sechser, T., Karen, I., Hoza, J.** *Konsensus používání antibiotik III., Chinolony*. Praha : ČLS JEP, 2006.
16. Antibiotikum. [Online] 26. 2 2008. [Citace: 12. 3 2008.] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum>.

17. **Martínková, J. Geršl, V., Mičuda, S., Grim, J., Macháčková, J., Čermanová, J.** Antibiotika. [Online] 1999. [Citace: 12. 3 2008.]
<http://camelot.lfhk.cuni.cz/farmakol/cz/antib99.doc>.
18. **Cleuvers, M.** Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2004, Sv. 59, stránky 309-315.
19. **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, Sv. 36, str. 2.
20. **Boxall, A., Breton, R.** Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Regulatory Drivers and Research Needs. *QSAR and Combinational Science.* 2003, Sv. 22, str. 3.
21. **Kümmerer, K.** Drugs in the Environment: Emission of Drugs, Diagnostic Aids and Disinfectants into Wastewater by Hospitals in Relation to Other Sources. *Chemosphere.* 2001, Sv. 45, stránky 6-7.
22. **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, Sv. 40, str. 7.
23. *Role of metabolism in chemical toxicity. In Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects, C Ionnides. Vermeulen, N. P. E.* Florida : CRC Press, Boca Raton, 1996.
24. **Cunningham, V.** Special Characteristics of Pharmaceuticals Related to Environmental Fate, In Pharmaceuticals in the environment: Sources, Fate, Effects and Risks. *Springer.* 2, 2004, Sv. 2.
25. **Sumpter, J. P.** Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. *Toxicology Letters.* 1998, Sv. 102-103.
26. **Heberer, T.** Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters.* 2002, Sv. 131, stránky 5-17.
27. **Daughton, C. G., Ternes, T.** Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agent sof subtle chase? *Environmental Health Perspectives.* 6, 1999, Sv. 107, stránky 907-938.
28. **McEwen, S., Fedorka-Cray, P.** Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Disease.* 2002, Sv. 34, stránky 93-106.

29. **Koschorreck, J., Koch, C., Ronnefahrt, I.** Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU – a regulatory perspective. *Toxicology Letters*. 2002, Sv. 131, stránky 117-124.
30. **Teuber, M.** Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1999, Sv. 56, stránky 755-763.
31. **Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U.** Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*. 2003, Sv. 43, stránky 325-335.
32. ČOV Modřice. [Online] 21. 7 2005. [Citace: 17. 3 2008.]
<http://www.bvk.cz/ipublisher/files/COV%20Modrice%20-%20technicky%20popis.pdf?show=dbfil&id=102>.
33. **Fent, B., Paxeus, N., Giudice, R. L., Pollio, A., Garric, J.** Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, Sv. 55, stránky 359-370.
34. **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, Sv. 122, stránky 195-204.
35. **Fent, B., Weston, A., Caminada, D.** Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 2005, Sv. 76, stránky 122-159.
36. **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, Sv. 336, stránky 155-170.
37. **Stumpf, M., Ternes, T. A., Wiiken, 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, Sv. 225, stránky 135-141.
38. **Redderesen, K., Heberer, T., Dunnbier, U.** Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground and drinking water. *Chemosphere*. 2002, Sv. 49, stránky 539-544.
39. **Metzger, J. W.** Drugs in municipal landfills and landfill leachates In Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. [editor] K. Kümmerer. *Springer*. 2004.
40. **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, Sv. 22, stránky 340-351.

41. **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, Sv. 4, stránky 276-299.
42. **Kristensen, P., Tyle, H.** The assessment of bioaccumulation. [autor knihy] Loskill R. Nagel R. *Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the Assessment*. Weinheim : VCH Publishers, 1991.
43. **Dorado, J., Almendros, G.** Assessment of molecular descriptors involved in the sorptive interactions of phenoxy-carboxylic acid. *Toxicology and Environmental Chemistry*. 2001, Sv. 84, stránky 21-32.
44. **Beause, J.** Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004, Sv. 23, stránky 753-761.
45. **Opperhuizen, A.** Bioconcentration and biomagnification: is a direction necessary? [autor knihy] Loskill R. Nagel R. *Bioaccumulation in aquatic systems*. Weinheim : VCH Publishers, 1991.
46. **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, Sv. 27, stránky 2855-2863.
47. Biomagnification. [Online] 16. 12 2006. [Citace: 19. 3 2008.] <http://toxics.usgs.gov/definitions/biomagnification.html>.
48. **Clark, T., Clark, K., Paterson, S., Mackay, C., Nostrom, R. J.** Wildlife monitoring, modelling and fugacity. *Environmental Science and Technology*. 1988, Sv. 22, stránky 120-127.
49. **Farrington, J. W.** Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Environmental Health Perspectives*. 1991, Sv. 90, stránky 75-84.
50. **Janků, J., Čermák, J.** *Vzorkování odpadů*. Praha : VŠCHT v Praze, 2006.
51. **Crepin, J., Johnson, R. L.** *Soil sampling and methods of analysis*. : Carter R. M., editor, Lewis publishers, 1993. ISBN 0-87371-861-5.
52. **Thorsten, Ch., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Goldbach, H. E.** Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil and Surface Waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 2003.

53. **Renew, J. E., Huang, C. H.** Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 2004.
54. Metody získávání a izolace sloučenin 2. (Extrakce). [Online] 1999. [Citace: 16. 4 2008.] <http://chemlinkcz.cz/clanky/metody-ziskavani-a-izolace-sloucenin-2-extrakce>.
55. **Klejdus, B.** *Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu*. 2004. Habilitační práce.
56. Extrakce na tuhou fázi. [Online] 2003. [Citace: 16. 4 2008.] www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf.
57. **Popl, M.** *Analytická chemie životního prostředí*. Praha : VŠCHT v Praze, 1999. 4. přeprac. vyd.. ISBN 8070803363.
58. **Coufal, P.** *Extrakce*. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Praha, 2006. Přednáška.
59. **Procházková, D.** Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy*. 2002, Sv. 96, stránky 827-852.
60. Stanovení Fe v cigaretovém popelu. [Online] 2007. [Citace: 17. 4 2008.] analytika.upol.cz/electromigrace/docs/navody/ACHSB/doc/09.doc.
61. Electromagnetic spectrum. [Online] 17. 4 2008. [Citace: 17. 4 2008.] http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_spectrum.
62. **Zabada, M.** *Instrumentální strukturní analýza v OCH*. VUT v Brně. Brno, 2005. Přednáška.
63. **Klouda, P.** *Moderní analytické metody*. Ostrava : Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 2. upr. vyd.. ISBN 80-86369-07-0.
64. Optické metody. [Online] 7. 7 2005. [Citace: 22. 4 2008.] www.natur.cuni.cz/~opekar/analchem/anchem14a.doc.
65. Repetitorium chemie VIII. [Online] 22. 12 2004. [Citace: 23. 4 2008.] www.biomed.cas.cz/mbu/gabriel/Repetitorium%20chemie%20VIII.pdf.
66. **Sýkora, D., Fähnrich, J.** *Kapalinová chromatografie a absorpční UV spektrofotometrie*. VŠCHT. Praha, 2008. Přednáška.
67. Beer-Lambert law. [Online] 14. 4 2008. [Citace: 17. 4 2008.] http://en.wikipedia.org/wiki/Beer-Lambert_law.

68. Technologie kvantitativních metod. [Online] 3. 10 2006. [Citace: 23. 4 2008.] <http://portal.lf1.cuni.cz/download.php?fid=2>.
69. **Sommer, L.** *Analytická spektrometrie*. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, n. p., 1986. Sv. I.
70. **Dočekalová, H.** *Instrumentální a strukturní analýza*. VUT v Brně. Brno, 2006. Přednáška.
71. Český lékopis. [Online] 2002. [Citace: 28. 4 2008.] <http://www.lekopis.cz/Default.htm>.
72. **Botello, J. C., Pérez-Caballero, G.** Spectrophotometric determination of diclofenac sodium with methylene blue. *Talanta*. 1995, Vol. 42, 1, pp. 105-108.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATP	Adenosintrifosfát
AO	Atomový orbital
BCF	Biokoncentrační faktor
CAR	Carboxen™
CNS	Centrální nervová soustava
CW	Carbowax™
ČOV	Čistírna odpadních vod
DF	Diklofenak
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
D_{ow}	Rozdělovací koeficient voda/oktanol
DVB	Divinylbenzen
HPLC	High performance liquid chromatography (vysoce účinná kapalinová chromatografie)
INN	International Non-Proprietary Name (generické názvy léčiv)
IR	Infračervená oblast spektra
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
LLE	Liquid-liquid extraction (extrakce kapalina-kapalina)
MO	Molekulový orbital
M_r	Molekulová hmotnost
PA	Polyamid
PABA	Kyselina <i>p</i> -aminobenzoová

PDMS	Polydimethylsiloxan
pK_a	Disociační konstanta
RSD	Relative standard deviation (relativní směrodatná odchylka)
QSAR	Quantitative structure-activity relationship (kvantitativní vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou)
SPE	Solid phase extraction (extrakce tuhou fází)
SPME	Solid phase microextraction (mikroextrakce tuhou fází)
TC	Tetracykliny
TPR	Templated resin (podkladová pryskyřice)
UV	Ultrafialová oblast spektra
VIS	Viditelná oblast spektra
VFU	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)
WWTP	Waste-water treatment plant (čistírna odpadních vod)