

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Techniky přípravy vzorků čistírenského kalu pro stanovení
reziduí antibiotik**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:

Hana Hudziecová

Studijní obor:

Chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

2021 Olomouc

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Hana Hudziecová
Název práce:	Techniky přípravy vzorků čistírenského kalu pro stanovení reziduí antibiotik
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2021
Anotace:	Bakalářská práce se zabývá technikami přípravy vzorků čistírenského kalu pro stanovení reziduí antibiotik metodou HPLC/MS. Práce obsahuje přiblížení do problematiky antibiotik a čistírenských kalů a představení vybraných extrakčních metod. Extrakční techniky byly aplikovány na čistírenský kal a byly posuzovány z hlediska výtěžností a matričních efektů. Metoda s nejlepšími výsledky byla použita ke stanovení 14 vybraných zástupců antibiotik v reálných vzorcích kalů.
Klíčová slova:	Antibiotika, čistírenský kal, extrakční metody, HPLC/MS, příprava vzorku, QuEChERS, rezidua antibiotik, SPE
Počet stran:	49
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Hana Hudziecová

Title: Techniques of pretreatment of sludge samples for determination of antibiotic residues

Type of thesis: Bachelor's thesis

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

The year of submission: 2021

Annotation: This Bachelor's thesis deals with techniques of pretreatment of sewage sludge samples for the determination of antibiotic residues by the HPLC/MS method. Thesis contains an approach to the issue of antibiotics and sewage sludge and the introduction of selected extraction methods. Extraction techniques were applied to sewage sludge samples and were assessed by their recoveries and matrix effects. The method with the best results was applied to real sewage sludge samples for the determination of 14 selected antibiotics.

Keywords: Antibiotic residues, antibiotics, extraction techniques, HPLC/MS, QuEChERS, sample pretreatment, sewage sludge, SPE

Number of pages: 49

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 30. 4. 2021

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce, doc. RNDr. Petru Fryčákovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Také chci poděkovat Mgr. Volodymyru Paukovi, Ph.D. za odborné rady a měření všech vzorků HPLC/MS. Tato práce byla finančně podpořena Agenturou pro zdravotnický výzkum ČR (projekt *Epidemiologie vankomycin-rezistentních enterokoků v České republice: One Health concept*, číslo projektu NV18-05-00340) a Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2020_030, IGA_PrF_2021_021).

Obsah

1	Úvod	8
2	Teoretická část	9
2.1	Antibiotika	9
2.1.1	Původ reziduí antibiotik v životním prostředí	9
2.1.2	Antibiotická rezistence	10
2.2	Čistírenský kal	10
2.2.1	Technologické postupy pro zpracování kalu	11
2.2.2	Složení kalů	11
2.2.3	Nakládání s kaly	12
2.3	Příprava vzorků	13
2.3.1	Soxhletova extrakce	14
2.3.2	Ultrazvuková extrakce	15
2.3.3	Extrakce mikrovlnným zářením	15
2.3.4	Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PLE)	15
2.3.5	Extrakce stlačenou horkou vodou (PHWE)	16
2.3.6	Extrakce na pevné fázi dispergované s matricí (MSPDE)	16
2.3.7	QuEChERS extrakce	17
2.3.8	Extrakce tuhou fází (SPE)	18
2.3.9	Extrakce disperzní tuhou fází (d-SPE)	19
2.4	Stanovení metodou HPLC/MS	19
3	Experimentální část	21
3.1	Chemikálie a přístroje	21
3.2	Analýza HPLC/MS	22
3.3	Pracovní postup	23
3.3.1	Zásobní roztoky standardů	23
3.3.2	UAE následovaná SPE na HLB sorbentu	23

3.3.3	UAE následovaná SPE na MAX a HLB sorbentech.....	24
3.3.4	Extrakce QuEChERS	25
3.3.5	SPE na MAX sorbentu následovaná QuEChERS	25
3.3.6	SPE na HLB sorbentu následovaná QuEChERS	26
3.3.7	Stanovení analytů v reálných vzorcích kalů.....	27
4	Výsledky a diskuze	29
4.1	UAE následovaná SPE na HLB sorbentu	29
4.2	UAE následovaná SPE na MAX a HLB sorbentech.....	30
4.3	Extrakce QuEChERS	33
4.4	SPE na MAX sorbentu následovaná QuEChERS.....	35
4.5	SPE na HLB sorbentu následovaná QuEChERS	37
4.6	Stanovení analytů v reálných vzorcích kalů.....	40
4.7	Porovnání výsledků zvolené metody	41
5	Závěr.....	43
6	Seznam použitých zkratk	44
7	Seznam použité literatury	46

1 ÚVOD

Objev antibiotik představoval revoluční změnu v léčení bakteriálních onemocnění a dodnes jsou v této oblasti nepřekonaná. Z tohoto důvodu antibiotika byla a stále jsou předepisována k léčbě lidí a zvířat, používají se i preventivně, při chirurgických zákrocích či jako stimulanty růstu chovných zvířat. Toto nadměrné užívání má ale svůj negativní dopad. Antibiotika se dostávají do životního prostředí, kde mohou způsobit rozvoj rezistentních bakterií. Stále více se objevují kmeny rezistentních bakterií, na které původně účinné antibiotikum už neúčinkuje, což způsobuje vyšší nemocnost nebo dokonce úmrtnost.

Antibiotika, která se dostanou do odpadních vod, nejsou v čistíčkách odpadních vod nijak regulována ani kontrolována. Během procesu čištění odpadních vod se tyto látky dostávají do čistírenského kalu, který se dále může používat v zemědělství jako forma hnojiva. Takto se antibiotika dostávají do potravního řetězce a dále kolují v životním prostředí. Proto je důležité, aby byly koncentrace těchto látek v čistírenských kalech hlídány a regulovány. Je tedy nutné najít metodu, kterou by se antibiotika v kalech dala spolehlivě stanovit.

Práce si klade za cíl nalézt metodu přípravy vzorků čistírenského kalu s příznivými parametry pro stanovení reziduí antibiotik. Nedílnou částí je představení si čistírenského kalu, jeho tvorby a zpracování a samozřejmě různých metod přípravy vzorků čistírenského kalu. Experimentální část byla zaměřena na testování různých metod a jejich kombinací za účelem nalezení metody s dobrými výsledky. Metody byly vyhodnocovány na základě výsledků výtěžností a matričních efektů pomocí reálné matrice obohacené standardy 14 vybraných zástupců antibiotik. Nalezená metoda byla poté aplikována na stanovení těchto antibiotik v reálných vzorcích čistírenských kalů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky, které poškozují a usmrcují bakterie nebo inhibují jejich růst. Původně tato skupina zahrnovala pouze látky přírodního původu, produkované houbami, plísněmi nebo bakteriemi, dnes je rozšířena i o látky syntetického původu se stejným účinkem. Je to velmi heterogenní skupina látek a dělí se do mnoha skupin podle způsobu vzniku, rozsahu působení, razance účinku, chemické struktury atd. [1,2]

Prvním používaným antibiotikem byl penicilin objevený Alexandrem Flemingem a izolovaný skupinou vědců roku 1940 z plísně *Penicillium notatum*. Tento objev znamenal převrat v léčení bakteriálních onemocnění, jelikož léky do té doby používané nebyly příliš účinné nebo měly zároveň toxické účinky na hostitelský organismus. [1,2]

2.1.1 Původ reziduí antibiotik v životním prostředí

Antibiotika se používají především k léčbě bakteriálních infekcí v humánní a veterinární medicíně díky jejich selektivě účinku, tzn. působí proti bakteriím, zatímco lidské či zvířecí buňky zůstávají nepoškozeny. Díky této vlastnosti se používají i bez jednoznačného určení nemoci, preventivně nebo při chirurgických zákrocích. V malých dávkách působí antibiotika jako stimulatory růstu ve výkrmných hospodářských zvířat, i když v mnoha zemích už je tato praxe zakázána. [1,2]

Do životního prostředí se antibiotika mohou dostávat při jejich výrobě, užívání nebo nesprávné likvidaci. Při užívání se léčivo vylučuje z organismu v přeměněné nebo původní formě a dostává se do odpadních vod. V případě chovných zvířat se rezidua antibiotik mohou dostávat do statkových hnojiv. Při neodborné likvidaci se nepotřebovaná léčiva dostávají na skládky komunálního odpadu nebo do kanalizace. [2]

Odpadní vody procházejí čističkami odpadních vod (ČOV), kde může být část antibiotik odstraněna, téměř nikdy však nedojde k úplné eliminaci. Antibiotika jsou velmi různorodou skupinou látek s různými fyzikálně chemickými vlastnostmi a efektivita jejich odstranění se tudíž liší a závisí také na použité technologii čištění. [3] Statková hnojiva procházejí procesem fermentace, při němž se může odbourat část přítomných reziduí antibiotik. Neodstraněná antibiotika ze statkových hnojiv a kalů z ČOV se dostávají dále do životního prostředí aplikací na zemědělskou půdu. [2]

2.1.2 Antibiotická rezistence

Antibiotickou rezistenci můžeme rozdělit na přirozenou, dané antibiotikum na daný bakteriální druh nepůsobí, a získanou, bakterie se adaptuje a stává se rezistentní. V této kapitole se budeme zabývat získanou rezistencí. [2]

Bakterie se stává rezistentní, pokud si vyvine nebo získá gen rezistence. Ten může bakterie získat vertikálním přenosem z mateřské buňky dělením, náhodnými mutacemi nebo horizontálním přenosem. Horizontální přenos se může uskutečnit přenosem plazmidu obsahující gen rezistence konjugací s rezistentní bakterií, prostřednictvím bakteriofágů s částí DNA rezistentní bakterie nebo přímou absorpcí exogenní DNA s rezistentním genem přes buněčnou membránu. Gen rezistence může působit proti antibiotiku několika mechanismy, deaktivací pomocí enzymu, snížením propustnosti buňky pro antibiotikum, aktivním transportem antibiotika z buňky, ochranou buněčné struktury proti působení antibiotika a další. [2,4]

Při působení antibiotika na bakterie dojde k poškození nebo usmrcení bakterií citlivých na léčivo. Zbylé bakterie s nějakou formou rezistence mohou přežít a začnou se rychle množit, čímž dojde k vyselektování rezistentních bakterií. Antibiotikum může rovněž napadnout příznivé bakterie přirozeně žijící v organismu, což může způsobit rozšíření přítomných rezistentních patogenních bakterií, množení rezistentních příznivých bakterií, které mohou přenést geny rezistence na patogenní bakterie nebo které se samy stanou problémem. [4]

K selektivnímu množení rezistentních bakterií dochází v jakémkoli prostředí s výskytem antibiotik. Vzhledem k obrovskému užívání antibiotik a jejich nedokonalému odstraňování ze životního prostředí je antibiotická rezistence stále vzrůstajícím problémem globálního charakteru. Bakteriální patogeny vykazují čím dál větší odolnost vůči antibiotické léčbě, což způsobuje větší morbiditu, tj. nemocnost, a mortalitu. [2,4]

2.2 Čistírenský kal

Čistírenský kal je vedlejší produkt vznikající při čištění odpadních vod. Jedná se o suspenzi koloidních a zrnitých částic ve vodě a obsahuje anorganické a organické látky původem z odpadních vod nebo vzniklých při procesu čištění odpadních vod. Surový čistírenský kal se skládá z primárního kalu a sekundárního (aktivovaného) kalu. Primární kal

vzniká sedimentací látek z odpadní vody a aktivovaný kal vzniká v biologickém stupni čištění vody a je tvořen biomasou a inertními látkami. Oba druhy kalu se spojují v tzv. surový čistírenský kal, který obsahuje surovou odpadní vodou a v ní suspendované 2-3 hm.% tuhé fáze (sušiny) [5]. [5,6]

2.2.1 Technologické postupy pro zpracování kalu

Zahušťování slouží k redukci obsahu vody a zvýšení podílu tuhé fáze na 4-6 hm.%. Provádí se sedimentací, centrifugací nebo filtrací. [5,7]

Stabilizace kalu je nutná pro vyhovění hygienickým a ekologickým požadavkům, které závisí na plánovaném využití kalu. Nejčastější způsoby jsou anaerobní, aerobní a chemická stabilizace. Anaerobní stabilizace je nejčastěji prováděna vyhníváním (methanizací), kdy mikroorganismy v bezkyslíkatém prostředí rozkládají organické látky za současného vzniku bioplynu (hlavně methan a oxid uhličitý). Po tomto anaerobním zpracování se obsah kalu sníží až o 20 % oproti kalu surovému. [5] Aerobní stabilizace není tak častá, ale jde rovněž o rozklad organické hmoty, tentokrát však za přístupu kyslíku. [6] Chemická stabilizace slouží k usmrcení patogenů zvýšením pH na 12 a více. Provádí se přidávkem oxidu nebo hydroxidu vápenatého. [7]

Odvodňováním odstraníme další vodu z kalu a zvýšíme obsah sušiny na 20-50 % [7] podle toho, jakou techniku zvolíme. Přirozené odvodňování na kalových polích a v kalových lagunách probíhá vsakováním vody do země a výparem. Odvodňovat můžeme také filtrací za současného přidání flokulantů a koagulantů (Fe, Al, vápno, jemnozrnné uhlí), dekantáčními odstředivkami nebo kalolisy. [5,6]

Sušení kalů se běžně neprovádí, jelikož je energeticky, a tudíž i finančně velmi náročné. Na druhou stranu má i výhody, zajistí úplnou hygienizaci kalu a při 90% sušině sníží celkovou produkci čistírenských kalů až na čtvrtinu, což výrazně sníží náklady na manipulaci a přepravu. Provádí se jako předstupeň při spalování kalu. [8]

2.2.2 Složení kalů

Samotné složení kalu závisí na lokálních geografických, klimatických a demografických podmínkách a na zvolené technologii čištění vod a stabilizace kalu. Následující charakteristika složení kalů se týká městských čistíren odpadních vod a nezahrnuje průmyslové odpadní vody, jejichž složení je výrazně ovlivněno typem průmyslu. [7]

Před odvodněním je kal tvořen z více než 90 % vodou. Pevná fáze kalu je suspendována ve vodě a obsahuje zhruba 80 % částic o velikosti nad 0,1 mm a 20 % částic o velikosti pod 0,1 mm. Mnoho částic má charakter koloidní nebo blízký koloidnímu, tudíž mají velkou povrchovou plochu, na kterou se mohou adsorbovat další látky přítomné ve vodě. [6]

Čistírenské kaly obsahují 50-80 % původního znečištění vod. Hlavní příspěvky znečištění jsou patogenní organismy, toxické chemické látky (halogenované organické sloučeniny, polychlorované bifenyly aj.) a těžké kovy (Cu, Cr, Cd, Hg, Pb, Zn). Patogenní mikroorganismy pochází především z exkrementů infikovaných lidí a zvířat. Jedná se zejména o viry, bakterie, protozoa a parazitické červy. [6]

Kalová sušina se skládá ze 60-70 % z organických látek a ze 30-40 % z látek anorganických. [6] Velké zastoupení organických látek naznačuje, že kaly obsahují velké množství organické hmoty, základních živin a stopových prvků vhodné k aplikaci v zemědělství. Obsah organických látek se přibližně stanovuje žiháním sušiny při 550 °C a hmotnostní úbytek představuje mimo látek organických i některé anorganické (NH_4^+ , HCO_3^- apod.). [5,6]

Hodnoty pH čistírenského kalu se pohybují v neutrální až alkalické oblasti. Anaerobně stabilizovaný kal má tmavé zbarvení, které je způsobeno sulfidem železnatým a dalšími nerozpustnými sulfidy těžkých kovů. Z pohledu elementárního složení, mimo uhlík, vodík a kyslík obsažený v biomase z aktivovaného kalu, je v kalu přítomen dusík (3-5 %), fosfor (3-4 %), síra (až 1 %) a chlor (0,1 %). Koncentrace kovů (K, Na a těžké kovy) zpravidla nepřekročí 100 ppm. [5]

2.2.3 Nakládání s kaly

Nakládání s kaly je řízeno právními předpisy, mezi něž patří zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech, zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech, pomocných půdních látkách, pomocných rostlinných přípravcích a substrátech a o agrochemickém zkoušení zemědělských půd a další vyhlášky. V České republice patří mezi hlavní způsoby využití kalů přímá aplikace a rekultivace, kompostování, skládkování a spalování. [8]

Kompostování slouží k výrobě organického hnojiva z biodegradabilních odpadů. Proces kompostování zajišťují mikroorganismy a probíhá za přístupu vzduchu. Aby byl kal použit na kompostování, musí mít vhodné fyzikální, chemické a mikrobiologické vlastnosti. Kompostovatelná směs odpadů, která většinou obsahuje pouze 20 % čistírenského kalu,

musí obsahovat nejméně 70 % organické složky, 55 % vody a pH v rozmezí 5,5-8. Pro správný růst mikroorganismů musí být poměr uhlíku a dusíku 25-30:1. V průběhu kompostování se teplota udržuje nad 55 °C a dochází k přeměně organických látek, což zajišťuje hygienizaci a stabilizaci kalu. [6]

Pro **přímou aplikaci v zemědělství** musí stabilizovaný kal splňovat požadavky na maximální koncentrace rizikových látek, těžkých kovů, organických mikropolutantů a patogenů. Dále musí mít vhodný obsah sušiny, organické složky, nutrientů a vhodnou hodnotu pH. Výhodami využití kalů v zemědělství jsou živiny obsažené v kalech (hlavně dusík a fosfor) a organické látky zvyšující humusový podíl v půdě. Velkou nevýhodou je ale přítomnost organických mikropolutantů a patogenů, které mohou mít negativní vliv na životní prostředí. Stabilizované kaly se díky svému obsahu živin přidávají do rekultivačních směsí používaných k navrácení poškozených či zničených částí krajiny do původního stavu. [6]

Kal obsahuje spalitelné složky a je možné jej **spálit**. Energetický výtěžek spalování kalů výrazně závisí na obsahu kalu a dále pak na technologii spalování. Kal musí být dobře vysušen a měl by obsahovat co nejvíce organické hmoty, což je hlavní tuhá spalitelná složka čistírenského kalu. Při spalování bohužel nedochází ke zneškodnění některých škodlivých látek obsažených v kalu jako např. těžkých kovů. Ty se dostávají do spalin nebo zůstávají v nespalitelné tuhé formě a musí se vyčistit. [6]

Další způsob nakládání s kaly je **skládkování**. V současné době je snaha o maximální recyklaci a minimalizaci ukládání odpadů na skládky. Vyhláška č. 437/2016 Sb. [9] zpřísnuje podmínky skladování a aplikace upravených kalů. [8]

2.3 Příprava vzorků

Kvůli komplexnosti vzorků čistírenského kalu je potřeba vzorky před finální analýzou upravit, což zabírá nejvíce času. Mezi hlavní kroky patří extrakce a následná purifikace a cílem je izolovat pozorovaný analyt od zbytku matrice, která by mohla zkreslovat výsledky analýzy. [10,11]

Analyt obsažený v čistírenském kalu se pomocí extrakčních metod snažíme oddělit od nerozpustné vysokomolekulární části kalu. Analyt se při tomto procesu přesune

do rozpouštědla, ve kterém je rozpustný analyt a v ideálním případě nerozpustné ostatní interferující složky. [10]

Existuje mnoho způsobů, jak extrahovat látky z pevné matrice do rozpouštědla. Mezi nejstarší způsoby patří macerace a digesce neboli vyluhování studeným či horkým rozpouštědlem. Současně používané metody jsou samozřejmě složitější a mnohem efektivnější. Na následujících stránkách je výběr nejpoužívanějších extrakčních technik od klasické Soxhletovy extrakce až po novější techniky, jako je např. QuEChERS.

Čisticí metody jsou v přípravě vzorků nezbytné, protože většina extrakčních metod není dostatečně selektivní. Čistírenský kal je komplexní matrice a obsahuje látky, které by mohly interferovat při analýze. Extrakční techniky jako např. SPE nebo d-SPE mohou sloužit k odstranění těchto interferujících látek. [10]

2.3.1 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce je jedna z nejstarších extrakčních technik přípravy pevných vzorků. Extrakce probíhá v Soxhletově extraktoru, do kterého se vloží pevný vzorek uzavřený v patroně z propustného materiálu. Rozpouštědlo v destilační baňce se zahřívá k varu, jeho páry se kondenzují v kondenzátoru a skapávají na vzorek. Když kapalina v extraktoru dosáhne dostatečné výšky, aktivuje se sifon a kapalina s extrahovanými látkami steče do destilační baňky. [12]

Výhodami Soxhletovy extrakce jsou opakovaný kontakt vzorku s čistým rozpouštědlem, vysoká teplota, za které extrakce probíhá, nebo nepotřeba následné filtrace. Je to jednoduchá technika, která nevyžaduje velké množství praxe a je schopná extrahovat větší množství vzorku než většina ostatních extrakčních technik. Na druhou stranu je velmi náročná na čas a práci a vyžaduje velké množství vzorku a rozpouštědla, což je drahé a neekologické. Vysoká teplota, která může zvýšit výtěžek extrakce, může naopak způsobit rozklad tepelně labilních analytů. [10,12,13]

Klasická Soxhletova extrakce se vyvíjela a existuje řada modifikací, které se snaží přizpůsobit současnému trendu přípravy pevných vzorků, a to zkrácením času extrakce a automatizací. [12] Za zmínku stojí Soxtec, automatizovaná Soxhletova extrakce, která je rychlejší, bezpečnější a díky obnově rozpouštědla ekonomičtější než ta klasická. [13]

2.3.2 Ultrazvuková extrakce

Při extrakci ultrazvukem se využívá ultrazvukových vln o frekvencích nad 20 kHz, tudíž nad hranici slyšitelnosti lidského ucha. Ultrazvukové vlny způsobí v extrakčním rozpouštědle efekt akustické kavitace, který nejvíce přispívá k extrakci. Při akustické kavitaci se v důsledku náhlých změn tlaku v kapalině vytváří, expandují a následně implozivně kolabují kavity, dutinky. Když kavity dosáhnou nestabilní velikosti, prudce implodují a lokálně mohou vytvářet turbulence, vysokorychlostní srážky částic, teploty až 5000 K a tlaky v řádu 50 MPa. [14] Akustická kavitace má za následek mechanickou erozi pevných látek, prasknutí částic, narušení buněk a další efekty, které napomáhají extrakci analytu do rozpouštědla. [11,14]

Ultrazvuková extrakce je alternativou k Soxhletově extrakci. V porovnání s touto metodou je ultrazvuková extrakce rychlejší a spotřebovává méně rozpouštědla. Na druhou stranu je méně reprodukovatelná a vyžaduje následnou filtraci. [10,11,13] Provádí se nejčastěji v ultrazvukové vaně, protože je to nejdostupnější a nejlevnější forma. [11]

2.3.3 Extrakce mikrovlnným zářením

Extrakce mikrovlnným zářením je metoda využívající mikrovlnného záření k zahřátí rozpouštědla, které je v kontaktu se vzorkem. Zvýšená teplota podpoří výtěžek extrakce. Mikrovlnné záření způsobí pohyb iontů a rotaci dipólů. Při pohybu iontů v poli mikrovlnného záření dochází k odporu okolní hmoty, ke tření a zahřívání roztoku. Záření má také za následek rotaci dipólů a tento vynucený pohyb molekul se projeví teplem. Tato metoda vyžaduje rozpouštědlo schopné absorbovat mikrovlnné záření a převést ho na teplo, tedy rozpouštědlo s permanentními dipóly. Použít se mohou ale i směsi rozpouštědel s a bez permanentních dipólů. [11,15]

Mikrovlnná extrakce umožňuje používat malé množství vzorku a extrahovat mnoho vzorků zároveň. V porovnání s dříve zmíněnými extrakčními metodami je tato technika rychlejší a spotřebovává se při ní méně rozpouštědla. Mezi nevýhody patří omezení výběru rozpouštědla, nutný následný filtrační krok a větší finanční náklady na vybavení. [10,11,13]

2.3.4 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PLE)

Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem nebo také PLE (pressurized liquid extraction) používá a zvýšenou teplotu a tlak k zahřátí rozpouštědla nad jeho normální teplotu varu. Zvýšení teploty může zvýšit rozpustnost analytu a rychlost přenosu hmoty. Vysoká teplota

zároveň způsobí snížení viskozity a povrchového napětí rozpouštědla, což umožní rozpouštědлу lépe proniknout do matrice vzorku a zlepšit účinnost extrakce. [13]

Tato extrakční technika využívá malé objemy rozpouštědel, je rychlá, snadno automatizovatelná a schopná zpracovávat více vzorků najednou. Ke zlepšení extrakce můžeme také použít více extrakčních cyklů, ovšem na úkor většího zředění analytu. PLE je velmi efektivní a díky možnosti použití polárních a nepolárních rozpouštědel nebo jejich směsí je aplikovatelná na velkou škálu analytů. Tato metoda není bohužel příliš selektivní a spolu s analyty se často extrahují i interferující složky matrice, tudíž je potřeba po extrakci zahrnout čistící krok. [10,11,13]

2.3.5 Extrakce stlačenou horkou vodou (PHWE)

Extrakce stlačenou horkou vodou funguje na stejném principu jako PLE a jako rozpouštědlo se využívá voda za zvýšené teploty a tlaku. Voda je polární rozpouštědlo, tudíž by se dalo předpokládat, že bude extrahovat hlavně polární analyty. Z některých studií ale vyplývá, že za určité teploty a tlaku je polarita vody blízká polaritě alkoholů, a může tak rozpouštět i středně nebo málo polární analyty. [16] Důležitým faktorem při extrakci je hodnota pH, která může napomáhat extrakci analytů s acidobazickými vlastnostmi. Jejím správným nastavením můžeme podpořit výskyt nabitě formy analytu, která je více rozpustná ve vodné fázi, a tak zvýšit účinnost extrakce. [13]

Nevýhodou PHWE je omezená použitelnost na nepolární analyty a možnost degradace, hydrolýzy nebo oxidace za vysokých teplot. [13] Mezi výhody této metody extrakce patří snadná dostupnost vody, levnost, bezpečnost a obnova či likvidace použité vody bez většího dopadu na životní prostředí. Je to tedy technika šetrná k životnímu prostředí, jelikož snižuje použití organických rozpouštědel. [10]

2.3.6 Extrakce na pevné fázi dispergované s matricí (MSPDE)

MSPD extrakce je technika vhodná pro komplexní matrice, jako je právě čistírenský kal, protože zahrnuje současně extrakci i čistící krok. [11] Vzorek se rozele a zhomogenizuje s přidaným dispergačním činidlem (abrazivní pevná látka), vloží se do patrony či kolonky a stlačí se. Analyty se extrahují vhodným elučním rozpouštědlem. Rozemletí s abrazivní pevnou látkou způsobí mechanické narušení struktury matrice, a tudíž lepší extrakci analytů. [10,17] Jako dispergační činidlo se používá lipofilní sorbent, nejčastěji oxid křemičitý s navázaným oktadecylem nebo oktylem. Dále se používají nederivatizovaný oxid křemičitý, písek, syntetické polymery, Florisil nebo grafitová vlákna.

Tyto sorbenty mají i čisticí funkci a zabraňují extrakci některých interferujících látek. Výběr elučního rozpouštědla závisí na povaze pevného materiálu, nejčastěji to jsou směsi organických rozpouštědel, ale v některých případech můžeme použít i vodu. [17]

Tato extrakční metoda je rychlá, jednoduchá, levná, flexibilní, nenáročná na manuální práci a spotřebovává malé množství rozpouštědel. Díky velkému výběru sorbentů a elučních rozpouštědel je vhodná pro širokou škálu analytů a matric. MSPDE poskytuje dobré výsledky i při pokojové teplotě a atmosférickém tlaku a v závislosti na povaze analytu a detekční metodě může a nemusí vyžadovat další čisticí krok. [10]

2.3.7 QuEChERS extrakce

Metoda QuEChERS v sobě zahrnuje extrakční i čisticí krok. Název metody je akronym složený z počátečních písmen anglických slov: rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní a bezpečný. Metoda byla původně použita pro stanovení reziduí pesticidů v ovoci a zelenině a byla vyvinuta za účelem snížení spotřeby rozpouštědel, finančních nákladů, času a práce v laboratoři za současného zachování kvalitních výsledků. Následující popis postupu QuEChERS extrakce je z této původní publikace. [18]

K 10 g zhomogenizovaného vzorku přidáme 10 ml acetonitrilu, který se ze tří studovaných rozpouštědel (acetonitril, aceton a ethylacetát) ukázal jako nejúčinnější extrakční činidlo. Poté vzorek protřepeme 1 minutu na vortexu a přidáme k němu 4 g bezvodého síranu hořečnatého a 1 g chloridu sodného. Bezprostředně poté promícháme 1 minutu na vortexu, aby nedošlo k tvorbě $MgSO_4$ konglomerátů. Následně vzorek zcentrifugujeme 5 minut při 5000 rpm. Odebereme 1 ml horní vrstvy acetonitrilu a přidáme jej k 25 mg PSA (primární – sekundární amin) a 150 mg $MgSO_4$. 30 sekund protřepeme a poté centrifugujeme 1 minutu při 6000 rpm. Odebereme 0,5 ml extraktu k analýze GC/MS. [18]

NaCl se přidává k iniciaci rozdělení organické a vodné fáze a bezvodý $MgSO_4$ má schopnost vázat velké množství vody. Obě soli způsobí tzv. vysolovací efekt, nasytí vodnou fází a polární sloučeniny přejdou do organické fáze acetonitrilu. Hydratace $MgSO_4$ je vysoce exotermický proces, vzorek se zahřeje až na 40-45 °C, což zvýší výtěžnost extrakce zvláště nepolárních sloučenin. [18]

$MgSO_4$ se podruhé přidává pro vysušení zbylé vody, která by mohla ovlivnit separaci na disperzní tuhé fázi a v plynové chromatografii. Odstraněním vody se acetonitrilová fáze stane méně polární, což může způsobit vysrážení některých polárních koextrahovaných

látek. PSA se přidává jako sorbent pro extrakci na disperzní tuhé fázi. Funguje jako slabý aniont, tudíž váže anionty, ale může se vázat i vodíkovými můstky. Zachytává mastné kyseliny, další organické kyseliny, sacharidy a pigmenty. [18]

2.3.8 Extrakce tuhou fází (SPE)

Extrakce tuhou fází, dále jen SPE (z anglického solid phase extraction), je separační technika, která se používá pro přípravu vzorků, konkrétně pro izolaci, přečištění či zakoncentrování analytu. [19]

SPE se provádí nejčastěji v SPE kolonkách, které jsou naplněny stacionární fází. Při průchodu kapalného vzorku kolonkou jsou látky sorbovány na tuhé fázi. Látky, které nevykazují afinitu k dané tuhé fázi, projdou kolonkou nezachyceny a dojde tak k rozdělení vzorku. Látky zachycené ve stacionární fázi se poté vymyjí z kolonky elučním rozpouštědlem. [19]

Separace na nepolární fázi jsou takové, kde je mobilní fáze polárnější než stacionární. Nepolární až středně polární analyty se zachycují na stacionární fázi nepolárními interakcemi, tj. van der Waalsovými nebo disperzními interakcemi. Jako sorbent se nejvíce používá modifikovaný silikagel, který má na sobě navázány nepolární skupiny, nejčastěji oktadecyl nebo oktyl. [19,20]

U separací na normální fázi je stacionární fáze polárnější než obrácená. Polární analyt je ke stacionární fázi zachycován vodíkovými vazbami, π - π interakcemi nebo interakcemi typu dipól – dipól a dipól – indukovaný dipól. Na silikagel jsou navázány polární skupiny jako kyanopropyl, aminopropyl a 3-(2,3-dihydroxypropoxy)propyl, tzv. diol. [19,20]

Iontově výměnné fáze se používají pro separaci nabitých analytů a dělí se na anexy a katexy. Stacionární fáze anexů je kladně nabitá a elektrostatickými silami přitahuje záporně nabité analyty. Jako sorbent se používá silikagel s navázaným aminopropylem nebo trimethylamoniumpropylem. Katexy jsou záporně nabitě a zachycují kladně nabitě analyty. Na silikagel jsou navázány benzensulfonová kyselina nebo karboxypropyl. U iontově výměnné fáze je důležité nastavit pH tak, aby zároveň analyt i vázaná skupina byly nabitě. [19,20]

SPE můžeme provádět třemi různými metodami. U selektivní extrakce je zachytáván buď analyt nebo nečistoty. Pokud je zachytáván analyt, po průchodu vzorku ho vyeluujeme z kolonky. Pokud jsou zachytávány nečistoty, sbíráme procházející vzorek s analytem.

U selektivního vymývání se na stacionární fázi zachytávají analyt i nečistoty. Nečistoty poté vymyjeme rozpouštědlem, které není dost silné, aby vymylo analyt. U selektivní eluce se zachytí rovněž analyt i nečistoty a poté se selektivně eluuje pouze analyt. [20]

SPE kolonku musíme před začátkem extrakce kondicionovat. Kondicionaci provádíme pro optimální adsorpci vzorku. Rozpouštědlo volíme podle typu fáze a používá se objem kolonky. Vzorek aplikujeme bezprostředně po kondicionaci, aby sorbent nevyschl. Průchod vzorku přes kolonku můžeme realizovat za normálního nebo sníženého tlaku a je nutné dbát na to, abychom nepřekročili kapacitu stacionární fáze. Pokud se na kolonce zachytává analyt, kolonku po průchodu vzorku promyjeme pro odstranění slabě vázaných látek. Používáme rozpouštědlo, ve kterém byl rozpuštěn vzorek, anebo takové, které nevymyje analyt. Zachycený analyt eluujeme malým množstvím elučního rozpouštědla, čímž vzorek zároveň zakoncentrujeme. [20]

2.3.9 Extrakce disperzní tuhou fází (d-SPE)

Extrakce disperzní tuhou fází je velmi jednoduchá čistící technika, která využívá přidání adsorbentu k extraktu pro odstranění interferujících látek. K adsorbentu se přidá extrakt, směs se promíchá a poté se oddělí centrifugací či filtrací. [18] Jako adsorbenty se používají nejčastěji PSA (primární sekundární amin) k odstranění polárních kyselin a pigmentů, cukrů a mastných kyselin, GCB (gravitované saze) k odstranění sterolů a pigmentů), Florisil, oxid hlinitý a silikagel pokrytý C18 (oktadecyl) k odstranění nepolárních sloučenin, např. lipidů. [21,22] K adsorbentu se přidává také bezvodý síran hořečnatý k odstranění zbylé vody a pro lepší vyčištění extraktu. [18,21]

V porovnání s SPE je tato metoda rychlejší, jednodušší a spotřebovává se při ní menší množství adsorbentu. Není potřeba kondicionování, sorbent nemůže vyschnout, ale naopak interaguje rovnoměrně s matricí a je dosaženo větší kapacity na miligram sorbentu. Tato metoda také umožňuje libovolné kombinování sorbentů v jakémkoli množství. [18]

2.4 Stanovení metodou HPLC/MS

Kapalinová chromatografie (LC) je separační technika používaná k rozdělení látek směsi na základě jejich odlišných afinit ke stacionární a mobilní fázi. Vzorek je nastříknut na kolonu, kde je unášen kapalnou mobilní fází. Látky, které jsou více zadržovány

ve stacionární fázi, budou mít delší retenční čas, z kolony se budou eluovat později, a tudíž dojde k separaci. [23]

HPLC technika byla poprvé představena v roce 1970 jako vysokotlaká kapalinová chromatografie. C. Horváth použil vysokotlaká čerpadla a zesílené náplňové kolony k vytvoření vysokých tlaků. Dnes se u HPLC používá vylepšená instrumentace, větší tlaky a menší částice stacionární fáze vedoucí k účinnějším separacím, tudíž se metoda přejmenovala na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. [23]

Hmotnostní spektrometrie (MS) je technika kvalitativní i kvantitativní analýzy. Látky rozdělené kapalinovou chromatografií jsou ve spektrometru zplyněny a v ionizačním zdroji převedeny na ionty. V hmotnostním analyzátoru jsou ionty rozděleny podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) a poté jsou zaznamenány v detektoru. [23]

HPLC/MS může být použita pro většinu organických látek a umožňuje i analýzu látek, které by bylo obtížné analyzovat pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). U kapalinové chromatografie není potřeba dodat velké množství tepla, aby se vzorek převedl na plyn. To umožňuje analýzu velkých, polárních, iontových, termálně nestabilních i netěkavých látek, které by se pomocí GC/MS analyzovat nedaly. [24]

Na spolehlivost analýzy HPLC/MS mají negativní vliv matriční efekty. Matriční efekty způsobují látky přítomné v matici vzorku, které koeluují s analytem, a mohou způsobovat zvýšení či snížení efektivity tvorby iontů analytu v elektrospreji. [25]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a přístroje

Deionizovaná voda, Direct-Q® Water Purification system, Millipore

Acetonitril, CHROMASOLV™, Gradient for HPLC, gradient grade, >= 99,9%, Honeywell Riedel-de Haën™

Kyselina mravenčí, 85%, p.a., PENTA s.r.o.

Kyselina o-fosforečná, 85%, p.a., PENTA s.r.o.

Kyselina chlorovodíková, 37%, ACS Reagent, Honeywell Fluka™

Methanol, CHROMASOLV™, for HPLC, gradient grade, >= 99,9%, Honeywell Riedel-de Haën™

Hydroxid sodný, pecky, p.a., PENTA s.r.o.

Amoniak vodný roztok 25-29%, p.a., PENTA s.r.o.

Chlorid sodný, p.a., Lachema Brno, Chemapol Praha

Síran hořečnatý bezvodý, Lachema Brno

Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing, Supelco, Sigma-Aldrich

SPE kolona: Oasis HLB 6cc, 200 mg

SPE kolona: Oasis MAX 3cc, 60 mg

Ultrazvuková čistička Elmasonic S40H

LC kolona: Kinetex ® 100 x 2,1 mm, 1,7 µm XB-C18 100 A (Phenomenex)

Kapalinový chromatograf: Waters Acquity UPLC I- Class spojený s hmotnostním spektrometrem (Xevo TQ-S)

Standardy:

Ampicilin – ChemCruz™

Chloramfenikol – ChemCruz™

Klindamycin – Clindamycine hydrochloride monohydrate, ChemCruz™

Erythromycin – ChemCruz™

Linezolid – ChemCruz™

Nitrofurantoin – Toronto Research Chemicals

Ofloxacin – SIGMA-ALDRICH spol. s.r.o.

Penicilin G – Penicillin G potassium salt, Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Penicilin V – Penicillin V potassium, ChemCruz™

Sulfamethoxazol – SIGMA-ALDRICH spol. s.r.o.

Teicoplanin – Teicoplanin A2 mixture of 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, Toronto Research Chemicals

Tigecyklin – Toronto Research Chemicals

Tetracyklin – ChemCruz™

Vankomycin – Vancomycin hydrochloride, ChemCruz™

Značené vnitřní standardy:

Ampicillin-d₅ – Toronto Research Chemicals

Chloramphenicol-d₅ – Toronto Research Chemicals

Clindamycin-d₃ Hydrochloride – Toronto Research Chemicals

Erythromycin-¹³C₃ – Toronto Research Chemicals

Linezolid-d₃ – Toronto Research Chemicals

Nitrofurantoin-¹³C₃ – Toronto Research Chemicals

Ofloxacin-d₃ – SIGMA-ALDRICH spol. s.r.o.

Penicillin G-d₇ Potassium Salt – Toronto Research Chemicals

Penicillin V-d₅ – Toronto Research Chemicals

Sulfamethoxazole-(phenyl-¹³C₆) – SIGMA-ALDRICH spol. s.r.o.

Tigecycline-d₉ – Toronto Research Chemicals

Tetracycline-d₆ (80%) – Toronto Research Chemicals

Vzorky kalů byly odebírány z ČOV Olomouc a zmrazeny při teplotě -80 °C.

3.2 Analýza HPLC/MS

K analýze vzorků byl použit kapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC I-Class spojený s hmotnostním spektrometrem (Xevo TQ-S) a ke zpracování dat byl použit program MassLynx 4.1. Separace na chromatografické koloně probíhala za laboratorní teploty, objem nástřiku vzorku byl 25 µl a byla provedena gradientová eluce podle Tab. I. Jako mobilní fáze A (MF A) byla použita deionizovaná voda s 0,5 % kyseliny mravenčí. Mobilní fáze B byl methanol s 0,5 % kyseliny mravenčí. Rychlost průtoku byla 0,250 ml/min. NFR, CHL a TCP byly analyzovány v negativním módu ionizace, zbytek analytů v kladném módu ionizace. Stanovení bylo provedeno metodou vnitřního standardu.

Tabulka I: Složení mobilní fáze v průběhu HPLC

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0	95	5
3,5	95	5
5	0	100
5,1	0	100
6,5	95	5

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Zásobní roztoky standardů

Zásobní roztoky standardů CHL, CLD, ERT, LNZ, NFR, OFL, PNG, PNV, SFM, TGC, TTC byly připraveny rozpuštěním 5 mg standardu v 5 ml methanolu. Zásobní roztoky standardů AMP, TCP, VNC byly připraveny rozpuštěním 5 mg standardu v 5 ml vody. Všechny zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml a dále podle potřeby ředěny.

3.3.2 UAE následovaná SPE na HLB sorbentu

Bylo připraveno 500 ml dvou roztoků. Roztok A o hodnotě pH 2 byl připraven smícháním 500 ml kyseliny fosforečné naředěné na koncentraci 0,14 mol/l a 5 ml 20% (w/w) hydroxidu sodného. Roztok B o hodnotě pH 10 byl připraven smícháním 500 ml vody a 750 µl koncentrovaného amoniaku.

Spikovací roztok o objemu 5 ml byl připraven ředěním zásobních roztoků standardů tak, aby standardy NFR, TCP, TGC byly v roztoku obsaženy v koncentraci 1000 ng/ml, standardy AMP, CHL, PNG, PNV, VNC v koncentraci 500 ng/ml a standardy CLD, ERT, LNZ a TTC v koncentraci 50 ng/ml. K ředění byl použit methanol.

Do 18 centrifugačních zkumavek bylo naváženo 500 mg kalu. K těmto 18 vzorkům bylo přidáno 2,5 ml roztoku A (vzorky P1 až P9) nebo 2,5 ml roztoku B (vzorky N1 až N9). Vzorky P1 až P9 byly upraveny 40 µl koncentrované kyseliny chlorovodíkové na pH 2 a vzorky N1 až N9 byly upraveny 100 µl amoniaku na pH 10. Ke všem vzorkům bylo přidáno 3,3 ml acetonitrilu. Vzorky byly dány na 30 minut do ultrazvukové lázně o teplotě 30 °C a následně na 5 minut do centrifugy na 14000 rpm. Po centrifugaci bylo odebráno 3,5 ml supernatantu do PP nádobek a vzorky P4, P5, P6, N4, N5, a N6 byly spikovány 50 µl spikovacího roztoku. Ke vzorkům bylo přidáno 35 ml roztoku A (vzorky P1 až P9) nebo 35 ml roztoku B (vzorky N1 až N9).

Pro SPE byly použity kolonky Oasis HLB 200 mg a byla realizována za sníženého tlaku. Ke kondicionaci kolonek bylo použito 5 ml methanolu. K ekvilibraci kolonek se použilo 2 ml vody a 5 ml roztoku A (vzorky P1 až P9) nebo jen 5 ml vody (vzorky N1 až N9). Následoval průchod vzorku a promytí kolonky buď vodou, nebo směsí methanolu ve vodě podle Tab. II. Eluce byla provedena 2 ml methanolu. Ke vzorkům P7, P8, P9, N7, N8 a N9 bylo přidáno 50 µl spikovacího roztoku a všechny vzorky byly odpařeny dosucha pod proudem dusíku. Před HPLC/MS byly vzorky rozpuštěny v 0,5 ml methanolu se značenými standardy.

Tabulka II: Promývání vzorků po SPE

Název vzorku	P1, N1	P2, N2	P3, N3	P4, N4	P5, N5	P6, N6	P7, N7	P8, N8	P9, N9
Promytí po SPE	voda	15% metanol	25% metanol	voda	15% metanol	25% metanol	voda	15% metanol	25% metanol

3.3.3 UAE následovaná SPE na MAX a HLB sorbentech

Fosfátový pufr o hodnotě pH 2 byl připraven smícháním 500 ml kyseliny fosforečné naředěné na koncentraci 0,14 mol/l a 7,5 ml 20% (w/w) hydroxidu sodného.

Spikovací roztok byl připraven stejným způsobem jako v předchozí kapitole.

Do PP nádoby byly naváženy 4 g kalu. Ke kalu bylo přidáno 20 ml fosfátového pufru (pH 2), 40 µl koncentrované kyseliny chlorovodíkové na úpravu pH na hodnotu 2 a 27 ml acetonitrilu. Kal byl dán na 30 minut do ultrazvukové lázně o teplotě 30 °C. Poté byl extrakt rozdělen do centrifugačních zkumavek, které se daly na 5 minut do centrifugy na 14000 rpm. Po centrifugaci bylo do 8 zkumavek odebráno 3,5 ml supernatantu a vzorky BL7, MAX7, HLB7 a AN7 byly upraveny roztokem hydroxidu sodného na pH o hodnotě 7. Ke vzorkům MAX7 a MAX2 bylo přidáno 50 µl spikovacího roztoku.

Pro první SPE byly použity kolonky Oasis MAX 60 mg a byla realizována za sníženého tlaku. Ke kondicionaci kolonek byl použit 1 ml acetonitrilu. K ekvilibraci bylo použito 3 ml fosfátového pufru o pH 2 (vzorky BL2, MAX2, HLB2, AN2) nebo fosfátového pufru upraveného na pH 7 (vzorky BL7, MAX7, HLB7, AN7). Následoval průchod a zachycení vzorků. Vzorky byly zředěny vodou na 35 ml a vzorky BL2, MAX2, HLB2, AN2 byly upraveny na pH o hodnotě 7. Ke vzorkům HLB7 a HLB2 bylo přidáno 50 µl spikovacího roztoku.

Pro druhou SPE byly použity kolonky Oasis HLB 200 mg a byla realizována za sníženého tlaku. Ke kondicionaci kolonek bylo použito 5 ml methanolu a k ekvilibraci 5 ml vody. Následoval průchod vzorku a promytí kolonky 10 ml vody. Eluce byla provedena 2 ml methanolu. Ke vzorkům AN7 a AN2 bylo přidáno 50 µl spikovacího roztoku a všechny vzorky byly odpařeny dosucha pod proudem dusíku. Před HPLC/MS byly vzorky rozpuštěny v 0,5 ml methanolu se značenými standardy.

3.3.4 Extrakce QuEChERS

Roztok A o hodnotě pH 2 byl připraven smícháním 100 ml kyseliny fosforečné naředěné na koncentraci 0,14 mol/l a 1 ml 20% (w/w) hydroxidu sodného. Roztok B o hodnotě pH 10 byl připraven smícháním 100 ml vody a 150 µl koncentrovaného amoniaku.

Spikovací roztok o objemu 5 ml byl připraven ředěním zásobních roztoků standardů tak, aby standardy NFR, TCP, TGC byly v roztoku obsaženy v koncentraci 500 ng/ml, standardy AMP, CHL, PNG, PNV, VNC v koncentraci 250 ng/ml a standardy CLD, ERT, LNZ a TTC v koncentraci 25 ng/ml. K ředění byl použit methanol.

Do 8 centrifugačních zkumavek bylo naváženo 500 mg kalu. K těmto 8 vzorkům bylo přidáno 2,5 ml roztoku A (vzorky QBLA, Q0A, Q1A, Q2A) nebo 2,5 ml roztoku B (vzorky QBLB, Q0B, Q1B, Q2B). Vzorky QBLA, Q0A, Q1A, Q2A byly upraveny 40 µl koncentrované kyseliny chlorovodíkové na pH 2 a vzorky QBLB, Q0B, Q1B, Q2B byly upraveny 100 µl amoniaku na pH 10. Ke všem vzorkům bylo přidáno 2,5 ml acetonitrilu. Vzorky Q0A a Q0B byly spikovány 167 µl spikovacího roztoku. Vzorky byly dány na 30 minut do ultrazvukové lázně o teplotě 30 °C a následně k nim byl přidán 1 g bezvodého síranu hořečnatého a 0,25 g chloridu sodného. Po zamíchání na vortexu se zkumavky na 5 minut daly do centrifugy na 14000 rpm. Z horní acetonitrilové vrstvy bylo odebráno 1,8 ml a vzorky Q1A a Q1B byly spikovány 120 µl spikovacího roztoku. Ke vzorkům bylo přidáno 50 mg PSA a 300 mg bezvodého, následoval vortex a centrifugace. Do eppendorfek bylo odebráno 1,2 ml supernatantu, vzorky Q2A a Q2B byly spikovány 80 µl spikovacího roztoku a všechny vzorky byly odpařeny dosucha pod proudem dusíku. Před HPLC/MS byly vzorky rozpuštěny v 0,5 ml methanolu se značenými standardy.

3.3.5 SPE na MAX sorbentu následovaná QuEChERS

Fosfátový pufr o hodnotě pH 2 byl připraven podle stejného postupu jako roztok A v předchozí kapitole.

Spikovací roztok o objemu 5 ml byl připraven ředěním zásobních roztoků standardů tak, aby standardy NFR, TCP, TGC byly v roztoku obsaženy v koncentraci 500 ng/ml, standardy AMP, CHL, PNG, PNV, VNC, SFM, OFL v koncentraci 250 ng/ml a standardy CLD, ERT, LNZ a TTC v koncentraci 25 ng/ml. K ředění byl použit methanol.

Do PP nádoby bylo naváženo 5 g kalu. Ke kalu bylo přidáno 25 ml fosfátového pufru, 100 µl koncentrované kyseliny chlorovodíkové na úpravu pH na hodnotu 2 a 33 ml acetonitrilu. Kal byl dán na 30 minut do ultrazvukové lázně o teplotě 30 °C. Poté byl extrakt rozdělen do centrifugačních zkumavek, které se daly na 5 minut do centrifugy na 14000 rpm. Po centrifugaci bylo do 10 zkumavek odebráno 4,4 ml supernatantu a vzorky BLC7, MTC7, MXC7, QRC7 a PUC7 byly upraveny roztokem hydroxidu sodného na pH o hodnotě 7. Ke vzorkům MTC7 a MTC2 bylo přidáno 208 µl spikovacího roztoku.

Pro SPE byly použity kolonky Oasis MAX 60 mg a byla realizována za sníženého tlaku. Ke kondicionaci kolonek byl použit 1 ml acetonitrilu. K ekvilibraci bylo použito 3 ml fosfátového pufru o pH 2 (vzorky BLC2, MTC2, MXC2, QRC2 a PUC2) nebo fosfátového pufru upraveného na pH 7 (vzorky BLC7, MTC7, MXC7, QRC7 a PUC7). Následoval průchod a zachycení vzorků. Ke vzorkům MXC7 a MXC2 bylo přidáno 208 µl spikovacího roztoku.

Poté byl do zkumavek přidán 1 g bezvodého síranu hořečnatého a 0,25 g chloridu sodného. Po zamíchání na vortexu se zkumavky na 5 minut daly do centrifugy na 14000 rpm. Z horní acetonitrilové vrstvy bylo odebráno 1,8 ml a vzorky QRC7 a QRC2 byly spikovány 150 µl spikovacího roztoku. Ke vzorkům bylo přidáno 50 mg PSA a 300 mg bezvodého síranu hořečnatého, následoval vortex a centrifugace. Do eppendorfek bylo odebráno 1,2 ml supernatantu, vzorky PUC7 a PUC2 byly spikovány 100 µl spikovacího roztoku a všechny vzorky byly odpařeny dosucha pod proudem dusíku. Před HPLC/MS byly vzorky rozpuštěny v 0,5 ml methanolu se značenými standardy.

3.3.6 SPE na HLB sorbentu následovaná QuEChERS

Fosfátový pufr o hodnotě pH 2 byl připraven podle postupu pro roztok A v kapitole 3.3.4.

Spikovací roztok byl připraven podle postupu v kapitole 3.3.5.

Do PP nádoby bylo naváženo 5 g kalu. Ke kalu bylo přidáno 25 ml fosfátového pufru, 40 µl koncentrované kyseliny chlorovodíkové na úpravu pH na hodnotu 2 a 33 ml

acetonitrilu. Kal byl dán na 30 minut do ultrazvukové lázně o teplotě 30 °C. Poté byl extrakt rozdělen do centrifugačních zkumavek, které se daly na 5 minut do centrifugy na 14000 rpm. Po centrifugaci bylo do 10 PP nádobek odebráno 4,4 ml supernatantu a zředěno vodou na 35 ml. Vzorky HQBN, HQ0N, HQ1N, HQ2N a HQ3N byly upraveny roztokem hydroxidu sodného na pH o hodnotě 7 a vzorky HQBA, HQ0A, HQ1A, HQ2A a HQ3A byly upraveny kyselinou chlorovodíkovou na pH o hodnotě 2. Ke vzorkům HQ0N a HQ0A bylo přidáno 208 µl spikovacího roztoku.

Pro SPE byly použity kolonky Oasis HLB 200 mg a byla realizována za sníženého tlaku. Ke kondicionaci kolonek byl použit 5 ml methanolu. K ekvilibraci bylo použito 5 ml vody upravené na pH 2 (vzorky HQBA, HQ0A, HQ1A, HQ2A a HQ3A) nebo 5 ml vody (vzorky HQBN, HQ0N, HQ1N, HQ2N a HQ3N). Následoval průchod vzorků a promytí kolonek vodou o hodnotě pH 2 nebo 7. K eluci bylo použito 2,5 ml acetonitrilu. Ke vzorkům HQ1N a HQ1A bylo přidáno 208 µl spikovacího roztoku.

Poté bylo do zkumavek přidáno 2,5 ml vody, 1 g bezvodého síranu hořečnatého a 0,25 g chloridu sodného. Po zamíchání na vortexu se zkumavky na 5 minut daly do centrifugy na 14000 rpm. Z horní acetonitrilové vrstvy bylo odebráno 1,5 ml a vzorky HQ2N a HQ2A byly spikovány 125 µl spikovacího roztoku. Ke vzorkům bylo přidáno 50 mg PSA a 300 mg bezvodého síranu hořečnatého, následoval vortex a centrifugace. Do eppendorfek bylo odebráno 0,7 ml supernatantu, vzorky HQ3N a HQ3A byly spikovány 58,3 µl spikovacího roztoku a všechny vzorky byly odpařeny dosucha pod proudem dusíku. Před HPLC/MS byly vzorky rozpuštěny v 0,5 ml methanolu se značenými standardy.

3.3.7 Stanovení analytů v reálných vzorcích kalů

Fosfátový pufr o hodnotě pH 2 byl připraven podle postupu pro roztok A v kapitole 3.3.4.

Roztok se značenými vnitřními standardy o objemu 10 ml byl připraven ředěním značených vnitřních standardů acetonitrilem na příslušnou koncentraci standardu. NFR – 500 ng/ml, TGC a CHL – 100 ng/ml, PNV a AMP – 50 ng/ml, PNG – 25 ng/ml, LNZ a ERT – 7,5 ng/ml, TTC – 2,5 ng/ml, CLD – 0,5 ng/ml.

Do 22 centrifugačních zkumavek bylo naváženo 100 mg reálných vzorků kalů. Ke vzorkům bylo přidáno 2,5 ml fosfátového pufru, 3,2 ml acetonitrilu a 100 µl roztoku značených vnitřních standardů. Vzorky byly dány na 30 minut do ultrazvukové lázně

o teplotě 30 °C a poté se daly na 5 minut do centrifugy na 14000 rpm. Po centrifugaci bylo odebráno 4,4 ml supernatantu.

Dále byla prováděna SPE na MAX sorbentech a QuEChERS extrakce podle postupu pro pH 2 popsaného v kapitole 3.3.5. Standardy ani značené standardy už přidávány nebyly.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 UAE následovaná SPE na HLB sorbentu

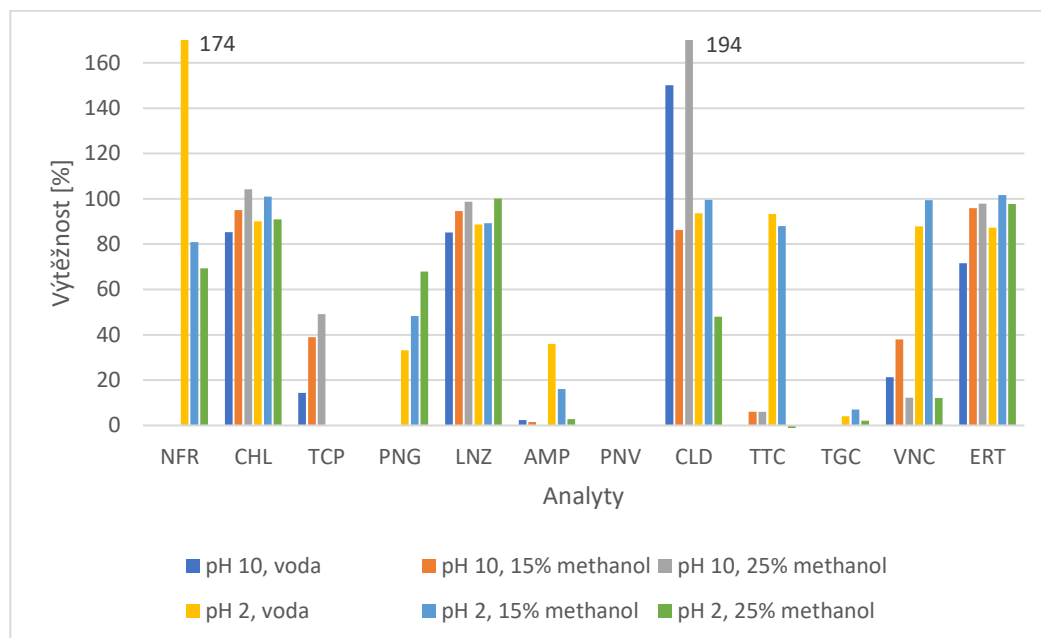
V tomto experimentu byla na vzorky aplikována extrakce ultrazvukem a SPE. Vzorky byly extrahovány buď v kyselém, nebo zásaditém prostředí směsi vodného roztoku a acetonitrilu. Při SPE byly kolonky promývány buď vodou, 15%, nebo 25% směsí methanolu ve vodě (v/v). Matriční efekty (M.E.) byly stanoveny jako podíl ploch píků značených vnitřních standardů ve vzorcích spikovaných před analýzou HPLC/MS a ploch píků značených vnitřních standardů v QC vzorcích (neobsahují matici). Z ploch píků analytů ve vzorcích spikovaných před a po SPE se spočítala výtěžnost SPE pro daný analyt podle vzorce č. 1.

$$R_{SPE} = \frac{\frac{A_A(P4)}{A_{IS}(P4)} \cdot \frac{A_A(P1)}{A_{IS}(P1)}}{\frac{A_A(P7)}{A_{IS}(P7)} \cdot \frac{A_A(P1)}{A_{IS}(P1)}} \quad (1)$$

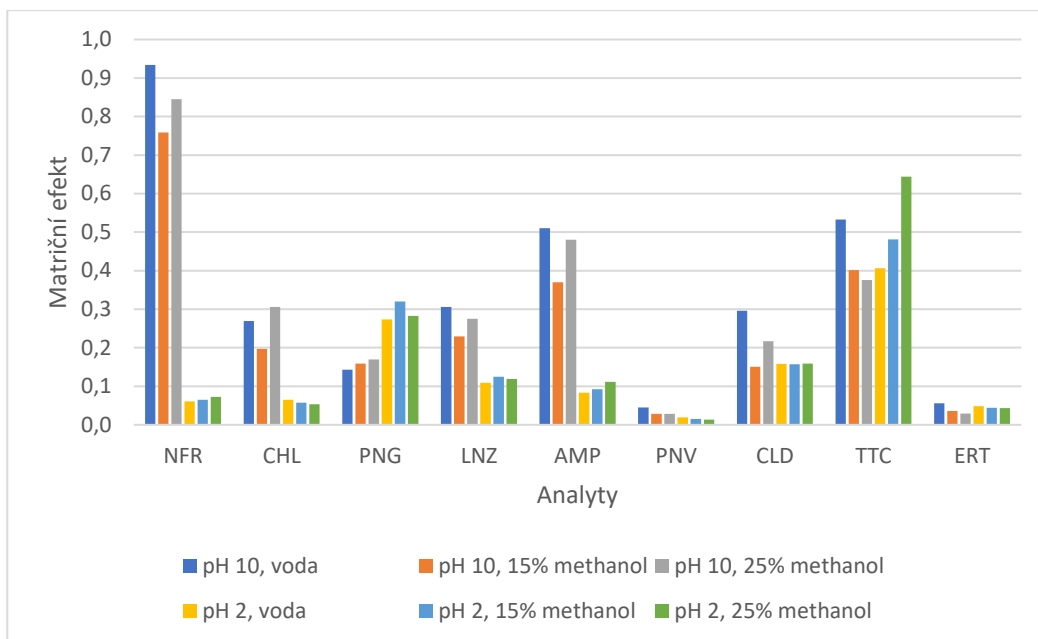
R_{SPE} ...výtěžnost SPE, konkrétně pro pH 2 a promývání vodou

A_A ...plocha píku analytu

A_{IS} ...plocha píku značeného standardu příslušného analytu



Obrázek 1: Výtěžnost SPE



Obrázek 2: Matriční efekty

U NFR a AMP byly v zásaditém prostředí uspokojivé maticové efekty, ale nízká výtěžnost SPE, v kyselém prostředí to bylo naopak. U CHL a LNZ byly dobré výtěžnosti i v kyselém i v zásaditém prostředí, M.E. byly nižší v prostředí zásaditém. U PNG byly v kyselém prostředí dobrá výtěžnost a uspokojivý M.E. U CLD a TTC byly v kyselém prostředí dobrá výtěžnost a uspokojivý M.E. U TGC byla špatná výtěžnost u obou hodnot pH, výsledky matričních efektů nebyly spolehlivé. U ERT byly dobrá výtěžnost, ale silné M.E. v obou prostředích. PNV měl vysoké M.E., v kyselině se zřejmě rozložil a ani v zásaditém prostředí vůbec nešlo vidět jeho signál. TCP měl lepší výtěžnosti v zásaditém prostředí, VNC zase v kyselém. Matriční efekty u těchto dvou látek nebylo možné stanovit, protože pro ně nebyly značené standardy.

Výtěžnosti byly vesměs lepší v kyselém prostředí s výjimkou TCP. Promývání kolonek směsí methanolu s vodou nebylo celkově přínosné, nepomohlo to zlepšit M.E., u některých látek to zvýšilo výtěžnost, u jiných naopak snížilo. Bylo potřeba snížit množství interferujících složek matrice ve vzorcích, proto bylo přikročeno ke zkoušení dalších způsobů extrakce.

4.2 UAE následovaná SPE na MAX a HLB sorbentech

V tomto experimentu byly na vzorky aplikovány extrakce ultrazvukem a dvě extrakce tuhou fází buď v kyselém, nebo v neutrálním prostředí. Extrakce probíhala ve směsi

fosfátového pufru a acetonitrilu. Výtěžnost obou SPE byla stanovena stejným způsobem jako v předchozím experimentu. Matriční efekty byly stanoveny podle vzorce č. 2.

$$M.E. = \frac{\frac{A_A(AN)}{A_{IS}(AN)} \cdot \frac{A_A(BL)}{A_{IS}(BL)}}{\frac{c_A(AN)}{\frac{A_A(QC)}{A_{IS}(QC)}}} \quad (2)$$

A_A...plocha píku analytu

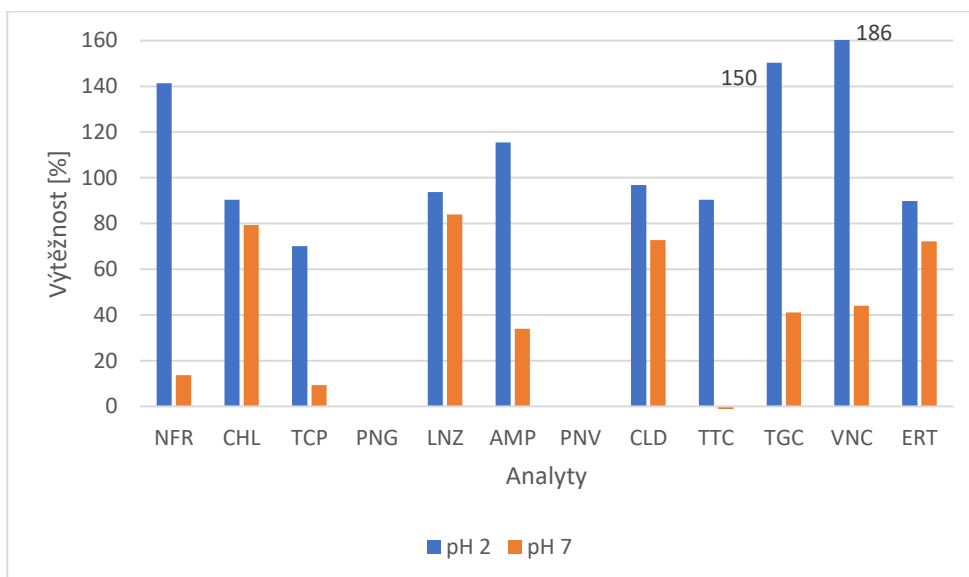
A_{IS}...plocha píku značeného standardu příslušného analytu

c_A...koncentrace analytu

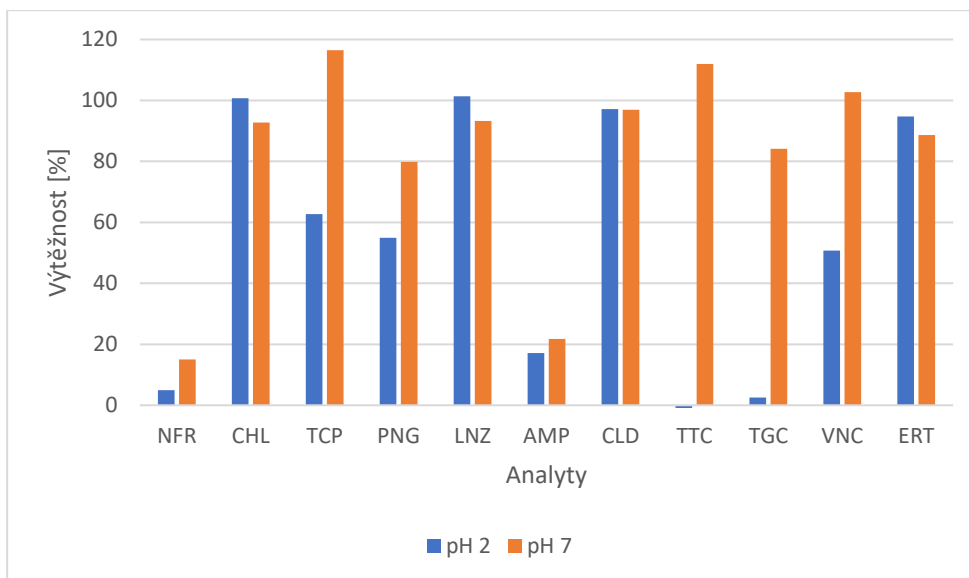
AN...vzorek spikovaný na konci

BL...blank

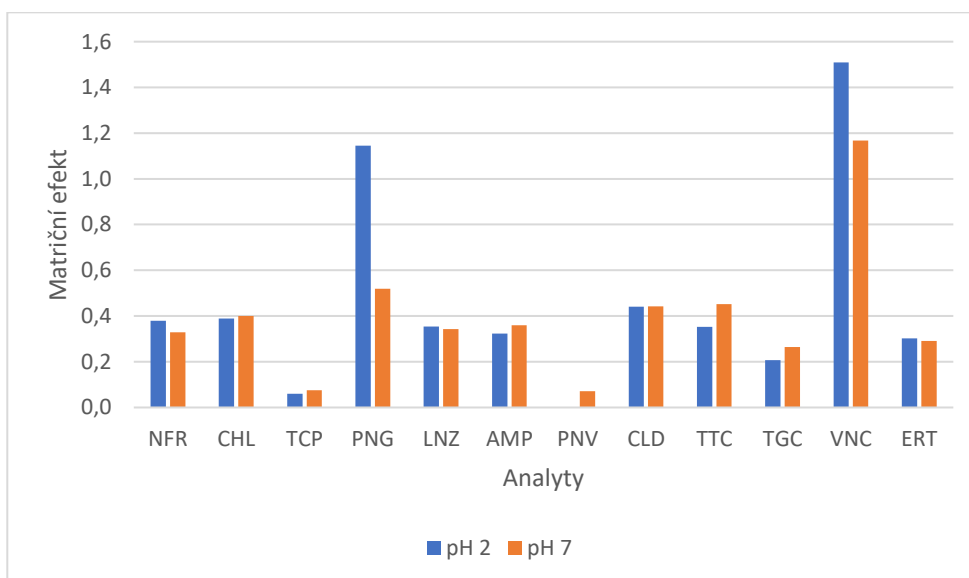
QC...QC vzorek



Obrázek 3: Výtěžnost SPE na MAX sorbentu



Obrázek 4: Výtěžnost SPE na HLB sorbentu



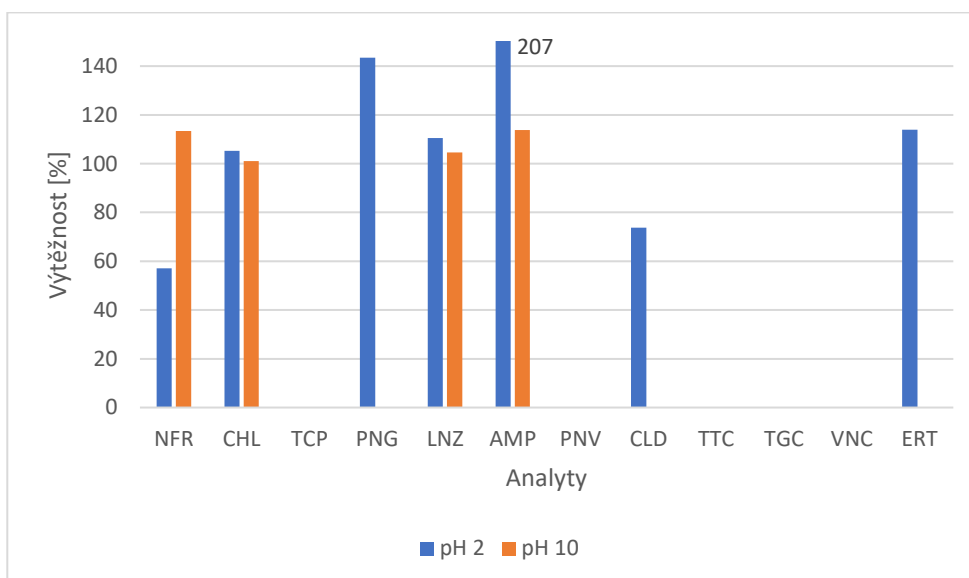
Obrázek 5: Matriční efekty

Analyty CHL, LNZ, CLD a ERT měly dobré výtěžnosti, ale silnější matriční efekty při obou hodnotách pH. NFR a AMP měly silnější M.E., u SPE HLB nízké výtěžnosti a u SPE MAX měly výrazně vyšší výtěžnosti v kyselém prostředí. TGC a VNC měly lepší výtěžnosti i M.E. v neutrálním prostředí. TCP měl dobré výtěžnosti v kyselém prostředí, ale silné M.E. TTC měl silnější M.E., u SPE MAX vyšší výtěžnost v kyselém prostředí, zato v SPE HLB v neutrálním prostředí. U PNG byly uspokojivé M.E., výtěžnost byla dobrá u SPE HLB, ale špatná u SPE MAX. PNV měl špatnou výtěžnost i matriční efekt v obou prostředích, výsledky výtěžnosti u SPE HLB nebyly spolehlivé.

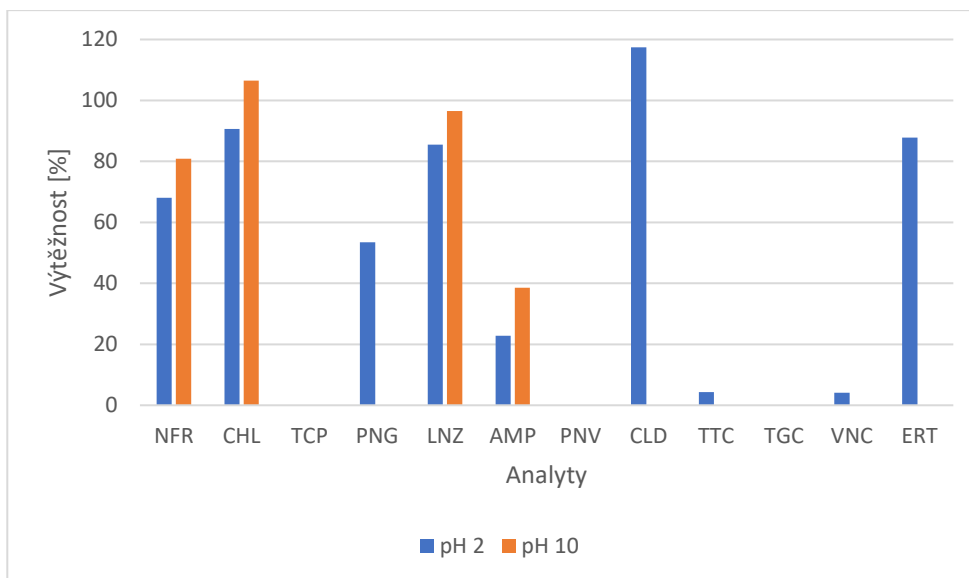
Co se týče porovnání výtěžností extrakcí a matričních efektů při hodnotách pH 2 a 7, nelze říct, které prostředí je pro celou skupinu výhodnější. Matriční efekty byly u většiny analytů stále poměrně silné a při porovnání obou pH se téměř vůbec nelišily. Stále bylo nutné snížit množství interferujících látek matrice ve vzorcích, proto byly vyzkoušeny další extrakční metody.

4.3 Extrakce QuEChERS

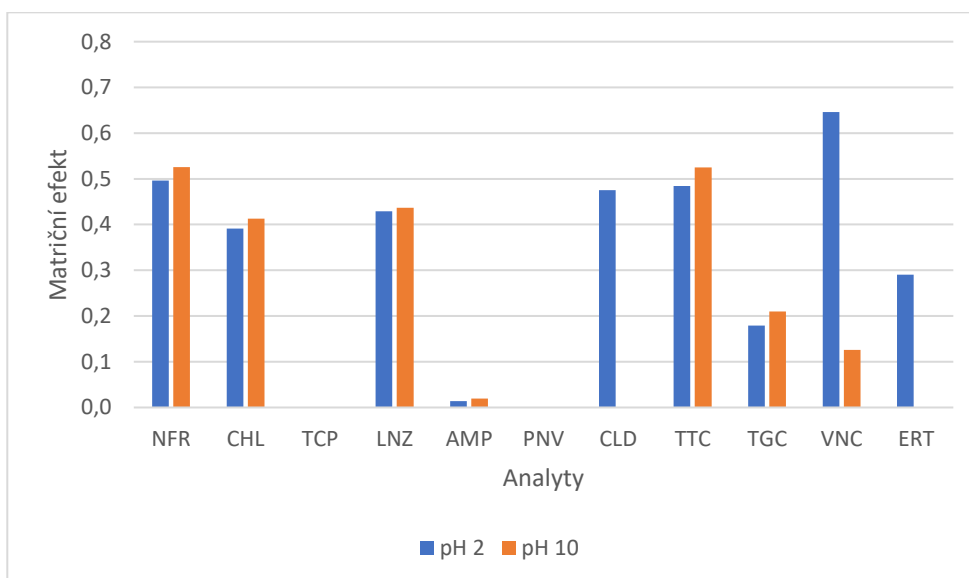
V tomto experimentu byla provedena extrakce ultrazvukem a QuEChERS extrakce v kyselém a bazickém prostředí (pH 2 a 10). Výtěžnost byla stanovena pro spojení ultrazvukové extrakce s vysolováním do acetonitrilové fáze a pro d-SPE na PSA sorbentu a síranu hořečnatém. Matriční efekty byly stanoveny podle vzorce 2.



Obrázek 6: Výtěžnost extrakce ultrazvukem s vysolováním



Obrázek 7: Výtěžnost d-SPE



Obrázek 8: Matriční efekty

Analyty NFR, CHL a LNZ měly dobré výtěžnosti a celkem uspokojivé matriční efekty při obou hodnotách pH. Výtěžnosti obou extrakčních metod u TCP, PNV, TTC, TGC a VNC byly v obou prostředích blíží se nebo rovné nule. Jejich matriční efekty byly silné, TTC měl uspokojivý M.E. PNG, CLD a ERT vykazovaly vyšší výtěžnosti v kyselém prostředí. Matriční efekty u CLD a ERT byly v kyselém prostředí nižší, ale stále poměrně silné. U PNG nebyly výsledky matričních efektů spolehlivé. Výtěžnosti extrakcí u AMP byly lepší v zásaditém prostředí, ale M.E. byly velmi silné při obou hodnotách pH.

Z výtěžností by se dalo usoudit, že extrakce v kyselém prostředí byla celkově více vyhovující. Matriční efekty byly stále poměrně silné, proto bylo přikročeno ke spojení SPE a QuEChERS extrakce.

4.4 SPE na MAX sorbentu následovaná QuEChERS

V tomto experimentu byla provedena SPE na MAX sorbentu a QuEChERS extrakce při pH 2 nebo 7. Výtěžnost byla stanovena pro SPE, vysolování do acetonitrilové fáze a pro d-SPE. Matriční efekty byly stanoveny podle vzorce č. 3.

$$M. E. = \frac{\frac{A_A(PUC)}{A_{IS}(PUC)} \frac{A_A(BLC)}{A_{IS}(BLC)}}{\frac{A_A(REF)}{A_{IS}(REF)}} \quad (3)$$

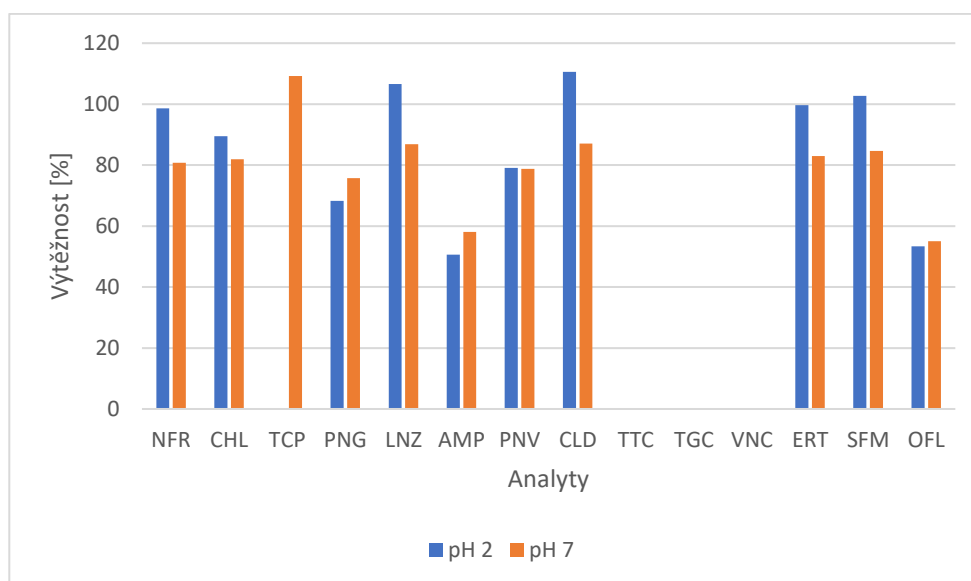
A_A ...plocha píku analytu

A_{IS} ...plocha píku značeného standardu příslušného analytu

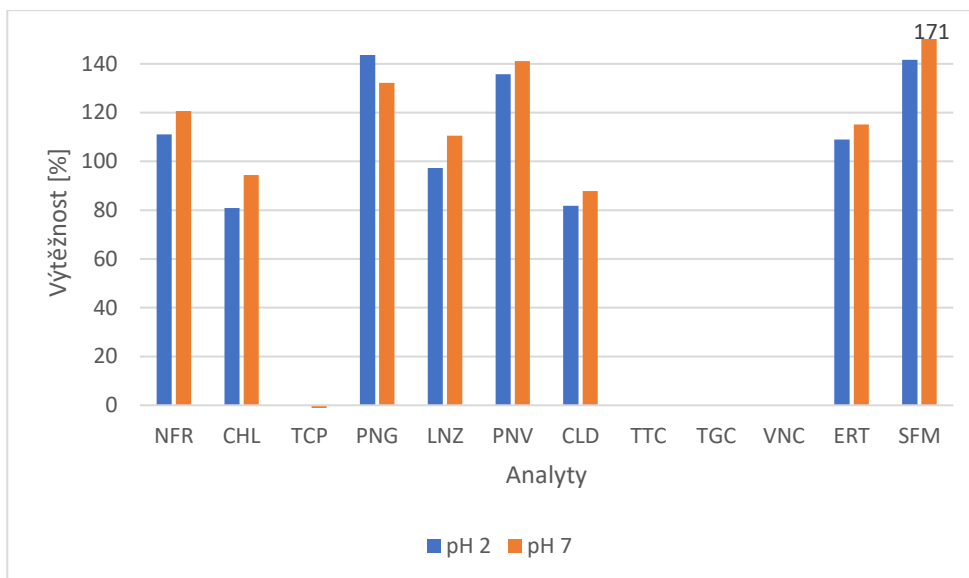
PUC...vzorek spikovaný na konci

BLC...blank

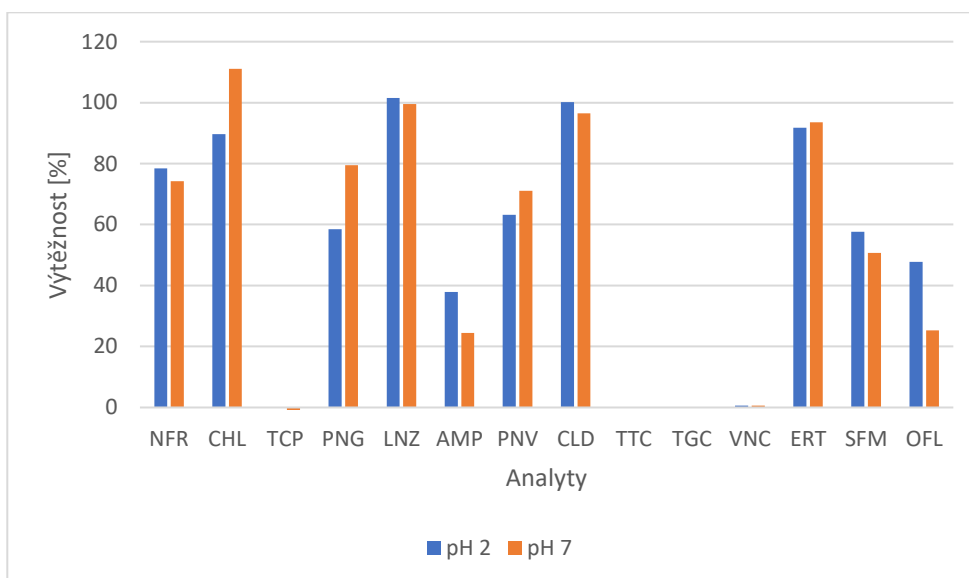
REF...referentní vzorek bez matrice připravený ze spikovacího roztoku



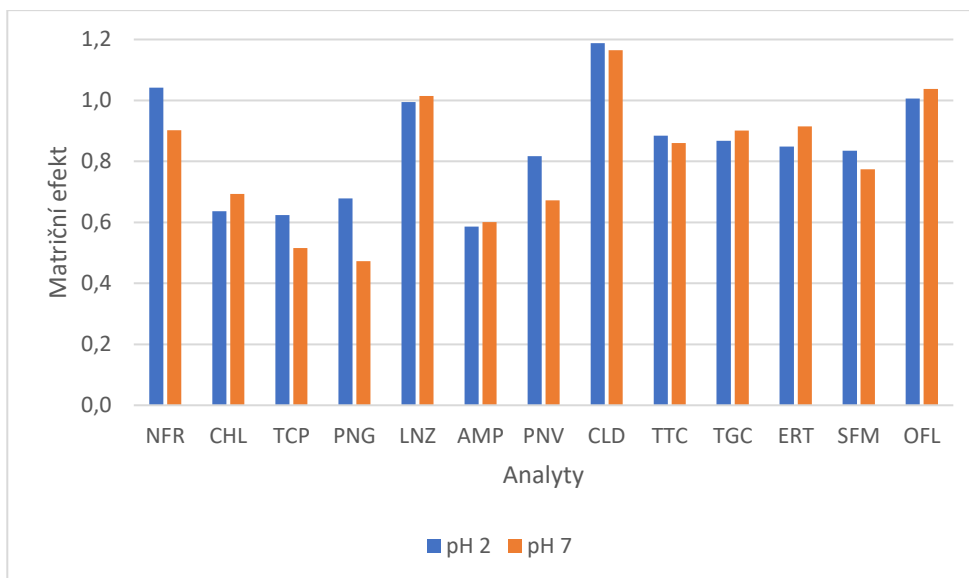
Obrázek 9: Výtěžnost SPE na MAX sorbentu



Obrázek 10: Výtěžnost QuEChERS – vysolování



Obrázek 11: Výtěžnost d-SPE



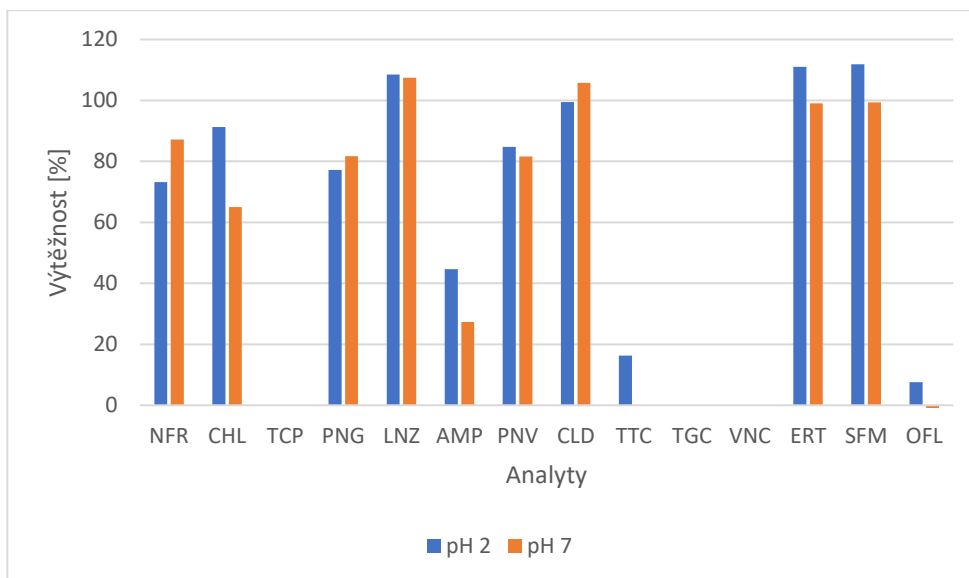
Obrázek 12: Matriční efekty

NFR, CHL, PNG, LNZ, CLD a ERT měly dobré výtěžnosti u všech extrakčních metod a uspokojivý M.E. při obou hodnotách pH. Píky analytů TTC, TGC a VNC nebyly kvantifikovatelné v žádných vzorcích mimo těch spikovaných na konci. TTC a TGC měly nízké matriční efekty, VNC neměl spolehlivé hodnoty matričních efektů. U TCP byl uspokojivý M.E., výtěžnost byla stanovitelná pouze u SPE MAX při pH 7, ale plochy píků byly velmi nízké. AMP a OFL měly u SPE MAX dobrou výtěžnost, u d-SPE nižší výtěžnost a u vysolování neměly spolehlivé výsledky. PNV a SFM měly dobré výtěžnosti kromě vysolování, kde byla výtěžnost vyšší. Matriční efekty u AMP, OFL, PNV a SFM byly uspokojivé.

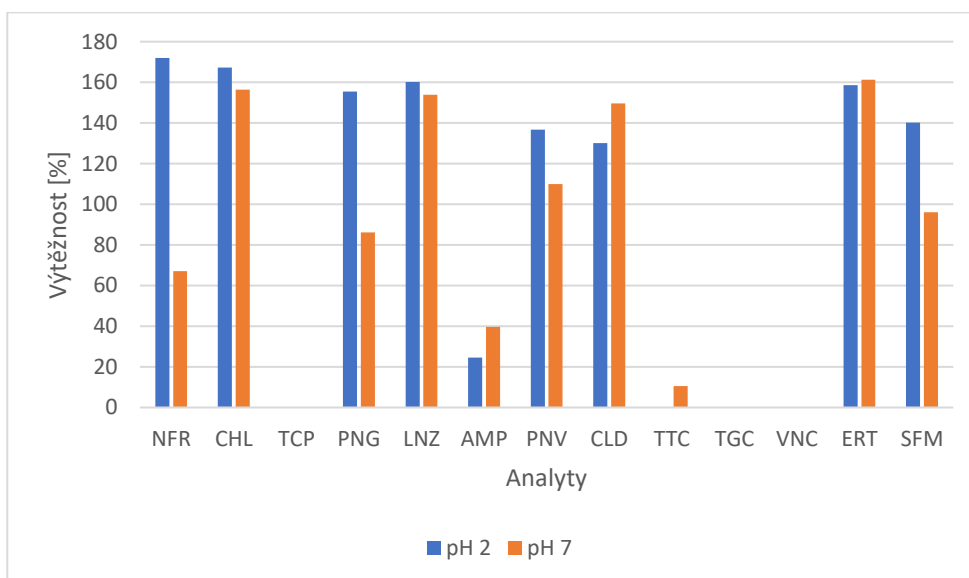
Všechny analyty měly v porovnání s předchozím experimentem mnohem nižší matriční efekty. Rozdíly mezi extrakcí při pH 2 nebo 7 nebyly u výtěžností ani matričních efektů výrazné. Metoda QuEChERS zřejmě není vhodná pro analyty TCP, TTC, TGC a VNC, jelikož v tomto i v předchozím experimentu měly malé nebo až nekvantifikovatelné píky.

4.5 SPE na HLB sorbentu následovaná QuEChERS

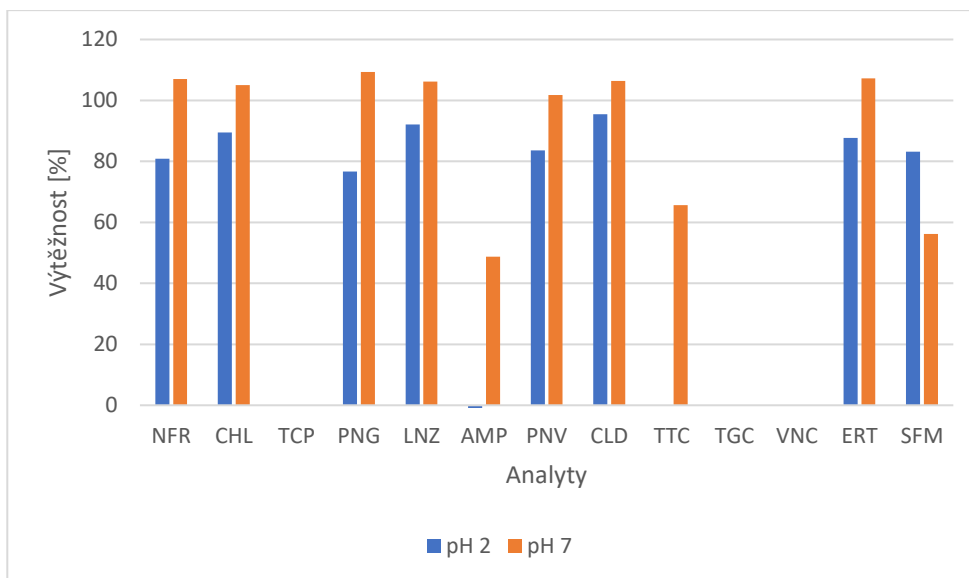
V tomto experimentu byly na vzorky aplikovány SPE na HLB sorbentu a QuEChERS extrakce při pH 2 nebo 7. Výtěžnost i matriční efekty byly stanoveny stejným způsobem jako v předchozím experimentu.



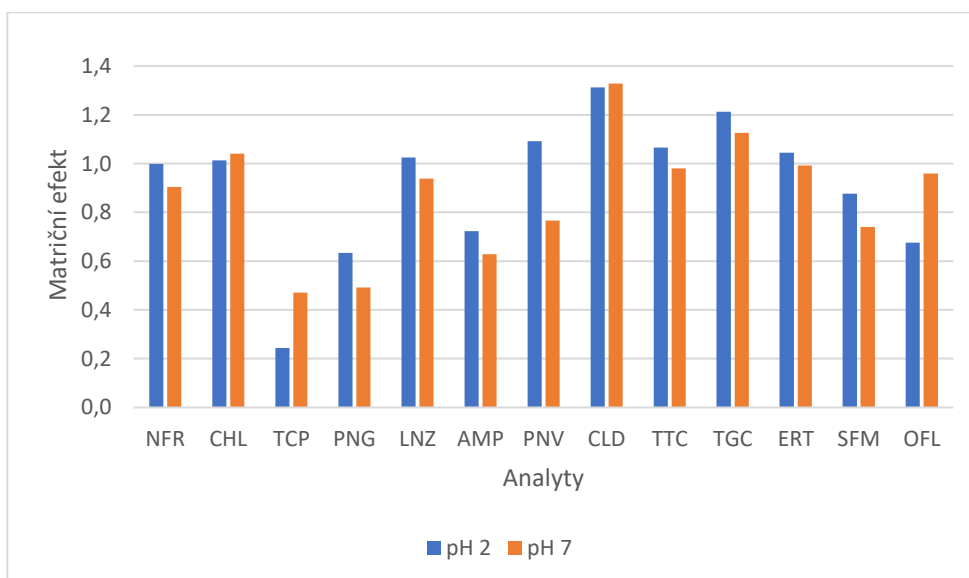
Obrázek 13: Výtěžnost SPE na HLB sorbentu



Obrázek 14: Výtěžnost QuEChERS – vysolování



Obrázek 15: Výtěžnost d-SPE



Obrázek 16: Matriční efekty

CHL, LNZ a ERT měly dobré výtěžnosti u SPE HLB a d-SPE při obou hodnotách pH, u vysolování měly výtěžnosti vysoké. PNV, CLD a SFM měly u všech extrakcí celkem dobré výtěžnosti. NFR a PNG měly dobré výtěžnosti u SPE HLB a d-SPE při obou hodnotách pH, u vysolování měly výtěžnosti dobré v kyselém prostředí, zato v neutrálním vysoké. AMP měl nízké výtěžnosti u všech tří extrakcí. OFL měl u SPE HLB nízkou výtěžnost, u vysolování a d-SPE měl zřejmě kvůli interferencím nespolehlivé výsledky. U analytů TCP, TTC, TGC a VNC měly některé vzorky velmi malé až nekvantifikovatelné plochy píků.

Potvrdilo se, že pro TCP, TTC, TGC a VNC metoda QuEChERS vhodná není. U d-SPE byly téměř u všech analytů vyšší výtěžnosti v neutrálním prostředí. Metoda vysolování dávala některým analytům velkou pozitivní chybu. Matriční efekty byly u všech analytů uspokojivé a výrazně se nelišily mezi oběma hodnotami pH. VNC opět neposkytoval spolehlivé výsledky matričních efektů, zřejmě kvůli silným interferencím.

4.6 Stanovení analytů v reálných vzorcích kalů

Metoda aplikující SPE na MAX sorbentu s QuEChERS extrakcí měla z vyzkoušených metod nejlepší výsledky výtěžností a matričních efektů vzhledem k celé studované skupině, proto byla vybrána ke stanovení analytů v reálných vzorcích kalů. Extrakce byly prováděny při pH 2, protože v kyselém prostředí se pro většinu analytů dosahovalo lepších výsledků než v neutrálním prostředí, ačkoli rozdíly nebyly velké.

Analyzováno bylo 22 vzorků čistírenských kalů, odebíraných z ČOV Olomouc v různých měsících roků 2018, 2019 a 2020.

Tabulka III: Naměřené koncentrace analytů v reálných vzorcích kalů (ng/g)

Měsíc odebrání kalu	LNZ	CLD	TTC	VNC	ERT	SFM	OFL
červen 2018	-	0,54	-	1,1	-	0,012	4,4
září 2018	-	1,0	-	-	-	0,073	7,7
říjen 2018	-	1,6	17	2,2	-	0,043	19
listopad 2018	-	0,94	9,7	2,4	-	0,091	24
prosinec 2018	-	0,77	-	-	-	0,0045	7,6
leden 2019	-	0,67	-	-	-	0,033	2,6
únor 2019	0,62	1,6	P	1,5	0,54	0,086	12
březen 2019	-	1,3	-	-	-	0,013	1,1
duben 2019	-	0,14	-	-	-	0,010	0,1
květen 2019	-	3,1	11	1,2	-	0,037	34
červen 2019	-	0,96	-	2,0	-	0,032	1,5
červenec 2019	-	1,1	-	1,6	-	-	2,0
srpen 2019	0,49	1,1	P	-	0,43	0,047	11
září 2019	-	0,64	-	-	-	0,013	2,4
říjen 2019	-	0,37	-	-	-	-	0,4
listopad 2019	0,44	0,93	9,1	8,8	0,49	0,084	20
leden 2020	-	0,66	7,9	2,5	-	0,10	14
únor 2020	-	1,1	9,0	5,0	-	0,091	25
červen 2020	-	0,42	5,8	-	-	0,089	5,8
červenec 2020	-	0,96	7,4	7,3	-	0,021	7,3
srpen 2020	-	0,30	-	-	-	0,015	1,1
září 2020	-	0,88	-	-	-	0,030	1,0

P...analyt je přítomen, ale je pod mezí kvantifikace

Linezolid a erythromycin byly v koncentraci kolem 0,5 ng/g přítomny ve 3 vzorcích. Klindamycin byl přítomen ve všech vzorcích v koncentracích od 0,14 ng/g po 3,10 ng/g, vankomycin se nacházel v 11 vzorcích v koncentracích od 1,06 ng/g až po 8,22 ng/g. Tetracyklin byl zaznamenán v 10 vzorcích, ale plochy píků značeného standardu byly velmi nízké, a proto mohly být koncentrace zkreslené. Malé píky tetracyklinu byly přítomny téměř ve všech vzorcích, ale nebylo možné spočítat jeho koncentraci, jelikož u některých vzorků nebyl signál značeného standardu vidět vůbec. Sulfamethoxazol byl přítomen téměř ve všech vzorcích. Jeho koncentrace byly o řád nižší než koncentrace ostatních stanovených antibiotik, signál mohl být potlačen vlivem interferencí. Ofloxacin byl nalezen ve všech vzorcích a u některých z nich měl velmi vysokou odezvu. Ostatní analyty nebyly nalezeny v žádném vzorku. Pro vankomycin a teicoplanin nebyly k dispozici izotopicky značené standardy, ale byly vztahovány na standard jiného analytu s podobným retenčním časem. Pro SFM a OFL nebyly použity značené standardy, proto byla jejich koncentrace spočítána lineární regresí z odezev kalibračních vzorků, které bohužel nezohledňují matriční efekt ani výtěžnost.

4.7 Porovnání výsledků zvolené metody

Tabulka IV: Výtěžnosti a matriční efekty metody SPE na MAX sorbentu následované QuEChERS extrakcí

Analyty	Výtěžnost (%)	ME
NFR	85	1,04
CHL	65	0,64
TCP	-	0,62
PNG	57	0,68
LNZ	105	0,99
AMP	43	0,59
PNV	68	0,82
CLD	91	1,19
TTC	-	0,88
TGC	-	0,87
VNC	-	4,68
ERT	99	0,85
SFM	84	0,84
OFL	63	1,01

Mnoho článků [26-30] stanovujících antibiotika v kalech, realizovalo SPE na HLB sorbentu. [10] V kombinaci s QuEChERS extrakcí ale podle provedených experimentů dosáhla lepších výsledků SPE prováděná na MAX sorbentu.

Při porovnání finální metody s metodami využívajícími SPE [27,28] bylo pro některé analyty dosaženo lepších výtěžností (SFM, ERT) a pro některé horších (TTC, OFL). SFM měl celkovou výtěžnost 84 %, zatímco v publikacích jen 43 % [27] a 63-75 % [28]. Na druhou stranu TTC, který v tomto experimentu v některých vzorcích nebyl detekován, měl v publikacích výtěžnosti 104 % [27] a 67-73 % [28].

Při porovnání s metodami využívajícími QuEChERS extrakci bylo pro SFM dosaženo finální metodou lepší výtěžnosti [31-33] a pro ERT také lepší [32,34]. TTC, který měl tak nízkou výtěžnost, že nebyl v některých vzorcích detekován, měl v publikaci [34] také nízkou výtěžnost, ale v publikaci [32] výtěžnost 70-249 %.

Autoři publikace [32] stanovovali LNZ, TTC, SFM a OFL v kalech ze tří ČOV v Nigérii z roku 2017. Linezolid byl nalezen v koncentraci 26,3 ng/g, sulfamethoxazol v koncentraci 47 ng/g, ofloxacin v koncentraci 557 ng/g a tetracyklin v koncentraci až 1172 ng/g. Tyto koncentrace jsou minimálně o řád vyšší v porovnání s nalezenými koncentracemi těchto antibiotik v čistírenském kalu z Olomouce.

5 ZÁVĚR

Čistírenský kal je velmi komplexní matrice obsahující mnoho látek, které mohou interferovat při stanovení obsažených analytů metodou kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií. Najít vhodnou metodu pro stanovení antibiotik v čistírenském kalu není snadné, protože musí být dostatečně selektivní, aby odstranila interferující látky, a přitom si zachovala dobrou výtěžnost.

Sérií experimentů byly zkoumány tři extrakční techniky a jejich kombinace při různých hodnotách pH. Otestovaly se ultrazvuková extrakce, QuEChERS extrakce a SPE na dvou různých sorbentech. Tyto techniky byly zvoleny, protože jsou jednoduché, relativně levné a šetrné k životnímu prostředí svou malou spotřebou rozpouštědel. Ze všech provedených metod se jako nejvhodnější z hlediska výtěžností a matričních efektů ukázala kombinace ultrazvukové extrakce, SPE na MAX sorbentu a QuEChERS extrakce při hodnotě pH 2. Touto metodou byla poté stanovena antibiotika v reálných vzorcích kalů z ČOV Olomouc. Ze čtrnácti analyzovaných antibiotik bylo ve vzorcích kalů přítomno sedm, z čehož koncentrace ofloxacinu, přítomného ve všech vzorcích, byly největší.

Nalezená metoda měla dobré nebo uspokojivé matriční efekty pro všechna zkoumaná antibiotika. Z hlediska výtěžností je metoda nevhodná pro teicoplanin, tigecyklin, tetracyklin a vankomycin. Tetracyklin a vankomycin byly přesto v řadě vzorků detekovány. V případě tetracyklinu koriguje nízkou výtěžnost izotopicky značený standard, lze tedy předpokládat, že přesnost metody je uspokojivá a nedostatečná výtěžnost ovlivňovala především limit stanovitelnosti a preciznost. Pro vankomycin nebyl izotopicky značený standard k dispozici (vankomycin byl vztahován na standard jiného analytu s podobným retenčním časem) a je tedy pravděpodobné, že výsledné obsahy v reálných vzorcích jsou podhodnocené oproti skutečnému stavu.

Pro celou skupinu antibiotik nalezená metoda není vhodná, důvodem je velká heterogenita antibiotik z hlediska chemické struktury. Pro některá ze zkoumaných antibiotik je však tato metoda použitelná a dalším krokem by mělo být určení validačních parametrů. Pro ostatní antibiotika je potřeba najít jinou, vhodnější metodu přípravy vzorků čistírenského kalu.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMP	ampicilin
C18	oktadecyl
CHL	chloramfenikol
CLD	klindamycin
ČOV	čistírna odpadních vod
d-SPE	extrakce disperzní tuhou fází
ERT	erythromycin
GC/MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
GCB	gravitované saze
HLB	hydrofilní-lipofilní rovnováha
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
LC	kapalinová chromatografie
LNZ	linezolid
M.E.	matriční efekty
MAX	smíšený měnič aniontů
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MSPDE	extrakce na pevné fázi dispergované s maticí
NFR	nitrofurantoin
OFL	ofloxacin
PHWE	extrakce stlačenou horkou vodou
PLE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem
PNG	penicilin G
PNV	penicilin V
PP	polypropylen
PSA	primární – sekundární amin
QC	kontrola kvality
SFM	sulfamethoxazol

SPE	extrakce tuhou fází
TCP	teicoplanin
TGC	tigecyklin
TTC	tetracyklin
VNC	vankomycin
UAE	ultrazvuková extrakce

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) J. Beneš, Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití, Grada Publishing, Praha 2018.
- 2) P. Fryčák, Vztah výskytu reziduí antibiotik a bakteriální rezistence v odpadních a přírodních vodách, Chem. Listy 114 (2020) 815-822.
- 3) R. K. Langbehn, C. Michels, H. M. Soares, Antibiotics in wastewater: From its occurrence to the biological removal by environmentally conscious technologies, Environ. Pollut. 116603 (2021).
- 4) S. B. Levy, The challenge of antibiotic resistance, Sci. Am. Vol. 278, No. 3 (1998) 46-53.
- 5) M. Hartman, K. Svoboda, V. Veselý, O. Trnka, J. Chour, Tepelné zpracování čistírenských kalů, Chem. Listy 97 (2003) 976-982.
- 6) Multimediální učební texty zaměřené na problematiku zpracování kalů. <http://hgf10.vsb.cz/546/ZpracovaniKalu/index.html>, staženo 10. prosince 2020.
- 7) M. Vajgantová, Analýza technologických procesů čištění odpadních vod, které působí obtíže v praxi jednotlivých ČOV, bakalářská práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice 2009.
- 8) Nakládání s čistírenskými kaly v České republice, SOVAK ČR. <https://www.sovak.cz/sites/default/files/2019-11/SOVAK%20ČR%20Studie%20nakládání%20s%20čistírenskými%20kaly%20v%20ČR%20FINAL.pdf>, staženo 10. prosince 2020.
- 9) Vyhláška č. 437/2016 Sb., o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady a změně vyhlášky č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a o změně vyhlášky č. 294/2005 Sb., o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady (vyhláška o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady).
- 10) N. Pérez-Lemus, R. López-Serna, S. I. Pérez-Elvira, E. Barrado, Analytical methodologies for the determination of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in sewage sludge: A critical review, Anal. Chim. Acta 1083 (2019) 19-40.

- 11) L. Martín-Pozo et al., Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review, *Talanta* 192 (2019) 508-533.
- 12) L. de Castro, F. Priego-Capote, Soxhlet extraction: Past and present panacea, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2383-2389.
- 13) O. Zuloaga et al., Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review, *Anal. Chim. Acta* 736 (2012) 7-29.
- 14) B. K. Tiwari, Ultrasound: A clean, green extraction technology, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 100-109.
- 15) C. Sparr Eskilsson, E. Björklund, Analytical-scale microwave-assisted extraction, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 227-250.
- 16) C. C. Teo et al., Pressurized hot water extraction (PHWE), *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2484-2494.
- 17) A. L. Capriotti et al., Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2521-2532.
- 18) M. Anastassiades et al., Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and „dispersive solid-phase extraction“ for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86(2) (2003) 412-431.
- 19) M. Charvátová, Automatizace extrakce na tuhé fázi pomocí Lab-On-Valve techniky, bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, Hradec Králové 2015.
- 20) Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Bulletin 910: Guide to solid phase extraction. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/4538.pdf>, staženo 11. prosince 2020.
- 21) L. Mijangos et al., Simultaneous determination of a variety of endocrine disrupting compounds in carrot, lettuce and amended soil by means of focused ultrasonic solid-liquid extraction and dispersive solid-phase extraction as simplified clean-up strategy, *J. Chromatogr. A* 1389 (2015) 8-18.
- 22) G. Peng et al., Analysis of five bisphenol compounds in sewage sludge by dispersive solid-phase extraction with magnetic montmorillonite, *Microchem. J.* 157 (2020) 105040.
- 23) J. W. Allwood, R. Goodacre, An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses, *Phytochem. Anal.* 21 (2010) 33-47.

- 24) Agilent Technologies, Inc., Basics of LC/MS (5968-2543E), Hewlett-Packard Company, 1998,
<https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf>, staženo 24. března 2021.
- 25) P. J. Taylor, Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328-334.
- 26) J. L. Chen, S. Ravindran, S. Swift, N. Singhal, Changes in estrogenicity and micropollutant concentrations across unit processes in a biological wastewater treatment system, *Water Sci. Technol.* 77 (6) (2018) 1673-1682.
- 27) M. Ashfaq et al., Occurrence, fate, and mass balance of different classes of pharmaceuticals and personal care products in an anaerobic-anoxic-oxic wastewater treatment plant in Xiamen, China, *Water Res.* 123 (2017) 655-667.
- 28) J. Hou, C. Wang, D. Mao, Y. Luo, The occurrence and fate of tetracyclines in two pharmaceutical wastewater treatment plants of Northern China, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 1722-1731.
- 29) Q. Yan et al., Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the largest municipal wastewater treatment plant in Southwest China: Mass balance analysis and consumption back-calculated model, *Chemosphere* 99 (2014) 160-170.
- 30) P. Gao et al., Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant, *Sci. Total Environ.* 421-422 (2012) 173-183.
- 31) J. L. Malvar et al., Comparison of ultrasound-assisted extraction, QuEChERS and selective pressurized liquid extraction for the determination of metabolites of parabens and pharmaceuticals in sludge, *Microchem. J.* 157 (2020) 104987.
- 32) A. S. Ajibola, S. Tisler, C. Zwiener, Simultaneous determination of multiclass antibiotics in sewage sludge based on QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 12 (2020) 576-586.
- 33) M. B. R. Cerqueira et al., Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS, *Chemosphere* 107 (2014) 74-82.
- 34) W. Peysson, E. Vulliet, Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction

followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry,
J. Chromatogr. A 1290 (2013) 46-61.