



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

## SLEDOVÁNÍ OBSAHU SULFONAMIDŮ V ODPADNÍCH VODÁCH Z ČISTÍREN ODPADNÍCH VOD S RŮZNÝMI TECHNOLOGIEMI ČIŠTĚNÍ

MONITORING OF SULFONAMIDES IN WASTEWATER FROM SEWAGE TREATMENT PLANTS  
WITH DIFFERENT TREATMENT TECHNOLOGIES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. PETRA DADÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2014



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0846/2013</b>	Akademický rok: <b>2013/2014</b>
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	<b>Bc. Petra Dadáková</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	<b>prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.</b>	
Konzultanti:	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	

### Název diplomové práce:

Sledování obsahu sulfonamidů v odpadních vodách z čistíren odpadních vod s různými technologiemi čištění

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše zaměřené na obsah sulfonamidů v odpadních vodách a na metody jejich izolace a stanovení
2. Výběr a optimalizace vhodných metod pro stanovení vybraných sulfonamidů v reálných vzorcích
3. Analýza sady reálných vzorků odpadních vod odebraných na ČOV s různým počtem EO a s různou technologií čištění
4. Přehledné zpracování a interpretace získaných výsledků, porovnání s publikovanými daty

### Termín odevzdání diplomové práce: 31.8.2014

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Petra Dadáková  
Student(ka)

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty



## ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá stanovením obsahu léčiv v odpadních vodách z čistíren odpadních vod (ČOV) s různými počty ekvivalentních obyvatel a různými technologiemi čištění. Pro tento účel bylo vybráno pět zástupců ze skupiny sulfonamidových chemoterapeutik z důvodu jejich hojného využívání v humánní i veterinární medicíně. Konkrétně jsou to léčiva sulfamerazin, sulfamethazin, sulfapyridin, sulfathiazol a sulfamethoxazol.

Pro stanovení těchto léčiv byla vybrána a optimalizována metoda analýz pomocí UHPLC s UV-VIS detektorem typu diodového pole. Rovněž byla optimalizována metoda pro úpravu vzorků pomocí extrakce tuhými fázemi (SPE), se zaměřením na výběr ideálního objemu vzorku. Jako optimální objem vzorku pro extrakci léčiv z odpadní vody pomocí SPE bylo zvoleno 250 ml.

Tato optimalizovaná metoda byla následně použita pro stanovení obsahu léčiv v reálných vzorcích odpadní vody z ČOV v Podivíně, Pohořelicích, Hustopečích, Valticích, Lednici a Mikulově. Koncentrace léčiv se pohybovaly řádově v desetínách  $\mu\text{g/l}$  na přítoku i na odtoku z ČOV. Koncentrace léčiv na odtoku byla ve většině případů nižší, než na přítoku. Lze proto konstatovat, že na ČOV dochází čisticími procesy k částečné eliminaci léčiv z odpadní vody.

## **ABSTRACT**

The aim of this thesis is to determine the presence of pharmaceuticals in wastewater from several wastewater treatment plants (WWTPs) with different number of equivalent persons and different treatment technologies. Five sulfonamides were chosen for a determination due to their wide usage in human and veterinary medicine practice. The specific compounds are sulfamerazine, sulfamethazine, sulfapyridine, sulfathiazole a sulfamethoxazole.

For the determination of those sulfonamides, an UHPLC/DAD analytical method was chosen and optimized. There was also a need for optimization of SPE extraction method, especially a sample volume optimization. 250 mL was chosen as an ideal volume of wastewater sample for SPE.

The optimized method was used for determination of sulfonamides in real wastewater samples from WWTP in Podivín, Pohořelice, Hustopeče, Valtice, Lednice and Mikulov. Average concentrations of pharmaceuticals in influent and effluent wastewater samples was in a range of 0,1 – 1 µg/l. The concentration of sulfonamides was mostly found higher in influent samples and lower in effluent samples. It can be said that a partial recovery of sulfonamides on WWTPs was observed.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

rezidua léčiv, sulfonamidy, kapalinová chromatografie, odpadní voda, čistírna odpadních vod

## **KEY WORDS**

drug residua, sulfonamides, liquid chromatography, wastewater, wastewater treatment plant

DADÁKOVÁ, P. *Sledování obsahu sulfonamidů v odpadních vodách z čistíren odpadních vod s různými technologiemi čištění*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 79 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....

podpis studenta

*Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala především prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc., doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. a Ing. Janě Oborné za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytli při vypracování mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala svému snoubenci, svým přátelům a kolegům za morální podporu, pomoc a trpělivost.*

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1. Antibiotika a antimikrobní chemoterapeutika</b> .....	<b>10</b>
2.1.1. Historie antibiotik .....	10
2.1.2. Rozdělení antibiotik.....	11
2.1.3. Mechanismus účinku antibiotik .....	12
2.1.4. Farmakokinetika .....	15
2.1.4.1. Absorpce .....	15
2.1.4.2. Transport a distribuce .....	15
2.1.4.3. Biotransformace a eliminace.....	16
2.1.5. Nežádoucí účinky .....	16
2.1.6. Toxicita.....	16
2.1.7. Bakteriální rezistence .....	17
2.1.8. Kombinace antibiotik .....	18
2.1.9. Antibiotika v životním prostředí.....	18
2.1.9.1. Osud antibiotik v životním prostředí a jejich efekty na organismech .....	19
2.1.9.2. Antibiotika v ČOV .....	20
<b>2.2. Sulfonamidy</b> .....	<b>21</b>
2.2.1. Historie sulfonamidů .....	21
2.2.2. Charakteristika sulfonamidů .....	21
2.2.3. Chemická struktura.....	22
2.2.4. Farmakokinetika a metabolismus sulfonamidů .....	22
2.2.5. Vybrané sulfonamidy .....	23
2.2.5.1. Sulfamerazin (SMR) .....	23
2.2.5.2. Sulfamethazin (SMT).....	24
2.2.5.3. Sulfamethoxazol (SMX) .....	24
2.2.5.4. Sulfapyridin (SPY) .....	25
2.2.5.5. Sulfathiazol (STZ) .....	25
<b>2.3. Postupy používané při stanovení léčiv</b> .....	<b>26</b>
2.3.1. Odběr, transport, uchování vzorku .....	26
2.3.2. Příprava vzorku k analýze.....	27
2.3.2.1. Extrakce tuhou fází (SPE).....	28
2.3.3. Vlastní analýza.....	29
2.3.3.1. Kapalinová chromatografie.....	30
2.3.3.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	31
2.3.3.3. Ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC) .....	32
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1. Přístroje, zařízení, software</b> .....	<b>33</b>
3.1.1. Vybavení pro preanalytické úpravy vzorku .....	33
3.1.2. Přístroje pro vlastní analýzu .....	33
3.1.3. Software pro zpracování a interpretaci dat .....	34
<b>3.2. Chemikálie a standardy</b> .....	<b>34</b>
3.2.1. Chemikálie.....	34
3.2.2. Standardy .....	34
<b>3.3. Sledovaná matrice</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4. Čistírny odpadních vod</b> .....	<b>35</b>
3.4.1. ČOV Podivín .....	35
3.4.2. ČOV Pohorelice.....	35
3.4.3. ČOV Hustopeče.....	35
3.4.4. ČOV Valtice .....	35
3.4.5. ČOV Lednice.....	36

3.4.6. ČOV Mikulov .....	36
<b>3.5. Sledované analyty.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6. Pracovní postupy.....</b>	<b>36</b>
3.6.1. Roztoky standardů léčiv .....	36
3.6.2. Odběry vzorků .....	37
3.6.3. Preanalytické úpravy vzorků .....	37
3.6.3.1. Filtrace a uchování vzorku .....	37
3.6.3.2. Extrakce tuhou fází SPE .....	37
3.6.4. Vlastní analýzy vzorků a standardů .....	38
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Stanovení podmínek analýzy pomocí UHPLC/DAD.....</b>	<b>40</b>
4.1.1. Gradient mobilní fáze .....	41
4.1.2. Nástřik .....	43
4.1.3. Teplota termostatu kolony .....	44
4.1.4. Průtok mobilní fáze .....	46
4.1.5. Úprava gradientu při vyšších teplotách kolony .....	47
4.1.6. Vliv parametrů kolony na separaci analytů .....	48
4.1.7. Optimalizovaná metoda pro stanovení sulfonamidů pomocí UHPLC.....	48
<b>4.2. Optimalizace extrakce tuhou fází .....</b>	<b>49</b>
<b>4.3. Vyhodnocení a kvantifikace sledovaných léčiv.....</b>	<b>52</b>
<b>4.4. Reálné vzorky .....</b>	<b>55</b>
4.4.1. Vliv matrice .....	56
4.4.2. Kvantifikace léčiv v reálných vzorcích.....	57
4.4.3. ČOV Podivín .....	57
4.4.4. ČOV Pohořelice.....	58
4.4.5. ČOV Hustopeče .....	59
4.4.6. ČOV Valtice .....	60
4.4.7. ČOV Lednice .....	62
4.4.8. ČOV Mikulov .....	64
4.4.9. Zhodnocení výsledků.....	67
4.4.9.1. Koncentrace léčiv na různých ČOV.....	67
4.4.9.2. Koncentrace léčiv na ČOV Mikulov .....	69
4.4.9.3. Diskuze výsledků .....	72
<b>5. ZÁVĚR.....</b>	<b>74</b>
<b>6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>75</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>79</b>

# 1. ÚVOD

Antibiotika jsou chemické sloučeniny celosvětově široce užívané k léčbě bakteriálních infekcí v humánní medicíně či k léčbě a prevenci nemocí u zvířat. Intenzivní užívání antibiotik a dalších rizikových skupin léčiv (například analgetik či hormonální antikoncepce) způsobilo, že léčiva byla zařazena mezi tzv. prioritní organické polutanty (POPs), které je nezbytné sledovat ve všech složkách životního prostředí. V současnosti je nejvýznamnějším problémem při průniku antibiotik do životního prostředí vznik bakteriální rezistence. Jednou z nejvýznamnějších skupin antiinfekčních léčiv jsou sulfonamidová antibiotika.

Po podání a vstřebání léčiva v organismu dochází k jeho vylučování, a to především prostřednictvím moči a výkalů. Léčiva aplikovaná k léčbě člověka se jako součást splaškových vod dostávají na čistírny odpadních vod, kde zpravidla nejsou zcela eliminována a prostřednictvím přečištěné vody se stávají zdrojem kontaminace vodních toků. Koncentrace léčiv v odpadních vodách je zpravidla velmi nízká, přesto ale z hlediska zpětného účinku na organismy významná.

Pro stanovení léčiv se v současnosti nejčastěji využívá kapalinové či plynové chromatografie. Před vlastní analýzou vzorku je také třeba věnovat patřičnou pozornost výběru preanalytické metody.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo optimalizovat vhodnou metodu pro stanovení sulfonamidových antibiotik v odpadních vodách. Tato metoda byla následně použita ke sledování obsahu sulfonamidů ve vzorcích odpadní vody odebraných na čistírnách odpadních vod s různými technologiemi čištění.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Antibiotika a antimikrobní chemoterapeutika

Antibiotika (ATB) a antimikrobní chemoterapeutika jsou skupinou léčiv používaných k léčbě a prevenci infekčních onemocnění způsobených převážně bakteriemi nebo plísněmi. Antibakteriální látky přírodního původu a jejich polosyntetické deriváty se souhrnně označují jako antibiotika. Antibiotika jsou látky vzniklé produkcí určitých mikroorganismů, přičemž jsou schopné zastavit růst a množení jiných mikroorganismů. Synteticky vyrobená antimikrobiální léčiva se nazývají chemoterapeutika. Antimikrobní chemoterapeutika jsou chemické látky relativně neškodné pro buňky lidského organismu, které však dokážou tlumit životní projevy mikroorganismů [1, 2, 3].

Principiálně se antibiotika od antimikrobních chemoterapeutik v působení na mikroorganismy neliší. Jejich účinkem jsou mikrobiální buňky buď usmrcovány, nebo je zastaven jejich růst a rozmnožování. Proto se v současnosti termín „antibiotika“ používá pro všechny typy antimikrobiálních léčiv včetně chemoterapeutik [2, 4].

Ideální antiinfekční léčivo by mělo mít vysoce selektivní účinek na patogen a mělo by co nejméně ovlivňovat makroorganismus. Tohoto cíle ovšem dosahují jen některé látky (např.  $\beta$ -laktamy) [4].

#### 2.1.1. Historie antibiotik

Z historie medicíny je zřejmé, že hlavními osobnostmi na poli moderní bakteriologie byli Louis Pasteur (1822-1895) a Robert Koch (1843-1910). V roce 1864 Francouzská akademie věd oficiálně přijala teorii Louise Pasteura o původu, způsobu života a rozmnožování bakterií. V roce 1877 Louis Pasteur učinil objev, že znečištění kultur antraxového bacilu jinými mikroorganismy tohoto původce závažného onemocnění zabíjí. Ukázalo se, že jednotlivé bakteriální kmeny se mohou vzájemně ničit, působit proti životu, tj. antibioticky. Z této doby pochází také samotný pojem antibiotikum. Vychází ztermínu „antibiosa“, který byl zaveden v roce 1899 jako obecné označení antagonismu mezi živými organismy [2, 5, 6].

Nejzásadnější objev v antibakteriální léčbě však učinil v roce 1928 britský vědec Alexandr Fleming, když zaznamenal, že látka, kterou vyprodukoval určitý druh plísně, způsobila zničení bakteriologické kultury stafylokoků. Plíseň se jmenovala *Penicillium notatum*. O praktické využití tohoto objevu se zasloužili až v roce 1940 angličtí vědci, a to patofyziolog Howard Florey, biochemik E. B. Chain a farmakolog N. G. Heatley. Od roku 1941 již byl penicilin využíván i k terapii lidí. Významný terapeutických úspěchů bylo s tímto lékem dosaženo v závěru druhé světové války, kdy byl použit pro válečná poranění



komplikovaná infekcí. Za objev a výrobu penicilinu byla v roce 1945 udělena Nobelova cena A. Flemingovi, H. Floreyemu a E. B. Chainovi [5, 6].

V roce 1952 byl odměněn Nobelovou cenou Selman Waksman (1888-1973) za objev streptomycinu. Streptomycin byl prvním antibiotikem, které zapůsobilo i na dosud zcela neovlivnitelnou příčinu tuberkulózy, bacila tuberkulózy [5].

Po objevu prvních účinných antibiotik nastal boom v jejich užívání. Antibiotiky se léčilo vše, od chřipky přes kašel, rýmu až po bolení břicha. V reakci na nadužívání antibiotik se objevila první vlna rezistence, po jejímž nástupu se do jisté míry zpřísnila pravidla pro předepisování ATB. Byla založena specializovaná střediska, která sledují interakci a vztah mezi používanými antibiotiky a bakteriálními kmeny vyvolávajícími lidská onemocnění [5].

Objev antibiotik je z obecného hlediska považován za jeden ze základních stavebních kamenů moderní medicíny.

### 2.1.2. Rozdělení antibiotik

Antibiotika je možné rozdělovat podle mnoha kritérií, například podle šíře a charakteru účinku, podle formy aplikace apod. [3].

#### 1. Dělení podle charakteru účinku:

- a) **ATB baktericidní** – léčivo je schopné usmrtit přítomné bakterie (např. peniciliny, cefalosporiny),
- b) **ATB bakteriostatická** – zastavují množení bakterií. Po přerušení léčby se mohou mikroorganismy v těle opět pomnožit. Takto fungují např. sulfonamidy, tetracykliny, makrolidy [2, 7].

Některá antibiotika s bakteriostatickými účinky mohou mít ve vyšších koncentracích i účinky baktericidní [7].

#### 2. Dělení podle rozsahu působení na bakteriální kmeny:

- a) **s úzkým spektrem** – někdy se označují jako látky s cíleným (specifickým) účinkem. Jsou velmi účinná na vybrané druhy bakterií (např. peniciliny),
- b) **s rozšířeným nebo širokým spektrem** – jsou schopny postihnout mnoho bakteriálních kmenů (např. tetracykliny, sulfonamidy). Do této skupiny patří většina používaných antibiotik [4, 8].
- c) **základní s nejrozsáhlejším působením** – například  $\beta$ -laktamy, oxaciny [3].

3. Dělení podle způsobu přípravy:

- a) **přírodního původu** – produkována přímo živými mikroorganismy,
- b) **semisyntetická** – základní molekula přirozeného antibiotika je nahrazena chemickým ekvivalentem,
- c) **syntetická** – vzniklá chemickou syntézou, předlohou pro syntézu je struktura antibiotika přírodního původu [9].

4. Dělení podle místa účinku (resp. způsobu podání):

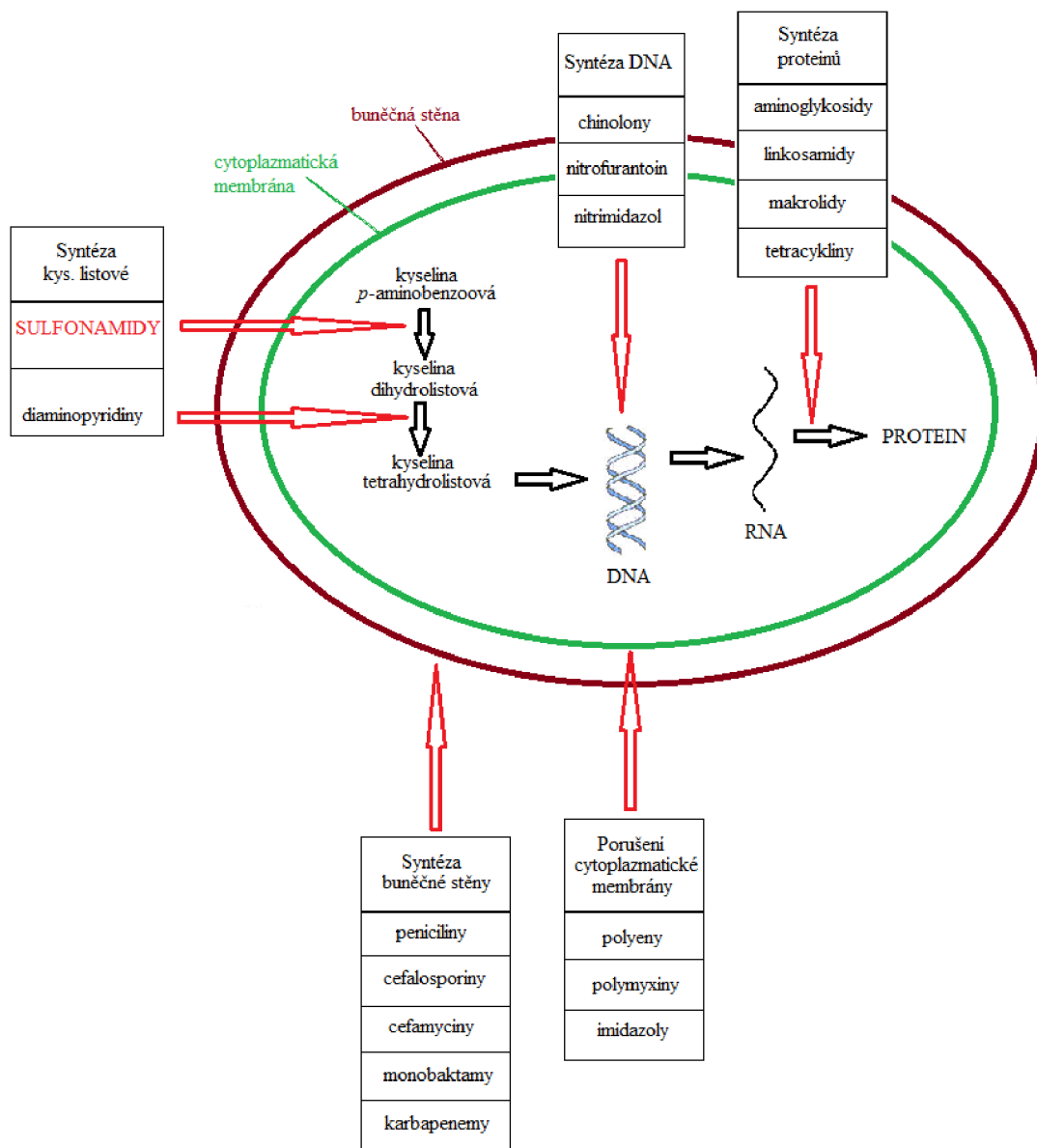
- a) **celková** – perorální (antibiotika podávaná ústy a vstřebávaná z trávicího traktu; nejčastější a také nejpřirozenější způsob podání léčiva), perrektální (léčiva podávaná a vstřebávaná přes rektum), parenterální (léčiva aplikovaná injekčně přímo do krevního oběhu nebo mimo něj; dále inhalací nebo transdermálně aj.),
- b) **lokální** – aplikovaná místně, většinou na kůži; léčivo působí převážně v místě podání, jeho absorpce do celého makroorganismu je nežádoucí [9, 10, 11].

Dále je možné antibiotika dělit podle chemické struktury a podle praktického užití [4].

### 2.1.3. Mechanismus účinku antibiotik

Mechanismus účinku antibiotika vyjadřuje způsob, jakým antibiotikum zasahuje do syntézy molekul bakteriální buňky. Určuje jak spektrum účinku antibiotik, tak také jejich aktivitu [1, 3]. Na následující straně (obr. 1) jsou schematicky znázorněny mechanismy účinků různých skupin antibiotik. Podle místa (a také podle způsobu) zásahu bakteriální buňky lze antibiotika rozdělit do několika skupin:

1. **Inhibice syntézy buněčné stěny** – antibiotikum se naváže na enzymy, které katalyzují syntézu molekul peptidoglykanů v bakteriální buněčné stěně, čímž brání jejímu plnému vývoji. Defekty v buněčné stěně způsobí neschopnost bakteriální buňky odolávat osmotickým změnám a vedou k buněčné smrti. Antibiotika tohoto typu mají baktericidní účinky, patří mezi ně například peniciliny, cefalosporiny a monobaktamy [1, 4].



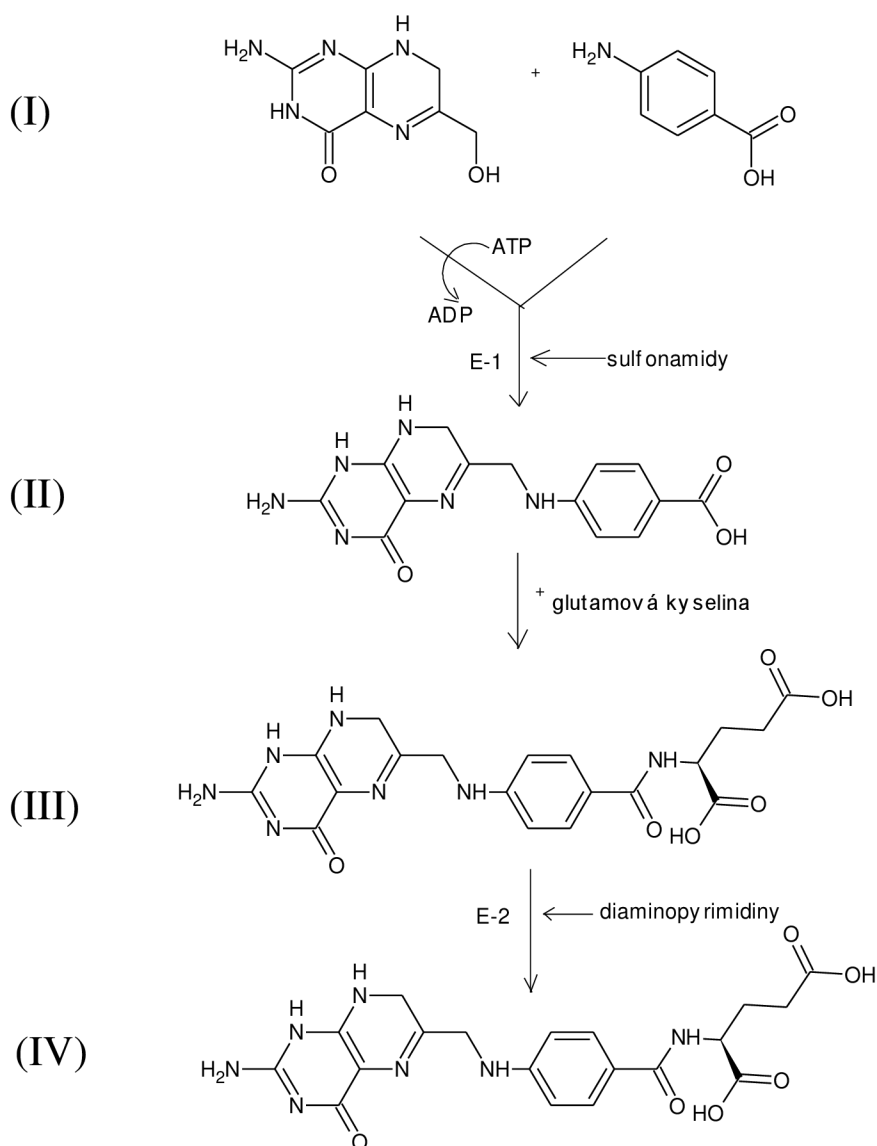
**Obr. 1:** Schematické znázornění mechanismů účinku antibiotik v bakteriální buňce [7].

2. **Poškození funkce cytoplazmatické membrány** – antibiotikum zvýší permeabilitu buňky, čímž dojde k narušení iontové rovnováhy v buňce. V důsledku toho bakteriální buňka ztrácí integritu. Takový mechanismus účinku mají polyeny (amfotericin B, nystatin), polymyxiny a imidazoly. Působí baktericidně [1, 4].

3. **Inhibice proteosyntézy** – antibiotikum zasahuje bakteriální ribozomy a brání syntéze buněčných bílkovin. Tato antibiotika mají převážně bakteriostatický účinek. Příkladem takto působících antibiotik jsou makrolidy, tetracyklíny, aminoglykosidy [1, 4].

4. **Inhibice syntézy nukleových kyselin** – antibiotikum inhibuje DNA-gyrázu nebo RNA-polymerázu; inhibice probíhá při replikaci DNA nebo transkripci. DNA je nezbytná pro život

buňky, proto tato antibiotika působí baktericidně. Mezi takto působící antibiotika patří chinolony, rifampicin, pyrimetamin [1, 4].



**Obr. 2:** Schéma biosyntézy kyseliny tetrahydrolistové. Krok I: dihydropteridin, krok II: kyselina dihydropteroová, krok III: kyselina dihydrolistová, krok IV: kyselina tetrahydrolistová. Znázorněno místo působení sulfonamidových a diaminopyrimidinových antibiotik [3].

**5. Inhibice metabolismu bakteriální buňky** – tento mechanismus účinku je typický pro sulfonamidová a dipyrimidinová antibiotika. V tomto případě dochází k blokaci syntézy kyseliny listové z kyseliny *p*-aminobenzoové v organismu bakteriální buňky. Mechanismus účinku sulfonamidů vychází z faktu, že sulfanilamid, jako základní strukturální jednotka sulfonamidů, je strukturálně blízký kyselině *p*-aminobenzoové (PAB), která je nezbytná pro syntézu kyseliny tetrahydrolistové. Sulfonamidy blokují syntézu kyseliny listové již

v úvodní fázi, kdy se naváží (namísto PAB) na enzym dihydropteroát-syntetasu a zabrání tak reakci se substituovaným dihydropteridinem (obr. 2, krok I). Další kroky vedoucí k syntetizování kyseliny listové potom nemohou proběhnout. Diaminopyrimidiny zastavují syntézu kyseliny listové až v konečné fázi, kdy brání interakci meziproduktu syntézy (kyseliny dihydrolistové) s dihydrofolát-reduktázou (obr. 2, krok IV) [1, 3, 11].

#### **2.1.4. Farmakokinetika**

Farmakokinetika antibiotika je založena na sledování jeho pohybu a přeměny od podání léčiva po jeho vyloučení z organismu; zabývá se působením organismu na léčivo. V organismu po podání léčiva probíhají procesy, které vedou ke změně jeho koncentrace v čase. Mezi tyto procesy patří především absorpce léčiva po podání, jeho distribuce v organismu, biotransformace a eliminace z organismu. Znalost těchto procesů charakteristických pro léčivo umožňují zjistit optimální dávku tak, aby bylo dosaženo potřebné koncentrace léčiva v místě infekce. [1, 2, 12, 13].

##### **2.1.4.1. Absorpce**

Léčivo může v organismu působit pouze tehdy, jestliže se absorbuje z místa podání do krevního a lymfatického oběhu a odtud do tkání organismu. Rychlost a rozsah absorpce léčiva do organismu významně ovlivňuje způsob podání léku. V kapitole 2.1.2 je uvedeno rozdělení antibiotik podle místa účinku (resp. způsobu podání) na antibiotika lokální a celková. Při lokální aplikaci léčiva se jeho potřebná koncentrace nachází pouze v místě podání. Při celkové aplikaci dochází k interakci celého organismu s léčivem. Systémová absorpce léčiv je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva a na anatomicko-fyziologických vlastnostech místa absorpce [2, 10, 14].

##### **2.1.4.2. Transport a distribuce**

Absorpcí do krevního oběhu se léčivo může transportovat prakticky po celém organismu. Po průchodu krevním řečištěm dochází difuzí k distribuci léčiva do tkání a orgánů. Farmaka mají tendenci se v organismu rozptýlit rovnoměrně. V tom jim ovšem brání systém bariér samotného organismu, které musí léčivo překonat před tím, než se dostane k cílovým strukturám. Proto se ve skutečnosti léčiva v organismu rozdělují většinou nerovnoměrně. To znamená, že část se jich rozpustí například v krevní plazmě, buněčné tekutině a mezibuněčném prostoru; část se naváže na různé struktury, například v krvi na plazmatické bílkoviny nebo červené krvinky, ve tkáních na receptory, na tukové vakuoly nebo kosti. Vázaný podíl léčiva již nemůže nikam difundovat, a proto nemůže obsadit místa účinku.

Pro terapii (i následnou eliminaci léčiva z organismu) je zejména důležitý volný podíl léku [10, 13, 14].

#### **2.1.4.3. Biotransformace a eliminace**

Léčiva jsou v těle vystavena působení mnoha biochemických reakcí, které způsobují jejich biologickou přeměnu neboli biotransformaci. Cílem biotransformace je přeměnit léčivo na látku lépe rozpustnou ve vodě, a tím snadněji vylučitelnou z organismu. Léčiva mohou být z těla vyloučena v nezměněné podobě (vysoce polární látky), mohou se samovolně přeměňovat, nebo se vyloučí jejich metabolit vzniklý biotransformací. Při biotransformaci může dojít k biodegradaci léčiva (jeho deaktivaci) nebo bioaktivaci (léčivo se stává farmakologicky aktivnějším). Mnohé látky se vylučují částečně v původní podobě a částečně přeměněné. Schopnost eliminace látky z organismu se vyjadřuje veličinou nazývanou poločas eliminace. Tato veličina je definována jako doba, za kterou klesne koncentrace léčiva v organismu na polovinu. Polární léčiva se vylučují poměrně rychle, lipofilní látky naopak velmi pomalu. Léčiva se vylučují především ledvinami do moči a střevní sliznicí nebo žlučí do stolice. Celková anestetika se vylučují plícemi [1, 10, 13, 14].

#### **2.1.5. Nežádoucí účinky**

Antibiotika mohou působit na organismus především toxicky (přímo nebo nepřímo), případně mohou poškozovat jeho imunitu. Nejrozšířenějšími nežádoucími účinky, které antibiotika vyvolávají, jsou alergické reakce. Projevují se zejména postižením kůže a respiračními obtížemi. Mezi další rozšířené nežádoucí účinky patří nauzea a zvracení. U některých druhů ATB se mohou vyskytnout i vážnější komplikace (např. poškození jater, ztráta sluchu nebo poškození plodu v těhotenství). Dalším velmi závažným a rozšiřujícím se nežádoucím projevem antibiotik je vznik a šíření bakteriální rezistence. Vedlejší účinky antibiotik vznikají narušením rovnováhy organismu jejich působením - jedná se například o zásah do enzymových systémů nebo do vitamínové bilance organismu [2, 15, 16].

#### **2.1.6. Toxicita**

Toxické projevy antimikrobiálních látek mohou být přímé (fyzikálně-chemické, dané vlastním charakterem látky a lékovou formou) nebo nepřímé (nejrozšířenější jsou hematotoxické, neurotoxické, nefrotoxické, hepatotoxické a gastrointestinální reakce). Toxicita užívaných ATB by měla být co nejnižší – antibiotika by měla účinkovat pouze proti patogenním mikroorganismům, neměla by účinkovat proti střevní mikroflóře nebo poškozovat vlastní buňky organismu. Každé léčivo však do určité míry toxické je. Toxické

účinky léčiv mohou vznikat po vysokých dávkách (při vysokých koncentracích antibiotik v tělních tekutinách) i po běžných terapeutických dávkách [8, 15, 16].

Mírou toxicity je stanovení LD<sub>50</sub> v mg/kg. V tab. 1 jsou uvedeny hodnoty LD<sub>50</sub> pro nejrozšířenější skupiny ATB.

**Tab. 1:** LD<sub>50</sub> v mg na kg hmotnosti u některých skupin antimikrobiálních látek [16].

<b>Antimicrobiální léčivo</b>	<b>LD<sub>50</sub> [mg/kg]</b>
makrolidy, linkosamidy	2 – 3 000
peniciliny, cefalosporiny	5 – 10 000
aminoglykosidy	100 – 300
tetracykliny, chloramfenikol	1 – 2 000
sulfonamidy, kotrimoxazol	5 – 10 000
nitroimidazoly	1 000 – 2 000
fluorochinolony	5 000

### 2.1.7. Bakteriální rezistence

Rezistence je schopnost mikroorganismu (bakterie) odolávat účinku antibiotika nebo antimikrobiálního chemoterapeutika. Rezistence vzniká různými mechanismy. Její vznik a míra závisí jak na struktuře antibiotika, tak také na stavbě bakteriální buňky a na její schopnosti vytvořit enzymy, které potlačují účinek antimikrobiální látky. Bakteriální rezistenci rozlišujeme především na rezistenci primární (přirozenou) a rezistenci sekundární (získanou). [2, 4, 15, 16, 17].

1. **Rezistence primární** – je rezistence geneticky podmíněná. Jedná se o přirozenou odolnost bakterie vůči antibiotiku, tzn., že bakterie je mimo spektrum působnosti antibiotika. Příkladem takového druhu mohou být bakterie, které samy antimikrobiální látky produkují [16, 17].

2. **Rezistence sekundární** – je rezistence získaná působením antibiotika na původně citlivé bakteriální kmeny. Tento typ rezistence je závažným medicínským problémem. Antibiotika, která v minulosti na určitý bakteriální kmen působila, jsou dnes neúčinná, a proto je třeba vyvíjet stále nové druhy antibiotik. Rezistence vzniká přenosem genetické informace nebo mutacemi mikrobů při jejich rozmnožování [16, 17].

- **rezistence zkřížená** – rezistence bakterií na léčiva sobě blízká
- **rezistence sdružená** – rezistence bakterií na léčiva chemicky odlišná

### 2.1.8. Kombinace antibiotik

V případě, že léčba pouze jedním antibiotikem není dostatečně účinná, přistupuje se k léčbě kombinací více antibiotik (dvou, výjimečně tří různých léků). Cílem takového postupu je dosáhnout vyššího účinku, než by bylo dosaženo při použití každého přípravku zvlášť. To je ovšem jen jeden z případů, které mohou při kombinování antibiotik nastat. Kombinace více léků může působit:

- synergisticky a potenciačně (pokud se mechanismy účinku doplňují)
- antagonisticky (pokud se mechanismus účinku jednotlivých ATB vzájemně ruší, např. baktericidní a bakteriostatická ATB současně)
- aditivně (když je výsledný účinek součtem samostatných účinků)
- indiferentně (výsledný účinek je stejný, jako účinek účinnější z podaných látek)

Z jiného úhlu pohledu je možné kombinace antibiotik rozdělit podle charakteru změny účinků. Kombinace pak může umožnit:

- rozšíření antimikrobiálního spektra (tento jev nemusí být vždy pozitivní - může vzniknout superinfekce, dysmikrobie aj.)
- zvýšení účinnosti určitého ATB (příkladem je kombinace sulfonamidu sulfamethoxazolu a trimethoprimu s názvem co-trimoxazol, viz dále)
- omezení nebo zpomalení vývoje rezistence v průběhu léčby
- snížení nežádoucích účinků
- obnovení účinku samostatně nefunkčního ATB [4, 15]

### 2.1.9. Antibiotika v životním prostředí

Výzkum reziduí léčiv vyskytujících se v životním prostředí a jejich toxických účinků na organismy je v současnosti významným odvětvím v oblasti environmentální analýzy. Výskyt reziduí různých skupin antibiotik v odpadních vodách je již několik let pozorován v mnoha evropských zemích i ve světě. Rezidua léčiv nebo jejich metabolity jsou detekovány v životním prostředí ve stopových koncentracích (ng/l – µg/l); i takto nízké koncentrace však mohou mít toxické účinky [18, 19].

Antibiotika jsou hojně využívána jak v humánní medicíně pro léčbu onemocnění bakteriálního původu, tak také ve veterinární medicíně a v zemědělství (především jako prevence nemocí dobytka, drůbeže a ryb, případně jako promotory růstu). Zdrojem výskytu antibiotik v životním prostředí je proto především antropogenní činnost. Přítomnost reziduí antibiotik v životním prostředí má za následek mimo jiné vznik chronické toxicity na organismech a rozšíření rezistence bakteriálních kmenů vůči různým druhům antibiotik [19, 20, 21, 22].



Na obr. 3 jsou znázorněny možnosti vstupu antibiotik do životního prostředí, jejich osud v ŽP a efekty způsobené na organismech.

### ***2.1.9.1. Osud antibiotik v životním prostředí a jejich efekty na organismech***

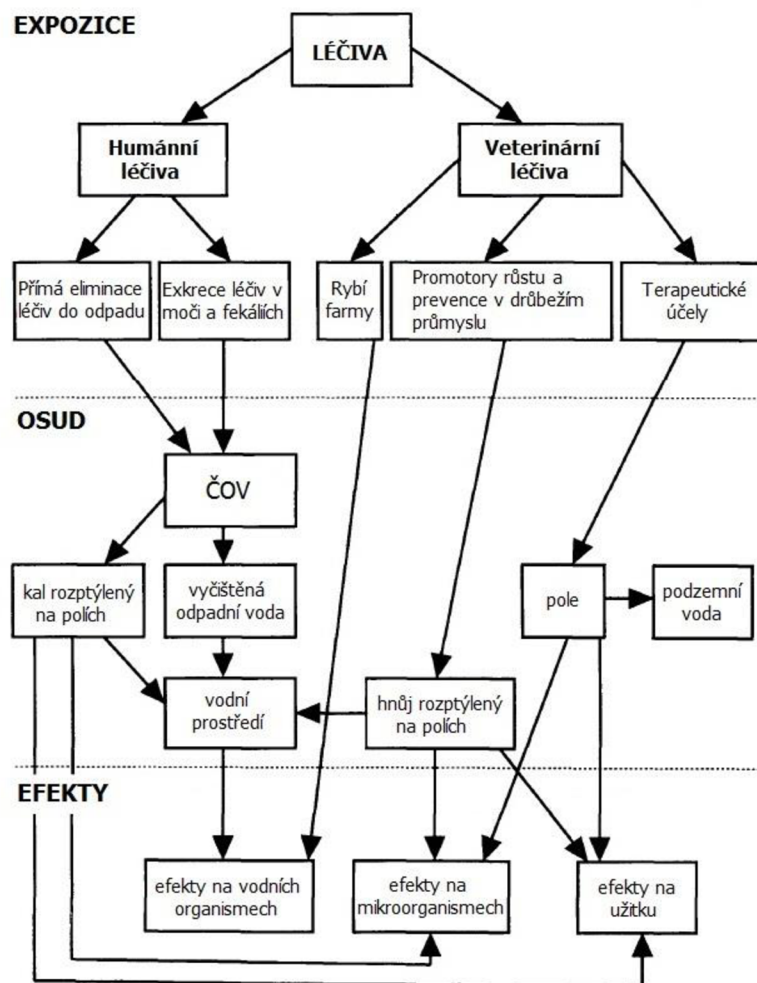
Jak již bylo řečeno výše (kapitola 2.2.4.3), po průchodu léčiva metabolismem člověka nebo zvířete je léčivo eliminováno z těla močí nebo výkaly. Lidské exkrementy putují jako splaškové odpadní vody na čistírny odpadních vod (ČOV), kde jsou po přečištění (viz kap. 2.2.9.2) vypouštěny do povrchových vodních toků. Přebytečný kal může být v ČOV dále zpracován a použit jako hnojivo. Protože na ČOV nedochází ke stoprocentní eliminaci léčiv, antibiotika v podobě vyčištěné odpadní vody nebo čistírenského kalu pronikají do životního prostředí. Zvířecí exkrementy obsahující rezidua antibiotik jsou jako hnůj vypouštěny na pole [19, 21, 23].

Použitím hnoje nebo čistírenského kalu obsahujícího rezidua antibiotik jako hnojiva dochází k působení antibiotik na mikroorganismy obsažené v půdě, čímž může dojít ke vzniku bakteriální rezistence. Antibiotika obsažená v hnojivech přijímají do svého těla rostliny; akumulace reziduí v rostlinných pletivech může způsobit změny v růstu a vývoji rostlin. Používáním takto hnojených plodin k výživě může docházet ke zpětné expozici člověka a zvířat. Antibiotika obsažená v hnojivech pronikají také díky splachům z polí do vodního ekosystému; rizikem je potom především kontaminace podzemních vod a ovlivnění vodních organismů [19, 20, 23].

Zdrojem antibiotik v životním prostředí mohou být také komunální odpady, kdy může průsakem docházet k průniku léčiva do podzemních vod a tím rovněž ke kontaminaci zdrojů pitné vody [23].

Další významnou cestou vstupu antibiotik do životního prostředí je jejich hojné používání v akvakultuře. Některé skupiny antibiotik (tetracykliny, sulfonamidy a chloramfenikol) jsou široce užívané jako prevence nemocí ryb nebo pro podporu růstu. Antibiotika jsou aplikována spolu s krmivem nebo jsou přidávána přímo do vody. Rezidua léčiv po průchodu vodním organismem, případně také zbytky nespotřebovaných léčiv jsou potom přítomny v sedimentech, kde jsou buď degradovány, nebo pronikají zpátky do povrchových vod [20].

Rezidua antibiotik pronikají do životního prostředí buď v nezměněné podobě, nebo jako biologicky aktivní metabolity. Nepřetržitý tok reziduí léčiv do životního prostředí má za následek jejich kumulování v přírodě. Největším problémem zapříčiněným rostoucím využíváním antibiotik a jejich přítomností v životním prostředí je bezpochyby bakteriální rezistence [20, 21].



Obr. 3: Osud antibiotik v ŽP [22].

### 2.1.9.2. Antibiotika v ČOV

Čistírny odpadních vod obvykle se obvykle skládají z primárního, sekundárního a někdy také terciárního čistícího stupně. V prvním stupni dochází k mechanickému čištění odpadní vody, ve druhém stupni potom k biologickému čištění působením aerobních a anaerobních systémů. K eliminaci a transformaci antibiotik dochází právě ve druhém stupni čištění odpadní vody. Léčiva jsou z odpadní vody odstraňována různými biotickými a abiotickými procesy. Hlavním biotickým procesem je bakteriální biodegradace (nejhojněji je využíván aktivační proces nebo biofilmové reaktory). Mezi abiotické procesy čištění patří především sorpce, hydrolyza a fotolýza [1923].

Míra odstranění antibiotik z odpadní vody závisí především na jejich schopnosti sorbovat se na kal a na jejich degradaci a transformaci. Hydrofobní nepolární antibiotika se lépe sorbují na aktivovaný kal než hydrofilní. Většina antibiotik je ovšem hydrofilní povahy a jsou proto

přítomné především ve vodné fázi odpadní vody. Čistící procesy léčiva z odpadní vody neodstraní dokonale, míra eliminace antibiotik se pohybuje mezi 60 – 90 % [19, 20, 21, 23].

## **2.2. Sulfonamidy**

Sulfonamidy patří mezi jedny z nejstarších a nejdůležitějších antibiotik. Do terapeutické praxe byly zavedeny ve druhé polovině 30. let 20. století. Jejich objevení způsobilo převrat v léčení řady bakteriálních infekcí, ovšem poměrně brzy byly vytlačeny jinými typy antibiotik. V současné době se však začaly znovu hojněji používat, především z důvodů vzniku rezistence bakterií vůči mnoha jiným druhům antibiotik, a také díky objevu zesíleného terapeutického účinku při kombinaci sulfonamidů s trimethoprimem [4, 6, 13].

### **2.2.1. Historie sulfonamidů**

Sulfonamidy jako antibiotika mají svůj původ v azobarvivech. Ve 30. letech 20. století byl při výzkumech azobarviv, používaných v textilním průmyslu, objeven jejich antibiotický účinek. Dr. Gerhard Domagk poprvé úspěšně použil azobarvivo sulfamidochrysoidin k léčení stafylokokové infekce u laboratorních myší. Experiment byl natolik úspěšný, že v roce 1935 byl tento sulfonamid uveden na trh jako lék Prontosil. Až později se podařilo skupině francouzských vědců izolovat účinnou látku přípravku – sulfanilamid (ten byl přitom poprvé syntetizován již v roce 1908 a později bez využití zapomenut) [3, 24].

### **2.2.2. Charakteristika sulfonamidů**

Sulfonamidy patří do skupiny uměle vyrobených antimikrobních chemoterapeutik. Působí bakteriostaticky a mají středně široké antibakteriální spektrum zahrnující grampozitivní i některé gramnegativní aerobní bakterie (streptokoky, pneumokoky, meningokoky, hemofily, chlamydie, nokardie a jiné bakteriální kmeny). Používají se při terapii infekcí horních a dolních cest dýchacích, infekcí kůže a měkkých tkání a infekcí trávicího nebo urogenitálního ústrojí. Jedná se o antibiotika relativně málo toxická. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří fototoxicita a různé kožní reakce, včetně jejich závažných forem, který mívají například toxická epidermální nekrolýza nebo Stevensův-Johnsonův syndrom. Ojedinele se může vyskytnout i megaloblastická nebo hemolytická anémie [1, 3, 4, 17, 25].

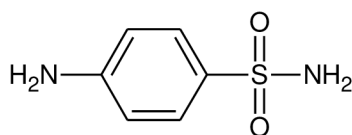
Sulfonamidy jsou chemické sloučeniny relativně málo rozpustné ve vodě, mají kyselý charakter a některé z nich jsou nestabilní, protože se rozkládají se na světlo. Jako léčiva se používají buď čisté, nebo jejich sodné soli. V tab. 2 je uveden přehled sulfonamidových antibiotik v současnosti registrovaných v České republice [3].

**Tab. 2:** Seznam léků registrovaných v ČR, jejichž účinnou látkou je sulfonamid [25, 26].

Název přípravku	Účinná látka	Léková forma
BISEPTOL	co-trimoxazol	koncentrát pro infuzní roztok
BISEPTOL	co-trimoxazol	tableta
COTRIMOXAZOL AL FORTE	co-trimoxazol	tableta
IALUGEN PLUS	stříbrná sůl sulfadiazinu	impregnovaný obvaz
IALUGEN PLUS	stříbrná sůl sulfadiazinu	krém
SALAZOPYRIN EN	sulfasalazin s povidonem	tableta
SULFASALAZIN K	sulfasalazin s povidonem	tableta
SULFASALAZIN K-EN	sulfasalazin s povidonem	tableta
SULPHACETAMIDE 10%	monohydrát sodné soli sulfacetamidu	oční kapky, roztok
SUMETROLIM	co-trimoxazol	tableta
SUMETROLIM	co-trimoxazol	sirup

### 2.2.3. Chemická struktura

Sulfonamidová chemoterapeutika jsou strukturně blízká kyselině p-aminobenzoové. Karboxylová skupina v kyselině p-aminobenzoové je u sulfonamidů nahrazena sulfonamidovou skupinou. Základní strukturní jednotkou sulfonamidů je sulfanilamid (obr. 4), který byl v počátcích užívání sulfonamidů také účinnou látkou. Pozdějšími výzkumy bylo zjištěno, že různé deriváty sulfanilamidu jsou terapeuticky účinnější. Nejrozšířenějšími deriváty jsou N<sub>(1)</sub>-sulfonamidy, které mají substituovaný sulfamoylový dusík, a N<sub>(4)</sub>-sulfonamidy, které mají substituovanou amino- skupinu [3, 12].



**Obr. 4:** Strukturní vzorec sulfanilamidu.

### 2.2.4. Farmakokinetika a metabolismus sulfonamidů

Farmakokinetické vlastnosti jednotlivých sulfonamidů jsou velmi rozdílné. Liší se především stupněm absorpce v gastrointestinální soustavě (dále GIT) a poločasem eliminace, a v důsledku toho i terapeutickým použitím. Sulfonamidy se také různě intenzivně vážou na plazmatické proteiny, čímž se liší délka jejich terapeutického účinku i délka trvání případných nežádoucích účinků [12, 25].

Rozdělení sulfonamidů podle doby účinku, případně podle poločasu eliminace, je uvedeno v tab. 3.

$N_{(4)}$ -sulfonamidy jsou špatně rozpustné ve vodě, a proto v GIT jsou téměř nevstřebatelné. Naproti tomu  $N_{(1)}$ -sulfonamidy jsou v trávicím traktu dostatečně rychle vstřebány. Vstřebávají se v žaludku a tenkém střevě, největší koncentrace byly zaznamenány 4 – 6 hodin po podání. Koncentrace ve tkáních jsou vyšší v játrech, plicích, svalovině, nižší naopak v kostech, střevní sliznici a mozku. Sulfonamidy i jejich metabolity se vylučují především ledvinami (respektive močí) [3, 27].

**Tab. 3:** Rozdělení účinnosti sulfonamidů podle poločasu eliminace [3].

Sulfonamidy účinkující	Doba účinku	
krátkodobě	2 – 6 h	sulfacetamid, sulfathiazol, sulfisoxazol, sulfamethizol, sulfakarbamid, sulfisomidin
středně dlouze	6 – 20 h	sulfamethoxazol, sulfamoxol, sulfadiazin
dlouhodobě	24 – 70 h	sulfamethoxydiazin, sulfamethoxin, sulfaperin
ultra dlouze	až 180 h	sulfadoxin, sulfalen

### 2.2.5. Vybrané sulfonamidy

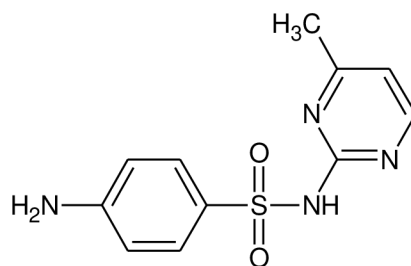
Pro analýzu sulfonamidů v odpadní vodě bylo vybráno několik zástupců  $N_{(1)}$ -sulfonamidů. Předpokladem výběru bylo jejich hojné využívání k léčbě; proto je pravděpodobný jejich výskyt v životním prostředí.

#### 2.2.5.1. Sulfamerazin (SMR)

Sumární vzorec:  $C_{11}H_{12}N_4O_2S$

Systematický název: 4-amino-N-(4-methylpyrimidin-2-yl)benzen-1-sulfonamid

Sulfamerazin je bílý, nažloutle bílý nebo narůžověle bílý krystalický prášek. Velmi těžce je rozpustný ve vodě, špatně rozpustný v ethanolu, mírně rozpustný v acetonu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách nebo v roztocích hydroxidů. Teplota tání je 235 °C. V zahraničí je používán spolu s trimethoprimem pro léčbu bakteriálních infekcí v ORL [3, 28].



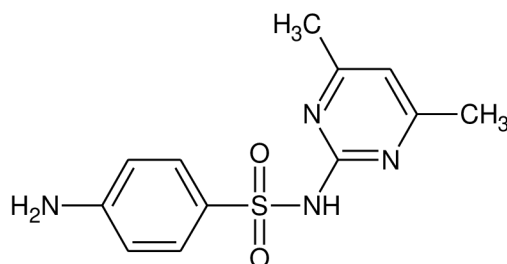
**Obr. 5:** *Strukturální vzorec sulfamerazinu.*

#### 2.2.5.2. Sulfamethazin (SMT)

Sumární vzorec:  $C_{12}H_{14}N_4O_2S$

Systematický název: 4-amino-N-(4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)benzen-1-sulfonamid

Sulfamethazin je bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Těžce je rozpustný ve vodě, v ethanolu a ve vodném roztoku acetonu je rozpustný za zvýšené teploty. Rozpouští se v minerálních kyselinách a v roztocích hydroxidů. Teplota tání je 196 – 200 °C. V humánním lékařství se v ČR dnes již nepoužívá, avšak je stále široce rozšířen jako veterinární léčivo [4, 29].



**Obr. 6:** *Strukturální vzorec sulfamethazinu.*

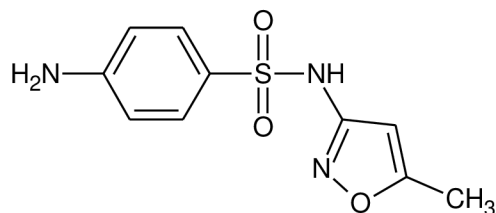
#### 2.2.5.3. Sulfamethoxazol (SMX)

Sumární vzorec:  $C_{10}H_{11}N_3O_3S$

Systematický název: 4-amino-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzen-1-sulfonamid

Sulfamethoxazol je bílý (nebo téměř bílý) krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, lehce rozpustný v acetonu, mírně rozpustný v ethanolu. Rozpouští se ve zředěných kyselinách a ve zředěných roztocích hydroxidu sodného. Je to nejužívanější sulfonamid se středně dlouhým účinkem, je kompletně vstřebáván v GIT, vylučován je nezměněn (15-20 %) nebo jako acetylovaný metabolit (30-65 %). Aplikuje se především v terapii infekcí kůže a žlučových [3, 28].

Používá se především v kombinaci s trimethoprimem (v poměru 5:1), a to jako lék s názvem Kotrimoxazol. Jak již bylo řečeno výše, kombinace těchto dvou léčiv zvyšuje terapeutický účinek léčiva. Kotrimoxazol je využíván zejména při infekcích respiračního a močového systému, dále při infekcích tyfu, sinusitid a kapavky [3, 11].



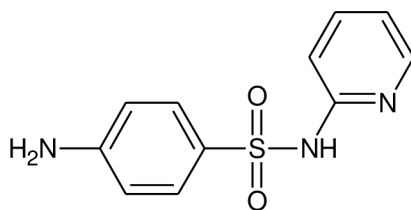
**Obr. 7:** *Strukturní vzorec sulfamethoxazolu.*

#### 2.2.5.4. Sulfapyridin (SPY)

Sumární vzorec: C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S

Systematický název: 4-amino-N-pyridin-2-ylbenzen-1-sulfonamid

Sulfapyridin je bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a v roztocích hydroxidů. Účinkuje na fibrinózní pneumonii, meningitidu, úplavici. Poprvé byl připraven v roce 1939, avšak již v 50. letech 20. století se vzhledem k nežádoucím účinkům a špatné rozpustnosti začal v humánním lékařství nahrazovat sulfamethazinem [3, 29].



**Obr. 8:** *Strukturní vzorec sulfapyridinu.*

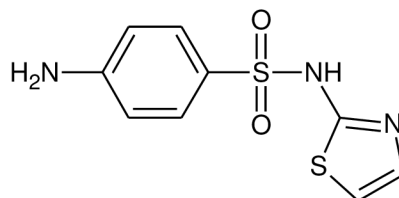
#### 2.2.5.5. Sulfathiazol (STZ)

Sumární vzorec: C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S

Systematický název: 4-amino-N-(thiazol-2-yl)benzen-1-sulfonamid

Sulfathiazol je bílý nebo nažloutlý krystalický prášek. Je prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu. Rozpouští se ve zředěných minerálních kyselinách a v roztocích alkalických hydroxidů. Používá se k lokální léčbě očních infekcí a rovněž k léčbě infikovaných popálenin a bércových vředů [4, 11, 28].

Je nestabilní (na světle se rozkládá), má krátký účinek, existuje u něho riziko nefrotoxicity metabolicky vznikajícího nerozpustného acetylderivátu. Používá se zejména jako topické chemoprophylaktikum v dermatologii. V čisté formě nebo jako stříbrná sůl se používá k léčbě popálenin, omrzlin. Další jeho použití je ve veterinářství. [3].



**Obr. 9:** *Strukturní vzorec sulfathiazolu.*

## 2.3. Postupy používané při stanovení léčiv

Obecný postup při stanovení léčiv zahrnuje několik nezbytných kroků. Prvním z nich je správné provedení odběru vzorku, dále transport vzorku z místa odběru do analytické laboratoře a případné uchování vzorku. Surový vzorek není ve většině případů možné přímo analyzovat a proto je zapotřebí provést preanalytické úpravy vzorku zvolené podle typu matrice a finální analytické metody. Následuje vlastní analýza a vyhodnocení výsledků [30, 31].

### 2.3.1. Odběr, transport, uchování vzorku

Do celkového analytického postupu při stanovení léčiv je nutné zahrnout i správný postup při vzorkování matrice. Výsledky analýzy části objektu, tj. odebraného vzorku, jsou pak zdrojem informací o sledovaném objektu jako celku [32].

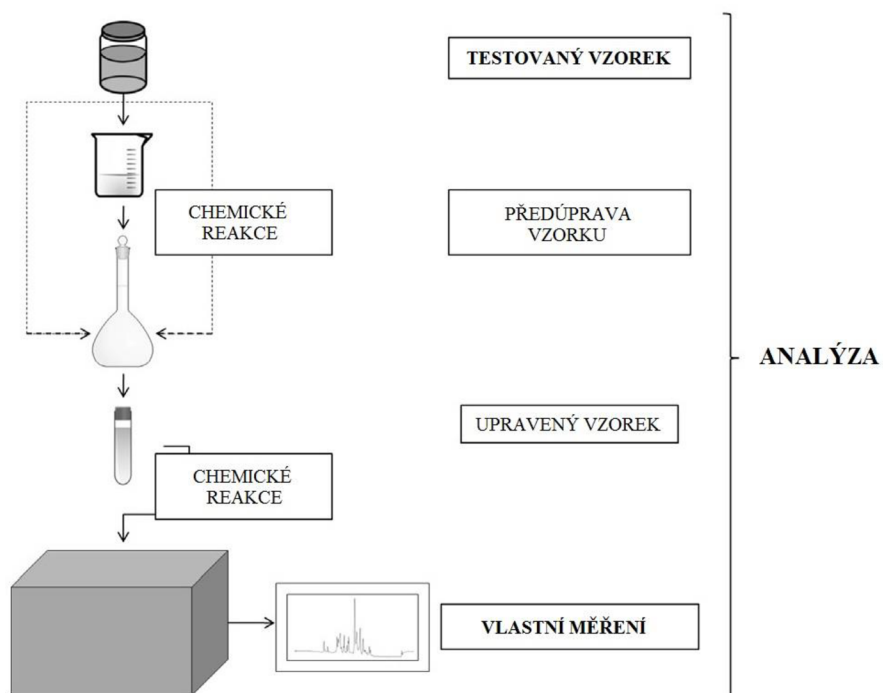
Základním požadavkem při vzorkování určitého celku je získání reprezentativního vzorku. Reprezentativní vzorek je takový vzorek, jehož fyzikální nebo chemické charakteristiky jsou shodné s průměrnými charakteristikami celkového objemu, který je vzorkován [30, 31].

Výzkumy týkající se odpadních vod se soustředí především na odběry vzorků z komunálních a průmyslových čistíren odpadních vod, přičemž vzorky jsou odebírány na přítoku do čistírny odpadních vod (ČOV) a na odtoku z ČOV. Pro dosažení reprezentativnosti vzorku by vzorek měl být odebírán v místě, kde je odpadní voda dobře promíchávána, ve středu proudu, v hloubce 40 – 60 % celkové hloubky toku. Pro odběr vzorku se v současné době vesměs využívá automatických dávkovačů, jejichž výhodou je opakovatelnost a možnost odebírat nepřetržitě a v přesně daných časových intervalech. Další využívanou možností odběru je manuální odběr vzorku [33, 34].



Po provedení vlastního odběru vzorku je třeba zajistit transport vzorku do laboratoře a jeho uchování tak, aby nedošlo ke změně jakosti. Jako odběrové láhve se používají skleněné vzorkovnice. Každou vzorkovnici je třeba označit štítkem se základními informacemi o vzorku, aby nemohlo dojít k záměně. Transport a skladování vzorků se provádí v chladicím boxu při teplotě maximálně 4°C [30, 31, 34].

Legislativním předpisem vztahujícím se ke správnému vzorkování komunálních a průmyslových odpadních vod je norma ISO 5667-10:1992 [35].



**Obr. 10:** Znárodnění jednotlivých kroků postupu při analýze léčiv [32].

### 2.3.2. Příprava vzorku k analýze

Surový vzorek není ve většině případů možné analyzovat přímo a je třeba provést preanalytické úpravy vzorku, které musí být zvolené podle typu analytu, matrice a aplikované finální metody. Obecné kroky postupu při analýze léčiv jsou znázorněny na obr. 10. V případě odpadní vody je zpravidla nutné vzorek nejprve přefiltrovat přes papírové filtry s různou zrnitostí. Typ filtru je volen podle podílu nerozpuštěných nečistot přítomných v odpadní vodě [32, 36].

Dále je před vlastní analýzou nutné oddělit stanovovaný analyt nebo skupinu analytů od původní matrice. K tomuto účelu slouží extrakce. Extrakci lze z pohledu fyzikální chemie chápat jako přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými

kapalinami. V případě kapalných vzorků se může jednat konkrétně o extrakci tuhou fází (SPE), extrakci kapalina - kapalina a gelovou permeační chromatografií. Při stanovení sulfonamidových antibiotik je preferována převážně extrakce tuhou fází, méně často se využívá extrakce kapalina - kapalina:

- extrakce kapalina – kapalina je založena na rozdělovací rovnováze v soustavě dvou nemísitelných kapalin. Sledovaná složka přechází do toho rozpouštědla, ve kterém je více rozpustná.
- při extrakci z kapaliny na pevnou fázi pevná fáze selektivně zachycuje požadované složky [36, 37, 38].

### **2.3.2.1. Extrakce tuhou fází (SPE)**

Extrakce tuhou fází je v současnosti oblíbenou, široce využívanou technikou vhodnou pro zpracování kapalných vzorků. Používá se převážně pro extrakci středně těžkých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a přečištění. Její hlavní výhodou proti extrakci kapalina - kapalina je především malá spotřeba organických rozpouštědel [39, 40, 41].

Principem této metody je přivedení roztoku analytu do kontaktu s tuhým sorbentem, který silně sorbuje analyt, ale co nejméně ostatní složky roztoku. Cílem SPE metody je snaha o to, aby sorbované analyty byly při eluci maximálně desorbovány a dosáhlo se tak co nejlepších výtěžností finální analýzy. Při SPE dochází k sorbování analytů na povrch tuhého sorbentu; eluce cílových sloučenin silně závisí na polaritě elučního činidla. Nejlepších výsledků při extrakci antibiotik bylo dosaženo použitím methanolu jako elučního činidla (výtěžnost 72 – 93 %) [39, 42].

Pro SPE se využívá kolonek o malém objemu, které obsahují sorbent o velikosti částic 50-60  $\mu\text{m}$ , který je umístěn mezi dvěma porézními kovovými nebo plastovými fritami. V současnosti se využívá mnoho sorbentů. V analýze organických sloučenin jsou běžně aplikovány sorbenty na bázi modifikovaného silikagelu (oktadecylové - C18 nebo oktylové - C8). Sorbent klade odpor protékající kapalině, a proto se často průtok kapaliny přes kolonku urychluje vakuem na výstupu z kolonky, případně tlakem na vstupu do kolonky nebo centrifugací. Retenční mechanismus je řízen zejména hydrofobními interakcemi mezi analytem a navázanými uhlíkatými řetězci. Pro extrakci látek obsahujících disociující skupiny (například COOH, OH, NH<sub>2</sub>), je často nutná úprava pH vzorku [39, 42, 43].

Pracovní postup při extrakci tuhou fází se skládá ze čtyř hlavních kroků (obr. 11):

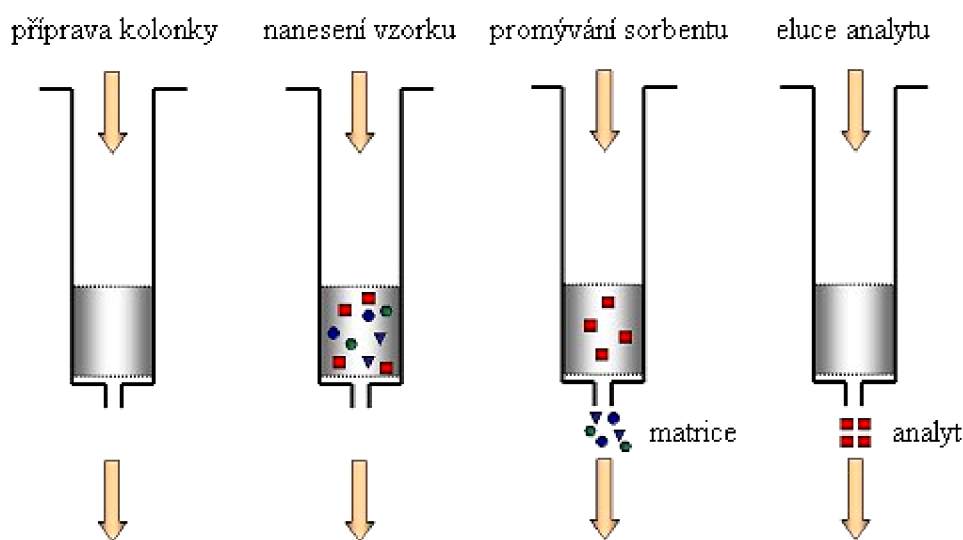
1. **Aktivace sorbentu** – povrch sorbentu je kondicionován rozpouštědlem (zpravidla stejným, jaké bude použito na eluci) za účelem specifikace sorbentu pro daný analyt. Současně se tímto krokem sníží pravděpodobnost zachycení nečistot na sorbentu. Tento krok

je velmi důležitý pro vodné roztoky analytů. Po překapání vhodného objemu elučního činidla je jeho přebytek vymyt slabým rozpouštědlem [39, 40, 41].

2. **Nanesení vzorku** – po aktivaci sorbentu následuje nanesení vzorku na sorbent. Roztok analytu projde přes sorbent při kontrolovaném průtoku (2–5 ml/min). Rozpouštědlo přejde do odpadu a sledované analyty se zachytí na sorbentu. V případě vodných roztoků je důležité po překapání vzorku zařadit krok sušení [39, 40, 41].

3. **Promytí vzorku** – v některých případech zachycený vzorek obsahuje nečistoty a je nutné jej promýt. Vzorek se promývá pomocí slabého rozpouštědla, které vymyje nečistoty, avšak neeluuje sledované látky [39, 40].

4. **Eluce vzorku** – nakonec jsou sledované látky eluovány malým objemem elučního činidla, kterým je silné rozpouštědlo [39, 40].



**Obr. 11:** *Typický postup při extrakci tuhou fází [43].*

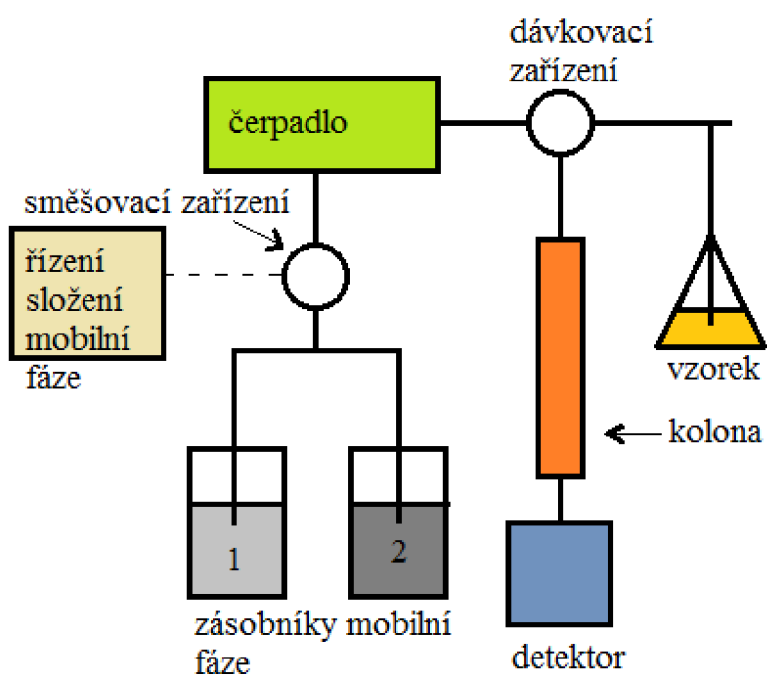
### 2.3.3. Vlastní analýza

Nejrozšířenějšími způsoby analýzy antibiotik jsou v současnosti plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS) nebo UV/VIS detektorem. Při výběru mezi těmito metodami bývá dávána přednost HPLC/MS, případně HPLC/MS/MS (kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií) před GC/MS, a to z důvodu vyšší selektivity a lepší kompatibility s málo těkavými, vysoce polárními léčivy. Dále je možné léčiva analyzovat pomocí elektromigračních metod, především pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) ve spojení s MS, MS<sup>2</sup> nebo dokonce MS<sup>3</sup> [42, 44].

### 2.3.3.1. Kapalinová chromatografie

Chromatografie je fyzikální separační metoda, při níž jsou separované složky distribuovány mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární, zatímco druhá se pohybuje v daném směru (mobilní fáze). Kapalinová chromatografie (LC) je druh chromatografie, kde mobilní fázi tvoří kapalina. Je charakterizována použitím stacionární fáze (tuhé látky) umístěné v koloně, kterou protéká mobilní fáze. Při běžné eluční metodě je roztok vzorku nadávkován v úzké zóně na začátek kolony. Mobilní fáze unáší všechny složky mezerami mezi částicemi stacionární fáze. V kontaktu se sorbentem každá složka vzorku přechází zčásti do stacionární fáze, a to ve snaze dosáhnout termodynamické rovnováhy. V závislosti na velikosti retence (zadržení) složek vzorku ve stacionární fázi dochází k separaci jednotlivých složek vzorku [45, 46].

Kapalinová chromatografie je používána k separaci směsí látek, které jsou netěkavé, případně málo těkavé a termicky labilní. Jako mobilní fáze se používají méně polární rozpouštědla nebo vodné roztoky. Běžně se používá mnoho druhů stacionárních fází, jakými jsou například oxid křemičitý, porézní grafit, oxid hlinitý, pryskyřice a polymery [28].



Obr. 12: Schematické znázornění přístroje pro HPLC [47]

### 2.3.3.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

V současnosti nejvíce využívanou modifikací kapalinové chromatografie je vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC). Vysoké rychlosti a účinnosti separace se dosahuje díky poměrně velkým průtokům mobilní fáze a použitím kolon, které jsou plněny velmi jemnými částicemi o velikosti 3-15  $\mu\text{m}$ . Pro účinnou separaci je nezbytné pracovat při vysokém tlaku (30 – 60 MPa) [38, 48].

Schematické znázornění přístroje pro HPLC je uvedeno na obr. 12. Přístroj pro HPLC se skládá z počítače (v dnešní době slouží k ovládání podmínek separace a k vyhodnocování), zásobníků mobilní fáze, čerpadla, směšovacího zařízení, zásobníku vzorku, dávkovacího zařízení, kolony a detektoru napojeného na vyhodnocovací zařízení.

Čerpadla pro HPLC by měla být zkonstruována z materiálů odolných vůči korozi a agresivním mobilním fázím a měla by být schopna dávkovat mobilní fázi pod vysokým tlakem. Čerpadlo musí umožňovat konstantní bezpulzní tok mobilní fáze o malé rychlosti [38, 49].

Ve směšovacím zařízení mohou být jednotlivé složky mobilní fáze před vstupem do čerpadla směšovány v různém poměru. Směs může mít buď stálé složení po celou dobu analýzy, nebo se může jednat o gradientovou eluci [50, 51].

Pro dávkování vzorku se dnes zpravidla používá automatický dávkovač (šesticestný dávkovací ventil se smyčkou). Vzorek lze také nadávkovat přímým nástřikem injekční stříkačkou přes septum (dnes se prakticky nepoužívá) nebo ručně dávkovacím ventilem se smyčkou [49].

Výsledek chromatografické separace závisí především na vhodnosti použité kolony, zejména její náplně. V HPLC se nejčastěji používají kolony z antikorozivní oceli o délce 5-30 cm a průměru 2-5 mm. S rostoucí délkou kolony se zvyšuje účinnost separace, ale i doba analýzy. Pro separaci léčiv je vhodné použít chromatografii na obrácených fázích [38, 49, 51].

V současnosti je možné v kapalinové chromatografii použít několik druhů detektorů. Detektory používané v HPLC jsou tyto:

- spektrofotometrické detektory
  - UV-VIS s pevně nastavenou vlnovou délkou,
  - UV-VIS s nastavitelnou vlnovou délkou,
  - UV-VIS detektor diodového pole (DAD),
- fluoresenční detektor,
- refraktometrický detektor,
- elektrochemický detektor,
- vodivostní detektor,
- hmotnostní spektrometr [51].

V této diplomové práci byl ke stanovení sulfonamidů použit UV-VIS detektor typu diodového pole. U tohoto detektoru se záření přicházející ze zdroje spektrálně rozkládá holografickou mřížkou. Na každou z fotodiod dopadá zářivý tok o určité vlnové délce, který je zeslabený absorpcí ve cele detektoru. Každá fotodioda je spojena s nabitým kondenzátorem, přičemž fotoelektrický proud vznikající po dopadu záření na diodu vybijí kondenzátor. Poté se kondenzátory opět nabíjejí a měří se velikost proudu, který je potřebný na dobití kondenzátorů. Výhodou tohoto detektoru je univerzálnost, citlivost a především použitelnost v gradientových technikách [52, 53].

### **2.3.3.3. Ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC)**

V souvislosti se zvyšujícími se nároky na počet analýz za časovou jednotku dochází k neustálému vývoji analytických technik. Například kapalinové chromatografie tento jev vedl k vývoji zcela nové generace chromatografických kolon a s tím spojené instrumentace, operující při maximálních tlacích 100 MPa. Pro tuto novou modifikaci byl přijat název Ultra účinná kapalinová chromatografie. V literatuře lze nalézt dvě označení pro ultra účinnou chromatografii; UPLC a UHPLC, která lze považovat za synonyma.

Kolony v ultra účinné kapalinové chromatografii používají extrémně malých částic označovaných jako „sub-2  $\mu\text{m}$ “. Při použití takto malých částic lze dosáhnout vysoké účinnosti při mnohem vyšších průtokových rychlostech, což má za následek rychlejší separaci. Díky této technologii lze zkrátit dobu analýzy až devětkrát, citlivost zlepšit třikrát a dvakrát lze zlepšit rozlišení. Takové zrychlení se pozitivně projeví především v úspoře organických rozpouštědel, energie a času [54].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Hlavním cílem předložené diplomové práce bylo vybrat a optimalizovat vhodnou metodu pro stanovení sulfonamidů v odpadních vodách. Vybraná metoda zahrnuje úpravu vzorků odpadní vody pomocí extrakce tuhými fázemi (SPE), analýzu pomocí UHPLC s detektorem diodového pole (DAD) a dále běžné úpravy vzorků odpadní vody, jakými jsou homogениzace vzorku a filtrace.

#### 3.1. Přístroje, zařízení, software

##### 3.1.1. Vybavení pro preanalytické úpravy vzorku

- Analytické váhy HR-120, A&D Instruments, Japonsko
- Ultrazvuková vodní lázeň, typ Teson 4, Tesla, ČR
- Filtrační papír pro kvalitativní analýzu KA4,  $\Phi$  150mm, Papírna Pernštejn, ČR
- Filtrační papír MN GF-1,  $\Phi$  55mm, Macherey-Nagel, Německo
- Zařízení pro filtraci odpadní vody
- SPE extraktor Baker, model spe-12 G, J. T. Baker, USA
- Membránová vývěva KIF LAB, Laboport, Maneko, ČR
- SPE kolony: Supelclean envi-18, 6 ml/1g, Supelco, USA
- Přístroj pro sušení dusíkem Evaterm, Labicom, ČR
- Membránové filtry Cronus Syringe Filter Nylon 4mm 0.2  $\mu$ m, Laticom, UK
- Běžné laboratorní vybavení

##### 3.1.2. Přístroje pro vlastní analýzu

- UHPLC: přístroj Agilent Technologies 1290 Infinity Binary LC System
  - Čerpadlo mobilní fáze: binární pumpa, nastavitelný průtok 0,001 – 5 ml/min, tlak do 105 MPa
  - Kolona: ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD (rozměry: 2,1x50 mm, 1,8 $\mu$ m)
  - Kolona: ZORBAX SB-C18, Rapid Resolution HD (rozměry: 2,1x100 mm) s velikostí částic náplně 1,8  $\mu$ m
  - Detektor DAD: zdrojem světla je deuteriová lampa, 1024 fotodiod, vlnový rozsah 190 – 640 nm, programovatelná šířka štěrbin: 1, 2, 4, 8 nm

### 3.1.3. Software pro zpracování a interpretaci dat

- Microsoft Office Word 2007
- Microsoft Office Excel 2007
- ACD/ChemSketch 10.0
- ChemStation for LC 3D Systems Rev. B.04.03, Agilent Technologies

## 3.2. Chemikálie a standardy

### 3.2.1. Chemikálie

- Kyselina mravenčí, Riedel de Haen, Sigma Aldrich, GmbH, čistota p. a., Německo
- Methanol, pro HPLC, Lach-Ner, Neratovice, ČR
- Deonizovaná voda upravená přístrojem Milli-Q Academic firmy Millipore o specifické vodivosti  $0,055 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  při teplotě  $24 \text{ }^\circ\text{C}$

### 3.2.2. Standardy

- Sulfathiazol, čistota  $\geq 99 \%$ , Sigma Aldrich
- Sulfapyridin, čistota  $\geq 99 \%$ , Sigma Aldrich
- Sulfamethazin, čistota  $\geq 99 \%$ , Sigma Aldrich
- Sulfamethoxazol, čistota  $\geq 99 \%$ , Sigma Aldrich
- Sulfamerazin, čistota  $\geq 99 \%$ , Sigma Aldrich

## 3.3. Sledovaná matrice

Sledovanou maticí byly vzorky odpadní vody odebrané vždy na přítoku a na odtoku z čistírny odpadních vod. Konkrétně se jednalo o celkem 9 směsných 24 hodinových vzorků odebraných 5. 6. 2014 na ČOV v Pohořelicích, Valticích, Lednici a Mikulově a 7. 7. 2014 v Hustopečích, Podivíně, Valticích, Lednici a v Mikulově. Dále byl po dobu jednoho týdeň na ČOV v Mikulově odebírán každý den vzorek na přítoku a na odtoku, a to ve dnech 31. 7. – 6. 8. 2014.



### **3.4. Čistírny odpadních vod**

Vzorky odpadní vody byly odebírány z čistíren odpadních vod s různými technologiemi čištění a různými počty ekvivalentních obyvatel (EO). V následujících kapitolách jsou popsány základní charakteristiky daných ČOV.

#### **3.4.1. ČOV Podivín**

Kapacita: 5 250 EO

Stávající ČOV Podivín je navržena jako mechanicko-biologická pro odstranění uhlíkatého znečištění se zpracováním kalu anaerobním studeným vyhníváním v kalovém prostoru šterbinových nádrží. Biologický stupeň je tvořen dvojicí zkrápěných biologických filtrů.

#### **3.4.2. ČOV Pohořelice**

Kapacita: 6 000 EO

ČOV je technologicky řešena jako mechanicko-biologická. Biologický stupeň pracuje na principu simultánní nitrifikace a denitrifikace, biologické odbourávání fosforu je doplněno o chemické srážení. Strojně odvodňovaný kal je hygienizován vápněním.

#### **3.4.3. ČOV Hustopeče**

Kapacita: 8 753 EO

V Hustopečích je v provozu mechanicko-biologická čistírna odpadních vod. Za vstupním šnekovým česlem je mechanické předčištění a na obtoku průtočná dešťová zdrž. Biologická část sestává z oběhových aktivačních nádrží s mechanickou aerací a kruhovými dosazovacími nádržemi. Kalové hospodářství zahrnuje uskladňovací nádrž a odvodnění kalu pomocí sítopásového lisu.

#### **3.4.4. ČOV Valtice**

Kapacita: 9 700 EO

Čistírna pracuje jako mechanicko-biologická ČOV s odstraňováním dusíku systémem nitrifikace a denitrifikace a s odstraňováním fosforu chemickým srážením. Kal je separován v nově vybudované dosazovací nádrži. Odvodněný kal je hygienizován vápnem. Nově je řešeno čerpání dešťových vod, pro jejichž záchyt je využita rekonstruovaná stávající aktivační nádrž.

### **3.4.5. ČOV Lednice**

Kapacita: 12 000 EO

ČOV je řešena jako mechanicko-biologická s biologickým stupněm řešeným jako dvoustupňová aktivace. První stupeň je představován rotačními biodisky a čtvercovými dosazovacími nádržemi. Druhý stupeň je tvořen třemi aktivačními nádržemi s aerátory FRINGS. Dosazovací nádrž je kruhová o průměru 15 m. Kalové hospodářství je založeno na aerobní stabilizaci kalu. Odvodnění kalu je řešeno pomocí sítopásového lisu.

### **3.4.6. ČOV Mikulov**

Kapacita: 24 850 EO

ČOV je technologicky řešena jako mechanicko-biologická s terciárním čištěním. Biologický stupeň je tvořen dvojicí oběhových aktivačních nádrží s mechanickou aerací a dvěma dosazovacími nádržemi. Fosfor se z vody odstraňuje chemickým srážením. Hygienizace kalu probíhá pomocí kyslíku, hygienizovaný kal je potom mechanicky odvodňován.

## **3.5. Sledované analyty**

Sledovanými analyty byla léčiva sulfamerazin, sulfamethazin, sulfamethoxazol, sulfapyridin a sulfathiazol. Jejich chemicko-fyzikální vlastnosti a oblasti použití byly popsány v kapitolách 2.2.5.1 – 2.2.5.5.

## **3.6. Pracovní postupy**

### **3.6.1. Roztoky standardů léčiv**

Pro optimalizaci metody byly nejprve připraveny roztoky standardů vybraných sulfonamidů.

Zásobní roztoky standardů vybraných léčiv měly koncentraci 1 mg/ml. Na základě literární rešerše a pilotní studie byla léčiva rozpuštěna v roztoku 0,1M HCOOH v MeOH. Tyto zásobní roztoky byly připraveny přesným navážením 0,0100 g každého léčiva. Navážky byly převedeny do 10 ml odměrných baněk a doplněny 0,1M HCOOH v MeOH. Pro podporu a rychlejší rozpouštění byly roztoky umístěny do ultrazvukové vodní lázně, a to přibližně po dobu 10 minut.

Z těchto zásobních roztoků byl následně připraven směsný pracovní roztok o koncentraci 100 µg/ml v 0,1M HCOOH v MeOH. Tento roztok byl následně používán jak při optimalizaci chromatografické metody na UHPLC/DAD, tak také při optimalizaci SPE metody.

### 3.6.2. Odběry vzorků

Odběry vzorků byly provedeny na ČOV vedoucími pracovníky těchto čistíren, kteří zajistili kontinuální jednodenní odběry přesně podle předem připraveného plánu vzorkování.

### 3.6.3. Preanalytické úpravy vzorků

#### 3.6.3.1. Filtrace a uchování vzorku

Všechny vzorky odpadní vody byly filtrovány přes dva typy filtrů, a to:

1. Papírový filtr pro kvalitativní analýzu KA4,
2. Papírový filtr MN GF-1.

Po přefiltrování byly vzorky uloženy v chladicím boxu při 4 °C až do doby dalšího zpracování. Ze vzorků odpadní vody byla léčiva izolována pomocí extrakce tuhou fází.

#### 3.6.3.2. Extrakce tuhou fází SPE

Typ SPE kolonky:	ENVI-18 SPE Tubes, objem 6 ml, 1 g sorbentu
Kondicionace kolonky:	2 ml 0,1 M HCOOH v MeOH 2 ml 5% MeOH
Aplikace vzorku:	250 ml odpadní vody, okyseleno HCOOH na pH 3
Sušení proudem vzduchu:	10 minut
Promytí sorbentu:	2 ml 5% MeOH
Eluce analytu:	4 ml 0,1 M HCOOH v MeOH

Po ukončení SPE extrakce byl eluát odpařen do sucha pod proudem dusíku, znovu rozpuštěn v 1 ml 0,1 M HCOOH v MeOH a přes membránové filtry převeden do 1,8 ml vialky a takto byl připraven k následné chromatografické analýze.



**Obr. 13:** Zařízení pro SPE Baker.

#### **3.6.4. Vlastní analýza vzorků a standardů**

Analýza reálných vzorků a standardů vybraných léčiv byla prováděna metodou ultra účinné kapalinové chromatografie s detektorem diodového pole (UHPLC/DAD). Pro stanovení byla použita kolona ZORBAX SB-C18, Rapid Resolution HD (rozměry: 2,1x100 mm) s velikostí částic náplně 1,8  $\mu\text{m}$ . Podmínky metody jsou následující:

Nástřík:	0,5 $\mu\text{l}$
Mobilní fáze:	složka A: 0,01 M HCOOH v Milli Q vodě; složka B: MeOH
Průtok mobilní fáze:	0,25 ml/min
Gradient mobilní fáze:	$t_0 = 10\% \text{ MeOH}$ , $t_{0,2} = 20\% \text{ MeOH}$ , $t_{0,7} = 30\% \text{ MeOH}$ $t_{1,5} = 40\% \text{ MeOH}$ $t_3 = 100\% \text{ MeOH}$
Teplota kolony:	45 $^{\circ}\text{C}$
Vlnová délka detekce:	270 nm
Celková délka analyzy:	4 + 1 minut



**Obr. 14:** *Přístroj Agilent Technologies 1290 Infinity.*



**Obr. 15:** *Kolona ZORBAX SB-C18, Rapid Resolution HD.*

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

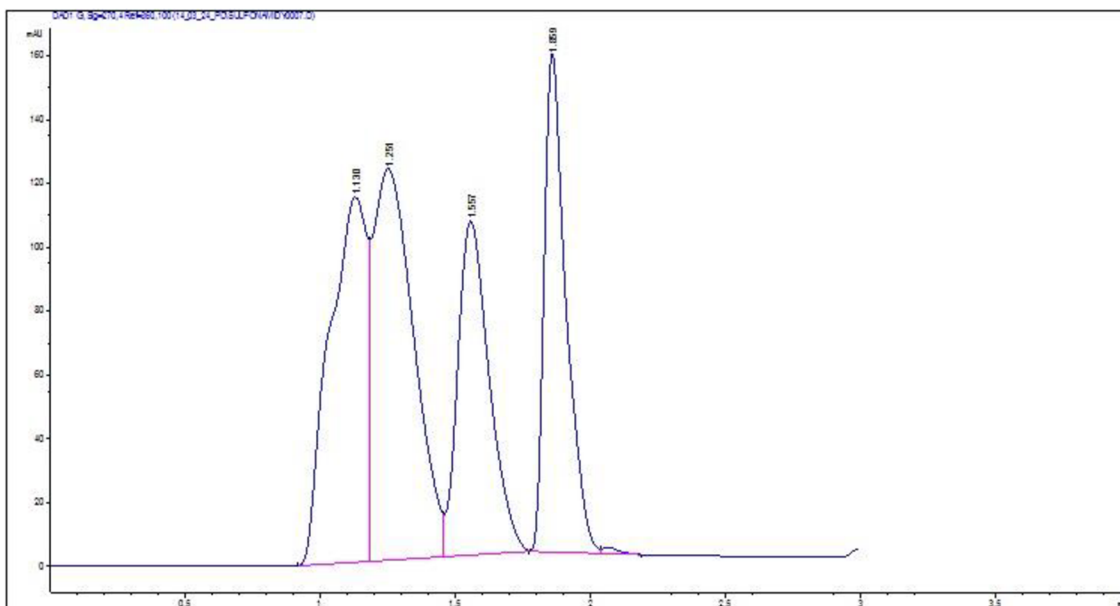
### 4.1. Stanovení podmínek analýzy pomocí UHPLC/DAD

Pro určení vhodných podmínek analýzy na UHPLC/DAD byly použity standardy vybraných sulfonamidových léčiv: STZ, SPY, SMR, SMT a SMX rozpuštěné v 0,1 M HCOOH v MeOH. Koncentrace směšného standardu léčiv použitého pro optimalizaci chromatografické metody byla 100 µg/ml.

Jako výchozí bod optimalizace byla zvolena na našem pracovišti již dříve optimalizovaná metoda pro stanovení sulfonamidových antibiotik pomocí HPLC (uvedena v tab. 4). Metoda byla následně modifikována pouze zvolením kratší doby analýzy (pro analýzu na HPLC byla zvolena doba 3+1 min.). Jak je patrné z chromatogramu (obr. 16), tato metoda se ukázala pro použití na UHPLC jako zcela nevyhovující. V dalším kroku optimalizace byla potom doba analýzy prodloužena na 12 minut, avšak ani v tomto případě nebylo dosaženo dobré separace, píky jednotlivých léčiv nebyly od sebe dostatečně odděleny.

**Tab 4.:** Podmínky analýzy pro stanovení sulfonamidů pomocí HPLC [38].

Nástřik	1 µl
Mobilní fáze	0,01 M HCOOH, MeOH
Průtok mobilní fáze	0,15 ml/min pro C18
Teplota kolony	20 °C
Gradient	t <sub>0</sub> = 30 % MeOH, t <sub>3</sub> = 40 % MeOH, t <sub>6</sub> = 80 % MeOH, t <sub>10</sub> = 100 % MeOH
Vlnová délka	270 nm
Doba analýzy	25 minut



**Obr. 16:** Chromatogram směsi standardů vybraných léčiv STZ, SPY, SMR, SMT a SMX při podmínkách analyzy optimalizované pro HPLC.

Další optimalizace zvolené metody spočívala v úpravách nástřiku, průtoku mobilní fáze, teploty kolony a gradientu. O úpravách těchto parametrů je podrobně pojednáno v následujících kapitolách 4.1.1 – 4.1.6.

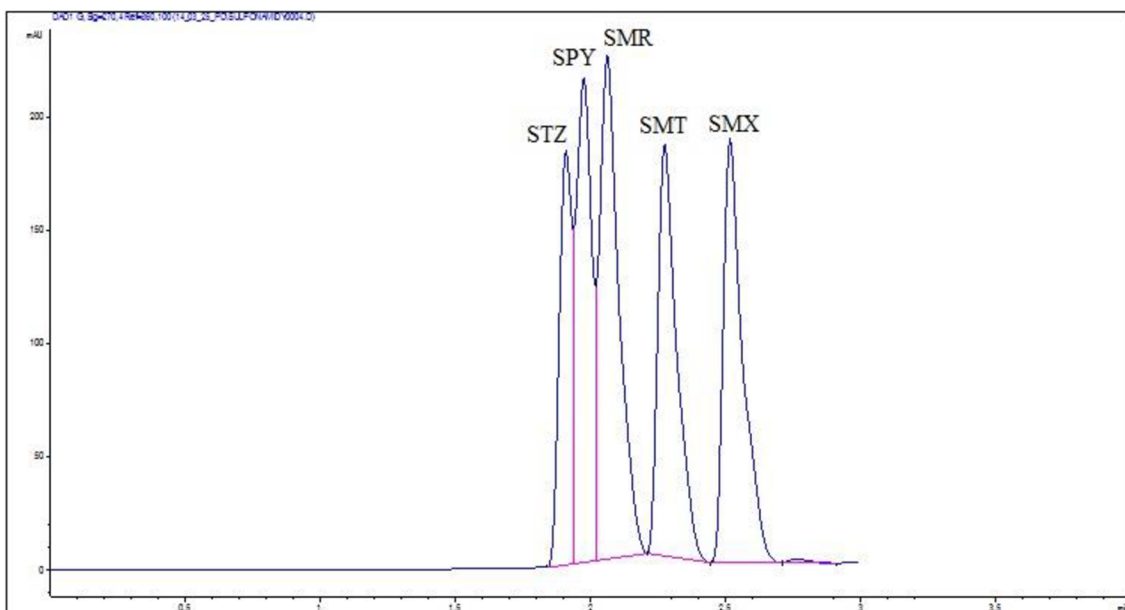
#### 4.1.1. Gradient mobilní fáze

Optimalizace podmínek metody byla prováděna na koloně ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD (rozměry: 2,1x50 mm), 1,8  $\mu\text{m}$ . Největším problémem při optimalizaci bylo oddělení prvních tří píků v chromatogramu (léčiva STZ, SPY a SMR). Proto byl jako první parametr upravován gradient mobilní fáze. V průběhu vývoje metody bylo ověřováno celkem 30 různých gradientů mobilní fáze. Píky prvních tří léčiv byly od sebe odseparovány až v případě, kdy analýza začínala při poměru složek mobilní fáze 90 % 0,01 M HCOOH a 10 % MeOH (obr. 17). Dalšími úpravami gradientu bylo dosaženo poněkud lepšího oddělení píků, avšak stále nedošlo k jejich úplnému rozdělení. V některých případech bylo také nutné prodloužit dobu analýzy až na 5+1 min, neboť léčiva se začala eluovat až ve třetí minutě analýzy (obr. 18). Nejlepší výsledek, kterého bylo dosaženo při úpravách gradientu, je uveden na obr. 19. Při tomto gradientu byly již od sebe odděleny alespoň píky sulfapyridinu a sulfamerazinu. Současně však došlo k deformaci především píku sulfamethazinu. Tento gradient byl potom používán při následujících úpravách metody.

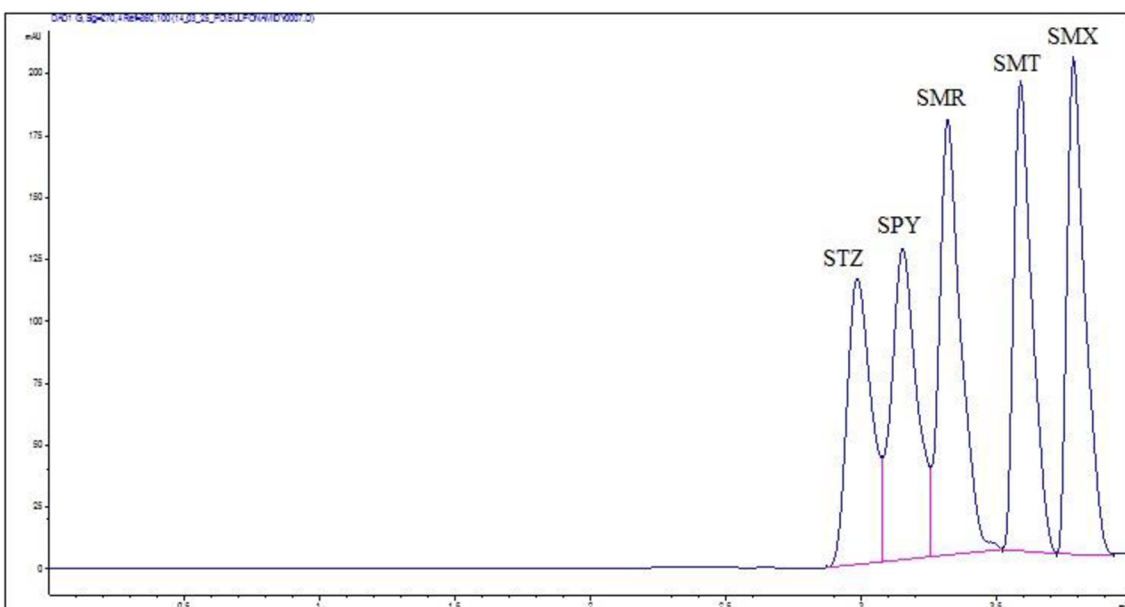
V této fázi optimalizace bylo konstatováno, že pouhou úpravou gradientu mobilní fáze nebylo přesto dosaženo uspokojivého oddělení píků. Jako další parametr, který byl vrácen



optimalizace upravován, byla zvolena teplota kolony; současně však byl snížen nástřik na 0,5  $\mu$ l a průtok mobilní fáze zvýšen na 0,2  $\mu$ l/min.

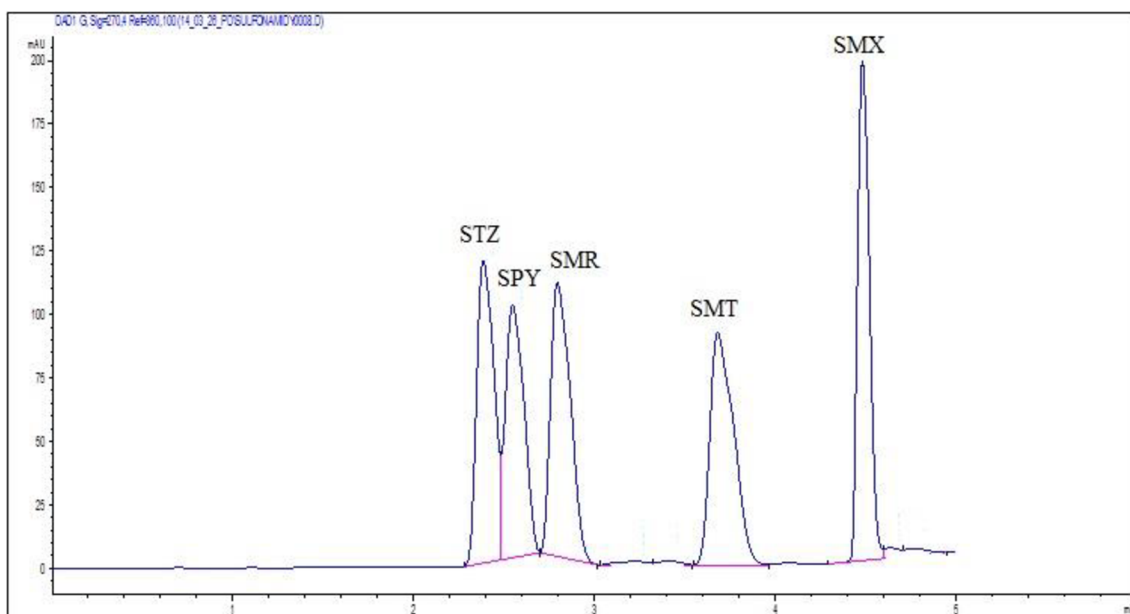


**Obr. 17:** Chromatogram směsi standardů vybraných léčiv, gradient mobilní fáze:  $t_0 = 10\%$  MeOH,  $t_{0,5} = 30\%$  MeOH,  $t_1 = 40\%$  MeOH,  $t_{1,5} = 50\%$  MeOH,  $t_3 = 100\%$  MeOH.



**Obr. 18:** Chromatogram směsi standardů vybraných léčiv, gradient mobilní fáze:  $t_0 = 10\%$  MeOH,  $t_{0,9} = 10\%$  MeOH,  $t_1 = 20\%$  MeOH,  $t_{1,9} = 20\%$  MeOH,  $t_2 = 30\%$  MeOH,  $t_4 = 100\%$  MeOH; doba analýzy: 4+1min.

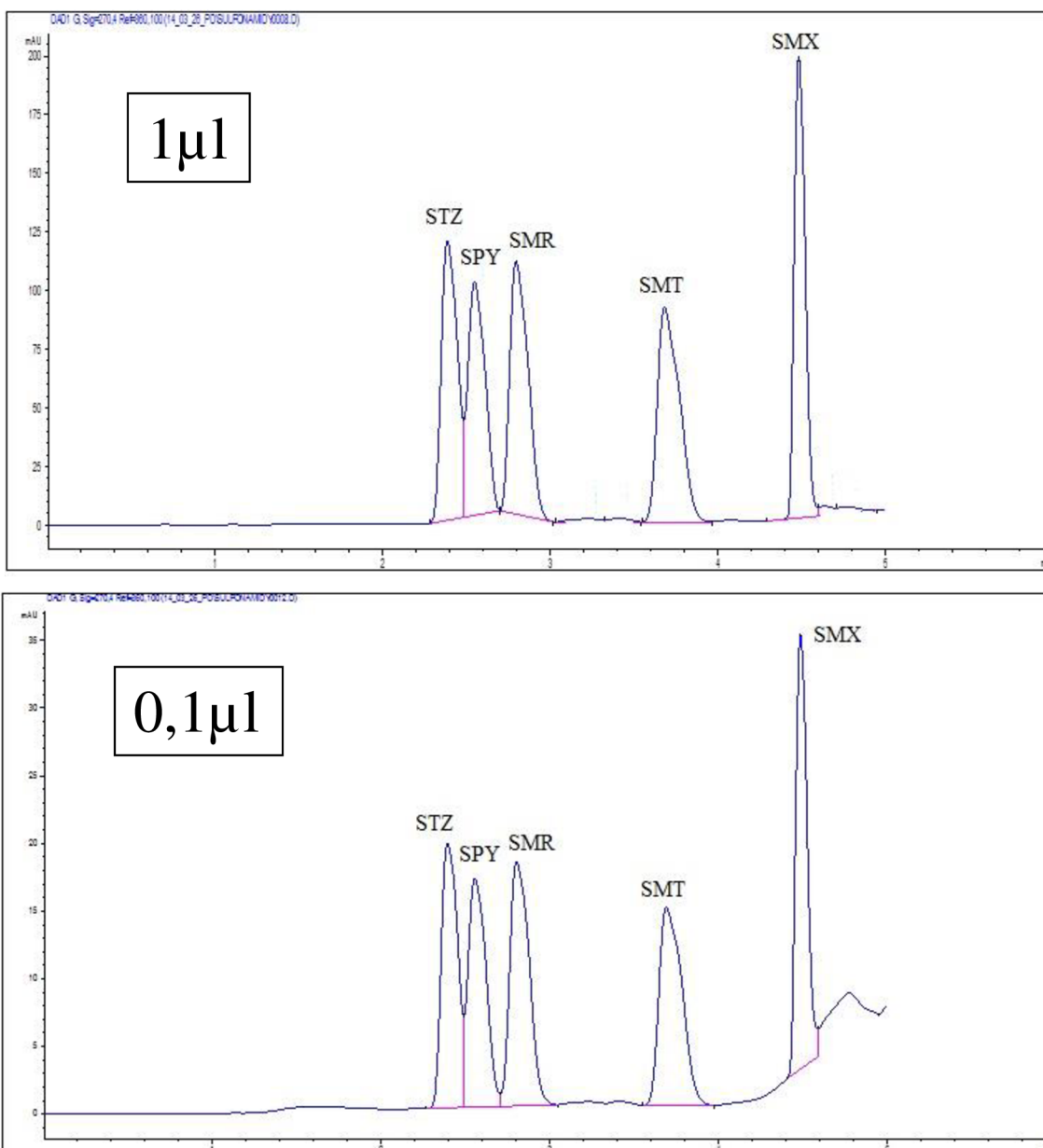




**Obr. 19:** Chromatogram směsi standardů vybraných léčiv, gradient mobilní fáze:  $t_0 = 10\%$  MeOH,  $t_{0,3} = 20\%$  MeOH,  $t_1 = 20\%$  MeOH,  $t_{1,9} = 22\%$  MeOH,  $t_2 = 24\%$  MeOH,  $t_{2,9} = 24\%$  MeOH,  $t_3 = 30\%$  MeOH,  $t_4 = 100\%$  MeOH; doba analýzy: 5+1 min.

#### 4.1.2. Nástřik

Protože se pouhou úpravou gradientu nepodařilo dosáhnout oddělení a ostroty všech píků v chromatogramu, byl nejprve upraven nástřik z původního 1  $\mu\text{l}$  na 0,1  $\mu\text{l}$ . Ukázalo se, že změna nástřiku nemá vliv na oddělení píků a celkový tvar chromatogramu (viz obr. 20). Při dalších úpravách byl nástřik zvýšen na 0,5  $\mu\text{l}$  z důvodu dosažení vyšší odezvy, a dále již tento nástřik nebyl upravován. Dalším parametrem, který byl dále optimalizován, byla teplota kolony.



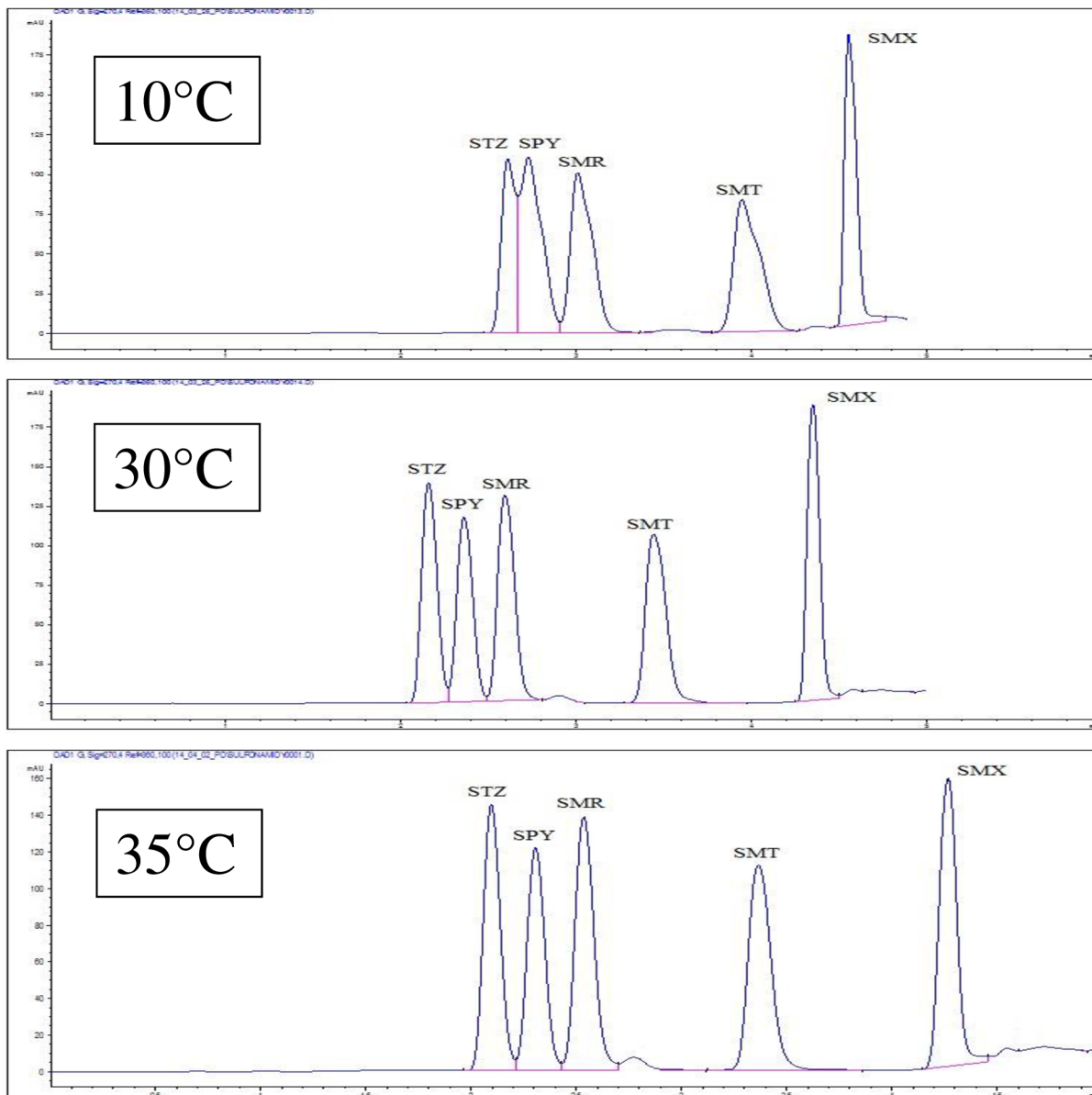
**Obr. 20:** Porovnání chromatogramů směsi léčiv při různém nástřiku, gradient mobilní fáze:  $t_0 = 10\% \text{ MeOH}$ ,  $t_{0,3} = 20\% \text{ MeOH}$ ,  $t_1 = 20\% \text{ MeOH}$ ,  $t_{1,9} = 22\% \text{ MeOH}$ ,  $t_2 = 24\% \text{ MeOH}$ ,  $t_{2,9} = 24\% \text{ MeOH}$ ,  $t_3 = 30\% \text{ MeOH}$ ,  $t_4 = 100\% \text{ MeOH}$ ; doba analýzy: 5+1 min.

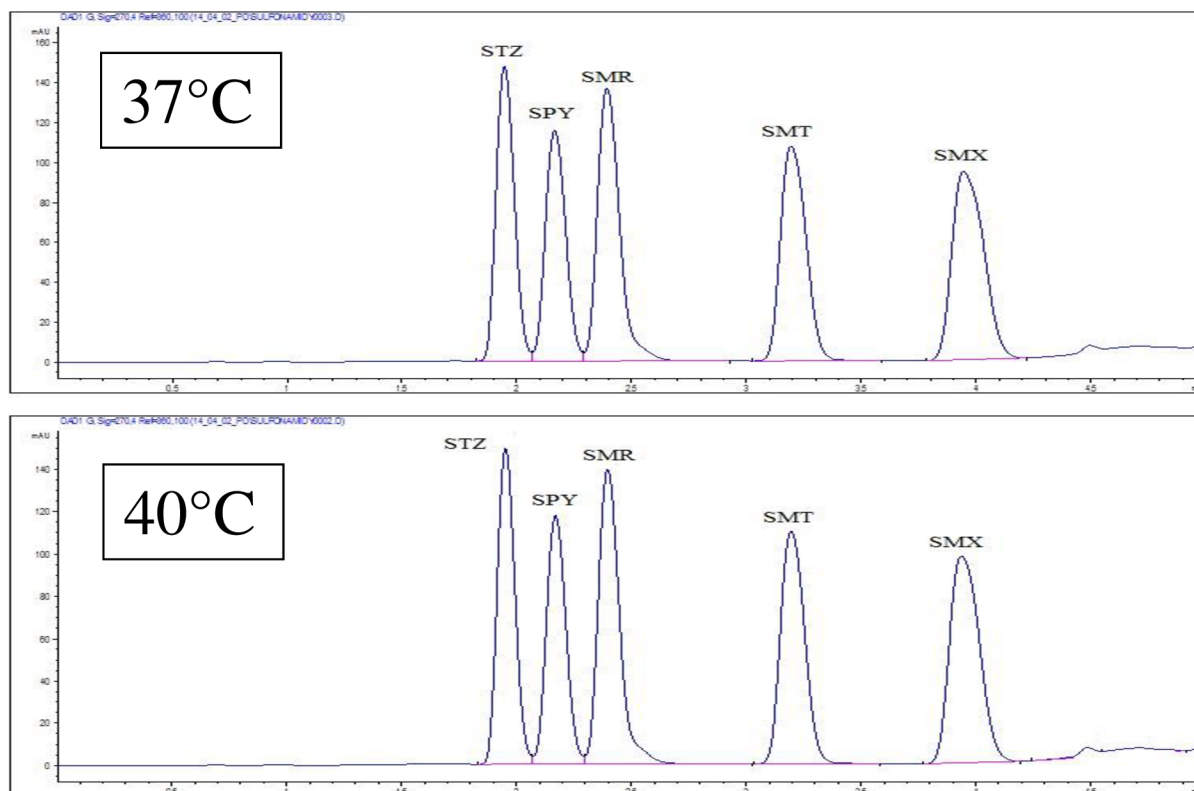
#### 4.1.3. Teplota termostatu kolony

Nejprve byla teplota termostatu kolony snížena z  $20\text{ }^\circ\text{C}$  na  $10\text{ }^\circ\text{C}$ . Snížení teploty se ukázalo být chybnou cestou, výsledkem byly spojené píky sulfathiazolu a sulfapyridinu a zdvojené píky sulfamerazinu a sulfamethazinu. Nadále tedy byla kolona ohřívána postupně na  $30$ ,  $35$ ,  $37$ ,  $40\text{ }^\circ\text{C}$  a  $45\text{ }^\circ\text{C}$ . Maximální pracovní teplota pro použitou kolonu je  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , proto raději nebyla teplota dále zvyšována nad  $45\text{ }^\circ\text{C}$ . Při zvýšení teploty kolony bylo dosaženo

oddělení prvních tří píků léčiv, ale v některých případech píky chvostovaly a docházelo také k rozmytí píků sulfamethazinu a sulfamethoxazolu. Chromatogramy léčiv při teplotách 10 – 40 °C jsou souhrnně zobrazeny na obr. 21.

Při teplotě kolony 45 °C a při současném upravení gradientu a průtoku mobilní fáze (popsáno dále) bylo dosaženo nejlepšího oddělení píků. Píky měly také nejlepší odezvu, byly ostré a úzké. Teplota kolony 45 °C byla tedy přijata jako optimální.





**Obr. 21:** Chromatogramy léčiv při různých teplotách kolony, gradient mobilní fáze:  $t_0 = 10\%$  MeOH,  $t_{0,3} = 20\%$  MeOH,  $t_1 = 20\%$  MeOH,  $t_{1,9} = 22\%$  MeOH,  $t_2 = 24\%$  MeOH,  $t_{2,9} = 24\%$  MeOH,  $t_3 = 30\%$  MeOH,  $t_4 = 100\%$  MeOH; doba analýzy: 5+1min.

#### 4.1.4. Průtok mobilní fáze

V průběhu optimalizace metody byly ověřovány tři hodnoty průtoku mobilní fáze. Počáteční hodnota byla 0,15 ml/min, další potom 0,2 ml/min a konečná 0,25 ml/min.

Při úpravě průtoku mobilní fáze nebyly pozorovány výrazné změny ve vzhledu píků, docházelo však ke změně retenčních časů léčiv. Na základě provedených experimentů lze konstatovat, že čím byl vyšší průtok mobilní fáze, tím dříve se léčiva eluovala (za předpokladu, že další parametry analýzy zůstaly nezměněny). Protože při úpravě gradientu byl jedním z problémů právě pozdní čas retence léčiv, byla jako ideální zvolena hodnota průtoku 0,25 ml/min i přesto, že při tomto průtoku byly píky poněkud rozmytější, než při nižších hodnotách průtoku mobilní fáze (tento problém byl odstraněn dalšími úpravami gradientu).

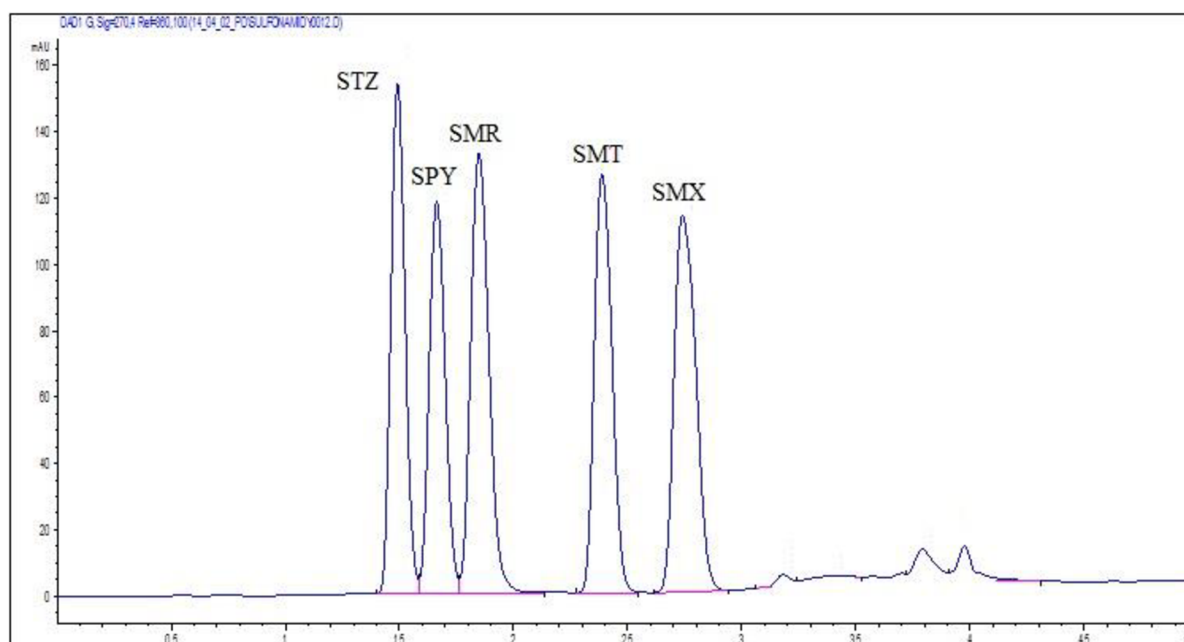
#### 4.1.5. Úprava gradientu při vyšších teplotách kolony

Jak je popsáno v kapitolách 4.1.1 a 4.1.3, samostatnými úpravami gradientu nebo nastavením teploty termostatu kolony nebylo dosaženo ideálního tvaru piků. Proto byly dále ověřovány různé úpravy teploty kolony a gradientu (případně i průtoku mobilní fáze) současně.

Úpravami bylo nakonec dosaženo optimálního výsledku a byl získán postup, který pro naše účely již vyhovoval. Podmínky analýzy jsou uvedeny v tab. 5, příslušný chromatogram je znázorněn na obr. 22. Tyto podmínky byly na několik dní přijaty jako optimalizované.

**Tab 5.:** Podmínky analýzy

Nástřik	0,5 $\mu$ l
Mobilní fáze	0,01 M HCOOH, MeOH
Průtok mobilní fáze	0,25 ml/min
Teplota kolony	45 °C
Gradient	$t_0 = 10\%$ MeOH, $t_{0,3} = 20\%$ MeOH, $t_1 = 20\%$ MeOH, $t_{1,1} = 25\%$ MeOH, $t_{1,9} = 25\%$ MeOH, $t_2 = 30\%$ MeOH, $t_3 = 100\%$ MeOH
Vlnová délka	270 nm
Doba analýzy	4+1 min



**Obr. 22:** Chromatogram vybraných léčiv při podmínkách analýzy uvedených v tab. 5.

#### 4.1.6. Vliv parametrů kolony na separaci analytů

Metoda analýzy byla zpočátku optimalizována na koloně ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD, 2,1x50 mm, 1,8 µm. Následně byla vyzkoušena kolona ZORBAX SB-C18, Rapid Resolution HD (rozměry: 2,1x100 mm) s velikostí částic náplně 1,8 µm. Po výměně kolony bylo nutné ještě upravit gradient mobilní fáze, neboť při použití gradientu uvedeného v tab. 5 byly poslední dva píky v chromatogramu z cca 20% spojené (léčiva SMT a SMX).

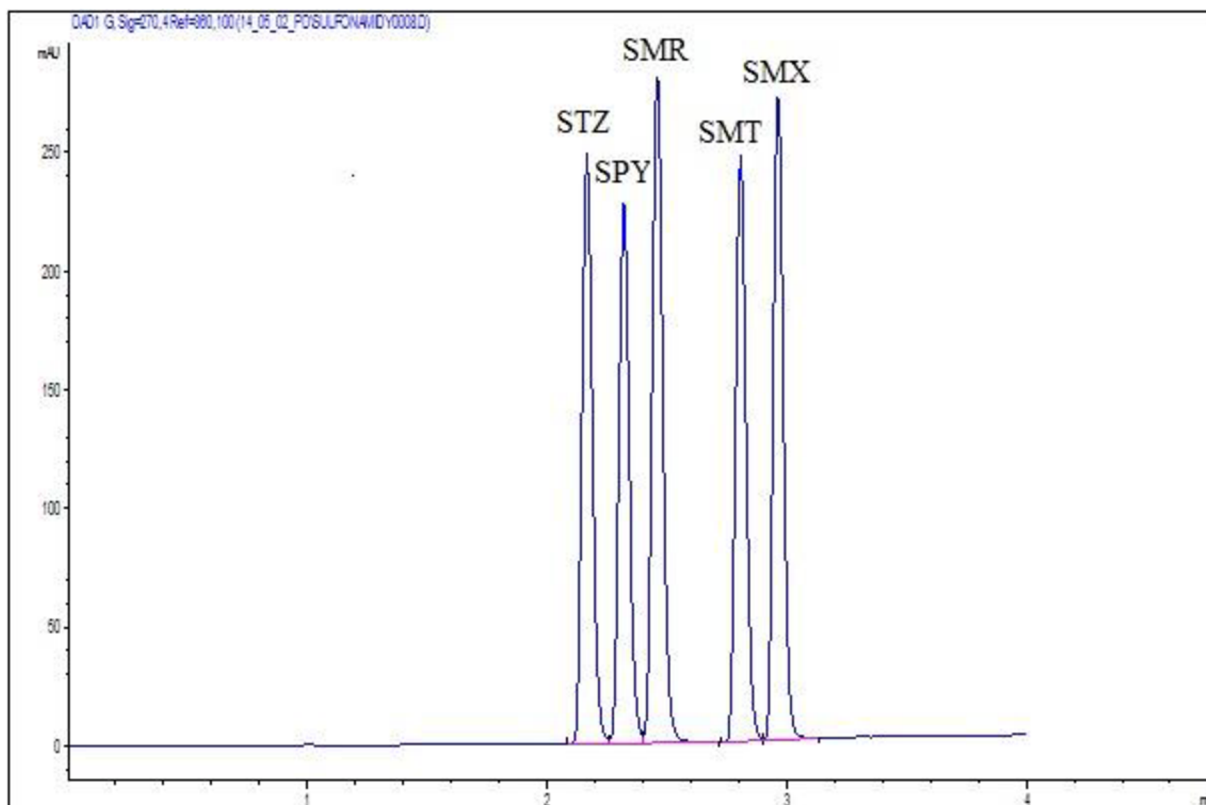
Experimenty, při kterých byla použita delší kolona, přinesly lepší výsledky, než byly získány měřením na původní kratší koloně. Jak vyplývá z porovnání obr. 22 a obr. 23, při měření na delší koloně bylo dosaženo vyšší odezvy. Píky odpovídající jednotlivým léčivům jsou užší, ostřejší a dokonale od sebe oddělené.

#### 4.1.7. Optimalizovaná metoda pro stanovení sulfonamidů pomocí UHPLC

Optimalizované podmínky metody následně používané při analýze sulfonamidových antibiotik pomocí UHPLC/DAD jsou shrnuty do tab. 6. Příslušný výsledný chromatogram je prezentován na obr. 23 a retenční časy vybraných léčiv jsou uvedeny v tab. 7.

**Tab 6.:** *Optimalizované podmínky analýzy pro stanovení sulfonamidů pomocí UHPLC.*

Nástřik	0,5 µl
Mobilní fáze	0,01 M HCOOH, MeOH
Průtok mobilní fáze	0,25 ml/min
Teplota kolony	45 °C
Gradient	t <sub>0</sub> = 10 % MeOH, t <sub>0,2</sub> = 20 % MeOH, t <sub>0,7</sub> = 30 % MeOH, t <sub>1,5</sub> = 40 % MeOH, t <sub>3</sub> = 100 % MeOH
Vlnová délka	270 nm
Doba analýzy	4+1 min



**Obr. 23:** Chromatogram směsi vybraných léčiv při optimálních podmínkách analýzy.

**Tab 7.:** Retenční časy vybraných léčiv při optimálních podmínkách analýzy.

Léčivo	STZ	SPY	SMR	SMT	SMX
Retenční čas [min]	<b>2,16</b>	<b>2,32</b>	<b>2,46</b>	<b>2,80</b>	<b>2,96</b>

## 4.2. Optimalizace extrakce tuhou fází

Optimalizace metody extrakce tuhou fází spočívala převážně ve stanovení ideálního množství vzorku použitého pro extrakci. Na základě informací získaných z literatury lze předpokládat, že pokud by byla vybraná sulfonamidová léčiva v odpadní vodě přítomná, jejich koncentrace by byly velmi nízké. Vzhledem k relativně vysokým mezím detekce a stanovitelnosti u detektoru diodového pole (v porovnání s hmotnostním spektrometrem), bylo žádoucí optimalizovat metodu pro co největší objem dávkovaného vzorku, respektive bylo třeba zjistit takový objem dávkovaného vzorku, při kterém by bylo dosaženo co nejvyšší výtěžnosti i při nízkých koncentracích.

Pro optimalizaci byly použity standardy vybraných sulfonamidových léčiv: STZ, SPY, SMR, SMT a SMX rozpuštěné v 0,1 M HCOOH v MeOH. Koncentrace použitého směšného

standardu léčiv byla 100 µg/ml. Na základě literární rešerše byly jako vhodné kolonky pro extrakci sulfonamidů zvoleny ENVI-18 SPE Tubes, objem 6 ml, 1 g sorbentu [38]. V rámci optimalizace podmínek bylo vyzkoušeno celkem 9 různých kombinací objemů vzorku a koncentrací léčiv při dvou různých modifikacích metody.

**Tab 8.: Výchovní podmínky při SPE.**

Typ SPE kolonky	ENVI-18 SPE Tubes 6 ml/1 g
Kondicionace kolonky	2 ml 0,1 M HCOOH v MeOH 2 ml 5% MeOH
Aplikace vzorku	200, 500 ml
Sušení proudem vzduchu	10 minut
Promytí sorbentu	2 ml 5% MeOH
Eluce analytu	4 ml 0,1 M HCOOH v MeOH

Nejprve byla ověřována optimalizovaná metoda extrakce pro stanovení léčiv ze sedimentů a čistírenských kalů (uvedena v tab. 8). V první řadě bylo dávkováno 500 ml vzorku při koncentraci standardů 50 µg/ml a dále byl použit objem 200 ml při koncentracích standardů 50 a 30 µg/ml. Ve všech případech bylo dosaženo velmi rozdílných výtěžností léčiv. Při dávkování 500 ml vzorku měl uspokojivou výtěžnost pouze sulfamethazol (65,38 %), výtěžnost ostatních léčiv se pohybovala v rozmezí 3 – 30 %. V obou dalších případech byly výtěžnosti léčiv sice vyšší, avšak ještě stále nevyhovující, protože se pohybovaly v rozmezí 3 – 144 %. Z tohoto důvodu byl tento postup posouzen jako nevhodný. Průměrné výtěžnosti léčiv za těchto podmínek jsou uvedeny v tab. 9.

**Tab 9.: Průměrné výtěžnosti léčiv při výchovní metodě SPE [%].**

Objem vzorku	500 ml	200 ml	
Původní koncentrace	50 µg/ml	50 µg/ml	30 µg/ml
<b>STZ [%]</b>	8,87	19,65	27,51
<b>SPY [%]</b>	29,19	75,35	84,73
<b>SMR [%]</b>	8,66	19,81	26,66
<b>SMT [%]</b>	65,38	133,30	144,12
<b>SMX [%]</b>	3,74	3,08	3,87



Při optimalizaci bylo rovněž uvažováno, že se léčiva mohla částečně vyeluovat již při přečišťování. Na základě této úvahy byla zachycena a proměřena přečišťovací frakce extrakce (2 ml 5% MeOH). Bylo prokázáno, že léčiva se během přečišťování neeluovala.

Byla zvolena další modifikace metody, která spočívala v okyselení vzorku kyselinou mravenčí na pH 3. Jako první byl dávkován menší objem vzorku (200 ml), přičemž koncentrace léčiv byla vysoká (50 µg/ml). Po okyselení bylo dosaženo mnohem lepších výtěžností léčiv (65 – 143 %). Následně byly při ověřování této metody použity větší objemy vzorku a nižší koncentrace léčiv. Výsledky, kterých bylo experimenty dosaženo, jsou prezentovány v tab. 10.

**Tab 10.:** *Průměrné výtěžnosti léčiv při okyselení vzorku na pH 3 [%].*

Objem vzorku	200 ml		250 ml		300 ml	500 ml
	50 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml
<b>STZ [%]</b>	65,69	78,98	63,43	69,96	45,61	34,51
<b>SPY [%]</b>	84,63	94,74	74,29	83,39	52,94	41,53
<b>SMR [%]</b>	101,24	101,43	79,40	89,98	64,70	51,69
<b>SMT [%]</b>	143,35	104,97	93,59	86,48	69,51	91,42
<b>SMX [%]</b>	100,81	100,74	94,39	92,67	81,80	87,21

Bylo provedeno vyhodnocení dosažených výsledků. Za optimální objem dávkovaného vzorku odpadní vody byl určen objem 250 ml. Při vyšším objemu vzorku již docházelo ke snížení výtěžností stanovovaných léčiv. Při objemu 200 ml vzorku bylo sice dosaženo vyšších výtěžností než při 250 ml, avšak za předpokladu velmi nízkých koncentrací léčiv v reálných vzorcích bylo přijatelnější zvolit k nadávkování raději větší objem vzorku.

Zvolené optimální podmínky extrakce tuhou fází jsou uvedeny v tab. 11.

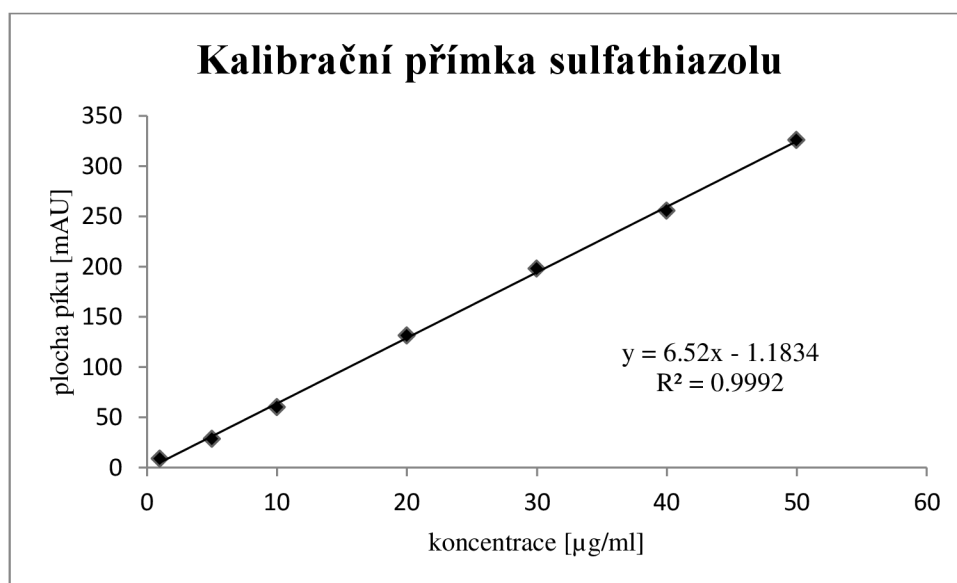
**Tab 11.:** *Optimální podmínky SPE pro stanovení sulfonamidů v odpadní vodě.*

Typ SPE kolonky	ENVI-18 SPE Tubes 6 ml/1 g
Kondicionace kolonky	2 ml 0,1 M HCOOH v MeOH 2 ml 5% MeOH
Aplikace vzorku	250 ml, okyseleno HCOOH na pH 3
Sušení proudem vzduchu	10 minut
Promytí sorbentu	2 ml 5% MeOH
Eluce analytu	4 ml 0,1 M HCOOH v MeOH

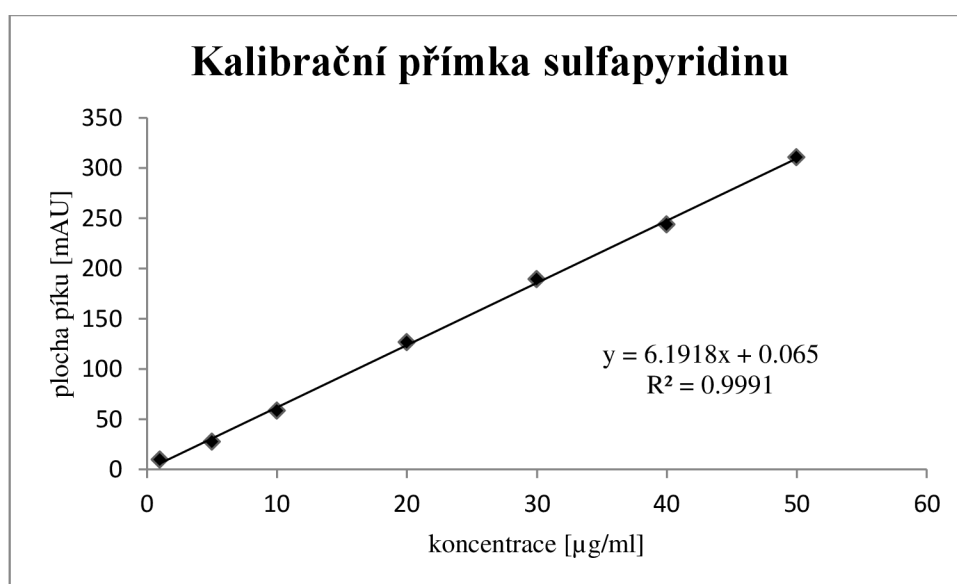
### 4.3. Vyhodnocení a kvantifikace sledovaných léčiv

Pro vyhodnocení výtěžnosti léčiv při optimalizaci SPE extrakce a pro následné stanovení léčiv v reálných vzorcích byly sestrojeny kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci léčiva. Kalibrační roztoky o koncentracích 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 a 50,0  $\mu\text{g/ml}$  byly připraveny ředěním pracovního roztoku popsaného v kapitole 3.6.1. Grafy 1 – 5 znázorňují kalibrační závislosti, rovnice regrese a regresní koeficient  $R^2$  pro každé léčivo.

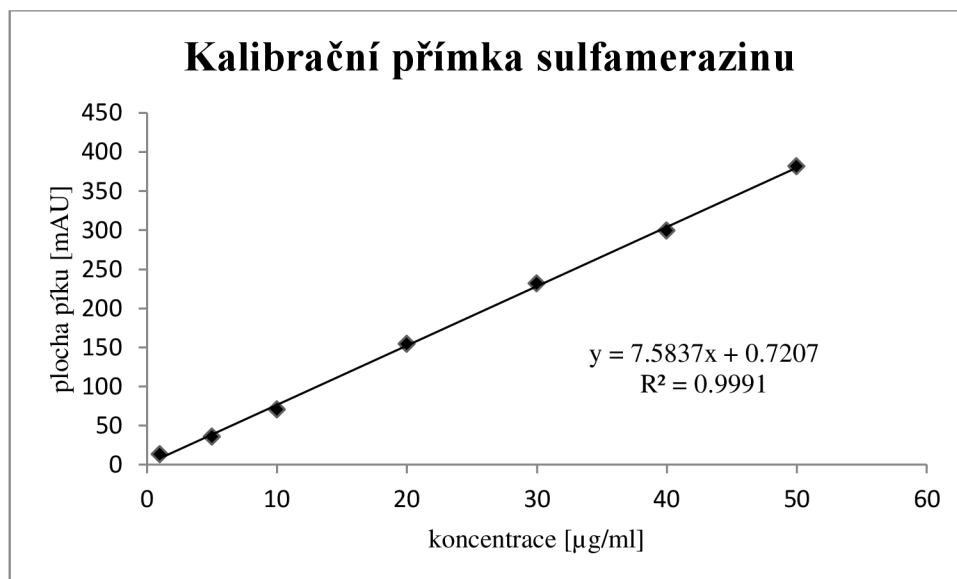
**Graf 1:** Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci pro léčivo sulfathiazol.



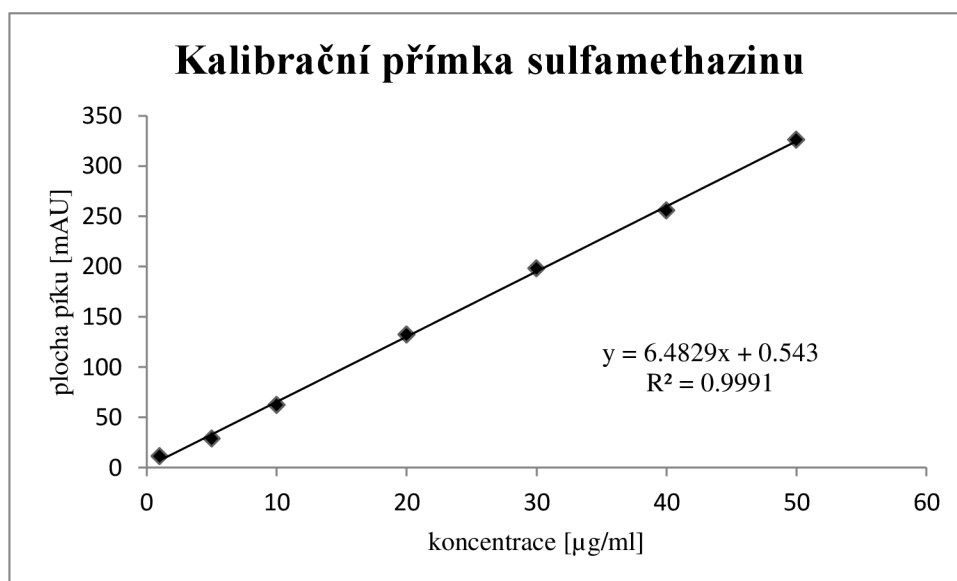
**Graf 2:** Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci pro léčivo sulfapyridin.



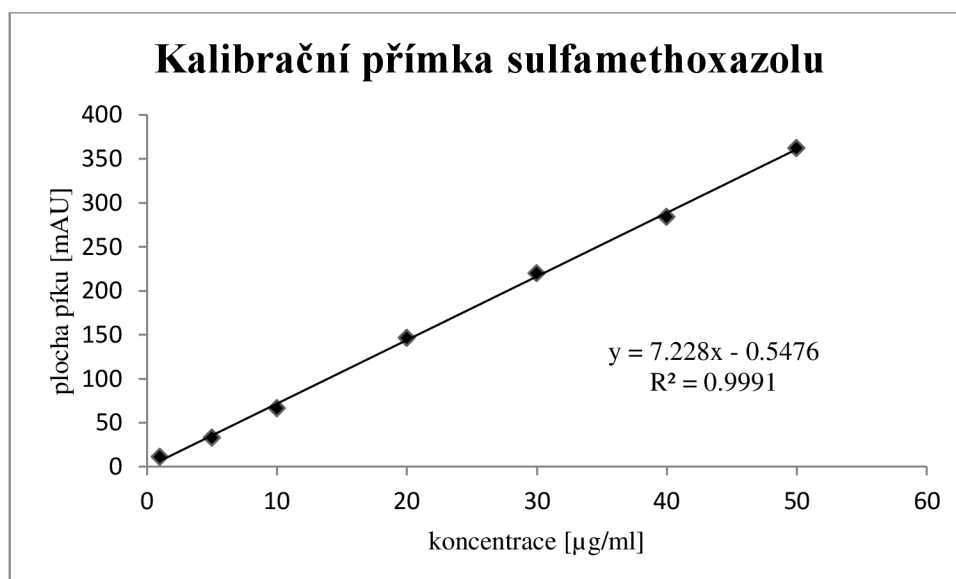
**Graf 3:** Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci pro léčivo sulfamerazin.



**Graf 4:** Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci pro léčivo sulfamethazin.



**Graf 5:** Kalibrační závislost plochy píku na koncentraci pro léčivo sulfamethoxazol.



Dále byla vypočtena mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) každého léčiva podle vztahů (1) a (2). Pro výpočet těchto veličin byla nejprve odečtena výška píku každého léčiva z nejnižšího bodu kalibrace ( $S$ ) a následně bylo vybráno 15 píků ze šumu základní linie (jejich průměr =  $N$ ). Vypočtené meze jsou uvedeny v tab. 12.

$$LOD = \frac{3 \cdot c}{\frac{S}{N}}, \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot c}{\frac{S}{N}}, \quad (2)$$

Byla vypočtena rovněž směrodatná odchylka pomocí funkce SMODCH v programu Microsoft Excel a relativní směrodatná odchylka podle vztahu (3):

$$S_r = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100\%, \quad (3)$$

kde  $S$  je směrodatná odchylka a  $\bar{x}$  je aritmetický průměr hodnot výtěžností léčiva. Hodnoty směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky pro vybraná léčiva jsou uvedeny v tab. 13.

**Tab 12.:** *Mez detekce a mez stanovitelnosti vybraných léčiv.*

Léčivo	LOD [ $\mu\text{g/l}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/l}$ ]
STZ	1,098	3,660
SPY	1,168	3,892
SMR	0,9460	3,153
SMT	1,068	3,562
SMX	1,014	3,380

**Tab 13.:** *Směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka vybraných léčiv.*

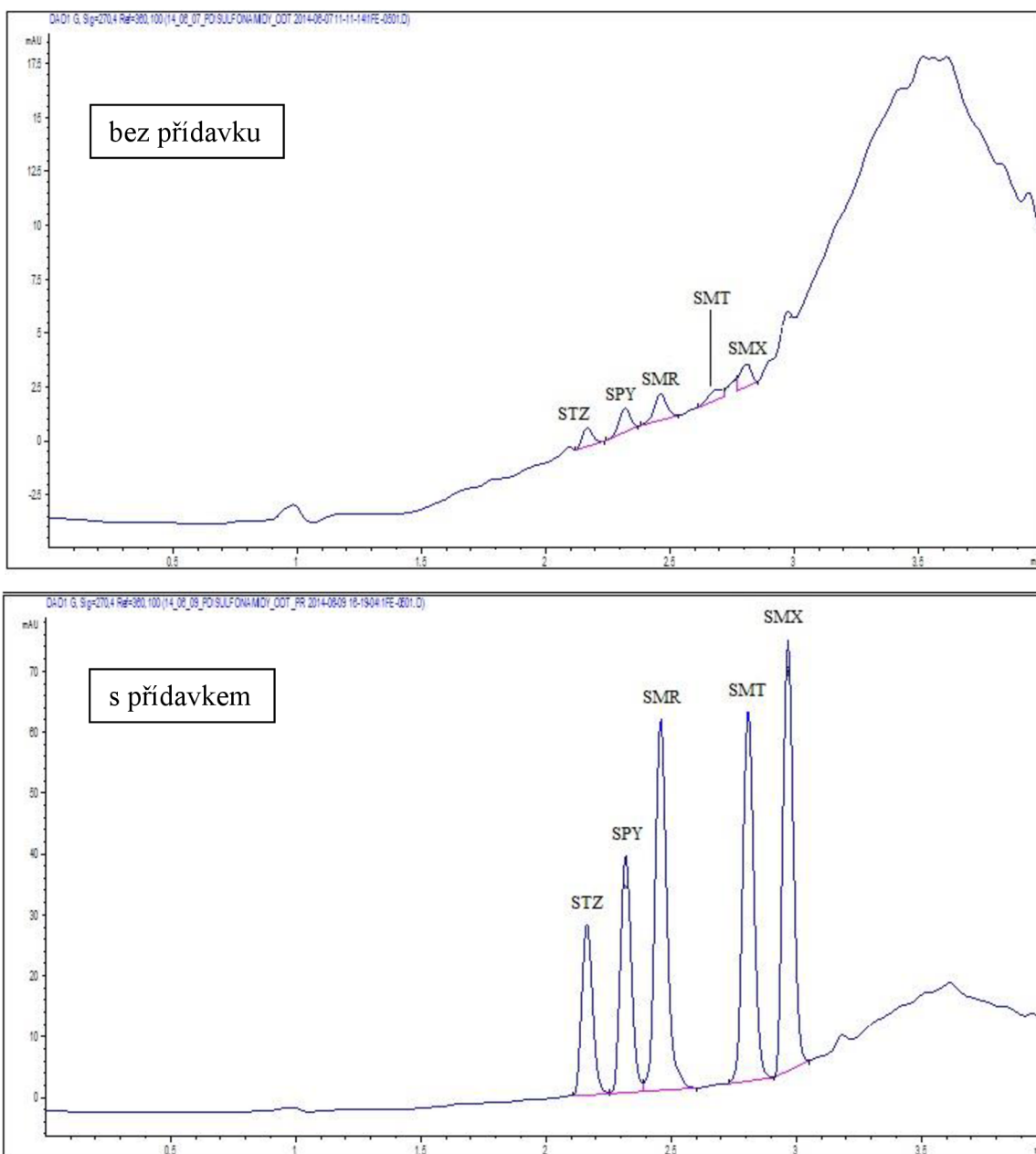
Léčivo	S [ $\mu\text{g/ml}$ ]	S <sub>r</sub> [%]
STZ	0,3517	1,91
SPY	1,222	5,65
SMR	1,045	4,51
SMT	1,760	6,39
SMX	1,914	6,87

#### 4.4. Reálné vzorky

Byla sledována léčiva ve vzorcích odpadní vody z čistíren odpadních vod s různými technologiemi čištění. Směsné 24 hodinové vzorky byly odebírány vždy na přítoku i na odtoku z čistírny odpadních vod, aby mohla být zhodnocena účinnost čisticích procesů dané ČOV. Vzorky odpadní vody byly nejprve filtrovány podle postupu uvedeného v kapitole 3.6.3.1 a dále zpracovány pomocí optimalizované SPE metody uvedené v kap. 3.6.3.2. Léčiva byla následně stanovována pomocí optimalizované metody pro UHPLC/DAD (kap. 3.6.4.).

V první sérii vzorků odebraných dne 5. 6. 2014 byla léčiva nejprve stanovována přímo. Ve všech případech se koncentrace všech léčiv nacházela pod mezemi detekce a kvantifikace metody. Z toho důvodu byl do všech vzorků z 5. 6. 2014 i do všech následujících přidán standardní přídavek tak, aby jeho vý sledná koncentrace vupraveném vzorku byla 30  $\mu\text{g/ml}$ . Na obr. 24 jsou pro porovnání zobrazeny chromatogramy léčiv ve vzorku bez standardního přídávku a se standardním přídávkem.

Protože byl standardní přídavek dávkován do nezpracovaného vzorku (před úpravou SPE), bylo třeba do výpočtů reálné koncentrace léčiv ve vzorcích zahrnout vliv matrice.



**Obr. 24:** Porovnání chromatogramů stanovených léčiv bez standardního přídavku a se standardním přídavkem. Lednice, odtok, 5. 6. 2014.

#### 4.4.1. Vliv matrice

Vliv matrice na léčiva ve vzorku byl zjišťován výpočtem matričního efektu. Matriční efekt byl vypočítán podle vztahu (4) [38], tj. porovnáním plochy píku léčiva u reálného vzorku (ovlivněno maticí) s plochou píku léčiva z modelového vzorku.

$$\%ME = \frac{\text{plocha píku v reálném vzorku}}{\text{plocha píku v modelovém vzorku}} \cdot 100\% \quad (4)$$

Jak již bylo uvedeno výše, koncentrace léčiv přidaná do reálného vzorku vody činila vždy 30 µg/ml. Stejná koncentrace byla přidána i do modelového vzorku vody. Pokud je hodnota ME rovna 100 %, znamená to, že nebyl zjištěn žádný matriční efekt.

V tab. 14 jsou uvedeny průměrné matriční efekty vypočítané pro vybraná léčiva. Jak je z tabulky patrné, byl zjištěn rozdílný vliv matrice na přítoku a na odtoku z ČOV. Na přítoku byl zjištěn nízký vliv matrice u sulfapyridinu, střední vliv matrice u sulfamerazinu a sulfamethazinu a vysoký vliv usulfathiazolu a sulfamethoxazolu. Na odtoku byl zjištěn střední vliv matrice u sulfamerazinu, sulfamethazinu a sulfamethoxazolu, vysoký vliv pak u sulfathiazolu a sulfapyridinu.

**Tab 14.:** Průměrné hodnoty ME pro stanovovaná léčiva.

Léčivo	přítok	odtok
STZ	31,72	43,02
SPY	88,10	52,76
SMR	61,87	76,43
SMT	74,58	70,81
SMX	52,52	63,19

#### 4.4.2. Kvantifikace léčiv v reálných vzorcích

Koncentrace jednotlivých léčiv ve vzorcích odpadní vody byly stanoveny pomocí kalibračních závislostí plochy píku na koncentraci léčiva uvedených v kapitole 4.3. Při kvantifikaci léčiv byl do výpočtů zahrnut stanovený vliv matrice. Hodnoty reálných koncentrací léčiv byly získány z rozdílu koncentrace léčiva v reálném vzorku se standardním přídatkem a koncentrace léčiva v modelovém vzorku. Koncentrace léčiv v tomto modelovém vzorku byla stejná, jako byla koncentrace standardního přídatku v reálných vzorcích.

#### 4.4.3. ČOV Podivín

Vzorky odpadní vody z ČOV Podivín (přítok a odtok) byly odebrány 7. 7. 2014. Stanovené koncentrace léčiv ve vzorcích odpadní vody jsou uvedeny v tab. 15. Tabulka obsahuje tři paralelní stanovení koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. Koncentrace léčiv na přítoku se pohybovaly přibližně v rozmezí 0,40 – 0,90 µg/l, koncentrace léčiv na odtoku byla v rozmezí 0,36 – 0,74 µg/l. V následující tabulce 16 je zhodnocena účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV vyjádřená v µg/l a v %.

**Tab 15.:** *Koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Podivín.*

Léčivo	Přítok				Odtok			
	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>3</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>3</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]
<b>STZ</b>	0,8434	0,8958	0,7956	<b>0,8449</b>	0,5901	0,5407	0,7382	<b>0,6230</b>
<b>SPY</b>	0,6095	0,6093	0,6098	<b>0,6095</b>	0,6073	0,6090	0,6011	<b>0,6058</b>
<b>SMR</b>	0,5198	0,5199	0,5213	<b>0,5203</b>	0,5242	0,5244	0,5230	<b>0,5239</b>
<b>SMT</b>	0,5137	0,5137	0,5136	<b>0,5137</b>	0,5134	0,5135	0,5138	<b>0,5136</b>
<b>SMX</b>	0,4121	0,4097	0,3963	<b>0,4060</b>	0,3564	0,3642	0,3853	<b>0,3686</b>

**Tab 16.:** *Účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV Podivín.*

Léčivo	Průměrná koncentrace [µg/l]		Odstraněno [µg/l]	Odstraněno [%]
	přítok	odtok		
<b>STZ</b>	0,8449	0,6230	0,2219	26,26
<b>SPY</b>	0,6095	0,6058	0,0037	0,61
<b>SMR</b>	0,5203	0,5239	-	-
<b>SMT</b>	0,5137	0,5136	-	-
<b>SMX</b>	0,4060	0,3686	0,0374	9,21

#### 4.4.4. ČOV Pohořelice

Vzorky odpadní vody z ČOV Pohořelice (přítok a odtok) byly odebrány 5. 6. 2014. Stanovené koncentrace léčiv ve vzorcích odpadní vody jsou uvedeny v tab. 17. Tabulka obsahuje tři paralelní stanovení koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. Koncentrace léčiv na přítoku se pohybovaly přibližně v rozmezí 0,36 – 0,74 µg/l, koncentrace léčiv na odtoku v rozmezí 0,36 – 0,61 µg/l. V tabulce 18 je zhodnocena účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV vyjádřená v µg/l a v %.



**Tab 17.:** *Koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Pohořelice, odběr 5. 6. 2014*

Léčivo	Přítok			Odtok		
	c <sub>1</sub> [μg/l]	c <sub>2</sub> [μg/l]	c <sub>průměr</sub> [μg/l]	c <sub>1</sub> [μg/l]	c <sub>2</sub> [μg/l]	c <sub>průměr</sub> [μg/l]
<b>STZ</b>	0,7355	0,7416	<b>0,7386</b>	0,5901	0,5407	<b>0,5654</b>
<b>SPY</b>	0,6105	0,6106	<b>0,6105</b>	0,6073	0,6090	<b>0,6082</b>
<b>SMR</b>	0,5205	0,5209	<b>0,5207</b>	0,5242	0,5244	<b>0,5243</b>
<b>SMT</b>	0,5135	0,5135	<b>0,5135</b>	0,5134	0,5135	<b>0,5135</b>
<b>SMX</b>	0,3624	0,3769	<b>0,3696</b>	0,3564	0,3642	<b>0,3603</b>

**Tab 18.:** *Účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV Pohořelice u vzorků odebraných 5.6. 2014.*

Léčivo	Průměrná koncentrace [μg/l]		Odstraněno [μg/l]	Odstraněno [%]
	přítok	odtok		
<b>STZ</b>	0,7386	0,5654	0,1731	23,44
<b>SPY</b>	0,6105	0,6082	0,0024	0,39
<b>SMR</b>	0,5207	0,5243	-	-
<b>SMT</b>	0,5135	0,5135	-	-
<b>SMX</b>	0,3696	0,3603	0,0094	2,53

#### 4.4.5. ČOV Hustopeče

Vzorky odpadní vody z ČOV Hustopeče odebírané na přítoku a na odtoku byly vzorkovány 7. 7. 2014. Stanovené koncentrace léčiv ve vzorcích odpadní vody jsou uvedeny v tab. 19. Tabulka obsahuje tři paralelní stanovení koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. Koncentrace léčiv na přítoku se pohybovaly přibližně v rozmezí 0,43 – 0,82 μg/l, koncentrace léčiv na odtoku v rozmezí 0,38 – 0,61 μg/l. V tabulce 20 je zhodnocena účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV vyjádřená v μg/l a v %.

**Tab 19.:** *Koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Hustopeče.*

Léčivo	Přítok				Odtok			
	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>3</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>3</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]
<b>STZ</b>	0,8192	0,8051	0,8120	<b>0,8121</b>	0,6101	0,6027	0,5614	<b>0,5914</b>
<b>SPY</b>	0,6086	0,6087	0,6083	<b>0,6085</b>	0,6067	0,6069	0,6082	<b>0,6073</b>
<b>SMR</b>	0,5190	0,5201	0,5196	<b>0,5195</b>	0,5232	0,5233	0,5238	<b>0,5234</b>
<b>SMT</b>	0,5137	0,5137	0,5137	<b>0,5137</b>	0,5136	0,5135	0,5135	<b>0,5135</b>
<b>SMX</b>	0,4305	0,4357	0,4357	<b>0,4339</b>	0,3878	0,3970	0,3831	<b>0,3893</b>

**Tab 20.:** *Účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV Hustopeče.*

Léčivo	Průměrná koncentrace [µg/l]		Odstraněno [µg/l]	Odstraněno [%]
	přítok	odtok		
<b>STZ</b>	0,8121	0,5914	0,2207	27,18
<b>SPY</b>	0,6085	0,6073	0,0013	0,21
<b>SMR</b>	0,5195	0,5234	-	-
<b>SMT</b>	0,5137	0,5135	-	-
<b>SMX</b>	0,4339	0,3893	0,0446	10,28

#### 4.4.6. ČOV Valtice

Byly měřeny dvě série vzorků odpadní vody z ČOV Valtice. První série vzorků byla odebrána 5. 6. 2014, druhá série 7. 7. 2014. Vzorky byly odebírány na přítoku a na odtoku z ČOV. Stanovené koncentrace léčiv ve vzorcích jsou uvedeny v tab. 21 a 22. Tabulky obsahují vždy dvě nebo tři paralelní stanovení koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. Koncentrace léčiv na přítoku se pohybovaly v rozmezí 0,35 – 0,76 µg/l, koncentrace léčiv na odtoku v rozmezí 0,38 – 0,67 µg/l. V tabulkách 23 a 24 je zhodnocena účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV vyjádřená v µg/l a v %.

**Tab 21.:** *Koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Valtice, odběr 5. 6. 2014*

Léčivo	Přítok			Odtok		
	c <sub>1</sub> [μg/l]	c <sub>2</sub> [μg/l]	c <sub>průměr</sub> [μg/l]	c <sub>1</sub> [μg/l]	c <sub>2</sub> [μg/l]	c <sub>průměr</sub> [μg/l]
<b>STZ</b>	0,7229	0,7100	<b>0,7165</b>	0,5932	0,5843	<b>0,5888</b>
<b>SPY</b>	0,6087	0,6082	<b>0,6084</b>	0,6082	0,6083	<b>0,6083</b>
<b>SMR</b>	0,5205	0,5208	<b>0,5207</b>	0,5240	0,5243	<b>0,5241</b>
<b>SMT</b>	0,5135	0,5135	<b>0,5135</b>	0,5134	0,5133	<b>0,5134</b>
<b>SMX</b>	0,3884	0,3924	<b>0,3904</b>	0,4159	0,3842	<b>0,4000</b>

**Tab 22.:** *Koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Valtice, odběr 7. 7. 2014.*

Léčivo	Přítok				Odtok		
	c <sub>1</sub> [μg/l]	c <sub>2</sub> [μg/l]	c <sub>3</sub> [μg/l]	c <sub>průměr</sub> [μg/l]	c <sub>1</sub> [μg/l]	c <sub>2</sub> [μg/l]	c <sub>průměr</sub> [μg/l]
<b>STZ</b>	0,7291	0,6189	0,7551	<b>0,7010</b>	0,6724	0,6508	<b>0,6616</b>
<b>SPY</b>	0,6073	0,6100	0,6069	<b>0,6081</b>	0,6031	0,6048	<b>0,6039</b>
<b>SMR</b>	0,5211	0,5237	0,5212	<b>0,5220</b>	0,5224	0,5231	<b>0,5227</b>
<b>SMT</b>	0,5137	0,5133	0,5138	<b>0,5136</b>	0,5138	0,5137	<b>0,5137</b>
<b>SMX</b>	0,3680	0,3511	0,3666	<b>0,3619</b>	0,3809	0,3756	<b>0,3783</b>

**Tab 23.:** *Účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV Valtice u vzorků odebraných 5. 6. 2014.*

Léčivo	Průměrná koncentrace [μg/l]		Odstraněno [μg/l]	Odstraněno [%]
	přítok	odtok		
<b>STZ</b>	0,7165	0,5888	0,1277	17,82
<b>SPY</b>	0,6084	0,6083	-	-
<b>SMR</b>	0,5207	0,5241	-	-
<b>SMT</b>	0,5135	0,5134	-	-
<b>SMX</b>	0,3904	0,4000	-	-

**Tab 24.:** Účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV Valtice u vzorků odebraných 7. 7. 2014.

Léčivo	Průměrná koncentrace [µg/l]		Odstraněno [µg/l]	Odstraněno [%]
	přítok	odtok		
STZ	0,7010	0,6616	0,0395	5,63
SPY	0,6081	0,6039	0,0041	0,68
SMR	0,5220	0,5227	-	-
SMT	0,5136	0,5137	-	-
SMX	0,3619	0,3783	-	-

#### 4.4.7. ČOV Lednice

Z ČOV Lednice byly opět odebrány a hodnoceny dvě série vzorků odpadní vody. První série vzorků byla odebrána 5. 6. 2014, druhá série 7. 7. 2014. Vzorky byly odebírány na přítoku a na odtoku z ČOV. Stanovené koncentrace léčiv ve vzorcích jsou uvedeny v tab. 25 a 26. Tabulky obsahují vždy dvě nebo tři paralelní stanovení koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. Koncentrace léčiv na přítoku se pohybovaly v rozmezí 0,42 – 0,83 µg/l, koncentrace léčiv na odtoku v rozmezí 0,37 – 0,66 µg/l. V tabulkách 27 a 28 je zhodnocena účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV vyjádřená v µg/l a v %.

**Tab 25.:** Koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Lednice, odběr 5. 6. 2014.

Léčivo	Přítok			Odtok		
	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]
STZ	0,8320	0,8140	<b>0,8230</b>	0,6011	0,5966	<b>0,5988</b>
SPY	0,6088	0,6096	<b>0,6092</b>	0,6074	0,6075	<b>0,6074</b>
SMR	0,5192	0,5194	<b>0,5193</b>	0,5241	0,5241	<b>0,5241</b>
SMT	0,5137	0,5135	<b>0,5136</b>	0,5135	0,5135	<b>0,5135</b>
SMX	0,4220	0,4316	<b>0,4268</b>	0,3673	0,3691	<b>0,3682</b>

**Tab 26.:** *Koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Lednice, odběr 7. 7. 2014.*

Léčivo	Přítok				Odtok			
	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>3</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>3</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]
<b>STZ</b>	0,7369	0,8022	0,7848	<b>0,7746</b>	0,6381	0,6369	0,6574	<b>0,6442</b>
<b>SPY</b>	0,6091	0,6087	0,6087	<b>0,6089</b>	0,6050	0,6051	0,6048	<b>0,6050</b>
<b>SMR</b>	0,5220	0,5210	0,5216	<b>0,5215</b>	0,5234	0,5234	0,5231	<b>0,5233</b>
<b>SMT</b>	0,5137	0,5138	0,5138	<b>0,5138</b>	0,5137	0,5137	0,5137	<b>0,5137</b>
<b>SMX</b>	0,4168	0,4267	0,4203	<b>0,4213</b>	0,3752	0,3745	0,3760	<b>0,3752</b>

**Tab 27.:** *Účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV Lednice u vzorků odebraných 5. 6. 2014.*

Léčivo	Průměrná koncentrace [µg/l]		Odstraněno [µg/l]	Odstraněno [%]
	přítok	odtok		
<b>STZ</b>	0,8230	0,5988	0,2242	27,24
<b>SPY</b>	0,6092	0,6074	0,002	0,29
<b>SMR</b>	0,5193	0,5241	-	-
<b>SMT</b>	0,5136	0,5135	-	-
<b>SMX</b>	0,4268	0,3682	0,0586	13,74

**Tab 28.:** *Účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV Lednice u vzorků odebraných 7. 7. 2014.*

Léčivo	Průměrná koncentrace [µg/l]		Odstraněno [µg/l]	Odstraněno [%]
	přítok	odtok		
<b>STZ</b>	0,7746	0,6442	0,1305	16,84
<b>SPY</b>	0,6089	0,6050	0,0039	0,64
<b>SMR</b>	0,5215	0,5233	-	-
<b>SMT</b>	0,5138	0,5137	-	-
<b>SMX</b>	0,4213	0,3752	0,0460	10,93

#### 4.4.8. ČOV Mikulov

Z ČOV Mikulov byly odebrány a posuzovány tři série vzorků odpadní vody. První série vzorků byla odebrána 5. 6. 2014, druhá série 7. 7. 2014. Obě tyto série tvořily směsné 24 hodinové vzorky odebírané na přítoku a na odtoku. Třetí sérii tvořily vzorky odebírané na přítoku a na odtoku po dobu jednoho týdne, a to ve dnech 31. 7. – 6. 8. 2014.

Stanovené koncentrace léčiv ve vzorcích jsou uvedeny v tab. 29, 30, 33 a 34. Tabulky obsahují dvě nebo tři paralelní stanovení koncentrace a jejich průměrnou hodnotu. V případě týdenního odběru vzorků jsou ve dvou souhrnných tabulkách (tab. 33 a 34) uvedeny průměrné koncentrace léčiv na přítoku a na odtoku za každý den.

Koncentrace léčiv na přítoku v první a druhé sérii se pohybovaly v rozmezí 0,39 – 0,77 µg/l, koncentrace léčiv na odtoku v rozmezí 0,37 – 0,65 µg/l. Koncentrace léčiv třetí série kolísaly v průběhu týdne 31. 7. – 6. 8. 2014 na přítoku mezi hodnotami 0,41 – 1,84 µg/l, na odtoku potom mezi 0,39 – 1,30 µg/l. V tabulkách 31, 32 a 35 je zhodnocena účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV vyjádřená v %.

**Tab 29.:** Koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Mikulov, odběr 5. 6. 2014

Léčivo	Přítok			Odtok		
	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]
<b>STZ</b>	0,6737	0,7746	<b>0,7242</b>	0,5752	0,5912	<b>0,5832</b>
<b>SPY</b>	0,6094	0,6082	<b>0,6088</b>	0,6085	0,6075	<b>0,6080</b>
<b>SMR</b>	0,5227	0,5206	<b>0,5217</b>	0,5247	0,5241	<b>0,5244</b>
<b>SMT</b>	0,5135	0,5136	<b>0,5136</b>	0,5133	0,5135	<b>0,5134</b>
<b>SMX</b>	0,3885	0,3998	<b>0,3941</b>	0,3651	0,3695	<b>0,3673</b>

**Tab 30.:** *Koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Mikulov, odběr 7. 7. 2014*

Léčivo	Přítok				Odtok			
	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>3</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]	c <sub>1</sub> [µg/l]	c <sub>2</sub> [µg/l]	c <sub>3</sub> [µg/l]	c <sub>průměr</sub> [µg/l]
<b>STZ</b>	0,7486	0,7272	0,6897	<b>0,7218</b>	0,6280	0,6476	0,6359	<b>0,6371</b>
<b>SPY</b>	0,6086	0,6089	0,6099	<b>0,6091</b>	0,6060	0,6053	0,6055	<b>0,6056</b>
<b>SMR</b>	0,5218	0,5222	0,5232	<b>0,5224</b>	0,5236	0,5233	0,5235	<b>0,5235</b>
<b>SMT</b>	0,5137	0,5136	0,5135	<b>0,5136</b>	0,5136	0,5136	0,5136	<b>0,5136</b>
<b>SMX</b>	0,4637	0,4631	0,4390	<b>0,4553</b>	0,3700	0,3727	0,3713	<b>0,3713</b>

**Tab 31.:** *Účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV Mikulov u vzorků odebraných 5. 6. 2014*

Léčivo	Průměrná koncentrace [µg/l]		Odstraněno [µg/l]	Odstraněno [%]
	přítok	odtok		
<b>STZ</b>	0,7242	0,5832	0,1410	19,47
<b>SPY</b>	0,6088	0,6080	0,0008	0,12
<b>SMR</b>	0,5217	0,5244	-	-
<b>SMT</b>	0,5136	0,5134	-	-
<b>SMX</b>	0,3941	0,3673	0,0268	6,81

**Tab 32.:** *Účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV Mikulov u vzorků odebraných 7. 7. 2014.*

Léčivo	Průměrná koncentrace [µg/l]		Odstraněno [µg/l]	Odstraněno [%]
	přítok	odtok		
<b>STZ</b>	0,7218	0,6371	0,0847	11,73
<b>SPY</b>	0,6091	0,6056	0,0036	0,58
<b>SMR</b>	0,5224	0,5235	-	-
<b>SMT</b>	0,5136	0,5136	-	-
<b>SMX</b>	0,4553	0,3713	0,0840	18,44

**Tab 33.:** Průměrné koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Mikulov, týdenní odběr 31. 7. – 6. 8. 2014, PŘÍTOKY.

Léčivo	Průměrná koncentrace [µg/l]						
	31. 7.	1. 8.	2. 8.	3. 8.	4. 8.	5. 8.	6. 8.
STZ	1,2980	1,3670	1,8361	1,2220	0,8206	0,8103	0,7923
SPY	0,6039	0,6056	0,6019	0,5971	0,6046	0,6061	0,6060
SMR	0,5141	0,5139	0,5101	0,5178	0,5211	0,5196	0,5220
SMT	0,5160	0,5158	0,5174	0,5156	0,5141	0,5140	0,5139
SMX	0,5621	0,4943	0,4923	0,4138	0,8336	0,4077	0,4364

**Tab 34.:** Průměrné koncentrace vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody z ČOV Mikulov, týdenní odběr 31. 7. – 6. 8. 2014, ODTOKY.

Léčivo	Průměrná koncentrace [µg/l]						
	31. 7.	1. 8.	2. 8.	3. 8.	4. 8.	5. 8.	6. 8.
STZ	1,1770	0,9431	1,3039	1,1563	0,6836	0,7881	0,7250
SPY	0,5837	0,5931	0,5756	0,5841	0,6020	0,5992	0,6015
SMR	0,5179	0,5199	0,5175	0,5175	0,5226	0,5219	0,5227
SMT	0,5149	0,5146	0,5150	0,5150	0,5140	0,5142	0,5140
SMX	0,4685	0,4305	0,4909	0,4694	0,3918	0,3985	0,3922

**Tab 35.:** Účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na ČOV Mikulov, týdenní odběr 31. 7. – 6. 8. 2014.

Léčivo	Odstraněno [%]						
	31. 7.	1. 8.	2. 8.	3. 8.	4. 8.	5. 8.	6. 8.
STZ	9,32	31,02	28,98	5,38	16,70	2,74	8,49
SPY	3,34	2,06	4,37	2,18	0,43	1,15	0,74
SMR	-	-	-	-	-	-	-
SMT	0,22	0,24	0,46	0,12	-	-	-
SMX	16,65	12,92	0,29	-	52,99	2,24	10,14



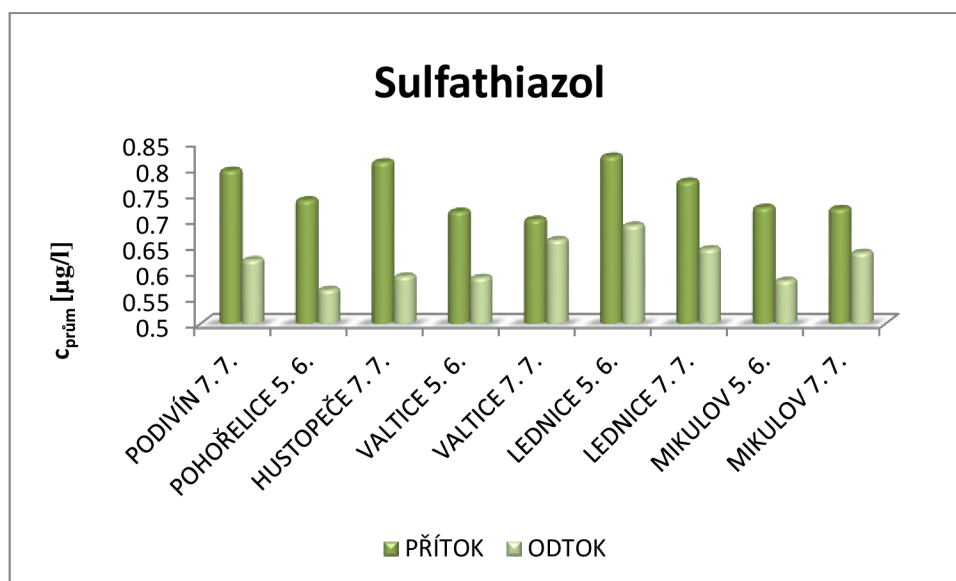
#### 4.4.9. Zhodnocení výsledků

Dosažené výsledky prezentované v předcházejících kapitolách jsou v následujících dvou kapitolách pro názornost zpracovány do sloupcových grafů. Grafy znázorňují koncentrace jednotlivých léčiv na přítoku a na odtoku vedle sebe, čímž je možné lehce zhodnotit míru odstranění každého z léčiv na různých ČOV.

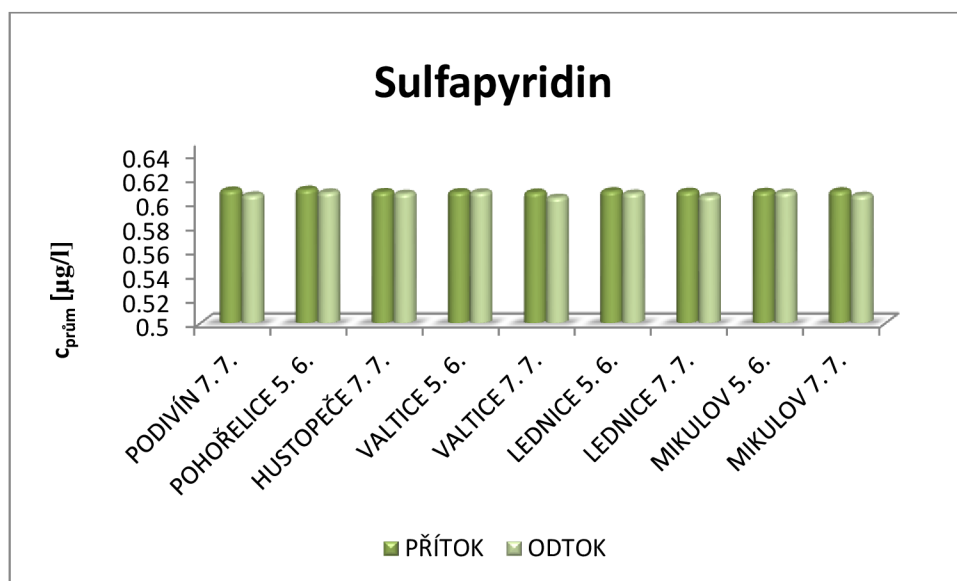
##### 4.4.9.1. Koncentrace léčiv na různých ČOV

V této kapitole jsou uvedeny sloupcové grafy znázorňující koncentrace léčiv STZ, SPY, SMR, SMT a SMX ve vzorcích odpadní vody z ČOV Podivín, Pohořelice, Hustopeče, Valtice, Lednice a Mikulov ve dnech odběru 5. 6. 2014 a 7. 7. 2014.

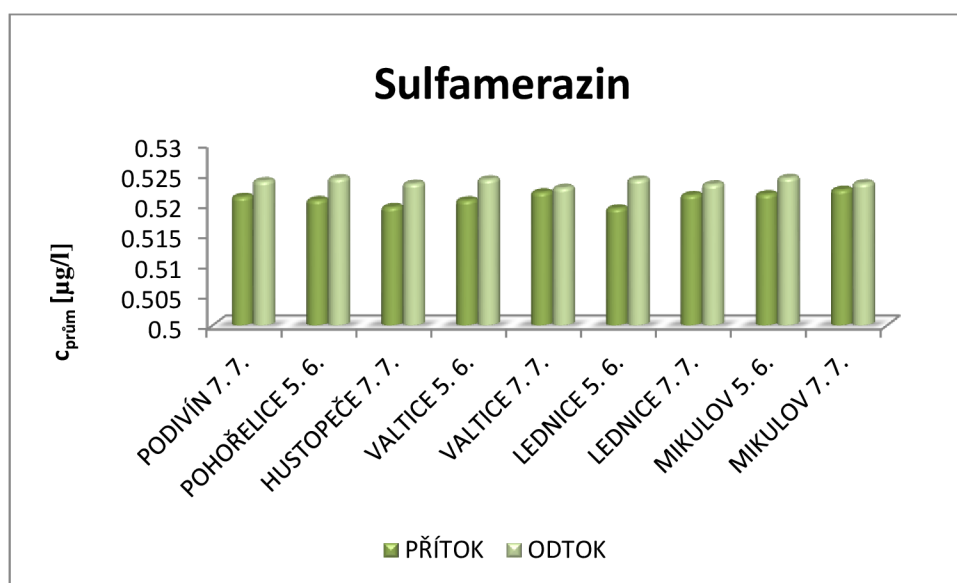
**Graf 6:** Koncentrace sulfathiazolu na přítoku a odtoku z různých ČOV.



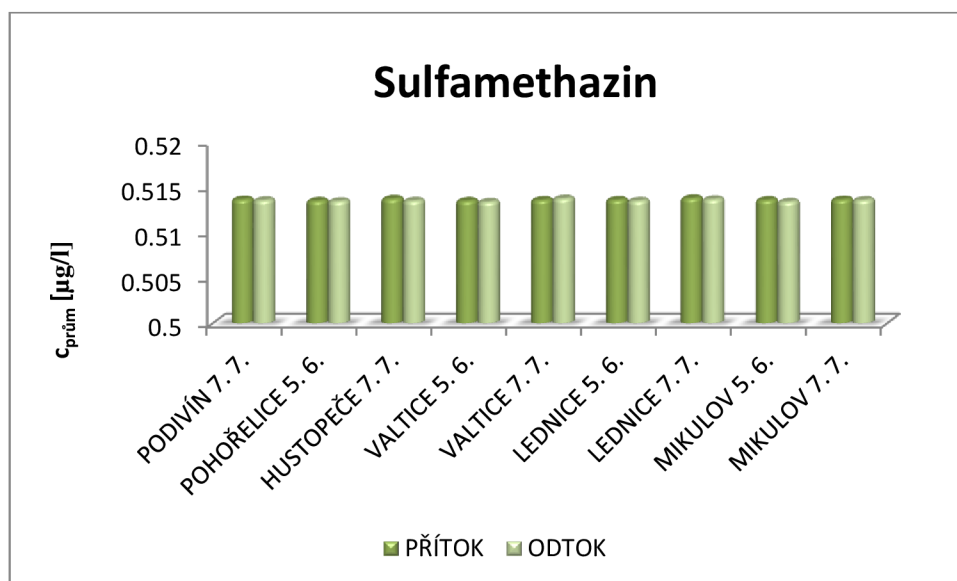
**Graf 7:** *Koncentrace sulfapyridinu na přítoku a odtoku z různých ČOV.*



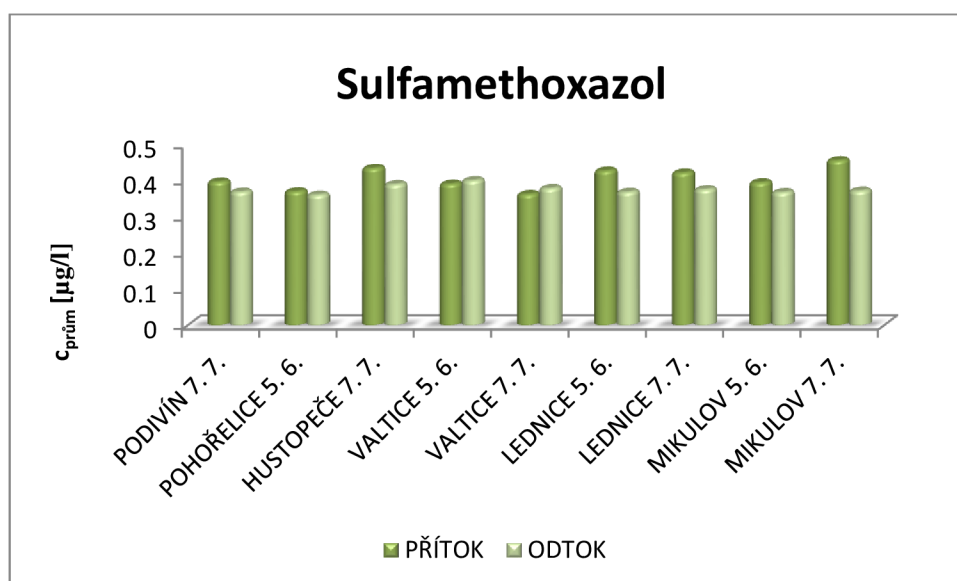
**Graf 8:** *Koncentrace sulfamerazinu na přítoku a odtoku z různých ČOV.*



**Graf 8:** *Koncentrace sulfamethazinu na přítoku a odtoku z různých ČOV.*



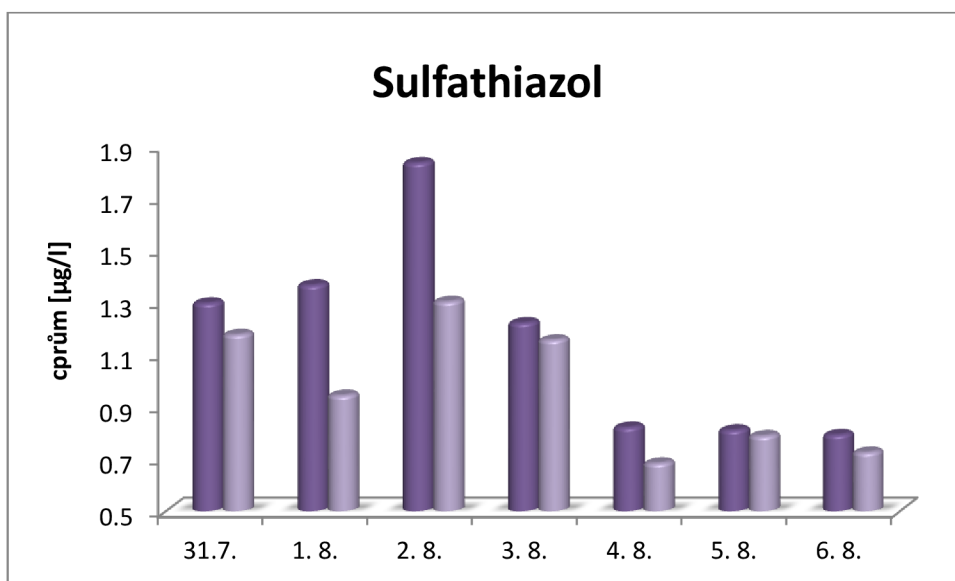
**Graf 9:** *Koncentrace sulfamethoxazolu na přítoku a odtoku z různých ČOV.*



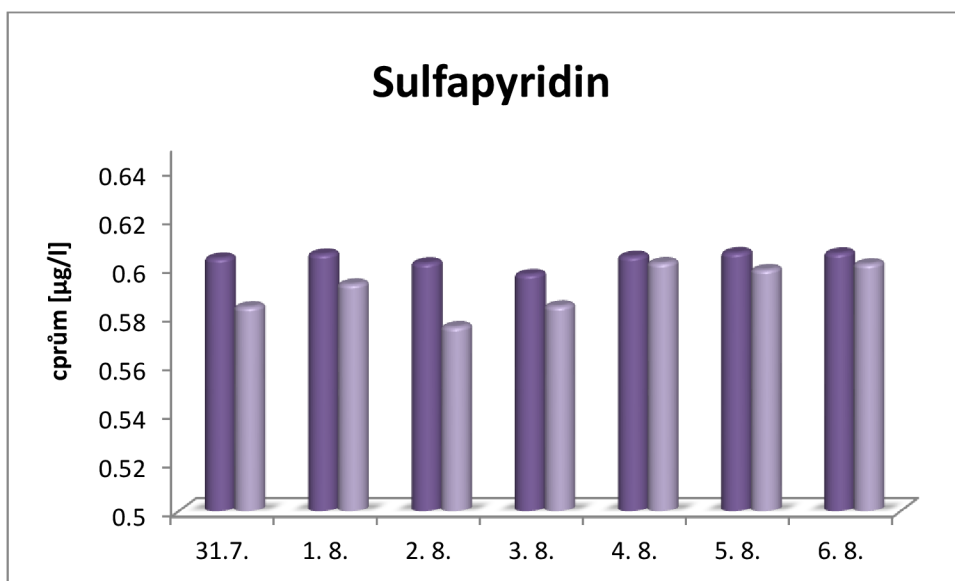
#### 4.4.9.2. Koncentrace léčiv na ČOV Mikulov

V této kapitole jsou prezentovány sloupcové grafy znázorňující koncentrace sulfathiazolu, sulfapyridinu, sulfamerazinu, sulfamethazinu a sulfamethoxazolu ve vzorcích odpadní vody z ČOV Mikulov odebíraných každý den po dobu jednoho tý dne, a to ve dnech 31.7. – 6. 8. 2014.

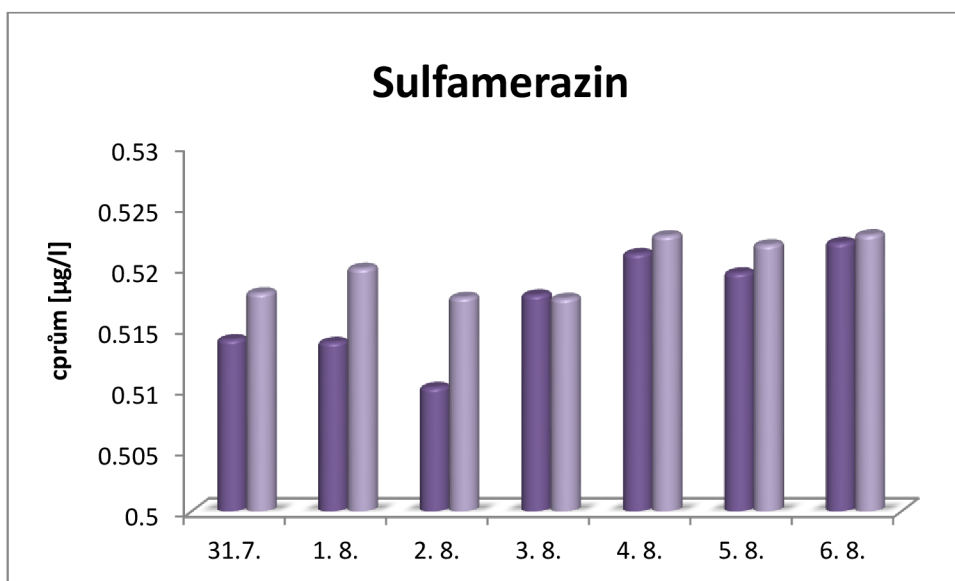
**Graf 10:** *Koncentrace sulfathiazolu na přítoku a odtoku z ČOV Mikulov.*



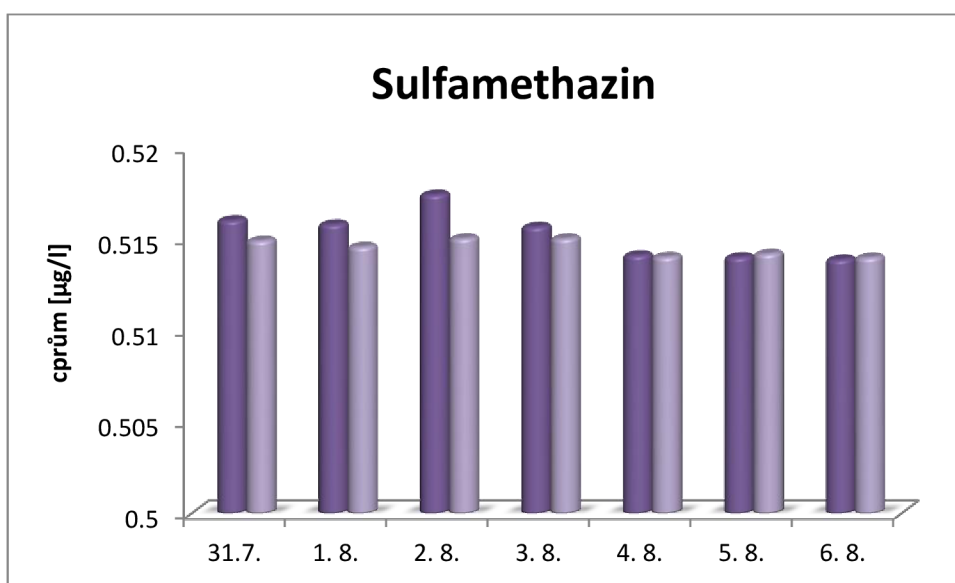
**Graf 11:** *Koncentrace sulfapyridinu na přítoku a odtoku z ČOV Mikulov.*



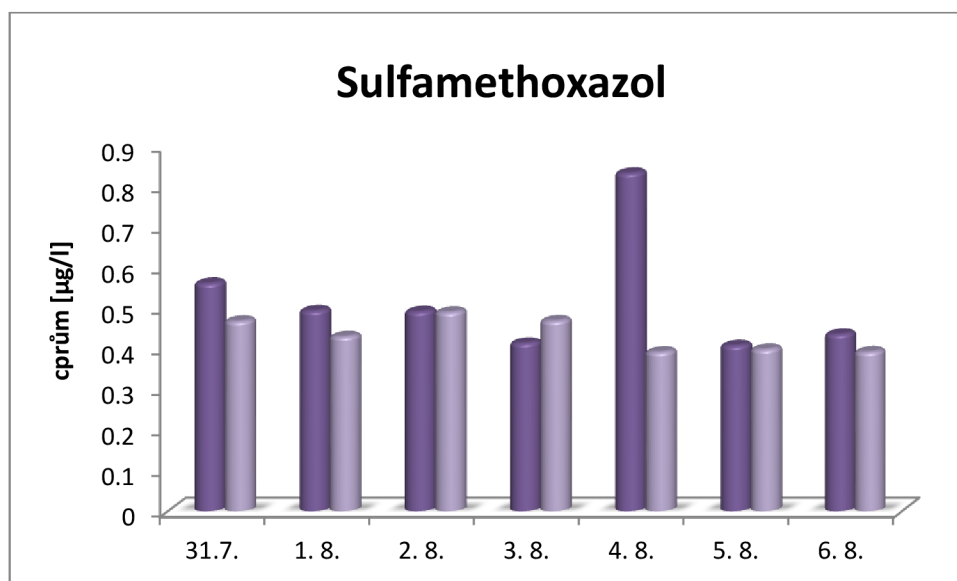
**Graf 12:** *Koncentrace sulfamerazinu na přítoku a odtoku z ČOV Mikulov.*



**Graf 13:** *Koncentrace sulfamethazinu na přítoku a odtoku z ČOV Mikulov.*



**Graf 14:** Koncentrace sulfamethoxazolu na přítoku a odtoku z ČOV Mikulov.



#### 4.4.9.3. Diskuze výsledků

Byl prokázán výskyt všech sledovaných sulfonamidových antibiotik ve vzorcích odpadních vod. Koncentrace všech léčiv se pohybovaly průměrně v desetinách µg/l. Z prezentovaných výsledků je patrné, že koncentrace stanovovaných léčiv se ve vzorcích z různých ČOV příliš nelišily. Nejvíce kolísaly koncentrace sulfathiazolu, méně pak koncentrace sulfamethoxazolu. Koncentrace zbývajících tří léčiv se na všech ČOV lišily pouze nepatrně. Z tohoto faktu lze usuzovat, že léčiva STZ a SMX jsou ve sledované oblasti používána nárazověji (pravděpodobně v odlišnějších dávkách) než léčiva SPY, SMR a SMT.

Posouzením hodnot procentuální účinnosti odstranění léčiv na různých ČOV i pouhým pohledem na grafy v předcházejících kapitolách je možné zkonstatovat, že míra odstranění léčiv na ČOV v současnosti všeobecně není příliš vysoká. Největší míru eliminace (různou na různých ČOV) vykazovalo léčivo sulfathiazol, dalším, alespoň z části úspěšně odstraněným léčivem byl sulfamethoxazol. Sulfathiazol byl v největší míře odstraněn na ČOV Hustopeče, sulfamethoxazol na ČOV Mikulov. Ostatní léčiva byla na ČOV odstraněna pouze minimálně nebo vůbec.

Dále byl sledován obsah vybraných sulfonamidů na ČOV Mikulov v průběhu jednoho týdně. Zdosazených výsledků je patrné, že koncentrace léčiv v odpadní vodě v průběhu jednoho týdně poněkud kolísaly, přičemž nejvýrazněji kolísaly koncentrace sulfathiazolu. Zjištěné rozdíly v koncentracích léčiv byly pravděpodobně způsobeny rozdílnou aplikací léčiv v průběhu tohoto týdne. Léčiva také vykazovala v průběhu týdne různou míru eliminace.

Vybraná léčiva byla sledována na ČOV s různým počtem ekvivalentních obyvatel a různými technologiemi čištění. Výsledky prezentované v této diplomové práci neprokázaly významně rozdílnou míru eliminace léčiv při použití různých technologií čištění v současnosti používaných na vybraných čistírnách odpadních vod. Rovněž nebyla pozorována korelace mezi počtem ekvivalentních obyvatel a zjištěnými koncentracemi vybraných léčiv ve vzorcích odpadních vod.

V některých případech byl při vyhodnocení výsledků měření zjištěn nárůst koncentrace léčiva na odtoku v porovnání s původní hodnotou koncentrace na přítoku. V těchto případech nelze vyloučit, že nedošlo k další kontaminaci léčivy přímo na ČOV v průběhu čištění. Vzhledem k relativně nízké citlivosti použitého detektoru a z toho vyplývající nutnosti použít metodu standardního přídavku lze konstatovat, že by bylo pravděpodobně vhodnější použít detekci pomocí hmotnostní spektrometrie, která je při podobných měřeních doporučována rovněž v literatuře.

Závěrem lze konstatovat, že současné technologie čištění na sledovaných ČOV nejsou příliš úspěšné v eliminaci léčiv z odpadních vod. K účinnější eliminaci léčiv bude pravděpodobně zapotřebí zavést na ČOV nové, specializované technologie pro čištění odpadních vod.

## 5. ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na stanovení obsahu léčiv v odpadních vodách z čistíren odpadních vod s různými počty ekvivalentních obyvatel a různými technologiemi čištění. Z důvodu jejich častého využívání v humánní i veterinární medicíně byla ke sledování vybrána sulfonamidová chemoterapeutika. Hlavním cílem předložené práce proto bylo optimalizovat analytickou metodu pro stanovení vybraných léčiv ve vzorcích odpadní vody. Pro stanovení bylo vybráno pět zástupců ze skupiny sulfonamidových chemoterapeutik, konkrétně léčiva sulfamerazin, sulfamethazin, sulfapyridin, sulfathiazol a sulfamethoxazol.

Výsledky, kterých bylo dosaženo:

- Byla optimalizována metoda pro analýzu pěti zástupců sulfonamidových chemoterapeutik pomocí UHPLC s UV-VIS detektorem typu diodového pole.
- Rovněž byla optimalizována metoda pro úpravu vzorků odpadní vody pomocí extrakce tuhou fází (SPE), se zaměřením na výměr ideálního objemu vzorku.
- Optimalizovaná metoda byla poté použita pro stanovení vybraných léčiv v reálných vzorcích odpadní vody. Léčiva byla stanovena ve vzorcích odpadní vody z čistíren odpadních vod s různými počty ekvivalentních obyvatel; konkrétně se jednalo o ČOV Podivín, Pohořelice, Hustopeče, Valtice, Lednice a Mikulov.
- Byla posouzena účinnost odstranění léčiv čistícími procesy na těchto ČOV, což se provádělo porovnáním obsahu léčiv stanovených na přítoku a na odtoku z ČOV.

Z dosažených výsledků vyplývá, že v současnosti dochází na čistírnách odpadních vod pouze k částečné, nedokonalé eliminaci léčiv. Vzhledem k rizikovosti léčiv a dalších nových polutantů ve vztahu k životnímu prostředí je jistě na místě uvažovat o zavedení nových, specializovaných technologií pro čištění odpadních vod, které by ve větší míře umožnily i odstranění léčiv.



## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LINCOVÁ, D., et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [2] HEJZLAR, M. *Základy lékařské mikrobiologie: antibiotika a chemoterapeutika: určeno pro posl. lék. fak. hygienické a dalších lék. fakult, IDLF v Praze*. 1. vyd. Praha: SPN, 1985. 83 s.
- [3] BOROVSANÝ, A.; CSÖLLEI, J. *Farmaceutická chemie: (farmakochemie)*. VI., *Léčiva s účinkem antiinfekčním a antiparazitárním, 1. část*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2003. 159 s. ISBN :80-7305-474-4.
- [4] HYNIE, S. *Farmakologie v kostce*. 2., přeprac. vyd. Triton, 2001. 520 s. ISBN 80-7254-181-1.
- [5] KOVAŘÍK, Z. *Poznámky k historii objevu vztahu mikroorganismu a lidského onemocnění*. [online] 2005 [cit. 2013-12-05]. Zdravotnické noviny. Dostupné z WWW:<<http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/poznamky-k-historii-objevu-vztahu-mikroorganismu-a-lidskeho-onem-165567>>
- [6] LEVY, S., B. *Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc*. Praha: Academia, 2007. 312 s. ISBN 978-80-200-1485-6.
- [7] ADOLF, J. *Léčiva* [online]. 2008 [cit. 2013-12-06]. Speciální farmakologie. Dostupné z WWW: <[http://spsprerov.draksoft.net/rocprace/Leciva/special\\_farmakologie.html](http://spsprerov.draksoft.net/rocprace/Leciva/special_farmakologie.html)>.
- [8] LÜLLMANN, H., et al. *Barevný atlas farmakologie* 3. vydání. Praha: Grada, 2007. 372 s. ISBN 978-80-247-1672-5.
- [9] LOCHMANN, O. *Antimikrobní terapie v praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 2006. 204 s. ISBN 80-7254-826-3.
- [10] LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 2. vyd. Praha : Grada, 2004. 725 s. ISBN 80-247-0836-1.
- [11] HRDINA, R., et al. *Farmakologický slovník* Praha: Maxdorf, 1997. 410 s. ISBN 80-85800-42-X.
- [12] HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie. Díl VII/B*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 239 s. ISBN 80-246-0657-7.
- [13] HAMPL, F.; RÁDL, S.; PALEČEK, J. *Farmakochemie*. Praha: VŠCHT, 2007. 450 s. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [14] DOSTÁLEK, M., et al. *Farmakokinetika*. 1. vyd. Praha: Grada, 2006. 219 s. ISBN 80-247-1464-7.
- [15] ŠČIGEL, V. *Antibiotika v praxi zubního lékaře*. Praha: Quintessenz, 2005. 224 s. ISBN 80-903181-9-3.
- [16] LOCHMANN, O. *Nežádoucí účinky antiinfekčních léčiv*. 1. vyd. Praha: Triton, 2008. 243 s. ISBN 978-80-7387-073-7.
- [17] LOCHMANN, O. *Základy antimikrobní terapie*. 1. vyd. Praha: Triton, 1994. 175 s.

- [18] HERNANDO, M. D. et al.: Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Science Direct*. 2005, vol. 69, s. 334-342.
- [19] MICHAEL, I. et al.: Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research*. 2013, vol. 47, s. 957 – 995.
- [20] HIRSCH, R., et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*. 1999, no. 225, s. 109-118.
- [21] DÍAZ-CRUZ, M. S.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003, vol. 22, no. 6, s. 340-351.
- [22] HALLING-SORENSEN, B., et al. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment – A Review. *Chemosphere*. 1998, vol. 36, no. 2, s. 357-393.
- [23] VÁŇA, M., et al. Lze stanovit správnou koncentraci farmak ve vodách? *Vodní hospodářství*. 2011, no. 12, s. 17-18.
- [24] TESÁŘÍK, B. Z historie léčby sulfonamidy. *Medicina v praxi: měsíčník pro lékaře, farmaceuty a ostatní zdravotníky*. Praha: Adore, 2000, no. 7, s. 56. ISSN: 1212-8759
- [25] SUCHOPÁR, J.; VALENTOVÁ, Š. *Remedia compendium*. 4. vyd. Praha: Panax, 2009, 946 s. ISBN 978-80-902806-4-9.
- [26] Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [cit. 2013-12-06]. Dostupné z: <<http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>>
- [27] SIMON, C.; STILLE, W. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 1998. 711 s. ISBN 80-7169-268-9.
- [28] *Český lékopis 2009*. Praha: Grada, 2009. 3 sv. (3942 s.) ISBN 978-80-247-2994-7.
- [29] SENOV, P., L. *Farmaceutická chemie*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1954.
- [30] HELÁN, V. *Odběry vzorků: sborník přednášek z kurzu*. 1. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2003. 185 s. ISBN: 80-86380-18-1
- [31] HORÁLEK, V., et al. *Vzorkování I – obecné zásady*. 1. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2010. 131 s. ISBN: 978-80-86380-53-7
- [32] BODNAR, M., NAMIESNIK, J., KONIECZKA, P. Validation of a sampling procedure. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013, vol. 51, s. 117–126.
- [33] Operating Procedure: Wastewater sampling. In: *SESDPROC-306-R3*. USA, Georgia: U.S. Environmental Protection Agency, 2013. Dostupné z: <<http://www.epa.gov/region4/sesd/fbqstp/Wastewater-Sampling.pdf>>

- [34] POVÝŠILOVÁ, M.: Odběry vzorků z čistíren odpadních vod. *Odběry vzorků, sborník přednášek z kurzu*. 2. vyd. Český Těšín: 2THETA, 2006. s. 265-267. ISBN 80-86380-33-5.
- [35] COTMAN, M., PINTAR, A. Sampling uncertainty of wastewater monitoring estimated in a collaborative field trial. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013, vol. 51, s.71–78.
- [36] ŠTULÍK, K. et al.. *Analytické separační metody*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2004, 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [37] JANČÁŘOVÁ, I. a JANČÁŘ, L. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 195 s. ISBN 978-80-7157-647-12008.
- [38] DVOŘÁKOVÁ, P. *Využití kapalinové chromatografie pro stanovení reziduí léčiv*. Brno, 2012. 140 s. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [39] POOLE, C. F., GUNATILLEKA, A. D., SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2000, vol. 885, s. 17–39.
- [40] CHEN, L., et al. On-line coupling of dynamic microwave-assisted extraction to solid-phase extraction for the determination of sulfonamide antibiotics in soil. *Analytica Chimica Acta*. 2009, vol. 648, s. 200-206.
- [41] POPL, M.; FÄHNRIK, J. *Analytická chemie životního prostředí*. Praha: VŠCHT, 1999. 218 s. ISBN 80-7080-336-3
- [42] ZHOU, J. L., MASKAOUI, K., LUFADJEU, A. Optimization of antibiotic analysis in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spektrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2012, vol. 731, s. 32–39.
- [43] Izolace léčiv ze skupiny sulfonamidů pomocí SPE. *Praktické cvičení z předmětu Cizorodé látky v potravinách*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Dostupné z: <[http://fvhe.vfu.cz/export/sites/fvhe/adresa/sekce\\_ustavy/uvozp/Navody\\_na\\_cviceni\\_Izolace\\_leciv\\_pomoci\\_SPE.pdf](http://fvhe.vfu.cz/export/sites/fvhe/adresa/sekce_ustavy/uvozp/Navody_na_cviceni_Izolace_leciv_pomoci_SPE.pdf)>
- [44] ŽENATOVÁ, P. *Posouzení kontaminace kalů z čistíren odpadních vod rezidui léčiv*. Brno, 2009. 97 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [45] ŠVEC, F. Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií? *Chemické listy*. 2009, vol. 103, s. 266–270.

- [46] D. SÝKORA, D., FÄHNRICH, J. *Kapalinová chromatografie a absorpční UV spektrofotometrie* [online]. [cit. 2014-08-10]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. Dostupné z: <[http://www.vscht.cz/anl/lach1/6\\_LC.pdf](http://www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf)>
- [47] LILLENBERG, M., et al. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009, no. 1216, s. 5949–5954.
- [48] VYSLYŠELOVÁ, P. *Chromatografická frakcionace rostlinných extraktů*. Olomouc, 2012. 114 s. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie.
- [49] CHURÁČEK, J., et al.: *Analytická separace látek*. Praha: SNTL, 1990.
- [50] PERTILE, E., ČABLÍK, V. *Instrumentální metody analýzy* Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006, 238 s. ISBN 80-248-1049-2.
- [51] NOVÁKOVÁ, L. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [52] SOMMER, L., et al. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: Nakladatelství VUTIUM. 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [53] KARLÍČEK, R. et al. *Analytická chemie pro farmaceuty*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 2007. 279 s. ISBN 978-80-246-1453-3.
- [54] OLŠOVSKÁ, J., JURKOVÁ, M. Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod. *Kvasny Prum.* 2012, vol. 58, no. 2, s. 30–35.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATB	Antibiotikum (antibiotika)
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
ČOV	Čistírna odpadních vod
ČR	Česká republika
DAD	Spektrofotometrický detektor diodového pole
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EO	Ekvivalentní obyvatel
GC/MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
GIT	Gastrointestinální soustava
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LC	Kapalinová chromatografie
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
ORL	Ušní-krční-nosní
PAB	<i>p</i> -aminobenzoová kyselina
POPs	prioritní organické polutanty
RNA	Ribonukleová kyselina
SMR	Sulfamerazin
SMT	Sulfamethazin
SMX	Sulfamethoxazol
SPY	Sulfapyridin
STZ	Sulfathiazol
UHPLC	Ultra účinná kapalinová chromatografie
UPLC	Ultra účinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	Ultrafialové-viditelné záření
ŽP	Životní prostředí