



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 VÝSKYTU PENICILINOVÝCH ANTIBIOTIK VE VODÁCH

THE ISSUE OF PENICILLIN ANTIBIOTICS IN WATER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PAVLÍNA LANDOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0777/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Pavλίna Landová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)
Vedoucí práce **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Problematika výskytu penicilinových antibiotik ve vodách

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování literární rešerše
2. Na základě rešerše provést výběr léčiv ze skupiny penicilinových antibiotik a metod pro jejich stanovení
3. Vybranou metodu optimalizovat pomocí uměle kontaminovaných vzorků, tj. vody a sedimentu
4. Optimalizovanou metodu použít na stanovení vybraných penicilinových antibiotik v reálných vzorcích odpadních a povrchových vod
5. Provést zhodnocení experimentu, včetně interpretace získaných výsledků
6. Provést posouzení úrovně kontaminace

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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

Pavλίna Landová
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se věnuje problematice výskytu a stanovení penicilinových antibiotik v odpadních vodách. Vybraným zástupcem této skupiny antibiotik byl penicilin V, protože je nejčastěji předepisován. Jako metoda izolace sledovaného analytu z odpadní vody byla zvolena extrakce tuhou fází (SPE). Optimální podmínky byly nalezeny pro SPE kolonky Bakerbond C₁₈. Analýza léčiva proběhla na ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografii (UHPLC) s UV-VIS detekcí s diodovým polem (UV/VIS-DAD). Za optimalizovaných podmínek byla provedena analýza odpadní vody z přítoku a odtoku ČOV Brno Modřice.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the occurrence and determination of penicillin antibiotics in wastewater. Penicillin V was selected as a representative of this class of antibiotics due to its frequent prescribing. Solid phase extraction (SPE) was selected as a method of isolation of the analyte from the wastewater. Optimal conditions were found for Bakerbond C₁₈ SPE column. Drug analysis was carried out on ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) with diode array detection (UV/VIS-DAD). Under optimized conditions, the analysis of wastewater from the WWTP Brno Modřice influent and effluent was performed.

KLÍČOVÁ SLOVA

penicilinová antibiotika, odpadní voda, ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, extrakce tuhou fází

KEYWORDS

penicillin antibiotics, wastewater, ultra-high performance liquid chromatography, solid phase extraction

LANDOVÁ, P. *Problematika výskytu penicilinových antibiotik ve vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 43 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

Ráda bych na tomto místě poděkovala paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za odborné vedení a cenné rady. Dále bych také chtěla poděkovat doktorandům z ústavu ÚCHTOŽP za jejich vstřícnou pomoc a rady při řešení bakalářské práce.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. Historie používání léčiv.....	8
2.2. Antibiotika	8
2.2.1. Historie antibiotik.....	8
2.3. Rozdělení antibiotik.....	9
2.3.1. Podle spektra účinku.....	9
2.3.2. Podle typu účinku.....	9
2.3.3. Podle mechanismu účinku.....	9
2.3.4. Rezistence.....	11
2.3.5. Farmakokinetika antibiotik.....	12
2.3.6. Distribuce v organismu	12
2.3.7. Eliminace a biotransformace léčiv z organismu	12
2.3.8. Cyklus antibiotik v životním prostředí	13
2.3.9. Léčiva v čistírnách odpadních vod	13
2.4. Peniciliny.....	14
2.4.1. Základní charakteristika.....	14
2.4.2. Farmakokinetika penicilinů	14
2.4.3. Výroba penicilinů.....	15
2.4.4. Charakteristika vybraných penicilinů	15
2.5. Metody stanovení léčiv	16
2.5.1. Odběry	16
2.5.2. Úprava vzorku odpadní vody před analýzou	17
2.5.3. Kapalinová chromatografie	21
2.5.4. UHPLC	21
2.5.5. Detektory v UHPLC/HPLC.....	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1. Přístroje a pomůcky	25
3.2. Používaný software pro zpracování dat.....	25
3.3. Používané chemikálie a standardy	25
3.3.1. Chemikálie.....	25
3.3.2. Inertní plyn	25

3.3.3. Standardy.....	25
3.4. Sledovaná matrice.....	25
3.5. Sledované analyty.....	26
3.5.1. Penicilin V (fenoxymethylpenicilin)	26
3.6. Postup stanovení.....	26
3.6.1. Odběry vzorků	26
3.6.2. Úprava vzorku před izolací sledovaného analytu	27
3.6.3. Izolace sledovaného analytu.....	27
3.6.4. Identifikace a kvantifikace analytu.....	28
3.6.5. Chromatografické podmínky	28
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	30
4.1. Optimalizace chromatografických podmínek	30
4.1.1. Výběr vhodné mobilní fáze	30
4.1.2. Výběr vlnové délky detekce	32
4.2. Optimalizace SPE extrakce.....	34
4.2.1. Kalibrační křivka.....	34
4.2.2. Ověřované SPE postupy.....	34
4.3. Reálné vzorky.....	37
5. ZÁVĚR.....	38
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	39
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	43

1. ÚVOD

Antibiotika patří mezi nejfrekventovanější skupiny léčiv dnešní doby. Mají svá uplatnění jak v humánní, tak i ve veterinární medicíně. V humánní medicíně se často stává, že na základě chybné diagnózy jsou antibiotika podávána nevhodně často zcela zbytečně. K plýtvání s antibiotiky přispívá také to, že v některých státech jsou až do dnešní doby antibiotika dostupná bez lékařského předpisu. Je samozřejmé, že také to přispívá k jejich nadměrné a neuvážené spotřebě. Ve veterinární medicíně jsou antibiotika využívána nejen při léčbě infekčních nemocí, ale často jsou také podávána nepřetržitě jako prevence onemocnění nebo jako podpora růstu hospodářských zvířat. Léčiva potom, a to částečně v nezměněné formě a částečně ve formě metabolitů, vstupují různými cestami do životního prostředí.

Největším celosvětovým problémem je vznik bakteriální rezistence; čím častěji se dostávají bakterie do styku s těmito medikamenty, tím rychleji jsou schopné mutace, která vede k jejich rezistenci proti těmto lékům. Zdánlivě snadno vyléčitelné infekce by mohly mít v důsledku toho fatální následky, mnohdy končící i smrtí pacienta.

Léčiva v odpadních vodách mohou proto negativně ovlivňovat proces biologického čištění na čistírnách odpadních vod. Může docházet k tomu, že léčiva mohou na čistírnách odpadních vod inhibovat růst přirozeně se zde vyskytujících bakterií a tak snižovat účinnost čištění. Již je známo, že ne všechna léčiva jsou na ČOV eliminována a proto právě ČOV patří mezi největší bodové zdroje kontaminace povrchových vod léčivy. V povrchových vodách potom mohou tato léčiva působit toxicky na vodní organismy.

Tyto skutečnosti měly za následek snahu o vývoj vhodných analytických postupů použitelných ke stanovení těchto kontaminantů negativně ovlivňujících životní prostředí. Nejčastěji aplikovanými metodami bývají, stejně jako v případě většiny organických polutantů, kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC-MS), kapalinová chromatografie nebo ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV/VIS detekcí pomocí diodového pole (HPLC nebo UHPLC-UV/VIS-DAD), případně plynová chromatografie s hmotnostní detekcí po derivatizaci (GC-MS).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Historie používání léčiv

Již od pradávna hledal člověk způsob, jak navrátit organismus ze stavu nemoci a bolesti do stavu zdraví. V minulosti byly jako první pro tyto účely použity rostliny. Později byl již člověk schopen extrahovat účinné látky z těchto rostlin a získávat tak jejich koncentrovanější formu. Rostlina „ma huang“ byla pro své léčivé účely používána již před téměř 5 000 lety; bylo zjištěno, že tato rostlina obsahuje látku efedrin se stimulačními účinky na CNS. K léčbě byly využívány rovněž sušené části rostlin, nevýhodou však často býval i obsah toxických látek, a to vedle látek léčivých. Tinktury vznikaly nakládáním rostlin do ethanolu. Tento způsob byl ale vhodný pouze pro ty léčivé látky, které byly v ethanolu rozpustné. Hlavní nevýhodou při těchto způsobech podávání léčiv byla nepřesnost množství nadávkované účinné látky, protože její obsah může v rostlinách značně kolísat, například v závislosti na období nebo místu sklizně, případně na způsobu skladování rostlin. Postupem času došlo na další způsob získávání účinných látek z rostlin, tj. na izolaci účinných látek z přírodních surovin. Na přelomu 18. a 19. století již byly izolovány další léčivé látky; příkladem může být morfin, chinin a kofein. Některé účinné látky jsou až do současnosti získávány přírodní cestou, protože jejich syntéza by byla vzhledem k jejich strukturní složitosti neuskutečnitelná, případně příliš finančně nákladná. Jedná se především o alkaloidy, silice, hormony apod. Nyní bývají léčivé látky, a to až na výše specifikované výjimky, převážně chemicky syntetizovány. Vyrábějí se tak analoga účinných látek obsažených v rostlinách, avšak často se provádí i vědomé změny původních struktur, které mohou přispět k eliminaci jejich negativních vlastností, např. ke snížení toxicity nebo návykovosti. Kromě toho jsou syntetizovány i látky zcela nové, které nemají svoji předlohu v rostlinném původu. Některé látky jsou mnohdy objeveny i náhodně [1;2].

2.2. Antibiotika

Cílem antibakteriálních látek je zničit původce onemocnění nebo alespoň omezit jeho růst a pokud možno, nepoškodit při tom hostitelský organismus. Uměle syntetizované antibakteriální látky jsou označovány jako chemoterapeutika; pokud se ovšem jedná (alespoň primárně) o produkty metabolismu mikroorganismů, nazývají se tyto antibakteriální látky antibiotika [3].

2.2.1. Historie antibiotik

Již po staletí používali lidé chemické látky k hubení bakterií. Často ovšem neznali pravou příčinu nemoci a využívali proto jen kladného účinku látek při léčbě. Již v patnáctém století se začaly objevovat teorie, že určité nemoci se mohou mezi lidmi šířit a za přenašeče se začaly považovat živé organismy, které byly schopné růstu a rozmnožování. Významným přínosem pro rozvoj léčby bakteriálních nemocí byl objev mikroskopu v sedmáctém století, který otevřel cestu ke zkoumání věcí doposud pouhým lidským okem nepozorovaných. V devatenáctém století se začalo spekulovat, zda by mohla existovat chemická substance, která by v lidském těle selektivně usmrcovala jen buňky bakterií způsobujících onemocnění. Výzkum zaměřený tímto směrem měl za následek to, že se podařilo vyvinout lék na velice frekventovanou nemoc té doby, což byl syfilis. Nová léčiva měla často velké množství

vedlejších účinků a při špatně nastavené dávce mohla působit i toxicky. Sulfonamidy byly objeveny prostřednictvím nově vyrobených barviv, které vykazovaly antibakteriální účinky. Alexander Fleming potom svým náhodným objevem plísň *Penicillium notatum*, která vykazovala antibakteriální účinky, umožnil vznik léčivých látek nazvaných peniciliny [4].

2.3. Rozdělení antibiotik

2.3.1. Podle spektra účinku

Jedná se o výčet bakteriálních druhů, na něž má daný antimikrobní přípravek teoreticky působit; podle toho rozlišujeme *antibiotika s úzkým spektrem účinku a antibiotika s širokým spektrem účinku*. Příkladem širokospektrých antibiotik jsou tetracykliny, mezi úzkospektrá patří například základní druhy penicilinů, tj. Penicilin G a Penicilin V [5;6].

2.3.2. Podle typu účinku

Za *bakteriostatická léčiva* jsou považována ta léčiva, která způsobují inhibici dalšího růstu mikroorganismů [3].

Baktericidní antibiotika způsobují usmrcení původce onemocnění; tento druh léčiv se používá v případech, kdy jsou obranné síly makroorganismu oslabeny, a bakteriostatický účinek by nepostačoval k vyléčení. Podávání vyšších koncentrací bakteriostatického léčiva může působit i baktericidně [3;5].

Tabulka č. 1: Rozdělení antibiotik podle typu účinku [6;7]

baktericidní	bakteriostatická
peniciliny	tetracykliny
cefalosporiny	makrolidy
monobaktamy	linkosamidy
karbapenemy	amfenikoly
aminoglykosidy	sulfonamidy
chinolony	pirimidiny
ansamyciny	nitrofurany
glykopeptidy	
polypeptidy	
nitroimidazoly	

2.3.3. Podle mechanismu účinku

2.3.3.1. Inhibice syntézy buněčné stěny

Protože lidské buňky nemají buněčnou stěnu, působí tyto látky velice specificky právě na buněčnou stěnu bakterií. Dochází k inhibici enzymu peptidyltransferázy, která je potřebná ke stavbě buněčné stěny. Jejím úkolem je spojovat peptidovým řetězcem jednotlivé aminocukry, které jsou základními jednotkami buněčné stěny [1].

2.3.3.2. Poškození buněčné membrány

Tato farmaka zvyšují permeabilitu buněčné membrány a narušují iontovou rovnováhu buňky. Léčiva z této skupiny obsahují ve své struktuře hydrofilní a lipofilní část. Vážou se na lipofilní část buněčné membrány. Voda, kterou s sebou antibiotika nesou, zvětšuje povrch buňky až do okamžiku, než dojde ke zhroucení membrány. Účinnost je závislá na množství fosfolipidů v buněčné membráně a také na schopnosti léčiva pronikat buněčnou stěnou [7;8].

2.3.3.3. Inhibice syntézy kyseliny tetrahydrolistové

Kyselina tetrahydrolistová působí jako koenzym při syntéze purinů a tymidinu. Tyto látky jsou složkami DNA a RNA a jejich přítomnost je nutná pro růst a dělení buněk. Působením enzymu dihydrogenfolátreduktázy dochází k redukci kyseliny dihydrolistové, kterou dokáží buňky bakterií vyprodukovat, na kyselinu tetrahydrolistovou. Lidské buňky syntetizují kyselinu dihydrolistovou z kyseliny listové, která je přijímána stravou jakožto esenciální látka. Léčiva této skupiny způsobují kompetitivní inhibici syntézy kyseliny dihydrolistové nebo kyseliny tetrahydrolistové a tak je zastaven růst dalších mikroorganismů [1].

2.3.3.4. Interference s bakteriální DNA

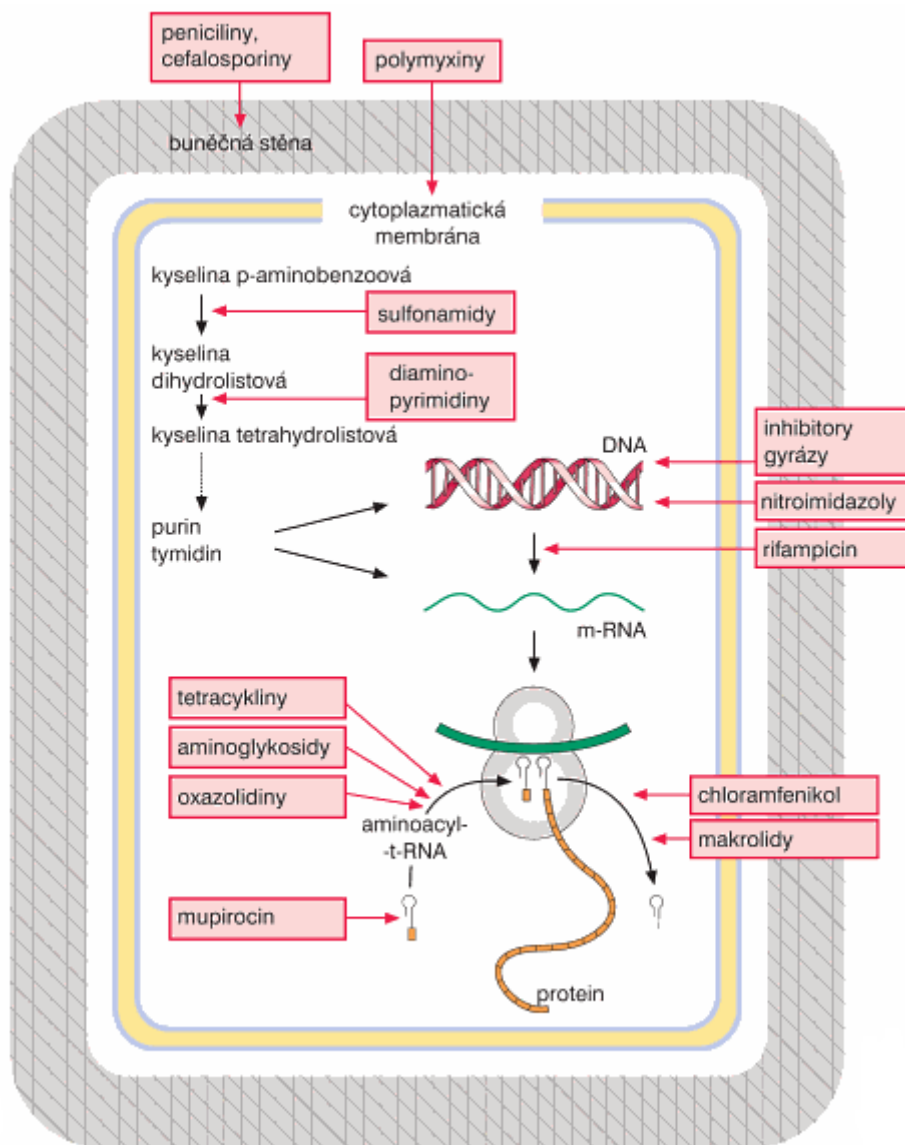
Tato farmaka inhibují transkripci genetické informace z matrice DNA a poškozují tímto způsobem regulační centrum buněčného metabolismu. Léčiva mohou tvořit komplexy s DNA nebo způsobovat zlomy vláken nebo inhibici gyrázy. Enzym gyráza slouží k uspořádání bakteriálního chromozomu v buňce, aniž by bylo třeba smyčku chromozomu rozmotat [1].

2.3.3.5. Inhibice proteosyntézy

Jedná se o přenos genetické informace do peptidového řetězce, která byla převedena na mRNA. Tato skupina léčiv tak zasahuje do syntézy proteinů [1].

Tabulka č. 2: Dělení antibiotik podle mechanismu jejich účinku [1;3]

účinek	antibiotika	
inhibice syntézy buněčné stěny	peniciliny cefalosporiny karbapenemy monobaktamy	vankomycin bacitracin fosfomycin
poškození buněčné membrány	polymyxin B polymyxin E	tyrotricin
inhibice syntézy kyseliny tetrahydrolistové	sulfonamidy	diaminopyrimidiny
interference s bakteriální DNA	kys. pipemidová norfloxacin ciprofloaxin	enoxacin levofloxacin metronidazol
inhibice proteosyntézy	aminoglykosidy makrolidy tetracykliny	linkosamidy chloramfenikol rifampicin



Obrázek č. 1: Mechanismy účinku antibiotik [3]

2.3.4. Rezistence

Nadměrné, často i nevhodné a zbytečné užívání antibiotik vede k adaptaci mikroorganismů prostřednictvím mutací a genetických rekombinací. Tyto rezistentní kmeny potom mohou v určitém společenství bakterií dominovat. Velké množství lidí každoročně umírá v důsledku infekcí způsobených bakteriemi odolnými vůči antibiotikům. Již po čtyřech letech od uvedení prvních penicilinových antibiotik na trh si našel tzv. *Staphylococcus aureus* neboli zlatý stafylokok cestu, jak odolat tomuto druhu léčiv. Vývoj nových léčiv je velice dlouhý a náročný proces, což dokazuje i to, že za posledních 30 let vstoupily na trh jen dvě nové skupiny antibiotik. V budoucnu se proto může stát, že pro určitá onemocnění nebude vhodné léčivo a zdánlivě obyčejná infekce bude mít fatální následky. Velká část léčiv ze skupiny antibiotik je také využívána ve veterinární léčbě; u chovných zvířat jsou používána nejen k léčbě infekcí, ale často jsou nepřetržitě podávána jako prevence nemocí. Antibiotika podávaná ve veterinární léčbě tak velkou mírou přispívají k bakteriální rezistenci [9;10;11].

Zkříženou rezistenci se rozumí rezistence mikroorganismů na léčiva sobě chemicky blízká. *Rezistence sdružená* znamená odolnost mikroorganismů na léčiva chemicky odlišná [8].

2.3.5. Farmakokinetika antibiotik

Farmakokinetika popisuje časový průběh hladiny léčiv v tělesných tekutinách jako výsledek absorpce, distribuce a vylučování léčiva po podání. Většina antimikrobiálních léčiv je podávána buď intravenózně nebo perorálně. Absorpce je nejlépe popsána pomocí biodostupnosti léčiva, což je definováno jako procento dávky léku, které se dostává do systémové cirkulace. Po intravenózní aplikaci je 100 % dávky podaného léčiva biodostupné. Tato cesta podání se volí v případech, kdy má pacient závažnou infekci a kdy je nutné dosáhnout antimikrobiálního účinku co nejrychleji. Léky podávané perorálně ve srovnání s intravenózní aplikací dosahují často nižších plazmatických koncentrací a pomalejšího nástupu, což je způsobeno nutností resorpce z GIT traktu do krevního řečiště. Kyselé prostředí žaludku dokáže některá léčiva částečně zničit, což může způsobit snížení biodostupného množství. Příkladem může být penicilin G, kdy je po perorálním podání biodostupné jen asi 30 % původně podaného množství [12].

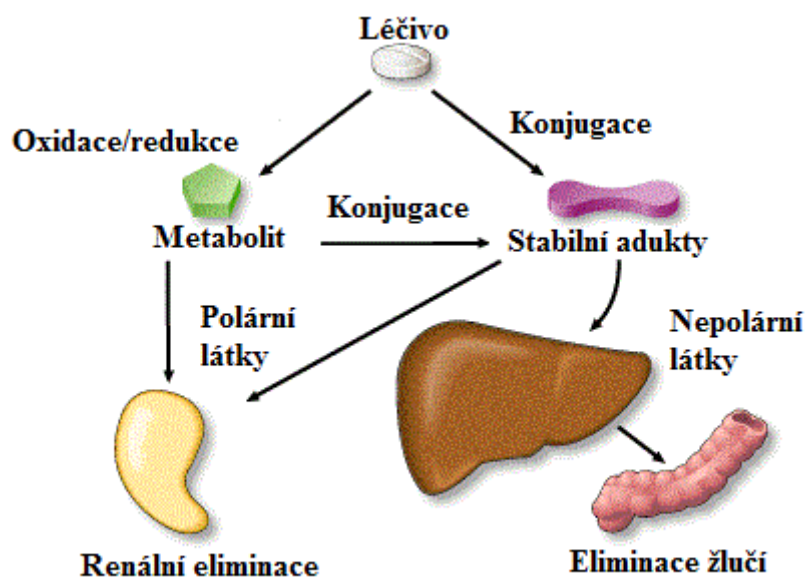
2.3.6. Distribuce v organismu

Distribuce je proces, kterým se léčivo dostává z intravaskulárního řečiště do extravaskulárního prostoru. Léčba infekcí nacházejících se právě v extravaskulárním prostoru je závislá na pohybu léčiva z krevního řečiště až do intersticia a někdy i do intracelulární tekutiny. Schopnost léčiva dostávat se na místa určení závisí jak na vlastnostech tkáně (míra prokrvení), tak také na vlastnostech daného léčiva (rozpuštěnost v tucích, velikost molekuly, pK_a) [12].

Většina lipofilních léčiv prochází přes biologické membrány, které jsou tvořeny především fosfolipidy, *pasivní difúzí*. K tomuto jevu dochází, když je koncentrace léčiva na jedné straně membrány menší než na druhé, tzn., že je zde snaha o vyrovnání koncentrací. Další možností přestupu je tzv. *transport*, kdy látka využívá transportních systémů. V tomto případě musí docházet k interakcím přenášené látky s transportním systémem. Aktivní transport se uskutečňuje proti koncentračnímu gradientu, usnadněný transport probíhá podle koncentračního gradientu [1;12].

2.3.7. Eliminace a biotransformace léčiv z organismu

Léčiva mohou být eliminována z organismu převedením na metabolity (především v játrech), případně mohou být nezměněná léčiva nebo jejich metabolity vyloučeny stolicí a močí prostřednictvím ledvin, jater a střev. Některá léčiva nebo jejich metabolity, které jsou vylučovány žlučí, mohou být znovu resorbovány do krevního řečiště tzv. enterohepatální cirkulací. Renální exkrece léčiv je zprostředkována třemi procesy: glomerulární filtrací, tubulární sekrecí a pasivní tubulární reabsorpcí. Po filtraci jsou polární látky účinně eliminovány ledvinami. Renální eliminace nepolárních léčiv obvykle závisí na jejich metabolických přeměnách v játrech; tato eliminace probíhá pouze v případě, pokud může mít výsledný metabolit polárnější charakter. U látek, které se ledvinami vylučují nejlépe, je při poruše renálních funkcí největší nebezpečí nadměrného zvýšení hladin farmaka v krvi [12].



Obrázek č. 2: Možnosti eliminace léčiv z organismu [13]

2.3.8. Cyklus antibiotik v životním prostředí

Antibiotika se dostávají do životního prostředí různými cestami. Po podání se mohou vylučovat ve formě metabolitů, avšak značné množství léčiv je vylučováno močí a výkaly v nezměněné podobě do kanalizace. Mnohé výzkumy pak dokazují, že na ČOV nedochází během procesu čištění k úplnému odstranění léčiv. Z ČOV se tak mohou léčiva posléze dostat do povrchové vody, případně do podzemní vody a kalu. Dalšími významnými zdroji antibiotik jsou nemocnice, ve kterých mohou být tato léčiva nevhodným způsobem likvidována. Zdrojem kontaminace jsou také veterinární léčiva včetně metabolitů. Zvířecí výkaly se dostávají v podobě hnojiva na zemědělská pole a odtud mohou kontaminovat podzemní a povrchové vody. Na rybích farmách jsou léčiva často aplikována přímo do vody spolu s krmivem, a proto se může velká část sorbovat do sedimentů, kde dochází buď k postupné degradaci nebo k opětovnému vyluhování do okolní vody [14;15].

2.3.9. Léčiva v čistírnách odpadních vod

Účinnost odstranění léčiv při čištění odpadních vod se liší a je závislá zejména na kombinaci fyzikálně-chemických vlastností a na použitém procesu čištění. Alternativní metody, které mohou přispívat k odstraňování léčiv, jsou následující: membránové procesy, adsorpce na aktivním uhlí a pokročilé oxidační procesy. Klasický postup při čištění odpadních vod se skládá z primární, sekundární a terciární fáze. V primární fázi dochází k odstranění hrubých nečistot, jako jsou písek, štěrk a usazené pevné látky; rovněž dochází k odstranění olejů, tuků a mastnoty. V sekundární fázi již probíhá biologický proces (aerobní a anaerobní pochody), pomocí kterého jsou odstraňovány organické látky z vody. Ve většině ČOV je tento sekundární krok založen na principu aktivovaného kalu. V terciárním kroku dochází k odstranění fosforu procesem srážení; k těmto účelům se hojně využívá síranu železitého [16].

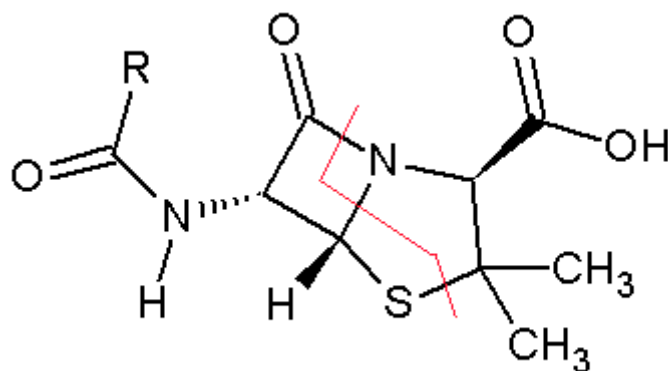
Odstranění a přeměna antibiotik při biologickém čištění jsou výsledkem řady procesů. Jedná se o procesy biotické (biodegradace prostřednictvím bakterií a plísní) a procesy abiotické (sorpcce, hydrolýza a fotolýza). Nepolární léčiva budou mít větší tendenci přecházet do kalu, který je bohatý na organické látky. Dále mohou být léčiva transportována z vodného prostředí do kalu pomocí iontové výměny a tvorby komplexů s kovy. Kalová sorpční konstanta K_D vyjadřuje schopnost léčiva přecházet do kalu. Čím jsou větší hodnoty K_D , tím dochází k větší sorpci. Kal lze používat jako hnojivo, avšak do kalu přechází velké množství polutantů, včetně antibiotik a těžkých kovů, a proto není tento způsob jejich použití doporučován. Další parametr, který může sloužit k posouzení, zda bude léčivo setrvávat ve vodném prostředí nebo zda bude přecházet do kalu, je koeficient oktanol – voda K_{OW} . Je známo, že čím větší je hodnota $\log K_{OW}$, tím je větší sorpční schopnost. Velké množství léčiv má však hydrofilní charakter a proto bude setrvávat především ve vodném prostředí. Faktory ovlivňující odstranění těchto látek jsou následující: BSK_5 , existence a velikost anoxických a anaerobních procesů, nerozpuštěné látky, pH a teplota [16].

2.4. Peniciliny

2.4.1. Základní charakteristika

Peniciliny patří společně s cefalosporiny a karbapeny do skupiny tzv. β -laktamových antibiotik. Základní strukturu tvoří thiazolidinový kruh napojený na β -laktamový kruh, ke kterému je připojen postranní řetězec. β -laktamový kruh, který je nositelem antibakteriálního účinku, podléhá degradaci za příliš vysokého respektive nízkého pH, kdy dochází k jeho hydrolýze. Degradace může být způsobena i teplem nebo chladem [17;18].

Ze struktury je patrná biogeneze z aminokyselin valinu a cysteinu, a proto mohou být peniciliny nazývány též dipeptidovými antibiotiky [19].



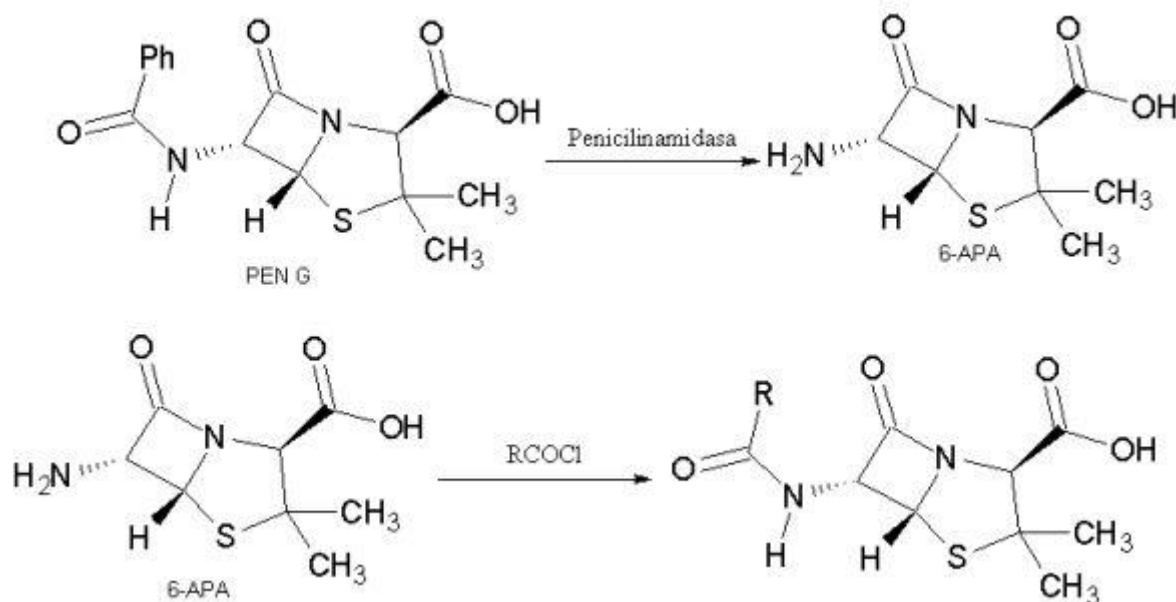
Obrázek č. 3: Základní struktura penicilinů a jejich biogeneze z valinu a cysteinu [19]

2.4.2. Farmakokinetika penicilinů

Z farmakokinetického hlediska dochází při perorálním podání k absorpci z GIT, která je závislá především na odolnosti penicilinů vůči HCl. Peniciliny jsou distribuovány do extracelulární tekutiny, avšak do buněk nevstupují. Vylučování léčiv je uskutečňováno především ledvinami [20].

2.4.3. Výroba penicilinů

Peniciliny jsou v dnešní době vyráběny polysyntetickou cestou. Zcela syntetický postup výroby je sice znám, avšak z ekonomického hlediska se stále preferuje způsob polysyntetický. Fermentačně vyrobený penicilin G se hydrolyzuje účinky penicilinamidázy na kyselinu 6-aminopenicilanovou (6-APA), která se následně acyluje chloridy příslušných kyselin nebo kondenzuje přímo s těmito kyselinami pomocí dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) [19].



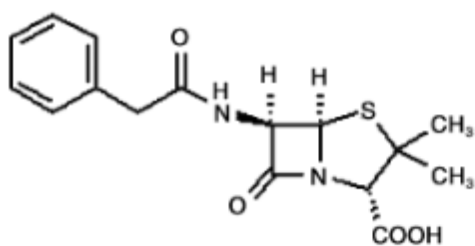
Obrázek č. 4: Výroba penicilinových antibiotik [19]

2.4.4. Charakteristika vybraných penicilinů

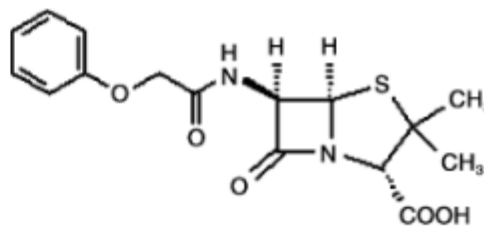
2.4.4.1. Penicilin V

Penicilin V, neboli fenoxymethylpenicilin, je acidostabilním úzkospektrým antibiotikem. Inhibuje syntézu buněčné stěny bakterií vazbou na specifické proteiny. Je rozkládán enzymem penicilinázou a dalšími β -laktamázami bakterií. Na rozdíl od penicilinu G, a to vzhledem ke své stabilitě v kyselém prostředí, může být podáván i perorálně. Ve formě draselné soli je aplikován proti streptokokovým infekcím, infekcím ústní dutiny, stomatologickým infekcím nebo lymfské borelióze [21;22].

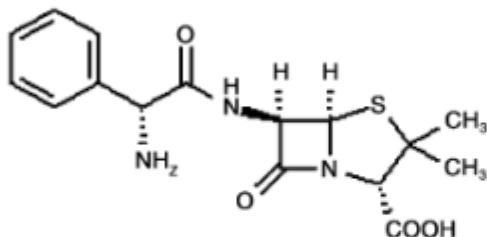
Metabolizace penicilinu V probíhá částečně v játrech, kde je 30 % metabolizováno na fenoxymethylpenicilinovou kyselinu, která je s 20-30 % nezměněného léčiva eliminována močí, a to převážně tubulární sekrecí. Jedna třetina látky je vyloučena stolicí. Doba vylučování se prodlužuje u pacientů se sníženou funkcí ledvin [22].



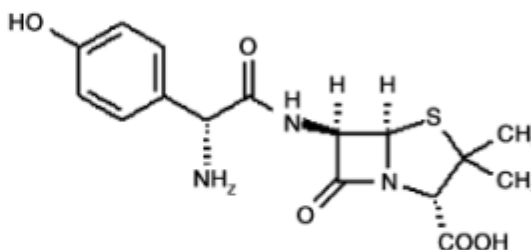
Penicillin G (PENG)
 $pK_{a2.8}$



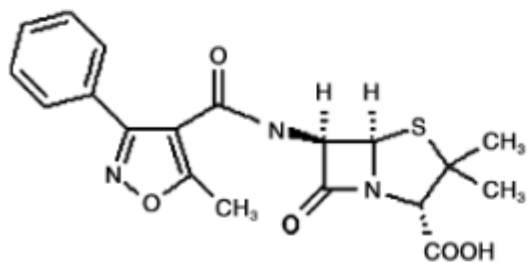
Penicillin V (PENV)
 $pK_{a2.7}$



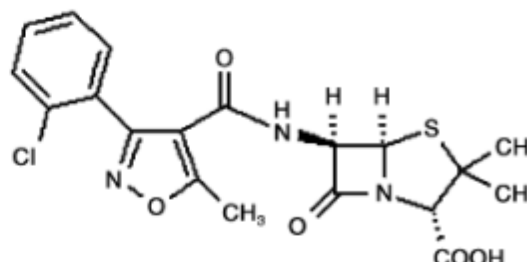
Ampicillin (AMPI)
 $pK_{a1}2.7; pK_{a2}7.3$



Amoxicillin (AMOX)
 $pK_{a1}2.8; pK_{a2}7.2$



Oxacillin (OXA)
 $pK_{a2.7}$



Cloxacillin (CLOX)
 $pK_{a2.7}$

Obrázek č. 5: Chemická struktura některých penicilinů [10]

2.5. Metody stanovení léčiv

2.5.1. Odběry

Odběr vzorku je jedním z kroků, který má velký význam pro konečný výsledek environmentální analýzy. Na finálním výsledku se vzorkování může, a to společně s uskladněním vzorku a případnou konzervací, podílet na konečné nejistotě měření až z 85 %. Základním požadavkem je, aby odebraný vzorek měl dostatečně velkou vypovídající hodnotu a byl reprezentativní. Rovněž se nesmí od doby odběru až po počátek analýzy změnit vlastnosti a koncentrace analytů. U odběrů odpadních vod je největším problémem jejich nehomogenita a změny vlastností v průběhu času a prostoru. Tento problém může být částečně vyřešen pomocí směšného vzorku, kdy se v určitých časových intervalech odebírá definované množství odpadní vody, které se potom za určitý časový úsek, např. za 24 hodin, smísí. Velký význam má také použití správných vzorkovnic. Pro tyto účely jsou nejčastěji

používány tmavé skleněné vzorkovnice, které jsou až do počátku analýzy skladovány v chladu (4 °C) a temnu [23;24].

2.5.2. Úprava vzorku odpadní vody před analýzou

Filtrace patří mezi základní procesy související s úpravou vzorků. Běžně se odpadní voda filtruje přes membránové nebo skleněné filtry o velikosti pórů 0,45 µm; v případě velkého množství suspendované hmoty lze nejdříve použít filtraci přes papírové filtry a následně teprve filtraci membránovými a skleněnými filtry. Pro odstranění NL lze použít i centrifugaci.

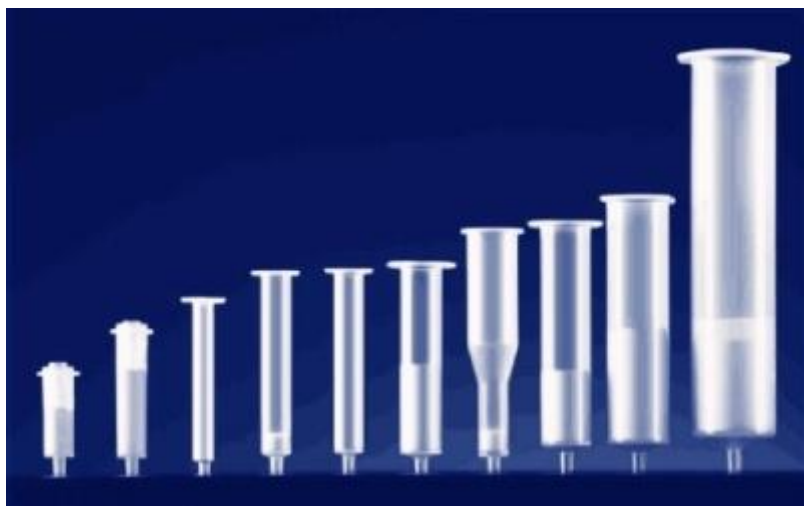
Ke zpracování odebraného vzorku by mělo dojít co nejdříve od jeho odběru. Pokud není možno přistoupit k analýze bezprostředně po úpravě odebraného vzorku, musí být vzorky uchovány v chladu (4 °C) a temnu. Analýza by však měla proběhnout do 12, maximálně do 24 hodin po odběru. Pro skladování vzorků delší dobu je možné vzorek konzervovat, přičemž pro tuto konzervaci se může použít konzervační roztok 1% formaldehydu. Předem však musí být prostřednictvím pilotní studie ověřeno, zda konzervační činidlo nebude mít negativní dopad na sledované analyty [23;24].

2.5.2.1. Extrakce tuhou fází (SPE)

Extrakce tuhou fází je technikou stále více používanou při úpravách vzorku vody před analýzou. Zajišťuje extrakci analytu, jeho zakoncentrování a také přečištění od možných interferujících látek a nečistot. Pokud použijeme SPE, odpadá mnoho problémů spojených s extrakcí kapalina/kapalina (LLE), tj. například neúplné oddělení fází, malé návratnosti a především velká spotřeba organických rozpouštědel. SPE extrakce je proto účinnější metodou než LLE; velkou výhodou je také to, že může být automatizována [25].

Tato technika se nejčastěji aplikuje pro extrakce semivolatilních a netěkavých analytů z kapalných matric. Kromě toho může být tato metoda využita rovněž pro extrakci analytů, které jsou obsaženy v pevných matricích a byly předem vyextrahovány do rozpouštědla. Výběr vhodného typu a velikosti adsorbentu je pro analýzu rozhodující [25].

V současnosti je na trhu k dostání mnoho typů SPE kolonek lišících se zejména svým objemem, který bývá nejčastěji v rozmezí 1-60 ml. Dalším důležitým aspektem je množství sorbentu; toto množství by mělo být zvoleno s ohledem na předpokládané množství zachycovaného analytu, které by nemělo překročit 5 % z celkové hmotnosti sorbentu. Hmotnosti sorbentů se nejčastěji pohybují v rozmezí 60 mg až 10 g [25;26].



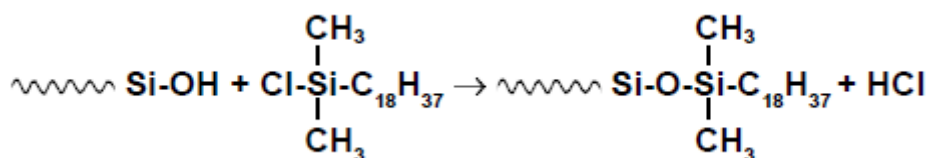
Obrázek č. 6: Druhy SPE kolonek [27]

Tabulka č. 3: Typy sorbentů (vázaný na silikagel) a jejich možné využití [28]

Vázaná fáze	Akronym	Primární vlastnosti
oktadecyl	C18, ODS	nepolární
oktyl	C8	nepolární
ethyl	C2	nepolární
fenyl	PH	nepolární
cyklohexyl	CH	nepolární
kyanopropyl	CN (Kyano)	nepolární/polární
propandiol	2OH (Diol)	polární/nepolární
silikagel (nevázaný)	SI	polární
alumina (nevázaná)	AL	polární
florisil (nevázaný)	FL	polární
diethylaminoethyl	DEA	slabý aniontový iontoměnič/polární
aminopropyl	NH ₂	slabý aniontový iontoměnič/polární
karboxyethyl	CBA	slabý kationový iontoměnič
propylsulfonová kyselina	PRS	silný kationový iontoměnič
etylbenzensulfonová kyselina	SCX	silný kationový iontoměnič
trimethylamonium propyl	SAX	silný aniontový měnič

Systém s obrácenými fázemi

Separace na obrácených fázích zahrnuje polární (vodné) nebo středně polární matrice vzorku a nepolární stacionární fáze. Analyt je převážně středně polární až nepolární. Stacionární fáze obsahuje hydrofilní silanolové skupiny situované na povrchu oxidu křemičitého, které jsou chemicky modifikované, a to hydrofobní alkyl- nebo aryl- funkční skupinou. Retence organických analytů z polárních roztoků je dána především přitažlivými silami mezi C-H vazbami analytu a funkčními skupinami na povrchu oxidu křemičitého; jedná se o van der Waalsovy síly. K eluci analytu z adsorbentu je zapotřebí nepolární rozpouštědlo, které naruší síly poutající analyt se sorbentem. Každý modifikovaný oxid křemičitý obsahuje určité procento nezreagovaných silanolových skupin, které způsobují tzv. *sekundární interakce*. Tyto interakce mohou být užitečné při extrakci a retenci vysoce polárních analytů nebo kontaminantů; mohou je však také nenávratně zadržovat [25].



Obrázek č. 7: Příprava chemicky vázané C₁₈ stacionární fáze na silikagelu [25]

SPE postup pro systém s obrácenými fázemi

1. Kondicionace

Sorbent musí být před nanášením vzorku podroben vhodné aktivaci, která posléze zajistí kvantitativní záchyt analytu. Ke kondicionaci je nejčastěji používáno organické rozpouštědlo, s vodou dobře mísitelné. Ve většině případů je používán methanol, který je více polární než sorbent, avšak méně polární než voda. Vázané fáze sorbentu se začnou otevírat a jsou připraveny k interakci s analytem (obr. č. 8: B). K dosažení maximální aktivace sorbentu (obr. č. 8: C) je zapotřebí použití méně polárního rozpouštědla, jakými jsou acetonitril, případně tetrahydrofuran [25;28].

První aktivační činidlo je potom následováno roztokem, který je svými vlastnostmi (pH, polarita) podobný vlastnostem matrice vzorku. Pro vodné roztoky je používána deionizovaná voda s upraveným nebo neupraveným pH nebo roztok pufru. Sorbent během kondicionace a nanášení vzorku nesmí vyschnout, jelikož by docházelo ke ztrátě sorpčních vlastností [25;28].



Obrázek č. 8: Průběh aktivace vázaných fází sorbentu: A) inaktivovaný sorbent, B) částečná aktivace, C) plná aktivace [28]

2. Nanesení vzorku

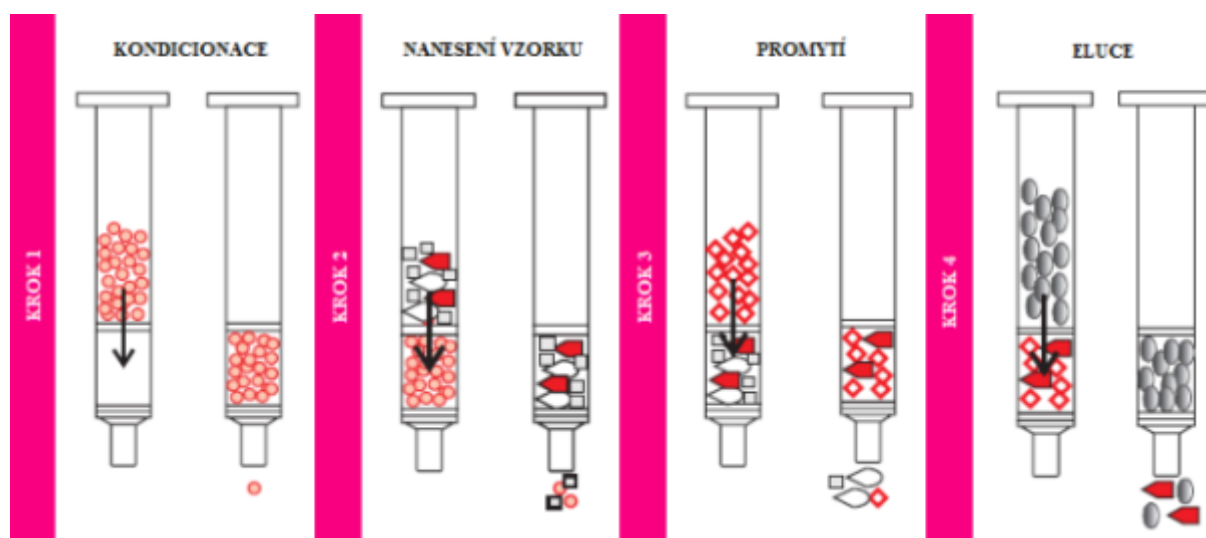
Objem nanášeného vzorku může být značně rozdílný, a to v závislosti na jeho použití pro konkrétní aplikaci; rozpětí je poměrně velké, od μl až do jednotek litru. Průtokové rychlosti by neměly překročit 5 ml/min (mohou se lišit od typu sorbentu a velikosti kolonek) [25;29].

3. Promytí

Slouží k odstranění nežádoucích složek, které by mohly následně způsobovat interference při vlastní analýze. Používají se rozpouštědla s menší eluční silou, než která jsou potřebná pro eluci analytu. Příkladem může být deionizovaná voda, případně roztoky malého množství methanolu v deionizované vodě (běžně 1-5 hm. % methanolu). U slaběji zadržovaných analytů lze tento krok přeskočit. Dále následuje sušení kolonky od zbytků matrice vzorku pomocí proudu dusíku nebo vzduchu [25;30;31].

4. Eluce

Pro tyto účely je využíváno malé množství vhodného elučního činidla, např. acetonitrilu nebo methanolu. Eluce se nejčastěji provádí ve více krocích, přičemž se vždy aplikuje alikvotní množství elučního činidla, např. $2 \times 500 \mu\text{l}$ (množství elučního činidla se odvíjí od použitého typu sorbentu a především od jeho hmotnosti) [25;29].



Obrázek č. 9: Jednotlivé kroky při SPE [25]

2.5.3. Kapalinová chromatografie

Jedná se o separační techniku, která využívá dělení složek mezi dvě fáze, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní; v případě kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina. Stacionární fázi zde tvoří buď tuhá látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči, která je umístěna v chromatografické koloně v podobě sorbentu. Mobilní fáze pak tímto sorbentem protéká a její průtok je regulován pomocí čerpadla. Při dělení látek dochází k opakovanému ustalování rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. Distribuční konstanta pak popisuje distribuci složek mezi tyto dvě fáze. Čím větší je hodnota K_D pro danou látku, tím delší dobu dochází k setrvání této látky ve stacionární fází. Na základě rozdílných K_D separovaných látek potom dochází k jejich dělení. Další faktor, kromě vlastností sorbentu, ovlivňující zdržení látek ve stacionární fází, je složení mobilní fáze. Při tzv. *isokratické eluci* je složení mobilní fáze po celý čas analýzy stejné, a proto je tato technika vhodná pro látky, které mají podobné chemické vlastnosti, např. K_D . Další možností je *eluce gradientová*, při které dochází v průběhu analýzy ke změně složení mobilní fáze a to ve prospěch silnějšího elučního činidla. Tato technika se uplatňuje v případech, kdy mají separované látky rozdílné vlastnosti; v tomto případě volba gradientové eluce snižuje celkový čas analýzy [32;33].

Z literatury je také známá kapalinová chromatografie v plošném uspořádání, mezi které patří např. papírová chromatografie nebo tenkovrstvá chromatografie [32;33].

Používané stacionární fáze v kapalinové chromatografii jsou obdobné jako v SPE (viz. tabulka č. 3). Materiál kolon bývá z nerezové oceli, která je vysoce antikorozivní. Také může být použito speciální tvrzené sklo (pouze do 20 MPa), které je uloženo v kovovém pouzdře. Pro separaci penicilinových antibiotik je využíván systém s obrácenými fázemi. Jako sorbent se nejčastěji uplatňuje silikagel chemicky modifikovaný oktadecylem [33].

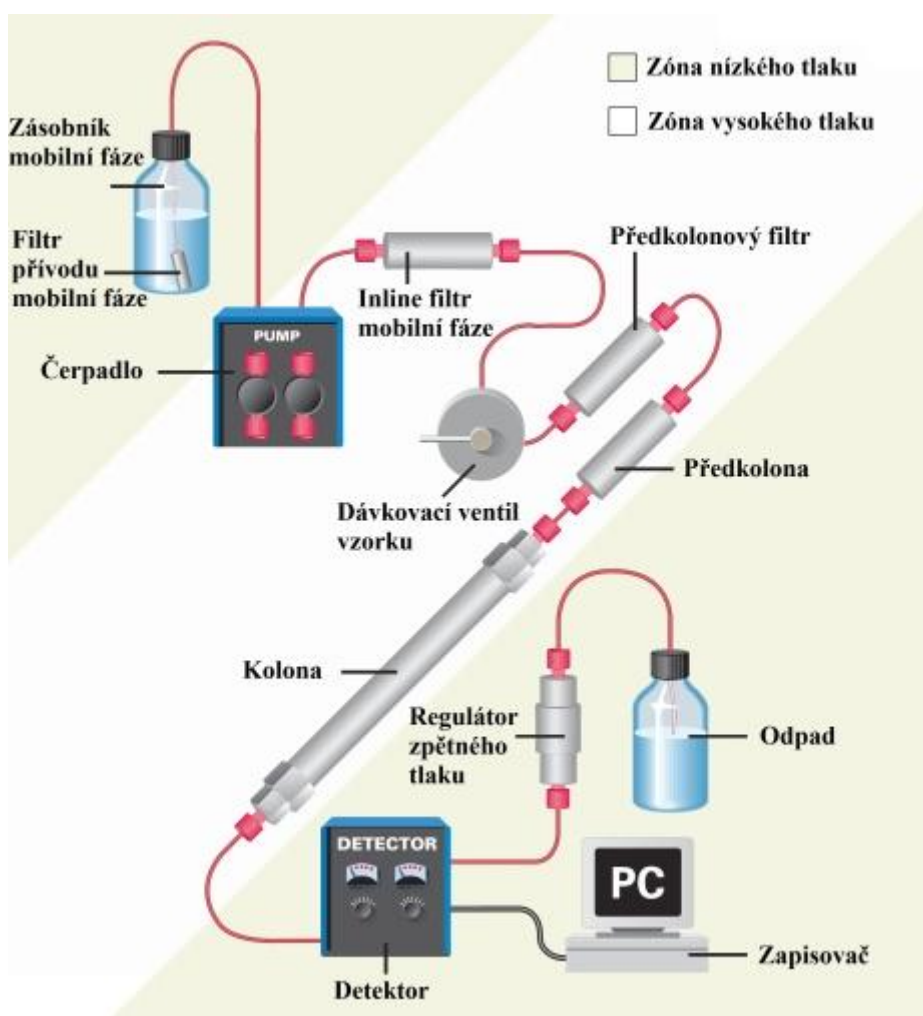
2.5.4. UHPLC

V ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografii je pro zvýšení účinnosti separace využíváno částic menších jak 2 μm . Použití takto malých částic však vyvolá nárůst zpětného tlaku systému, což nutně znamená použití výkonnějších čerpadel, která dokáží vyvinout tlaky až nad 100 MPa. Používané stacionární fáze musí těmto vysokým tlakům rovněž odolat. Hlavní výhodou této techniky v porovnání s HPLC je výrazné snížení doby analýzy, v některých případech až o 90 % [33].

Tabulka č. 4: Porovnání typických rozměrů kolon a tlaků pro HPLC a UHPLC [32;33]

	HPLC	UHPLC
rozměry částic	3–10 μm	1,5–2,1 μm
délka kolony	100–300 mm	50–150 mm
vnitřní průměr	3–4,6 mm	2,1 mm
maximální tlak	60 MPa	130 MPa

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, odkud je kapalina vedena přes odplyňovací jednotku, nejčastěji vakuovou, do vysokotlakého čerpadla. Směšovač mobilních fází může být zařazen jak před vstupem do čerpadla, tak také za čerpadlem ve vysokotlaké části, kde dochází k menšímu zpoždění gradientu, než by tomu bylo v nízkotlaké části. Na čerpadla jsou v HPLC i UHPLC kladeny velké nároky. Znamená to, že musí zajišťovat dokonale bezpulsní tok a kromě toho musí zvládat vysoké tlaky, při kterých se při aplikaci těchto technik pracuje. Pro tyto účely se nejčastěji používají pístová čerpadla, konkrétně dvoupístová čerpadla zapojená do série. Dále mobilní fáze postupuje přes inline filtr mobilní fáze do zařízení pro dávkování vzorku, která jsou v dnešní době nejčastěji řešena v podobě autosamplerů. Dále prochází mobilní fáze přes ochrannou předkolonu, poté pokračuje spolu s extraktem izolovaným ze vzorku do chromatografické kolony. Kolona je v přímém spojení s detektorem, ve kterém dochází k přenosu určitých vlastností analytu na signál, který je prostřednictvím softwaru ChemStation přenášen do počítače [33].



Obrázek č. 10: Schéma kapalinového chromatografu [34]

2.5.5. Detektory v UHPLC/HPLC

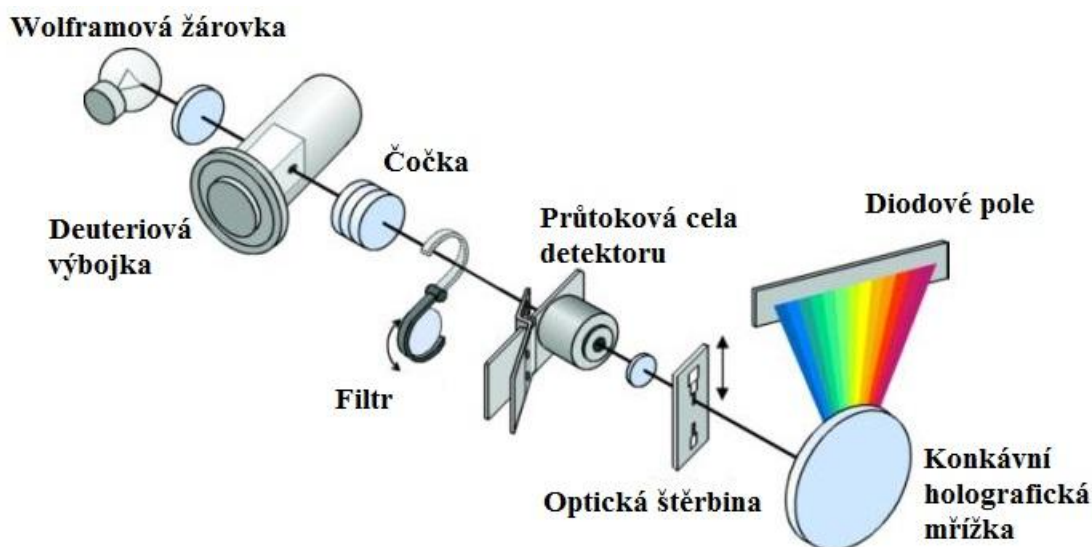
Detektory zaznamenávají rozdíly v signálu mezi průchodem mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Detektor by měl v ideálním případě umožňovat detekci všech typů látek, měl by poskytovat okamžitou a lineární koncentrační odezvu v co nejširším rozmezí koncentrací, měl by mít vysokou citlivost a nízkou úroveň šumu a neměl by být citlivý ke změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty. Takový detektor ovšem v praxi neexistuje, jednotlivé používané typy detektorů se těmito podmínkám jen blíží [32;33].

2.5.5.1. Spektrofotometrické UV/VIS detektory

Tento typ detektorů je v dnešní době hojně využíván díky své univerzálnosti; podmínkou použití je schopnost látek absorbovat záření v rozsahu 190-800 nm. Rozeznáváme čtyři základní typy těchto detektorů, a to podle vlnové délky použité k měření. Jedná se o detektory s *fixní vlnovou délkou*, s *měnitelnou vlnovou délkou* (vlnové délky jsou předem dané), s *programovatelnou vlnovou délkou* (vlnová délka je měnitelná během analýzy, při zastavení průtoku mobilní fáze možno sejmout celé spektrum); čtvrtým typem jsou detektory s *diodovým polem*, které snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušování průtoku mobilní fáze [32;33].

Detektory s diodovým polem

Záření ze zdroje je po průchodu měrnou celou spektrálně rozkládáno holografickou mřížkou, na každou z fotodiód pak dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Každá fotodióda je spojena s kondenzátorem, který je předem nabitý na určitou hodnotu; fotoelektrický proud vznikající po dopadu záření na fotodiódu vybijí kondenzátor úměrně velikosti intenzity dopadajícího zářivého toku. V další fázi se kondenzátor dobije a měří se proud spotřebovaný na dobítí, jehož velikost se pro každou fotodiódu ukládá do paměti řídicího počítače. Sekvence vybíjení a nabíjení je velmi rychle opakována, pohybuje se v řádech 10 ms. Spektrální rozlišení je dáno počtem fotodiód na poli. Tento počet se pohybuje od 512 do 1024 diód [32;33].



Obrázek č. 11: Schéma detektoru s diodovým polem [35]

2.5.5.2. Fluorescenční detektory

Jedná se o velice selektivní a citlivé detektory pro látky schopné fluorescence. Jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního, emisního záření, které látka vydá po absorpci primárního, excitačního elektromagnetického záření. Fotonásobič pak registruje emitované záření, které na něj dopadá; ten pak poskytuje proud úměrný toku emitovaného fluorescenčního záření a koncentraci analyzované látky v cele detektoru. Fotonásobič musí být chráněn před dopadem excitačního záření, a proto je umístěn kolmo na jeho zdroj. Zdrojem záření bývají rtuťové výbojky a interferenční filtry, které zajišťují monochromatické záření. Lepší varianty přístrojů obsahují xenonové výbojky a monochromátory, které umožňují výběr vlnové délky excitačního i emitovaného záření [32;33].

2.5.5.3. Hmotnostně spektrometrická detekce

Jedná se o spojené instrumentální techniky poskytující údaje z chromatogramu a spektrální údaje důležité pro identitu látky. Vedle spektrofotometrické detekce mají v kapalinové chromatografii druhé největší využití. V prvním kroku dochází k ionizaci analytu, potom k rozdělení iontů podle poměru hmotnosti a náboje m/z a jejich urychlení v analyzátoru. Posledním krokem je detekce iontů a zesílení signálu v detektoru. Veškerá data včetně chromatogramu jsou převedena do počítače, kde jsou pomocí vhodného softwaru zpracována. Nejpoužívanějšími ionizačními technikami používanými ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou ionizace elektrosprejem (ESI), ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Realizace spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie byl dříve značný problém, jednalo se hlavně o nekompatibilitu používaných HPLC rozpouštědel, vysoký průtok mobilní fáze a především rozdílné podmínky separace, protože MS detekce vyžaduje vysoké vakuum. Vzhledem k dnes používaným ionizačním technikám (ESI, APCI, APPI) již toto spojení nepředstavuje žádné problémy. Jako analyzátory jsou nejčastěji používány: kvadrupól, iontová past nebo průletový analyzátor (TOF). Detektorem bývá nejčastěji elektronový násobič [33;36].

Mezi další, ovšem méně používané detektory v HPLC/UHPLC, patří elektrochemické detektory, refraktometrické detektory, vodivostní detektory a také chemiluminiscenční detektory [33].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy HR-120-EC, a & D Instruments Ltd.

Přístroj pro přípravu milli-Q vody Millipore QGARD, Academic

Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity LC

- Detektor UV/VIS-DAD s diodovým polem: zdroj světla deuteriová (UV) lampa, 1024 fotodiod, vlnový rozsah 190-640 nm, programovatelná šířka štěrbin 1–8 mm
- Kolona ZORBAX eclipse Plus – C18, velikost 2,1 x 50 mm, velikost částic 1,8 µm

Přístroj pro sušení pod dusíkem Evaterm, LABICOM s. r. o.

SPE extraktor se sušícím modulem SUPELCO a vakuová pumpa KNF LAB LABOPORT
SPE kolonky:

- Bakerbond 500 mg, 3 ml
- Oasis HLB 200 mg, 6 ml
- Supelclean™ ENVI – 18 500 mg, 6 ml

Filtry:

- Filtry se skleněnými vlákny NM GF 1, průměr 55 mm, Macherey-Nagel, Německo
- Nylon 66, 0,45 µm, průměr 47 mm, SUPELCO, USA
- LUT Syringe Filter PTFE, 0,45 µm, průměr 13 mm, LABICOM s. r. o.
- CRONUS Syringe Filter Nylon, 0,2 µm, průměr 4 mm, LABICOM s. r. o.

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.2. Používaný software pro zpracování dat

MS Excel 2007

MS Word 2007

ChemStation for LC & LC/MS Systems, ver. 32.1, Agilent, USA

3.3. Používané chemikálie a standardy

3.3.1. Chemikálie

Acetonitril – CHROMASOLV® grad. grade, for HPLC $\geq 99,9$ %, Sigma Aldrich

Kyselina mravenčí – ≥ 98 %, Sigma Aldrich

Methanol – HPLC grad. grade, J. T. Baker

Kyselina trifluoroctová – CHROMASOLV® for HPLC $\geq 99,0$ %, Sigma Aldrich

Kyselina chlorovodíková – 35 % p. a., Penta

3.3.2. Inertní plyn

Dusík – 4,7 Siad Czech spol. s. r. o.

3.3.3. Standardy

Penicillin V potassium salt, čistota 98,7 %, Fluka, Sigma - Aldrich, GmbH

3.4. Sledovaná matrice

Odpadní voda odebraná z velkokapacitní ČOV Brno – Modřice, přítok a odtok.

3.5. Sledované anality

3.5.1. Penicilin V (fenoxymethylpenicilin)

$C_{16}H_{17}KN_2O_5S$

Kalium-(2S,5R,6R)-6-(phenoxycetamido)-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-karboxylát

M_r : 388,50

Bílý mikrokryсталický prášek, velmi snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v 95% ethanolu a nerozpustný v chloroformu [22].

3.6. Postup stanovení

3.6.1. Odběry vzorků

V průběhu 5 dnů byly odebírány směsné slévané 24 hodinové vzorky z přítoku a odtoku odpadní vody na ČOV Brno – Modřice. Odběry byly prováděny ve dnech 22. 4. až 26. 4. 2014. Vzorky byly přelity do tmavých skleněných vzorkovnic o objemu 1 l a do doby zahájení analýzy byly skladovány při teplotě 4 °C. Analýza vzorků proběhla nejpozději do 24 hodin od jejich odběru.



Obrázek č. 12: Letecký pohled na velkokapacitní čistírnu odpadních vod Brno – Modřice [37]

3.6.2. Úprava vzorku před izolací sledovaného analytu

Před vlastní SPE extrakcí bylo nutné odstranit ze vzorku suspendované pevné částice. Pro přítok byla nejprve provedena filtrace přes papírový filtr a následně filtrace přes skleněné filtry. U odpadní vody odebrané na odtoku byla filtrace provedena pouze přes skleněné filtry.

3.6.3. Izolace sledovaného analytu

Pro izolaci analytu z matrice odpadní vody byla provedena extrakce na tuhou fázi (SPE). Pro extrakci byly použity kolonky Bakerbond.

Optimalizovaný SPE postup pro kolonky Bakerbond:

kondicionace:	3 ml methanolu
	3 ml milli-Q vody
nanesení vzorku:	250 ml
sušení:	proudem vzduchu 10 minut
eluce:	2×1 ml methanolu
sušení:	pod dusíkem
rozpuštění:	1 ml methanolu

Po rozpuštění odparku v methanolu bylo nutné před vlastní analýzou na UHPLC roztok přefiltrovat, a to nejprve přes filtry o velikosti pórů 0,45 μm a následně přes filtry o velikosti pórů 0,2 μm .



Obrázek č. 13: SPE extrakce



Obrázek č. 13: Sušení pod dusíkem

3.6.4. Identifikace a kvantifikace analytu

Pro identifikaci a kvantifikaci penicilinu V byla aplikována kapalinová chromatografie. Byla provedena ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV/VIS-DAD detekcí na přístroji Agilent 1290 Infinity LC. Analyt byl separován na koloně ZORBAX eclipse Plus – C18 o rozměrech 2,1 x 50 mm a velikosti částic 1,8 μm . Kvantifikace analytu proběhla metodou kalibrační křivky.

3.6.5. Chromatografické podmínky

mobilní fáze:	A: 0,01% roztok kyseliny trifluoroctové v milli-Q vodě B: 0,01% roztok kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu
nástřik:	1 μl
průtok mobilní fáze:	0,3 ml/min
eluce:	izokratická o složení A:B 60:40
teplota kolony:	15 °C
vlnová délka detekce:	195 nm
délka analýzy:	6 min (+ 1 min promývání)

Připravené mobilní fáze byly vždy před použitím přefiltrovány přes nylonové filtry o velikosti pórů 0,45 μm .



Obrázek č. 14: Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity LC

Protože je v rámci stopové analýzy nezbytné pracovat v souladu s dobrou laboratorní praxí, bylo provedeno ověření celého metodického postupu i jednotlivých rozpouštědel, zda nejsou zdrojem sekundární kontaminace. Výsledky tohoto ověření prokázaly, že pracovní prostředí ani použitá rozpouštědla a chemikálie nejsou zdrojem sekundární kontaminace.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. Optimalizace chromatografických podmínek

Cílem bakalářské práce, která byla zaměřená na stanovení penicilinu V, byla optimalizace metody. Penicilin V byl izolován z matrice odpadní vody.

Prvním důležitým krokem optimalizace byl výběr vhodné mobilní fáze; následně byl proveden výběr optimální vlnové délky pro izokratickou eluci a nakonec byla optimalizována kompletní izolace analytu pomocí SPE.

4.1.1. Výběr vhodné mobilní fáze

Byly ověřovány dva typy mobilních fází, které jsou specifikovány v tabulce č. 5:

Tabulka č. 5: Použité mobilní fáze

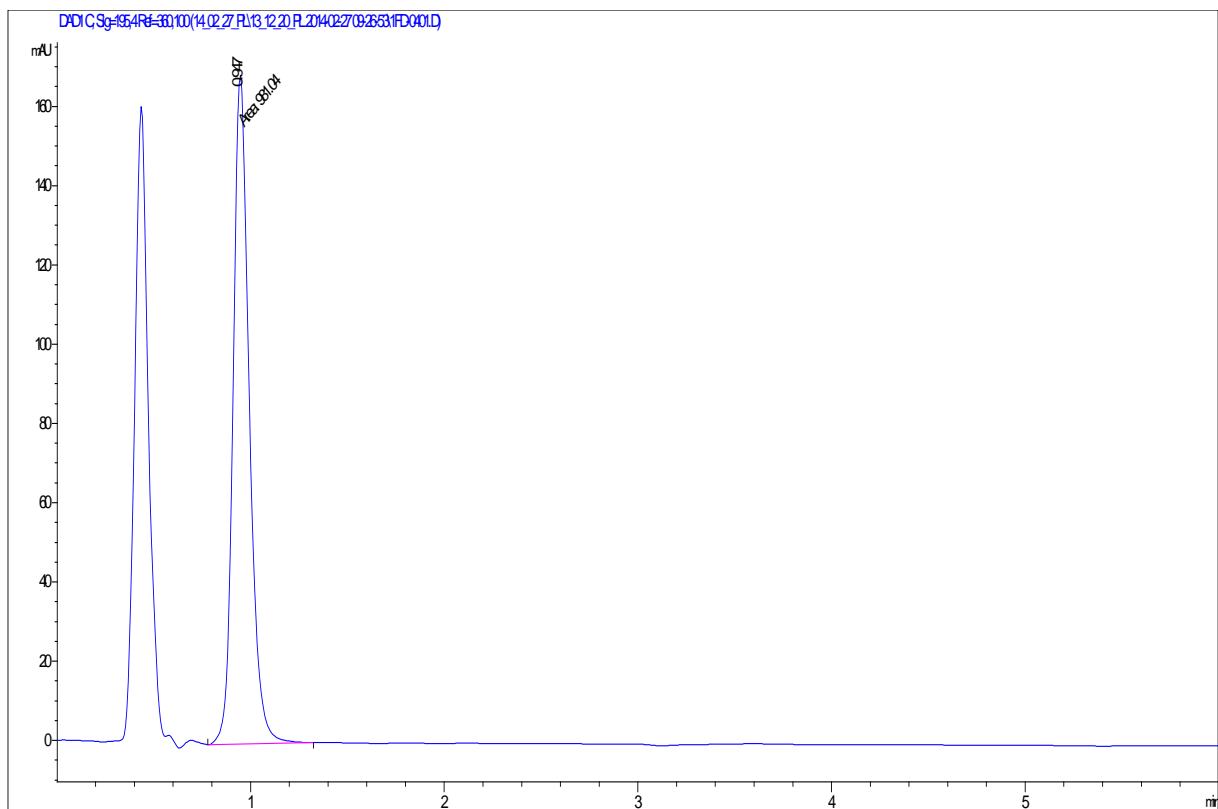
A	B
0,005 M HCOOH	ACN
0,01 % TFA	0,01 % TFA v ACN

Jako nejvhodnější byla zvolena mobilní fáze složená z 0,01 % TFA a 0,01 % TFA v ACN. Pokud byla použita tato mobilní fáze, bylo docíleno velmi dobré odezvy detektoru a píky na chromatogramu byly symetrické.

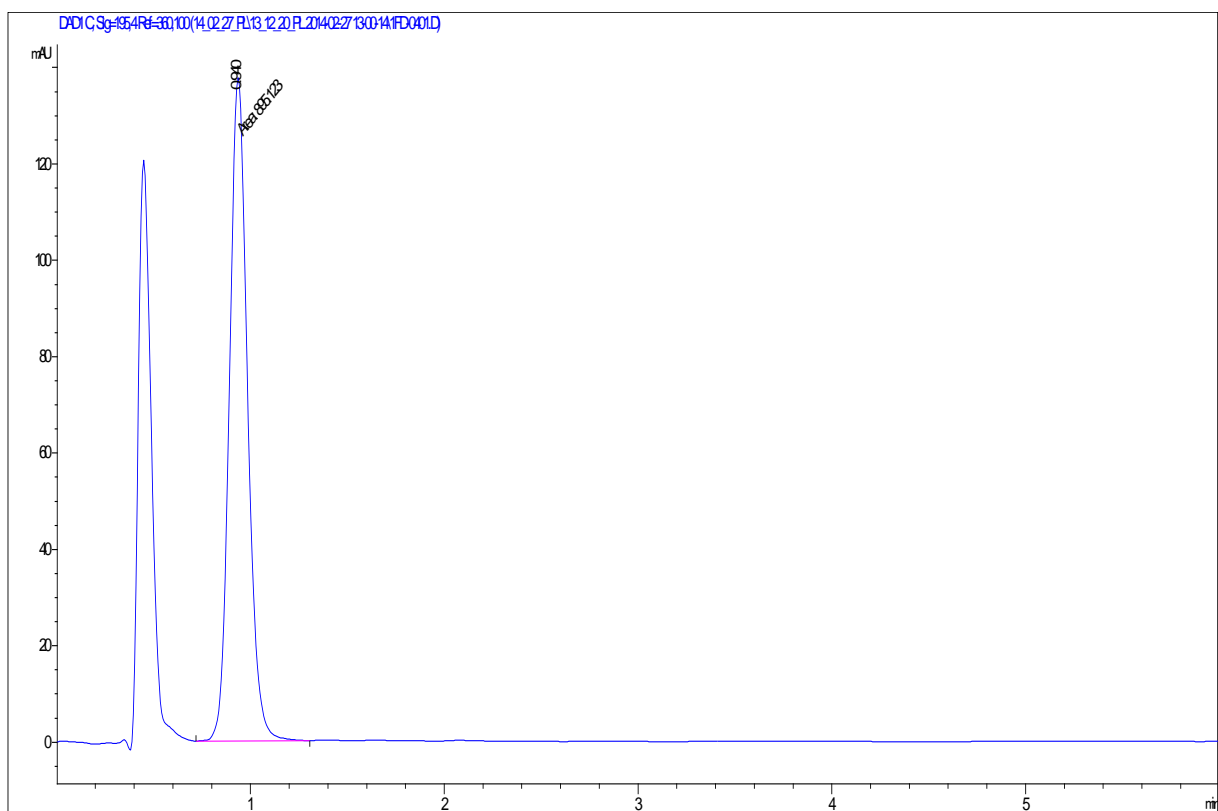
Ukázka chromatogramů získaných při různé volbě složek mobilní fáze je prezentována na obrázcích č. 16-18. Pro chromatogram znázorněný na obrázku č. 16 byla mobilní fáze složená z 0,005 M HCOOH a ACN (poměr 55/45 A/B).

Obrázek č. 17 představuje chromatogram získaný v případě, kdy byla použita tato mobilní fáze: 0,01 % TFA a 0,01 % TFA v ACN (poměr 55/45 A/B). Na dalším obrázku č. 18 je znázorněn chromatogram, kdy byla použita shodná mobilní fáze jako v předchozím případě, tj. 0,01 % TFA a 0,01 % TFA v ACN, avšak složení mobilní fáze bylo změněno na 60/40 A/B; rovněž byla upravena teplota kolony, a to z 20 °C na 15 °C. Tyto dvě změny měly za následek posunutí retenčního času analytu. Jako optimální byl, a to vzhledem k provedeným experimentům, stanoven průtok MF 0,3 ml/min, s nástřikem vzorku 1 µl.

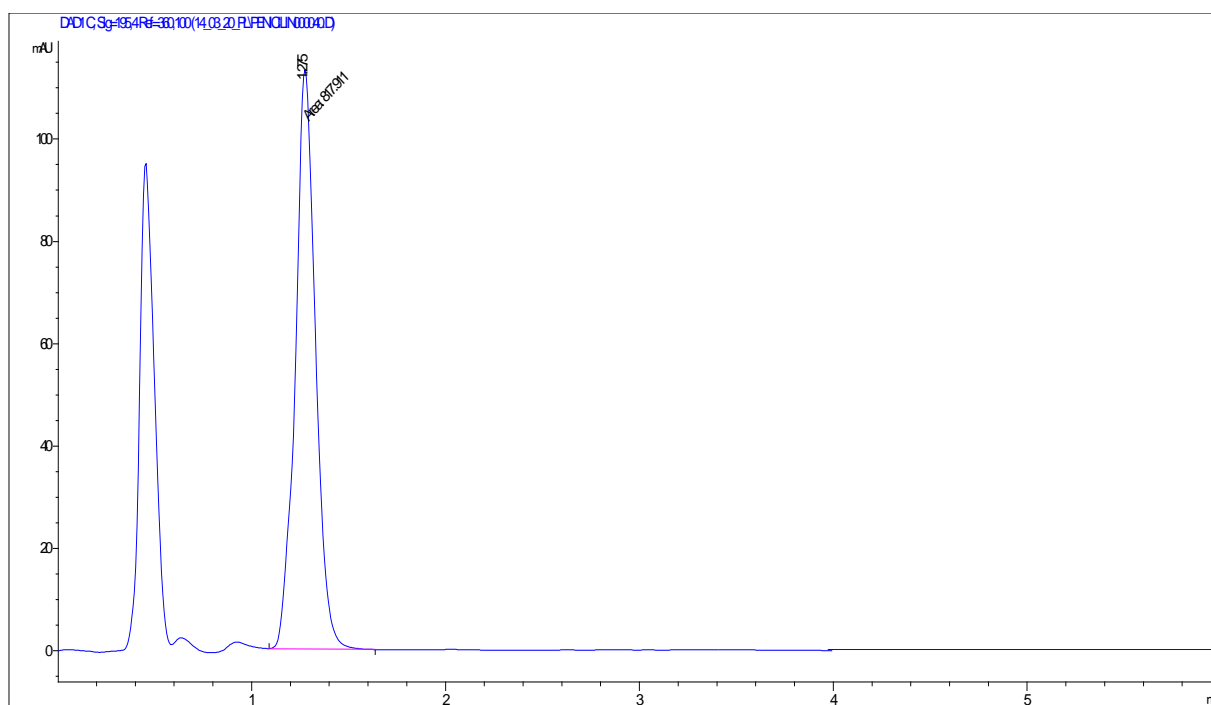
Ačkoliv byla snaha posunout retenční čas ještě dále, nebylo možné tento další posun uskutečnit. Důvody byly následující: v případě obou mobilních fází docházelo s dalším zvyšováním poměru složky A k rozmývání eluční zóny analytu a k frontování píky. Rovněž další snížení teploty kolony nepřispělo kladně k pozdější eluci penicilinu V.



Obrázek č. 16: Chromatogram modelového vzorku penicilinu V, použitá MF 0,005 M HCOOH a ACN (poměr 55/45 A/B)



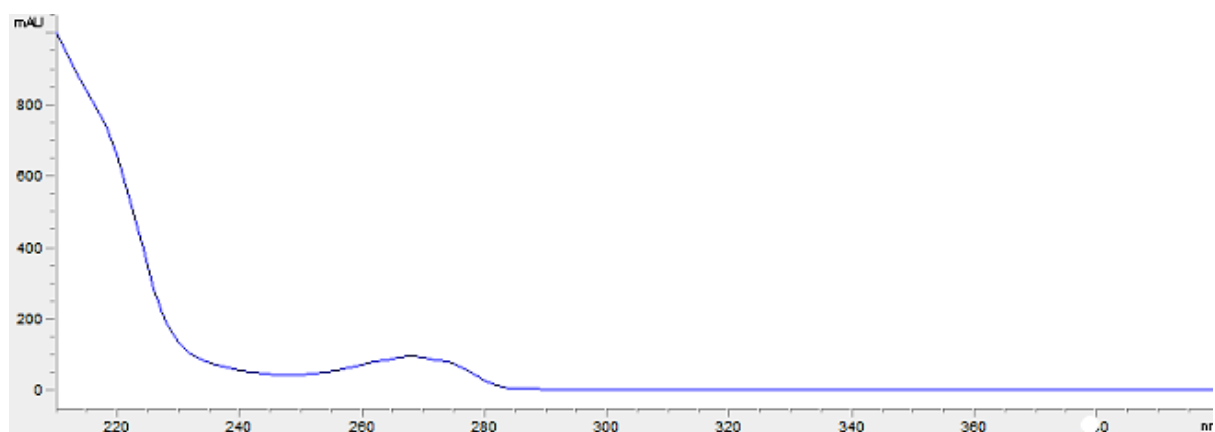
Obrázek č. 17: Chromatogram modelového vzorku penicilinu V, použitá mobilní fáze 0,01 % TFA a 0,01 % TFA v ACN (poměr 55/45 A/B)



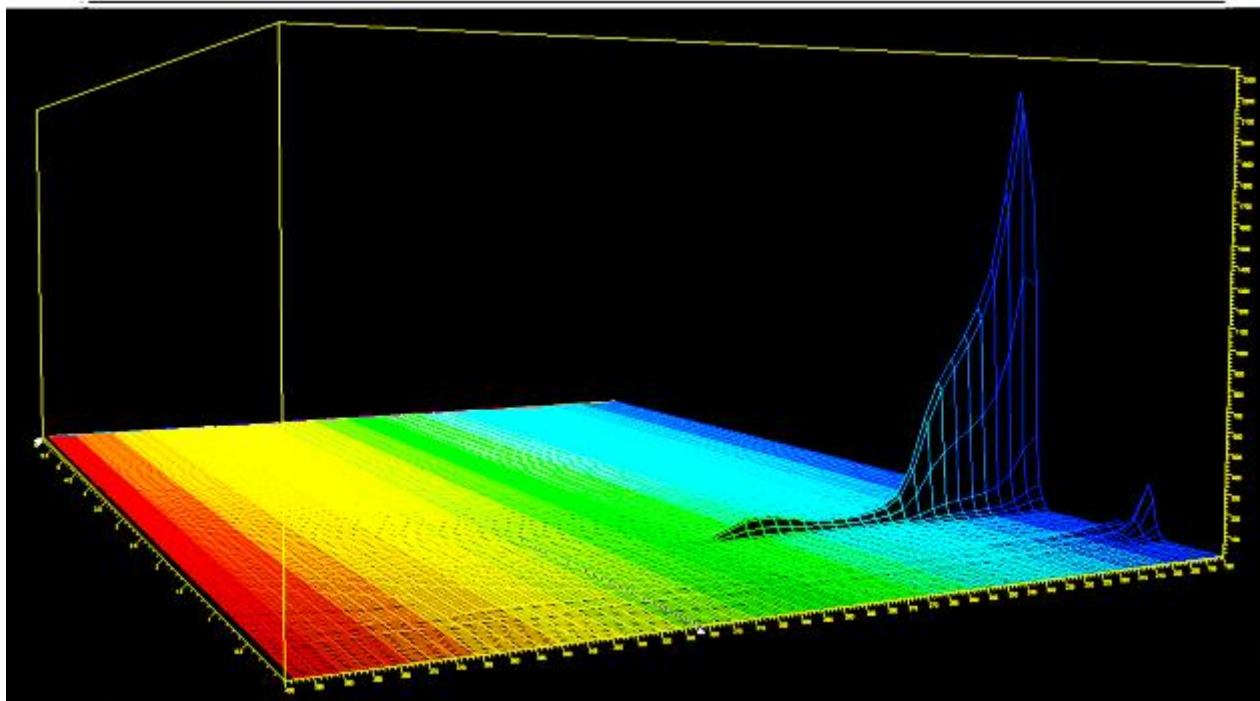
Obrázek č. 18: Chromatogram penicilinu V při optimálních podmínkách: MF složená z 0,01 % TFA a 0,01 % TFA v ACN (poměr 60/40 A/B), teplota kolony 15 °C, průtok MF 0,3 ml/min a objem nástřiku 1 μ l

4.1.2. Výběr vlnové délky detekce

Bylo snímáno spektrum penicilinu V, a to v rozsahu vlnových délek 190-400 nm. Teprve potom byla vybrána vlnová délka, při které byla odezva detektoru na analyt nejvyšší. Pro penicilin V byla proto zvolena vlnová délka 195 nm.



Obrázek č. 19: Absorpční UV spektrum penicilinu V



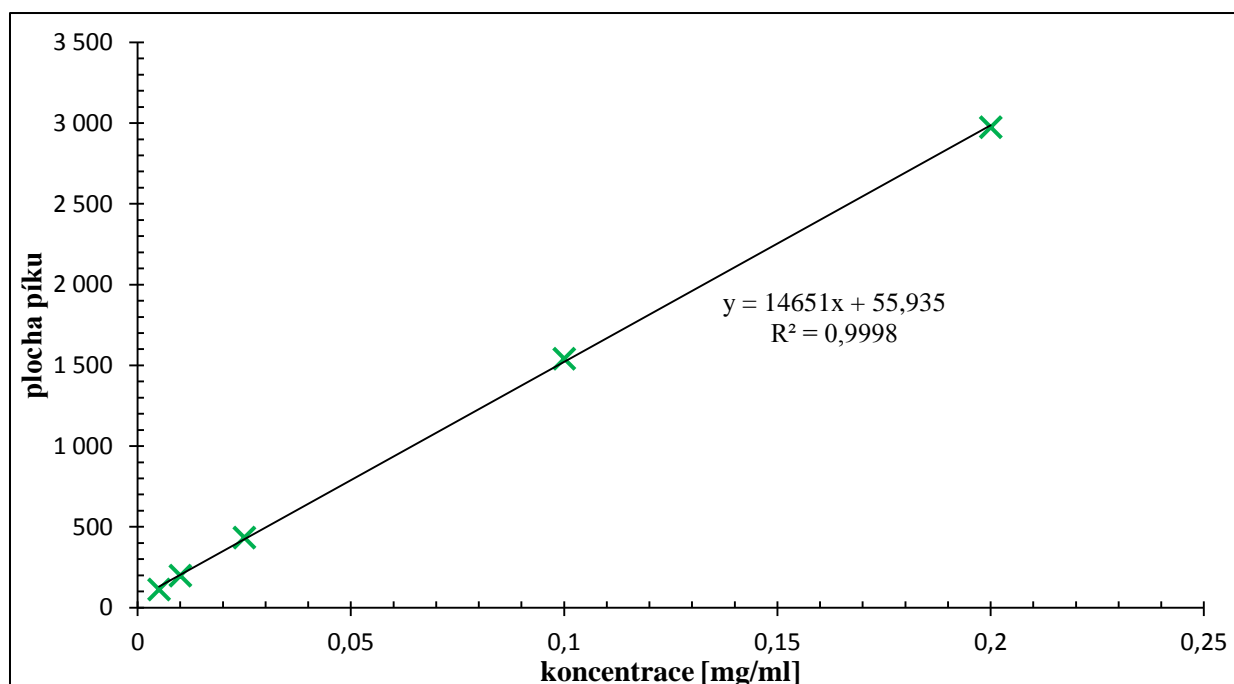
Obrázek č. 20: 3D absorpční UV spektrum penicilinu V

4.2. Optimalizace SPE extrakce

Za účelem dosažení co nejlepších výsledků byla provedena optimalizace SPE extrakce. Pro tyto účely bylo ověřeno několik postupů této izolační metody s využitím různých SPE kolonek. Modelové vzorky vody o objemu 100 ml obsahovaly vždy 0,2 mg penicilinu V. Výtěžnosti jednotlivých metod a použitých kolonek byly zjišťovány pomocí kalibrační křivky.

4.2.1. Kalibrační křivka

Pro zjištění koncentrací, a tím i výtěžnosti SPE metody, byla sestrojena kalibrační křivka závislosti plochy píků na koncentraci. Vhodným rozpouštědlem pro penicilin V byl zvolen methanol.



Obrázek č. 21: Kalibrační křivka penicilinu V

4.2.2. Ověřované SPE postupy

Byly ověřovány celkem tři typy SPE kolonek, a to Oasis HLB 200 mg, Supelclean™ ENVI™-18 SPE 500 mg a Bakerbond 500 mg. Na kolonkách Oasis HLB a Supelclean™ ENVI™-18 SPE byl aplikován vypracovaný postup č. 1 a postup č. 2.

Postup č. 1:

kondicionace: 2 ml methanolu
3 ml acetonitrilu
5 ml milli-Q vody
nanesení vzorku: 100 ml vody s obsahem 0,2 mg penicilinu V
sušení: vzduchem 10 minut
eluce: 6 ml acetonitrilu
odpaření: pod dusíkem
rozpuštění: 1 ml methanolu

Postup č. 2:

kondicionace:	3 ml methanolu 3 ml 0,5 M HCl 3 ml milli-Q vody
nanesení vzorku:	100 ml vody s obsahem 0,2 mg penicilinu V
promytí:	3 ml milli-Q vody
sušení:	vzduchem 10 minut
eluce:	2 ml methanolu
odpaření:	pod dusíkem
rozpuštění:	1 ml methanolu

Tabulka č. 6: Výtěžnosti pro kolonky Supelclean a Oasis při aplikaci postupu č. 1 a postupu č. 2

Supelclean™ ENVI™-18 SPE 500 mg			Oasis HLB 200 mg		
Postup č. 1			Postup č. 1		
Původní koncentrace [mg/ml]	Výsledná koncentrace [mg/ml]	Výtěžnost [%]	Původní koncentrace [mg/ml]	Výsledná koncentrace [mg/ml]	Výtěžnost [%]
0,200	0,0165	8,23	0,200	0,0707	17,68
0,200	0,0184	9,22	0,200	0,0840	21,00
0,200	0,0007	0,33	0,200	0,0756	18,91
Postup č. 2			Postup č. 2		
0,200	0,0273	13,67	0,200	0,0653	32,63
0,200	0,0011	0,57	0,200	0,0627	31,29
0,200	0,0004	0,19	0,200	0,0620	31,00

Protože obě testované kolonky vykazovaly u postupu č. 1 nízké výtěžnosti, nebyl tento postup hodnocen jako vhodný pro sledovaný analyt a proto nebyl již dále ověřován a zkoušen. Kolonky Oasis HLB vykazovaly největší výtěžnosti u postupu č. 2, a proto byly doporučeny jako vhodné pro další analýzy.

U postupu č. 2 byl dále sledován vliv promývání na ztrátu zachyceného analytu. Bylo zjištěno, že výtěžnosti analytu bez promývacího kroku byly větší než s aplikací tohoto kroku. Na základě těchto ověřovacích analýz musela být promývací fáze vynechána.

Postup č. 2 byl potom dále modifikován na postup č. 3 a pomocí tohoto postupu byla potom opět ověřována vhodnost použití kolonky Oasis HLB a také nové kolonky Bakerbond 500 mg.

Postup č. 3:

kondicionace: 3 ml methanolu
3 ml milli-Q vody
nanesení vzorku: 100 ml vody s obsahem 0,2 mg penicilinu V
sušení: vzduchem 10 minut
eluce: 2×1 ml methanolu
odpaření: pod dusíkem
rozpuštění: 1 ml methanolu

Tabulka č. 6: Výtěžnosti pro kolonky Oasis a Bakerbond při aplikaci postupu č. 3

Oasis HLB 200 mg			Bakerbond 500 mg		
Postup č. 3			Postup č. 3		
Původní koncentrace [mg/ml]	Výsledná koncentrace [mg/ml]	Výtěžnost [%]	Původní koncentrace [mg/ml]	Výsledná koncentrace [mg/ml]	Výtěžnost [%]
0,200	0,1589	79,45	0,200	0,1754	87,68
0,200	0,1542	77,11	0,200	0,1603	80,16
0,200	0,1437	71,82	0,200	0,1717	85,86
0,200	0,1405	70,26	0,200	0,1675	83,77
0,200	0,1301	65,04	0,200	0,1646	82,31
0,200	0,1536	76,78	0,200	0,1707	85,36
0,200	0,1533	76,64	0,200	0,1711	85,57

Protože výtěžnosti u kolonek Bakerbond 500 mg byly největší, byly tyto kolonky vyhodnoceny jako nejvhodnější pro analýzu penicilinu V.

Pro tyto kolonky byla následně vypočtena směrodatná odchylka S v MS Excel funkcí SMODCH. Relativní směrodatná odchylka S_r byla vypočtena podle vzorce:

$$S_r = \frac{100 \cdot S}{\bar{c}}$$

S ... směrodatná odchylka [mg/ml]

\bar{c} ... průměrná koncentrace [mg/ml]

Pomocí funkce VAR. VÝBĚR byl následně vypočten rozptyl naměřených hodnot.

Tabulka č. 7: Výtěžnost a základní statistické parametry SPE metody pro penicilin V

průměrná koncentrace	0,1688 mg/ml
průměrná výtěžnost	84,39 %
směrodatná odchylka	0,0044 mg/ml
relativní směrodatná odchylka	2,58 %
rozptyl	$2,5238 \cdot 10^{-5}$ mg/ml

4.3. Reálné vzorky

Optimalizovaná metoda prezentovaná jako postup č. 3 byla následně použita také pro analýzu reálných vzorků odpadní vody. Reálné vzorky odpadní vody byly odebrány ve dnech 22. 4. až 26. 4. 2014 na přítoku a na odtoku na ČOV Brno – Modřice. Vzhledem k nízkým koncentracím sledovaného analytu v odpadní vodě musela být použita také metoda vnitřního standardu. Rovněž byla vypočtena mez detekce a mez stanovitelnosti podle následujících vztahů. Výběr rovnic pro výpočet meze detekce a meze stanovitelnosti vycházel z literatury IUPAC [38].

Byla stanovena mez detekce (LOD) dle vztahu:

$$\text{LOD} = 3 \cdot \frac{c}{S/N}$$

c ... koncentrace analytu
S ... signál, výška píku při koncentraci c
N ... výška šumu

Dále byla stanovena mez stanovitelnosti (LOQ) dle vztahu:

$$\text{LOQ} = 10 \cdot \frac{c}{S/N}$$

c ... koncentrace analytu
S ... signál, výška píku při koncentraci c
N ... výška šumu

Vypočtená mez detekce měla hodnotu 0,647 0 µg/l a mez stanovitelnosti 2,156 7 µg/l.

Tabulka č. 8 obsahuje naměřené hodnoty koncentrací penicilinu V, zjištěné v odpadních vodách z ČOV Brno – Modřice. Každý vzorek na přítoku i na odtoku byl měřen paralelně, a to dvakrát. Hodnoty prezentované v tabulce představují průměr ze dvou paralelních stanovení. Penicilin V byl v odpadní vodě odebrané na přítoku ČOV detekován každý den, na odtoku však nebyl penicilin V detekován vůbec. Zjištěné hodnoty prokázané na přítoku se v průměrných hodnotách pohybovaly v rozmezí 2,5251 až 3,6496 µg/l. Pouze v úterý, dne 23. 4., se koncentrace nacházely pod mezí detekce a kvantifikace. Tato odchylka mohla být způsobena také tím, že ten den byly větší dešťové srážky nad celým nasávacím územím ČOV, což mohlo znamenat, že na ČOV přitékal větší objem čistší vody.

Tabulka č. 8: Koncentrace penicilinu V zjištěné v odpadní vodě

	přítok			odtok	
	c ₁ [µg/l]	c ₂ [µg/l]	c _{prům} [µg/l]	c ₁ [µg/l]	c ₂ [µg/l]
22.4.	3,7679	3,4523	3,6101	ND	ND
23.4.	LOQ	LOQ	LOQ	ND	ND
24.4.	3,5115	3,7876	3,6496	ND	ND
25.4.	2,3476	3,3734	2,8605	ND	ND
26.4.	2,4265	2,6237	2,5251	ND	ND

5. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovení penicilinových antibiotik v odpadních vodách. Pro tyto účely musela být vypracována a následně optimalizována metoda umožňující stanovení stopových koncentrací. Pro izolaci analytu z matrice byla použita extrakce SPE, jako rozhodčí metoda byla použita ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s detekcí UV/VIS detektorem s diodovým polem (UHPLC-UV/VIS-DAD). Vybraným penicilinovým antibiotikem byl penicilin V, který je v dnešní době často předepisovaným léčivem.

Metoda byla optimalizována pomocí uměle kontaminovaných vzorků vod a potom byla provedena analýza reálných vzorků odpadních vod.

Analyt byl separován na koloně ZORBAX eclipse Plus – C18 o rozměrech 2,1 x 50 mm a velikosti částic 1,8 μm . Na základě provedených experimentů byly vybrány vhodné chromatografické podmínky pro separaci penicilinu V. Pro izolaci analytu z matrice byla zvolena izokratická eluce o složení mobilní fáze: 60 % 0,01% TFA v milli-Q vodě a 40 % 0,01% TFA v ACN. Optimalizovaný průtok MF byl 0,3 ml/min, nástřik vzorku byl 1 μl , termostat, kde byla umístěna kolona, byl nastaven na teplotu 15 $^{\circ}\text{C}$. Optimální vlnová délka pro spektrofotometrickou detekci byla 195 nm. Tyto podmínky umožnily provést rozhodčí analýzu za 6 minut.

Jako vhodná metoda pro izolaci analytu z odpadní vody byla ověřována extrakce tuhou fází (SPE). Pro tyto účely byly vybrány tři druhy SPE kolonek, na kterých byly následně vyzkoušeny různé preanalytické postupy. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v případě, kdy byly použity kolonky Bakerbond C₁₈, na kterých byl postup dále optimalizován; výtěžnosti extrakce penicilinu V z odpadní vody dosahovaly v průměru 84,39 %. Pro příslušnou metodu byly stanoveny meze detekce a meze kvantifikace.

V průběhu pěti dnů, tj ve dnech 22. 4. až 26. 4. 2014, byly odebírány vzorky odpadní vody z ČOV Brno – Modřice (přítok, odtok). V těchto reálných vzorcích odpadních vod bylo provedeno stanovení penicilinu V. Toto antibiotikum bylo detekováno pouze na přítoku do ČOV, a to ve všech vzorcích odebraných v těchto dnech. Stanovené hodnoty koncentrací se pohybovaly v jednotkách $\mu\text{g/l}$. Tato prokázaná skutečnost potvrzuje náš předpoklad, že peniciliny nepatří mezi stabilní látky a proto v průběhu procesu čištění odpadní vody dochází k jejich snadné eliminaci. Důvodem je pravděpodobně to, že dochází k hydrolýze nestabilního β -laktamového kruhu.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. 3. vyd. Praha: Grada, 2007, 372 s. ISBN 978-80-247-1672-5.
- [2] LACKO, Pavel. *Základy chemie léčiv*. 2010, 88 s.
- [3] LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- [4] STONE, Trevor a Gail DARLINGTONOVÁ. *Léky, drogy, jedy*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2003, 440 s. ISBN 80-200-1065-3.
- [5] KOLÁŘ, Milan. *Antimikrobní léčiva* [online]. 2011 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: www.lf.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/.../Antibiotika.ppt
- [6] HANOVCOVÁ, Irena. *Antibiotika* [online]. 2004 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: web.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/ppt/atb_skupiny.ppt
- [7] DEMNEROVÁ a Igor HOCHEL. *Úvod do farmaceutické mikrobiologie* [online]. 2013 [cit. 2014-05-08]. Dostupné z: <http://biomikro.vscht.cz/vyuka/fm/Farmaka3.pdf>
- [8] HYNIE, Sixtus. *Farmakologie v kostce*. Vyd. 2. Praha, 2001, 520 s. ISBN 80-725-4181-1.
- [9] European strategic action plan on antibiotic resistance. *World health organization regional office for Europe* [online]. 2011 [cit. 2014-04-13]. Dostupné z: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/147734/wd14E_AntibioticResistance_111380.pdf
- [10] BENITO-PEÑA, E., A.I. PARTAL-RODERA, M.E. LEÓN-GONZÁLEZ a M.C. MORENO-BONDI. Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2006, vol. 556, issue 2, s. 415-422 [cit. 2014-03-12]. DOI: 10.1016/j.aca.2005.09.054. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005016247>
- [11] *Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe* [online]. Copenhagen: World Health Organization, xvi, 65 p. [cit. 2014-04-13]. ISBN 92-890-1422-9.
- [12] LEVISON, Matthew E. a Julie H. LEVISON. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents. *Infectious Disease Clinics of North America* [online]. 2009, vol. 23, issue 4, s. 791-815 [cit. 2014-04-21]. DOI: 10.1016/j.idc.2009.06.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552009000531>

- [13] How drugs are eliminated from the body. In: *Medscape: How drug interact: what clinicians need to know* [online]. 2014 [cit. 2014-04-21]. Dostupné z: http://www.medscape.org/viewarticle/421137_1
- [14] HERRERA-HERRERA, Antonio V., Javier HERNÁNDEZ-BORGES, Teresa M. BORGES-MIQUEL a Miguel Ángel RODRÍGUEZ-DELGADO. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2013, vol. 75, 5 March 2013, s. 130-137 [cit. 2014-03-18]. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.11.026. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708512006413>
- [15] SEIFRTOVÁ, Marcela, Lucie NOVÁKOVÁ, Celeste LINO, Angelina PENA a Petr SOLICH. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, vol. 649, issue 2, s. 158-179 [cit. 2014-03-18]. DOI: 10.1016/j.aca.2009.07.031. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267009009623>
- [16] MICHAEL, I., L. RIZZO, C.S. MCARDELL, C.M. MANAIA, C. MERLIN, T. SCHWARTZ, C. DAGOT a D. FATTA-KASSINOS. Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water Research* [online]. 2013, vol. 47, issue 3, s. 957-995 [cit. 2014-04-23]. DOI: 10.1016/j.watres.2012.11.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135412008391>
- [17] CÁMARA, M., A. GALLEGO-PICÓ, R.M. GARCINUÑO, P. FERNÁNDEZ-HERNANDO, J.S. DURAND-ALEGRÍA a SÁNCHEZ. An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in ewe milk. *Food Chemistry* [online]. 2013, vol. 141, issue 2, s. 829-834 [cit. 2014-02-18]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.131. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613003877>
- [18] LARA, Francisco J., Monsalud DEL OLMO-IRUELA, Carmen CRUCES-BLANCO, Carolina QUESADA-MOLINA a Ana M. GARCÍA-CAMPAÑA. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2012, vol. 38, s. 52-66 [cit. 2014-02-18]. DOI: 10.1016/j.trac.2012.03.020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993612001781>
- [19] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 2. rozš. vyd. Praha: VŠCHT, 2007, 450 s. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [20] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007, 379 s. ISBN 978-802-4713-564.
- [21] *Konsensus používání antibiotik I.: Penicilinová antibiotika* [online]. 2002 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.infekce.cz/Standardy/ATBkonsens1DP.pdf>

- [22] URBÁŠKOVÁ, Pavla a Vilma MAREŠOVÁ. Phenoxymethylpenicillinum (penicilin V). *REMEDIA* [online]. 2005, č. 3 [cit. 2014-02-17]. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Mikrobiologie-a-infekcni-choroby/Phenoxymethylpenicillinum-penicilin-V/8-1c-ax.magarticle.aspx>
- [23] POPL, Milan. *Analytická chemie životního prostředí*. 4. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1999, 218 s. ISBN 80-708-0336-3.
- [24] LACINA, P.: *Využití plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí pro posouzení kontaminace odpadních a povrchových vod rezidui léčiv*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 134 s. Vedoucí dizertační práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [25] *Guide to solid phase extraction* [online]. 2001 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- [26] Solid phase extraction (SPE). *Sigma-Aldrich Co. LLC*. [online]. 2014 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&N=0+9642731&mode=partialmax&focus=product&lang=en®ion=CZ>
- [27] *SPE kolonky* [online]. 2014 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.gbs.cn/Upload/User/tjpxkj/201373114404821.jpg>
- [28] SIMPSON, Nigel J. *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*. New York: Marcel Dekker, 2000, xi, 514 p. ISBN 08-247-0021-X.
- [29] *Instructions for use: BAKERBOND spe™ Column Instructions* [online]. 2012 [cit. 2014-05-03]. Dostupné z: <http://www.avantormaterials.com/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=4294972001>
- [30] *Care and use manual: Oasis HLB Cartridges and 96-Well Plates* [online]. 2014 [cit. 2014-05-04]. Dostupné z: <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf>
- [31] VAŠÍČKOVÁ, P. *Rezidua léčiv ve vodách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 43 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
- [32] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- [33] NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [34] Things to Consider When Selecting HPLC System Tubing. In: *Separation Science* [online]. 2013 [cit. 2014-04-29]. Dostupné z: <http://www.sepscience.com/Techniques/LC/Articles/159-/Things-to-Consider-When-Selecting-HPLC-System-Tubing?pageNo=1>

- [35] *Diode array detector* [online]. 2006 [cit. 2014-05-08]. Dostupné z: http://www.sec.psu.ac.th/web-board/content/view_img.php?id=2698
- [36] MILDE, David. *Hmotnostní spektrometrie* [online]. 2010 [cit. 2014-05-08]. Dostupné z: <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/10-im-ms-1352292974.pdf>
- [37] ČOV Brno - Modřice. *Brněnské vodárny a kanalizace, a.s.* [online]. 2014 [cit. 2014-03-17]. Dostupné z: <http://www.bvk.cz/o-spolecnosti/odvadeni-a-cisteni-odpadnich-vod/cov-brno-modrice/>
- [38] IUPAC. Compendium of Chemical Terminology. *The Gold Book* [online]. Oxford. © 2014 [cit. 2014-05-12]. Dostupné z: <http://goldbook.iupac.org/>.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK a SYMBOLŮ

6-APA	kyselina 6-aminopenicilanová
ACN	acetonitril
APCI	ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BSK ₅	biologická spotřeba kyslíku za 5 dní
CNS	centrální nervová soustava
ČOV	čistírna odpadních vod
DAD	detektor s diodovým polem
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina/kapalina
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MF	mobilní fáze
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
NL	nerozpuštěné látky
ND	nedetekováno
PEN G	penicilin G
PEN V	penicilin V
RNA	ribonukleová kyselina
SPE	extrakce tuhou fází
TFA	trifluoroctová kyselina
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
WWTP	wastewater treatment plant (čistírna odpadních vod)