



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STANOVENÍ ANTIBIOTIK V ODPADNÍ VODĚ

DETERMINATION OF ANTIBIOTICS IN THE WASTEWATER

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petra Suková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0995/2015** Akademický rok: **2015/2016**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Petra Suková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce **prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.**
Konzultanti:

Název bakalářské práce:

Stanovení antibiotik v odpadní vodě

Zadání bakalářské práce:

Zpracování literární rešerše

Provedení výběru léčiv, jejichž koncentrace bude sledována v odpadních vodách.

Výběr vhodné metody pro stanovení, její optimalizace a aplikace na reálné vzorky odpadních vod.

Interpretace získaných výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

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

Petra Suková
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V práci je řešena problematika antibiotik, látek používaných k prevenci a léčbě infekčních onemocnění v humánní i veterinární medicíně. Ze skupiny antibiotik byla diskutována aminopenicilinová antibiotika, zejména ampicilin a amoxicilin, které jsou v dnešní době nejčastěji předepisovanými antibiotiky jak v České republice, tak také ve světě.

Léčiva se spolu s odpadními vodami dostávají na čistírnu odpadních vod (ČOV), kde však čistírenské procesy neodstraní zcela léčiva z vyčištěné vody. To má za následek, že léčiva mohou pronikat do dalších složek životního prostředí, zejména do povrchové vody a půdy, kde mohou negativně působit na organismy zde žijící.

Pro izolaci analytů ze vzorků odpadních vod byla zvolena extrakce tuhou fází (SPE). Pro finální analýzu antibiotik byla použita metoda ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV-VIS detekcí s diodovým polem a také metoda kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Sledovaným analytem izolovaným z odpadní vody byl na základě optimalizace analytických technik vybrán především ampicilin. Analýza odpadní vody byla prováděna celkem po čtyři dny z přítoku a odtoku ČOV Brno-Modřice a ČOV situované v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

ABSTRACT

This thesis deals with problem of antibiotics, substances used in the prevention and treatment of infectious diseases in human and veterinary medicine. Have been discussed aminopenicillins antibiotics from the group of antibiotics, particularly ampicillin and amoxicillin, which are one of the most frequently prescribed antibiotics in both the Czech Republic and in the world now.

Drug substances together with wastewater pass into the wastewater treatment plant where sewage process does not remove the drug from the treated water entirely. Drug substances can be penetrate into the other components of the environment in the result, especially in surface water and soil, where they can have adverse effects on organisms living there.

For the isolation of analytes from samples of wastewater was selected solid phase extraction (SPE). For final analysis of antibiotics was used method of ultra-high performance liquid chromatography with UV-VIS detection with diode array detector and method of liquid chromatography with mass spectrometric detection. Based on the optimization of analytical techniques was especially ampicillin chosen as analyte isolated from the matrix of waste water.

Analysis of the wastewater was conducted for a total of four days of influent and effluent wastewater treatment plant in Brno-Modřice and wastewater treatment plant which is situated in area of the Veterinary and Pharmaceutical University in Brno.

KLÍČOVÁ SLOVA

Aminopenicilinová antibiotika, extrakce tuhou fází, (ultra-)vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UV-VIS detekce pomocí diodového pole, odpadní voda

KEYWORDS

Aminopenicillins antibiotics, solid phase extraction, ultrahigh performance liquid chromatography, UV-VIS detection using diode array detector, wastewater

SUKOVÁ, P. *Stanovení antibiotik v odpadní vodě*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 68 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala paní prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za její vstřícnost, cenné rady a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat všem akademickým pracovníkům a studentům z ústavu ÚCHTOŽP za jejich pomoc, rady a čas při řešení bakalářské práce. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala celé své rodině za trpělivost a podporu, kterou mi v průběhu mého studia poskytla.

Obsah

1	Antibiotika a chemoterapeutika.....	8
1.1	Historie antibiotik.....	8
1.2	Rozdělení antibiotik a antibakteriálních chemoterapeutik.....	10
1.3	Mechanismus účinku antibiotik	12
1.4	Toxicita a nejzávažnější nežádoucí účinky antibiotik.....	13
1.4.1	Toxicita antibiotik.....	13
1.4.2	Potlačení normální mikrobiální flóry	14
1.4.3	Alergie	14
1.5	Antimikrobiální účinnost antiinfekčních látek.....	14
1.6	Rezistence.....	15
1.7	Farmakokinetika antiinfekčních látek	15
1.7.1	Adsorpce	16
1.7.2	Distribuce.....	16
1.7.3	Biotransformace a vylučování	17
2	Aminopenicilinová antibiotika	18
2.1	Ampicilin.....	19
2.1.1	Názvosloví a chemická struktura.....	19
2.1.2	Charakteristika ampicilinu.....	19
2.1.3	Způsob podání a dávkování ampicilinu.....	20
2.1.4	Distribuce a eliminace ampicilinu z organismu	21
2.1.5	Interakce ampicilinu s jinými léčivy	21
2.2	Amoxicilin.....	22
2.2.1	Názvosloví a chemická struktura.....	22
2.2.2	Charakteristika.....	22
2.2.3	Způsob podání amoxicilinu	22
2.2.4	Distribuce a eliminace amoxicilinu z organismu	22
2.2.5	Interakce amoxicilinu s jinými léčivy	23
3	Stanovení antibiotik.....	24
3.1	Metody stanovení léčiv (antibiotik)	24
3.1.1	Vzorkování	24
3.1.2	Separáční metody - extrakce.....	25

3.1.3	Chromatografie jako finální analýza léčiv (antibiotik).....	27
3.1.4	Detektory v kapalinové chromatografii	30
3.1.5	Vyhodnocení chromatografické analýzy:	33
4	Experimentální část	34
4.1	Používané přístroje, software a laboratorní vybavení	34
4.2	Použité chemikálie a standardy	35
4.3	Stanovované analyty	35
4.3.1	Vlastnosti stanovovaných analytů	36
4.4	Analyzovaná matrice	36
4.5	Postup stanovení.....	36
4.5.1	Odběr vzorků	36
4.5.2	Extrakce analytů z matrice vzorku	37
4.5.3	Finální analýza.....	39
5	Výsledky a diskuze	41
5.1	Optimalizace chromatografických podmínek	41
5.1.1	Výběr optimální vlnové délky UV-VIS detekce	41
5.1.2	Výběr vhodné mobilní fáze	41
5.1.3	Optimalizace poměru složek mobilní fáze	44
5.1.4	Optimalizace gradientu mobilní fáze.....	47
5.1.5	Kvalitativní charakteristika sledovaných analytů při definovaných chromatografických podmínkách	48
5.1.6	Kvantitativní charakteristika sledovaných analytů při definovaných chromatografických podmínkách - kalibrační přímky	49
5.2	Optimalizace SPE.....	50
5.2.1	Ověřované postupy SPE	51
5.3	Reálné vzorky odpadní vody.....	53
5.3.1	Matriční efekt	54
5.3.2	Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) stanovení ampicilinu.....	54
5.3.3	Výsledky analýzy reálných vzorků odpadní vody metodou UHPLC.....	54
5.4	Analýza reálných vzorků odpadní vody metodou HPLC/MS.....	57
5.4.1	Identifikace a kvantifikace ampicilinu	57
5.4.2	Optimalizace chromatografických podmínek.....	58
5.4.3	Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) stanovení ampicilinu.....	59
5.4.4	Výsledky analýzy reálných vzorků odpadní vody metodou LC/MS.....	60

6	Závěr	62
7	Citované zdroje	63
8	Seznam použitých zkratek	68

1 ANTIBIOTIKA A CHEMOTERAPEUTIKA

Antibiotika představují velkou skupinu léčivých látek používaných k prevenci a terapii infekčních a parazitálních chorob. Antibiotika jsou, a to společně s antimykotiky a antimikrobními chemoterapeutiky, látkami prioritně používanými k potlačení již vzniklé infekce probíhající v organismu.

Jedná se o látky, které jsou produkovány v průběhu metabolismu mikroorganismů a svým specifickým účinkem zasahují do růstu jiných mikroorganismů způsobujících infekci; to je princip, který jim umožňuje jejich přežití v infikovaném hostitelském organismu. Způsob takto vzniklých antibiotik představuje zásadní rozdíl v porovnání antibakteriálními chemoterapeutiky, které jsou syntetizovány uměle [1].

Nutno zde uvést, že antibiotika nejsou vůbec účinná proti infekcím způsobenými viry; rovněž pouze málo druhů antibiotik působí proti houbám a prvokům. Také v účinnosti antibiotik proti různým typům bakterií jsou značné rozdíly, na čemž se pravděpodobně nejvíce podílí i umístění infekce v organismu, tj. schopnost antimikrobiálních látek pronikat tkáněmi až k ohnisku vzniku infekce [2]. Některé bakterie však mohou být vůči danému druhu antibiotika resistentní.

Úzkospektrá antibiotika zasahují jen některé druhy bakterií, případně jen některé bakteriální rody; tuto skupinu nazýváme antibiotiky specifickými. Širokospektrá antibiotika naproti tomu likvidují velké spektrum mikroorganismů, včetně prospěšných symbiotických, které tvoří v organismu mikroflóru na povrchu sliznic; např. mikroflóra na povrchu střešní sliznice [2]. Podle způsobu svého působení na bakterie jsou antibiotika rozdělena na baktericidní a bakteriostatická. Baktericidní antibiotika bakterie usmrcují, bakteriostatická naopak zabráňují jejich množení. Velké množství bakteriostatických antibiotik působí ve vyšších koncentracích rovněž baktericidně [2].

Vzhledem k tomu, že antibiotika jsou v současnosti široce využívaná léčiva, je naprosto nezbytné, aby u každého druhu antibiotik byla známá jeho charakteristika a vlastnosti, tj. především mechanismus a citlivost působení, nežádoucí účinky a jeho farmakokinetika. Důležité je rovněž dodržovat pravidla jejich aplikace, protože nesprávné dávkování a užívání antibiotik může vést k vytvoření rezistence bakterií vůči danému druhu antibiotik [3].

1.1 Historie antibiotik

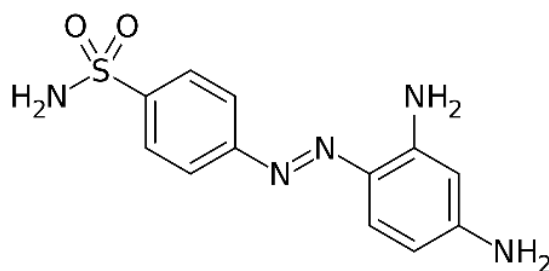
Využití antibiotik v boji proti infekčním nemocím odstartovalo uveřejnění teorie, která popisovala mikroorganismy jako původce mnoha onemocnění [4]. První zmínky o látkách mající antibakteriální účinky sahají až do 19. století, kdy v roce 1877 popsal francouzský vědec Louise Pasteur antagonistické působení některých anaerobní bakterií na růst bacilu *Bacillus anthracis*. Tento objev ho dovedl k myšlence využít tohoto poznatku v medicíně. Aplikaci prvních známých antibiotik však zabránila jejich toxicita, protože tato léčiva měla kromě antibakteriálních účinků také negativní účinky na hostitelský infikovaný organismus [5]. Vysoká toxicita zabránila například využití sekrece s antibakteriálními účinky, vylučovanou bakteriemi *Bacillus pyocyaneus*, které v roce 1888 izoloval německý vědec E. de Freudenreich [4].

Dalším vědcem, který se zabýval studiem antibakteriálních látek, byl německý lékař Paul Ehrlich, který v roce 1910 představil první moderní chemoterapeutikum, a to sloučeninu

s pořadovým číslem 606, nazvanou *arsphenamine*, později *Salvarsan*. Jednalo se o první chemickou sloučeninu, která prokazatelně vyléčila infekční nemoc. Látka byla až do objevu penicilinu používána jako lék proti všem formám syfilidy. Paul Ehrlich se za své objevy v této oblasti stal držitelem Nobelovy ceny [4].

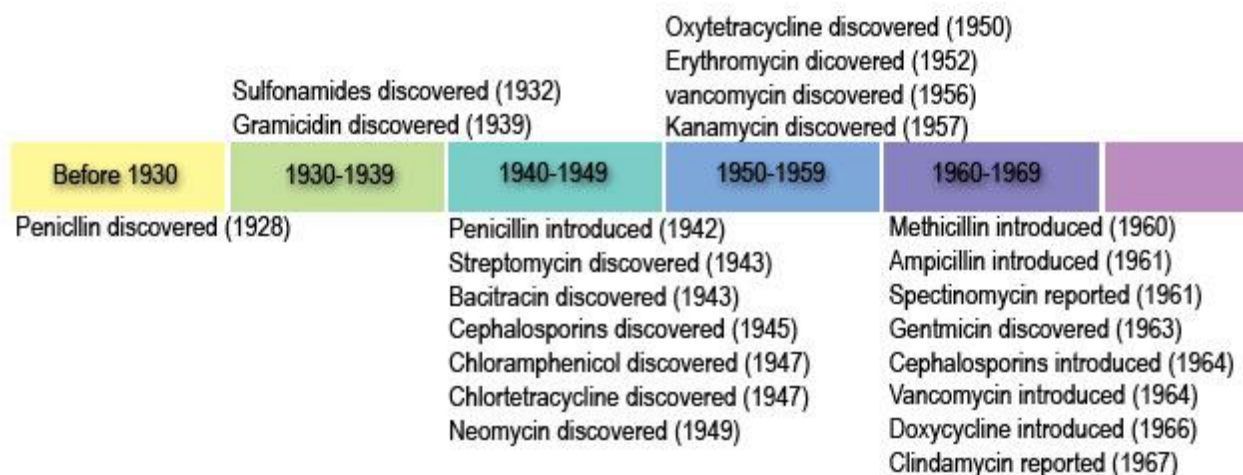
Nejvýznamnějším objevem v oblasti antibakteriální léčby byl v roce 1929 objev penicilinu Alexandrem Flemingem. Fleming však nebyl schopen penicilin rafinovat a vyprodukovat dostatečné množství aktivní složky, a proto byl pozitivní dopad tohoto objevu realizován až v roce 1940. V tomto období byl penicilin, a to s výbornými výsledky, testován týmem vědců vedených dvěma lékaři (Howard Walter Florey a Ernst Boris Chain). Testování bylo nejprve prováděno na zvířatech, později rovněž v humánní medicíně na klinických případech. Jednoznačně byl prokázán jeho léčebný účinek a především možnost aplikace penicilinu v lékařské praxi [4]. V roce 1945 potom obdrželi Alexander Fleming, Howard Florey a Ernest Chain Nobelovu cenu za objev penicilinu a jeho léčebného účinku, a to na různé infekční choroby [6].

Dalším významným příspěvkem byl objev německého patologa a bakteriologa Gerharda Domagka, který publikoval studii o antibakteriálních účincích sulfonamidů, tj. sloučenin odvozených od azobarviv. V podstatě se jedná o vedlejší produkty, které vznikly při výzkumu barviv [7]. Domagk vyvinul v roce 1933 první komerčně dostupné antibiotikum *Sulfonamidochrysoidine* (KI-730), které se na trh dostalo pod názvem *Prontosil*; také tento vědec obdržel, a to v roce 1939, za své významné výsledky, které byly ověřené v praxi Nobelovu cenu, a to za fyziologii a medicínu. Prontosil byl úspěšně používán především k léčbě některých infekčních onemocnění způsobených streptokoky a stafylokoky. Mezi prvními pacienty, kterým Domagk toto antibiotikum podal, byla jeho vlastní dcera, která byla nakažená streptokokovou infekcí; pomocí tohoto léku byla u ní infekce potlačena. Nežádoucím účinkem, který se projevil u Domagkovy dcery, bylo trvalé zčervenání kůže způsobené použitím léku odvozeným od červeného barviva [4].

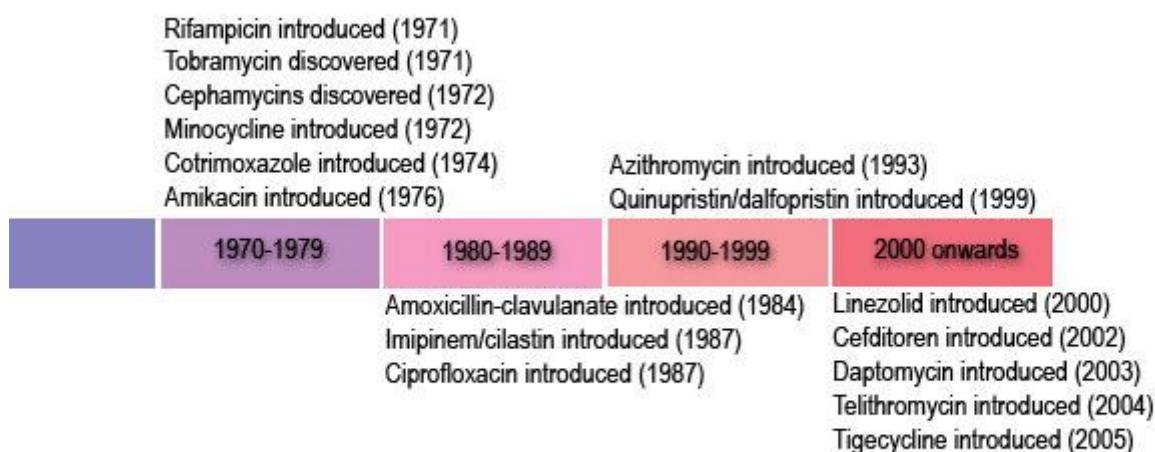


Obrázek 1: Chemická struktura Protosilu; 4-[(2,4-diaminofenyl) azo]-benzensulfonamid [8].

Od roku 1930 až po současnost bylo objeveno a popsáno mnoho dalších významných antibiotik, mezi které lze počítat streptomycin, bacitracin, chloramfenikol, chlortetracyklin, erythromycin aj. (Obrázek 2, Obrázek 3). Poměr mezi všemi dosud objevenými látkami s antibakteriálním účinkem a těmi, které již našly své uplatnění v humánní a veterinární lékařské praxi, je velký. Důvodem tohoto rozdílu je především toxicita většiny objevených antibiotik a chemoterapeutik [5].



Obrázek 2: Objevy antibiotik mezi léty 1930–1969 [4].



Obrázek 3: Objevy antibiotik mezi léty 1969–2005 [4]

1.2 Rozdělení antibiotik a antibakteriálních chemoterapeutik

Antibiotika a antibakteriální chemoterapeutika tvoří velmi početnou heterogenní skupinu látek vyznačujících se různými účinky. Z tohoto důvodu nelze všechna antibiotika rozdělit do skupin podle jednoho kritéria, a proto existuje celá řada klasifikací těchto léčivých látek.

Základním kritériem klasifikace antibiotika může být nejen jeho individuální charakterizace, ale také charakteristika příslušného vědního oboru, který se studiem této látky zabývá [9]. Rozhodujícím znakem klasifikace proto může být:

- 1) **Chemická struktura** – uplatňuje se při dělení z hlediska farmaceutické chemie [9]
- 2) **Mechanismus účinku** – uplatňuje se při dělení z mikrobiologického hlediska [9]
- 3) **Spektrum mikroorganismů**, které antibiotikum inhibuje (důležité především pro klinickou praxi) [9]:

- a) **úzkospektrá antibiotika** – zasahují jen některé bakteriální druhy nebo rody (peniciliny)
 - b) **širokospektrá antibiotika** – inhibují velké spektrum mikroorganismů (sulfonamidy)
- 4) **Charakter účinku** - uplatňuje se při mikrobiologickém a klinickém dělení
- a) **baktericidní antibiotika** – bakterie jsou látkou zahubeny
 - b) **bakteriostatická antibiotika** – látka zastavuje množení bakterií
– některé mohou mít při vyšších koncentracích baktericidní účinky

Tabulka 1: Přehled baktericidních a bakteriostatických antibiotik [10]

Baktericidní antibiotika		Bakteriostatická antibiotika
peniciliny	ansamyciny	chloramfenikol
cefalosporiny	nitroimidazoly	tetracykliny
monobaktamy	fluorochinolony	makrolidy
karbapenemy	nitrofurantoin	linkosamidy
aminoglykosidy	oxazolidinony	sulfonamidy
peptidy	streptograminy	imidazoly
glykopeptidy		glycylcykliny

- 5) **Původ a způsob přípravy antibakteriálních chemoterapeutik a antibiotik** [7]
- a) **přírozená** – zejména antibiotika; jsou to látky přírodního původu, primárně produkty metabolismu jiných mikroorganismů
 - b) **syntetická** – antibakteriální chemoterapeutika, která vznikají chemickou syntézou v laboratoři, nevyskytují se v přírodě
 - c) **semisyntetická** – došlo k obměně molekul původního přírodního antibiotika, čímž bylo často docíleno vzniku sloučeniny s výhodnějšími vlastnostmi než měl původní přírodní produkt.

Poznámka: Mezi antibiotika jsou zařazovány i jejich analogické formy (penicilin V), které jsou získávány syntetickými postupy ze základních látek nebo semisyntetických prekursorů. Termín *antibiotikum* je vázán k příslušné struktuře tohoto léčiva, nikoliv však k opravdovému původu látky. Za antibiotikum je proto považován i synteticky vyráběný cykloserin. Základní rozdíly mezi antibiotiky a chemoterapeutiky jsou tímto přístupem postupně stírány [1].

- 6) **Farmakokinetické vlastnosti** – dělení podle vstřebatelnosti, metabolické stálosti, délky působení [9]
- 7) **Cílový makroorganismus** [9]
- a) **humánní antibiotika**
 - b) **veterinární antibiotika**
- 8) **Léková forma a místo účinku** [9]
- a) **celková antibiotika:**
 - perorálně podávaná – aplikace ústy a vstřebávání trávicím traktem (penicilin)
 - parentálně podávaná – aplikace injekčně nebo inhalací (vankomycin)

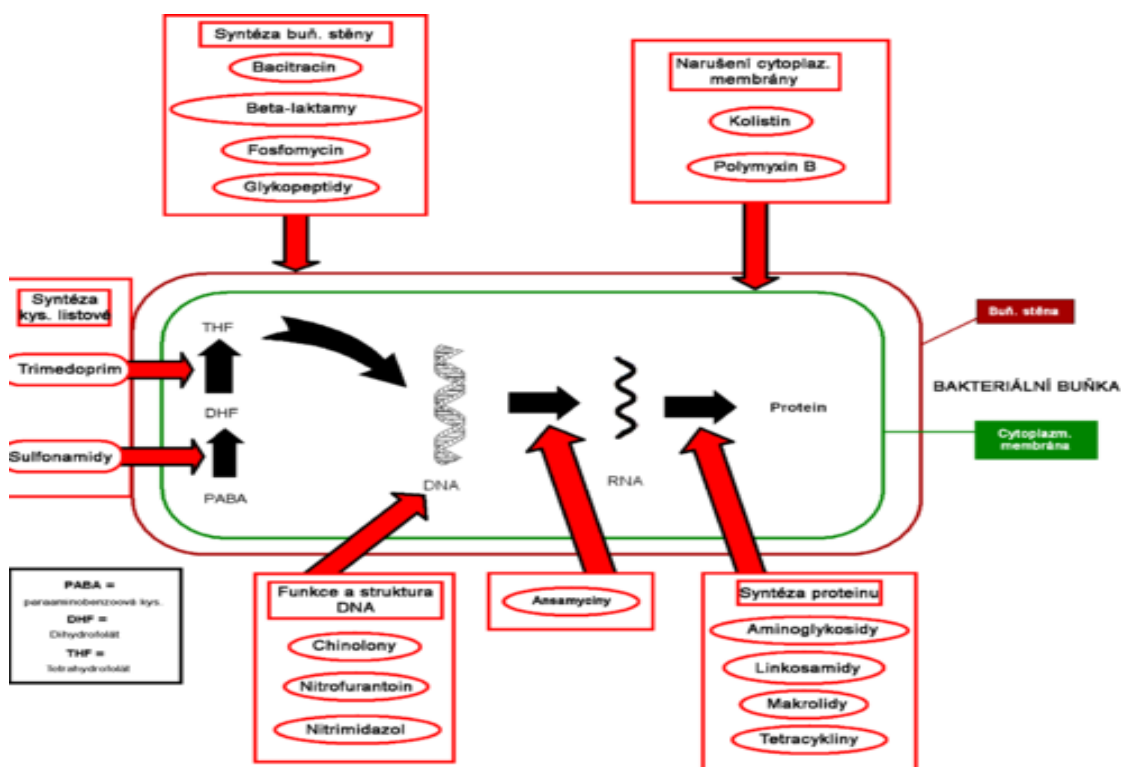
- b) **lokální antibiotika** – místní aplikace přímo na infikované místo (bacitracin)

1.3 Mechanismus účinku antibiotik

Klasifikace účinků antibiotik na mikroorganismy je založena na molekulárně biologických mechanismech, kterými antibiotika zasahují do metabolických cest původce infekce. Existují čtyři velké skupiny, do kterých lze antibiotické látky rozdělit tak, aby byly pokryty všechny mechanismy účinků antibiotik. Zároveň však může dojít k působení i několika mechanismů najednou [7].

- 1) **Antibiotika ovlivňující složky membrán bakterií**
 - a) **inhibice syntézy buněčné stěny** – bakteriální buňce je znemožněno dělení: Důvodem je navázání antibiotika na katalytické enzymy syntézy buněčné stěny. To vede k porušení funkce buněčné stěny, případně až k lýze buňky a k následné buněčné smrti. Jedná se proto o baktericidní mechanismus, kterým působí například penicilin a jeho deriváty, případně také cefalosporiny [11; 12].
 - b) **poškození funkce cytoplazmatické membrány:** Baktericidní mechanismus, kterým působí například polymyxin B, kolistin, polyeny a imidazoly [11; 12].
- 2) **Antibiotika ovlivňující buněčnou proteosyntézu** – bakteriostatický účinek je způsoben navázáním antibiotika na různá místa ribozomů, čímž specificky brání syntéze buněčných bílkovin. Mezi tato antibiotika patří například makrolidy, aminoglykosidy, tetracykliny, linkosamidy a vysoce toxický chloramfenikol [11; 12].
- 3) **Antibiotika ovlivňující syntézu nukleových kyselin** – látky se složitou strukturou a značnou toxicitou, tvořící přechod k chemoterapeutikům [7].
 - a) **antibiotika blokující DNA-gyrázu**, důležitou pro replikaci DNA (chinolová antibiotika) [12].
 - b) **antibiotika blokující RNA-polymerázu** – jsou toxické jak pro bakteriální buňku, tak také pro buňky infikovaného organismu [12].
- 4) **Antibiotika inhibující metabolismus bakteriální buňky** [12]

Tato antibiotika blokují v organismu bakteriální buňky syntézu kyseliny listové z kyseliny *p*-aminobenzoové. Bakteriální buňky jsou za normálních okolností schopny si kyselinu listovou sami syntetizovat; jsou-li však vystaveny této skupině antibiotik, nejsou schopny zabudovat kyselinu *p*-aminobenzoovou do koenzymů kyseliny listové a syntetizovat ji. Mezi tato antibiotika patří především sulfonamidy.



Obrázek 4: Schématické znázornění mechanismu účinku antibiotik na bakteriální buňku [13]

1.4 Toxicita a nejzávažnější nežádoucí účinky antibiotik

V ideálním případě by měly léky používané proti infekci vykazovat vysoce selektivní účinky na infekční agens (původce infekce); zároveň by však měl být co nejméně ovlivněn nakažený hostitelský makroorganismus, například zásahem do přirozené mikroflóry [7]. Například beta-laktamová chemoterapeutika působí pouze na struktury, které se v makroorganismu přirozeně nevyskytují. Nežádoucí účinky jsou podle mechanismu vzniku rozděleny na toxické, alergické a biologické [14].

1.4.1 Toxicita antibiotik

Obecně lze konstatovat, že se u všech léčiv často projevují účinky příznivé i ty nepříznivé, mezi které patří mimo jiné i projevy toxicity, které lze charakterizovat jako vysoce závažné. Naprostá většina látek vpravených do organismu (nox), tj. i léčiv včetně antibiotik, je v organismu metabolizována procesy, které jsou nazývány biotransformace a mohou vést ke vzniku účinnějších, avšak v řadě případů i toxičtějších látek, než byla látka původní. Proces zvyšování toxicity je nazýván letální syntéza [7]. Z výše zmíněných důvodů je důležitá informovanost o základních vlastnostech aplikovaných látek, zahrnujících zejména jejich farmakokinetiku a farmakodynamiku, které vysvětlují případné účinky, které nesouvisí s protiinfekčním působením antibiotik a které mohou být hlavní příčinou toxicity antibiotik na makroorganismus [14].

S toxickými projevy se můžeme do určité míry setkat téměř u všech antibiotik. Druh a závažnost toxických účinků jsou dány stupněm selektivní toxicity, množstvím účinné látky v dávce, způsobem podávání dávky a akutním stavem organismu. Toxicita se může projevit

méně vážnou lokální bolestivostí po nitrosvalové aplikaci nebo závažnějšími projevy. Mezi nejzávažnější toxické projevy antibiotik, které se u některých typů mohou projevit již po podání běžné terapeutické dávky, patří gastrointestinální, hematotoxické, hepatotoxické, nefrotoxické a neurotoxické projevy. Nejčastějšími projevy jsou projevy gastrointestinální, zahrnující nevolnost, nauzeu, průjem a zvracení. Typickým hematotoxickým projevem je porucha krvetvorby, nefrotoxické účinky mohou vést až k selhání ledvin, projevy hepatotoxicity bývají většinou přechodné a více časté u jedinců s již poškozenými játry.

Nežádoucí účinky lze rozdělit, a to podle frekvence jejich výskytu, takto: velmi časté ($\geq 1/10$); časté ($\geq 1/100$ až $< 1/10$); méně časté ($\geq 1/1\ 000$ až $< 1/100$); vzácné ($\geq 1/10\ 000$ až $< 1/1\ 000$); velmi vzácné ($< 1/10\ 000$) [15].

1.4.2 Potlačení normální mikrobiální flóry

Použití antiinfekčních léčiv se širokým spektrem účinku může vést k zánubě přirozených mikroorganismů v makroorganismu, což může mít za následek i poruchy přirozené mikrobiální rovnováhy organismu, tzv. dismikrobii. Dismikrobie se projevuje převážně průjmy, může však vést až ke vzniku superinfekce rezistentními druhy mikrobů [14].

1.4.3 Alergie

Nejčastějšími nežádoucími účinky antibiotik jsou alergické reakce. U antibiotik se může vyvinout léková alergie, která se projevuje alergickou reakcí organismu na opakovaně podávanou látku. Rovněž se může vyvinout i po podání látek podobné chemické struktury. Alergii lze vztahovat i na látky podané sice poprvé, avšak pouze na ty, se kterými byl organismus v kontaktu již jiným způsobem. U pacientů s častými plísňovými onemocněními může tímto způsobem vzniknout alergie na penicilin [14; 16].

Projevy alergie na antibiotika jsou různorodé a postihují širokou škálu orgánů. Většinou platí, že různé látky vyvolávají přednostně určitý typ alergické reakce a frekvence užívání určuje vážnost této reakce. Sulfonamidy vyvolávají především dermatitidy, peniciliny kopřivku nebo svědění [14].

1.5 Antimikrobiální účinnost antiinfekčních látek

Antimikrobiální účinky protiinfekční látky jsou charakterizovány třemi způsoby, tj. antimikrobiálním spektrem, aktivitou a rezistencí mikroorganismů, které společně vyjadřují antimikrobiální účinnost daného antibiotika.

Antimikrobiální účinnost je mírou intenzity účinku protiinfekčního terapeutika na určité mikrobiální druhy, u kterých je následně vyjádřena citlivost vůči působení dané antiinfekční látky [16].

Na základě tohoto pozorování je stanovena tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC) antimikrobní látky, která je schopná zastavit růst daného mikroorganismu. Analogickým způsobem je zjišťována minimální baktericidní koncentrace (MBC), tj. nejnižší koncentrace antimikrobní látky snižující růst bakterií o 90 % [14].

1.6 Rezistence

Pro terapii infekčních chorob je důležitým faktorem rezistence, která je definována jako odolnost mikroorganismu vůči účinku antimikrobiálních látek. Rezistenci můžeme rozdělit na podkladě několika faktorů [14]:

- a) **absolutní rezistence** – mikroby nemají ve své buňce žádné cílové struktury, které by mohly být antimikrobiální látkou ovlivněny
- b) **relativní rezistence** – mikroby mají ve své buňce cílové struktury, které by mohly být antimikrobiální látkou ovlivněny, avšak v plazmě makroorganismu není dosaženo dostatečné koncentrace antimikrobiální látky

Dále může být rezistence rozlišována na:

- a) **primární rezistenci** – geneticky podmíněná, přirozená odolnost vůči antimikrobiální látce
- b) **sekundární rezistenci** – získaná odolnost vůči antimikrobiální látce u původně citlivých kmenů bakterií na tuto látku

Právě sekundární rezistence je v současné době velkým problémem léčby bakteriálních infekcí. Mnoho bakteriálních kmenů si v průběhu času dokázalo vyvinout sekundární rezistenci vůči určitým typům antibakteriálních látek, což má za následek to, že dříve účinné látky se stávají neúčinnými. Z farmakologického hlediska je proto důležité používat při terapii pouze účinná antibiotika a chemoterapeutika, a to ve správných dávkách a vyhnout se tak zbytečnému užívání těchto látek, pokud to není opravdu nezbytně nutné. Rovněž by mělo být přihlédnuto ke klinickému stavu pacienta a k současné epidemiologické situaci, například také k aktuálnímu stavu rezistence mikroorganismů. Těmito postupy lze zabránit vzniku rezistence antibiotik vůči určité antimikrobiální látce [14]. Ke vzniku rezistence může dojít také po kolísání terapeutické koncentrace antimikrobiální látky, případně po předčasném ukončení léčby.

Pro účelné a bezpečné používání antibiotik byl vypracován závazný dokument, nazvaný „Návrh antibiotické politiky v České republice“, na základě kterého byla všechna používaná antibiotika rozdělena do dvou kategorií. Antibiotika náležící do první skupiny mohou být lékaři předepisována bez porady s Antibiotickým střediskem. Naproti tomu antibiotika náležící do druhé skupiny mohou být předepisována pouze po poradě lékaře s Antibiotickým střediskem [14].

1.7 Farmakokinetika antiinfekčních látek

Organismy zasažené stejnou infekcí mohou reagovat na stejnou antimikrobiální léčbu odlišným způsobem. Na tomto jevu se podílí nejen imunitní systém organismu, ale především schopnost infikovaného organismu ovlivnit osud podané léčebné látky, a to především koncentraci léčiva v organismu v závislosti na čase – **farmakokinetika léčiva** [11].

Mezi farmakokinetické procesy patří zejména adsorpce léčiva po jeho podání, distribuce léčiva v organismu, metabolické přeměny léčiva, eliminace léčiva nebo jeho metabolitů z organismu [5]. Znalost farmakokinetiky antimikrobiálních látek umožňuje vypracovat plán optimálního dávkování těchto látek a pro pacienta tak zajistit jejich maximální terapeutický účinek, případně upravit dávkování u patologických poruch organismu, tj. především poruchy ledvin a jater [11].

1.7.1 Adsorpce

Za adsorpci jsou považovány procesy zajišťující pohyb léčivé látky z místa podání do krevního oběhu (systémové cirkulace). Tyto procesy jsou značně ovlivňovány lékovou formou podaného léčiva, tj. zda se jedná o antibiotika celková (perorální a parentální) nebo topická.

1.7.1.1 Perorální podání antibiotika [5]

Výhody: pohodlnost, bezpečnost, cena.

Nevýhody: adsorpce je pomalejší a závisí na tom, kde je léčivo z lékové formy uvolňováno (např. hrozí poškození léčiva enzymy a kyselými žaludečními šťávami, a to při uvolnění z lékové formy v žaludku); často proto může docházet až k podráždění gastrointestinálního traktu.

Řešení některých nevýhod: vhodné složení lékové formy umožní uvolňování léčivé látky až ve střevě, čímž dojde k eliminaci rizika poškození léčivé látky žaludečními šťávami; takto je eliminováno i podráždění sliznice žaludku.

1.7.1.2 Parentální podání antibiotika [5]

Může se uskutečnit několika způsoby, tj. intravenózní, intramuskulární a subkutánní injekce a infúze.

Formou injekce je do organismu jednorázově vpraveno malé množství roztoku léčiva (ml), zatímco formou infúze většinou stovky mililitrů roztoku léčiva během několika hodin.

Rychlost adsorpce při parentálním podání léčiva je ovlivněna způsobem jeho provedení. Při intravenózním vpravení léčiva do organismu dochází k jeho okamžitému vstupu do systémové cirkulace a fáze adsorpce je proto téměř eliminována. Fáze adsorpce není eliminována při intramuskulárním a subkutánním podání. Významnou roli při parentálním podání léčiva hrají také fyzikálně-chemické vlastnosti terapeutické látky.

1.7.1.3 Topické, tj. lokální podání antibiotika:

Při tomto způsobu podání většinou dochází k účinku pouze v místě aplikace případně v jeho těsné blízkosti [5].

1.7.2 Distribuce

Distribuce léčiva v organismu je ovlivňována jeho vazbou na některé struktury organismu. V této souvislosti je možno jmenovat receptory ve tkáních, červené krvinky, případně některé z proteinů krevní plazmy. Pevnost vazby protein-léčivo je vyjádřena vztahem pro rovnovážnou konstantu K :

$$K = \frac{c_{LP}}{c_L c_P}, \quad \text{Rovnice (1)}$$

kde c_L je rovnovážná koncentrace volného léčiva, c_P je rovnovážná koncentrace volného proteinu a c_{LP} je rovnovážná koncentrace komplexu léčivo-protein.

Dalším farmakokinetickým procesům, jako je biotransformace nebo eliminace, může následně podléhat pouze nevázané léčivo; rovněž pouze nevázané léčivo může vykazovat farmakodynamické účinky (účinky léčiva na organismus). Dojde-li však ke snížení koncentrace volného léčiva, komplex léčivo-protein krevní plazmy se rozpadne a rovnováha

prezentována pomocí rovnice (*Rovnice 1*) se obnoví. Komplex léčivo-protein může v tomto případě představovat důležitý depot (zásobu) léčivé látky [5].

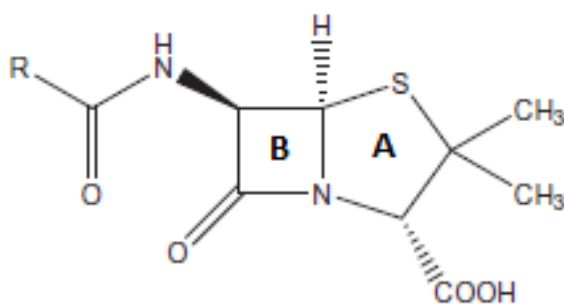
1.7.3 Biotransformace a vylučování

K biotransformaci všech léčiv obsažených v organismu dochází vesměs působením specifických i nespecifických enzymových reakcí; většinou se jedná o dvoustupňový proces. Cílem biotransformace je vznik snadněji ve vodě rozpustných látek, které se lépe vylučují z organismu. Metabolická přeměna vede častěji ke vzniku neúčinného metabolitu (inaktivace, detoxikace), někdy ke vzniku účinnější látky (aktivace). Vznik metabolitu, který vykazuje shodný farmakodynamický účinek jako původní aplikované léčivo, není běžný. Pouze výjimečně však nedochází k biotransformaci léčiva vůbec (léčivo je vyloučeno v nezměněné podobě) [5].

Schopnost organismu eliminovat látku je ve zjednodušené podobě lze vyjádřit veličinou nazývanou poločas rozpadu, který je někdy také označován jako biologický poločas. Vyjadřuje dobu, za kterou klesne koncentrace léčiva v systémové cirkulaci organismu na polovinu své počáteční hodnoty [5].

2 AMINOPENICILINOVÁ ANTIBIOTIKA

Aminopenicilinová antibiotika, nazývaná rovněž aminopeniciliny, vznikají úpravou postranního řetězce přirozeného penicilinu. Přirozený penicilin patří mezi tzv. β -laktamová antibiotika, které více než 80 let představují nejvýznamnější skupinu antimikrobiálních látek. Mezi β -laktamová antibiotika patří kromě penicilinů také cefalosporiny a karbapenemy. Penicilinová antibiotika jsou odvozena od 6-aminopenicilanové kyseliny (6-APA); jejich základní strukturu tvoří thiazolidinový kruh, který je napojený na čtyřčlenný β -laktamový kruh, ke kterému je připojena sekundární aminoskupina s postranním řetězcem [17]. Nositelem antibakteriálního účinku je β -laktamový kruh, který může za určitých podmínek (příliš kyselý/zásaditý pH, teplo, chlad) podléhat degradaci [18]. Antibakteriální účinek těchto antibiotik spočívá v inhibici syntézy buněčné stěny citlivých druhů bakterií [17].



Obrázek 5: Chemická struktura penicilinů: A - thiazolidinový kruh, B - β -laktamový kruh, R – postranní řetězec [32]

Aminopeniciliny jsou v lidském těle distribuovány v extracelulární tekutině, a proto jsou vhodné především k léčbě středně těžkých až těžkých infekcí, dále rovněž na dobře prokrvených tkáních, případně infekcí v krevním řečišti. Naproti tomu nejsou vhodné pro povrchové nebo slizniční infekce [19].

Aminopeniciliny patří mezi nejčastěji předepisovaná antibiotika jak v České republice, tak také ve světě. Ze skupiny aminopenicilinů jsou v ČR registrovány především ampicilin a amoxicilin, případně kombinované přípravky amoxicilin-kyselina klavulanová a také ampicilin-sulbactam, které byly popsány a následně jsou používány ve snaze zabránit narůstající rezistenci mnoha bakteriálních druhů. Jedná se o tzv. chráněné aminopeniciliny obsahující kromě ampicilinu a amoxicilinu inhibitor β -laktamázy (kyselina klavulanová, sulbactam, případně tazobactam). Mechanismus působení β -laktamázy viz níže [19].

Tabulka 2: Přehled aminopenicilinových antibiotik registrovaných v ČR [19]

Antibiotikum		Příklady přípravků registrovaných v ČR	
skupina	složení	parentální podání	orální podání
Základní aminopeniciliny	ampicilin	Ampicilin Biotika	-
	amoxicilin	-	Amoclen, Amoxicilin, Duomax, Ospamox
Aminopeniciliny s inhibitory beta-laktamázy	Ampicilin + sulbactam	Ampicilin + Sulbactam, Unasyn	Unasyn
	Amoxicilin + kys. klavulanová	Amoksiklav, Augmentin	Amoksiklav, Augmentin, Amoxicilin Ratiopharm Comp, Betklav a další

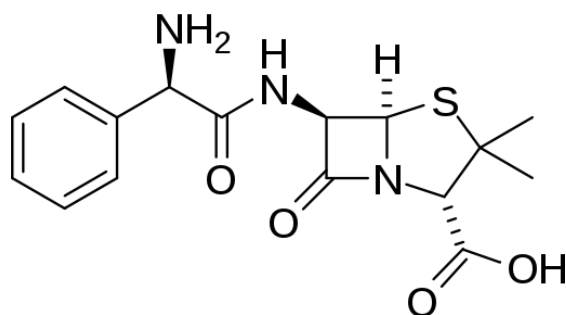
2.1 Ampicilin

2.1.1 Názvosloví a chemická struktura

Chemické názvosloví podle IUPAC:

7-(2-amino-2-fenyl-acetyl)amino-3,3-dimethyl-6-oxo-2-tia-5-azabicyklo[3.2.0]heptan-4-karboxylová kyselina

Chemická struktura:

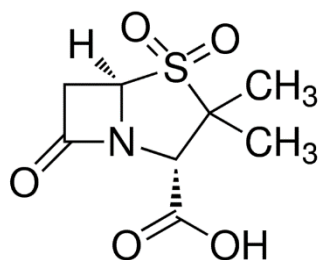


Obrázek 6: Chemická struktura ampicilinu [20].

2.1.2 Charakteristika ampicilinu

Ampicilin patří do farmakoterapeutické skupiny aminopenicilinů, jejichž účinnou látkou je stejnojmenný ampicilin [21]. Ampicilin byl připraven úpravou postranního řetězce přirozeného penicilinu [17]. Jedná se o penicilinové semisyntetické širokospektrální baktericidní antibiotikum, citlivé na β -laktamázu zlatých stafylokoků a gramnegativních bakterií [15; 21]. Tyto kmeny bakterií si již vypěstovaly proti ampicilinu rezistenci a jsou schopny ho štěpit pomocí bakteriálního enzymu β -laktamáza. To byl také hlavní důvod, proč se začal vyrábět lék Ampicilin/Sulbactam, který kromě ampicilinu obsahuje i sloučeninu sulbactam. Sulbactam β -laktamázu neutralizuje, čímž je struktura ampicilinu chráněna [21; 22].

Baktericidní účinek ampicilinu spočívá v blokadě syntézy buněčné stěny bakterie s následnou bakteriolýzou. Toto ampicilinové antibiotikum je vzhledem k širokému antibakteriálnímu spektru účinku ampicilinu vhodné k léčbě mnoha běžných bakteriálních infekcí, tj. především infekcí horních cest dýchacích, zánětu dutin, zánětu středního ucha, zápalu plic a močové infekce [15].



Obrázek 7: Chemická struktura sloučeniny sulbactam [23]

2.1.2.1 Antibakteriální spektrum ampicilinu

Ampicilin působí na všechny kmeny hemolytických streptokoků, včetně streptokoků skupiny A a B, dále na pneumokoky, enterokoky, corynebakteria, listérie, *Bacillus anthracis* a rovněž na aktinomycey, méně často však na klostridia. U stafylokoků je účinný pouze na ty kmeny, které netvoří β -laktamázu, což je pouze 10 % kmenů [15].

U gramnegativních bakterií je nejvýznamnější vysoká účinnost na meningokoky a na salmonely; méně citlivé jsou hemofily, bordetely a *Escherichia coli* (60 %) [15].

Z anaerobních zástupců původce infekcí je na ampicilin citlivá většina grampozitivních koků a bakterií, s výjimkou *Bacillus fragilis*. Nepůsobí však na mykobakteria, mykoplasmata, chlamydie, houby a prvoky [15].

2.1.2.2 Nežádoucí účinky ampicilinu

Nežádoucí účinky se objevují nejčastěji mezi 7. až 10. dnem od zahájení terapie a můžeme je identifikovat u 10 až 15 % pacientů [15]. Podle frekvence nežádoucích účinků prezentovaných v kapitole (*Kapitola 1.4.1*), je ampicilin charakterizován tímto způsobem v následující tabulce (*Tabulka 3*).

Tabulka 3: Nežádoucí účinky ampicilinu [15]

Porucha	Projevy	frekvence
Imunitní systém	riziko zkřížené senzibilizace s peniciliny	velmi časté
	riziko zkřížené senzibilizace s cefalosporiny, anafylaktický šok, edém	méně časté
Kůže a podkožní tkáň	ekzém, kopřivka	méně časté
Krev a lymfatický systém	purpura, trombocytopenie	vzácné
Játra a žlučové cesty	poruchy funkce jater	vzácné
Gastrointestinální poruchy	nauzea, zvracení, průjem	méně časté
Poruchy nervového systému	bolesti hlavy	velmi vzácné
Psychiatrické poruchy	poruchy spánku a osobnosti	velmi vzácné

2.1.3 Způsob podání a dávkování ampicilinu

Léková forma antibiotika ampicilinu existuje pouze ve formě roztoků a je určena především k injekčnímu intravenóznímu podání, a proto se aplikuje spíše u hospitalizovaných pacientů. Parenterálně je ampicilin podáván především při těžkých infekcích, kde musí být použity vysoké dávky, případně při zahájení léčby, v níž se dále pokračuje perorální aplikací amoxicilinu, který má podstatně lepší biologickou dostupnost (*Kapitola 2.2*) [15].

Obvykle podávaná denní dávka pro dospělého je 200 – 300 mg/kg tělesné hmotnosti za den, při těžších infekcích až 400 mg/kg tělesné hmotnosti za den. Denní dávka pro dítě je 1 700 – 2 300 mg/m² tělesného povrchu nebo 50 – 400 mg/kg tělesné hmotnosti. Denní dávka se rozděluje na 4 dávky, které jsou aplikovány intramuskulárně nebo intravenózně. Při léčbě bacilonosičů salmonel je současně aplikováno i léčivo probenecid, a to na udržení vysokých plazmatických hladin ampicilinu [15].

Podávání tohoto antibiotika by při běžných infekcích mělo trvat 7 – 14 dnů, při vážných stavech však i déle [15].

2.1.4 Distribuce a eliminace ampicilinu z organismu

Ampicilin se dobře distribuuje do většiny tkání a tělních dutin; výjimkou je mozkomíšní mok. Do mozkomíšního moku proniká pouze při zánětu mozkových blan. V játrech a ledvinách je koncentrace ampicilinu srovnatelná s koncentrací v krevní plazmě. Maximální plazmatická koncentrace je dosažena nejrychleji při intravenózním a intramuskulárním podání. Již bylo prokázáno, že u gravidních žen může ampicilin pronikat i placentární bariérou a v nízkých koncentracích tak může přecházet i do mateřského mléka. Dobře je vylučován rovněž do žluče, kde vytváří terapeuticky účinné koncentrace [15].

Biologický poločas ampicilinu je přibližně 1 – 1,5 hodiny a k jeho eliminaci dochází v ledvinách, a to především tubulární sekrecí. Podáním probenecidu (léčivo aplikované na onemocnění dny) dochází k inhibici tubulární sekrece, čímž je biologický poločas ampicilinu prodloužován. Za normálních podmínek je po intramuskulárním podání po 24 hodinách vyloučeno močí (částečně i stolicí) 64 % ampicilinu, po intravenózním podání 70 %. Při selhání ledvin je biologický poločas ampicilinu prodloužen až na 20 hodin a z organismu ho lze odstranit také hemodialýzou. Hemodialýza může být indikována rovněž při předávkování ampicilinem. Vzhledem k velké terapeutické šíři ampicilinu je však předávkování tímto antibiotikem nepravděpodobné [15].

2.1.5 Interakce ampicilinu s jinými léčivy

Interakce ampicilinu s peniciliny může způsobit zkříženou senzibilizaci. Při současně aplikaci s bakteriostatickými antibiotiky (tetracykliny, chloramfenikol a erytromycin) dochází k antagonismu (soupeření). Při kombinaci s aminoglykosidovými antibiotiky se naopak projevuje zvýšení antimikrobiální účinnosti, a to rozšířením antimikrobiálního spektra [15].

Současné podávání diuretik (látky zabraňující nebo regulující vylučování moči) snižuje plazmatické koncentrace ampicilinu. Ampicilin může snižovat účinek perorálně podávané antikoncepce obsahující estrogen, a proto by pacientky užívající perorální hormonální antikoncepci měly být upozorněny na skutečnost, že účinky hormonální antikoncepce mohou během podávání antibiotika selhat [15].

Při podávání ampicilinu spolu s alopurinolem se zvyšuje frekvence výskytu alergických kožních reakcí. Současné podání probenecidu zpomaluje vylučování; u dětí do 2 let je však probenecid kontraindikován, což má za následek to, že není dětem podáván [15].

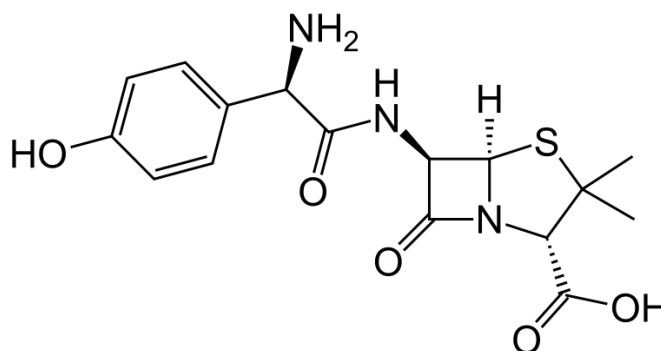
2.2 Amoxicilin

2.2.1 Názvosloví a chemická struktura

Chemické názvosloví podle IUPAC:

(2*S*, 5*R*, 6*R*)-6-[(2*R*)-2-amino-2-(*p*-hydroxyfenyl)acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptan-2-karboxylová kyselina

Chemická struktura:



Obrázek 8: Chemická struktura amoxicilinu [24]

2.2.2 Charakteristika

Amoxicilin byl objeven roku 1972, jako další ze skupiny semi-syntetických penicilinů. Vyznačuje se lepším vstřebáváním z trávicího ústrojí než původní penicilin a ampicilin [19]. Rovněž to je semi-syntetické β -laktamové antibiotikum, analogické ampicilinu, s širokým antibakteriálním spektrem a baktericidními účinky na mnoho gram-pozitivních a gram-negativních bakterií. Protože je analogem k ampicilinu, je antibakteriální spektrum amoxicilinu, jeho nežádoucí účinky a také způsob dávkování, a to až na drobné odchylky, téměř totožné s charakteristikou uvedenou pro ampicilin.

2.2.3 Způsob podání amoxicilinu

Lékovou formou amoxicilinu je roztok, který je určený k intravenóznímu nebo intramuskulárnímu podání, případně je dostupný také v lékové formě určené pro orální aplikaci. Možnosti způsobu podávání jsou také jedním z největších rozdílů mezi amoxicilinem a ampicilinem, který je v ČR dostupný pouze v lékové formě jako roztok [19].

2.2.4 Distribuce a eliminace amoxicilinu z organismu

Pro distribuci a eliminaci amoxicilinu platí stejná pravidla jako pro ampicilin. Největší rozdíl je však ve vstřebávání amoxicilinu z trávicího traktu. Ampicilin se z trávicího traktu vstřebává nespolehlivě, tzn., že jeho biologická dostupnost představuje pouze 30 – 60 % podané dávky a zbývajících 40 – 70 % zůstává nevyužito. Již bylo publikováno, že může dokonce působit negativně, protože narušuje střevní bakteriální mikroflóru. Vstřebávání amoxicilinu je v porovnání s ampicilinem dvakrát lepší, protože jeho biologická dostupnost dosahuje až 80 % a je méně ovlivněno potravou [19].

2.2.5 Interakce amoxicilinu s jinými léčivy

Při současné aplikaci amoxicilinu s bakteriostatickými antibiotiky (tetracykliny, chloramfenikol), makrolidovými antibiotiky a sulfonamidy dochází k antagonizmu. Při interakci s Allopurinolem, který je používán při léčbě a prevenci dny, je často zaznamenáván zvýšený výskyt kožní vyrážky a alergie. Brobenecid v kombinaci s amoxicilinem snižuje tubulární sekreci, což zvyšuje plazmatickou koncentraci amoxicilinu; rovněž způsobuje udržování množství amoxicilinu v terapeutické koncentraci delší dobu [25].

Pozitivní interakci má s amoxicilinem také kyselina klavulanová, která způsobuje synergický baktericidní účinek, což se projevuje tak, že podporuje baktericidní účinek amoxicilinu, a to při neutralizaci bakteriálního enzymu β -laktamázy [25].

Při užívání amoxicilinu je možné, že test na obsah glukózy v moči by mohl vykazovat falešně pozitivní reakci [25].

3 STANOVENÍ ANTIBIOTIK

Nízké koncentrace sledovaných analytů a složitost matrice, která je závislá na druhu odebraného vzorku (podzemní, povrchové nebo odpadní vody; vzorky potravin, vzorky biologických tekutin, tj. krev a krevní plazma), vyžadují pro stanovení β -laktamových antibiotik nutnost stálého vývoje a použití optimalizovaných, vysoce citlivých a selektivní metod. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je často používanou metodou pro stanovení antibiotik v potravinách a ve složkách životního prostředí (tzv. environmentální analýza), a to především v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (MS) [17].

Finálnímu stanovení koncentrace léčiv, v našem případě antibiotik ve vzorcích odpadních vod, předchází důležitá preanalytická úprava, která zahrnuje především správný odběr a transport vzorků. Také jejich uchování do doby zahájení analýzy a příprava k analýze jsou základními požadavky pro získání spolehlivých a realitě odpovídajících výsledků. V literatuře již bylo prezentováno, že chybně provedené vzorkování se může na celkové nejistotě dosažených výsledků podílet až 85 % [26].

Pro stanovení léčiv ze vzorků odebraných z vodního ekosystému se vypracovávají standardní operační postupy (SOP), které zahrnují tři hlavní kroky:

- vzorkování (vlastní odběr vzorku, jeho zakonzervování a transport do laboratoře)
- extrakce (zakonzentrování a přečištění extraktu obsahujícího analyty)
- vlastní analýza vhodnou instrumentální technikou.

3.1 Metody stanovení léčiv (antibiotik)

3.1.1 Vzorkování

Odběr vzorku, v tomto případě odpadní vody, musí být proveden odborně podle validovaného způsobu tak, aby byl odebraný vzorek reprezentativní. Správné vzorkování je základem úspěšné analýzy, protože chyba způsobená při vzorkovacím procesu je již neodstranitelná [26; 27].

V současné době jsou pro odběr vzorků odpadní vody využívány automatické vzorkovače, jejichž největší výhodou je možnost nepřetržitého a opakovatelného odbírání vzorku, a to v přesných a předem určených časových intervalech. Při samotném procesu vzorkování povrchových vod automatickým vzorkovačem je nutné dbát na to, aby tento vzorkovač byl umístěn v takovém místě a v takové hloubce vodních toků nebo nádrží, aby nedocházelo nejen k nasávání sedimentů ze dna, ale ani různých materiálů z povrchu hladiny. Rovněž je možné vzorkování provést přímo do vzorkovnice, tj. do nádoby určené na uchování a transport vzorku [26]. Vzorkovač i vzorkovnice musí být vyrobeny z materiálu, který neovlivňuje stanovované parametry vzorku; proto se nejčastěji používají skleněné nebo plastové vzorkovnice. Bylo však již prokázáno, že plastové nádoby nejsou vždy pro odběry vhodné, a to z důvodu možné sorpce některých látek na polyethylen. Proto je pro analýzu léčiv vhodnější provádět vzorkování do skleněných vzorkovnic, nejlépe vyrobených z tmavého skla. Pokud není analyzovaná složka stabilní, je nutné navíc vzorek po odběru konzervovat a transportovat ho při nižších teplotách v chladicím zařízení [28].

Při odběru je důležité zaznamenat si podrobně podmínky odběru, tj. místo, datum, čas, povětrnostní podmínky, teplotu vzduchu, teplotu vody, jevy ukazující se na hladině a průtok. K tomuto účelu je vždy vyplňován tzv. odběrový protokol, obsahující kromě výše zmíněných informací rovněž jméno toho, kdo vzorkování provedl, informaci o typu odběru a druhu vzorku [26].

3.1.1.1 Odběr odpadní vody

Z oblasti vzorkování vod je nejobtížnější odebrat reprezentativní vzorek z odpadních vod. Odpadní voda se ve srovnání s přírodní nebo pitnou vodou vyznačuje větší nehomogenitou a její složení není konstantní, avšak mění se v čase i prostoru [26; 29]. Ideálním místem pro správné provedení odběru je místo s turbulentním prouděním, kde nelze předpokládat velký výskyt nerozpuštěných látek. Vzorkování zde lze provést manuálně přímým odběrem do vzorkovnic nebo pomocí naběráku, případně pomocí automatického vzorkovače [26].

Nejčastěji je odpadní voda odebírána na přítoku a na odtoku z ČOV. Na přítoku na ČOV vykazuje odpadní voda značnou míru nehomogenity, a proto musí být místo odběru vybíráno velice pečlivě. Naopak vzorkování již vyčištěné vody na odtoku není tak problematické. Jednorázovým odběrem se získávají bodové vzorky, které umožňují sledovat a porovnávat naměřené hodnoty koncentrací analyzovaných složek v jednotlivých časových intervalech. Naproti tomu odběrem několika individuálních vzorků za den (např. 24 individuálních vzorků za den, tj. jeden vzorek každou hodinu) získáme směsný vzorek, který udává průměrnou hodnotu koncentrací posuzovaných analytů obsažených v odpadní vodě [30].

Celý proces vzorkování, tj. od plánu vzorkování, až po samotný odběr vzorku, jeho konzervaci a transport odpadní vody do laboratoře, by měl být prováděn v souladu se státní normou pro odběry odpadních vod [31]:

- ČSN ISO 5667-10 Jakost vod. Odběr vzorků. Část 10: Pokyny pro odběr vzorků odpadních vod

3.1.2 Separační metody - extrakce

Je-li nutné léčivo zjišťované ve vodním ekosystému izolovat z pevné fáze, tj. ze sedimentu nebo z čistírenského kalu, vzorek je v tomto případě nejprve vysušen a zhomogenizován a teprve potom je provedena izolace léčiv ze vzorku extrakcí.

Extrakce léčiv z pevných podílů může být provedena několika metodami: pomocí ultrazvuku (USE), zrychlenou extrakcí rozpouštědlem (PSE), mikrovlnnou extrakcí (MAE) nebo tlakovou kapalinovou extrakcí (PLE). Pokud je nutné extrakt ještě přečistit a zakonzentrovat, je možné aplikovat metodu extrakce tuhou fází (SPE), případně gelovou permeační chromatografii (GPC) [27].

Úprava vzorků odpadní vody před finální analýzou spočívá zejména v technice filtrace. Nejčastěji se vzorek nejprve filtruje přes papírové filtry na Büchnerově nálevce, čímž jsou odstraněny nejhrubší nečistoty. Potom je suspenze filtrována přes membránové nebo skleněné filtry o velikosti pórů 0,45 μm , čímž jsou odstraněny jemnější částice nečistot. Takto upravený vzorek odpadní vody je dále upravován. Nejprve následuje přečištění extraktu, který obsahuje sledované analyty od interferujících látek, dále jeho zakonzentrování, a to metodou extrakce tuhou fází (SPE).

3.1.2.1 Extrakce tuhou fází (SPE)

Protože jsou antibiotika (i léčiva obecně) ve vzorcích odpadních vod a kalů obsažena ve velmi nízkých koncentracích, mohla by být jejich kvantifikace ze vzorku ovlivněna přítomností interferujících látek. Proto je často nezbytné extrakty obsahující analyty v kapalně matrici nejprve přechistit a potom ještě zakoncentrovat. K tomuto účelu se jako optimální metoda nejčastěji používá extrakce tuhou fází, a to zejména vzhledem ke své rychlosti a efektivitě [27; 32].

Extrakce tuhou fází patří mezi separační (dělicí) metody, které jsou založeny na rozdílech v rovnovážné distribuci složek mezi dvě fáze. U extrakce tuhou fází, jak již název napovídá, jsou fázemi kapalina a pevná látka. SPE si lze představit jako chemickou filtraci, kdy jsou složky zachycovány selektivně na základě chemické podstaty jejich částic (nikoliv však podle velikosti, jak je tomu u běžné filtrace). Principem SPE je v podstatě přivedení roztoku vzorku do kontaktu s tuhou fází (sorbentem), na který je analyzovaná látka sorbována silněji než ostatní látky ve vzorku. Metoda SPE je účinnější než metoda extrakce kapalina/kapalina (LLE), která je při extrakci analytů z kapalně matrice další vhodnou extrakční technikou. Účinnost této metody je však značně snižována možným nedokonalým oddělením fází; často je diskutována rovněž vzhledem k vysoké spotřebě organických rozpouštědel [27; 33].

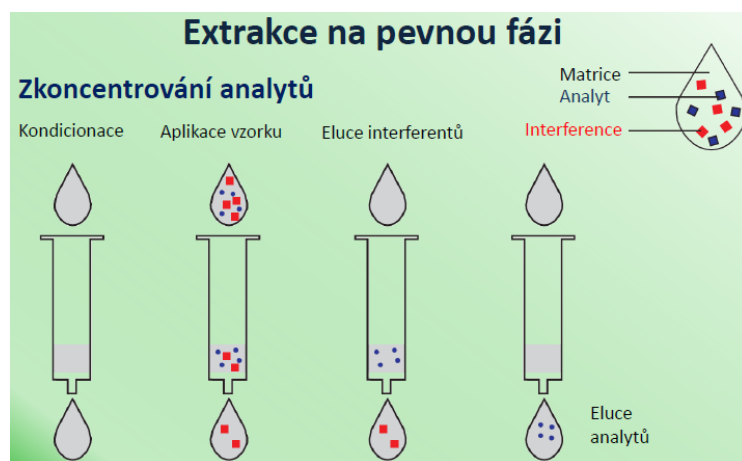
Základem SPE je použití extrakčních kolonek o malém objemu, které obsahují různá množství silikagelu s chemicky vázaným sorbentem; řádově stovky miligramů. Předpokladem úspěšné extrakce je výběr vhodného sorbentu, jehož částice mají takovou velikost, aby mohly zajišťovat dostatečně velký specifický povrch pro navázání analyzovaných složek. Posuzuje se povaha a počet funkčních skupin molekuly analytu, jejich polarita, atd. Tyto faktory rozhodují o typu a síle mezimolekulárních interakcí (vodíková vazba, dipól-dipól interakce, elektrostatické přitažlivé síly mezi ionty, aj.) vznikajících mezi analytem a sorbentem. Protože většina analytů organické povahy může v důsledku těchto mezimolekulárních interakcí interagovat se svým okolím, lze ve většině analýz připravit takový povrch (sorbent), který má specifickou afinitu k určité vybrané skupině analyzovaných látek. Je však nutné předpokládat rovněž interakce sorbentu s ostatními složkami matrice, protože SPE není zcela selektivní a specifickou metodou. Po sorpci na pevnou fázi lze analyty ze sorbentu uvolnit pomocí tepelné desorpce nebo elucí vhodným rozpouštědlem [27; 33].

Postup při extrakci na tuhou fází:

Extrakce tuhou fází (SPE) se realizuje protékáním vzorku obsahujícím jak analyty, tak také interferující látky, přes sorpční kolonku. Zrychlení průtoku vzorku a urychlení extrakce lze dosáhnout při použití přetlaku (čerpadlo) nebo podtlaku (vývěva).

- 1. Kondicionace kolonky, aktivace sorbentu:** pro zadržení analytu je nezbytné, aby fáze na povrchu sorbentu byla nejprve smočena organickým rozpouštědlem. To umožňuje mnohem účinnější interakce sorbentu s analyty [27; 28; 33].
- 2. Aplikace vzorku:** roztok vzorku je kvantitativně převeden do kolonky, zde se vsákne na sorbent a je zahájen proces eluce. Matrice vzorku společně s většinou interferujících látek přejde jako balastní látka do odpadu a analyzovaná látka je zachycena na sorbentu [27; 28; 33].

3. **Promytí sorbentu:** Sorbent je promýván pomocí slabého rozpouštědla (vody nebo pufru), čímž dojde k odstranění zbylých nečistot a interferujících látek, pokud jsou nasorbovány na pevnou fázi; zároveň nedojde k eluci analyzované složky [27; 33].
4. **Eluce analytu:** závěrečný krok extrakce, který by měl přispět k získání již čistého analytu z extrakční kolonky. Eluce je prováděna promytím extrakční kolonky malým objemem elučního činidla (silné rozpouštědlo), čímž dojde k desorpci analytů a eluát s analyzovanou složkou je jímán do jímací nádoby [27; 33].



Obrázek 9: Pracovní postup při extrakci na tuhou fázi [34].

3.1.3 Chromatografie jako finální analýza léčiv (antibiotik)

Finální stanovení léčiv je nejčastěji prováděno metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), dále metodou ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC), případně metodou plynové chromatografie, a to po derivatizaci (GC) [27; 35].

Chromatografie je separační metoda, kdy je vzorek roztoku analytu vnášen mezi dvě fáze. Jedna fáze je nepohyblivá (stacionární) a druhá fáze, která se pohybuje přes fázi nepohyblivou, je nazývána mobilní fází. Všechny chromatografické metody jsou založeny na rozdílné distribuci složek vzorku mezi dvě nemísitelné fáze, mezi stacionární a mobilní fází. Složky vykazující velkou afinitu ke stacionární fázi k ní jsou poutány silněji a v chromatografickém systému jsou zadržovány delší dobu. Složky s malou afinitou ke stacionární fázi jsou z chromatografického systému eluovány rychleji [27; 35].

3.1.3.1 Kapalinová chromatografie (LC) - vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC) a ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

U všech separačních metod založených na kapalinové chromatografii (HPLC a UHPLC) je mobilní fáze tvořena kapalinou. Složky vzorku jsou rozdílně distribuovány mezi mobilní kapalnou fází a stacionární pevnou nebo kapalnou fází, která je umístěná v chromatografické koloně. Složky vykazující velkou afinitu ke stacionární fázi jsou v chromatografické koloně zadržovány po nejdelší dobu a mají vysokou hodnotu retenčního času. Složky s malou afinitou ke stacionární fázi jsou z chromatografické kolony eluovány rychleji a hodnota jejich retenčního času je malá. **Retenční čas** je doba potřebná pro eluci dané složky z kolony [27; 35].

Stacionárních fází se používá mnoho typů, tj. například oxid křemičitý, porézní grafit, oxid hlinitý, pryskyřice nebo různé polymery. Jako mobilní fáze je možné použít vodu, polární

rozpouštědla, méně polární rozpouštědla a jejich směsi. Mobilní fáze musí být propustná pro vlnovou délku použitou při detekci analytu [27; 35].

U kapalinové chromatografie hraje rozhodující roli v separaci složek vzorku nejen jejich afinita ke stacionární fázi, ale především použitá mobilní fáze. Je možné použít různé metody separace, tj. adsorpci, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontovou výměnu nebo specifické interakce. Proto je na základě vlastností separovaných látek důležité vybrat jako mobilní fázi vhodné rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel. Je-li vyžadována analýza se změnou složení mobilní fáze během analýzy, jedná se o tzv. gradientovou eluci. K jednomu rozpouštědlu je v průběhu času přidáváno rostoucí množství druhého rozpouštědla s větším elučním účinkem (organická složka mobilní fáze). Není-li povahou analyzovaného vzorku vyžadována změna složení během analýzy, jedná se o tzv. isokratickou eluci, kdy je složení mobilní fáze v průběhu celé analýzy konstantní [27; 35].

Účinnost separace kapalinové chromatografie je rovněž závislá na velikosti částic stacionární fáze. Čím menší částice sorbentu stacionární fáze jsou použity, tím je účinnost separace větší, avšak zároveň je kladen větší odpor průchodu mobilní fáze a je nutné pracovat za použití vysokého tlaku. Pracujeme-li s kolonou obsahující částice sorbentu o velikosti 3 až 10 μm , hovoříme o tzv. vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC), která pracuje při tlaku 30 až 40 MPa. Použitím takto malých částic náplně kolony dochází ke snížení příspěvku nežádoucí vířivé a molekulové difúze v kapalině, což má za následek vysokou účinnost chromatografického systému a poměrně rychlou separaci analytů s vysokým rozlišením zón separovaných složek [27; 35].

Snahou však bylo už tak poměrně rychlou separaci pomocí HPLC ještě zrychlit, avšak za předpokladů zachování stejně dobrých nebo ještě lepších výsledků, než bylo dosahováno při klasické HPLC. Vhodným nástrojem pro rychlejší separaci je zmenšení částic náplně kolony na méně než 2 μm . To však s sebou přináší podstatné zvýšení tlaku v chromatografickém systému (kolem 100 MPa), což při vývoji přístrojové techniky představovalo dlouhou dobu značný problém. Až v roce 2004 byl do prodeje uveden první přístroj pro ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii – UHPLC (Ultra-Hight Performance Liquid Chromatography). Uspořádání UHPLC přístroje se nijak zásadně neliší od přístroje pro HPLC, rozdíl je pouze v tom, že je jako ochrana chromatografické kolony používán tzv. in-line filtr a ne předkolona, jak je tomu u přístrojů pro HPLC [27; 35; 36].

Rozdíl standardních parametrů při separaci HPLC a UHPLC [27; 35; 36]:

- HPLC - velikost částic sorbentu: 3 – 10 μm
 - délka kolony: 50 – 300 mm
 - vnitřní průměr kolony: 2 – 8 mm
 - tlak dosahovaný na koloně: 30 – 40 MPa, u komerčních HPLC přístrojů je dosahováno nižších tlaků
- UHPLC - velikost částic sorbentu: 1,5 – 2 μm
 - délka kolony 50 – 150 mm
 - vnitřní průměr kolony: 2,1 mm
 - tlak dosahovaný na koloně: až 100 MPa a více, u komerčních UHPLC přístrojů je dosahováno nižších tlaků

3.1.3.2 Princip (ultra-)vysokoučinné kapalinové chromatografie pro stanovení léčiv [27; 35; 36]

✓ Pro stanovení léčiv (antibiotik) je nejvhodnější použít chromatografii na obrácených fázích; znamená to, že stacionární fáze je nepolární, a to v důsledku navázaných uhlovodíků (nejčastěji C18) na nosič, kterým je nejčastěji silikagel. Chromatografický systém s obrácenými fázemi je označován jako RP (Reserved Phase).

✓ Rozpouštědla (pro gradientovou eluci lze použít až 4 druhy), která jsou používána jako mobilní fáze, jsou umístěna v **zásobních lahvích** a pomocí **směšovacího zařízení** lze podle potřeby připravit mobilní fáze o různém složení (různé podíly rozpouštědel). Mobilní fázi je nutné odplynit, což se provádí probubláváním heliem nebo pomocí vakua.

Eluční síla mobilní fáze roste s klesající polaritou. Při gradientové eluci je separace zahájena při velkém poměru anorganické (polární) složky mobilní fáze. Koncová část separace naopak probíhá při velkém poměru organické (nepolární) složky mobilní fáze.

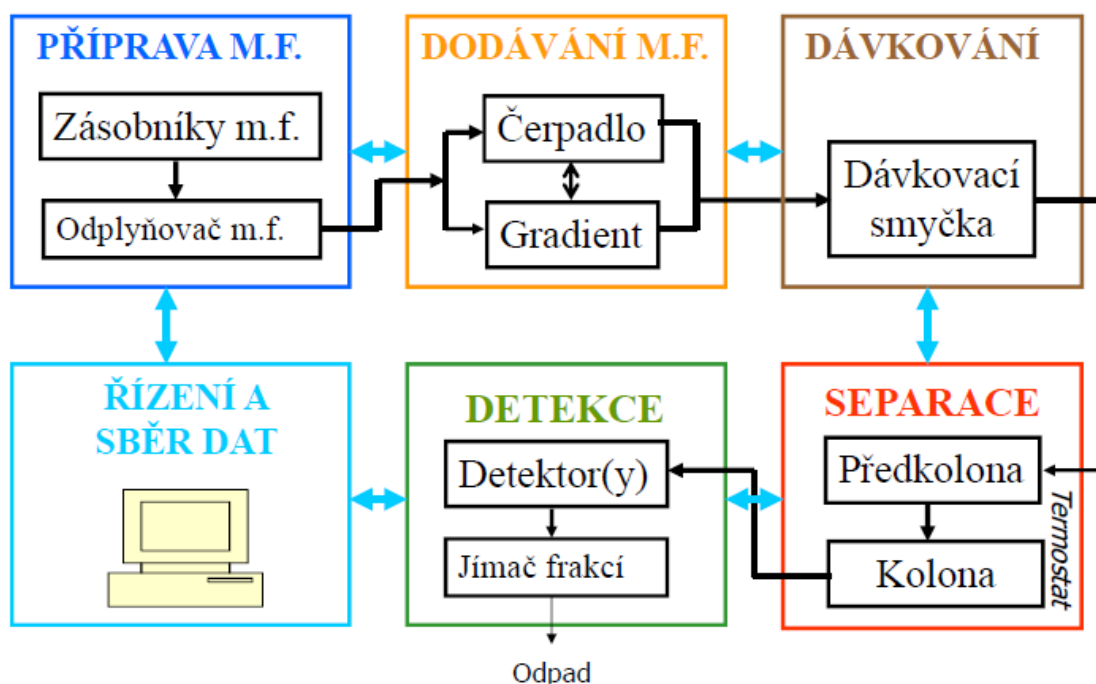
✓ Mobilní fáze je do chromatografického systému čerpána **vysokotlakým čerpadlem**, které musí být schopno udržovat konstantní dokonale bezpulzní tok mobilní fáze o malé průtokové rychlosti a za vysokého tlaku, až 40 MPa při HPLC a až 100 MPa při UHPLC.

Dávkování roztoku vzorku je zajištěno dávkovacím zařízením, tj. buď dávkovacím kohoutem, speciální injekční mikrostříkačkou nebo pomocí automatického dávkovače (dnes nepoužívanější). Objem nástřiku vzorku je obvykle mezi 20 – 50 μl u HPLC a 2 μl u UHPLC.

✓ Separace analytů probíhá na chromatografické **koloně**. Kolony jsou naplněny stacionární fází, přes kterou prochází mobilní fáze s částicemi analytu.

✓ Analýza probíhá pomocí **detektoru**, což je zařízení kontinuálně sledující složení eluátu; následně je prováděn převod nějaké sledované vlastnosti na elektrický signál.

✓ **Sběr dat a vyhodnocení** je prováděno pomocí počítače (ChemStation), který má navíc na starosti i **řízení zvoleného chromatografického postupu**.



Obrázek 10: Schéma kapalinového chromatografu pro HPLC [37]

3.1.4 Detektory v kapalinové chromatografii

Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi, dále by měly poskytovat rychlou a lineární odezvu s vysokou citlivostí a nízkým šumem. Vliv změny tlaku, teploty a průtoku mobilní fáze na odezvu detektoru by měl být minimální.

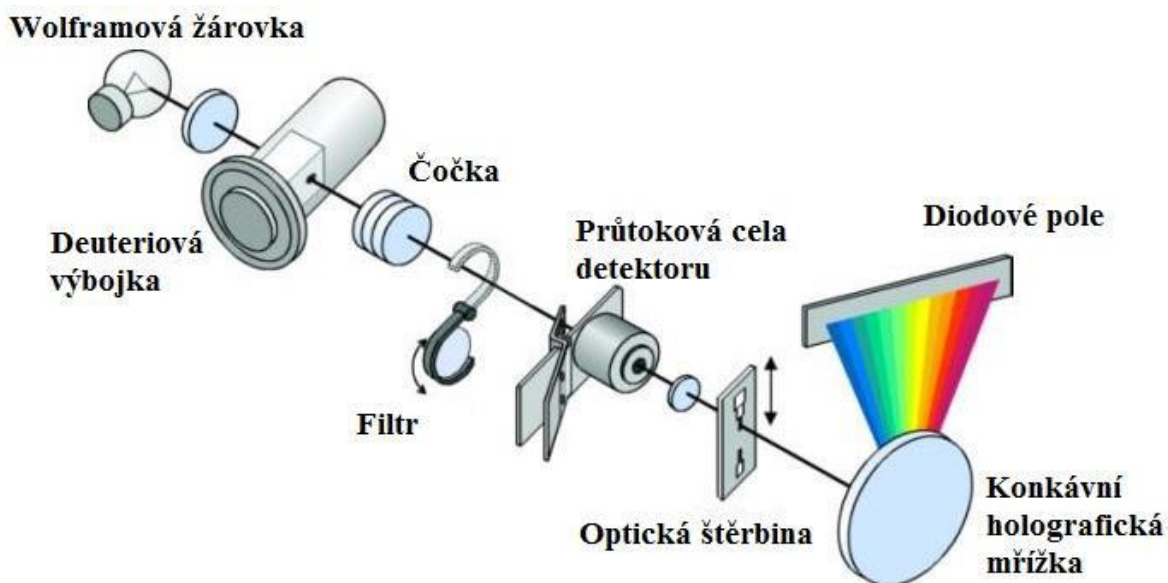
Jak bylo zmíněno výše, **detektor** je zařízení kontinuálně sledující složení eluátu, které následně provádí převod některé sledované vlastnosti na elektrický signál. Například **fotometrické a spektrofotometrické detektory** měří absorpční mobilitu vycházející z kolony, **refraktometrický detektor** měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Dalším používaným detektorem je **fluorescenční detektor**, který je založen na principu fluorescence a také **hmotnostní spektrometr** [27; 35].

Detekce v kapalinové chromatografii probíhá pomocí detektoru, který je umístěn za chromatografickou kolonou. Detektor kontinuálně sleduje složení eluátu a zaznamenává rozdíl signálu čisté mobilní fáze a signál mobilní fáze s eluovanými analyty. Nejčastěji jsou jako detektory v HPLC využívány zejména UV/VIS spektrofotometrický detektor s diodovým polem (DAD) a hmotnostně spektrometrický detektor (MS) [27; 35].

3.1.4.1 Detektor s diodovým polem (DAD)

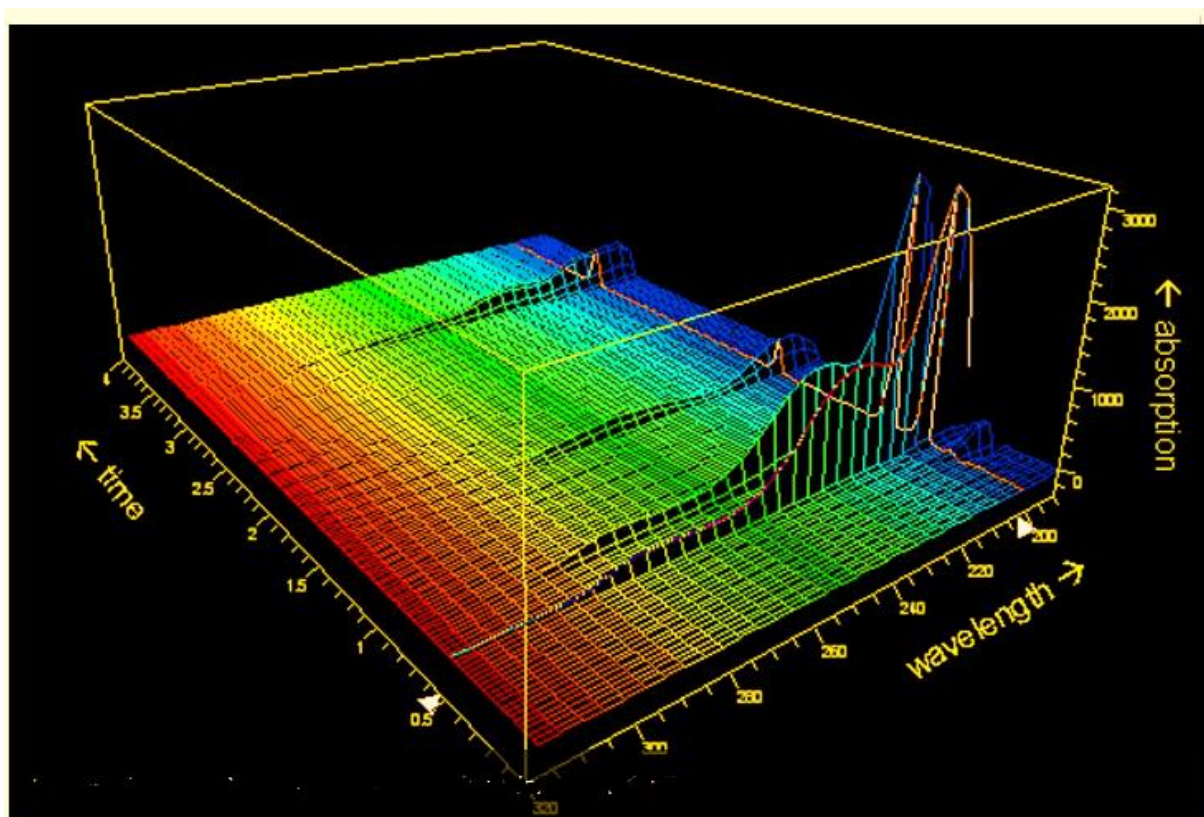
Nejvýznamnější výhodou detektoru s diodovým polem je to, že snímá absorpční eluátu kontinuálně při definovaném rozsahu vlnových délek. Lineární diodové pole je multikanálový detektor, jehož elementy měří najednou paprsek rozložený disperzním prvkem. Obsahuje mnoho malých fotodiód na jediném křemíkovém čipu. Nejběžněji užívaný počet je 1 024 fotodiód (elementů), přičemž každou diódou se měří změna absorpce jen ve velmi úzkém rozsahu vlnových délek (např. 1 nm). Údaje z jednotlivých diód jsou registrovány a ukládány do paměti vyhodnocovacího zařízení, tj. do ChemStation (PC). To umožňuje v průběhu několika milisekund získat absorpční spektrum analyzovaných složek. Absorpční spektrum analyzované složky je informací charakterizující daný analyt, podobně jako retenční čas. Absorpční spektrum může proto, stejně jako retenční čas, posloužit v kapalinové chromatografii pro identifikaci analytu, protože ho lze využít i k prozkoumání „čistoty“ analytu, a to porovnáním absorpčního spektra referenčního píku standardu a píku sledovaného analytu pocházejícího z reálného vzorku [27; 35; 38].

DAD detektor je tvořen zdrojem záření, zdrojovou čočkou, průtočnou kyvetou, mřížkou a fotodiódovým polem. Schéma spektrofotometrického detektoru s DAD je zobrazeno na obrázku (Obrázek 11).



Obrázek 11: Schéma spektrofotometrického detektoru s DAD [38]

Při použití detektoru s diodovým polem jsou výstupem chromatografické analýzy trojrozměrné chromatogramy, kde jsou na osách vyneseny veličiny: retenční čas, absorpance a vlnová délka. Pro detekci si operátor vybírá takovou vlnovou délku, při které analyty nejlépe absorbují a kdy je intenzita signálu největší.



Obrázek 12: Trojrozměrný chromatogram při použití DAD detektoru [39]

Metoda HPLC případně UHPLC v kombinaci s UV detekcí pomocí detekce diodovým polem (DAD) je velmi často využívaná technika pro stanovení β -laktamových antibiotik, mezi něž patří i aminopeniciliny [17; 32; 40]. Největší, v literatuře popsanou, nevýhodou této techniky limitující stanovení β -laktamů je nízká citlivost, která je způsobená možnou absencí chromoforů ve struktuře sledovaných analytů [17].

3.1.4.2 Hmotnostně spektrometrická detekce

Jedná se o velice citlivou spektrometrickou metodu, kterou lze aplikovat v kvalitativní a kvantitativní analýze. Metoda umožňuje objasňování struktur neznámých sloučenin, určení jejich molekulové hmotnosti a sumárního vzorce [27; 35].

Pro spektrometrické metody je vesměs charakteristické, že po absorpci elektromagnetického záření dochází k přechodu molekuly ze základního energetického stavu do stavu excitovaného a následně se opět vrací zpět do svého základního stavu. Jedná se proto o techniky nedestruktivní. Na rozdíl od všech ostatních spektrometrických metod je hmotnostní spektrometrie (mass spektrometry – MS) technikou destruktivní, protože přechod molekul z excitovaného stavu zpět do stavu základního není možný [41].

Principem této techniky je generace iontů z molekul analytů a jejich následná separace podle poměru m/z . Výsledné hmotnostní spektrum představuje závislost relativního zastoupení produkovaných iontů na m/z , přičemž relativní intenzita nejvýraznějšího iontového proudu je 100 % a ostatní iontové proudy jsou vzhledem k ní přepočítávány.

Hmotnostní spektrometr se skládá z pěti částí: vstup vzorku, iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor a sběr dat (PC). V hmotnostním spektrometru je z důvodu prodloužení střední volné dráhy letu iontů udržováno v prostoru od iontového zdroje až po detektor vysoké vakuum. Požadovaná míra vakua se odvíjí od použitého hmotnostního analyzátoru, hodnoty bývají převážně v rozmezí $10^{-3} - 10^{-11}$ Pa [27].

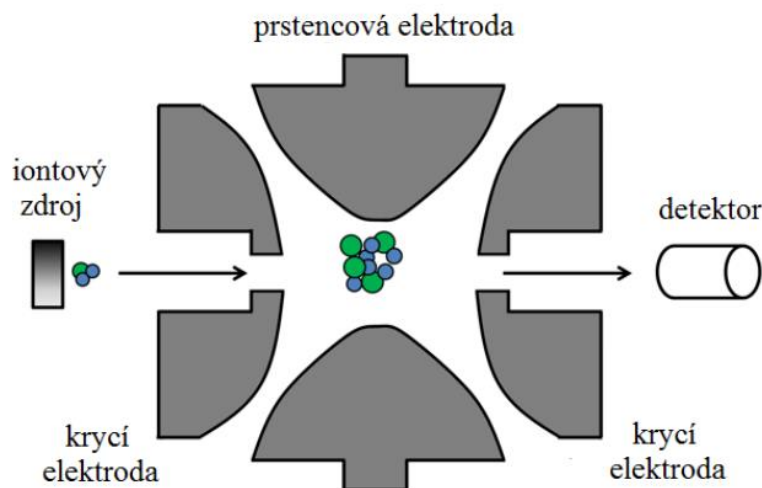
Spojení HPLC a MS

Spojení technik HPLC a MS je velice výhodné, protože chromatografie přináší schopnost separovat složky a prostřednictvím hmotnostní spektrometrie lze tyto složky jednoznačně rozlišit a tak identifikovat jednotlivé složky komplexních směsí [27].

Protože je v hmotnostním spektrometru udržováno vysoké vakuum, musí být mobilní fáze z HPLC před vstupem do spektrometru odstraněna. Technika LC/MS je proto obtížnější dosažitelná než spojení plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC/MS). Mezi nejpoužívanější *iontové zdroje* zajišťující vhodné spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií patří chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a elektrosprej (ESI). *Elektrosprej* je technika umožňující ionizaci látek z kapalného stavu. Je schopen vypařovat z roztoku látky o vysoké molekulové hmotnosti a mnohonásobně je nabíjet [27; 35; 41].

Ionty dále přechází do analyzátoru. *Analyzátor* má za úkol separovat ionty na základě poměru jejich hmotnosti a náboje m/z . Jako analyzátory lze použít kvadrupól, sférickou iontovou past nebo analyzátor doby letu, a to s různými rozlišovacími schopnostmi. *Sférická iontová past* se skládá z centrální prstencové elektrody a dvou krycích elektrod. Na prstencovou elektrodu je vkládáno střídavé radiofrekvenční napětí R_f , krycí elektrody jsou uzemněny. Po napuštění iontové pasti jsou ionty kolizně ochlazeny heliem a jsou soustředěny

v centrální oblasti. Na prstencové elektrodě je postupně zvyšováno napětí R_f , přičemž ionty v pasti začnou cirkulovat po stabilních trajektoriích. Dalším zvyšováním napětí R_f dojde k destabilizaci trajektorie iontů, ionty opouštějí past a pokračují do detektoru. Nejdříve jsou destabilizovány trajektorie nejlehčích iontů [27; 41].



Obrázek 13: Sférická iontová past [42]

Detektor převádí svazek iontů na elektrický signál, který je dále zpracováván elektronovým násobičem. Analogový signál z elektronového násobiče je počítačem digitalizován [27].

Metoda kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC/MS) popřípadě tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC/MS/MS) je velmi často využívanou technikou pro stanovení antibiotik z analyzovaných vzorků, zejména jedná-li se o komplexní vzorky, které kromě cílových analytů obsahují i velké množství balastních látek. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí vzhledem k vysoké specifičnosti a citlivosti vede k lepší kvantifikaci a identifikaci sloučenin [17; 43; 44; 45; 46].

3.1.5 Vyhodnocení chromatografické analýzy:

Po provedení chromatografické analýzy získáme **chromatogram**. Chromatogram je grafickým znázorněním měřené veličiny, tj. vyjadřující množství (koncentraci) eluované látky, a to buď v závislosti na čase, na objemu nebo vzdálenosti. Tato veličina vytváří na chromatogramu tzv. pík. Plocha píku je po skončení analýzy vyhodnocena počítačem. Kromě plochy píku je možné zjišťovat i výšku píku; to je sice snadno měřitelné, avšak výsledek je méně přesný. V každém případě získáme přesnější a správnější výsledek, pokud stanovíme plochu píku. Plocha píku i jeho výška roste s obsahem analyzované složky ve vzorku.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Používané přístroje, software a laboratorní vybavení

Příprava a extrakce vzorků

- zařízení pro přípravu Milli-Q vody Milli-Q[®] Academic, Millipore, Francie
- analytické váhy HR-120-EC, A&D Instruments, Japonsko
- SPE extraktor Visiprep[™] SPE Vacuum Manifold, Sigma Aldrich, Německo, s vakuovou pumpou Laboport, KNF, USA
- SPE kolonky:
 - Oasis[®] HLB (60 mg/3 ml) Extraction Cartridge, Waters, USA
 - Supel[™] – Select SPE (60 mg/3 ml), Supelco, USA
 - Supelclean[™] ENVI[™]-18 SPE (1 000 mg/ 6 ml), Supelco, USA
 - *Bakerbond* SPE (C18 500 mg/3 ml), J.T.Baker, USA
- přístroj EVATERM pro sušení vzorku proudem dusíku, Labicom, Česká Republika
- ultrazvuková vodní lázeň Teson 4, Tesla, Česká republika
- filtrační papíry kvalitativní KA 2, průměr 150 mm, Fisher Scientific, Česká republika
- filtry se skleněnými vlákny NM GF – 1, průměr 55 mm, Macherey-Nagel, Německo
- stříkačkové filtry:
 - LUT Syringe Filters PTFE, průměr 13 mm, 0,45 μm, Labicom s. r. o., Česká republika
 - Whatman[™] Syringe Filters PTFE; průměr 4 mm, 0,2 μm, GE Healthcare Life Science, Velká Británie
- pH metr InoLab 730, Nameko, Česká republika
- běžné laboratorní vybavení

Kapalinová chromatografie UHPLC s DAD detekcí

- kapalinový chromatograf Agilent 1 290 Infinity, Agilent, USA
 - binární pumpa
 - automatický dávkovač
 - termostat pro umístění kolon
 - UV/VIS DAD detektor: zdroj záření – deuteriová lampa (rozsah vlnových délek 190 až 640 nm), diodové pole (1 024 prvků), programovatelná šířka štěrby 1 – 8 mm
- In-Line Filtr 0,3 μm
- kolona ZORBAX Eclipse Plus C18, Rapid Resolution HD 2,1×100 mm; velikost částic 1,8 μm, Agilent, USA

Kapalinová chromatografie HPLC s MS detekcí

- kapalinový chromatograf Agilent 1 100 Series, Agilent, USA
 - gradientové čerpadlo
 - vakuový odplyňovač
 - automatický dávkovač
 - termostat pro umístění kolon

- UV-VIS detektor s diodovým polem – zdroj světla deuteriová (UV) a wolframová pro (VIS a blízké IČ) lampa, 1 024 fotodiod, vlnový rozsah 190 – 950 nm, programovatelná šířka štěrbin 1 – 16 nm
- kolona KINETEX C18, velikost 150×3 mm, velikost částic 2,6 μm,
- hmotnostní spektrometr Agilent 6 320 Series, Ion Trap LC-MS
- infuzní pumpa kdS 9 100, kdScientific,
- generátor dusíku Peak Scientific

Použitý software ke zpracování a prezentaci dat

- ChemStation for LC & LC/MS Systems, ver. 32.1, Agilent, USA
- Chemstation for LC 3D systems Rev. B.01.03-SR2
- 6300 Series TrapControl Version 6.2
- 6300 Series DataAnalysis Version 6.2
- Microsoft Office Word 2007, Microsoft, USA
- Microsoft Office Excel 2007, Microsoft, USA

4.2 Použité chemikálie a standardy

Chemikálie

- Deionizovaná voda upravená přístrojem Milli-Q[®] Academic firmy Millipore
- Methanol HPLC Gradient Grade, čistota ≥ 99,8 %, J. T. Baker[®], Nizozemsko
- Acetonitril Gradient Grade for HPLC, čistota ≥ 99,9 %, Sigma-Aldrich, Německo
- Kyselina trifluoroctová – CHROMASOLV[®] for HPLC ≥ 99,0 %, Sigma Aldrich
- Methanol - CHROMASOLV[®] for HPLC ≥ 99,0 %, Sigma Aldrich
- Aceton pro organickou stopovou analýzu SUPRASOLV[®], Merck, Německo
- Kyselina chlorovodíková – 35 % p. a., Penta

Inertní plyn

- Dusík – 4.7 Siad Czech spol. s. r. o.
- Helium – 6.0 Linde gas a. s.

Standardy aminopenicilinových antibiotik

- Ampicilin, standard dodaný z farmaceutické fakulty VFU Brno, čistota ≥ 95 %,
- Amoxicilin, standard dodaný z farmaceutické fakulty VFU Brno, čistota ≥ 95 %,

4.3 Stanovované analyty

Jako cílové analyty byly vybrány dva druhy aminopenicilinových antibiotik, které jsou v dnešní době jedny z nejčastěji předepisovaných antibiotik jak v České republice, tak také ve světě. Právě vysoká četnost předepisování těchto antibiotik v humánní i ve veterinární medicíně byla hlavním důvodem jejich výběru. Jako každá antibiotika působící na organismus mohou i aminopenicilinová antibiotika po přestupu do různých složek životního prostředí působit negativně na flóru a faunu životního prostředí. Navíc půdní nebo vodní bakterie při dlouhodobém vystavení působení těchto antibiotik si mohou vůči této skupině antibakteriálních látek vypěstovat sekundární resistenci.

Ze skupiny aminopenicilinových antibiotik byly konkrétně vybrány **ampicilin** a **amoxicilin**.

4.3.1 Vlastnosti stanovovaných analytů

4.3.1.1 Ampicilin [20; 47]

- Sumární vzorec: C₁₆H₁₉N₃O₄S
- Systematický název dle IUPAC: (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2*R*)-2-amino-2-fenylacetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3.2.0]heptan-2-karboxylová kyselina
- M_r = 349,404 76 g/mol
- pK_{a1} = 2,7; pK_{a2} = 7,3 [32]
- Barva: v pevném stavu bílý krystalický prášek – bílé jehlicovité krystalky
- Vůně: bez charakteristického zápachu
- Teplota tání: taje při 202 °C za současného rozkladu
- Rozpustnost: ve vodě 11,1 mg/ml
v methanolu 50 mg/ml
v dimethylacetamidu 76 mg/ml
v dimethylsulfoxidu 10 mg/ml

4.3.1.2 Amoxicilin [24; 47]

- Sumární vzorec: C₁₆H₁₉N₃O₅S
- Systematický název dle IUPAC: (2*S*,5*R*,6*R*)-6-[(2*R*)-2-amino-2-(4-hydroxyfenyl)-acetamido]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyklo[3.2.0]heptan-2-karboxylová kyselina
- M_r = 365,404 16 g/mol
- pK_{a1} = 2,8; pK_{a2} = 7,2 [32]
- Barva: v pevném stavu bílý krystalický prášek – bílé jehlicovité krystalky
- Vůně: typický zápach po penicilinu a hořká chuť
- Teplota tání: taje při 194 °C
- Rozpustnost: ve vodě 3,43 mg/ml

4.4 Analyzovaná matrice

Analyzovanou matricí byla odpadní voda ze dvou čistíren odpadních vod, konkrétně z ČOV situované v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno a ČOV Brno-Modřice. Za účelem porovnání účinnosti eliminace ampicilinu byly vzorky odpadní vody odebírány 4 dny na přítoku i odtoku ČOV.

4.5 Postup stanovení

4.5.1 Odběr vzorků

Odběr vzorků odpadní vody na přítoku i na odtoku ČOV Veterinární a farmaceutické univerzity Brno a ČOV Brno-Modřice byl odborně proveden pověřeným pracovníkem čistírny. Po provedení odběru byly vzorky přelity do správně označených tmavých skleněných lahví o objemu jeden litr, které byly následně transportovány do laboratoře pro environmentální analýzu fakulty chemické. V případě, že vzorky mohly být ihned zpracovávány, byly uloženy do chladničky s teplotou maximálně do 4 °C, a to nejdéle po dobu 24 hodin. Následně byly vzorky zpracovány postupem metody SPE extrakce.

4.5.2 Extrakce analytů z matrice vzorku

Po transportu do laboratoře byly vzorky přefiltrovány pomocí filtračního zařízení nejprve přes kruhové papírové filtry, aby byly odstraněny hrubé nečistoty a následně přes filtry se skleněnými vlákny, čímž byly odstraněny jemnější nečistoty. Filtrace byla podle potřeby opakována, a to v závislosti na množství hrubých nečistot obsažených ve vzorku.

Po vyhodnocení výsledků a po provedené optimalizaci postupu extrakce tuhou fází (SPE) bylo rozhodnuto, že nejvhodnější kolonkou je kolonka Supelclean™ ENVI™-18, pomocí níž bylo dosahováno největší výtěžnosti ampicilinu. Na žádné z dostupných ověřovaných kolonek nebylo pro amoxicilin dosaženo uspokojivé výtěžnosti, a proto tento analyt nebyl ze vzorků reálné vody extrahován, sledován byl pouze ampicilin.

Extrakce probíhala tak, že na kolonku byl při extrakci ampicilinu z reálných vzorků nanášen objem 100 ml odpadní vody odebrané z přítoku na ČOV a 200 ml odpadní vody odebrané z odtoku z ČOV. Použitý optimalizovaný postup SPE extrakce je uveden v následující tabulce (Tabulka 4).

Tabulka 4: Optimalizovaný postup SPE extrakce na extrakční kolonce Supelclean™ ENVI™-18

Aktivace sorbentu	9 ml methanolu (pH 2) 9 ml Milli-Q vody (pH 2)
Nanesení vzorku	100 ml odpadní vody z přítoku na ČOV (pH 2) 200 ml odpadní vody z odtoku z ČOV (pH 2)
Promytí a odstranění interferujících látek	neprováděno
Sušení	60 minut proudem vzduchu
Eluce analytů	2×2 ml methanolu

SPE kolonky byly nejprve aktivovány pomocí 9 ml methanolu a 9 ml Milli-Q vody. Následně byl na kolonku přikapáváním z kádinky kvantitativně přenesen vzorek analyzované odpadní vody, která byla ještě před začátkem extrakce okyselena 2M roztokem HCl na hodnotu pH 2. Rychlost extrakce byla nastavena tak, aby z kolonky odkapávala matrice vzorku do odpadu rychlostí přibližně 1 kapka za vteřinu. Promývací krok byl na základě výsledků optimalizace výtěžnosti SPE extrakce vynechán, protože promytím sorbentu malým množstvím Milli-Q vody byla výrazně snížena výtěžnost sledovaného analytu. Aby došlo k co nejúčinnější sorpci analytů bylo nezbytné, aby kolonka mezi aktivací sorbentu a nanášením vzorku nevyschla. Po odkapání veškerého množství vzorku odpadní vody byl sorbent 60 minut sušen proudem vzduchu. Následně byla dvakrát provedena eluce analytů, a to vždy pomocí 2 ml methanolu, přičemž eluát byl jímán do vysokých vialek.

Eluát ve vysokých vialkách byl následně odpařen pod proudem dusíku. Odparek byl znovu rozpuštěn v přesném objemu 1 000 µl směsi rozpouštědel směsi rozpouštědel methanol a aceton smíchané v poměru 24:1.. Zakoncentrovaný extrakt byl přefiltrován přes stříkačkové filtry do správně označených 1,8 ml vialek a takto připravené vzorky byly připraveny pro finální analýzu.



Obrázek 14: SPE extrakce – nanášení vzorku na extrakční kolonky



Obrázek 15: Sušení eluátu pod proudem dusíku

4.5.3 Finální analýza

Finální analýza byla prováděna metodou kapalinové chromatografie. Pro analýzu byl použit ultra-vysokoúčinný kapalinový chromatograf (UHPLC) Agilent 1 290 Infinity. K samotné separaci docházelo na koloně ZORBAX Eclipse Plus C18. Pro detekci analytů byl použit detektor s diodovým polem (DAD).

Pro analýzu aminopenicilinových antibiotik byla na UHPLC chromatografu vytvořena nová metoda pro gradientovou eluci analytů. Jako mobilní fáze byly použity 0,01% roztok kyseliny trifluoroctové a acetonitril. Připravené mobilní fáze byly před použitím přefiltrovány přes nylonové filtry o velikosti pórů 0,45 μm . Chromatografické podmínky nastavené pro tuto metodu, při kterých probíhala finální analýza antibiotik, jsou prezentovány v tabulkách (*Tabulka 5, Tabulka 6*).

Na základě skutečnosti, že se v průběhu optimalizace výtěžnosti preanalytického postupu SPE pro izolaci aminopenicilinových antibiotik nepodařilo prostřednictvím dostupných SPE kolonek optimalizovat vhodný postup pro extrakci amoxicilinu, byla finální analýza reálných vzorků odpadní vody zaměřena pouze na stanovení ampicilinu



Obrázek 16: Přístroj UHPLC Agilent 1 290 Infinity

Tabulka 5: Optimalizované chromatografické podmínky analýzy aminopenicilinových ATB

Nástřik vzorku na kolonu	1 μ l
Teplota kolony	15 °C
Použité mobilní fáze	polární složka A: 0,01% TFA nepolární složka B: ACN
Průtok mobilní fáze	0,3 ml/min
Typ eluce	gradient mobilní fáze (viz tabulka č. 6)
Vlnová délka detekce	195 nm, 210 nm
Celková doba analýzy	6,5 min (+ 1 min promývání)

Tabulka 6: Optimalizovaný gradient mobilní fáze

Čas [min]	0,01% TFA [%]	ACN [%]
0	90	10
2,3	90	10
3	60	40
5	60	40
6	90	10
6,5	90	10

Kvalitativní charakteristiku sledovaných analytů provádíme při kapalinové chromatografii pomocí retenčního času a jejich absorpčních spekter; množství analytu obsaženého ve vzorku zjistíme výpočtem plochy píku, a to po integraci. Integrace byla prováděna v offline softwaru ChemStation pro vyhodnocování výsledků. Retenční čas ampicilinu a amoxicilinu prezentovaný v tabulce (Tabulka 8) byl zjištěn analýzou jejich standardů o koncentraci 1 mg/ml. Standardy analytů byly rozpouštěny ve směsi rozpouštědel methanol a aceton smíchané v poměru 24:1. Kvantifikace byla provedena odečtem ze sestrojovaných kalibračních přímků pro jednotlivá aminopenicilinová antibiotika.

V souladu se správnou laboratorní praxí bylo nutné zjistit, zda nejsou použita rozpouštědla zdrojem sekundární kontaminace vzorků. Při totožných chromatografických podmínkách, uvedených v tabulkách (Tabulka 5, Tabulka 6), byla analyzována i směs použitých rozpouštědel.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Bakalářské práce byla zaměřena na stanovení aminopenicilinových antibiotik ampicilinu a amoxicilinu. Byl proveden výběr a optimalizace analytické metody, vhodné pro stanovení obou aminopenicilinových antibiotik. Z matrice odpadní vody byl izolován a následně stanovován ampicilin.

5.1 Optimalizace chromatografických podmínek

Optimalizace chromatografických podmínek pro analýzu aminopenicilinových antibiotik byla založena zejména na výběru optimální vlnové délky UV-VIS detekce; následně byl proveden výběr vhodných rozpouštědel použitých jako mobilní fáze. Posledním optimalizovaným parametrem byl gradient mobilní fáze pro stanovení obou analytů vedle sebe.

Optimalizace chromatografické metody probíhala pomocí roztoků standardů ampicilinu a amoxicilinu o koncentracích 1 mg/ml a následně také pomocí jejich směšného roztoku, rovněž o koncentraci 1 mg/ml každého z nich.

5.1.1 Výběr optimální vlnové délky UV-VIS detekce

Na základě naměřených absorpčních spekter sledovaných analytů zobrazených na obrázcích (*Obrázek 26* a *Obrázek 27*) byla jako vhodná vlnová délka detekce pro analýzu aminopenicilinových antibiotik zvolena hodnota 210 nm. Absorbance analytů výrazně klesá se stoupající vlnovou délkou. Vyšší odezvy detektoru bylo dosahováno při vlnové délce 195 nm, avšak při této vlnové délce může být analýza výrazně ovlivněna intenzivní absorpcí většiny interferujících organických látek.

5.1.2 Výběr vhodné mobilní fáze

Na základě studia odborné literatury byl jako vhodná polární složka mobilní fáze vybrán roztok kyseliny trifluoroctové, dále TFA [17]. TFA je velmi silná kyselina, což s ohledem na hodnotu pKa cílových analytů (*Kapitola 4.3.1*) umožňuje připravit mobilní fázi o vhodném pH tak, aby došlo k retenci analytů na chromatografické koloně. S ohledem na parametry použité kolony uvádějící účinnost separace v rozmezí pH 2 – 9, byl připraven 0,01% roztok TFA o pH 2,9.

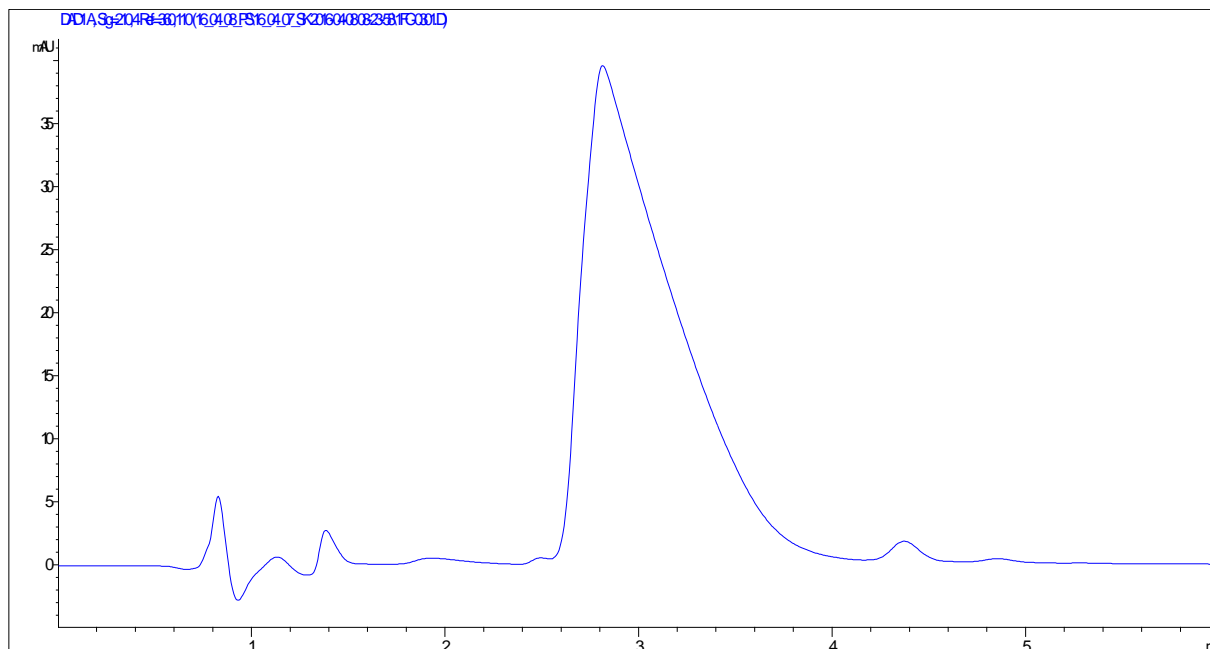
Jako nepolární složka mobilní fáze byly na základě porovnání výsledků chromatografické analýzy vybrány methanol a acetonitril. Znamená to, že byla ověřována vhodnost dvou typů mobilních fází, uvedených v tabulce (*Tabulka 7*).

Tabulka 7: Ověřované mobilní fáze

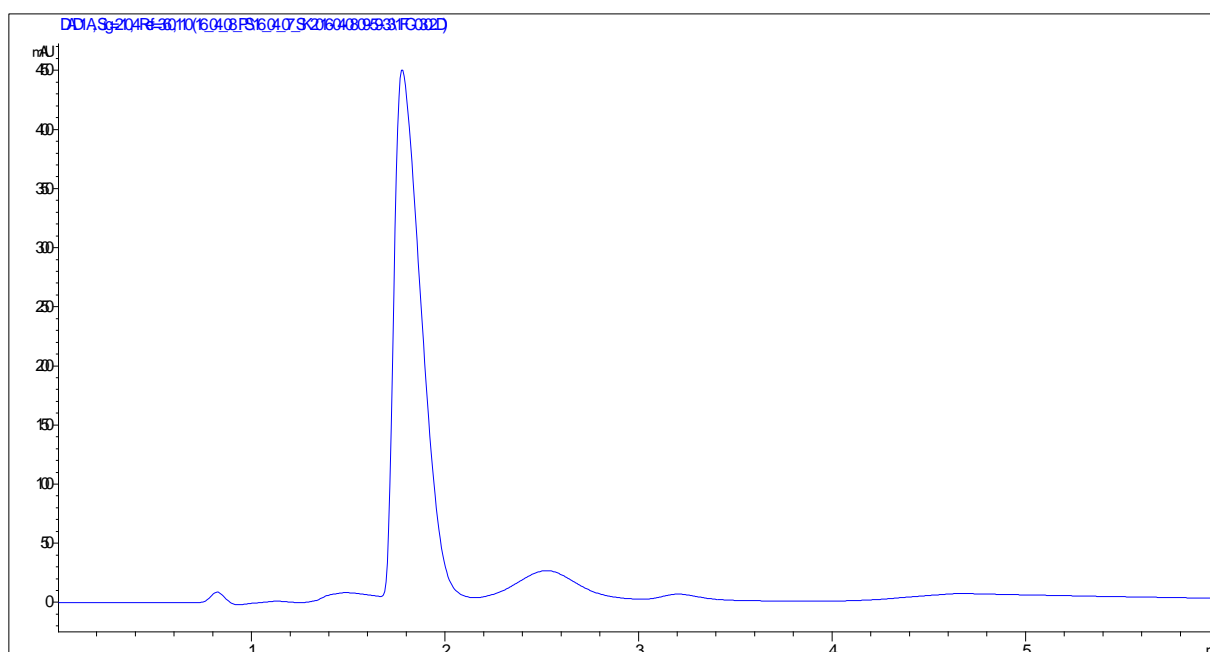
A	B
0,01% TFA	MeOH
0,01% TFA	ACN

Ukázka chromatogramů analýzy ampicilinu a amoxicilinu získaných při různé volbě složek mobilní fáze je prezentována na obrázcích (*Obrázek 17*, *Obrázek 18*, *Obrázek 19* a *Obrázek 20*).

Pro chromatogramy znázorněné na obrázcích (*Obrázek 17* a *Obrázek 18*) byla mobilní fáze složená z 0,01% TFA a MeOH (poměr A/B 60/40). Tento typ mobilní fáze nebyl příliš vhodný pro eluci ampicilinu, protože jeho pík měl nízkou odezvu a výrazně chvostoval. Pík pro amoxicilin již měl vyšší odezvu, byl užší a nechvostoval tak výrazně.

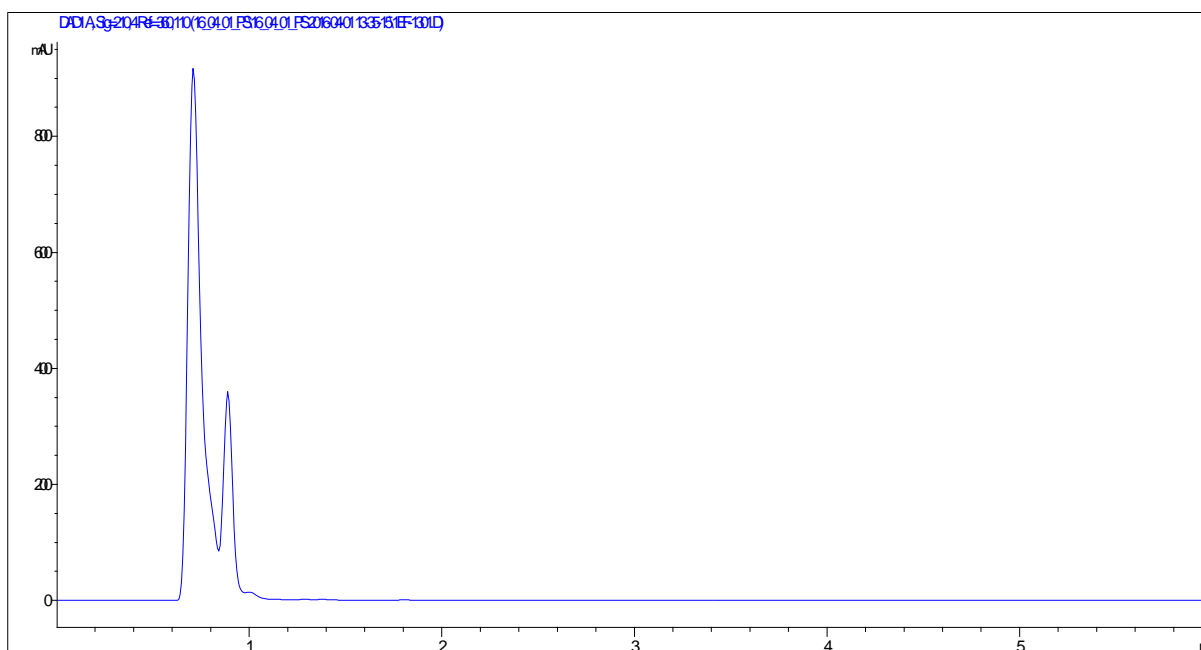


Obrázek 17: Chromatogram ampicilinu 1mg/ml, použitá mobilní fáze 0,01% TFA a MeOH (poměr A/B 60/40)

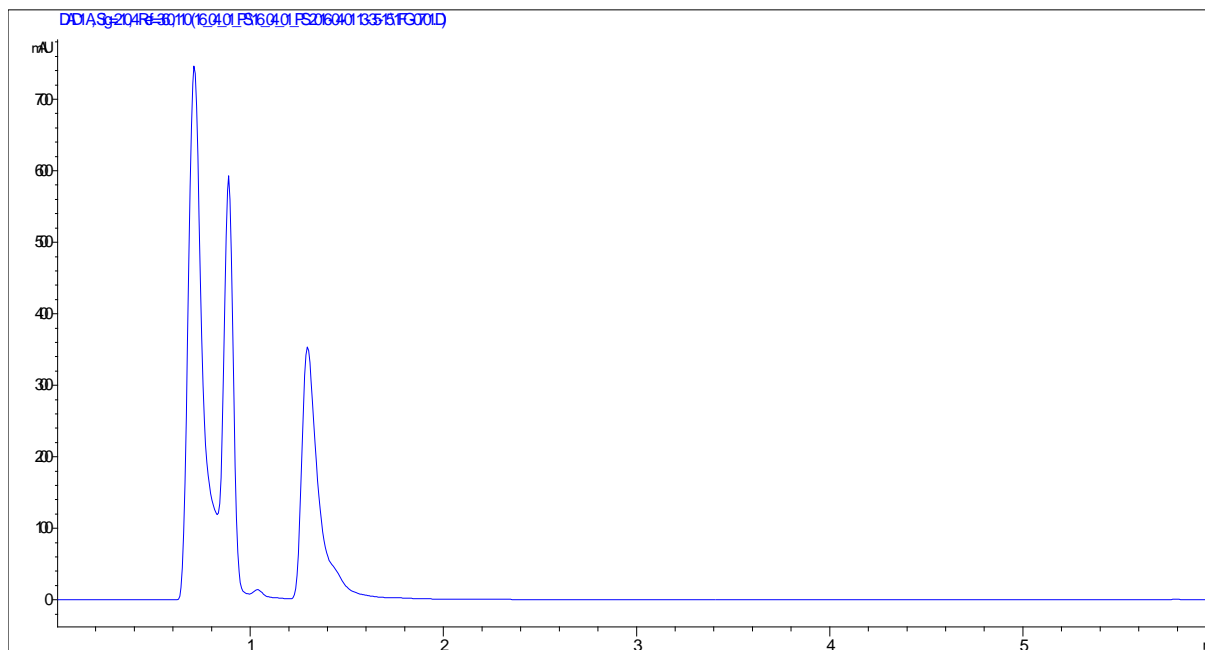


Obrázek 18: Chromatogram amoxicilinu 1mg/ml, použitá mobilní fáze 0,01% TFA a MeOH (poměr A/B 60/40)

Pro chromatogramy znázorněné na obrázcích (*Obrázek 19* *Obrázek 19* a *Obrázek 20*) byla mobilní fáze složená z 0,01% TFA a ACN (poměr A/B 60/40). Tento typ mobilní fáze s acetonitrilem byl pro stanovované analyty vhodnější, protože píky pro oba analyty měly větší odezvu než s methanolem, byly úzké a výrazněji nechvostovaly. Závadou však bylo to, že na chromatogramech není patrný pouze jeden pík. U ampicilinu se jednalo o dva píky, u amoxicilinu byly dokonce píky tři. Analyty byly navíc eluovány v příliš krátkém a navíc podobném retenčním čase, a to do 1 minuty, což bylo pro budoucí analýzu reálných vzorků odpadní vody nevhodné. Proto bylo experimentálně ověřováno, zda existuje vhodnější poměr složek mobilní fáze při izokratickém způsobu eluce a popřípadě jakým způsobem se výsledky chromatografické analýzy změní při aplikaci eluce s gradientem mobilní fáze.



Obrázek 19: Chromatogram ampicilinu 1 mg/ml, použitá mobilní fáze 0,01% TFA a ACN (poměr A/B 60/40)



Obrázek 20: Chromatogram amoxicilinu 1 mg/ml, použitá mobilní fáze 0,01% TFA a ACN (poměr A/B 60/40)

5.1.3 Optimalizace poměru složek mobilní fáze

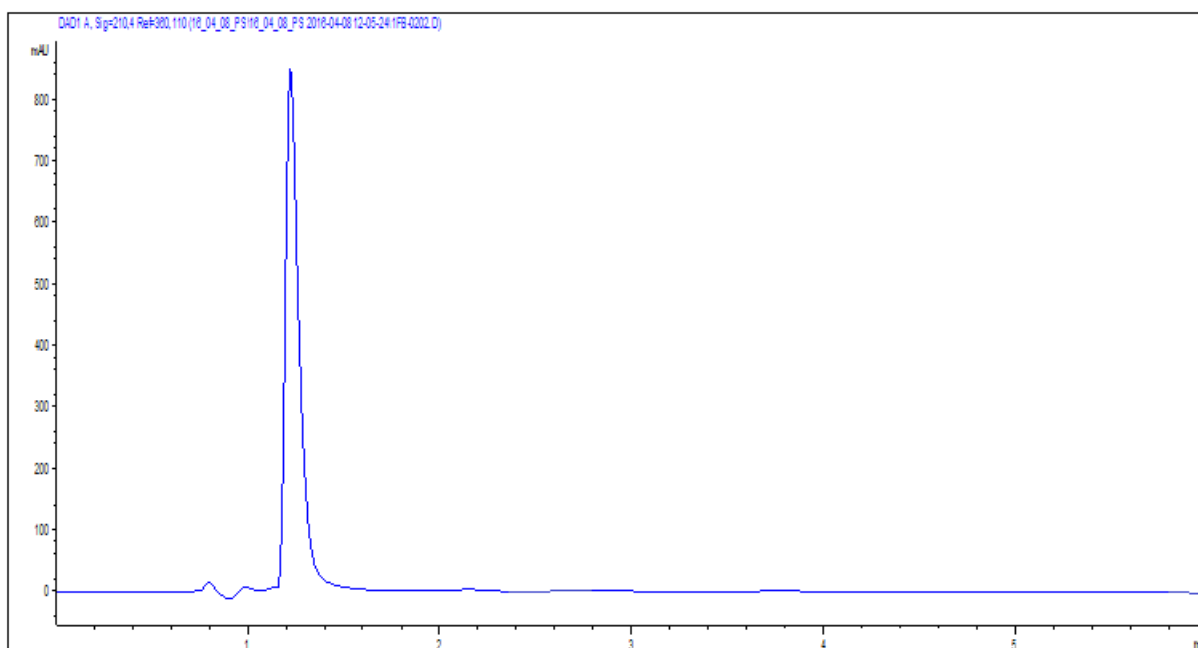
Optimalizací poměru složek mobilní fáze (methanol a acetonitril) mělo být dosaženo eluce molekul jednotlivých analytů v jednotnou dobu a zvýšení hodnot retenčních časů nad 1 minutu. Pomocí vzorků standardů stanovovaných analytů o koncentracích 1 mg/ml byly ověřovány tři postupy izokratické eluce definované v tabulce (Tabulka 8).

Tabulka 8: Prověřené metody izokratické eluce

Metoda	Poměr složek mobilní fáze A:B
izokratická „metoda A“	75:25
Izokratická „metoda B“	80:20
Izokratická „metoda C“	90:10

Výsledky analýzy *izokratickou metodou eluce A* se ani u jednoho ze sledovaných analytů příliš nelišily od výsledků pro poměr složek mobilní fáze A/B 60/40 a chromatogramy byly téměř totožné jako ty, které jsou uvedené na obrázcích (Obrázek 19 a Obrázek 20).

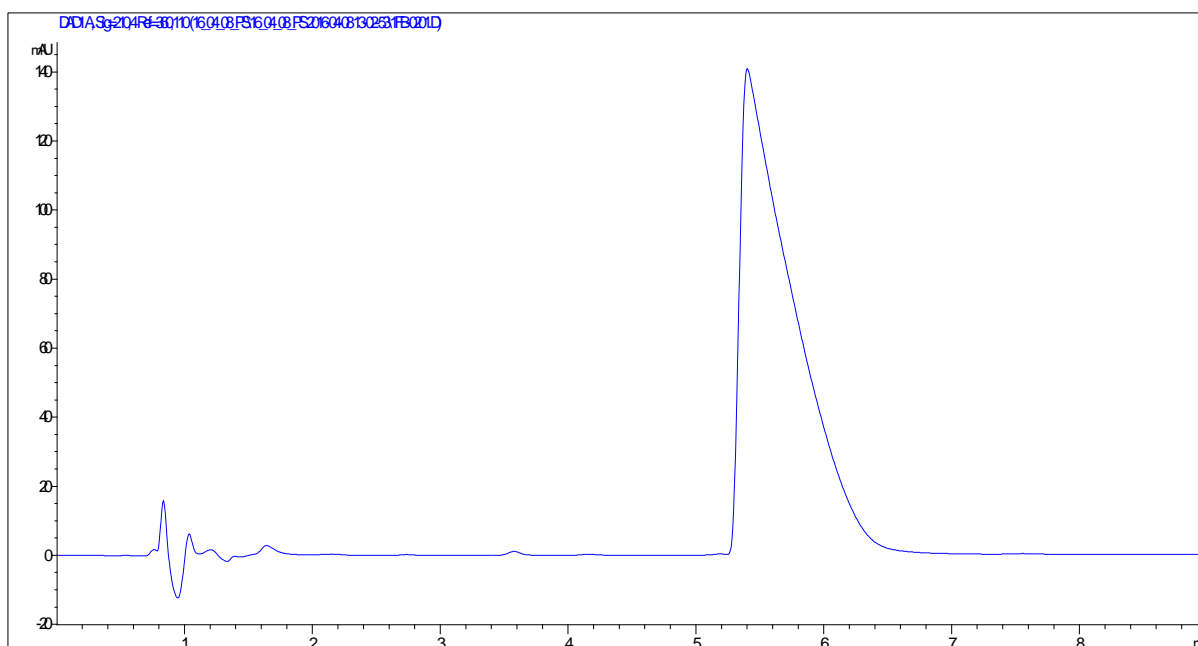
Metodou izokratické eluce B bylo docíleno toho, že na chromatogramu při analýze ampicilinu se již objevoval pouze jeden intenzivní pík, který však, jak je možné vidět na obrázku (Obrázek 21)Obrázek 21, chvostuje. Retenční čas ampicilinu se podařilo posunout na hodnotu okolo 1,2 min. Výsledky pro amoxicilin se však ani při tomto způsobu izokratické eluce příliš nelišily od výsledku dosažených elucí poměrem složek mobilní fáze A/B 60/40 zobrazeného na obrázku (Obrázek 20).



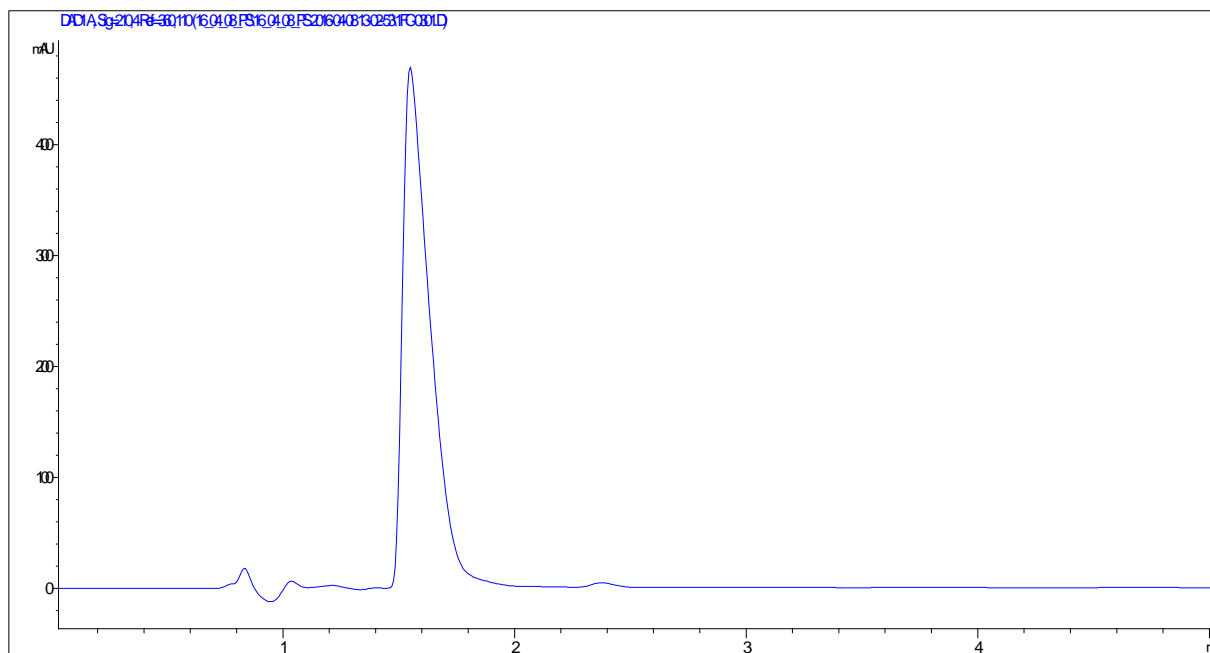
Obrázek 21: Chromatogram ampicilinu 1 mg/ml, použitá mobilní fáze 0,01% TFA a ACN (poměr A/B 80/20)

Metodou izokratické eluce C byl u ampicilinu získán jeden pík a retenční čas měl hodnotu okolo 5,4 min. Jak je však vidět na obrázku (Obrázek 22), tento pík není vůbec symetrický a štíhlý a kromě toho velmi výrazně chvostuje.

Výsledkem eluce amoxicilinu touto izokratickou metodou C byl na chromatogramu také jeden symetrický pík. Ten sice, jak je vidět na obrázku (Obrázek 23), měl menší odezvu než zdvojené píky získané elucí při poměru složek mobilní fáze A/B 60/40 (Obrázek 20), ale retenční čas amoxicilinu se podařilo posunout na hodnotu okolo 1,55 min, což je pro analýzu reálných vzorků odpadní vody důležité.

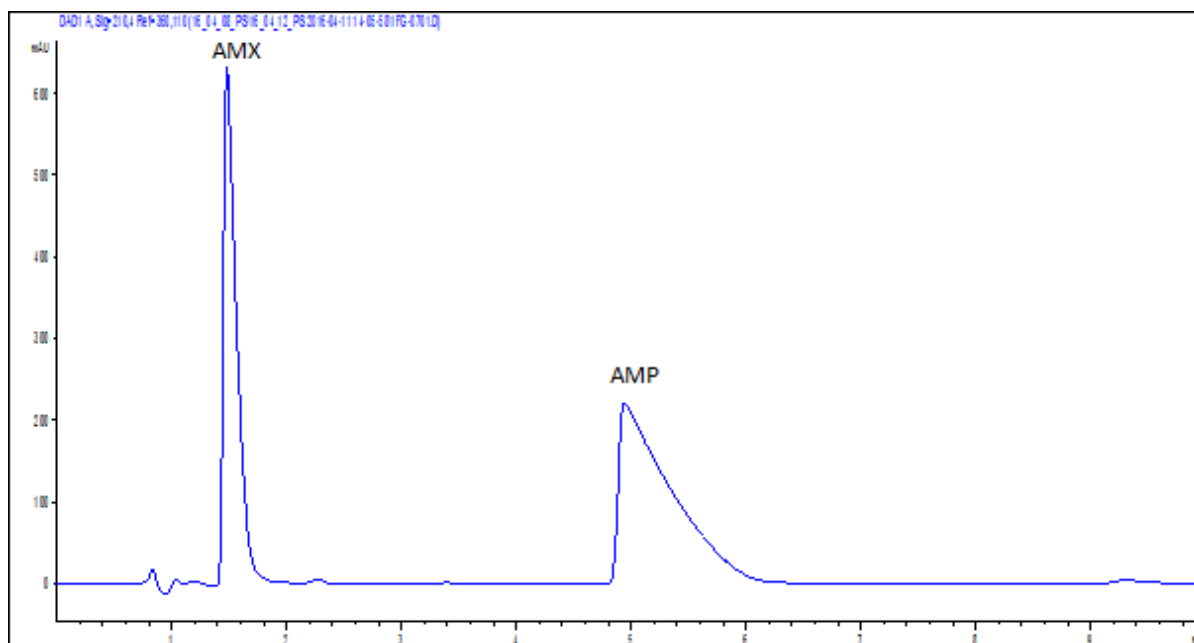


Obrázek 22: Chromatogram ampicilinu 1 mg/ml, použitá mobilní fáze 0,01% TFA a ACN (poměr A/B 90/10)



Obrázek 23: Chromatogram amoxicilinu 1 mg/ml, použitá mobilní fáze 0,01% TFA a ACN (poměr A/B 90/10)

Metoda izokratické eluce C byla rovněž použita pro analýzu směsného vzorku analytů o koncentraci 1 mg/ml (každého z nich); důvodem bylo zjištění, zda a případně jakým způsobem se analyty navzájem ovlivňují. Retenční čas ampicilinu se v přítomnosti amoxicilinu posunul na hodnotu 4,96 min a amoxicilin byl v přítomnosti ampicilinu ve vzorku eluován v retenčním čase 1,48. Odezvy obou analytů (v jednom vzorku vedle sebe) byly zvýšeny, jak je vidět na obrázku (Obrázek 24).



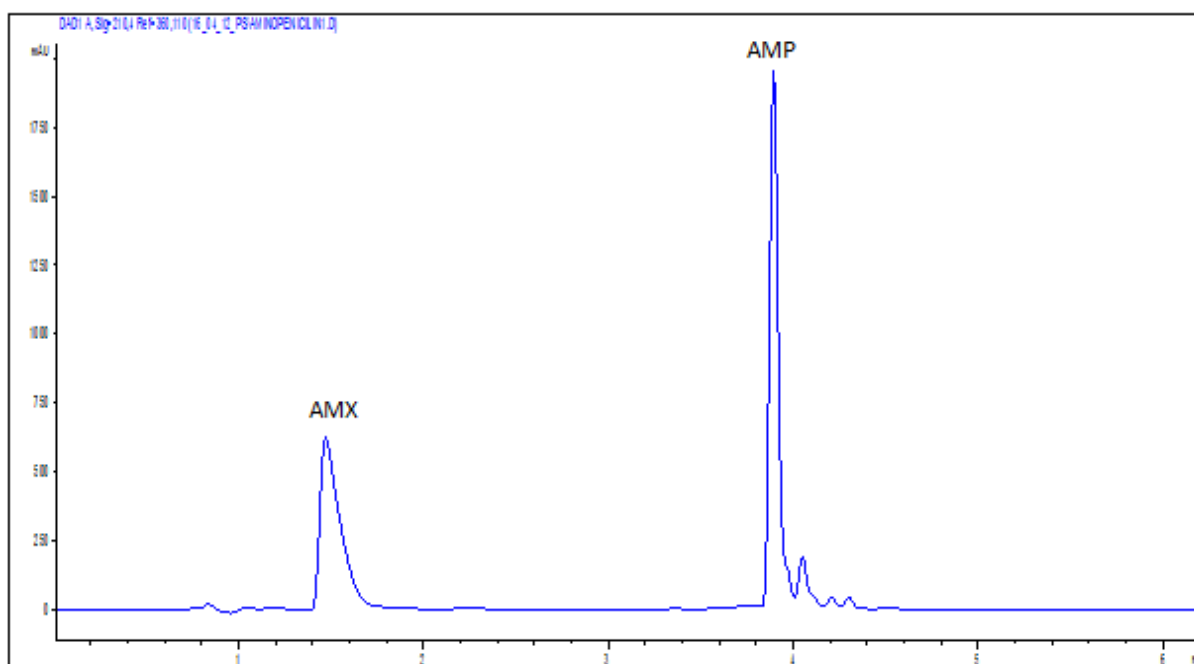
Obrázek 24: Chromatogram směsného roztoku analytů o koncentraci každého z nich 1mg/ml, použitá mobilní fáze 0,01% TFA a ACN (poměr A/B 90/10)

5.1.4 Optimalizace gradientu mobilní fáze

Protože retenční čas ampicilinu ve směsném vzorku byl *metodou izokratické eluce C* posunut až na hodnotu okolo 4,96 min, bylo vhodné pokusit se hodnotu jeho retenčního času snížit. Toho bylo dosaženo navýšením poměru organické složky mobilní fáze v určitém čase před jeho elucí. Proto byla k chromatografickému stanovení aminopenicilinových antibiotik nakonec vyvinuta a optimalizována metoda s gradientovou elucí. Nastavený gradient mobilní fáze je uveden v následující tabulce (*Tabulka 9*).

Tabulka 9: Gradient mobilní fáze

Čas [min]	0,01% TFA [%]	acetonitril [%]
0	90	10
2,3	90	10
3	60	40
6	60	40
7	90	10
9	90	10



Obrázek 25: Výsledek gradientové eluce směsného roztoku analytů o koncentraci každého z nich 1 mg/ml, použitá mobilní fáze 0,01% TFA a ACN (poměr A/B 90/10)

Protože byl retenční čas ampicilinu tímto postupem snížen na hodnotu 3,9 min, mohl být celkový čas analýzy z 9 min + 1 min promývání snížen na 6,5 min + 1 min promývání, čímž došlo ke snížení spotřeby mobilní fáze. Gradient mobilní fáze byl upraven tak, že v průběhu eluce analytů (přibližně do konce 5. minuty analýzy) byl poměr složek mobilní fáze stejný, jak je uvedeno v tabulce (*Tabulka 9*) a ke změnám došlo až po eluci analytů, aby mohl být celkový čas analýzy zkrácen. Optimalizovaný gradient mobilní fáze použitý pro finální analýzu aminopenicilinových antibiotik je uveden výše v tabulce (*Tabulka 6*).

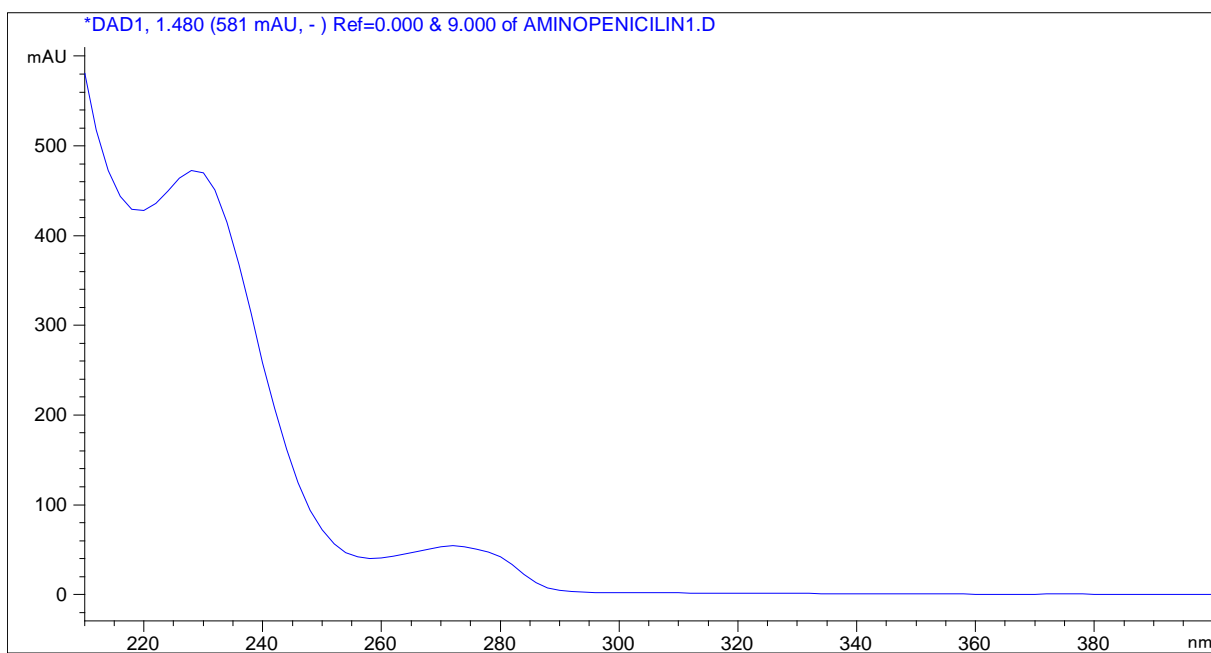
5.1.5 Kvalitativní charakteristika sledovaných analytů při definovaných chromatografických podmínkách

Retenční časy ampicilinu a amoxicilinu, které jsou kvalitativní charakteristikou analytů, byly zjištěny analýzou směsného roztoku ampicilinu a amoxicilinu za podmínek definovaných v následujících tabulkách (*Tabulka 5, Tabulka 6*).

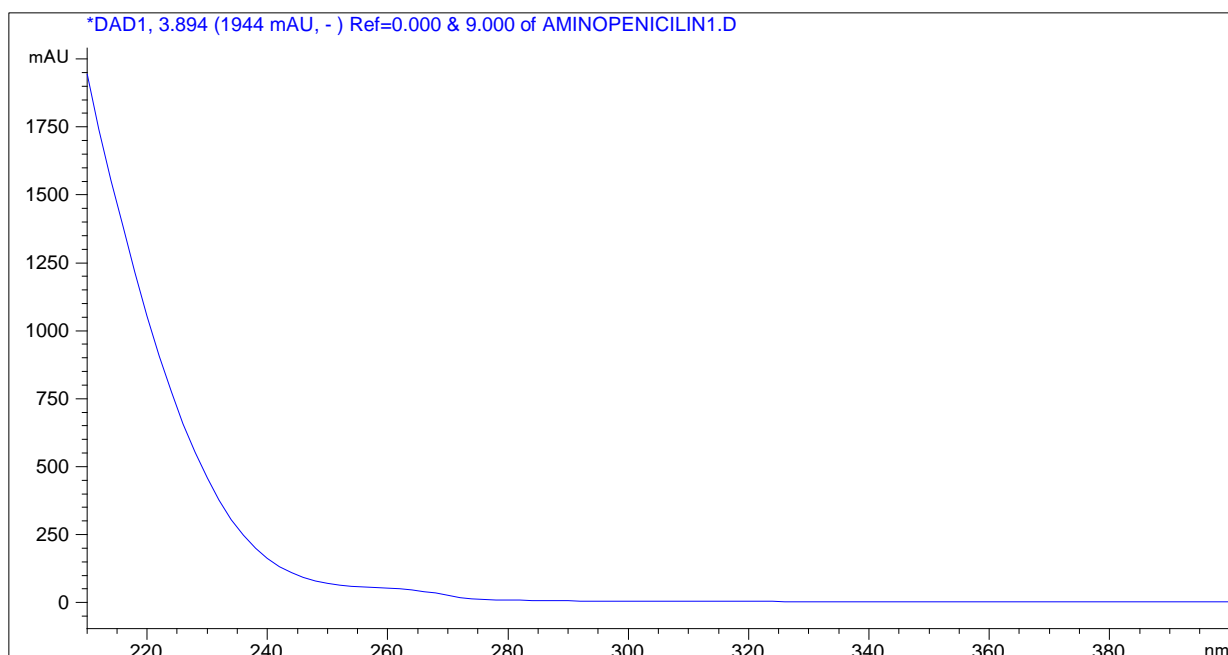
Tabulka 10: Retenční časy stanovovaných antibiotik

Sledovaný analyt	R _t [min]
Amoxicilin	1,468
Ampicilin	3,891

V případě použití spektrofotometrického detektoru s diodovým polem DAD, který snímá v průběhu analýzy celé UV-VIS spektrum, lze za další kvalitativní charakteristiku považovat absorpční spektra analytů. Absorpční spektra ampicilinu a amoxicilinu jsou zobrazena na obrázcích (*Obrázek 26, Obrázek 27*).



Obrázek 26: Naměřené absorpční spektrum amoxicilinu



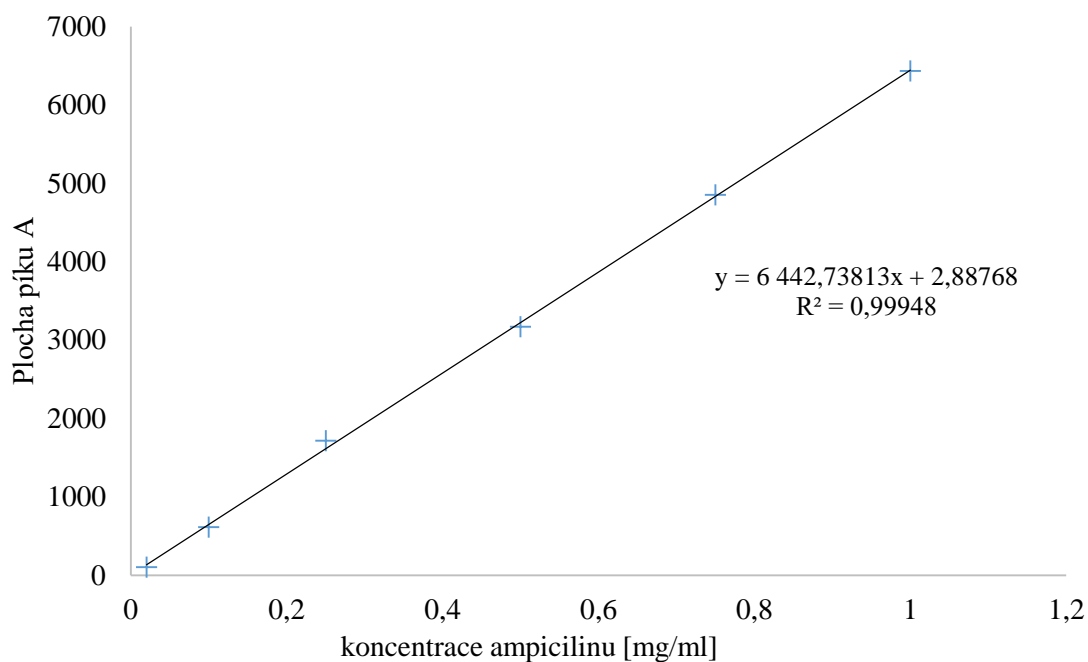
Obrázek 27: Naměřené absorpční spektrum ampicilinu

5.1.6 Kvantitativní charakteristika sledovaných analytů při definovaných chromatografických podmínkách - kalibrační přímky

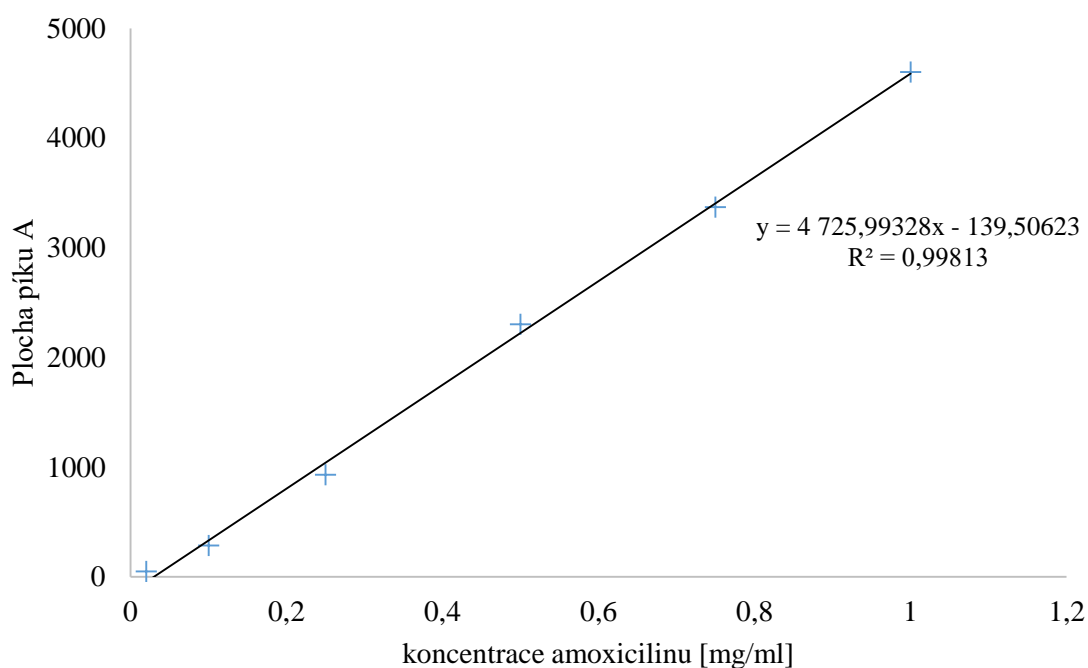
Součástí metody stanovení aminopenicilinových antibiotik je kvantifikace sledovaných analytů. Pro kvantifikaci analytů v reálných vzorcích odpadní vody bylo nutné sestavit kalibrační přímky, a to jako závislosti plochy píků sledovaných analytů na koncentraci. Proto byla vytvořena následující závislost: $A = f(c)$.

Pro sestavení kalibračních přímek cílových analytů bylo připraveno šest směsných roztoků standardů ampicilinu a amoxicilinu o koncentracích: 0,02; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; a 1,0 mg/ml. Tyto roztoky byly změřeny metodou UHPLC za chromatografických podmínek uvedených v tabulkách (*Tabulka 5, Tabulka 6*). Pro sestavení kalibračních přímek byla použita pouze data získaná detekcí při vlnové délce 210 nm.

S ohledem na absorpční spektra sledovaných analytů nebyla intenzita absorpce snímána při vyšší vlnové délce, čímž by bylo sice nejvíce zabráněno vlivu interferujících organických látek absorbujících při nižších vlnových délkách okolo 190 – 210 nm, zároveň by však nebyla zajištěna dobrá citlivost metody a nebylo by dosahováno dobrých intenzit signálů.



Obrázek 28: Kalibrační přímka ampicilinu



Obrázek 29: Kalibrační přímka amoxicilinu

5.2 Optimalizace SPE

Optimalizace preanalytického postupu SPE, která byla prováděna na modelových vodných vzorcích, představovala prioritně výběr vhodné extrakční kolonky pro sorpci sledovaných analytů, aby bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti analytů.

Vhodný druh extrakční kolonky a postup SPE extrakce byl zvolen na základě porovnání výtěžnosti analytů z uměle kontaminované Milli-Q vody standardy sledovaných analytů.

Množství uměle kontaminované vody použité pro extrakci analytů bylo 150 ml. Modelové vzorky vody, které byly použité při optimalizaci postupu SPE, byly připraveny přidáním 1 ml zásobního směsného roztoku ampicilinu a amoxicilinu o koncentraci 1 mg/ml každého analytu do 149 ml Milli-Q vody. Ke kvantifikaci a k určení výtěžnosti extrakce byly použity kalibrační přímky pro jednotlivá aminopenicilinová antibiotika.

5.2.1 Ověřované postupy SPE

Optimalizace postupu SPE byla prováděna na čtyřech typech dostupných extrakčních kolonek – *Oasis HLB* (60 mg sorbentu) od firmy Waters, *SupelTM – Select SPE* (60 mg sorbentu) od firmy Supelco, *SupelcleanTM ENVITM-18* (1 000 mg sorbentu) rovněž od firmy Supelco a *Bakerbond* (500 mg sorbentu) od firmy Baker. Na každý typ kolonky byly aplikovány výrobcem doporučené postupy extrakce, které byly rozšířeny o další dva postupy lišící se především hodnotou pH kondicionačních kapalin a nanášených vzorků odpadní vody, které byly modifikovány v závislosti na hodnotě pKa sledovaných analytů. Optimalizační postupy a výtěžnosti dostupných SPE kolonek jsou shrnuty v tabulkách (*Tabulka 11*, *Tabulka 12*, *Tabulka 13* a *Tabulka 14*).

Tabulka 11: Optimalizace výtěžnosti extrakční kolonky Oasis HLB (60 mg sorbentu)

<i>Oasis HLB</i>	<i>Postup č. 1</i>	<i>Postup č. 2</i>	<i>Postup č. 3</i>
<i>Kondicionace</i>	2×3 ml MeOH 2×2 ml Milli-Q	2×3 ml MeOH 2×2 ml Milli-Q	2×3 ml MeOH (pH 2) 2×2 ml Milli-Q (pH 2)
<i>Nanesení vzorku</i>	150 ml	150 ml (pH 2)	150 ml (pH 2)
<i>Promývací krok</i>	-	-	-
<i>Sušení vzduchem</i>	30 min	30 min	30 min
<i>Eluce</i>	2×3 ml MeOH	2×3 ml MeOH	2×3 ml MeOH
<i>Výtěžnost AMP</i>	7,01 %	60,32 %	63,78 %
<i>Výtěžnost AMX</i>	0,78 %	6,28 %	6,32 %

Tabulka 12: Optimalizace výtěžnosti extrakční kolonky Supel Select HLB (60 mg sorbentu)

Supel Select HLB	<i>Postup č. 1</i>	<i>Postup č. 2</i>	<i>Postup č. 3</i>
<i>Kondicionace</i>	2×3 ml MeOH 2×3 ml Milli-Q	2×3 ml MeOH 2×3 ml Milli-Q	2×3 ml MeOH (pH 2) 2×3 ml Milli-Q (pH 2)
<i>Nanesení vzorku</i>	150 ml	150 ml (pH 2)	150 ml (pH 2)
<i>Promytí</i>	-	-	-
<i>Sušení vzduchem</i>	30 min	30 min	30 min
<i>Eluce</i>	MeOH/acetonitril 50/50 2×3 ml	MeOH/acetonitril 50/50 2×3 ml	MeOH/acetonitril 50/50 2×3 ml
Výtěžnost AMP	4,28 %	5,21 %	5,57 %
Výtěžnost AMX	3,79 %	3,22 %	3,52 %

Tabulka 13: Optimalizace výtěžnosti extrakční kolonky Baker Bond (500 mg sorbentu)

Baker Bond	<i>Postup č. 1</i>	<i>Postup č. 2</i>	<i>Postup č. 3</i>
<i>Kondicionace</i>	1×5 ml MeOH 1×5 ml Milli-Q	1×5 ml MeOH 1×5 ml Milli-Q	1×5 ml MeOH (pH 2) 1×5 ml Milli-Q (pH 2)
<i>Nanesení vzorku</i>	200 ml	200 ml (pH 2)	200 ml (pH 2)
<i>Promytí</i>	-	-	-
<i>Sušení vzduchem</i>	30 min	30 min	30 min
<i>Eluce</i>	1x4 ml MeOH	1x4 ml MeOH	1x4 ml MeOH
Výtěžnost AMP	23,26 %	83,52 %	85,56 %
Výtěžnost AMX	0,3 %	0 %	0 %

Tabulka 14: Optimalizace výtěžnosti extrakční kolonky Supel Select ENVI-18 (1 000 mg sorbentu)

Supel Select ENVI-18	<i>Postup č. 1</i>	<i>Postup č. 2</i>	<i>Postup č. 3</i>
<i>Kondicionace</i>	1×9ml MeOH (pH 2) 1×9ml Milli-Q (pH 2)	1×9ml MeOH 1×9ml Milli Q	1×9ml MeOH (pH 2) 1×9ml Milli Q (pH 2)
<i>Nanesení vzorku</i>	200 ml	200 ml (pH 2)	200 ml (pH 2)
<i>Promytí</i>	-	-	-
<i>Sušení vzduchem</i>	60 min	60 min	60 min
<i>Eluce</i>	1×4 ml MeOH	1×4 ml MeOH	1×4 ml MeOH
Výtěžnost AMP	21,68 %	84,36 %	87,33 %
Výtěžnost AMX	0 %	0 %	0 %

Z výsledků uvedených v tabulkách (*Tabulka 11, Tabulka 12, Tabulka 13 a Tabulka 14*) je patrné, že pro extrakci ampicilinu jsou nejvhodnější kolonky *Baker Bond* dosahující výtěžnosti 84,36 % a kolonky *Supel Select ENVI-18* s výtěžností 87,33 %. Ani jedna z dostupných kolonek však nebyla vhodná pro extrakci amoxicilinu. Při žádném optimalizovaném postupu pro extrakci amoxicilinu z odpadní vody nedosahovala jeho výtěžnost ani 10 %. Vyhodnocení výtěžnosti sledovaných analytů bylo prováděno s využitím metody kalibrační přímky.

Protože výtěžnost ampicilinu na kolonkách *Supel Select ENVI-18* (1 000 mg) byla nejvyšší, byly tyto kolonky vybrány pro analýzu reálných vzorků odpadní vody. Průměrná výtěžnost ampicilinu na kolonkách *Supel Select ENVI-18* byla stanovena pomocí *postupu č. 3* prezentovaném v tabulce (*Tabulka 14*) pomocí celkem šesti paralelních stanovení. Promývací krok spočívající v nanesení menšího množství Milli-Q vody byl z důvodu velkých ztrát výtěžnosti (pokles výtěžnosti na 50 %) ampicilinu vynechán.

Tabulka 15: Určení průměrné výtěžnosti a základních statistických parametrů SPE extrakční kolonky Supel Select ENVI-18

Původní koncentrace AMP [mg/ml]	Výsledná koncentrace AMP [mg/ml]	Výtěžnost [%]
1,00	0,873 3	87,33
1,00	0,975 8	97,58
1,00	0,770 2	77,02
1,00	0,830 5	83,05
1,00	0,795 4	79,54
1,00	0,843 2	84,32
Průměrná koncentrace [mg/ml]		0,848 1
Průměrná výtěžnost [%]		84,81
Směrodatná odchylka [mg/ml]		0,065 98
Relativní směrodatná odchylka [%]		7,780
Rozptyl [mg/ml]		5,224 · 10⁻³

Funkcí SMODCH v programu MS Excel byla vypočtena směrodatná odchylka S , relativní směrodatná odchylka S_R byla potom vypočtena podle vzorce:

$$S_R = \frac{100 \cdot c_{prumer}}{S} \quad (2)$$

Pomocí funkce VAR. VÝBĚR v programu MS Excel byl vypočten rozptyl naměřených hodnot.

5.3 Reálné vzorky odpadní vody

Aminopenicilinové antibiotikum ampicilin bylo zjišťováno ve vzorcích odpadních vody. Vzorky odpadní vody byly odebírány z ČOV Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně a z ČOV Brno-Modřice. Před vlastní analýzou bylo nutné sestavit kalibrační přímky a bylo nutné si ověřit, jakým způsobem ovlivňuje sledovaná matrice stanovení posuzovaných analytů,

tzn. potvrdit, popřípadě vyloučit matriční efekt analyzované matrice. Dále byl vypočítán limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) sledovaných analytů.

5.3.1 Matriční efekt

Látky přítomné v reálném vzorku odpadní vody mohou mít na účinnost výtěžnosti SPE extrakce pozitivní, negativní nebo žádný vliv. Pro určení efektu vlivu matrice odpadní vody na stanovení aminopenicilinového antibiotika ampicilinu byla za optimalizovaného postupu SPE extrakce analyzována voda odebraná z přítoku a odtoku na ČOV Brno-Modřice, přičemž bylo do vody před nanesením na extrakční kolonku nadávkováno 500 µg ampicilinu. Vliv matrice byl sledován paralelně třikrát na přítoku i odtoku. Z těchto tří hodnot byla vypočítána průměrná hodnota určující vliv matričního efektu.

Matriční efekt byl vypočítán podle následující rovnice:

$$M[\%] = 100 \cdot \frac{\text{plocha píku v reálném vzorku}}{\text{plocha píku v modelovém vzorku}} \quad (3)$$

Na přítoku i odtoku na ČOV byl pozorován pozitivní vliv matrice na extrakci ampicilinu. Hodnoty matričních efektů pro přítok a odtok jsou shrnuty do krátké tabulky (*Tabulka 16*).

Tabulka 16: Stanovené hodnoty matričních efektů

	M [%]			ϕ M [%]
Přítok	134,1	122,7	138,6	131,8
Odtok	98,86	102,1	105,7	102,2

5.3.2 Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) stanovení ampicilinu

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) metody pro stanovení ampicilinu v odpadních vodách byl vypočítán pomocí níže uvedených rovnic [48]. Z nejnižšího bodu kalibrace, to znamená při koncentraci c (0,02 mg/ml) byla z chromatogramu odečtena výška signálu ampicilinu jako hodnota S . Ze šumu základní linie bylo náhodně vybráno pět píků nalevo a pět píků napravo od signálu pro ampicilin. Byly odečteny výšky těchto deseti píků, z nichž byla vypočítána průměrná hodnota představující hodnotu N .

$$LOD = 3 \cdot \frac{c}{S/N} \quad (4)$$

$$LOQ = 10 \cdot \frac{c}{S/N} \quad \text{Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.} \quad (5)$$

Vypočtená hodnota meze detekce byla 0,1964 µg/ml a meze stanovitelnosti 0,6546 µg/ml.

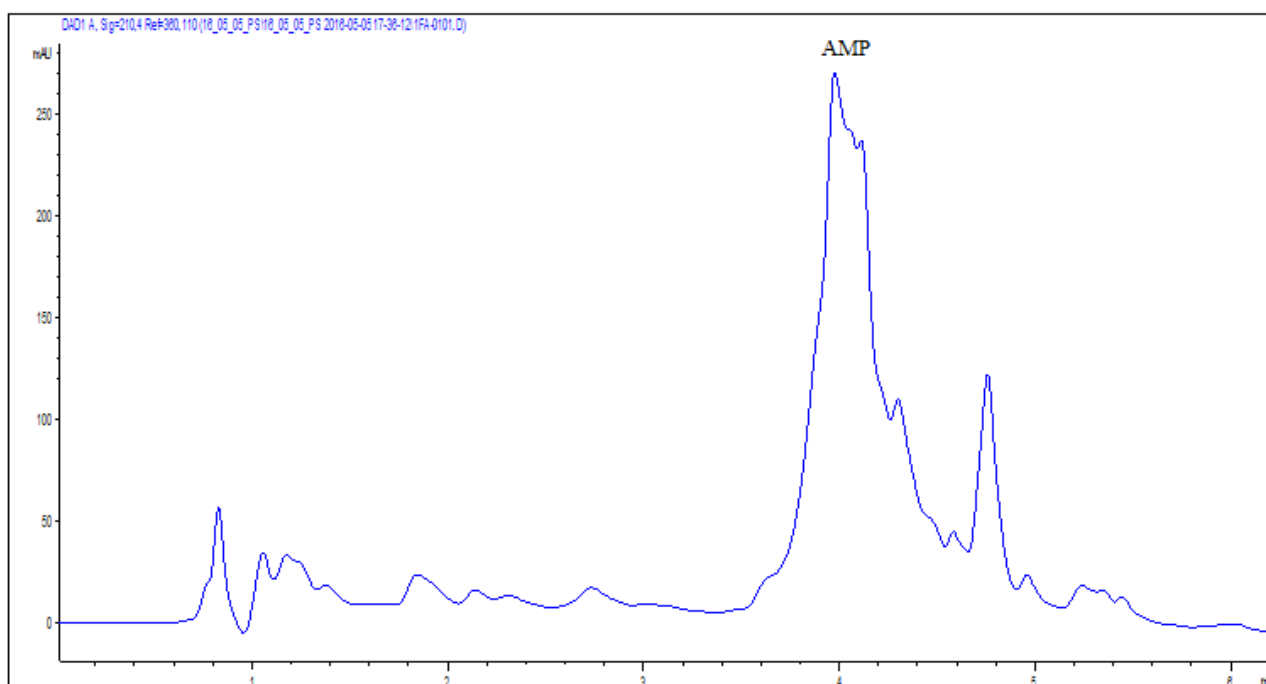
5.3.3 Výsledky analýzy reálných vzorků odpadní vody metodou UHPLC

Výsledky analýzy stanovení ampicilinu obsažených ve vzorcích odpadní vody jsou shrnuty do tabulky (*Tabulka 17*). Každý vzorek odpadní vody z přítoku i odtoku byl měřen paralelně dvakrát a následně byla vypočítána průměrná hodnota.

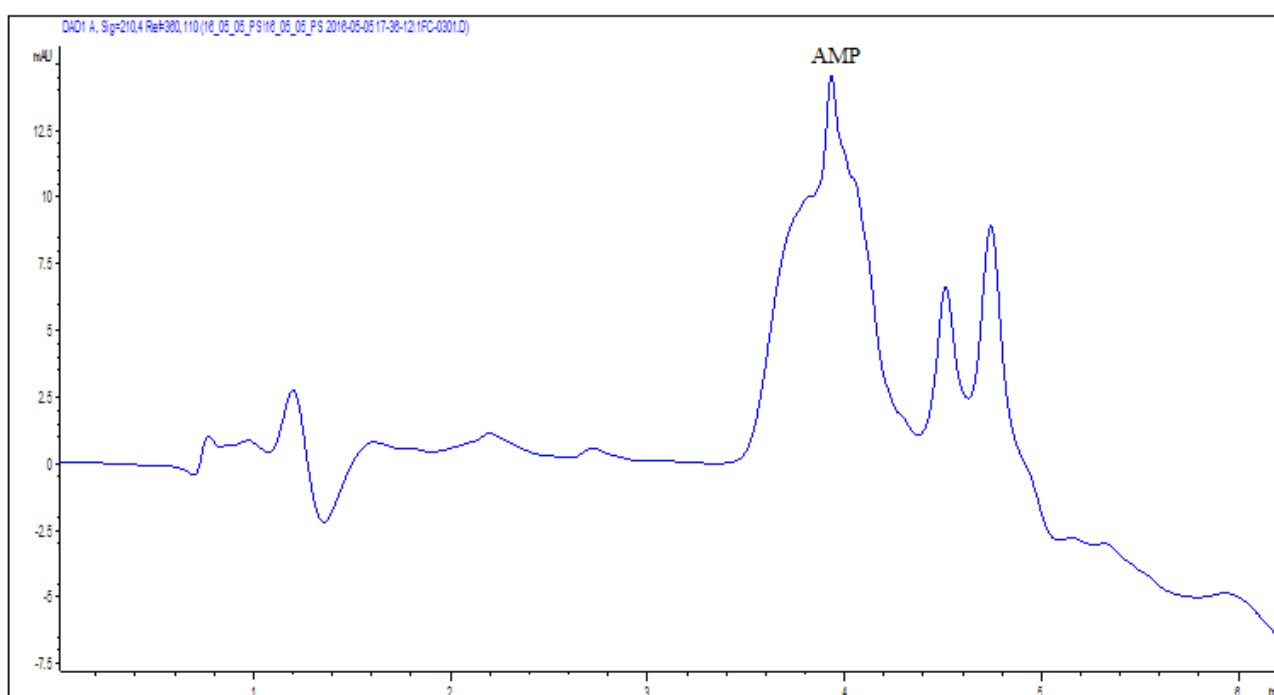
Tabulka 17: Zjištěné koncentrace ampicilinu v reálných vzorcích odpadní vody

Datum	Přítok/odtok	ČOV Brno-Modřice CAMP [mg/l]		ČOV VFU Brno CAMP [mg/l]	
		paralelní měření	ϕ	paralelní měření	ϕ
3.5.2016	Přítok	5,407	8,724		
		12,04			
	Odtok	4,183	4,024		
		3,865			
4.5.2016	Přítok	11,46	11,88	4,924	6,283
		12,30		7,641	
	Odtok	2,175	2,300	2,271	2,219
		2,425		2,166	
5.5.2016	Přítok	8,876	10,09	8,593	7,699
		11,31		6,805	
	Odtok	3,790	2,884	2,125	2,127
		1,978		2,128	
6.5.2016	Přítok			8,883	8,507
				8,130	
	Odtok			2,028	2,088
				2,148	

Metodou ultra-vysokoučinné kapalinové chromatografie byl ampicilin detekován v každém vzorku odpadní vody, a to jak na přítoku, tak také na odtoku v poměrně vysokých koncentracích. Stanovené koncentrace se však řádově liší od publikovaných výsledků environmentálních analýz na residua antibiotik v odpadních vodách, uvedených v literatuře (jednotky až desítky $\mu\text{g/l}$) [17; 49]. Také účinnost eliminace ampicilinu z odpadní vody není podle našich dosažených výsledků analýzy příliš vysoká, protože i na odtoku z ČOV byly vždy detekovány vysoké koncentrace ampicilinu v jednotkách mg/l . Příklady chromatogramů z analýzy odpadní vody z přítoku a odtoku na ČOV jsou uvedeny na obrázcích níže (Obrázek 30, Obrázek 31).



Obrázek 30: Chromatogram reálného vzorku odpadní vody z přítoku na ČOV Brno-Modřice



Obrázek 31: Chromatogram reálného vzorku odpadní vody z odtoku na ČOV Brno – Modřice

Jak je zřejmé, metoda UHPLC, vyvinutá ke stanovení aminopenicilinových antibiotik, není příliš vhodná pro tato stanovení.

Na chromatogramu nelze jednoznačně rozlišit pík patřící ampicilinu, protože došlo k jeho spojení s píky interferujících látek, eluovaných v čase 3,8 – 5 minut. Eluční zóna je navíc výrazně rozmývána. Dosažené výsledky stanovení ampicilinu metodou UHPLC prezentované v tabulce (Tabulka 17) nemají správnou vypovídající hodnotu.

5.4 Analýza reálných vzorků odpadní vody metodou HPLC/MS

5.4.1 Identifikace a kvantifikace ampicilinu

Protože metodou UHPLC nedošlo k účinné separaci molekul látek přítomných ve vzorcích odpadní vody, byly zakoncentrované vzorky odpadní vody navíc analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí, umožňující separaci molekul podle poměru m/z . Ionizační technikou byl elektrosprej a analyzátozem sférická iontová past. Analyty byly separovány na koloně KINETEX C18 o rozměrech 150×3 mm s velikostí částic 2,6 μm .

Tabulka 18: Chromatografické podmínky analýzy ampicilinu

HPLC podmínky:	
Nástřik vzorku na kolonu	2,50 μl
Teplota kolony	45 °C
Použité mobilní fáze	polární složka A: 0,01% TFA (pH 2,9) nepolární složka B: ACN
Průtok mobilní fáze	0,500 ml/min
Typ eluce	gradient mobilní fáze
Vlnová délka detekce	210 nm
Celková doba analýzy	5 min (+ 2 min na ekvilibraci kolony)
MS podmínky:	
Tlak zmlžovače	35 psi
Průtok sušícího plynu	12 l/min
Teplota sušícího plynu	350 °C
Ionizační mód	pozitivní
Scan	300 – 500 m/z

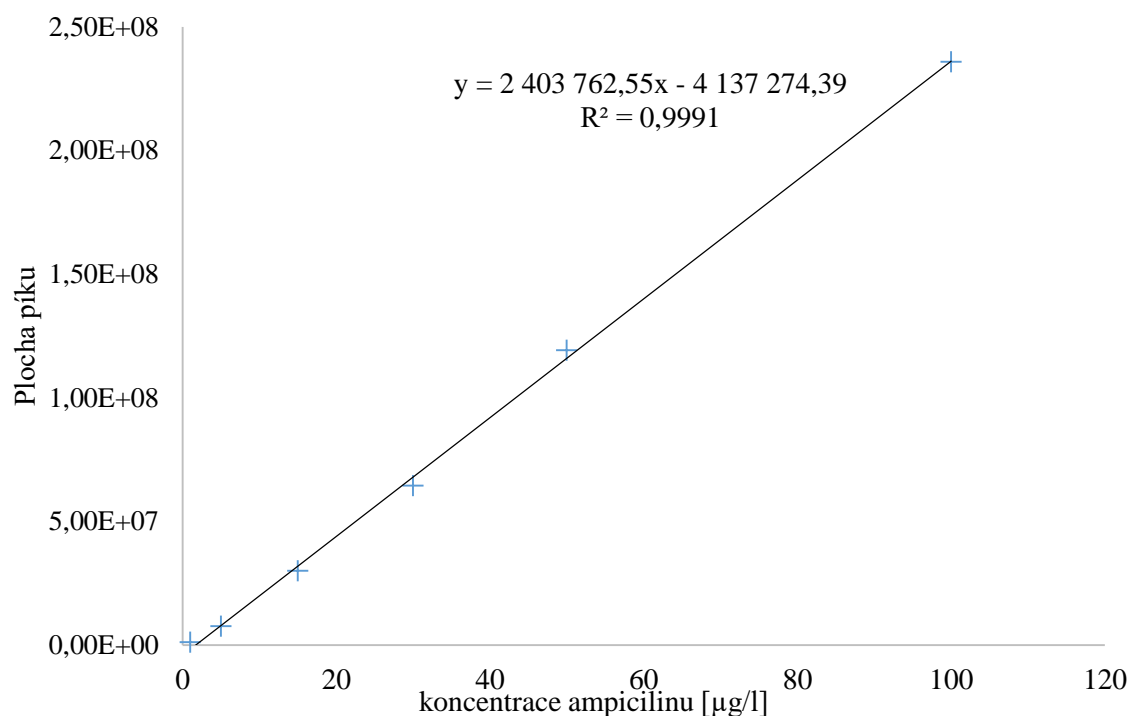
Tabulka 19: Průběh gradientu mobilní fáze

Čas [min]	0,01% TFA [%]	ACN [%]
2	20	80
3	40	60
4	40	40
5	20	80

Protože byl metodou LC/MS stanovován pouze jeden analyt ampicilin, byl gradientový typ eluce nastaven pouze ve smyslu rychlého a účinného promytí kolony od interferujících látek v reálném vzorku odpadní vody.

Z literatury byla zjištěna hmota 350,1 pro $[\text{M}+\text{H}]^+$, určující poměr m/z ampicilinu [43; 45; 49]. Z celého scanovaného hmotnostního spektra byl extrahován iontový chromatogram pro hmotu 350,1 m/z , ze kterého byl stanoven retenční čas ampicilinu při daných chromatografických podmínkách a gradientu mobilní fáze, definovaných v tabulkách

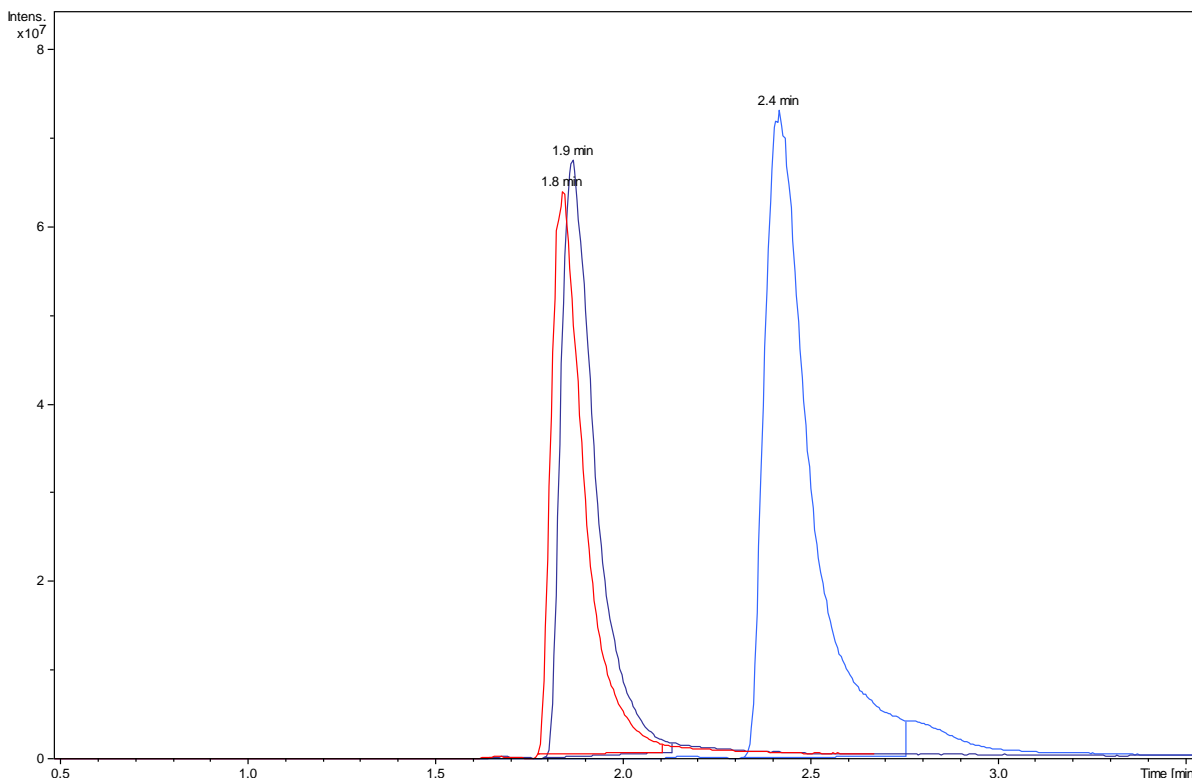
(Tabulka 18, Tabulka 19) na hodnotu 1,8 min. Ke kvantifikaci byla použita metoda kalibrační přímky, která představuje závislost plochy píků na koncentraci. Kalibrace byla provedena v rozsahu koncentrací 1 – 100 µg/ml.



Obrázek 32: Kalibrační přímka ampicilinu (HPLC/MS)

5.4.2 Optimalizace chromatografických podmínek

Z časových důvodů byla provedena pouze jednoduchá optimalizace chromatografických podmínek, a to především teploty kolony a gradientu mobilní fáze tak, aby bylo dosaženo intenzivního, štíhlého a symetrického píku pro ampicilin, a to v příslušném extrahovaném iontovém chromatogramu (EIC) pro hmotu 350,1. Pro HPLC/MS byly v podstatě přepočítány podmínky použité v metodě pro UHPLC a byly jen částečně modifikovány.



Obrázek 33: Optimalizace chromatografických podmínek na koloně KINETEX C18

Jako nejvhodnější byly zvoleny takové chromatografické podmínky a gradient mobilní fáze definované v tabulkách (*Tabulka 18*, *Tabulka 19*), při kterých je na chromatogramu znázorněn štíhlý a symetrický pík pro ampicilin, s retenčním časem 1,8 min. Zbylé dva píky prezentované na obrázku (*Obrázek 33*) vykazují sice větší odezvu, avšak chvostují a nejsou tak symetrické.

5.4.3 Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) stanovení ampicilinu

Pomocí vztahů z rovnic 4 a 5 byl vypočten limit detekce LOD a limit kvantifikace LOQ metody HPLC/MS za optimalizovaných chromatografických podmínek. Výška šumu byla odečtena z deseti míst v okolí píku analytu z jeho příslušného EIC a byla zprůměrována. Bylo pracováno s nejnižším bodem kalibrace, tj. 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

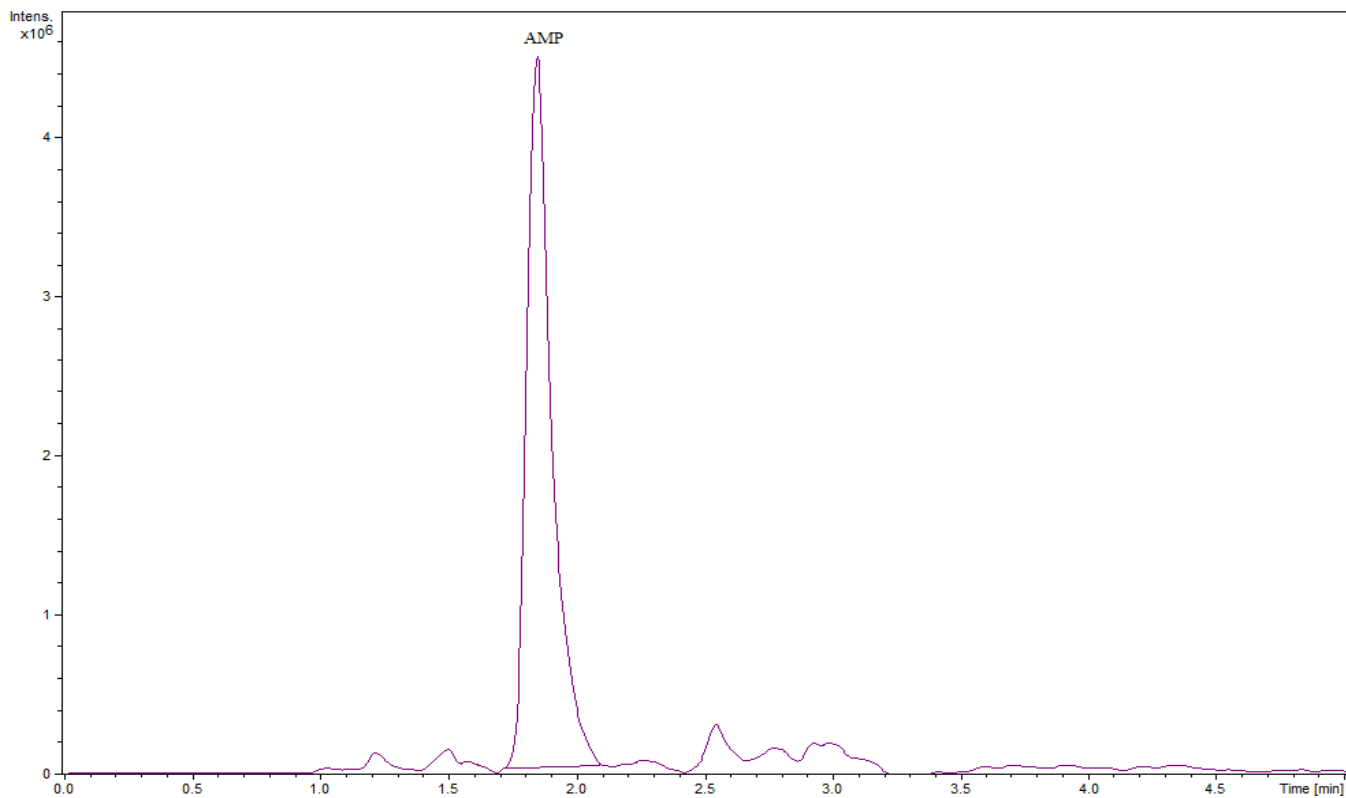
Vypočtená hodnota meze detekce metody byla stanovena na 0,031 8 $\mu\text{g/ml}$ a meze kvantifikace na 0,105 9 $\mu\text{g/ml}$.

5.4.4 Výsledky analýzy reálných vzorků odpadní vody metodou LC/MS

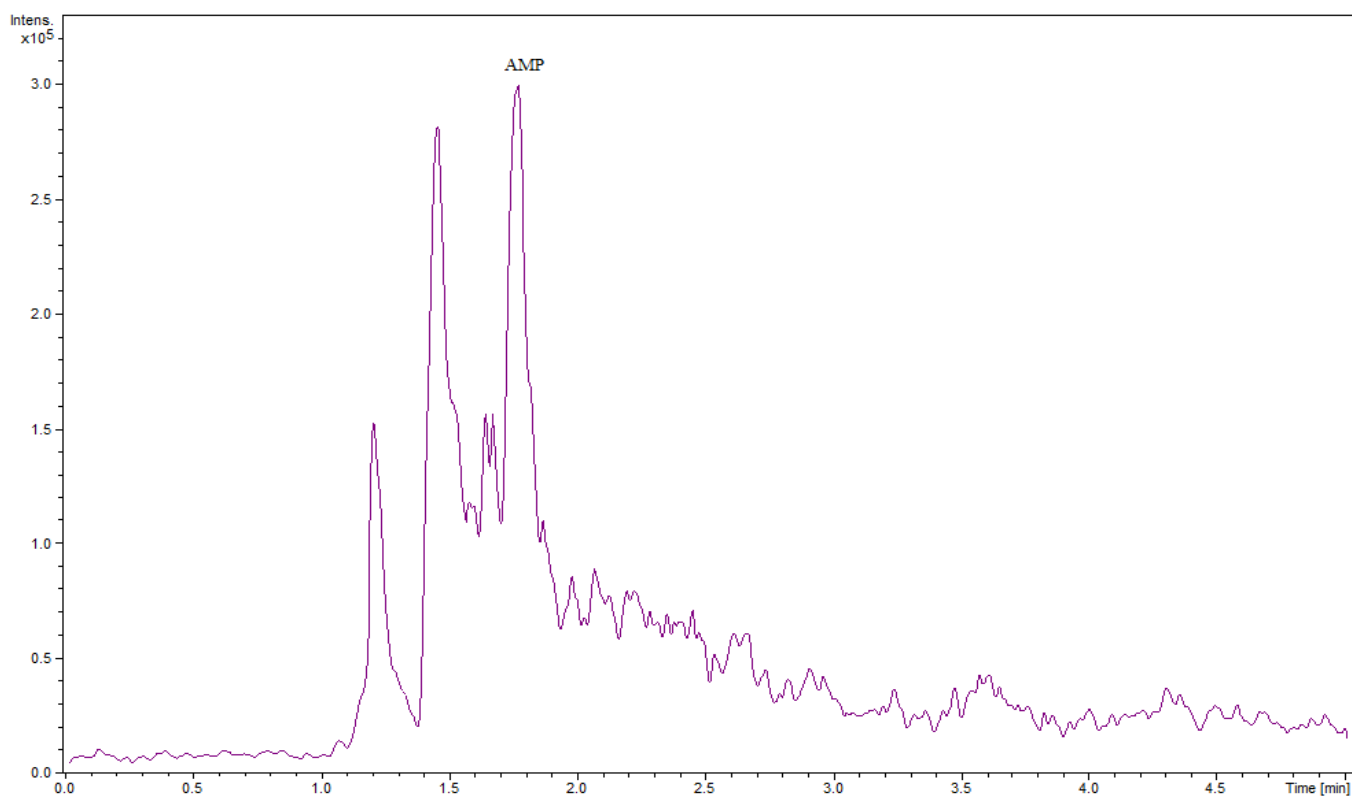
Tabulka 20: Zjištěné koncentrace ampicilinu v reálných vzorcích odpadní vody metodou HPLC/MS

Datum	Přítok/odtok	ČOV Modřice		ČOV VFU	
		c _{AMP} [μg/l]		c _{AMP} [μg/l]	
		paralelní měření	ϕ	paralelní měření	ϕ
3.5.2016	Přítok	116,9	108,6	/	
		100,2			
	Odtok	18,69	18,39		
		18,08			
4.5.2016	Přítok	122,5	113,2	39,74	39,65
		103,9		39,56	
	Odtok	17,85	17,92	17,74	17,65
		17,98		17,55	
5.5.2016	Přítok	131,7	123,1	68,86	76,87
		114,4		84,88	
	Odtok	18,73	18,60	18,27	18,13
		18,46		17,98	
6.5.2016	Přítok	/		88,21	83,91
				79,61	
	Odtok			18,29	18,04
				17,79	
12.5.2016	Přítok	153,1	149,3	84,19	91,28
		145,5		98,36	
	Odtok	17,84	17,72	17,98	18,18
		17,60		18,37	

Metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí byl ampicilin rovněž detekován v každém vzorku odpadní vody, a to jak na přítoku, tak také na odtoku, jak tomu bylo u metody UHPLC. Metoda LC/MS je však výrazně selektivnější a na základě separace poměru m/z hmoty 350,1 pro ampicilin bylo dosaženo výrazně nižších a reálnějších koncentrací, než tomu bylo u metody UHPLC, avšak koncentrace jsou ve srovnání s odbornou literaturou stále velice vysoké [17; 49]. K přesnějším a selektivnějším výsledkům by pravděpodobně mohlo vést použití detekce tandemovou technikou MS². Tato metoda by však vyžadovala časově náročnější optimalizaci a nebylo možno ji vyřešit v časovém horizontu stanoveném pro zpracování bakalářských prací.



Obrázek 34: Ukázka extrahovaného iontového chromatogramu ampicilinu z přítoku ČOV Brno-Modřice



Obrázek 35: Ukázka extrahovaného iontového chromatogramu ampicilinu z odtoku ČOV Brno-Modřice

6 ZÁVĚR

V předložené bakalářské práci je řešena aktuální problematika stanovení léčiv v odpadní vodě. Toto téma je v poslední době poměrně aktuální, především v důsledku stoupající spotřeby léčiv v medicíně, které mohou mít často negativní dopad na ekosystém. Z léčiv byla vybrána skupina aminopenicilinových antibiotik, z nichž byl v reálných vzorcích odpadní vody stanovován pouze ampicilin. Vzorky odpadní vody byly odborně odebírány z ČOV Brno-Modřice a z ČOV Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, a to vždy na přítoku i na odtoku.

Pro izolaci a zakoncentrování vybraného analytu z původní vodní matrice byla zvolena metoda extrakce tuhou fází (SPE). Nejvhodnější extrakční kolonkou pro izolaci ampicilinu byla kolonka *Supel Select ENVI-18* 1 000 mg.

Pro identifikaci a kvantifikaci aminopenicilinových antibiotik byla zvolena metoda ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) s UV-VIS detekcí pomocí diodového pole (DAD), což je časově i cenově dostupná metoda vykazující dostatečnou citlivost. Optimalizované analytické postupy byly aplikovány na reálné vzorky odpadních vod. V průběhu tří denního sledování byla zjišťována koncentrace ampicilinu na přítoku a na odtoku ČOV Brno-Modřice a ČOV Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

Optimalizovaná UHPLC metoda však ke stanovení ampicilinu v reálných vzorcích odpadní vody nebyla zcela vhodná, protože pro naše účely nebyla dostatečně selektivní. Proto byly formou pilotní studie rovněž analyzovány vzorky metodou vysokoúčinné chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC/MS), a to za použití elektrospreje jako ionizační techniky a sférické iontové pasti jako analyzátoru. Z časových důvodů byly chromatografické podmínky HPLC/MS metody optimalizovány v souladu s předchozí analytickou technikou.

Pro kvantitativní vyhodnocení množství ampicilinu v reálných vzorcích odpadních vod bylo nejprve nutné sestavit kalibrační přímku, a to jako závislost plochy píku sledovaného analytu na jeho koncentraci. Kalibrační závislost byla sestavena zvlášť pro metodu UHPLC s DAD detekcí a pro metodu HPLC/MS. Množství ampicilinu zjištěné na přítoku na ČOV Brno-Modřice, bylo v porovnání s ČOV VFU Brno vyšší, avšak v žádném případě nedošlo ve sledovaném období k překročení koncentrace 200 µg/l. Na ČOV VFU Brno se koncentrace ampicilinu na přítoku pohybovala v desítkách µg/l. Na odtocích z obou sledovaných ČOV byly koncentrace ampicilinu srovnatelné a v žádném případě nedošlo k překročení hodnoty 20 µg/l. K přesnějším a selektivnějším výsledkům by bylo vhodné použít tandemovou techniku MS², avšak tato metoda by vyžadovala další časově náročnější optimalizaci a nebyla cílem této práce. Vzhledem k tomu, že při přeměření roztoku standardu ampicilinu metodou UHPLC, a to po 14 dnech od jeho nařazení byl prokázán jeho částečný rozklad, lze v reálných vzorcích odpadní vody navíc očekávat i přítomnost jeho degradačních produktů a fragmentů. To však neznamená, že tyto produkty, případně fragmenty antibiotik, nemají žádný negativní dopad na ekosystém. Řešení této problematiky, včetně využití dalších separačních technik pro stanovení, bude předmětem mého dalšího studia souvisejícího se zpracováváním diplomové práce.

7 CITOVANÉ ZDOJE

- [1] HAMPL, František a Jaroslav PALEČEK. 2002. *Farmakochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 413 s. ISBN 80-708-0495-5.
- [2] Antibiotika ano či ne. In testcrp [online] [cit. 15. 3. 2015]. Dostupné na [www: <http://www.testcrp.cz/antibiotika/co-jsou-antibiotika/>](http://www.testcrp.cz/antibiotika/co-jsou-antibiotika/)
- [3] *Antibiotika*. In Velký lékařský slovník [online] [cit. 15. 3. 2015]. Dostupné na [www: <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/antibiotika>](http://lekarske.slovníky.cz/pojem/antibiotika)
- [4] *The pre-bacterial era; The golden age of antibacterials*. In Antimicrobial resistance learning site [online] [cit. 16. 3. 2015]. Dostupné na [www: <http://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/historical-perspectives/the-pre-antibacterial-era>](http://amrls.cvm.msu.edu/pharmacology/historical-perspectives/the-pre-antibacterial-era)
- [5] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 2. rozš. vyd. ISBN 978-80-7080-639-5
- [6] Howard Walter Florey and Ernst Boris. In ChainChemical Heritage Foundation [online] [cit. 15. 3. 2015]. Dostupné na [www: <http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/pharmaceuticals/preventing-and-treating-infectious-diseases/florey-and-chain.aspx>](http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/pharmaceuticals/preventing-and-treating-infectious-diseases/florey-and-chain.aspx)
- [7] PROKEŠ, Jaroslav. 2005. *Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 248 s. ISBN 80-726-2301-X.
- [8] *Prontosil*. In Pubchem [online] [cit. 15. 3. 2015]. Dostupné na [www: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/66895#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/66895#section=Top)
- [9] *Antibiotika a antibakteriální chemoterapeutika* [online] [cit. 30. 3. 2015]. Dostupné na [www: <http://mikrobiologie.xf.cz/files/antibiotika.doc.html>](http://mikrobiologie.xf.cz/files/antibiotika.doc.html)
- [10] LOCHMANNOVÁ, Jindra, Milan KOLÁŘ a Dagmar KOUKALOVÁ. 2004. ANTIBIOTICKÁ LÉČBA BAKTERIÁLNÍCH INFEKČÍ Z POHLEDU KLINIKA, MIKROBIOLOGA A FARMAKOLOGA. *Interní medicína pro praxi*. (1): 15-18. Dostupné také z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2004/01/04.pdf>
- [11] HYNIE, Sixstus. 1999. *Základy farmakologie*. 1. vyd. Praha: TRITON, 368 s. ISBN 80-725-4048-3.
- [12] ALANIS, Alfonso J. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research*. 2005, **36**(6), 697-705. DOI: 10.1016/j.arcmed.2005.06.009. ISSN 01884409. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0188440905002730>
- [13] Antibiotikum [online] [cit. 30. 3. 2015]. Dostupné na [www: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum>](http://cs.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum)

- [14] HYNIE, Sixtus. 2001. *Farmakologie v kostce*. Vyd. 2. Praha. ISBN 80-7254-181-1.
- [15] *Příbalové informace pro uživatele ampicilin 0,5 antibiotika* [online] [cit. 23. 4. 2015]. Dostupné na www:
 <<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:UjLceQy6-PIJ:www.sukl.cz/download/pil/PI107646.doc+&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz> >
- [16] HYNIE, Sixtus. 2003. *Speciální farmakologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 166 s. Učební texty (Univerzita Karlova). ISBN 80-246-0656-9.
- [17] LARA, Francisco J., Monsalud DEL OLMO-IRUELA, Carmen CRUCES-BLANCO, Carolina QUESADA-MOLINA a Ana M. GARCÍA-CAMPAÑA. Advances in the determination of β -lactam antibiotics by liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012, **38**, 52-66. DOI: 10.1016/j.trac.2012.03.020. ISSN 01659936. Dostupné také z:
 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993612001781>
- [18] CÁMARA, M., A. GALLEGO-PICÓ, R.M. GARCINUÑO, P. FERNÁNDEZ-HERNANDO, J.S. DURAND-ALEGRÍA a P.J. SÁNCHEZ. An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine β -lactam antibiotics in ewe milk. *Food Chemistry*. 2013, **141**(2), 829-834. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.131. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613003877>
- [19] BENEŠ, J. *Vlastnosti a dávkování aminopenicilinových antibiotik* [online]. [cit. 2015-05-05]. Dostupné z: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/vlastnosti-a-davkovani-447155>
- [20] *Ampicilin*. In PubChem.net [online] [cit. 25. 4. 2015]. Dostupné na www: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6249#section=Top>
- [21] WERNER, H., W. HEIZMANN a F. HEILMANN. The effect of a combination of ampicillin and sulbactam against clinical isolates of anaerobic bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1996, **6**, S27-S30. DOI: 10.1016/S0924-8579(96)80004-5. ISSN 09248579. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857996800045>
- [22] PENWELL, William F., Adam B. SHAPIRO, Robert A. GIACOBBE, et al. Molecular Mechanisms of Sulbactam Antibacterial Activity and Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015, **59**(3). DOI: 10.1128/AAC.04808-14. ISSN 0066-4804. Dostupné také z: <http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.04808-14>
- [23] *Sulbactam*. In PubChem.net [online] [cit. 5. 5. 2015]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/130313#section=Top>
- [24] *Amoxicilin*. In PubChem.net [online] [cit. 5. 5. 2015]. Dostupné na www: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/33613#section=Top>

- [25] *Amoxicillin*. In PubChem.net [online] [cit. 5. 5. 2015]. Dostupné na [www: <http://www.drugs.com/monograph/amoxicillin.html>](http://www.drugs.com/monograph/amoxicillin.html)
- [26] HELÁN, Václav (ed.). *Odběry vzorků: sborník přednášek z kurzu. 2., upr. a dopl. vyd.* Český Těšín: 2 Theta, 2006. Analytical standards and equipment. ISBN 80-863-8033-5.
- [27] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analyza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014.* Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [28] POPL, Milan a Jan FÄHNRIK. *Analytická chemie životního prostředí.* Vyd. 4., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1999. ISBN 80-708-0336-3.
- [29] *Analytika odpadních vod.* Praha: Česká vědeckotechnická vodohospodářská společnost, 1995. ISBN 80-020-1072-8.
- [30] LABUDA, Ján. *Průručka vybraných pojmů v analytické chemii.* Bratislava: Nakladatel'stvo STU, 2012. Edícia průruček. ISBN 978-80-227-3769-2.
- [31] Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. ČSN online. ÚNMZ. [online]. © 2014 [cit. 2015-12-28] Dostupné z: <https://csnonline.unmz.cz/>
- [32] BENITO-PEÑA, E., A.I. PARTAL-RODERA, M.E. LEÓN-GONZÁLEZ a M.C. MORENO-BONDI. Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection. *Analytica Chimica Acta.* 2006, **556**(2), 415-422. DOI: 10.1016/j.aca.2005.09.054. ISSN 00032670. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005016247>
- [33] *Guide to solid phase extraction.* In Sigma-Aldrich [online]. 2001 [cit. 18. 10. 2015]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- [34] *Extrakce na pevnou fázi - přehled nových a speciálních typů sorbentů, vybavení pro SPE.* In Labicom [online] [cit. 18. 10. 2015]. Dostupné na [www: http://www.labicom.cz/spe-kolonky-81/](http://www.labicom.cz/spe-kolonky-81/)
- [35] MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC separations.* Waltham, MA: Elsevier, c2013. ISBN 978-0-12-385013-3.
- [36] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi.* vyd. 1. Hradec Králové, Klatovy: Lucie Nováková, Michal Douša, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [37] *Chemické dělicí metody – přednáška 6* [online] [cit. 12. 5. 2015]. Dostupné na [www: <https://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=310206>](https://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=310206)

- [38] The DAD and MWD principle. In: *Agilent Technologies* [online] [cit. 25. 5. 2016]. Dostupné z: http://www.team-cag.com/support/theory/chroma/hplc_bas_at/detectors/dadPrinciple.html
- [39] G1315B Diodenarraydetektor der Series 1100. In: *Chromatograph.de* [online] [cit. 25. 5. 2016]. Dostupné z: <http://www.chromatograph.de/de/Chromatographen/HPLC-Systeme/G1315B-Diodenarraydetektor-der-Series-1100>
- [40] FERNANDEZ-TORRES, R., M. Olías CONSENTINO, M.A. Bello LOPEZ a M. Callejon MOCHON. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography–diode array–fluorescence (HPLC–DAD–FLD) in human urine samples. *Talanta*. 2010, **81**(3), 871-880. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.01.031. ISSN 00399140. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914010000457>
- [41] BARKER, James, ANDO, D. J. (ed.). *Mass spectrometry: analytical chemistry by Open Learning*. 2nd ed. Chichester: John Wiley, c1999. Analytical chemistry by Open Learning. ISBN 04-719-6762-9.
- [42] A diagrammatic representation of an ion trap. In: *NPTEL* [online]. [cit. 24. 05. 2016]. Dostupné z: <http://nptel.ac.in/courses/102103044/module2/lec12/5.html>
- [43] MACAROV, C.A., L. TONG, M. MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.P. HERMO, E. CHIRILA, Y.X. WANG, D. BARRÓN a J. BARBOSA. Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC–MS/MS. *Food Chemistry*. 2012, **135**(4), 2612-2621. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.126. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612011272>
- [44] LIU, Chuangji, Hai WANG, Yanbin JIANG a Zhenxia DU. Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2011, **879**(7-8), 533-540. DOI: 10.1016/j.jchromb.2011.01.016. ISSN 15700232. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023211000390>
- [45] SUN, Lirui, Longfei JIA, Xing XIE, et al. Quantitative analysis of amoxicillin, its major metabolites and ampicillin in eggs by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2016, **192**, 313-318. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.028. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461501033X>
- [46] ZHOU, YunYun, Lavorato, D., Mathews, T., & Countryman, S. Rapid LC/MS/MS Analysis of Antibiotics in Meat for Human Consumption Using Kinetex™ 2.6 µm Core-Shell LC Column.

- [47] *Český lékopis 2005: Pharmacopea bohemica MMV (Ph.B.MMV)*. 1. vyd. Praha: Grada, 2005, 3249 s. ISBN 80-247-1532-5.
- [48] SWARTZ, Michael a Ira S. KRULL. *Handbook of analytical validation*. Boca Raton: CRC Press, c2012. ISBN 978-0-8247-0689-0.
- [49] GROS, Meritxell, Sara RODRÍGUEZ-MOZAZ a Damià BARCELÓ. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1292**, 173-188. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.12.072. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731300037X>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APA	aminopenicilanová kyselina
ČOV	Čistírna odpadních vod
DAD	Detektor diodového pole
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
EIC	extrahovaný iontový chromatogram
ESI	ionizace elektrosprejem
GC	plynová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii)
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MAE	metoda mikrovlonné extrakce
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie
MS ²	tandemová hmotnostní spektrometrie
PLE	tlaková kapalinová extrakce
PSE	zrychlená extrakce rozpouštědlem
RNA	ribonukleonová kyselina
RP	obrácená fáze (Reserved Phase)
SOP	standartní operační postup
SPE	extrakce na tuhou fázi
TFA	trifluoroctová kyselina
VFU	Veterinární a farmaceutická univerzita
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
USE	metoda ultrazvukové extrakce
UV	ultrafialové záření
UV/VIS	spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti záření