

1 ÚVOD

Za uplynulých třicet let došlo v celosvětovém měřítku k nebyvalému nárůstu spotřeby léčiv. Tisíce tun farmakologicky aktivních látek jsou každoročně produkovány a používány v humánní, ale i veterinární medicíně, a proto je poslední dobou věnována zvýšená pozornost jejich likvidaci, přítomnosti a potenciálním nepříznivým účinkům v životním prostředí. Značné množství léčiv se totiž dostává do povrchové vody a odtud do celého životního prostředí různými cestami, např. likvidací odpadních vod v průběhu výrobního procesu (farmaceutický průmysl) anebo vypouštěním přečištěné vody z čistíren odpadních vod (domácnosti). V současnosti používané technologie bohužel neumožňují z odpadních vod efektivně odstranit veškeré zbytky léčiv. Některé medikamenty a metabolity navíc vykazují specifickou biologickou aktivitu, která způsobuje problémy při biologickém čištění. Mimoto i lipofilní charakter a obtížná biologická rozložitelnost některých druhů léčiv způsobují, že se zbytky medikamentů vyskytují v tělech vodních živočichů. V poslední době se ale čím dál častěji objevují i informace o přítomnosti některých léčiv v pitné vodě, čímž se tato problematika stává novým ekologickým problémem světa. V podzemních, povrchových a odpadních vodách byl prozatím prokázán obsah více než sta druhů léčivých přípravků. Toto číslo však není konečné, protože představuje jen nepatrný zlomek z přibližně 10.000 různých léčiv, která jsou v současnosti k dispozici jako terapeutické látky, a proto je potřeba se důkladně zabývat jejich analýzou [1-5].

Pro analýzu reziduí léčiv se běžně používají separační techniky ve spojení s citlivou detekcí, zejména se jedná o hmotnostní detekci, která umožňuje stanovení až do úrovně desetin ng/l. Velmi rozšířené je tak stanovení metodou plynové (GC) resp. kapalinové chromatografie (LC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem (MS), příp. spektrometry (MS/MS). Dnes jsou léčiva analyzována vesměs metodou LC-MS/MS. Ačkoliv tato metoda poskytuje celkem přesné výsledky a umožňuje analýzu širšího spektra léčiv s větší citlivostí než GC-MS, vysoké náklady na přístrojové vybavení znemožňují její dostupnost. Plynová chromatografie se využívá mnohem častěji, i když je popsáno poměrně málo metod pro rutinní analýzu. V GC na rozdíl od LC dosahujeme daleko lepší citlivosti, avšak často je nutná derivatizace analytů. Kromě samotného analytického dělení je bez ohledu na analytickou koncovku potřeba vzorek prekoncentrovat tak, abychom se zbavili matricových komponent, k čemuž se nejčastěji využívá extrakce kapalinou nebo tuhou fází.

Tyto techniky jsou však časově náročné a vyžadují složité postupy [1-2, 6].

V České republice se stále oblíbenosti těší skupina léčiv proti bolesti – analgetika. Analgetika se podle údajů Státního ústavu pro kontrolu léčiv drží za poslední léta na prvním místě v žebříčku nejprodávanějších skupin léčiv. Nejznámější analgetikum ibuprofen se dokonce v letech 2007, 2008 a 2009 stalo třetím nejprodávanějším léčivem v České republice. Velkému objemu distribuce analgetik nahrává i fakt, že jde o léčiva, která jsou k dispozici i bez lékařského předpisu [7].

Diplomová práce se zabývá kvalitativní a kvantitativní analýzou čtyř účinných látek z řady analgetik. Výsledkem práce je pak zavedení nové techniky, která umožňuje detekci ibuprofenu, naproxenu, ketoprofenu a diklofenaku ve vzorcích povrchové vody ve velmi nízkých koncentracích.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 LÉČIVA

Analgetika

Analgetika představují rozmanitou skupinu léčiv, která se používají k úlevě od bolesti a dosažení analgesie (=bezbolestnosti). Analgetika účinkují rozdílnými způsoby na periferní a centrální nervový systém. Řadíme mezi ně např. paracetamol a nesteroidní antiflogistika (ibuprofen, naproxen, ketoprofen, diklofenak ad.) [8].

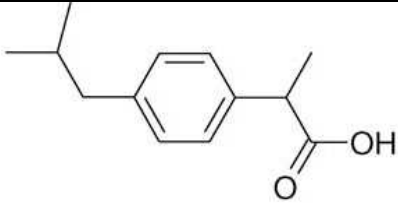
2.1.1 IBUPROFEN

Ibuprofen zastaralým anglickým názvem iso-butyl-propanoic-phenolic acid je nesteroidní antirevmatikum s dobrým analgetickým, protizánětlivým a antipyretickým účinkem. Vyznačuje se velmi dobrou snášenlivostí [9].

Jedná se o volně prodejné léčivo, které je k dispozici ve formě tablet (200, 400, 600 příp. 800 mg), čípků (600 mg) a mastí. Prodává se pod komerčními názvy Brufen, Ibuprofenal, Ibalgin, Dolgit apod. (příloha 4).

2.1.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Ibuprofen se vyskytuje jako bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je špatně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v etheru, v methanolu a v dichlormethanu. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitánů [10].

strukturní vzorec	
systematický název	2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propanová kyselina
sumární vzorec	$C_{13}H_{18}O_2$
molekulová hmotnost	206,280 g/mol
teplota tání	76 °C
pK _a	4,91

Tab. 1 – Vlastnosti ibuprofenu [10]

2.1.1.2 Historie

Historie ibuprofenu je spjata s doktorem Stewartem Adamsem, který byl v padesátých letech dvacátého století vedoucím vědeckého výzkumu u společnosti Boots Pure Drug Company. Původním úkolem pracovní skupiny Stewarta Adamse bylo nalezení protizánětlivého léku pro pacienty s revmatickou artritidou, nicméně výsledkem byla látka tišící bolesti mnohem silněji než aspirin a s menším množstvím vedlejších účinků. Zajímavostí je, že lék byl testován i na kocovinu. Ibuprofen byl patentován v roce 1961, v roce 1969 byl schválen k léčbě ve Velké Británii a v roce 1974 v USA [9].

Doktoru Adamsovi byla za objev ibuprofenu v roce 1987 udělena dvě významná ocenění, mezi nimiž byl i Řád britského impéria [9].

2.1.1.3 Farmakologické vlastnosti

2.1.1.3.1 Farmakodynamické údaje

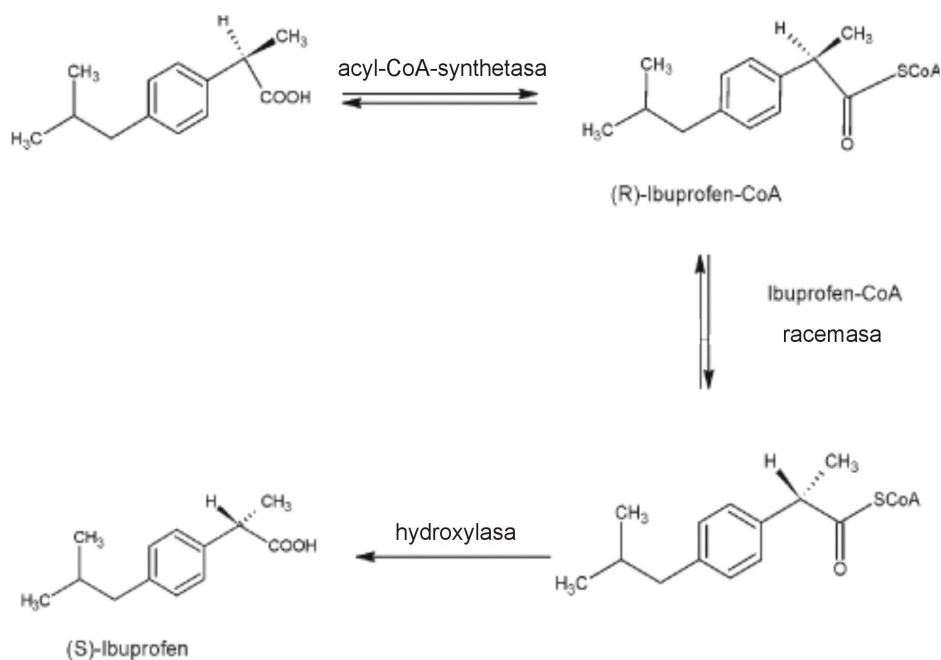
Ibuprofen působí v nižších dávkách analgeticky a ve vyšších dávkách protizánětlivě, např. dávka okolo 2400 mg denně má protizánětlivý účinek odpovídající účinku 4 g kyseliny acetylsalicylové. Protizánětlivý účinek je dán inhibicí enzymu cyklooxygenázy s následnou inhibicí biosyntézy prostaglandinů. Zánět je zmírňován snížením uvolňování mediátorů zánětu z granulocytů, bazofilů a žírných buněk. Ibuprofen snižuje citlivost cév vůči bradykininu a histaminu, ovlivňuje produkci lymfokinů v T lymfocytech a potlačuje rozšiřování cév. Tlumí též agregaci krevních destiček [11-12].

2.1.1.3.2 Farmakokinetické údaje

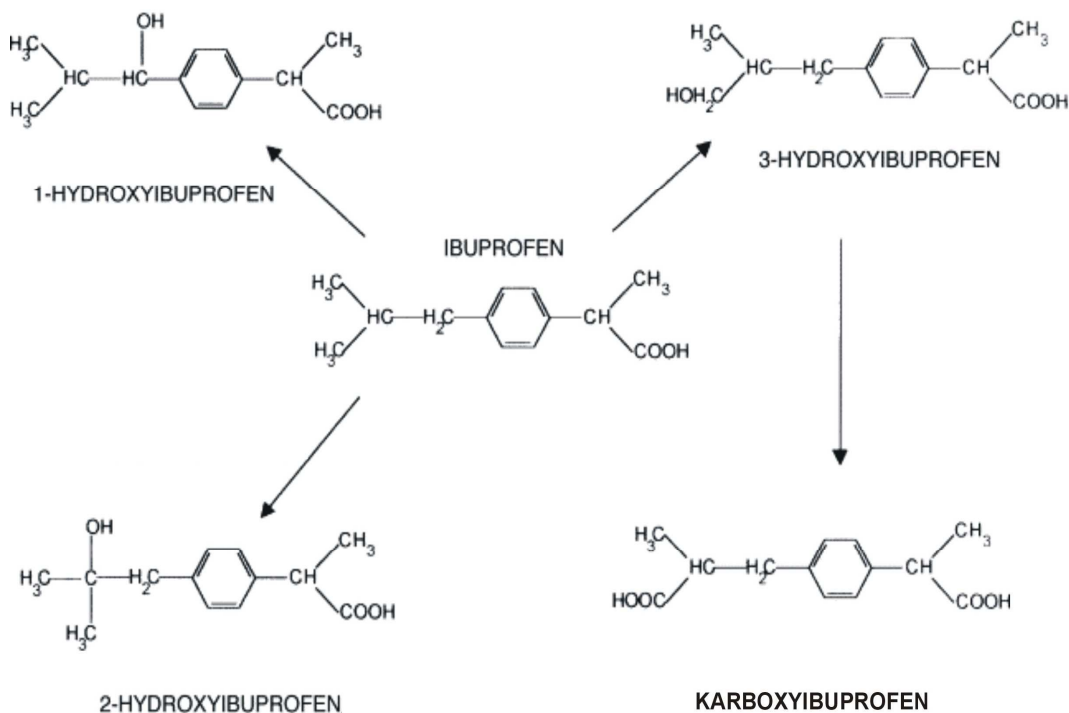
Po perorálním podání se ibuprofen rychle a dobře vstřebává a vrcholu plazmatické koncentrace při podání nalačno dosahuje již za 45 minut, zatímco při podání s jídlem cca za 1-3 hodiny. Po rektální aplikaci se ibuprofen vstřebává pomaleji, maximální koncentrace v séru je dosaženo až za 2 hodiny po aplikaci. Sérové koncentrace po podání 600 mg ibuprofenu rektálně po 4-6 hodinách po aplikaci odpovídají sérovým koncentracím 400 mg ibuprofenu podaného perorálně [13].

Ibuprofen se z více než 99 % váže na plazmatické proteiny, ale vazba je reverzibilní. Léčivo je intenzivně metabolizováno cytochromy CYP2C8 a CYP2C9 v játrech. Část (*R*)(-) izomeru je ireverzibilně přeměněna na (*S*)(+) formu (Obr. 1). Poměrně rychle je vylučován močí, hlavně ve formě metabolitů (Obr. 2) a jejich konjugátů a jen malá část je vylučována

žlučí do stolice. Biologický poločas má asi 2 hodiny. Při snížení vylučování může dojít ke kumulaci léku v organismu. Exkrece ibuprofenu je ukončena za 24 hodin po podání poslední dávky. Biologická dostupnost je minimálně alterována přítomností stravy. Ibuprofen u žen prochází placentární bariérou a je vylučován do mateřského mléka [10-13].



Obr. 1 – Metabolická inverze ibuprofenu [14]



Obr. 2 – Metabolizace ibuprofenu [15]

2.1.1.4 Použití v léčebné praxi

Ibuprofen se používá k léčbě zánětlivých a degenerativních kloubních chorob, mimokloubního revmatismu a chorob páteře. Jako analgetikum-antipyretikum ho lze využít při horečnatých stavech, nemocech z nachlazení, bolestech hlavy různého původu, bolestech zubů a bolestivé menstruaci [13].

2.1.1.5 Kontraindikace

Absolutní kontraindikace: Léčiva na bázi ibuprofenu se nesmí užívat při přecitlivělosti na ibuprofen, při vředech žaludku a dvanáctníku a dále pak při poruchách krvetvorby a krevní srážlivosti [13].

Relativní kontraindikace: O léčbě ibuprofenem by se měli se svým lékařem nebo lékárníkem poradit i pacienti trpící výrůstky v nosní sliznici, zúžením průdušek po kyselině acetylsalicylové a jiných nesteroidních antirevmatikách, otokem hrtanu, patologickým hubnutím a dále těhotné a kojící ženy. Zvýšené opatrnosti je třeba dbát i při těžší poruše ledvin, jater, srdeční funkce a u astmatiků [13].

2.1.1.6 Nežádoucí účinky

Nejčastějšími nežádoucími účinky bývají gastrointestinální potíže: nauzea, zvracení, bolesti v nadbříšku, pálení žáhy, průjem, zácpa, nadýmání apod. Vzácně se pak vyskytuje žaludeční nebo dvanáctníkový vřed, krvácení do gastrointestinálního traktu, zánět žaludečních sliznic, změny v jaterních funkcích a zánět slinivky břišní [13].

Vlivem na centrální nervovou soustavu se mohou objevit závratě, bolesti hlavy, neostře vidění a zcela vzácně nespavost, deprese a emoční labilita. Ojedinele se objevují poruchy krvetvorby (neutropenie, agranulocytóza, aplastická nebo hemolytická anémie, trombocytopenie), z kardiovaskulárních poruch edémy, retence tekutin a nepravidelná činnost srdce. U některých jedinců se projeví alergické kožní reakce a ve výjimečných případech i poruchy ledvinových funkcí (intersticiální nefritida nebo nefrotický syndrom) [13].

2.1.1.7 Interakce s jinými léčivy

Při současném podávání ibuprofenu s antikoagulancii kumarinového typu dochází k prodloužení protrombinového času. Při současné aplikaci s kyselinou acetylsalicylovou se výrazně snižuje agregace krevních destiček a hladiny protrombinu a fibrinogenu. Fenobarbital

zrychluje metabolizaci ibuprofenu. Samotný ibuprofen zvyšuje plazmatické hladiny lithia, digoxinu a fenytoinu a je zodpovědný i za zvýšení toxicity metotrexátu a baklofenu. Současným podáním s glukokortikoidy se zvyšuje riziko krvácení do gastrointestinálního traktu. Ibuprofen snižuje urikosurický účinek probenecidu a sulfinpyrazonu a diuretický účinek spironolaktonu. Celkově je možné snížení účinku diuretik (léky na odvodnění) a antihypertonik (léky proti vysokému tlaku) [13].

2.1.1.8 Dávkování

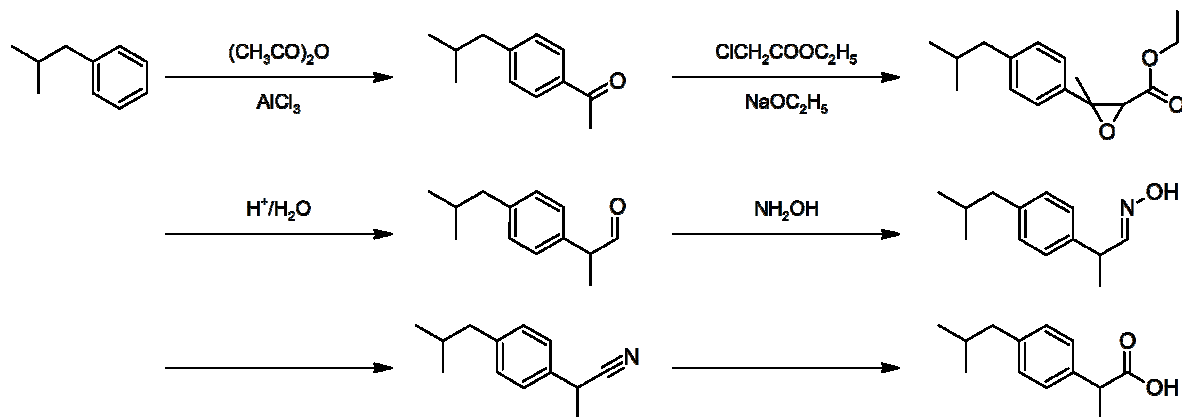
Dávkování je v rozsahu 1,2-2,4 g denně podle závažnosti onemocnění a reakce pacienta na léčbu, přičemž by neměla být překročena denní dávka 2,4 g. U zánětlivých forem se pak podávají dávky vyšší. U menstruačních bolestí v podbřišku se podává 400 mg perorálně po 4-6 hodinách. Jako analgetikum se podává 3-4krát denně v dávkách 200-400 mg perorálně.

Čípková forma je zvláště vhodná pro pacienty po operaci, pacienty užívající více léků současně a pro podání na noc. Podává se 2-5 čípků denně (účinnost 1 čípku s obsahem 600 mg ibuprofenu přibližně odpovídá účinnosti 1 tablety s obsahem 400 mg) [13].

Pro děti se používají potahované tablety s obsahem 200 mg ibuprofenu. Denně se aplikuje dávka 20 mg/kg tělesné hmotnosti, a to rozděleně v několika dílčích dávkách. U dětí s tělesnou hmotností nižší než 30 kg se nepřekračuje dávka 400 mg denně [13].

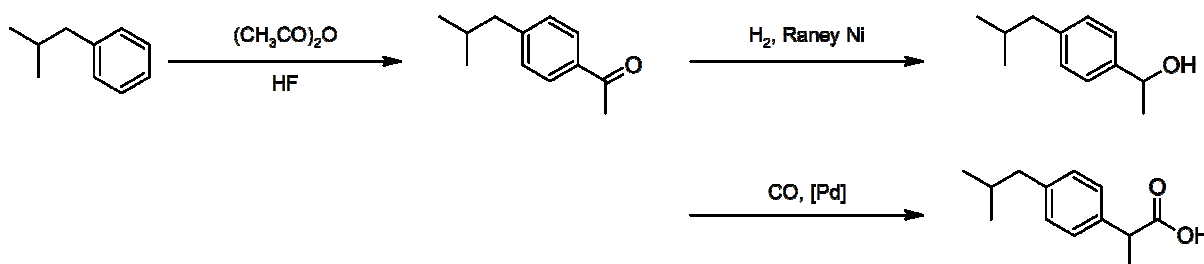
2.1.1.9 Výroba

Existují dvě základní cesty pro přípravu ibuprofenu a u obou se jako výchozí látka využívá izobutylbenzen [9]. První metoda je starší a k syntéze ibuprofenu ji využil i Stewart Adams v roce 1960. Skládá se ze šesti kroků (Obr. 3).



Obr. 3 – Výroba ibuprofenu (postup I) [9]

V roce 1997 byla pro přípravu ibuprofenu vyvinuta nová metoda, která je rychlejší a skládá se pouze ze tří kroků (Obr. 4).



Obr. 4 – Výroba ibuprofenu (postup II) [9]

2.1.2 NAPROXEN

Naproxen je derivát naftylpropionové kyseliny a svými farmakologickými vlastnostmi je velmi podobný ibuprofenu. Naproxen je nesteroidní antirevmatikum a antiflogistikum s výraznými antipyretickými, analgetickými a protizánětlivými účinky [13].

Je k dispozici ve volném prodeji především ve formě tablet (220, 250, 275 mg) a čípků (250, 500 mg), ale také jako gel nebo mast. Prodává se pod komerčními názvy Nalgesin, Napsyn, Emoxen gel apod. (příloha 5).

2.1.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Naproxen se vyskytuje jako bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, který je špatně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu a methanolu a mírně rozpustný v etheru. Naproxen je v současnosti jediné nesteroidní protizánětlivé léčivo, které se prodává pouze jako jeden izomer [10-11].

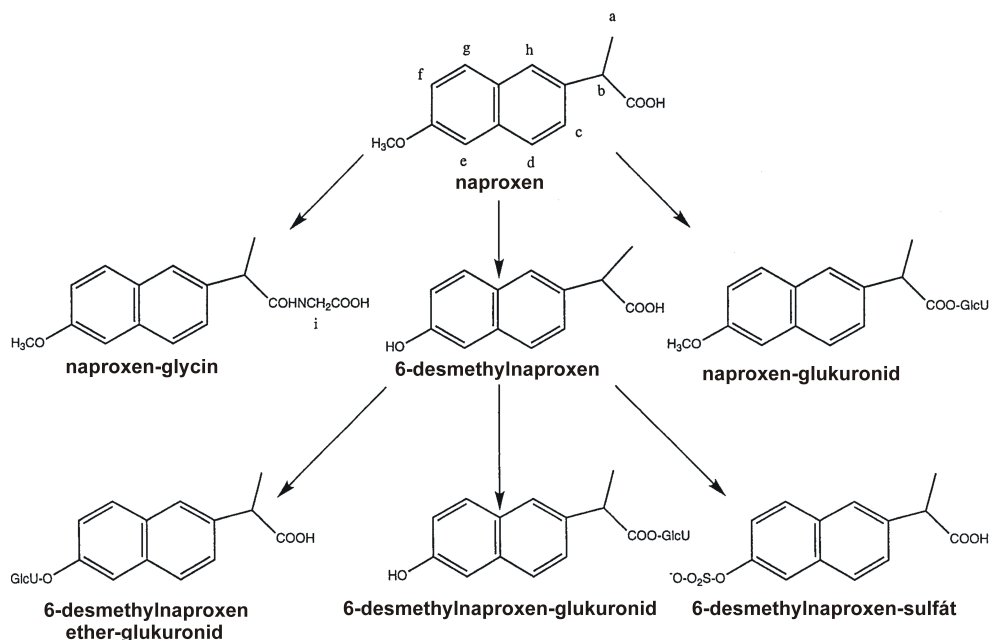
strukturní vzorec	
systematický název	2-(6-methoxynaftalen-2-yl)propanová kyselina
sumární vzorec	$C_{14}H_{14}O_3$
molekulová hmotnost	230,259 g/mol
teplota tání	153 °C
pK _a	4,15

Tab. 2 – Vlastnosti naproxenu [10]

2.1.2.2 Farmakologické vlastnosti

Protizánětlivé účinky naproxenu jsou způsobeny inhibicí cyklooxygenázy a následným tlumením syntézy prostaglandinů a dalších mediátorů zánětu [11,13].

Maximální plazmatické koncentrace nastupují za 2-4 hodiny po podání. Naproxen se výrazně váže na plazmatické bílkoviny (99 %). Přibližně 95 % podané dávky se vylučuje, z toho asi 70 % v nezměněné podobě a zbývající část jako inaktivní 6-desmethylnaproxen a jeho konjugáty (Obr. 5). Zajímavostí je, že volná frakce naproxenu je o 41 % vyšší u žen než u mužů, ačkoliv vazba na albumin je velmi vysoká u obou pohlaví. Léčivo je intenzivně metabolizováno cytochromy CYP2C9, ale také CYP1A2 a CYP2C8. Poločas termální eliminační fáze je přibližně 12-15 hodin [11,13].



Obr. 5 – Metabolizace naproxenu [16]

2.1.2.3 Použití v léčebné praxi

Přípravek se používá u zánětlivých a degenerativních revmatických onemocnění: revmatoidní artritida, ankylozující spondylitida (Bechtěrevova nemoc), osteoartróza, spondylóza (vyhřezlé plotýnky), mimokloubní revmatismus, posttraumatické a pooperační otoky a záněty a zánětlivá onemocnění v gynekologii [13].

2.1.2.4 Kontraindikace

Naproxen se nesmí užívat při aktivních žaludečních vředech, přecitlivělosti na účinnou látku a při nesnášenlivosti kyseliny acetylsalicylové a jiných nesteroidních antirevmatik. Naproxen je kontraindikován v těhotenství a v období laktace.

Zvýšené opatrnosti by se mělo dbát u nemocných s postižením trávicího ústrojí v anamnéze, při závažnějším poškození jater, ledvin, srdce a při poruchách krvetvorby a hemokoagulace [13].

2.1.2.5 Nežádoucí účinky

Relativně častými nežádoucími účinky bývají gastrointestinální potíže (nauzea, pálení žáhy, bolesti v nadbříšku aj.). Méně často se vyskytují bolesti hlavy, poruchy soustředění, nespavost, trombocytopenie (nedostatek krevních destiček), erythema exsudativum multiforme (kožní onemocnění) a jiné kožní reakce, fotosenzibilace a gastrointestinální tvoření vředů [13].

2.1.2.6 Interakce s jinými léčivy

Naproxen je zodpovědný za možnost vzniku interakcí v oblasti vazby na krevní bílkoviny. Současné podání s probenecidem zvyšuje celkovou koncentraci naproxenu. Naproxen snižuje natriuretické působení furosemidu, antihypertenzivní působení propranololu a jiných β -blokátorů. Snižuje se též vylučování lithia a metotrexátu [13].

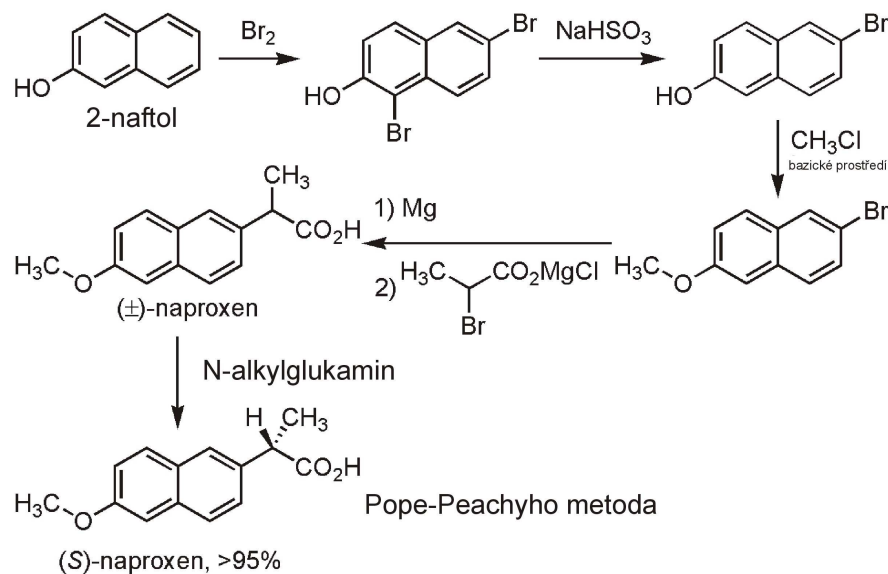
Podávání léčiva může interferovat s určováním 17-ketosteroidů a 5-hydroxyindolactové kyseliny [13].

2.1.2.7 Dávkování

Počáteční dávkování u akutních stavů je 1 g/den a později se dávka upravuje na hodnotu 500 mg/den, a to rozděleně do dávek. Vyšší dávkování se používá zejména u akutního záchvatu dny a u poúrazových stavů. U dětí nad jeden rok věku se u revmatoidní artritidy podává dávka 10 mg/kg/den, a to odděleně ve dvou dávkách. Při poklesu glomerulární filtrace pod 20 ml/min je možné pouze krátkodobé podávání [13].

2.1.2.8 Výroba

Průmyslová výroba naproxenu se skládá z pěti kroků a jako výchozí látka se používá 2-naftol (Obr. 6) [17].



Obr. 6 – Výroba naproxenu [17]

2.1.3 KETOPROFEN

Ketoprofen je stejně jako ibuprofen a naproxen derivát propionové kyseliny a má i podobné vlastnosti. Ketoprofen je nesteroidní antirevmatikum a antiflogistikum s protizánětlivým, analgetickým a antipyretickým účinkem [13].

V podobě mastí a gelů je k dispozici ve volném prodeji, ale ve formě tablet (50, 100 mg), kapslí (50, 100 mg), čípků (100 mg) a injekcí (100 mg) je vázán na lékařský předpis. Prodává se pod komerčními názvy Ketonal, Profenid, Diractin, Fastum gel aj. (příloha 6).

2.1.3.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Ketoprofen se vyskytuje jako bílý nebo téměř bílý krystalický prášek, který je špatně rozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, v ethanolu a v dichlormethanu [10].

strukturní vzorec	
systematický název	2-(3-benzoylphenyl)propanová kyselina
sumární vzorec	$C_{16}H_{14}O_3$
molekulová hmotnost	254,281 g/mol
teplota tání	94 °C
pK _a	4,45

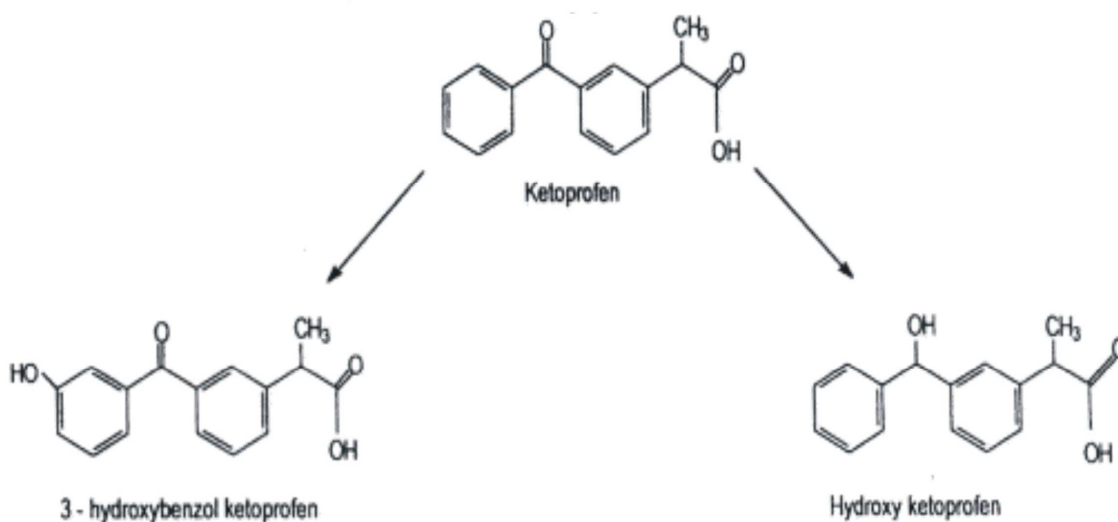
Tab. 3 – Vlastnosti ketoprofenu [10]

2.1.3.2 Farmakologické vlastnosti

Ketoprofen ovlivňuje vasomotorické (průtok krve cévami) a exsudativní (únik tekutin a bílkovin) projevy zánětu. Jeho protizánětlivý účinek je dán inhibicí enzymů cyklooxygenázy a lipoxygenázy s následnou inhibicí syntézy prostaglandinů a jiných mediátorů zánětu. Ketoprofen se úplně metabolizuje v játrech, především na glukuronid, který podléhá reaktivaci a opětovně prochází játry [11,13].

Po perorální aplikaci jsou maximální plazmatické koncentrace dosaženy za 60-120 minut. Ketoprofen se z velké části váže na krevní bílkoviny (99 %). Při distribuci vstupuje též do synoviální tekutiny (tekutina obklopující klouby), kde hladiny léčiva přetrvávají déle než 4 hodiny po podání. Střední plazmatický poločas je 1,5-2 hodiny. Méně než 1 % podané látky se vylučuje v nezměněné podobě močí, 65-75 % jako glukuronáty [13].

Metabolizace ketoprofenu zjednodušeně probíhá podle obr. 7.



Obr. 7 – Metabolizace ketoprofenu [18]

2.1.3.3 Použití v léčebné praxi

Přípravek je indikován u chronických a degenerativních onemocnění pohybového ústrojí, zejména u revmatoidní artritidy, ankylozující spondylitidy (Bechtěrevova nemoc) a u dekompenzované osteoartrózy. Indikací jsou též projevy mimokloubního revmatismu, drobné poúrazové a pooperační stavy, dnavý záchvat, bolest v nadbříšku při menstruaci (primární dysmenorea) a bolesti nádorového původu [13].

2.1.3.4 Kontraindikace

Absolutní kontraindikace: Ketoprofen se nesmí užívat při gastroduodenálních vředech i v anamnéze a přecitlivělosti na ketoprofen. Nesmí být podáván rovněž pacientům do 16 let, těhotným ženám a při laktaci [13].

Relativní kontraindikace: Léčbu ketoprofenem by měli nejprve se svým lékařem nebo lékárníkem konzultovat pacienti trpící bronchiálním astmatem, alergickými reakcemi na kyselinu acetylsalicylovou a jiná nesteroidní antirevmatika, srdeční, ledvinovou a jaterní slabostí. Užívání léčiva není doporučováno ani lidem, kteří prochází antikoagulační terapií nebo trpí těžšími formami hypertenze [13].

2.1.3.5 Nežádoucí účinky

Nejčastějšími nežádoucími účinky bývají gastrointestinální potíže, např. chronické bolesti břicha (dyspepsie), nauzea, zvracení, bolesti v nadbříšku, anorexie, pálení žáhy, průjem nebo zácpa. Vzácněji se objevují: zhoršení nemoci, vředové choroby, krvácení do gastrointestinálního traktu, perforace, bolesti hlavy, ospalost, závratě a kožní vyrážky [13].

2.1.3.6 Interakce s jinými léčivy

Ketoprofen může snižovat účinek některých diuretik a antihypersenzitivních látek. Možné jsou též interakce v oblasti vazby na perorální antikoagulantia, antidiabetika a fenytoin. Přípravek snižuje plazmatickou koncentraci lithia. Probenecid snižuje ledvinovou eliminaci ketoprofenu [13].

Přípravek může vyvolat ospalost či závratě a tím nepříznivě ovlivnit činnosti vyžadující zvýšenou pozornost [13].

2.1.3.7 Dávkování

Dospělým se podává obvykle 200 mg ketoprofenu denně, a to po 100 mg ve dvou denních dávkách ráno a večer. U velmi bolestivých stavů se denní dávky zvyšují na 300 mg a podávají se rozděleně ve třech dílčích dávkách. U osob ve vyšším věku je však potřeba denní dávky redukovat [13].

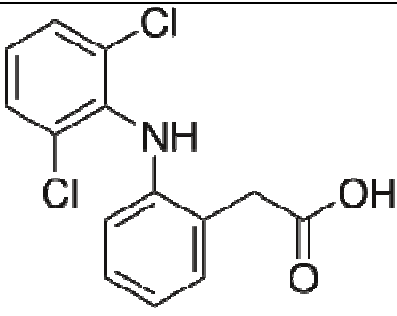
2.1.4 DIKLOFENAK

Diklofenak je derivát fenylactové kyseliny a svým účinkem a strukturou je podobný flurbiprofenu a meklofenamátu. Diklofenak je nesteroidní antirevmatikum, které má protizánětlivé, antipyretické, antiflogistické a analgetické účinky [11, 13].

Je k dispozici ve volném prodeji především ve formě tablet (25 mg) a různých gelů nebo mastí. Tablety s vyšším množstvím účinné látky (50, 75, 100, 150 mg), čípky a injekce jsou však vázány na lékařský předpis. Prodává se pod komerčními názvy Diclofen, Diclofenacal, Diclorem, Dolmina, Monoflam, Veral, Voltaren emulgel apod. (příloha 7).

2.1.4.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Diklofenak se nejčastěji vyskytuje jako sodná sůl, a pak se jedná o bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek, který je slabě hygroskopický. Diklofenak je mírně rozpustný ve vodě, snadno v methanolu, dobře rozpustný v ethanolu, ale těžce se rozpouští v acetonu a v etheru je prakticky nerozpustný [10].

strukturní vzorec	
systematický název	2-[2-(2,6-dichlorofenylamino)fenyl]octová kyselina
sumární vzorec	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ N O ₂
molekulová hmotnost	296,148 g/mol
teplota tání	284 °C

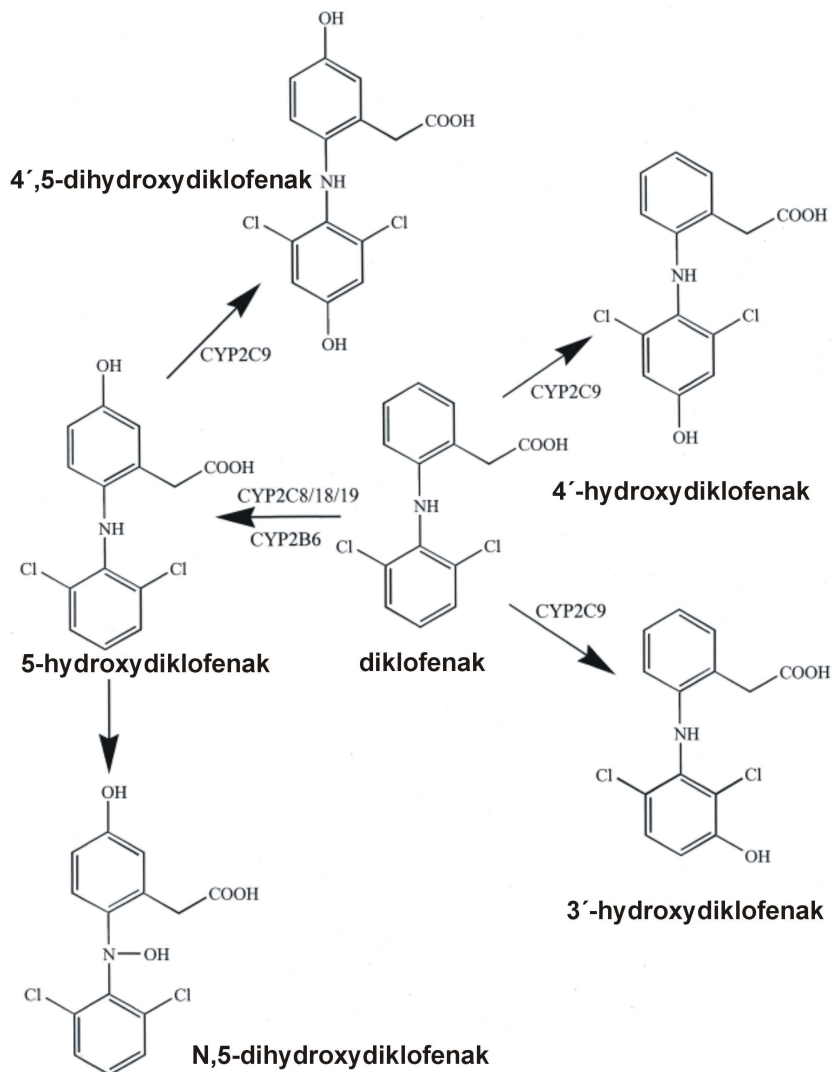
Tab. 4 – Vlastnosti diklofenaku [10]

2.1.4.2 Farmakologické vlastnosti

Diklofenak je silným neselektivním inhibítozem cyklooxygenázy, čímž se snižuje biosyntéza prostaglandinů a dalších mediátorů zánětu [11,13].

Po perorálním podání se diklofenak rychle absorbuje, ale jeho systémová biologická dostupnost je jen 30-70 % díky metabolismu po prvním průchodu játry. Diklofenak se výrazně váže na plazmatické bílkoviny (99,7 %). Maximální plazmatické koncentrace

nastupují za 2 hodiny po podání a po dalších 2-4 hodinách je dosaženo maximální koncentrace v synoviální tekutině. Léčivo je intenzivně metabolizováno cytochromy CYP3A4 a CYP2C9. Okolo 60 % podané dávky se vylučuje ledvinami ve formě metabolitů (Obr. 8). Plazmatický eliminační poločas je přibližně 1-2 hodiny [11,13,19].



Obr. 8 – Metabolizace diklofenaku [19]

2.1.4.3 Použití v léčebné praxi

Přípravek se používá u zánětlivých a degenerativních revmatických onemocnění: revmatoidní artritida, ankylozující spondylitida, osteoartróza, spondylóza, mimokloubní revmatismus, akutní dna, posttraumatické a pooperační otoky a záněty, bolestivá a zánětlivá onemocnění v gynekologii, např. dysmenorea a adnexitis (zánět vejcovodů a vaječníků) [13].

2.1.4.4 Kontraindikace

Diklofenak je zakázáno užívat při aktivních vředech žaludku a dvanáctníku, přecitlivělosti na účinnou látku a při nesnášenlivosti kyseliny acetylsalicylové a jiných nesteroidních antirevmatik. Diklofenak je kontraindikován v těhotenství a v období laktace.

Zvýšené opatrnosti by měli dbát pacienti s postižením trávicího ústrojí v anamnéze, se závažnějším postižením jater, ledvin, srdce a při poruchách krvetvorby a hemokoagulace [13].

2.1.4.5 Nežádoucí účinky

Relativně častými nežádoucími účinky bývají gastrointestinální potíže (nauzea, pálení žáhy, bolesti v nadbřišku aj.). Vzácně se vyskytují bolesti hlavy, poruchy soustředění, nespavost, trombocytopenie, kožní reakce a gastrointestinální vředovatění [13].

2.1.4.6 Interakce s jinými léčivými

U diklofenaku je vysoká pravděpodobnost vzniku interakcí v oblasti vazby na krevní bílkoviny. Současné podání diklofenaku s lithiem nebo digoxinem zvyšuje jejich sérovou koncentraci. Diklofenak může snížit účinnost současně podávaných diuretik [13].

2.1.4.7 Dávkování

Počáteční dávkování u dospělých je 100-150 mg denně, ale u méně závažných stavů obvykle postačuje 75-100 mg/den, přičemž denní dávka se vždy dělí do 2-3 dílčích dávek. V léčbě primární dysmenorey je počáteční dávka 50-100 mg a podle terapeutické účinnosti se zvyšuje až na 200 mg za den.

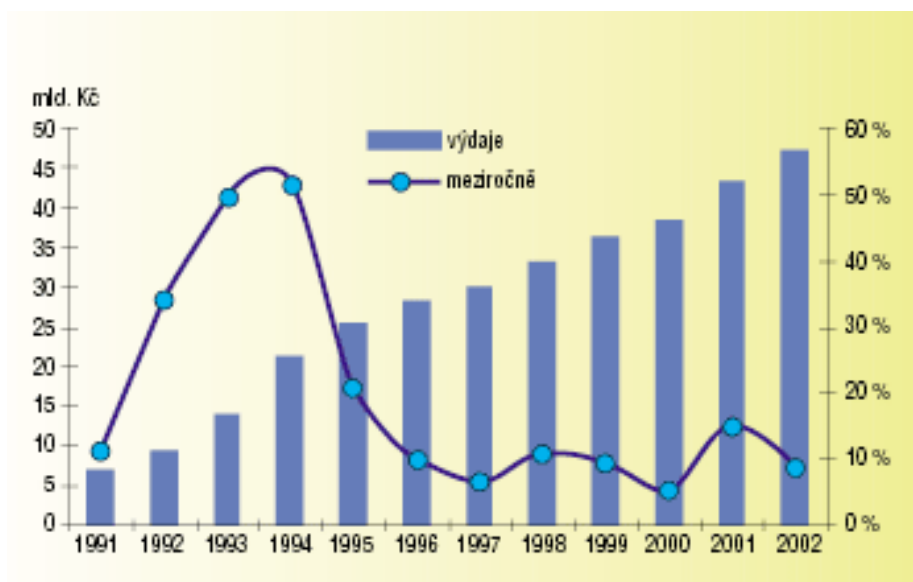
U dětí nad jeden rok věku se podává 0,2-2 mg/kg/den. Při léčení chronické artritidy je maximální možná denní dávka 3 mg/kg rozdělená do 2-3 dílčích dávek [13].

2.2 ZNEČIŠTĚNÍ POVRCHOVÝCH VOD LÉČIVY

2.2.1 Příčiny

Existuje několik cest, jejichž prostřednictvím do povrchových vod vstupují farmakologicky aktivní látky. Jenom dvě z těchto cest jsou ale natolik významné, že vyvolávají problémy v životním prostředí.

Jednou z příčin kontaminace povrchových vod je nadměrné užívání léčiv. Za posledních 20-30 let došlo nejen v České republice, ale i v celém světě k prudkému nárůstu spotřeby léčiv (Graf 1).



Graf 1 – Výdaje na léčiva v ČR v letech 1991-2002 [20]

Lidé se stávají na léčivech de facto psychicky i fyzicky závislí, čímž umocňují dávno známou skutečnost, že lidský organismus není schopen plně využít veškeré množství podaného léčiva. Dochází k tomu, že určitá část medikamentu je z těla vyloučena přirozenou cestou v nezměněné podobě. Zbytky léčiv včetně metabolitů se tak dostávají na čistírně odpadních vod, skrze ně prostupují do vod povrchových a odtud do celého životního prostředí. V současnosti používaná technologie pro čištění odpadních vod totiž není na takový druh znečištění uzpůsobena, i když je schopna snížit relativně vysoké koncentrace léčiv a některé dokonce úplně eliminovat [21].

Dalším neméně důležitým zdrojem znečištění je farmaceutický průmysl, jehož činnost bezprostředně souvisí se spotřebou léčiv. Ve výrobě léčiv vznikají odpadní vody, které jsou daleko bohatěji zamořeny než běžné splaškové vody. Odpadní voda farmaceutického průmyslu podstupuje speciální očištění na průmyslových čistírnách odpadních vod. I když je tento typ čistíren vybaven špičkovou technologií, nelze zabránit tomu, že část účinných látek proniká do povrchových vod.

2.2.2 Důsledky

Léčiva jsou v povrchových vodách přítomna ve velmi nízkých koncentracích, řádově se jedná o ng/l – µg/l. Vzhledem k nízkým koncentracím účinných látek je prakticky vyloučena jakákoliv akutní toxicita. Problémy ale způsobuje jejich chronická toxicita, které je nepřetržitě vystavena zejména vodní fauna a flora. Chronickému působení stopových množství léčiv mohou načas unikat migrující živočišné druhy (např. úhoř, parma...), kterých je však minimum. Nemožnost jakékoliv migrace a pravidelný přísun reziduí léčiv způsobují, že se v tělech živočichů a rostlin hromadí účinné látky medikamentů [22].

Celá řada vědeckých studií prokázala neblahý vliv léčiv na přírodní prostředí. Vědci bylo prokázáno, že stopová množství psycholeptik a antiepileptik vyvolávají změny v chování ryb a některých bezobratlých. Analgetika a antibiotika zase ovlivňují růst vodních řas a rostlin [22-23].

Analgetika

Vědecké studie potvrzují, že v tělech ryb je přítomna cyklooxygenáza, jež se vyskytuje i v lidském těle. Její inhibicí nesteroidními antiflogistiky dochází k inhibici biosyntézy prostaglandinů z kyseliny arachidonové, což vede k protizánětlivým účinkům. Prostaglandiny hrají také důležitou roli při syntéze vaječných skořápek u ptáků a inhibice jejich syntézy má za následek ztenčení skořápek [24].

Z nesteroidních antiflogistik vykazuje nejvyšší ekotoxikologické riziko v tomto ohledu **diklofenak**, který vyvolává chronickou intoxikaci u pstruhů, jež jsou potravou větších ptáků. Diklofenak u pstruha obecného (Obr. 9a) snižuje hodnoty hematokritu (množství červených krvinek) už při velmi nízkých koncentracích okolo 0,5 µg/l. Při koncentracích přibližně 5 µg/l dochází k vážnému poškození jater a ledvin pstruha duhového (Obr. 9b). Diklofenak se vyznačuje i významnou fytotoxicitou, protože inhibuje rozmnožování sladkovodních a mořských řas [24].



a) pstruh obecný (*Salmo trutta fario*)



b) pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*)

Obr. 9 – Živočichové citliví na diklofenak

Chronická toxicita byla prokázána i u nejpoužívanějšího analgetika ibuprofenu. **Ibuprofen** způsobuje u ryby halančika japonského (Obr. 10a) zvětšení jater a zvýšenou produkci jiker. Ibuprofen ovlivňuje i chování a reprodukci vodních korýšů hrotnatky velké (Obr. 10b) a blešivce obecného (Obr. 10c), kteří jsou na jeho přítomnost citliví již při koncentracích mezi 1-10 ng/l.



a) halančik japonský
(*oryzias latipes*)



b) hrotnatka velká
(*daphnia magna*)



c) blešivec obecný
(*gammarus pulex*)

Obr. 10 – Živočichové citliví na ibuprofen

Z fyto-logického hlediska ibuprofen stimuluje růst cyanobakterií ve vodním prostředí a zároveň brání rostlinnému růstu okřehek menšího (Obr. 11) [24].



okřehek menší (*lemna minor*)

Obr. 11 – Rostlina citlivá na ibuprofen

Ekotoxicita **naproxenu** byla testována na nižších organismech. Laboratorní testy na vířnicích (*Brachionus calyciflorus*, *Ceriodaphnia dubia*) a sladkovodních korýších (*Thamnocephalus platyurus*) prokázaly akutní toxicitu v rozsahu koncentrací 1-100 mg/l. Při nižších koncentracích 62 µg/l byla zjištěna inhibice růstu vířníků *Ceriodaphnia dubia* [24].

Kontaminace pitné vody

Stopy léčiv se vlivem koloběhu vody v přírodě vyskytly už i v pitné vodě. Prozatím byla přítomnost medikamentů prokázána ve vodovodních sítích jen v USA, Evropě se tento jev podle současných vědeckých studií zatím vyhýbá. Zbytky léčiv ve vodovodním řádu byly

zaznamenány nejen ve velkých městech, jako je Los Angeles nebo New York, ale úplně ve všech 50 státech unie. Ve vodovodních sítích se vyskytla léčiva na snížení hladiny cholesterolu, léky proti bolesti, astmatu, epilepsii, infekci včetně antibiotik, léky na srdce a duševní nemoci [25-26].

Pro množství léků v pitné vodě neexistují žádné normy. Jen 28 z 62 největších vodárenských společností testuje jejich přítomnost, většinou však jen na jedno nebo dvě léčiva [26].

Odborná veřejnost se obává dlouhodobých následků užívání stopových koncentrací léčiv, protože hrozí, že například antibiotika ztratí svou účinnost. Už nyní se objevují kmeny tuberkulózy odolné vůči antibiotikům [26].

2.2.3 Opatření

Voda se stává jakýmsi médiem přenosu zbytků léčiv od pacienta k jednotlivým složkám životního prostředí. Rezidua léčiv ve složkách životního prostředí svoji pouť nekončí, ale vrací se zpět k lidem prostřednictvím potravy a pitné vody. Koloběhu léčiv v přírodě (Schéma 1) je potřeba účinně bránit, protože stopové koncentrace medikamentů představují potenciální riziko pro člověka.

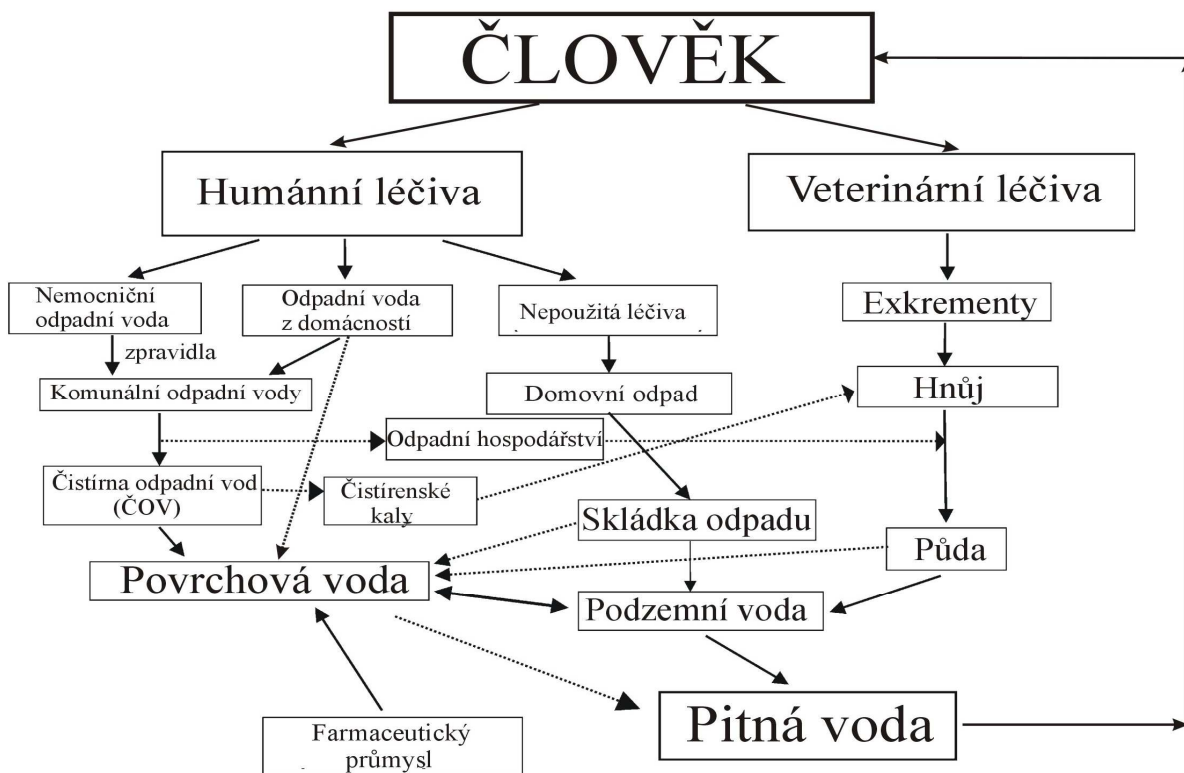


Schéma 1 – Koloběh léčiv v životním prostředí [27]

Abychom ochránili svoje zdraví a zároveň zamezili vstupu léčiv do životního prostředí je potřeba věnovat zvláštní péči úpravě pitné vody, ale i důkladnému čištění odpadní vody. Pro eliminaci léčiv z povrchových vod se nejčastěji využívá:

1) Biologické odbourání

Nejlepším způsobem pro odstranění léčiv z odpadních vod je kvalitní biodegradační proces. Biologické odbourání léčiv v bioreaktoru pomocí aktivovaného kalu je oproti ostatním používaným technologiím daleko účinnější, ačkoliv i zde existují léčiva, která jsou vůči biodegradaci rezistentní, např. diklofenak [28-29].

2) Adsorpce

Tato metoda čištění vody je založena zejména na schopnosti léčiv adsorbovat se na aktivním uhlí. Voda kontaminovaná léčivy je za pomoci elektrického čerpadla proháněna přes filtry obsahující aktivní uhlí. Na uhlíkových filtrech dochází k adsorpci organických látek (léčiv), čímž je voda čištěna. Metoda využívá fyzikálně-chemických procesů [30-31].

K adsorpci může docházet i v souvislosti s aktivovaným kalem, na který se zachytávají hydrofobní látky. Problém vzniká v případě hydrofilních léčiv, jejichž eliminace touto metodou je prakticky vyloučena [28].

3) Fotodegradace

Fotodegradace je metodou samovolného čištění vody v přírodě, ale lze ji realizovat i uměle. Účinkem ultrafialového a viditelného záření za přítomnosti TiO_2 jako katalyzátoru dochází k rozkladu molekuly léčiva a tím i ke ztrátě jeho specifických vlastností. Odstraňování léčiv účinkem slunečního záření je velmi účinné v případě ketoprofenu a diklofenaku [21, 27, 32].

4) Ozonizace a oxidační procesy

Ozonizace a oxidační procesy (např. Cl_2 nebo H_2O_2) se používají většinou k úpravě pitné vody za účelem odstranění choroboplodných zárodků, ale lze je využít i k odstranění léčiv. Aktivní molekula ozonu je schopná okamžitě rozložit molekulu léčiva. Nevýhodou této metody čištění je, že dochází k vedlejšímu vlivu – okysličování vody [31].

5) Srážení

Odstranění medikamentů z vody metodou srážení bývá u některých druhů léčiv značně problematické a málo účinné [31, 33]. Nicméně lze využít této metody k separaci léčiva tvořícího sraženinu se srážecím činidlem (např. léčiva obsahující Ca, Mg nebo fosfáty se dobře sráží roztokem NaHCO_3) [34].

6) Laboratorní metody

Velmi dobrých výsledků odstranění léčiv bylo dosaženo metodami reverzní osmózy a nanofiltrace [33]. Bohužel jsou tyto metody v průmyslovém měřítku jen velmi těžko realizovatelné.

2.3 STOPOVÁ ANALÝZA LÉČIV

2.3.1 ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKU K ANALÝZE

Koncentrace léčiv v povrchových vodách jsou velmi nízké ($\text{ng/l} - \mu\text{g/l}$), a proto je nutné odebírat relativně velké objemy vzorku, které se následně zkoncentrují. Před samotným zkoncentrováním vzorku se ale provádí další dílčí kroky, jejichž úkolem je zejména odebraný vzorek zbavit hrubých nečistot a rozpuštěných plynů.

Před konečnou analýzou vzorku je potřeba provést několik nezbytných operací:

- 1) Odběr vzorku
- 2) Filtrace vzorku
- 3) Extrakce vzorku
- 4) Derivatizace vzorku

2.3.1.1 Odběr vzorku

Vzorky povrchové vody se odebírají do vzorkovnic z nereaktivního materiálu (např. sklo, PE, PTFE...). Vzorkovnice musí být čisté a je-li to nutné, měly by obsahovat i malé množství kyseliny kvůli konzervaci vzorku. Vzorkování se provádí v přiměřené vzdálenosti od břehu a ideálně v hloubce asi 25 cm pod vodní hladinou. Objem vzorku pro stopovou analýzu bývá 500 ml nebo 1 l. Po odebrání vzorku se vzorkovnice uzavře takovým způsobem, aby se v ní neobjevila vzduchová bublina. Vzorkovnice se pak uloží do chladicí přepravky s teplotou okolo 4°C a je transportována do laboratoře, kde by se měl vzorek do 24 hodin zpracovat.

2.3.1.2 Filtrace vzorku

Odebraný vzorek povrchové vody zpravidla obsahuje drobné nerozpustné částice, které je potřeba odstranit, zejména bude-li následně využita extrakce tuhou fází. Pro separaci pevných nečistot se používá klasická filtrace. Filtruje se buď přes běžné celulosové nebo speciální filtry ze skelných vláken s průměrem pórů 0,45 nebo 0,75 μm . Pokud to vyžadují okolnosti, lze filtry před samotnou filtrací proprat v organickém rozpouštědle (hexan, diethylether, methanol...), které bude použito k extrakci [35-36].

2.3.1.3 Extrakce vzorku

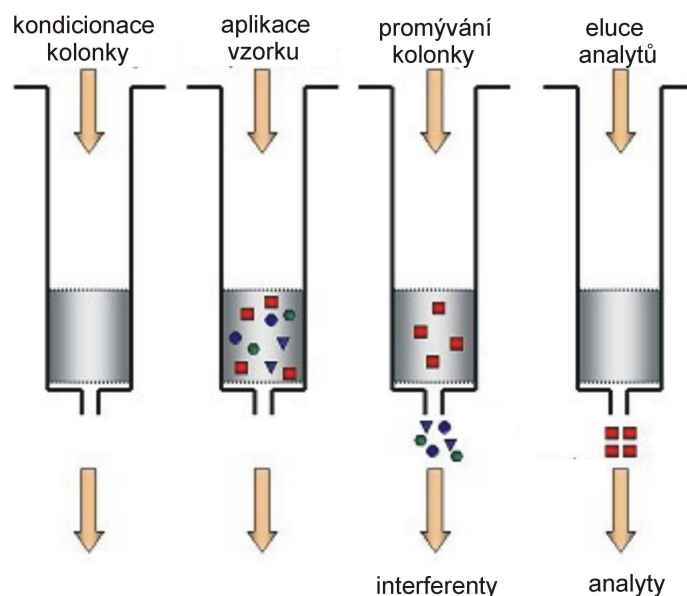
Po odstranění hrubých nečistot ze vzorku obvykle následuje izolace sledovaných analytů. Jednou z nejběžnějších metod izolace je extrakce, která poskytuje celou řadu možností. Při extrakci přechází složka ze směsi látek v kapalnou nebo tuhou fází do jiné kapalnou nebo tuhou fáze, přičemž je splněna podmínka vzájemné nemísitelnosti obou fází. Vhodnou volbou extrakčních podmínek a znalostí vedlejších rovnováh lze docílit dobré selektivity separace. Podle charakteru analyzované látky se například volí vhodné pH anebo typ rozpouštědla. Extrakce hraje významnou roli také v souvislosti se separací léčiv ze vzorků povrchových vod, kde se nejčastěji využívá extrakce kapalinou nebo tuhou fází.

Extrakce kapalinou

Extrakce z kapalinou do kapalinou je nejstarší formou izolace organických látek z vody. Jedná se o velmi jednoduchou izolační techniku, která nevyžaduje složité postupy ani nákladnou instrumentaci. Sledovaná složka spolu s ostatními látkami přechází z vody do organického rozpouštědla, ve kterém je více rozpustná. Podmínkou však zůstává ustavení fázové rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami [37].

Extrakce tuhou fází (SPE)

Extrakce tuhou fází je moderní technika pro přípravu vzorků, jejíž podstatou je zachycení molekul sledované látky na tuhém sorbentu. Sorbent bývá zpravidla umístěn v umělohmotné kolonce, přes kterou se nechává protékat roztok vzorku. Vhodnou volbou sorbentu a rozpouštědla lze docílit i toho, že na sorbentu se zachytí pouze sledované analyty, které se posléze jenom vymyjí elučním činidlem (Obr. 12).



Obr. 12 – Extrakce tuhou fází [38]

Sorbentem zpravidla bývá chemicky modifikovaný silikagel ve formě drobných částíček ($\text{\O} = 50 \mu\text{m}$), na které se navazují skupiny různých vlastností, které pak rozhodují o vlastnostech sorbentu [37].

Pro izolaci léčiv se nejvíce používají nepolární vázané fáze a iontově-výměnné fáze. Použití fází na bázi imunoafinitních sorbentů a „molekulárních otisků“ (molecular imprinting) bývá zcela výjimečné.

Nepolární vázané fáze

Mají hydrofobní vlastnosti a používají se pro extrakci nepolárních a středně polárních sloučenin. Jedná se v podstatě o první teoretické patro kapalinové chromatografie na reverzní fázi, kdy jako funkční skupinu zakotvenou na stacionární fázi používáme např. oktadecyl (kolonky C_{18}) či oktyl (kolonky C_8) a mobilní fází je voda [37-39].

Iontově-výměnné vázané fáze

Příkladem je trimethylamoniumpropyl-chloridová fáze, která je silným iontoměníčem pro výměnu aniontů (anex) z vodných i nevodných roztoků náhradou za svůj chloridový anion. Dalšími iontově-výměnnými fázemi mohou být zmíněná aminopropylová, benzensulfonová nebo propansulfonová [37].

I když extrakce tuhou fází má oproti klasické extrakci kapalinou řadu pozitiv, je v některých situacích výhodnější využít extrakce kapalinou. Extrakce v systému kapalina – kapalina totiž poskytuje lepší návratnost, která je v případě stopové analýzy nepostradatelná. Na úkor času tak lze dosáhnout lepších detekčních limitů a přitom ještě ušetřit za SPE kolonky.

2.3.1.4 Derivatizace vzorku

Derivatizace je proces, při kterém se převádí analyty ve vzorku na vhodné deriváty pomocí derivatizačního činidla. Proces derivatizace slouží zejména k:

- zvýšení citlivosti a zlepšení detekce [40]
- zvýšení rozlišení a zlepšení separace (zvýšení těkavosti, snížení polarity) [39-40]
- zamezení nežádoucí sorpce v koloně [40]

Samotná derivatizace však není nezbytnou součástí postupu chemické analýzy a lze ji v některých případech vypustit. Za těchto podmínek je ale nutné počítat se zhoršením limitů detekce příslušné metody koncového stanovení.

Derivatizace se nevyužívá například při stanovení léčiv metodou kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovými hmotnostními spektrometry (HPLC-MS/MS), kde se právě díky tandemovému uspořádání MS/MS dosahuje i tak dobrých detekčních limitů. Naproti tomu při analýze metodou plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS) je derivatizace obvykle nezbytným krokem, bez něhož by stanovení extrémně nízkých koncentrací léčiv bylo nemyslitelné.

K derivatizaci léčiv, která jsou následně stanovována metodou GC-MS, se využívají zejména tato derivatizační činidla:

- *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) [2]
- *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) [2]
- *N-terc*-butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoracetamid (MTBSTFA) [2]
- pentafluorbenzylbromid [41-42]
- diazomethan [43]
- methanol / BF₃ [35]
- hydrogensíran tetrabutylamonia [39]

Negativní stránkou derivatizace je její pracnost, časová náročnost a možný vznik vedlejších derivatizačních produktů. Mezi nevýhody patří i nebezpečné vlastnosti většiny derivatizačních činidel, protože mnohá z nich jsou explozivní, jedovatá či karcinogenní [39, 44].

2.3.2 ANALÝZA VZORKU

Při stopové analýze medikamentů se v drtivé většině případů využívá jako analytická koncovka separační metoda ve spojení s hmotnostní detekcí. V analýze reálných vzorků je tak nejčastěji využíváno metody GC-MS nebo HPLC-MS, případně tandemového uspořádání GC-MS/MS resp. HPLC-MS/MS. Pro léčiva iontové povahy je zvláště výhodná separace pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostní detekcí (CE-MS). Bohužel její aplikace na reálné vzorky bývá většinou limitována matricovými efekty vzorku. Mimo dosud uvedených metod analýz byla v souvislosti se stanovením léčiv v životním prostředí realizována i online spojení kapalinové chromatografie se spektrometrickým (HPLC-DAD) a fluorescenčním (HPLC-FLD) detektorem nebo offline spojení s nukleární magnetickou rezonancí (HPLC-NMR) [17, 45-46].

2.3.2.1 Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (GC-MS)

GC-MS je metoda, která kombinuje vlastnosti plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Spojení GC-MS se používá k analýze léčiv, drog, výbušnin, životního prostředí, vyšetřování příčin požárů a k identifikaci neznámých vzorků. GC-MS je součástí bezpečnostních kontrol na letištích, soudech apod. Hlavní výhodou tohoto zapojení je však možnost stopové analýzy [47].

GC-MS je standardní metodou ve forenzní analýze, kde slouží k provádění specifických testů, které jednoznačně identifikují přítomnost určitých látek v daném vzorku. Nespecifické testy totiž pouze naznačují, že daná látka může být ve vzorku přítomna, protože spadá do určité kategorie, což může vést k její falešné pozitivní identifikaci [47].

2.3.2.1.1 Historie

Použití hmotnostního spektrometru jako detektoru v plynové chromatografii bylo vyvinuto v průběhu roku 1950 Rolandem Gohlkem a Fredem McLaffertym. První realizované GC-MS představovalo objemné zařízení, které bylo nesmírně citlivé na laboratorní podmínky. Vývoj cenově dostupných, miniaturizovaných a výkonných počítačů umožnil zjednodušení této techniky a zkrácení celkové doby analýzy. V roce 1996 se na trhu objevila generace vysokorychlostních GC-MS, která umožnila zkrácení doby analýzy hořlavín z 16 minut na pouhých 90 sekund. Zkrácení doby analýzy vedlo k širokému uplatnění GC-MS nejen v laboratoři, ale i v terénu [47].

2.3.2.1.2 Instrumentace

GC-MS se skládá z plynového chromatografu (GC) a hmotnostního spektrometru (MS). Tyto dva přístroje se používají dohromady, protože poskytují daleko lepší výsledky, než kdyby se využívaly samostatně. Kromě toho přesná identifikace určité molekuly pouze GC nebo pouze MS by nebyla dostatečná.

Plynový chromatograf využívá k separaci látek kapilární kolonu, která bývá charakterizována svými rozměry (délka, průměr, tloušťka filmu) a typem stacionární fáze (např. nepolární HP 5). V chromatografické koloně dochází k separaci složek vzorku na základě jejich různé schopnosti poutat se ke stacionární fázi. Složky vzorku potom opouští kolonu v různém čase (retenční čas) a přechází z plynového chromatografu do hmotnostního spektrometru, který umožňuje jejich detekci. V hmotnostním spektrometru dochází k ionizaci molekul, jejich fragmentaci a akceleraci. Jednotlivé fragmenty jsou potom hmotnostním analyzátozem (např. kvadrupól) separovány a samostatně detekovány. Fragmenty molekuly jsou od sebe oddělovány podle poměru m/z (hmotnost/náboj), odtud název hmotnostní spektrometrie [47].

Velkou předností hmotnostního detektoru je jeho výborná citlivost a možnost rozeznat případnou koeluci dvou či více složek. Pomocí výsledného chromatogramu a hmotnostních spekter lze tak jednoduše zjistit, zda ke koeluci dochází či nikoliv. V případě GC-MS je totiž velmi nepravděpodobné, že by koeluovaly dvě látky, které by navíc i stejně fragmentovaly. Kvalitativními charakteristikami v GC-MS tak jsou retenční čas a hmotnostní spektrum. Ke kvantifikaci se pak využívá plocha píku resp. jeho výška, pokud pík nevykazuje asymetrii [47].

Nástřik v GC-MS

Vzorek je zaváděn do kolony pomocí mikrostřičkačky, kterou se propíchnou septum a provede se nástřik. Po nástřiku je vzorek okamžitě převeden do plynné fáze a může být nadávkován na kolonu. V plynové chromatografii se využívá několik technik pro převedení vzorku na kolonu, nejpoužívanějšími technikami však jsou [47]:

- 1) Nástřik do kolony (on column) je základní metodou náplňových a mikronáplňových kolon. V závislosti na podmínkách měření se dávkuje 1-10 μl vzorku. Bývá preferován i pro kapilární kolony větší světlosti (od průměru 0,25 mm) s použitím jemné nástřikové jehly pro 0,2-2 μl vzorku. Horní část kolony je zahřívána na teplotu o 10-30 $^{\circ}\text{C}$ nižší, než je teplota varu rozpouštědla. Vzorek musí být rychle nastříknut a vytvořit kapalný film na stěně kolony. Po 30-60 s se teplota kolony prudce zvýší, aby nastalo odpaření [37].
- 2) Nástřik pomocí děliče toku (split injection). Tenčí kapilární kolony mají malou kapacitu, a proto se zejména u koncentrovaných vzorků musí pomocí děliče toku (splitter) jeho část s nosným plynem oddělit. Do kolony se pak dostává jen definovaný zlomek nastříknutého množství (zpravidla 0,1-10 %), které bývá v intervalu 0,1-2 μl . Skleněná vata v odpařovací trubici (liner) zajišťuje homogenní odpařování a účinné promíchávání vzorku před vstupem do kolony [37].
- 3) Nástřik bez děliče toku (splitless injection) je využíván hlavně při stopové analýze, protože umožňuje stanovení velmi nízkých koncentrací (ppm a méně). Používá se téhož zařízení jako s dělením toku, ale odvod děliče je uzavřen. Po nástřiku dochází v lineru k odpaření vzorku a jeho vstupu na kolonu. Při této metodě nástřiku je většina vzorku převáděna přímo na kolonu, a proto je možné dosahovat nižších limitů detekce (vyšší citlivosti) než ve splitovacím režimu. Vylepšenou variantou bezděličového nástřiku je *pulzní nástřik bez děliče toku (pulsed splitless injection)*, který umožňuje efektivnější vstup vzorku na kolonu. Princip nástřiku je téměř stejný s tím rozdílem, že po odpaření vzorku je prudce zvýšen tlak, což umožňuje rychlejší převod vzorku na kolonu. Kromě toho dochází po 30-60 sekundách k otevření děliče toku a oplachu lineru od zbytků rozpouštědla a analytů, čímž je zamezeno chvostování píků. Hlavní výhody oproti klasickému splitless spočívají v možnosti nástřiku většího objemu (až 5 μl) a v rychlejším transferu vzorku na kolonu [48-49].

Typy hmotnostních analyzátorů

Nejběžnějším hmotnostním analyzátozem v GC-MS je *kvadrupól*, který je cenově nejdostupnější. Kvadrupólový hmotnostní analyzátor je obvykle tvořen čtyřmi rovnoběžnými tyčovými elektrodami s kruhovým nebo hyperbolickým průřezem. Tyčové elektrody jsou paralelně umístěny v rozích pomyslného pravidelného čtyřbokého hranolu a na každou dvojici protilehlých tyčí je aplikováno jiné vysokofrekvenční napětí. Nastavení hodnot veličin (stejnoseměrné napětí, amplitudy a frekvence radiofrekvenčního pole) předurčuje trajektorie drah, po kterých se mezi tyčemi budou pohybovat ionty s určitou hodnotou m/z . Při daném nastavení mají stabilní trajektorii vedoucí k detektoru jen ionty určité hodnoty m/z . Ostatní ionty k detektoru neprojdou, protože jejich trajektorie jsou nestabilní a kolidují s tyčovými elektrodami. Nastavení veličin kvadrupólu se postupně mění a detektor zachycuje ionty o různých hodnotách m/z .

Dalším relativně běžným analyzátozem je *iontová past*, která pracuje podobně jako kvadrupól. Jinou variantou je pak *sektorový hmotnostní analyzátor*, který je ale finančně nákladný, rozměrný a může si jej dovolit jen málokterá laboratoř. *Analyzátor doby letu* se používá zejména v tandemovém uspořádání, kde bývá řazen za kvadrupól [47].

2.3.2.1.3 Analýza

Hmotnostní spektrometr obvykle může pracovat ve dvou režimech, buď měří celá spektra tzv. celkový iontový proud (TIC), anebo selektivně monitoruje určitou hmotu tzv. selektivní monitorování iontů (SIM). Typický GC-MS je schopen vykonávat obě tyto funkce, a to buď jednotlivě anebo současně v závislosti na možnostech a nastavení přístroje [47].

TIC („Total Ion Current“)

Pokud má přístroj registrovat celá spektra, je nutné mu zadat určitý interval m/z , ve kterém bude pracovat (např. 50-400 m/z). Šířka intervalu bývá ovlivněna očekávanými analyty, použitými rozpouštědly a případnými interferencemi. Ve sledovaném intervalu by neměly být obsaženy příliš nízké hmoty, protože jejich přítomnost vede ke zvýšení šumu. Lze tak potom v naměřeném spektru najít například dusík (28 m/z), oxid uhličitý (44 m/z), vodu (18 m/z), popřípadě další možné interference. Kromě toho nastavení příliš širokého intervalu skenování má za následek snížení citlivosti a reprodukovatelnosti metody, protože při každém skenu je sledováno velké množství různých fragmentů, což vede ke snížení frekvence snímání spekter a zhoršení tvaru píků [47].

Úplný sken se provádí při určování neznámé látky ve vzorku. Pokud jde o určení nebo potvrzení obsahu určité sloučeniny ve vzorku, tak režim TIC poskytuje daleko více informací než režim SIM. Mód TIC bývá nástrojem pro vývoj nové metody stanovení, kdy se při první analýze provádí nejprve celkový sken. Z naměřených retenčních časů a hmotnostního spektra sledovaných látek se pak volí podmínky pro režim SIM [47].

SIM („Selective Ion Monitoring“)

Hmotnostní spektrometr v režimu SIM registruje pouze takové fragmenty, které mu byly dopředu zadány. Mód SIM umožňuje dosažení extrémně nízkých detekčních limitů, protože je sledováno jenom několik vybraných fragmentů (např. 4), a proto se nesnižuje citlivost přístroje. Vzhledem k tomu, že jsou sledovány pouze vybrané hmoty, tak se částečně eliminuje i vliv matricových efektů ve vzorku. Aby byl výsledek dostatečně relevantní, je důležité ověřit, zda daný pík skutečně odpovídá hledanému analytu. K tomu se může využít referenčního standardu, který se přidá ke vzorku a analýza se provede znovu. Další možností je tzv. „qualifier ions“, což je skupina iontů vybraná z hmotnostního spektra sledované sloučeniny. Přítomnost těchto iontů v určitém množství k charakteristickému iontu analytu pak poskytuje důkaz o správné identifikaci cílové sloučeniny [47].

Typy ionizace

Potomco složky vzorku opustí kolonu, procházejí přes interface a vstupují do hmotnostního spektrometru, kde nejprve probíhá jejich ionizace. Po nezbytné ionizaci, fragmentaci, akceleraci a separaci iontů následuje jejich detekce pomocí elektronového násobiče (detektor s konverzní dynodou). Ionizované fragmenty jsou tak převedeny na elektrický signál, který je pak detekován. V GC-MS se používají tyto způsoby ionizace [47]:

1) Ionizace elektronem (EI)

Ionizace elektronem je zdaleka nejčastějším způsobem ionizace, který se stal určitým standardem. Molekuly vstupují do hmotnostního analyzátoru (kvadrupól nebo iontová past), kde jsou bombardovány elektrony uvolněnými z rozžhaveného vlákna. Elektrony dopadají na molekuly a vyvolávají jejich fragmentaci, která probíhá charakteristickým a reprodukovatelným způsobem. Tato „tvrdá“ ionizační technika vede k tvorbě mnoha fragmentů o nízkém poměru m/z a jen několik málo z nich se svou hmotou blíží

molekulové hmotnosti původní molekuly. Z toho vyplývá, že molekulární ion může být ve spektru málo intenzivní a v některých případech může dokonce chybět. Molekulární fragmentace je závislá na ionizační energii elektronů (typicky 70 eV). Použití ionizační energie 70 eV usnadňuje porovnání naměřených spekter se spektry uloženými v knihovně spekter počítače [47].

2) *Chemická ionizace (CI)*

Chemická ionizace využívá k ionizaci reakčního plynu (methan, amoniak), který je zaváděn do ionizační komůrky hmotnostního spektrometru. V závislosti na módu chemické ionizace (pozitivní nebo negativní CI) je zvolen reakční plyn, který interaguje s elektrony a analytem a způsobuje jeho „měkkou“ ionizaci. Při „měkké“ ionizaci dochází k menší fragmentaci molekuly než při „tvrdé“ ionizaci elektronem. Jednou z hlavních výhod chemické ionizace je, že molekulární ion bývá ve spektru daleko intenzivnější, než je tomu u ionizace elektronem [47].

- *pozitivní chemická ionizace (PCI)* – Reakční plyn (např. methan, izobutan...) reaguje s molekulami látek, které mají protonovou afinitu [47].
- *negativní chemická ionizace (NCI)* – Reakční plyn (např. amoniak, dichlormethan...) reaguje s molekulami látek, které mají elektronovou afinitu [47].

V GC-MS je prioritou identifikace látky, která se provádí pomocí retenčních charakteristik a hmotnostního spektra. Určitému retenčnímu času v chromatogramu odpovídá určité hmotnostní spektrum, jehož vyhodnocením lze zjistit, o jakou látku se jedná. Toto vyhodnocení provádí počítač, který pomocí příslušného softwaru porovnává naměřené hmotnostní spektrum se spektry uloženými v databázi, tzv. knihovně spekter. Ve výsledku jsou pak navrženy látky, jejichž hmotnostní spektra přicházejí v úvahu. V případě, že software nenalezne vhodnou látku, která by odpovídala naměřenému spektru, je na místě manuální interpretace spektra. Počítač současně porovnává více údajů (např. retenční časy z GC), které se přesně týkají naměřených dat [47, 50].

Jinou metodou identifikace je matematická analýza píků v MS spektru. MS spektrum má totiž původně charakter píků, teprve matematickým zpracováním získáváme čárové spektrum. V této metodě je nejvyššímu píku přiřazena 100 % hodnota a dalším píků v MS spektru jsou přiřazeny poměrné hodnoty, přičemž se berou v úvahu všechny hodnoty nad 3 %. Molekulová hmotnost neznámé sloučeniny obvykle odpovídá molekulárnímu píku, jehož

přesná hmota se použije ke zjištění chemického vzorce, který obsahuje různé prvky, jež mohou být přítomny ve sloučenině. Izotopové linie ve spektru, které jsou charakteristické pro jednotlivé prvky, se použijí k identifikaci těchto prvků. Jakmile je pomocí spektra nalezen chemický vzorec, může být identifikována molekulární struktura, která však musí být v souladu s charakteristikami zaznamenanými GC-MS. Tato identifikace je automaticky prováděna programem, který je dodáván společně s přístrojem. Software automaticky navrhuje možné struktury, které by mohly být ve vzorku přítomny [47, 50].

V módu TIC se berou v úvahu všechny fragmenty ve spektru, kdežto v módu SIM se sledují pouze vybrané hmoty odpovídající konkrétní látce. Využívá se předpokladu, že v daném retenčním čase je určitá skupina iontů charakteristická pro danou látku. To umožňuje rychlou a efektivní analýzu, zejména pokud má analytik předběžné informace o vzorku nebo hledá jen několik specifických látek. Díky SIM módu dochází k výraznému zjednodušení výsledného chromatogramu, čímž roste citlivost analýzy, takže lze detekovat menší množství sloučeniny [47].

Ke kvantifikaci látky se pak využívá geometrických charakteristik píku, kdy se měří jeho plocha nebo výška.

GC-MS/MS

Tandemové uspořádání MS/MS umožňuje stanovení velmi nízkých koncentrací ve vzorcích s výrazným vlivem matricových efektů. V praxi existuje několik typů tandemových hmotnostních spektrometrů, které se od sebe liší druhem použitých hmotnostních analyzátorů. V GC-MS/MS se v této souvislosti nejběžněji využívá trojitěho kvadrupólu. Hmotnostní spektrometr tak ve skutečnosti obsahuje tři kvadrupóly (QqQ) – 1. analyzátor (Q1), kolizní celu (q2) a 2. analyzátor (Q3). V prvním kvadrupólu (Q1) dochází ke generaci iontů, z nichž se separuje požadovaný ion, který se v kolizní cele (q2) podrobí další reakci, a z něj vzniklé ionty jsou analyzovány následujícím kvadrupólem (Q3) [47].

Kromě trojitěho kvadrupólu se využívá také iontové pasti, která poskytuje několik výhod. Je možné ji zkonstruovat i s malými rozměry při zachování velmi dobrého rozlišení. Iontová past má také menší nároky na vakuum a napájení než kvadrupóly (a tím je možné použít menší a jednodušší vakuové pumpy). Hlavní výhodou však je možnost provádět GC-MSⁿ, kde jediná iontová past slouží zároveň jako hmotnostní analyzátor i kolizní cela.

Obecně lze v první fázi tandemové hmotnostní spektrometrie separovat buď pouze jeden ion (SRM) nebo více iontů (MRM), a ty potom podrobit dalším reakcím. Tandemové uspořádání MS/MS je vysoce specifická metoda, která prakticky eliminuje vlivy matrice. Využití jiných typů uspořádání hmotnostních analyzátorů (např. QqTOF, QqTrap apod.) je v souvislosti s plynovou chromatografií méně běžné [47].

2.3.2.2 Kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS)

HPLC-MS je analytická technika, která kombinuje vlastnosti kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. HPLC-MS je výborná technika, která se používá zejména tam, kde je požadována vysoká citlivost a specifičnost analýzy. Obecně se metoda HPLC-MS využívá k detekci a potenciální identifikaci chemických látek v přítomnosti jiných chemických látek (ve složité směsi) [51].

Kapalinová chromatografie

HPLC-MS se od kapalinové chromatografie s běžnou detekcí (např. spektrometrický detektor) odlišuje hlavně použitým měřítkem. V HPLC-MS se obvykle používají kolony s menšími vnitřními průměry a tedy i s nižšími průtoky mobilních fází. Nedávno se v HPLC-MS ještě využívaly kolony o průměru 1 mm (klasická HPLC 4,6 mm), nyní převládají kolony s vnitřním průměrem okolo 300 μm nebo i 75 μm , a tak v těchto případech nebývají výjimkou i průtoky v řádech stovek nanolitřů za minutu [51].

V případě separace na klasických kolonách s průměry 4,6 mm lze eluát z kolony rozdělit v určitém splitovacím poměru (např. 10:1), a tak realizovat současně spektrofotometrickou (HPLC-UV/VIS) a hmotnostní detekci (HPLC-MS příp. HPLC-MS/MS). Na jednu stranu dochází rozdělením toku ke snížení citlivosti spektrometrického detektoru, ale na druhou stranu nám hmotnostní spektrometr poskytuje výbornou citlivost při průtocích 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ nebo méně [51].

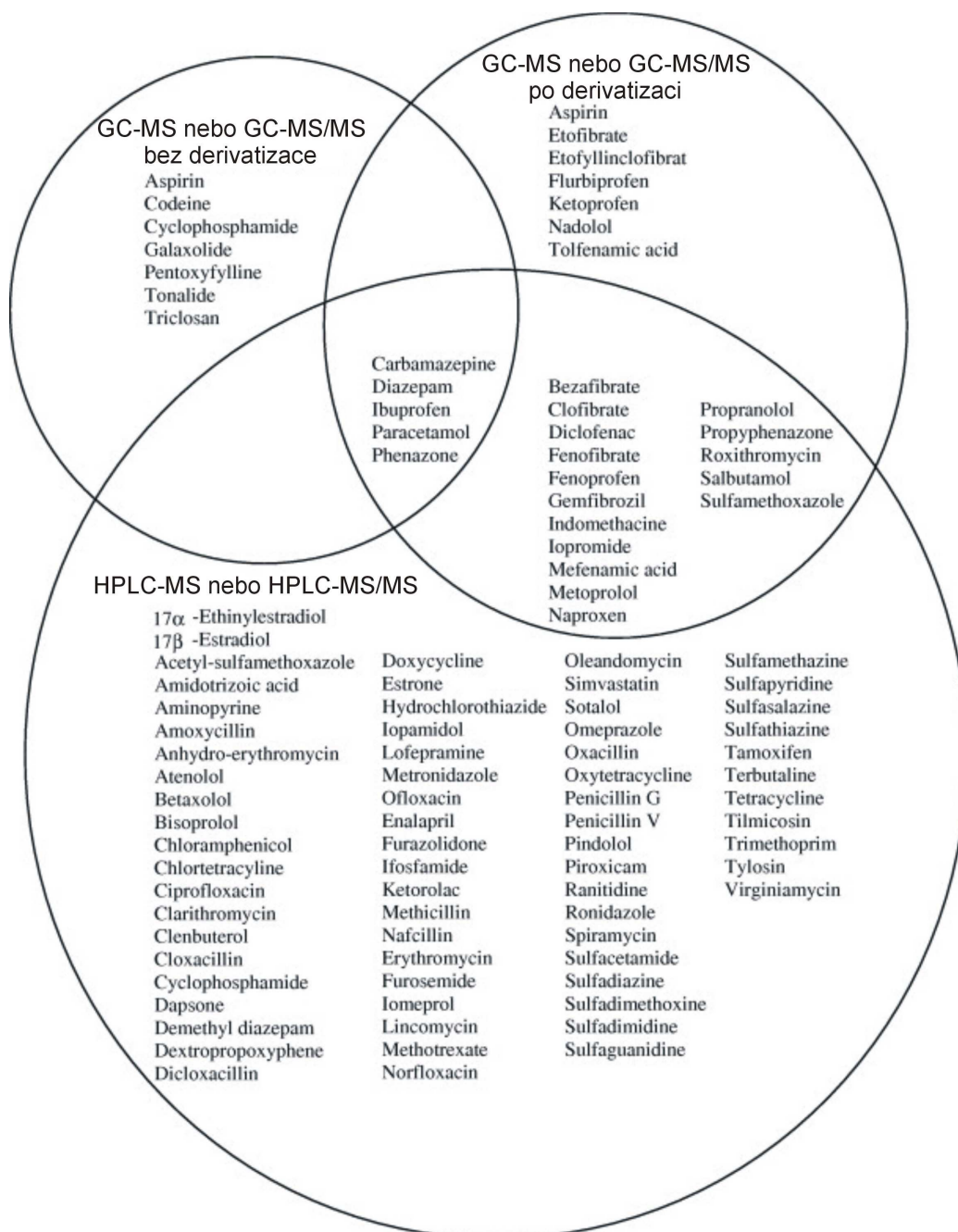
Hmotnostní spektrometrie

Obvyklým hmotnostním analyzátozem v HPLC-MS bývá kvadrupól, iontová past nebo analyzátor doby letu. V případě tandemového uspořádání HPLC-MS/MS je podobně jako v GC-MS/MS využíváno trojitého kvadrupólu (QqQ) nebo kombinace kvadrupólu s průletovým analyzátozem (QqTOF) [51].

Donedávna byl největším problémem HPLC-MS interface mezi kapalinovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem, rozvoj ionizačních technik však tento

problém vyřešil. Především ionizace elektrosprejem (ESI) se zasloužila o rozvoj HPLC-MS a jeho uplatnění ve farmakologické praxi. Je ale využíváno i jiných ionizačních technik např. bombardování rychlými atomy, termospreje, nanospreje nebo chemické či fotometrické ionizace za atmosférického tlaku. Pro biologické vzorky našla uplatnění technika MALDI [51].

GC-MS a HPLC-MS umožňují separaci a citlivou detekci širokého spektra léčiv (Obr. 13) [46].



Obr. 13 – Stanovení léčiv separačními metodami [46]

2.3.3 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Stopová analýza bývá často doprovázena komplikovaným pozadím a matricovými efekty. Z tohoto důvodu se musí volit vhodná kvantifikační metoda, která tyto nepříznivé vlivy do jisté míry eliminuje. Ke kvantifikaci léčiv v životním prostředí se zejména používá:

1) Metoda kalibrační křivky

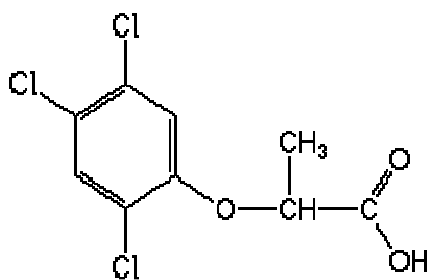
Tato metoda spočívá v přípravě tzv. kalibračních standardů, což jsou roztoky, které obsahují postupně rostoucí koncentraci stanovované složky. Kalibrační standardy se proměří a sestrojí se grafická závislost sledované veličiny na obsahu složky. Pak se proměří vzorek a z velikosti naměřené veličiny se určí obsah složky ve vzorku. Musí se přitom dbát na to, aby bod na kalibrační křivce, který patří vzorku, ležel mezi standardy.

Metoda kalibrační křivky je sice hojně využívána v praxi, ale v případě stopové analýzy v povrchových vodách ji nelze uplatnit, protože ve vzorku dochází k výraznějším matricovým efektům, které ruší stanovení. Analyt se totiž jinak chová ve vzorku a jinak zase v připravených standardech. Z tohoto důvodu pak detektor může dávat různé odezvy, čímž dochází k chybám při stanovení. Řešením může být přidavek balastních látek do tzv. matricových standardů nebo využití jiné kalibrační metody – nejlépe metody standardního přídávku [3, 30, 36-37, 52-53].

2) Metoda vnitřního standardu

Ke vzorku se přidává známé množství standardu. Standardem je látka, která nesmí být ve vzorku obsažena a musí tvořit samostatný pík v blízkosti píku stanovované složky. Je nezbytné zabránit chybám způsobeným jinou odezvou standardu a analytu. V takovém případě plochy píků pro stejná látková množství standardu a analytu nejsou stejné; jejich poměr tedy není roven jedné a označujeme jej jako korekční faktor, kterým je nutno korigovat změřené plochy píků. Samotná kvantifikace se pak provádí, buď metodou přímého srovnání anebo metodou kalibrační křivky [37].

Nalezení vhodného vnitřního standardu bývá problematické. Vhodným vnitřním standardem např. pro analýzu ibuprofenu je látka známá pod obchodním názvem „fenoprop“, systematickým názvem 2-(2,4,5-trichlorfenoxy)propanová kyselina (Obr. 14) [54]:



Obr. 14 – Strukturní vzorec 2-(2,4,5-trichlorfenoxy)propanové kyseliny („fenoprop“)

3) Metoda standardního přídavku

Při využití metody standardního přídavku se provádí dávkování samotného vzorku a vzorku, do kterého bylo přidáno známé množství standardu stejného jako stanovovaná látka. Zvětšení plochy píku je pak přímo úměrné přidanému množství standardu [37, 54].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Dichlormethan, p.a. (Penta, Praha, Česká republika)

Methanol, p.a. (Penta, Praha, Česká republika)

Kyselina chlorovodíková 35 %, p.a. (Penta, Praha, Česká republika)

Síran sodný, p.a. (Lachema, Neratovice, Česká republika)

Léčiva:

- Ibuprofen */Ibalgin 400/* (Zentiva, Praha, Česká republika)
- Naproxen */Nalgesin S/* (Krka, Praha, Česká republika)
- Ketoprofen */Ketonal/* (Pharmaceutical and Chemical Company, Ljubljana, Slovinsko)
- Diklofenak */Diclofenac AL/* (Aliud Pharma, Laichingen, Německo)

Účinné látky byly izolovány z komerčních přípravků, jejichž názvy jsou uvedeny kurzívou.

Diazomethan v diethyletheru – byl připraven alkalickou hydrolyzou N-nitroso-N-methylmočoviny (Sigma Aldrich, St. Luis, USA)

3.2 Přístroje a zařízení

Plynový chromatograf HP 6890

Hmotnostní spektrometr Agilent 5973N

Automatický dávkovač HP 7683

Křemenná kapilární kolona HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm)

Nosný plyn – He (99,998 %, SIAD, Bergamo, Itálie)

Tlaková láhev s N₂ (99,998 %, SIAD, Bergamo, Itálie)

Ultrazvuková lázeň Elmasonic S 40H

Centrifuga Eppendorf 5702

Topná deska Evaterm

Analytické váhy Kern

Automatické pipety

Laboratorní sklo

Plastové špičky a mikrozkuřavky

3.3 Odběr vzorků

K analýze léčiv byla odebírána povrchová voda z řeky Dřevnice, která pramení na jihu Hostýnských vrchů, zhruba 3 km severně od obce Držková, v nadmořské výšce 551 m. Nedaleko pramene cca 7 km jižněji se na řece nachází přehrada, která slouží k zadržování povrchové vody, jež se posléze upravuje na vodu pitnou, kterou je zásobováno město Zlín a blízké okolí. Řeka protéká Slušovicemi, Zlínem a Otrokovicemi, u kterých se vlévá zleva do řeky Moravy ve výšce 182 m n.m. Dřevnice se svou délkou toku 42,3 km patří k významným řekám Zlínského kraje [55].

Vzorkování probíhalo jak na samotném toku řeky Dřevnice, tak i na jejích významných přítocích a řece Moravě. Mapoval se asi 35 km dlouhý úsek řeky, který sahá od přehrady ve Slušovicích až po ústí Dřevnice do řeky Moravy. Analyzováno bylo celkem 33 vzorků, které byly odebírány ve třech sériích z 11 odběrových míst, jejichž poloha je znázorněna na mapce (Obr. 15).



Obr. 15 – Mapa odběru vzorků

K vzorkování byla použita nádoba pro odběr vody a čisté plastové (PE-HD, PET) láhve o objemech 500, 1500 a 2000 ml. Vzorky vody byly ihned po odběru transportovány do laboratoře, kde byly v průběhu následujících 48 hodin zpracovány. Data a podmínky odběrů jsou uvedeny v tabulce č. 5.

číslo měřicí stanice	umístění stanice /řeka/	dlouhodobý průměr		2.3.2009 T _{vzd.} = 2,9°C		3.5.2009 T _{vzd.} = 13,4°C		2.3.2010 T _{vzd.} = 3,0°C	
		Q [m ³ /s]	H [cm]	Q [m ³ /s]	H [cm]	Q [m ³ /s]	H [cm]	Q [m ³ /s]	H [cm]
1	Spytihněv /Morava/	55,40	155	87,46	188	34,70	130	314,00	420 (1.SPA)
2	Kroměříž /Morava/	51,30	179	77,82	206	26,52	142	295,50	415 (1.SPA)
3	Zlín /Dřevnice/	2,21	36	5,74	40	0,46	24	7,13	57
4	Vizovice /Lutoninka/	0,59	24	1,07	23	0,13	13	1,60	32
5	Slušovice /Dřevnice/	–	–	0,30	15	0,04	7	0,80	25

Tab. 5 – Podmínky vzorkování /zdroje: Povodí Moravy s.p. a ČHMU/

3.4 Pracovní postup

Odměrným válcem bylo odměřeno 500 ml vzorku, který se nechal asi 5 minut odplynit v ultrazvuku. Odplyněný vzorek byl převeden do dělicí nálevky o objemu 1 litr a okyselen přidavkem 1,5 ml 5 M HCl, čímž se upravilo pH na 2. Pro extrakci léčiv bylo do děličky přidáno 20 ml dichlormethanu a poté se obsah děličky asi 5 minut intenzivně protřepával. Po ustálení obou vrstev byla spodní organická vrstva odpuštěna do plastové centrifugační zkumavky. Extrakce pak byla ještě jednou opakována s přidavkem 10 ml dichlormethanu.

Extrakt ve zkumavkách byly následně centrifugovány po dobu 5 minut při maximálních otáčkách (4400 min⁻¹), aby se od sebe dokonale oddělily vrstvy dichlormethanu, vody a přítomných nečistot. Vodná fáze byla odstraněna do odpadu a vrstva dichlormethanu byla opatrně pomocí automatické pipety převedena do skleněné baňky. Pro vysušení bylo k extraktu přidáno menší množství bezvodého Na₂SO₄. Vysušený extrakt byl na topné desce odpařen mírným proudem dusíku na objem 3-4 ml. Tento objem byl postupně pipetou převeden do skleněné vialky a odpařen dosucha.

Pro derivatizaci vzorku bylo do vialky přidáno 500 µl roztoku diazometanu v diethyletheru. Vzorek se nechal methylovat přibližně 15 minut, a pak bylo přebytečné rozpouštědlo pomocí jemného proudu dusíku opět odpařeno. Methylace diazometanem byla poté ještě jednou zopakována. Následně bylo do vialky přidáno 1000 µl methanolu a vzorek ve vialce byl asi na 2 minuty vložen do ultrazvuku. Vzorek se v této fázi kvůli odstranění velmi jemných nečistot nechal ještě jednou centrifugovat a posléze se opatrně převedl do čisté vialky. Takto připravený vzorek pak byl podroben analýze na GC-MS.

Paralelně byly zpracovávány i vzorky se standardními přídávky léčiva 10 a 100 ng/l.

3.5 Analýza GC-MS

Analýza byla prováděna na plynovém chromatografu HP-6890, který byl vybaven hmotnostním spektrometrem Agilent 5973N a automatickým dávkovačem HP-7683.

Vzorky ve vialkách byly umístěny do automatického dávkovače a následně byla spuštěna analýza. Mikrostríkačka Hamilton byla nejprve propláchnuta acetonem, posléze vzorkem a až poté byl nadávkován 1 µl vzorku. K nadávkování vzorku do kolony byla zvolena metoda pulzního dávkování bez děliče toku – (138 kPa; 0,4 min.). Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 0,9 ml/min. Teploty nástřiku a spojky mezi GC a MS byly nastaveny na 280°C. K separaci byla použita křemenná kapilární kolona o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm, tloušťce filmu 0,25 µm a teplotní program: 50°C – 2 min – 10°C/min – 300°C – 5 min. Celková doba analýzy byla 42 minut.

Hmotnostní spektrometr využíval ionizace elektronem (EI) a byl na počátku analýzy po dobu 5 minut vypnut kvůli odstranění rozpouštědla. Sběr dat byl realizován v modech „TIC“ a „SIM“ (161, 185, 209 a 214 m/z).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Při extrakci do dichlormethanu byly zjištěny technikou vícenásobné extrakce poměrně vysoké hodnoty návratnosti, které se pohybovaly okolo 99 % (Tab. 6, příloha 1). Bohužel návratnost extrakce bývá závislá na složení vzorku. Vzhledem k případným matricovým efektům byla pro kvantifikaci léčiv zvolena metoda standardního přídávku, která matricové efekty do jisté míry eliminuje a poskytuje správné a přesné výsledky i v případě nekvantitativní extrakce analytů. Takto zpracovaný vzorek s příslušnými standardními přídávky byl poté využit pro analýzu dalších vzorků jako standard (matricový standard).

Z důvodu značného vlivu matrice na výsledné tvary a plochy píků je bez matricových standardů problematické i stanovení příslušných detekčních limitů. Pro orientační odhad byl použit vzorek pitné vody zpracovaný jako slepý pokus a tentýž vzorek s přídávkem léčiv na koncentrační úrovni 0,5 ng/l. V příloze č. 2 je doložen dostatečně průkazný vliv standardních přídávků na plochy detekovaných píků. Hodnota 0,5 ng/l byla proto přijata jako spolehlivě prokazatelná koncentrace ve vzorcích nepříliš znečištěných vod. V tabulce č. 6 jsou rovněž uvedeny hodnoty koncentrací léčiv, které odpovídají plochám píků detekovaných ve slepém pokusu (C_{BLANK}).

léčivo	t_R [min]	charakteristický ion [m/z]	návratnost extrakce [%]	LOD [ng/l]	C_{BLANK} [ng/l]
ibuprofen	15,14	161	99,12	0,5	0,22
naproxen	20,41	185	98,69		0,11
ketoprofen	21,53	209	98,67		0,04
diklofenak	22,23	214	99,28		0,08

Tab. 6 – Retenční charakteristiky léčiv

Analýzou methylovaných standardů (výchozí koncentrace 1 $\mu\text{g/l}$) byly zjištěny retenční časy jednotlivých léčiv (Tab. 6) a jejich příslušná hmotnostní spektra, která byla porovnána s databází knihovny spekter (příloha 3). Z naměřených hmotnostních spekter byly zjištěny charakteristické ionty (Tab. 6), které byly následně použity pro citlivou kvantifikaci léčiv v reálných vzorcích pomocí režimu Selective Ion Monitoring (SIM).

Monitoring řeky Dřevnice

Rozborem odebraných vzorků vody se podařilo prokázat přítomnost všech čtyř sledovaných léčiv jak v řece Dřevnici, tak v jejích významných přítocích (Obr. 16-17, příloha 8). Zjištěné koncentrace se pohybovaly v rozmezí několika desítek až stovek ng/l, avšak vyskytla se i taková místa, kde byla přítomnost medikamentů prakticky vyloučena (Tab. 8). Bylo zjištěno, že koncentraci léčiv v řece ovlivňuje několik faktorů. Množství léčiv totiž závisí mj. na místě odběru, průtoku vody a ročním období.

Z tabulky naměřených hodnot a grafů (Tab. 8, Grafy 2-5) jasně vyplývá, že koncentrace léčiv závisí především na místě odběru. Nejvyšší koncentrace léčiv byly nalezeny na samotné výusti přečištěné odpadní vody z areálu ČOV Zlín-Malenovice a bezprostředně za ní. To jednoznačně dokazuje, že se léčiva do životního prostředí dostávají právě skrze ČOV. Naopak nejnižší množství léčiv bylo nalezeno pod slušovickou přehradou, která spadá do I. stupně vodárenské ochrany, a proto by zde neměla připadat v úvahu jakákoliv vnější kontaminace. V letním období zde dokonce nebyla přítomnost léčiv téměř vůbec prokázána. Koncentrace léčiv na ostatních místech řeky nepatrně kolísaly, což je zřejmě způsobeno tím, že do Dřevnice ústí i odpadní stoky z obcí, které nejsou napojeny na ČOV. Kromě toho se na horním toku řeky nachází také ČOV Slušovice nebo ČOV Vizovice, která vypouští přečištěnou vodu do řeky Lutoninky, jež je levostranným přítokem Dřevnice.

Z uvedených tabulek (Tab. 5 a 8) je parné, že koncentrace léčiv v povrchových vodách jsou silně ovlivněny i průtokem vody. V řece Moravě byly nalezeny maximální koncentrace v řádu desítek ng/l i přes to, že se nad nedalekým místem odběru vzorku č.1 (cca 2 km) nachází ČOV Otrokovice. Ve srovnání s řekou Dřevnicí v téže vzdálenosti od ČOV Zlín-Malenovice (vzorek č. 3) se jedná o koncentraci cca třetinovou, což sice může být ovlivněno počtem obyvatel obou měst, ale na druhou stranu i rychlostí toku a mírou průtoku, protože dochází ke zředění kontaminované vody, postupnému odbourávání, případně k ukládání do sedimentů.

Výsledky rovněž ukazují, že v zimním období dosahují koncentrace léčiv vyšších hodnot, než je tomu počátkem léta. To je nepochybně zapříčiněno vyšší spotřebou léčiv během zimy, kdy se u lidí objevují chřipková onemocnění. V důsledku jarního oteplení se snižuje výskyt akutních respiračních onemocnění, s čímž souvisí i pokles spotřeby léků.

Koncentrace medikamentů zaregistrované dne 2.3.2010 vykazují vesměs mírný pokles oproti množství nalezeným přesně před rokem (2.3.2009) na stejných místech.

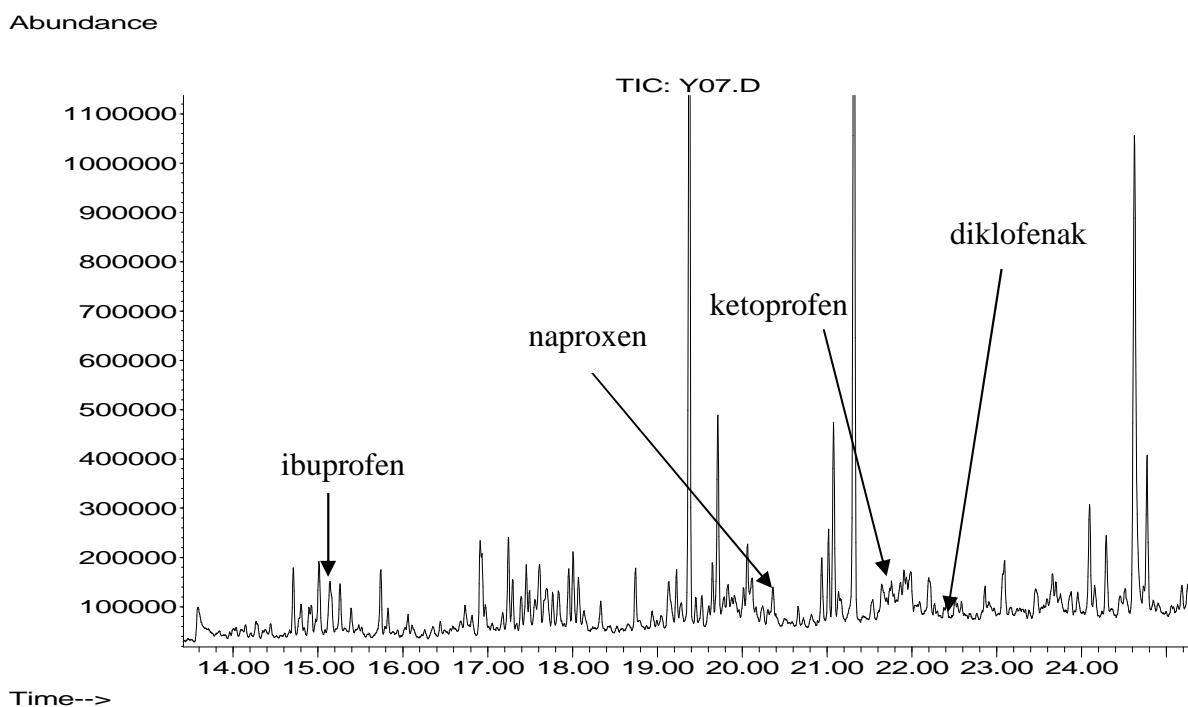
V průběhu vzorkování v roce 2009 totiž vrcholila chřipková epidemie, a proto se dal přepokládat nárůst koncentrací. Tehdejší data také neovlivňovala jarní obleva, kterou jsou zatíženy hodnoty z roku 2010, kdy byly na řece Moravě vyhlášeny 1. stupně povodňové aktivity.

Množství jednotlivých medikamentů ve vodních tocích se odlišuje. Nejvyšší koncentrace jsou zaznamenány u diklofenaku a nejnižší v případě ketoprofenu. Jejich různé zastoupení ve vodním toku je ovlivněno několika faktory, mezi něž patří např. množství účinné látky v medikamentu, spotřeba nebo obtížnost biologické přeměny. Ačkoliv údaje Státního ústavu pro kontrolu léčiv (Tab. 7) ukazují, že spotřeba ibuprofenu je ze všech čtyř zkoumaných subjektů nejvyšší, nalezené hodnoty říkají, že nejvyšší koncentrace byla zaznamenána u diklofenaku. Právě molekula diklofenaku je totiž obtížně rozložitelná látka, která nepříznivě působí na vodní organismy. Naopak koncentrace ketoprofenu jsou bez ohledu na roční období nejnižší ze všech zkoumaných léčiv. Ketoprofen dokonce nebyl na většině odběrových míst v létě vůbec zaregistrován, což je způsobeno i tím, že většina léků s jeho obsahem je vázána na lékařský předpis.

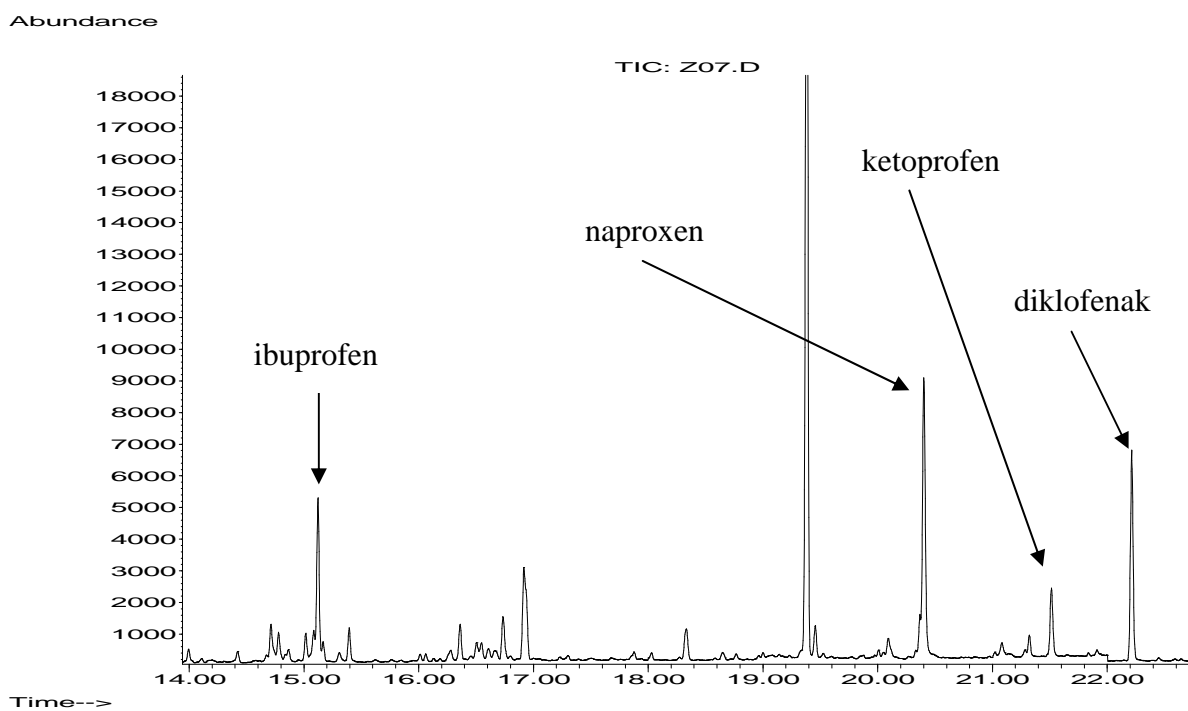
Kromě již zmíněných faktorů mají na koncentraci léčiv vliv i přírodní podmínky, zejména počasí a charakter vodního toku. Zvýšená sluneční aktivita totiž příznivě snižuje koncentrace farmak ve vodním toku, kdy dochází k přirozené fotodegradaci léčiva. Množství jsou ovlivňována i typem vodního toku a počtem jezů. Právě u jezů proniká do vody kyslík nezbytný pro život vodních organismů, ale současně působí i na rezidua léčiv, která jsou oxidována na jednodušší molekuly. Problémem tohoto samočisticího procesu je jeho pomalý průběh.

Farmakologické údaje		Statistické údaje	
účinná látka	DDD [mg]	průměrný počet spotřebovaných DDD na 1000 obyvatel za den [-]	roční spotřeba [t]
ibuprofen	1200	26,10	119,64
naproxen	500	0,53	1,01
ketoprofen	150	0,77	0,44
diklofenak	100	10,48	4,00

Tab. 7 – Spotřeba analyzovaných léčiv v ČR za rok 2009 /zdroj: SÚKL/ (data jsou vztažena na počet obyvatel k 1.1.2009 – 10 467 542 obyv.)



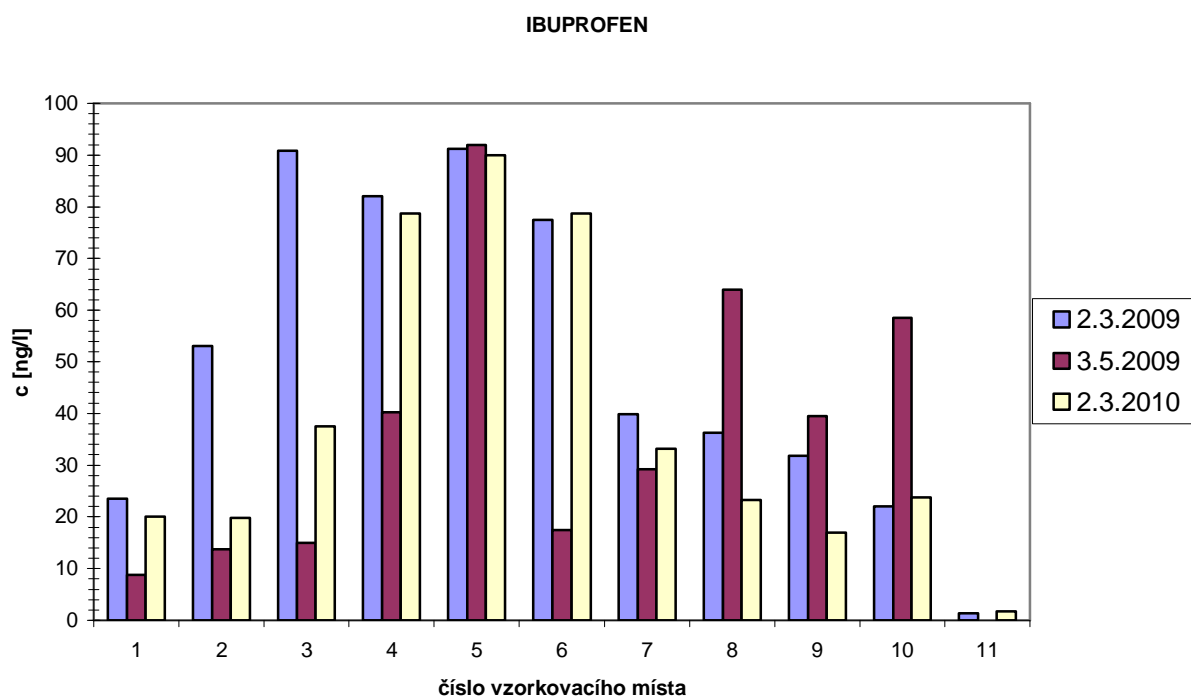
Obr. 16 – Chromatogram odebraného vzorku vody na výsti z areálu ČOV do řeky Dřevnice (vzorek č.5) z 2.3.2009, měřeno v módu TIC



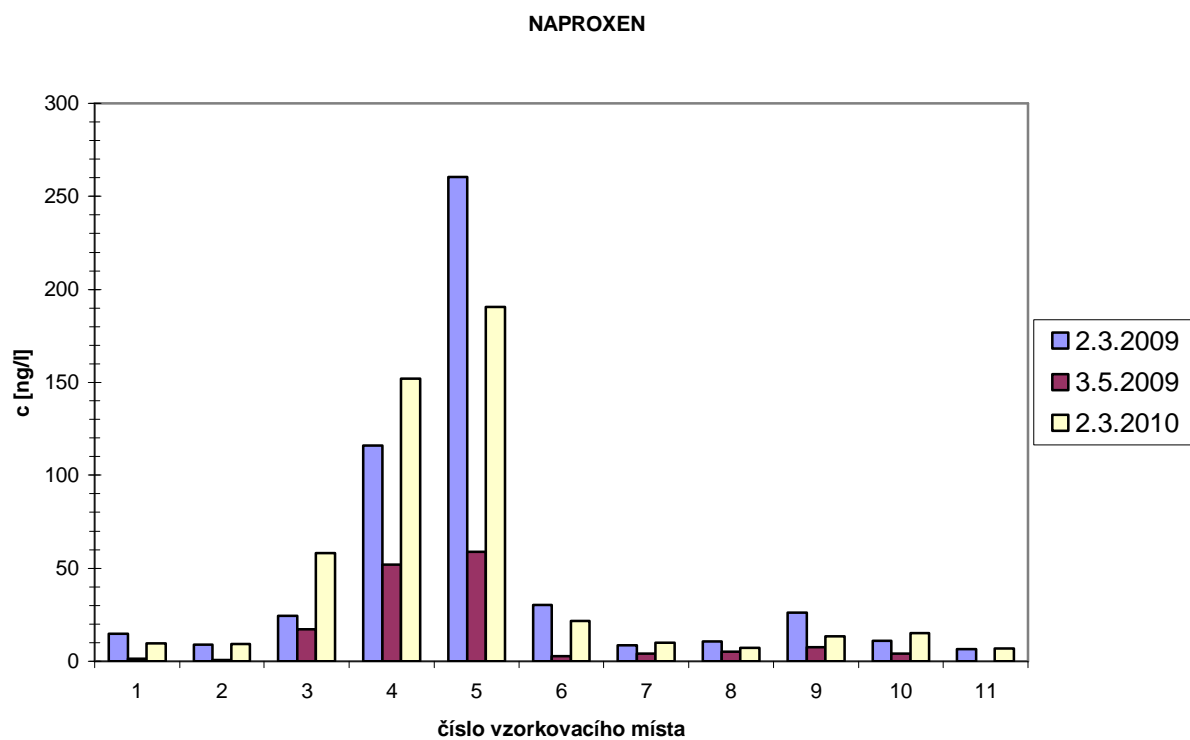
Obr. 17 – Chromatogram odebraného vzorku vody na výsti z areálu ČOV do řeky Dřevnice (vzorek č.5) z 2.3.2009, měřeno v módu SIM

číslo vzorku	místo odběru	řeka	IBUPROFEN			NAPROXEN			KETOPROFEN			DIKLOFENAK		
			2.3.09	3.5.09	2.3.10	2.3.09	3.5.09	2.3.10	2.3.09	3.5.09	2.3.10	2.3.09	3.5.09	2.3.10
1	Napajedla – přístaviště	Morava	23,52	8,83	20,01	14,81	1,32	9,77	7,35	2,96	9,44	108,48	28,70	27,75
2	Otrokovice – lávka	Morava	53,10	13,70	19,79	9,11	0,73	9,23	10,47	<0,50	8,98	113,02	29,47	41,82
3	Otrokovice – Organik	Dřevnice	90,81	15,00	37,46	24,29	17,18	58,28	24,45	<0,50	15,2	124,60	38,82	104,84
4	Zlín-Malenovice (za ČOV)	Dřevnice	82,11	40,21	78,70	115,90	52,12	152,21	102,08	26,08	79,52	406,30	82,74	172,51
5	Zlín-Malenovice (výúst' z ČOV)	–	91,21	91,94	89,99	260,53	58,72	190,53	191,42	57,62	147,06	687,12	105,24	403,12
6	Zlín-Malenovice (před ČOV)	Dřevnice	77,49	17,45	78,74	30,20	2,84	21,75	73,88	<0,50	11,25	70,59	33,94	28,49
7	Zlín-Příluky (U Přístavu)	Dřevnice	39,83	29,18	33,17	8,55	4,23	9,87	10,49	<0,50	7,72	61,84	24,01	30,37
8	Lípa - Pražanka	Dřevnice	36,22	63,94	23,29	10,51	5,10	7,28	27,30	<0,50	5,47	67,96	12,92	30,82
9	Lípa - odbočka	Lutoninka	31,78	39,45	16,98	26,18	7,64	13,38	17,52	<0,50	7,91	62,62	14,17	30,83
10	Lípa - obalovna	Dřevnice	22,01	58,50	23,81	11,14	4,07	15,12	11,34	<0,50	10,06	51,99	33,94	31,17
11	Slušovice – pod přehradou	Dřevnice	1,33	<0,50	1,70	6,58	<0,50	6,90	1,56	<0,50	1,69	17,00	5,94	8,62

Tab. 8 – Tabulka naměřených hodnot

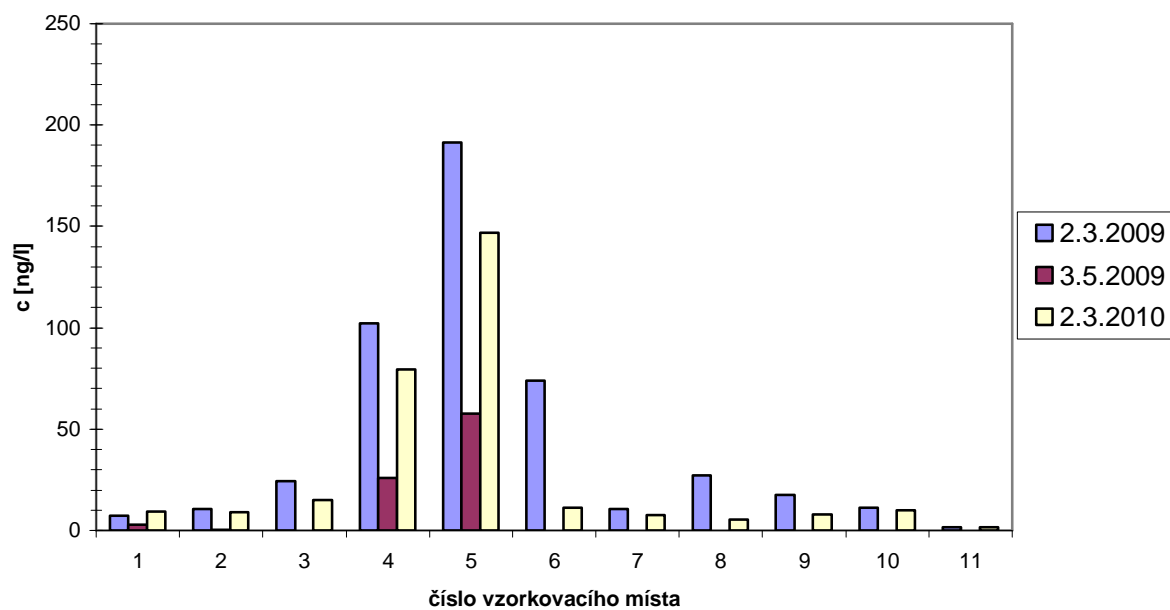


Graf 2 – Množství ibuprofenu na jednotlivých místech toku



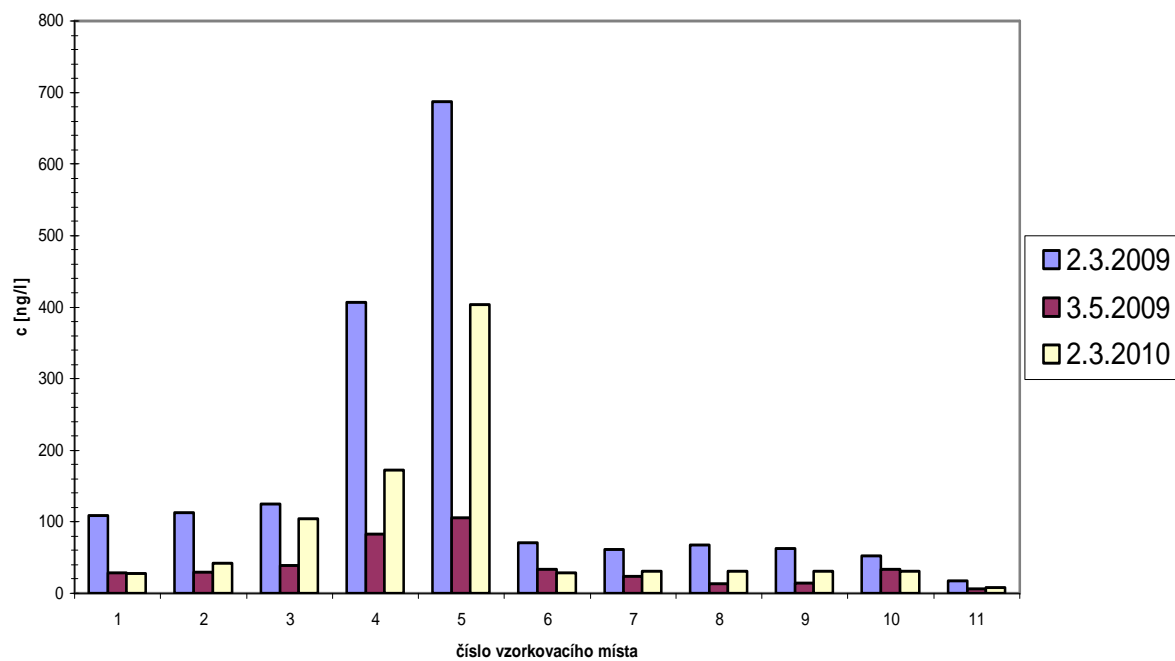
Graf 3 – Množství naproxenu na jednotlivých místech toku

KETOPROFEN



Graf 4 – Množství ketoprofenu na jednotlivých místech toku

DIKLOFENAK



Graf 5 – Množství diklofenaku na jednotlivých místech toku

5 ZÁVĚR

Cílem mé diplomové práce bylo provést kvalitativní a kvantitativní analýzu čtyř protizánětlivých léčiv v povrchové vodě. K tomuto účelu bylo vybráno povodí řeky Dřevnice. Na jednotlivých místech řeky byla pomocí metody GC-MS prokázána přítomnost ibuprofenu, naproxenu, ketoprofenu a diklofenaku. Koncentrace medikamentů se pohybovaly v řádech několika desítek až stovek ng v jednom litru. Bylo rovněž zjištěno, že množství účinných látek v povrchové vodě ovlivňují tři základní faktory, mezi něž patří hlavně místo odběru, průtok vody v řece a roční období.

Znečištění povrchové vody léčivy bylo v drtivé většině způsobené domácnostmi, protože v blízkosti řeky Dřevnice se nenachází žádná farmaceutická továrna, která by se zabývala jakýmkoliv zpracováním zkoumaných léčiv. Určitý podíl na znečištění nesou také nemocniční zařízení, kterých je v okolí hned několik. Hladina analgetik v řece je i přesto relativně nízká (ng/l), a proto zde nevzniká riziko, které by mohlo negativně ovlivňovat lidské zdraví [56]. Otázkou ale zůstává, do jaké míry jsou kontaminovány podzemní vody a studny v blízkém okolí řeky. Není také dostatečně jasné, jak moc je ovlivněn život vodních organismů v řece.

Z výsledků provedeného monitoringu vyplývá, že ke znečištění povrchových vod nedochází pouze v blízkosti velkých měst, nýbrž i v menších městech a větších obcích.

6 LITERATURA

- [1] Ven K., Dongen W., Maes B.U.W., Esmans E.L., Blust R., Coen W.M.: *Chemosphere* **57**, 967–973 (2004).
- [2] Bisceglia K.J., Yu J.T., Coelhan M., Bouwer E.J., Roberts A.L.: *J. Chromatogr. A* **1217**, 558–564 (2010).
- [3] Gros M., Petrović M., Barceló D.: *Talanta* **70**, 678–690 (2006).
- [4] Joss A., Keller E., Alder A.C., Göbel A., McArdell C.S., Ternes T., Siegrist H.: *Water. Res.* **39**, 3139–3152 (2005).
- [5] Vieno N.M., Tuhkanen T., Kronberg L.: *J. Chromatogr. A* **1134**, 101–111 (2006).
- [6] Moldovan Z.: *Chemosphere* **64**, 1808–1817 (2006).
- [7] <http://www.sukl.cz/4-ctvrtleti-a-za-cely-rok-2008> (staženo 8.2.2010)
- [8] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Analgetika> (staženo 8.2.2010)
- [9] <http://en.wikipedia.org/wiki/Ibuprofen> (staženo 8.2.2010)
- [10] <http://www.piskac.cz/ETD/> (staženo 9.2.2010)
- [11] Katzung B.G.: *Základní a klinická farmakologie*. H&H, Jinočany 2006.
- [12] <http://www.ibalgin.cz/Pages/pro-odborniky.aspx> (staženo 8.2.2010)
- [13] Švihovec J.: *Pharmindex – kompendium*. MediMedia Informations, Praha 1995.
- [14] Carvalho P.O., Cass Q.B., Calafatti S.A., Contesini F.J., Bizaco R.: *Braz. J. Chem. Eng.* **23**, 291–300 (2006).
- [15] Oliveira A.R.M., Santana F.J.M., Bonato P.S.: *Anal. Chim. Acta* **538**, 25–34 (2005).
- [16] Sidelmann U.G., Bjørnsdottir I., Shockcor J.P., Hansen S.H., Lindon J.C., Nicholson J.K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 569–579 (2001).
- [17] <http://en.wikipedia.org/wiki/Naproxen> (staženo 10.2.2010)
- [18] Heitmeier S., Blaschke G.: *J. Chromatogr. B* **721**, 109–125 (1999).
- [19] Bort R., Macé K., Boobis A., Lechón M.J.G., Pfeifer A., Castell J.: *Biochem. Pharmacol.* **58**, 787–796 (1999).
- [20] http://www.pace.cz/go/archiv_p0303_2 (staženo 17.2.2010)
- [21] Lin A.Y-C., Yu T-H., Lateef S. K.: *J. Hazard. Mater.* **167**, 1163–1169 (2009).
- [22] Lange H.J., Noordoven W., Murk A.J., Lürling M., Peeters E.T.H.M.: *Aquat. Toxicol.* **78**, 209–216 (2006).

- [23] Pomati F., Netting A.G., Calamari D., Neilan B.A.: *Aquat. Toxicol.* **67**, 387–396 (2004).
- [24] Santos L.H.M.L.M., Araújo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M.: *J. Hazard. Mater.* **175**, 45–95 (2010).
- [25] Webb S., Ternes T., Gibert M., Olejniczak K.: *Toxicol. Lett.* **142**, 157–167 (2003).
- [26] <http://www.novinky.cz/zahranicni/amerika/134979-milionum-americanu-tece-z-kohoutku-voda-se-zbytky-leku.html> (staženo 17.2.2010)
- [27] Heberer T.: *Toxicol. Lett.* **131**, 5–17 (2002).
- [28] Sipma J., Osuna B., Collado N., Monclús H., Ferrero G., Comas J., Rodriguez-Roda I.: *Desalination* **250**, 653–659 (2010).
- [29] Zhang Y., Geißen S.U., Gal C.: *Chemosphere* **73**, 1151–1161 (2008).
- [30] Santos J.L., Aparicio I., Alonso E., Callejón M.: *Anal. Chim. Acta* **550**, 116–122 (2005).
- [31] Betts K.S.: *Environ. Sci. Technol.*, 377–378 (2002).
- [32] Fono L.J., Kolodziej E.P., Sedlak D.L.: *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7257–7262 (2006).
- [33] Kim S.D., Cho J., Kim I.S., Vanderford B.J., Snyder S.A.: *Water Res.* **41**, 1013–1021 (2007).
- [34] http://www.bbraweb.cz/doc/doc_download.cfm?5781&uuid=51CD374B2A5AE6266DFCD2A42DD2C6F4&&IRACER_AUTOLINK&& (staženo 18.2.2010)
- [35] Verenitch S.S., Lowe C.J., Mazumder A.: *J. Chromatogr. A* **1116**, 193–203 (2006).
- [36] Tauxe-Wuersch A., Alencastro L.F., Grandjean D., Tarradellas J.: *Water Res.* **39**, 1761–1772 (2005).
- [37] Klouda P.: *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [38] <http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/item.asp?sectionid=3&mytype=training&number=2&fsid=61> (staženo 20.2.2010)
- [39] Lin W.C., Chen H-C., Ding W-H.: *J. Chromatogr. A* **1065**, 279–285 (2005).
- [40] <http://www.hplc.cz/> (staženo 20.2.2010)
- [41] Farré M., Petrovic M., Gros M., Kosjek T., Martinez E., Heath E., Osvald P., Loos R., Menach K.L., Budzinski H., Alencastro F., Müller J., Knepper T., Fink G., Ternes T.A., Zuccato E., Kormali P., Gans O., Rodil R., Quintana J.B., Pastori F., Gentili A., Barceló D.: *Talanta* **76**, 580–590 (2008).
- [42] Sacher F., Lange F.T., Brauch H-J., Blankenhorn I.: *J. Chromatogr. A* **938**,

- 199–210 (2001).
- [43] Öllers S., Singer H.P., Fässler P., Müller S.R.: *J. Chromatogr. A* **911**, 225–234 (2001).
- [44] Gómez M.J., Agüera A., Mezcua M., Hurtado J., Mocholí F., Fernández-Alba A.R.: *Talanta* **73**, 314–320 (2007).
- [45] Deng A., Himmelsbach M., Zhu Q-Z., Frey S., Sengl M., Buchberger W., Niessner R., Knopp D.: *Environ. Sci. Technol.* **37**, 3422–3429 (2003).
- [46] Fatta D., Nikolaou A., Achilleos A., Meriç S.: *Trends Anal. Chem.* **26**, 515–533 (2007).
- [47] <http://en.wikipedia.org/wiki/GC-MS> (staženo 27.2.2010)
- [48] http://www.kinesis-solutions.co.uk/kinesis_techtips.asp?id=12 (staženo 31.3.2010)
- [49] <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5988-9944EN.pdf>
(staženo 31.3.2010)
- [50] http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry (staženo 27.2.2010)
- [51] http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography-mass_spectrometry
(staženo 27.2.2010)
- [52] Balakrishnan V.K., Terry K.A., Toito J.: *J. Chromatogr. A* **1131**, 1–10 (2006).
- [53] Nebot C., Gibb S.W., Boyd K.G.: *Anal. Chim. Acta* **598**, 87–94 (2007).
- [54] Quintana J.B., Rodil R., Reemtsma T.: *J. Chromatogr. A* **1061**, 19–26 (2004).
- [55] <http://cs.wikipedia.org/wiki/D%C5%99evnice> (staženo 5.3.2010)
- [56] Schwab B.W., Hayes E.P., Fiori J.M., Mastrocco F.J., Roden N.M., Cragin D., Meyerhoff R.D., D'Aco V.J., Anderson P.D.: *Regul. Toxicol. Pharm.* **42**, 296–312 (2005).
- [57] Galmier M-J., Bouchon B., Madelmont J-C., Mercier F., Pilotaz F., Lartigue C.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**, 790–796 (2005).

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

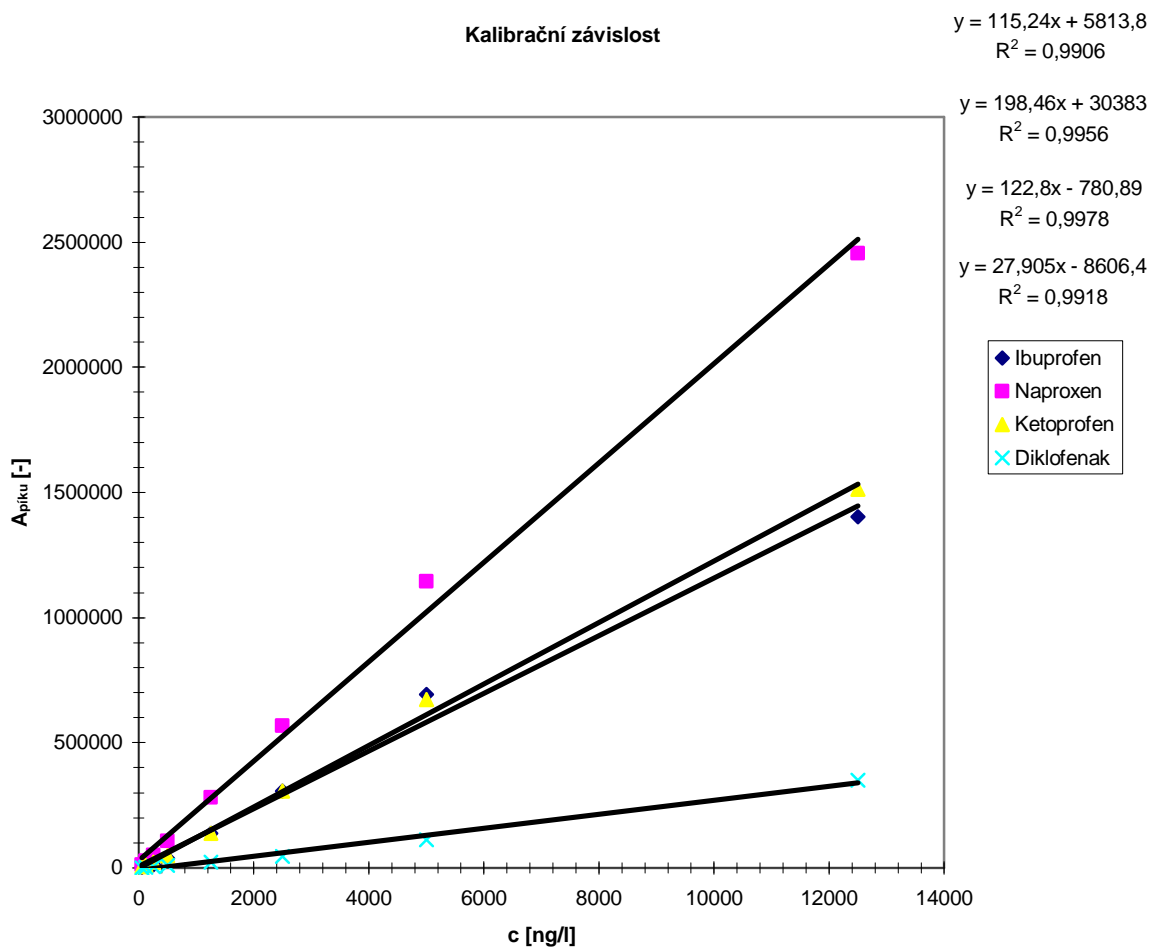
A _{píku}	plocha píku
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
C _{BLANK}	koncentrace léčiva ve slepém pokusu v ng/l
CE	kapilární elektroforéza
CI	chemická ionizace
CYP1A2	druh cytochromu
CYP2C8	druh cytochromu
CYP2C9	druh cytochromu
CYP3A4	druh cytochromu
ČHMÚ	Český hydrometeorologický ústav
ČOV	čistírna odpadních vod
DAD	detektor s diodovým polem
DDD	doporučená denní dávka
EI	ionizace elektronem
ESI	ionizace elektrosprejem
FLD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
H	výška vodní hladiny v cm
HP	Hewlett-Packard
HP 5	typ stacionární fáze v GC – jedná se o poly(5%-difenyl-95%-dimethylsiloxan)
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV/VIS	vysoce účinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí
LC	kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
MALDI	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice
MRM	monitorování reakce více iontů (z angl. „ <i>Multiple Reaction Monitoring</i> “)
MS	hmotnostní spektrometrie

MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -trimethylsilyltrifluoracetamid
MTBSTFA	<i>N</i> - <i>terc</i> -butyldimethylsilyl- <i>N</i> -methyltrifluoracetamid
NCI	negativní chemická ionizace
NMR	nukleární magnetická rezonance
PCI	pozitivní chemická ionizace
PE	polyethylen
PE-HD	vysokohustotní polyethylen
PET	polyethylenetereftalát
PTFE	polytetrafluorethylen (teflon)
Q	průtok vody v m ³ za sekundu
Q1	kvadrupól č. 1 (1. hmotnostní analyzátor)
q2	kvadrupól č. 2 (kolizní cela)
Q3	kvadrupól č. 3 (2. hmotnostní analyzátor)
QqQ	tandemový hmotnostní spektrometr tvořený třemi kvadrupóly (=trojitý kvadrupól)
QqTOF	tandemový hmotnostní spektrometr, kde koncovým analyzátozem je analyzátor doby letu
QqTrap	tandemový hmotnostní spektrometr, kde koncovým analyzátozem je iontová past
SIM	selektivní monitorování iontu (z angl. „ <i>Selective Ion Monitoring</i> “)
SPE	extrakce pevnou fází
SRM	monitorování reakce jednoho iontu (z angl. „ <i>Single Reaction Monitoring</i> “)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TIC	celkový iontový proud (z angl. „ <i>Total Ion Current</i> “)
TOF	průletový analyzátor
t _R	retenční čas v min.
T _{vzd.}	teplota vzduchu v °C
USA	Spojené státy americké

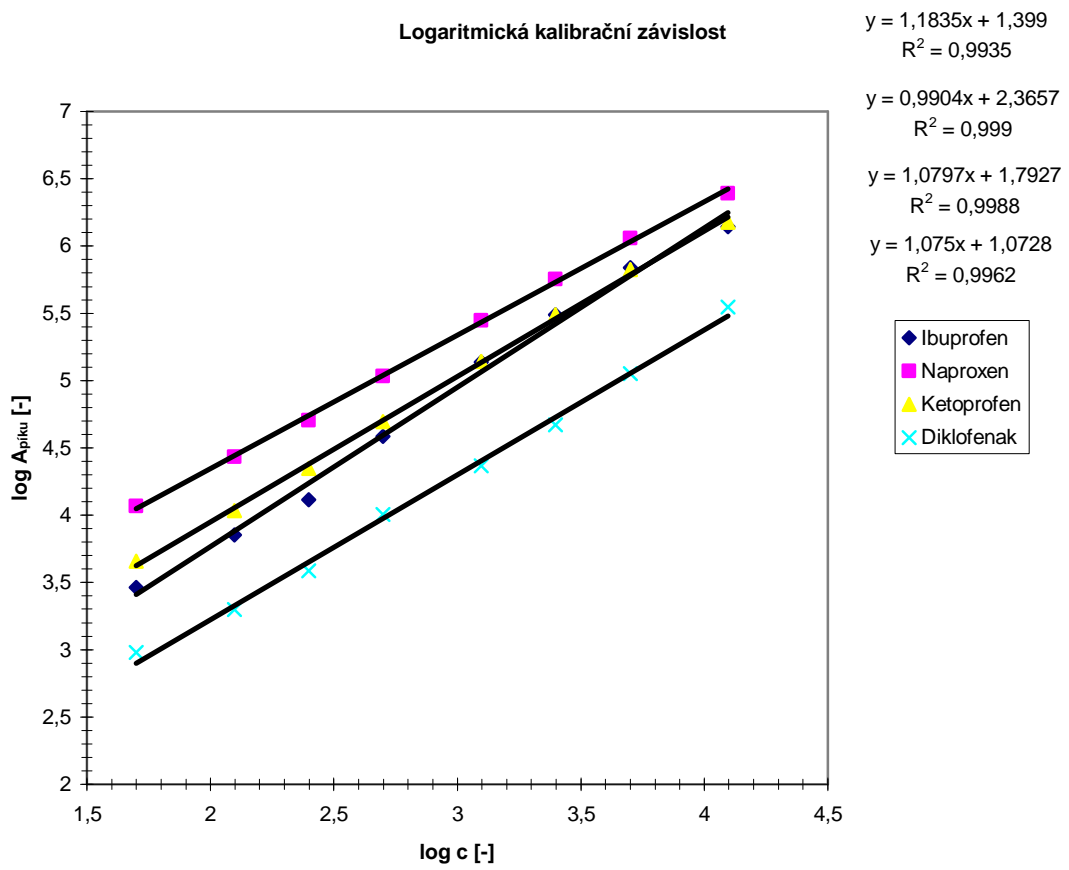
8 PŘÍLOHY

Příloha č. 1 – Kalibrační závislosti

c [ng/l]	log c [-]	ibuprofen		naproxen		ketoprofen		diklofenak	
		A _{píku} [-]	log A _{píku} [-]	A _{píku} [-]	log A _{píku} [-]	A _{píku} [-]	log A _{píku} [-]	A _{píku} [-]	log A _{píku} [-]
50	1,6990	2908	3,4636	11702	4,0683	4564	3,6593	954	2,9795
125	2,0969	7117	3,8523	27183	4,4343	10875	4,0364	1980	3,2967
250	2,3979	12999	4,1139	50543	4,7037	22182	4,3460	3885	3,5894
500	2,6990	38585	4,5864	107757	5,0324	49646	4,6959	10171	4,0074
1250	3,0969	137231	5,1375	279867	5,4470	139114	5,1434	23182	4,3652
2500	3,3979	307782	5,4882	566191	5,7530	306354	5,4862	46934	4,6715
5000	3,6990	693603	5,8411	1144482	6,0586	671105	5,8268	112525	5,0512
12500	4,0969	1401819	6,1467	2456220	6,3903	1513095	6,1799	350309	5,5445



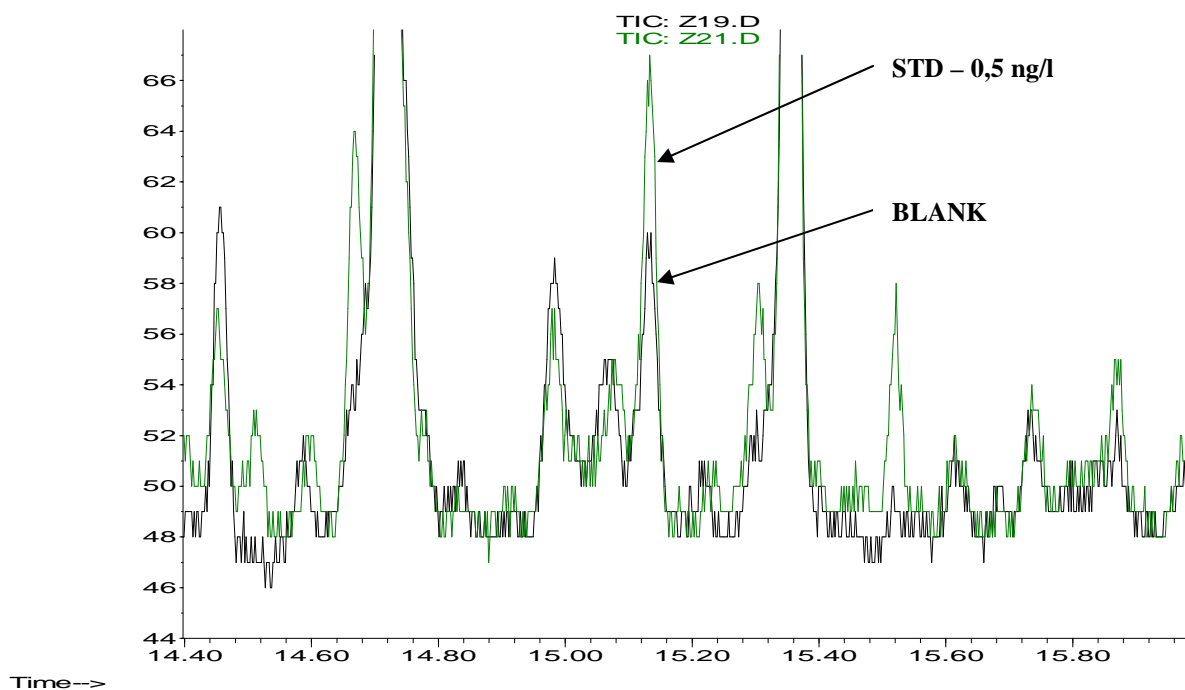
Logaritmická kalibrační závislost



Příloha č. 2 – Detaily chromatogramů vzorku pitné vody a standardu s přidavkem 0,5 ng/l

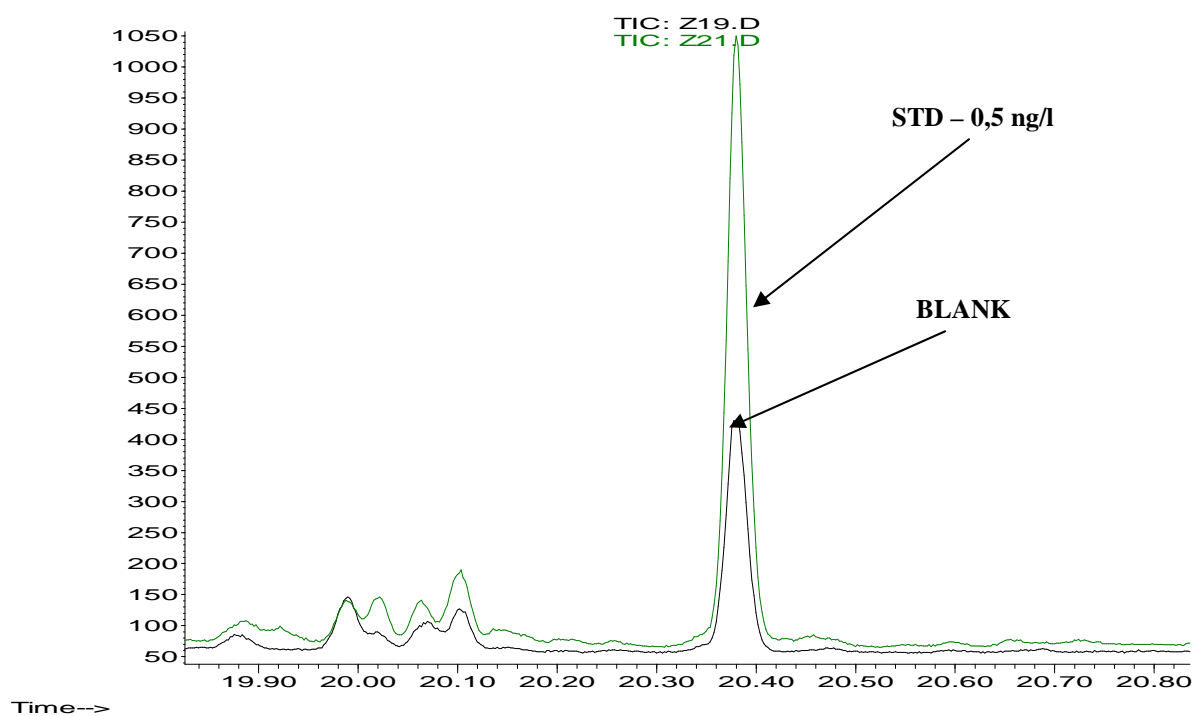
IBUPROFEN

Abundance



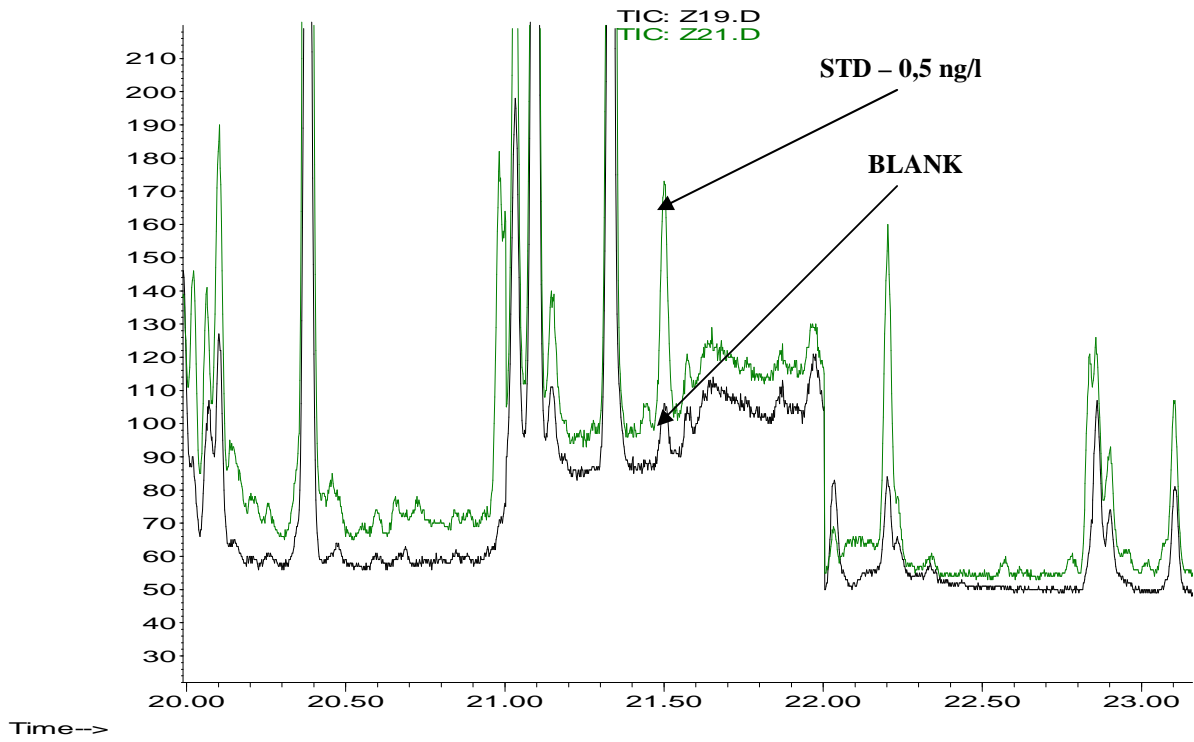
NAPROXEN

Abundance



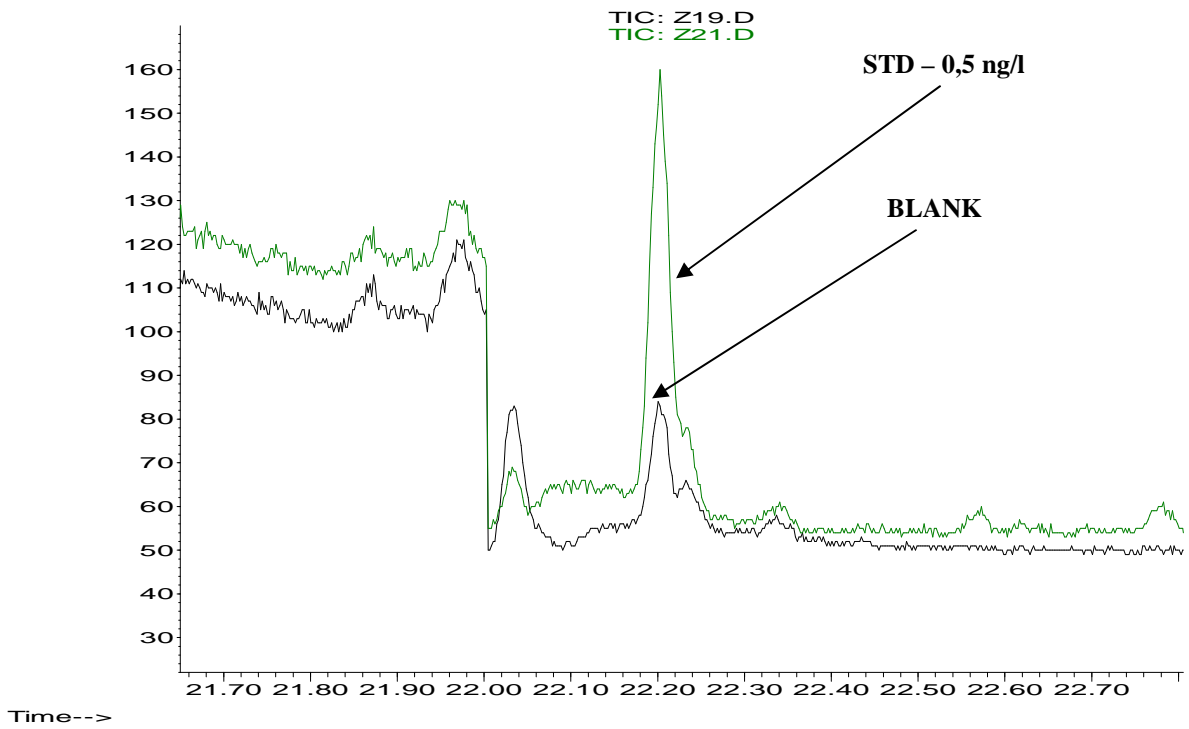
KETOPROFEN

Abundance



DIKLOFENAK

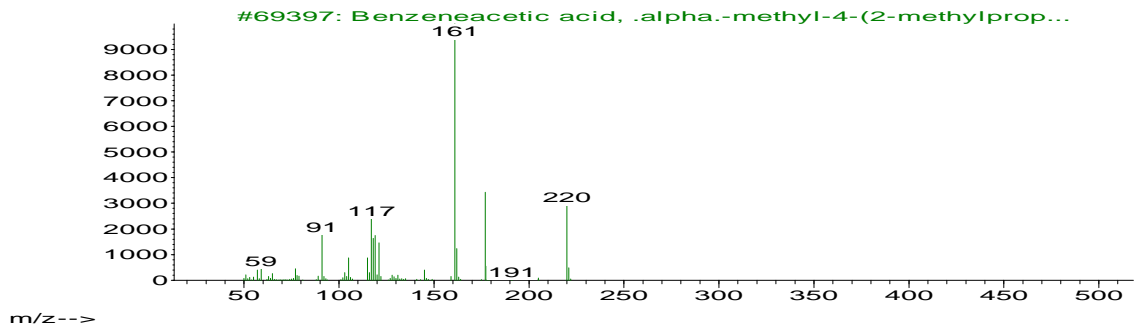
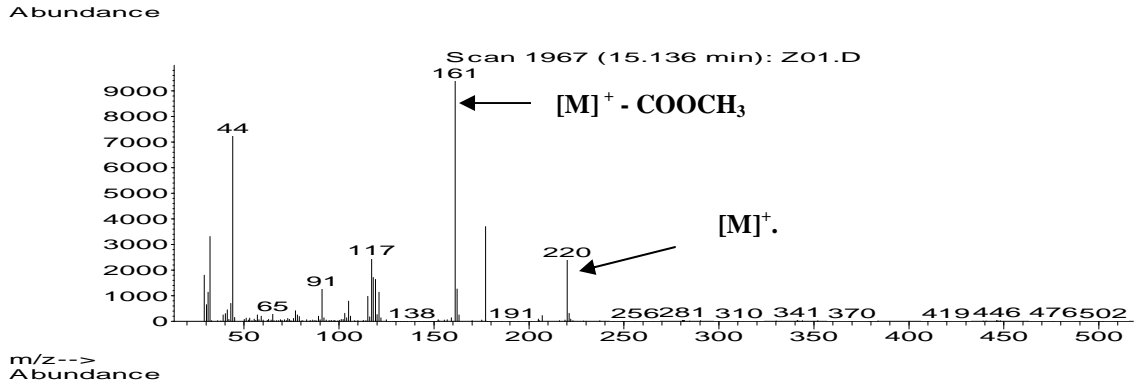
Abundance



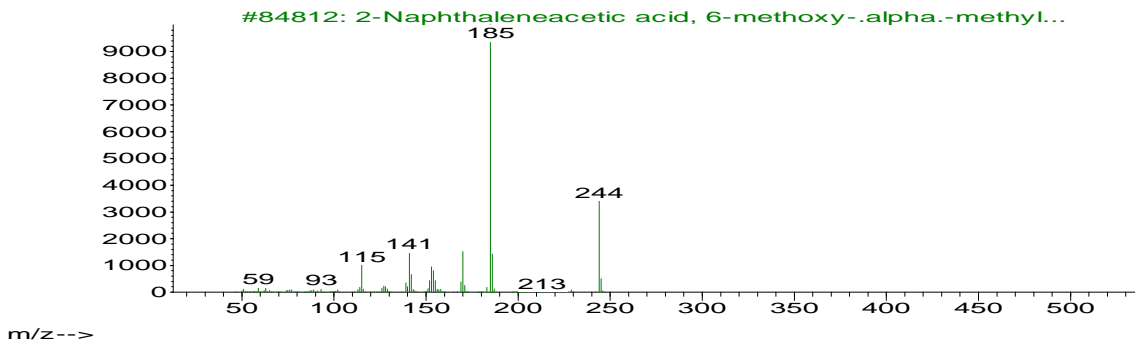
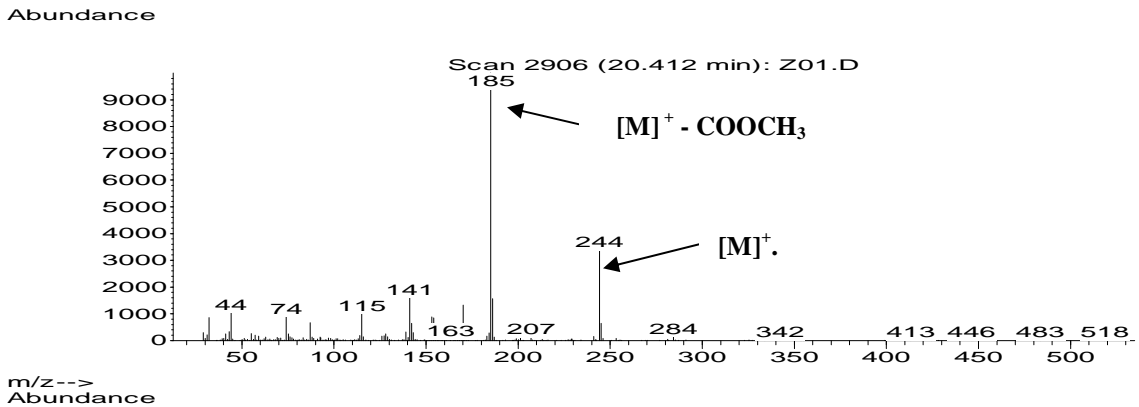
Příloha č. 3 – Porovnání naměřených hmotnostních spekter s databází knihovny spekter

naměřené spektrum (výše), originální spektrum (níže)

IBUPROFEN

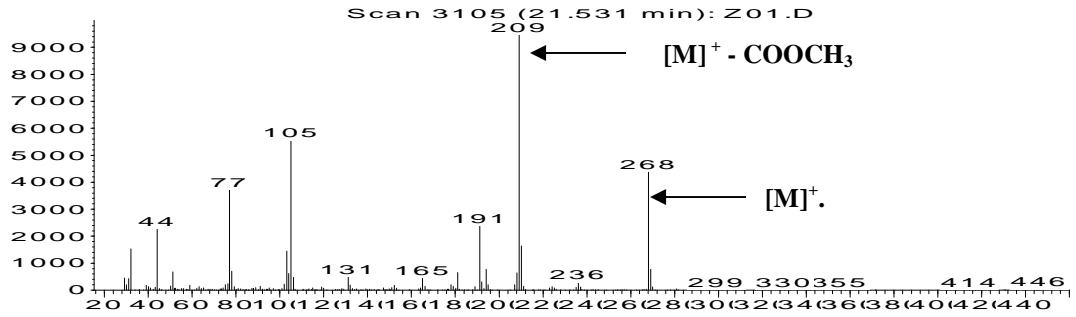


NAPROXEN

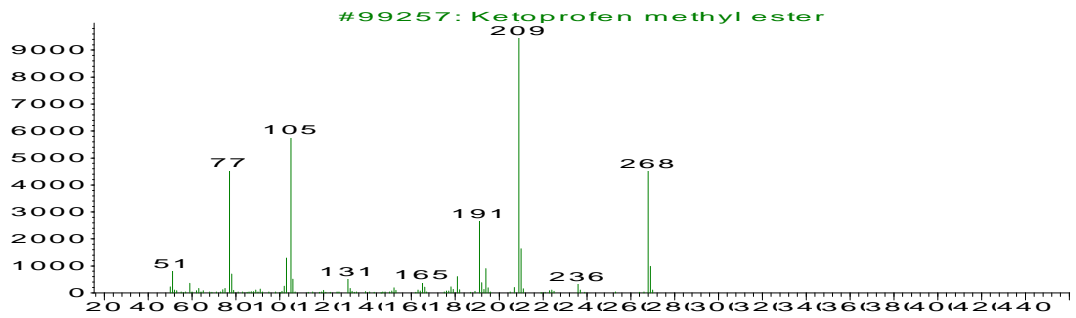


KETOPROFEN

Abundance

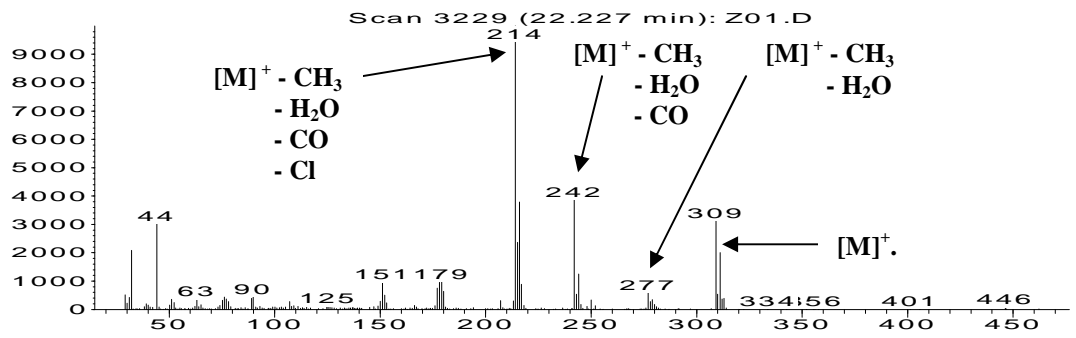


Abundance

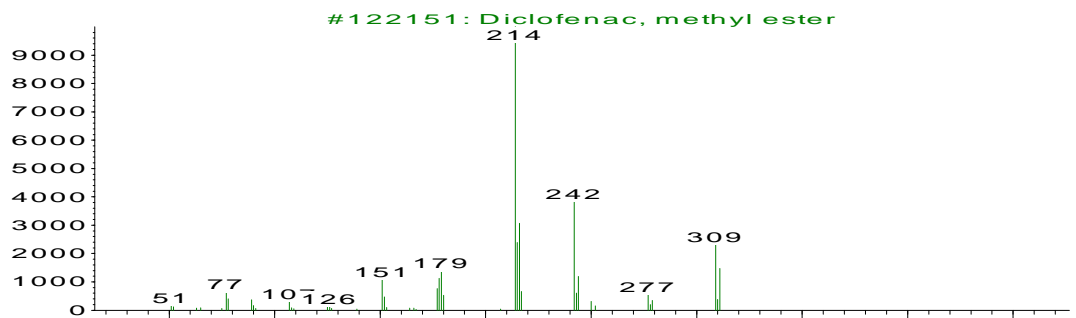


DIKLOFENAK [57]

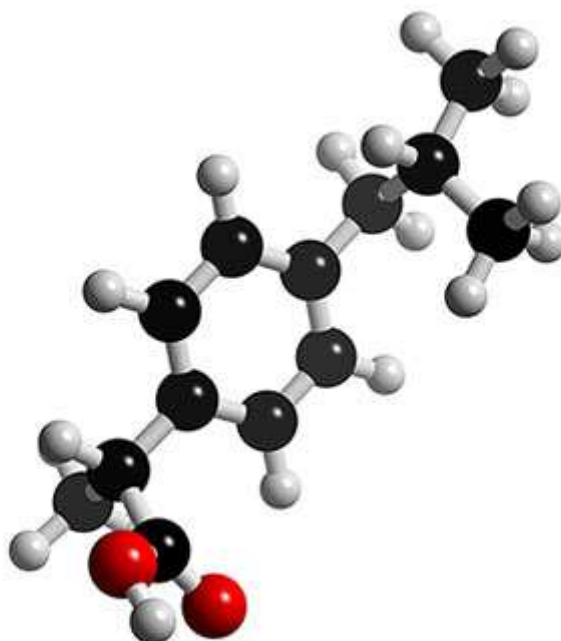
Abundance



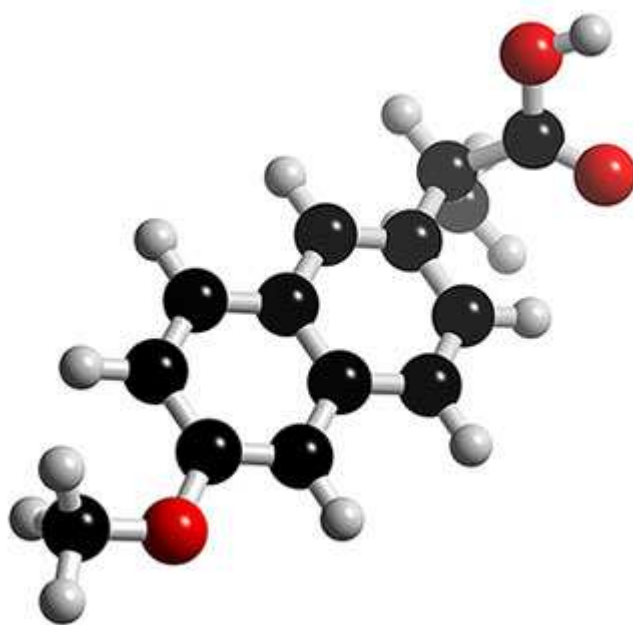
Abundance



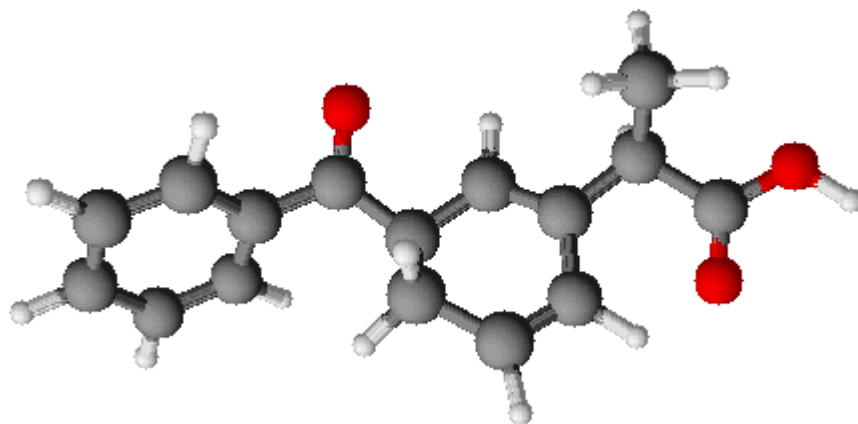
Příloha č. 4 – Prostorový model ibuprofenu a léčivo Ibalgin 400



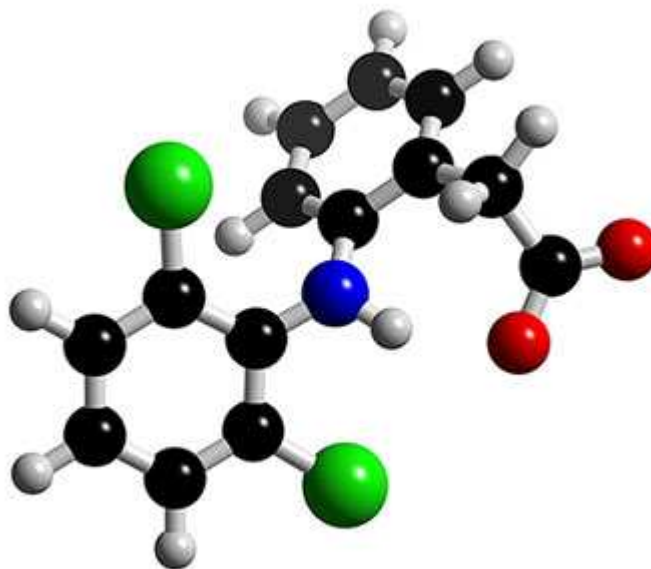
Příloha č. 5 – Prostorový model naproxenu a léčivo Nalgesin S



Příloha č. 6 – Prostorový model ketoprofenu a léčivo Ketonal



Příloha č. 7 – Prostorový model diklofenaku a léčivo Diclofenac AL



Příloha č. 8 – Vzorkovací místa
řeka Dřevnice (nahore), výúst' z ČOV (dole)



Příloha č. 9 – Publikovaný článek

ACTA UNIVERSITATIS PALACKIANAE OLOMUCENSIS

FACULTAS RERUM NATURALIUM (2008)

CHEMICA 48

Do you know where pharmaceuticals flow?

Lukáš Rozsypal, Marcela Korhoňová, Lukáš Müller, Vítězslav Maier, Juraj Ševčík,
Lubomír Čáp, Petr Bednář, Petr Barták*

*Department of analytical chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Tr. Svobody 8,
771 46 Olomouc, Czech Republic*

E-mail: petr.bartak@seznam.cz

Abstract

Ibuprofen was detected in surface water of two rivers in the Central and South Moravia using simple liquid - liquid extraction, derivatization with diazomethane and determination by gas chromatography - mass spectrometry. The fast and simple method reliably evidences ibuprofen at concentration level below 1 ng/l. Concentrations determined by standard addition method in samples of river water ranged within 8.2 - 83.8 ng/l.

Keywords: pharmaceuticals, environmental analysis, GC/MS, non-steroidal anti-inflammatory drugs, ibuprofen, derivatization, diazomethane

1. Introduction

With a growing population and an increased demand for medicine, the amount of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) used in everyday life has been steadily increasing. Probably since 1977 mankind has seriously perceived that huge amount of various compounds used as pharmaceutical as well as their metabolites, degradation products, adjuvant, fillings and other substances related to usage of pharmaceuticals enter the environment [1]. Actually, about 3000 different compounds have been reported as substantial ingredients of pharmaceuticals formulations [2,3]. However, only a small portion (~ 150) of these compounds has been investigated in environmental samples [2].

Although the concentrations of PPCPs in environment are usually fairly low (let's say from ppb to ppt level), we currently do not know very much about possible impacts of long-term exposure to these compounds on people and other biotic entities. The main areas of interest focus on PPCPs role in endocrine disruption and antibiotic resistance. Many of these drugs have similar biological mechanisms, so while individually the levels are low, when grouped by modes of action, the biological effects may be significant. Although these drugs are approved for human use, they are not necessarily safe for all humans and effects on sensitive populations, such as children and pregnant women, should be accentuated and studied intensely.

Medical substances are usually developed with an idea of the desirable biological effect and, consequently, desirable physico-chemical properties (e.g. medicals are usually

*Corresponding author

lipophilic in order to pass through the membranes, they are often persistent in order to retain therapeutic effect and so on) [4]. Hence, unmetabolized pharmaceuticals often belong to the group of non-biodegradable substances with strong tendency to bioaccumulate in organisms [5] which are often released to the environment at the same order of magnitude as many others notorious xenobiotics [4].

For the reason, great effort has been spent on determination of different pharmaceuticals in the environment recently [2,6-11]. Naturally, highly sophisticated methods, promising excellent sensitivity, are used for the purpose. Among them liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry leads the dance [12-30]. A kind of renaissance and comeback of the gas chromatography with simple quadrupole mass spectrometry into the field of the analysis of pharmaceuticals in environment is proposed in this communication [30-33]. The simple procedure based on simple liquid - liquid extraction, derivatization and GC-MS determination was adapted for the determination of ibuprofen in surface water [34-36].

Ibuprofen (2-(4-isobutylphenyl)propionic acid) belongs to the group of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), class of pain relievers that act by inhibition of cyclooxygenase enzymes responsible for the synthesis of prostaglandins from arachidonic acid [37,38]. Even though that only part of unmetabolized pharmaceutical is released into the environment, the monitoring of its analytical level in environment is of high importance in virtue of its high therapeutic dose (600 - 1200 mg per day) and frequent therapeutic use.

2. Experimental

Dichloromethane, diethylether, acetone and methanol were purchased from Penta (Chrudim, Czech Republic), hydrochloric acid, sulphuric acid, sodium hydroxide, anhydrous sodium sulfate and sodium nitrite were obtained from Lach-Ner (Neratovice, Czech Republic), *N*-methylurea was from Fluka (Buchs, Switzerland). All chemicals were of analytical grade. Sodium sulfate was dried for 2 hours at 140°C before use. Ibuprofen was recovered from commercial preparation Ibuprofen AL 400 (Aliud Pharma, Laichingen, Germany) and recrystallized from methanol (m.p. 73-75°C).

Diazomethane was prepared by alkaline decomposition of *N*-nitroso-*N*-methylurea [39,40]. *N*-methylurea (11.1 g) and sodium nitrite (10.8 g) were dissolved in 100 ml of water. Then 40 ml of 1.7 mol.l⁻¹ sulphuric acid was added while mixing and cooling in ice water. After 2 hours *N*-nitroso-*N*-methylurea was filtrated, dissolved in 50 ml of diethylether, placed in ice water bath and decomposed by dropwise addition of 70% KOH (20 ml). After 30 min the ethereal solution of diazomethane was decanted and stored in freezer at -20 °C for one month without loss of methylation activity.

Surface water was sampled from the river Dřevnice near the sewage treatment plant in Zlín - Malenovice and from the Morava river in the center of Olomouc on the March 18th and December 9th 2008. Samples were immediately transferred into the laboratory and processed as follows. Potable water was sampled from the water supply network in the rest room adjoining to laboratory on the same days and the samples were processed together with surface water in the same way.

Samples were degassed in ultrasonic bath for 4 min and aliquots (500 ml) were transferred into the separating funnels. Samples were acidified [41,42] to pH 2 with concentrated hydrochloric acid (approx. 0.5 ml) and spiked with standard addition where appropriate. Samples were extracted with 20 ml of dichloromethane [43-45] for 5 minutes,

extracts were removed and samples were extracted again with 10 ml of fresh dichloromethane. Centrifugation (3000 g for 5 minutes) was applied for better separation of layers in case of need. Combined extracts were dried over the sodium sulfate and gradually transferred into glass vial and evaporated at 40°C under gentle stream of nitrogen to the dryness. Ibuprofen was methylated with 0.35 ml of ethereal solution of diazomethane at ambient temperature for 30 minutes. Excessive solution was evaporated under gentle stream of nitrogen to the dryness, the residue was dissolved in 0.5 ml of methanol, placed in ultrasonic bath for 2 minutes and analyzed by GC-MS.

All analyses were performed on Agilent 6890 gas chromatograph equipped with Agilent 5973N mass selective detector and autosampler HP 7683 (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Analytes were separated on nonpolar capillary column ZB-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) with temperature program 50°C - 2 min - 10°C/min - 300°C - 5 min. Helium (5.0, Siad, Bergamo, Italy) at a flow rate 0.9 ml/min was used as a carrier gas. Injection port was maintained at 280°C, 1 µl of the sample was injected using pulsed (140 kPa, 0.4 min) splitless injection mode. Electron impact ionization (70 eV) was used; mass spectra were collected within the mass range 29 - 520 m/z. Selective ion 161 m/z was used for quantification in the single ion monitoring mode.

3. Results and discussion

Ibuprofen, contained in the sample of surface water, was extracted with small amount of dichloromethane. The recovery of the single extraction of real sample at concentration level 10 ng/l was roughly estimated by so called "multiple extraction" technique at 60-70 % (exact value depends on the sample composition to a certain extent). Regarding pronounced matrix effect, the standard addition method was selected as the most proper quantification technique which gives accurate and precise results even if the efficiency of the extraction process is far from the optimal and quantitative course.

By virtue of the strong influence of the sample matrix on peak area and peak shape, the determination of the detection limit becomes rather difficult in the same way. On this account, the sample of drinking water from local water supply network and the same sample with addition of ibuprofen on the concentration level 1 ng/l were used for approximative estimation of the detection (perhaps even quantitation) limit. Figure 1 clearly evidences sufficiently provable influence of the standard addition on the peak area. Hence, the value 1 ng/l was accepted as a reliably detectable concentration of ibuprofen in slightly contaminated aqueous samples. The peak area detected in the blank sample corresponds to the concentration 0.49 ng/l. The value was interpreted as a residual concentration of ibuprofen coming through the environment and water works into the potable water.

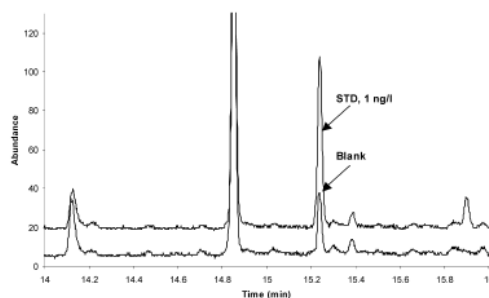


Fig. 1: Detail of the SIM chromatogram (161 m/z) obtained from the analysis of the potable water (Blank) and the same sample with standard addition of 1 ng/l of ibuprofen (STD, 1 ng/l).

The retention time of ibuprofen methyl ester under given conditions is about 15.2 min. Mass spectrum of ibuprofen methyl ester obtained from analysis of the standard (data not shown) as well as spectra from the real sample (target concentration 84 ng/l) and database NIST 2002 (Fig. 2) consistently depict the dominant ion 161 m/z, corresponding to the neutral loss of 59 m/z from molecular ion (220 m/z). The loss was attributed to the elimination of the group COOCH₃. Hence, the ion 161 m/z was selected for sensitive quantification in Single Ion Monitoring (SIM) mode. The ion 177 m/z corresponds probably to the cleavage of the group C₃H₇ (43 m/z) from "isobutyl" end of ibuprofen. The ion 177 m/z as well as molecular ion 220 m/z could be suggested as qualifiers for correct quantification

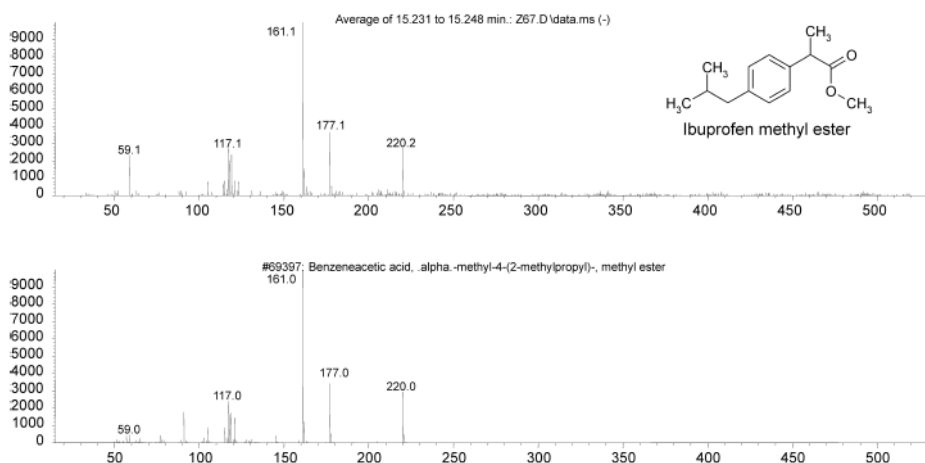


Fig. 2: Mass spectrum of methyl ester of ibuprofen isolated from the Dřevnice river (upper) and referential spectrum from the NIST 2002 library (lower).

The method was applied for determination of the ibuprofen in two different locations: (i) Morava river in the center of Olomouc and (ii) Dřevnice river near the municipal sewage treatment plant in Zlín - Malenovice (Fig. 3). The sewage treatment plant was assumed as a point of entry of the ibuprofen into the environment [3]. The samples were collected under the sewage treatment plant, where the effluent mixes with the flow of the Dřevnice river.

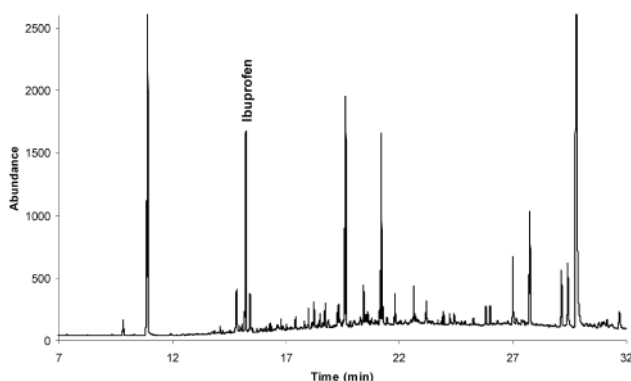


Fig. 3: SIM chromatogram (161 m/z) obtained from the analysis of the real sample from river Dřevnice (18th March 2008).

Table I summarizes the results obtained in the March and December 2008. Higher concentrations of ibuprofen were observed in Dřevnice river. Concentration higher about order of magnitude was found in Dřevnice river (83.8 ng/l in comparison to 8.2 ng/l in Morava river) in March. The fact was ascribed to supposed higher consumption of the drug in the end of "influenzal stage" in March in combination with sampling place under the sewage treatment plant. The value obtained in the same place in the beginning of December was significantly lower (13.6 ng/l). The concentration determined in the Morava river in the center of Olomouc are not loaded with effluent from the sewage treatment plant. Both values are in the same order of magnitude (8.2 ng/l in March and 11.4 ng/l in December).

Table I: Ibuprofen concentrations (ng/l) determined in samples under investigation.

Date	Morava river Olomouc	Dřevnice river Zlín – Malenovice
18 th March 2008	8.2	83.8
9 th December 2008	11.4	13.6

Proposed method is fast and simple. The results evidence sufficient sensitivity and selectivity of the method based on single quadrupole mass spectrometer for analysis of surface water. Largely, the accuracy and robustness of the proposed method consist in utilization of standard addition method. For this reason, the method is suitable for fast analysis of limited number of samples rather than large series of the routine samples.

Since the extraction procedure exhibit good selectivity for acidic compounds and diazomethane react readily with carboxylic group, the method could be probably easily adopted for the determination of other acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs like ketoprofen, naproxen, diclofenac and others. Further work in this field is still in progress.

4. Conclusion

The fast and simple method based on liquid – liquid extraction, derivatization and GC-MS determination was developed for determination of ibuprofen in surface water. The method enables detection of ibuprofen in common samples of surface waters. Concentrations determined in samples of river water from rivers Morava and Dřevnice ranged within 8.2 - 83.8 ng/l. The method is easily adaptable for determination of other acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs.

Acknowledgement

Although the expenses associated with development and operation of the proposed method are not very high in comparison to other common protocols used for the same purposes, the financial support of the grants No MSM 6198959216 and MSM 2E08021 is gratefully acknowledged. Moreover, the immaterial support arising particularly from the second project aimed at untraditional methods of cooperation should be strongly highlighted herein.

5. References

- [1] C. Hignite, D.L. Azarnoff, *Life Sci.* 20 (1977) 337.
- [2] S. D. Richardson, *Anal. Chem.* 80 (2008) 4373.
- [3] O. A. H. Jones, N. Voulvoulis, J. N. Lester, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 35 (2005) 401.
- [4] B. Halling-Sørensen, S. Nors Nielsen, P. F. Lansky, F. Ingerslev, H. C. Holten Lützhøft, S. E. Jørgensen, *Chemosphere* 36 (1998) 357.
- [5] F. Stuer-Lauridsen, M. Birkved, L. P. Hansen, H. C. Holten Lützhøft, B. Halling-Sørensen, *Chemosphere* 40 (2000) 783.
- [6] S. D. Richardson, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3807.
- [7] S. D. Richardson, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4021.
- [8] M. Farré, M. Petrovic, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1203.
- [9] W. W. Buchberger, *Anal. Chim. Acta* 593 (2007) 129.
- [10] C. Coetsier, L. Lin, B. Roig, E. Touraud, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1163.
- [11] V. J. Drover, Ch. S. Bottaro, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3740.
- [12] E. Zuccato, D. Calamari, M. Natangelo, R. Fanelli, *Lancet* 355 (2000) 1789.
- [13] S. C. Kim, K. Carlson, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 635.
- [14] D. Löffler, J. Römbke, M. Meller, T. A. Ternes, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5209.
- [15] O. J. Pozo, C. Guerrero, J. V. Sancho, M. Ibanez, E. Pitarch, E. Hogendoorn, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 83.
- [16] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 941.
- [17] D. Hummel, D. Löffler, G. Fink, T. A. Ternes, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7321.
- [18] S. Castiglioni, E. Zuccato, E. Crisci, C. Chiabrando, R. Fanelli, R. Bagnati, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8421.
- [19] M. D. Hernando, A. Agüera, A. R. Fernández-Alba, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1269.
- [20] N. M. Vieno, H. Härkönen, T. Tuhkanen, L. Kronberg, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 5077.
- [21] B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 132.
- [22] D. Stülten, S. Zühlke, M. Lamshöft, M. Spiteller, *Sci. Total Environ.* 405 (2008) 310.
- [23] A. Piram, A. Salvador, C. Verne, B. Herbreteau, R. Faure, *Chemosphere* 73 (2008) 1265.
- [24] C. Lacey, G. McMahon, J. Bones, L. Barron, A. Morrissey, J. M. Tobin, *Talanta* 75 (2008) 1089.
- [25] A. Piram, A. Salvador, J. Y. Gaudvrit, P. Lanteri, R. Faure, *Talanta* 74 (2008) 1463.
- [26] S. Pérez, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 836.
- [27] E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, C. Chiabrando, P. Grassi, R. Fanelli, *Water Res.* 42 (2008) 961.
- [28] J. C. Van De Steene, W. E. Lambert, *J. Chromatogr. A* 1182 (2008) 153.
- [29] J. M. Conley, S. J. Symes, S. A. Kindelberger, S. M. Richards, *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 206.
- [30] D. Barceló, M. Petrović, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1141.
- [31] M. Peschka, J. P. Eubeler, T. P. Knepper, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7200.
- [32] P. Cuderman, E. Heath, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1343.
- [33] A. Togola, H. Budzinski, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 150.
- [34] C. Tixier, H. P. Singer, S. Oellers, S. R. Müller, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 1061.
- [35] A. Gentili, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1185.

- [36] L. Araujo, J. Wild, N. Villa, N. Camargo, D. Cubillan, A. Prieto, *Talanta* 75 (2008) 111.
- [37] J. R. Vane, R. M. Botting, *Inflamm. Res.* 47 (1998) S78.
- [38] S. K. Khetan, T. J. Collins, *Chem. Rev.* 107 (2007) 2319.
- [39] Arndt F.: *Org. Synth., Coll. Vol. II* (1943) 165.
- [40] Arndt F.: *Org. Synth., Coll. Vol. II*, (1943) 461.
- [41] N. T. Hansen, I. Kouskoumvekaki, F. S. Jørgensen, S. Brunak, S. Ó. Jónsdóttir, *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2006) 2601.
- [42] M. Kah, C. D. Brown, *Chemosphere* 72 (2008) 1401.
- [43] F. Péhourcq, F. Lagrange, L. Labat, B. Bannwarth, *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995) 3969.
- [44] H. R. Buser, T. Poiger, M. D. Müller, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2529.
- [45] Z. Sun, W. Schüssler, M. Sengl, R. Niessner, D. Knopp, *Anal. Chim. Acta.* 620 (2008) 73.