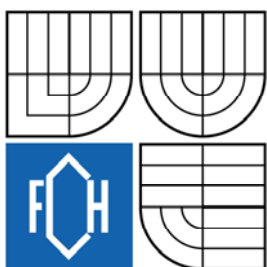


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE
OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE PRO STANOVENÍ REZIDUÍ LÉČIV

APPLICATION OF GAS CHROMATOGRAPHY FOR DETERMINATION OF DRUG
RESIDUALS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

RICHARD SÝKORA

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2009



Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0324/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Richard Sýkora**
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. Ludmila Mravcová

Název bakalářské práce:

Využití plynové chromatografie pro stanovení reziduí léčiv

Zadání bakalářské práce:

- zpracovat rešerši na dané téma
- na základě rešerše ověřit možnosti stanovení reziduí léčiv metodou GC po předchozí derivatizaci
- zhodnocení získaných výsledků

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.

Richard Sýkora
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

Analgetika jsou v dnešní době široce využívanou skupinou léčiv jak v humánní tak i ve veterinární medicíně. Rezidua těchto léčiv se dostávají do povrchových vod z čistíren odpadních vod, ve kterých nedojde k jejich eliminaci.

V bakalářské práci byly experimentálně ověřeny možnosti stanovení reziduí analgetik ve vodách pomocí plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s předchozí derivatizací. Rovněž byly porovnány jednotlivé derivatizační postupy. Byla vyzkoušena řada derivatizačních činidel, pro která byl optimalizován postup derivatizace vybraných analgetik (doba derivatizace, teplota, množství činidla). Dále bylo ověřeno několik postupů extrakce léčiv z vody pomocí extrakce na tuhou fázi. Použitou analytickou koncovkou při všech měření byla plynová chromatografie s hmotností detekcí (GC/TOF-MS).

ABSTRACT

Analgesics are nowadays widely used group of drugs in human and also in veterinary medicine. Residuals of these drugs enter surface waters via discharges from the waste water treatment plants as the result of insufficient efficiency of their removal during cleaning process.

In this bachelor thesis the possibilities of the analgesics residuals determination in waters using derivatization followed by gas chromatography with mass spectrometric detection were experimentally evaluated. Individual derivatization procedures were compared too. Several derivatization agents were tested and experimental parameters for selected analgesics were optimized (reaction time and temperature, amount of derivatizing agent). Further, several procedures of isolation of target compounds from water based on Solid Phase Extraction were verified. In all cases, gas chromatography with TOF-based mass spectrometric detection acts as final analytical method.

KLÍČOVÁ SLOVA

rezidua léčiv, plynová chromatografie, derivatizace, SPE

KEYWORDS

drug residuals, gas chromatography, derivatization, SPE

SÝKORA, R. *Využití plynové chromatografie pro stanovení reziduí léčiv*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 39 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. a Ing. Ludmile Mravcové za cenné rady a odborné vedení a rovněž dalším pracovníkům ÚCHTOŽP za pomoc a rady při řešení dílčích problémů.

1. ÚVOD.....	6
2. CÍL PRÁCE.....	6
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	8
3.1. Léčiva	8
3.1.1. Léčivé látky	8
3.1.2. Léčivé přípravky.....	8
3.1.3. Pomocné látky	8
3.1.4. Léková forma.....	8
3.2. Analgetika.....	8
3.2.1. Nenarkotická analgetika	8
3.2.1.1. Ibuprofen	9
3.2.1.2. Deriváty kyseliny salicylové	9
3.2.1.3. Ketoprofen.....	10
3.2.1.4. Naproxen	11
3.2.1.5. Diclofenac.....	11
3.3. Léčiva ve vodách.....	12
3.4. Metody stanovení léčiv.....	12
3.4.1. Extrakce na tuhém sorbetu	13
3.4.2. Derivatizace.....	14
3.4.2.1. Silylace	14
3.4.2.2. Acylace	15
3.4.2.3. Alkylace.....	15
3.4.2.4. Silylační činidla.....	15
3.4.3. Chromatografie.....	16
3.4.3.1. Plynová chromatografie.....	17
3.4.4. Hmotnostní spektrometrie	19
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4.1. Chemikálie.....	23
4.2. Přístroje.....	23
4.2.1. Nastavení plynového chromatografu.....	23
4.2.1.1. Plynový chromatograf	23
4.2.1.2. Hmotnostní spektrometr	23
4.3. Optimalizace derivatizačních metod	24
4.3.1. Retenční časy a hmotnostní spektra	24
4.3.2. Optimalizace množství použitého derivatizačního činidla.....	25
4.3.2.1. MSTFA.....	25
4.3.2.2. BSTFA.....	26
4.3.2.3. MTBSTFA.....	27
4.3.2.4. BSTFA + 1% TMCS	28
4.3.3. Optimální teplota derivatizace.....	29
4.3.4. Optimální čas derivatizace	29
4.4. Kalibrace pro BSFTA.....	30
4.5. Porovnání metod přípravy SPE kolonek	33
5. ZÁVĚR.....	35
6. POUŽITÁ LITERATURA	36
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	39

1. ÚVOD

Celosvětově vzrůstá výroba i spotřeba různých humánních i veterinárních léčiv. Tyto léčiva se potom dostávají různými cestami do životního prostředí. Jednou z cest jak se tyto látky dostávají do životního prostředí je jejich neúplné eliminování v čistírnách odpadních vod. Obecně se léčiva nacházejí ve vodách ve stopových množstvích, které nemohou způsobit akutní riziko, avšak se stávají nebezpečná při dlouhodobé expozici. V dnešní době je brán zřetel hlavně na antibiotika a hormonální léčiva, která narušují přirozenou mikroflóru v čistírnách odpadních vod a ty pak vykazují menší účinnost při čištění vod. Avšak už méně se berou v úvahu analgetika a nesteroidní antiflogistika, která nejsou tak nebezpečná, ale ve vodách je možná jejich detekce v koncentracích stejných a nebo i vyšších. Proto je zapotřebí vyvinout účinnou analytickou metodu k jejich zjištění.

2. CÍL PRÁCE

- Zpracovat rešerši na dané téma
- Na základě rešerše ověřit možnosti stanovení reziduí léčiv metodou GC po předchozí derivatizaci
- Zhodnocení získaných výsledků.

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1. Léčiva

Za léčiva se považují léčivé látky nebo jejich směsi, případně léčivé přípravky určené k aplikaci lidem nebo zvířatům [1].

3.1.1. Léčivé látky

Těmito látkami se rozumí látky přírodní nebo syntetické s farmakologickým či imunologickým účinkem, případně látky, které ovlivňují metabolismus. Tyto látky slouží k prevenci, k léčení a mírnění chorob, k diagnostice a k ovlivňování fyziologických funkcí [1].

3.1.2. Léčivé přípravky

Tímto termínem označujeme přípravky získané technologickým zpracováním léčivých a pomocných látek do určité lékové formy, balené ve vhodných obalech a náležitě označené. Rozlišujeme **humánní** přípravky určené k podání lidem a **veterinární** přípravky určené k podání zvířatům [1].

3.1.3. Pomocné látky

Jsou to složky léčivých přípravků, které samy nemají léčebný účinek, avšak umožňují a usnadňují výrobu, přípravu, uchování a aplikaci léčivých přípravků. Někdy mohou příznivě ovlivňovat farmakokinetické vlastnosti přítomných léčivých látek [1].

3.1.4. Léková forma

Je to způsob úpravy léčiva do formy vhodné pro léčebné použití. Musí být přizpůsobena požadované cestě přívodu léčiva do organismu a musí respektovat jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Podle způsobu podání ji dělíme na **enterální** a na **parenterální** [1].

3.2. Analgetika

Jsou látky snižující pocit bolesti, aniž by však výrazně ovlivňovaly smyslové vnímání a vědomí. Většina analgetik má také protizánětlivý (antiflogistický) a antipyretický (snižující horečku) účinek. Analgetika neléčí příčinu onemocnění, ale používají se k napomáhání vlastního léčení tím, že snižují zátěž a stres organismu způsobený bolestí, zánětem a zvýšenou teplotou. Analgetika dělíme podle účinku na **analgetika narkotická (anodyna, opioidní analgetika)** a na **analgetika-antipyretická** spolu s **nesteroidními protizánětlivými látkami (NSPZL)** [2].

3.2.1. Nenarkotická analgetika

Tato skupina zahrnuje **analgetika-antipyretika** spolu s **nesteroidními antiflogistiky**. Tato léčiva se používají potlačení mírnějších bolestí, horečky a různých zánětů. Mechanismem účinku tohoto léčiva je inhibice enzymu **cyklooxygenázy (COX)**. Tento enzym je zodpovědný za tvorbu prostaglandinů z kyseliny arachidonové. Prostaglandiny jsou látky způsobující bolestivé vjemy a zvyšující teplotu. Pro zvýšení účinku se často nenarkotická analgetika kombinují s jinými látkami např. kofein. Hlavními zástupci jsou Ibuprofen, Aspirin a Naproxen. K nežádoucím účinkům těchto látek patří gastrointestinální krvácení, ulcerace a perforace, které mohou být až smrtelné. Riziko těchto příhod se zvyšuje s velikostí podané

dávky. K dalším nežádoucím účinkům těchto léčiv se řadí nauzea, zvracení, průjem, flatulence, zácpa, dyspepsie, bolest břicha, melena (krev ve stolici), hemateméza (zvracení krve), ulcerativní stomatitis. Méně často gastritis (zánět žaludku) [2, 3].

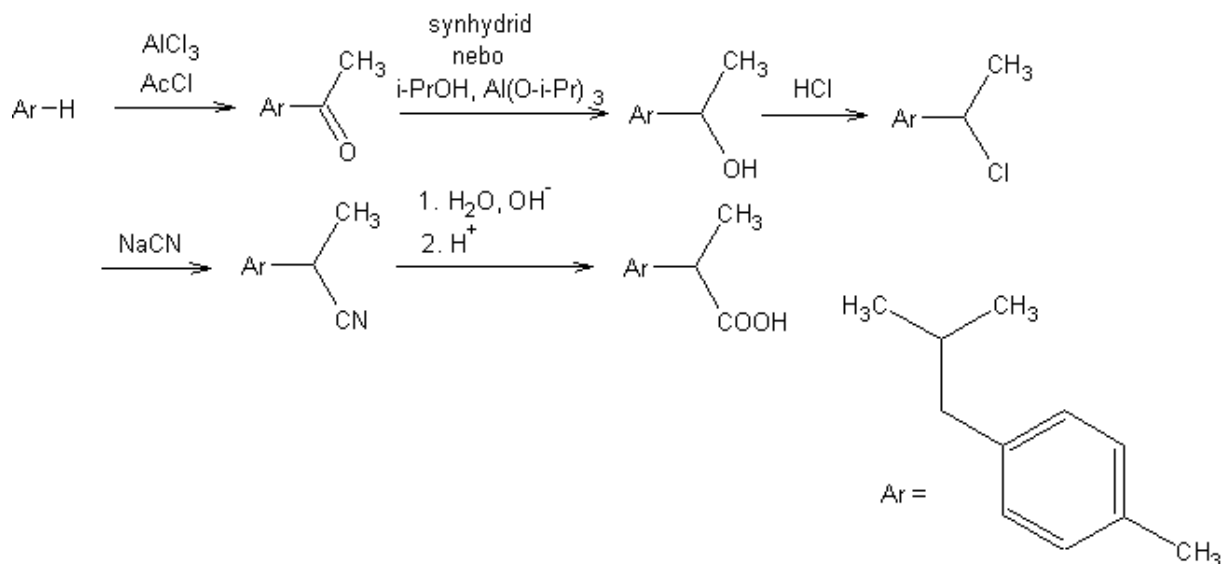
3.2.1.1. Ibuprofen

Ibuprofen patří do indikační skupiny nesteroidní antiflogistika, analgetika a antipyretika. Užívá se při mírných a středních bolestech různého původu (především bolesti kloubů, svalů, zubů, hlavy a menstruační bolesti), zvýšené teplotě a při zánětech.

Při dlouhodobém užívání ibuprofenu může docházet k poškozování stěny žaludku, čímž dochází k vzniku žaludečních vředů. Jedinou možností jak tomu předcházet je neužívat ibuprofen dlouhodobě.

Komerčními názvy jsou např.: **Apo-Ibuprofen, Brufen, Dolgit, Ibalgin, Ibumax, Nurofen**, aj. [2, 4, 5].

Jedna z možností výroby Ibuprofenu je jeho syntetizace z isobutylbenzenu (obr.č. 1).



3.2.1.2. Deriváty kyseliny salicylové

Jsou to účinná antipyretika s mírnými analgetickými a antipyretickými účinky. Odedávna byla využívána v lidovém léčitelství ke snížení zvýšené teploty ve formě glykosidu salicinu, který je obsažen ve vrbové kůře. Hojnější použití kyseliny salicylové a jejich derivátů umožnila až Kolbeho-Schmittova syntéza (obr.č. 2).

Nejrozšířenějším derivátem kyseliny salicylové je **kyselina acetylsalicylová**. Je to volně dostupné antipyretikum a analgetikum. Ve vyšších dávkách se stává i protizánětlivým léčivem. Díky těmto účinkům je často používána na léčení revmatoidních artritid různého typu.

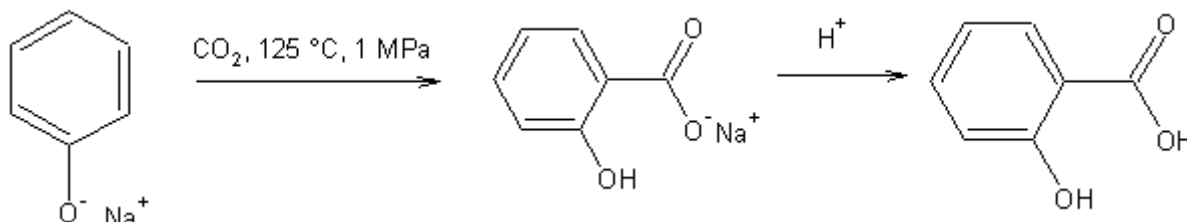
Kyselina acetylsalicylová snižuje agregační schopnost krevních destiček v důsledku inhibice syntézy tromboxanu A₂. Těchto účinků se využívá např. k prevenci srdečního infarktu a mozkové mrtvice.

Nežádoucími vedlejšími účinky mohou být až žaludeční nebo dvanáctníkové vředy, které vznikají při dlouhodobém užívání. Dalším nežádoucím účinkem může být zvýšená krvácivost

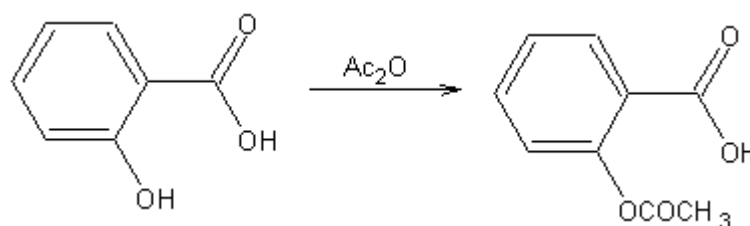
vyvolaná vyššími dávkami. U dětí mladších 12 let hrozí riziko vzniku Reyova syndromu, což je onemocnění jater a mozku, které může končit až smrtí.

Kyselina acetylsalicylová se získá acylací kyseliny salicylové acetanhydridem.

Jejími komerčními názvy jsou např.: **Aspirin, Acylpyrin, Anopyrin**, aj. [2, 6].



Obr.č.2: Kolbeho-Schmittova syntéza kyseliny salicylové



Obr.č.3: Syntéza kyseliny acetylsalicylové

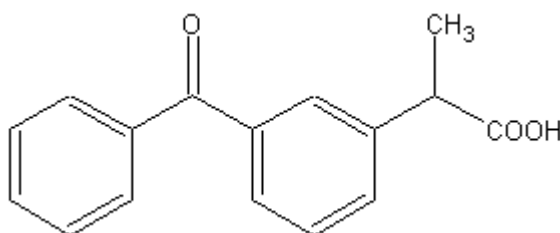
3.2.1.3. Ketoprofen

Ketoprofen je nesteroidní antirevmatikum ze skupiny derivátů kyseliny propionové se silným antiflogistickým, analgetickým a antipyretickým účinkem. Inhibuje syntézu prostaglandinů a leukotrienů, které se podílejí na vzniku bolesti a zánětu, má antibiodykininovou aktivitu a stabilizující účinky na lyzozomální membránu [7].

Při dlouhodobé léčbě je ketoprofen určen k léčení chronického revmatizmu (revmatoidní artritidy, ankylozující spondylartritidy-Bechtěrevovy choroby, zánětů kloubů při lupencepsoriartritické artritidy) a bolestivých forem artrózy (tj. degenerativních změn kloubů). Při krátkodobé léčbě se doporučuje na bolesti při zánětech kloubů (náhlých bolestivých stavů v oblasti ramenního kloubu, při zánětech šlachového aparátu, zánětech kloubních burz, zánětech kloubů při některých metabolických poruchách, např. dně), bolestí při artróze, náhlých bolestí bederní páteře a při náhle vzniklé bolesti zad způsobené podrážděním míšních nervů. [8].

Nežádoucími účinky mohou být stejně jako u ostatních léčiv této skupiny bolesti břicha, pocity na zvracení, zvracení, zácpa nebo průjem, poruchy trávení a anorexie. Výjimečně se mohou objevit bolesti hlavy, závratě, deprese, nervozita, poruchy jaterních funkcí a poruchy zraku [7, 8].

Komerčně je ketoprofen prodáván pod názvy: **Fastum Gel, Ketonal, Profenid**, aj.



Obr.č.4: Ketoprofen

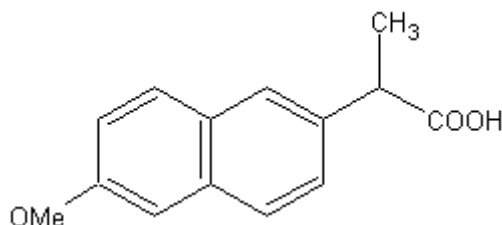
3.2.1.4. Naproxen

Naproxen má také analgetické, antiflogistické a antirevmatické účinky jako ostatní léčiva z této skupiny.

Naproxen účinně mírní bolest, horečku a zánět. Má analogické použití jako ibuprofen, tzn. že se používá nejen ke zmírnění bolesti hlavy, zubů, svalů, bolestí zad, menstruačních bolestí, ale také ke snížení horečky při nachlazení a zmírnění bolestí. Jestliže je naproxen ve formě potahovaných tablet, je jeho užívání možné až od dvanácti let.

Jako vedlejší účinky se nejčastěji vyskytují bolesti břicha, zvracení, nevolnost, průjem, větry, zácpa, vertigo, závratě, samovolné točení hlavy ke světlu, únava, poruchy spánku, hučení nebo šelesty v uších, případně oteklé nohy. Méně často se mohou vyskytnout otoky obličeje, krvácení z trávicího ústrojí, kopřivka, astmatický záchvat, ztráta vědomí, černá stolice obsahující krev, zvracení krve, zánět žaludku, nový nástup zánětu tlustého střeva a Crohnovy choroby, vředový zánět sliznice ústní dutiny. Tyto účinky jsou však závažné a vyžadují okamžitou lékařskou pomoc.

Naproxen je komerčně prodáván pod názvy: **Naprosyn, Naxen, Nalgesin S, Emoxen Gel, Aleve**, aj. [9].



Obr.č.5: Naproxen

3.2.1.5. Diclofenac

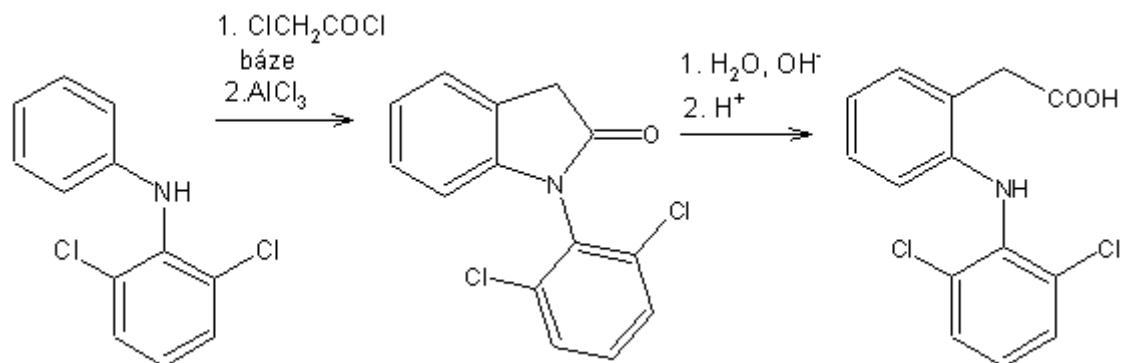
Diclofenac je dalším ze skupiny analgetik, antipyretik a nesteroidních antiflogistik. Je derivátem **kyseliny aryloctové**; poprvé byl syntetizován v 60. letech a obvykle je dostupný jako diclofenac sodný, draselný nebo diclofenac diethylamin. Diclofenac epolamin je nová sůl diclofenaku, která byla připravena za pomoci hydroxyethylpyrrolidinu [2, 10].

Používá se při akutních (prudkých) zánětech kloubů, včetně záchvatu dny, při chronických (dlouhotrvajících) zánětech kloubů, zejména při tzv. chronické polyartritidě nebo revmatoidní artritidě (chronické onemocnění postihující více kloubů), při zánětlivých a revmatických onemocněních páteře, jako např. při Bechtěrevově chorobě, při náporech bolestí u degenerativních postižení kloubů a páteře (při tzv. artrózách a spondylartrózách), při revmatických onemocněních měkkých tkání a při bolestivých poúrazových anebo pooperačních otocích nebo zánětech [11].

Při užívání diclofenacu mohou vzniknout tyto vedlejší účinky: střevní a žaludeční potíže jako nevolnost, zvracení, průjem; někdy může dojít k poruchám trávení, nadýmání, žaludečním křečím a nechutenství. Občas se mohou vyskytnout bolesti hlavy, rozrušení, popudlivost, únava, otupělost a závratě. V ojedinělých případech se mohou objevit poruchy vidění (mlhavé vidění, dvojité vidění), hučení v uších a přechodné poruchy sluchu. U přecitlivělých osob může dojít ke vzniku kožních projevů jako jsou vyrážky, kopřivka, zřídka též vypadávání vlasů. Výjimečně se mohou objevit příznaky zhoršení funkce ledvin (snížené vylučování moči, otoky, bílkovina nebo krev v moči). Vzácně může dojít ke vzniku žaludeční

nebo dvanáctníkovej vředovej choroby spojené s krváčením do zažívacieho ústroja (tmavě zbarvená stolice) [12].

Běžně je diclofenac prodáván pod komerčními názvy: **Voltaren, Diclofenac AL 25, Veral**, aj.



Obr.č.6: Syntéza Diclofenacu

3.3. Léčiva ve vodách

Rostoucí spotřeba léčiv užívaných v humánní i veterinární medicíně se stává novým environmentálním problémem. Kromě dalších mikropolutantů jsou rezidua léčiv významnými kontaminanty nejen povrchových, ale také podzemních vod [13]. Obsah léčiv ve vodách se pohybuje řádově v ng/l až v µg/l, což jsou relativně malá množství, a tak nehrozí téměř žádné akutní riziko; mohou však být velmi nebezpečné z pohledu chronické toxicity [14]. V životním prostředí způsobují závažné problémy v přírodních ekosystémech [15]. Do povrchových vod se dostávají většinou z čistíren odpadních vod (dále ČOV), které nedokáží léčiva úplně odstranit. V dnešní době je největší zřetel brán hlavně na antibiotika a na hormonální léčiva, které jsou nejnebezpečnější, protože nejvíce narušují bakteriální mikrobiotu ČOV, která pak vykazuje nižší efektivitu procesu čištění. Avšak daleko menší pozornost se věnuje jiným skupinám léčiv, jako jsou analgetika-antipyretika a nesteroidní antiflogistika, které mají menší vliv na snížení efektivitu procesu čištění ČOV, ale přesto se ve vodách nacházejí v množství srovnatelném s antibiotiky.

3.4. Metody stanovení léčiv

Sledovaná analgetika (kys. salicylová, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, diclofenac) jsou organické netěkavé látky. Od těchto vlastností se potom odvíjí úprava a způsob stanovení ze vzorků odebraných z příslušných ekosystémů.

Obvykle se, vzhledem ke své netěkavosti, stanovují pomocí kapalinové chromatografie [16, 17, 18, 19, 20]. Kromě toho je možné i stanovení analgetik plynovou chromatografií pomocí předchozí derivatizace, při které jsou analgetika reakcí s derivatizačním činidlem převedena na těkavější formu, kterou lze snadno převést do plynné fáze a poté analyzovat plynovou chromatografií. Jako detektory se většinou využívají hmotnostní spektrometry. V našem případě to bude hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu (Time Of Fly – TOF).

3.4.1. Extrakce na tuhém sorbetu

Extrakce na tuhém sorbetu (Solid Phase Extraction – SPE) je v současné době nejvýkonnější technika dostupná pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Její podstatou je zachycení molekul látky na tuhém sorbetu, přes který protéká vzorek. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbetu [21].

Při použití SPE se lze vyhnout řadě problémů, které jsou již tradičně spojovány s další metodou přípravy vzorků, a to s extrakcí kapalina-kapalina. Nejdůležitější výhodou oproti extrakci kapalina-kapalina je snížení spotřeby organických rozpouštědel, která jsou často řazena mezi látky toxické, ničící ozónovou vrstvu, ale i jinak nebezpečné.

SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, k jejich zakoncentrování a k odstranění nežádoucích látek rušících následná analytická stanovení.

Princip sorbce je obdobný jako u kapalinové chromatografie a také nabídka sorbentů je široká. Nejdůležitějším krokem je volba správného sorbentu. Metoda je rychlá, přesná a dobře reprodukovatelná.

SPE je technika, ve které se analyt sorbuje na tuhou fázi z fáze kapalně. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s fází kapalnou, ve které je analyt rozpuštěn. Sorbent je uložen v trubičkách z polypropylenu nebo ze skla. SPE se používá pro izolaci, čištění a zakoncentrování analytu. Po extrakci na tuhou fázi je analyt přítomen v roztoku, obsahuje minimum interferujících látek a je v dostatečné koncentraci. Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii, a proto i používané sorbenty jsou vlastně velice podobné. Používají se chemicky obrácené vázané fáze na bázi silikagelu, normální fáze a iontově výměnné fáze, ale i celá řada dalších sorbentů [22, 23].

V člancích, ze kterých bylo čerpáno, nejčastěji používali pro stanovení reziduí léčiv kolonky Oasis HLB [14, 16, 24, 25, 26]; dalšími často používanými kolonkami byly Oasis MCX [25] a StrataTM X [27]. V tabulce č. 1 jsou porovnány výtěžnosti podle druhu zvolené extrakční kolonky [25, 27].

Tabulka č.1: Porovnání výtěžností SPE

	Výtěžnost [%]		
	Oasis HLB	Oasis MCX	Strata TM X
Naproxen	79 ± 12	90 ± 3	102,1 – 104,1
Diclofenac	91 ± 10	105 ± 5	103,7 - 157
K. Salicylová	84 ± 18	71 ± 12	-
Ibuprofen	84 ± 11	80 ± 3	84,2 – 91,9
Ketoprofen	89 ± 14	106 ± 6	99,3 – 103,4



Obr.č.7: SPE kolonky

3.4.2. Derivatizace

Derivatizace je proces, při kterém je původní sloučenina chemicky pozměněna tak, aby vznikla nová chemická látka mající vhodné vlastnosti pro aplikování konkrétní analytické metody. Některé vzorky analyzované pomocí plynové chromatografie vyžadují, aby pro tuto metodu byly vhodně upraveny; k tomu nám právě slouží derivatizace. Používá se pro sloučeniny, které mají špatnou volatilitu a špatnou tepelnou stabilitu, případně které by mohly být při nástřiku absorbovány. Tyto sloučeniny by potom měly nereproduktivní oblast, výšku a tvar píku. Jiné sloučeniny mohou špatně reagovat na konkrétní detektor, a proto je zapotřebí takové sloučeniny derivatizací za vzniku jiné funkční skupiny „označit“ pro zlepšení detekce. Kromě zlepšení vhodnosti a odpovědi, může derivatizace zlepšit rozlišení při koeluci sloučenin a překrývání piků, které je v plynové chromatografii nežádoucí [28, 29, 30].

Dobré derivatizační činidlo a postup by mělo produkovat požadovanou změnu v chemické sloučenině (sloučeninách), která nás zajímá. Proto musí být reprodukovatelné, efektivní zejména neriskantní. Pro plynovou chromatografii existují tři základní typy derivatizačních reakcí: silylace, acylace a alkylace. Silylační činidla reagují se sloučeninami obsahujícími ve své funkční skupině aktivní vodík např. $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{SH}$. Tato činidla jsou nejčastějším typem používaným v plynové chromatografii. Acylační činidla reagují s vysoce polárními funkčními skupinami jako jsou aminokyseliny a sacharidy. Alkylační činidla jsou zacílena na aktivní vodík na aminech a na kyselých hydroxylových skupinách [28, 29].

3.4.2.1. Silylace

Silylace je nejrozšířenější derivatizační postup při analýze vzorku plynovou chromatografií. Silylační činidla jsou oblíbená, protože jsou snadno použitelná a formy jejich derivátů jsou snadno „čitelné“. Při silylaci je aktivní vodík nahrazen alkylsilyl skupinami, jako jsou trimethylsilyl (TMS) nebo t-butyldimethylsilyl (t-BDMS). Ve srovnání s jejich mateřskými sloučeninami jsou jejich silyl deriváty těžké, méně polární a více tepelně stabilní. Výsledkem je lepší separace plynovou chromatografií a posílení detekce.

Silylační činidla jsou obecně citlivá na vlhkost a vyžadují, aby byla zapečetěna pod dusíkem, a aby se zabránilo jejich deaktivaci. Deriváty TMS jsou také citlivé na vlhkost, a proto byly zavedeny t-BDMS činidla, jejichž deriváty jsou 10000 krát více hydrolyticky stabilní než TMS deriváty. Obě jak TMS tak i t-BDMS činidla jsou vhodná pro širokou škálu

látek; nabízejí vynikající tepelnou stabilitu a mohou být použita za různých podmínek a při různých aplikacích v plynové chromatografii.

Analýza podle populární kombinace plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS) často vyžaduje speciální derivatizační vzorek. Zvláště účinné je v těchto aplikacích činidlo MTBSTFA [28].

3.4.2.2. Acylace

Acylační činidla nabízejí stejné výhody jako silylační činidla: vytvoření méně polárních a více těkavých derivátů. Avšak v porovnání s nimi se acylační činidla lépe zaměřují na vysoce polární, multifunkční sloučeniny, jako jsou sacharidy a aminokyseliny. Kromě toho poskytují acylační činidla výraznou výhodu zavedením elektron-odstupujících skupin, čímž se zlepší detekce během analýzy. Tato činidla jsou k dispozici jako anhydridy kyselin, acyl deriváty, nebo acyl halogenidy. Acyl halogenidy a acyl deriváty jsou vysoce reaktivní a jsou vhodné pro použití v případě, že je rozhodujícím faktorem sterická překážka. Anhydridy kyseliny se dodávají v řadě fluorovaných konfigurací, které zlepšují detekci. Deriváty fluorovaných anhydridů se používají především pro detekci detektorem elektronového záchyty (ECD), ale mohou být použity i pro plamenoionizační detekci (FID). Fluorované anhydridy se často používají k deprivatizaci vzorků, především k potvrzení zneužívání drog. Navzdory zvláštní užitečnosti těchto činidel jejich kyselá povaha vyžaduje, aby jakýkoli jejich přebytek nebo vedlejší produkt byl odstraněn před analýzou, aby se zabránilo poškození kolony [28].

3.4.2.3. Alkylace

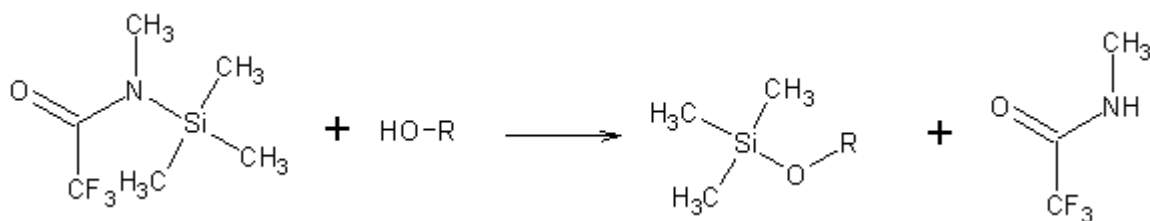
Stejně jako u ostatních činidel tak i alkylační činidla snižují molekulární polaritu nahrazením aktivních vodíků alkylovými skupinami. Tato činidla se používají ke změně sloučeniny s kyselým vodíkem jako jsou karboxylové kyseliny a fenoly. Alkylační činidla mohou být použita samostatně k vytvoření esterů, etherů a amidů; nebo mohou být použita ve spojení s acylačními nebo silylačními činidly. Dvoufázový postup se běžně používá k deprivatizování aminokyselin, kde vícenásobné funkční skupiny mohou vyžadovat ochranu během derivatizace.

Vzhledem k dostupnosti těchto činidel a jejich snadnému použití je esterifikace (reakce kyseliny s alkoholem v přítomnosti katalyzátoru za vzniku esteru) nejpopulárnější způsob alkylace. Alkylační činidla jsou k dispozici v několika konfiguracích, které umožňují tvorbu různých esterů. Alkyl estery jsou stabilní a mohou být tvořeny rychle a kvantitativně. Změnou délky substituované alkyl skupiny, může vzniknout různá retence derivátů. Kromě vytváření jednoduchých esterů, mohou být alkylační činidla použita v extrakčních procedurách, které mohou být prezentovány v biologických maticích [28, 29].

3.4.2.4. Silylační činidla

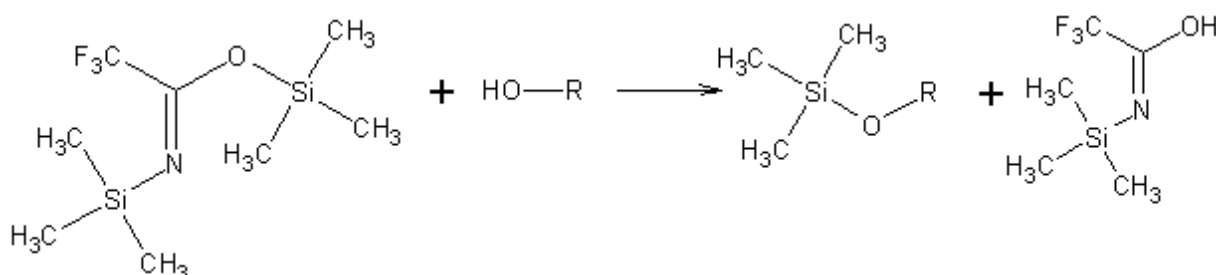
Pro derivatizaci analgetik byly vybrány ke srovnání tyto čtyři silylační derivatizační činidla: MSTFA, BSTFA, MTBSTFA a BSTFA + 1% TMCS.

MSTFA (N-Methyl-N-trifluoroacetamid) – při reakci nahrazuje labilní vodíkový atom a tvoří nejtěkavější deriváty, které jsou tepelně stabilní a nejpoužitelnější k analýze těkavých stopových materiálů, kde mohou mít deriváty píky blízko činidlům nebo vedlejším produktům [31].



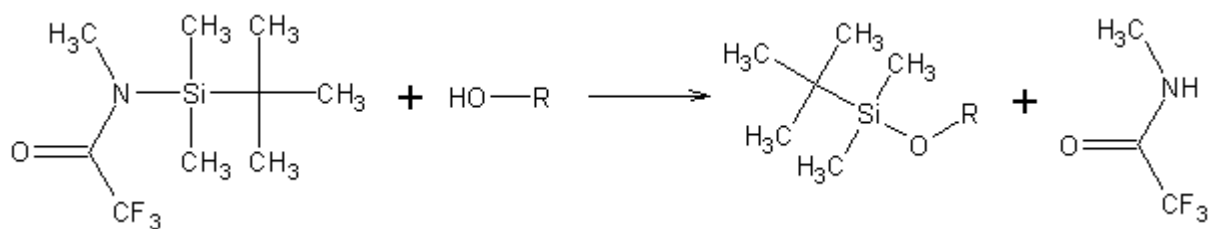
Obr.č.8: Mechanismus reakce MSTFA

BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) je to účinný trimethylsilylový dárce, který reaguje s celou řadou polárních sloučenin a nahrazuje jejich labilní vodíkový atom TMS skupinou. TMS deriváty BSTFA jsou těkavé a tepelně stabilní, proto se běžně používají v plynové chromatografii s hmotnostní spektrometrií BSTFA se používá k analyzování zneužívání drog jako jsou THC metabolity, Morfin a PCP [32, 33].



Obr.č.9. Mechanismus reakce BSTFA

MTBSTFA (N-methyl-N - [tert-butyldimethyl-silyl] trifluoroacetimid); tímto činidlem se deprivatizují hydroxyly, karboxyly, trioly a primární a sekundární aminy. Typické jsou výtěžky > 96%. Deriváty t-BDMS jsou 104 krát stabilnější než deriváty TMS. Vedlejší produkty reakce jsou neutrální a těkavé. Zvýšení silylačního potenciálu jde zajistit přidáním 1% TBDMCS (tert-Butyldimethylchlorosilane) [34].



Obr.č.10: Mechanismus reakce MTBSTFA

BSTFA + 1%TMCS (N, O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamid s 1% Trimethylchlorosilan) má stejné vlastnosti jako samotné BSTFA a navíc lépe derivatizuje amidy, mnohé sekundární aminy a blokové hydroxyly, které není možno samotným BSTFA derivatizovat [33, 35].

3.4.3. Chromatografie

Chromatografie je separační metoda, tzn. Metoda, při které se oddělují – separují složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku [21].

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Těmito fázemi jsou stacionární fáze, která je nepohyblivá a mobilní pohyblivá fáze. Vzorek je pomocí mobilní

fáze unášen soustavou přes stacionární fázi. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdržují složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované.

Chromatografické metody dělíme podle několika hledisek:

- **Podle skupenství mobilní fáze**
 - Kapalinná chromatografie (Liquid Chromatography – LC) – mobilní fáze je kapalina
 - Plynová chromatografie (Gas Chromatography – GC) – mobilní fází je plyn
- **Podle uspořádání stacionární fáze**
 - Kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně)
 - Plošné techniky:
 - Papírová chromatografie (Paper Chromatography – PC) – stacionární fáze je součástí chromatografického papíru.
 - Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography – TLC) – stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce nebo hliníkové fólii).
- **Podle povahy děje, který převládá při separaci**

Obvykle se při separaci uplatňuje několik fyzikálně-chemických dějů současně, ale jeden z nich převládá.

 - Rozdělovací chromatografie – o separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární fází (kapalina) a mobilní fází (kapalina nebo plyn).
 - Adsorpční chromatografie – o separaci rozhoduje různá schopnost složek poutat se (adsorbovat se) na povrch stacionární fáze (tuhá látka).
 - Iontově-výměnná chromatografie – o separaci rozhodují různě velké elektrostatické přitažlivé síly mezi funkčními skupinami stacionární fáze (iontoměnič) a ionty vzorku.
 - Gelová chromatografie – složky se separují podle velikosti na pórovité stacionární fází (gelu); menší molekuly vzorku se v pórech gelu zdržují déle (molekulově síťový efekt).
 - Afinitní chromatografie – stacionární fáze je schopna vázat ze vzorku právě určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu) [21].

3.4.3.1. Plynová chromatografie

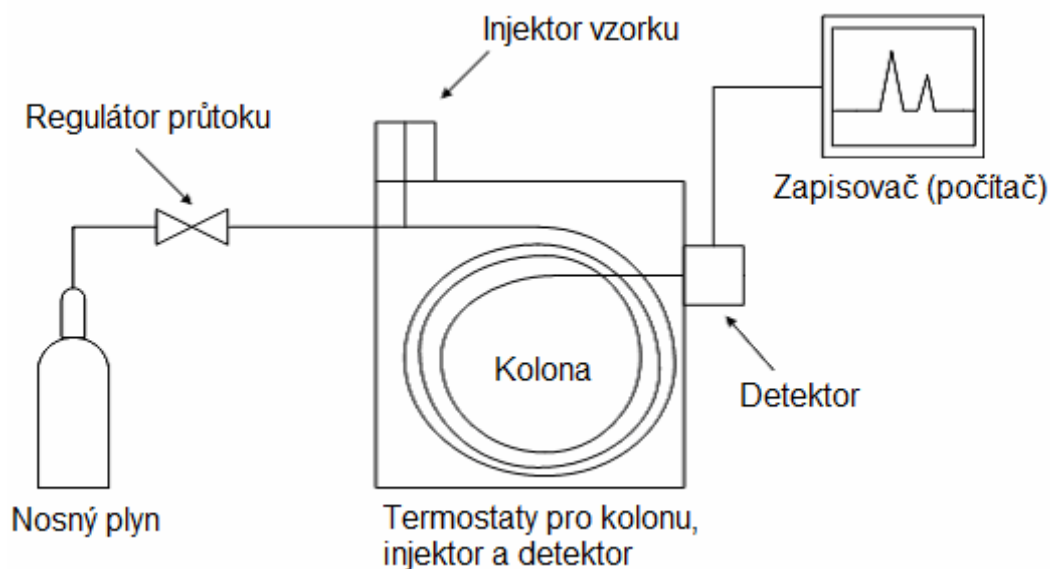
Plynová chromatografie je analytická a separační metoda, která má výsadní postavení v analýze těkavých látek. Mezi hlavní výhody této techniky patří jednoduché a rychlé provedení analýzy, účinná separace látek a malé množství vzorku potřebné k analýze. Existuje mnoho variant; v praxi jsou nejvíce rozšířené plynové chromatografy s kapilárními kolonami [36].

Mobilní fází v plynové chromatografii je nosný plyn, který je inertní (obvykle vodík, dusík, hélium nebo argon) a nereaguje jak se vzorkem, tak ani se stacionární fází. Při volbě nosného plynu se uvažují následující faktory: viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, typ používaného detektoru a cena plynu.

Stacionární fází v plynové chromatografii může být buď pevná látka nebo kapalina. V případě pevné stacionární fáze je distribuce mobilní fáze založena na adsorpci vzorku na stacionární fází, kterou obvykle bývá aktivní uhlí, silikagel nebo molekulová síta. V případě kapalně stacionární fáze se jedná o rozdělovací mechanismus, kdy dochází k rozpuštění

vzorku v obou fázích. Kapalná stacionární fáze bývá tvořena např. polyethylenglykoly, polyestery nebo polysiloxany.

Plynový chromatograf se skládá z regulátoru tlaku a průtoku, injektoru, kolony, detektoru a vyhodnocovacím zařízením, kterým bývá počítač.



Obr.č.11: Zjednodušené schéma plynového chromatografu [36]

Regulátor tlaku a průtoku je elektrické regulační zařízení, které slouží k ovládní průtoku a tlaku nosného plynu. Regulátor průtoku zaručuje konstantní průtok plynu kolonou a detektorem bez ohledu na typ nosného plynu, teplotu a rozměry kolony. Tlak je potom proměnnou veličinou a nastaví se automaticky podle viskozity plynu, vnitřního průměru kolony a délky kolony tak, aby průtok kolonou byl konstantní.

Injektor je zařízení na dávkování vzorku do kolony plynového chromatografu. Na dávkování jsou kladeny veliké nároky. Vzorek je zapotřebí dopravit do kolony v co nejkratším čase a měl by zaujmout co nejmenší prostor. Množství nadávkovaného vzorku by mělo zaujmout prostor odpovídající jednomu teoretickému patru. Objem injektoru by měl být malý a měl by jím protékat velký proud plynu. Kapalné vzorky je nutné okamžitě zplynit, aby přicházely do kolony ve formě par. Teplota nástřiku má být asi 50°C nad bodem varu analyzované látky a nejčastěji se dávkuje mikrostříkačkou opatřenou jehlou, která propíchně septum.

Kolona bývá v plynové chromatografii buď náplňová a nebo kapilární. Náplňová kolona je trubice o průměru 2 až 5 mm a obsahuje sorbent nebo nosič se zakotvenou kapalnou fází; délka kolony bývá od desítek centimetrů do několika metrů. Kolony bývají vyrobeny ze skla nebo nerezové oceli. Kapilární kolony jsou vyráběny z křemenného skla a kvůli pevnosti bývají potaženy filmem polyamidu. Kapilární kolony nemívají průměr větší než 5 mm a jejich délka se může pohybovat od deseti do stovek metrů. Stacionární fáze je rozprostřena na vnitřních stranách kapiláry. Kolona je umístěna v peci, která je temperována na určitou teplotu. Teplota je důležitou proměnnou v plynové chromatografii. Jestliže je teplota během celé analýzy neměnná, pak se jedná o takzvanou isothermální analýzu. Jestliže se teplota během analýzy mění, pak se jedná o teplotní gradient, kterého se využívá pro analýzu vzorku multikomponentálních směsí, aby se zlepšily tvary chromatografických píků a zkrátila doba analýzy.

V plynové chromatografii se využívá několik druhů detektorů. Těmi jsou:

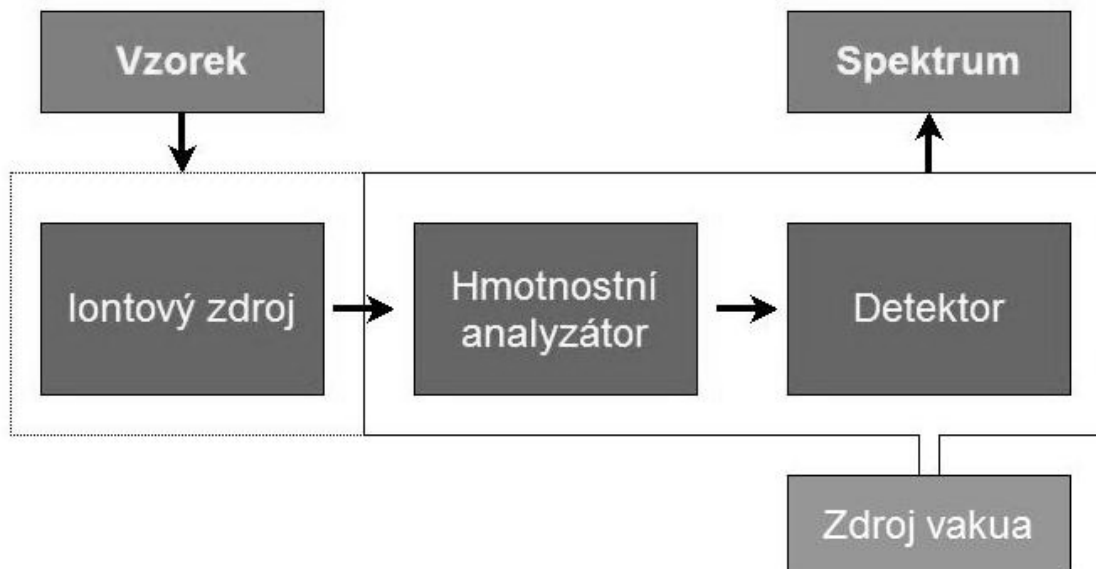
- **Tepelně vodivostní detektor (TCD)** – je velmi často používaný, oblíbený detektor zejména pro svou univerzálnost. U tohoto detektoru je vysoká oblast linearity odezvy. Principem měření je skutečnost, že zahřáté těleso se ochlazuje rychlostí závislou na složení okolního prostředí, které teplo odvádí. Detektor obsahuje zahříváné odporové vlákno, které se ochlazuje protékajícím plynem, čímž se mění jeho elektrický odpor. Jestliže detektorem prochází pouze nosný plyn, vlákno se ochlazuje rovnoměrně, jeho teplota i odpor jsou konstantní. Obsahuje-li nosný plyn eluovanou látku, dojde ke změně teploty vlákna a ke změně elektrického odporu. Nejčastěji se jako nosný plyn používá hélium nebo vodík. V praxi se vedle sebe zapojují dva TCD detektory, do jedné z měrných cel se přivádí čistý nosný plyn, do druhé plyn vycházející z kolony.
- **Plamenový ionizační detektor (FID)** – poskytuje odezvu téměř na všechny organické látky. V FID je plyn z chromatografické kolony zaváděn do kyslíkovo-vodíkového plamene, kde probíhají chemoionizační reakce vedoucí ke vzniku nabitých částic. V elektrickém poli dochází ke vzniku elektrického proudu. Cílem je dosažení co nejdokonalejšího sběru iontů. Měříme zde ionizační účinnost hoření.
- **Plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem (AFID)** – je to modifikace FID, kde je k ústí trysky umístěna peleta soli alkalického kovu (Vebr, KCl) používaná zejména ke stanovení fosforu, dusíku a síry v organických látkách.
- **Detektor elektronového záchytu (ECD)** – je to selektivní ionizační detektor citlivý na elektronegativní atomy, zejména na halogeny. Zdrojem ionizace je v ECD ^3H nebo ^{63}Ni , emitující částice β . Nosným plynem je dusík, který je vlivem β záření ionizován, čímž vzniká konstantní proud pomalých elektronů. Atomy halogenů (elektronegativní atomy) zachytávají pomalé elektrony, čímž dochází ke snížení ionizačního proudu. Toto snížení proudu je měřítkem koncentrace daných elektronegativních atomů. Nejmenší detekované množství je o několik řádů nižší než u FID. Detektor je velmi vhodný pro stopovou analýzu pesticidů v životním prostředí.
- **Heliový ionizační detektor (HeD)** – patří k univerzálním detektorům a je citlivý na organické i anorganické sloučeniny včetně permanentních plynů. Pracuje na principu ionizace heliovými atomy vzbuzenými do metastabilního stavu s vysokým ionizačním potenciálem. Nestabilního stavu heliových atomů je dosahováno absorpcí elektronů emitovaných z radioaktivního zdroje při současném působení elektrického pole o velké intenzitě. Všechny sloučeniny s nižším ionizačním potenciálem jsou ionizovány a poskytují signál úměrný jejich množství. Jako nosný plyn je potřeba používat helium.
- **Hmotnostně spektrometrický detektor (MS)** – Umožňuje nejen detekci přítomnosti analytu, ale také jeho identifikaci na základě hmotnostního spektra [37].

3.4.4. Hmotnostní spektrometrie

Je to fyzikálně-chemická metoda určující hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty [38]. Tato metoda má výbornou vypovídající schopnost o struktuře analyzovaných látek. Nejvíce se hmotnostní spektrometrie využívá ke stopové analýze organických látek s důrazem na zjištění jejich struktury. Hmotnostní spektrometrie umožňuje určit izotopový poměr prvku ve vzorku ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$, $^{33}\text{S}/^{32}\text{S}$).

Přístroj se nazývá hmotnostní spektrometr a má čtyři základní prvky:

1. **Iontový zdroj**
2. **Hmotnostní analyzátor**
3. **Detektor**
4. **Řídící počítač**



Obr.č.12: Schéma hmotnostního spektrometru [39]

Iontové zdroje dělíme na dva druhy:

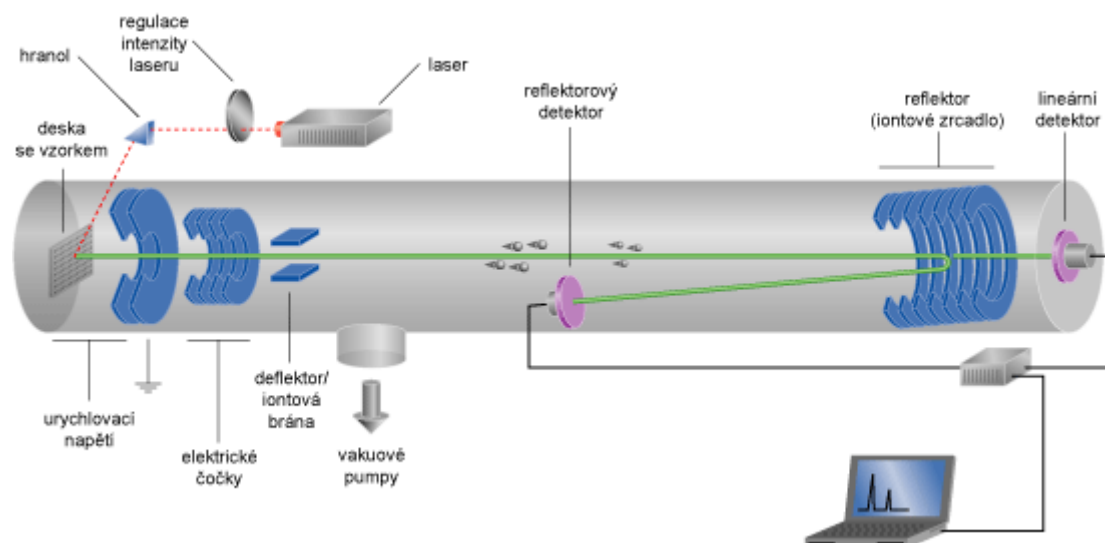
1. Tvrdé – vysoce energetická ionizace, molekuly se rozpadají na fragmenty, sem patří **Ionizace elektrickým polem**.
2. Měkké - málo energetické, vznikají hlavně molekulární adukty, minimální fragmentace a jsou to: **Elektrosprej**, **MALDI** (desorpce/ionizace laserem za účasti matrice), **Chemická ionizace za atmosférického tlaku** a **Ionizace ostřelováním vzorku rychlými atomy**

Hmotnostních analyzátorů máme také několik typů, těmito typy jsou:

- **Magnetický hmotnostní analyzátor** – je to nejstarší analyzátor, avšak z hlediska rozlišení a hmotnostního rozsahu to je nejdokonalejší disperzní prvek. Umožňuje prostorové rozdělení monoenergetického svazku iontů podle hodnoty m/z . Konstrukčně je magnetický hmotnostní analyzátor elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci procházejí ionty. Ionty, které jsou urychleny v iontovém zdroji mají kinetickou energii danou vztahem:
$$E_K = \frac{m \cdot v^2}{2} = z \cdot V$$
- **Elektrický analyzátor** – je to pomocný disperzní prvek umožňující energeticky sjednotit proud iontů vycházejících z iontového zdroje nezávisle na jejich hodnotách m/z . Elektrický analyzátor je součástí přístrojů s dvojí fokusací (sektorových), pro něž je typické vysoké rozlišení a cena.
- **Kvadrupolový analyzátor (filtr)** – bývá součástí hmotnostních spektrometrů s nízkým rozlišením, vhodných pro spojení s plynovou nebo kapalinovou chromatografií. Konstrukčně se jedná o čtyři kovové tyče hyperbolického nebo kruhového průřezu, do nichž je přiváděno stejnosměrné a střídavé napětí. Ionty

vlétávající do prostoru mezi tyčemi se dostanou do střídavého elektrického pole a začínají oscilovat. Při vhodném poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí a dané hodnotě těchto napětí projdou kvadrupolem jenom ionty o určitém poměru m/z . Zařízení se tak chová vlastně jako filtr nastavený na určitou hodnotu m/z . Změnou vkládaných napětí je možné nechat projít filtrem postupně ionty v celém rozsahu hodnot m/z .

- **Iontová past** – je to pomocné zařízení, které umožňuje účinkem elektrického pole uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Je složena ze vstupní a výstupní elektrody kruhového průřezu a z prstencové středové elektrody. Krajiní elektrody jsou uzemněny a na středovou elektrodu je vkládáno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Ionty jsou nuceny se uvnitř iontové pasti pohybovat po uzavřených kruhových drahách. S rostoucí amplitudou napětí se ionty s rostoucím m/z dostávají na nestabilní trajektorie a opouštějí prostor iontové pasti směrem do detektoru.
- **Průletový analyzátor (Time Of Fly – TOF)** – Je to nejjednodušší analyzátor, který je tvořen pouze prázdnou trubicí. K časovému rozdělení iontů podle m/z dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Hmotnější ionty se pohybují pomaleji než ionty lehčí a doráží proto do detektoru později. Dosažené rozlišení závisí na délce dráhy, kterou ionty v průletovém analyzátoru urazí. Průletový analyzátor vyžaduje použití iontového zdroje pracujícího v pulzním režimu.



Obr.č.13: Schéma hmotnostního spektrometru na principu MALDI-TOF [40]

Detektory v hmotnostní spektrometrii dělíme do dvou skupin:

1. **Detektory pro přímá měření** – detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem stanovovaných iontů.
2. **Násobičové detektory** – využívají efekt násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu iontů.

Detektory pro přímá měření jsou nezbytné pro určení přesného izotopového zastoupení prvků například při zjišťování stáří hornin. Jsou také obvykle součástí specializovaných zakázkových systémů.

Násobičové detektory jsou nejčastěji používaným typem detektorů v metodě hmotnostní spektrometrie. Jsou také schopny poskytnout měřitelný signál pro jednotlivé ionty.



Obr.č.14: Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem [41]

Tabulka č.2: Porovnání různých způsobů stanovení léčiv metodou plynové chromatografie

SPE	Derivatizační činidlo	Nosný plyn	Chromatograf	Detektor	Zdroj
Oasis HLB	diazomethan	Helium	HRGC 8060	MS - MD 800	[43]
Oasis HLB	MTBSTFA BSTFA	Helium	Varian 4000	MS – iontová past	[42]
Oasis HLB	MTBSTFA	Helium	HP 6890	MS - kvadrupól	[26]
Strata™ X	MSTFA	Helium	HP 6890	MS	[27]
Oasis MCX	MSTFA	Helium	HP 6890	MS - kvadrupól	[25]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Chemikálie

- Methanol, pro HPLC, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
- Ethyl acetát, pro HPLC, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
- Aceton p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
- n-hexane, pro HPLC, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
- Pyridin, Lach-Ner, s.r.o., Česká Republika
- Kyselina salicylová, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Ibuprofen sodná sůl, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Naproxen, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Ketoprofen, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- Diclofenac sodná sůl, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- MSTFA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- BSTFA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- BSTFA + 1% TMCS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo
- MTBSTFA, Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo

4.2. Přístroje

- Analytické váhy HR-120, A&D Instruments, Japonsko
- Přístroj EVATERM pro sušení dusíkem a zahřívání vzorků, LABICOM, ČR
- Běžné laboratorní vybavení
- Plynový chromatograf Pegasus IV D, LECO[®], USA

4.2.1. Nastavení plynového chromatografu

Analýza reálných vzorků byla provedena pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s detekcí doby letu (GC/MS-TOF) na přístroji Pegasus IV D. Jako primární kolona byla použita HT-5 (30 m x 0,25 mm, 0,1 μ m vrstva filmu tvořená z 5 % fenylem a z 95 % dimethylpolysiloxanem) a jako sekundární BPX-50 (1,5 m x 0,1 mm, 0,1 μ m vrstva filmu tvořená z 50 % fenylem a z 50 % dimethylpolysiloxanem). Nosným plynem bylo helium. Podmínky analýzy byly následující:

4.2.1.1. Plynový chromatograf

- Množství nastříknutého vzorku: 1 μ l
- Teplota nástřiku: 270 °C
- Metoda nástřiku: *splitless*
- Průtok nosného plynu: 1 ml/min
- Teplotní program: začátek na 80 °C po dobu 1 min, poté nárůst teploty 20 °C/min do 300 °C, která byla udržována po 2 min
- Teplota Transfer Line: 280 °C

4.2.1.2. Hmotnostní spektrometr

- Rozsah sledovaných molekulových hmotností: 50 - 600
- Skenovací rychlost: 5 spekter / s
- Napětí na detektoru: 1850 V
- Teplota iontového zdroje: 220 °C

4.3. Optimalizace derivatizačních metod

Byly použity čtyři druhy derivatizačních činidel (MSTFA, BSTFA, MTBSTFA, BSTFA + 1% TMCS). Pro každé činidlo bylo zapotřebí optimalizovat metodu (množství činidla, teplota derivatizace, čas derivatizace).

4.3.1. Retenční časy a hmotnostní spektra

Bylo použito čtyř druhů činidel (BSTFA, MSFTA, BSFTA + 1% TMCS, MTBSTFA). Pro BSTFA, MSTFA a BSTFA + 1% TMCS byly použity následující charakteristické hmotnosti jednotlivých látek:

- Kyselina salicylová: $m/z = 267 \pm 1$
- Ibuprofen: $m/z = 160 \pm 1$
- Naproxen: $m/z = 185 \pm 1$
- Ketoprofen: $m/z = 282 \pm 1$
- Diclofenac: $m/z = 214 \pm 1$

Při použití těchto činidel vycházely následující retenční časy pro jednotlivá léčiva:

- Kyselina salicylová: $RT = 487$ s
- Ibuprofen: $RT = 523$ s
- Naproxen: $RT = 685$ s
- Ketoprofen: $RT = 719$ s
- Diclofenac: $RT = 741$ s

Protože u MTBSTFA nevzniká TMS jako u předchozích činidel ale t-BDMS je zapotřebí použít jiné charakteristické hmotnosti pro jednotlivé látky a těmi jsou:

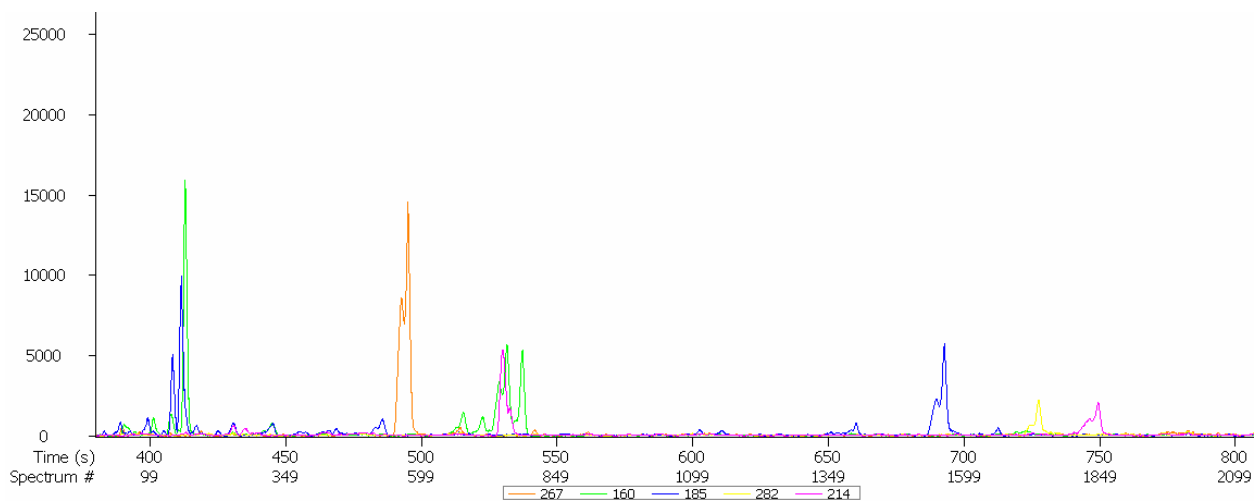
- Kyselina salicylová: $m/z = 252 \pm 1$
- Ibuprofen: $m/z = 267 \pm 1$
- Naproxen: $m/z = 287 \pm 1$
- Ketoprofen: $m/z = 295 \pm 1$
- Diclofenac: $m/z = 354 \pm 1$

Díky použití MTBSTFA se lišily i jednotlivé retenční časy léčiv:

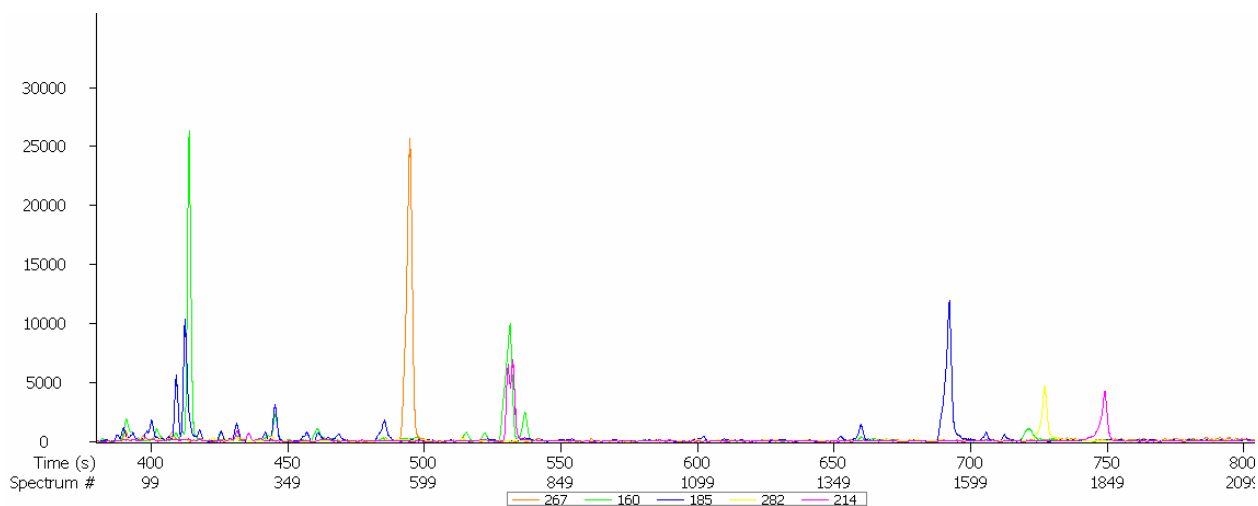
- Kyselina salicylová: $RT = 632$ s
- Ibuprofen: $RT = 600$ s
- Naproxen: $RT = 746$ s
- Ketoprofen: $RT = 787$ s
- Diclofenac: $RT = 813$ s

4.3.2. Optimalizace množství použitého derivatizačního činidla

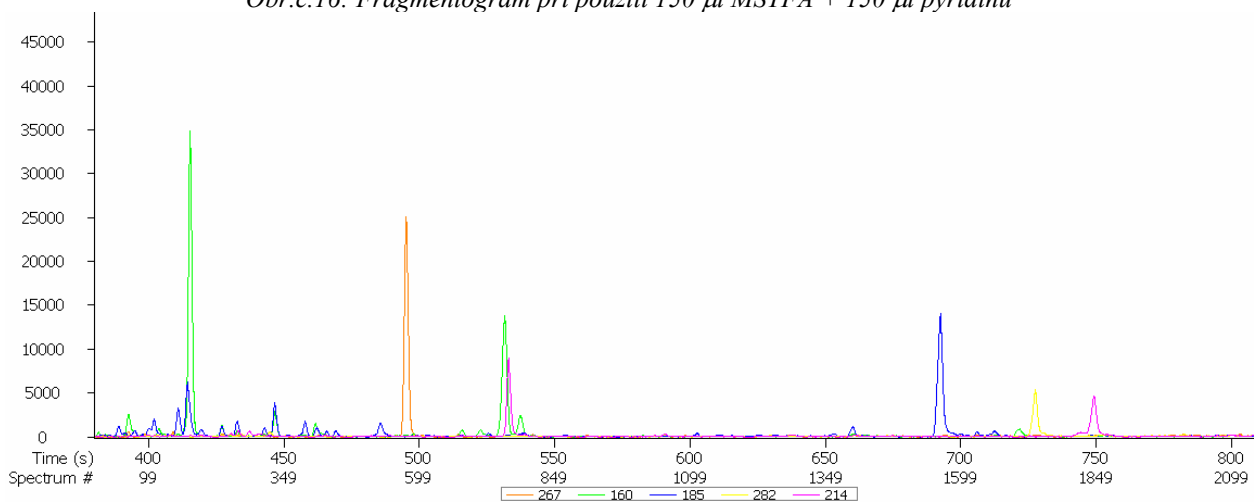
4.3.2.1. MSTFA



Obr.č.15: Fragmentogram při použití 100 µl MSTFA + 300 µl pyridinu



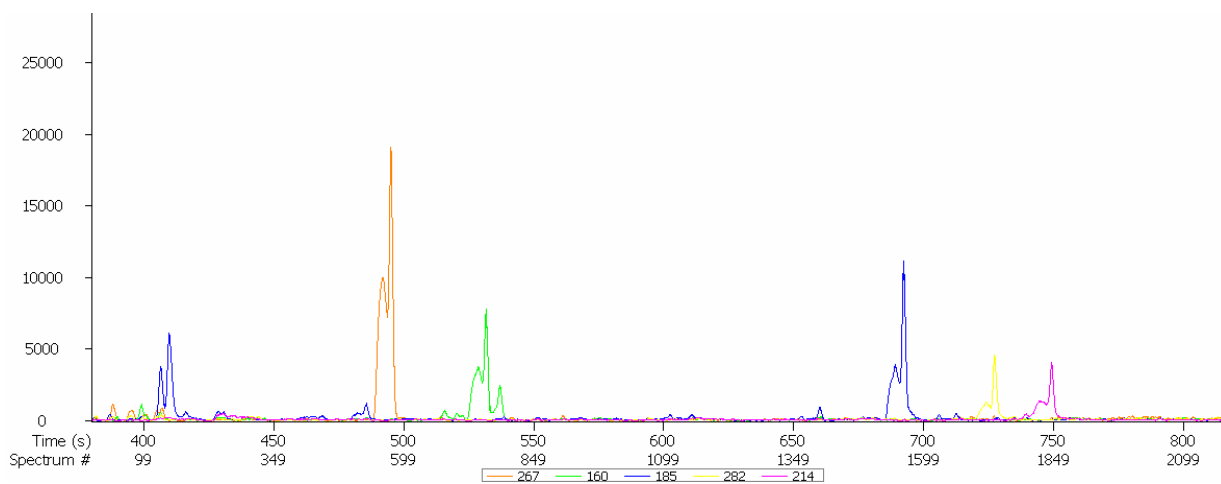
Obr.č.16: Fragmentogram při použití 150 µl MSTFA + 150 µl pyridinu



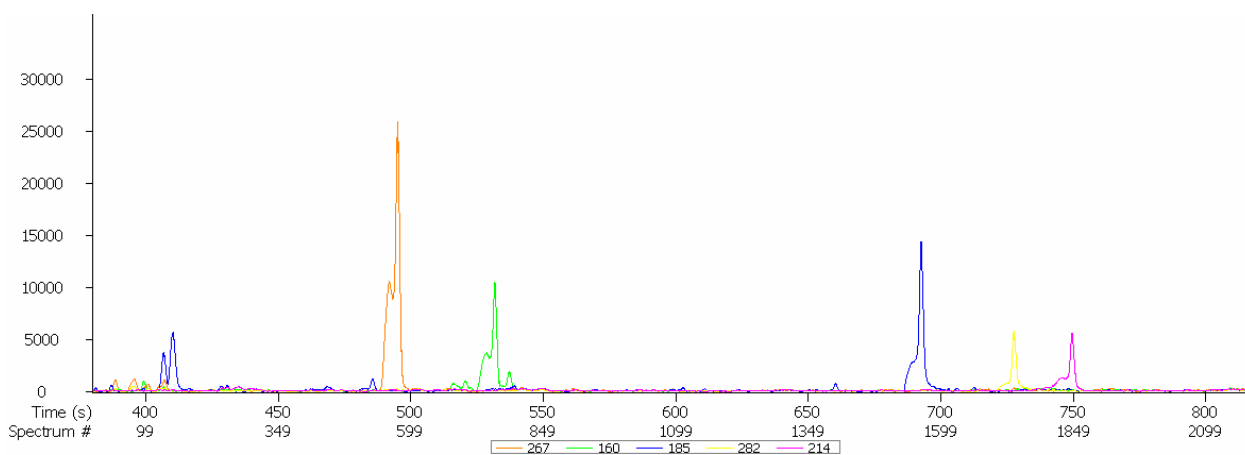
Obr.č.17: Fragmentogram při použití 200 µl MSTFA + 200 µl pyridinu

Z fragmentogramů je patrné, že nejlepších výsledků a nejlepšího tvaru píků bylo dosaženo při použití 200 μ l MSTFA + 200 μ l pyridinu.

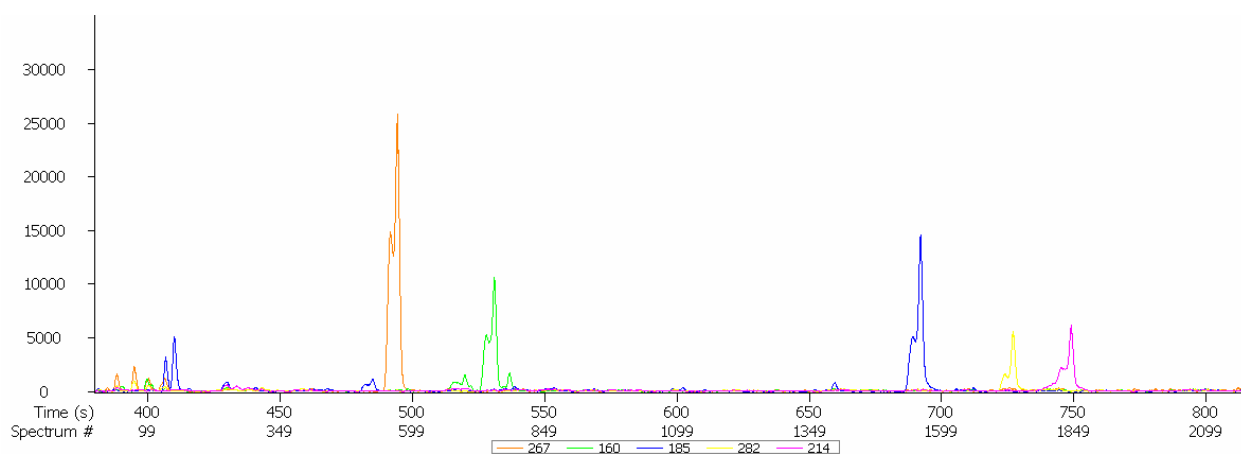
4.3.2.2. BSTFA



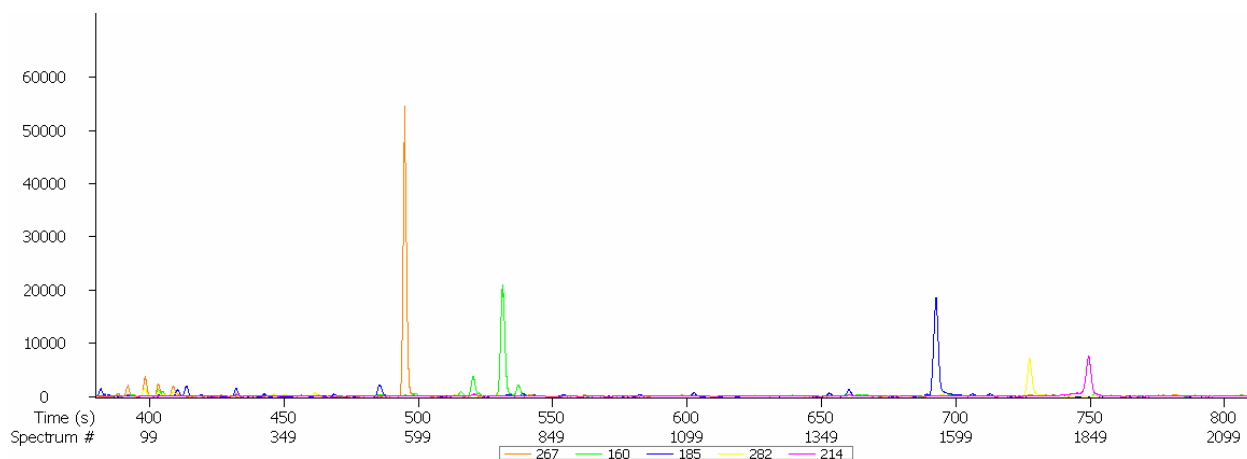
Obr.č.18: Fragmentogram při použití 100 μ l BSTFA + 300 μ l pyridinu



Obr.č.19: Fragmentogram při použití 150 μ l BSTFA + 150 μ l pyridinu



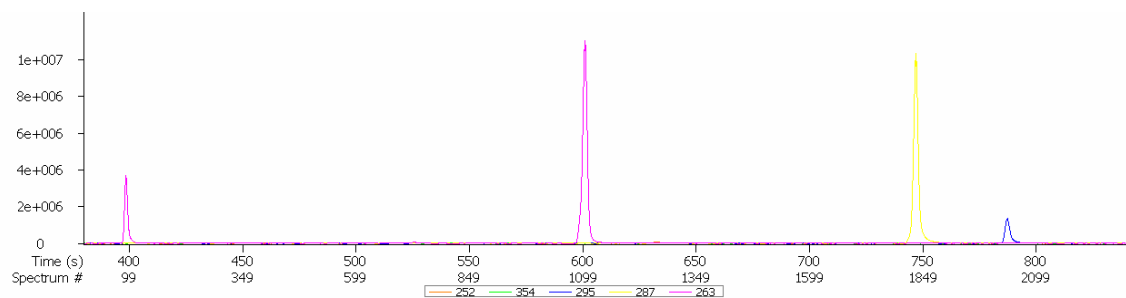
Obr.č.20: Fragmentogram při použití 200 μ l BSTFA + 200 μ l pyridinu



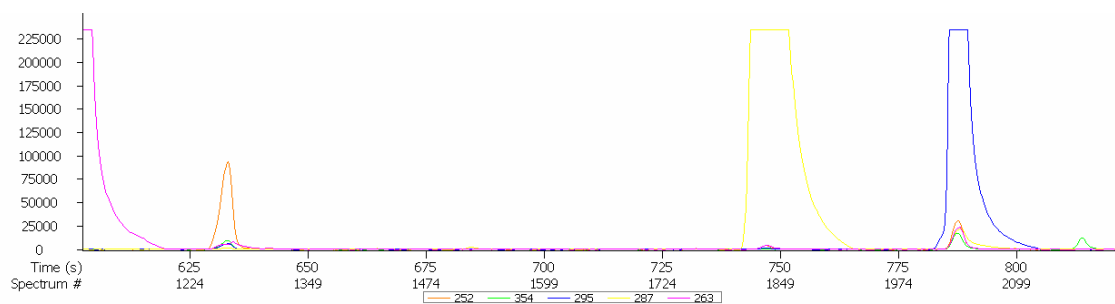
Obr.č.21: Fragmentogram při použití 300 μ l BSTFA + 100 μ l pyridinu

Z fragmentogramů je patrné, že nejlepších výsledků a nejlepšího tvaru piků bylo dosaženo při použití 300 μ l BSTFA + 100 μ l pyridinu.

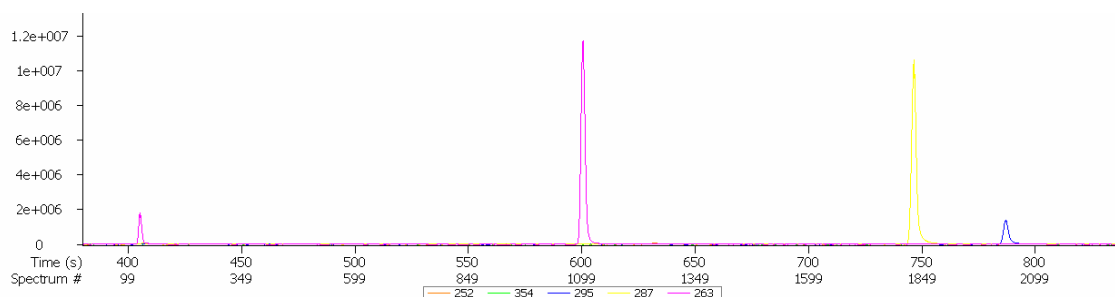
4.3.2.3. MTBSTFA



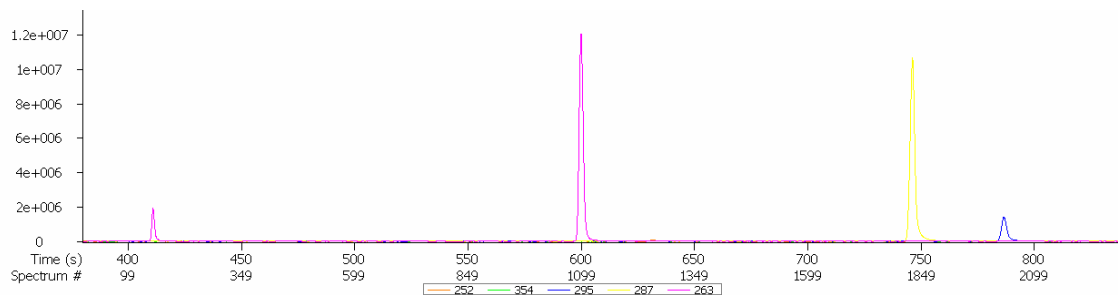
Obr.č.22: Fragmentogram při použití 100 μ l MTBSTFA + 300 μ l pyridinu



Obr.č.23: Výřez z fragmentogramu při použití 100 μ l MTBSTFA + 300 μ l pyridinu, kde lze vidět i pik derivátu kyseliny salicylové (oranžový) a diclofenacu (zelený)



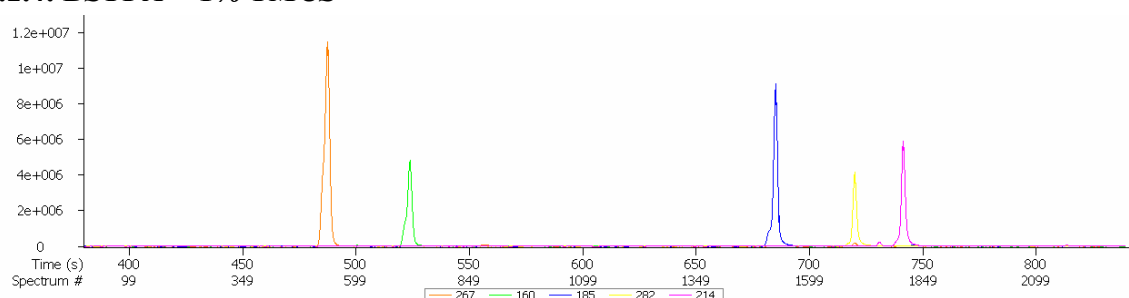
Obr.č.24: Fragmentogram při použití 200 μ l MTBSTFA + 200 μ l pyridinu



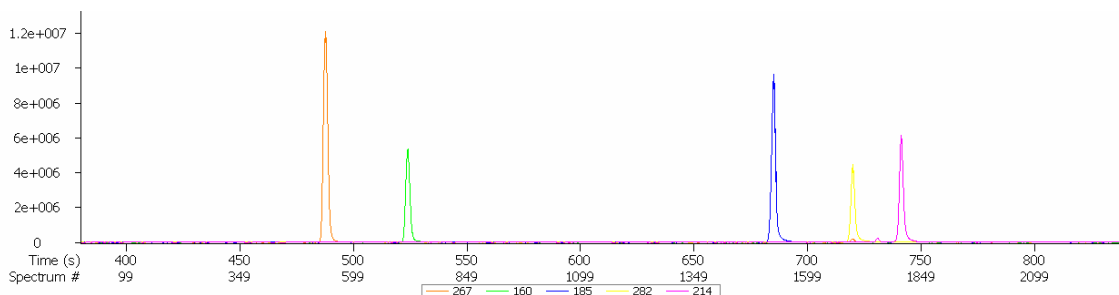
Obr.č.25: Fragmentogram při použití 300 µl MTBSTFA + 100 µl pyridinu

Z fragmentogramů je patrné, že velikost a tvaru píků se dále nelišila již při použití 100 µl MTBSTFA + 300 µl pyridinu.

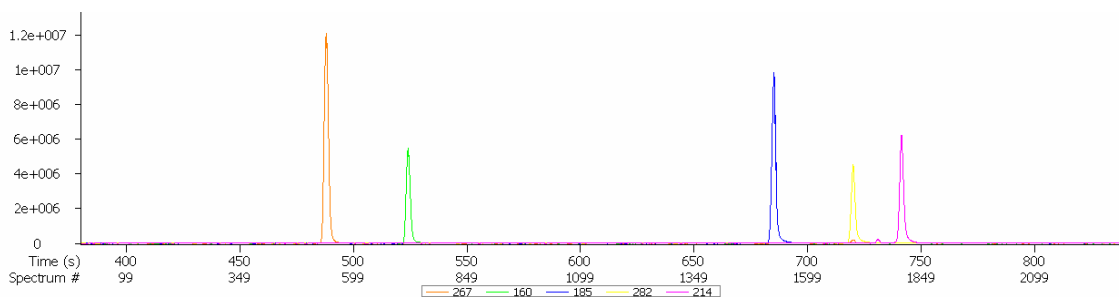
4.3.2.4. BSTFA + 1% TMCS



Obr.č.26: Fragmentogram při použití 100 µl BSTFA + 1% TMCS + 300 µl pyridinu



Obr.č.27: Fragmentogram při použití 200 µl BSTFA + 1% TMCS + 200 µl pyridinu



Obr.č.28: Fragmentogram při použití 300 µl BSTFA + 1% TMCS + 100 µl pyridinu

Z fragmentogramů je patrné, že nejlepších výsledků a nejlepšího tvaru píků bylo dosaženo při použití 200 µl BSTFA + 1% TMCS + 200 µl pyridinu, při použití většího množství činidla se již píky neměnily.

4.3.3. Optimální teplota derivatizace

Optimální teplota derivatizace byla vybírána podle velikosti plochy píků. Vhodnost použité teploty byla posuzována podle velikosti plochy píku. Plochy píků příslušných derivátů analgetik při jednotlivých časech jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka č. 3: Plochy píků jednotlivých derivátů analgetik při různých časech derivatizace

derivatizační činidlo	analgetikum	teplota (°C)		
		50	70	90
MSTFA	kyselina salicylová	162696	238014	177464
	ibuprofen	92046	112884	84446
	naproxen	89110	109885	81166
	ketoprofen	39870	49247	36242
	diklofenak	39825	53868	36730
BSTFA	kyselina salicylová	205717	220252	182085
	ibuprofen	95730	108928	66449
	naproxen	77773	102893	68562
	ketoprofen	33451	49092	25639
	diklofenak	28552	51977	36606
MTBSTFA	kyselina salicylová	3375518	13423040	11979626
	ibuprofen	2064784	10510570	2981611
	naproxen	7200303	8490406	7966742
	ketoprofen	1232117	3487577	1966695
	diklofenak	363729,3	450385	430834,5
BSTFA + 1% TMCS	kyselina salicylová	11846996	15028367	13685990
	ibuprofen	4225613	5563888	5132816
	naproxen	4910319	7194241	6804237
	ketoprofen	1250422	2282466	2224227
	diklofenak	1243525	1969443	1765423

V tomto případě je nejvhodnější teplota pro derivatizaci analgetik u všech derivatizačních činidel 70 °C. Tato teplota pak byla použita při všech následujících analýzách.

4.3.4. Optimální čas derivatizace

Podobně jako teplota derivatizace je i nejvhodnější čas dán plochou píku. Čím větší plocha tím vhodnější čas. Výsledky jsou opět uvedené v následující tabulce:

Tabulka č. 4: Plochy píků jednotlivých derivátů analgetik při různých časech derivatizace

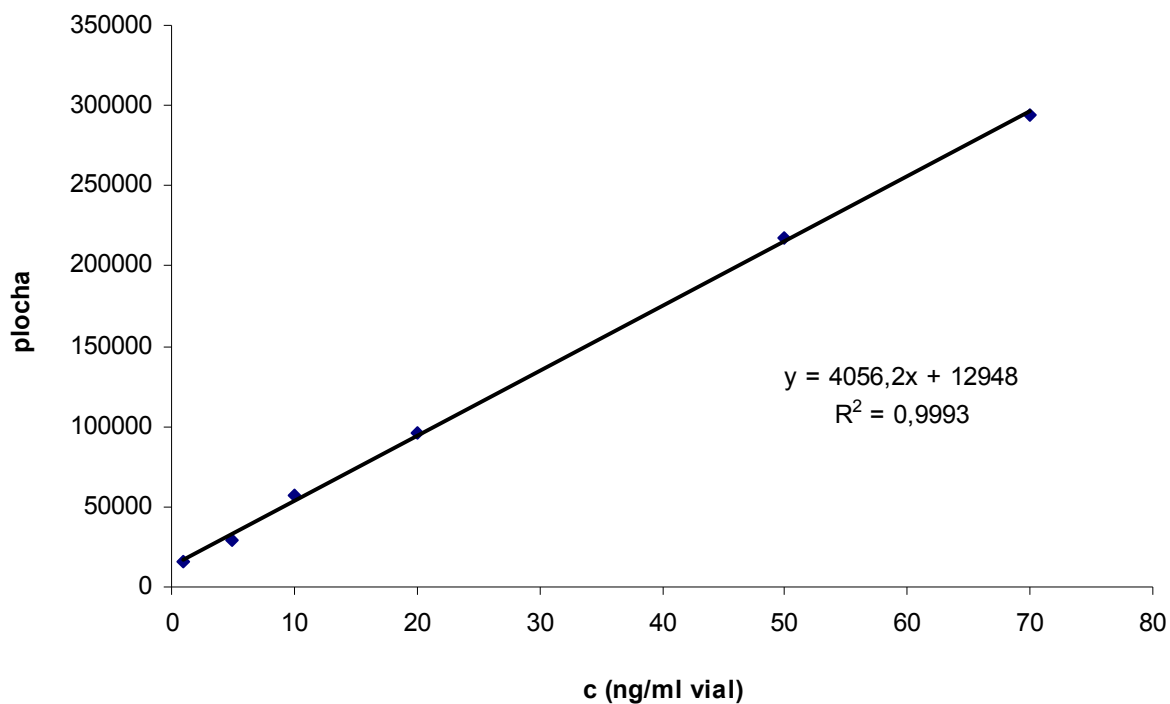
derivatizační činidlo	analgetikum	čas (min)		
		60	90	120
MSTFA	kyselina salicylová	200269	238014	161009
	ibuprofen	85696	112884	66093
	naproxen	83186	109885	62630
	ketoprofen	38259	49247	18705
	diklofenak	44525	53868	34499
BSTFA	kyselina salicylová	220252	210932	151529
	ibuprofen	108928	91569	69329
	naproxen	102893	87144	67150
	ketoprofen	49092	38666	28809
	diklofenak	51977	39511	35684
MTBSTFA	kyselina salicylová	13423040	3925021	14974532
	ibuprofen	10510570	2400912	2662153
	naproxen	8490406	8372445	8851935
	ketoprofen	3487577	1432694	1755978
	diklofenak	450385	422941	478705
BSTFA + 1% TMCS	kyselina salicylová	13617237	15028367	13550485
	ibuprofen	4857027	5563888	5081996
	naproxen	5644045	7194241	6736868
	ketoprofen	1437267	2282466	2202205
	diklofenak	1429339	1969443	1747944

Z tabulky lze zřejmé, že pro kyselinu salicylovou, naproxen a diclofenac je při použití MTBSTFA lepší čas 120 minut, ale rozdíl v plochách píků není tak markantní jako u ibuprofenu a ketoprofenu, a proto byl dále používán čas 60 minut pro ostatní derivatizace. Času 60 minut bylo dále používáno i u BSTFA. U MSFTA a BSTFA + 1% TMCS se používalo dále času 90 minut.

4.4. Kalibrace pro BSFTA

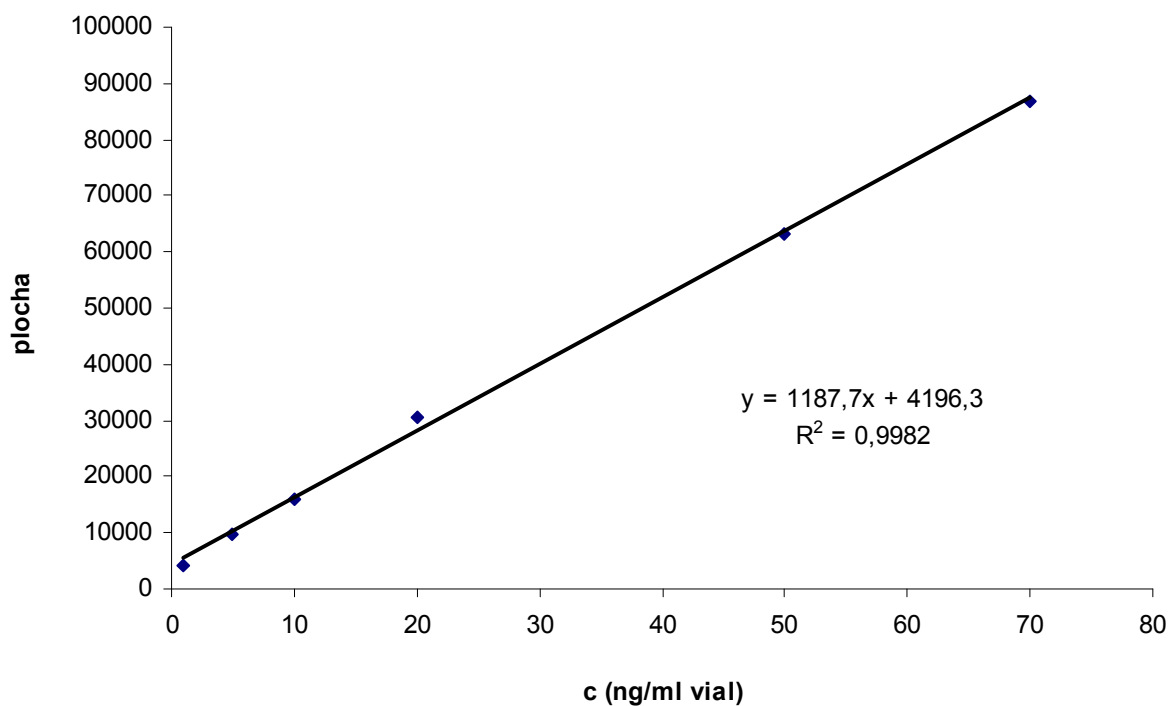
Byly vytvořeny roztoky analgetik o koncentracích 1, 5, 10, 20, 50 a 70 ng/ml. Poté byly zderivatizovány a zanalyzovány. Pak byla podle známých koncentrací a ploch píků vypočítána kalibrační závislost pro jednotlivá léčiva.

kyselina salicylová



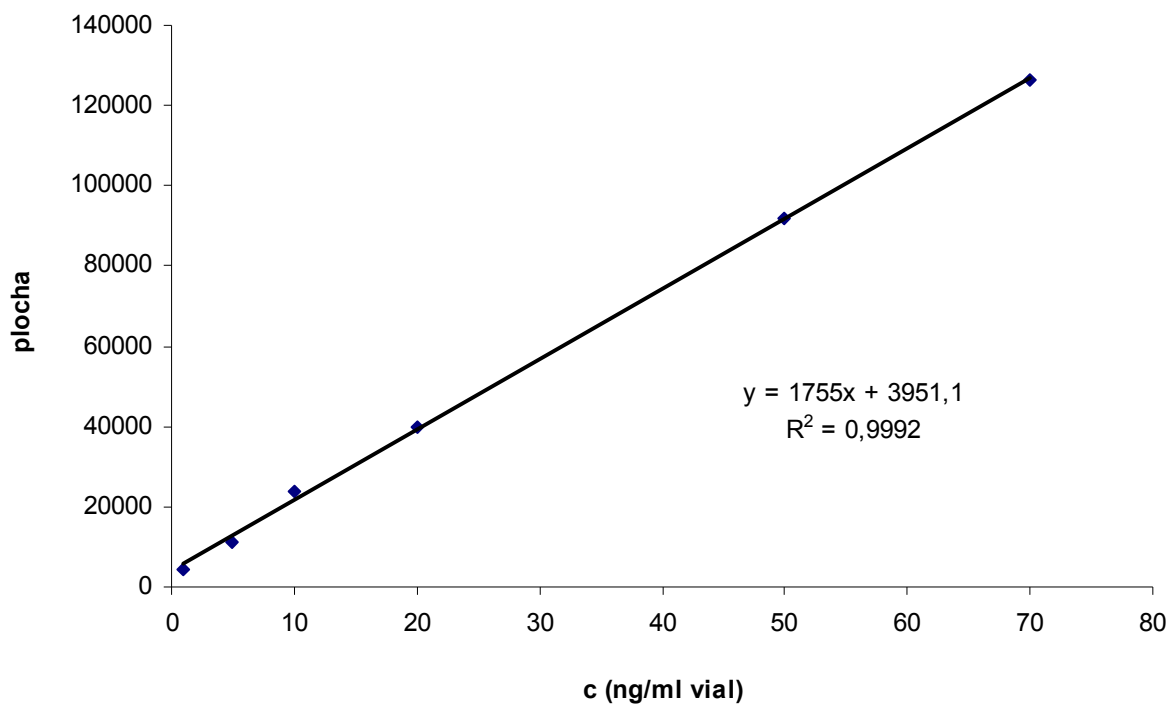
Graf č.1: Kalibrační závislost pro kyselinu salicylovou

ibuprofen



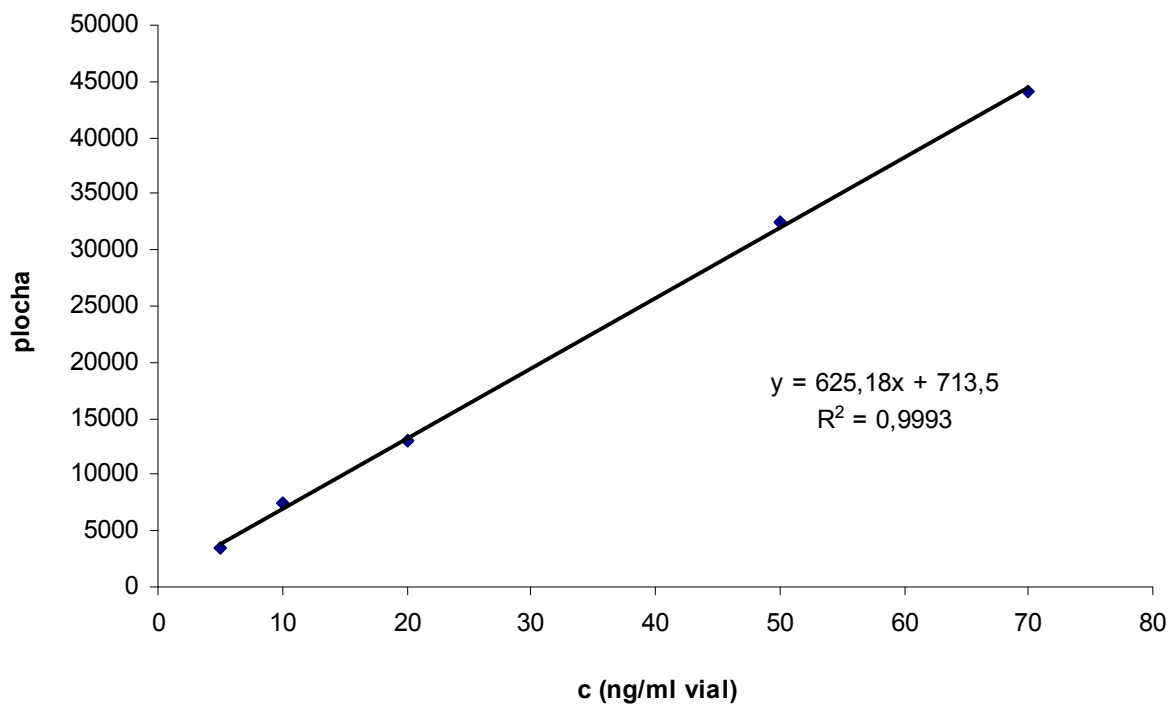
Graf č.2: Kalibrační závislost pro ibuprofen

naproxen

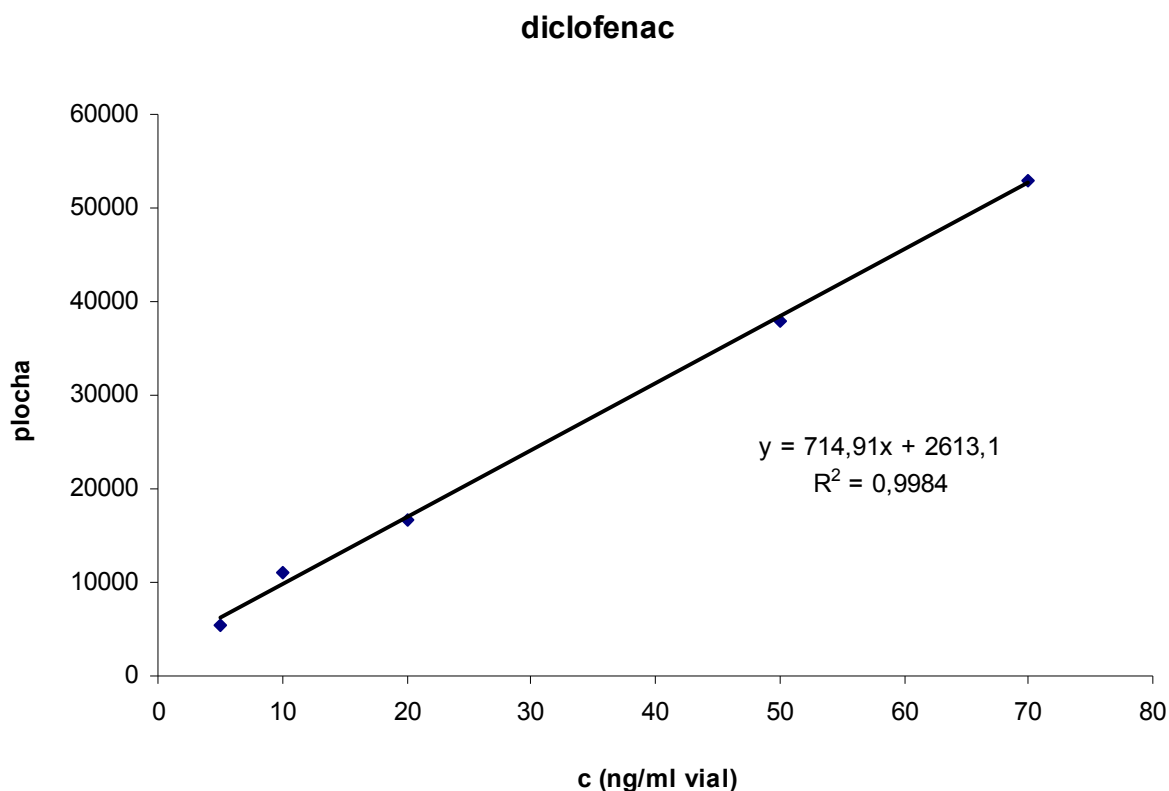


Graf č.3: Kalibrační závislost pro naproxen

ketoprofen



Graf č.4: Kalibrační závislost pro ketoprofen



Graf č.5: Kalibrační závislost pro diclofenac

4.5. Porovnání metod přípravy SPE kolonek

Z článků [42, 43, 44, 45] byly vybrány 4 metody přípravy SPE kolonek, u kterých byla potom porovnávána výtěžnost. Všechny kolonky byly Oasis HLB. Kolonky byly připraveny a promývány podle těchto následujících postupů:

1. Podle článku [42] byly kolonky nejprve promyty 5 ml hexanu, 5 ml ethylacetátu, 10 ml methanolu a 10 ml H₂O. Poté byl nanesen vzorek a po projití vzorku kolonkou byla kolonka vysušena a následně eluována 5 ml hexanu, 5 ml ethylacetátu a 14 ml methanolu. Tento postup byl z důvodu většího množství použitých rozpouštědel a nepřilíš reprodukovatelných výsledků proveden pouze jednou.
2. Podle článku [44] byly kolonky promyty 6 ml methanolu a 5 ml H₂O. Poté byl nanesen vzorek, po nanesení vzorku byla kolonka promyta 1,5 ml H₂O a vysušena. Eluována byla 8 ml methanolu.
3. Podle článku [45] byly kolonky nejprve promyty 3 ml ethyl-acetátu, 3 ml methanolu a 3 ml H₂O. Byl nanesen vzorek a kolonka byla vysušena. Eluována byla 4 ml ethylacetátu.
4. Podle článku [43] byly kolonky nejprve promyty 2 ml ethylacetátem/acetone m v poměru 1:1, 2 ml methanolu a 3 ml H₂O. Po nanesení vzorku byly kolonky promyty 1 ml methanol/H₂O v poměru 1:9 a opět vysušeny. Eluovány byly 6 ml ethylacetátem/acetone m (1:1).

Všechny vzorky byly nanášeny v objemu 20 ml, a tak aby výsledná koncentrace analgetik na analýzu byla 50 ng/ml. Na derivatizaci bylo použito činidlo BSTFA. Po provedení analýzy byla vypočítána koncentrace jednotlivých analgetik podle kalibrace, a pak byly koncentrace

přepočítány na procentuální výtěžnost. Metody SPE 2, 3 a 4 byly provedeny třikrát. Podle tabulky č.5, kde jsou porovnány jednotlivé výtěžnosti metod, je jednoznačně prokazatelné, že metoda s nejspřávnějšími procentuálními výtěžnostmi je metoda SPE 2. Použitelné by byly i metody SPE 3 a 4.

Tabulka č.5: Porovnání výtěžnosti jednotlivých metod SPE

	Výtěžnost [%]			
	SPE 1	SPE 2	SPE 3	SPE 4
K. salicylová	304,17	84,66	12,93	69,53
Ibuprofen	117,17	81,32	129,72	116,71
Naproxen	111,07	79,65	106,66	110,97
Ketoprofen	188,47	77,77	168,16	176,27
Diclofenac	285,67	58,16	111,01	131,26

5.ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na stanovení léčiv metodou plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s předchozí derivatizací. V bakalářské práci byla řešena tato problematika:

- ✚ Jako sledovaná léčiva byla vybrána analgetika, přesněji ibuprofen, kyselina salicylová, ketoprofen, naproxen a diclofenac.
- ✚ K jejich derivatizaci byly ke srovnání vybrány činidla: BSTFA, MSTFA, MTBSTFA a BSTFA + 1% TMCS.
- ✚ Z hlediska času, velikostmi a tvary píků byly nejvhodnějšími derivatizačními činidly BSTFA a BSTFA + 1% TMCS.
- ✚ Nevhodným činidlem pro stanovení všech pěti léčiv bylo MTBSTFA, protože píky u kyseliny salicylové a diclofenacu byly ve srovnání s ostatními velmi malé.
- ✚ Bylo provedeno zhodnocení metod SPE; bylo prokázáno, že nejsprávnější výsledky a nejlepší výtěžnost byly zjištěny za použití kolonek Oasis HLB.
- ✚ Metoda přípravy kolonky byla následující: promytí kolonky 6 ml methanolu a 5 ml H₂O. Poté byl nanesen vzorek. Po nanesení vzorku byla kolonka promyta 1,5 ml H₂O a vysušena. Eluována byla 8 ml methanolu.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] HAMPL F, PALEČEK J. *Farmakochemie*. 1. vyd. Budka J. Praha : Vydavatelství VŠCHT Praha, 2002. ISBN 80-7080-495-5. Úvod, s. 13-14.
- [2] HAMPL F, PALEČEK J. *Farmakochemie*. 1. vyd. Budka J. Praha : Vydavatelství VŠCHT Praha, 2002. ISBN 80-7080-495-5. Analgetika, s. 79-98.
- [3] *Cs.wikipedia.org* [online]. 2002 , 11.4.2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Analgetika>>.
- [4] *Cs.wikipedia.org* [online]. 2002 , 11.4.2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Ibuprofen>>.
- [5] *Zentiva* [online]. 2006 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.zentiva.cz/default.aspx/cz/productwide?Kod=20401&DetailType=detail&Type=10>>.
- [6] *Cs.wikipedia.org* [online]. 2002 , 11.4.2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_acetylsalicylov%C3%A1>.
- [7] *Ketonal*. [s.l.] : [s.n.], 1999. s. 1-4.
- [8] *Profenid*. [s.l.] : [s.n.], 2007. 3 s.
- [9] *MedicineNet* [online]. 1996 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.medicinenet.com/naproxen/article.htm>>.
- [10] *Farmakoterapie* [online]. 2005 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/835>>.
- [11] *Léky na internetu* [online]. 2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.lekynainternetu.cz/p/diclofenac-al-25-100-tbl/>>.
- [12] *Online lékárna* [online]. 2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.online-lekarna.cz/index.php?cmd=product&catid=8&id=117>>.
- [13] NESPĚŠNÁ, L. *MS analýza farmak ve vodných roztocích*. [s.l.], 2007. 44 s. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí bakalářské práce Štícha M.
- [14] GÓMEZ, M. J., PETROVIĆ, M., BARCELÓ, D. 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 [cit. 2009-05-25].
- [15] VÍTEČKOVÁ, H. *Stanovení reziduí léčiv v odpadních vodách metodou HPLC* [s.l.], 2006. 56 s. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ, FAKULTA CHEMICKÁ. Vedoucí diplomové práce Vávrová M.
- [16] AHRER, W., SCHERWENK, E., BUCHBERGER, W. Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000 [cit. 2009-05-25].
- [17] ABU-QARE, A. W., ABOU-DONIA, M. B. A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2001 [cit. 2009-05-25].
- [18] LACEY, C., et al. An LC–MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta* [online]. 2008 [cit. 2009-05-25].

- [19] RAMIREZ, A. J., et al. Analysis of Pharmaceuticals in Fish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2007 [cit. 2009-05-25].
- [20] KOSTRANOJ, A. V., et al. High-Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Multicomponent Pharmaceutical Preparations. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2008 [cit. 2009-05-25].
- [21] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. dopl. vyd. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [22] PROCHÁZKOVÁ, D. Extrakce na tuhou fázi. *CHEMagazín* [online]. 2003 [cit. 2009-05-25].
- [23] *Sigma-Aldrich* [online]. 2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/01.Par.0001.File.dat/01.pdf>.
- [24] SPONGBERG, A. L., WITTER, J. D. Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Science of the total environment* [online]. 2008 [cit. 2009-05-25].
- [25] TOGOLA, A., BUDZINSKI, H. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, [online]. 2007 [cit. 2009-05-25].
- [26] GIBSON, R., et al. Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007 [cit. 2009-05-25].
- [27] KOSJEK, T., HEATH, E., KRBAVČIČ, A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environment International* [online]. 2005 [cit. 2009-05-25].
- [28] *REGIS TECHNOLOGIES, INC.* [online]. 2007 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.registech.com/Markets/Chromatography/GCDerivatizationReagents.html>>.
- [29] *REGIS TECHNOLOGIES, INC.* [online]. 2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <http://www.restek.com/aoi_forensics_A009.asp>.
- [30] *Chromatography-online* [online]. 2000 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.chromatography-online.org/GC/Quantitative-Analysis/Derivatization/rs55.html>>.
- [31] *Thermo scientific* [online]. 2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=03010306>>.
- [32] *Thermo scientific* [online]. 2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.piercenet.com/Products/browse.cfm?fldID=03010302>>.
- [33] SIGMA-ALDRICH. *Derivatization Reagents : For Selective Response and Detection in Complex Matrices*. [s.l.] : [s.n.], 2007. 83 s.
- [34] *Thermo scientific* [online]. 2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=03010307>>.
- [35] *Thermo scientific* [online]. 2009 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.piercenet.com/Products/browse.cfm?fldID=03010303>>.
- [36] *Chemistry department at FS MU Brno* [online]. 2008 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.chemi.muni.cz/~literak/uvod.pdf>>.
- [37] *WWW stránky studentů a zaměstnanců BF JU* [online]. 2006 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separb.htm>.

- [38] FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ Univerzity obrany, Hradec Králové [online]. 2000 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Zaklady_MS.pdf>.
- [39] INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY AS CR, v.v.i. [online]. 2006 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <http://www.uochb.cz/web/document/cms_library/450.pdf>.
- [40] Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [online]. 2005 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://biomikro.vscht.cz/maldiman/cz/theory/basics.php>>.
- [41] INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY AS CR, v.v.i. [online]. 2006 [cit. 2009-05-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.uochb.cz/web/structure/171.html?lang=cz>>.
- [42] SEBÖK, Á., et al. Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry. *Talanta* [online]. 2008 [cit. 2009-05-25].
- [43] ÖLLERS, S., et al. Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001 [cit. 2009-05-25].
- [44] PAVLOVIĆ, D. M., et al. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals . *Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2007 [cit. 2009-05-25].
- [45] XU, J., et al. Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008 [cit. 2009-05-25].

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

- GC/TOF-MS – plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií s průletovým analyzátozem
- SPE – extrakce na tuhém sorbentu
- NSPZL – nesteroidní protizánětlivé látky
- COX – cyklooxygenáza
- ČOV – čistírna odpadních vod
- t-BDMS – terc-butyl dimethyl silyl
- TMS – trimethyl silyl
- ECD – detektor elektronového záchytu
- FID – plamenově ionizační detektor
- BSTFA – N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
- MSTFA – N-Methyl-N-trifluoroacetamid
- MTBSTFA – N-methyl-N - [tert-butyl dimethyl-silyl] trifluoroacetimid
- BSTFA + 1% TMCS – N,O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamid s 1% Trimethylchlorsilan
- LC – kapalinová chromatografie
- GC – plynová chromatografie
- PC – papírová chromatografie
- TLC – tenkovrstvá chromatografie
- TCD – tepelně vodivostní detektor
- AFID – plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem
- HeD – heliový ionizační detektor
- MS – hmotnostní spektrometr
- MALDI – desorpce/ionizace laserem za účasti matrice
- TOF – průletový analyzátoz