ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na sledování průniku syntetických farmak do vodního ekosystému. Sledovanými léčivy byly nesteroidní analgetika, konkrétně ketoprofen a diclofenac. Cílem této práce bylo vypracovat vhodnou analytickou metodu pro izolaci analytů z dané matrice a optimální postup pro identifikaci a stanovení reziduí analgetik ve vodách.

Pro izolaci daných léčiv byla použita separační metoda extrakce na pevnou fázi (SPE) a vlastní stanovení bylo provedeno pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie (HPLC) s detekcí diodovým polem. Vypracovaná a validovaná metoda byla použita na modelových vzorcích vody. Získané výsledky byly zpracovány a byla provedena jejich interpretace.

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on studying synthetic pharmaceuticals spreading into the aquatic ecosystem. Ketoprofen and diclofenac, non-steroidal analgetics were studied. The aim of this work is to develop both a suitable analytic method for analytes isolation from a given matrix and an optimal technique for identification and determination of analgetics residues in waters.

Solid phase extraction (SPE) was employed as the separation method for isolation of given pharmaceuticals and high performance liquid chromatography (HPLC) with diode-array detection was used for their determination. The optimised and validation method was used to model samples of water. Obtained results were evaluated and their interpretation was done.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rezidua léčiv, povrchové vody, odpadní vody, separační metody

KEY WORDS

Residues of pharmaceuticals, surface waters, wastewaters, separation methods

VAŠÍČKOVÁ, P. *Rezidua léčiv ve vodách.* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 43 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

…….....
Podpis studenta

Poděkování:
Chtěla bych poděkovat paní
Prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc.
a Ing. Lucii Vydrové za jejich vstřícnost,
čas, odborné vedení a cenné rady.

OBSAH

1 ÚVOD **7**
2 TEORETICKÁ ČÁST **8**
2.1 Analgetika **8**
2.1.1 Historie používání léčiv 8
2.1.2 Rozdělení analgetik 9
2.1.3 Mechanismus účinku 9
2.1.4 Distribuce léčiv v organismu 9
2.1.5 Biotransformace léčiv 10
2.2 Analgetika-antipyretika **11**
2.2.1 Historie této skupiny léčiv 11
2.2.2 Rozdělení analgetik-antipyretik 12
2.2.3 Mechanismus účinku analgetik-antipyretik 12
2.2.4 Farmakokinetika analgetik-antipyretik 13
2.2.5 Cyklus léčiv v životním prostředí 13
2.2.6 Léčiva v čistírnách odpadních vod 14
2.2.7 Ketoprofen 14
2.2.7.1 Příprava *15*
2.2.7.2 Vlastnosti *15*
2.2.7.3 Metabolismus *15*
2.2.8 Diclofenac 15
2.2.8.1 Příprava *16*
2.2.8.2 Vlastnosti *16*
2.2.8.3 Metabolismus *16*
2.3 Metody stanovení léčiv **16**
2.3.1 Odběry vzorků 16
2.3.2 Úprava vzorku 16
2.3.2.1 Extrakce na tuhém sorbentu *17*
2.3.3 Separace pomocí HPLC 19
2.3.3.1 Vlastní separační metoda *19*
2.3.3.2 Detektory pro HPLC *21*
3 EXPERINMENTÁLNÍ ČÁST **24**
3.1 Přístroje, zařízení, software **24**
3.1.1 Příprava a extrakce vzorků 24
3.1.2 Kapalinová chromatografie 24
3.1.3 Software pro zpracování a prezentaci dat 24
3.2 Používané chemikálie a standardy **24**
3.2.1 Chemikálie 24
3.2.2 Standardy 24
3.3 Pracovní postupy **25**
3.3.1 Stanovované analyty a jejich vlastnosti 25
3.3.1.1 Ketoprofen *25*
3.3.1.2 Diclofenac sodium salt *25*
3.3.2 Izolace analytů 25
3.3.3 Identifikace a kvantifikace analytů 27

3.3.4 Určení chromatografických podmínek ... 27
4 VÝSLEDKY A DISKUZE ... 29
4.1 Optimální chromatografické podmínky ... 29
4.2 Úprava vzorku před vysoko účinnou kapalinovou chromatografií ... 32
4.2.1 Hledání vhodného postupu pro SPE na různých kolonkách ... 32
4.2.1.1 Postup SPE pro kolonky Oasis HLB a ENVI-18 ... 33
4.2.1.2 Postup SPE pro kolonku LC-SAX ... 33
4.2.1.3 Postupy použité na kolonce Oasis HLB ... 33
4.2.2 Výtěžnost ketoprofenu ... 34
4.2.3 Výtěžnost diclofenacu ... 35
4.3 Degradace ketoprofenu a diclofenacu ... 37
5 ZÁVĚR ... 38
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ ... 39
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK ... 42
8 SEZNAM POUŽITÝCH ODBORNÝCH POJMŮ ... 43

1 ÚVOD

V souvislosti s rozšiřováním počtu civilizačních chorob narůstá celosvětově poptávka po nových a účinnějších léčivech vhodných pro aplikaci v humánní a veterinární medicíně.

Mezi nejrozšířenější skupinu léčiv patří analgetika. Jejich velký počet a rozsáhlá aplikace má za následek jejich vstup do všech složek životního prostředí, ve kterých jsou posuzovány jako škodliviny. Protože patří do skupiny biologicky aktivních látek, mohou negativně působit na některé technologie využívané při čištění odpadních vod. Analgetika pronikají do životního prostředí různými cestami a mohou zde způsobovat závažné změny. Šířit se mohou buď v čisté formě nebo již metabolicky pozměněná. V ekosystémech dochází v důsledku jejich distribuce zejména k ovlivnění nebo poškození potravního řetězce. Nejčastější matricí, ve které se rezidua léčiv vyskytují, je odpadní voda. Na základě tohoto poznatku vzrůstá potřeba regulace množství léčiv v odpadních vodách. Může docházet k tomu, že na čistírně odpadních vod nemusí být léčiva zcela odstraněna a mohou tak negativně ovlivňovat efektivitu biologického stupně čištění.

Odpadní voda je proto hlavním zdrojem kontaminace životního prostředí těmito biologicky aktivními látkami. Vývoj nových technologií pro odstranění léčiv z odpadních vod je prvořadým úkolem v oblasti čištění odpadních vod. Proto je důležité vyvíjet nové a ekonomicky výhodné technologické postupy pro jejich odstraňování v čistícím procesu.

Zároveň roste potřeba analýz, které slouží k ověření účinnosti všech stupňů čištění v rámci čistícího procesu. Tyto analýzy musí být schopné stanovit i velmi nízké koncentrace antibiotik v odpadní i vyčištěné vodě. V současné době lze přítomnost antibiotik v odpadní vodě stanovit několika metodami. Hlavní používanou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie, dalšími metodami jsou pak plynová chromatografie a kapilární elektromigrační metody.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Analgetika

Bolest je nejčastější chorobný příznak, lze ho považovat za jeden z podstatných znaků lidského života. Z tohoto důvodu léčba patřila a stále ještě patří mezi stěžejní léčebné úkony léčba bolesti. Svědčí o tom i archeologické nálezy; trepanované lebky prehistorických lidí jsou dokladem dávných pokusů směřujících ke zmírnění úporné bolesti. Bolest lze definovat jako nepříjemný smyslový a emoční zážitek, vyvolaný skutečným, nebo hrozícím poškozením celistvosti organismu.

Podle délky trvání lze bolest rozdělit:

- Akutní – trvá krátce, často signalizuje okamžité poškození tkáně
- Chronická – trvá 3 až 6 měsíců, případně i déle

Podle lokalizace se bolest rozlišuje na dva typy:

- Somatická – vychází z pohybového aparátu, kůže a z povrchu hlavy
- Viscerální – vychází z vnitřních orgánů a cév [1].

Analgetika jsou látky, které snižují nebo potlačují pocit bolesti, aniž by však výrazně ovlivňovala smyslové vnímání a vědomí. Mnohá analgetika vykazují rovněž protizánětlivý a antipyretický účinek. Přestože analgetika neléčí příčinu onemocnění, jejich podávání může významně napomáhat vlastnímu léčebnému procesu tak, že snižují zátěž a stres organismu způsobený bolestí, zánětem a zvýšenou teplotou [2].

2.1.1 Historie používání léčiv

Historie léčby bolesti je snad stejně stará jako lidstvo samo. Z některých nálezů a kreseb z doby kamenné se usuzuje, že člověk již v této době používal rybích kostí ke stimulaci některých míst na těle, čímž dokázal tlumit bolest. Techniku tlumení bolesti pomocí stimulace akupunkturních bodů dovedli k dokonalosti staří Číňané. Staří Řekové používali ke zmírnění bolesti elektroléčbu. Všimli si, že pacientům s bolestivým revmatickým postižením kloubů pomáhají opakované elektrické výboje úhoře (*Scriborinus longum*). Základ léčby bolesti však již v dávné době před naším letopočtem tvořila „farmakoterapie" založená na aplikaci fytofarmak. Prvními léky používanými proti bolesti byly rostlinné výtažky a alkoholické nápoje; vůbec prvním používaným lékem byla maková šťáva, kterou rozšířili nomádští obchodníci ze Sýrie. Znalosti o účinku opia měli i staří Řekové, kteří dovedli rozlišovat šťávu vytlačovanou z nezralých makovic, zvanou meconium a mléčnou šťávou získávanou naříznutím nezralých makovic, pojmenovanou opos (odtud název opium). Osobní lékař císaře Nerona vymyslel lék theriak, který se používal jak proti nespavosti, tak při léčbě silné bolesti, jehož základní složkou bylo právě opium.

Do Evropy se opium dostalo v období renesance. Na rozvoji jeho používání se významně podílel švýcarský lékař pracující v oblasti farmakologie Paracelsus, který vynalezl opiovou tinkturu. V 18. a 19. století bylo opium dodáváno lékárníkům a lékařům jako sedativum a lék proti bolesti. Již od 16. století však začalo být opium stále častěji zneužíváno jako droga. K významnému objevu došlo v roce 1805, kdy německý lékárník Serturner izoloval z opia bílý prášek, který nazval podle boha spánku Morphea – morphin [3].

2.1.2 Rozdělení analgetik

Analgetika se podle míry a mechanismu účinku dělí na:

- narkotická
- antipyretická [2].

2.1.3 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku analgetik spočívá v jejich zásahu do tzv. dráhy bolesti. Proces vzniku a vnímání bolesti je složitý děj začínající podrážděním receptorů bolesti, nazývaných nociceptory, umístěných téměř ve všech tkáních.

Periferní nociceptory jsou volná nervová zakončení neuronů a jejich podrážděním, které může být mechanické, termické nebo chemické, dochází k uvolňování mediátorů bolesti, což jsou např. prostaglandiny, které při poškození tkání zvyšují citlivost těchto receptorů. Z nociceptorů se bolestivý signál šíří do zadních rohů míšních. Většina bolestivých impulsů je vedena z periferie do míchy pomalými nemyelinizovanými C-vlákny, která vedou tupou a pálivou bolest. Ostrá, bodavá, dobře lokalizovatelná bolest se propaguje rychleji, a to málo myelinizovanými A_δ-vlákny.

Druhým neuronem dráhy bolesti jsou spinothalamické dráhy, které vedou signál z míchy do thalamu.

Třetím neuronem dráhy bolesti jsou thalamokortikální dráhy, vedoucí signály z thalamických jader do mozkové kůry. Její úloha spočívá ve zpracování přicházejících informací, lokalizaci bolesti, určení jejího původu a zdroje a v odpovědi na bolest [4].

Zatímco nenarkotická slabá analgetika-antipyretika účinkují zásahem do tvorby prostaglandinů, mechanismus účinku narkoanalgetik je dán přímým působením na nociceptory [5].

2.1.4 Distribuce léčiv v organismu

Léčiva zpravidla dosahují cílového orgánu krevní cestou. Musí se proto nejdříve dostat do krve, a to většinou do venózní větve krevního oběhu. Existuje několik možných přívodních cest. Účinná látka se může podávat intravenózní cestou, přímo do krevního oběhu, zatímco při subkutánní (podkožní) nebo intramuskulární (nitrosvalové) aplikaci musí difundovat teprve z místa podání do krve. Mnohem častěji se dává přednost jednoduchému způsobu podání léčiva ústy – perorálně. Tímto způsobem podané léčivo se resorbuje sliznicí trávícího ústrojí přímo do krve. Nevýhodou perorálního podání je to, že účinná látka musí cestou do krevního oběhu projít vždy játry, ve kterých léčiva podléhají rychlé chemické přeměně a inaktivaci. Probíhá-li tato přeměna rychle, vstoupí do celkového oběhu v nezměněné podobě jen část resorbovaného léčiva, protože zbylá část je vyřazena buď biotransformací nebo procesem zvaným „*efekt prvního průchodu játry*“ [6].

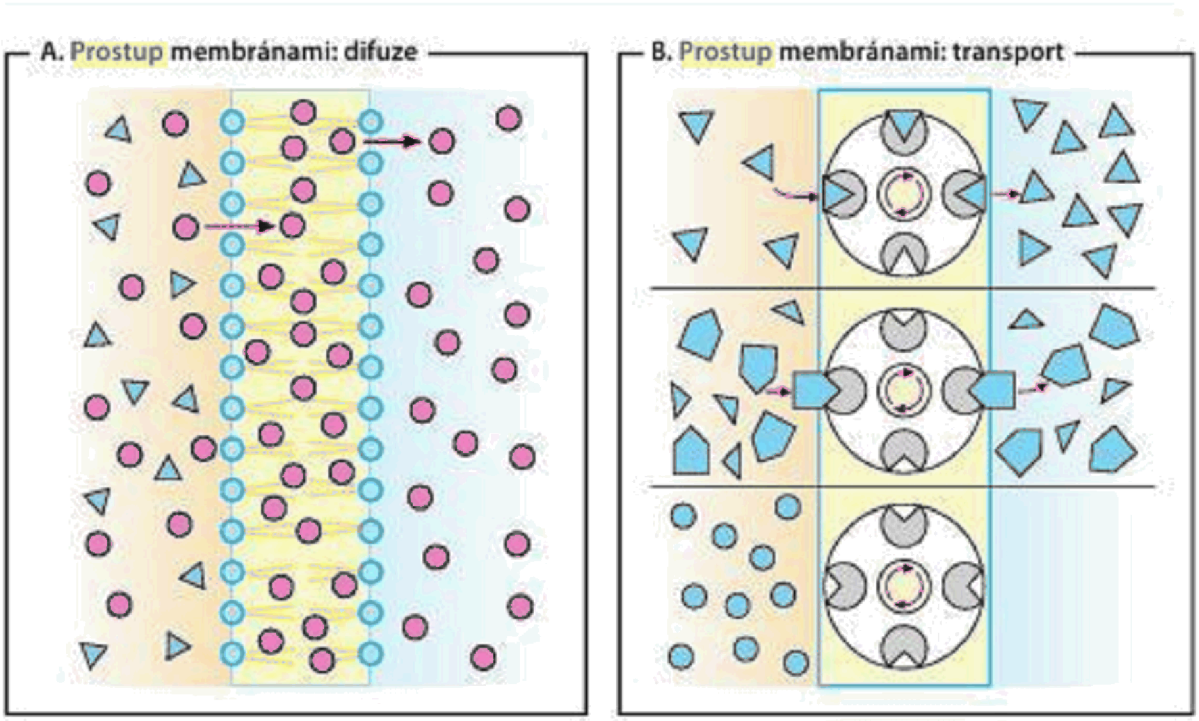
Účinek léčiv často závisí na jejich zásahu do buněčných funkcí. Regulace buněčných funkcí se děje pomocí přenašečů, což jsou mediátory a transmitery uvolňované z nervů, které buňka rozpoznává pomocí receptorů. Buněčná funkce je ovlivňována i změnou aktivity transportních systémů. Léčiva mohou ovlivňovat přímo nitrobuněčný metabolismus. Na rozdíl od látek působících na struktury buněčné membrány zvnějšku, musí tyto látky prostoupit buněčnou membránou. Buněčná membrána je v zásadě tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou, ve které jsou zabudovány integrální membránové proteiny nebo transportní molekuly.

Fosfolipidová membrána má hydrofobní vnitřek, který představuje pro difuzi nabitých částic téměř neproniknutelnou bariéru. Nepolární částice naopak prostupují membránou dobře, což má velký význam pro resorpci, distribuci a eliminaci léčiv. Hlavním předpokladem resorpce léčiv je jejich schopnost překonávat lipidovou dvojvrstvu.

Látky mohou prostupovat membránou více způsoby:

- ✓ *Difuzí* – lipofilní látky mohou přestupovat do membrány z mimobuněčného prostoru, v ní se nahromadit a opustit ji směrem do cytozolu. Směr a rychlost tohoto prostupu závisí na poměrných koncentracích v kapalných prostředích a v membráně. Čím větší je gradient, tím víc léčiva difunduje za jednotku času (Fickův zákon).
- ✓ *Transportem* – některá léčiva překonávají bariéru membrány nezávisle na svých fyzikálně-chemických vlastnostech, zejména na lipofilitě, a to prostřednictvím transportních systémů. Základním předpokladem je to, aby látka měla afinitu k transportnímu systému a pomocí něho byla přenesena přes membránu.

Distribuce léčiv je umožněna různě. Resorbované léčivo se nejprve rozdělí v krvi a odtud se dostává dále do různých tělních tkání. Distribuce léčiv se může omezit na mimobuněčný prostor nebo mohou tyto látky prostupovat do vnitra buňky [6].



Obr. č. 1: *Možnosti prostupu látek membránou* [6]

2.1.5 Biotransformace léčiv

Mnoho z terapeuticky využívaných látek se v organismu může chemicky přeměňovat – biotransformují [6]. Při biotransformaci léčiv se tvoří hydrofilnější, polárnější metabolity, které jsou z organismu vylučovány lépe, než původní lipofilní látka [4]. Metabolity jsou často farmakodynamicky méně aktivní než mateřské léčivo a některé z nich mohou být dokonce neúčinné. Jiné produkty tohoto procesu však biotransformací získávají větší aktivitu nebo

toxické vlastnosti, včetně účinků cytotoxických, mutagenních, teratogenních nebo karcinogenních [7].

Přes nesmírně velký počet léčiv se jejich biotransformační přeměna v těle děje na základě relativně malého počtu reakcí, které jsou klasifikovány do dvou biotransformačních fází.

Při biotransformačních reakcích I. fáze, ke kterým patří reakce oxidační, redukční a hydrolytické, se buď zavádí do chemické struktury léčiva funkční skupina, nebo dochází ke změně stávající funkční skupiny léčiva. Výsledkem je obvykle ztráta farmakologické účinnosti původní látky.

Biotransformační reakce II. fáze se nazývají reakce konjugační nebo syntetické. Při nich dochází za účasti enzymů transferaz k vytvoření kovalentní vazby mezi funkční skupinou původního léčiva, případně jeho metabolitu a mezi konjugačním činidlem. Konjugační činidla vznikají v těle v procesu intermediárního metabolismu ze živin (např. kyselina glukuronová).

Biotransformační reakce jsou katalyzovány enzymy. Hlavním místem přeměny léčiv jsou játra (avšak také jiné orgány, např. gastrointestinální trakt, kůže, plíce), která mají významnou metabolickou aktivitu.

Po biotransformaci jsou léčiva z těla vylučována exkrecí buď v nezměněné formě, nebo jako metabolity. Nejdůležitějším orgánem pro eliminaci léčiv a jejich metabolitů jsou ledviny. Látky, které jsou vylučovány stolicí, jsou převážně neabsorbované perorálně podané léčivé látky nebo metabolity vylučované do žluči a nereabsorbované ze střevního traktu [4].

2.2 Analgetika-antipyretika

Analgetika-antipyretika představují neustále se vyvíjející a velmi často používanou skupinu léčiv. Někdy bývá tato skupina léčiv označována jako neopioidní analgetika nebo nesteroidní protizánětlivé látky (NSAID). Analgetika-antipyretika mají sice slabší analgetický efekt než opiáty, ale na rozdíl od nich mají další příznivé účinky, a to nejen antipyretický (tj. snižující horečku), ale zejména protizánětlivý (antiflogistický). Jejich výsledný efekt je tedy komplexnější, než jsou vyhraněné účinky analgetik-anodyn [1].

2.2.1 Historie této skupiny léčiv

Schopnost vrbové kůry (*Cortex salicin*) snižovat horečku byla známá již v druhé polovině 18. století, avšak teprve z ní izolovaný antipyreticky účinný glykosid salicin dal počátkem 19. století reálný směr výzkumu, který přes kyselinu salicylovou vyvrcholil koncem tohoto století přípravou kyseliny acetylsalicylové, účinné látky obsažené téměř ve všech analgetikách.

Druhý směr vývoje skupiny analgetik-antipyretik vznikl na základě poznání antipyretických vlastnosti kůry chinovníku (*Cortex Chinae*), z níž byl počátkem 19. století izolovaný chinin, který se jako antipyretikum udržel v terapii dodnes [5].

Hlavní érou rozvoje NSAID byla bezesporu druhá polovina minulého století. V roce 1969 byl vyroben ibuprofen, který měl podstatně lepší snášenlivost než např. indometacin, vyrobený dříve. V současné době je ibuprofen v řadě zemí nejčastěji předepisovaným antirevmatikem. V sedmdesátých a osmdesátých letech byl do praxe uveden diclofenac a ketoprofen, další dodnes velmi oblíbená antirevmatika. Devadesátá léta přinesla zcela novou generaci NSAID, tzv. selektivní inhibitory cyklooxygenázy II (např. rofecoxib, celecoxib), vyznačující se prakticky absencí gastrointestinálních nežádoucích účinků [8].

2.2.2 Rozdělení analgetik-antipyretik

Ke klasifikaci nesteroidních protizánětlivých látek lze zvolit různá kritéria, z nichž každé má své přednosti i nedostatky.

Nejčastější je dělení *podle chemické struktury*, které informuje o základních vlastnostech dané skupiny [4]

- deriváty kyseliny salicylové
- deriváty kyseliny octové
- deriváty kyseliny propionové
- deriváty kyseliny anthranilové
- deriváty anilinu
- deriváty pyrazolonu
- oxikamy (arylsulfonamidy)
- koxiby [2].

Z terapeutického hlediska je důležitá délka působení jednotlivých látek a rychlost nástupu ustálené hladiny léčiva po jeho opakovaném podání. O tom nejlépe informuje rozdělení *podle délky biologického poločasu eliminace.*

Po objevení existence dvou izoenzymů cyklooxygenasy se velký důraz kladl především na schopnost látek selektivně ovlivnit izoenzym COX-2 [4]. Forma COX-1 je přítomna i ve zdravém těle a tvoří prostaglandiny, které chrání žaludek a ledviny, kdežto forma COX-2 vzniká v buňkách jen při zánětu, produkuje prostaglandiny, které zvyšují citlivost nervových zakončení a zesilují bolest spojenou se zánětem [9]. *Podle poměru inhibice obou izoforem cyklooxygenasy* se analgetika-antipyretika rozdělují na:

- *Nespecifické (neselektivní) inhibitory*: ovlivňují obě izoformy cyklooxygenasy. Patří sem většina analgetik-antipyretik.
- *Preferenční inhibitory COX-2*: např. meloxicam, nabumeton, nimesulid, které inhibují COX-2 až 100krát více než COX-1.
- *Selektivní inhibitory COX-2*: koxiby (např. rofecoxib, celecoxib), které ani v maximálních terapeutických dávkách neinhibují COX-1 [4].

2.2.3 Mechanismus účinku analgetik-antipyretik

Podstatou účinku analgetik-antipyretik je inhibice enzymu cyklooxygenasy (COX), která zahajuje biosyntézu prostaglandinů z kyseliny arachidonové [2]. Prostaglandiny, farmakologicky aktivní látky regulující řadu fyziologických funkcí organismu, se prakticky vyskytují ve všech orgánech a ve zvýšené míře také ve tkáních, ve kterých probíhá zánětlivý proces. Prostaglandiny jsou deriváty kyseliny prostanové. V organismu vznikají z kyseliny arachidonové, tj. 5,8,11,14 – eikosatetreanové, která aktivací fosfolipázy A_2 je uvolňována z fosfolipidů buněčných membrán. V případě prostaglandinů se kyselina arachidonová mění vlivem působení cyklooxygenasy na cyklický endoperoxid PGG_2, který je pak redukován na PGH_2. Aktivitu cyklooxygenasy určuje koncentrace kyslíkových a peroxidových radikálů, které jsou ve zvýšené míře uvolňovány v zánětlivých tkáních [5].

V organismu existuje několik izoforem cyklooxygenasy. *Konstituční izoforma cyklooxygenasy COX-1* je tvořená ve většině buněk a je odpovědná za vznik prostaglandinů zajišťujících fyziologické a homeostatické funkce organismu. *Indukovatelná forma cyklooxygenasy COX-2* je syntetizována působením protizánětlivých faktorů v místě zánětu. Je zodpovědná za tvorbu prostaglandinů, které mají lokální zánětlivý účinek, podílí se na

vzniku horečky a bolesti. V srdci a centrálním nervovém systému byl identifikován třetí izoenzym cyklooxygenasy *COX-3* (je odvozený od genu COX-1). Enzym je selektivně inhibován neopioidními analgetiky i některými nesteroidními protizánětlivými látkami (např. ibuprofenem nebo diklofenakem). Je možné, že inhibice COX-3 představuje centrální mechanismus analgetického a antipyretického účinku těchto látek. Protizánětlivé a analgetické účinky nesteroidních protizánětlivých látek jsou však převážně zprostředkované inhibicí COX-2 a následným potlačením tvorby prostaglandinů v periferních tkáních [4].

2.2.4 Farmakokinetika analgetik-antipyretik

K systémovému použití lze tyto léky podávat perorálně, rektálně a parenterálně. Existuje i řada přípravků pro lokální léčbu, kdy látky dosahují terapeutické hladiny pouze v místě podání. Po perorálním podání, které je nejčastější formou aplikace, se většina látek dobře vstřebává z trávícího ústrojí. Potrava může zpomalit rychlost absorpce, ale obvykle neovlivní její rozsah. U řady látek dochází k enterohepatálnímu oběhu, který přispívá ke zvýšení celkového množství účinné látky v organismu.

Vazba na bílkoviny krevní plazmy je vysoká, v mnoha případech dosahuje až 99 % (např. ibuprofen, diclofenac, ketoprofen a další).

Průnik do tkání a tělesných tekutin je dobrý. Po opakovaném podání pronikají nesteroidní protizánětlivé látky do synoviální tekutiny a v ní dosahují asi 60 % plazmatických koncentrací. Vzestup hladin v synoviální tekutině je pomalý, avšak opožděná bývá i eliminace.

Téměř všechny nesteroidní protizánětlivé látky dobře prostupují hematoencefalickou bariérou a většinou i placentární bariérou; důsledku toho lze očekávat nežádoucí účinky na plod.

V játrech dochází k intenzivní biotransformaci (hydroxylaci, oxidaci, glukoronidaci), a to převážně za vzniku neaktivních metabolitů. Na účinný metabolit jsou pak v játrech metabolizované prolátky: parecoxib, sulindac a nabumeton. Pouze malé procento z mateřských látek se vylučuje močí nebo stolicí v nezměněné formě.

Většina látek má krátký poločas eliminace a musí se podávat 3 – 4krát denně [4].

2.2.5 Cyklus léčiv v životním prostředí

Léčiva se řadí mezi tzv. „mikrokontaminanty“, které v posledních letech způsobují značné znepokojení v environmentální oblasti. Ve velkém rozsahu jsou léčiva užívána v humánní i veterinární medicíně. Přesto lze naleznout v literatuře jen málo informací o konečném osudu většiny léčiv, zejména po jejich úmyslném požití.

Léky z humánní oblasti jsou buď v nezměněné formě, případně jako metabolity neustále přiváděny do odpadních vod. Existují dvě cesty: nepřímo, prostřednictvím výkalů, a přímo, tj. vypouštěním z čistíren odpadních vod (ČOV) podniků zabývajících se výrobou léčiv. Do odpadní vody se mohou dostávat také veškerá nepoužitá léčiva. V cyklu humánních léčiv hrají důležitou roli ČOV, které jsou považovány za bodový zdroj znečištění vodního ekosystému [10, 11, 12].

Významným zdrojem léčiv v odpadních vodách jsou nemocnice, protože zde může docházet k jejich úniku do kanalizace bez předběžného ošetření v ČOV; mohou proto přestavovat významný zdroj léčiv vyskytujících se ve vodním ekosystému. Kontakt

nemocničních odpadů s vodním ekosystémem ohrožuje jeho biologickou rovnováhu. Odpadní vody z nemocnic vykazují vůči vodním organismům toxickou aktivitu. Vliv léčiv na vodní populace se obvykle předpovídá podle laboratorních testů akutní a chronické toxicity, např. testů prováděných na řasách, korýších nebo rybách. V koncentracích < 1 mg/l se neprojevuje akutní ekotoxicita, ale > 90% látek má vysokou EC50 při koncentraci > 1 mg/ml.

Ve vodách se vyskytující rezidua léčiv se stávají součástí životního prostředí, ze kterého by se mohly přes potravní řetězce metabolizovat, a tak se vrátit zpět ke člověku, například přes ryby nebo jiné vodní živočichy.

Léčiva používaná ve veterinární medicíně vstupují do životního prostředí kontaktem močůvky a hnoje se zemědělskou půdou nebo přímou depozicí domácími a hospodářskými zvířaty. Ze zemědělských ploch potom mohou být tyto látky splachovány deštěm do vod povrchových, případně prosakují až do vod podzemních.

S vývojem nových citlivějších analytických metod se v posledních letech zvýšila průkaznost přítomnosti těchto látek ve vodním ekosystému[13, 14, 15, 16, 36].

2.2.6 Léčiva v čistírnách odpadních vod

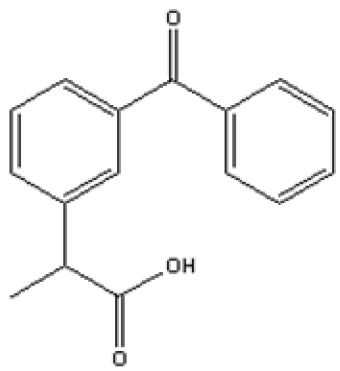
V současné době se projevuje zvýšený zájem o zjišťování přítomnosti a osudu farmaceutických přípravků v životním prostředí, zejména vzhledem k jejich potenciálnímu riziku pro vodní ekosystém. Stále větší množství léků je ročně používáno z důvodu prevence, zmírnění bolestí a zlepšení zdravotního stavu nejen u lidí, ale také u zvířat. Protože jsou léčiva z těla vylučována močí nebo výkaly, dostávají se následně do odpadních vod. Léčiva mohou skončit ve vodním ekosystému, kde lze při jejich působení na vodní organismy očekávat podobný farmakodynamický efek jako při jejich působení na lidi. Kromě toho musíme předpokládat i to, že vedlejší efekty, které se u lidí nemusí projevit, mohou mít významný dopad právě na vodní organismy.

Proto jsou čistírny odpadních vod považovány za nejdůležitější bodový zdroj farmak v životním prostředí. Tradiční ČOV obsahují primární, sekundární a terciální stupeň čištění. V primárním stupni bývají odstraněny nerozpuštěné látky a tuky. Sekundární biologický stupeň odstraňuje rozpuštěnou organickou hmotu. Terciární stupeň čištění poskytuje snížení koncentrace fosforu a dusíku chemickými procesy. Tento tradičně zavedený postup na ČOV však není dostatečně účinný na odstraňování léčiv. Jejich eliminace na ČOV závisí na jejich schopnosti adsorbovat se na pevných částicích, případně na jejich schopnosti rozkladu [11]. Díky jejich schopnosti sorpce na pevné částice odpadního kalu dochází k jejich rozšiřování do suchozemských ekosystémů, a to z důvodu jejich používání jako hnojiv v zemědělství.

Metody, které by umožnily odstranit z odpadních vod farmaka, se teprve rozvíjí. Zjistilo se, že k jejich odstranění by mohla být nejvíce účinná membránová filtrace nebo ozonizace [17, 36].

2.2.7 Ketoprofen

Ketoprofen je derivát kyseliny propionové, který inhibuje jak cyklooxygenázu (neselektivně), tak i lipoxygenázu. Chemicky se jedná o kyselinu 2-(3-benzoylfenyl) propionovou, která byla poprvé syntetizována koncem šedesátých let. Ketoprofen je racemická látka, má pravotočivý optický enantiomer, nazývaný dexketoprofen [5, 7].



Obr. č. 2: *Strukturní vzorec ketoprofenu*

2.2.7.1 Příprava

Ketoprofen se připravuje bromací 3-methylbenzofenonu. Připravený brommethylderivát s NaCN reaguje na fenylacetonitril. Ten v prostředí alkoholátu s diethylkarbonátem dává derivát kyseliny fenyloctové, který se po methylaci na aktivním α-uhlíku zahřátím s kyselinou sírovou za zmýdelnění dekarboxyluje na ketoprofen [5].

2.2.7.2 Vlastnosti

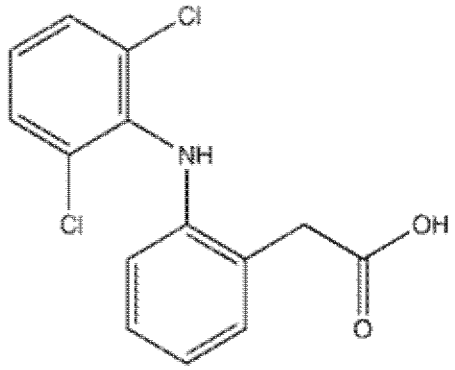
Ketoprofen je bílý krystalický prášek s teplotou tání okolo 94 °C. Dobře se rozpouští v ethanolu a chloroformu a také v silných zásadách. Ve vodě je prakticky nerozpustný [5].

2.2.7.3 Metabolismus

Po perorálním podání je ketoprofen v GIT rychle vstřebáván s 90% biodostupností. Plazmatická koncentrace dosahuje maxima za 2 hodiny. Metabolizuje se úplně v játrech, a to oxidací na hydroxyderiváty, které jsou eliminovány močí ve formě glukuronidů [5, 7].

2.2.8 Diclofenac

Diclofenac je derivát kyseliny octové. Je silným, avšak neselektivním inhibitorem cyklooxygenázy. Chemicky se jedná o kyselinu 2-(2,6-dichloranilino) fenyloctovou, která byla v laboratoři poprvé syntetizována v roce 1966 [5, 7].



Obr. č. 3: *Strukturní vzorec diclofenacu*

2.2.8.1 Příprava

Kyselina 2-chlorbenzoová a 2,6-dichloranilin se kondenzují v prostředí KOH za použití katalyzátoru mědi na derivát kyseliny anthranilové. Ten se redukuje $LiAlH_4$ na primární alkohol, následuje převedení na chlorid a dále pomocí kyanidu na nitril, který se hydrolyzuje na diclofenac.

2.2.8.2 Vlastnosti

Diclofenac je bílý nebo slabě nažloutlý, krystalický a slabě hygroskopický prášek. Většinou je používán ve formě sodné soli. Je mírně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v 96% lihu a těžce se rozpouští v acetonu.

2.2.8.3 Metabolismus

Po perorálním podání se diclofenac rychle absorbuje. Jeho biologický poločas je 1 – 2 hodiny. Je prakticky zcela vázán na bílkoviny krve. Pouze v nepatrném množství může být z organismu vylučován nezměněn, případně ve formě glukuronidů. Metabolizován je převážně oxidativní hydroxylací na aromatickém jádru kyseliny fenyloctové za vzniku hydroxydiclofenacu, který je převážně vylučován močí a jen v menší míře žlučí do stolice.

Mezi jeho nežádoucí účinky se řadí poruchy GIT, bolesti hlavy, kožní reakce a žaludeční vředy [5].

2.3 Metody stanovení léčiv

2.3.1 Odběry vzorků

Typickými místy pro odběr vzorků odpadní vody jsou přítoky a odtoky z ČOV. Většina provozovatelů velkých čistíren rovněž odebírá vzorky i v průběhu procesu čištění nebo na kanalizační síti. Vhodné místo pro získání informací cenných pro řízení procesu čištění je přítok na aktivaci.

Pro odběry vzorků se používají skleněné a plastové vzorkovnice. U skleněných vzorkovnic je třeba dbát na kvalitu skla. Také je možné použití vzorkovačů, což jsou přístroje umožňující jednorázové, ale i opakované odběry vzorků. Vzorkovače určené pro odběr vzorků z míst nepřístupným obsluze se nazývají hlubinné a vzorkovače pracující bez obsluhy jsou nazývané automatickými. Výhodou těchto vzorkovačů je možnost odběru vzorků nepřetržitě a v přesně daných časových intervalech [18].

Vzorky odpadních vod jsou odebírány v pravidelných časových intervalech na přítoku i na odtoku. Odebírá se většinou směsný vzorek [13]. Nutno si však uvědomit, že rozborem tohoto druhu vzorku jsou získávány jen údaje o průměrných hodnotách sledovaných parametrů v daném dni. Lepší je odběr vzorků bodových, kde je dobře vidět vývoj jednotlivých hodnot v různých časových intervalech daného dne [18]. V poslední době jsou také doporučovány pasivní vzorkovače.

2.3.2 Úprava vzorku

První částí úpravy vzorku vody je filtrace, která se provádí z důvodu odstranění hrubých a suspendovaných nečistot. Vzorky odpadních vod jsou filtrovány za pomoci vakua přes

skleněný filtr o velikosti pórů 0,7 μm [13], nebo mohu být filtrovány za pomoci vakua přes skleněný filtr 1 μm s následným použitím nylonového membránového filtru (0,45 μm). Vzorky povrchových vod mohou být filtrovány jen za pomoci 0,45 μm filtrů [19].

Vzorky se uchovávají při teplotě 4 °C v chladničkách do dalšího zpracování, které by mělo být provedeno do 24 hodin po odběru, aby se zamezilo degradaci stanovovaných látek [13, 20]. Dalším krokem úpravy vzorku je extrakce nebo lyofilizace. Pro izolaci léčiv z matrice může být použita extrakce na tuhém sorbetu a mikroextrakce na tuhém nebo kapalném sorbentu. Nejpoužívanější je extrakce tuhým sorbentem (Solid Phase Extraction – SPE) [21].

2.3.2.1 Extrakce na tuhém sorbentu

Extrakce na tuhou fázi 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 proti extrakci kapalina-kapalina je snížení spotřeby organických rozpouštědel.

SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, kam se řadí i analgetika, dále pro jejich zakoncentrování a odstranění nežádoucích látek rušících následná analytická stanovení [22].

Princip extrakce tuhým sorbentem spočívá v tom, že roztok analytu ve vodě se přivede do kontaktu s tuhým sorbentem, který silně sorbuje analyt, ale co nejméně ostatní složky přítomné v roztoku. Pro oddělení sorbentu od roztoku může být zachycený analyt uvolněn buď zahřátím nebo elucí rozpouštědlem. Při desorpci rozpouštědlem se po nanesení vzorku a promytí kolonky analyt desorbuje vhodným rozpouštědlem; rozpouštědlo se u netěkavých analytů může odpařit do sucha a potom se analyt znovu rozpustí v malém množství rozpouštědla. Určitý podíl z tohoto objemu (cca 1–10 %) je potom nastříknut do plynového nebo kapalinového chromatografu. Nevýhodou této techniky je malé množství analytu, které se dostane do analytické kolony (cca 10 %).

K extrakci tuhým sorbentem lze použít uspořádání statické, tj. míchání roztoku analytu se sorbentem a odfiltrování sorbetu, nebo uspořádání dynamické.

Při dynamickém uspořádání protéká roztok vzorku přes sorpční kolonku malých rozměrů, která obsahuje řádově miligramy až gramy vhodného sorbentu. Průtok vzorku je umožněn buď gravitací, pozitivním tlakem (čerpadlem, injekční stříkačkou), nebo negativním tlakem (připojeným vakuem). Sorpční kolonka má obvykle délku okolo 10–20 mm, její vnitřní průměr je 2–4,6 mm a je naplněna sorbentem o velkosti částic 20–50 μm. Jejím hlavním úkolem je zakoncentrování analytu, ale dá se použít i k čištění, uchovávání a derivatizaci vzorku. Namísto sorpční kolonky je možné použít extrakční disk, což je síťka z teflonu nebo ze skelných vláken, ve které je zakotveno asi 90 hm. % silikagelu modifikovaného skupinami C18 nebo C8, popř. hydrofobního kopolymeru. Průměry extrakčních disků se pohybují od 4 mm, pro vzorek o objemu asi 1 ml, do 90 mm. Tloušťka disků je 0,5 mm a jejich předností je rychlost, s jakou je možno vzorek perkolovat.

Volba sorbetu je určována především charakterem látky, která má být zakoncentrována. Nejdůležitější je posoudit povahu a počet funkčních skupin v molekule analytu, polaritu, kyselost apod. Dalším nutným posouzením jsou interakce mezi analytem a sorbentem, kdy je třeba uvažovat charakter solvatované fáze sorbentu ve všech etapách extrakce, např. při dávkování vzorku nebo promývání kolonky apod. Dále je třeba uvažovat také interakce mezi

ostatními složkami vzorku a sorbentem. Zřídka je selektivita sorbentu taková, aby se na něm zachytil pouze analyt a ostatní složky tvořící matrici, by prošly. Složky tvořící matrici není možno odstranit bez toho, aniž by došlo ke ztrátě části analytu. Jedná se o jev, který je typický pro většinu v současnosti používaných sorbentů. Pro sorpci netěkavých organických látek, mezi které se řadí i analgetika, se dají použít hydrofobní sorbenty (aktivní uhlí, silikagel modifikovaný alkylsilany) nebo měniče iontů. Pro sorpci z vody na hydrofóbních sorbentech platí, že retence bude stoupat s rostoucí molekulovou hmotností a klesat s jeho polaritou.

Extrakce je složena z těchto několika kroků: [23]

- Příprava vzorku – fyzikální a chemické vlastnosti vzorku by měly podporovat zadržení vzorku v kolonce. Znamená to převedení tuhého vzorku do roztoku; extrakce tuhých látek kapalinou před použitím SPE; filtrace vzorků obsahujících tuhé nečistoty apod.

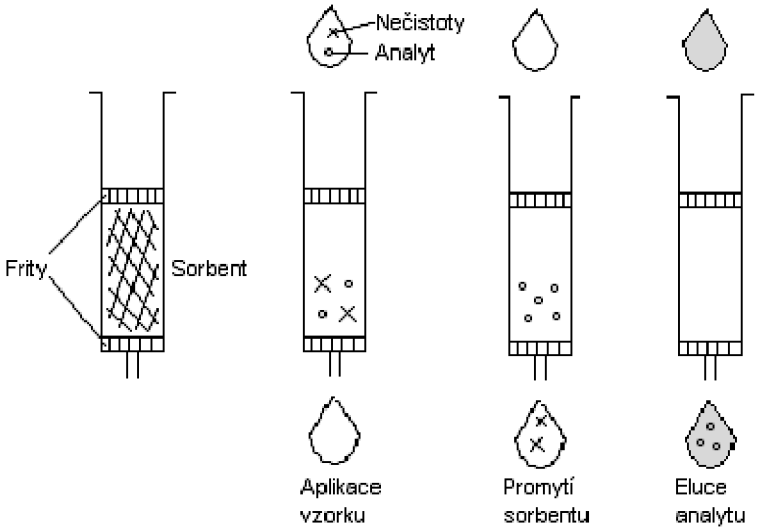
- Aktivace sorbentu – jedná se o smáčení fáze vázané na silikagelu matricí vzorku. Smáčivost je zajištěna solvatací. U některých sorbentů je tento krok vynechán [23].

- Předrovnovážná úprava kolonky – jedná se o nasycení kolonky čistým rozpouštědlem analytu. Ustaví se rovnováha mezi sorbentem v kolonce a tímto rozpouštědlem [24]. Při extrakci analgetik se dá použít methanol s vodou okyselenou HCl na pH 2,6 [20], methanol a deionizovaná voda, n-hexan, aceton, methanol, voda s upraveným pH [23].

- Aplikace vzorku – analyt je z větší části oddělen od matrice vzorku. Lze nastavit různou intenzitu průtoku 5ml/min [26], 8ml/min [25], 5-10ml/min [27].

- Promytí sorbentu – slouží k odstranění nežádoucích složek z vázaných fází bez toho, že by byl eluován analyt. U málo zadržovaného analytu může být tento krok vynechán a sorpční kolonka se zbaví zbytku vody profoukáním plynem [23]; dá se použít také dusík [25].

- Eluce koncentrovaného analytu – znovuzískání analytu se provádí promytím kolonky rozpouštědlem, které eluuje analyty z vázaných fází. U analgetik může být eluce provedena např. čistým methanolem [20], acetonem [25].



Obr. č. 4: *Postup extrakce na tuhém sorbentu* [23]

2.3.3 Separace pomocí HPLC

Vysoko účinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography – HPLC*) je separační metoda, která využívá k dělení složek směsi mnohonásobného opakovaného vytváření rovnovážných stavů složek mezi dvěmi fyzikálně odlišnými fázemi – stacionární a mobilní. Rovnovážné stavy se vytvářejí na základě různých fyzikálně chemických interakcí mezi složkou a mobilní fází, složkou a stacionární fází a také mezi mobilní a stacionární fází [28]. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Složky, které jsou stacionární fází silněji poutány, se zdrží více a tím se složky od sebe separují [24].

2.3.3.1 Vlastní separační metoda

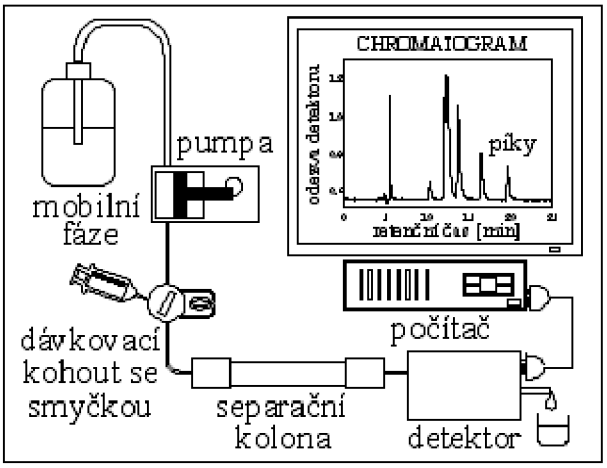
Kapalinová chromatografie se používá především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé, špatně těkavé nebo termicky labilní. Kapalná mobilní fáze zde hraje důležitou roli, je hlavním faktorem ovlivňujícím retenci jednotlivých složek směsi, a tím i jejich vzájemné rozdělení. Vysoce účinná kapalinová chromatografie je separační metoda, která využívá kolony s vhodnou stacionární fází. Vlastnosti těchto fází umožňují dosáhnout rychlé separace složitých směsí s vysokým rozlišením zón. Kolony se stacionární fází obsahují velmi malé částice (3-10 μm), které tvoří homogenní náplň, díky úzké distribuci jejich velikosti. Účinnost takových kolon se pohybuje v rozsahu 30 – 90 000 teoretických pater na metr [28]. Proto je pro dostatečně rychlý průtok mobilní fáze zapotřebí protlačit ji kolonou pomocí čerpadla pod vysokým tlakem.

K dělení látek lze využít všechny vratné dvoufázové separační mechanismy, kterými jsou adsorpce, rozdělování, iontová výměna a sítový efekt gelu. Proto je možné naleznout selektivní a účinný chromatografický systém k dělení všech organických látek rozpustných v různých rozpouštědlech [29].

Při stanovení analgetik se často využívá chromatografie na obrácených fázích [13]. Stacionární fáze je nepolární (často alkyly vázané na silikagel), zatímco mobilní fáze je polární (voda, acetonitril). Jedná se o rozdělovací kapalinovou chromatografii, při které se analyty rozdělují mezi dvě nemísitelné kapalné fáze, a to mobilní fázi, která unáší analyty a

stacionární fázi, která je zakotvena na pevném nosiči. Retenční časy analytů závisí na tom, jak jsou rozpustné v každé z obou fází o rozdílné polaritě. Separace na obrácených fázích je vhodná pro látky jakékoliv polarity. Je to optimální technika pro separaci nepolárních, polárních a disociovatelných vzorků [24].

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



Obr. č. 5: *Schéma kapalinového chromatografu* [30]

Mobilní fází často bývá acetonitril, případně methanol [27]. Může být použita i voda, nebo amonium acetát [26]. Pokud se během separace pomocí HPLC nemění složení mobilní fáze, jedná se o tzv. izokratickou eluci. Při separaci NSAID se hojněji využívá tzv. gradientová eluce, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem [26, 27, 29]. To je umožněno programováním směšovacího zařízení [24].

Následuje přesun směsi pomocí pístového, membránového nebo recipročního čerpadla do dávkovacího zařízení. *Pístové čerpadlo* pracuje na principu sání a následného výtlaku. Jednočinné pístové čerpadlo by způsobovalo rušivé tlakové rázy, a proto se používají dvojčinná čerpadla. *Membránové čerpadlo* má prostor s pístem naplněný hydraulickou pracovní kapalinou, který je oddělen od pracovního prostoru pro mobilní fázi membránou [24].

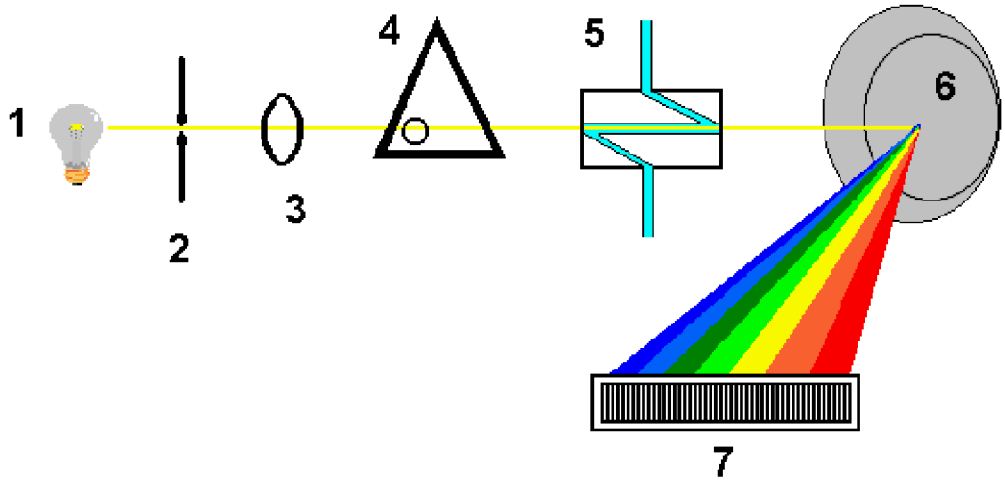
Reciproční čerpadlo je tvořeno válcem o objemu několika desetin mililitru. Má dva zpětné ventily, které se při pravidelně se opakujícím pohybu pístu ve válci otevírají nebo uzavírají. Tato čerpadla se s výhodou používají pro programovou změnu složení mobilní fáze během analýzy, pro tzv. gradientovou eluci [28].

K dávkování roztoku vzorku se mohou použít speciální injekční mikrostříkačky nebo dávkovací kohouty. Jehlou stříkačky se probodne septum a lze dávkovat různé objemy vzorku, kdežto dávkovacím kohoutem lze dávkovat pevně daný objem, a to mnohem přesněji.

Další důležitou částí kapalinového chromatografu je kolona. Používají se pouze náplňové kolony lišící se délkou, vnitřním průměrem a náplní. Kolony jsou většinou nerezové [24], ale mohou být i z tvrzeného skla nebo plastu [28]. Jako ochrana hlavní kolony se hojně využívají předkolony, které zabraňují kontaminaci pocházející z různých nečistot [24].

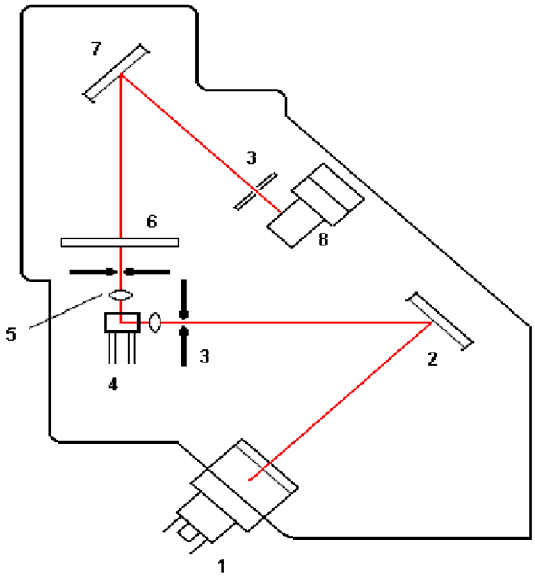
2.3.3.2 Detektory pro HPLC

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru v kapalinové chromatografii musí snést tlak mobilní fáze a udržet těsnost celého systému [24]. K dalším požadovaným vlastnostem patří okamžitá lineární odezva, vysoká citlivost, nízký šum a minimální vliv změny tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty. Pro stanovení NSAID se používají různé typy detektorů. Nejčastěji používaný detektor v HPLC je s diodovým polem (*Diode Array Detector* – DAD), fluorescenční (FLD) a hmotnostní (*Mass spektrometry* – MS) [21]. *Spektrofotometrický* detektor patří k nejběžnějším detektorům. Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Pro optimální citlivost detektoru by měla být zajištěna dostatečná absorpční dráha průtočné kyvety, kterou prochází paprsek. Nejdokonalejší fotometrické detektory jsou schopny pomocí diodového pole proměřit absorpční spektrum v určené oblasti vlnových délek a uložit ho do paměti. Jeho detekční limit je až 10^{-10} g/ml, citlivost a selektivita je pro různé látky různá a při zvolené vlnové délce závisí na velikosti molárního absorpčního koeficientu. DAD detektor je tvořen zdrojem záření, zdrojovou čočkou, průtočnou kyvetou, mřížkou a fotodiodovým polem [24].



Obr. č. 6: *Schéma sprektrofotometrického detektoru* [31]

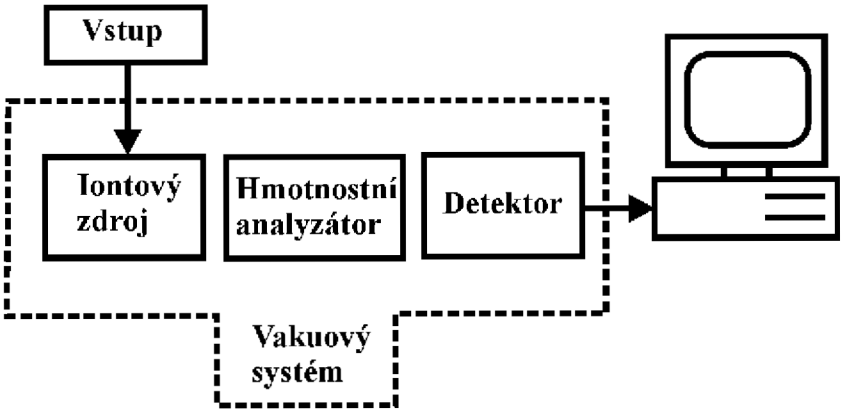
Fluorescenční detektor je velmi selektivní pro látky, které mají přirozenou fluorescenci nebo je lze na fluoreskující deriváty převést. To se provádí za pomoci derivatizačních činidel, kterými se do molekuly solutu zavede fluorofor. Fluorescenční detektor se využívá v případě, když je současně vyžadována vysoká selektivita a citlivost měření, tj. při stopových analýzách látek v komplikovaných matricích, např. při sledování metabolitů léčiv, při analýze aminokyselin atd. Je až o tři řády citlivější než spektrofotometrický detektor; detekční limit je až pg/ml. Schéma fluorescenčního detektoru je uvedeno na obr. č. 7. Analyt je ozařován zářením o určité vlnové délce (excitující záření ze zdroje, kterým může být např. rtuťová výbojka, xenonová lampa nebo laser) a produkuje záření o větší vlnové délce (emitované záření). Výhodou laserů je velká intenzita a koherentnost jejich záření [32].



Obr. č. 7: *Schéma fluorescenčního detektoru* [31]
1- výbojka (rtuťová nebo xenonová), 2- monochromátor, 3- štěrbina, 4- průtoková cela, 5- mikročočky, 6- cut-off filtr, 7- emisní mřížka (monochromátor), 8- fotonásobič

Hmotnostní detektor slouží k rozlišení iontů produkovaných v iontovém zdroji podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) [32]. V HPLC má specifické postavení z důvodu dominantního způsobu identifikace jednotlivých složek. Přímé spojení kapalinového chromatografu s hmotnostním detektorem vyžaduje speciální interface (styčnou plochu), vhodný pro odstranění přebytku mobilní fáze před vstupem do ionizační komory spektrometru [28]. Dalším problémem je tlak, jelikož pro funkci hmotnostního spektrometru je nezbytně nutné vysoké vakuum, kdežto kapalinový chromatograf pracuje za tlaku atmosférického. Veškeré informace poskytované hmotnostním spektrometrem se týkají jen částic nesoucích náboj, a proto je ionizace analyzované látky nezbytným předpokladem analýzy. V současnosti se nejčastěji provádí tzv. elektrosprejová ionizace. Roztok vzorku je přiváděn do kovové kapiláry, na níž je přiváděno vysoké napětí. Tím dochází ke vzniku velmi malých kapiček s vysokou hustotou povrchového náboje. Za pomoci sušícího plynu dochází k rychlému odpaření mobilní fáze z povrchu kapiček a ke vzniku iontů analytů. Vzniklé ionty se po ionizaci vedou do hmotnostního analyzátoru. Tím často bývá kvadrupól nebo iontová past (*ion-trap*). Kvadrupólový analyzátor tvoří čtyři kovové tyče kruhového průřezu, na které je přiváděno stejnosměrné a střídavé napětí. Při vhodně zvolených hodnotách stejnosměrného a střídavého napětí a jejich vhodném poměru projdou kvadrupólem pouze ionty o určitém m/z. Ostatní ionty se zachytí na tyčích kvadrupólu nebo na stěnách přístroje.

Iontová past je obdobou kvadrupólu, je tvořena třemi elektrodami. Ionty se vypuzují k detektoru podle svých hodnot m/z nastavením nestabilních potenciálových podmínek v centru iontové pasti [32, 33].



***Obr. č. 8**: Blokové schéma hmotnostního detektoru* [32]

3 EXPERINMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje, zařízení, software

3.1.1 Příprava a extrakce vzorků

- Analytické váhy HR-120, A&D Instruments, Japonsko
- pH metr InoLab WTW series
- SPE extraktor Baker, model spe - 12G, s vakuovou pumpou Barmany, Co., USA
- Přístroj EVATERM pro sušení dusíkem, LABICOM, ČR
- Kolonky:
    - ENVI-18, Supelco, Německo
    - Oasis® HLB Cartridge, Waters, USA
    - LC SAX, Supelco, Německo

Běžné analytické vybavení

3.1.2 Kapalinová chromatografie

- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series
- Vakuová odplyňovací jednotka HP 1100, příkon 30 VA
- DAD dektor – zdroj světla deuteriová (UV) a wolframová (VIS a blízké IČ) lampa, 1024 fotodiod, vlnový rozsah 190-950 nm, programovatelná šířka štěrbiny 1 – 16 nm
- Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18, velikost 4,6 × 150 mm, velikost částic 5 μm

3.1.3 Software pro zpracování a prezentaci dat

- Microsoft® Word 2003
- Microsoft® Excel 2003
- HP Chem Station pro LC 3D, Rev. B.01.01 (Agilent, USA)

3.2 Používané chemikálie a standardy

3.2.1 Chemikálie

- Kyselina mravenčí, Riedel – de Haen, Sigma – Aldrich
- Methanol, LiChrosolv, Merck KGaA, Německo
- Acetonitril, LiChrosolv, Merck KGaA, Německo
- Ethylacetát, Sigma – Aldrich
- Aceton p. a., PENTA, Česká republika, Chrudim
- Kyselina chlorovodíková 36%, Penta, ČR
- Hydrogenfosforečnan draselný, Fluka, Německo
- Dihydrogenfosforečnan draselný, Fluka, Německo

3.2.2 Standardy

- Ketoprofen, Sigma – Aldrich Chemie, Německo
- Diclofenac sodium salt, Sigma – Aldrich, Německo

3.3 Pracovní postupy

3.3.1 Stanovované analyty a jejich vlastnosti

3.3.1.1 Ketoprofen

- ($C_{16}H_{14}O_3$)
- (2RS)-2-(3-benzoylfenyl)propanová kyselina
- Počítáno na vysušenou látku obsahuje 99 % až 100,5 % sloučeniny $C_{16}H_{14}O_3$
- M_r: 254,28
- Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek
- Prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v 96% ethanolu a v dichlormethanu [34].

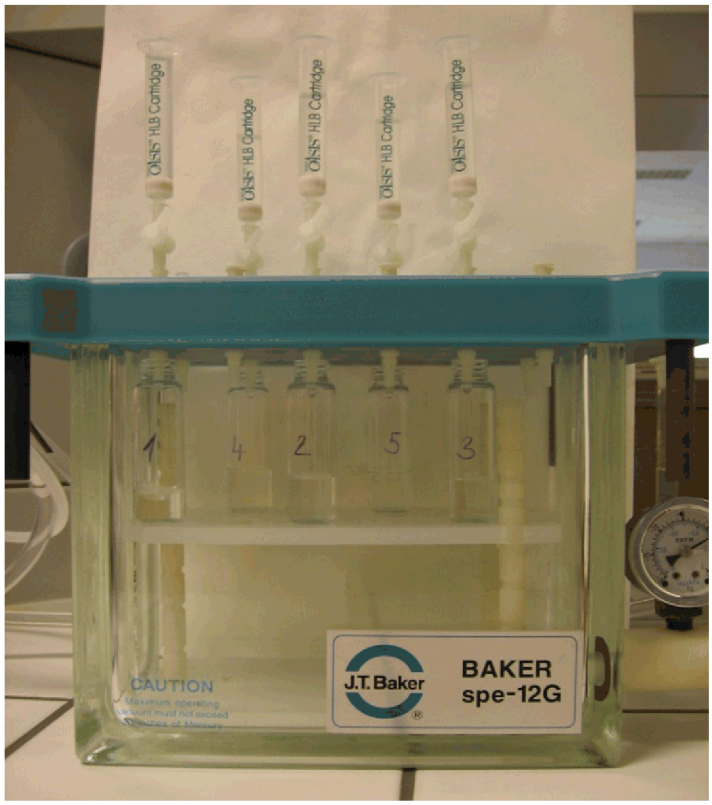
3.3.1.2 Diclofenac sodium salt

- ($C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$)
- Natrium-{2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyl} acetát
- Počítáno na vysušenou látku obsahuje 99 % až 101 % sloučeniny $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$
- M_r: 318,13
- Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek
- Slabě hygroskopický
- Teplota tání: 280 °C
- Mírně rozpustný ve vodě. Snadno rozpustný v methanolu, dobře rozpustný v 96% lihu. V acetonu je těžce rozpustný [35].

3.3.2 Izolace analytů

Izolace analytů byla provedena pomocí SPE na kolonkách Oasis HLB Cartridge (*obr. č. 9 a 10*).

- promytí 6 ml methanolu a potom 5 ml mili Q vody
- nanesení 30 ml vzorku (pH 7)
- promytí 1,5 ml mili Q vody
- sušení proudem vzduchu
- eluce 2 x 4 ml methanolu
- sušení N_2
- rozpuštění v 1 ml methanolu

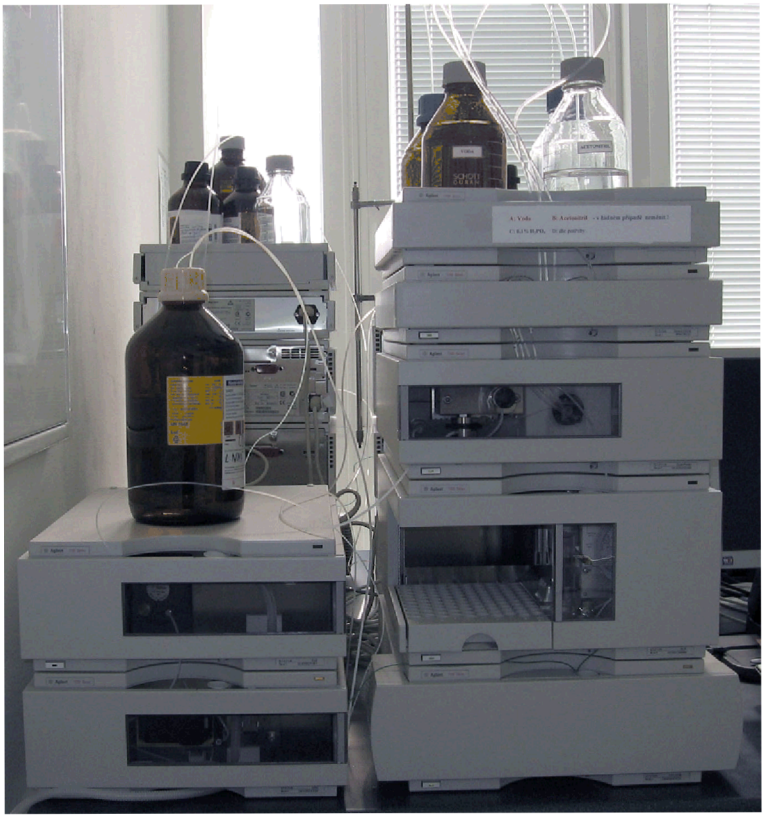


Obr. č. 9: *SPE extrakce*

Obr. č. 10: *Sušení dusíkem*

3.3.3 Identifikace a kvantifikace analytů

Modelové vzorky, které obsahovaly dané analyty byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s DAD detektorem na přístroji Agilent 1100 Series (*obr. č. 11*)



Obr. č. 11: *Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series* [36]

Analýza byla prováděna na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18, která byla opatřena předkolonou (*obr. č. 12*)

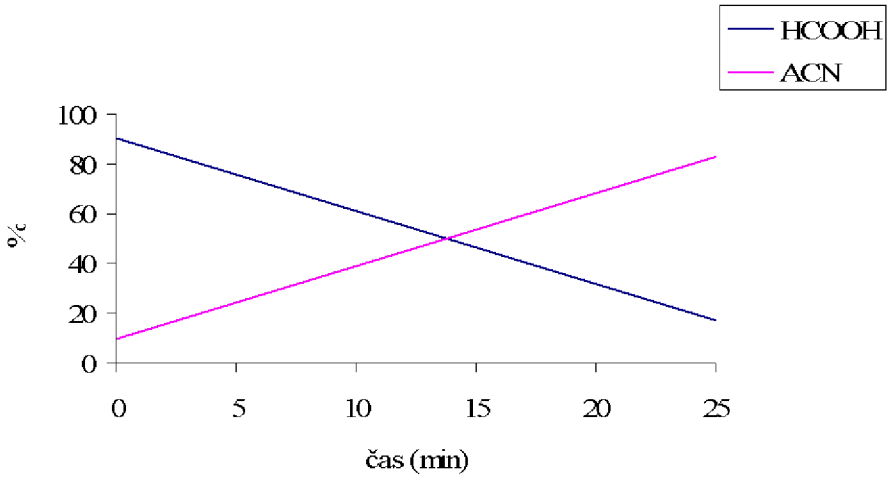
Obr. č. 12: *Kolona Zorbax Elipse XDB-C18 s předkolonou* [36]

3.3.4 Určení chromatografických podmínek

- mobilní fáze: 0,1% roztok kyseliny mravenčí, acetonitril
- nástřik: 5 µl
- průtok MF: 1 ml/min
- teplota kolony: 20 °C
- vlnová délka: 254 nm, 275 nm
- délka analýzy: 30 min – 25 min vlastní analýza, 5 min promývání
- gradient: viz. *Tabulka 1*

***Tabulka 1**: Průběh gradientu mobilní fáze*

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



***Obr. č. 13**: Grafický průběh gradientu (0,1% HCOOH: ACN)*

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

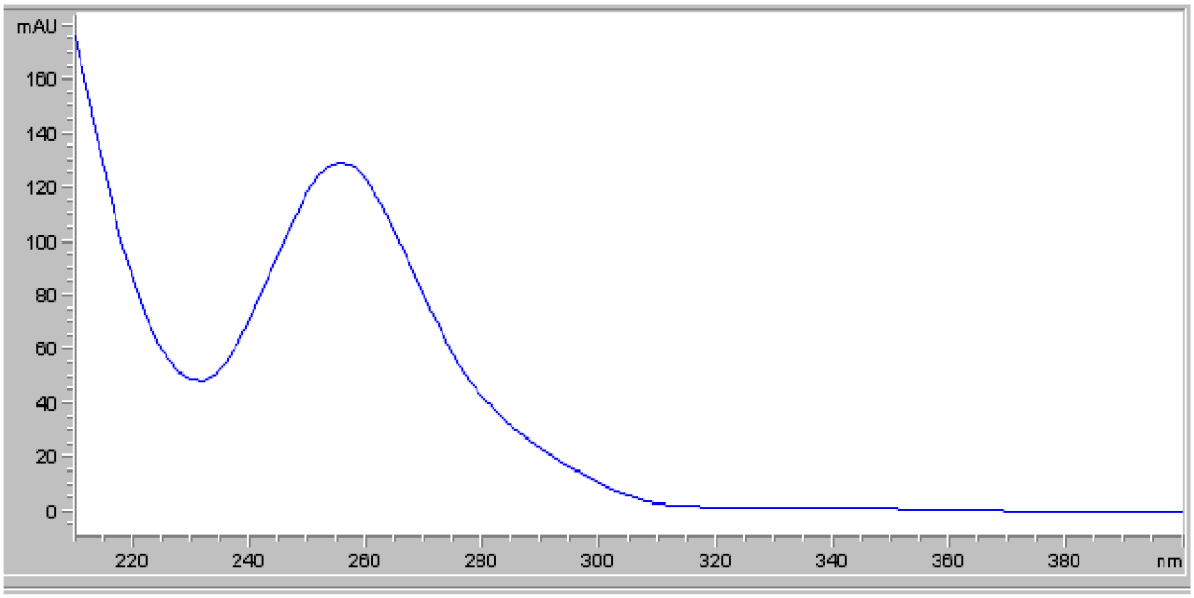
4.1 Optimální chromatografické podmínky

Modelové vzorky byly připraveny rozpuštěním ketoprofenu a diclofenacu sodné soli v mili Q vodě.

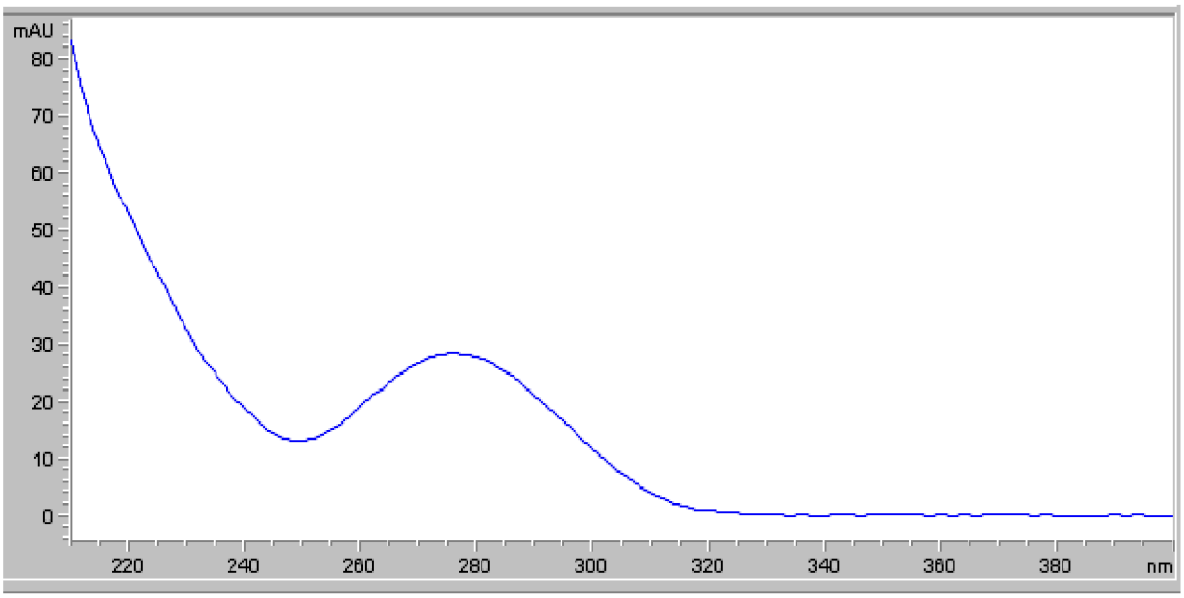
Jako vhodná mobilní fáze byla určena 0,1% HCOOH (pH 2,7) s acetonitrilem.

Následně byla zvolena optimální vlnová délka pro měření analyzovaných látek.

Z průběhu absorpčních spekter analytů (*obr. č. 14, obr. č. 15*) vyplývá, že absorbance ketoprofenu je maximální při vlnové délce 254 nm a absorbance diclofenacu je maximální při vlnové délce 275 nm. Proto byly tyto vlnové délky zvoleny jako optimální pro vyhodnocování.



Obr. č. 14: *Absorpční spektrum ketoprofenu*

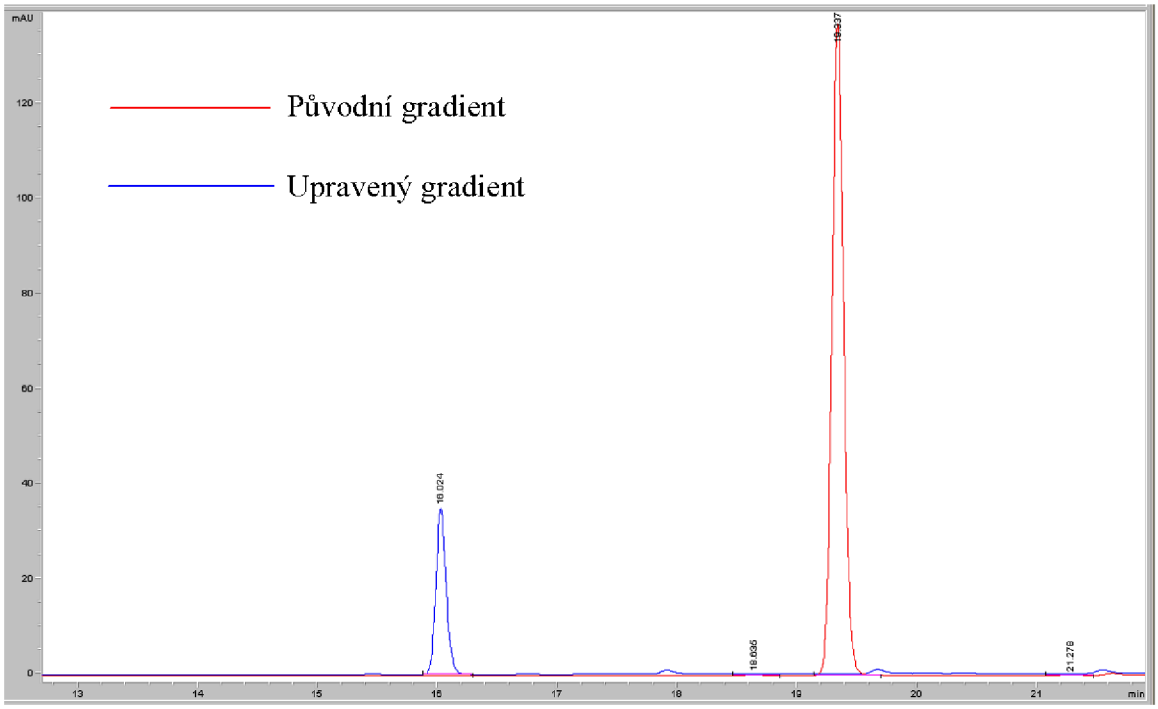


Obr. č. 15: *Absorpční spektrum diclofenacu*

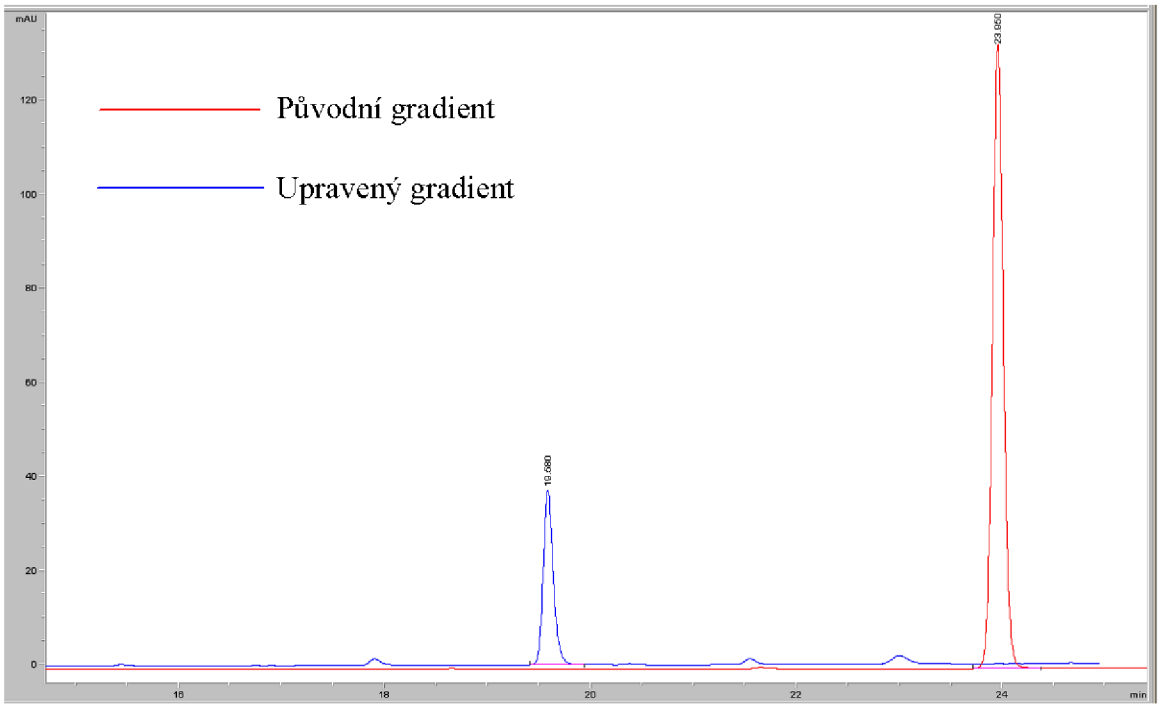
Optimální průtok mobilní fáze byl 1 ml/min.

Analýzu významně ovlivňuje také teplota kolony, která byla stanovena na 20 °C vzhledem k vlastnostem kolony.

Dalším podstatným faktorem je i průběh gradientu mobilní fáze. Jako vhodný se jevil gradient, při kterém se měnilo složení mobilní fáze po dobu 40 min. Na začátku analýzy bylo složení MF 10 % ACN a 90 % 0,1% HCOOH a na konci odpovídalo 100 % ACN. Avšak pro celkové zkrácení doby analýzy byl posléze zvolen gradient, který je uveden v *tabulce 1*. Na *obr. 16 a 17* je patrný výrazný posun retenčních časů stanovovaných analytů, různá velikost píků je dána různou koncentrací těchto látek při optimalizaci metody.

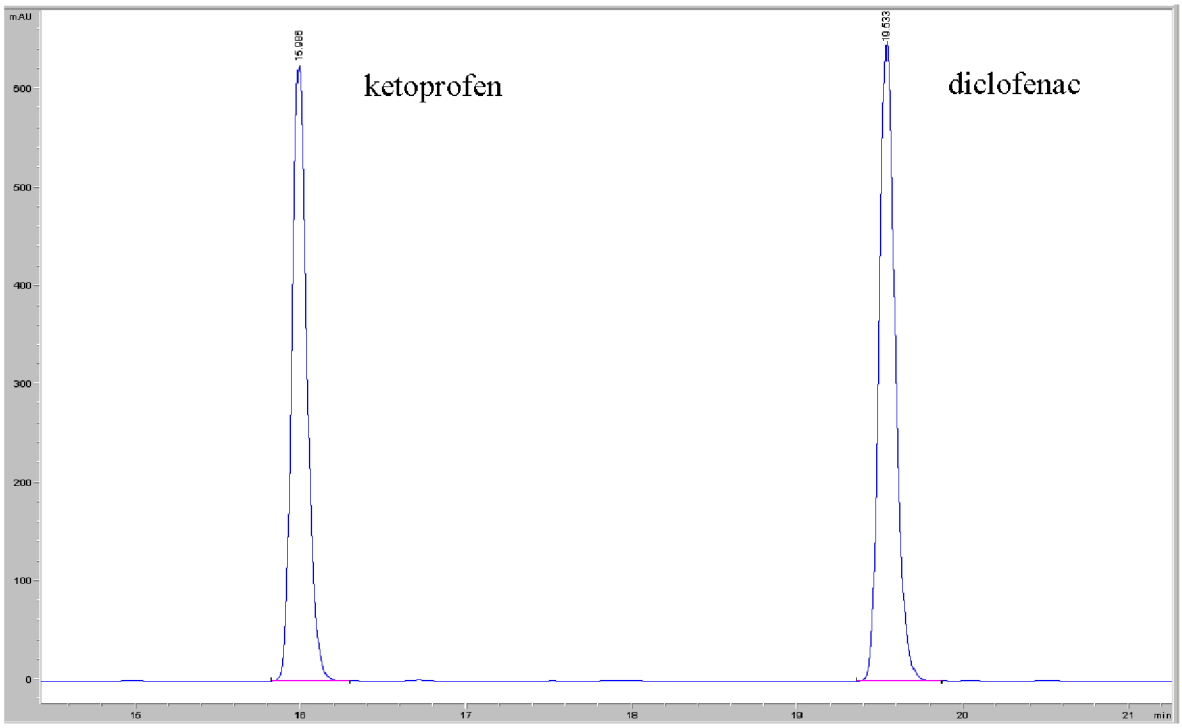


Obr. č. 16: *Chromatogram ketoprofenu při změně gradientu mobilní fáze*



Obr. č. 17: *Chromatogram diclofenacu při změně gradientu mobilní fáze*

Nastavením všech výše uvedených chromatografických podmínek byly získány dostatečně ostré píky obou stanovovaných látek (*obr. č. 18*). Vlivem všech chromatografických faktorů byl retenční čas ketoprofenu 16 min a diclofenacu 19,6 min.



Obr. č. 18: *Chromatogram ketoprofenu a diclofenacu při optimálních podmínkách*

4.2 Úprava vzorku před vysoko účinnou kapalinovou chromatografií

Stejně jako při zjišťování optimálních chromatografických podmínek byla i metoda izolace analytů ověřena na modelových vzorcích připravených rozpuštěním standardů ketoprofenu a diclofenacu v mili Q vodě.

Stanovením výtěžností byla ověřena vhodnost metody izolace vzorků popsaná v kapitole 3.3.2. Výtěžnost byla stanovena pro 5 modelových vzorků o koncentraci 0,015 mg/ml.

4.2.1 Hledání vhodného postupu pro SPE na různých kolonkách

Pro nalezení vhodného sorbentu byla provedena separace analytů na třech různých typech kolonek: ENVI-18, Oasis HLB Cartridge a LC-SAX (*obr. č. 19*). ENVI-18 obsahuje jako sorbent polymerně vázanou oktadecylovou fázi [22], v kolonce Oasis HLB Cartridge působí jako sorbent kopolymer divinylbenzen/N-vinylpyrrolidin [27] a iontově-výměnná kolonka LC-SAX obsahuje polymerně vázaný quarternární amin [22].

***Obr. č. 19**: Zkoušené kolonky pro SPE*

4.2.1.1 Postup SPE pro kolonky Oasis HLB a ENVI-18

- promytí kolonky 3 ml směsi ethylacetát – aceton (1:1), potom 3 ml methanolu a 3 ml mili Q vody okyselené na pH 2
- nanesení 30 ml vzorku (pH 2)
- promytí 5 ml směsi methanol – voda (2:3)
- eluce 5 ml směsi ethylacetát – aceton (1:1)
- odpaření proudem dusíku
- rozpuštění v 0,5 ml methanolu

4.2.1.2 Postup SPE pro kolonku LC-SAX

- promytí 6 ml methanolu, potom směsí methanol – pufr (pH 8) (1:1)
- nanesení 30 ml vzorku
- eluce 3 ml směsi methanol – 0,01 M pufr (pH 4,5) (9:1)
- odpaření proudem dusíku
- rozpuštění v 0,5 ml methanolu

Tabulka 2: *Výtěžnosti modelových vzorků pro různé kolonky*

Kolonka	**Původní koncentrace ketoprofenu mg/ml**	**Výsledná koncentrace ketoprofenu mg/ml**	**Výtěžnost ketoprofenu %**	**Původní koncentrace diclofenacu mg/ml**	**Výsledná koncentrace diclofenacu mg/ml**	**Výtěžnost diclofenacu %**
Oasis HLB	0,0150	0,0110	73,30	0,0150	0,0042	28,04
ENVI-18	0,0150	0,0108	71,69	0,0150	0,0036	24,23
LC-SAX	0,0150	$5{,}89.10^{-5}$	0,39	0,0150	$2{,}37.10^{-5}$	0,16

Z tabulky 2 vyplývá, že daný postup SPE je vhodný pro ketoprofen při použití kolonek Oasis HLB a ENVI-18. Ovšem pro diklofenac je nevhodný – nízká výtěžnost. Kolonka LC-SAX je pro tato léčiva nevyhovující neboť na ní nejsou sorbována.

Proto za vhodnou kolonku byla zvolena Oasis HLB, z důvodu nejvyšších výtěžností ketoprofenu i diclofenacu ze zkoušených kolonek.

Pro nalezení optimálního postupu SPE pro obě léčiva byly vyzkoušeny jiné průběhy SPE na kolonkách Oasis HLB.

4.2.1.3 Postupy použité na kolonce Oasis HLB

POSTUP 1:

- promytí 6 ml methanolu, potom 5 ml mili Q vody
- nanesení 30 ml vzorku (pH 7)
- promytí 1,5 ml mili Q vody
- sušení proudem vzduchu
- eluce 2 x 4 ml methanolu
- odpaření pomocí dusíku
- rozpuštění v 1 ml methanolu

POSTUP 2:
- promytí 6 ml acetonu, potom 6 ml methanolu a 6 ml mili Q vody
- nanesení 30 ml vzorku (pH 6)
- sušení proudem vzduchu
- eluce 2 x 3 ml methanolu
- odpaření pomocí dusíku
- rozpuštění v 1 ml methanolu

POSTUP 3:
- promytí 5 ml ethylacetátu, potom 5 ml methanolu a 5 ml mili Q vody
- nanesení 30 ml vzorku (pH 7)
- promytí 5 ml mili Q vody
- sušení proudem vzduchu
- eluce 2 x 4 ml ethylacetátu
- odpaření pomocí dusíku
- rozpuštění v 1 ml methanolu

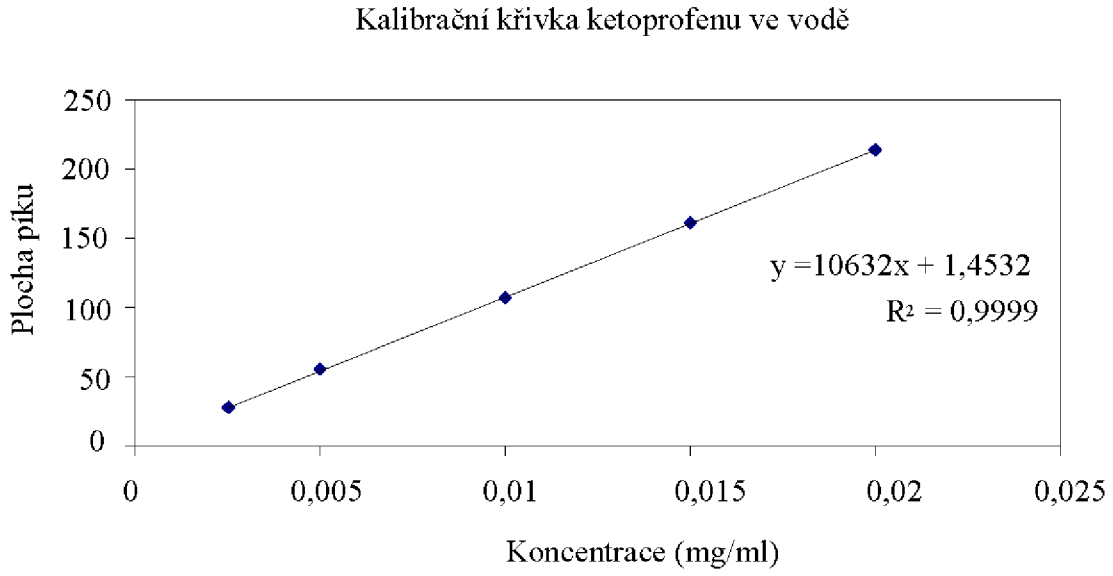
Tabulka 3: *Výtěžnosti na kolonce HLB při zkoušení různých postupů*

Postup	**Původní koncentrace ketoprofenu (mg/ml)**	**Výsledná koncentrace ketoprofenu (mg/ml)**	**Výtěžnost ketoprofenu (%)**	**Původní koncentrace diclofenacu (mg/ml)**	**Výsledná koncentrace diclofenacu (mg/ml)**	**Výtěžnost diclofenacu (%)**
1	0,0150	0,0107	71,39	0,0150	0,0108	72,06
2	0,0150	0,0107	71,04	0,0150	0,0110	73,16
3	0,0150	0,0091	60,96	0,0150	0,0096	63,99

Z hodnot prezentovaných v *tabulce 3* vyplývá, že pro izolaci analyzovaných látek by se mohl použít postup 1 i 2; za optimální však byl zvolen postup 1.

4.2.2 Výtěžnost ketoprofenu

Výtěžnost ketoprofenu byla zjišťována na kolonce Oasis HLB použitím postupu 1. Tato výtěžnost byla vyhodnocena pomocí metody kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci látky. Modelové vzorky byly připraveny rozpuštěním standardu ketoprofenu ve vodě o koncentraci 0,015 mg/ml.



Obr. č. 20: *Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci*

Tabulka 4: *Výtěžnost modelových vzorků ketoprofenu*

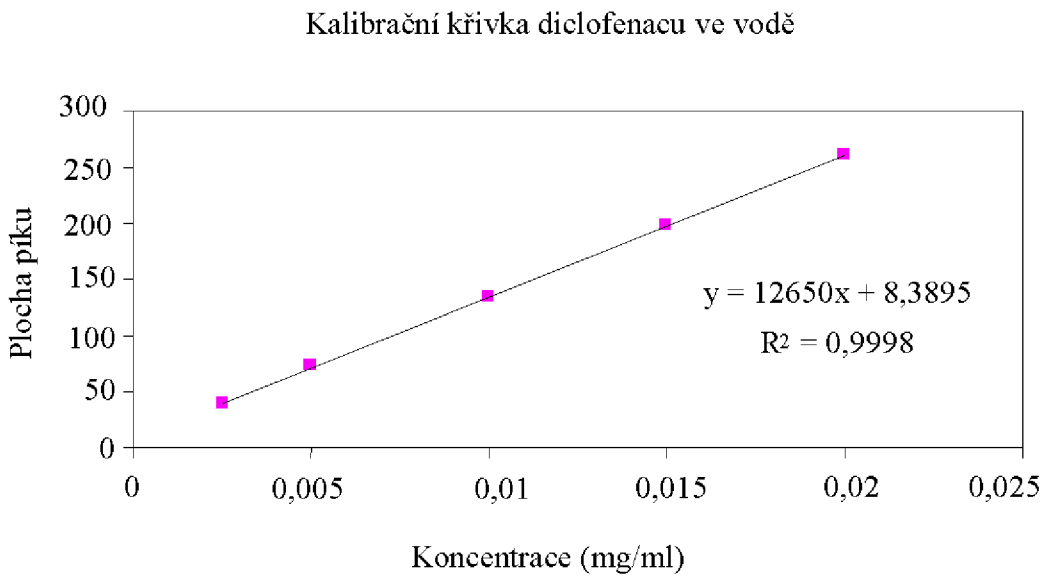
Číslo vzorku	**Původní koncentrace (mg/ml)**	**Výsledná koncentrace (mg/ml)**	**Výtěžnost (%)**
1	0,0155	0,0122	78,97
2	0,0155	0,0119	77,08
3	0,0155	0,0122	78,89
4	0,0155	0,0114	73,28
5	0,0155	0,0118	76,35

Průměrná výsledná koncentrace je 0,0119 mg/ml a průměrná výtěžnost je 76,92 %.
Směrodatná odchylka je 0,00032.
Relativní směrodatná odchylka je 5,41 %.
Rozptyl je $1{,}3.10^{-7}$.

Výtěžnosti ketoprofenu se pohybovaly v rozmezí 73,28 – 78,97 % viz. *tabulka 4*.

4.2.3 Výtěžnost diclofenacu

Pro výpočet výtěžnosti diclofenacu byla stejně jako u ketoprofenu využita kalibrační závislost plochy píku na koncentraci. Standard diclofenacu byl rozpuštěn ve vodě.



Obr. č. 21: *Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci*

Tabulka 5: *Výtěžnost modelových vzorků diclofenacu*

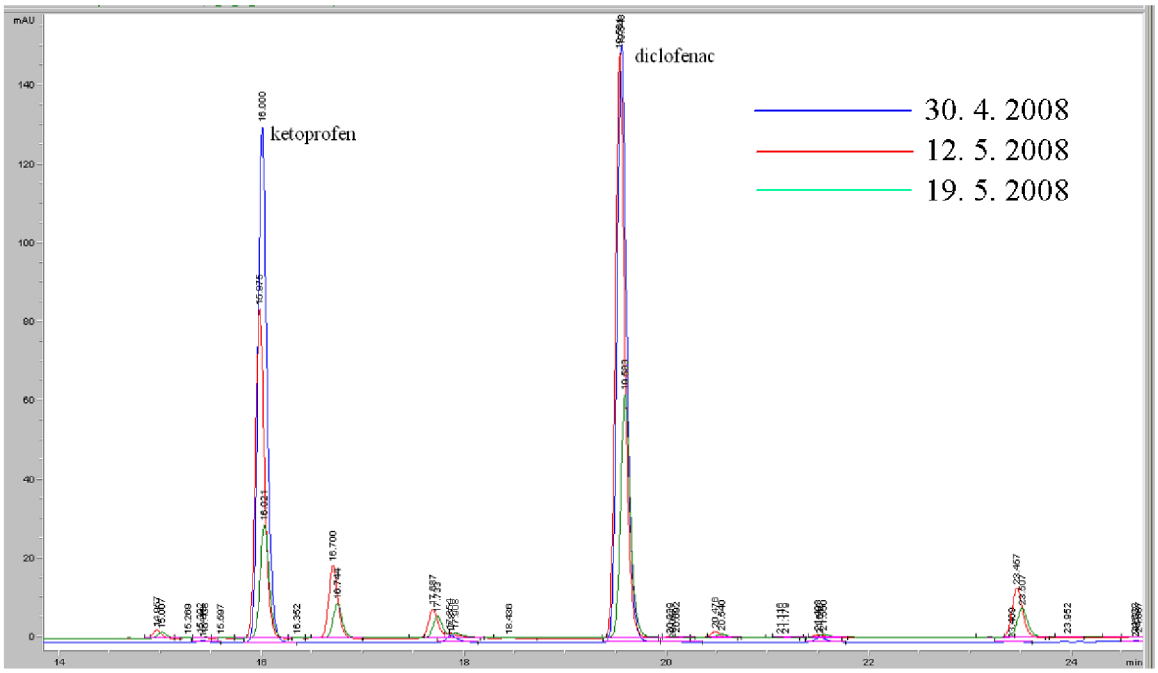
Číslo vzorku	**Původní koncentrace (mg/ml)**	**Výsledná koncentrace (mg/ml)**	**Výtěžnost (%)**
1	0,0150	0,0112	74,89
2	0,0150	0,0109	72,71
3	0,0150	0,0112	74,59
4	0,0150	0,0106	70,97
5	0,0150	0,0108	71,76

Průměrná výsledná koncentrace je 0,0109 mg/ml a průměrná výtěžnost je 72,99 %.
Směrodatná odchylka je 0,00023.
Relativní směrodatná odchylka je 4,22 %.
Rozptyl je $6{,}68.10^{-8}$.

Výtěžnosti diclofenacu se pohybovaly v rozmezí 70,97 – 74,89 % viz. *tabulka 5*.

4.3 Degradace ketoprofenu a diclofenacu

Pro zjištění schopnosti analyzovaných látek se rozkládat byl připraven standardní roztok o koncentraci 0,1 mg/ml, který byl proměřen a poté skladován při různých podmínkách. První dva vzorky byly uchovávány při laboratorní teplotě, jeden ve tmě a druhý na denním světle. Další dva vzorky byly uchovávány v lednici, jeden ve světlé vialce a druhý zabalený v alobalu. Doba, po kterou byla degradace sledována byla 19 dnů.



Obr. č. 22: *Chromatogram degradace ketoprofenu a diclofenacu uchovávaných při laboratorní teplotě a při působení denního světla.*

Na *obr. č. 22* je chromatogram vzorku, který byl skladován při laboratorní teplotě a na denním světle; 30. 4. 2008 byl připraven a proměřen čerstvý standard. Z měření 12. 5. 2008 je patrný pokles koncentrace ketoprofenu a vznik nových píků. Diclofenac z měření 12. 5. 2008 nevykazuje žádnou změnu.

Z proměření provedeného 19. 5. 2008 vyplynulo, že nastal výrazný pokles koncentrace ketoprofenu a také došlo ke změně píků naměřených 12. 5. 2008. Výrazný pokles koncentrace nastal i u diclofenacu; koncentrace se snížila více jak o polovinu.

Ostatní vzorky, uchovávané v lednici a při laboratorní teplotě ve tmě nevykazovaly žádné degradační změny.

5 ZÁVĚR

Vypracovaná bakalářská práce byla zaměřena na hodnocení průniku farmak do životního prostředí, zejména do vodního ekosystému, a to do odpadních vod. Sledovanými analyty byla analgetika, neboť patří mezi nejčastěji užívaná léčiva. Z této velké skupiny byl vybrán diclofenac a ketoprofen, které tvoří nejčastěji obsahové látky přítomné v léčebných přípravcích.

Za vhodnou metodu pro stanovení reziduí léčiv byla zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Cílem práce bylo najít a optimalizovat vhodnou analytickou metodu pro izolaci a následně bude pomocí této metody provedeno stanovení reziduí analgetik ve reálných vzorcích vod; toto stanovení však bude již součástí experimentů prováděných v rámci řešení diplomové práce.

- Byl vypracován vhodný postup pro izolaci reziduí léčiv z vody a analytický postup pro jejich identifikaci a stanovení pomocí standardních roztoků. Vlastní identifikace a stanovení těchto analytů byly prováděny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s detekcí diodovým polem.

- Byla nalezena vhodná pevná fáze ve formě SPE pro extrakci reziduí léčiv z vody.

- Na optimálním sorbentu byly vyzkoušeny různé metody provedení extrakce na pevné fázi (SPE) a jejich zhodnocením byl zvolen optimální postup, který byl ověřen stanovením výtěžností.

- Bylo zjištěno že stanovované analyty podléhají fotodegradaci.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] KVĚTINA, J., HERINK, J., VOPRŠALOVÁ, M. *Základy farmakologie 2. díl: Speciální farmakologie nervstva, kardiovaskulární soustavy, dýchacího systému, ledvin.* 1. vyd. Brno: Ediční středisko VFU Brno, 1999. 193 s. ISBN 80-85114-45-3.

[2] HAMPL, F., PALEČEK, J. *Farmakochemie.* 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 413 s. ISBN 80-7080-495-5.

[3] www.remedia.cz/clanek.php?unit=347&parent=100001&action=79 [cit. 12. 5. 2008]

[4] LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie.* 2. dop. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.

[5] BOROVANSKÝ, A., BENEŠ, L. *Farmaceutická chemie 2: Léčiva s účinkem na centrální a periferní nervový systém.* 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 1999. 234 s. ISBN 80-85114-78-X.

[6] LÜLLMANN, H., MOHR, K., ZIEGLER, A., BIEGER, D. *Barevný atlas farmakologie.* 2. přepracované vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 2001. 392 s. ISBN 80-7169-973-X.

[7] KATZUNG, B., G. *Základní a klinická farmakologie.* 2. vyd. Jinočany: H & H Vyšehradská, s. r. o., 2006. 1106 s. ISBN 80-7319-056-7.

[8] http://www.pace.cz/source.php?id=8&page=1 [cit. 12. 5. 2008]

[9] STONE, T. W., DARLINGTON, G. *Léky, drogy, jedy.* 1. vyd. Praha: Academia, 2003. 440 s. ISBN 80-200-1065-3.

[10] BARCELÓ, D. Editorial: Pharmaceutical-residue analysis. *Trends in Analytical Chemistry.* 2007, Vol. 26, No. 6.

[11] SANTOS, J.L, APARICIO, I., ALONSO, E. Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environment International.* 2007, vol. 33, pp. 596-601.

[12] HILTON, M. J., THOMAS, K. V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 2003, vol. 1015, no. 1, s. 129-141.

[13] GÓMEZ, J. M., PETROVIC, M., FERNANDEZ-ALBA, A. R., BARCELO, D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A.* 2006, Vol. 1114, pp. 224-233.

[14] BEAUSSE, J. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004, Vol. 23, No. 10-11.

[15] RAMIREZ, A., J., MOTTALEB, M., A., BROOKS, B., W., CHAMBLISS, K., C. Analysis of Pharmaceuticals in Fish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem*. 2007, Vol. 79, ISSN 3155-316.

[16] ANKLEY, G., T., BROOKS, B., W., NUGGETY, D., B., SUMATER, J., P. Repeating History: Pharmaceuticals in the Environment. *Environmental Science & Technology*., 2007, vol. 41, pp. 8211-8217.

[17] SNYDER, S., A., ADHAM, S., REDDING, A., M., CANNON, F., S., DeCAROLIS, J., Oppenheimer, J., Wert, E., C., Yoon, Y.: Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination*, 2007, vol. 202, pp. 156–181.

[18] POVÝŠILOVÁ, M. Odběry vzorků z čistíren odpadních vod. *Odběry vzorků, sborník přednášek z kurzu*, 2. upravené a doplněné vydání, 2006, Český Těšín: 2 THETA, s.265-267. ISBN 80-86380-33-5.

[19] PETROVIC, M., GROS, M., BARCELO, D. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2006, Vol. 1124, pp. 68-81.

[20] KOSJEK, T., HEATH, E.r, KRBAVČIČ, A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environment International*. 2005, Vol. 31, pp. 679-685.

[21] FATTA, A. N., ACHILLEOS, A., MERIC, S. Analytical methods for tracing pharmaceuticals residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry*. 2007. Vol. 26, No. 6.

[22] www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf [cit. 19. 5. 2008]

[23] POPL, M., FÄHNRICH, J. *Analytická chemie životního prostředí*. 4. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1999. 218 s. ISBN 80-7080-336-3.

[24] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. upr. a dop. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

[25] LINDQVIST, N., TUHKANEN, T., KRONBERG, L. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Research*. 2004, Vol. 39, pp. 2219-2228.

[26] NEBOT, C., GIIB, S. W., BOYD, K. G. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2007, Vol. 598, pp. 87-94.

[27] ZHANG, Z. L., ZHOU, J. L. Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, Vol. 1154, pp. 205-213.

[28] SOMMER, L. a kol. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.

[29] KARLÍČEK, R. a kol. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2001. 281 s. ISBN 80-246-0348-9.

[30] http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html [20. 4. 2008]

[31] http://www.hplc.cz/ [20. 4. 2008]

[32] ŠTULÍK, Karel a kol. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.

[33] VŘEŠŤÁL, Jan a kol. *Hmotnostní spektrometrie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 1998. 114 s. ISBN 80-210-1835-6.

[34] *Český lékopis 2005* - 2. díl. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. 2005. 1156 s. ISBN 80-247-1532.

[35] *Český lékopis 2002* - 2. díl. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s. 2002. 1264 s. ISBN 80-247-0464-1.

[36] VYDROVÁ, L. *Stanovení reziduí a degradačních produktů tetracyklinu a chlortetracyklinu v odpadních vodách*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 70 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

[37] KÁBRT, J., KÁBRT, J. jr. *Lexicon Medicum*. 2. dop. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2004. 1136 s. ISBN 80-7262-235-8

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Vysvětlení
NSAID	Nesteroidní protizánětlivé látky
COX	Cyklooxygenáza
ČOV	Čistírna odpadních vod
EC_{50}	Efektivní koncentrace
GIT	Gastrointestinální trakt
SPE	Extrakce na tuhém sorbentu
HPLC	Vysoko účinná kapalinová chromatografie
DAD	Detektor s diodovým polem
FLD	Fluorescenční detektor
MS	Hmotnostní detektor

8 SEZNAM POUŽITÝCH ODBORNÝCH POJMŮ

Odborný výraz	**Vysvětlení** [37]
Nociceptor	Receptor zprostředkující vnímání bolesti při poranění
Intravenózní	Vnitrožilní
Subkutánní	Podkožní
Intramuskulární	Nitrosvalová
Thalamus	Zadní část mezimozku
Spinothalamický	Týkající se míchy a thalamu
Thalamokortikální	Týkající se thalamu a kůry mozkové
Rektální	Konečníkový
Parenterální	Mimo trávící trubici; např. podávání léků v injekcích nebo nitrožilních infúzích
Enterohepatální	Týkající se zánětu jater a střev
Venózní	Žilní