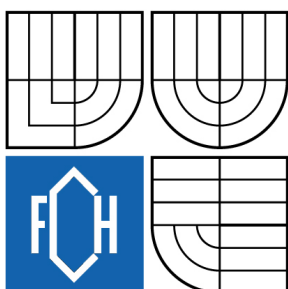




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

PROBLEMATIKA STANOVENÍ ANALGETIK VE VODÁCH

QUESTION OF DETERMINATION OF ANALGETICS IN WATERS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

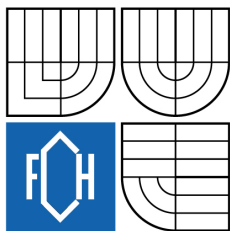
MARKÉTA BENEŠOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2009



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0280/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Markéta Benešová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)
Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**
Konzultanti bakalářské práce: Ing. Lucie Vydrová

Název bakalářské práce:

Problematika stanovení analgetik ve vodách

Zadání bakalářské práce:

- zpracovat rešerši na dané téma
- vypracovat metodický postup pro stanovení vybraných analgetik v modelových vzorcích vod
- optimalizovanou metodu použít pro stanovení analytů v reálných vzorcích

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Markéta Benešová
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na optimalizaci metody pro stanovení analgetik ve vodách. Cílem práce bylo vypracovat metodický postup pro stanovení vybraných léčiv, tj. kyseliny salicylové a naproxenu v modelových vzorcích vod. Pro izolaci analytů byla použita extrakce pevnou fází (SPE) a pro jejich identifikaci metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodovým polem (HPLC - DAD).

Na základě několika ověřených postupů byla vybrána optimální metoda použitelná pro stanovení vybraných analytů ve vzorcích vod.

ABSTRACT

The bachelor thesis is focused on the optimization of the method for the determination of analgetics in waters. The aim of this work is to work up the methodical procedure for determination of chosen pharmaceuticals i.e. salicylic acid and naproxen in model water samples. Analytes were isolated by solid phase extraction (SPE); they were identified by high performance liquid chromatography with UV-VIS detection of diode – array type (HPLC – DAD). The optimal method was selected from several verified procedures on the basis of practical experience.

KLÍČOVÁ SLOVA

analgetika, metoda stanovení, vody

KEY WORDS

analgetics, method of determination, waters

BENEŠOVÁ, M. *Problematika stanovení analgetik ve vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 49 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za odborné vedení a cenné rady při zpracování této bakalářské práce a ing. Lucii Vydrové za ochotnou pomoc zejména při řešení praktické části této práce.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Analgetika	8
2.1.1	Bolest.....	8
2.1.2	Historie léčby bolesti.....	8
2.1.3	Vývoj analgetik	9
2.1.3.1	Opioidní analgetika	9
2.1.3.2	Analgetika – antipyretika	9
2.1.4	Rozdělení analgetik	10
2.1.5	Mechanismus účinku analgetik	10
2.1.5.1	Dráha bolesti	10
2.1.5.2	Mechanismus účinku analgetik – antipyretik.....	11
2.1.5.3	Mechanismus účinku opioidních analgetik	11
2.1.6	Osud léčiva v organismu	11
2.1.6.1	Mechanismus transportu léčiv v organismu.....	12
2.1.6.2	Biotransformace léčiv	13
2.1.7	Výskyt léčiv v životním prostředí	13
2.1.7.1	Toxicita povrchových vod.....	15
2.1.8	Možnosti odstranění léčiv z odpadních vod.....	15
2.1.9	Kyselina salicylová	15
2.1.9.1	Příprava	16
2.1.9.2	Vlastnosti.....	16
2.1.9.3	Metabolismus	16
2.1.10	Naproxen	16
2.1.10.1	Příprava	16
2.1.10.2	Vlastnosti.....	17
2.1.10.3	Metabolismus	17
2.2	Analýza léčiv.....	17
2.2.1	Odběr vzorku.....	17
2.2.2	Úprava vzorku	17
2.2.2.1	Úprava a uchování vzorku před extrakcí.....	17
2.2.2.2	Extrakce.....	18
2.2.3	Analýza vzorku pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ..	20
2.2.3.1	Princip	20
2.2.3.2	Kapalinový chromatograf.....	20
2.2.3.3	Detektory HPLC.....	22
3	Experimentální část	25
3.1	Použité přístroje a vybavení	25
3.2	Použitý software pro zpracování a interpretaci dat	25
3.3	Použité chemikálie a standardy	25
3.3.1	Chemikálie	25
3.3.2	Standardy.....	25
3.4	Vlastnosti stanovovaných analytů.....	25
3.4.1	Naproxen	25
3.4.2	Kyselina salicylová (Salicylic acid)	26
3.5	Postupy stanovení.....	26
3.5.1	Izolace sledovaných analytů.....	26
3.5.2	Identifikace a kvantifikace analytů	28

3.5.2.1	Chromatografické podmínky.....	29
4	Výsledky a diskuze.....	30
4.1	Určení a optimalizace chromatografických podmínek.....	30
4.1.1	Optimalizace mobilní fáze	30
4.1.2	Optimalizace vlnové délky	33
4.1.3	Optimalizace teploty	34
4.1.4	Optimalizace průtoku mobilní fáze	35
4.2	Optimalizace postupu extrakce pevnou fází (SPE).....	36
4.2.1	Postupy pro kolonky Supelclean TM ENVI TM – 18 SPE.....	38
4.2.1.1	Výtěžnosti kyseliny salicylové a naproxenu	38
4.2.2	Postupy pro kolonky Oasis HLB.....	39
4.2.2.1	Výtěžnosti kyseliny salicylové a naproxenu	40
4.3	Optimalizovaná metoda pro stanovení kyseliny salicylové a naproxenu	43
5	Závěr.....	44
6	Literární zdroje	45
7	Seznam použitých zkratk a symbolů	49

1 ÚVOD

V současnosti vyvstává nový rozměr problematiky kontaminace životního prostředí farmaceutickými produkty. Na jedné straně vzrůstá spotřeba těchto látek a spolu s ní dochází i ke zvyšování produkce odpadu, na straně druhé sílí náš zájem o ochranu životního prostředí, přičemž objevujeme stále nedostatky naší snahy v této oblasti.

Jeden z důvodů tak vysoké spotřeby farmak, jaký nyní pozorujeme, bychom mohli nalézt v komercializaci těchto produktů. Postupem času se léčiva a různé doplňky stravy stávají běžnou součástí života mnoha lidí, staly se spotřebním zbožím. Vztah lidí k léčivům je nepříznivě ovlivňován reklamou, roste množství informací – mnohdy nepravdivých nebo zavádějících a to zapříčiňuje nadbytečné nakupování těchto produktů. Léčiva a doplňky stravy jsou užívány nadměrně, což vede ke snižování obranyschopnosti organismu člověka. Vyšší náchylnost k chorobám pak opět vede k vyhledávání medikamentů. Pokles obranyschopnosti organismu, vyšší výskyt civilizačních chorob, horší snášenlivost bolesti, to jsou pouze základní příčiny vyšší spotřeby farmaceutických produktů. Prodlužující se délka života zde sehrává taktéž důležitou roli, léčiva jsou užívána pro zlepšení jeho kvality.

Léčiva se mohou do prostředí dostávat v původní nebo pozměněné formě různými cestami. Nejčastějším zdrojem kontaminace těmito látkami je odpadní voda, ta je také nejdůležitější matricí pro stanovení léčiv. Farmaka však mohou do životního prostředí pronikat i jinými cestami, například prostřednictvím hnoje produkovaného léčenými hospodářskými zvířaty. Příčinou, proč je odpadní voda nejvíce kontaminovaná, je nedostatečná schopnost čistíren odpadních vod tyto látky odstranit. Rostoucí kontaminace životního prostředí léčivy je podnětem k vyvíjení nových a účinnějších metod, které odhalí nejnižší koncentrace těchto látek a napomohou k jejich zneškodnění.

Ve své práci se zaměřím na analgetika, jednu z obecně nejrozšířenějších skupin léčiv. Analgetika jsou léčiva užívaná proti bolesti.

V současné době je známo několik analýz pro stanovení analgetik ve vodách, patří mezi ně např. kombinace plynové nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, HPLC-MS) nebo spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií (CE-MS).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Analgetika

Analgetika jsou léčiva užívaná proti bolesti, neléčí příčinu onemocnění, pouze jeho příznaky, jsou to tedy symptomatické léky. Působí na CNS a na periferní nervový systém. U některých analgetik s převážně periferními účinky je významné i protizánětlivé působení; tyto látky se často označují jako nesteroidní protizánětlivé látky (NSAID) [1].

2.1.1 Bolest

Bolest je nepříjemný smyslový a emocionální zážitek, který je spojen s aktuálním nebo potenciálním poškozením tkání [1]. Vnímání bolesti je čistě subjektivní záležitostí, každý organismus je vůči ní jinak odolný. Pro soustavu vnímání bolesti byl navržen název nociceptivní systém, neboli nocicepce. Nociceptory, senzory bolesti, jsou volná nervová zakončení, nerovnoměrně umístěná prakticky po celém těle. Hojně jsou v kůži, ve svalech, v útrokách, méně v CNS [2].

V různých literaturách lze najít mnoho typů dělení bolesti podle různých kritérií. Zde uvádím nejběžnější:

1. Podle délky trvání bolesti:
 - a) akutní – trvá krátce, bývá většinou ostrá
 - b) chronická – trvá déle než 3 měsíce
2. Podle postiženého systému [1]:
 - a) somatická – bolesti kůže, svalů, hlavy, kostí a kloubů
 - b) viscerální – v hloubce, ale může pronikat i do kůže
 - c) neuropatická – nastává v důsledku porušení nervů v periférii nebo v CNS

Chronickou bolest je možno dělit dále podle etiologie [3]:

- a) bolest nociceptivního původu – vzniká podrážděním nociceptorů, které se nacházejí v oblasti různých epitelů a tkání
- b) bolest neuropatického původu – vzniká postižením nervového systému
- c) bolest psychogenní – převažuje zde psychická složka,
- d) bolest dysautonomní – zásadní podíl na intenzitě má autonomní nervový systém
- e) bolest smíšená – kombinace několika typů bolestí.

Analgetika však nelze použít na všechny druhy bolesti. Nejsou vhodná zejména pro léčbu psychogenní bolesti, jelikož ta nemusí být nutně organického původu – bývají zde především příčiny psychické, to znamená, že bolest nevzniká na úrovni nociceptorů, nýbrž na vyšších úrovních CNS [4].

2.1.2 Historie léčby bolesti

Bolest byla patrně léčena již od počátků lidstva. Z kreseb z doby kamenné je patrné, že člověk dokázal tlumit bolest stimulací některých míst na těle rybími kostmi. Staří Číňané dovedli k dokonalosti techniku stimulace akupunkturálních bodů, staří Řekové zase používali k léčbě bolesti elektrické výboje úhoře (*Scriborinus longum*).

Jako první léky proti bolesti byly používány alkoholické nápoje a rostlinné výtažky. Nomádové byli první, kdo poznali léčivé účinky makové šťávy – opia a díky jejich

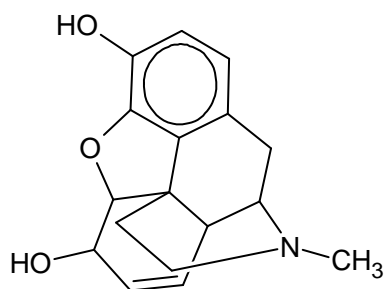
obchodním stykům bylo opium velmi rozšířeno. Řekové rozlišovali mezi šťávou vytlačenou z nezralých makovic nazývanou meconium a šťávou získanou naříznutím nezralých makovic zvanou opos. Osobní lékař císaře Nerona vynalezl lék theriak, jehož hlavní složkou bylo právě opium, a který byl používán při nespavosti a při léčbě silné bolesti.

V Evropě se opium začalo používat až v době renesance, kdy švýcarský lékař Paracelsus vynalezl opiovou tinkturu. V 18. a 19. století se užívání opia velmi rozšířilo, bylo užíváno jako lék proti bolesti i jako sedativum, bylo však stále častěji zneužíváno jako droga [5].

2.1.3 Vývoj analgetik

2.1.3.1 Opioidní analgetika

Do začátku 19. století bylo jediným silným analgetikem opium, které v roce 1805 nahradil z něj izolovaný bílý prášek morfin. Ten se udržel v terapii dodnes. Morfin má však závažné nežádoucí účinky a tak je dodnes vynakládána velká snaha najít polysyntetické nebo syntetické deriváty bez těchto nežádoucích účinků. Tato snaha spočívala v přímém pozměnění struktury morfinu blokováním fenolové skupiny nebo obměnou na hydroxylových skupinách a izolované dvojně vazbě. Tímto však nebyly požadované účinky dosaženy [6].



Obr. č. 1: Strukturní vzorec morfinu [6]

Ve třicátých letech byla objevena účinná analgetika pethidin a methadon, což jsou látky syntetizované jako potenciální spasmolytika. Tyto látky mají podobnou strukturu jako morfin, a proto jsou analgeticky aktivní. Nežádoucí účinky morfinu se však u nich zachovaly.

Zásadní obrat nastal až ve čtyřicátých letech, kdy byl objeven nadorfin, což je antagonist morfinu s analgetickými vlastnostmi. Jeho nedostatek spočíval v psychomotorickém působení a proto se přestal používat.

V současné době směřuje vývoj k látkám, které by měly zachovány silné analgetické vlastnosti jako morfin, avšak které by byly zbaveny nežádoucích účinků, zvláště návykovosti. Tyto látky se nazývají κ -agonisté [6].

2.1.3.2 Analgetika – antipyretika

Již v druhé polovině 18. století byla známa schopnost vrbové kůry (Cortex salicis) snižovat horečku. Počátkem 19. století z ní byl izolován účinný glykosid salicyl, později byla objevena kyselina salicylová a ke konci 19. století byla objevena kyselina acetylsalicylová. Rovněž byl koncem 19. století izolován z kůry chininovníku chinin, který se jako antipyretikum užívá dodnes. Fragment struktury chininu je chinolin, z něhož byl

v 80. letech minulého století připraven účinný derivát – fenazon. Ve stejné době byly objeveny antipyretické účinky acetanilidu, který tvoří předlohu paracetamolu, jenž je nyní vedle kyseliny acetylsalicylové nejhodněji užívaným analgetikem a antipyretikem. V současné době jsou však více používány inhibitory syntézy prostaglandinů, mezi které patří např. ibuprofen [6].

2.1.4 Rozdělení analgetik

Z praktického hlediska dělíme analgetika do dvou skupin [7]:

1. Analgetika morfinového typu
2. Analgeticko-antipyretické látky

První skupina jsou silná farmaka, působící převážně na CNS, často jsou také označovány jako opioidní analgetika. Řadí se mezi ně morfin, jeho deriváty a náhražky. Dále se dělí podle jejich afinity a vnitřní aktivity k jednotlivým podtypům opioidních receptorů [8].

Druhá skupina léčiv účinkuje slaběji, avšak nenarkoticky. Bývá rovněž označována jako nesteroidní protizánětlivé látky (NSAID). Působí převážně na periferní nervová zakončení a má taktéž schopnost snižovat tělesnou teplotu. Nejčastěji je dělíme podle jejich chemické struktury nebo dle délky biologického poločasu eliminace na:

- a) Deriváty kyseliny salicylové (acylpyrin, anopyrin, aspirin...)
- b) Deriváty anilinu (panadol, paralen...)
- c) Deriváty pyrazolu (saridon, algifen...)
- d) Analgetika jiných struktur [6]

2.1.5 Mechanismus účinku analgetik

Účinek analgetik spočívá v jejich zásahu do tzv. dráhy bolesti. Vjem bolesti blokuje zásahy na různých místech [7].

2.1.5.1 Dráha bolesti

Dráha bolesti je tříneuronová. V periférii se nacházejí nociceptory reagující na bolestivé podněty. Na počátku dráhy bolesti jsou senzorycké neurony, které svými vlákny vedou impulsy do zadních rohů míšních. Bolest vedou dva typy vláken:

- Vlákna lehce myelizovaná (A-delta), která vedou bolest rychleji a umožňují její přesnou lokalizaci.
- Nemyelizovaná vlákna (C), která vedou bolest pomaleji, neumožňují přesně lokalizovat bolest, ta se projevuje jako pálení nebo tupá bolest.

Při vedení bolesti jsou užívány odlišné vzestupné dráhy:

- Vlákna pro rychlý přenos bolesti využívají jako druhý neuron dráhy spino-talamické. Vznikají zde únikové reflexy a dochází k ovlivnění sympatických funkcí.
- Vlákna pro pomalý přenos bolesti využívají jako druhý neuron dráhy spino-retikulo-talamické. Reflexy podmíněné vedením bolestivých podnětů těmito dráhami vedou ke zvracení, pocení a snížení tlaku krve.

Třetím neuronem jsou dráhy talamo-kortikální, které vedou do oblastí, kde dochází ke zpracování informací o bolesti.

Tlumivý vliv na nociceptivní systém vykonávají sestupné dráhy [1].

2.1.5.2 Mechanismus účinku analgetik – antipyretik

Hlavní účinek spočívá v útlumu tvorby prostaglandinů, což jsou tkáňové působky, které regulují fyziologické funkce organismu. Prostaglandiny se vyskytují ve zvýšeném množství právě v tkáních, ve kterých probíhá zánět. Vznikají z kyseliny arachidonové, která je uvolňována z fosfolipidů buněčných membrán aktivací fosfolipázy A₂. Za přítomnosti koenzymu cyklooxygenázy (COX) vzniká nejdříve nestabilní cyklický endoperoxid PGG₂, jenž je zdrojem pro vzájemně příbuzné látky o 20 uhlících (eikosanoidy, prostanoidy).

COX existuje ve dvou izomerických formách. Jako COX-1 je přítomna ve všech tkáních, jako COX-2 je přítomna v plicích, ledvinách a v nervových tkáních. Její koncentrace je zvýšená v zánětlivých tkáních.

Analgetika - antipyretika specificky tlumí aktivitu COX a tím i tvorbu prostaglandinů a ostatních metabolitů kyseliny arachidonové [2, 6].

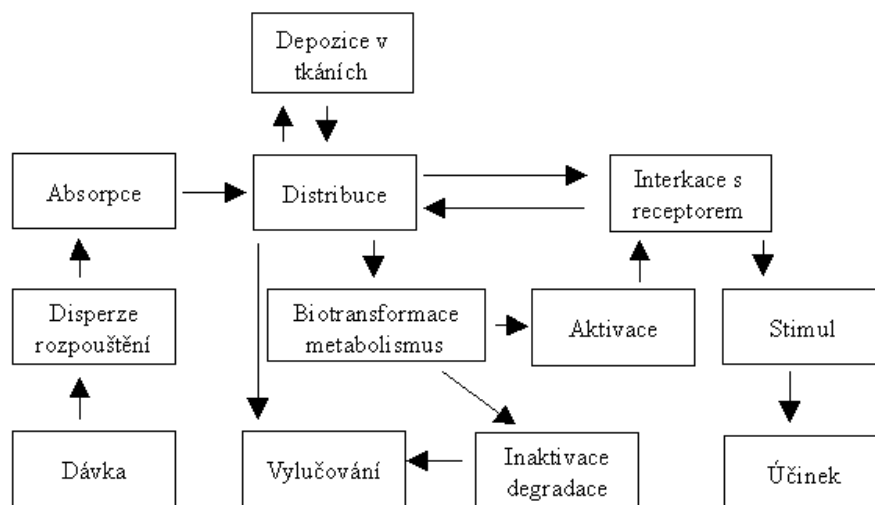
2.1.5.3 Mechanismus účinku opioidních analgetik

Účinek opioidních analgetik je dán působením na nociceptory, blokují se tedy vzruchy, které jsou interpretovány jako bolest. Mají ovšem také vliv na prožívání bolesti a na náladu nemocných. Ovlivňují sekreci některých neurotransmiterů, které ovlivňují psychiku.

Z nociceptorů jsou nejdůležitější μ - a κ - receptory. Hlavním léčivem μ - receptoru je morfin. Interakcí s μ - receptory je vyvolaný analgetický účinek doprovázen útlumem dýchacího centra, vznikem tolerance, závislosti a dalšími vedlejšími příznaky. Interakcí s κ - receptory je analgezie doprovázena sedativním efektem bez útlumu dýchacího centra. Pro vazbu na σ - receptory je typickým projevem halucinace bez analgezie [2, 6].

2.1.6 Osud léčiva v organismu

Po vstupu léčiva do organismu nastává tzv. farmaceutická fáze, která zahrnuje uvolnění molekul účinné látky z léku. Poté přichází farmakokinetická fáze, kdy organismus působí na léčiva. V následující farmakodynamické fázi je zahájena interakce léčiva s receptorem. Na obr. č. 2 je schematicky osud léčiva v organismu znázorněn [9].



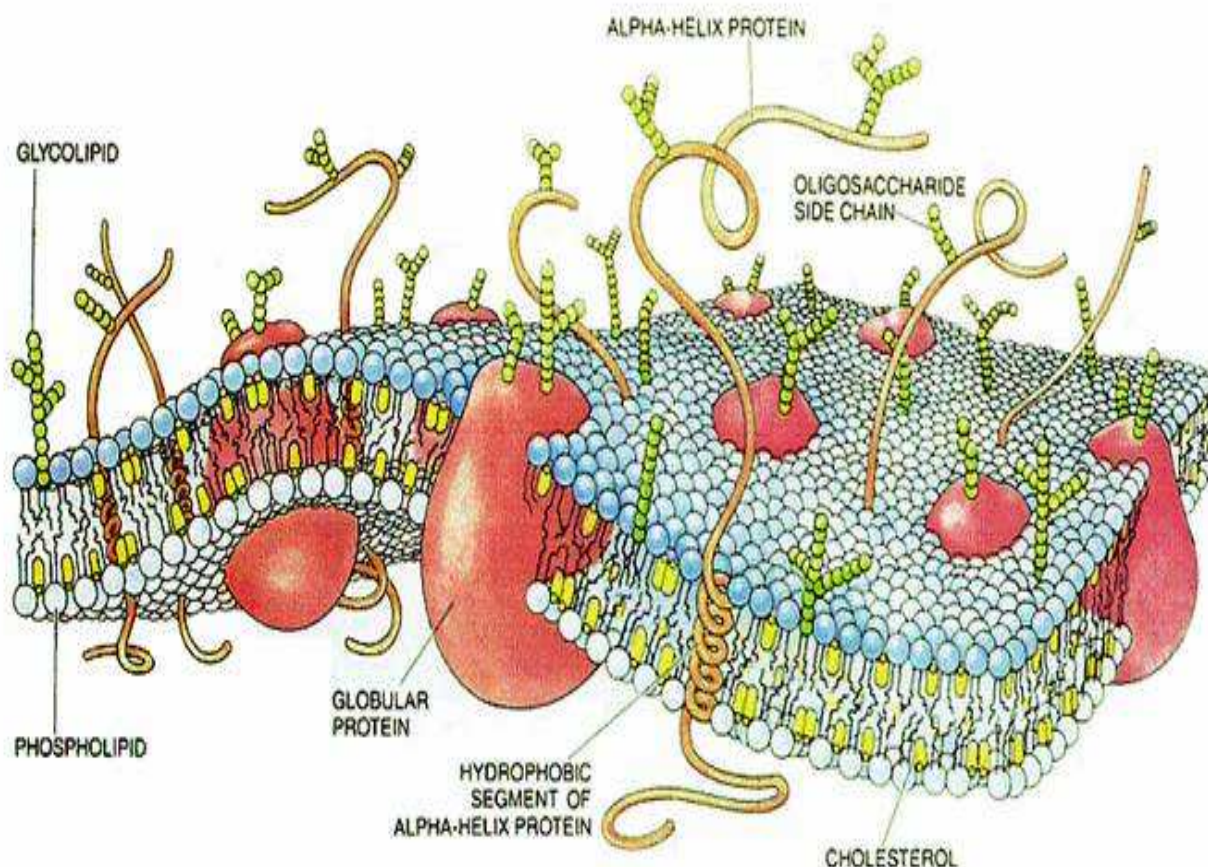
Obr. č. 2: Osud léčiva v organismu [9]

2.1.6.1 Mechanismus transportu léčiv v organismu

Transport léčiva na větší vzdálenosti zajišťuje krevní oběh. Transportované látky však musí být rozpuštěny ve vodě nebo být schopné vázat se na bílkoviny krevní plazmy. Aby se mohlo léčivo dostat k cílové buňce (receptoru), která je odpovědná za jeho účinek, musí překonat různé bariéry, většinou tvořené biologickými membránami. Membrány jsou tvořeny dvojvrstvou glycerolfosfolipidů. Polární hydrofilní skupiny molekul fosfolipidů směřují ven do vodné fáze, hydrofobní acylové řetězce směřují dovnitř dvojvrstvy. V membráně jsou zabudované molekuly proteinů, které účinkují jako enzymy, iontové kanály nebo pumpy, receptory apod. [9].

Transport látek přes membránu je možný dvěma mechanismy:

- Pasivní transport – probíhá difúzí přestupem z míst o větší koncentraci do míst o koncentraci nižší. Tento způsob nevyžaduje dodání energie. Schopnost látek přestupovat přes biologickou membránu difúzí je dán jejich lipofilitou a to tak, že čím je látka lipofilnější, tím snáze přechází přes membránu.
- Aktivní transport – je zprostředkován iontovými kanály nebo různými specializovanými nosiči (glykoproteidy). Tímto způsobem může transport probíhat i proti koncentračnímu spádu, potřebuje však dodání energie získané štěpením ATP. Podmínkou tohoto transportu je schopnost dané látky tvořit komplex s příslušným nosičem (proteinem) [9].



Obr. č. 3: Biologická membrána [10]

2.1.6.2 Biotransformace léčiv

Biotransformace je soubor chemických změn, které doprovázejí fyzikální a fyzikálně - chemické děje jako je vstřebávání, distribuce a vylučování xenobiotik. Produktem látkové přeměny jsou metabolity, což jsou látky s pozměněnou chemickou strukturou v porovnání s původní látkou. Cílem je vznik látek rozpustných ve vodě, které se snáze vyloučí z organismu. Probíhají zde enzymatické reakce, které jsou často komplexní; produkt jedné reakce se stává reaktantem reakce následující. Díky inhibici nebo aktivaci enzymy mohou produkty reakce:

1. vykazovat stejné vlastnosti jako původní sloučenina
2. vykazovat vyšší toxicitu než původní sloučenina
3. v kombinaci s jinými sloučeninami vést k podpůrným farmakologickým efektům
4. vést ke ztrátě biologické aktivity [11, 12].

Průběh biotransformace je dán vlastnostmi xenobiotika a organismu, ve kterém se nachází. Biotransformace většinou zahrnuje pouze čtyři typy biotransformačních reakcí za účasti enzymů:

1. oxidace
2. redukce
3. hydrolýza
4. syntéza – konjugace

Reakce probíhají ve dvou biotransformačních fázích:

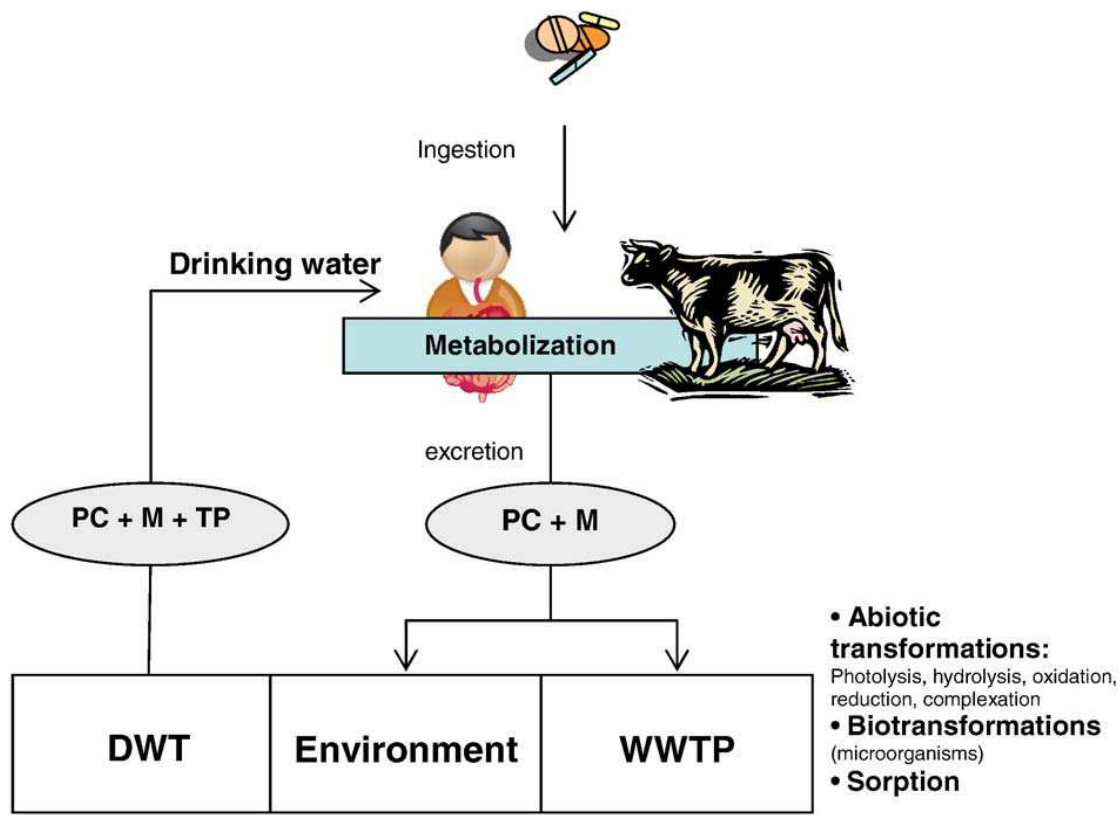
- I. Fáze – probíhají převážně reakce oxidační, redukční nebo hydrolytické. Tyto reakce vedou ke vzniku polárnějších látek, než bylo původní xenobiotikum a jsou tedy lépe rozpustné v tělních tekutinách.
- II. Fáze – probíhají konjugační (syntetické) reakce, vzniklé metabolity bývají dobře rozpustné ve vodě a vylučují se převážně močí, stolicí nebo potem [9, 11].

2.1.7 Výskyt léčiv v životním prostředí

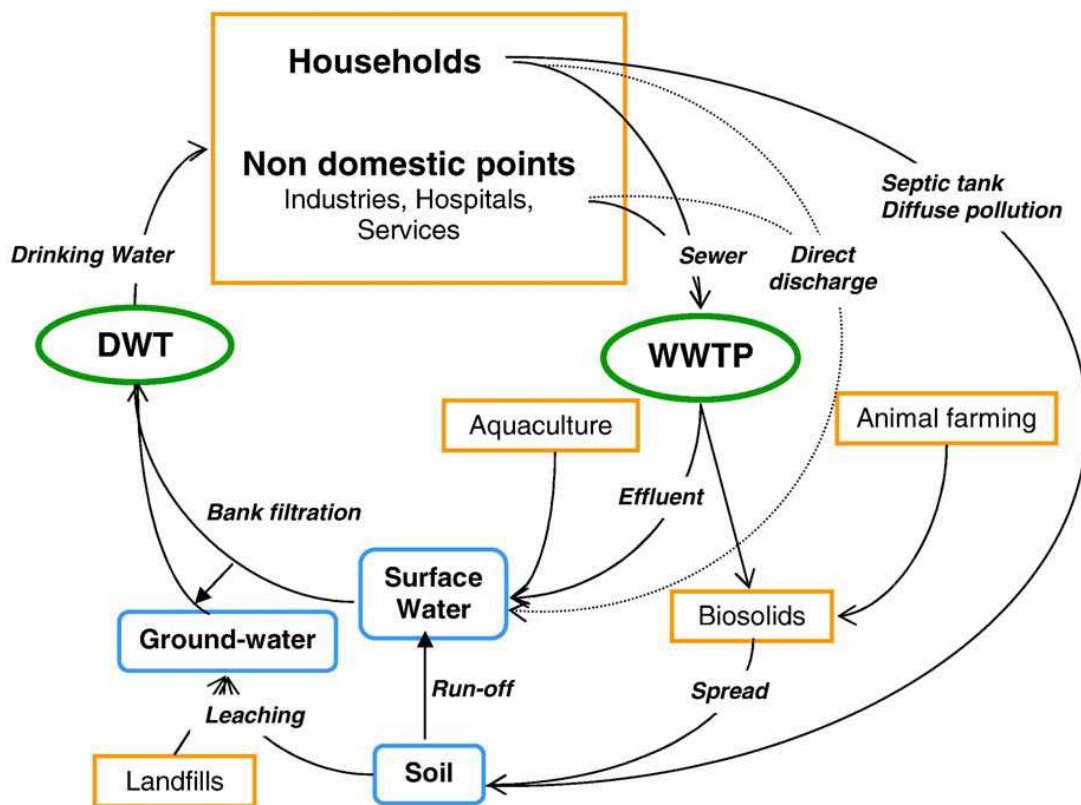
V posledních letech vzrůstá zájem stanovovat léčiva a jejich rezidua v životním prostředí. Je to zapříčiněno vývojem nových metod schopných detekovat již velmi nízké koncentrace těchto látek a také tím, že u některých léčiv byla již prokázána toxicita a další jsou potenciálně toxické.

Rezidua léčiv a jejich metabolity byly detekovány v mnoha přírodních matricích, jako jsou např. povrchové a odpadní vody, sedimenty a kaly. Tyto sloučeniny v závislosti na hydrofilite mohou vstupovat do vodního prostředí nebo zůstávat adsorbované na pevných částicích. Jejich koncentrace se obvykle pohybují ve stopových úrovních ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ - $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), ale i takto nízké koncentrace mohou vyvolat toxické účinky. V odpadních a povrchových vodách byly zaznamenány hodnoty až $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; farmaceutické produkty již byly zjištěny i v pitných vodách. Velká část těchto látek je perzistentní v životním prostředí a mnoho z nich je biologicky aktivní [13, 14, 15].

Léčivo putuje přes organismus, z kterého se vyloučí v nezměněné formě nebo ve formě metabolitu. V těchto formách se dostává do odpadní vody a okolního prostředí (např. půd). ČOV nejsou schopny tyto vysoce polární látky odstranit, čímž se léčiva nebo jejich metabolity dostanou do povrchových vod. Ty mohou být karcinogenní, teratogenní nebo mutagenní a společně mohou vykazovat synergické účinky. Toky povrchových a podzemních vod se často nacházejí blízko sebe – odtud plyne možnost kontaminace podzemních vod prosakováním z vod povrchových. Podzemní vody se před rozvodem do vodovodní sítě pitné vody chlorují, tato metoda ale není dostačující k úplnému odstranění reziduí léčiv z pitné vody a dochází tedy k nežádoucímu přijímání těchto látek (obr. č. 4 a 5) [16].



Obr. č. 4: Transformační cesta léčiva [16]



Obr. č. 5: Cesta léčiva v životním prostředí [16]

2.1.7.1 Toxicita povrchových vod

Farmaceutické produkty vstupují do životního prostředí v původní nebo pozměněné formě. Hlavními zdroji těchto látek jsou domácnosti, nemocnice, průmyslové podniky, čistírný odpadních vod a zvířecí chovné stanice. Velkým problémem jsou odpadní vody z nemocničních zařízení, které vykazují značnou toxicitu [13, 17].

Toxicita vod na odtoku z ČOV může být akutní nebo chronická. Akutní toxicita je krátkodobá, způsobená vyššími koncentracemi kontaminantů a způsobuje morfologické změny a smrt organismů, chronická toxicita je dlouhodobé vystavení organismů nižším koncentracím kontaminantů a způsobuje např. změny chování. Toxicita povrchových vod má ve většině případů chronické účinky. Přítomnost léčiv ve vodách ovlivňuje mikroorganismy, řasy, vyšší rostliny, bezobratlé, ryby a obojživelníky. Toxicita má vliv na bioluminiscenci, reprodukci a aktivitu mikroorganismů, způsobuje změny v mikrobiálním uskupení. Nepříznivě působí na bezobratlé (např. Dafnie) tím, že se mění podíl samčích a samičích potomků. Vliv toxicity vod na ryby je spíše nepřímý, a to přes potravní řetězec; je to způsobeno zejména nízkou rozpustností analgetik ve vodách, díky čemuž dochází k bioakumulaci [18, 19, 20].

2.1.8 Možnosti odstranění léčiv z odpadních vod

Nejčastějším zdrojem farmaceutických látek v životním prostředí jsou odtoky z čistíren odpadních vod, a proto je snaha tyto látky odstraňovat právě zde. Hlavní účel čistírný odpadních vod je odstranit rozpuštěné látky, pevné látky a živiny ze surových splašků. V klasických ČOV probíhá čištění ve 3 fázích:

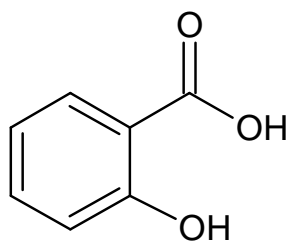
- Primární čištění – odstraní se suspendované pevné částice a tuky
- Sekundární čištění – odstraní se rozpuštěné organické látky
- Terciární čištění – odstraní se nadbytky živin, hlavně dusíku a fosforu.

Tento způsob čištění však není postačující k odstranění léčiv. Léčiva se odstraňují hlavně biodegradací a sorpcí na kal, to je však podmíněno jejich schopností biodegradaci podléhat nebo schopností sorbovat se na pevné částice. Mezi další faktory, které ovlivňují tento způsob odstranění léčiv, patří např. rozpustnost, retenční časy, stavba ČOV, nebo klimatické podmínky (déšť a teplota) [21, 22].

Odstranění léčiv je možné fyzikálně - chemickými metodami, jako jsou převrácená osmóza nebo nanofiltrace, případně také metodami využívajícími adsorpci na aktivní uhlí. V současné době probíhá vývoj nových metod, který je založen především na kombinaci ozonizace s biologickou mikrofiltrací nebo kombinace oxidačních procesů ozonem nebo peroxidem vodíku s UV [23].

2.1.9 Kyselina salicylová

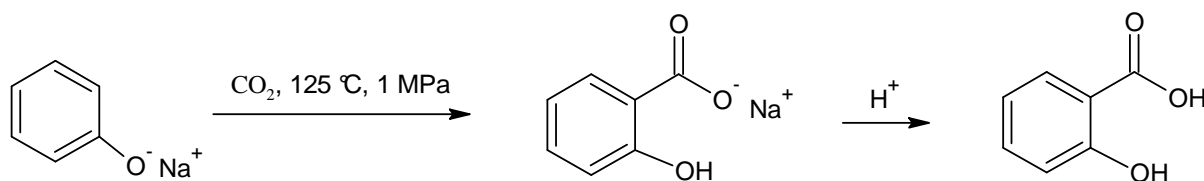
Kyselina salicylová je kyselina 2-hydroxybenzoová, ve formě glykosidu salicinu je obsažena ve vrbové kůře. Její sumární vzorec je $C_7H_6O_3$, $M_r = 138,12$, CAS je 69-72-7 [9, 23].



Obr. č. 6: Strukturální vzorec kyseliny salicylové [9]

2.1.9.1 Příprava

Kyselina salicylová se připravuje Kolbeho - Schmittovou syntézou, díky které se roku 1874 začala spolu s jejími deriváty hojně užívat [9].



Obr. č. 7 Kolbeho – Schmittova syntéza [9]

2.1.9.2 Vlastnosti

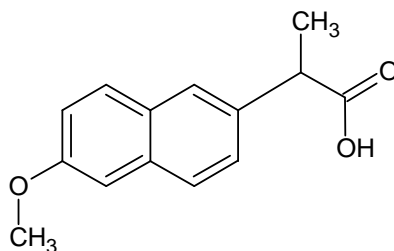
Kyselina salicylová je bílá krystalická látka, tvoří jehlicovité krystaly. Je nepatrně rozpustná ve studené vodě, mírně rozpustná v dichlormetanu, ve vroucí vodě se rozpouští v poměru 1:15, v ethanolu (1:2,7), v acetonu (1:3) v chloroformu (1:42). Bod tání kyseliny salicylové se pohybuje v rozmezí $158 - 161^\circ\text{C}$, bod sublimace je 76°C . Je poměrně silnou kyselinou, která má pK_a 3,0. Analgetický účinek je podmíněn ortho - uspořádáním obou funkčních skupin [6, 24].

2.1.9.3 Metabolismus

Kyselina salicylová se přibližně z 80% metabolizuje v játrech. Vazbou s glycinem tvoří kyselinu salicylurovou, vazbou s glukuronovou kyselinou glukuronidy. V menší míře se oxidativně hydroxyluje na kyselinu 2,5–dihydroxybenzoovou a 2,3,5–trihydroxybenzoovou. Vylučuje se močí v nezměněné formě nebo ve formě konjugátů, způsob závisí na pH [6, 25].

2.1.10 Naproxen

Naproxen je kyselina (+)-S-2-(6-methoxynaft-2-yl)-propanová, patří mezi aryl – alkanové kyseliny. Sumární vzorec naproxenu je $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_3$, $M_r = 230,26$, CAS je 22204-53-1 [9, 24].

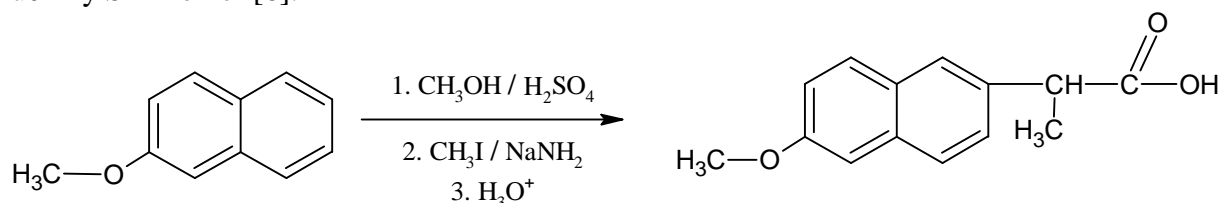


Obr. č. 8: Strukturální vzorec naproxenu [9]

2.1.10.1 Příprava

Kyselina 2-(6-methoxynaft-2-yl)-propanová se připraví Friedel – Craftsovou acylací a Willgerodtovou reakcí v Kindlerově modifikaci z 2-methoxynaftalenu. Kvůli ochraně karboxylu se ve formě esteru probíhá methylace do α – polohy a vzniklý methylester se

zmýdelní na racemát naproxenu. Alkaloidem cinchonidinem se poté rozdělí sůl a získá se účinný S – izomer [6].



Obr. č. 9: Příprava naproxenu [6]

2.1.10.2 Vlastnosti

Naproxen je bílá nebo téměř bílá krystalická látka s teplotou tání 154 - 158 °C prakticky nerozpustná ve vodě, ale rozpustná v tucích, v 96% ethanolu a v methanolu. Má specifickou optickou otáčivost (+59 až + 62) [6, 24].

2.1.10.3 Metabolismus

Naproxen má vyšší afinitu ke COX-2, což je indukovatelný enzym, jehož množství se v zanícené tkáni rychle zvyšuje. Inhibicí tohoto enzymu se léčí zánět. Naproxen je v GIT rychle a kompletně vstřebáván, z 99% se váže na plazmatické bílkoviny, maximální hladina je dosažena za 2 – 4 hodiny. Z 95% je vylučován ledvinami jako naproxen, dále jako 6-0-demethylnaproxen nebo ve formě konjugátů. Má poměrně dlouhý poločas eliminace [6, 26].

2.2 Analýza léčiv

Pro stanovení obsahu léčiv ve vzorcích vod se používá několik metod. Mezi nejčastěji používané patří tandemové techniky, např. spojení plynové chromatografie nebo kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS a LC-MS), nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s využitím detektorů, např. detektor s diodovým polem (DAD). Vlastnímu stanovení však předchází odběr a úprava vzorku, která zahrnuje filtraci, případnou acidifikaci, extrakci a čištění [14].

2.2.1 Odběr vzorku

Vzorek odpadní vody se odebírá na přítoku a odtoku ČOV, v některých případech mezi jednotlivými kroky čištění. Jednotlivé odběry jsou uskutečněny ve stanovených časových intervalech. Provádějí se buď bodové odběry vzorků nebo se odebírá směsný vzorek automatickým vzorkovačem během stanovené doby. Vzorky se odebírají do vzorkovnic z plastu nebo skla manuálně nebo pomocí automatických vzorkovačů [27].

2.2.2 Úprava vzorku

2.2.2.1 Úprava a uchování vzorku před extrakcí

Vzorky odpadní vody se před provedením extrakce filtrují kvůli odstranění suspendovaného materiálu přes sklovláknité membránové filtry s velikostí pórů 0,45 – 0,2 μm [14]. Vzorky podzemní vody se filtrují přes skleněná mikroválkna o velikosti pórů 0,7 μm [28].

U vzorků obsahujících léčiva s kyselými skupinami nebo skupinami, které se v oblasti neutrálního pH vyskytují v ionizované formě, je nutná acidifikace [14].

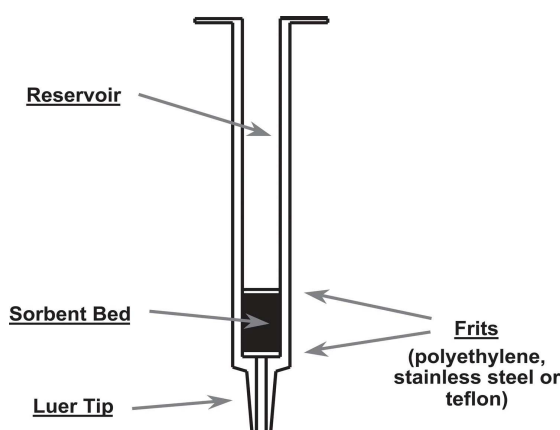
Vzorky by měly být uchovávány v tmavých skleněných vzorkovnicích při teplotě do 4°C a stanovení by mělo proběhnout do 24 h po odběru, aby se předcházelo degradaci [29, 30].

2.2.2.2 *Extrakce*

Extrakce je přechod složky fázovým rozhraním, při kterém je složka směsi převáděna přes fázové rozhraní z jedné fáze do fáze druhé. Podle skupenství fází, mezi kterými složka přechází, rozdělujeme:

- Extrakce z pevné fáze do kapaliny – požadovaná složka se na rozdíl od ostatních rozpouští ve vhodném rozpouštědle.
- Extrakce z kapaliny do kapaliny – požadovaná složka přejde z výchozí kapalné matrice do rozpouštědla, ve kterém je více rozpustná. Podmínkou je ustavení rovnováhy mezi dvěma nemísitelnými kapalinami.
- Extrakce z kapaliny nebo plynu na pevnou fázi – dochází k zakoncentrování analytu adsorpcí na polymer, který pokrývá křemenné vlákno. Tato technika se nazývá mikroextrakce pevnou fází (SPME).
- Extrakce z kapaliny na pevnou fázi – z roztoku jsou selektivně zachycovány požadované složky [31]. Tento způsob jsem použila v praktické části této práce.

Extrakce pevnou fází je analytická technika založená na selektivním zachycení složek z kapalné matrice podle jejich chemické podstaty. Pro extrakci se nejčastěji používají extrakční kolonky, ve kterých je práškový sorbent uzavřen fritami, ale je možné použít i extrakční disky, což jsou tenké membrány z teflonu a příslušného modifikovaného sorbetu. Jako sorbent se obvykle používá silikagel s navázanými organickými skupinami, které rozhodují o jeho vlastnostech. Je však možné použít i jiné sorbety, např. na bázi aluminu (oxid hlinitý) nebo florisil (gel oxidu hořečnatého a křemičitého) [31, 32]. Povaha sorbetu se liší podle extrakce různých typů sloučenin. Vazebné síly mezi sorbentem a analytem jsou založené na van der Waalsových silách, vodíkových vazbách nebo elektrostatických interakcích [33].



Obr. č. 10: Popis SPE kolonky [34]

Použitím tuhého sorbetu se odstraňuje řada nedostatků, které má, dříve hojně využívaná, extrakce v systému kapalina – kapalina. SPE dosahuje vyšší selektivity, chemicky vázané fáze na silikagelu se rozpouštědlem nevymývají ⇒ eliminuje se potřeba nemísitelnosti, použitím sorbetů s různou velikostí částic je možné volit velikost separovaných molekul, snižuje se

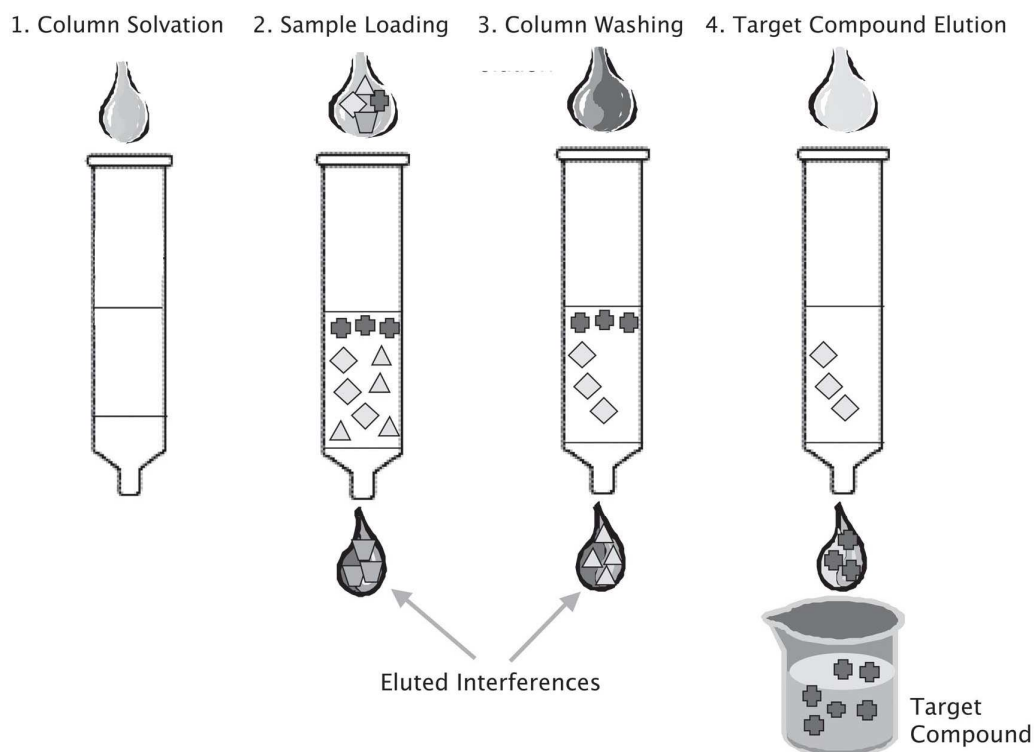
spotřeba rozpouštědel. Díky práci s menšími objemy vzorků je bezpečnější, rychlejší a levnější, dá se snadno automatizovat [32].

Princip metody spočívá v přivedení roztoku analytu ve vodě do kontaktu s tuhým sorbentem, který silně sorbuje analyt, ale co nejméně ostatní složky. Zachycený analyt je po oddělení sorbentu od roztoku uvolněn zahřátím (při zapojení „on-line“ s plynovým chromatografem) nebo elucí rozpouštědlem. Lze použít dvojí uspořádání:

1. Statické uspořádání – roztok analytu se míchá se sorbentem a následně se sorbent odfiltruje.
2. Dynamické uspořádání – roztok vzorku protéká přes sorpční kolonku. Průtok je umožněn buď gravitací, pozitivním tlakem (čerpadlem, injekční stříkačkou) nebo negativním tlakem (připojením vakua) [35].

Postup SPE:

1. Předúprava kolonky – pevná fáze kolonky se musí aktivovat \Rightarrow propláchne se předepsaným rozpouštědlem a následně rozpouštědlem, které je podobné vzorku, aby se pro něj upravilo prostředí.
2. Dávkování vzorku – podle druhu sorbentu dochází k selektivním reakcím se vzorkem. Analyt se zachytí a ostatní látky procházejí volně kolonkou.
3. Promývání – propláchnutím kolonky vhodným rozpouštědlem se dosáhne selektivního vymytí nežádáných součástí vzorku, zatímco analyt zůstane sorbován na pevné fázi.
4. Sušení – je nutné v případě, kdy se rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku. Sušení se provádí proudem inertního plynu, nejčastěji dusíku.
5. Eluce – promytím elučním rozpouštědlem dochází k selektivní desorpci analytu a jeho vymytí z kolonky. Eluát se jímá a dále upravuje pro následnou analýzu [32].



Obr. č. 11: Postup SPE [34]

2.2.3 Analýza vzorku pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

Vývoj vysokoúčinné kapalinové chromatografie probíhá od 70. let 20. stol. Tato metoda slouží k analýze tepelně nestálých nebo netěkavých látek a polymerů [36]. V porovnání s ostatními separačními metodami používanými pro stanovení léčiv má řadu výhod:

- Umožňuje kvantitativní i kvalitativní hodnocení separovaných složek směsí.
- Je rychlá a v závislosti na použitých detektorech může být i vysoce citlivá.
- Má nízkou spotřebu vzorku pro stanovení.
- Je možné ji automatizovat.

Výhody HPLC jsou srovnatelné s GC, ale protože většina léčiv je netěkavých, je zde výhodnější použití HPLC [37].

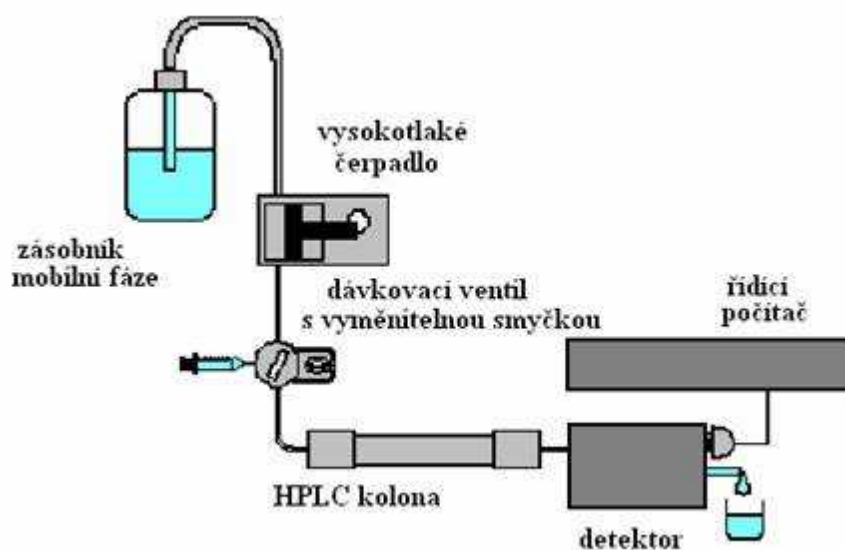
2.2.3.1 Princip

Principem separace je rozdělování látek mezi stacionární fází v koloně a kolonou procházející mobilní fází za vysokého tlaku. K separaci lze využít všechny vratné dvoufázové mechanismy [36]:

- Gelová permeační chromatografie (GPC) - molekuly se separují na základě své odlišné velikosti v pórech gelu.
- Rozdělovací chromatografie (LLC) – molekuly se rozdělují na základě odlišné rozpustnosti dvou nemísitelných kapalin.
- Adsorpční chromatografie (LSC) – molekuly se rozdělují na základě jejich odlišné schopnosti poutat se na povrch pevné fáze s aktivními centry.
- Ionově výměnná chromatografie (IEC) – ionty se separují na základě odlišné schopnosti adsorpce analytů na povrch iontoměniče [32].

2.2.3.2 Kapalinový chromatograf

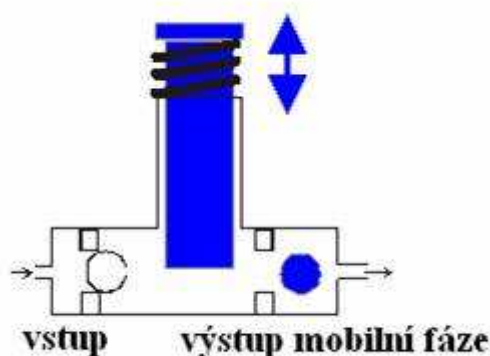
Základními částmi kapalinového chromatografu je zásobník mobilní fáze, čerpadlo, dávkovací ventil, kolona, detektor a řídicí počítač.



Obr. č. 12: Schéma kapalinového chromatografu [38]

Zásobník mobilní fáze obsahuje odplyňovač. Zásobníků může být více, protože je možné provádět gradientovou eluci, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství druhé, případně třetí mobilní fáze. Toto uspořádání se používá, pokud se jednotlivé složky směsi liší svými elučními parametry. Pokud se složky směsi neliší svými elučními parametry, používá se izokratická eluce, při které se složení mobilní fáze nemění [32, 36].

Kapalina se do kolony čerpá pístovými nebo membránovými čerpadly. Pístové čerpadlo nasaje mobilní fázi přes sací ventil a pístem přes výtláčkový ventil ji vytlačí. Membránové čerpadlo má prostor s pístem naplněný hydraulickou pracovní kapalinou, který je od pracovního prostoru pro mobilní fázi oddělen membránou. Jelikož by jednočinné čerpadlo způsobovalo rušivé tlakové rázy, používají se čerpadla zapojená v sérii, dvou nebo vícepístová čerpadla nebo dvojčinná (reciproční) čerpadla [31].



Obr. č. 13: Schéma recipročního čerpadla [38]

Vzorek se dává speciální injekční mikrostříkačkou přes pryžové septum nebo obtokovým dávkovacím kohoutem. Mikrostříkačkou lze dávkovat různé objemy vzorku, ale není použitelná pro tlaky vyšší než 10 MPa, obtokový dávkovací kohout je přesnější a je použitelný pro vyšší tlak, avšak lze s ním dávkovat pouze jeden objem vzorku [32, 36].

Separace probíhá v koloně, což je trubice z borosilikátového skla nebo nerez oceli dlouhá 5 – 30 cm s vnitřním průměrem 2 – 8 mm [32]. Kolona je naplněná sorbentem, nejčastěji tzv. chemicky vázanou stacionární fází, kdy jsou na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelu navázány chemickou reakcí různé radikály. Těmi mohou být:

- V případě nepolárních chemicky vázaných (reverzních) fází uhlovodíkové řetězce C8, C18.
- V případě středně polárních fází 3C řetězec zakončený skupinou -NH₂, -CN.

Jako sorbent se používají i silikagel a alumina nebo ionexy pro iontově výměnnou chromatografii [37].

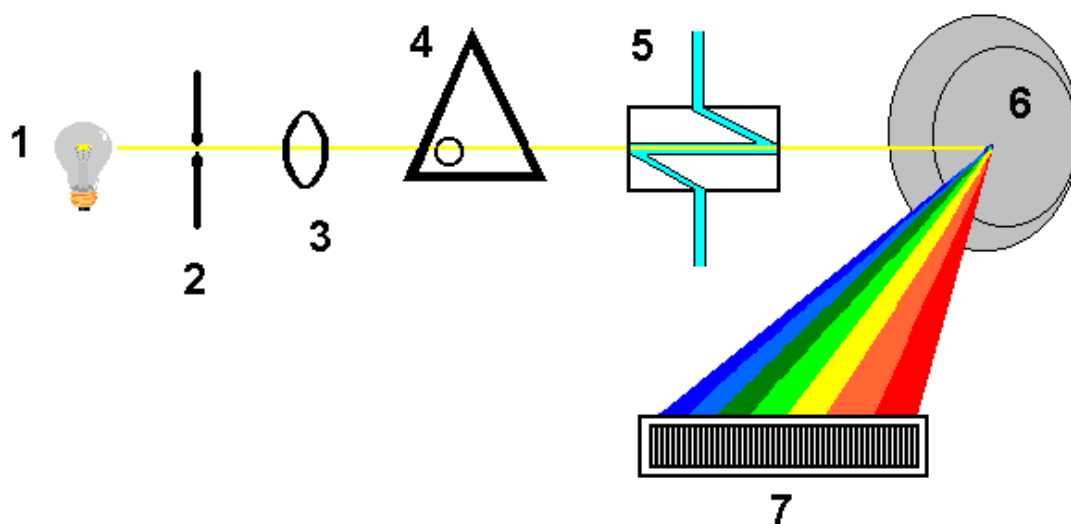


Obr. č. 14: Kolona pro HPLC [38]

2.2.3.3 Detektory HPLC

Eluát vycházející z kolony prochází detektorem. Ten pak měří některou fyzikální vlastnost eluátu (absorpci, fluorescenci, vodivost, index lomu...). Detektor musí být vysoce citlivý (schopný změřit koncentrace $\mu\text{g/ml}$ až ng/ml), univerzální (schopný detekovat všechny oddělené složky vzorku), odezva musí být reprodukovatelná, lineární a nezávislá na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci [32, 36].

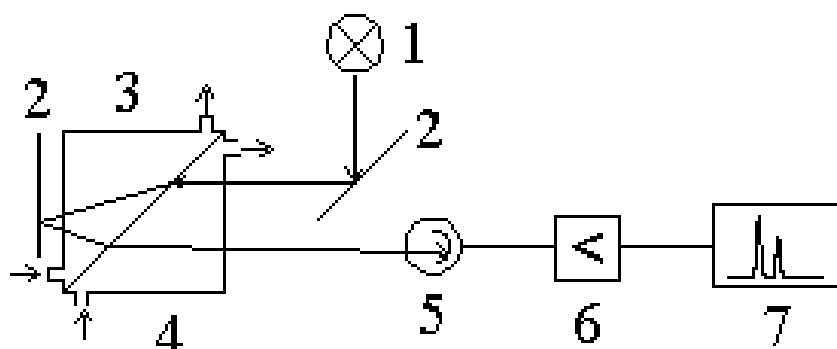
Spektrofotometrický detektor měří absorpenci elektromagnetického záření určité vlnové délky eluátu protékajícího kvyetou. Jednodušší detektory měří při dané vlnové délce v UV oblasti (220, 254, 436 a 546 nm), dokonalejší mají volitelnou vlnovou délku v rozsahu 200 – 800 nm. Nejdokonalejší je spektrofotometr s diodovým polem (DAD), který je řízený počítačem a snímá celé absorpční spektrum eluátu v reálném čase bez přerušení separace. Umožňuje také porovnávat získaná spektra s knihovnou spekter a vypočítat čistotu píku (identifikovat látku). Tento typ detektoru patří mezi nejpoužívanější při analýze léčiv, je velmi citlivý $10^{-9} - 10^{-10}$ g/ml a je použitelný při gradientové eluci [36, 37, 39].



Obr. č. 15: Schéma spektrofotometrického detektoru s diodovým polem [39]

1 – zdroj záření, 2 – štěrbinu, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná cela detektoru, 6 – holografická mřížka, 7 - fotodiody

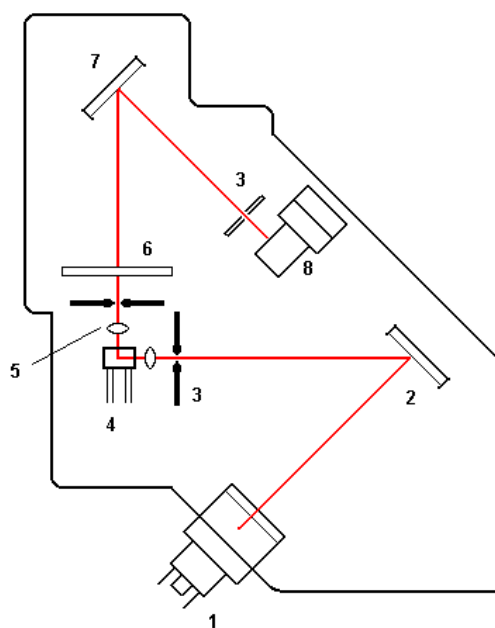
Refraktometrický detektor měří rozdíl mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Tento typ detektoru je velmi univerzální, ale není příliš citlivý (10^{-6} g/ml), vyžaduje pečlivé termostátování a není použitelný v gradientové eluci, a proto se pro stanovení léčiv příliš nepoužívá [37].



Obr. č. 16: Schéma refraktometrického detektoru [40]

1 - zdroj světla, 2 - zrcadlo, 3 - měrná cela, 4 - referenční cela, 5 - fotonásobič, 6 - zesilovač, 7 - zapisovač

Fluorimetrický (fluorescenční) detektor je založen na schopnosti některých látek absorbovat UV záření a pak vysílat záření na vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. U jednoduchých fluorescenčních detektorů se jako zdroj monochromatického excitačního záření používají rtuťové výbojky a interferenční filtr. Fluorescenční záření se detekuje současně při všech vlnových délkách. Novější detektory umožňují nastavit vlnovou délku excitovaného i emitovaného záření použitím monochromátoru. Tento typ detektoru je vysoce selektivní a vysoce citlivý (10^{-14} g/ml) a je použitelný při gradientové eluci, a proto je vhodný pro analýzu léčiv [32, 37, 41].



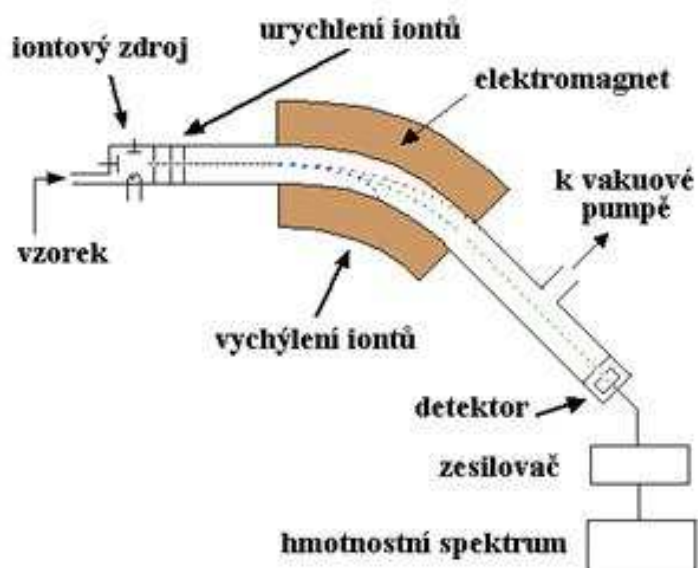
Obr. č. 17: Schéma fluorescenčního detektoru [41]

1 - výbojka (rtuťová nebo xenonová), 2 - excitační mřížka (monochromátor), 3 - štěrba, 4 - průtoková cela, 5 - mikročočky, 6 - cut-off filtr, 7 - emisní mřížka (monochromátor), 8 - fotonásobič

Elektrochemické detektory se používají, pokud jsou v roztoku obsaženy ionty oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizovatelné elektrodě. Mezi tyto typy detektorů patří detektor amperometrický, voltmetrický a polarografický. Jsou velmi citlivé ($10^{-9} - 10^{-12}$ g/ml), ale nelze je většinou použít při gradientové eluci [32, 37].

FTIR detektor (Fourier transform infrared detector) je univerzální detektor zpracovávající infračervená spektra složek v mobilní fázi [32].

Hmotnostní spektrometr je poslední dobou velmi využívaný pro detekci léčiv. Po výstupu z kolony je nutné eluát zbavit mobilní fáze. Molekuly léčiva se v hmotnostním spektrometru v plynném stavu ionizují nárazy elektronů, termoionizací nebo elektroionizací. Nabitě částice se v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separují podle podílu hmotnosti a náboje a je zaznamenáno hmotnostní spektrum. Hmotnostní detektory jsou vysoce citlivé a selektivní, ale finančně velmi náročné [37].



Obr. č. 18: Schéma hmotnostního spektrometru [42]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a vybavení

- Analytické váhy HR-120-EC, A&D Instruments, Japonsko
- pH metr InoLab WTW series, Maneko, CZ
- SPE extraktor Baker, model spe-12 G, membránová vývěva KIF LAB. Laboport, Maneko, CZ
- Přístroj pro sušení dusíkem Evaterm, Labicom, CZ
- Kolonky:
 - Supelclean™ENVI™ – 18 SPE, SRN
 - Oasis HLB, Cartridge, Waters, USA
- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, USA
- Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C-18, velikost 4,6x150 mm, velikost částic 5 µm (Agilent, USA)
- Detektor DAD Agilent 110 Series, USA
- Běžné laboratorní vybavení

3.2 Použitý software pro zpracování a interpretaci dat

- Microsoft Office Word 2003
- Microsoft Office Excel 2003
- ACD/ChemSketch FREEWARE, verze 10.0
- HP Chem Station pro LC 3D, Rev.B.01.01 (Agilent, USA)

3.3 Použité chemikálie a standardy

3.3.1 Chemikálie

- Acetonitril, Chromasolv® pro LC, Sigma - Aldrich, SRN
- Ethylacetát pro HPLC, Lach - Ner, s.r.o., CZ
- Ethanol, LiChrosolv, Merk, SRN
- Kyselina sírová, Lach – Ner, s.r.o., CZ
- Kyselina mravenčí, Sigma - Aldrich, SRN
- Kyselina fosforečná, Penta, CZ
- Methanol pro HPLC, Lachema a.s., CZ
- Mili Q voda

3.3.2 Standardy

- Naproxen, pro HPLC, čistota 99,9% Sigma – Aldrich, SRN
- Salicylic acid, čistota 99+%, Sigma - Aldrich Chemie, SRN

3.4 Vlastnosti stanovovaných analytů

3.4.1 Naproxen

Strukturní vzorec: C₁₄H₁₄O₃

Relativní molekulová hmotnost: M_r = 230,26

Vlastnosti: Bílý krystalický prášek, prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu a v 96% ethanolu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{14}O_3$ [24].

3.4.2 Kyselina salicylová (Salicylic acid)

Strukturní vzorec: $C_7H_6O_3$

Relativní molekulová hmotnost: $M_r = 138,12$

Vlastnosti: Bílá krystalická látka, špatně rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v 96% ethanolu. Počítáno na vysušenou látku, obsahuje 99,0 až 100,5 % sloučeniny $C_7H_6O_3$ [24].

3.5 Postupy stanovení

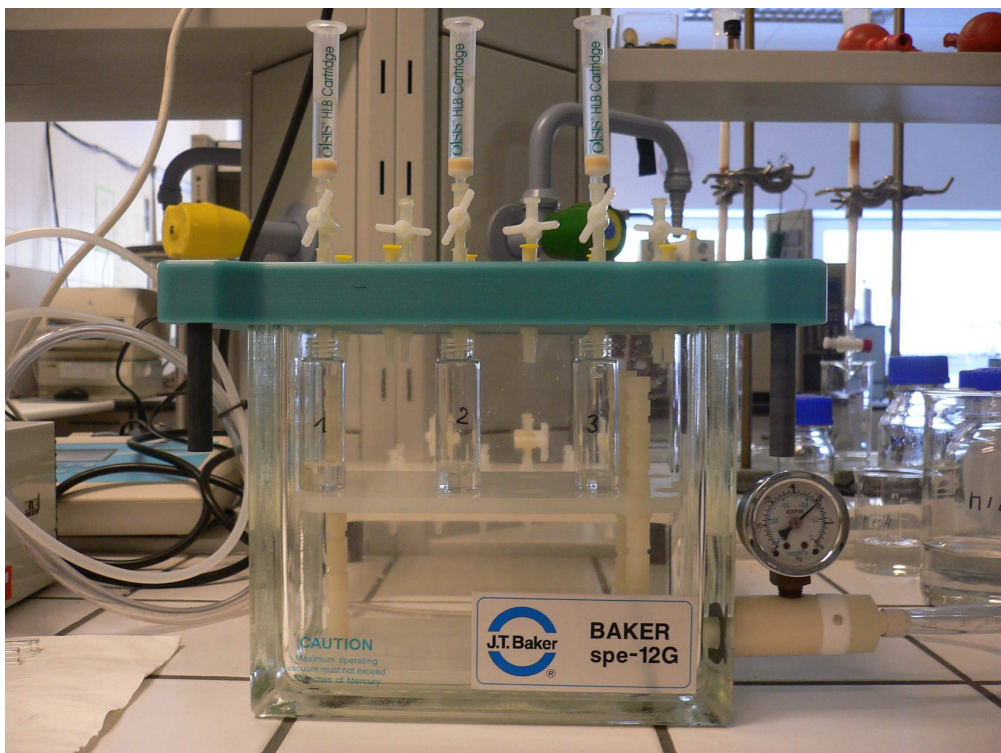
3.5.1 Izolace sledovaných analytů

Analyty byly izolovány pomocí SPE na kolonkách Oasis HLB:

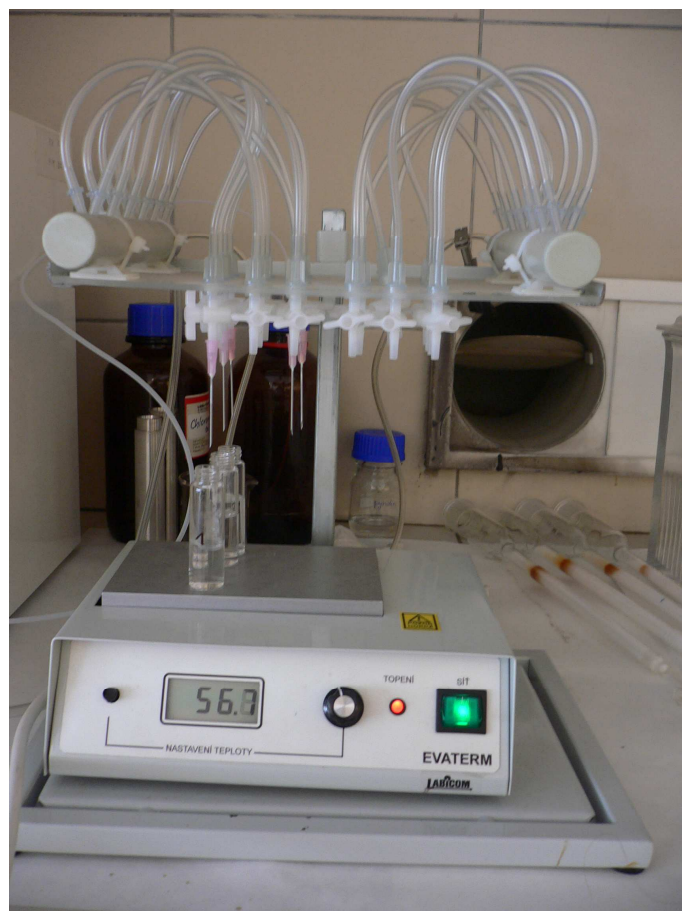
- Aktivace kolonky 6 ml methanolu, 5 ml mili Q vody
- Nanesení 30 ml vzorku (obr. č. 19)
- Promytí 1,5 ml mili Q vody
- Sušení proudem vzduchu
- Eluce 2 x 4 ml methanolu (obr. č. 20)
- Sušení proudem dusíku (obr. č. 21)
- Rozpuštění v 1 ml methanolu



Obr.č. 19: SPE – nanášení vzorku



Obr.č. 20: SPE - Eluce



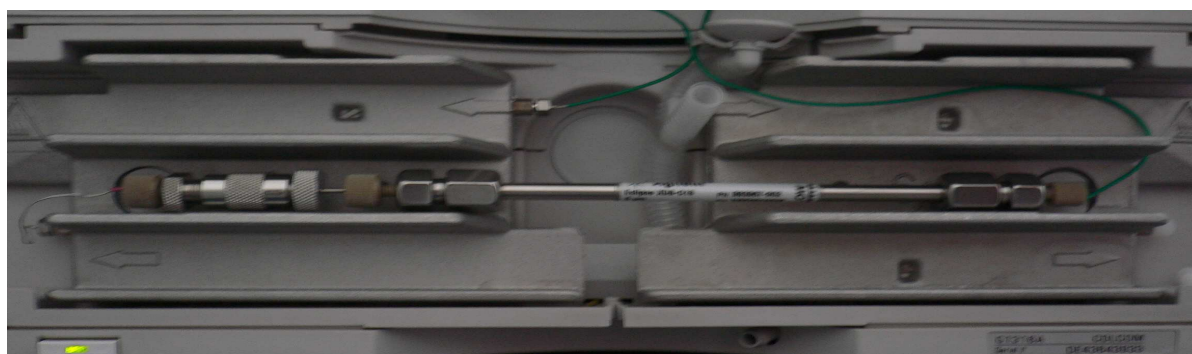
Obr. č. 21: Sušení dusíkem

3.5.2 Identifikace a kvantifikace analytů

Připravené vzorky byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series, využita byla kolona ZORBAX Eclipse XDB-C-18. K identifikaci přítomných analytů byl použit UV detektor typu DAD. Kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky.



Obr. č. 22: Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series s DAD Agilent 1100 Series



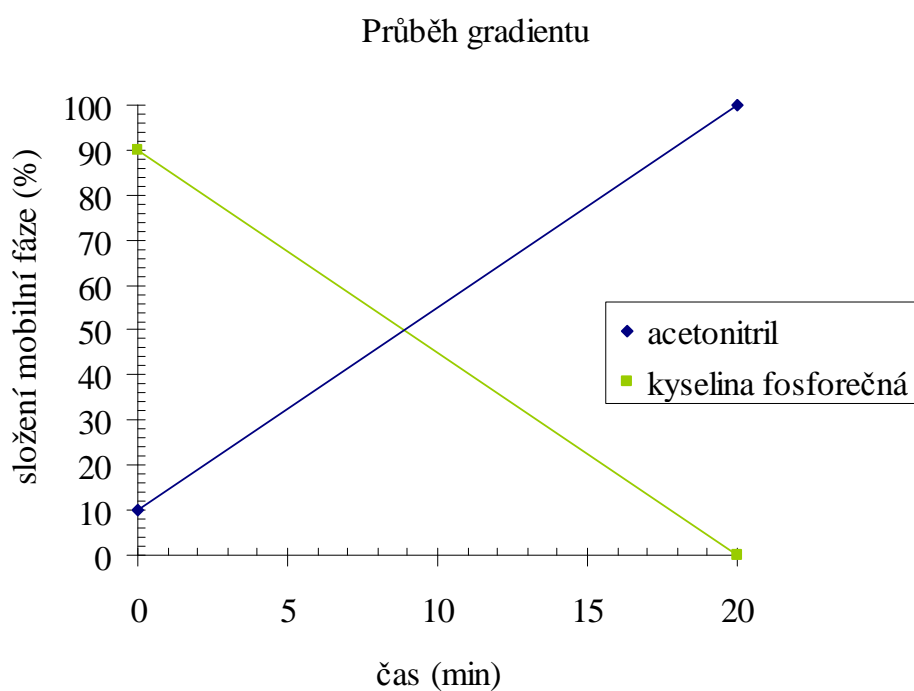
Obr. č. 23: Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C-18 s předkolonou

3.5.2.1 Chromatografické podmínky

- Mobilní fáze: acetonitril a 0,1% roztok kyseliny fosforečné
- Gradientová eluce (tabulka č. 1)
- Nástřik: 5 μ l
- Průtok: 1 ml/min
- Teplota: 20°C
- Vlnová délka: 230 nm
- Doba analýzy: 20 min

Tabulka č. 1: Časový průběh gradientu mobilní fáze

čas (min)	CH ₃ CN	H ₃ PO ₄
0	10	90
20	100	0



Obr. č. 24: Grafický průběh gradientu mobilní fáze

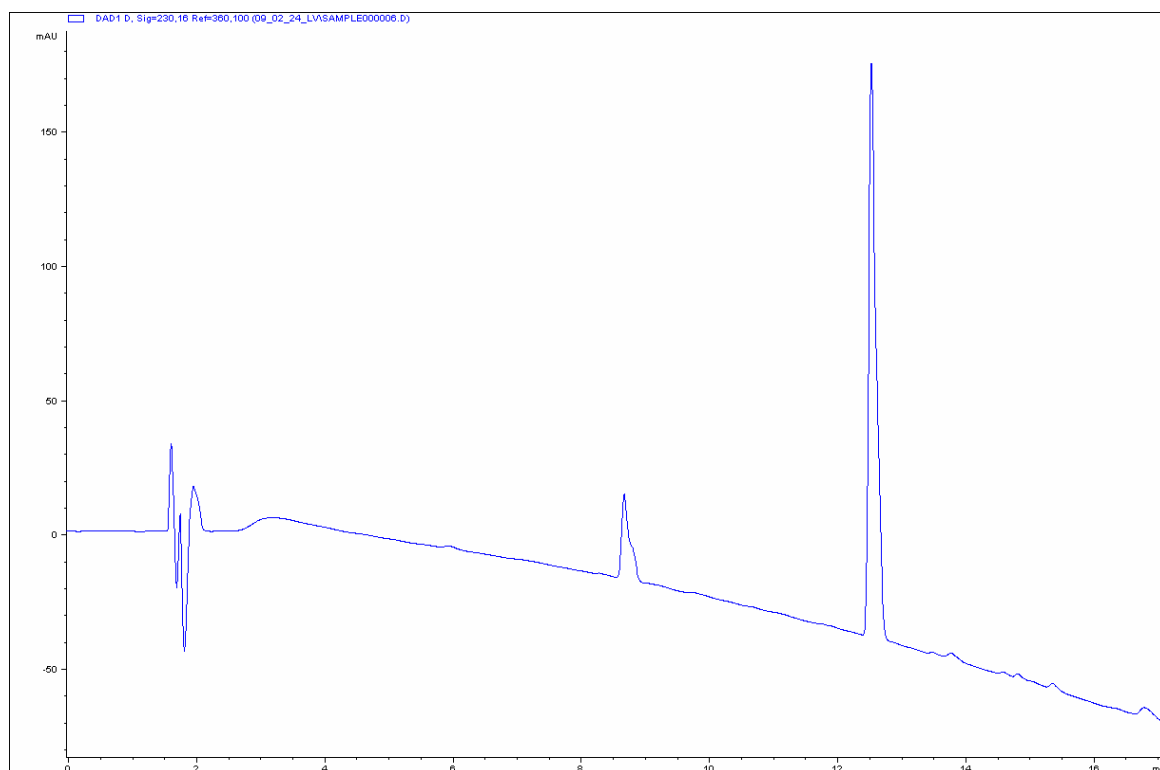
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Určení a optimalizace chromatografických podmínek

Standardní roztoky o koncentraci 0,005 mg/ml byly připraveny ředěním methanolových roztoků kyseliny salicylové a naproxenu o koncentraci 0,5 mg/ml v mili Q vodě.

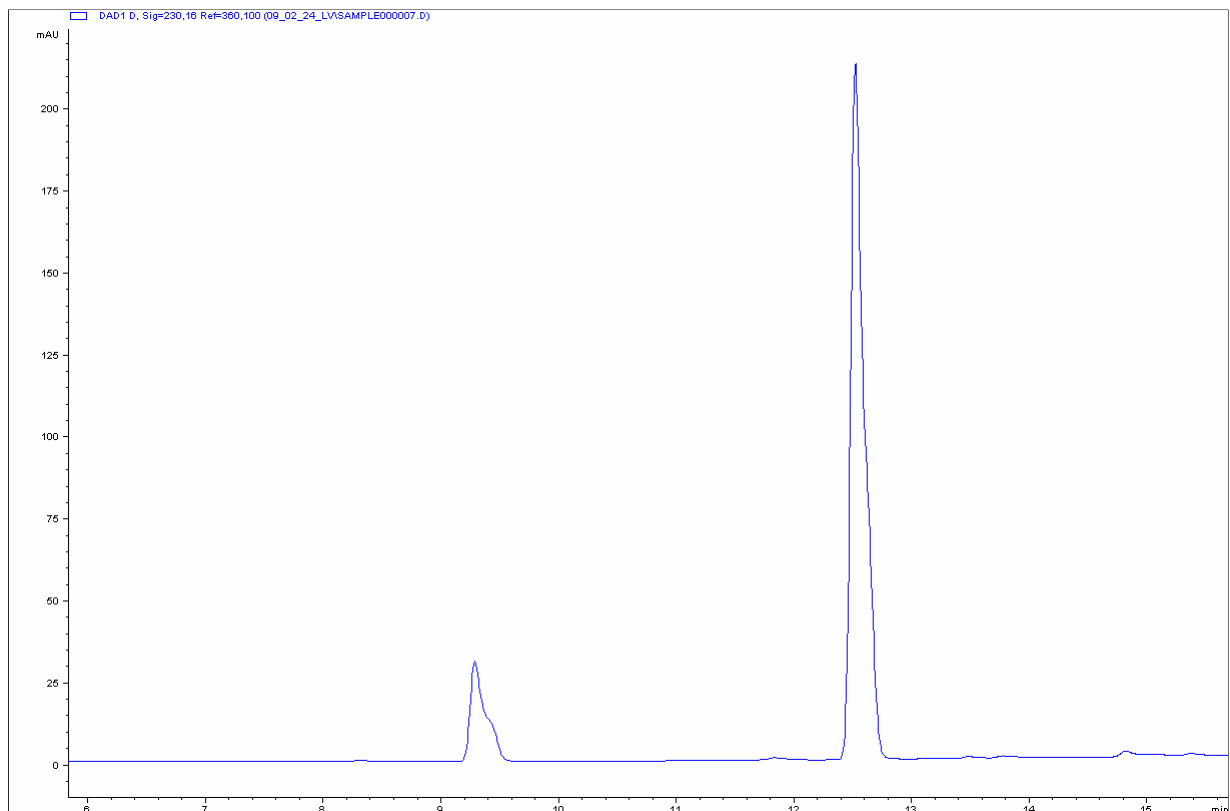
4.1.1 Optimalizace mobilní fáze

Pro optimální proměření stanovovaných analytů bylo nutné vybrat vhodnou mobilní fázi. Ve všech případech byl použit acetonitril, který se kombinoval s kyselinou sírovou (pH = 2,1), 0,1% roztokem kyseliny fosforečné a 0,01 M kyselinou mravenčí.



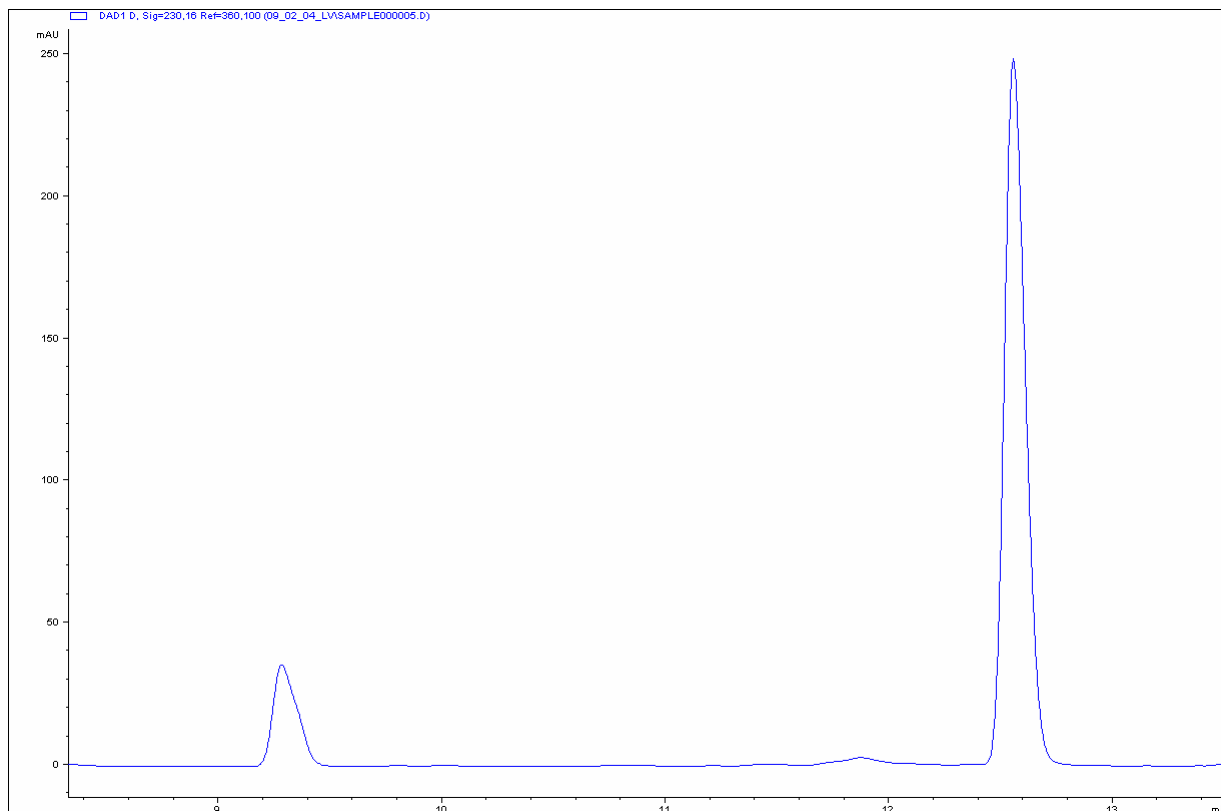
Obr. č. 27: Chromatogram kys. salicylové a naproxenu (MF = 0,01 M HCOOH + ACN), retenční čas kyseliny salicylové: 8,661 min, retenční čas naproxenu: 12,518 min

Kyselina mravenčí jako mobilní fáze není vhodná, protože jí během proměřování klesá baseline.

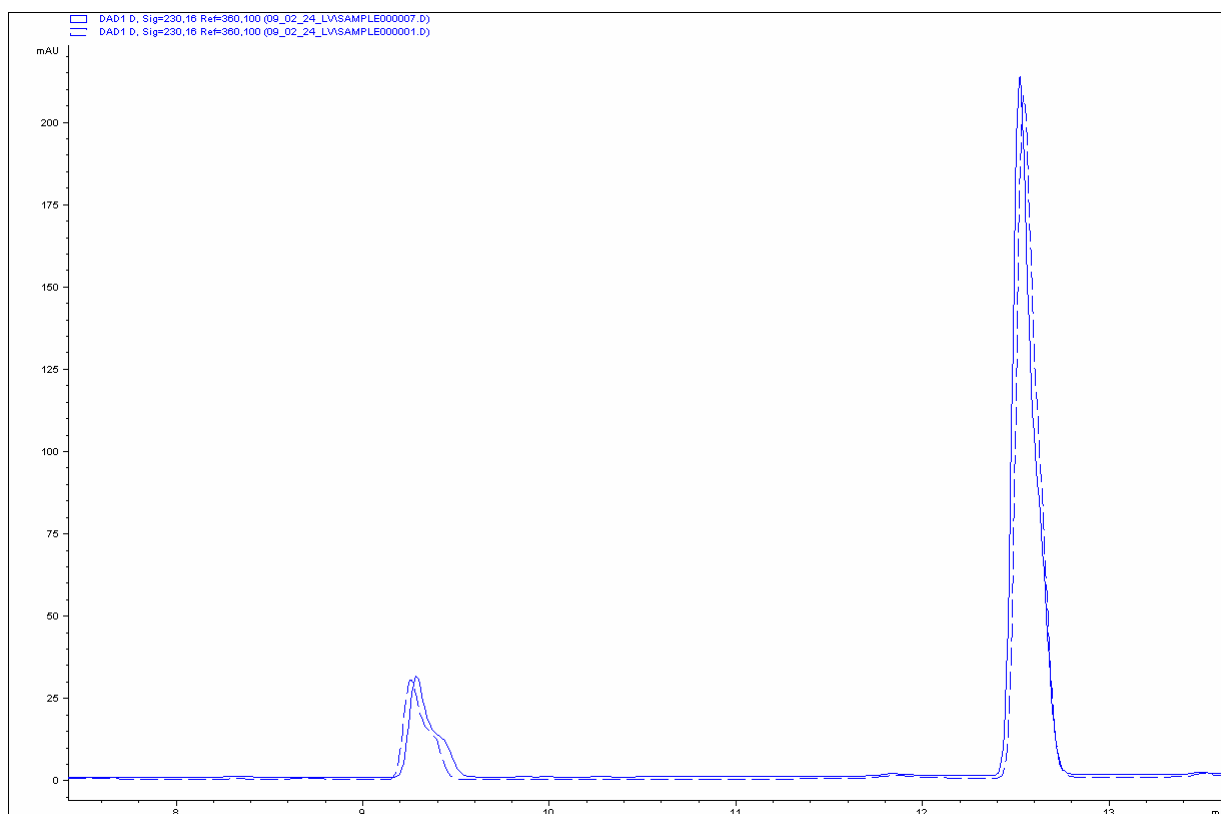


Obr. č. 28: Chromatogram kys. salicylové a naproxenu (MF = H₂SO₄ + ACN), retenční čas kyseliny salicylové: 9,284 min, retenční čas naproxenu: 12,519 min

Kyselina sírová se jeví jako vhodná mobilní fáze pro stanovení těchto léčiv, avšak pík kyseliny salicylové chvostuje.



Obr. č. 29: Chromatogram kys. salicylové a naproxenu ($MF = 0,1\% H_3PO_4 + ACN$).
Retenční čas kyseliny salicylové: 9,255 min, retenční čas naproxenu: 12,540 min

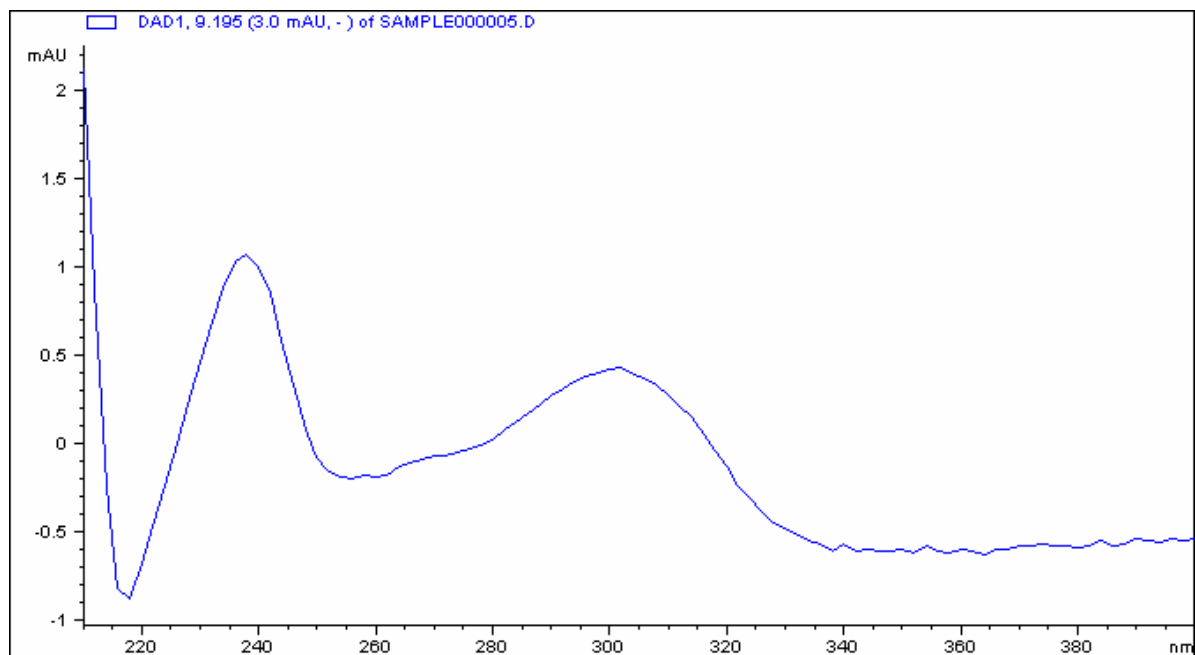


Obr. č. 30: Chromatogram kys. salicylové a naproxenu: Srovnání MF: H_2SO_4 (plná čára) a H_3PO_4 (přerušovaná čára) + ACN

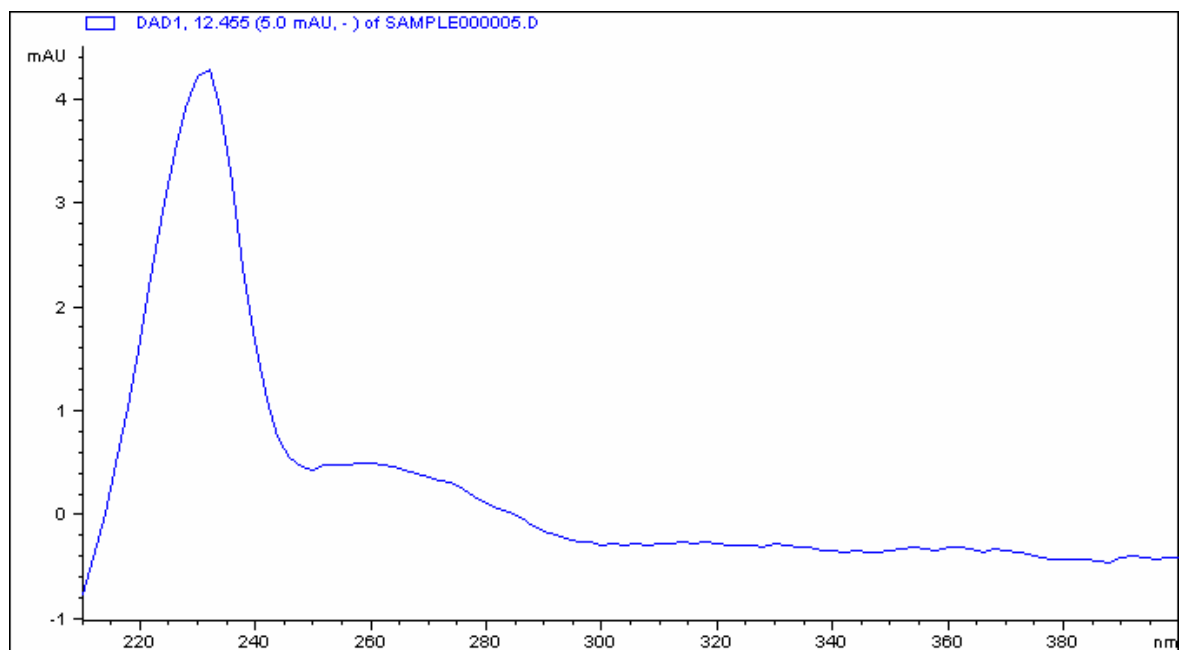
Srovnáním výše uvedených chromatogramů byla jako nejvhodnější mobilní fáze zvolena 0,1% H₃PO₄ a acetonitril. Retenční časy analytů jsou v tomto případě nejkratší a píky se vyznačují nejlepším tvarem.

4.1.2 Optimalizace vlnové délky

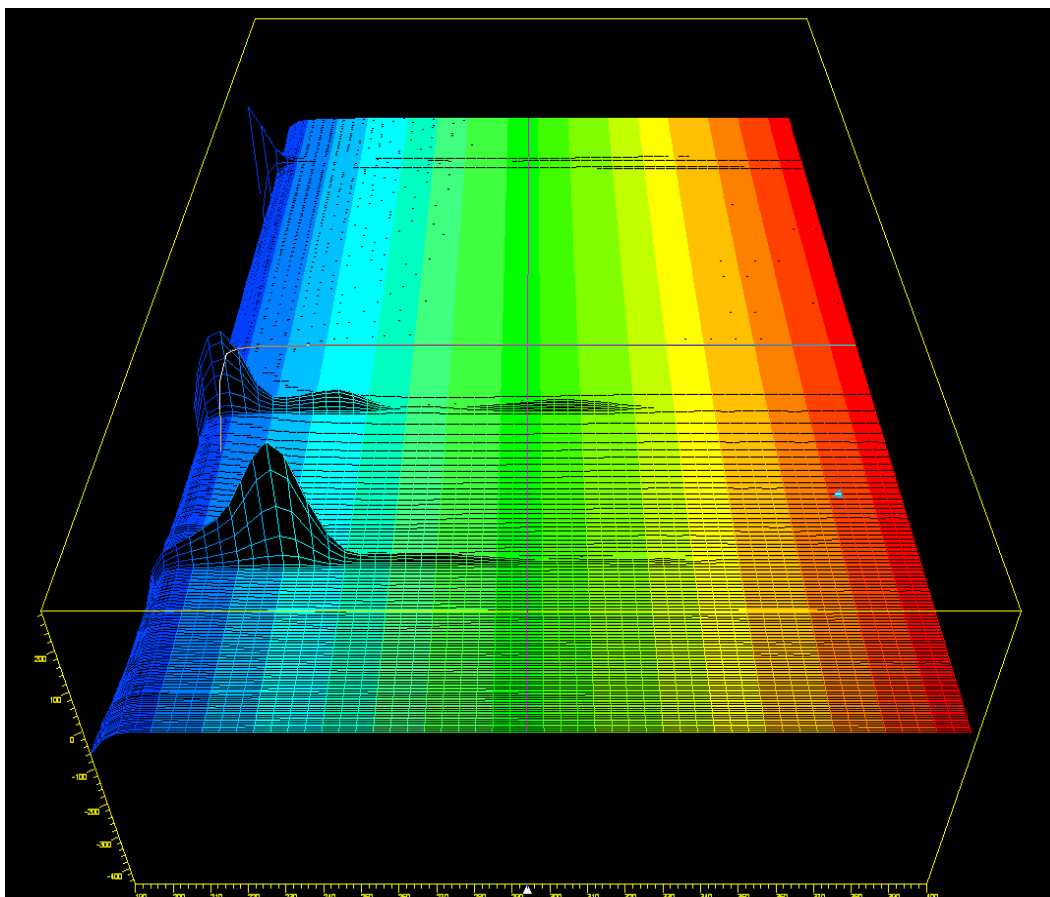
Pro optimální chromatografické podmínky je třeba vybrat vlnovou délku, při které bude probíhat měření. Z níže uvedených průběhů absorpčních spekter analytů vyplývá, že pro měření kyseliny salicylové i naproxenu je nejvhodnější vlnová délka 230 nm.



Obr. č. 31: Spektrum kyseliny salicylové



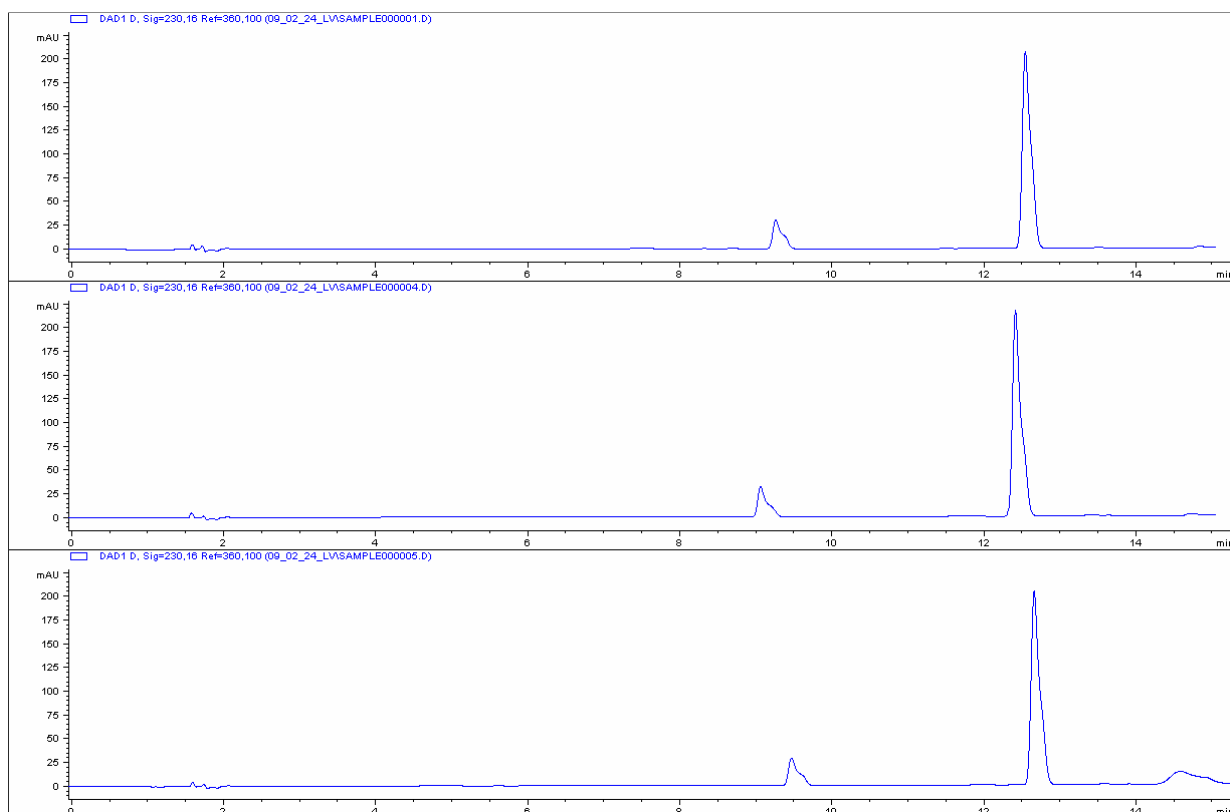
Obr. č. 32: Spektrum naproxenu



Obr. č. 33: 3-D spektrum kyseliny salicylové a naproxenu

4.1.3 Optimalizace teploty

Teplota je dalším důležitým faktorem při optimalizaci podmínek HPLC. Porovnáním níže uvedených chromatogramů byla jako nejvhodnější zvolena teplota 20°C, protože píky jsou symetričtější než při 25°C a retenční časy analytů jsou kratší než při teplotě 15°C.

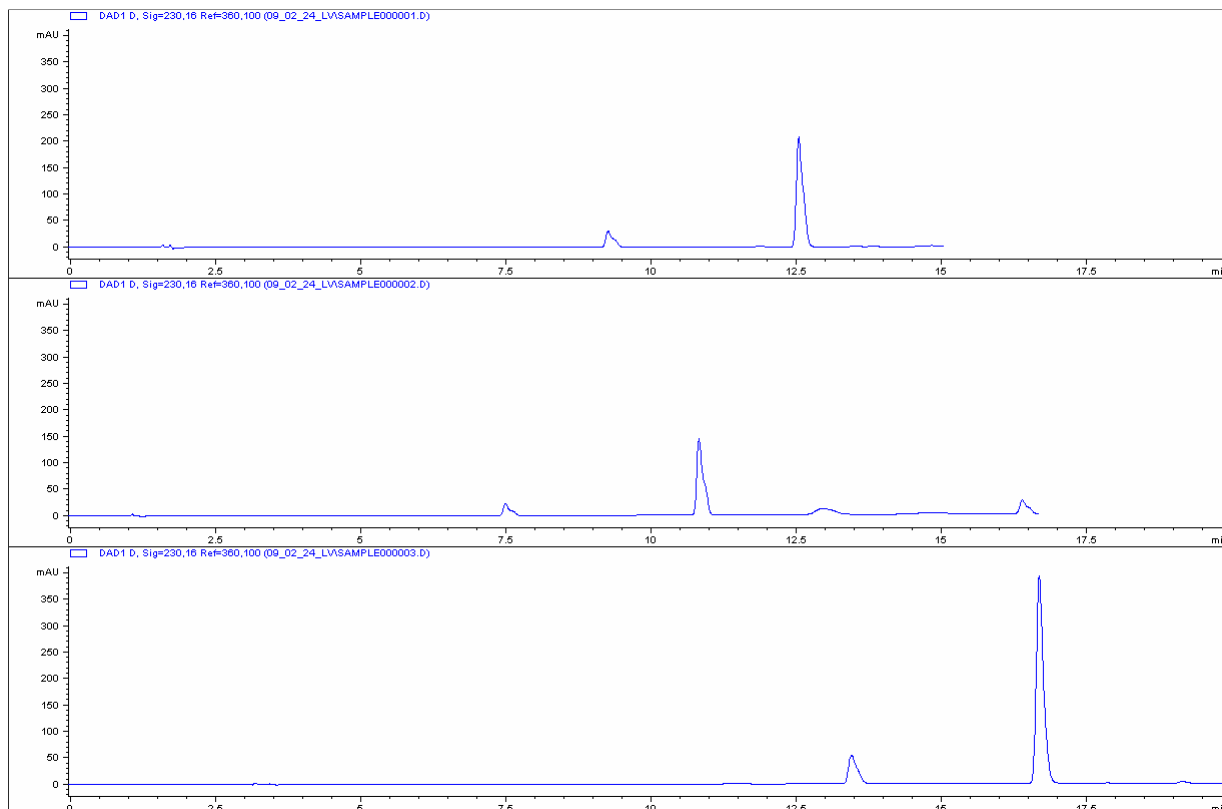


Obr. č. 34: Chromatogramy kyseliny salicylové a naproxenu: vliv teploty

- 1) 20°C, retenční čas kyseliny salicylové: 9,255 min, retenční čas naproxenu: 12,540 min
- 2) 25°C, retenční čas kyseliny salicylové: 9,059 min, retenční čas naproxenu: 12,407 min
- 3) 15°C, retenční čas kyseliny salicylové: 9,464 min, retenční čas naproxenu: 12,657 min

4.1.4 Optimalizace průtoku mobilní fáze

Průtok mobilní fáze významně ovlivňuje retenční časy a odezvu analytů. Jako nejvhodnější se jeví průtok 1 ml/min, protože při vyšším průtoku dochází k chvostování píků a při nižším průtoku je výrazně delší retenční čas analytů.



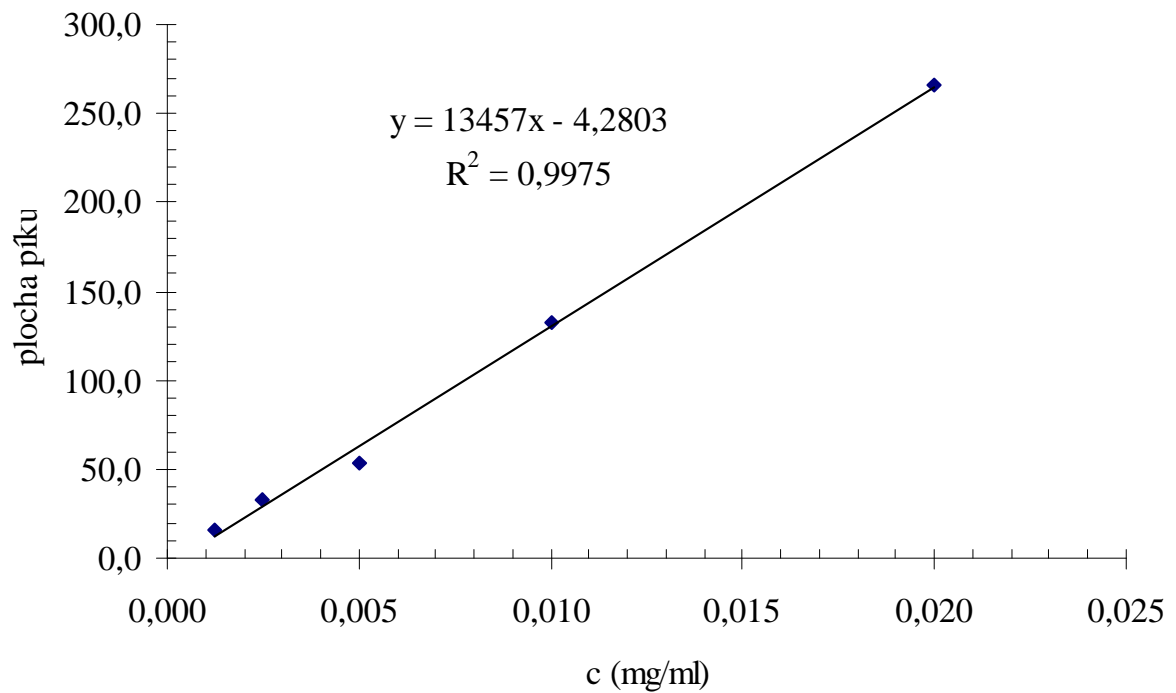
Obr. č. 34: Chromatogramy kyseliny salicylové a naproxenu: Vliv množství průtoku mobilní fáze

- 1) 1 ml/min, retenční čas kyseliny salicylové: 9,255 min, retenční čas naproxenu: 12,540 min
- 2) 1,5 ml/min, retenční čas kyseliny salicylové: 7,486 min, retenční čas naproxenu: 10,821 min
- 3) 0,5 ml/min, retenční čas kyseliny salicylové: 13,448 min, retenční čas naproxenu: 16,863 min

4.2 Optimalizace postupu extrakce pevnou fází (SPE)

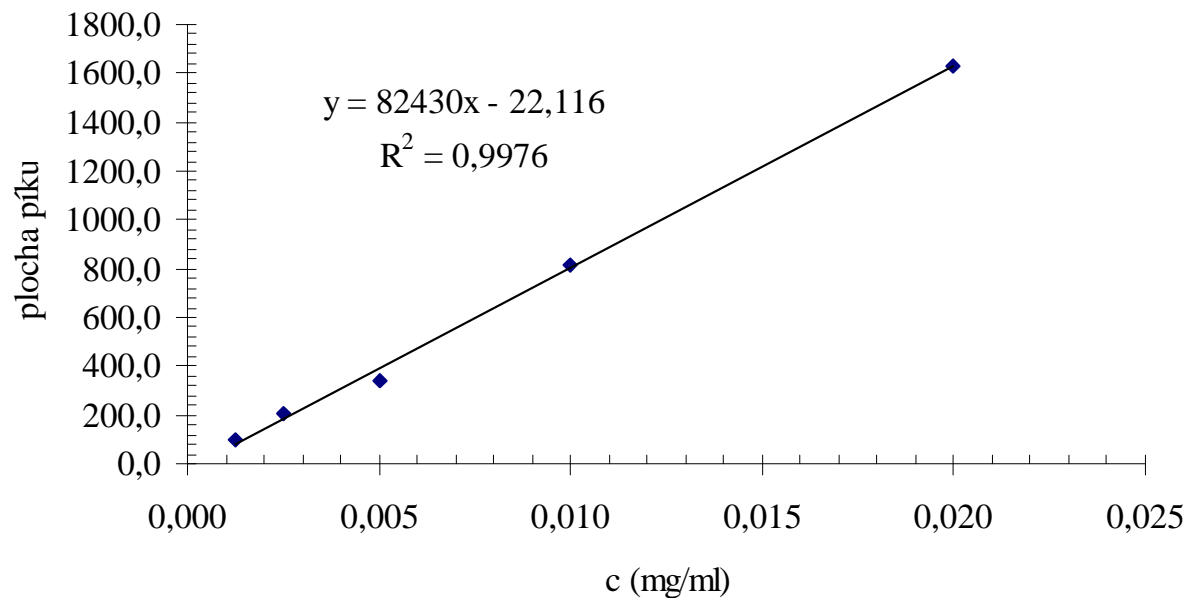
Pro nalezení vhodné úpravy vzorku byly použity dva typy kolonek. Nejprve byly analyty izolovány na kolonkách SupelcleanTMENVITM – 18 SPE. Byly porovnávány výtěžnosti jednotlivých postupů pro připravené roztoky ze standardů kyseliny salicylové a naproxenu o koncentraci $c = 0,005 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků naproxenu a kyseliny salicylové v methanolu. Poté byly porovnávány postupy pro stejné vzorky na kolonkách Oasis HLB. Výtěžnost byla vypočítána pomocí kalibrační křivky.

Kalibrační křivka kyseliny salicylové v methanolu



Obr. č. 25: Kalibrační křivka kyseliny salicylové v methanolu

Kalibrační křivka naproxenu v methanolu



Obr. č. 26: Kalibrační křivka naproxenu v methanolu

4.2.1 Postupy pro kolonky SupelcleanTMENVITM – 18 SPE

Pro nalezení optimálních výtěžností bylo na kolonkách SupelcleanTMENVITM – 18 SPE zkoušeno několik postupů:

- Postup č. 1:
 - Aktivace kolonky 3 ml acetonitrilu a 3 ml mili Q vody
 - Nanesení 30 ml vzorku
 - Promytí 2 ml mili Q vody
 - Eluce 2 x 2 ml methanolu
 - Sušení dusíkem
 - Rozpuštění v 1 ml methanolu
- Postup č. 2:
 - Aktivace kolonky 5 ml methanolu a 3 ml mili Q vody
 - Nanesení 30 ml vzorku
 - Promytí 3 ml mili Q vody
 - Sušení 30 min proudem vzduchu
 - Eluce 2 x 4 ml methanolu
 - Sušení dusíkem
 - Rozpuštění v 1 ml methanolu
- Postup č. 3:
 - Aktivace kolonky 2 ml ethylacetátu, 2 ml methanolu a 2 ml mili Q vody
 - Nanesení 30 ml vzorku
 - Promytí 2 ml 5% methanolu
 - Eluce 3 x 2 ml směsi methanolu a ethylacetátu (1:1)
 - Sušení dusíkem
 - Rozpuštění v 1 ml methanolu
- Postup č. 4:
 - Aktivace kolonky 2 x 5 ml methanolu a 2 x 5 ml mili Q vody
 - Nanesení 30 ml vzorku
 - Promytí 2 x 5 ml mili Q vody
 - Sušení 15 min proudem vzduchu
 - Eluce 3 x 2 ml methanolu
 - Sušení dusíkem
 - Rozpuštění v 1 ml methanolu.

4.2.1.1 Výtěžnosti kyseliny salicylové a naproxenu

Tabulka č. 2: Výtěžnosti kyseliny salicylové na kolonkách SupelcleanTMENVITM – 18 SPE:

Postup č.	Původní koncentrace(mg/ml)	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,005	$1,172 \cdot 10^{-4}$	2,37
2	0,005	$1,098 \cdot 10^{-4}$	2,33
3	0,005	$1,577 \cdot 10^{-4}$	3,19
4	0,005	$3,860 \cdot 10^{-4}$	7,80

Tabulka č. 3: Výtěžnosti naproxenu na kolonkách SupelcleanTMENVITM – 18 SPE:

Postup č.	Původní koncentrace (mg/ml)	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,005	$5,903 \cdot 10^{-4}$	11,82
2	0,005	$6,240 \cdot 10^{-4}$	12,49
3	0,005	$6,066 \cdot 10^{-4}$	12,14
4	0,005	$1,781 \cdot 10^{-3}$	36,65

Výtěžnosti kyseliny salicylové (tab. č. 2) i naproxenu (tab. č. 3) jsou na kolonkách SupelcleanTMENVITM – 18 SPE u všech postupů velmi nízké. Pro tato léčiva je tedy tento typ kolonky nevhodný, další způsoby izolace byly tedy zkušeny na kolonkách Oasis HLB.

4.2.2 Postupy pro kolonky Oasis HLB

- Postup č. 1:
 - Aktivace kolonky 6 ml methanolu, 5 ml mili Q vody
 - Nanesení 30 ml vzorku
 - Promytí 1,5 ml mili Q vody
 - Sušení proudem vzduchu
 - Eluce 2 x 4 ml methanolu
 - Sušení proudem dusíku
 - Rozpuštění v 1 ml methanolu
- Postup č. 2:
 - Aktivace kolonky 6 ml acetonu, 6 ml methanolu a 6 ml mili Q vody
 - Nanesení 30 ml vzorku
 - Sušení proudem vzduchu
 - Eluce 3 x 2 ml methanolu
 - Sušení proudem dusíku
 - Rozpuštění v 1 ml methanolu
- Postup č. 3:
 - Aktivace kolonky 5 ml ethylacetátu, 5 ml methanolu a 5 ml mili Q vody
 - Nanesení 30 ml vzorku
 - Promytí 1,5 ml mili Q vody
 - Sušení proudem vzduchu
 - Eluce 2 x 4 ml ethylacetátu
 - Sušení proudem dusíku
 - Rozpuštění v 1 ml methanolu
- Postup č. 4:
 - Aktivace 3 ml ethylacetátu, 3 ml acetonu, 3 ml mili Q vody
 - Nanesení 30 ml vzorku
 - Sušení proudem vzduchu
 - Eluce 6 ml směsi ethylacetátu a acetonu (1:1)
 - Sušení proudem dusíku
 - Rozpuštění v 1 ml methanolu

- Postup č. 5:
 - Aktivace 6 ml methanolu a 6 ml mili Q vody
 - Nanesení 30 ml vzorku
 - Promytí 1 ml 5% methanolu
 - Eluce 3 ml směsí acetonitrilu a ethanolu (70:30) a 2 ml směsí acetonitrilu a methanolu (70:30)
 - Sušení proudem dusíku
 - Rozpuštění v 1 ml methanolu.

4.2.2.1 Výtěžnosti kyseliny salicylové a naproxenu

Tabulka č. 4: Výtěžnosti kyseliny salicylové na kolonkách Oasis HLB:

Postup č.	Původní koncentrace (mg/ml)	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,005	$4,395 \cdot 10^{-3}$	88,79
2	0,005	$3,895 \cdot 10^{-3}$	78,69
3	0,005	$3,580 \cdot 10^{-3}$	72,33
4	0,005	$4,316 \cdot 10^{-3}$	87,19
5	0,005	$3,561 \cdot 10^{-3}$	71,93

Tabulka č. 5: Výtěžnosti naproxenu na kolonkách Oasis HLB:

Postup č.	Původní koncentrace (mg/ml)	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	0,005	$5,233 \cdot 10^{-3}$	104,76
2	0,005	$4,488 \cdot 10^{-3}$	89,84
3	0,005	$5,440 \cdot 10^{-3}$	108,90
4	0,005	$4,939 \cdot 10^{-3}$	98,88
5	0,005	$4,744 \cdot 10^{-3}$	94,98

Tabulka č. 4 a 5 ukazuje výtěžnosti naproxenu a kyseliny salicylové při zkoušení různých postupů na kolonkách Oasis HLB. Výtěžnosti všech postupů jsou v rozmezí (89,94 - 108,90) %. Pro kyselinu salicylovou je nejlepší postup č. 1, pro naproxen postup č. 1 a 3. Dále bylo pracováno s těmito dvěma postupy.

Tabulka č. 6: Výtěžnosti kyseliny salicylové na kolonkách Oasis HLB pro postup č.1:

postup č. 1	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	$3,753 \cdot 10^{-3}$	75,82
2	$3,391 \cdot 10^{-3}$	68,50
3	$4,668 \cdot 10^{-3}$	94,30
4	$4,786 \cdot 10^{-3}$	96,69
5	$4,571 \cdot 10^{-3}$	92,35

Průměrná výtěžnost: 85,53%

Průměrná koncentrace: $4,234 \cdot 10^{-3}$ mg/ml

Směrodatná odchylka: $5,565 \cdot 10^{-4}$ mg/ml

Rozptyl: $3,097 \cdot 10^{-7}$ mg/ml

Tabulka č. 7: Výtěžnosti naproxenu na kolonkách Oasis HLB pro postup č.1:

Postup č. 1	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	$4,193 \cdot 10^{-3}$	83,94
2	$3,931 \cdot 10^{-3}$	78,70
3	$4,071 \cdot 10^{-3}$	81,51
4	$4,115 \cdot 10^{-3}$	82,38
5	$4,019 \cdot 10^{-3}$	80,46

Průměrná výtěžnost: 81,40 %

Průměrná koncentrace: $4,066 \cdot 10^{-3}$ mg/ml

Směrodatná odchylka: $8,830 \cdot 10^{-5}$ mg/ml

Rozptyl: $7,798 \cdot 10^{-9}$ mg/ml

Tabulka č. 8: Výtěžnosti kyseliny salicylové na kolonkách Oasis HLB pro postup č.3:

postup č. 3	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	$2,063 \cdot 10^{-3}$	41,67
2	$2,451 \cdot 10^{-3}$	49,52
3	$1,953 \cdot 10^{-3}$	39,46
4	$1,893 \cdot 10^{-3}$	38,25
5	$1,818 \cdot 10^{-3}$	36,74

Průměrná výtěžnost: 41,13 %

Průměrná koncentrace: $2,036 \cdot 10^{-3}$ mg/ml

Směrodatná odchylka: $2,226 \cdot 10^{-4}$ mg/ml

Rozptyl: $4,956 \cdot 10^{-8}$ mg/ml

Tabulka č. 9: Výtěžnosti naproxenu na kolonkách Oasis HLB pro postup č.3:

Postup č. 3	Výsledná koncentrace (mg/ml)	Výtěžnost (%)
1	$3,782 \cdot 10^{-3}$	75,71
2	$3,956 \cdot 10^{-3}$	79,21
3	$4,243 \cdot 10^{-3}$	84,94
4	$4,576 \cdot 10^{-3}$	91,61
5	$4,436 \cdot 10^{-3}$	88,80

Průměrná výtěžnost: 84,05 %

Průměrná koncentrace: $4,199 \cdot 10^{-3}$ mg/ml

Směrodatná odchylka: $2,943 \cdot 10^{-4}$ mg/ml

Rozptyl: $8,663 \cdot 10^{-8}$ mg/ml

Kyselina salicylová má nejvyšší výtěžnost u postupu č. 1 (85,53%) (tab. č. 6), naproxen u postupu č. 3 (84,05 %) (tab. č. 9). Vzhledem k velmi nízké výtěžnosti kyseliny salicylové u postupu č. 3 (41,13 %) (tab. č. 8) byl jako optimální zvolen postup č. 1.

4.3 Optimalizovaná metoda pro stanovení kyseliny salicylové a naproxenu

Provedením výše uvedených experimentů byly nalezeny optimální podmínky pro izolaci kyseliny salicylové a naproxenu SPE a jejich následnou analýzu HPLC. Extrakce pevnou fází se provede na kolonkách Oasis HLB následujícím postupem:

- Aktivace kolonky 6 ml methanolu, 5 ml mili Q vody
- Nanesení 30 ml vzorku
- Promytí 1,5 ml mili Q vody
- Sušení proudem vzduchu
- Eluce 2 x 4 ml methanolu
- Sušení proudem dusíku
- Rozpuštění v 1 ml methanolu.

Analýza vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií se provede za těchto podmínek:

- MF: acetonitril + 0,1% roztok kyseliny fosforečné gradientovým měřením
- Vlnová délka: 230 nm
- Teplota 20°C
- Průtok: 1 ml/min

5 ZÁVĚR

Byla zpracována rešerše obsahující základní informace o analgetikách, jejich průniku do životního prostředí a metodách stanovení těchto léčiv.

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat metodický postup pro stanovení vybraných analgetik v modelových vzorcích vod a tuto metodu optimalizovat, aby byla použitelná pro stanovení těchto léčiv v reálných vzorcích.

- Jako vhodná analgetika byla vybrána kyselina salicylová a naproxen, jelikož jsou velmi často obsaženy v medikamentech.
- Izolace léčiv byla provedena extrakcí na pevné fázi (SPE), byl vybrán vhodný typ sorbetu a optimální postup pro uskutečnění extrakce.
- Vlastní analýza analgetik byla provedena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s detektorem s diodovým polem (HPLC - DAD), kde byla pro optimální stanovení vybrána vhodná vlnová délka, mobilní fáze, teplota a průtok.

Optimalizovaná metoda bude použita pro stanovení analytů v reálných vzorcích při řešení navazující diplomové práce.

6 LITERÁRNÍ ZDROJE

- [1] Hynie, S.: *Psychofarmakologie v praxi : Farmakologie látek ovlivňujících CNS a senzorický systém*. 1. vyd. Praha : Galén, 1995. 320 s. ISBN 80-85824-17-5.
- [2] Miloschewsky, D.: *Analgetika - minimum pro praxi*. Odpovědná redaktorka Markéta Homolová. 1. vyd. Praha : Triton, 1999. 152 s. Levou zadní; sv. 34. ISBN 80-7254-043-2.
- [3] Bouček, J., Pidrman, V.: *Psychofarmaka v medicíně*. Odpovědná redaktorka Olga Kopaková. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2005. 304 s. ISBN 80-247-1136-2.
- [4] Rokyta, R.: Psychogenní bolest. *Psychiatrie* [online]. 2004, roč. 8, č. 1 [cit. 2008-12-04], s. 21-25. Dostupný z WWW: <<http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych104/07.htm>>. ISSN 1211-7579.
- [5] Hakl, M., Hřib, R.: Akutní bolest. *Remedia : farmaceutický dvouměsíčník* [online]. 2005, č. 4 [cit. 2008-12-18]. Dostupný z WWW: <<http://www.remédia.cz/clanek.php?unit=347&parent=100001&action=88>>.
- [6] Borovanský, A., Beneš, L.: *Farmaceutická chemie (Farmakochemie) : Léčiva s účinkem na centrální a periferní nervový systém*. 1. vyd. Brno : Ediční středisko Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 1999. 234 s. ISBN 80-85114-78-X.
- [7] Wenke, M., Hynie, S., Mráz, M.: *Farmakologie*. Odpovědná redaktorka Zdeňka Chvojková. 1. vyd. Praha 1 : Avicentrum, zdravotnické nakladatelství, 1977. 500 s. Učebnice pro lékařské fakulty. ISBN 08-049-77.
- [8] Lincová, D., Farghali, H., et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. doplněné a přepracované vyd. Praha : Galén, 2007. 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [9] Hampl, F., Rádl, S., Paleček, J.: *Farmakochemie*. 2. rozš. vyd. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2007. 450 s., CD-rom s elektronickou verzí. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [10] *Biologická membrána* [online]. 2006 , 14. 10. 2008 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Biologick%C3%A1_membr%C3%A1na>.
- [11] Prokeš, J., et al.: *Základy toxikologie II. : Biotransformace léčiv a její význam pro toxikologickou praxi*. 1. vyd. Praha : Karolinum - nakladatelství Univerzity Karlovy, 1998. 92 s. ISBN 80-7184-419-5.
- [12] Kosjek, T., et al.: Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2007, vol. 26, no. 11 [cit. 2008-12-27], s. 1076-1085. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V5H-4R0CJXW-1/2/c513904be473839c766238e9ac5c8c11>>. ISSN 0165-9936.
- [13] Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J.: The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase

extraction and ultra performance liquid chromatography–negative electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta : The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry* [online]. 2008, vol. 74, is. 5 [cit. 2008-12-27], s. 1299-1312. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THP-4PKPGP0-1/2/109e3dc43f27f7fa7029411fae940482>>. ISSN 0039-9140.

[14] Fatta, D., et al.: Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2007, vol. 26, no. 6 [cit. 2008-12-27], s. 515-533. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V5H-4N1JRKV-1/2/de9e48307af1ec3cbb21ac473ba69491>>. ISSN 0165-9936.

[15] Hernando, M. D., et al.: Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta : The International Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry* [online]. 2006, vol. 69, is. 2 [cit. 2008-12-27], s. 334-342. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THP-4HKMPM7-1/2/4d7f440557973b8faa10c556fb95b43b>>. ISSN 0039-9140.

[16] Mompelat, S., Lebot, B., Thomas, O.: Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International : A Journal of Environmental Science, Risk & Health* [online]. 2008, [cit. 2009-04-15]. Tiskne se. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V7X-4V5XP36-1/2/a4ffa84817de10c74c474ceddf254419>>. ISSN 0160-4120.

[17] Kraigher, B., et al.: Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors. *Water Research : A Journal of the International Water Association (IWA)* [online]. 2008, vol. 42, is. 17 [cit. 2009-04-04], s. 4578-4588. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V73-4T7085K-1/2/fb2d4711843889f3ae9c0eaa259404f9>>. ISSN 0043-1354.

[18] Quinn, B., Gagné, F., Blaise, Ch.: An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of The Total Environment : An International Journal for Scientific Research into the Environment and its Relationship with Humankind* [online]. 2008, vol. 389, is. 2-3 [cit. 2009-03-19], s. 306-314. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V78-4PVY2M0-1/2/d62b5aa51c3248a8b66e76c7350aa71b>>. ISSN 0048-9697.

[19] Flaherty, C. M., Dodson, S. I.: Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* [online]. 2005, vol. 61, is. 2 [cit. 2009-03-19], s. 200-207. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V74-4FX23DG-7/2/7af6d9cc60773124ce369c785fdc7e6f>>. ISSN 0045-6535.

[20] Crane, M., Watts, Ch., Boucard, T.: Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment : An International Journal for Scientific Research into the Environment and its Relationship with Humankind* [online]. 2006, vol. 367, is. 1 [cit. 2009-03-19], s. 23-41. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V78-4K4WGYC-2/2/332c70ba2e3dc1d87d0d9765e4028b55>>. ISSN 0048-9697.

- [21] Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L.: Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research : A Journal of the International Water Association (IWA)* [online]. 2007, vol. 41, is. 5 [cit. 2009-01-15], s. 1001-1012. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V73-4MXSY56-2/2/5d4b44120685bc91e9552634d53cf1d7>>. ISSN 0043-1354.
- [22] Santos, J. L., Aparicio, I., Alonso, E.: Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). *Environment International : A Journal of Environmental Science, Risk & Health* [online]. 2007, vol. 33, is. 4 [cit. 2009-01-15], s. 596-601. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V7X-4M877GF-1/2/ea391ba6b7fde0c226e7df6aa1423ad3>>. ISSN 0160-4120.
- [23] Gebhardt, W., Schröder, H. Fr.: Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry for the follow-up of the elimination of persistent pharmaceuticals during wastewater treatment applying biological wastewater treatment and advanced oxidation. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, vol. 1160, is. 1-2 [cit. 2009-01-15], s. 34-43. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG8-4NVH7WF-B/2/497f79259e53dcc41496f2633466c280>>. ISSN 0021-9673.
- [24] *Český lékopis*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2005. 3 sv. (880, 1156, 1228 s.). ISBN 80-247-1532-5.
- [25] Balali-Mood, M., Balali-Mood, K.: *Salicylic acid* [online]. Islamic Republic of Iran : Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, 1996 [cit. 2009-02-06]. Anglicky. Dostupný z WWW: <<http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim642.htm#SectionTitle:6.4%20%20Metabolism>>.
- [26] Fendrich, Z., et al.: *Farmakologie pro farmaceuty III.*. 1. vyd. Praha : Karolinum, 2007. 162 s. ISBN 978-80-246-1419-9.
- [27] Facchi, A., Gandolfi, C., Whelan, M.J.: A comparison of river water quality sampling methodologies under highly variable load conditions. *Chemosphere* [online]. 2007, vol. 66, is. 4 [cit. 2009-02-08], s. 746-756. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V74-4PNJ1KT-T/2/86394a5ecf8cd7a03dc444b36f553669>>. ISSN 0045-6535.
- [28] Fatro M., et al.: Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry : methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, vol. 938, is. 1-2 [cit. 2009-03-18], s. 187-197. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG8-43S67WW-C/2/a9f6d1c7c96a469c38f16a20a7e32c48>>. ISSN 0021-9673.
- [29] Gómez, M., et al.: Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, vol. 1114, is. 2 [cit. 2009-03-18], s. 224 -233. Dostupný z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG8-4JHMHX0-2/2/fa31b0d299ec955666fe5f729011b34e>>. ISSN 0021-9673.

[30] Costi, E., et al.: Supramolecular solid-phase extraction of ibuprofen and naproxen from sewage based on the formation of mixed supramolecular aggregates prior to their liquid chromatographic/photometric determination. *Journal of chromatography A* [online]. 2008, vol. 1210, is. 1 [cit. 2009-03-18], s. 1-7. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG8-4TF2J3S-5/2/6e11fe15c934222165838057683e2f6f>>. ISSN 0021-9673.

[31] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vyd. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

[32] Pertile, E., Čablík, V.: *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava : VŠB - Technická univerzita, 2006. 238 s. ISBN 80-248-1049-2.

[33] Christian, D. G.: *Analytical chemistry*. Nedah Rose; Jamie Perea. 5th edition. USA : John Wiley & Sons, 1994. 812 s. ISBN 0-471-59761-9.

[34] *Biotage : Introduction to Solid Phase Extraction (SPE) for Reaction Work-up* [online]. Biotage AB Headquarters (Sweden) : 2008 [cit. 2009-03-18]. Dostupný z WWW: <<http://www.biotage.com/DynPage.aspx?id=35833>>.

[35] Popl, M., Fahnrich, J.: *Analytická chemie životního prostředí*. 4. přeprac. vyd. Praha : VŠCHT, 1999. 218 s. ISBN 80-7080-336-3.

[36] Karlíček et al.: *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha : Karolinum, 2007. 281 s. ISBN 978-80-246-1453-3.

[37] Klimeš, J., et al.: *Kontrola léčiv I.* Praha : Karolinum, 2002. 140 s. ISBN 80-246-0419-1.

[38] Šíma, J.: *Separační metody v analytické chemii* [online]. 03-Aug-2005 [cit. 2009-03-30]. Dostupný z WWW: <http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm>.

[39] Douša, M.: *UV/VIS HPLC detektory* [online]. 1999 , 4. února 2009 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html>.

[40] Coufal, P.: *High Performance Liquid Chromatography, HPLC* [online]. 2004 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>.

[41] Douša, M.: *Fluorescenční HPLC detektory* [online]. 1999 , 4. října 2007 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html>.

[42] Šíma, J.: *Hmotnostní spektrometrie (MS)* [online]. 01-Aug-2005 [cit. 2009-04-01]. Dostupný z WWW: <http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm>.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

GC-MS.....	Plynová chromatografie - hmotnostní spektrometrie
HPLC-MS.....	Vysokoučinná kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
CE-MS.....	Kapilární elektroforéza – hmotnostní spektrometrie
NSAID.....	Nesteroidní protizánětlivé látky
CNS.....	Centrální nervový systém
COX.....	Cyklooxygenáza
ATP.....	Adenosintrifosfát
ČOV.....	Čistírna odpadních vod
UV.....	Ultrafialové záření
GIT.....	Gastrointestinální trakt
DAD.....	Detektor s diodovým polem
LLE.....	Extrakce kapalina - kapalina
SPME.....	Mikroextrakce na pevné fázi
M _r	Relativní molekulová hmotnost
SPE.....	Extrakce pevnou fází
HPLC.....	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
GC.....	Plynová chromatografie
FTIR.....	Fourierova transformace s infračervenou spektroskopií
MF.....	Mobilní fáze