

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2023

Nikola Opolzerová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Možnosti fotochemické degradace sulfonamidů a antibiotik ze skupiny diaminopyrimidinů

Bakalářská práce

Nikola Opolzerová

Školitelka: doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

Školitelka – specialistka: Ing. Pavla Fojtíková, Ph.D.

České Budějovice 2023

Opolzerová N. (2023). **Možnosti fotochemické degradace sulfonamidů a antibiotik ze skupiny diaminopyrimidinů.** [Possibilities of photochemical degradation of sulfonamides and antibiotics from the diaminopyrimidine group. Bc. Thesis, in Czech.] – 32pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

In the theoretical part, the thesis is focused on the basic characteristics of sulfonamide and diaminopyrimidine antibiotics, on HPLC analyses of two representatives of these drugs, sulfamethoxazole and trimethoprim, on the occurrence of sulfonamide and diaminopyrimidine antibiotics in the aquatic environment, and finally, on possibilities of photochemical degradation of these two groups of drugs. In the experimental part, HPLC methods for sulfamethoxazole and trimethoprim analyses were introduced and their photochemical degradation under light conditions relevant to environmental conditions was performed.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorkou této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 11.4.2023

.....

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce, doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc., za odborné vedení této bakalářské práce, za veškerý čas, který mi věnovala a za cenné rady a zkušenosti, bez kterých by tato bakalářská práce nemohla vzniknout. Velice si vážím jejího přátelského přístupu, trpělivosti a velké ochoty vždy pomoci. Mé poděkování také patří Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D. za odbornou pomoc při vývoji HPLC metody na kapalinovém chromatografu. Velice děkuji za poskytnuté zkušenosti, rady a ochotu vždy pomoci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za podporu nejen při psaní bakalářské práce, ale také v průběhu celého studia.

Seznam zkratk

ČOV	čistírna odpadních vod
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MF	mobilní fáze
MFA	mobilní fáze A
MFB	mobilní fáze B
SA	sulfonamidy
SDZ	sulfadiazin
SMT	sulfamethazin
SMX	sulfamethoxazol
TMP	trimethoprim
UV	ultrafialové záření

Cíl práce

Cílem této práce bylo:

- prostudovat možnosti HPLC stanovení antibiotik sulfamethoxazolu a trimethoprimu a zavést metodu na jejich stanovení,
- zmapovat koncentrace vybraných látek ze skupiny sulfonamidů (sulfamethoxazolu, sulfadiazinu, sulfamethazinu) a ze skupiny diaminopyrimidinů (trimethoprimu) v přírodních vodách,
- prostudovat literaturu o možnostech fotochemické degradace těchto látek, a
- otestovat reaktivitu sulfamethoxazolu a trimethoprimu při fotochemické reakci ve vodném roztoku při použití záření relevantního pro přírodní podmínky.

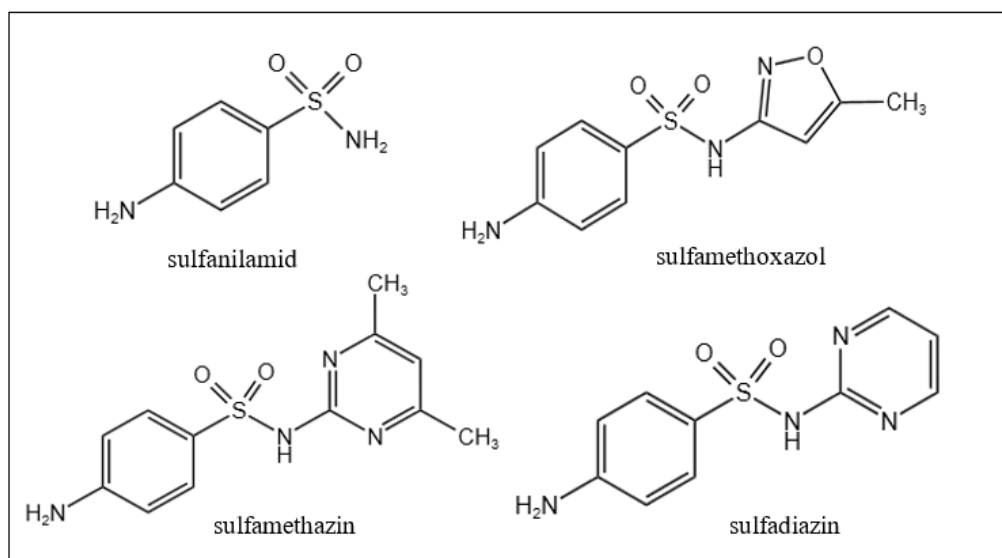
Obsah

Úvod.....	1
Sulfonamidy	1
Sulfamethoxazol.....	2
Diaminopyrimidiny	2
Trimethoprim	3
Možnosti HPLC stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu	4
Faktory ovlivňující výběr HPLC metody	6
Koncentrace sulfonamidů a diaminopyrimidinů v přírodních vodách	7
Možnosti fotochemické degradace sulfonamidů a diaminopyrimidinů	8
Materiály a metody	11
Výsledky a diskuse.....	13
Vývoj a optimalizace HPLC metody pro stanovení sulfamethoxazolu (SMX)	13
Vývoj a optimalizace HPLC metody pro stanovení trimethoprimu (TMP)	15
Fotochemické odbourávání sulfamethoxazolu (SMX) a trimethoprimu (TMP).....	19
Závěr	25
Seznam použitých zdrojů	26

Úvod

Sulfonamidy

Sulfonamidy (SA) jsou léčiva patřící mezi širokospektrální antibiotika. Za objevem prvních syntetických antibakteriálních látek, sulfonamidů, stál německý vědec Gerhard Domagk, který ve 30. letech 20. století zjistil, že sulfonamidové barvivo prontosil má antibakteriální vlastnosti, v organismu se totiž metabolizuje na svoji aktivní formu sulfanilamid (Yousef et al., 2018). Struktura sulfanilamidu se stala předlohou pro další sulfonamidy, jako je např. sulfamethoxazol (SMX), sulfamethazin (SMT) či sulfadiazin (SDZ), jejichž vzorce jsou uvedeny na Obr. 1.



Obr. 1: Struktura nejpoužívanějších sulfonamidů (KingDraw).

Sulfonamidy jsou strukturální analogy kyseliny *p*-aminobenzoové, která je nezbytnou složkou při bakteriální syntéze kyseliny listové (respektive kyseliny dihydrolistové). Zatímco pro člověka je kyselina listová esenciální látkou, většina bakterií má schopnost vytvářet kyselinu listovou (přesněji kyselinu dihydrolistovou) ve svém těle z prekurzorů. Vzniklá kyselina dihydrolistová je využita při syntéze tetrahydrolistové kyseliny nezbytné pro syntézu purinových a pyrimidinových bází (Lüllmann et al., 2007). Syntéza tetrahydrolistové kyseliny začíná reakcí kyseliny *p*-aminobenzoové s pteridinem za vzniku kyseliny dihydropteroové. Reakce je katalyzována enzymem dihydropteroát syntáza. Sulfonamidy se vážou na aktivní místo dihydropteroát syntázy, čímž zabraňují syntéze kyseliny dihydropteroové, potřebné pro další kroky v syntéze tetrahydrolistové kyseliny a následně při tvorbě DNA nezbytné pro růst a dělení buněk bakterií (Tačić et al., 2017).

Sulfonamidy jsou prvními antibakteriálními medikamenty, které byly úspěšně použity k léčbě lidských infekčních onemocnění. Jedná se o látky, které jsou předepisovány k léčbě infekcí močových cest, očních a ušních infekcí, zánětu průdušek či k léčbě pneumonie způsobené *Pneumocystis jirovecii* (García-Galán et al., 2008). Přesto, že sulfonamidy jsou používány k léčbě mnoha druhů infekcí u lidí, v dnešní době převažuje jejich aplikace ve veterinární medicíně. Zde se používají nejen pro léčbu infekčních onemocnění, ale také se přidávají do krmiv za účelem podpory růstu (García-Galán et al., 2008; Dmitrienko et al., 2014; Periša et al., 2013). Sulfonamidy jsou jedněmi z nejpoužívanějších veterinárních antibiotik v Evropské unii (García-Galán et al., 2008). Ve veterinární medicíně převažuje použití sulfamethazinu či sulfadiazinu, v humánní medicíně se používá sulfamethoxazol (Baran et al., 2011).

Sulfamethoxazol

Systematický název sulfamethoxazolu dle názvosloví IUPAC¹ je 4-amino-*N*-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)benzensulfonamid. Jedná se o krátkodobě působící bakteriostatické² antibiotikum (PubChem, 2023). Po perorálním podání nastává rychlé a úplné vstřebání SMX v horní části trávicí soustavy, maximální plazmatické koncentrace je dosaženo po 2 až 4 hodinách. Pouze 15–20 % SMX je vylučováno v nezměněné formě močí, zbytek je v lidském těle, zejména v játrech, metabolizován (SÚKL, 2023). Hlavními lidskými metabolity je *N*4-acetyl-sulfamethoxazol a sulfamethoxazol-*N*1-glukuronid (SÚKL, 2023), oba metabolity jsou vyloučené z těla močí. Acetylované ani glukuronidové metabolity nevykazují antibakteriální účinky (PubChem, 2023).

Diaminopyrimidiny

Diaminopyrimidiny jsou širokospektrální antibiotika s bakteriostatickým účinkem. Americký lékař G.H. Hitchings na konci 40. let 20. století zjistil, že 2,4-diaminopyrimidiny vykazují antibakteriální aktivitu (van Miert, 1994). Strukturně jsou antibiotika z této skupiny látky, které obsahují dvě aminové skupiny v pozici 2 a 4 na pyrimidinovém kruhu.

Diaminopyrimidiny mají podobný mechanismus působení jako sulfonamidy, též zasahují do dráhy syntézy tetrahydrolistové kyseliny, čímž zabraňují syntéze purinů a následně tvorbě DNA (Prescott, 2013). Diaminopyrimidiny inhibují enzym dihydrofolát reduktáza, který katalyzuje konečnou konverzi kyseliny dihydrolistové na kyselinu

¹ IUPAC = International Union of Pure and Applied Chemistry

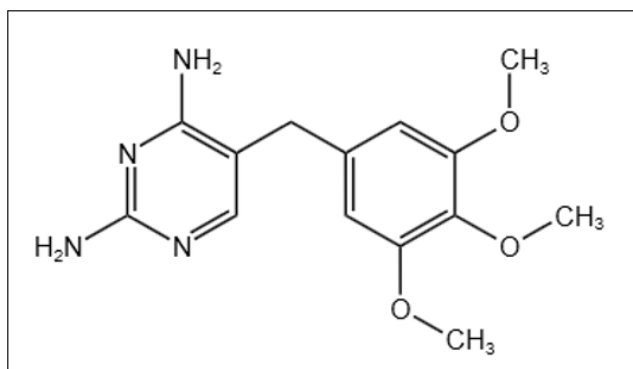
² Bakteriostatické antibiotikum = látky inhibující růst a množení bakterií

tetrahydrofolistovou. Tímto tyto sloučeniny získaly označení antifoláty (Swedberg & Sundström, 2010). Enzym dihydrofolát reduktáza se nachází i u člověka (Lüllmann et al., 2007), ale afinita antibakteriálních diaminopyrimidinů k bakteriálnímu enzymu je až 100 000× vyšší než afinita k savčímu enzymu (Tahan et al., 2015).

Diaminopyrimidiny, nejčastěji v kombinaci se sulfonamidy, se využívají k léčbě prostatických infekcí, infekcí močových cest či k léčbě zápalu plic způsobenému *Pneumocystis jirovecii* (Prescott, 2013). Mezi často používané antibiotikum ze skupiny diaminopyrimidinů patří trimethoprim (TMP).

Trimethoprim

Systematický název trimethoprimu podle názvosloví IUPAC je 5-[(3,4,5-trimethoxyfenyl)methyl]pyrimidin-2,4-diamin (PubChem, 2023). Struktura TMP je zobrazena na Obr. 2. TMP je první syntetický antibakteriální diaminopyrimidin, který byl zaveden pro klinické použití jako širokospektrální bakteriostatické antibiotikum (Prescott, 2013). V roce 1962 byl TMP poprvé použit, následně byl v roce 1968 registrován pro klinické použití v kombinaci se sulfonamidy (Eliopoulos & Huovinen, 2001).



Obr. 2: Struktura trimethoprimu (KingDraw).

TMP se po perorálním podání rychle vstřebává z gastrointestinálního traktu, přičemž maximální plazmatické koncentrace je dosaženo po 1 až 4 hodinách (Hruska & Frye, 2004). Většina TMP je vylučována v nezměněné formě močí, pouze cca 10–20 % TMP je metabolizováno, zejména v játrech, na neaktivní metabolity (PubChem, 2023). TMP podléhá zejména oxidativnímu metabolismu, přeměňuje se především oxidacemi jako je O-demethylace či N-oxidace (PubChem, 2023; SÚKL, 2023). TMP se často používá v kombinaci s SMX. Na samotný TMP se může rychle rozvinout rezistence, zatímco rozvoj rezistence pro použití SMX-TMP v kombinaci není tak rychlý (PubChem, 2023).

Možnosti HPLC stanovení sulfamethoxazolu a trimethoprimu

Pro stanovení SMX, resp. TMP, ve vzorcích se velice často používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s reverzními fázemi, která je mnohdy využívána v kombinaci s UV detekcí nebo hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). Bedor et al. (2008) udává, že metoda HPLC-MS pro stanovení SMX a TMP je přibližně šestkrát citlivější než detekce pomocí UV záření. HPLC slouží ke stanovení SMX a TMP ve farmaceutických, biologických a veterinárních vzorcích nebo např. v odpadní vodě pocházející z hospodářství a průmyslu (Sayar et al., 2010; Malintan & Mohd, 2006).

Při výběru chromatografické metody je kladen důraz na výběr optimální chromatografické kolony neboli stacionární fáze, složení a pH mobilní fáze, teplotu kolonového prostoru a vlnovou délku detekce (Asadi & Gharbani, 2013).

Na základě publikací jsou v případě stanovení SMX a TMP nejčastěji využívány chromatografické kolony se stacionární fází C18 nebo C8, kde nosičem stacionární fáze je silikagel. Na silikagel jsou chemicky navázané alkylové zbytky, v případě stacionární fáze C18 se jedná o osmnácti-uhlíkatý alkylový zbytek a u stacionární fáze C8 je to osmi-uhlíkatý uhlovodíkový zbytek (Nováková et al., 2021). Dle publikovaných studií se jako nejčastěji používané mobilní fáze jeví fosfátový pufr či jiné vodné roztoky solí v kombinaci s organickými rozpouštědly, zejména methanolem nebo acetonitrilem. Při výběru chromatografické metody je potřeba správně zvolit pH mobilní fáze, neboť kyselá mobilní fáze přispívá k retenci analytu na koloně.

Stanovení SMX a TMP pomocí HPLC se vyskytuje v řadě studií. Mezghich et al. (2017) provedli analýzu fotochemické degradace SMX pomocí slunečního záření za použití kolony Nucleodur C18 (150 × 4,6 mm). Použitá mobilní fáze obsahovala vodu okyselenou kyselinou mravenčí (0,1 obj. %) a acetonitril (60/40 obj. %). Průtok mobilní fáze činil 1 ml/min a detekce byla provedena při vlnové délce 250 nm a 280 nm.

Asadi & Gharbani (2013) navrhli metodu na určení SMX ve vzorcích lidské moči. Jako stacionární fáze byla použita kolona Symmetry C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) a mobilní fáze obsahující 10 mM dihydrogenfosforečnan draselný (pH 6,0), methanol a acetonitril v poměru (58/4/38 obj. %). Průtok činil 0,9 ml/min. Detekce byla provedena při více vlnových délkách, a to při vlnové délce 235 nm, 250 nm, 260 nm a 270 nm.

Sun et al. (2012) se ve své práci zabývali stanovením SMX v mléce, přičemž k této analýze použili kolonu Amethyst C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm). Mobilní fáze byla složena z vody a methanolu v poměru (64/36 obj. %) při průtoku 1 ml/min. Vlnová délka detekce byla 270 nm.

Analýzu TMP v krevním séru drůbeže ve své práci představili Kubasov et al. (2016). Ve zvolené metodě byla jako stacionární fáze použita kolona Kromasil 100-5 C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm), zatímco mobilní fáze obsahovala 50 mM acetátový pufr (pH 3,0) a acetonitril v poměru (86/14 obj. %). Průtok MF činil 1 ml/min a vlnová délka detekce byla 278 nm.

Na koloně Agilent TC-C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) Wang et al. (2012) stanovovali TMP ve farmaceutickém přípravku. Jako mobilní fázi využili 50 mM dihydrogenfosforečnan draselný, který byl na pH 3,0 upraven pomocí kyseliny fosforečné, a acetonitril (70/30 obj. %). Použitý průtok mobilní fáze činil 1 ml/min, přičemž zvolená vlnová délka detekce měla hodnotu 271 nm.

Stanovení TMP ve vzorcích obohacené pramenité vody a následnou analýzu TMP v odpadních vodách průmyslového původu ve své práci zpracovali Ašperger et al. (2009). K tomuto účelu byla použita kolona Microsorb-MV 100 C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm). Mobilní fáze A byla složena z 0,5 obj. % kyseliny mravenčí a 1 obj. % trifluoroctové kyseliny v 0,05 M octanu amonném, mobilní fáze B obsahovala methanol. Poměr mobilních fází byl (70/30 obj. %). Průtok MF byl 1 ml/min a k detekci byla použita vlnová délka 254 nm.

Řada studií ukazuje, že SMX a TMP jsou nejčastěji stanovovány současně. Stanovení SMX a TMP v nemocniční odpadní vodě ve své práci provedli Brenner et al. (2011). Pro separaci těchto dvou analytů využili kolonu Eclipse XDB-C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm). Mobilní fáze obsahovala 1 mM octan amonný, kyselinu octovou a methanol v poměru (49,5/1/49,5 obj. %). Průtok činil 600 μl/min. Detekce byla provedena pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.

Sayar et al. (2010) publikovali studii, ve které současně stanovovali SMX a TMP v krevní plazmě po podání léku co-trimoxazolu, který obsahuje kombinaci SMX a TMP. Stanovení proběhlo na koloně C8 (250 × 4,6 mm, 5 μm). Mobilní fáze použitá při analýze obsahovala hydrogenfosforečnan draselný, acetonitril, methanol a vodu s úpravou pH na hodnotu 6,2 pomocí hydroxidu sodného. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min.

Analýzu SMX a TMP v krevní plazmě provedli Bedor et al. (2008), kteří ve své práci k separaci využili kolonu Purospher® star C18 (125 × 4,0 mm, 5 μm). Mobilní fáze zahrnovala 20 mM hydrogenfosforečnan sodný, který byl na pH 3,0 upraven pomocí kyseliny fosforečné, a acetonitril v poměru (89/11 obj. %). Průtok mobilní fáze byl 2 ml/min a UV detekce probíhala při vlnové délce 230 nm.

Akay & Özkan (2002) uskutečnili současné stanovení SMX a TMP v komerčních farmaceutických přípravcích. Ke stanovení byla využita kolona Bondapak C18 (300 × 3,9 mm, 10 μm) a mobilní fáze obsahující vodu upravenou kyselinou fosforečnou na pH 3,0 a methanol v poměru (40/60 obj. %). Průtok mobilní fáze byl 1,8 ml/min a nastavená vlnová délka detekce činila 213 nm.

Faktory ovlivňující výběr HPLC metody

Při vývoji HPLC metody je potřeba, aby pík získaný při separaci měl optimální retenční faktor (k) a také dostatečnou intenzitu signálu. Právě zmiňovaný retenční faktor je důležitý pro vyhodnocování retence látky na koloně (Nováková et al., 2021).

Nováková et al. (2021) v publikaci Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. uvádí vztah pro výpočet retenčního faktoru dle rovnice 1

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

kde t_0 je mrtvý retenční čas inertní látky a t_R je retenční čas dělené látky. Při chromatografických separacích je běžně doporučováno, aby retenční faktor přesahoval hodnotu 2, čímž bude zajištěno, že dělená látka byla dostatečně separována od mrtvého objemu. Zároveň by retenční faktor neměl překročit hodnotu 10, neboť není žádoucí, aby délka realizované analýzy byla příliš dlouhá (Nováková et al., 2021).

Dalším důležitým kritériem při výběru HPLC metody je faktor asymetrie (A) popisující symetrii detekovaného píku. Při separaci je podstatné, aby získané píky byly symetrické a dobře oddělené. Faktor asymetrie lze definovat pomocí rovnice 2

$$A = \frac{t}{f} \quad (2)$$

kde t je šířka sestupné části píku a f je šířka vzestupné části píku. Šířka píku je nejčastěji měřena v 5 nebo 10% výšky daného píku. Faktor asymetrie má optimální hodnotu v rozmezí 0,8–1,5, přičemž by neměl nikdy překročit hodnotu 2,0 (Nováková et al., 2021).

Koncentrace sulfonamidů a diaminopyrimidinů v přírodních vodách

Aplikace sulfonamidů a diaminopyrimidinů v humánní a veterinární medicíně vede k časté detekci těchto látek ve vodním prostředí. Tato antibiotika se dostávají do vodních systémů v důsledku vylučování člověkem, nesprávné likvidace nepoužitých antibiotik či ve formě zemědělského odpadu po použití ve veterinární medicíně (Ashton et al., 2004; Gong & Chu, 2015). Jelikož čističky odpadních vod mají omezenou schopnost odstraňovat léčiva (Jewell et al., 2016), jsou tato antibiotika často detekována ve vodách, a to především ve vodách povrchových, v koncentracích od ng/l až po µg/l (Wang & Wang, 2018).

Roberts & Thomas (2006) měřili koncentrace různých léčiv v řece Tyne ve Velké Británii. Mezi zkoumanými léčivy byl také TMP, který byl detekován v maximální koncentraci 19 ng/l.

Měřením koncentrací léčivých látek ve vodách delty Perlové řeky v Číně se ve své studii zabývali Yang et al. (2013). Maximální naměřená koncentrace SMX v Perlové řece (Zhujiang) činila 65 ng/l, pro TMP byla zjištěna maximální koncentrace 18 ng/l. V přítoku Perlové řeky, v řece Beijiang, byla maximální koncentrace SMX 39 ng/l a TMP 12 ng/l.

Chen & Zhou (2014) ve své práci zkoumali koncentrace různých antibiotik v řece Huangpu v Šanghaji. Ze skupiny sulfonamidů byla zjištěna koncentrace 764,9 ng/l pro SMX, 112,5 ng/l pro SDZ a 389,4 ng/l pro SMT.

Koncentraci 18 antibiotik (včetně SMX a TMP) ve vzorcích odpadní a povrchové vody v Německu stanovili Hirsch et al. (1999). V odpadní vodě z ČOV byla naměřena maximální koncentrace SMX 2 µg/l a TMP 0,66 µg/l. V povrchové vodě byl SMX detekován v maximální koncentraci 480 ng/l a maximální koncentrace TMP činila 200 ng/l.

Nejvyšší koncentrace SMX a TMP naměřili ve své studii Dinh et al. (2017), a to konkrétně v odpadní vodě pocházející z nemocnice ve Francii (360 lůžek). V nemocniční odpadní vodě byla naměřena koncentrace SMX 2,1 µg/l, přičemž TMP se vyskytoval v koncentraci 0,94 µg/l.

Možnosti fotochemické degradace sulfonamidů a diaminopyrimidinů

SMX a TMP jsou persistentní látky, což znamená, že mají nízkou biologickou a chemickou rozložitelnost v životním prostředí. Je proto potřeba hledat efektivní způsob, jak tyto látky eliminovat, případně zjistit, jakým degradačním procesům mohou v přírodním prostředí podléhat (Gong & Chu, 2015). Vzhledem k tomu, že některé sulfonamidy a diaminopyrimidiny mohou absorbovat UV část slunečního záření, a to zejména díky struktuře s aromatickými cykly a dalšími chromoforovými skupinami, tak jedním z možných použitelných degradačních procesů je fotodegradace (Periša et al., 2013).

Fotochemickou degradací tří zástupců ze skupiny sulfonamidů, konkrétně sulfamethoxazolu, sulfadiazinu a sulfamethazinu, se ve své práci zabývali Periša et al. (2013). Vodné roztoky SA (10 mg/l) umístěné v křemenných kyvetách, byly ozařovány v reaktoru s xenonovou výbojkou po dobu 24 hodin. Studie byla provedena při hodnotách pH vzorku 4 a 8. Hodnota pH rozhoduje o formách SA, které budou přítomné v roztoku. Zatímco při kyselém pH jsou SA přítomné v roztoku v neutrální formě, při zásaditém pH převládá aniontová forma SA. Studie ukázala, že přítomná forma SA v roztoku ovlivňuje fotochemické chování a reaktivitu sloučenin. Zatímco u SDZ a SMT byla rychlejší degradace v jejich aniontové formě (pH 8), u SMX bylo zjištěno, že reaktivnější je jeho neutrální forma (pH 4). Získané výsledky ukazovaly, že rychlost odbourávání všech SA lze popsat kinetikou prvního řádu – pro SMX byly naměřeny rychlostní konstanty $0,035 \text{ min}^{-1}$ pro reaktivnější neutrální formu a $3,01 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ pro aniontovou formu SMX.

Trovó et al. (2009) vystavili SMX (10 mg/l) záření, které generovala xenonová výbojka. Ozařování proběhlo ve dvou vodných roztocích. V roztoku destilované vody (pH 4,8) byl zpočátku pozorován rychlý úbytek SMX, kdy za 45 minut ozařování bylo degradováno 40 % výchozí látky. Následně se však rychlost degradace zpomalila a po 30hodinovém ozařování došlo k eliminaci 98 % SMX. V mořské vodě (pH 8,1) byl pozorován pomalejší průběh odbourávání. Po 7 hodinách ozařování ubylo 14 % SMX. Autoři v práci studovali také vliv přítomnosti dusičnanů v destilované vodě na rychlost odbourávání SMX. Výsledky ale ukazují, že výskyt dusičnanů v tomto prostředí neměl na rychlost degradace SMX zásadní vliv.

Zhou & Moore (1994) ozařovali vzorky SMX (25,33 mg/l) v roztocích o hodnotách pH 3,4 a 7,4 středotlakou rtuťovou výbojkou po dobu 6 hodin. Při pH 3,4 bylo po šesti

hodinách odbouráno cca 70 % SMX, zatímco při pH 7,4 bylo za stejnou dobu eliminováno pouze přibližně 10 % SMX. Následně bylo pomocí HPLC-MS detekováno několik degradačních produktů. Všechny vzniklé produkty měly retenční čas nižší než výchozí látka. Hlavním produktem byl 4-amino-*N*-(5-methyl-2-oxazolyl)benzensulfonamid. Dále byla detekována kyselina sulfanilová, anilin a 3-amino-5-methylisoxazol.

Degradaci vodného roztoku TMP (25 mg/l) ve své práci studovali González et al. (2019). Odbourávání TMP provedli za různých podmínek. V případě, kdy vystavili vzorek pouze UV záření (zdroj středotlaká rtuťová výbojka) bez přítomnosti jakéhokoliv katalyzátoru, tak za 4 hodiny ozařování bylo odbouráno 37 % TMP. Při použití heterogenní fotokatalytické degradace s použitím modifikovaného montmorillonitu³ se jako nejvhodnější katalyzátor projevil montmorillonit pokrytý vrstvou TiO₂ dopovaný chromitými ionty. Za těchto podmínek bylo za 3 hodiny ozařování degradováno 76 % TMP. Ozařování probíhalo 4 hodiny, ale v poslední hodině už další odbourávání nebylo pozorováno. Tento katalyzátor byl vyzkoušen i v obměněné formě, kdy byl dopovaný železitými ionty a po 4 hodinách ozařování bylo dosaženo 50% degradace TMP.

Wang et al. (2019) představili studii, ve které srovnávali účinnost degradace vodného roztoku TMP v koncentraci 20 mg/l za použití UV-A záření, UV+H₂O₂, UV+Fe²⁺, Fentonova činidla (H₂O₂+Fe²⁺) a foto-Fentonovy reakce, která kombinuje UV záření s Fentonovým činidlem. Ve všech případech byly vzorky ozařovány po dobu 30 minut. Při vystavení roztoku UV-A záření a UV+Fe²⁺ bylo degradováno méně než 10 % TMP. Při použití Fentonova činidla dosáhla degradace cca 70 % výchozí látky. K úplné degradaci TMP po 30 minutách ozařování došlo v přítomnosti UV+H₂O₂. Jako nejúčinnější byla vyhodnocena foto-Fentonova reakce, kdy došlo k úplné eliminaci TMP již po 10 minutách ozařování při použití 2,0 mmol/l H₂O₂ a 0,04 mmol/l Fe²⁺.

Fotochemické odbourávání TMP v demineralizované a slané vodě popsali ve své publikaci Sirtori et al. (2010). V rámci studie sledovali vliv záření poskytovaného xenonovou výbojkou a vliv fotokatalýzy (TiO₂-P25) při ozáření slunečním světlem na degradaci TMP. Výsledky fotochemické degradace s použitím pouze xenonové lampy ukazovaly, že v obou vodních prostředích docházelo k pomalé eliminaci. V demineralizované vodě byl veškerý TMP degradován za cca 18,5 hodiny ozařování, zatímco z mořské vody TMP vymizel po cca 23,5 hodinách ozařování. Při fotochemickém

³ Montmorillonit = měkká skupina fylosilikátových minerálů, které vznikají vysrážením z vodního roztoku v podobě mikroskopických krystalů, tzv. jílu.

odbourávání v přítomnosti $\text{TiO}_2\text{-P25}$ jako katalyzátoru byl TMP zcela eliminován v obou prostředích – v demineralizované vodě za 29 minut a ve slané vodě za 79 minut. Rychlost odbourávání sledovala v obou případech kinetiku 1. řádu s rychlostní konstantou $0,22 \text{ min}^{-1}$ v demineralizované vodě a $0,081 \text{ min}^{-1}$ ve slané vodě. Dle autorů byla pravděpodobným důvodem pomalejší degradace ve slané vodě přítomnost anorganických látek, které fungují jako lapače hydroxylových radikálů a tím snižují účinnost fotokatalytického procesu.

Abellán et al. (2009) ve své práci studovali fotochemickou degradaci SMX a TMP za využití xenonové výbojky. Odbourávání SMX mělo zpočátku rychlý průběh, ale následně rychlost degradace klesala a po 6hodinovém ozařování bylo eliminováno pouze 38 % SMX. Za pomalou rychlostí degradace podle autorů pravděpodobně stála produkce absorbujících degradačních oxidačních produktů soutěžících s výchozí látkou o dostupné záření a snižující tak rychlost eliminace. Po přidavku katalyzátoru TiO_2 v suspenzi se degradace SMX výrazně zlepšila. Po 6 hodinách ozařování bylo eliminováno 88 % výchozí látky při koncentraci TiO_2 1,0 g/l. Odbourání TMP mělo rychlejší průběh a po 6hodinovém ozařování došlo k degradaci 99 % výchozí látky. Pro TMP autoři uvádějí, že fotodegradace s použitím jen UV záření je stejně účinná jako fotokatalýza.

Materiály a metody

Sulfamethoxazol sodný a trimethoprim byly zakoupeny od firmy Selleckchem. Zásobní roztok každé z látek, v koncentraci 50 mg/l, byl připraven rozpuštěním v ultračisté vodě Milli-Q®. Hodnoty pH připravených roztoků byly 5,06 pro SMX a 7,80 pro TMP. Jako zdroj železitých iontů byl použit roztok chloridu železitého (Penta) rozpuštěného v HCl o koncentraci 0,1 mol/l.

Pro HPLC analýzy SMX, resp. TMP, byl použit přístroj Thermo Scientific Dionex UltiMate System 3000 (USA) s UV detektorem PDA 3000RS.

Při vývoji chromatografické metody bylo použito odměrné sklo třídy A, analytické váhy MS105DU (Mettler Toledo) a pH metr (Thermo Scientific). Mezi chemikálie použité při vývoji chromatografické metody patří kyselina mravenčí 98–100 % (Merck), acetonitril pro HPLC (Penta), kyselina octová 100 % (Merck), octan amonný pro HPLC (Fluka Analytical), methanol pro HPLC (Merck), trifluoroctová kyselina pro LC-MS (Sigma Aldrich) a deionizovaná voda (Milli-Q® voda).

Pro stanovení SMX byla použita kolona ARION C18 (150 × 3 mm, 5 μm) od výrobce Chromservis. Mobilní fáze A (MFA) obsahovala vodu okyselenou 0,1 obj. % kyseliny mravenčí (90 obj. %) a mobilní fáze B (MFB) obsahovala acetonitril okyselený 0,1 obj. % kyseliny mravenčí (10 obj. %). Eluce probíhala při konstantním složení mobilní fáze, tedy při použití izokratické eluce. Průtok MF činil 1 ml/min a nastavená teplota kolonového prostoru byla 35 °C. Analýza roztoků při sledování fotochemické degradace byla provedena při vlnové délce 197 nm.

Pro stanovení TMP byla využita kolona LUNA C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) od výrobce Phenomenex. MFA byla složena z vody okyselené 0,1 obj. % kyseliny trifluoroctové (82 obj. %) a MFB obsahovala acetonitril okyselený 0,1 obj. % kyseliny trifluoroctové (18 obj. %). Při analýze byla použita izokratická eluce. Nastavený průtok MF byl 1,5 ml/min a použitá teplota kolonového prostoru byla 25 °C. Pro analýzu roztoků byla vybrána vlnová délka 205 nm. V obou případech byla získaná data zpracována pomocí programu Chromeleon.

Absorpční spektra byla změřena pomocí přístroje UV-1601 Shimadzu. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru UV-Probe.

Při ozařování vzorků byl jako zdroj světla použit reaktor Rayonet RPR 100, který byl osazen lampami RPR 3000 Å emitujícími záření o vlnové délce 250–350 nm. Záření o vlnových délkách kratších než 300 nm bylo odfiltrováno použitím optického skla, tj. všechny vzorky byly ozařovány ve skleněných kyvetách opatřených víčkem.

Ke sledování fotoredukce železitých iontů bylo použito komplexační činidlo 1,10-fenantrolin. Absorbance vzniklého komplexu byla měřena pomocí spektrofotometru JEN-WAY 6300 při vlnové délce 510 nm.

Výsledky a diskuse

Vývoj a optimalizace HPLC metody pro stanovení sulfamethoxazolu (SMX)

V průběhu zavedení metody pro stanovení SMX a jeho degradačních produktů byla dle publikace (Mezghich et al., 2017) použita chromatografická kolona ARION C18 (150 × 3 mm, 5 μm) od výrobce Chromservis.

Podle informací z publikací (Mezghich et al., 2017; Brenner et al., 2011) byla vyzkoušena tři různá složení mobilních fází. Složení použitých mobilních fází je shrnuto v Tab. I.

Tab. I: Složení mobilních fází použitých při vývoji SMX HPLC metody.

	MFA	MFB
Mobilní fáze 1	0,1 obj. % kyseliny mravenčí ve vodě pH 2,8	0,1 obj. % kyseliny mravenčí v acetonitrilu
Mobilní fáze 2	1,3 mM octan amonný, 1 obj. % kyseliny octové ve vodě pH 3,0	1 obj. % kyseliny octové v methanolu
Mobilní fáze 3	1,3 mM octan amonný, 1 obj. % kyseliny octové ve vodě pH 3,0	1 obj. % kyseliny octové v acetonitrilu

Na základě informací z publikace (Mezghich et al., 2017) se *mobilní fáze 1* skládala z 0,1 obj. % vodného roztoku kyseliny mravenčí (MFA) a acetonitrilu okyseleného 0,1 obj. % kyseliny mravenčí (MFB). Separace byla provedena při teplotě kolonového prostoru 35 °C a průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Při vývoji chromatografické metody pro stanovení SMX byl vyzkoušen různý poměr mobilní fáze MFA a MFB. Při složení mobilní fáze (80/20 obj. %) byl detekován pík, jehož retenční čas byl 4,3 min. Mrtvý retenční čas byl 1,0 min a vypočtený retenční faktor 3,3. Pro degradační produkty SMX lze předpokládat, že budou mít nižší retenční čas než výchozí látka. Dalším krokem byla tedy úprava chromatografických podmínek za účelem zvýšení retenčního faktoru SMX.

V systému s reverzními fázemi, tzn., že mobilní fáze je polárnější než charakter stacionární fáze, dochází k růstu retence látky s klesající frakcí organického rozpouštědla v mobilní fázi (Nováková et al., 2021).

Při změně složení mobilní fáze na poměr MFA/MFB (85/15 obj. %) byl analyt delší dobu zadržován na koloně, čímž se zvýšil retenční čas na 7,3 min. Vypočtený kapacitní faktor byl 6,3. Pík analytu SMX byl symetrický, vysoký a úzký s faktorem asymetrie (A) 1,1. Tato metoda je sice vhodná pro stanovení SMX, ale jak se později ukázalo, není optimální pro stanovení degradačních produktů SMX, neboť degradační produkty vycházejí v mrtvém objemu.

Další úprava poměru mobilní fáze MFA a MFB na (90/10 obj. %) vedla ke zvýšení retenčního času analytu na 15,1 min. Nástřik byl upraven z původní hodnoty 20 μ l na 100 μ l. Pík analytu byl úzký a symetrický s faktorem asymetrie 1,15. Změřením absorpčního spektra bylo zjištěno, že SMX má absorpční maximum při vlnové délce 197 nm a 270 nm. Při vlnové délce 197 nm byla následně prováděna analýza roztoků při sledování fotochemické degradace. Tato metoda byla nakonec vybrána jako výsledná metoda pro stanovení SMX a jeho degradačních produktů.

Dle autorů publikace Brenner et al. (2011) byla *mobilní fáze 2* složena z 1,3 mM octanu amonného a 1 obj. % kyseliny octové ve vodě (MFA) a mobilní fáze (MFB) obsahovala 1 obj. % kyseliny octové v methanolu. Separace byla provedena při teplotě kolonového prostoru 30 °C a průtok MF byl 0,75 ml/min. Při hledání optimální separace byly vyzkoušeny různé poměry MFA a MFB, ale ani změnou složení mobilní fáze se nepodařilo dosáhnout optimálních podmínek separace.

Mobilní fáze 3 měla podobné složení jako *mobilní fáze 2*, jen methanol byl nahrazen acetonitrilem, neboť eluční síla acetonitrilu je podstatně vyšší než methanolu. Vyšší eluční síla acetonitrilu měla zajistit nižší retenci analytu na koloně.

Teplota kolonového prostoru byla 30 °C a průtok mobilní fáze činil 1 ml/min. Poměr mobilních fází MFA/MFB byl nastaven na (85/15 obj. %). Retenční čas analytu byl 7,6 min, retenční faktor měl hodnotu 6,6. Pík analytu byl symetrický s faktorem asymetrie 1,1. Získaný signál byl dostatečně intenzivní. Tuto metodu lze též využít pro stanovení SMX.

Ze získaných dat chromatografické separace jak neozářených, tak ozářených vodných roztoků SMX byla vytvořena finální metoda, jejíž parametry jsou uvedeny v Tab. II.

Tab. II: Parametry finální HPLC metody pro SMX.

Název parametru	Parametr
Chromatografická kolona	ARION C18 (150 × 3 mm, 5 μm), Chromservis
Teplota kolonového prostoru	35 °C
MFA	0,1 obj. % kyseliny mravenčí ve vodě
MFB	0,1 obj. % kyseliny mravenčí v acetonitrilu
Poměr MFA/MFB	Izokratická eluce (90/10 obj. %)
Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Objem nástřiku	100 μl
Celková délka analýzy	18 min
Vlnová délka detekce	197 nm

Vývoj a optimalizace HPLC metody pro stanovení trimethoprimu (TMP)

Při zavedení metody pro stanovení TMP a jeho degradačních produktů ve vodném roztoku byly použity na základě literární rešerše (Mezghich et al., 2017; Wang et al., 2012) dvě chromatografické kolony – kolona ARION C18 (150 × 3 mm, 5 μm) a kolona LUNA C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm).

Na koloně ARION C18 byla dle publikace Brenner et al. (2011) použita mobilní fáze složená z 1,3 mM octanu amonného a 1 obj. % kyseliny octové ve vodě (MFA) a MFB obsahovala 1 obj. % kyseliny octové v acetonitrilu. Separace probíhala při teplotě 30 °C a průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Při analýze byl použit poměr MFA/MFB (85/15 obj. %). Analyt se však na koloně nezadržoval. Mrtvý retenční čas činil 1,0 min a retenční čas analytu měl hodnotu 1,2 min. Kapacitní poměr byl velice nízký ($k = 0,24$), metoda tak nebyla vhodná pro další analýzy.

Pro optimalizaci metody bylo potřeba zvýšit retenční čas analytu, čehož bylo dosaženo změnou poměru mobilní fáze MFA/MFB na (95/5 obj. %). Touto změnou se podařilo zvýšit retenční čas analytu na 5,9 min, což by pro stanovení TMP bylo ideální, neboť kapacitní poměr činil 4,9. Pík analytu byl ale velice široký a nesymetrický s faktorem asymetrie 2,2.

Na koloně ARION C18 se nepodařilo nalézt vhodné chromatografické podmínky pro stanovení TMP. Z uvedeného důvodu bylo potřeba přistoupit k použití delší kolony, aby se prodloužila retence látky na koloně.

Na koloně Luna C18 od výrobce Phenomenex byly vyzkoušeny dvě mobilní fáze (Brenner et al., 2011; Ašperger et al., 2009). Složení využitých mobilních fází je shrnuto v Tab. III.

Tab. III: Složení mobilních fází použitých při vývoji TMP HPLC metody.

	MFA	MFB
Mobilní fáze 1	1,3 mM octan amonný, 1 obj. % kyseliny octové ve vodě pH 3,0	1 obj. % kyseliny octové v acetonitrilu
Mobilní fáze 2	0,1 obj. % trifluorocetové kyseliny ve vodě pH 1,9	0,1 obj. % trifluorocetové kyseliny v acetonitrilu

Mobilní fáze 1 obsahovala 1,3 mM roztok octanu amonného a 1 obj. % kyseliny octové ve vodě (MFA), zatímco složení MFB bylo 1 obj. % kyseliny octové v acetonitrilu. Poměr mobilní fáze byl nastaven na (85/15 obj. %). Separace probíhala při teplotě kolonového prostoru 30 °C a průtok mobilní fáze činil 1,5 ml/min. Mrtvý retenční čas měl hodnotu 2,2 min a retenční čas analytu byl 4,2 min. Kapacitní poměr měl hodnotu 0,90. Pík analytu mírně chvostoval a nebyl symetrický, faktor asymetrie byl 2,5. Retence analytu navíc nebyla dostatečná vzhledem k předpokládaným degradačním produktům s nižším retenčním časem než samotný pík TMP. Z toho důvodu bylo potřeba změnit podmínky tak, aby byl analyt zadržován na koloně delší dobu. Konkrétně byla snížena teplota kolonového prostoru na 25 °C. Touto změnou došlo k posunu píku. Retenční čas se sice zvýšil na hodnotu 4,4 min, ale získaná eluční zóna neměla optimální vlastnosti a faktor asymetrie měl hodnotu 2,3.

Použitím delší kolony, změnou složení mobilní fáze a snížením teploty kolonového prostoru došlo k mírnému zlepšení podmínek, přesto se však stále nejednalo o optimální metodu pro stanovení TMP. Pro zajištění vyššího retenčního času analytu bylo sníženo pH

mobilní fáze. Na základě informací z publikace Ašperger et al. (2009) bylo snížení pH dosaženo použitím silné kyseliny trifluoroctové.

Mobilní fáze 2 se skládala z vodného roztoku, který byl okyselen 0,1 obj. % kyseliny trifluoroctové (MFA) a MFB obsahovala 0,1 obj. % trifluoroctové kyseliny v acetonitrilu. Separace probíhala při teplotě kolonového prostoru 25 °C a průtok MF byl 1,5 ml/min. Byl vyzkoušen různý poměr MFA a MFB. Při poměru mobilních fází (85/15 obj. %) byl analyt na koloně zadržován velice dlouho, retenční čas byl 11 min. Pík analytu byl mírně asymetrický, tzv. chvostoval. Na rozdíl od předchozích analýz, při těchto podmínkách byla délka analýzy příliš dlouhá, a proto bylo potřeba upravit podmínky tak, aby se analýza zkrátila. Z toho důvodu byl zvýšen podíl organické fáze. Tato změna měla vést k nižšímu retenčnímu času analytu a současně ke zúžení píku, případně i ke zlepšení symetrie.

Poměr mobilních fází MFA a MFB byl změněn na (75/25 obj. %). Touto změnou došlo k výrazné změně retenčního času. Analyt byl velice rychle vymyt z kolony a retenční čas píku byl 3,4 min. Získaný pík analytu byl symetrický, vysoký a úzký s faktorem asymetrie 1,8. Kapacitní poměr byl však za těchto podmínek velice nízký ($k = 0,75$) a s ohledem na to, že jsou předpokládány degradační produkty, tak metoda nebyla využitelná.

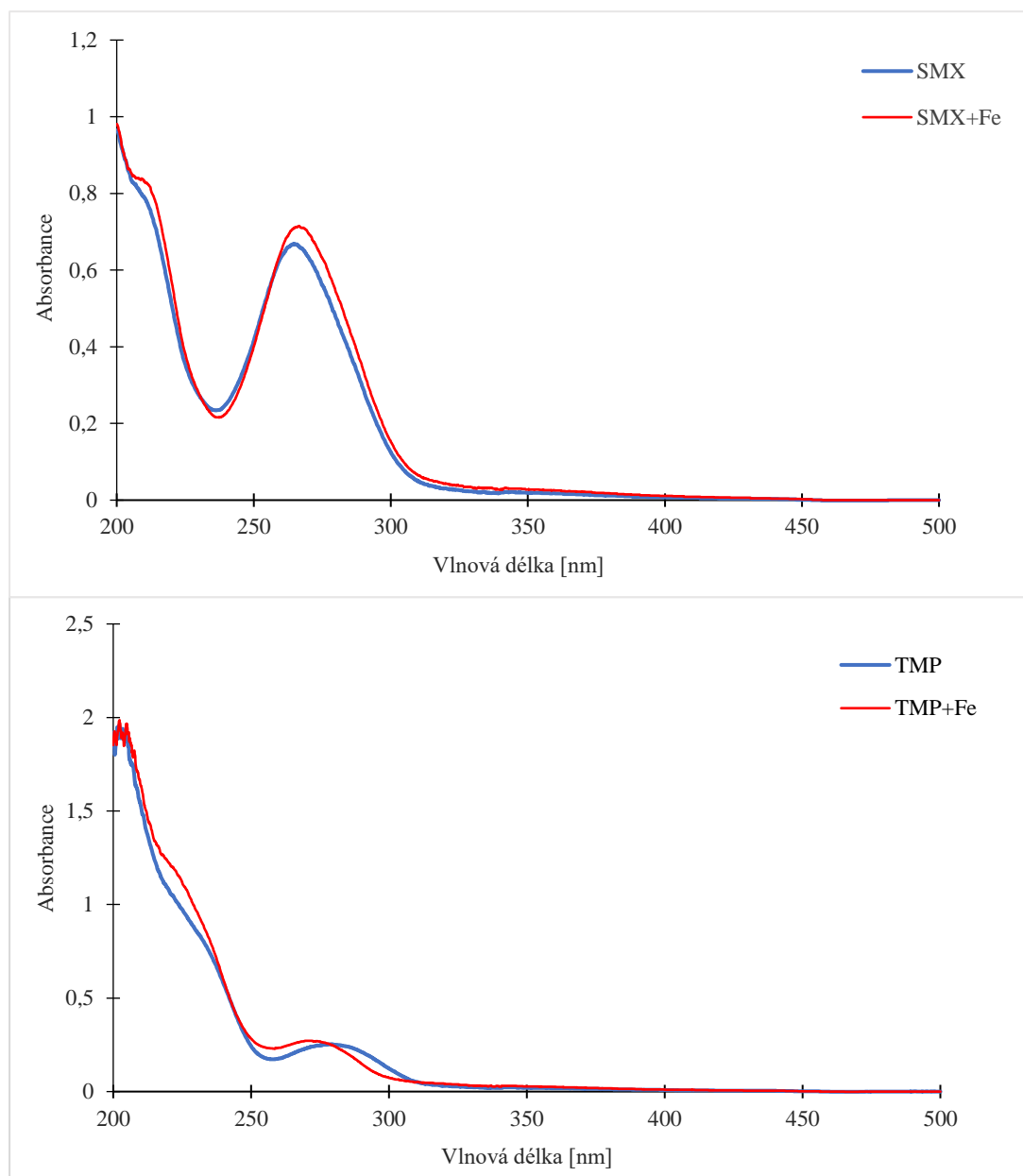
Vzhledem k tomu, že bylo potřeba zadržet analyt na koloně delší dobu, byl snížen podíl organické složky. Z tohoto důvodu byl zvolen poměr mobilní fáze MFA/MFB (82/18 obj. %). Touto změnou se podařilo ideálně posunout retenční čas analytu, jehož hodnota činila 6,9 min. Kapacitní poměr měl hodnotu 2,1. Získaný pík byl symetrický, faktor asymetrie měl hodnotu 1,5. Pík analytu byl vysoký, poměrně úzký a signál intenzivní. Změřením absorpčního spektra byla získána absorpční maxima pro TMP 205 nm a 273 nm. Při vlnové délce 205 nm byla následně prováděna analýza roztoků při sledování fotochemické degradace. Tato metoda byla vybrána jako finální metoda pro stanovení TMP a jeho degradačních produktů, její parametry jsou uvedeny v Tab. IV.

Tab. IV: Parametry finální HPLC metody pro TMP.

Název parametru	Parametr
Chromatografická kolona	LUNA C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm), Phenomenex
Teplota kolonového prostoru	25 °C
MFA	0,1 obj. % trifluoroctové kyseliny ve vodě
MFB	0,1 obj. % trifluoroctové kyseliny v acetonitrilu
Poměr MFA/MFB	Izokratická eluce (82/18 obj. %)
Průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
Objem nástřiku	20 μl
Celková délka analýzy	8 min
Vlnová délka detekce	205 nm

Fotochemické odbourávání sulfamethoxazolu (SMX) a trimethoprimu (TMP)

Absorpční spektra samotných roztoků SMX a TMP a roztoků s přidavkem železitých iontů jsou zaznamenány na Obr. 3.



Obr. 3: Absorpční spektrum roztoků SMX (50 mg/l) a TMP (50 mg/l) bez přidavku a s přidavkem železitých iontů (5 mg/l).

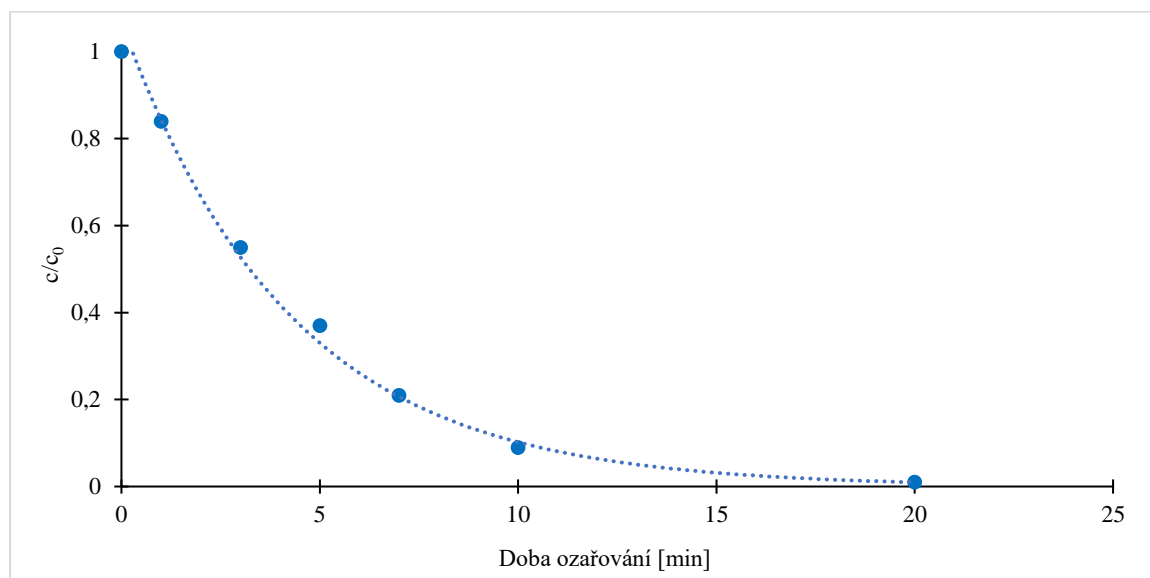
Jak je vidět z Obr. 3, samotný SMX významně absorbuje v UV oblasti, konkrétně v oblasti vlnových délek cca 240–300 nm s maximem při vlnové délce 260 nm. V oblasti vlnových délek nad 300 nm je však absorpce zanedbatelná. Přídavek železitých iontů zvyšuje absorpci SMX v oblasti nad 300 nm pouze nevýznamně.

TMP má absorpční maximum při vlnové délce 280 nm, zatímco v oblasti nad 300 nm absorbuje minimálně. Přídavek železitých iontů absorpci u 300 nm nezmění.

Absorpce v oblasti nad 300 nm je pro možnost fotochemického odbourávání v přírodním prostředí důležitá, protože na zemský povrch se za normálních okolností nedostane sluneční záření kratších vlnových délek (Fondriest, 2014).

Železo je nejhojněji se vyskytujícím kovem v přírodních vodách, a to až v koncentracích jednotek mg/l (Dojlido & Best, 1993). S organickými substráty může pak tvořit komplexy, které mají významně vyšší absorpci v oblasti nad 300 nm, jako např. v případě roztoku jednoho z antilipidemik ze skupiny statinů, atorvastatinu (Petráňová, 2020). V případě SMX a TMP to však nebyl tento případ.

Průběh fotochemické degradace SMX je zobrazen na Obr. 4. Přestože absorpce roztoku je zanedbatelná, bylo pozorováno rychlé odbourávání SMX – z Obr. 4 je patrné, že za 20 minut byl veškerý SMX odbourán. Rychlost odbourávání lze popsat rovnicí kinetiky 1. řádu, kdy rychlostní konstanta má hodnotu $0,215 \text{ min}^{-1}$.

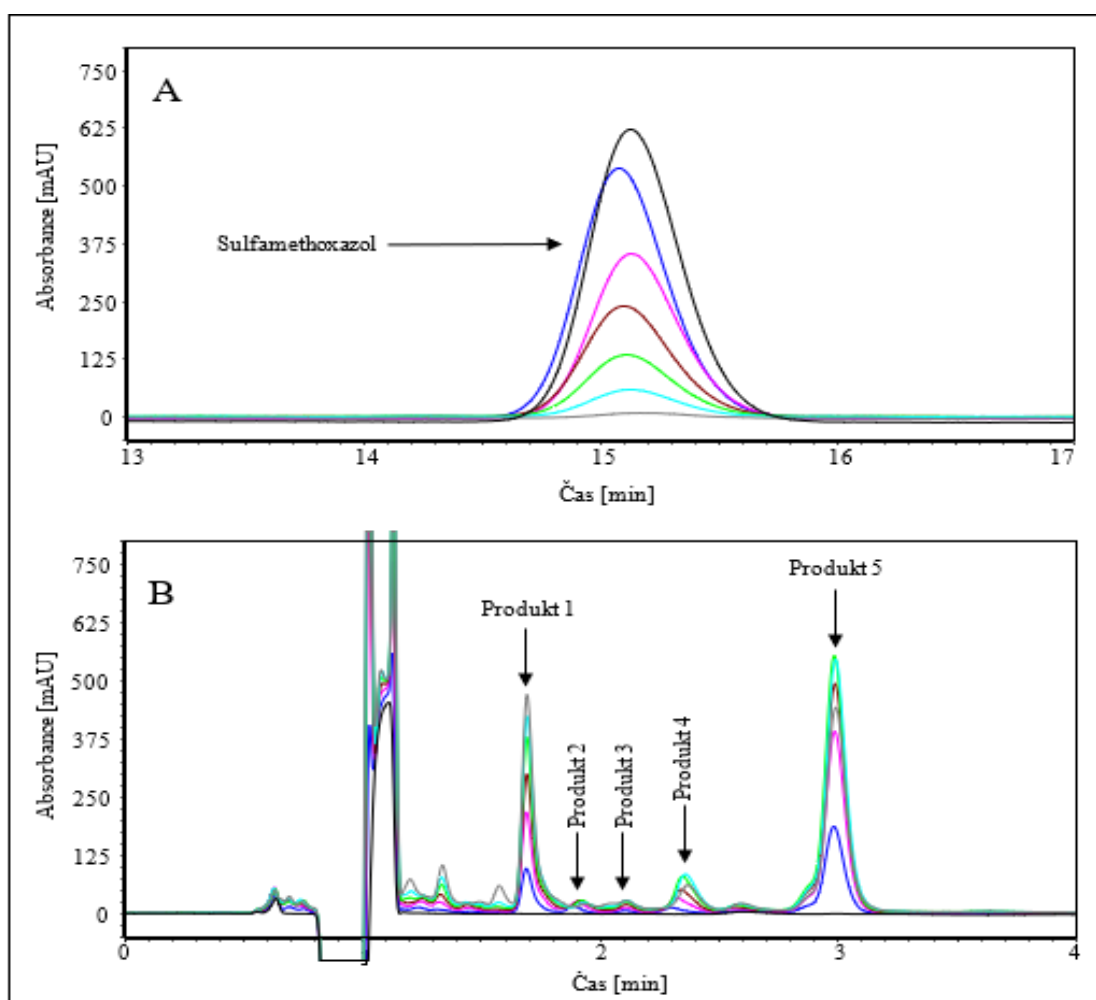


Obr. 4: Průběh fotochemického odbourávání SMX.

Rychlé odbourávání SMX je poněkud překvapivé ve srovnání s údaji udávanými v literatuře, kde se objevuje velká závislost na pH – v kyselém prostředí je pozorována významně vyšší reaktivita (Periša et al., 2013; Trovó et al., 2009; Zhou & Moore, 1994). Nicméně ani ve výrazně kyseljším prostředí nebyla pozorována takto rychlá reakce. Periša et al. (2013) uvádí hodnotu rychlostní konstanty při pH 4,0 rovnou $0,035 \text{ min}^{-1}$, což

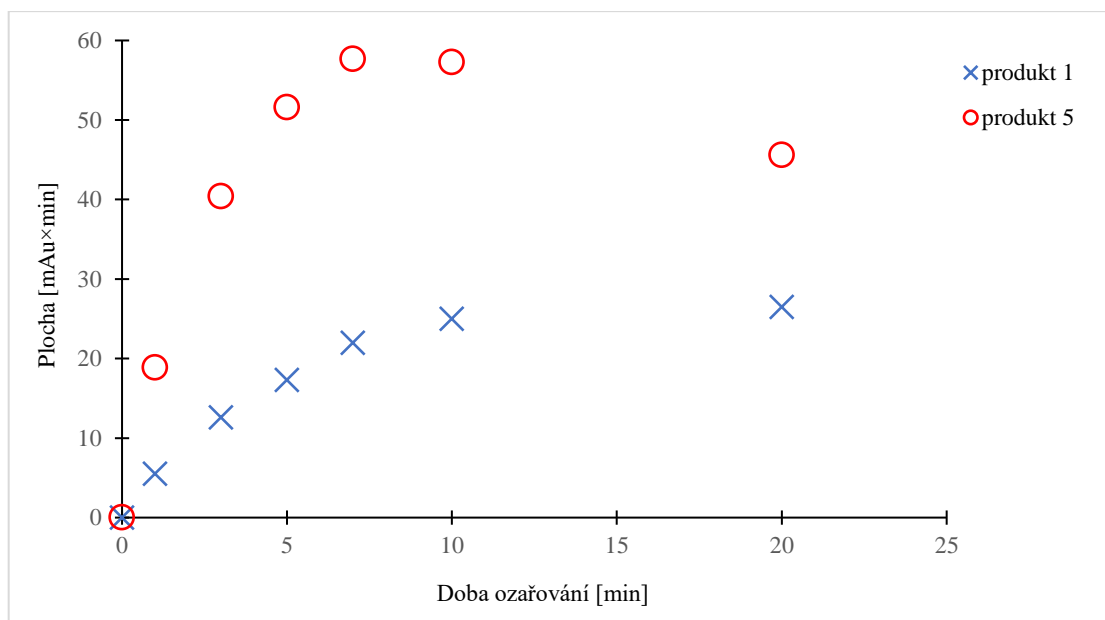
je hodnota téměř řádově menší než zde naměřená hodnota $0,215 \text{ min}^{-1}$ při pH 5,06. Důvodem nízké hodnoty rychlostní konstanty v práci autorů Periša et al. (2013) může být použití zdroje emitujícího záření v širokém rozmezí vlnových délek (300–800 nm), kdy většina uváděného výkonu zdroje (500 W/m^2) byla pravděpodobně v oblasti neúčinných dlouhých vlnových délek.

Při fotochemické degradaci SMX bylo za daných analytických podmínek na chromatogramu detekováno pět degradačních produktů. Dva produkty lze považovat za vyhodnotitelné, zatímco zbylé tři produkty detekované na chromatogramu jsou minoritní a nebyly vyhodnocovány. Obr. 5 zobrazuje, že všechny vzniklé produkty degradace měly nižší retenční čas než výchozí látka.



Obr. 5: Chromatogramy SMX a degradačních produktů v jednotlivých ozářovacích časech: černá – SMX neozářený, modrá – ozáření 1 min, růžová – 3 min, hnědá – 5 min, zelená – 7 min, tyrkysová – 10 min, šedá – 20 min, A – zvýrazněná výchozí látka, B – zvýrazněné produkty degradace.

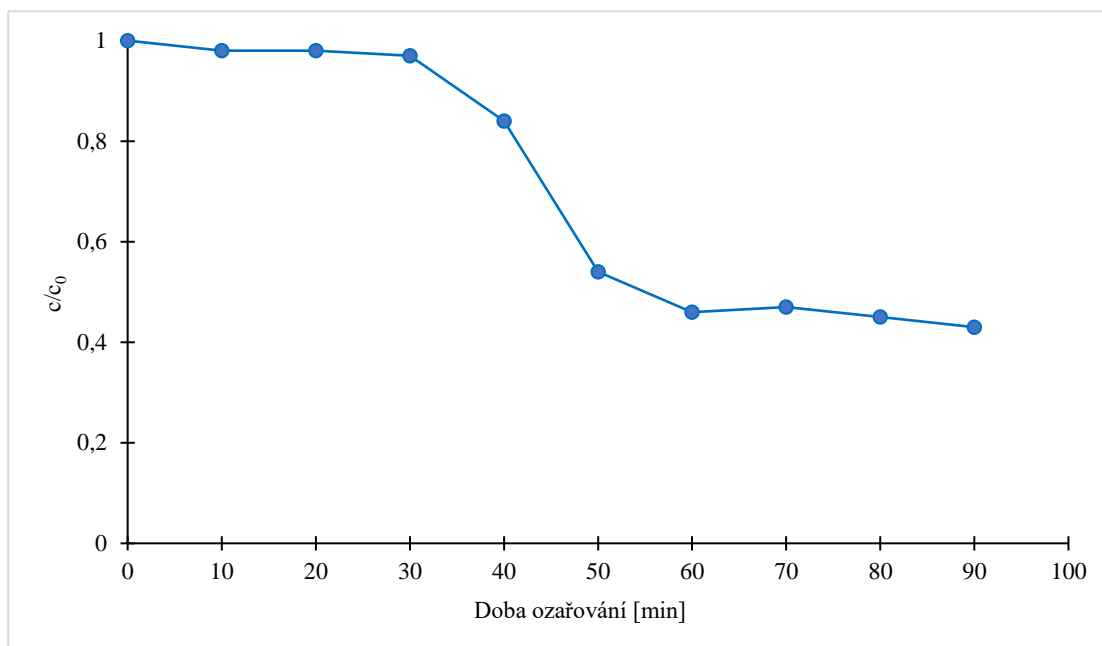
Za vyhodnotitelný lze považovat degradační produkt s retenčním časem 1,7 min, který je označen jako produkt 1, a degradační produkt s retenčním časem 3,0 min označený jako produkt 5. Vyhodnocení průběhu těchto dvou produktů degradace je zobrazeno na Obr. 6.



Obr. 6: Průběh množství produktů 1 ($t_R = 1,7$ min) a 5 ($t_R = 3,0$ min) v závislosti na délce ozařování.

Podíl produktu 1, jehož retenční čas je 1,7 min, v průběhu ozařování postupně roste, zatímco u degradačního produktu 5 dochází v prvních sedmi minutách k nárůstu a při delším ozařování jeho intenzita klesá. Tento produkt lze označit za meziprodukt, neboť z průběhu je pravděpodobné, že delším ozařováním nebo následnou temnou (tedy nefotochemickou) fází se rozpadá na jinou látku.

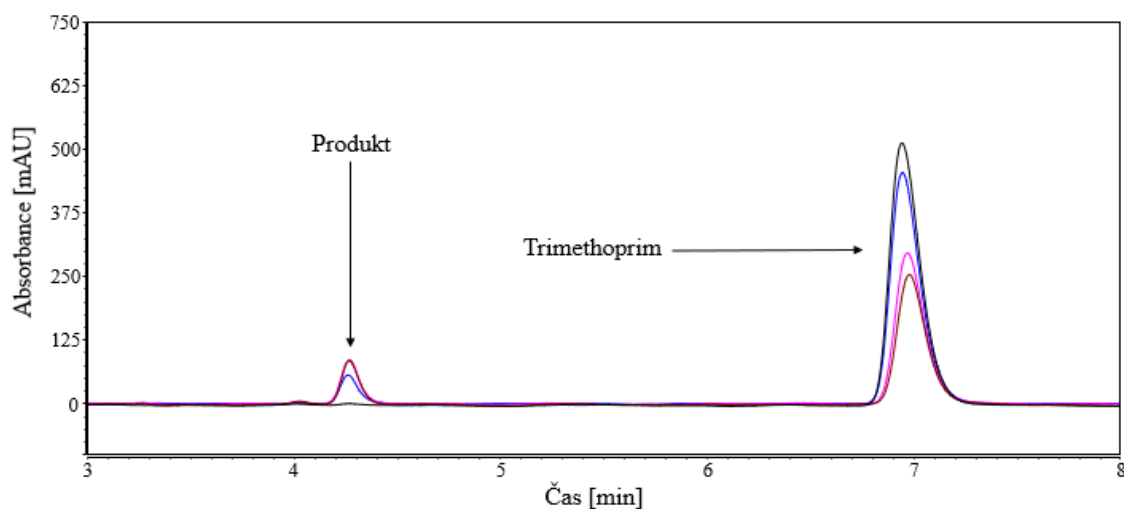
U samotného TMP došlo při ozáření po dobu 60 minut k odbourání cca 30 % TMP. Po přidavku železitých iontů se podíl odbouraného TMP zvýšil. Průběh odbourávání znázorňuje Obr. 7.



Obr. 7: Průběh fotochemického odbourávání TMP (50 mg/l) s přidavkem železitých iontů (5 mg/l).

Jak je vidět z grafu na Obr. 7, v prvních cca 30 minutách nedošlo prakticky k žádné reakci. V další fázi bylo pozorováno postupně se zrychlující odbourávání (do 50. minuty), mezi 50. a 60. minutou se degradace zpomalila a po 60 minutách již delším ozařováním degradace nepokračovala. Celkem bylo odbouráno cca 55 % původního množství TMP. Lagová fáze na začátku reakce by se dala vysvětlit pomalou fotoredukci přidaného katalyzátoru, tj. železitých iontů, neboť katalyticky aktivní je redukovaná forma (Klementova, 2018). Nicméně měření rychlosti fotoredukce železitých iontů ukázalo, že po jedné minutě ozařování jsou v reakční směsi přítomny 4 % železitých iontů v redukované formě a toto množství se nezmění ani po 40 minutách ozařování. Pomalá fotoredukce tedy nemůže být příčinou lagové fáze. Jiným vysvětlením lagové fáze může být autokatalýza či autosenzitizace, tedy tvorba a postupné nahromadění produktu, který pak urychlí reakci (Klementova et al., 2017). Nejasné ovšem zůstává, proč se fotodegradace zastaví na cca 45 % původního množství substrátu – je možné, že některý z produktů působí jako inhibitor např. tím, že tvoří adukt s TMP.

Během fotochemické degradace TMP v přítomnosti železitých iontů byl detekován jeden vyhodnotitelný degradační produkt, jak ukazuje Obr. 8.



Obr. 8: Chromatogramy reakční směsi TMP + Fe³⁺ a degradačního produktu v jednotlivých ozařovacích časech: černá – ozáření 30 min, modrá – 40 min, růžová – 50 min, hnědá – 60 min.

Produkt s retenčním časem 4,3 min se objevuje až při delším ozařování, pík je patrný po 40 minutách ozařování a do 50. minuty pík narůstá. S delším ozařováním se již jeho intenzita nezvyšuje.

González et al. (2019) uvádějí, že při ozáření středotlakou Hg výbojkou došlo za 4 hodiny k odbourání 37 % TMP. Prvních 90 minut odbourávání v jejich publikaci má prakticky stejný průběh jako v předkládané práci (Obr. 7) – prvních 30 minut byl pozorován pozvolný nástup reakce, pak do cca 60. minuty byla sledována rychlejší eliminace, poté se odbourávání zastavilo až do cca 150. minuty a ve zbývajícím čase byl pozorován další mírný úbytek. Celkový nižší úbytek TMP oproti zde předkládaným výsledkům je pravděpodobně způsobený tím, že González et al. (2019) používali zdroj záření o delších vlnových délkách (313 nm a 366 nm). Wang et al. (2019) pozorovali při ozáření vodného roztoku TMP za dobu 30 minut degradaci méně než 10 % TMP, stejně tak při přidavku železnatých iontů. Z průběhu reakce je vidět, že v jejich případě reakce probíhala prakticky jen prvních 10 minut, poté už k degradaci za těchto podmínek nedocházelo. Sirtori et al. (2010) nepozorovali prakticky žádnou reakci po dobu prvních šesti hodin v případě ozařování TMP v destilované vodě za použití xenonové výbojky jako zdroje záření. Reakce začala probíhat až při delším ozařování, po cca 18 hodinách byl TMP z roztoku eliminován.

Závěr

Závěrem lze shrnout, že pro oba studované substráty, SMX a TMP, byla zavedena HPLC metoda, která umožnila studovat nejen úbytek samotného substrátu ale i produkty s nižším retenčním časem.

Ozařování s použitím vlnových délek odpovídajících nejvyšším energiím slunečního záření, které dopadá na zemský povrch, vede u obou substrátů k odbourávání. Průběh odbourávání SMX lze modelovat kinetikou 1. řádu, stanovená rychlostní konstanta má hodnotu $0,215 \text{ min}^{-1}$. U TMP se v odbourávání vyskytuje lagová fáze na začátku ozařování a ozařování nevede k úplné eliminaci TMP, nýbrž úbytek se prakticky zastaví na cca 45 % zbytkového TMP.

Při ozařování SMX bylo pozorováno velké množství vznikajících produktů, z nichž dva se zdají být z hlediska intenzity signálu produkty majoritními. Při ozařování TMP byl detekován pouze jeden vznikající produkt.

Seznam použitých zdrojů

Abellán M. N., Giménez J., Esplugas S. (2009). Photocatalytic Degradation of Antibiotics: The Case of Sulfamethoxazole and Trimethoprim. *Catal. Today*. **144**(1–2), 131–136. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2009.01.051> [16.3.2023].

Akay C., Özkan S. A. (2002). Simultaneous LC Determination of Trimethoprim and Sulphamethoxazole in Pharmaceutical Formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **30**(4), 1207–1213. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00460-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00460-0) [25.2.2023].

Asadi S., Gharbani P. (2013). Simultaneous Determination of Sulfamethoxazole and Phthalazine by HPLC and Multivariate Calibration Methods. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* **32**(2), 1–8. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/287418148_Simultaneous_Determination_of_Sulfamethoxazole_and_Phthalazine_by_HPLC_and_Multivariate_Calibration_Methods [27.2.2023].

Ashton D., Hilton M., Thomas K. V. (2004). Investigating the Environmental Transport of Human Pharmaceuticals to Streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* **333**(1–3), 167–184. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.04.062> [7.3.2023].

Ašperger D., Babić S., Pavlović D. M., Dolar D., Košutić K., Horvat A. J. M., Kaštelan-Macan M. (2009). SPE-HPLC/DAD Determination of Trimethoprim, Oxytetracycline and Enrofloxacin in Water Samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **89**(8–12), 809–819. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/03067310902822896> [27.2.2023].

Baran W., Adamek E., Ziemiańska J., Sobczak A. (2011). Effects of the Presence of Sulfonamides in the Environment and their Influence on Human Health. *J. Hazard. Mater.* **196**, 1–15. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.082> [5.3.2023].

Bedor D. C. G., Gonçalves T. M., Ferreira M. L. L., de Sousa C. E. M., Menezes A. L., Oliveira E. J., de Santana D. P. (2008). Simultaneous Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim in Biological Fluids for High-throughput Analysis: Comparison of HPLC with Ultraviolet and Tandem Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr. B.* **863**(1), 46–54. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.12.027> [11.8.2022].

Brenner C. G. B., Mallmann C. A., Arsand D. R., Mayer F. M., Martins A. F. (2011). Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim and Their Metabolites in Hospital Effluent. *Clean (Weinh)*. **39**(1), 28–34. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/clen.201000162> [5.9.2022].

Dinh Q., Moreau-Guigon E., Labadie P., Alliot F., Teil M. J., Blanchard M., Eurin J., Chevreuil M. (2017). Fate of Antibiotics from Hospital and Domestic Sources in a Sewage Network. *Sci. Total Environ.* **575**, 758–766. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.118> [28.3.2023].

Dmitrienko S. G., Kochuk E. V., Apyari V. V., Tolmacheva V. V., Zolotov Y. A. (2014). Recent Advances in Sample Preparation Techniques and Methods of Sulfonamides Detection – A Review. *Anal. Chim. Acta.* **850**, 6–25. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.08.023> [7.3.2023].

Dojlido J., Best, G. A. (1993). Elements of Group VII – Iron. In Chemistry of Water and Water Pollution. Ellis Horwood Limited, Bodmin (UK). ISBN 978-0138789190.

Eliopoulos G. M., Huovinen P. (2001). Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clin. Infect. Dis.* **32**(11), 1608–1614. Dostupné z: <https://doi.org/10.1086/320532> [25.3.2023].

Fondriest Environmental, Inc. (2014). Solar Radiation and Photosynthetically Active Radiation. Fundamentals of Environmental Measurements. 21 Mar. 2014. Web. Dostupné z: <https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/weather/photosynthetically-active-radiation/> [10.11.2022].

García-Galán M. J., Díaz-Cruz M. S., Barceló D. (2008). Identification and Determination of Metabolites and Degradation Products of Sulfonamide Antibiotics. *Trends Analyt. Chem.* **27**(11), 1008–1022. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.001> [23.3.2023].

Gong H., Chu W. (2015). Photodegradation of Sulfamethoxazole with a Recyclable Catalyst. *Ind. Eng. Chem. Res.* **54**(51), 12763–12769. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b03849> [12.3.2023].

González B., Trujillano R., Vicente M. A., Rives V., Korili S. A., Gil A. (2019). Photocatalytic Degradation of Trimethoprim on Doped Ti-pillared Montmorillonite. *Appl. Clay Sci.* **167**, 43–49. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clay.2018.10.006> [12.3.2023].

Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K. L. (1999). Occurrence of Antibiotics in the Aquatic Environment. *Sci. Total Environ.* **225**(1–2), 109–118. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00337-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4) [27.3.2023].

Hruska M. W., Frye R. F. (2004). Determination of Trimethoprim in Low-volume Human Plasma by Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B.* **807**(2), 301–305. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.021> [27.2.2023].

Chen K., Zhou J. L. (2014). Occurrence and Behavior of Antibiotics in Water and Sediments from the Huangpu River, Shanghai, China. *Chemosphere.* **95**, 604–612. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.119> [27.3.2023].

Jewell K. S., Castronovo S., Wick A., Falås P., Joss A., Ternes T. A. (2016). New Insights into the Transformation of Trimethoprim during Biological Wastewater Treatment. *Water Res.* **88**, 550–557. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.026> [6.3.2023].

Klementova S. (2018) Photochemical Degradation of Organic Xenobiotics in Natural Waters. In Photochemistry and Photophysics – Fundamentals to Applications. Eds. Saha S., Mondal S. *InTechOpen.* 10–17. ISBN 978-1-78923-783-2. Dostupné z: <http://mts.intechopen.com/articles/show/title/photochemical-degradation-of-organic-xenobiotics-in-natural-waters> [14.12.2022].

Klementova S., Kahoun D., Doubkova L., Frejlichova K., Dusakova M., Zlamal M. (2017). Catalytic Photodegradation of Pharmaceuticals – Homogeneous and Heterogeneous Photocatalysis. *Photochem. Photobiol. Sci.* **16**, 67–71. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6PP00164E> [3.3.2023].

Kubasov A. S., Kochetkov P. P., Balyshv A. V., Lobova P. S., Abramov S. V., Abramov V. E. (2016). Simultaneous Determination of Trimethoprim, Enrofloxacin, and Ciprofloxacin in Blood Serum of Poultry. *J. Anal. Chem.* **71**(6), 637–640. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1134/S1061934816060071> [7.4.2023].

Lüllmann H., Mohr K., Hein L. (2007). Barevný atlas farmakologie. 3. vydání., české. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-1672-5.

Majewsky M., Wagner D., Delay M., Bräse S., Yargeau V., Horn H. (2014). Antibacterial Activity of Sulfamethoxazole Transformation Products (TPs): General Relevance for Sulfonamide TPs Modified at the para Position. *Chem. Res. Toxicol.* **27**(10), 1821–1828. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/tx500267x> [23.3.2023].

Malintan N. T., Mohd M. A. (2006). Determination of Sulfonamides in Selected Malaysian Swine Wastewater by High-performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A.* **1127**(1–2), 154–160. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.06.005> [1.3.2023].

Mezghich S., Ayari F., Sarakha M. (2017). Photochemical Degradation of the Antimicrobial Sulfamethoxazole upon Solar Light Excitation: Kinetics and Elucidation of Byproducts Using LC/ ESI /MS2 Technique. *Mass Spectrom. Purif. Tech.* **3**(1), 1000118. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/319155506_Photochemical_Degradation_of_the_Antimicrobial_Sulfamethoxazole_upon_Solar_Light_Excitation_Kinetics_and_Elucidation_of_Byproducts_Using_LC_ESIMS2_Technique [31.8.2022].

van Miert A. S. (1994). The Sulfonamide-diaminopyrimidine Story. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **17**(4), 309–316. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7966552/> [24.3.2023].

Nováková L., Douša M., Česla P. (2021). Moderní HPL separace v teorii a praxi. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek. ISBN 978-80-270-8559-0.

Periša M., Babić S., Škorić I., Frömel T., Knepper T. P. (2013). Photodegradation of Sulfonamides and their N-4-acetylated Metabolites in Water by Simulated Sunlight Irradiation: Kinetics and Identification of Photoproducts. *Environ. Sc. Pollut. Res.* **20**(12), 8934–8946. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-013-1836-1> [12.3.2023].

Petráňová P. (2020). Statiny – jejich použití, mechanismus účinku, vedlejší efekty. Atorvastatin a možnosti jeho fotochemické degradace v přírodních vodách. [Statins – applications, mechanism of action, side effects. Atorvastatin and possibilities of its photochemical degradation in natural waters. Bc. Thesis, in Czech.] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Prescott J. F. (2013). Sulfonamides, Diaminopyrimidines, and Their Combinations. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5. vydání). Eds. Giguère S, Prescott J. F., Dowling P. M. Wiley. 279–294. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118675014.ch17> [6.3.2023].

PubChem. (2023). Sulfamethoxazole. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole> [23.3.2023].

PubChem. (2023). Trimethoprim. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Trimethoprim> [25.3.2023].

Roberts P. H., Thomas K.V. (2006). The Occurrence of Selected Pharmaceuticals in Wastewater Effluent and Surface Waters of the Lower Tyne Catchment. *Sci. Total Environ.* **356**(1–3), 143–153. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.04.031> [26.3.2023].

Sayar E., Sahin S., Cevheroglu S., Hincal A. A. (2010). Development and Validation of an HPLC Method for Simultaneous Determination of Trimethoprim and Sulfamethoxazole in Human Plasma. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* **35**, 41–46. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13318-010-0006-9> [18.12.2022].

Sirtori C., Agüera A., Gernjak W., Malato S. (2010). Effect of Water-matrix Composition on Trimethoprim Solar Photodegradation Kinetics and Pathways. *Water Res.* **44**(9), 2735–2744. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.006> [16.3.2023].

Sun N., Wu S., Chen H., Zheng D., Xu J., Ye Y. (2012). Determination of Sulfamethoxazole in Milk Using Molecularly Imprinted Polymer Monolith Microextraction Coupled to HPLC. *Microchim. Acta.* **179**, 33–40. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00604-012-0862-x> [25.2.2023].

SÚKL. (2023). Databáze léků, Sulfamethoxazol. Dostupné z: https://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data%5Bsearch_for%5D=&data%5Bcode%5D=&data%5Batc_group%5D=&data%5Bmaterial%5D=sulfamethoxazol&data%5Bpath%5D=&data%5Breg%5D=&data%5Bradio%5D=none&data%5Brc%5D=&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-yes&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-no&data%5Bcheckbox%5D%5B%5D=braille-def&data%5Bwith_adv%5D=0&search=Vyhledat&data%5Blisting%5D=20 [25.3.2023].

Swedberg G., Sundström L. (2010). Diaminopyrimidines. In Antibiotic and Chemotherapy (9. vydání). Ed. Finch R. G. Elsevier. ISBN 9780702040641. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4064-1.00017-8> [25.3.2023].

Tačić A., Nikolić V., Nikolić N., Savić I. (2017). Antimicrobial Sulfonamide Drugs. *Advanced technologies*. **6**(1), 58–71. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/318034555_Antimicrobial_sulfonamide_drugs [21.3.2023].

Tahan G. P., Machado S. C., Malaguti E. C., Maia P. P., Rath S., Martins I. (2015). RP-LC Method for Simultaneous Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim Content in Veterinary Drugs. *Eclética Quim. J.* **40**(1), 32–41. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/322907129_RP-LC_method_for_simultaneous_determination_of_sulfamethoxazole_and_trimethoprim_content_in_veterinary_drugs [6.3.2023].

Trovó A. G., Nogueira R. F. P., Agüera A., Sirtori C., Fernández-Alba A. R. (2009). Photodegradation of Sulfamethoxazole in Various Aqueous Media: Persistence, Toxicity and Photoproducts Assessment. *Chemosphere*. **77**(10), 1292–1298. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.065> [16.3.2023].

Wang J. Ch., Zhang Q., Cai D. F. (2012). Stability-Indicating Validated HPLC Method for Analysis of Berberine Hydrochloride and Trimethoprim in Pharmaceutical Dosage Form. *J. Chem.* **2013**, 1–9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2013/360812> [25.2.2023].

Wang J., Wang S. (2018). Microbial Degradation of Sulfamethoxazole in the Environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 3573–3582. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8845-4> [7.3.2023].

Wang Q., Pang W., Mao Y., Sun Q., Zhang P., Ke Q., Yu H., Dai Ch., Zhao M. (2019). Study of the Degradation of Trimethoprim Using Photo-Fenton Oxidation Technology. *MDPI–Water*. **11**(2), 1–14. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/w11020207> [12.3.2023].

Yang X., Chen F., Meng F., Xie Y., Chen H., Young K., Luo W., Ye T., Fu W. (2013). Occurrence and Fate of PPCPs and Correlations with Water Quality Parameters in Urban Riverine Waters of the Pearl River Delta, South China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **20**, 5864–5875. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-013-1641-x> [28.3.2023].

Yousef F., Mansour O., Herbali J. (2018). Sulfonamides: Historical Discovery Development (Structure-Activity Relationship Notes). *In-vitro In-vivo In-silico J.* **1**(1), 1–15. Dostupné z: <https://openaccesspub.org/iiij/article/749> [6.3.2023].

Zhou W., Moore D. E. (1994). Photochemical Decomposition of Sulfamethoxazole. *Int. J. Pharm.* **110**(1), 55–63. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90375-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90375-1) [12.3.2023].