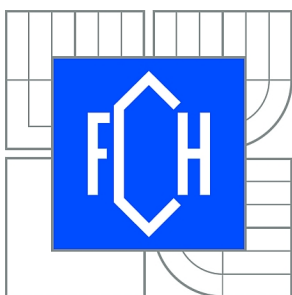




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

STANOVENÍ LÉČIV V PITNÝCH VODÁCH METODOU HPLC

DETERMINATION OF PHARMACEUTICALS IN DRINKING WATERS USING HPLC

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Mgr. RADKA KRÁLOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2014



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0790/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Mgr. Radka Králová**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)
Vedoucí práce **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**
Konzultanti:

Název diplomové práce:

Stanovení léčiv v pitných vodách metodou HPLC

Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše na téma přítomnost makrolidových antibiotik ve vodách
2. Provedení výběru vhodné preanalytické metody a rozhodčí metody na bázi kapalinové chromatografie
3. Optimalizace analytického postupu, jeho následné použití pro analýzu reálných vzorků
4. Zhodnocení výsledků a jejich interpretace

Termín odevzdání diplomové práce: 31.8.2014

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

Mgr. Radka Králová
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na stanovení makrolidových antibiotik v pitných vodách metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Z hlediska výběru antibiotik se jedná o erythromycin a clarithromycin, které se v současné době řadí mezi často předepisované léky. Pro zakoncentrování a přečištění vybraných analyzovaných složek z reálných vzorků pitných vod byla vybrána metoda extrakce tuhou fází (SPE) na kolonkách Oasis HLB. Optimalizace a konečná analýza vzorků byla prováděna na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC-MS). Vybraná metoda byla použita pro stanovení vybraných makrolidů v reálných vzorcích pitných vod odebíraných ze dvou zdrojů, z jímacího zařízení Litovel a Černovír Olomouc.

ABSTRACT

The aim of the diploma thesis is the determination of macrolide antibiotics in drinking water by using of high performance liquid chromatography. Erythromycin and clarithromycin were selected such as representative macrolides due to frequently prescribed pharmaceuticals in this time. Solid phase extraction (SPE) by using of Oasis HLB cartridges was applied for pre-concentration and purification of chosen analytes in real samples of drinking water. Optimalization of method and analysis were performed by using of high performance liquid chromatography with mass spectrometry detection (HPLC-MS). The suitable method was selected for determination of macrolides in real samples taken from two sources of drinking water, the interception of water in Litovel and Černovír Olomouc.

KLÍČOVÁ SLOVA

makrolidová antibiotika, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostně spektrometrická detekce, extrakce pevnou fází, pitná voda

KEYWORDS

macrolide antibiotics, high performance liquid chromatography, mass spectrometry detection, solid phase extraction, drinking water

KRÁLOVÁ, R. *Stanovení léčiv v pitných vodách metodou HPLC*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 73 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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

Chtěla bych poděkovat především paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za její odborné vedení při vypracování mé diplomové práce, za její cenné rady, poznatky a trpělivost, kterou mi s velkou ochotou a obětavostí předávala. Také chci mnohokrát poděkovat Ing. Veronice Píšťkové a RNDr. Václavu Rancovi, PhD. za jejich pomoc a ochotu při měření a zpracování experimentální části. Můj obrovský díky patří všem pracovníkům Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí FCH VUT v Brně a také celé mé rodině za umožnění studia a jejich podporu.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2.1 <i>Léčiva a léčivé přípravky</i>	8
2.1.1 Charakteristika léčivých látek	8
2.1.2 Klasifikace léčiv	9
2.1.3 Lék a organismus	10
2.1.3.1 Transport léčiva biologickým systémem	11
2.1.3.2 Absorpce a distribuce léčiva	12
2.1.3.3 Biotransformace léčiv a jejich vylučování	12
2.1.3.4 Klinická farmakokinetika	13
2.2 <i>Antibiotika</i>	14
2.2.1 Rozvoj a dělení antibiotik	14
2.2.2 Mechanismus jejich působení	15
2.2.3 Rezistence organismu na antibiotika	17
2.2.4 Antibiotika a jejich vliv na životní prostředí	18
2.2.4.1 Interakce antibiotik se složkami životního prostředí	19
2.2.4.2 Následky kontaminace	20
2.2.5 Makrolidová antibiotika	20
2.2.5.1 Dělení antibiotik	21
2.2.5.2 Studovaná makrolidová antibiotika	22
2.3 <i>Stanovení léčiv</i>	23
2.3.1 Vzorkování a úprava vzorku	24
2.3.2 Extrakce	24
2.3.2.1 LLE (extrakce kapalina – kapalina)	25
2.3.2.2 SPE (extrakce tuhou fází)	25
2.3.3 Analýza antibiotik pomocí HPLC	27
2.3.3.1 Proces separace	27
2.3.3.2 Zařízení a části kapalinového chromatografu	27
2.3.4 Detekční techniky v kapalinové chromatografii	29
2.3.4.1 Spektrofotometrické detektory	29
2.3.4.2 Elektrochemické detektory	30
2.3.4.3 Fluorescenční detektor	31
2.3.4.4 Hmotnostní spektrometr	31
2.3.5 Porovnání HPLC a UHPLC	33
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1 <i>Použité chemikálie</i>	34
3.2 <i>Přístroje a zařízení</i>	34

3.3 Vlastnosti sledovaných analytů	35
3.4 Reálné vzorky vody.....	35
3.5 Postupy stanovení analytů.....	35
3.5.1 Odběry vzorků	35
3.5.2 Úprava vzorků sledovaných analytů a jejich izolace	36
3.5.3 Identifikace a kvantifikace sledovaných analytů.....	37
3.5.4 Optimalizované podmínky pro LC/MS analýzu	39
4 Výsledky a diskuze.....	41
4.1 Optimalizace chromatografických podmínek	41
4.1.1 Výběr rozpouštědla pro standardní roztoky	41
4.1.2 Výběr vhodné mobilní fáze.....	42
4.1.3 Optimalizace průběhu gradientu	45
4.1.4 Optimalizace teploty a nástřiku.....	48
4.2 Optimalizace podmínek extrakce tuhou fází (SPE)	49
4.2.1 Vybrané postupy SPE	49
4.2.2 Kalibrační křivky pro SPE	51
4.2.3 Výtěžnosti jednotlivých postupů na kolonkách Oasis HLB SPE	51
4.3 Reálné vzorky	53
5 Závěr	58
6 Seznam použité literatury	59
7 Seznam použitých zkratk a symbolů	67
8 Přílohy	69

1 ÚVOD

Od 90. let minulého století se stále více objevují v životním prostředí polutanty typu biologicky aktivních látek, které se používají především v humánní a veterinární medicíně. Jedná se o léčiva, která se v závislosti na své biodegradabilitě vyskytují v odpadních, povrchových, podzemních, ale také v pitných vodách. Jedná se svým způsobem o koloběh látky v životním prostředí, ovšem tento cyklus není ve většině směrů pohledu pro lidstvo i přírodu prospěšný.

Vstup těchto látek do životního prostředí probíhá převážně formou splaškových vod, kam se dostávají společně s močí a tuhými fekáliemi. Čištění odpadních vod je závislé především na biologické rozložitelnosti a na lipofilitě léčiv, což hraje velmi důležitou roli u sorpční schopnosti čistírenského kalu. Velice často však nedochází k jejich dostatečnému odstranění z matrice, což má za následek to, že vyčištěná odpadní voda se spolu s polutanty typu reziduí léčiv šíří dále do životního prostředí, zejména do vodního ekosystému. V důsledku toho dochází ke kontaminaci povrchových vod, půdy a organismů zde žijících, což může mít vliv i na případnou distribuci léčiv do podzemních zdrojů pitné vody. V případě zemědělské produkce je zapotřebí brát v úvahu také znečištění chlévské mrvy a hnoje od léčených zvířat. Na kontaminaci se mohou výrazně podílet také metabolity léčiv, a proto je třeba rozlišovat, zda se v rámci čištění odpadních vod jedná o aerobní nebo anaerobní rozklad. Největší zdroj odpadní vody kontaminované léčivy představují nemocnice a zdravotnická zařízení.

Mezi nejvíce používaná léčiva patří antibiotika, kterým je věnována stále větší pozornost. Jako zlomový pro jejich šíření je označován rok 1928, kdy objev penicilinu a jeho následné rozšíření v praxi, a to především ve 40. letech 20. století, měly za následek obrovský nárůst spotřeby těchto látek. Mnoho antibiotik je velice často lékaři předepisováno zbytečně, pouze z důvodu prevence, čímž se organismus vůči nim stává rezistentním. Na tento problém reaguje farmaceutický výzkum vývojem nových typů léčiv. V poslední době dochází k výraznému rozmachu používání zejména širokospektrálních antibiotik, které jsou aplikovány pro velmi rozsáhlou oblast infekcí, často ještě před tím, než je u pacienta provedena typizace vzhledem k určitému mikroorganismu. Mezi tato specifická antibiotika patří makrolidy.

Protože v posledních letech neustále stoupá spotřeba antibiotik, je nutné pro tyto účely vyvíjet dokonalejší analytické techniky a optimalizovat takové analytické postupy, které budou schopné detekovat velice nízká množství těchto analytů obsažených v maticích. Pro jejich izolaci z matrice a zakoncentrování se používá metoda SPE (solid phase extraction = extrakce tuhou fází). Pro finální stanovení antibiotik se vedle plynové chromatografie (a to převážně po derivatizaci) používá především vysokoúčinná nebo ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie s různými typy detekce. Mezi používané typy patří spektrofotometrická detekce v diodovém poli (DAD), fluorimetrický detektor (FLD) s vysokou citlivostí, spojení s hmotnostním spektrometrem (MS), případně také méně známé a používané elektrochemické detekce.

Cílem této diplomové práce bude stanovení makrolidových antibiotik ve vzorcích pitné vody. Tomuto stanovení bude přecházet zjištění optimálních podmínek stanovení a ověření použitého analytického postupu na modelových vzorcích vody. Jako finální metoda pro tato stanovení bude použita technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí HPLC-MS.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Léčiva a léčivé přípravky

Obecně lze říci, že léčiva jsou obrovskou skupinou chemických látek, jejichž produkce vede k vytváření léků s obsahem léčivých látek. Kromě účinné látky, která hraje nejdůležitější roli v jejich užívání, se používají i doplňkové (pomocné) látky, které nejen zlepšují vlastnosti konečného produktu, ale rovněž určitým způsobem dodávají konečnému léku konsistenci, „tvar“ apod. [1,2].

2.1.1 Charakteristika léčivých látek

Existuje mnoho definic léčivých látek; jedna z nich označuje tyto látky jako produkty, které se aplikují z důvodu možnosti modifikace nebo zkoumání patologických stavů a fyziologických změn. Pochopitelně by měly být tyto látky užívány ve prospěch člověka a jakéhokoliv jiného organismu [1].

Léčivé látky a zacházení s nimi upravuje právní předpis, Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech), zavádí příslušné předpisy Evropské unie (EU) a spravuje:

- a) výzkum, výrobu, přípravu, distribuci, kontrolu a odstraňování léčivých přípravků a léčivých látek,
- b) registraci, poregistrační sledování, předepisování a výdej léčivých přípravků, prodej vyhrazených léčivých přípravků a poskytování informací,
- c) mezinárodní spolupráci při zajišťování ochrany veřejného zdraví a vytváření jednotného trhu léčivých přípravků EU,
- d) vedení dokumentace o úkonech uvedených v bodě a) a b).

S pojmy léčivé přípravky se setkáváme v Zákoně o léčivech 378/2007 Sb., v části první-léčiva. Přípravek definuje zákon jako:

- a) látka nebo kombinace látek prezentovaná s tím, že má léčebné nebo preventivní vlastnosti v případě onemocnění lidí nebo zvířat,
- b) látka nebo kombinace látek, kterou lze použít u lidí nebo podat lidem, nebo použít u zvířat či podat zvířatům, a to buď za účelem obnovy, úpravy nebo ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, imunologického nebo metabolického účinku, případně za účelem stanovení lékařské diagnózy [3].

Látkou se rozumí léčivá látka, která je součástí léčivého přípravku, popřípadě způsobuje jeho účinek. Zákon označuje pojmem látka také pomocné látky, které jsou v přípravku použity v určitém množství bez vlastního léčebného účinku. Ty umožňují nebo mohou usnadňovat výrobu přípravku nebo jeho podávání, případně nějakým způsobem příznivě ovlivňují farmakokinetické vlastnosti samotných léčivých látek obsažených v přípravcích [1,3].

Některé důležité informace o různých látkách a léčivech je možné najít v lékopisech (=pharmacopoea), které podávají údaje o chemických a generických názvech léčivých látek, a lze zde najít i maximální přístupné dávky, a to nejčastěji pro denní použití. Je nutné neustále dohlížet na správné používání účinných, bezpečných léčiv, kvalitních látek na jejich přípravu a výrobu, na věrohodnost výzkumu týkající se této oblasti apod. Tuto úlohu plní Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) [4].

2.1.2 Klasifikace léčiv

Rozdělení léčiv je uváděno v různých knihách a publikacích a jsou zde definovány důležité typy názvů, kterými jsou:

- Chemický název uvádí čistou látku jako chemické individuum, např. magnesium oxidum (oxid hořečnatý).
- Lékopisný název je psán latinsky a významem odpovídá generickému názvu.
- Generický název je mezinárodně uznávané označení léčiva, které se tvoří na základě určitých zásad a má jednotnou terminologii v identifikaci látky. Generické názvy je možné převést do jazyka dané země.
- Mezinárodně nechráněné názvy (INN) se v nynější době nejčastěji užívají při označení názvů látek v informacích o daném léku.
- Obchodní názvy jsou chráněné a mohou se vyskytovat v jakémkoliv tvaru, např. panadol [5].

Většina léčiv a léčivých přípravků se nejčastěji uvádí podle jejich generického názvu v národním jazyce.

Podle světové zdravotnické organizace je možno léčiva klasifikovat mnoha dalšími způsoby. Jedním z nich je tzv. ATC klasifikace, mezinárodní systém dělení léčiv, na kterém spolupracuje centrum Světové zdravotnické organizace pro metodologii statistiky léčiv, World Health Organization Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. Rozdělení léčiv podle této kvalifikace je založeno na skupinách, podle účinků především na orgány a soustavy, případně podle působení a struktury z farmakologického hlediska. Na základě toho bývá léčivým látkám přiřazen sedmimístní kód. Danému třídění odpovídá pět úrovní, z toho ta první, vyjádřená písmenem a dělená do 15-ti skupin udává, na kterou anatomickou soustavu lék působí (viz Obr. 1) [6,7,8].

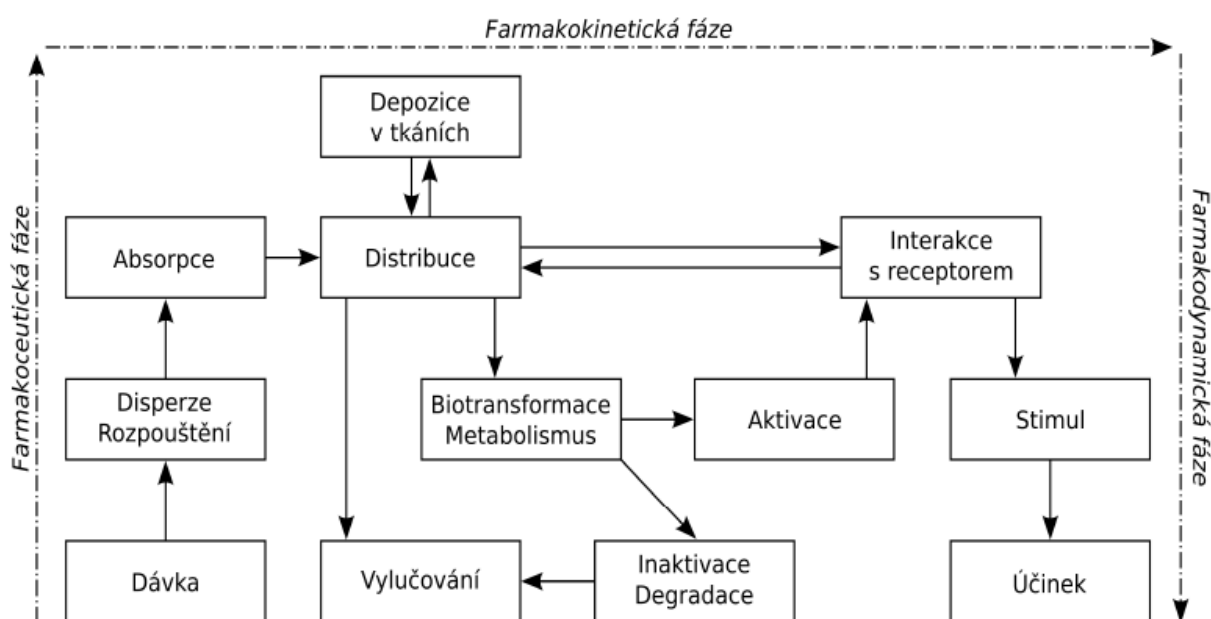
značka	anatomická soustava
A	Trávicí ústrojí a metabolismus
B	Krev a krevtovorné orgány
C	Kardiovaskulární systém
D	Dermatologika
G	Urogenitální systém a pohlavní hormony
H	Systémové hormonální přípravky kromě pohlavních hormonů a inzulínu
J	Protiinfekční léčiva pro systémové použití
L	Antineoplastika a imunomodulující léčiva
M	Muskuloskeletální systém
N	Nervová soustava
P	Antiparazitika, insekticidy, repelenty
R	Dýchací ústrojí
S	Smyslové orgány
V	Různé

Obr. č. 1: Klasifikace ATC podle první úrovně [6]

Další úroveň se vyjadřuje dvoučíselným kódem, který značí hlavní terapeutickou skupinu. Terapeuticko-farmakologickou a chemicko-terapeutickou podskupinu charakterizují písmena třetí a čtvrté úrovně. Poslední dvě čísla určují danou účinnou látku nebo jejich kombinaci. Např. lék mecilinam lze najít pod ATC kódem J01CA11 [6,8].

2.1.3 Lék a organismus

Při studiu působení léčiva na organismus je nutné znát jeho účinek, abychom byli schopni určit vztah mezi strukturou a biologickou aktivitou. Osud léčivé látky v organismu je zřejmý z obr. 2. Celý proces interakce je součtem několika dílčích kroků. Cesta látky je zahájena farmaceutickou částí, pokračuje farmakokinetickou a končí farmakodynamickou fází [1].



Obr. č. 2: Cesta léčiva organismem [9]

Farmaceutická fáze zahajuje proces uvolnění účinné látky z léku. Samozřejmě je podstatné, o jakou formu léku se jedná a jak je podávána. V případě tabletek, tobolek, tj. látek pevné konzistence, dochází k uvolnění látky účinné látky pomocí disperze a v ideálním případě dojde k jejímu rozpouštění. Pokud je lék v tekuté podobě, podáván např. formou injekce, farmaceutická fáze je částečně potlačena, avšak pokud je aktivní látka pouze dispergována, tato fáze probíhá klasicky s cílem aktivní substanci rozpustit.

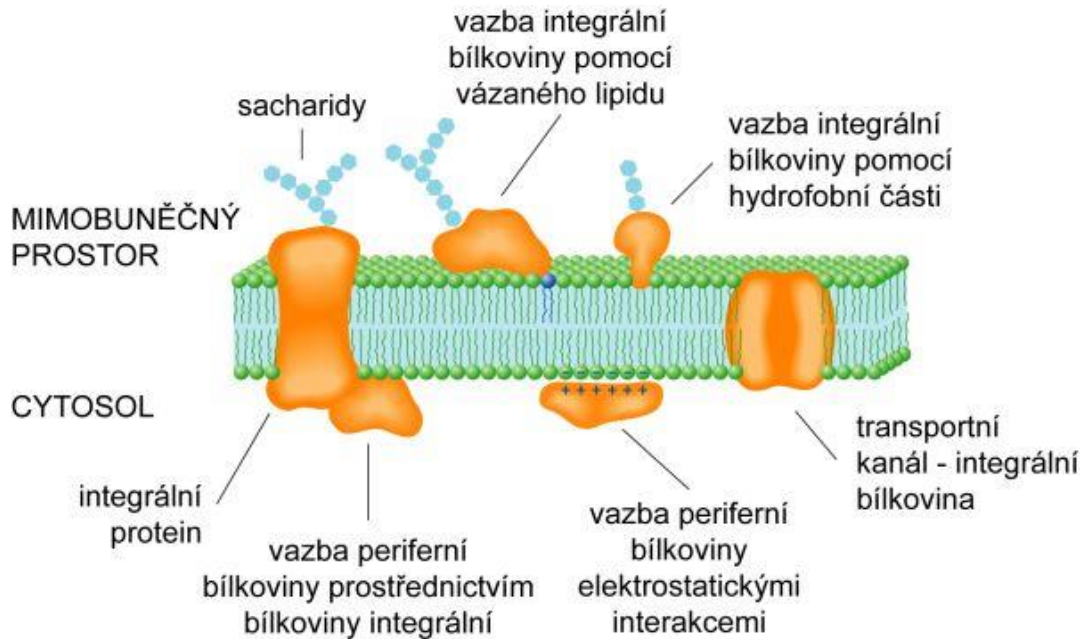
Farmakokinetická fáze je nejdůležitější částí procesu účinku léku na daný organismus a tvoří ji několik podstatných dílčích kroků. V literatuře jsou části fáze uváděny pod zkratkou ADME, což označuje čtyři děje, tj. adsorpci, distribuci, metabolismus a eliminaci. Tři části, ADE, se podílejí na transportu látky v organismu a poslední děj, tj. metabolismus, zajišťuje její přeměny do té doby, než dosáhne místa účinku. Podrobněji budou tyto děje probrány v následujících kapitolách.

Ve farmakodynamické fázi, která nastane po dosažení cílového bodu účinku lékové aktivní substance, dochází k působením složitého mechanismu. Probíhá reakce mezi biologickým systémem a účinnou látkou léčiva. Celý proces je závislý na interakci mezi aktivní látkou a receptorem a následnou stimulací biologického efektu. S receptorem úzce souvisí efektoři,

k jejichž aktivaci dochází po obsazení receptoru a které plní úlohu přenosu signálu a jeho přeměnu na příslušnou odezvu [9].

2.1.3.1 Transport léčiva biologickým systémem

Pohyb látek na větší vzdálenosti zajišťuje především krevní oběh. V tomto případě je podmínkou, aby transportované látky byly rozpustné ve vodě nebo měly schopnost vázat se na bílkoviny obsažené v krevní plazmě. Do konečných struktur se účinná látka dostává procesem difúze a musí být schopna zároveň překonat několik překážek buněčné membrány (viz Obr. 3) [9,10].



Obr. č. 3: Struktura biologické membrány [11]

Membrána je dynamická a molekuly v ní se mohou neustále přemísťovat; nejčastější přesun je aktivní nebo pasivní transport. Při pasivním pohybu dochází k difúzi z vyšší koncentrace do nižší, tím pádem tato reakce nevyžaduje energii. Důležitou úlohu při tomto procesu hraje lipofilita látky. Platí, že čím je lipofilita větší, tím je překonání membrány rychlejší. Pro určení míry lipofility se používá rozdělovacího koeficientu v systému voda a oktan-1-ol. Pro léčiva se hodnota pH, pro které je systém měřen, uvádí okolo 7, což odpovídá pH krevní plazmy. Aktivní transport může probíhat proti koncentračnímu spádu, proto je nutné procesu dodat energii, která se získá štěpením adenosintrifosfátu (ATP), aby mohlo dojít k přenosu účinné látky přes specializované membránové struktury (iontové kanálky a speciální nosiče pro transport větších molekul). Aktivní pohyb léčiv nebývá velmi častým, je ale typický pro léčiva založená na iontových sloučeninách, která se aplikují např. při léčbě psychóz. Existují některé další typy transportu přes buněčné membrány. Při pohybu makromolekulárních látek nebo uvolňování neurotransmiterů hraje důležitou roli funkce exocytózy a endocytózy [9].

2.1.3.2 Absorpce a distribuce léčiva

Děj absorpce zajišťuje pohyb účinné látky z místa jejího podání do krevního oběhu; probíhá především volnou difúzí a nejvíce závisí na lipofilitě a na stupni disociace.

Z hlediska způsobu podání léku, které v základě dělíme na enterální (přes trávicí trubici), parenterální (mimo trávicí trubici) a topické (lokální použití, povrch organismu), je nejčastější perorální, což je forma enterální aplikace. Jedná se o jednoduchý, celkem bezpečný a rychlý způsob, který však může mít řadu nevýhod. Jelikož dochází k uvolňování léku v oblastech žaludku a střeva, může se zde projevit negativní vliv působení žaludečních šťáv, dráždění gastrointestinálního traktu, případně částečné ztráty účinné látky při průchodu látky játry. Eliminovat tyto nepříjemné jevy je možné pomocí vhodného složení léku, které zajistí uvolnění léku až ve střevě. Sublingvální podání je založeno na rozpouštění léčiva pod jazykem s velmi rychlým účinkem uvolnění účinné látky a s eliminací výše zmíněných negativních vlivů. Rektální použití neboli aplikace léku konečníkem má obdobné výhody jako předcházející [9,12].

V případě parenterální aplikace léku se můžeme nejčastěji setkat s injekční formou podání. Dalším typem podání léku je pomocí infúze, která se od injekce liší větším množstvím roztoku a delší dobou absorpce. Na základě místa vstupu účinné látky do organismu rozlišujeme intravenózní (nitrožilní), subkutánní (podkožní) a intramuskulární (nitrosvalové) podání. Při intravenózní aplikaci je absorpce léku prakticky eliminována, jelikož dochází k okamžitému přechodu léčivé látky do krevního řečiště. Jinak je tomu při intramuskulárním a subkutánním podání, kde hraje hlavní roli absorpce; důležitý je také vliv fyzikálně-chemických vlastností léčivého přípravku. Mezi parentální formy se řadí i implantáty, které zaručují postupné uvolňování účinné látky.

Účinné látky v případě topického podání lékové formy (masti, krémy, gely, zásypy atd.) se vstřebávají v místě aplikace nebo v její blízkosti, avšak i u tohoto způsobu většinou dochází k transportu látky do nitra organismu [9].

Při posuzování využitelnosti daného léku se můžeme setkat s pojmem biologická dostupnost léčiva. Jeho definice je vyjádřena jako poměr mezi účinnou látkou v systémovém pohybu k celkovému množství léčivé látky v organismu. Vyjadřuje se hodnotou AUC, která je daná integrací vztahu mezi koncentrací léku v systémové cirkulaci a daného času [9,13].

2.1.3.3 Biotransformace léčiv a jejich vylučování

Působení enzymových reakcí na léčiva v organismu vede k jejich přeměně. Tyto procesy označujeme jako biotransformace nebo metabolismus, jejichž hlavním cílem je tvorba látek lépe rozpustných ve vodě, které by mohly být následně vyloučeny z organismu (exkrece). Při biotransformaci dochází ke vzniku metabolitů se silnějším (aktivace) nebo slabším účinkem (detoxikace, inaktivace). Ve výjimečných případech nemusí dojít k přeměně účinné látky, např. u sladidla sacharin. Biotransformace je dvoufázový proces. V prvním stupni dochází k přeměně xenobiotika na metabolity, jejichž polarita, která je vyšší než původní látky, zajišťuje lepší rozpouštění v tělních tekutinách. Druhá fáze zahrnuje reakce, které vedou ke vzniku konjugátu rozpustného ve vodě a vylučitelného močí, stolicí nebo potem [12].

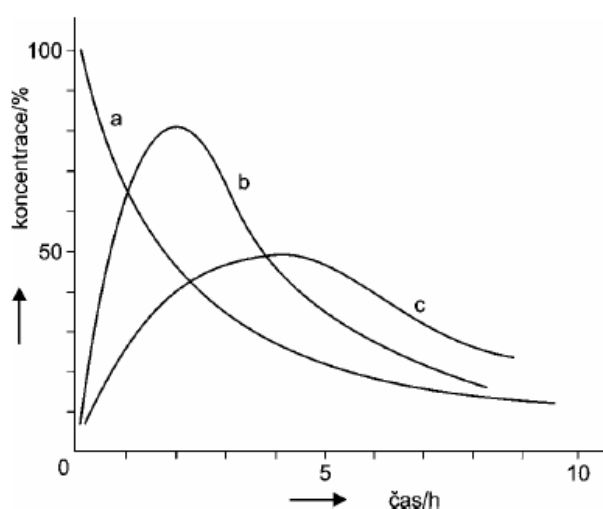
V této fázi je hlavním procesem eliminace látky v organismu, která se označuje jako clearance CL :

$$CL = k_e V_d \quad (1)$$

kde k_e značí konstantu eliminace a V_d je distribuční objem.

Samotný význam clearance je vztažen na objem, nejčastěji krevní plazmy, který je zbaven dané látky za jednotku času. Eliminace látky se v některé literatuře uvádí také ve významu poločasu eliminace nebo také biologického poločasu [9,12].

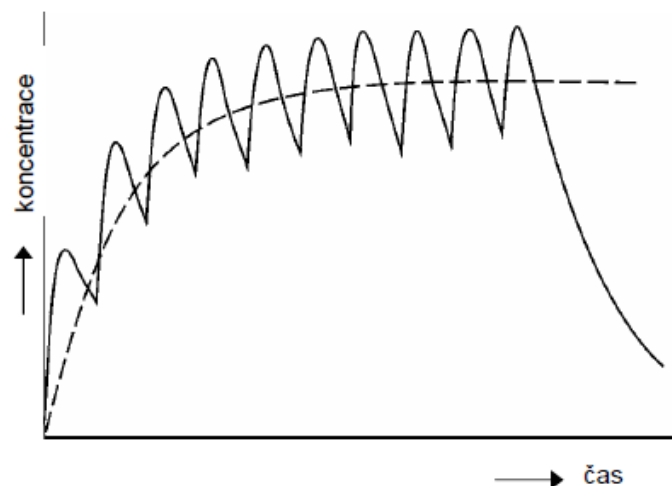
Pro ukázkou je na obr. č. 4 uvedena závislost koncentrace látky obsažené v krvi na čase. Křivky se liší podle způsobu podání. V případě intravenózního podání lze určit, že koncentrace závisí jen na rychlosti eliminace a absorpce je okamžitá. U perorálního podání určuje koncentraci poměr mezi rychlostí absorpce a distribucí léku k biotransformaci a eliminaci.



Obr. č. 4: Graf závislosti koncentrace látky obsažené v krvi na čase (koncentrace je udána v % výchozího stavu). (a) jednorázové intravenózní podání; (b) a (c) jednorázové perorální podání) [14]

2.1.3.4 Klinická farmakokinetika

Samotné slovo kinetika v sobě skrývá význam rychlosti. V tomto směru je tento pojem vztažen na vyrovnání rychlosti dávek a eliminace léčivé látky. Optimalizace dávkování daného léčiva je proto hlavním úkolem klinické farmakologie. Důvodem je především dosažení nutné koncentrace léku v nejkratším čase a její stálost v organismu. Tím pádem je úspěšná léčba založena na udržení vyššího množství, než je minimální efektivní koncentrace MEK, ale nižšího než odpovídá toxické dávce [1,9].



Obr. č. 5: Typický průběh koncentrace léčiva v krvi na čase při opakovaném podání [15]

U dlouhodobých terapií se dává přednost především lékům s prodlouženou dobou účinku nebo přípravkům, které se postupně uvolňují z matrice. Protažení intervalu mezi jednotlivými dávkami se využívá u starších lidí z důvodu jejich možného zapomenutí při používání léků. V případě vhodných matric se aplikují nejčastěji speciální náplasti nebo implantáty [9].

2.2 Antibiotika

Antibakteriální léky (ATB), antibiotika nebo také chemoterapeutika patří do rozsáhlé skupiny léčiv, které slouží k zamezení růstu a množení bakterií a následně i k jejich likvidaci, tzn., že působí bakteriostaticky i baktericidně [2,16].

V literatuře se můžeme setkat s různými typy rozdělení antibiotik. Podle staršího způsobu byla antibakteriální léčiva rozdělena na antibiotika, uměle syntetizované látky, přírodní produkty mikroorganismů a chemoterapeutika. V dnešní době se už spíše aplikuje novější rozdělení, které bude podrobněji rozebráno v další kapitole, protože se antibiotika již připravují především semisynteticky nebo čistě uměle [2].

2.2.1 Rozvoj a dělení antibiotik

Již v 19. století vznikl názor na škodlivé působení mikroorganismu na organismy. První, kdo se tímto problémem z hlediska onemocnění člověka podrobněji zabýval, byl Louis Pasteur. Při dalším pozorování vlivu bakterií v lidské moči a stolici se posunul ve výzkumu Robert Koch, který na základě porovnání člověka a zvířete zjistil velkou podobnost v působení bakterií na tyto dva organismy. Mezi další objevitele patří také Paul Vuillemin, od kterého pochází pojem „antibiosa“, která označuje hubení živočišných tvorů produkty organismů [16]. Za důležitý a v lékařství velice významný posun je považován objev penicilinu, kdy Alexandr Fleming v roce 1886 pozoroval zabránění růstu kolonií bakterií pomocí plísně *Penicillium notatum*; odtud pochází název tohoto antibiotika. Studium a především umožněním praktického používání penicilinu se zabývali vědci Florey a Chain, kteří se zasloužili o léčbu až v roce 1940, kdy se jim podařilo úspěšně látku separovat a stabilizovat v potřebném množství. První průmyslová výroba byla započata až v roce 1943 v Americe a Anglii [16,17].

Rozvoj ve výzkumu antibiotik stále pokračoval; mezi další antimikrobní léky uvedené v brzké době na trh byly streptomycin, gramicidin, z prvních zástupců širokospektrálních antibiotik byly uvedeny na trh chloramfenikol a cefalosporiny. V 30. letech byly jako první uměle syntetizovány sulfonamidy. V dnešní době se spíše setkáme s deriváty původních antibiotik [17].

Antibiotika tvoří rozsáhlou skupinu a jsou děleny na podle svých vlastností a struktury do několika skupin [12,13,19]:

a) Podle účinku:

- Baktericidní – zahubení bakterie
- Bakteriostatické – zamezení rozmnožování bakterií

b) Podle rozsahu působení:

- Širokospektrální
- Úzkospektrální

c) Podle mechanismu

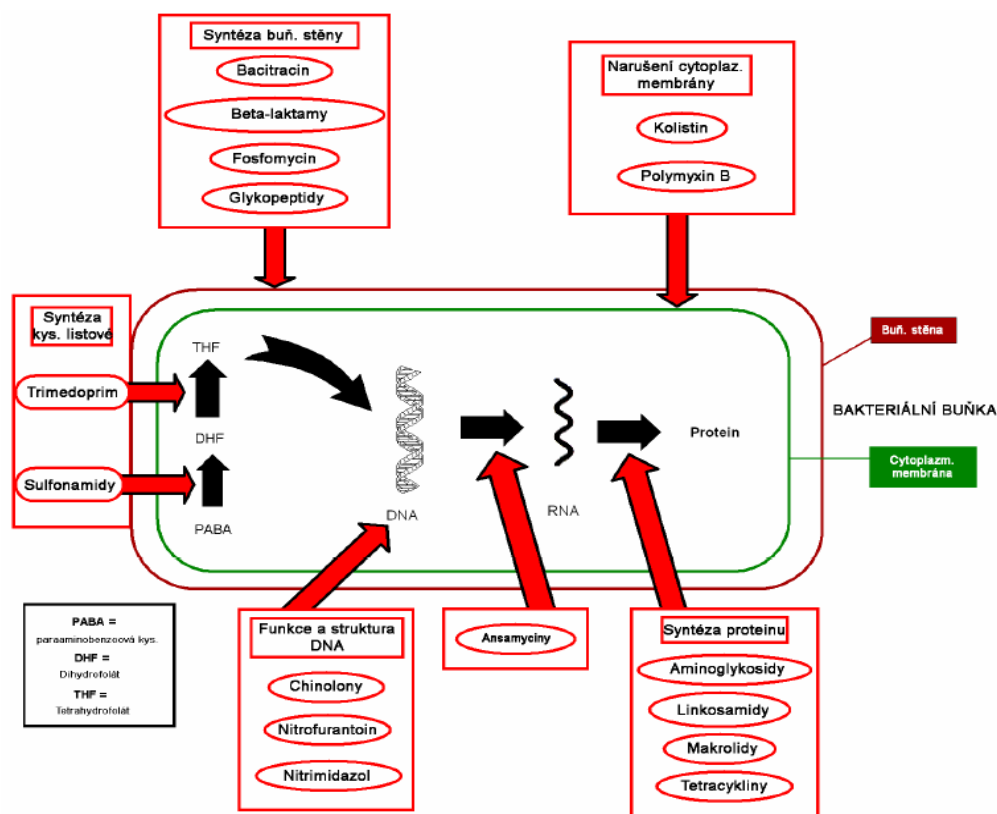
- Inhibice proteosyntézy
- Inhibice tvorby buněčné stěny
- Antimikrobní látky poškozující cytoplazmatickou membránu
- Inhibice syntézy kyseliny tetrahydroxylové
- Inhibice tvorby nukleových kyselin

d) Podle chemické struktury

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| • Peniciliny | • polypeptidy |
| • Sulfoamidy | • glycylcykliny |
| • Cefalosporiny | • makrolidy |
| • Imidazoly | • ansamyciny |
| • β -laktamová antibiotika | • pyrimidiny |
| • chinoliny | • linkosamidy |
| • amfenikoly | • aminoglykosidy |
| • tetracykliny | • lokální a ostatní antibiotika |
| • nitrofurany | |

2.2.2 Mechanismus jejich působení

Jak již bylo v předcházející kapitole naznačeno, mechanismus účinku antibiotik na bakterie může probíhat několika způsoby, které se však mohou navzájem i prolínat. Jedná se o procesy inhibice proteosyntézy, buněčné stěny, kyseliny tetrahydroxylové, tvorby nukleových kyselin nebo dokonce k poškození cytoplazmatické membrány. Tyto pochody jsou znázorněny ilustrativně na obr. č. 6 [12,19].



Obr. č. 6: Schéma účinku některých vybraných antibiotik [20]

Inhibice buněčné stěny, především její syntézy, bývá nejčastěji zapříčiněna β – laktamovými antibiotiky, např. cefalosporiny nebo peniciliny. Buněčná stěna je u bakterií tvořena mureinovou vrstvou s dekapeptidem kyseliny N-acetylmuranové, z něhož po odštěpení D-alaninového zbytku se polypeptid napojuje na vedlejší glykopeptid. V tomto případě zde antibiotikum interaguje s transpeptidázou a proces spojení glykopeptidů je narušen. V konečné fázi může dojít k lýze (smrti) buňky. K tomuto jevu dochází pouze u grampozitivních bakterií, u gramnegativních bakterií je mureinová vrstva pokryta fosfolipidovou, která chrání bakterie před hydrofilními antibiotiky [10].

Důvodem inhibice cytoplazmatické membrány zapříčiňují např. imidazoly, které způsobí zvýšení její permeability a následný únik nízkomolekulárních látek do prostředí vedoucí ke smrti buňky.

Sulfonamidy jsou častými inhibitory kyseliny tetrahydrofolové, která je podstatná při tvorbě nukleových kyselin. Principem tohoto poškození je vliv antibiotika na navázání kyseliny *p*-aminobenzoové, která je prekurzorem dihydrofolové kyseliny, a tím zastavení syntézy tetrahydrofolové kyseliny.

Poškození proteosyntézy navázáním na ribozom mohou způsobovat makrolidová antibiotika, tetracykliny, linkosamidy nebo amfenikoly. Působení těchto antibiotik je bakteriostatické a baktericidní. Konkrétně dochází ke spojení účinné látky s 50S podjednotkou ribozomu, jehož součástí jsou proteiny a rRNA, k poškození transpeptidázového děje, k brzkému odtržení peptidových řetězců a k zániku buňky [10,13].

Nukleové kyseliny jsou složité struktury, a proto jejich inhibice může probíhat ve třech částech:

- poškození gyrázy způsobené např. chinolovými antibiotiky brání zpětnému spojení dvouvláknové DNA po replikaci, což vede k baktericidnímu účinku, tj. smrti buňky.
- Inhibice syntézy RNA vede k poškození RNA - polymerázy závislé na DNA, způsobují baktericidní účinek ovlivňující tvorbu bakteriální RNA (např. makrocyclická látka rifampicin) [10,21].
- Navázání na bakteriální DNA ovlivňují imidazoly, které se shromažďují v bakteriích, přijímají elektrony a tím pádem dochází k redukci nitroskupiny, syntézy DNA komplexu a destrukci vláken [10,18,21].

2.2.3 Rezistence organismu na antibiotika

Jeden z hlavních problémů lidstva v současné době je vznik adaptace a vývoj odolnosti mikrobu na antibiotika. Lze proto říci, že žádná antimikrobní substance nepůsobí jen pozitivně, každá v sobě nese minimální riziko a možností vývoje rezistence [22].

Typy bakteriální rezistence lze dělit na primární a sekundární. Primární odolnost je přirozená, což znamená, že bakterie nereaguje na dané antibiotikum. Sekundární neboli získaná rezistence vzniká následkem dlouhodobé necílené terapie a špatné profylaxe (nesprávná aplikace ATB, nepodstatné použití antibiotik, slabé dávky nebo nedodržení doby užívání dávky) [23].

Rezistence bakterií k antibiotikům je možné rozdělit na základě různých mechanismů. Následně jsou uvedeny ty nejzákladnější; ve většině případů se může velice často jednat také o jejich kombinace:

- Narušení nebo zmodifikování struktury antimikrobních látek (např. makrolidů nebo aminoglykosidů) způsobené nadměrnou tvorbou bakteriálních enzymů,
- Změna bakteriální stěny, která může směřovat ke snížení její permeability (např. u chinolinů) a ovlivnění cílových míst působení antibiotik (např. u β -laktamových antibiotik),
- Zvýšení intenzity vylučování antibiotik z buněk bakterií a s tím související i změna bakteriálního metabolismu (např. u tetracyklinů a sulfonamidů),
- Změna cílového místa a jeho struktury pro působení antibiotik, která může být způsobena změnou genů subjednotek DNA gyrázy nebo cílového proteinu, případně změnou bílkoviny ribozomu [18,23].

Z hlediska bakterií je důležité brát zřetel zejména na jejich rychlé množení a počítat i s možností vzniku mutace, která se stává odolnou proti působícím antibiotikům. V tom případě se tato změněná (zmutovaná) bakterie stává zdrojem dalších rezistentních bakterií díky rozmnožování [24].

Přestože se organismu, ale především lékařům tento vývoj nelíbí, jedná se však o princip revoluce. Množství antibiotik v životním prostředí neustále roste, což vede k přirozenému jevu, budování rezistence bakterií. Těmito jevy se zabývali a také předpověděli vědci, zejména Darwin a Ehrlich [18,24].

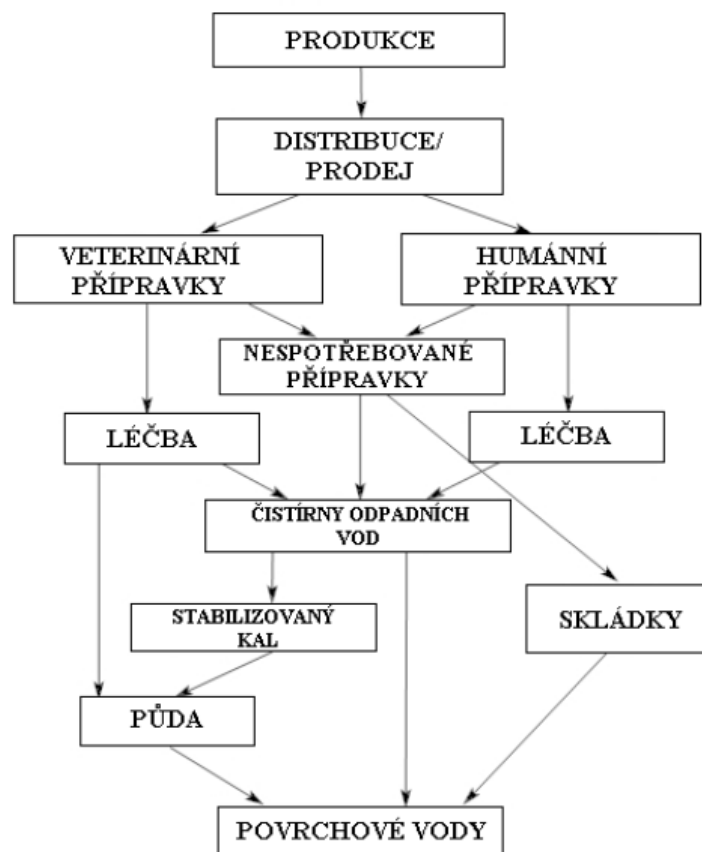
Existuje několik pravidel při používání léčiv, aby se co nejvíce zabránilo vzniku rezistence bakterií. Je důležité využít předepsanou dávku celou v určených dávkách, aby došlo k úplnému usmrcení bakterií a zabránění vzniku jejich rezistence. Pokud však pacient

nedodržuje dávkování nebo naopak užívá antibiotikum zbytečně dlouho, buduje snadnou cestu pro vznik odolnosti [18,23,25].

Nejdůležitější je proto správné užívání antimikrobních léků a vyvarování se předepisování léčiv pouze jako prevence nebo na nemoci virového původu [22].

2.2.4 Antibiotika a jejich vliv na životní prostředí

Množství antibiotik a jejich užívání v humánní i veterinární medicíně se neustále zvyšuje a představují riziko pro všechny oblasti životního prostředí. Antibakteriální léky byly detekovány v sedimentech, v odtocích z čistíren odpadních vod, v kalech, v povrchových vodách, ale také v podzemních a pitných vodách. Stanovené koncentrace ATB se pohybují v hodnotách $\mu\text{g/l}$ a ng/l . Obecně lze říci, že taková množství jsou velice nízká, avšak v případě interakce těchto látek a životního prostředí může způsobovat nepřírozené změny a rovněž nepříznivě ovlivňovat necílové organismy, tj. i člověka. Výskyt antibiotik a jejich rozšíření v životním prostředí se v nynější době stává problémem, který je nutné řešit, protože antibakteriální látky jsou velice stabilní, mohou se kumulovat v jednotlivých složkách prostředí, případně může docházet k jejich degradaci a v té horší formě mohou vznikat více nebezpečné metabolity. V dalších podkapitolách bude podrobněji tento proces vstupu antibiotik rozebrán [26,27,28].



Obr. č. 7: Cesta léčiva v životním prostředí [28]

2.2.4.1 Interakce antibiotik se složkami životního prostředí

Nejen antibiotika, ale obecně všechna léčiva se mohou do životního prostředí dostávat z několika zdrojů. Nejčastějším kontaminantem jsou čistírny odpadních vod (ČOV), dále nemocniční odpady, skládky, hospodářské chovy zvířat a také průmysl [29].

Možností vstupu léčiv je více, nejčastěji v podobě exkrecí a také vypouštěním a likvidací léků do komunálních odpadů nebo splachováním. Provedené studie ukazují, že v některých případech je až 90 % léčivých látek a metabolitů vyloučeno močí, především u látek lépe rozpustných ve vodě, a stolicí u léčiv lipofilnější povahy. Kanalizací se tyto kontaminanty dostávají na čistírnu odpadních vod, kde ve většině případů nedochází k jejich důkladnému odstranění. Léčiva se sorbují na čistírenský kal nebo odcházejí z ČOV beze změny přímo do recipientu. Odtud je kontaminace šířena dále prostřednictvím povrchových vod. Do půdy se léčiva dostávají nejčastěji z čistírenského kalu, který se používá k hnojení, ale také ze zavlažování odpadní vodou. Tímto způsobem může dojít až ke znečištění podzemních a následně i pitných vod; samozřejmě vždy záleží na mobilitě léku a také na stabilitě [30].

Vedle humánní medicíny jsou velmi rizikovým kontaminantem veterinární antibiotika, která jsou ve velkých dávkách používána pro léčbu, dezinfekci nebo pouze jako prevence u hospodářských zvířat. Kejdá vznikající jako konečný produkt vylučování se uchovává v jámách, které mohou prosakovat, případně se aplikuje jako hnojivo a takto se přes půdu mohou kontaminovat podzemní vody [31].

Protože nejčastějším zdrojem kontaminace vodního ekosystému jsou čistírny odpadních vod, jejichž účinnost pro odstranění antibiotik je velice nízká, je nutné tyto technologie neustále zdokonalovat. Přítomnost antibiotik v procesu čištění odpadních vod může rovněž ovlivňovat úlohu mikroorganismů, které jsou podstatné v biologické části čistícího procesu. V tomto případě potom může docházet k ovlivňování účinnosti odstranění léčiv [26,32].

Klasicky se čištění odpadních vod provádí v čtyřech základních krocích:

- hrubé předčištění (pomocí česlí, lapáků šterku a písku, odstranění látek větších rozměrů, tuků,
- mechanické čištění (odstranění sedimentu na dně usazovacích nádob a plovoucích látek na hladině),
- biologické čištění (využívá se mikroorganismů pro odstranění rozložitelných organických látek),
- dočištění (procesy založené na biologickém, chemickém, filtračním procesu) [33,34].

Tyto klasické postupy čištění však nepostačují k odstranění antibiotik z odpadní vody, a proto voda odcházející do recipientu není dostatečně vyčištěna a koncentrace antibakteriálních látek se mohou pohybovat i v koncentracích několika ng/l a µg/l. Je proto nutné volit kvalitnější a novější technologie. V současné době se mnoho vědců a technologů zabývá zlepšením a vytvořením nových technologických procesů, které by dokázaly odstranit farmaceutické látky z odpadních vod [32,35].

Jednou z forem čištění je možnost sorbovat na aktivovaný kal látky podléhající biodegradaci. Podstatou je interakce kalu s léčivem na základě jejich fyzikálně chemických vlastností, protože látky hydrofilní povahy se sorbují hůře. Tento proces ovlivňuje i řada jiných faktorů, jako je teplota odpadní vody, vytíženost čistící linky apod.[36].

V dnešní době jsou již aplikovány kvalitní membránové procesy, které jsou schopny zaručit lepší odstranění antibiotik z odpadních vod. Patří mezi ně mikro- a ultrafiltrace, v lepších případech nanofiltrace nebo reverzní osmóza. Čím „hustší“ membrány se používají, tím je

čištění nákladnější a vyžaduje více energie. Další možnosti odstranění antibiotik jsou oxidační procesy, fotokatalýza využívající UV záření a záření z viditelné oblasti, dále ozonizace, elektrolýza, Fentonova oxidace, působení mikrovlnného záření, plazmy nebo ultrazvuku, případně čištění pomocí nanočástic železa. V některých případech je aplikována i kombinace těch postupů čištění [35,37].

2.2.4.2 Následky kontaminace

Antibiotika lze označit jako biologicky aktivní látky v životním prostředí, jejichž přítomnost může způsobovat nevratné změny. Jejich vliv na lidský organismus a savce je obecně znám, avšak antibakteriální působení na necílové organismy může ovlivňovat negativně jejich funkce. Popis tohoto procesu je velice složitý, jelikož nejde přesně určit, zda organismus přijme původní aplikovanou sloučeninu nebo nějaký metabolit [38,39,40].

V případě kontaminace vodního ekosystému antibiotiky se pohybujeme v koncentracích ng/l až µg/l. Toto množství má na organismus vliv z hlediska chronické toxicity, což znamená, že projev přítomnosti antibakteriálních léčiv se ukáže až po delších časových úsecích, kdy napadá především metabolický a reprodukční cyklus [38]. Akutní toxicita ve spojitosti s kontaminací těmito látkami ve vodním prostředí nebyla v literatuře dosud popisována. Přítomnost antibiotik ve vodách může způsobovat změny mikrobiálních organismů, které se podílejí na důležitých procesech denitrifikace, nitrifikace, fixace dusíku, rozkladu organických látek apod. Studie potvrzují i abnormality u ryb, případně možný zánik některých populací a problémy v reprodukci. Organismy velice citlivé na výskyt antibiotik jsou sinice. Působení těchto látek může ovlivňovat jejich rozmanitost. Pochopitelně je nutné upozornit na synergický vliv, tj. vzájemné působení reziduí léčiv mezi sebou, kdy může dojít ke změně tím průběhu i konečného důsledku působení. Také ve vodním ekosystému se nacházejí bakterie, které mohou tato rezidua negativně ovlivňovat. Tyto bakterie mohou vytvořit zárodek pro vznik kmenů, které budou rezistentní na daný druh antibiotik a jejich průnik do vodního a následně do terestrického prostředí způsobí vznik modifikovaných genů, které budou odolné proti možnosti léčit určité nemoci a choroby daným typem antibiotik [41,42,43].

Lze proto konstatovat, že makrolidová antibakteriální léčiva jsou velice nebezpečná pro vodní prostředí [44].

2.2.5 Makrolidová antibiotika

Makrolidy patří mezi makrocyclické sloučeniny vyznačující se velmi podobnou chemickou strukturou a antimikrobními vlastnostmi. Základní struktura je postavena na laktonovém kruhu, ze kterého se potom odvozují všechna makrolidová antibiotika. V detailnějším pohledu jsou tyto antimikrobní látky tvořeny aglykonem s 12-, 14-, 15-, 16-, 17-ti členným laktonovým kruhem, s vazbou na hydroxylové, alkylové, ketonické nebo aldehydické skupiny. Na tento laktonový kruh se mohou dále přichytit dva až tři cukerné zbytky podle různých konformací. V případě 12- a 16-ti členného kruhu se vyskytuje ve struktuře dvojná vazba [45,49].

Mezi makrolidy se 14-ti členným kruhem se řadí erythromyciny A-F, dirithromycin, flurithromycin, roxithromycin, oleandomycin a klarithromycin; 15-ti členná makrolidová antibiotika zahrnuje pouze azithromycin, často označován také jako azalid. Josamycin,

spiramycin, rokitamycin, miokamycin a midekamycin patří mezi antimikrobní makrolidová antibiotika s 16-ti členným laktonovým kruhem [19,45,48].

Vedle penicilinu a streptomycinu patří makrolidy mezi nejstarší antibiotika. První z makrolidových antibiotik našel praktické uplatnění erythromycin, který byl poprvé izolován v roce 1952 ze *Streptomyces erythreus* (odtud také název antibiotika). Do pěti let od objevu erythromycinu byla stanovena jeho přesná struktura a následně se začaly připravovat jeho estery, které se velmi rozšířily v praktické léčbě. Kromě toho byly objeveny další typy makrolidů a v 80. letech minulého století dochází k rozvoji makrolidových antibiotik II. generace. Současná antibiotika jsou připravována především semisynteticky a nejnovější dokonce pouze synteticky [46,49].

Mechanismus působení makrolidových antibiotik je založen na inhibici proteosyntézy 50S podjednotky bakteriálního ribozomu. Jejich možnost vlivu na bakterie je rozsáhlý, nejen grampozitivní, ale také některé gramnegativní mikroorganismy jsou citlivé na makrolidy. Mezi další oblast použití se řadí i inhibice vybraných anaerobů a pneumokoků [45].

Ve srovnání s ostatními typy antibiotik patří makrolidy po β – laktamových mezi nejvíce nebezpečné z hlediska aplikace. Často se však v případě alergií nasazují i při léčbě dětí. Aplikují se jako širokospektrální antibiotika s bakteriostatickým působením, avšak u vyšších koncentrací použitých in vitro mohou působit i baktericidně [47,48].

2.2.5.1 Dělení antibiotik

Tabulka 1: Dělení antibiotik s uvedenými makrolidovými antibiotiky a jejich praktické použití ve formě léků [18]

Skupina	Název léčiva	Příklady vyráběných léků
přirozené makrolidy I. generace	erythromycin	EMU-V, Meromycin, Erythromycin-Ratiopharm, Erythrocin
	spiramycin	Rovamycine
	josamycin	Wilprafen
syntetické makrolidy II. generace	roxithromycin	Rulid
	clarithromycin	Klacid, Fromilid, Lekoklar
	dirithromycin	Dynabac
azalidy	azithromycin	Sumamed, Zitrocin, Zithromax, Azitrox
ketolidy	telithromycin	Ketek
	cethromycin	

Existuje mnoho typů dělení makrolidových antibiotik, a to na základě jejich fyzikálně chemických vlastností, struktury, mechanismů účinku apod. Podle působení je můžeme rozdělit do několika skupin:

- Přirozené makrolidy I. generace
- Syntetická makrolidová antibiotika II. generace
- Azalidy
- Ketolidy

Makrolidy I. generace jsou přirozeného původu. Bývají podávány v častých vysokých dávkách, protože jejich biologický poločas je krátký a také se u nich vyskytuje interakce s některými typy léčiv; II. generace syntetických makrolidových antibiotik se vyznačuje

lepšími farmakokinetickými vlastnosti a nižšími interakcemi mezi léky. Dávky těchto antibiotik jsou menší a méně časté. Odlišností azalidů od ostatních makrolidů je pomalé uvolňování a biologický rozklad. Jejich struktura je založena na 14-ti členném laktonovém kruhu s atomem dusíku. Mezi nejnovější skupinu makrolidových antibiotik patří ketolidy; tato léčiva jsou stále ve fázi výzkumu. Byla vyvinuta z důvodu vznikající rezistence na některé makrolidy jako jejich případná náhrada. Struktura ketolidů vychází z původního 14-ti členného laktonového kruhu s cukrem kladinózou, který byl nahrazen ketonovou vazbou [45,50].

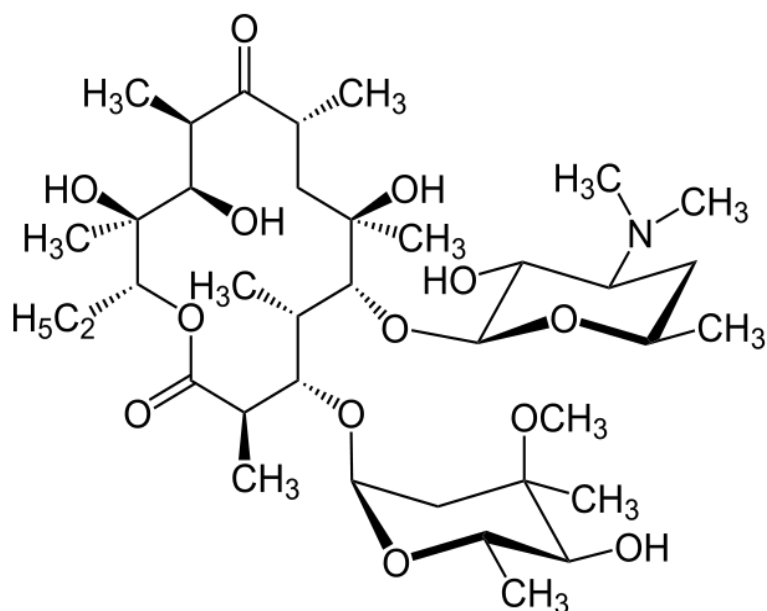
2.2.5.2 Studovaná makrolidová antibiotika

Erythromycin

Pod názvem erythromycin se skrývá směs makrolidových antibiotik, jejichž hlavní složkou je erythromycin A. Tento typ antibiotik je produkován mikroorganismem *Streptomyces erythreus*.

Sumární vzorec této chemické látky je $C_{37}H_{67}NO_{13}$, její molekulové hmotnost 733,94. Jedná se o bílý, někdy světle nažloutlý prášek, tvořený bezbarvými až světle žlutými krystalky. Je hygroskopický, špatně se rozpouští ve vodě, naopak v methanolu, ethanolu a podobných organických rozpouštědlech je dobře rozpustný [51].

V žaludku se vlivem kyselého prostředí rozkládá na vedlejší produkty, které nemají správný účinek a způsobují problémy s vedlejšími účinky v GIT. Působení tohoto antibiotika je bakteriostatické, čehož se využívá při léčbě infekcí dýchacích cest, kůže nebo močových cest [45,46].



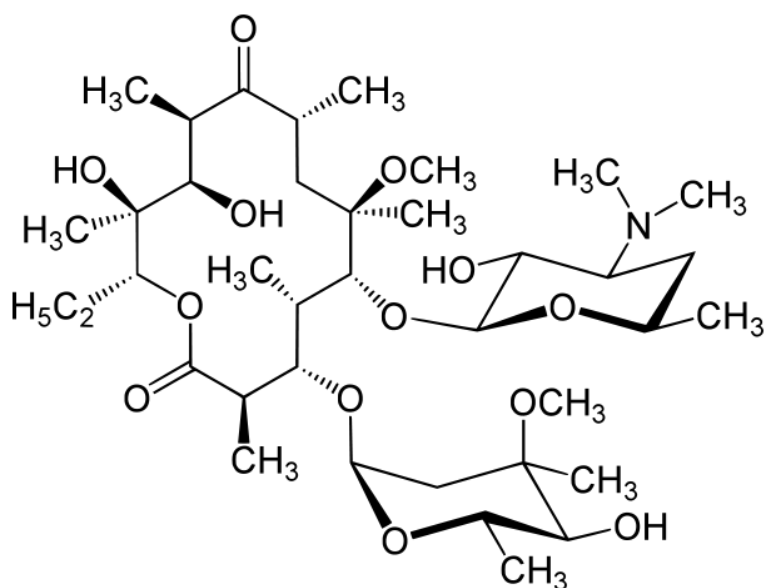
Obr. č. 8: Strukturální vzorec erythromycinu

Clarithromycin

Sumární vzorec clarithromycinu je $C_{38}H_{69}NO_{13}$ a jeho molekulová hmotnost $747,97 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Jedná se o bílý krystalický prášek, rovněž nerozpustný ve vodě, avšak dobře rozpustný v polárních organických rozpouštědlech, např. v acetonu [51].

Toto makrolidové antibiotikum má lepší farmakokinetické a antibakteriální vlastnosti, díky kterým je výrazně lépe snášen v GIT a také je více odolnější proti kyselosti žaludku než erythromycin. V organismu podléhá metabolismu, jehož produktem je účinnější forma produktu, 14-hydroxyclearithromycin [45].

Použití tohoto bakteriostatického léčiva je v případě onemocnění stejné jako u erythromycinu. Je možné ho použít také u infekcí způsobených bakterií *Helicobacter pylori* [46].



Obr. č. 9: Strukturální vzorec clarithromycinu

2.3 Stanovení léčiv

K analýze antibiotik izolovaných z vody je možné použít několik instrumentálních analytických technik. Mezi nejčastěji používané patří vysokoúčinná nebo ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, UHPLC), plynová chromatografie (GC), případně kapilární elektroforéza (CE). Využití všech těchto technik vyžaduje vhodný tep detektorů, které zaručí optimální kvalitativní a kvantitativní stanovení sledovaných látek. Mezi hlavní způsoby detekce patří spektrofotometrická detekce pomocí diodového pole (DAD), fluorescenční detekce (FLD), hmotnostní spektrometrie (MS) a elektrochemické detektory (amperometrický a coulometrický) [50,52].

Použití vhodných analytických technik pro finální analýzu je pouze jednou fází tohoto stanovení. Vlastní analýze musí ve většině případů předcházet metoda izolace analytů z matrice, zakoncentrování a čištění extraktu získaného ze vzorku. Tuto úlohu v dnešních technologiích zaujímají především extrakce pevnou fází (solid phase extraction - SPE). Velmi důležitou a podstatnou část ovlivňující celkovou analýzu a konečný výsledek je technika vzorkování a úprava samotného vzorku před extrakcí [53].

2.3.1 Vzorkování a úprava vzorku

Vzorkování je založeno na dvou základních krocích:

- Správný odběr a úprava vzorku přímo v terénu a následná doprava do příslušných laboratoří,
- Systém vzorkování, který se skládá z volby postupu, plánování a také kontroly a řízení jakosti procesu.

Odběr vzorku musí být proveden správně, aby byl konečný vzorek reprezentativní a pocházel z dostatečného množství daného materiálu (sediment, voda, biologický materiál). Podle pokynů a požadavků laboratoře provádějící konečné stanovení je vzorek zpracováván (lze použít např. filtraci, sedimentaci, suspendaci) a po odběru je uzavřen nejlépe do tmavé skleněné láhve (vzorkovnice) s kvalitním uzávěrem z polytetrafluorethylenu (PTFE). Tento vzorek by měl být umístěn v chladničce nastavené na teplotu 4°C. Obecně platí podmínka, že vzorek by měl být zpracován do 24 hodin od jeho odebrání [54,55].

Odběr vzorků pitné vody se provádí ve většině případů na místě výtoku zdroje pitné vody a také záleží na tom, které analýzy budou prováděny. Klasické způsoby analýzy se dělí na chemický, senzorický a mikrobiologický rozbor; ve všech těchto částech je vzorkování odlišné [26].

Naproti tomu odběry odpadních vod jsou více specifické, protože se provádí na přítoku i na odtoku vody z ČOV a to v pravidelných intervalech. Vzorky je také možné odebírat průběžně v rámci celého procesu čištění nebo přímo z kanalizační sítě. Vzorkovat můžeme manuálně nebo automaticky. Ruční odběry jsou používány především u vzorků pro stanovení těžkých látek, avšak automatické vzorkování je naopak více spolehlivé a efektivnější. Rozlišujeme dva typy vzorkování, bodové a směsné. Jak jejich název napovídá, směsné vzorky jsou odebírány po dobu 24 hodin, každý po jedné hodině; nakonec jsou smíchány a tvoří směsný, kompozitní vzorek, ze kterého můžeme lépe stanovit průměrné hodnoty znečištění. Naproti tomu bodové vzorky poskytují informace pouze pro dané místo a čas odběru. Sledování znečištění může rovněž probíhat po určitou pravidelnou dobu, např. celý týden, tj. 7 dní [54,56,57].

Přestože bývají vzorky odebírány z míst turbulentního proudění, kde se nachází nejnižší koncentrace nerozpuštěných látek, je nutné vzorky vod vždy před technikou extrakce zfiltrovat. Tento proces je rozdělen do dvou fází. Nejdříve se zbavujeme větších částic nerozpuštěných látek přes papírový filtr s velikostí pórů 2,5 µm, poté následuje čištění přes membránový filtr s rozměry pórů 0,45 µm [57,58].

2.3.2 Extrakce

Před stanovením sledovaného analytu je nezbytné provést důležitý krok, zahrnující jeho izolaci z matrice, přečištění a zakoncentrování. Protože matrice je složka bohatá na více látek, které mohou rušit detekci analytu, musí být odstraněny koextrahující látky. Technika, která tyto kroky zahrnuje, se nazývá extrakce. Často se můžeme setkat s pojmem protřepávání spojeným s extrakcí. Jedná se o separační proces, který je založen na různé rozpustnosti látky v odlišných rozpouštědlech, čímž dochází k rozdělení (distribuci) mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze.

Konkrétně v případě analýzy makrolidových antibiotik se používá extrakce kapalina-kapalina (LLE, liquid - liquid extraction), extrakce tuhou fází (SPE), mikroextrakce tuhou fází (SPME-solid phase microextraction) [58,59].

2.3.2.1 LLE (extrakce kapalina – kapalina)

U tohoto typu extrakce se používají dvě nemísitelné kapaliny, které zajistí distribuci analytu ve většině případů z vodné fáze do organické. Je podstatné, aby byla dodržena minimální mísitelnost fází a bylo zaručeno zamezení vzniku emulze na fázovém rozhraní. Jako extrakční činidla se volí převážně organické rozpouštědlo nebo směsi rozpouštědel. U analýzy makrolidových antibiotik se často používá diethylether. Tento typ extrakce je jednoduchý, univerzální, ale má i řadu nevýhod. Negativní vlastností je nadměrná spotřeba rozpouštědel a častá tvorba emulze na fázovém rozhraní [58,60].

2.3.2.2 SPE (extrakce tuhou fází)

Novější technikou čištění a zakoncentrování analytu je extrakce tuhou fází, při které je použito menší množství organických rozpouštědel a lépe se zabraňuje tvorbě emulzí. Je to metoda, která se vyznačuje vyšší selektivitou. Není zapotřebí volit nemísitelná rozpouštědla, protože k sorpci dochází na tuhém sorbentu, u něhož je také možné volit velikost pórů podle velikosti separovaných molekul [60].

SPE je založena na rozdělení složek analytu mezi vodnou a tuhou fází na základě distribučního koeficientu. Nejsilnější interakce je zajištěna mezi analytem a sorbentem a ostatní složky naopak vykazují nejnižší sorpci. Nasorbovaný analyt se ze sorbentu následně odstraní promytím vhodným rozpouštědlem, ve kterém je rozpustný, nebo termickou desorpcí.

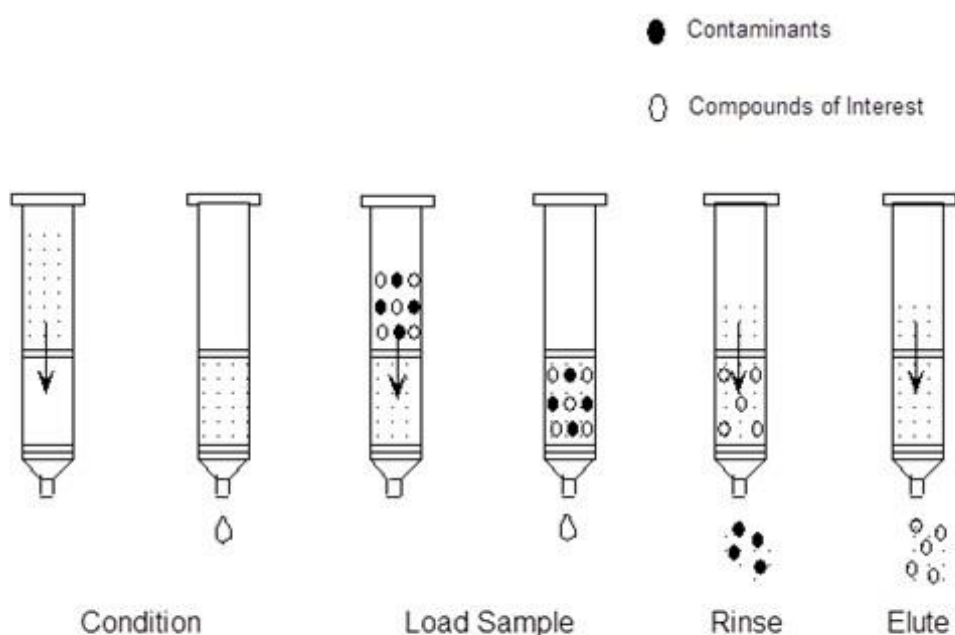
Uspořádání a proces extrakce lze rozdělit na dva druhy:

- Statické uspořádání je založené na míchání sorbentu s analytem a jeho následným oddělením pomocí filtrace.
- Dynamické uspořádání je složené ze sorpční kolonky, ve které je pevně umístěn sorbent a vzorek protéká kolonkou postupně [60,61].

Proces SPE extrakce se skládá z několika částí (viz Obr. 10):

1. Kolonka obsahující určitý sorbent se musí kondicionovat. Provádí se to tak, že se smočí určitým rozpouštědlem. Po této aktivaci kolonky se musí promýt roztokem, který je podobný vzorku, což zahrnuje zmíněnou předúpravu kolonky a úpravu prostředí. Pro makrolidy se aplikuje např. 5 ml acetonitrilu či methanolu a následně promytí pomocí milli Q vody.
2. Další fází je aplikace vzorku, který se zajišťuje stálým průtokem pomocí vodní vývěvy (pod tlakem), odstředivou silou pomocí odstředivek, případně přetlakem, který je aplikován pomocí čerpadla nebo jednoduchého pístu. Tok vzorku je kontrolován a nastaven podle daných podmínek. V závislosti na interakci mezi analytem a sorpční kolonkou je analyt na základě specifického působení zadržován a ostatní části vzorku procházejí kolonkou beze změny.

3. Vymytí zbývajících nežádoucích koextrahujících složek, které se zachytily na sorbentu, se provádí vhodným rozpouštědlem, a sledovaný analyt zůstane na sorbentu. V případě makrolidových antibiotik se používá milli Q voda.
4. Sušení kolonky je prováděno inertním plynem, ve většině případů dusíkem. Tento proces je důležitý především v tom případě, když se eluční činidlo výrazně liší od promývacího roztoku.
5. Závěrečnou fází je eluce analytu ze sorpční kolonky použitím vhodného elučního činidla, které zajistí vymytí (desorpci) analyzovaných složek ze sorbentu. U makrolidových antibiotik se aplikují methanol, acetonitril nebo acetát amonný [61,63].



Obr. č. 10: SPE instrumentace [64]

Kolonky pro SPE extrakci jsou bezpístové injekční stříkačky naplněné sorbentem, který je z obou stran obklopen fritami. Sorbent se volí v závislosti na stanovovaném analytu a jeho charakteru. Nejčastěji se používá modifikovaný silikagel (např. oktyl, oktadecyl, fenyl atd.), případně také polymerní, uhlíkové nebo imunoafinitní sorbenty. Pro konkrétní případy, makrolidů se využívají kolonky Oasis HLB nebo SAX kolonky se silným aniontovým výměnným typem sorbentu [63,66].

Metodu SPE je možné zautomatizovat a spojit ji s jinou analytickou technikou přímo. Nejčastěji se můžeme setkat s kombinací SPE a HPLC. Výhodou je větší citlivost, přesnost, bezpečnost a zároveň klesá spotřeba rozpouštědel a snižuje se možnost ztráty analyzované látky a možnost kontaminace vzorku. Navíc samotné zacházení se vzorkem se zjednoduší na jeden nástřik a poté dochází k SPE extrakci, jejíž produkty jsou následně automaticky vedeny k analýze pomocí kapalinové chromatografie [62,65].

Na základě této techniky vznikly další dvě modifikace:

- SPME je založena na sorpci analytu na křemenné mikrovlákno, které je pokryté polydimethylsiloxanem (PDMS), kopolymery divinylbenzenu a dimethylsiloxanu nebo polyakrylátem (PA). Při této metodě se pracuje bez rozpouštědel a vstup extraktu do chromatografického zařízení je zajištěn termickou desorpcí u plynové chromatografie a promytím mobilní fází u kapalinové chromatografie.
- Extrakce na membránovém disku se provádí pomocí disku s vysokou hustotou sorbentu. Díky této vlastnosti je sorpce velmi účinná a rychlá, což umožňuje velká plocha sorbentu. Takto je umožněna sorpce velkého množství analytu bez nadbytečných ztrát [61,63].

2.3.3 Analýza antibiotik pomocí HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography - HPLC) je hojně využívanou technikou pro analýzu makrolidových antibiotik izolovaných z přírodních matric. Má několik předností v souvislosti s kvalitativním i kvantitativním stanovením vzorku, kterými jsou vysoká citlivost ve spojitosti s rychlostí stanovení, minimální spotřeba vzorku s možností analýzy termolabilních látek i polárních substancí [66].

2.3.3.1 Proces separace

Principem kapalinové chromatografie je rozdělení složek směsi na základně interakcí mezi stacionární a mobilní fází. Na tomto procesu je založena nejen kapalinová chromatografie, ale obecně všechny typy chromatografických technik a v konkrétních případech je podrobněji charakterizována. V případě HPLC dochází k pohybu mobilní fáze za působení vysokého tlaku a separace probíhá podle vratných dvoufázových dějů (mechanismů), které lze následovně dělit:

- Rozdělovací (liquid – liquid chromatography LLC) je založena na separaci analyzované složky mezi dvě nemísitelné kapalné fáze.
- Adsorpční (liquid – solid chromatography LSC) využívá procesu adsorpce v závislosti na jeho schopnosti sorpce na povrchu tuhé fáze.
- Gelová permeační chromatografie (gel permeation chromatography GPC) vychází z principu zachycení složek směsi v pórech gelu v závislosti na jejich velikosti.
- Iontově výměnná chromatografie (ion exchange chromatograph IEC) rozděluje ionty na základě jejich interakcí s iontoměničem umístěným v koloně [62].

2.3.3.2 Zařízení a části kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z několika základních částí: zásobníky mobilní fáze, regulátory průtoku, čerpadlo, dávkovací zařízení, kolona, detektor. Pro jednoduché znázornění je jeho schéma uvedeno na obr. 11. V dalších odstavcích budou všechny části podrobněji popsány [60,62].

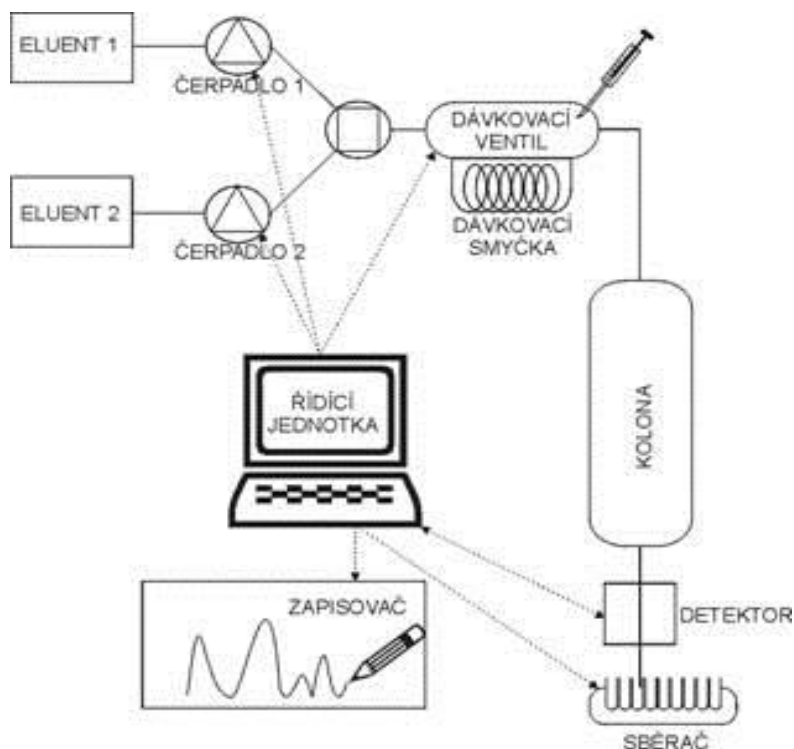
Zásobníky mobilní fáze bývají doplněny odplyňovačem, který zajistí odstranění možných plynných složek, které by mohly narušovat analýzu. Mobilní fáze jsou vedeny pomocí vysokotlakého čerpadla do směšovacího zařízení, kde dochází podle naprogramování k míchání mobilních fází na základě gradientové nebo isokratické eluce. V případě

izokratické eluce se používá jedna mobilní fáze, jejíž složení se během separace nemění, pracuje se s předem připravenou fází. Tato technika se aplikuje u látek s podobnými elučními vlastnostmi. Naopak gradientová eluce je založena na míchání mobilních fází, někdy i tří typů, a to na základě vhodných elučních parametrů analyzovaných složek. Zároveň je možné koncentrační poměry mobilních fází v průběhu analýzy měnit [60,62].

Membránová nebo pístová čerpadla zajišťují správný průtok mobilní fáze. Výhodou membránových čerpadel je jejich oddělení pístu, který obsahuje hydraulickou kapalinu, od samotného pracovního prostoru pomocí membrány, což má za následek menší nebezpečí kontaminace vzorku nebo zařízení chromatografu touto kapalinou. Pro kvalitní analýzu se zařazují za sebe dvě čerpadla, které zajišťují bezpulzní tok tak, aby fáze sání a fáze výtlačku byla v rovnováze a navazovala na sebe.

Dávkování vzorku je možné provádět dvěma způsoby. Pomocí injekční stříkačky dochází k protržení pryžového septa a aplikují se různé objemy vzorku. Přesnější a výhodnější je použití obtokového dávkovacího kohoutu, který zajistí dávkování daných množství vzorku o pevně určených objemech [62].

Další částí kapalinového chromatografu, kde probíhá již zmiňovaná separace, je náplňová kolona o vnitřním průměru 2 – 8 mm a délce 5 – 30 cm ve tvaru trubice z nerez oceli nebo borosilikátového skla. Stacionární fáze umístěná v koloně může být dvojího typu. Často je aplikována především chromatografie na reverzních neboli obrácených fázích. V tomto případě je stacionární fáze nepolárního charakteru, tzn., že na silikagel, velice často modifikovaný např. grafitem či kopolymeru styrenu, jsou navázány funkční skupiny-alkyly (oktadecyly, oktyly). Mobilní fáze bývají rozpouštědla např. methanol, tetrahydrofuran nebo acetonitril a jejich směsi s vodou. U chromatografie na normálních fázích se volí polární stacionární fáze tvořená silikagelem nebo aluminou. U separace makrolidových antibiotik se nejčastěji používají reverzní fáze, konkrétně s oktadecyl radikálem navázaným na silikagelu (např. Hypurity C18) [62,67].



Obr. č. 11: Součásti a zařízení vysokoúčinného kapalinového chromatografu [68]

2.3.4 Detekční techniky v kapalinové chromatografii

Detekce eluátu vycházejícího z kolony je založena na sledování fyzikálních vlastností (absorpci, indexu lomu, vodivosti atd.) Součástí analyzovaného vzorku je více složek, které je nutné na základě odlišných fyzikálních vlastností stanovit, a proto jsou v dnešní době kladeny vysoké nároky na analýzu stále více složitějších matic. Požadavky detektorů jsou vysoká citlivost (možná stanovení koncentrací v jednotkách až ng/l), reprodukovatelnost a linearita odezvy detektoru, zamezení kolísání odezvy v závislosti na změně mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnost detekční techniky, tj. možnost stanovení všech složek ve vzorku [60,62].

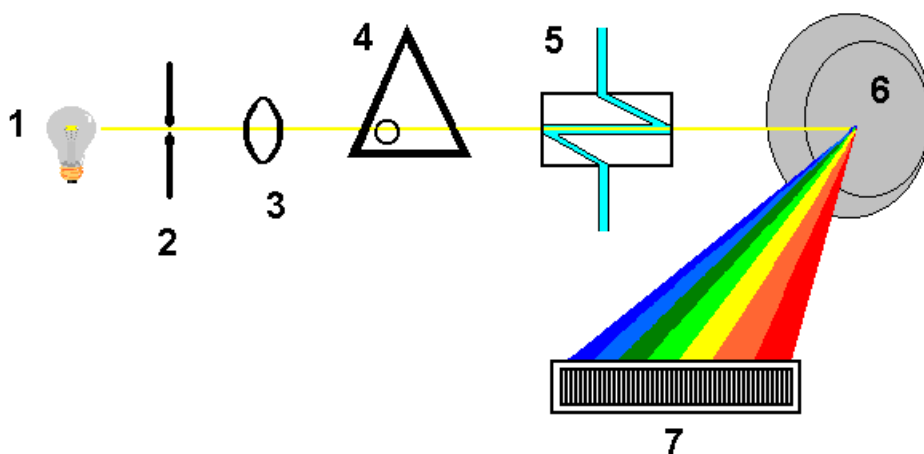
Makrolidová antibiotika se většinou v environmentálních maticích nacházejí v nízkých koncentracích a je nutné volit správnou techniku, která je schopna toto množství detekovat. U makrolidů se využívá nejčastěji spektrofotometrická detekce (UV/VIS detekce) a v případě velmi nízkých koncentrací se volí elektrochemické detektory, hmotnostní spektrometr a po vhodné derivatizaci lze použít i fluorescenční detektor [59,70,71].

2.3.4.1 Spektrofotometrické detektory

Tento typ detektorů je založen na absorpci záření eluátem protékajícího detekční celou. Základní typy těchto detektorů pracují pouze při daných vlnových délkách (220, 254, 436 nm a 546 nm), modernější detekční zařízení je schopné pracovat v rozsahu vlnových délek UV a VIS záření od 200 do 800 nm.

Nejnovější typ detektoru v této oblasti je detektor diodového pole (DAD), který se skládá z výbojky, nejčastěji deuteriové, jejíž záření je fokusováno do průtokové detekční cely. Odtud paprsek putuje na mřížku, kde dochází k jeho rozkladu. Toto široké spektrum vlnových délek dopadá na diodové pole, které je složené z několika fotodiod (početem 512 – 1024) a každá z nich je schopna zaznamenat velice úzký rozsah spektra (rozlišení od 1 do 2 nm). Nejmodernější UV/VIS spektrofotometry umožňují trojrozměrný záznam spektra a ve výsledku se můžeme setkat s 3D chromatografickým záznamem ukazujícím závislost absorbance a vlnové délky na čase. Názorné schéma spektrofotometrického detektoru je prezentováno na obr. 12 [60,62,71].

Citlivost spektrofotometrických detektorů se pohybuje v rozmezí 10^{-9} - 10^{-10} g/ml; tyto detektory se nejčastěji používají pro gradientovou eluci. Pro makrolidová antibiotika bývají velice často aplikovány, a to v rozsahu několika vlnových délek, např. 210, 220, 236 nm i 254 nm [59,69].



Obr. č. 12: UV/VIS detektor

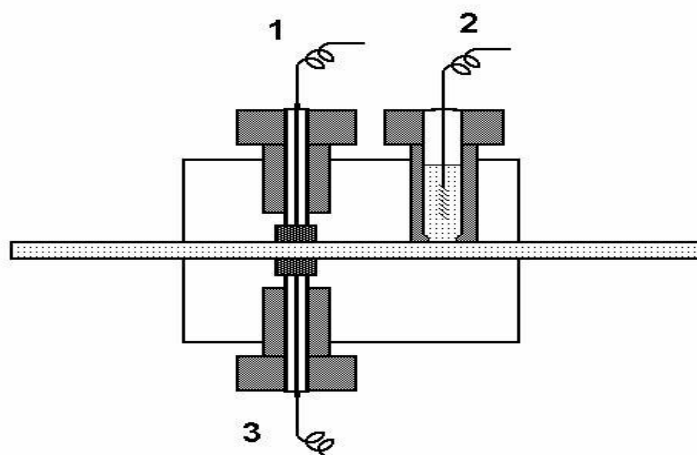
(1) zdroj záření, (2) štěrбина, (3) čočka, (4) clona, (5) měrná cela, (6) holografická mřížka, (7) diodové pole [72]

2.3.4.2 Elektrochemické detektory

Tento typ detekce je založen na měření nějaké elektrochemické veličiny, která je závislá na koncentraci analytu. Eluát prochází před průtokovou celou, kde jsou umístěny elektrody s vloženým napětím. Podle stanovované veličiny jsou nejčastěji používány coulometrické a ampérometrické detektory, kdy měříme náboj v případě coulometrických a proud u ampérometrických detekcí (viz Obr. 13) [62].

Elektrochemické detektory jsou také používány při analýze makrolidových antibiotik, avšak musí být splněno několik podmínek, které musí být v případě elektrochemické detekce dodrženy. Pro stanovení je nutné zajistit vodivost mobilní fáze, která musí být tvořena solí nebo směsí mísitelného organického rozpouštědla a vody, a která je aplikovatelná jen pro isokratickou eluci [73].

Výhodou této detekce je vysoká citlivost, tj. stanovení velmi nízkých koncentrací okolo 10^{-9} - 10^{-12} g/ml [62].



Obr. č. 13: Elektrochemický detektor

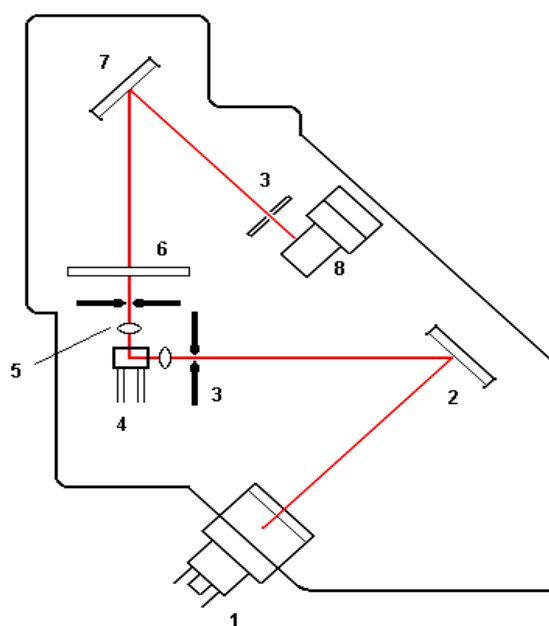
(1) pracovní elektroda, (2) pomocná elektroda, (3) referenční elektroda [74]

2.3.4.3 Fluorescenční detektor

Princip detekce pomocí fluorescence je založen na měření emisního záření, které vzniká po absorpci excitačního záření stanovovanou látkou. Konkrétně dochází k excitaci molekuly zářením za základního singletového stavu do excitovaného vibračního stavu. Absorbovaná energie je ve většině případů vyzářena jako fluorescence při dopadu molekuly zpět do základního stavu. Energie tohoto záření je stejná (rezonanční energie) nebo větší díky vibrační relaxaci [75].

Zdrojem excitačního záření bývá rtuťová, deuteriová nebo xenonová výbojka. Dále se zde nachází excitační mřížka (monochromátor), která umožní výběr pouze dané vlnové délky záření pro excitaci. Fluorescence je měřena v kolmém směru od vstupujícího záření, kde následně další difrakční (emisní) mřížka propustí záření o dané emisní vlnové délce. Jednoduché schéma funkce fluorescenčního detektoru je znázorněno na obr. 14 [60,62].

Fluorescenční detektor je velmi citlivý a selektivní, pracuje při gradientové eluci, ale jeho podmínkou je měření vzorků, které jsou schopné fluoreskovat. Pokud tuto vlastnost stanovovaná látka nemá, je nutné ji derivatizovat. Pomocí tohoto detektoru lze detekovat koncentrace i okolo hodnot 10^{-14} g/ml [62].



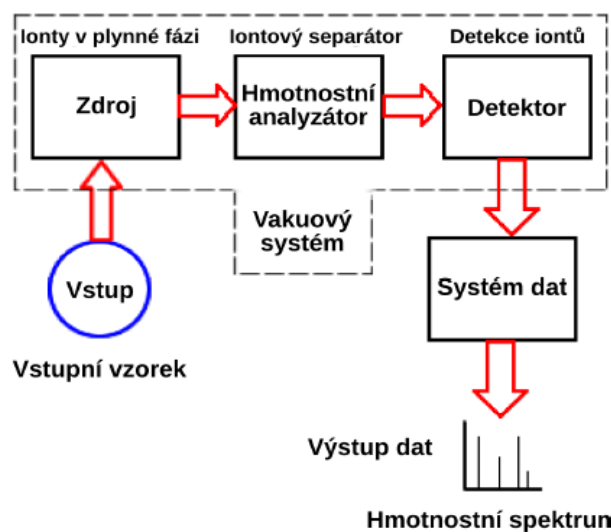
Obr. č. 14: Fluorescenční detektor

(1) výbojka, (2) excitační mřížka, (3) štěrбина, (4) cela, (5) mikročočky, (6) cut-off filtr, (7) emisní mřížka, (8) fotonásobič [75]

2.3.4.4 Hmotnostní spektrometr

Zájem o analýzu vzorku pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií nestále stoupá především z důvodu velmi vysoké citlivosti. Tato technika dokáže stanovovat koncentrace i v hodnotách ng/l. Často se můžeme setkat s tandemovým zapojením, tj. LC-MS-MS [76].

Principem hmotnostní spektrometrie je kvalitativní i kvantitativní analýza, která je založena na ionizaci a následné separaci analyzovaných složek podle poměru hmotnosti ku náboji m/z [60].



Obr. č. 15: Hmotnostní detektor a jeho uspořádání [77]

Vzorek vstupující do hmotnostního spektrometru je třeba přeměnit na ionty v iontovém zdroji, ze kterého putují do analyzátoru. Iontové zdroje se rozlišují především podle skupenské formy látky, která je stanovována:

- Pevné skupenství – technika MALDI
- Kapalné látky – elektrosprej, termosprej
- Plynné skupenství – elektronová a chemická ionizace

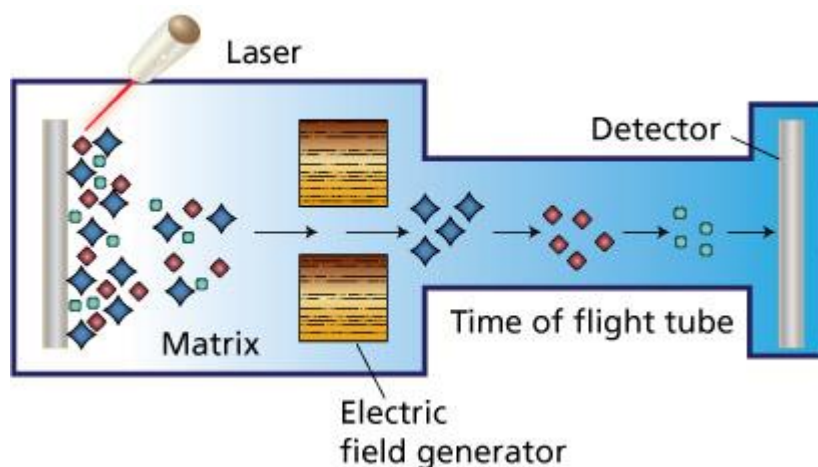
Dále je možné setkat se s jinými, méně obvyklými technikami ionizace, mezi které patří desorpce plazmou (PD), desorpce laserem (LD), ionizace desorpčí polem (FD), ionizace elektrickým polem (FI), ionizace bombardováním rychlými atomy (FAB).

Ionty dále putují do analyzátoru, kde dochází k jejich separaci podle poměru m/z . Mezi nejčastěji používané techniky patří iontová past, kvadrupól, ale také i analyzátor doby letu (TOF - time-of-flight) [78].

Kvadrupól je tvořen čtyřmi tyčemi, dvěma paralelními páry, hyperbolického nebo častěji kruhového tvaru, které jsou zapojeny na střídavé a stejnosměrné napětí a jejich propojení je nastaveno tak, aby vždy dvě protilehlé měly stejný potenciál. Ionty směřující z iontového zdroje v kvadrupólovém analyzátoru oscilují a v závislosti na určitém poměru střídavého a stejnosměrného napětí procházejí pouze dané ionty podle poměru m/z . Ostatní ionty zůstanou v analyzátoru nebo se uchytí a vybijí na tyčích.

Iontová past je složitějším typem kvadrupólu. Skládá se z tří elektrod, dvě koncové a jedna středová. Na středovou prstencovou elektrodu je nastavené vysokofrekvenční napětí se střídavou amplitudou, naproti tomu krajní elektrody jsou uzemněny. Jakmile ionty z iontového zdroje vstoupí do pasti, začnou se pohybovat po kružnici a se zvyšující se amplitudou napětí se změní jejich směr pohybu a lehčí ionty opustí komoru a narazí na detektor, který provede záznam.

Na jednoduchém principu pracuje analyzátor doby letu (TOF). Stále produkované kladné ionty jsou urychlovány a v prázdné trubici se separují podle doby, za kterou doletí k detektoru na základě platnosti kinetické energie, tj. lehčí ionty jsou rychlejší a dorazí k detektoru dříve než těžší [60,78].



Obr. č. 16: Spojení MALDI-TOF [79]

Po separaci následuje detekce; v případě hmotnostní spektrometrie se používají elektronový násobič, fotonásobič a Faradayova cela. Princip elektronásobiče je založen na několikanásobném zesílení původního signálu. Kladně nabitě ionty dopadají na dynodu, z níž uvolněné elektrony jsou urychlovány potenciálovým spádem směrem k další dynodě.

Zásadním problémem při používání hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií je jejich spojení, jelikož MS pracuje za podmínek vysokého vakua a analyty vystupující z LC jsou uvolňovány za atmosférického tlaku. Vznikem a nástupem měkkých ionizačních technik, jako jsou elektrosprej, termosprej a chemická ionizace za atmosférického tlaku, došlo k vyřešení dané problematiky spojením dvou přístrojů pro vynikající analýzu [78].

Konkrétně v případě makrolidových antibiotik se často používá elektrosprej jako ionizační technika, LC-(ESI)-MS v pozitivním módu [80].

2.3.5 Porovnání HPLC a UHPLC

Hlavním důvodem vzniku nových trendů v kapalinové chromatografii je především snaha nejen dosáhnout zvýšení účinnosti a rozlišení, ale také citlivosti. S tím byly velice často spojeny komplikace ohledně vysokých tlaků a řady dalších limitujících komplikací analýzy. První komerční ultra-vysokoúčinný kapalinový chromatograf vznikl tedy až v roce 2004.

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) využívá separace pomocí menších částic než 2 μm (sub-2-microne particles) a tím se dosahuje zvýšení separace. Zmenšení velikosti částic způsobuje nutnost použití vysokých tlaků. Pro UHPLC je zapotřebí okolo 100 MPa. Vedle těchto požadavků vyžaduje UHPLC také použití velkého čerpadla a dávkovacího zařízení s rychlými nástřiky velmi malých objemů, malé zpoždění gradientu (gradient volume delay) a mimokolonové objemy, vhodné stacionární fáze a vysokou frekvenci sbírání dat. Jedním z hlavních požadavků je stabilní stacionární fáze, která má vysokou chemickou a mechanickou stabilitu. Velikosti částic stacionární fáze se pohybují mezi hodnotami od 1,5 do 2 μm a délka kolony od 50 do 150 mm, s vnitřním průměrem okolo 2,1 mm. Pro výplň se využívají porézní i povrchově porézní částice.

S rozměrem částic souvisí vliv na parametr C ve Van Deemterově rovnici, kde je jeho hodnota na druhou mocninu. Díky tomu lze dosáhnout lepší rozlišení píků, účinnosti a zkrácení doby analýzy [62].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Použité chemikálie

Pro přípravu vzorků a při vlastním měření byly použity následující chemikálie:

- Acetonitril, for HPLC (far UV, gradient grade), Fischer Scientific spol. s.r.o., Pardubice
- Methanol, absolute LC/MS, Biosolve, Nizozemsko
- Octan amonný p.a., Fluka, Sigma-Aldrich GmbH, SRN
- Kyselina mravenčí p.a., Riedel de Haen, Sigma Aldrich GmbH, SRN
- Mravenčan amonný, Penta s.r.o., Praha
- Plyn: Dusík 4,7; Linde technoplyn a.s.
- Voda (for HPLC, gradient grade), Fischer Scientific, UK
- Milli Q voda (ultračistá)

Pro přípravu standardních roztoků léčiv byly využívány tyto látky:

- Erythromycin, Sigma-Aldrich, SRN
- Clarithromycin, for HPLC, $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, SRN

3.2 Přístroje a zařízení

Veškerá měření a vyhodnocení výsledků vzorků modelových a reálných byla prováděna na přístrojích uvedených níže:

- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, USA s těmito součástmi:
 - Kolona Kinetex 2.6u, C18, 100A, Agilent USA (rozměry: 150 mm x 3 mm, vel. částic 2,6 μm)
 - Detektor DAD 1100 Series Agilent, USA (zdroj světla: wolframová a deutriová lampa, 1024 fotodiod, šířka štěrby: 1-6 nm (programovatelná), vlnový rozsah: 190-950 nm)
 - Hmotnostní spektrometr Agilent, 6320 Series (Ion Trap LC/MS)
 - Infuzní pumpa kdS 9100, kdScientific, USA
- SPE Extraktor, Baker, model SPE-12 G (membránová vývěva KIF LAB, Laboport Maneko, Czech Republic)
- SPE kolonky, Oasis HLB, Cartridge Waters, USA
- Vybavení pro sušení dusíkem Evapoterm, Labicom, Czech Republic
- Analytické váhy HR-120-EC, A&D Instruments, Japonsko
- pH metr InoLab WTW Series Maneko, Czech Republic
- Přístroj pro přípravu milli Q vody Millipore QGARD
- Běžné laboratorní vybavení

Naměřená data byla vyhodnocována a zpracována pomocí následujících programů a příslušných softwarů:

- Microsoft Office Word 2010
- Microsoft Office Excel 2010
- HP ChemStation pro LC/MS, Rev. B.01.03, Agilent, USA

- DataAnalysis for 6300 Series Ion Trap LC/MS (version 4.0, Bruker Daltonik GmbH)
- QuantAnalysis for 6300 Series Ion Trap LC/MS (version 2.0, Bruker Daltonik GmbH)

3.3 Vlastnosti sledovaných analytů

Erythromycin

- Sumární vzorec $C_{37}H_{67}NO_{13}$
- Struktura: vícečlenný laktonový kruh s glykosidicky vázaným cukrem
- Molekulová hmotnost $M_r = 733,93$
- Vlastnosti: bílý až mírně nažloutlý prášek, obtížně rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, ethanolu i acetonitrilu

Clarithromycin

- Sumární vzorec $C_{38}H_{69}NO_{13}$
- Struktura: obdobná erythromycinu, pouze jeden vodík z OH skupiny na laktonovém kruhu je nahrazen CH_3 skupinou
- Molekulová hmotnost $M_r = 747,95$
- Vlastnosti: bílý krystalický prášek téměř nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu i acetonitrilu.

3.4 Reálné vzorky vody

Naší sledovanou maticí byly vzorky pitné vody pocházející ze dvou zdrojů. Prvním zdrojem pitné vody bylo jímací území prameniště Černovír Olomouc. Reálné vzorky z druhého zdroje byly odebírány z jímacího zařízení Litovel. Lokalizace těchto odběrových míst je uvedena v příloze č. 1, 2.

Všechny odběry těchto matic byly prováděny pod záštitou společnosti Moravská vodárenská a.s, Veolia Olomouc.

3.5 Postupy stanovení analytů

3.5.1 Odběry vzorků

Vzorky pitné vody byly odebírány po dobu 10 dní, tj. od 7.7.2014 do 11.7.2014 a od 14.7. 2014 do 18.7. 2014. K odběru vzorků byly vybrány již zmíněné dvě lokality, jímací území Litovel a prameniště Černovír. Odběr vzorku byl prováděn každý den vždy ve stejnou dobu do tmavých skleněných vzorkovnic s objemem 1 litr. Tyto odebrané vzorky byly uchovávány v lednici při teplotě $4^{\circ}C$ a zpracování vzorků proběhlo nejpozději do 24 hodin od odběru.

3.5.2 Úprava vzorků sledovaných analytů a jejich izolace

Protože vzorky pitné vod neobsahují suspendované částice, které by bylo nutné odstranit filtrací, nebylo zapotřebí tuto techniku používat.

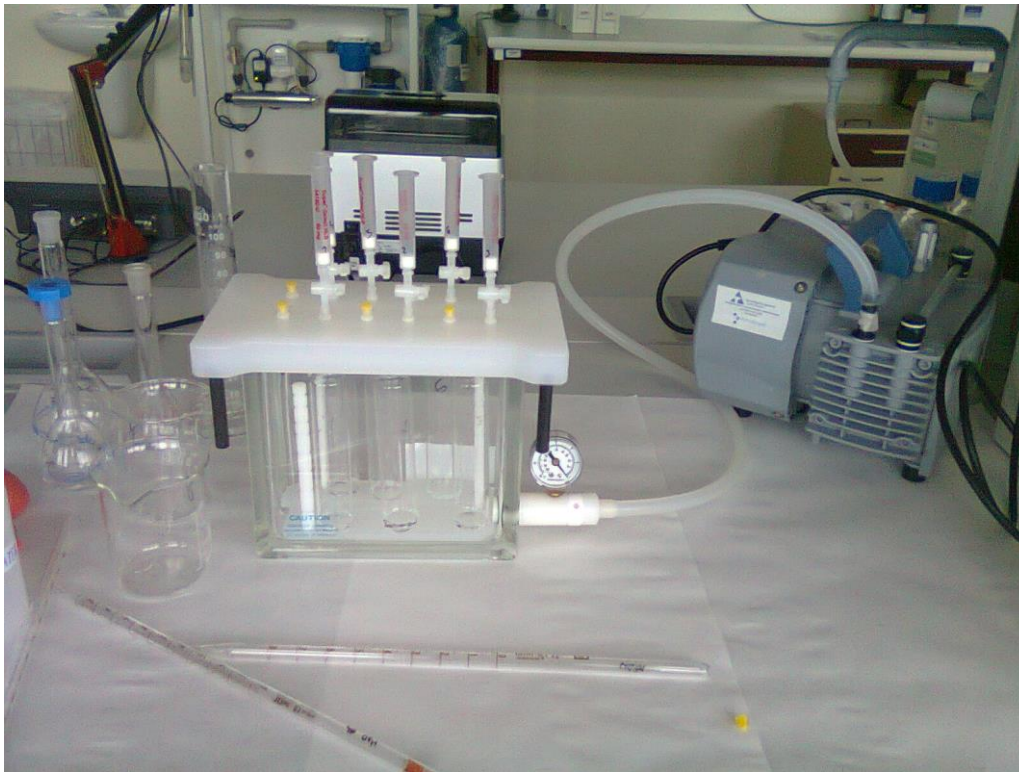
Izolace analytů byla prováděna pomocí extrakce tuhou fází a na základě optimalizací byl vybrán postup, který je uveden v tabulce 2. Pro extrakci byly použity kolonky typu Oasis HLB a postup byl vždy opakován nejméně třikrát. Pro každou izolaci sledovaných analytů bylo vždy použito 300 ml vzorků pitné vody.

Tabulka 2: Zvolený vhodný postup pro izolaci analytů pomocí SPE (Oasis HLB)

aktivace kolonky	5 ml methanolu
	5 ml miliQ vody okyselené kyselinou mravenčí (pH = 2)
nanesení vzorku	300 ml vzorků vody
promytí kolonky	5 ml milli Q vody
vysušení kolonky	proud vzduchu
eluce analytů	10 ml methanolu
proces zakoncentrování	sušení proudem dusíku
	rozpuštění v 1 ml acetonitrilu



Obr. č. 17: SPE - Nanesení reálných vzorků vody



Obr. č. 18 SPE – eluce stanovovaných analytů

3.5.3 Identifikace a kvantifikace sledovaných analytů

Analýza veškerých vzorků byla prováděna na přístroji uvedeném na obr. 19. Jedná se o vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series. Pro separaci byla použita kolona Kinetex 2.6 μ , C18. Identifikace analytů byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru s ionizací elektrosperejem (ESI) a iontovou pastí jako analyzátozem. Jednotlivé analyty vyznačující se svými molekulovými ionty byly kvantifikovány pomocí metody kalibrační křivky.

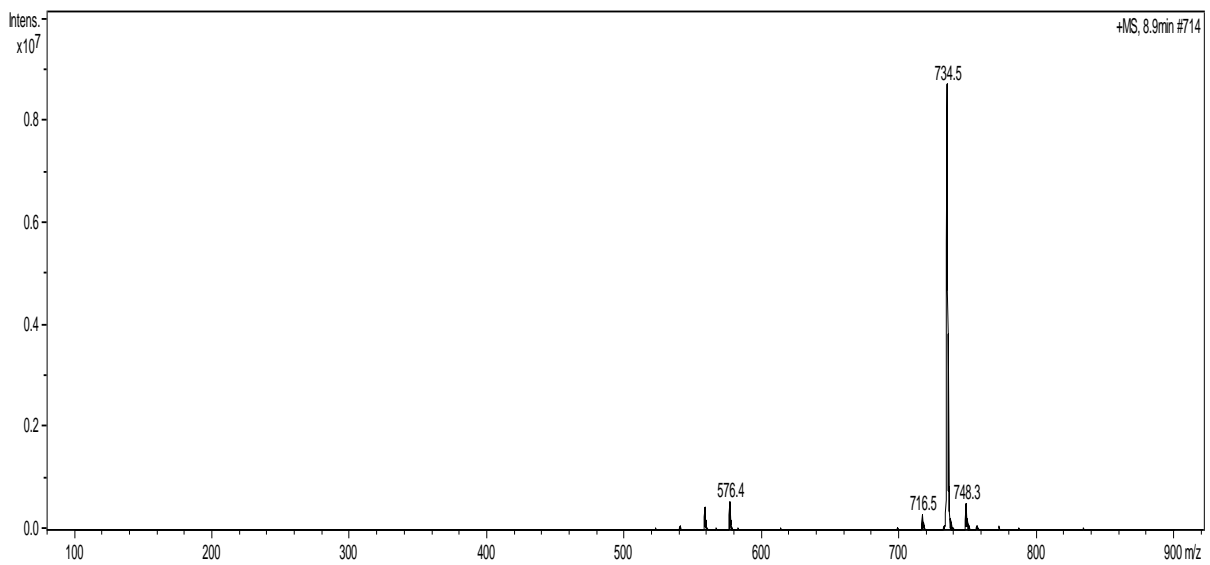
Pro sledované analyty byla proměřena hmotnostní spektra, uvedené na obr. 20, 21, pomocí metody přímého nástřiku.



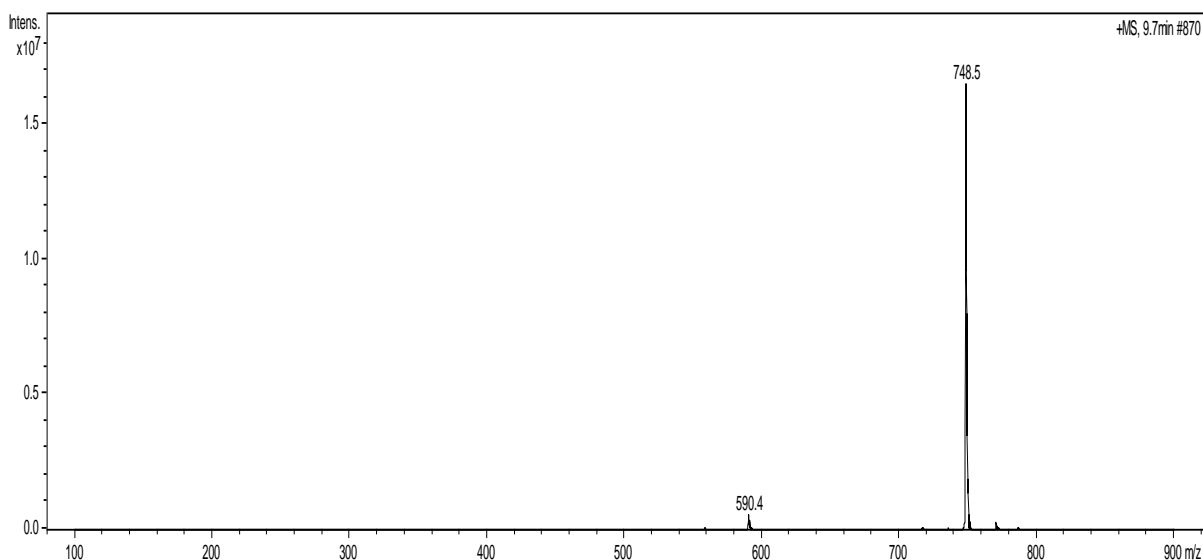
Obr. č. 19 Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent 6320 Series (LC/MS)

Tabulka 3: Parametry daných analyzovaných složek

analyt	m/z	Retenční čas (min)
erythromycin	734,5	8,9
clarithromycin	748,5	9,7



Obr. č. 20: Hmotnostní spektrum erythromycinu



Obr. č. 21: Hmotnostní spektrum clarithromycinu

3.5.4 Optimalizované podmínky pro LC/MS analýzu

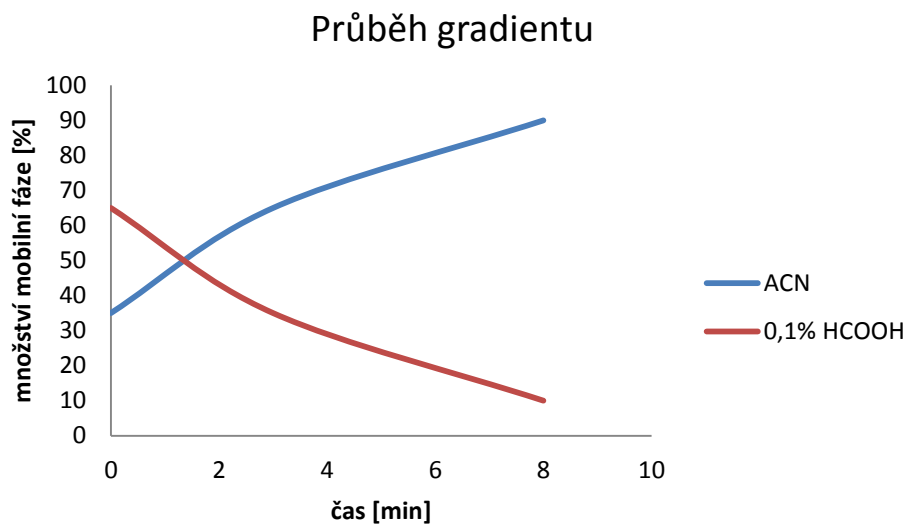
Pro stanovení sledovaných analytů bylo nutné zvolit optimální podmínky. Na základě pilotních studií byla použita kolona Kinetex 2.6u, C18, 100A s rozměry 150 mm x 3 mm a velikostí částic 2,6 μm . Optimalizace chromatografických podmínek je uvedena v tabulce 4 s průběhem gradientu v tabulce 5 a na obrázku č. 22. Optimální podmínky použité pro práci na hmotnostním spektrometru jsou prezentovány v tabulce 6.

Tabulka 4: Chromatografické podmínky

nástřik vzorku	5 μl
teplota kolony	30°C
mobilní fáze	acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí
typ eluce	gradientová (viz tab. 5)
průtok mobilní fáze	0,1 ml/min
doba analýzy sledovaných analytů	15 min
celková doba analýzy	12 min

Tabulka 5: Gradient mobilní fáze

Čas (min)	Acetonitril (%)	0,1% kyselina mravenčí (%)
0	35	65
3	65	35
8	90	10



Obr. č. 22: Průběh gradientu mobilní fáze v grafickém znázornění

Tabulka 6: Podmínky hmotnostního spektrometru

tlak zmlžovače	20 psi
teplota sušícího plynu	350°C
průtok sušícího plynu	10 l/min
napětí na kapiláře	3500 V
rozsah skenu (molekulových hmot)	100-900 m/z
ionizační mód	Pozitivní

4 Výsledky a diskuze

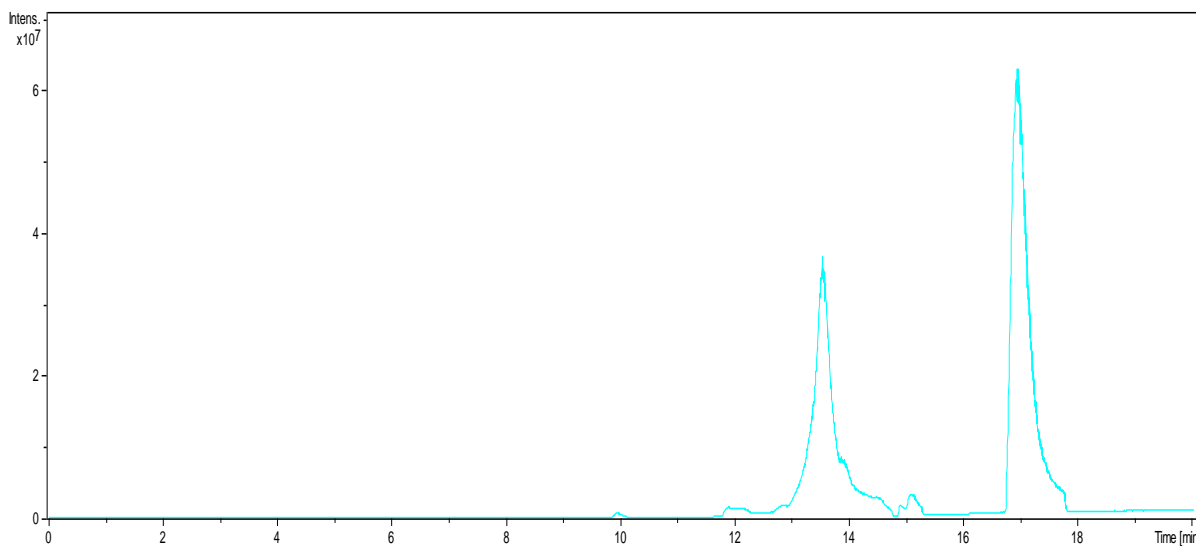
4.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Pro analýzu makrolidových antibiotik bylo nutné optimalizovat celý proces měření a získat tak vhodné podmínky pro jejich stanovení v reálných vzorcích. Tato optimalizace byla prováděna nejprve na modelových vzorcích vody. Zahrnovala výběr vhodného rozpouštědla pro sledované analyty, určení vhodné mobilní fáze, optimalizaci teploty a množství nástřiku. Jelikož reálné vzorky bylo nutné přechistit a zakoncentrovat, optimalizace byla směřována také na výběr vhodného postupu pro extrakci tuhou fází.

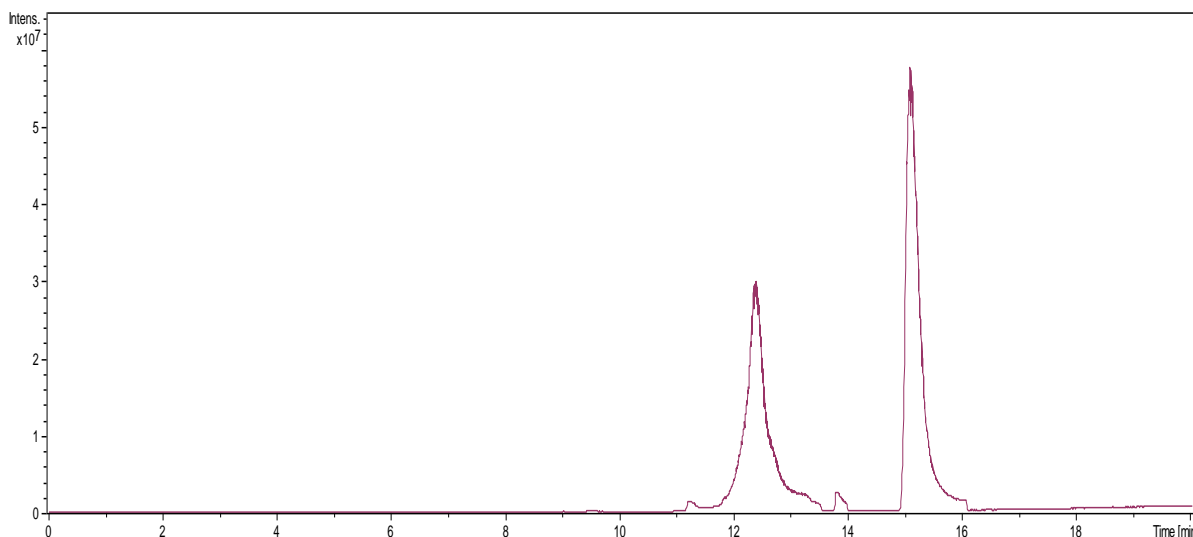
4.1.1 Výběr rozpouštědla pro standardní roztoky

Protože makrolidová antibiotika jsou nerozpustná ve vodě, bylo třeba určit vhodné rozpouštědlo pro přípravu standardních roztoků makrolidů. Pro tyto účely byla zvolena dvě rozpouštědla, methanol a acetonitril, které jsou zároveň vhodné pro použití při následné analýze metodou LC/MS. Také bylo ověřováno okyselení rozpouštědla pomocí 0,1% kyseliny mravenčí, což však nevedlo k žádné výrazné změně. Naopak nejlepší tvary píků byly získány při použití čistého rozpouštědla bez přídavku.

Na základě provedených analýz byl acetonitril vybrán jako vhodnější organické rozpouštědlo pro přípravu standardů, a to především z důvodu dosažených kratších retenčních časů. Pro tato měření byly připraveny modelové vzorky o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ rozpuštěním směsi makrolidových antibiotik.



Obr. č. 23: Celkový iontový chromatogram (TIC) makrolidových antibiotik (model. vzorek, konc. 10 $\mu\text{g/ml}$) rozpuštěných v methanolu



Obr. č. 24: Celkový iontový chromatogram (TIC) makrolidových antibiotik (model. vzorek, konc. 10 $\mu\text{g/ml}$) rozpuštěných v acetonitrilu

4.1.2 Výběr vhodné mobilní fáze

V případě optimalizace chromatografických podmínek je jedním z klíčových kroků určení vhodné mobilní fáze. Bylo vyzkoušeno několik typů mobilních fází:

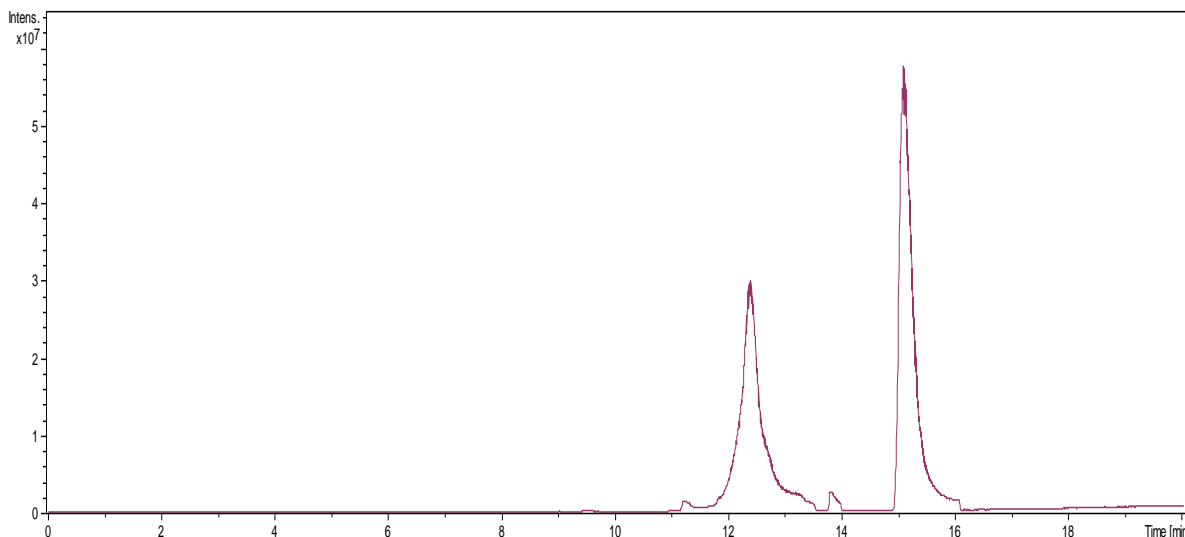
- acetonitril s octanem amonným
- acetonitril s mravenčanem amonným
- acetonitril s kyselinou mravenčí

Přesné složení připravovaných mobilních fází jsou uvedeny v tabulce 7.

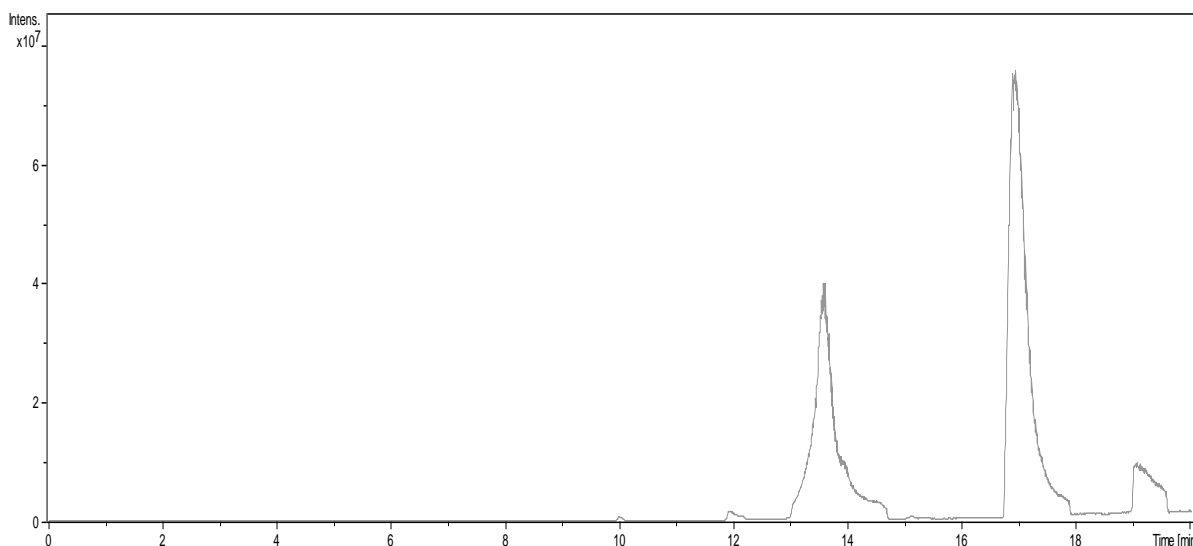
Po ověření vhodnosti těchto typů mobilních fází byla zvolena jako nejvhodnější směs acetonitril s kyselinou mravenčí, protože při této separaci měla makrolidová antibiotika nejlepší tvar píků, byla dobře odseparována a také bylo při analýze dosaženo nejnižších retenčních časů.

Tabulka 7: Použité mobilní fáze

Složka A	Složka B
acetonitril	10 mM octan amonný
	5 mM octan amonný
	10 mM mravenčan amonný
	5 mM mravenčan amonný
	1% kyselina mravenčí
	0,1% kyselina mravenčí

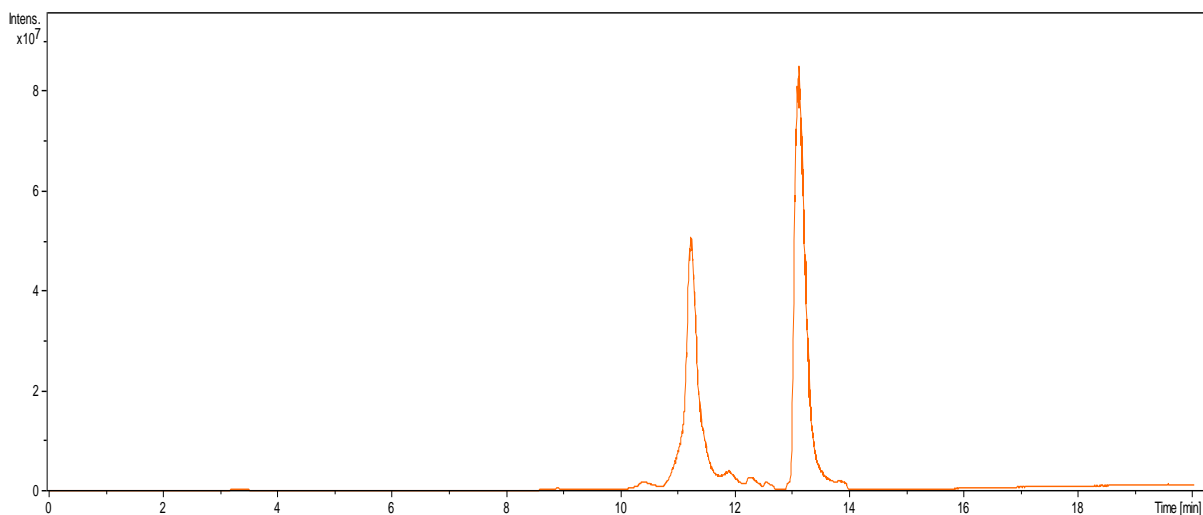


Obr. č. 25: Celkový iontový chromatogram modelového vzorku makrolidových antibiotik připravených v acetonitrilu, použitá mobilní fáze, 10 mM octan amonný



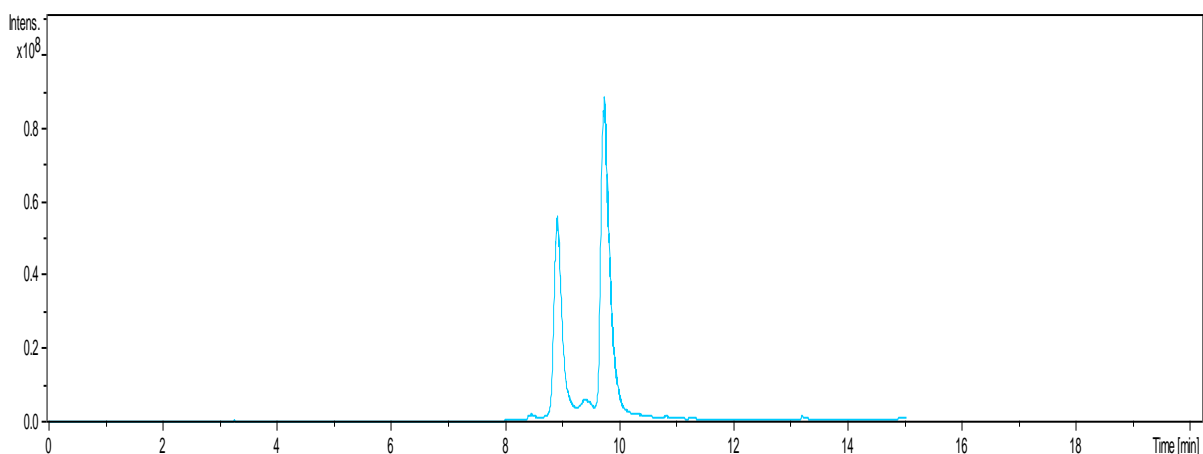
Obr. č. 26: Celkový iontový chromatogram makrolidových antibiotik (model. vzorek) rozpuštěných v acetonitrilu, použitá mobilní fáze: 5 mM octan amonný

V prvních experimentech byla použita kombinace mobilní fáze acetonitril s octanem amonným. Na první pohled je možné vidět výrazné rozdělení píků makrolidových antibiotik. V případě octanu amonného byly zvoleny dvě odlišné koncentrace, 5 a 10 mM. Z uvedených grafů lze vidět, že s klesající koncentrací došlo k posunutí retenčních časů analyzovaných makrolidových antibiotik. U 10 mM octanu amonného bylo možné erythromycin detekovat již ve 12-té a clarithromycin v 15-té minutě, naproti tomu v případě použití 5 mM octanu amonného se jednalo o minimální posun v retenčním čase (okolo 1 minuty).



Obr. č. 27: Celkový iontový chromatogram model. vzorku makrolidových antibiotik rozpuštěných v acetonitrilu, použitá mobilní fáze: 10 mM mravenčan amonný

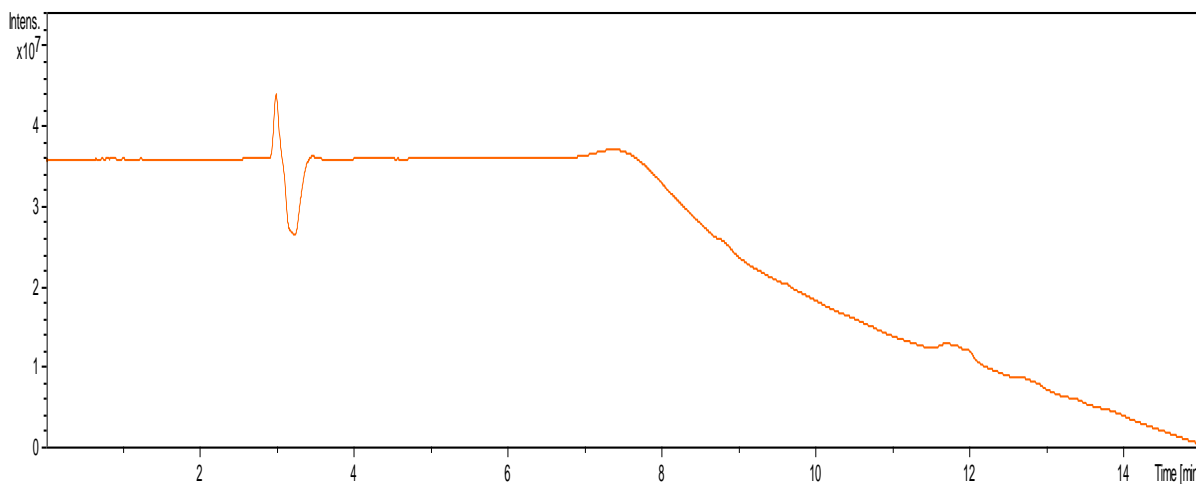
Následující volba mobilní fáze tvořené směsí acetonitrilu s mravenčanem amonným vedla ke zlepšení separace a ke zkrácení retenčních časů detekce makrolidových antibiotik. Byl studován koncentrační vliv mravenčanu amonného na změnu separačních podmínek. V tomto případě se výsledné chromatogramy nelišily, případně vykazovaly pouze minimální odchylky. Erythromycin byl detekován v retenčním čase 10,7 minut a clarithromycin ve 13 minutě. Tato mobilní fáze byla posouzena jako jedna z vhodných pro analýzu makrolidových antibiotik.



Obr. č. 28: Celkový iontový chromatogram modelového vzorku makrolidových antibiotik připravených v acetonitrilu, použitá mobilní fáze 0,1% kyselina mravenčí

Následující volba a kombinace acetonitrilu a kyseliny mravenčí s přidavkem 0,1% a 1% umožnila detekci makrolidových antibiotik. Lepším výsledkům bylo dosaženo u nižší koncentrace kyseliny mravenčí, u vyšší koncentrace bylo pozorováno mírné rozmytí píků. Také došlo k malým změnám v porovnání s předcházející mobilní fází. Tvar píků se v dolní

části mírně zúžil v případě obou analyzovaných složek a zároveň se retenční čas u jednotlivých analytů přiblížil na rozdíl půl minuty. Retenční časy se při použití této mobilní fáze byl u erythromycinu 8,9 minut a u clarithromycinu 9,7 minut. Tato mobilní fáze (ACN + 0,1% HCOOH) byla také posouzena jako vhodná pro analýzu námi zvolených makrolidových antibiotik, a to zejména vzhledem k nižším retenčním časům než byly časy u předcházející mobilní fáze, acetonitril a mravenčan amonný (ACN + 10 mM HCOONH_4).



Obr. č. 29: Chromatogram modelového vzorku makrolidů rozpuštěných v acetonitrilu, použitá mobilní fáze: 0,1% kyselina mravenčí, rozsah vlnových délek 190-400 nm

Na obrázku č. 29 je pro ukázkou znázorněn chromatogram, kde byl pro analýzu použit detektor diodového pole s rozsahem vlnových délek 190-400 nm. Při měření na DAD nebylo dosaženo kladných výsledků. Pro zvolené vlnové délky, tj. u erythromycinu 215 nm a u clarithromycinu 275 a 288 nm, nevykazovaly makrolidová antibiotika žádnou odezvu. Naše výsledky byly v souladu s publikací, ve které bylo uvedeno, že makrolidy neobsahují vhodný chromofor, který by umožňoval detekci pomocí UV-VIS DAD detektoru [59]. Pro kontrolu byla vždy detekce prováděna nejen pomocí hmotnostního spektrometru, ale také detektoru diodového pole. V tomto případě bylo prokázáno, že tento detektor neumožňuje stanovení makrolidových antibiotik.

4.1.3 Optimalizace průběhu gradientu

Bylo ověřováno několik typů mobilních fází s různými typy gradientů. Pro porovnání jsou znázorněny tři typy gradientů, které jsou z hlediska rozdělení a odezvy analyzovaných složek, retenčních časů a tvarů píků analyzovaných léčiv nejvhodnější. Průběhy vybraných gradientů jsou prezentovány v tabulkách 8, 9, 10, s grafickým znázorněním vybraných celkových iontových chromatogramů na obrázcích 30, 31, 32 a 33. Protože předtím provedené experimenty umožnily výběr vhodné mobilní fáze, byly gradientové závislosti testovány pro dva typy mobilních fází, tj. acetonitril (složka A) s kyselinou mravenčí (složka B) a acetonitril s mravenčanem amonným (složka B). Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití gradientu uvedeného v tabulce 10 a pro názornost zobrazeno na obrázku č. 32 a 33.

Tabulka 8: Průběh gradientu mobilní fáze – č. 1

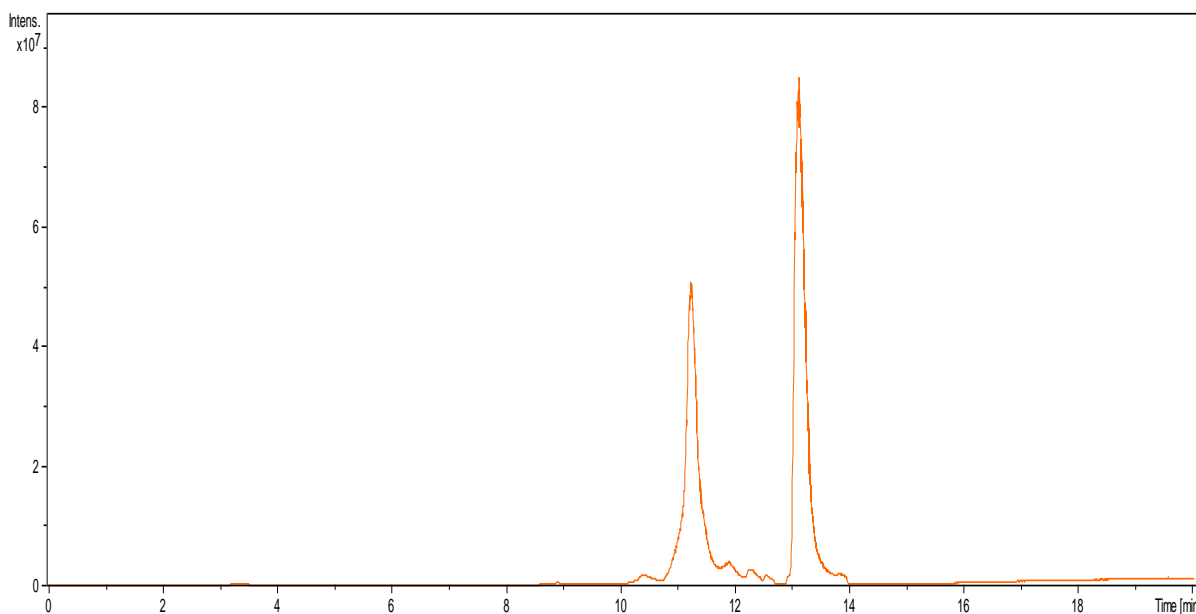
Čas (min)	Složka A mobilní fáze (%)	Složka B mobilní fáze (%)
0	25	75
3	55	45
10	90	10

Tabulka 9: Průběh gradientu mobilní fáze – č. 2

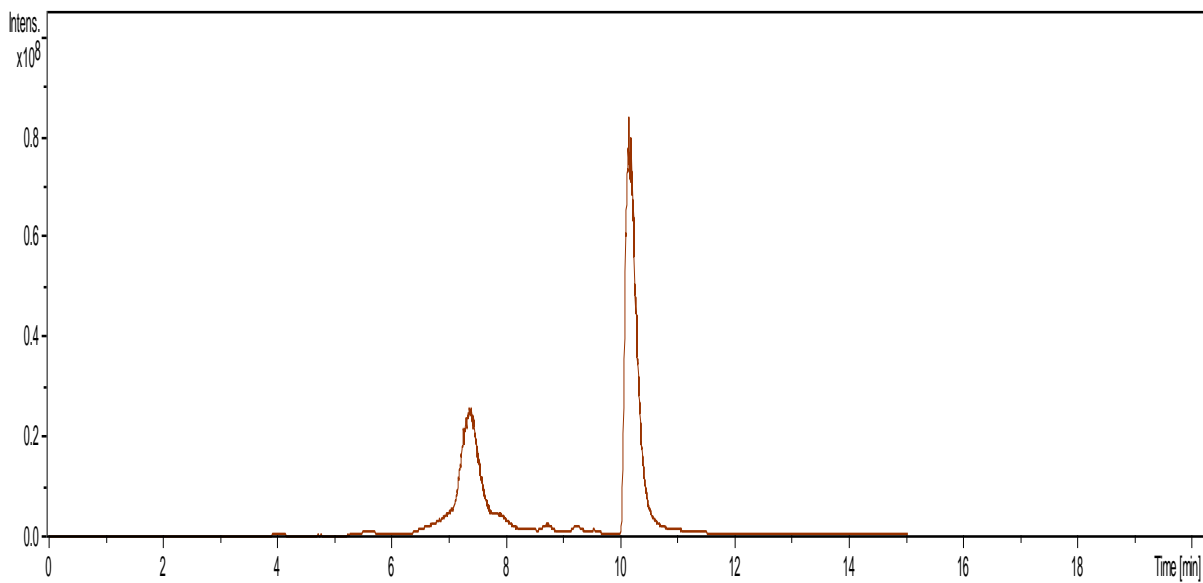
Čas (min)	Složka A mobilní fáze (%)	Složka B mobilní fáze (%)
0	40	60
3	60	40
7	90	10

Tabulka 10: Průběh gradientu mobilní fáze – č. 3

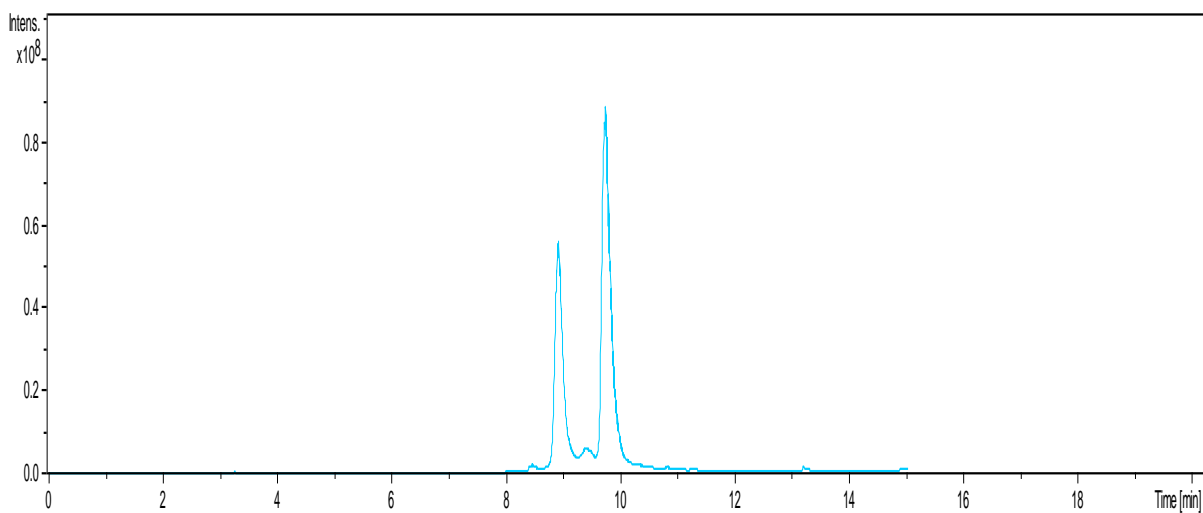
Čas (min)	Složka A mobilní fáze (%)	Složka B mobilní fáze (%)
0	35	65
3	65	35
8	90	10



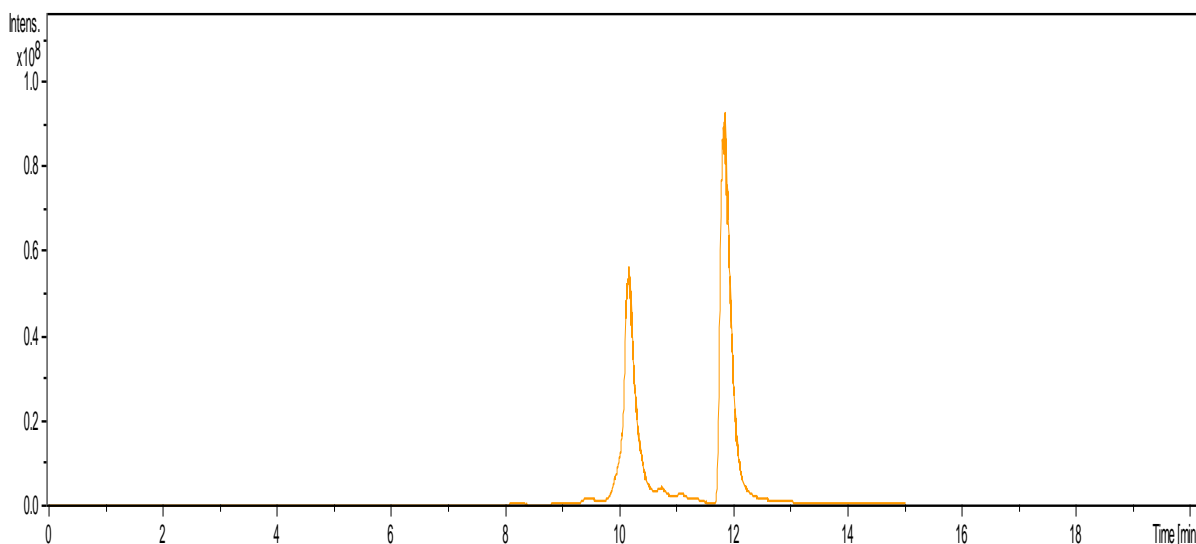
Obr. č. 30: Celkový iontový chromatogram (TIC) makrolidových antibiotik pro gradient č. 1 a mobilní fáze v kombinaci s 10 mM mravenčanem amonným



Obr. č. 31: Celkový iontový chromatogram (TIC) makrolidových antibiotik pro gradient č. 2 a mobilní fázi s 0,1% kyselinou mravenčí



Obr. č. 32: Celkový iontový chromatogram (TIC) makrolidových antibiotik pro gradient č. 3 a mobilní fázi s 0,1% kyselinou mravenčí

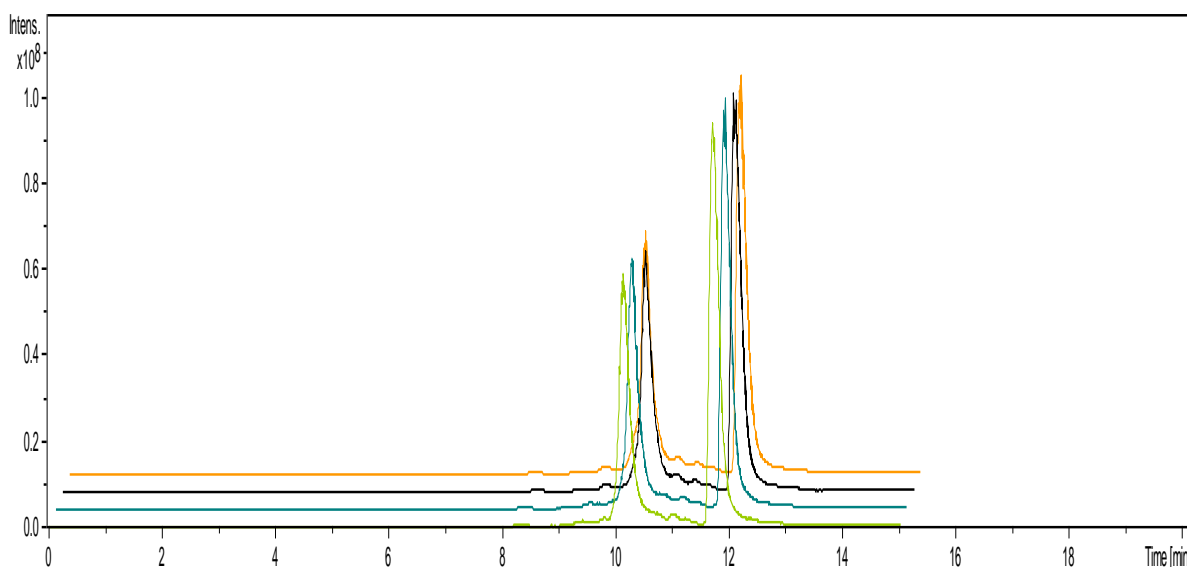


Obr. č. 33: Celkový iontový chromatogram (TIC) makrolidových antibiotik pro gradient č. 3 a mobilní fáze v kombinaci s 10 mM mravenčanem amonným

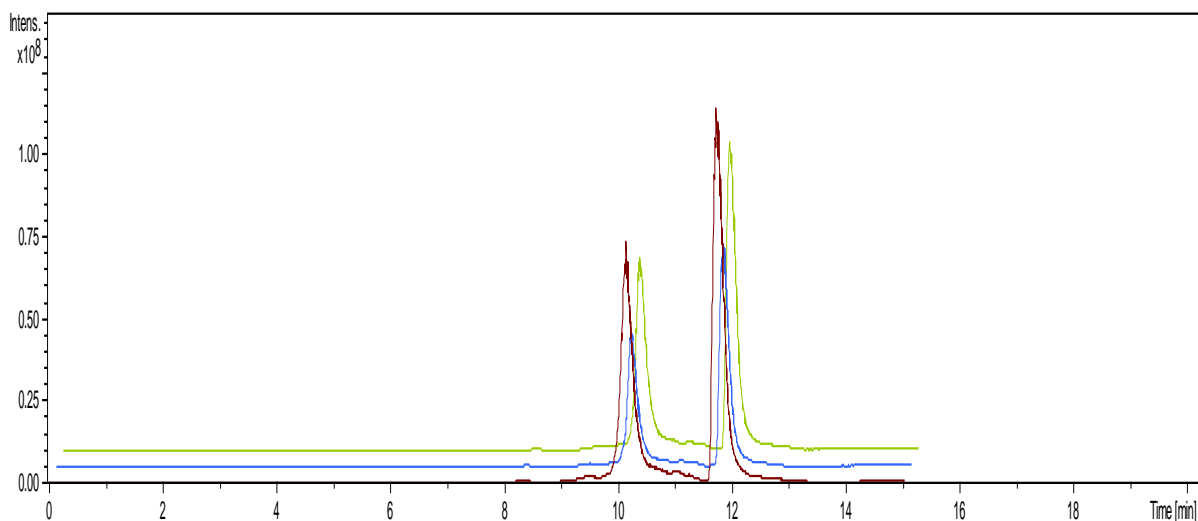
4.1.4 Optimalizace teploty a nástřiku

Teplota i objem nástřiku patří mezi další parametry, které ovlivňují především retenční čas jednotlivých analytů. Analýza byla prováděna při teplotách 20, 25, 30, 40°C. Při měření byly detekovány minimální změny retenčních časů i tvary píků sledovaných analytů. Závislosti a vliv různých teplot je znázorněn na obrázku č. 34.

Objem nástřiku může nejvíce ovlivnit především odezvu a tvar píků. Byly zvoleny nástřiky o objemu 3 μl , 5 μl a 7 μl . Tvar píků při různých objemech nástřiků se prakticky nelišil, pouze odezva nabývala odlišných hodnot. Nejvyšší odezvy bylo dosaženo při nástřiku 5 μl . Z tohoto důvodu byl tento objem vybrán jako optimální pro další analýzy. Výsledné chromatogramy s různými volbami nástřiku jsou uvedeny na obrázku č. 35.



Obr. č. 34: Celkový iontový chromatogram (TIC) makrolidových antibiotik při teplotách 20°C (zelená křivka), 25°C (modrá křivka), 30°C (černá křivka), 40°C (oranžová křivka)



Obr. č. 35: Celkový iontový chromatogram (TIC) makrolidových antibiotik při nástřiku 5 μ l (fialová křivka), 3 μ l (modrá křivka), 7 μ l (zelená křivka)

4.2 Optimalizace podmínek extrakce tuhou fází (SPE)

Protože výskyt makrolidových antibiotik se ve zdrojích pitných vod pohybuje v minimálních nebo velmi nízkých koncentracích, bylo nutné zvolit a ověřit optimální techniku izolace analytů pomocí extrakce tuhou fází. Optimalizace zahrnovala použití modelových vzorků vody, které byly vždy připraveny přidáním objemu 1 ml směsného standardního roztoku makrolidových antibiotik v acetonitrilu o koncentraci 1 μ g/ml do 200 ml milli Q vody. Připravené analyty byly aplikovány na kolonky Oasis HLB SPE, které byly na základě literatury vybrány jako nejvhodnější. Nejprve bylo prověřeno šest různých postupů vhodných pro izolaci makrolidů. Následně byl vybrán postup, u kterého byla zjištěna největší výtěžnost, testován deseti modelovými vzorky pro jeho ověření a vypočtení statistických parametrů izolace analytů.

4.2.1 Vybrané postupy SPE

Pro kolonky Oasis HLB byly ověřovány postupy, které jsou prezentovány v tabulkách 11, 12 a 13. Postupy se liší typem rozpouštědla, použitým pro aktivaci kolonky a také jinými způsoby eluce analytů.

Tabulka 11: Zkoušený postup SPE č. 1, 2

	postup č. 1	postup č. 2
aktivace kolonky	5 ml methanolu	5 ml methanolu
	5 ml milli Q vody okyselené kyselinou mravenčí (pH = 2)	5 ml milli Q vody
nanesení vzorku	300 ml vzorků vody	300 ml vzorků vody
promytí kolonky	5 ml milli Q vody	5 ml milli Q vody
vysušení kolonky	proud vzduchu	proud vzduchu
eluce analytů	10 ml methanolu	10 ml methanolu
proces zakoncentrování	sušení proudem dusíku	sušení proudem dusíku
	rozpuštění v 1 ml acetonitrilu	rozpuštění v 1 ml acetonitrilu

Tabulka 12: Zkoušený postup SPE č. 3, 4

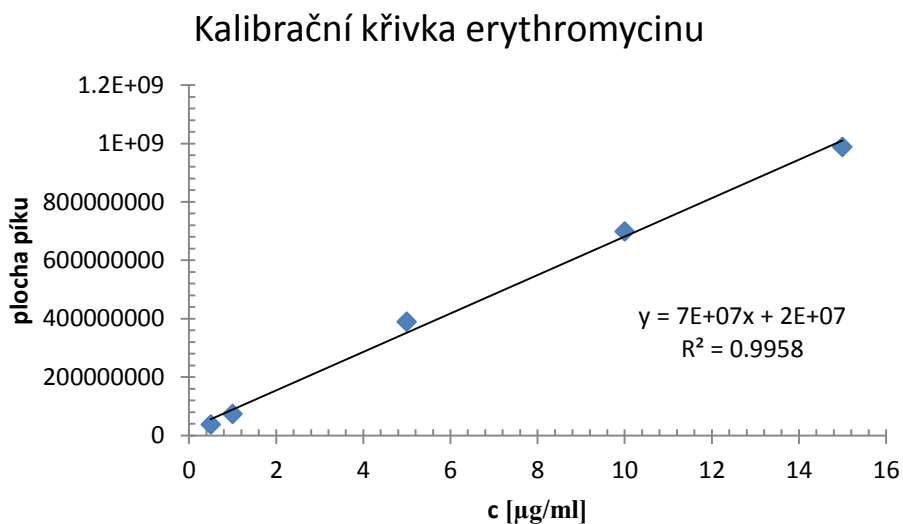
	postup č. 3	postup č. 4
aktivace kolonky	5 ml methanolu	5 ml methanolu
	5 ml milli Q vody okyselené kyselinou mravenčí (pH = 2)	5 ml milli Q vody
nanesení vzorku	300 ml vzorků vody	300 ml vzorků vody
promytí kolonky	5 ml milli Q vody	5 ml milli Q vody
vysušení kolonky	proud vzduchu	proud vzduchu
eluce analytů	10 ml methanolu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí	10 ml methanolu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí
proces zakoncentrování	sušení proudem dusíku	sušení proudem dusíku
	rozpuštění v 1 ml acetonitrilu	rozpuštění v 1 ml acetonitrilu

Tabulka 13: Zkoušený postup SPE č. 5, 6

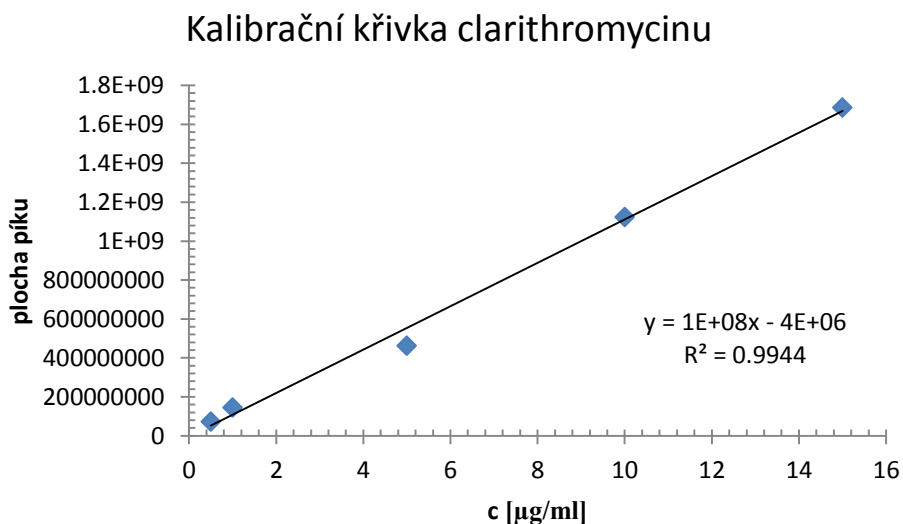
	postup č. 5	postup č. 6
aktivace kolonky	5 ml acetonitrilu	5 ml acetonitrilu
	5 ml milli Q vody okyselené kyselinou mravenčí (pH = 2)	5 ml milli Q vody
nanesení vzorku	300 ml vzorků vody	300 ml vzorků vody
promytí kolonky	5 ml milli Q vody	5 ml milli Q vody
vysušení kolonky	proud vzduchu	proud vzduchu
eluce analytů	10 ml methanolu	10 ml methanolu okyseleného 0,1% kyselinou mravenčí
proces zakoncentrování	sušení proudem dusíku	sušení proudem dusíku
	rozpuštění v 1 ml acetonitrilu	rozpuštění v 1 ml acetonitrilu

4.2.2 Kalibrační křivky pro SPE

Pro kvantifikaci výtěžností jednotlivých SPE postupů byly naměřeny kalibrační křivky v daném rozsahu, které jsou graficky znázorněny na obrázcích č. 36 a 37.



Obr. č. 36: Kalibrační křivka erythromycinu pro určení výtěžnosti SPE



Obr. č. 37: Kalibrační křivka clarithromycinu pro určení výtěžnosti SPE

4.2.3 Výtěžnosti jednotlivých postupů na kolonkách Oasis HLB SPE

Výtěžnosti všech postupů byly stanoveny pro všech šest provedených postupů. Výsledky jsou shrnuty do tabulky 14. V tabulce 15 jsou shrnuta naměřená data pro vybraný nejvhodnější postup. Příslušné základní statistické parametry jsou prezentovány v tabulce 16.

Tabulka 14: Výtěžnosti jednotlivých postupů

analyt		erythromycin		clarithromycin	
Postup	Počáteční koncentrace (µg/ml)	Výsledná koncentrace (µg/ml)	Výtěžnost (%)	Výsledná koncentrace (µg/ml)	Výtěžnost (%)
1	1	0,835	83,5	0,817	81,7
2	1	0,521	52,1	0,615	61,5
3	1	0,283	28,3	0,408	40,8
4	1	0,195	19,5	0,297	29,7
5	1	0,713	71,3	0,692	69,2
6	1	0,129	12,9	0,203	20,3

Tabulka 15: Výtěžnosti erythromycinu a clarithromycinu

analyt		erythromycin		clarithromycin	
vzorek	Počáteční koncentrace (µg/ml)	Výsledná koncentrace (µg/ml)	Výtěžnost (%)	Výsledná koncentrace (µg/ml)	Výtěžnost (%)
1	1	0,876	87,6	0,839	83,9
2	1	0,792	79,2	0,755	75,5
3	1	0,873	87,3	0,733	73,3
4	1	0,835	83,5	0,826	82,6
5	1	0,761	76,1	0,896	89,6
6	1	0,842	84,2	0,783	78,3
7	1	0,859	85,9	0,901	90,1
8	1	0,805	80,5	0,824	82,4
9	1	0,746	74,6	0,795	79,4
10	1	0,895	89,5	0,887	88,7

Pomocí programu Microsoft Excel byly vypočítány statistické parametry jednotlivých analytů. Pro výpočet směrodatné odchytky byla použita funkce SMODCH a relativní odchytky byla stanovena pomocí vztahu (I):

$$S_R = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

(2)

Kde S_R označuje relativní směrodatnou odchytku, S je směrodatnou odchytku a \bar{x} vyjadřuje aritmetický průměr. Rozptyl hodnot byl zpracován pomocí funkce VAR. VÝBĚR.

Tabulka 16: Vypočítané statistické parametry výtěžnosti analytů

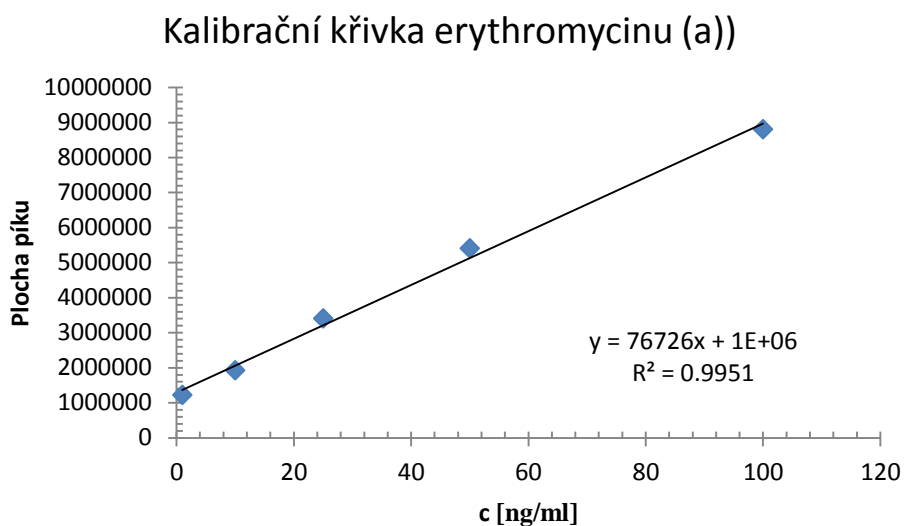
analyt	erythromycin	clarithromycin
Průměrná koncentrace (μg/ml)	0,8284	0,8239
Průměrná výtěžnost (%)	82,84	82,39
Směrodatná odchylka (μg/ml)	0,048	0,056
Relativní směrodatná odchylka (%)	5,79	6,79
Rozptyl (μg/ml)	$2,56 \cdot 10^{-3}$	$3,43 \cdot 10^{-3}$

4.3 Reálné vzorky

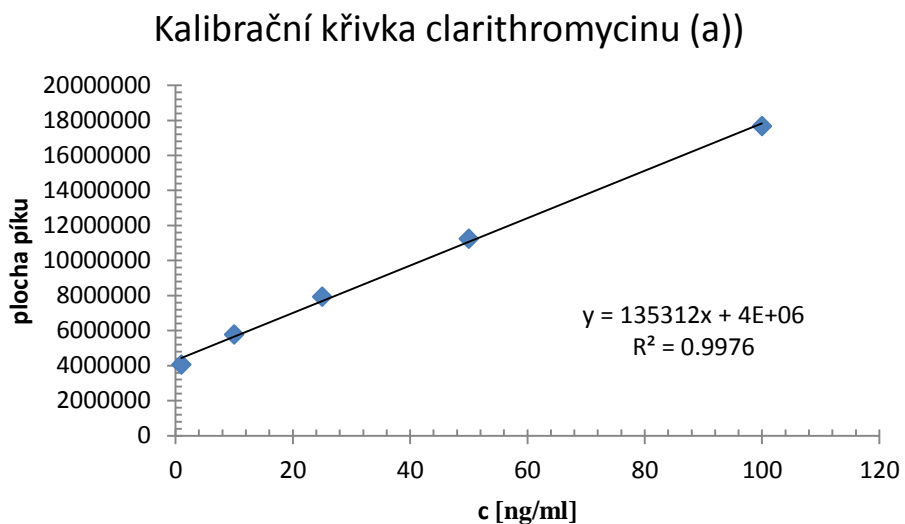
V předložené diplomové práci byla sledována makrolidová antibiotika a jejich výskyt v pitných vodách. Jako zdroje pitných vod byly zvoleny dvě jímací zařízení, prameniště Úpravny vody Černovír Olomouc a Jímací zařízení Litovel. Vzorky vody byly odebírány v časovém rozmezí od 7.7. 2014 do 18.7. 2014, tj. po dobu 10-dní.

Koncentrace analytů, tj. makrolidů erythromycinu a clarithromycinu, byly stanoveny pomocí metody kalibrační přímky, které byly vždy na začátku každého měření znovu proměřovány a sestrojovány. Ve stejném časovém horizontu byla prováděna komplexní stanovení ukazatelů kvality vod. Pro námi analyzované vzorky jsou výsledky uvedeny v příloze 3 a 4.

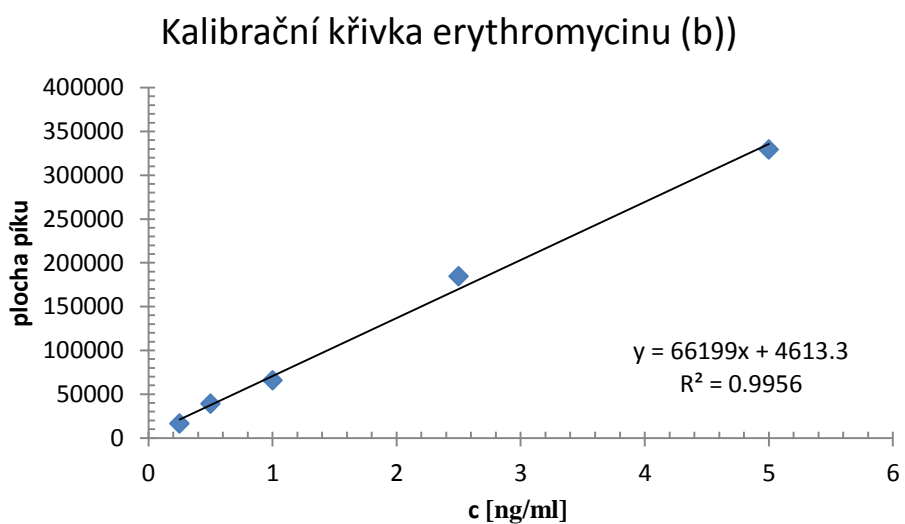
Výskyt makrolidových antibiotik by měl být v těchto vodách teoreticky velice nízký, prakticky pod detekčním limitem. Z tohoto důvodu byla snaha dosáhnout při měření kalibračních křivek nejnižších koncentrací. Kalibrační křivky jsou znázorněny na obrázcích č. 38-41.



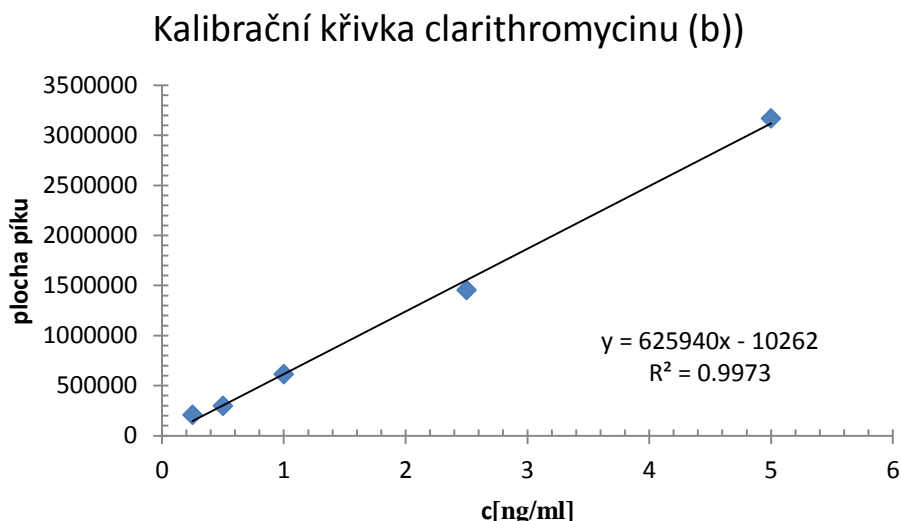
Obr. č. 38: Kalibrační křivka erythromycinu (vyšší rozsah koncentrací)



Obr. č. 39: Kalibrační křivka clarithromycinu (vyšší rozsah koncentrací)



Obr. č. 40: Kalibrační křivka erythromycinu (nejnižší rozsah koncentrací)



Obr. č. 41: Kalibrační křivka clarithromycinu (nejnižší rozsah koncentrací)

Pro každou analyzovanou složku bylo nutné určit meze detekčního limitu. Výsledky výpočtů jsou uvedeny v tabulce 17. Výpočet detekčního limitu byl stanoven pomocí výpočtu podle Grahama:

$$LLCI(X_D^\alpha) = 0 = X_D^\alpha - \left(\frac{s_{yl} \cdot t}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \right) \quad (3)$$

Detekční limit X_D uvedený označuje koncentraci analytu, která nemůže být podle statistiky rozlišena od nulové koncentrace. Hodnota X_D se dá také vyjádřit jako koncentrace, která má dolní mez intervalu spolehlivosti na určité hladině statistické významnosti rovnu nule. Tento detekční limit, včetně mezí intervalů spolehlivosti, chrání před chybou prvního druhu, tj. analyt je přítomen, i když ve realu přítomen není. Jeho označení je X_D^α a výpočet je znázorněn v rovnici (II) [81].

Ochrana před chybou druhého druhu je označována jako X_D^β a jeho výpočet je uveden v rovnici (III):

$$DMIS(X_D^\beta) = ULCI(X_D^\alpha = X_D^\alpha + \left(\frac{s_{yl} \cdot t}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \right) \quad (4)$$

Hodnota vypočtená z rovnice (III) udává hypotézu, která říká, že analyt přítomen není, přestože ve skutečnosti přítomen je. Pro tento detekční limit je dolní mez intervalu spolehlivosti totožná s horní mezí intervalu spolehlivosti X_D^β [81].

Parametry a jejich vypočtené hodnoty kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 17. Dále jsou zde také uvedeny hodnoty detekčních limitů stanovených podle Grahama. Hodnoty byly určeny pomocí programu Microsoft Excel s funkcí hledání řešení („řešitel“) pro rovnice regrese uvedených na obrázcích č. 40 a 41 pro kalibrační křivky s nejnižším koncentračním rozsahem.

Tabulka 17 Získané parametry kalibračních křivek a vypočtené detekční limity analyzovaných složek

analyt	erythromycin	clarithromycin
Rovnice regrese	$y = 66199x + 4613,3$	$y = 625940x - 10262$
Koeficient determinace R^2	0,9956	0,9973
Detekční limit X_D^α (ng/ml)	0,0527	0,0726
Detekční limit X_D^β (ng/ml)	0,0974	0,1184

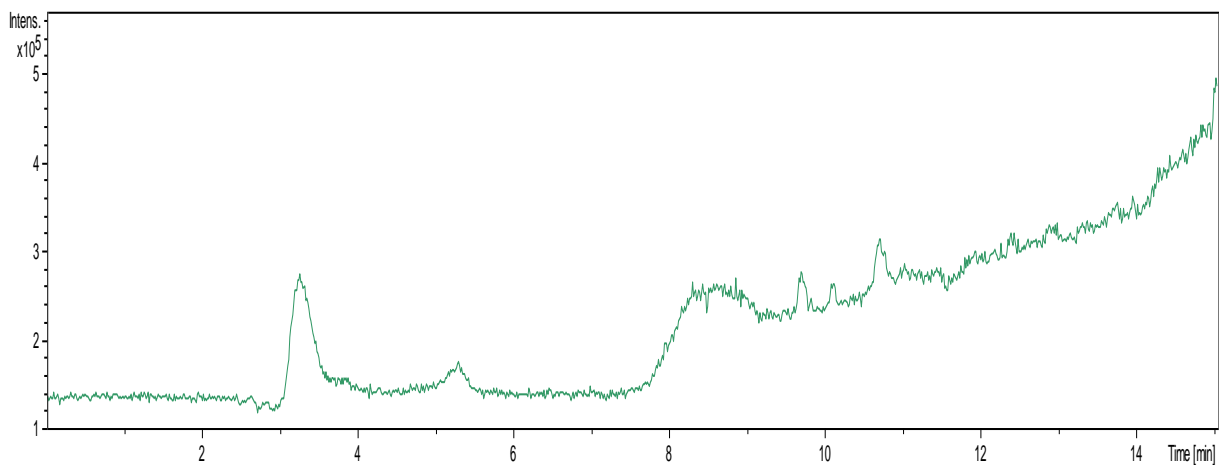
Výsledné stanovené hodnoty v reálných vzorcích jsou prezentovány v tabulce 18 a 19. V tabulkách jsou uvedeny vždy průměrné hodnoty ze tří stanovení. Výskyt makrolidových antibiotik nebyl prokázán v žádném ze vzorků, případně koncentrace se pohybovala pod mezi detekce použité metody. Ukázkové chromatogramy analýzy reálných vzorků jsou znázorněny na obrázcích č. 42 a 43.

Tabulka 18: Naměřená data koncentrací makrolidových antibiotik v reálných vzorcích vody z jímacího zařízení Úpravny vody Černovír Olomouc

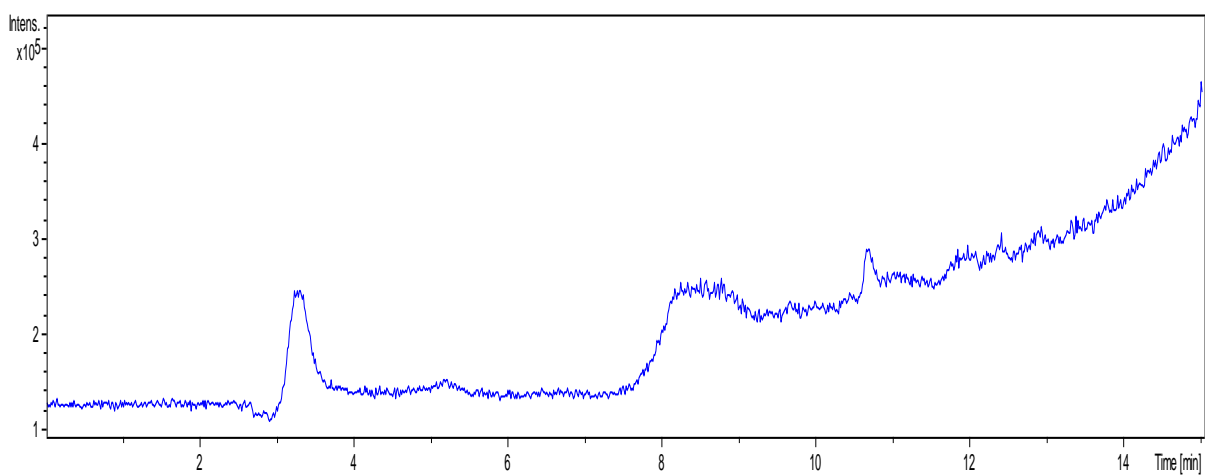
den	jímací zařízení	analyzované složky	
		erythromycin (ng/ml)	clarithromycin (ng/ml)
7.7.	Černovír	N/D	N/D
8.7.	Černovír	N/D	N/D
9.7.	Černovír	N/D	N/D
10.7.	Černovír	N/D	N/D
11.7.	Černovír	N/D	N/D
14.7.	Černovír	N/D	N/D
15.7.	Černovír	N/D	N/D
16.7.	Černovír	N/D	N/D
17.7.	Černovír	N/D	N/D
18.7.	Černovír	N/D	N/D

Tabulka 19: Naměřená data koncentrací makrolidových antibiotik v reálných vzorcích vody z jímacího zařízení Litovel

den	Jímací zařízení	analyzované složky	
		erythromycin (ng/ml)	clarithromycin (ng/ml)
7.7.	Litovel	N/D	N/D
8.7.	Litovel	N/D	N/D
9.7.	Litovel	N/D	N/D
10.7.	Litovel	N/D	N/D
11.7.	Litovel	N/D	N/D
14.7.	Litovel	N/D	N/D
15.7.	Litovel	N/D	N/D
16.7.	Litovel	N/D	N/D
17.7.	Litovel	N/D	N/D
18.7.	Litovel	N/D	N/D



Obr. č. 42: Chromatogram vzorku pitné vody z jímacího zařízení Černovír ze dne 11.7.2014



Obr. č. 43 Chromatogram vzorku pitné vody z jímacího zařízení Litovel ze dne 11.7.2014

5 Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na stanovení léčiv v pitných vodách pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s možností detekce pomocí detektoru diodového pole a hmotnostního spektrometru. Jako léčiva byla vybrána makrolidová antibiotika, konkrétně erythromycin a clarithromycin, která jsou novodobou obměnou penicilinu a patří v dnešní době mezi hojně používaná antibakteriální léčiva.

Cílem této práce bylo zvolit a optimalizovat analytickou metodu pro stanovení vybraných analyzovaných složek. Nejprve bylo nutné zvolit vhodnou detekční techniku pro stanovení makrolidových antibiotik. Protože detekci pomocí detektoru diodového pole nebylo možné použít, protože tento typ antibiotik neobsahuje vhodný chromofor, který je nezbytný pro měření pomocí DAD, byl pro jejich stanovení použit hmotnostně spektrometrický detektor, který umožnil analýzu erythromycinu a současně i clarithromycinu. Stanovení analytů pomocí LC/MS bylo nejdříve optimalizováno na modelových vzorcích vody a následně byla tato optimalizovaná metoda aplikována na reálné vzorky pitné vody.

Pro separaci byla zvolena kolona Kinetex 2,6u s velikostí částic 2,6 μm . Optimalizace byla prováděna v následujících krocích: volba vhodné mobilní fáze, jejího průtoku a gradientu, volba správné teploty analýzy a objemu nástříku.

Protože reálné vzorky obecně obsahují velice nízké koncentrace analytů, je zapotřebí provést jejich izolaci, pokud možno s maximální výtěžností. Pro izolaci byla zvolena metoda extrakce tuhrou fází, pro kterou byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co nejvyšších výtěžností. Vhodným typem kolonek pro SPE extrakci makrolidových antibiotik byly kolonky typu Oasis HLB, pomocí nichž bylo dosaženo výtěžností (erythromycin: 82,84 %, clarithromycin: 82,39 %), které byly dostačující pro následnou analýzu.

Pro jednotlivé analyzované složky byly stanoveny meze detekce a detekční limity postupem podle Grahama (X_D^{α} a X_D^{β}), které určují limity celé metody.

Námi optimalizovaná metoda mohla být použita pro stanovení daných antibiotik v reálných vzorcích pitné vody. Odběr byl prováděn po dobu deseti dnů, tj. od 7.7. 2014 do 18.7. 2014 ze dvou zdrojů, z jímacího zařízení Černovír Olomouc a jímacího zařízení Litovel. Reálné vzorky byly vždy zpracovány nejpozději následující den po odběru. Analýzou makrolidových antibiotik v pitných vodách pomocí LC/MS v daném kalibračním rozsahu bylo zjištěno, že výskyt erythromycinu a clarithromycinu byl pravděpodobně pod mezí detekce dané metody.

Lze proto říci, že reálné vzorky buď obsahovaly tak nízké koncentrace makrolidových antibiotik, že je naší metodou nebylo možné stanovit, nebo tyto látky nebyly v pitných vodách obsaženy. V publikovaných studiích se obecně uvádí minimální výskyt těchto analytů v pitných vodách, a to v porovnání s odpadními vodami.

Námi optimalizovaná technika byla ověřena modelovými i reálnými vzorky vody. Pro dosažení ještě nižších koncentrací by bylo možné zvolit jinou analytickou metodu, která by umožnila provádět analýzy v ještě nižších koncentracích.

6 Seznam použité literatury

1. KUCHARĚ, M. *Výzkum a vývoj léčiv*. Vydání první. Praha: VŠCHT Praha. 2008. 166 s. ISBN 978-80-7080-677-7.
2. STONE, T., DARLINGTONOVÁ, G. *Léky, drogy, jedy*. Vydání první. Praha. Academia Praha. 2003. 440 s. ISBN 80-200-1065-3.
3. Česko. Zákon č. 378/2007 Sb. Parlamentu České republiky: O léčivech a změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech), In *Sbírka zákonů, Česká republika*. 2007. 115/2007, 378 s. 5342.
4. KATZUNG, B.G. *Základní a klinická farmakologie*. Vydání druhé. Jinočany. H&H Vyšehradská, s.r.o.. 2006. 1106. ISBN: 80-7319-056-7.
5. HYNIE, S. *Farmakologie v kostce*. Vydání druhé, přepracované. Praha. Karlova univerzita. 1. Lékařská fakulta, Farmakologický ústav. 2001. 520 s. ISBN 80-7254-181-1.
6. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology [online]. 2014. [cit 2014-02-05].
Dostupné z WWW stránek:
<http://www.whocc.no/>.
7. BENEŠ, L., FARSA, O. *Farmaceutická chemie (Farmakochemie), Úvod do studia chemických léčiv*. Vydání první. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 2005. 107 s. ISBN 80-7305-516-3.
8. KOŘÍSTKOVÁ, B., GRUNDMANN, M. Metodika studia spotřeb léků. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2006. vol.20. 219–222. ISSN 1803-5353
Dostupné z WWW stránek:
<http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2006/04/08.pdf>.
9. HAMPL, F., RÁDL, S., PALEČEK J. *Farmakochemie*. 2. Rozšířené vydání. Praha: VŠCHT Praha. 2007. 450 s., CD-ROM s elektronickou verzí. ISBN 978-80-7080-639-5.
10. LULLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. Vydání druhé (české). Praha. Grada Publishing. 2004. 728 s. ISBN 80-247-0836-1.
11. Membrána biologická [online]. [2004]. Elektronická verze 1.0 k tištěné publikaci *Biochemické pojmy – výkladový slovník* ISBN 80-7080-551-X. [cit. 2014-02-12]
Dostupné z WWW:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/membrana_biologicka.html.

12. LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Vydání první. Praha: Galén. 2002. 601 s. ISBN 80-7262-168-8.
13. LULLMANN, H. et al. *Barevný atlas farmakologie*. Vydání druhé (doplněné a přepracované). Praha: Grada Publishing. 2001. 392 s. ISBN 80-7169-973-X.
14. KUCHAR, M., REJHOLEC, V. *Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou*. Vydání první. Praha. Academia Praha. 1987. 263 s. ISBN 978-0-1236-9520-8.
15. HYNIE, S. *Farmakologie v kostce*. Vydání první. Praha. Triton. 1999. 461 s. ISBN 80-85875-96-9.
16. MANN, J. *Jedy, drogy, léky*. Vydání první. Praha. Academia Praha. 1996. 203 s. ISBN 80-200-0508-0.
17. LEVY, S. B. *Antibiotický paradox: jak se nesprávných používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc*. Vydání první. Praha. Academia Praha. 2007. 312 s. ISBN 978-80-200-1485-6.
18. JEDLIČKOVÁ, A. *Antimikrobiální terapie: v každodenní praxi*. Vydání třetí (rozšířené). Praha. MAXDORF JESSENIUS. 2009. 662 s. ISBN 978-80-7345-208-7.
19. SIMON, C., STILLE, W. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. Vydání první (české). Praha: Grada Publishing. 1998. 712 s. ISBN 80-7169-268-9.
20. Antibiotikum. In *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. St. Peterburg: Wikipedia Foundation. 2005, last update on 24.1. 2014. [cit. 2014-03-10]
Dostupné z WWW:
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum>.
21. YIM, G., HUIMI WANG, H., DAVIES, J. The truth about antibiotics. *International Journal of Medical Microbiology*. 2006. vol. 296. no. 2-3. s. 163 – 170. ISSN 1438-4221.
22. LANGE-ERNST, M. E. *Antibiotika: omyly a pravda*. Vydání první. Olomouc: FONTÁNA. 2005. 141 s. ISBN 80-7336-202-3.
23. KOLÁŘ, M. *Antibiotická léčba v praxi I*. Vydání první. Olomouc: SOLEN. 2000. 77 s. ISBN 80-238-5835-1.
24. DAVIES, J., DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010. vol. 74. no. 3. s. 417 – 433. ISSN 1092-2172

25. WILLIAMS, J. D. *Zajištění optimálního používání antibiotik*. In *Éra antibiotik*. David Jappel. Říčany. Studio Evolving. 1997. s. 37 – 47.
26. PITTER, P. *Hydrochemie*. 4. aktualizované vydání. Praha. VŠCHT Praha. 2009. 592 s. ISBN 978-80-7080-701-9.
27. KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use-present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management*. 2009. vol. 90. no. 8. s. 2354 – 2366. ISSN 0301-4797.
28. KOTYZA, J., SOUDEK, P., KAFKA, Z., VANĚK, T. Léčiva – „nový“ environmentální polutant. *Chem. Listy*. 2009. vol. 103. 540 – 547. ISSN 1213-7103.
29. HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent of recent research data. *Toxicology Letters*. 2002. vol. 131. no. 1. s. 5 – 17. ISSN 0378-4274.
30. HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K., KRATZ K. L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*. 1999. vol. 225. no. 1. s. 109-118. ISSN 0048-9697.
31. SARMAH, A. K., MEYER, M.T., BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. 2006. vol. 65. no. 5. s. 725 – 759. ISSN 0045-6535.
32. BATT, A.L., BRUCE, I.B., AGA, D.S. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges. *Environmental Pollution*. 2006. vol. 142. no. 2. s. 295 – 302. ISSN 0043-1354.
33. ŠVEHLA, P., TLUSTOŠ, P., BALÍK, J. *Odpadní vody*. Druhé vydání (přepřacované). Praha, Česká zemědělská univerzita. 2007. 142 s. ISBN 978-80-213-1716-1.
34. KUČEROVÁ, R., FEČKO, P., LYČKOVÁ, B. *Úprava a čištění odpadních vod*. První vydání. VŠB Ostrava, Technická univerzita. 2011. 108 s. ISBN 978-80-248-2389-8.
35. KIM, S., EICHHORN, P., JENSEN, J. N., WEBER, A. S., AGA, D. S. Removal of Antibiotics in Wastewater: Effect of Hydraulic and Solid Retention Times on the Fate of Tetracycline in the Activated Sludge Process. *Environmental Science and Technology*. 2005. vol. 39. no. 15. s. 5816 – 5823. ISSN
36. LI, B., ZHANG, T. Biodegradation and Adsorption of Antibiotics in the Activated Sludge Process. *Environmental Science and Technology*. 2010. vol. 44. no. 9. s. 3468-3473. ISSN 1520-5851

37. SHANNON, M.A., BOHN, P.W., ELIMECH, M., GEORGIADIS, J.G., MARINAS, B.J., MAYES, A.M., Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*. 2008. vol. 452. no. 7185. s. 301 – 310. ISSN 0028-0836.
38. WATKINSON, A.J., MURBY E.J., KOLPIN D.W., COSTANZO S.D. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From waste water to drinking water. *Science of the total Environment*. 2009. vol. 407. no. 8. s. 2711 – 2723. ISSN 0048-9697.
39. KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. vol. 52. no. 1. s. 5 – 7. ISSN 1460-2091.
40. BAQUERO, F., MARTÍNEZ J-L., CANTÓZ R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 2008. vol. 19. no. 3. s. 260-265. ISSN 0958-1669.
41. DING, Ch., HE J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. vol. 87. no. 3. s. 925 – 941. ISSN 1432-0614.
42. KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*. 2008. vol. 8. no. 1. s. 1 -13. ISSN 1470-160X.
43. CABELLO, F.C., Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*. 2006. vol. 8 no. 7. s. 1137 – 1144. ISSN 1462-2920.
44. GÖBEL, A., McARDELL, Ch.S., JOSS, A., SIEGRIST H., GIGER W. Fate of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies. *Science of Total Environment*. 2007. vol. 372. no. 2-3. s. 361 – 371. ISSN 0048-9697.
45. PŘÍBORSKÝ, J., *Makrolidy – farmakologie a klinická farmakologie*. Vydání první, Olomouc, Farmakologický ústav LF UP Olomouc, MAXDORF, 2001, 107 s. ISBN 80-85912-53-8.
46. URBÁŠKOVÁ, P., MAREŠOVÁ, V., JINDRÁK, V., NYČ, O., SUCHOPÁR, J., SECHSER, T., HOZA, J., KAREN, I., ŠVIHOVEC, J., *Konsensus používání antibiotik II. Makrolidová antibiotika. Praktický Lékař*. 2003. vol. 83. no. 10. s. 563-571. ISSN 0032-6739.
47. HAVLÍK, J., *Makrolidová antibiotika v pediatrické praxi. Pediatrie pro praxi*. 2009. 2. Číslo 2. ISSN 1803-5264

48. RETSEMA, J., FU, W. Macrolides: structures and microbial targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001. vol. 18. no. 1. s. 3 – 10. ISSN 0924-8579.
49. HAVLÍK, J. Význam makrolidových antibiotik. *Lékařské listy: Příloha zdravotnických novin*. 2008. vol. 5. s. 7 – 10. ISSN 1214-7664.
50. FATTA, D., NIKOLAOU, A., ACHILLEOS, A., MERIC, S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. *Trends in Analytical Chemistry*. 2007. vol. 26. no. 6. s. 515 – 533. ISSN 0165-9936.
51. *Český lékopis 2009*. 2. díl. Vydání první. Praha, Grada Publishing. 2009. 1504 s. ISBN 978-80-247-2994-7.
52. CAHILL, J.D., FURLONG, E.T., BURKHARDT, M.R., KOLPIN, D., ANDERSON, L.G. Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004. vol. 1041. no. 1 – 2. s. 171 – 180. ISSN 0021-9673.
53. LIN, W-Ch., CHEN, H-Ch., DING, W-H. Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2005. vol. 1065. no. 2. s. 279 – 285. ISSN 0021-9673.
54. FUKSA, J.K. *Příručka pro vzorkování vody a vodního prostředí*. Vydání první. Praha. Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka. 2003. 94 s. ISBN 80-85900-53-X.
55. HELÁN, V. *Odběry vzorků: Sborník přednášek z kurzu*. Druhé upravené a doplněné vydání. Český Těšín. 2 Theta. 2006. 378 s. ISBN 80-86380-33-5.
56. HORÁKOVÁ, M. a kol. *Analytika vody*. Vydání druhé. Praha, VŠCHT Praha. 2007. 335 s. ISBN 978-80-70-80-520-6.
57. STEFAN, H., JOHNSON, T., McDONNELL, H. Sampling of Wastewater Effluent. *Journal of Environmental Engineering*. 1992. vol. 118. no. 2. s. 209 – 225. ISSN 1943-7870.
58. RAO, R.N., VENKATESWARLU, N., NARSIMHA, R. Determination of antibiotics in aquatic environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2008. vol. 1187. no. 1 – 2. s. 151 – 164. ISSN 0021-9673.
59. HUEBRA, M.J.G., VINCENT, U. Analysis of macrolide antibiotics by liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005. vol. 39. no. 3-4. s. 376 – 398. ISSN 0731-7085.

60. PERTILE, E., ČABLÍK, V. *Instrumentální metody analýzy*. Vydání první. Ostrava, VŠB – Technická univerzita. 2006. 238 s. ISBN 80-248-1049-2.
61. SIMPSON, N.J.K. *Solid-phase extraction: Principles, Techniques and Applications*. USA. New York, Marcel Dekker. 2000. 516 s. ISBN 0-8247-0021-X.
62. NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* Vydání první. Praha, Europrint Praha. 2013. 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
63. NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* Vydání první. Praha, Europrint Praha. 2013. 235 s. ISBN 978-80-260-4244-0.
64. Extrakce tuhou fází [online]. [2014]. [cit. 2014-02-25]
Dostupné na WWW:
[http://www.abacus-lab.com/analytical-chemistry/extraction/solid-phase-extraction-\(spe\)/](http://www.abacus-lab.com/analytical-chemistry/extraction/solid-phase-extraction-(spe)/).
65. STOOB, K., SINGER, H.P, GOETZ, Ch.W., RUFF, M., MUELLER, S.R. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. *Journal of Chromatography A*. 2005. vol. 1097. no. 1 – 2. s. 138 – 147. ISSN 0021-9673.
66. YANG, S., CARLSON, K.H. Solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices. *Journal of Chromatography A*. 2004. vol. 1038. no. 1 – 2. s. 141 – 155. ISSN 0021-9673.
67. ABUIN, S., CODONY, S., COMPANO, R., GRANADOS, M., PRAT, M.D. Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2006. vol. 1114. no. 1. s. 73-81. ISSN 0021-9673.
68. Vysocúčinná kapalinová chromatografie [online].[2014].[cit. 2014-02-26]
Dostupné na WWW:
http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/chromatografie_kapalinova_vysocueucinna.html.
69. GARCÍA-MAYOR, J.S., GARCINUNO, R.M., FERNÁNDEZ-HERNANDO, P., DURAND-ALEGRÍA, J.S., Liquid chromatography–UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. *Journal of Chromatography A*. 2006. vol. 1122. no. 1-2. s. 76 – 83. ISSN 0021-9673.

70. CIVITAREALE, C., FIORI, M., BALLERINI, A., BRAMBILLA, G. Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC-UV/DAD at 1 ppm. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004. vol. 36. no. 2. s. 317 – 325. ISSN 0731-7085.
71. VOLKA, K. et al. *Analytická chemie II*. Vydání první. Praha, VŠCHT Praha. 1195. 236 s. ISBN 80-7080-227-8.
72. UV/VIS detektor [online].[2013][cit. 2014-02-26]
Dostupné na WWW:
http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html#_top.
73. KEES, F., SPANGLER, S., WELLENHOFER, M. Determination of macrolides in biological matrices by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*. 1998. vol. 812. no. 1-2. s. 287 – 293. ISSN 0021-9673.
74. Elektrochemické detektory [online][2013][cit. 2014-02-26]
Dostupné na WWW:
http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html.
75. Fluorescenční detektory [online][2007][cit. 2014-02-26]
Dostupné na WWW:
http://www.hplc.cz/Teorie/FL_detector.html.
76. PETROVIĆ, M., HERNANDO, M.D., DÍAZ-CRUZ, S., BARCELÓ, D. Liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A*. 2005. vol. 1067. s. 1 – 14. ISSN 0021-9673.
77. Instrumentace - hmotnostní spektrometrie [online].[2009][cit. 2014-02-27]
Dostupné na WWW:
<http://www.hull.ac.uk/chemistry/masspec3/principles%20of%20ms.html>.
78. BARKER, J., *Mass spectrometry*. Second edition. England, University of Greenwich. 1999. 509 s. ISBN 0-471-96762-9.
79. MALDI-TOF MS [online][2014][cit. 2014-02-27]
Dostupné na WWW:
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-dna/learning-center/qc-qa/qc-analysis-by-mass-spectrometry.html>.
80. PEDROUZO, M., BORRULL, F., MARCÉ, R.M., POCURULL, E., Simultaneous determination of macrolides, sulfonamides, and other pharmaceuticals in water samples by solid-phase extraction and LC-(ESI) MS. *Journal of Separation Science*. 2008. vol. 31. no. 12. s. 2182 – 2188. ISSN 1615-9314.

81. GRAHAM R. C.. *Data analyses for chemical sciences*. VCH Publishers New York. 1993. 430 s.

7 Seznam použitých zkratek a symbolů

ACN	acetonitril
ADE	adsorpce, distribuce, eliminace
ADME	adsorpce, distribuce, metabolismus, eliminace
ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
AUC	plocha pod koncentrační křivkou „area under curve“ (farmakokinetika)
CE	kapilární elektroforéza
ČOV	čistička odpadních vod
DAD	detektor diodového pole
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
EU	Evropská unie
FAB	bombardování rychlými atomy
FD	desorpce polem
FI	ionizace plamenem
FLD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
GIT	gastrointestinální trakt
GPC	gelová permeační chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS, LC/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně- spektrometrickou detekcí
IEC	iontově výměnná chromatografie
INN	mezinárodně nechráněné názvy
LC	kapalinová chromatografie
LC-(ESI)-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem
LC-MS-MS	spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LD	desorpce laserem
LLC	kapalinová rozdělovací chromatografie
LLE	extrakce kapalina – kapalina
LSC	kapalinová adsorpční chromatografie
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice
MEK	minimální efektivní koncentrace
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
PA	polyakrylát
PD	desorpce plazmou
PDMS	polydimethylsiloxan
PTFE	polytetrafluorethylen
RNA	ribonukleová kyselina
SMODCH	směrodatná odchylka

SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TIC	celkový iontový chromatogram
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
VIS	viditelná složka záření

8 Přílohy

Seznam příloh:

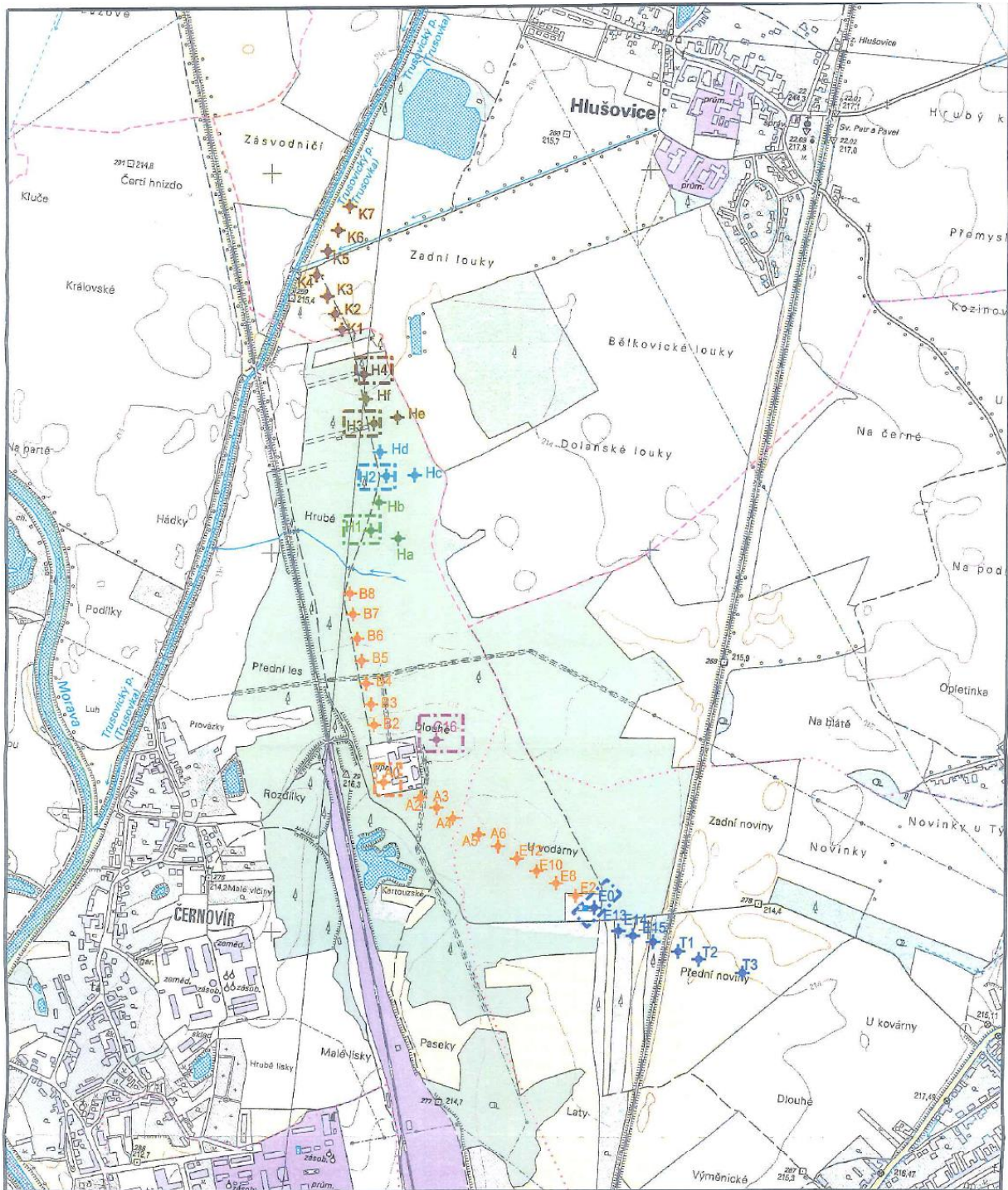
Příloha 1: Jímací zařízení Litovel (odběr vzorku – v mapě znázorněné v bodě SbS)

Příloha 2: Jímací zařízení Olomouc - Černovír (odběr vzorku – v mapě znázorněné v bodě E0)

Příloha 3: Hodnoty ukazatelů vzorků vod pitné vody v dnech od 7.7. 2014 do 31.7. 2014 z jímacího zařízení Litovel

Příloha 4: Hodnoty ukazatelů vzorků vod pitné vody v dnech od 7.7. 2014 do 30.7. 2014 z jímacího zařízení Olomouc - Černovír

Příloha 2: Jímací zařízení Olomouc - Černovír (odběr vzorku – v mapě znázorněné v bodě E0)



Příloha 3: Hodnoty ukazatelů vzorků vod pitné vody v dnech od 7.7. 2014 do 31.7. 2014 z jímacího zařízení Litovel

Hromadný zkrácený protokol rozboru vzorků za období : 07.07.14 - 29.07.14

Místo odběru : Pramenišť Litovel I, sběrná studna

Matrice :

Číslo vzorku:	Zahájení odběru:	NO3- mg/l	SO4-- mg/l	Cl- mg/l	KB KTJ/100	EC KTJ/100	KM22 KTJ/1ml	KM36 KTJ/1ml	Fe mg/l	A254 []	Mn mg/l	NO2- mg/l	NH4+ mg/l	pach stupeň	KNK4,5 mmol/l	ZNK8,3 mmol/l
7863	14.7.14	14,2	32	18,5					<0,02	0,006	<0,01	0,011	<0,033	0	4,36	0,35
8559	29.7.14	14,7			0,04		<0,01	<0,004	<0,033			
Prům.		14,5	32	18,5					0,02	0,006	0,00	0,006	0,000	0	4,36	0,35
Min.		14,2	32	18,5					<0,02	0,006	<0,01	<0,004	<0,033	0	4,36	0,35
Max.		14,7	32	18,5					0,04	0,006	<0,01	0,011	<0,033	0	4,36	0,35

Číslo vzorku:	Zahájení odběru:	Ca+Mg mmol/l	Ca mg/l	Mg mg/l	CHSKM mg/l	barva mg/l/Pt	T °C	pH []	Kondukt mS/m	Z ZFn	Cl2vol. mg/l	pach	chut'
7863	14.7.14	2,67	97,5	5,77	0,60			7,42	53,2	<0,5			
8559	29.7.14				<0,50	<4	12,7	7,36	51,8	<0,5	<0,05	příjateln	příjateln
Prům.		2,67	97,5	5,77	0,30	0	12,7	7,39	52,5	0,0	0,00		
Min.		2,67	97,5	5,77	<0,50	<4	12,7	7,36	51,8	<0,5	<0,05		
Max.		2,67	97,5	5,77	0,60	<4	12,7	7,42	53,2	<0,5	<0,05		

Příloha 4: Hodnoty ukazatelů vzorků vod pitné vody v dnech od 7.7 2014 do 30.7. 2014 z jímacího zařízení Olomouc - Černovír

Hromadný zkrácený protokol rozboru vzorků za období : 07.07.14 - 30.07.14

Místo odběru : ÚV Černovír, výtlačk 2

Matrice : pitná voda - výtlačky

Číslo vzorku:	Zahájení odběru:	NO3- mg/l	SO4-- mg/l	Cl- mg/l	KB KTJ/100	EK KTJ/100	EC KTJ/100	KM22 KTJ/1ml	KM36 KTJ/1ml	Fe mg/l	A254 []	Mn mg/l	Al mg/l	NO2- mg/l	NH4+ mg/l
7626	8.7.14	17,5	56	48,1	0	0	0	0	1	<0,02	0,062	<0,01	<0,011	<0,004	<0,033
7780	10.7.14									<0,02		<0,01			
7946	15.7.14				0	0	0	0	0	<0,02		0,02			
8126	17.7.14									<0,02		0,02			
8278	22.7.14	18,2	53	47,9	0	0	0	0	0	<0,02	0,074	<0,01	0,046	<0,004	<0,033
8400	24.7.14									<0,02		<0,01			
8508	28.7.14				0,02		<0,01			
8647	30.7.14									0,03		0,02			
Prům.		17,9	55	48	0	0	0	0	0	0,01	0,068	0,01	0,023	0,000	0,000
Min.		17,5	53	47,9	0	0	0	0	0	<0,02	0,062	<0,01	<0,011	<0,004	<0,033
Max.		18,2	56	48,1	0	0	0	0	1	0,03	0,074	0,02	0,046	<0,004	<0,033

Číslo vzorku:	Zahájení odběru:	KNK4,5 mmol/l	ZNK8,3 mmol/l	CO2vol. mg/l	Ca+Mg mmol/l	Ca mg/l	Mg mg/l	CHSKM mg/l	barva mg/l Pt	T °C	pH []	Kondukt mS/m	Z ZFn	Cl2vol. mg/l	pach
7626	8.7.14	4,80	0,35		3,24	113	10,2	1,4	5	12,1	7,42	68,6	1,4	0,18	
7780	10.7.14							1,4							
7946	15.7.14	4,74	0,38	17				1,6		11,9	7,35			0,33	
8126	17.7.14							1,5							
8278	22.7.14	4,52	0,25		3,19	108	12,0	1,5	<4	12,3	7,37	66,4	<0,5	0,37	přijatel
8400	24.7.14							1,4							
8508	28.7.14	4,72	0,30	13				0,92		12,7	7,42			0,57	
8647	30.7.14													
Prům.		4,70	0,32	15	3,22	111	11,1	1,4	3	12,3	7,39	67,5	0,7	0,36	
Min.		4,52	0,25	13	3,19	108	10,2	0,92	<4	11,9	7,35	66,4	<0,5	0,18	
Max.		4,80	0,38	17	3,24	113	12,0	1,6	5	12,7	7,42	68,6	1,4	0,57	