

Speciální metody v analytice vody

LÉČIVÉ LÁTKY jako antropogenní zátěž hydrosféry

Štěpánka Smrčková, Václav Janda

VŠCHT Praha

Fakulta technologie ochrany prostředí

Ústav technologie vody a prostředí

Centralizovaný rozvojový projekt MŠMT č. C29:

„Integrovaný systém vzdělávání v oblasti výskytu a eliminace reziduí léčiv v životním prostředí“



léčivé látky	původu minerálního, rostlinného, živočišného, syntetické
léčivé přípravky	tj. lékové formy
léky	tj. léčivé látky a léčivé přípravky upravené k použití a vydání pacientovi
léčiva	tj. léčivé látky, léčivé přípravky, léky

humánní i veterinární léčivo tj. jakákoliv látka nebo směs podávaná člověku nebo zvířeti k prevenci, diagnostice, léčení nebo mírnění chorob nebo ovlivnění fyziologických funkcí

léčiva se řadí do skupin:

PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) **léčiva a produkty osobní péče**

(např. přípravky pro údržbu domácností a veřejných prostor, UV-filtry, vůně, optické zjasňovače, detergenty, zpomalovače hoření, náhradní sladidla a některá další potravinová aditiva, prostředky pro kultivaci půdy nebo rostlin atd.)

a

EDCs (Endocrine Disrupting Chemicals) **endokrinní disharmonizátory**

tj. látka nebo směs látek měnící funkci (funkce) endokrinního systému za současného negativního vlivu na organismus, na který působí nebo na jeho potomstvo či na populaci,

tj. látky schopné zasahovat do hormonální regulace lidí a živočichů

ATC anatomicko-terapeutické skupiny

A trávicí trakt a metabolismus

- A01: stomatologické přípravky
- A02: léčiva k terapii onemocnění spojených s poruchou acidity
- A03: léčiva k terapii funkčních poruch trávicího traktu
- A04: antiemetika
- A05: léčiva k terapii onemocnění jater a žlučových cest
- A06: léčiva proti zácpě
- A07: antidiaroeika, střevní protizánětlivá a protiinfekční léčiva
- A08: léčiva k terapii obezity, kromě dietetik
- A09: digestiva včetně enzymových přípravků
- A10: léčiva k terapii diabetu
- A11: vitaminy
- A12: minerální doplňky
- A13: tonika
- A14: anabolika pro systémovou aplikaci
- A15: stimulancia chuti
- A16: trávicí trakt a metabolismus, jiná léčiva

B krev a krve tvorné orgány

- B01: antikoagulancia, antitrombotika
- B02: hemostyptika, hemostatika
- B03: antianemika
- B05: krevní náhrady, infuzní a perfuzní roztoky
- B06: jiné hematologické látky

C kardiiovaskulární systém

- C01: kardiaka
- C02: antihypertenziva
- C03: diuretika
- C04: periferní vazodilatancia
- C05: vazoprotektiva, venofarmaka
- C07: beta-blokátory
- C08: blokátory kalciových kanálů
- C09: léčiva ovlivňující renin-angiotenzinový systém
- C10: látky upravující hladinu lipidů

D dermatologika

- D01: antimykotika pro použití v dermatologii
- D02: emoliencia a protektiva
- D03: přípravky pro léčbu ran a vředů
- D04: antipruriginóza, včetně antihistaminik, anestetik, atd.
- D05: antipsoriatika
- D06: antibiotika a chemoterapeutika pro použití v dermatologii
- D07: kortikosteroidy, dermatologické přípravky
- D08: antiseptika a dezinficiencia
- D09: léčivé obvazy
- D10: léčiva k terapii akné
- D11: jiné dermatologické přípravky

G urogenitální trakt a pohlavní hormony

- G01: gynekologická antiinfektiva a antiseptika
- G02: jiná gynekologika
- G03: pohlavní hormony a modulatory genitálního systému
- G04: urologika

H systémová hormonální léčiva kromě pohlavních hormonů a inzulínů

- H01: hypofyzární a hypotalamické hormony a analogy
- H02: kortikosteroidy pro systémovou aplikaci
- H03: léčiva k terapii onemocnění štítné žlázy
- H04: pankreatické hormony
- H05: léčiva ovlivňující homeostázu vápníku

J antiinfektiva pro systémovou aplikaci

- J01: antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci
- J02: antimykotika pro systémovou aplikaci
- J04: antimykobakteriální léčiva
- J05: antivirotika pro systémovou aplikaci
- J06: hyperimunní séra a imunoglobuliny
- J07: vakcíny

L cytostatika a imunomodulační léčiva

- L01: cytostatika
- L02: hormonální léčiva používaná v onkologii
- L03: imunostimulancia
- L04: imunosupresiva

M muskuloskeletární systém

- M01: protizánětlivá a protirevmatická léčiva
- M02: lokální léčiva k terapii bolestí svalů a kloubů
- M03: myorelaxancia
- M04: léčiva k terapii dny
- M05: léčiva k terapii nemocí kostí
- M09: jiná léčiva pro poruchy muskuloskeletálního systému

N nervový systém

- N01: anestetika
- N02: analgetika
- N03: antiepileptika
- N04: antiparkinsonika
- N05: psycholeptika
- N06: psychoanaleptika
- N07: jiná léčiva nervového systému

P antiparazitika, insekticidy a repelenty

- P01: antiprotozoika
- P02: anthelmintika
- P03: antiectoparazitika, včetně skabicedních léčiv, insekticidů a repelentů

R respirační systém

- R01: nosní léčiva
- R02: krční léčiva
- R03: léčiva k terapii onemocnění spojených s obstrukcí dýchacích cest
- R05: léčiva proti nachlazení a kašli
- R06: antihistaminika pro systémovou aplikaci
- R07: jiná léčiva respiračního systému

S smyslové orgány

- S01: oftalmologika
- S02: otologika
- S03: oftalmologika a otologika

Q veterinární přípravky

- Q01: veterinaria - zažívací trakt a metabolismus
- Q02: veterinaria - krev a krvetvorné orgány
- Q03: veterinaria - kardiovaskulární systém
- Q04: veterinaria - dermatologika
- Q05: veterinaria - reprodukční hormony
- Q06: veterinaria - kortikosteroidy a systémová antihistaminika
- Q07: veterinaria - systémová antiinfektiva
- Q08: veterinaria - léčiva nervového systému
- Q09: veterinaria - antiparazitika
- Q10: veterinaria - léčiva respiračního systému
- Q11: veterinaria - léčiva smyslových orgánů
- Q12: veterinaria - gynekologika
- Q13: veterinaria - povzbuzující léčiva a stimulanty
- Q14: veterinaria - mikrobiotika, probiotika
- Q15: veterinaria - imunopreparáty
- Q16: veterinaria - přípravky pro speciální druhy zvířat
- Q20: veterinaria - varia

V různé přípravky

- V01: alergeny
- V03: všechny jiné terapeutické přípravky
- V04: diagnostika
- V06: celková výživa
- V07: jiné neterapeutické přípravky
- V08: kontrastní látky
- V09: diagnostická radiofarmaka
- V10: terapeutická radiofarmaka
- V11: fytofarmaka a živočišné produkty (česká ATC skupina)
- V12: homeopatika (česká ATC skupina)
- V20: chirurgický obvazový materiál

označení a názvy odpovídají aktuálnímu ATC indexu WHO
 jedna léčivá látka může být obsažena v monokomponentním léčivém přípravku či v kompozitu →
 léčivé přípravky mají **7-místný kód**

Př.

léčivá látka	ATC	léčivý přípravek	farmakologický účinek	další složky
<i>paracetamol</i>	N02BE51	ACIFEIN	analgetikum, antipyretikum	kys. acetylsalicylová, kofein
	N02AX52	APO-TRAMADOL	analgetikum	tramadol hydrochlorid
	N02BE51	ATARALGIN	analgetikum	guaifenesinum, kofein
	N02BE51	COLDREX MAXIGRIP	analgetikum, antipyretikum	kys. askorbová, fenylefedrin hydrochlorid
	N02BE51	MIGRALGIN	analgetikum, antipyretikum	kys. acetylsalicylová, kofein
	N02BE51	PANADOL EXTRA	analgetikum, antipyretikum	kofein
	N02BE01	PARACETAMOL KABI	analgetikum, antipyretikum	mono
	N02BE01	PARALEN SUS	analgetikum, antipyretikum	mono
	N02BE51	SARIDON	analgetikum, antipyretikum	propyfenazon, kofein
	N02BE51	TOMAPYRIN	analgetikum, antipyretikum	kys. acetylsalicylová, kofein
	N02AX02	TRAMADOL	analgetikum, anodynum	tramadol hydrochlorid
	N02BE51	TRIGRIP	analgetikum, antipyretikum	kys. askorbová, kofein
	N02BE51	VALETOL	analgetikum	propyfenazon, kofein
	Σ 85			

N ATC pro
N02 terapeutická podskupina
N02B farmakologická podskupina
N02BE chemická podskupina
N02AX chemická podskupina
N02BE51 chemická látka
N02AX52 chemická látka
N02BE01 chemická látka
N02AX02 chemická látka

nervový systém,
analgetika,
jiná analgetika a antipyretika
anilidy
jiná opioidní analgetika,
paracetamol kompozit kromě psycholeptik
tramadol kompozit
kyselina acetylsalicylová
tramadol

HUMÁNNÍ BIOTRANSFORMACE

eliminace léčivých látek = **biotransformace** ve dvou fázích a **exkrece**

fáze I → **metabolity** farmakologicky inaktivní nebo i s vyšším farmakologickým účinkem nebo toxické

oxidace → původní struktura podlehne hydroxylaci, dealkylaci, deaminaci, desulfuraci, sulfoxidaci, vznik oxidů

redukce → redukce karbonylové, nitro-, azo- skupiny, redukční dehalogenace

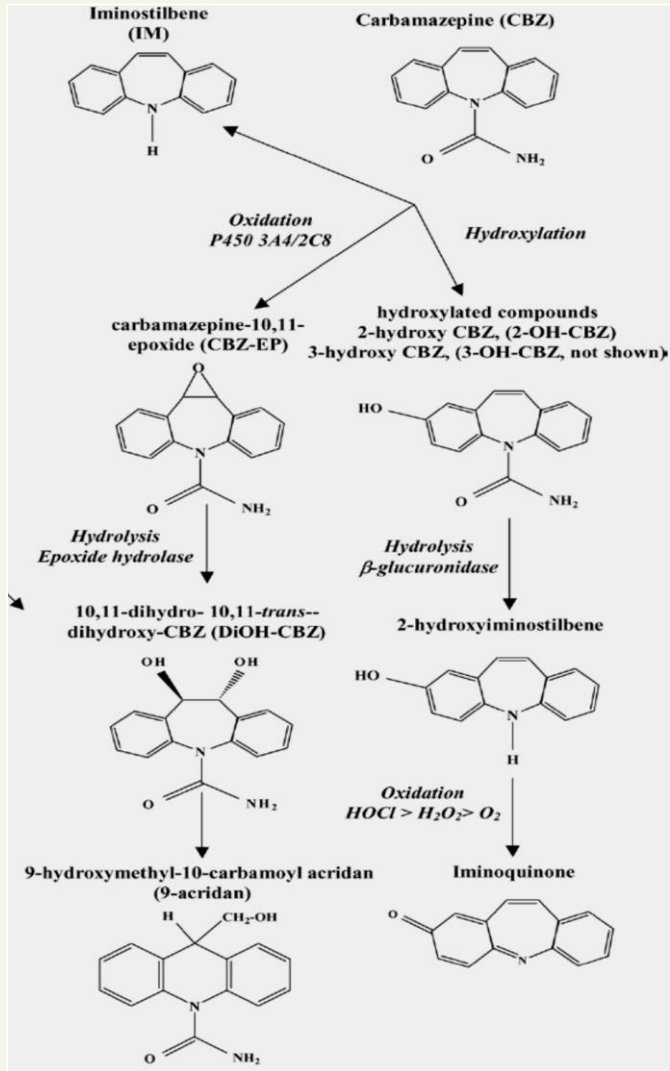
hydrolýza → hydrolytické štěpení esterové vazby, vazby C-N, hydrolytická dehalogenace

proléčiva - aplikovaná forma farmakologicky inaktivní → biotransformace → farmakologicky aktivní forma

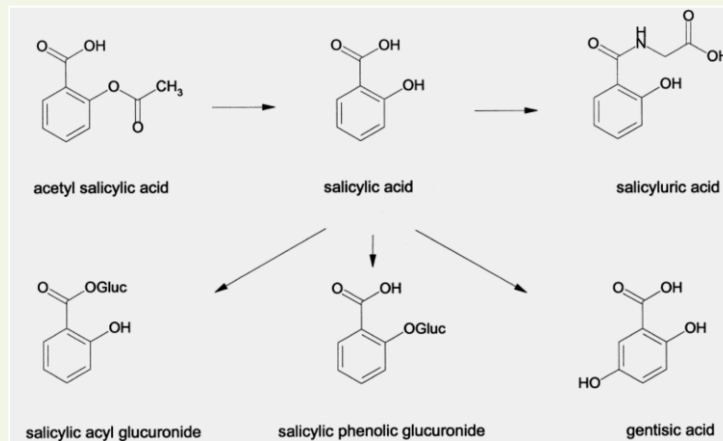
fáze II → **konjugáty** - za účasti transferáz kovalentní vazba mezi funkční skupinou původní látky či metabolitu a konjugačním činidlem (kyselina glukuronová, glutathion, metathion, ...)
intermediární metabolismus → konjugační činidla

enterohepatální recirkulace

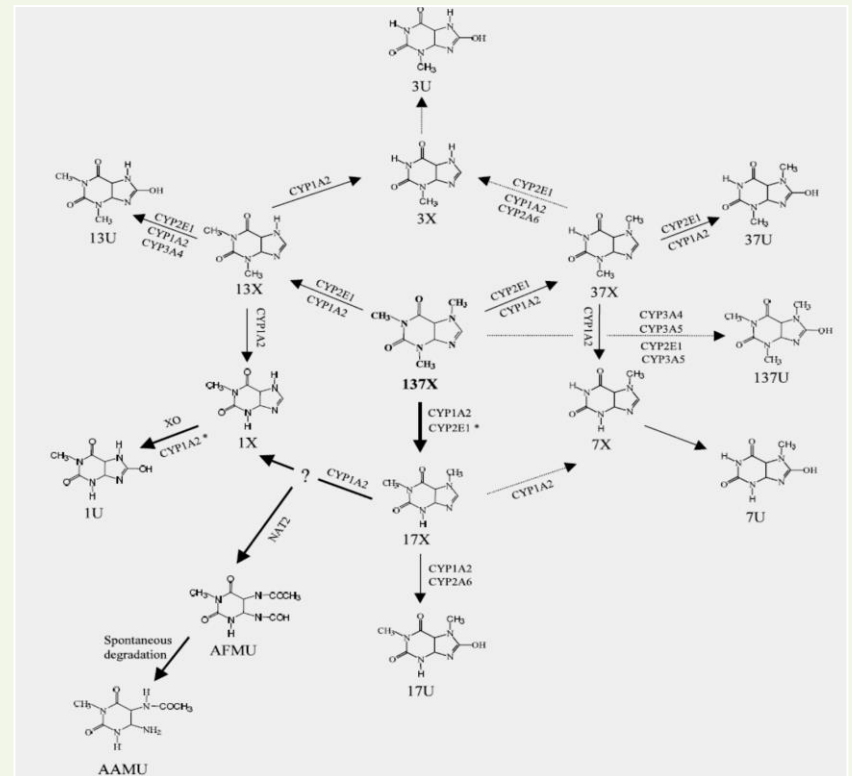
konjugáty s vyšší molární hmotností vyloučeny do žluči + střevní reductázy → původní forma léčivé látky → prodloužení farmakologického účinku → opožděná eliminace



humánní biotransformace karbamazepinu



humánní biotransformace
acetylsalicylové kyseliny



humánní biotransformace kofeinu

Biotransformační produkty vybraných léčivých látek

léčivá látka	ATC	biotransformační produkty humánní biotransformace	biotransformační produkty biotická biotransformace ČOV	identifikované metabolity v životním prostředí
ibuprofen	M01	1-hydroxyibuprofen 2-hydroxyibuprofen 3-hydroxyibuprofen karboxyibuprofen karboxyhydratropová kyselina konjugáty ibuprofenu buprofen glukuronid 2-hydroxyibuprofen glukuronid 2-karboxyibuprofen glukuronid	hydroxyibuprofen karboxyibuprofen karboxyhydratropová kyselina	hydroxyibuprofen karboxyibuprofen
naproxen	M01	<i>o</i> -desmethylnaproxen naproxen glukuronid <i>o</i> -desmethylnaproxen glukuronid	<i>o</i> -desmethylnaproxen 2-(6-hydroxynaftalen-2-yl)propanová kyselina	
diklofenak	M01	4'-hydroxydiklofenak 5-hydroxydiklofenak 3'-hydroxydiklofenak 4',5-dihydroxydiklofenak 3'-hydroxy-4'-methoxydiklofenak konjugáty diklofenaku konjugáty metabolitů		<i>p</i> -benzochinonimin
paracetamol = acetaminophen	N02	paracetamol- <i>o</i> -sulfát paracetamol glukuronid paracetamol-glutathionový konjugát paracetamol cysteinát metoxyparacetamol glukuronid Paracetamol merkaptát	3-(hydroxy-karboxymethyl)hydratropová kyselina paracetamol- <i>o</i> -sulfát paracetamolglutathionový konjugát N-[6-oxonaftalen-2(6H)-yliden]acetamid	
ketoprofen	M01, M02		2-{3-[karboxy(hydroxy)methyl]fenyl}propanová kyselina	
fenylbutazon	A03	oxyphenylbutazon hydroxylovaný phenylbutazon		

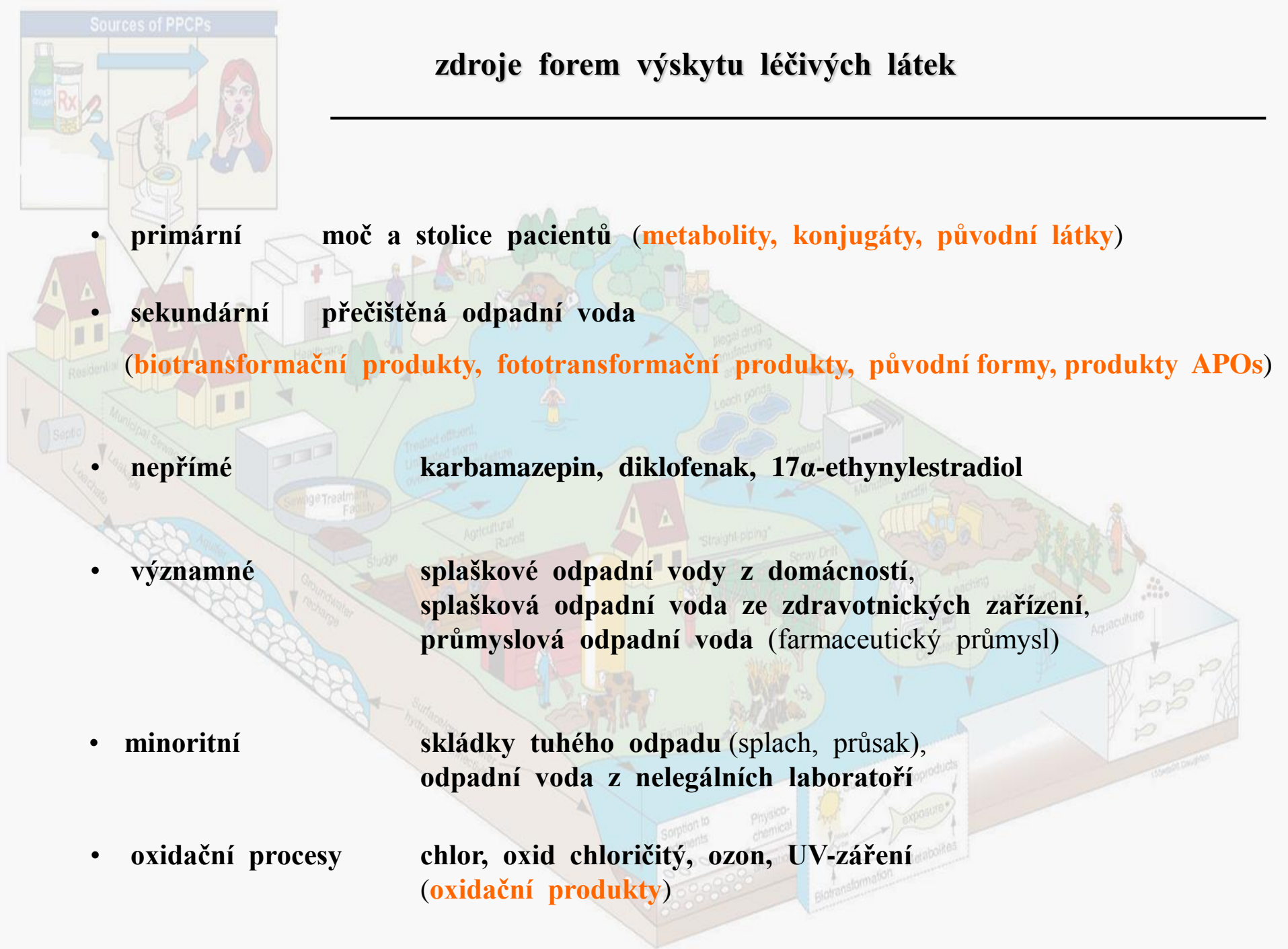
léčivá látka	ATC	biotransformační produkty humánní biotransformace	biotransformační produkty biotická biotransformace ČOV	identifikované metabolity v životním prostředí
etamizol = fenazon = antipyrin	A03	3-hydroxymethyl antipyrin antipyrin-3- karboxylová kyselina 4-hydroxyantipyrin 4,4'-dihydroxyantipyrin norantipyrin 4-hydroxyantipyrin glukuronid	4-aminoantipyrin acetaminoantipyrin formylaminoantipyrin 4-hydroxyantipyrin 3-hydroxymethylantipyrin norantipyrin	4-aminoantipyrin acetaminoantipyrin formylaminoantipyrin
klofibrát	C10	klofibrová kyselina + konjugáty		klofibrová kyselina
benzafibrát	C10	glukuronid hydroxylovaný benzafibrát	4-chlorobenzoová kyselina	
fenofibrát	C10	fenofibrová kyselina + konjugáty		fenofibrová kyselina
acetylsalicylová kyselina	N02	salicylová kyselina+konjugáty gentisová kyselina o-hydroxyhippurová kyselina salicylurová kyselina acyl-glukuronid kyseliny salicylové fenol-glukuronid kyseliny salicylové		salicylová kyselina gentisová kyselina
karbamazepin	N03	10,11-dihydro-10,11-epoxykarbamazepin 10,11-dihydro-10,11-dihydroxykarbamazepin 10,11-dihydro-10-hydroxykarbamazepin 2-hydroxykarbamazepin 3-hydroxykarbamazepin 10-hydroxykarbamazepin + konjugáty iminostilben 2-hydroxyiminostilben 9-akridan		10,11-dihydro-10,11-epoxykarbamazepin 10,11-dihydro-10,11-dihydroxykarbamazepin 2-hydroxykarbamazepin 3-hydroxykarbamazepin 10-hydroxykarbamazepin

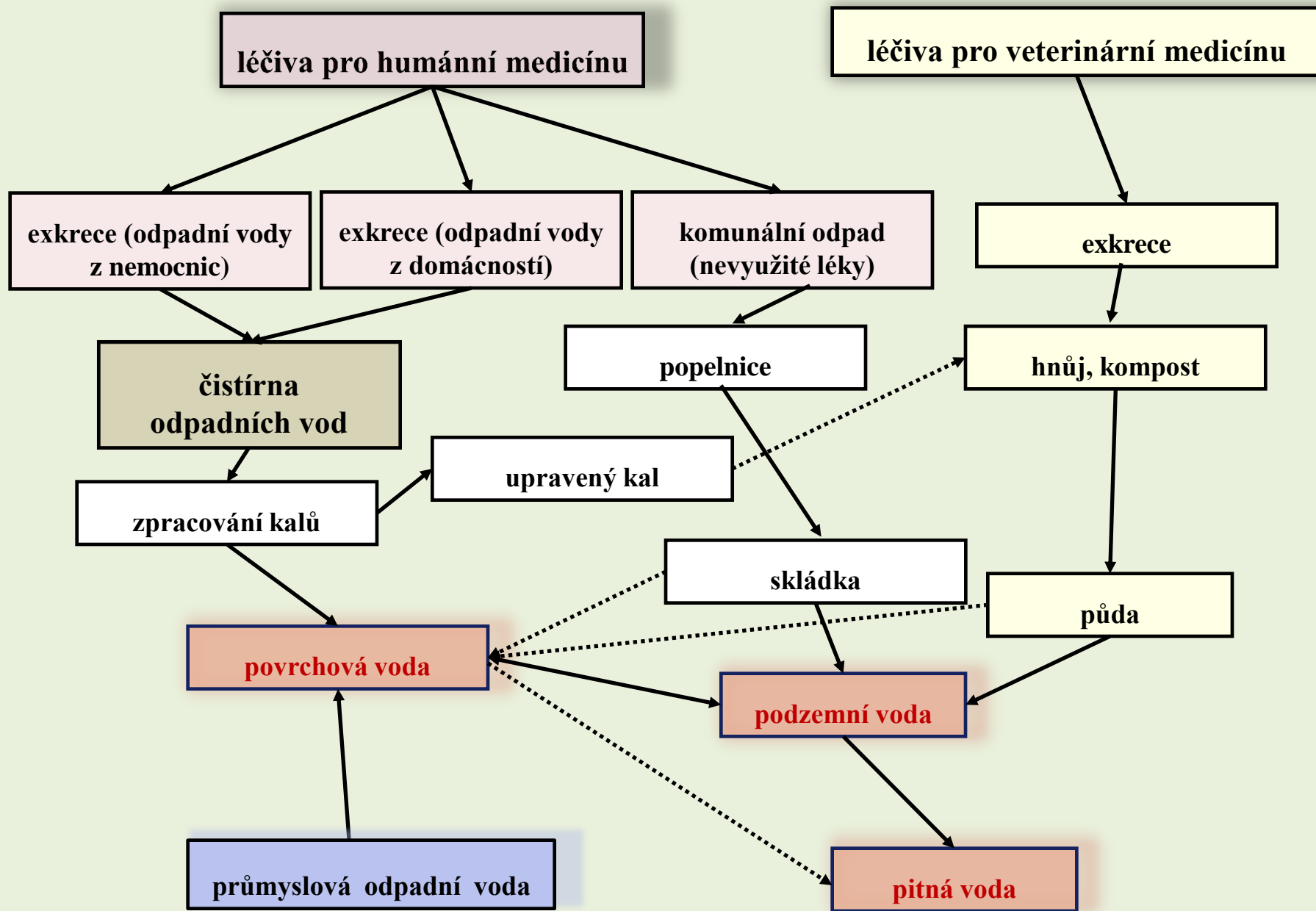
léčivá látka	ATC	biotransformační produkty humánní biotransformace	biotransformační produkty biotická biotransformace ČOV	identifikované metabolity v životním prostředí
diazepam	N05	desmethyldiazepam		desmethyldiazepam
atorvastatin	C10	<i>p</i> -hydroxyatorvastatin <i>o</i> -hydroxyatorvastatin <i>o</i> -hydroxyatorvastatin lakton atorvastatin lakton		<i>p</i> -hydroxyatorvastatin <i>o</i> -hydroxyatorvastatin
simvastain	C10	simvastatin hydroxy kyselina		simvastatin hydroxy kyselina
fluoxetin	N06	norfluoxetin fluoxetin glukuronid norfluoxetin glukuronid		norfluoxetin
sulfamethoxazol	J01	N ₄ -acetylsulfamethoxazol glukuronid		N ₄ -acetylsulfamethoxazol
trimethoprim	J01	α -hydroxytrimethoprim <i>o</i> -desmethyltrimethoprim N-oxidtrimethoprim	α -hydroxytrimethoprim hydroxytrimethoprim	
methotrexát	L01	7-hydroxymethotrexát	7-hydroxymethotrexát	
mestranol 17α-ethynylestradiol 17β-estradiolvalerát		17 α -ethynylestradiol 2-hydroxyethynylestradiol + konjugáty estradiol + konjugáty estron + konjugáty estriol + konjugáty	17 α -ethynylestradiol 17 β -estradiol	estron 16 α -hydroxyestron estron
enalapril	C09	enalaprilát		enalaprilát
17α-ethynylestradiol		17 α -ethynylestradiol sulfát 17 α -ethynylestradiol glukuronid 2-hydroxyethynylestradiol 2-metoxyethynylestradiol		
tamoxifen	C09	N-desmethyltamoxifen 4-hydroxytamoxifen 4-hydroxydesmethyltamoxifen N-oxidtamoxifen		

léčivá látka	ATC	biotransformační produkty humánní biotransformace	biotransformační produkty biotická biotransformace ČOV	identifikované metabolity v životním prostředí
jopromid	V08A		karboxyjopromid dikarboxyjopromid bis-dehydroxyjopromid 5-amino-N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6- trijodo-N-methylisofalamid 5-amino-2,4,6-trijodoisofalová kyselina desmethoxyacetyl jopromid 5-amino-N-(2,3-dihydroxypropyl)-2,4,6- trijodo-N-isofalová kyselina	
diatrizoat	V08		3-acetylamino-5-amino-2,4,6-trijodobenzoát 3,5-diamino-2,4,6-trijodobenzoát	
kofein		teofylin paraxantin theobromin 1-methylxanthin, 3-methylxanthin, 7-methylxanthin 1,3,7-trimethylmočová kyselina 1,3-dimethylmočová kyselina 1,7-dimethylmočová kyselina 3,7-dimethylmočová kyselina 1-methylmočová kyselina 3-methylmočová kyselina 7-methylmočová kyselina 5-acytylamino-6-formylamino-3- methyluracil		

zdroje forem výskytu léčivých látek

- **primární** moč a stolice pacientů (**metabolity, konjugáty, původní látky**)
- **sekundární** přečištěná odpadní voda (**biotransformační produkty, fototransformační produkty, původní formy, produkty APOs**)
- **nepřímé** **karbamazepin, diklofenak, 17 α -ethynylestradiol**
- **významné** **splaškové odpadní vody z domácností, splašková odpadní voda ze zdravotnických zařízení, průmyslová odpadní voda (farmaceutický průmysl)**
- **minoritní** **skládky tuhého odpadu (splach, průsak), odpadní voda z nelegálních laboratoří**
- **oxidační procesy** **chlor, oxid chloričitý, ozon, UV-záření** (**oxidační produkty**)





míra výskytu různých forem léčivých látek v různých druzích vod



- surová odpadní voda jednotky $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ až stovky $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$



- přečištěná odpadní voda desetiny $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ až desítky $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$



- specifická odpadní voda zdravotnická zařízení **až jednotky $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$**

- specifická odpadní voda farmaceutický průmysl desetiny $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ až desítky $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$



- povrchová voda desetiny $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ až jednotky $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$



- podzemní voda jednotky $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ až jednotky $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$



- pitná voda **desetiny $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ až desetiny $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$**

míra výskytu vybraných léčivých látek v pitné, povrchové a odpadní vodě ČR (2007 – 2011)

pitná voda	léčivá látka	stanovený obsah [ng·L⁻¹]		období
	ibuprofen	0,5 - 20,7		2009/10/11
	naproxen	0,5 - 3,0		2009/10/11
	diklofenak	0,6 - 3,9		2009/10/11
	karbamazepin	2,2 - 18,5		2009/10/11
	17 α -ethynylestradiol	< 2		2009/10/11
povrchová voda	léčivá látka	stanovený obsah [ng·L⁻¹]		období
	ibuprofen	< 50 - 10 000		2009/10
	naproxen	< 0,5 - 152		2010
	diklofenak	< 50 - 1 700		2009/10
	karbamazepin	< 20 - 450		2009
	kyselina salicylová	122 – 1 450		2010
	17 α -ethynylestradiol	1,6 - 3,3		-
	17 β -estradiol	1,3 - 3,8		-
	estriol	1,7		-
	estron	< 0,5 – 2,4		2010
odpadní voda	léčivá látka	přítok [ng·L⁻¹]	odtok [ng·L⁻¹]	období
	ibuprofen	9 400 - 21 900	46 - 634	2007/8
	diklofenak	187 - 3900	246 - 893	2007/8
	karbamazepin	184 - 152 3000	277 - 923	2007/8
	kyselina salicylová	7 300 – 67 000	384 - 3900	2007/8
	kyselina klofibrová	< 10 - 19,6	< 10 - 18,3	-
	17 α -ethynylestradiol	< 10	< 10 - 5,1	2007/8
	17 β -estradiol	10,0 - 31,7	< 6 - 11	-
	estriol	26,7 - 88,9	< 2 - 330	-

SUROVÁ ODPADNÍ VODA - ČIŠTĚNÍ ODPADNÍ VODY

primární mechanická část - záchyt hrubozrnného, makroskopického materiálu a sedimentace částic, suspenzí, (česle, síta, lapák šterku, písku, tuku, **usazovací nádrž**) => **primární kal**

sekundární biologická část - biochemická aktivita bakterií a mikromycet => rozklad a mineralizace organických látek v aerobních či anaerobních podmínkách, v **biologickém reaktoru** (aktivace) vločky směsných kultur mikroorganismů => **aktivovaný kal**

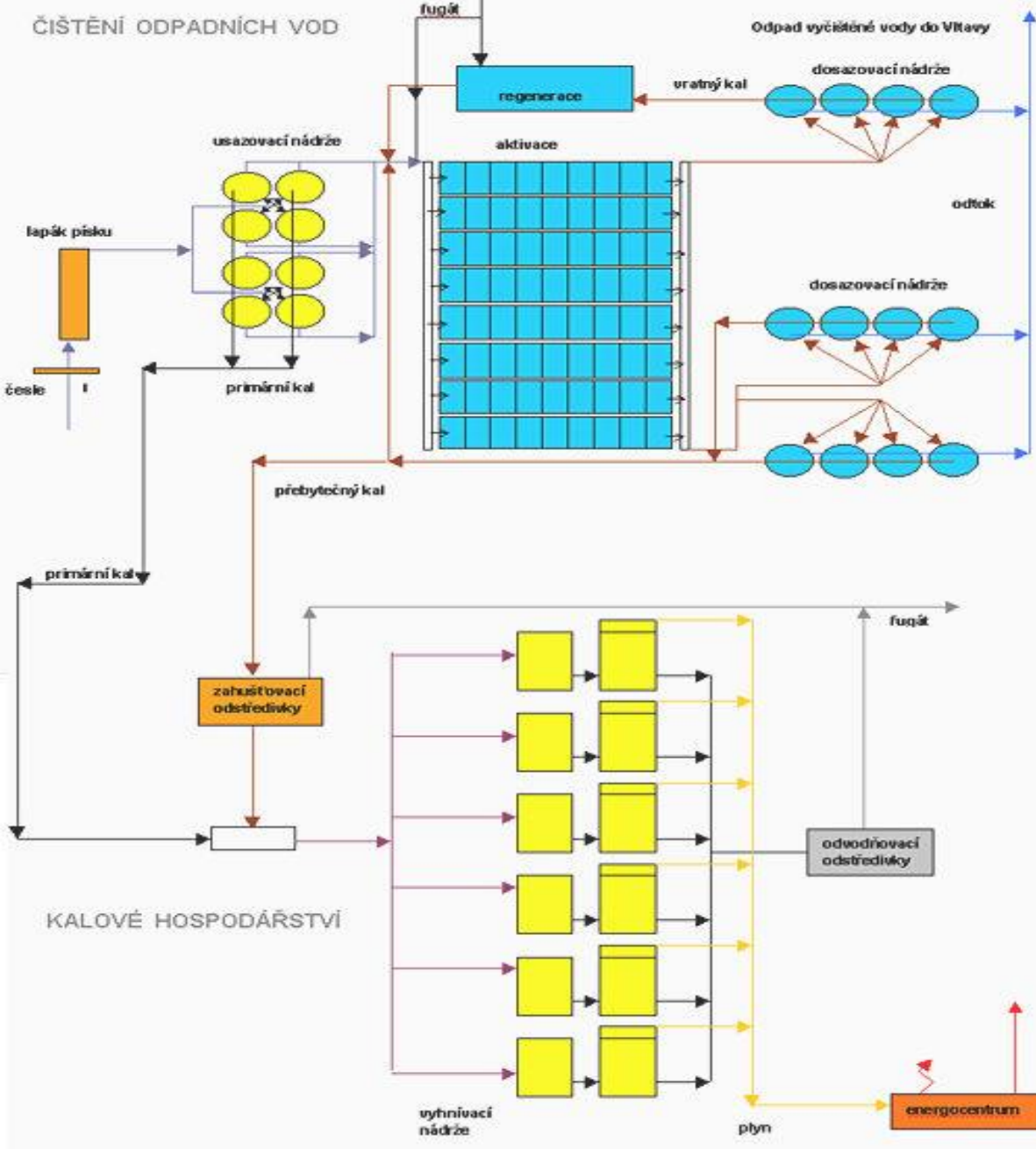
dosazovací nádrž - oddělení aktivovaného kalu = **sekundární kal**, část zpět do aktivace = **recirkulovaný - vratný kal**,

přebytečný sekundární kal → **anaerobní stabilizace vyhníváním** ve **vyhnívací nádrži** v *kyselém prostředí* → **CO₂ + H₂O**, v *alkalickém prostředí* za mezofilních podmínek 35°C

a za termofilních podmínek 55 °C → **CH₄**

anaerobně stabilizovaný kal před využitím odvodněn, kapalná fáze = **kalová voda**, přečištěné plyny = bioplyn vyhřívání vyhnívacích nádrží, produkce energie

ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD



aktivace



dosazovací nádrž



vyhnívací nádrže

□ procesy probíhající během čištění odpadní vody

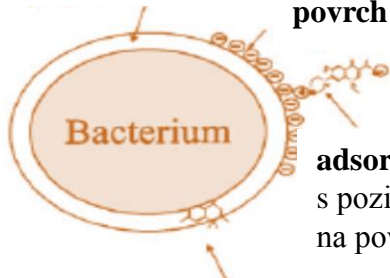
mechanismu a míra eliminace závislé na:

typu použité technologie biologického čištění, operačních podmínkách, teplotě, hodnotě pH, klimatických podmínkách, koncentraci biomasy, polaritě a iontové výměnných vlastnostech organických látek

- **abiotická transformace:** strippování během aerace, fototransformace → **produkty fotolýzy**, sorpce (primární, aktivovaný kal)

lipofilní membrána

povrch s negativním nábojem



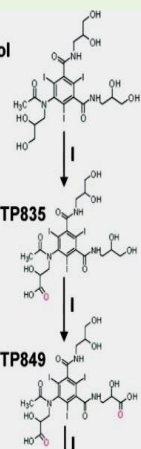
adsorpce organické látky s pozitivním nábojem na povrch částice

absorpce hydrofobní látky v lipofilní membráně

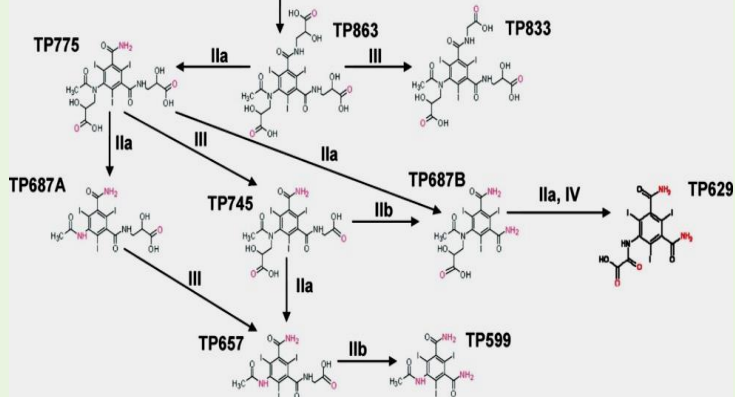
- **biotická transformace mikroorganismy** → enzymatické reakce → **transformační produkty**

- sloučeniny s esterovou, nitridovou funkční sk., aromatické alkoholy - **snáze biotransformovatelné**,
- aromatické aminy, jodované deriváty, látky s nitro-, azo- funkční sk., dlouhými a rozvětvenými alifatickými řetězci - **perzistentní**
- nenasycené alifatické sloučeniny - snáze biotransformovatelné
X nasycená analoga, aromatické sloučeniny se sulfo- skupinou nebo halogenem

lohexol



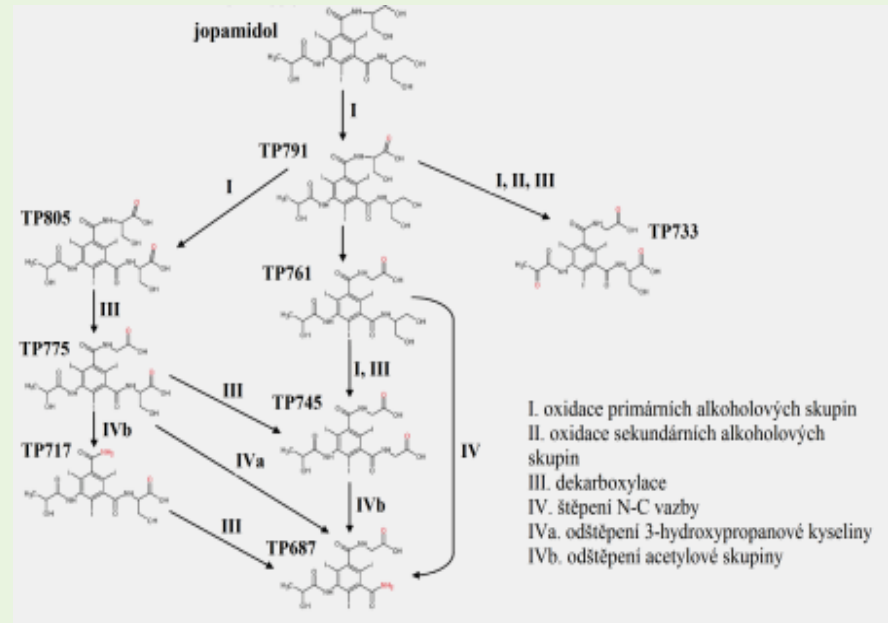
- I – Oxidation of primary alcohol groups
- II – Cleavage of N-C bond
- IIa – Cleavage of 2-hydroxyl propanoic acid
- IIb – Cleavage of an acetyl group
- III – Decarboxylation
- IV – Oxidation of methylene group



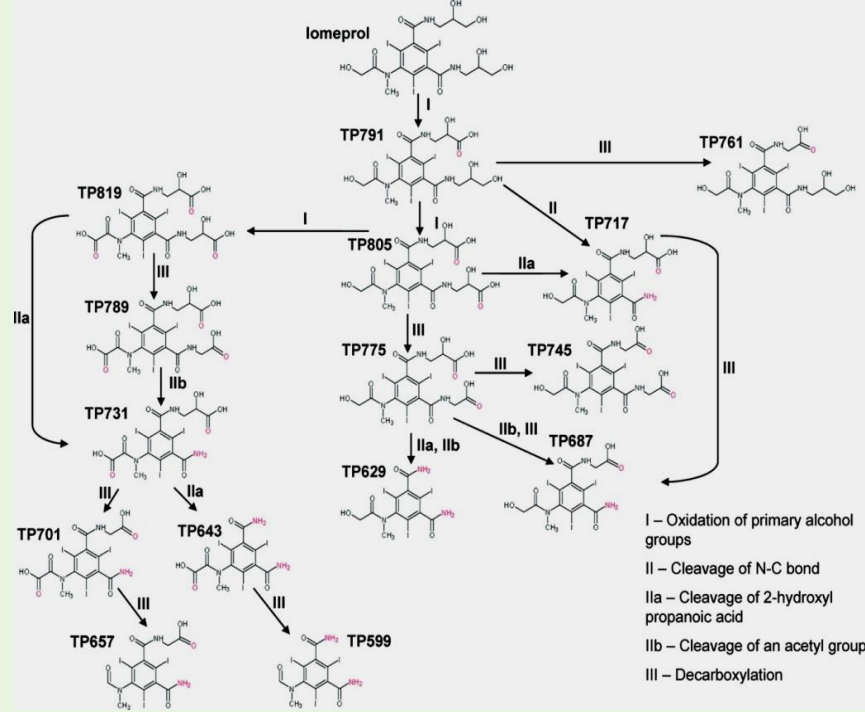
biotransformace johexolu

biotransformace jomeprolu

biotransformace jopamidolu



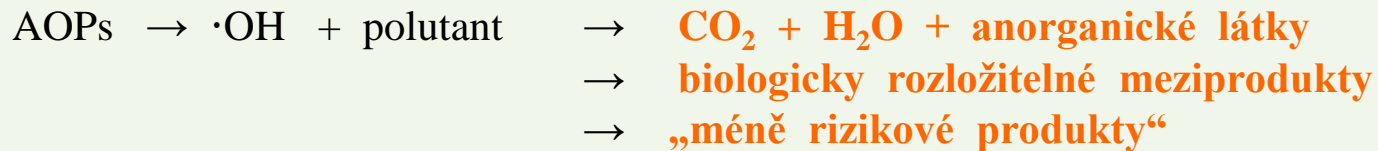
- I. oxidace primárních alkoholových skupin
- II. oxidace sekundárních alkoholových skupin
- III. dekarboxylace
- IV. štěpení N-C vazby
- IVa. odštěpení 3-hydroxypropanové kyseliny
- IVb. odštěpení acetylové skupiny



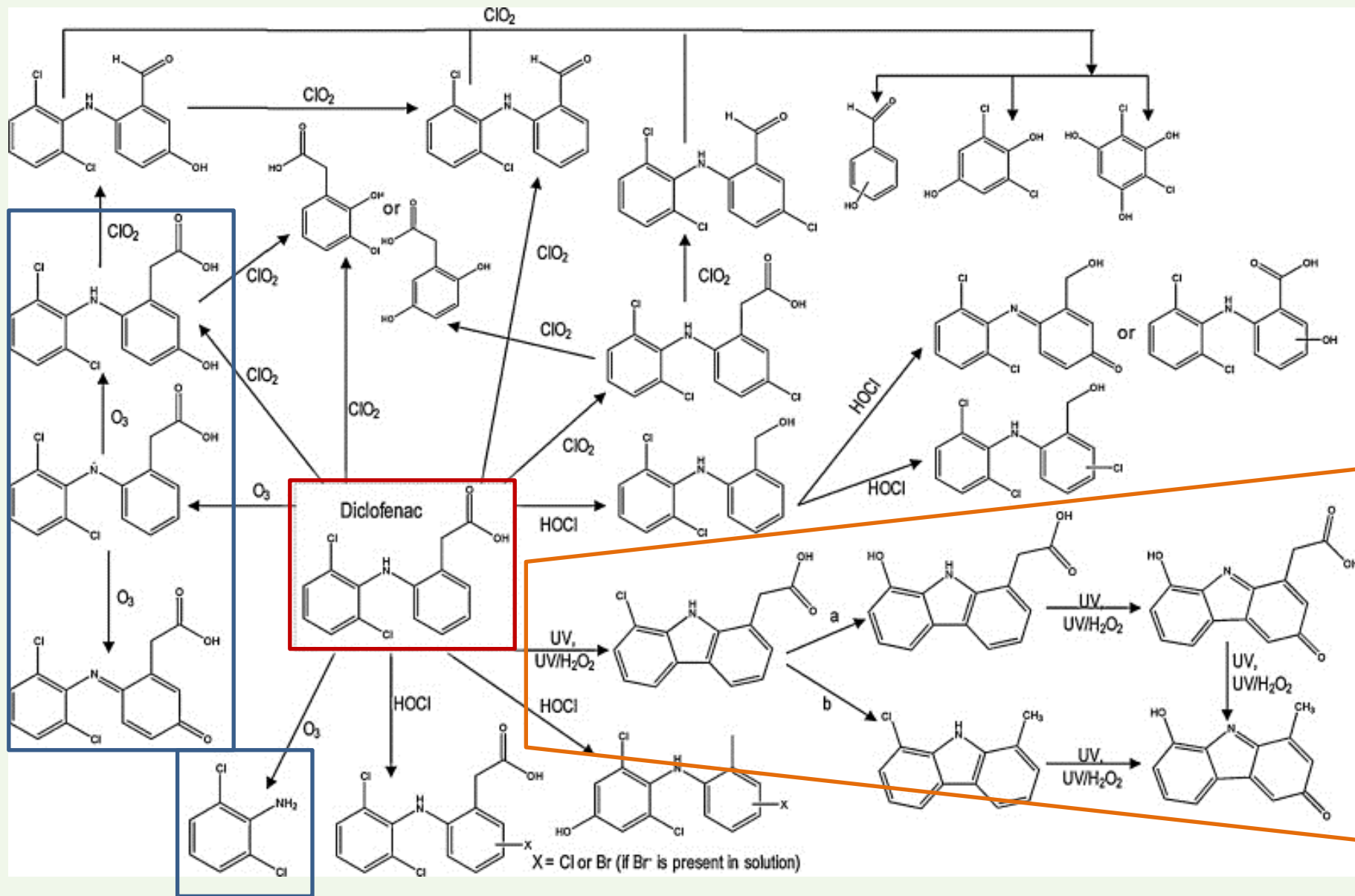
- I – Oxidation of primary alcohol groups
- II – Cleavage of N-C bond
- IIa – Cleavage of 2-hydroxyl propanoic acid
- IIb – Cleavage of an acetyl group
- III – Decarboxylation

□ některé pokročilé procesy čištění odpadních vod

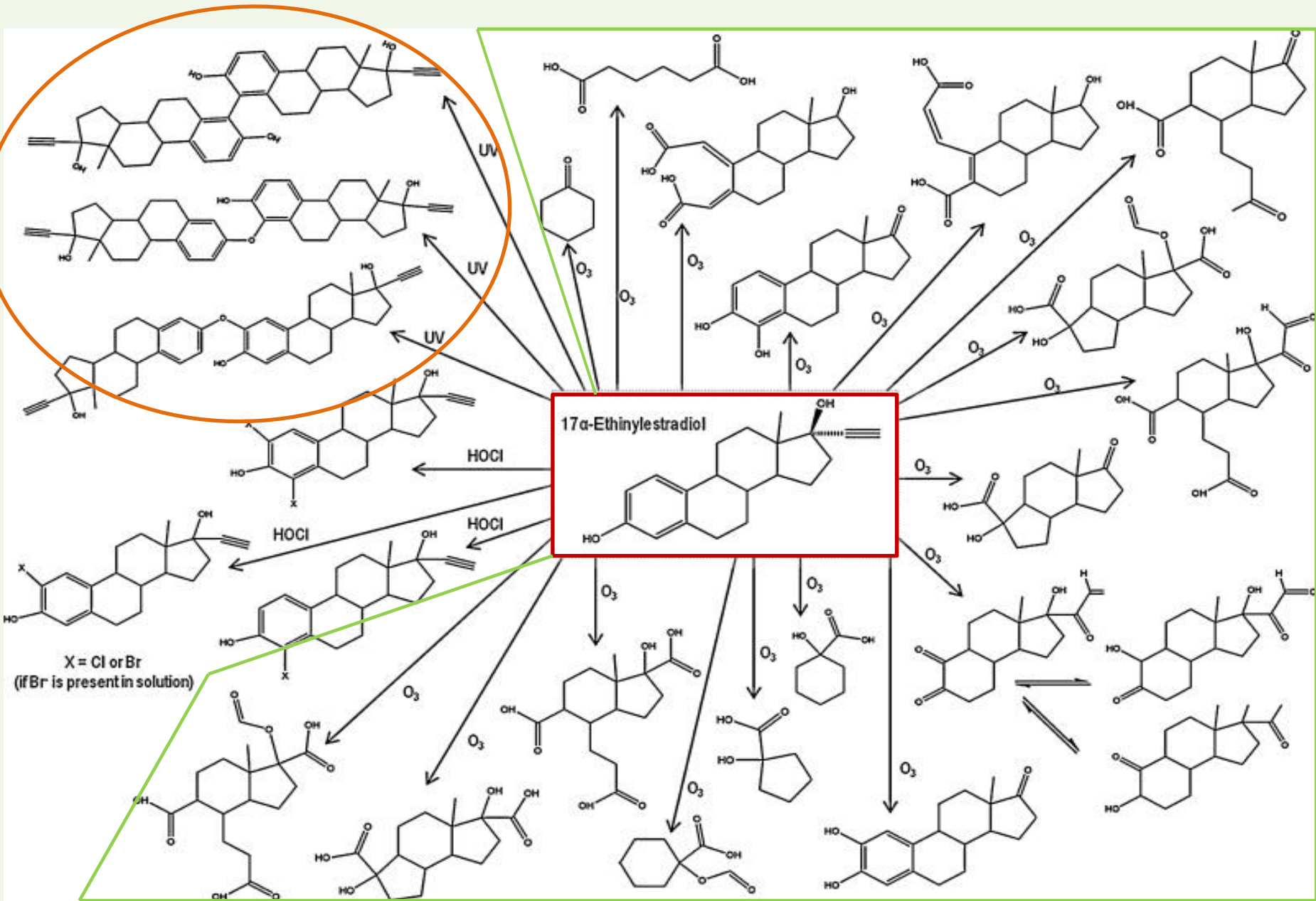
- pokročilé oxidační procesy (AOPs)



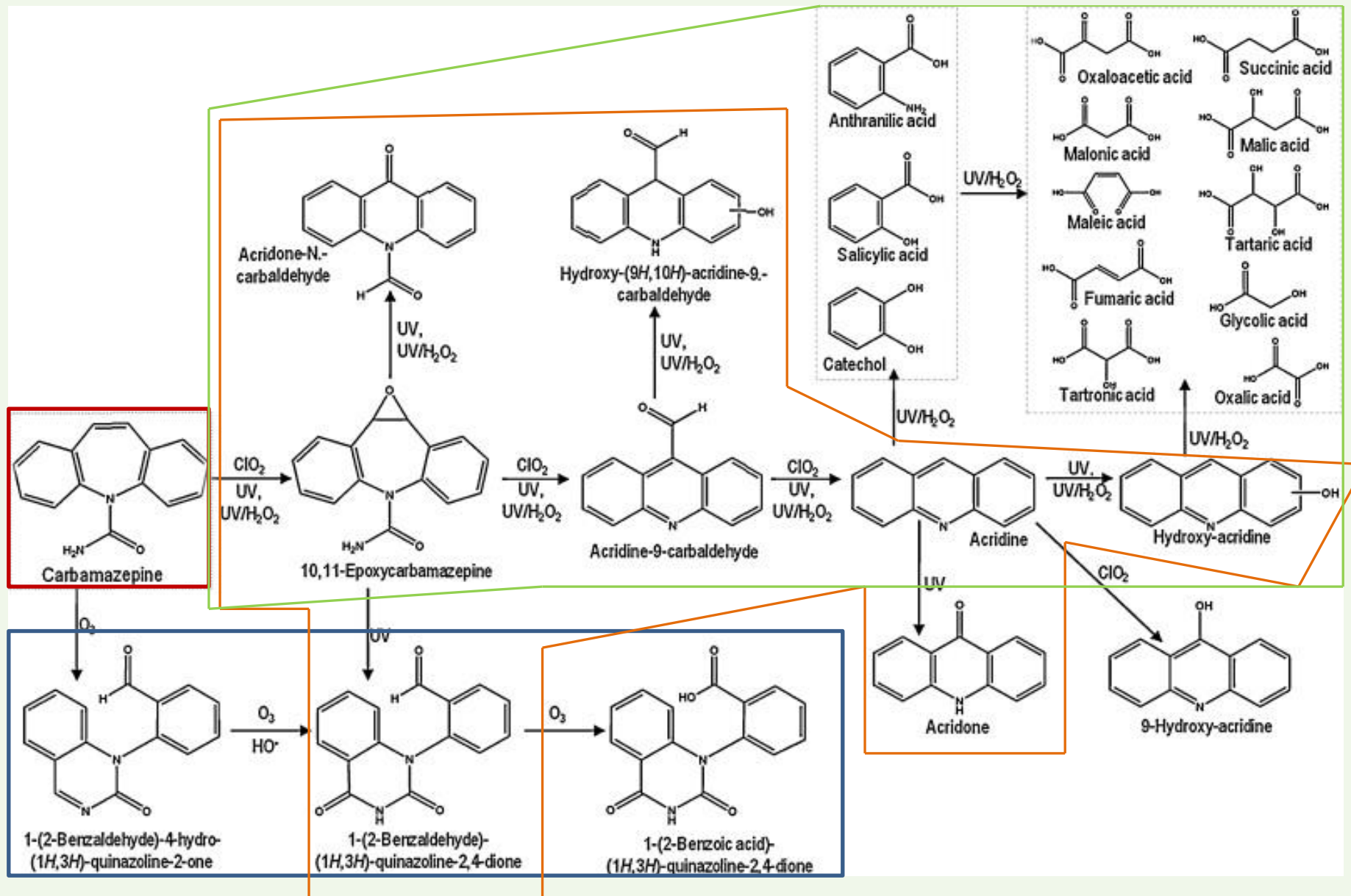
AOPs	polutant	míra eliminace
O₃	diklofenak	90 %
	17 α -ethynylestradiol	90 %
	karbamazepin	90 %
	jopromid	jodované organické látky
O₃/UV H₂O₂/UV	ibuprofen	lze eliminovat
	diklofenak	lze eliminovat
	naproxen	90 %
	karbamazepin	lze eliminovat
	kyselina klofibrová	lze eliminovat
O₃/H₂O₂	ibuprofen	~ 100 %
	diklofenak	~ 100 %
Fenton	josarkol	75 %
	johexol	70 %
Fe²⁺/UV	ibuprofen	lze eliminovat
	diklofenak	lze eliminovat
	17 α -ethynylestradiol	lze eliminovat
S₂O₈²⁻/UV	jopromid	100 %



Transformace diklofenaku v důsledku ozonizace, fotolýzy a kombinovaného procesu UV/H₂O₂



Transformace **17 α -ethinylestradiolu** v důsledku **ozonizace** a **fotolýzy**

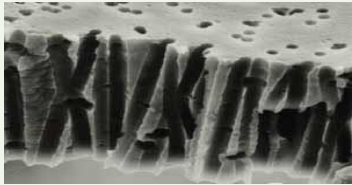


Transformace karbamazepinu v důsledku ozonizace, fotolýzy a kombinovaného procesu UV/H₂O₂

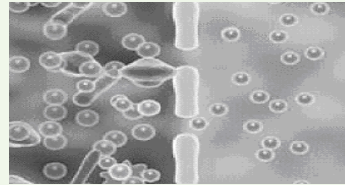
□ membránové procesy

= kombinace *biologického čištění* a *separace* aktivovaného kalu od vyčištěné vody

mechanické čištění → provzdušňování → biologické čištění → membrána → aktivovaný kal
přečištěná voda



póry v membráně



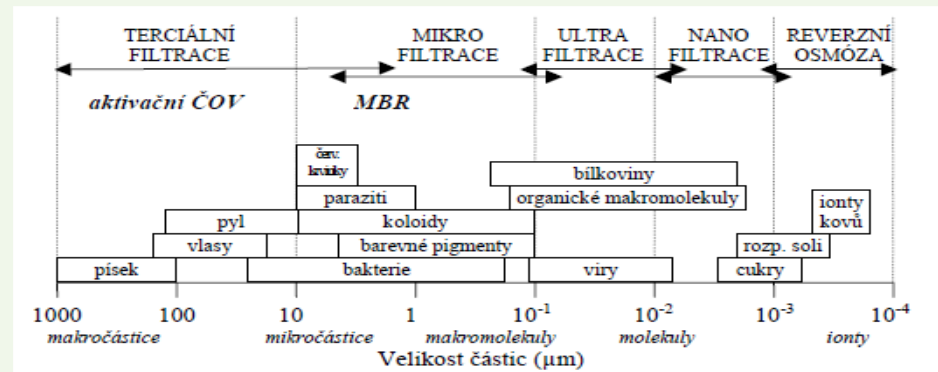
schematické znázornění filtrace přes membránu

separační vlastnosti membrán dle:

velikosti odseparovaných částic,
materiálu (membrány polymerní, anorganické),
směru toku přiváděné suspenze,
umístění membránového modulu
(do aktivační nádrže → bioreaktor s membránovým separátorem kalu,
mimo prostor aktivační nádrže - za bioreaktor, za dosazovací nádrž)



deskový membránový modul



typy filtrace a příklady odseparovaných částic

Velikost částic

Přibl. molekulární

hmotnost

Reverzní osmóza

< 0.001 μm

< 100 Da

Nanofiltrace

0.01 - 0.001 μm

100 - 1.000 Da

Ultrafiltrace

0.1 - 0.01 μm

1.000 - 500.000 Da

Mikrofiltrace

> 0.6 μm

> 500.000 Da

Účinnost eliminace vybraných ICM pomocí reverzní osmózy

ICM	sekundární odtok [$\mu\text{g/L}$]	post RO [$\mu\text{g/L}$]	účinnost RO [%]	země
diatrizoová	0,9 až 4,90	< 0,4	> 96	Austrálie
kyselina	< 1 až 2,5	< 0,3	> 92	Austrálie
jopamidol	0,4 až 0,62	< 0,2	> 97	Austrálie
jopromid	0,165	< 0,025	> 92	USA
	0,125	0,072	> 42	USA
	0,43 až 1,35	< 0,2	> 97	Austrálie
	1,4 až 2,8	< 0,2	96	Austrálie
johexol	2,80 až 4,76	< 0,2	95	Austrálie
jodipamid	0,14 až 0,23	< 0,1	92	Austrálie
	0,7 až 0,9	< 0,1	94	Austrálie

suspendované látky

olejové emulze

koloidní látky,

proteiny

ionty

bakterie

makromolekuly

zákal

nizkomolekulární

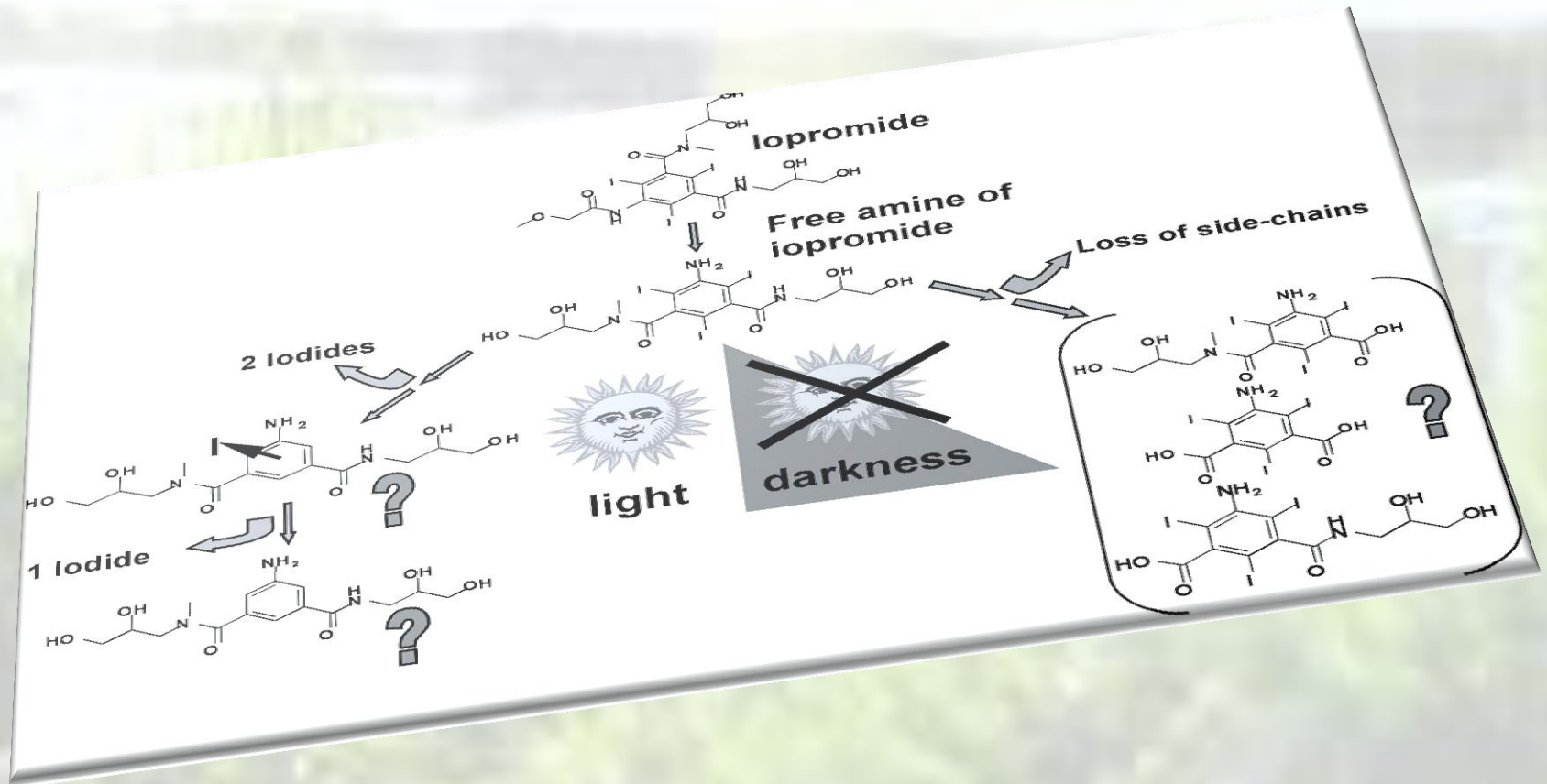
látky

POVRCHOVÁ VODA

- biotransformace necílovými vodními organismy, vodními mikroorganismy
- sorpce na sedimentech
- fototransformace **přímá**
organické látky s aromatickými jádry, heteroatomy, světlo absorbujícími funkčními skupinami
nepřímá
interakce organických látek s přechodovými částicemi ($\text{OH}\cdot$, $\text{RCOO}\cdot$, O)

léčivá látka	fotolýza	ve vodě identifikované transformační produkty
naproxen	přímá	4 fototransformační produkty
diklofenak	přímá	13 fototransformačních produktů
karbamazepin	přímá	6 fototransformačních produktů mj. akridin (genotoxický)
fluoxetin	přímá nepřímá	2 fototransformační produkty norfluoxetin (vyšší farmakologická aktivita)
17 α -ethynylestradiol	přímá	

fototransformace jopromidu



OSUDU LÉČIVÝCH LÁTEK

- humánní biotransformace**
- fotolýza**
- biotická transformace mikroorganismy**
- biotická transformace vodními organismy**
- pokročilé oxidační procesy**
- oxidace (Cl_2 , ClO_2 , O_3 , chloramin,)**








„Ty červené jsou na nemoc, ty modré potlačují vedlejší účinky těch červených a ty zelené potlačují vedlejší účinky těch modrých.“

=> **transformační produkty**

- farmakologická aktivita ?
- genotoxicita ?
- estrogenní aktivita ?

- kontinuální přísun různých forem léčivých látek byt' v nízkých koncentracích => přetrvávání v životním prostředí i přes transformační poločas = **perzistence** => **chronický efekt u necílových organismů**
- směsi:
 - zesílení účinku kombinací stejně působících léčivých látek = **synergismus**
 - **součtový toxikologický vliv na necílové organismy**

prokázaný dopad na necílové organismy

testovaná látka	sledovaný organismus	účinky
ibuprofen	<i>Oryzias latipes</i> (medaka japonská) <i>Lemna minor</i> (okřehek velký)	reprodukční abnormality inhibice růstu
naproxen	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (korýši) laboratorní potkan 	inhibice růstu vliv na kardiovaskulární systém novorozených mláďat
diklofenak	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (pstruh duhový) <i>Gyps bengalensis</i> (sup bengálský) <i>Gyps indicus</i> (sup indický) <i>Gyps tenuirostris</i> (sup tenkozobý) laboratorní potkan, myš, králík	poškození ledvin, žaber, hepatocitů, jater poškození ledvin, úhyn  retardace růstu a smrt plodu
karbamazepin	<i>Oryzias latipes</i> (medaka japonská) laboratorní potkan	poškození jater karcinogenní
17α-ethynylestradiol	ryby - blíže nespecifikováno	feminizace ryb
fluoxetin	<i>Lepomis macrochirus</i> (slunečnice obecná) <i>Ictalurus punctatus</i> (slunečnice tečkovaná) <i>Pomoxis nigromaculatus</i> (okounek černoskvrnný) <i>Ceriodaphnia dubia</i> (korýši) <i>Daphnia magna</i> (členovci) <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (řasy) <i>Oryzias latipes</i> (medaka japonská)	akumulace v mozku, játrech, svalovině  stimulace reprodukce  vliv na embryonální vývoj deformace buněk  vliv na embryonální vývoj
sertralin	ryby - blíže nespecifikováno	fyziologické změny, ztráta koordinace pohybu, respirační potíže

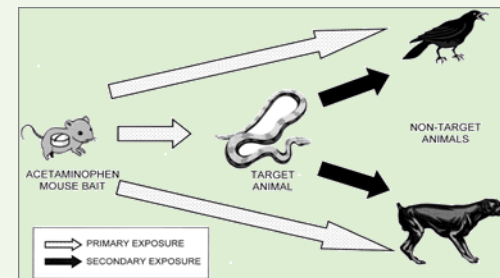
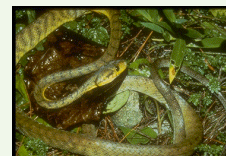
využití některých léčivých látek jako biocidů



kofein X *Eleutherodactylus coqui*
hluk, kompetice o hmyz se zpěvným ptactvem
X slimáci



paracetamol (acetaminofen) X *Boiga irregularis*
ptáci, netopýři, plazi, domácí zvířata, lidé



warfarin X potkani, krysy



4-aminopyridin X ptáci - necílové organismy ohroženy (kočka, pes, dravci, ..)

azacholesterol X kotraceptivum pro ptáky a hlodavce



antibiotika X *Erwinia amylovora* (patogenní bakteriální kmeny)

speciální rozbor vody

specifické organické látky - prokázané nebo potenciální **karcinogeny**
mutageny
teratogeny

genotoxicita - toxická látka ovlivňuje genetický materiál buňky

mutageneze

vznik chyby v DNA

karcinogeneze

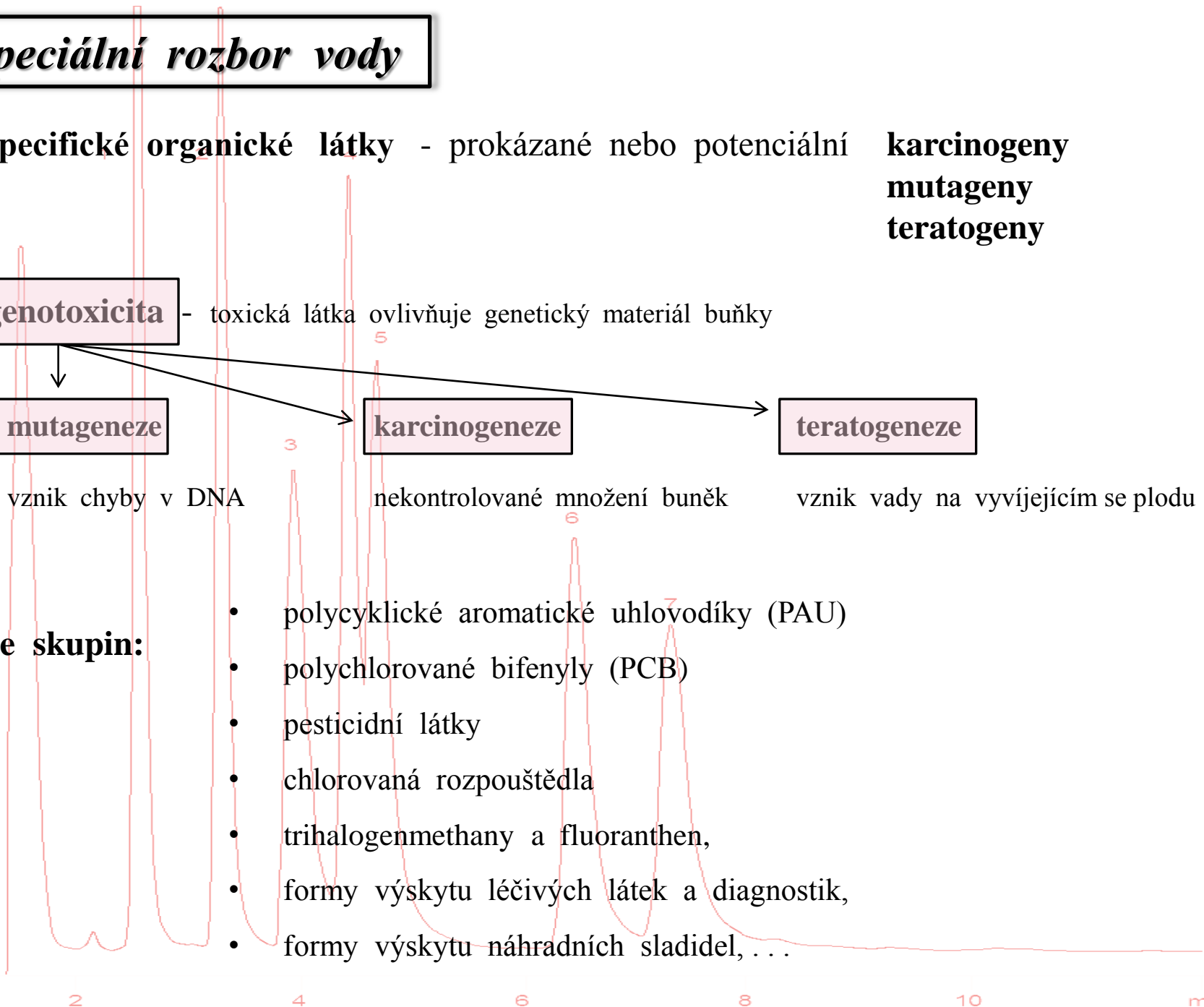
nekontrolované množení buněk

teratogeneze

vznik vady na vyvíjejícím se plodu

ze skupin:

- polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)
- polychlorované bifenyly (PCB)
- pesticidní látky
- chlorovaná rozpouštědla
- trihalogenmethany a fluoranthen,
- formy výskytu léčivých látek a diagnostik,
- formy výskytu náhradních sladidel, ...



stanovení cílových analytů - metody separace a zkoncentrování

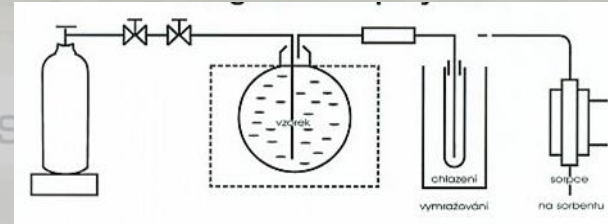
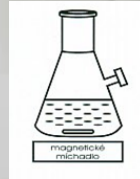
extrakce kapalinou

vodná matrice / s vodou nemísitelné organické rozpouštědlo
analyt - nepolární látka

extrakce plynem

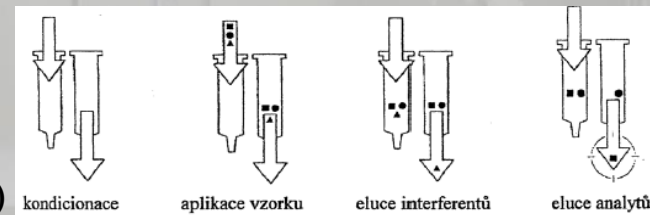
vodná matrice / plyn
analyt - těkává látka

- statická head space metoda
- dynamická head space metoda (strippovací metoda)



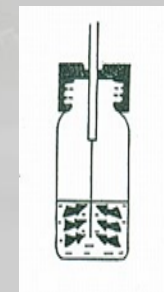
extrakce pevnou fází (SPE)

vodná matrice / pevná fáze → eluce
volba pevné fáze (promývacího a elučního činidla)
dle fyzikálně-chemických vlastností analytů



mikroextrakce pevnou fází (SPME)

vodná matrice / separační materiál na křemenném vlákne
→ nástříková GC komora → termická desorpce
nebo
adaptér SPME/LC



termodynamika separace

inertní látka neinteraguje s náplní kolony

V_M mrtvý objem = objem, který v ch. systému zaujímá MF od místa nástřiku po detektor

t_M mrtvá doba = doba, za kterou proteče MF od místa nástřiku do detektoru
= **doba, pobytu i-té složky vzorku v MF**

V_{Ri} retenční objem i-té složky = je objem mobilní fáze, který proteče ch. systémem od okamžiku nástřiku vzorku do okamžiku, kdy se na eluční křivce (píku) i-té složky objeví maximum

t_{Ri} retenční čas i-té složky = doba, která uplyne od okamžiku nástřiku vzorku do okamžiku, kdy se na eluční křivce (píku) i-té složky objeví maximum

V'_{Ri} redukovaný retenční objem i-té složky $V'_{Ri} = V_{Ri} - V_M$

t'_{Ri} redukovaný retenční čas i-té složky = doba pobytu i-té složky vzorku ve SF

$$t'_{Ri} = t_{Ri} - t_M$$

F_m [mL/min] = objemová průtoková rychlost MF

$$F_m = V_M / t_M$$

u [cm/min] = lineární průtoková rychlost MF

$$u = L / t_M, \quad L = \text{délka kolony}$$

V_m [mL] = objem MF

$$V_m = F_m \cdot t_M = V_M$$

V_{Ri} [mL]

$$V_{Ri} = F_m \cdot t_{Ri} = V'_{Ri} + V_M = F_m \cdot t'_{Ri} + F_m \cdot t_M$$

K_{Di} = distribuční konstanta i-té složky

$$K_{Di} = (c_i)_s / (c_i)_m = [(n_i)_s / (n_i)_m] \cdot [V_m / V_s] = k_i \cdot (V_m / V_s)$$

$$k_i$$

k_i = kapacitní poměr (kapacitní faktor, retenční faktor)

$$k_i = (n_i)_s / (n_i)_m = K_{Di} \cdot (V_s / V_m) = (V_{Ri} - V_M) / V_M$$

=> do jaké míry se bude i-tá složka vzorku eluovat v přijatelné době analýzy, závisí na:
vlastnostech SF, MF, složek vzorku a na V_s / V_m

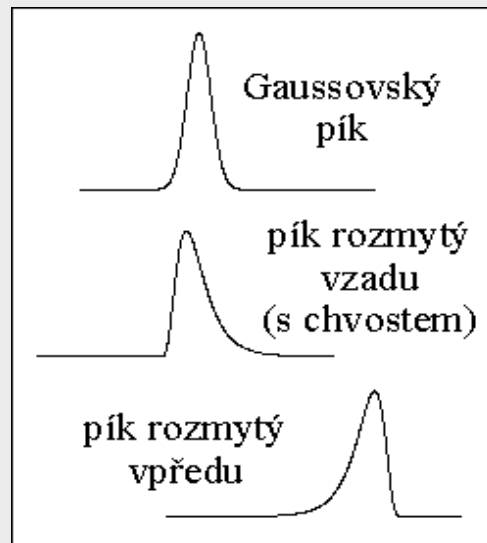
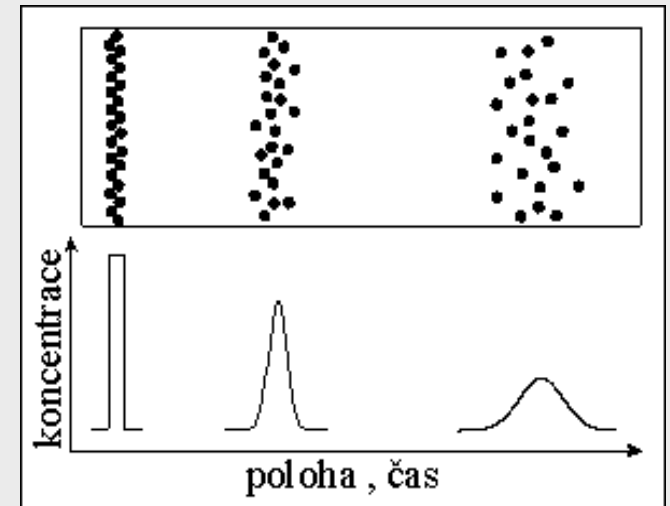
kinetika separace

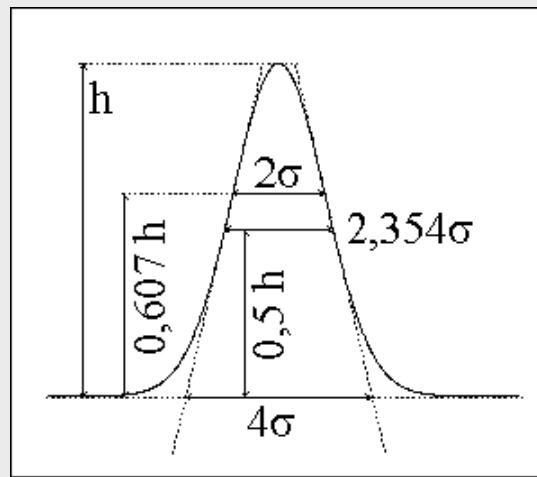
při pobytu vzorku ve stacionární fázi dochází k:

- separaci složek do izolovaných pásů (zón)
- rozšiřování zón (rozmývání)

každé zóně na ch. záznamu odpovídá určitý tvar píku =>
koncentrační profil i-té složky ve stacionární fázi

i-tá složka analyzovaného vzorku





Y_i = šířka píku v základně, h = výška píku

$$Y_i = 4 \sigma$$

$(Y_i)_{0,5}$ = šířka píku v polovině výšky, ve výšce $0,5 h$

$$(Y_i)_{0,5} = 2,354 \sigma$$

$(Y_i)_i$ = šířka píku mezi inflexními body, ve výšce $0,607 h$

$$(Y_i)_i = 2 \sigma$$

A = plocha píku

$$A = h \cdot (Y_i)_{0,5} \cdot 5,1064$$

teoretické patro kolony = část stacionární fáze, ve které je koncentrace i -té složky vzorku v rovnováze s koncentrací této složky v MF, která tuto část kolony opouští

n = počet teoretických pater kolony

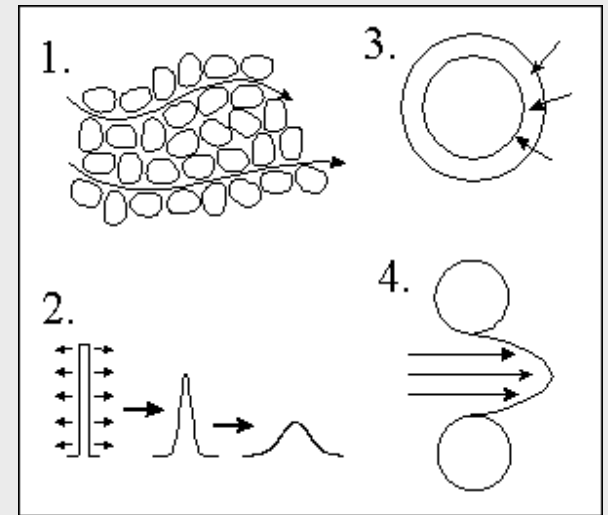
$$n = 16 \cdot (t_{Ri} / Y_i)^2$$

H = výškový ekvivalent teoretického patra kolony (délka teoretického patra kolony)

$$H = L / n \text{ [mm]} \quad L = \text{délka kolony}$$

□ **příčiny rozšiřování zón**

1. **vířivá difúze** = různé molekuly MF urazí stacionární fázi různé vzdálenosti
2. **podélná difúze** = složky vzorku putují z místa o vyšší koncentraci do místa o nižší koncentraci
3. **odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi** = různé molekuly složky vzorku difundují různě hluboko do elementárních částic stacionární fáze
4. **odpor proti přenosu hmoty v MF** = rychlostní profil MF v kanálcích stacionární fáze je parabolický



□ **vliv průtokové rychlosti na rozšiřování zón**

$$H = f(u)$$

$$H = H_v + H_p + H_s + H_m$$

1. vířivá difúze **nezávisí** na u $\Rightarrow H_v = A$
2. podélná difúze na u **závisí nepřímo úměrně** $\Rightarrow H_p = B / u$
3. odpor proti přenosu hmoty ve stac. fázi **přímo úměrný** u $\Rightarrow H_s = C_s \cdot u$
4. odpor proti přenosu hmoty v MF **přímo úměrný** u $\Rightarrow H_m = C_m \cdot u$

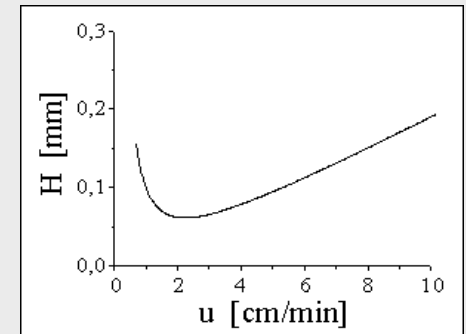
$$H = A + (B / u) + u (C_s + C_m) \quad A, B, C_s, C_m = \text{konstanty}$$

□ **vliv průtokové rychlosti MF na účinnost kolony**

$$H = A + (B / u) + u (C_s + C_m) \quad \text{Deemterova rovnice}$$

Deemterova křivka

minimum křivky odpovídá **optimální průtokové rychlosti MF**,
při které kolona vykazuje nejvyšší účinnost



$R_{2/1}$ = rozlišení - vyjadřuje účinnost separace dvou složek vzorku

$$= 2 \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / Y_1 + Y_2$$

$R_{2/1} = 1$ z 99 % odděleny

$R_{2/1} = 1,5$ z 99,7 % odděleny

$R_{2/1} > 1,5$ odděleny na základní linii

$a_{2/1}$ **separační faktor** $a_{2/1} = K_{D2} / K_{D1} = k_2 / k_1$

stanovení cílových analytů - instrumentální analytická koncovka

separace složek směsi - vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

systém: **složky směsi** - cílové analyty, dle jejich fyzikálně-chemických vlastností volba vhodné **kapané mobilní fáze (MF)** a **pevné stacionární fáze (SF)** – náplň analytické kolony

nepolární stacionární fáze C-18 → méně polární analyty se extrahují lépe - tedy:

se snížením polaritu analytu roste míra jeho retence →

polární analyty zadržovány méně → eluují jako první, dále středně polární, naposledy nepolární

retenci analytu určují:

polarita analytu
separační podmínky
typ SF
teplota

složení MF v závislosti na čase - 2- složkový gradient
složka (A) - organická, složka (B) - anorganická

zvýšení polaritu MF snížením podílu organické složky → **MF s nižší eluční silou** → **zvýšení míry retence analytu** → **prodloužení retenčního času** a **zvýšení kapacitního poměru**

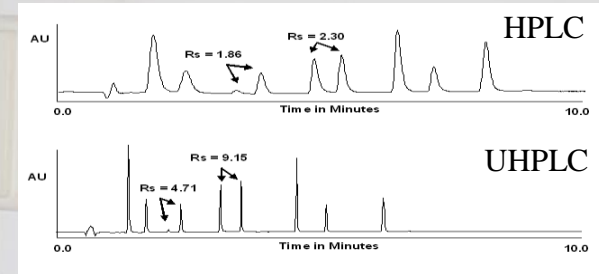
(vhodné aplikovat pro zvýšení retence polárních analytů a opačný postup pro zkrácení retenčních časů, tedy pro úpravu přijatelné doby analýzy)

rozdělení dvou po sobě elujících analytů závisí na **rozlišení** - lze ovlivnit průtokovou rychlostí MF
snížení průtokové rychlosti → **zvýšení rozlišení**

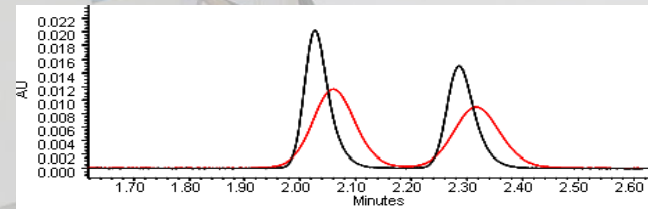
stanovení cílových analytů - instrumentální analytická koncovka

separace složek směsi - ultrarychlá kapalinová chromatografie (UHPLC)

- **účinnost separace** roste s klesající velikostí částic náplně kolony
- s klesající velikostí částic roste objemová průtoková rychlost MF
- s rostoucí účinností separace roste **rozlišení**



- **citlivost** - koncentrace analytu v maximu eluční křivky roste s:
klesající délkou kolony
klesajícím vnitřním průměrem kolony
rostoucím objemem nástřiku
rostoucí eluční silou MF



- **doba analýzy** se zkracuje s klesající délkou kolony
zmenšením vnitřního průměru kolony
zvýšením objemového průtoku mobilní fáze
- **účinnost UHPLC x účinnost HPLC** : menší velikost částic SF → vyšší měrný povrch, ALE kratší kolona s menším vnitřním průměrem

rozdíly UHPLC x HPLC

náplň kolony s menší velikostí částic, s menším vnitřním průměrem a délkou
vyšší průtoková rychlost MF
vyšší tlak
kratší doba analýzy

stanovení cílových analytů - instrumentální analytická koncovka

detekce UV/ VIS, DAD

detektory založeny na principu absorpce záření v oblasti λ 190 až 800 nm

kvantitativní vyhodnocení založeno na vztahu mezi :

velikostí absorpce vyjádřenou jako absorbance (A)
a koncentrací absorbující složky (c),
tloušťkou absorbující vrstvy (l),
specifickém absorpčním koeficientu (ϵ_λ)

Lambert-Beerův zákon

platnost se ověřuje závislostí $A = f(c)$,

přímka protíná osu y (A) =>
 A_0 absorbance pozadí

$$A = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot l$$

$$A = A_0 + \epsilon_\lambda \cdot c \cdot l$$

nezahrnuje: vliv teploty,
vliv λ ,
vliv matrice

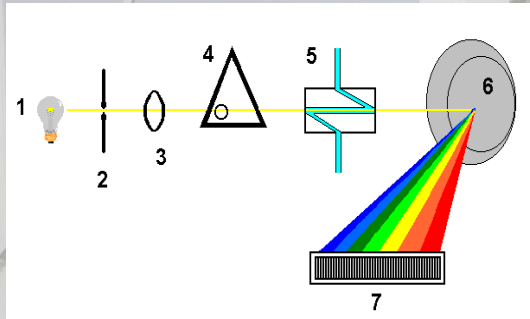
platnost omezena: *pravými odchylkami* ← změna chemické rovnováhy na základě měnící se koncentrace (iontová / molekulová interakce, disociace, asociace, polymerace, vznik komplexů, hydrolyza)
zdánlivými odchylkami fyzikálního charakteru

stanovení cílových analytů - instrumentální analytická koncovka

detekce UV/ VIS, DAD

dle konstrukčního typu:

- detektory s fixní vlnovou délkou 253,7 nm
- detektory s měnitelnou vlnovou délkou pouze předem danými vlnovými délkami
- detektory s programovatelnou vlnovou délkou lze nastavit v rozmezí 190 až 700 nm
- DAD detektory



- záření ze zdroje (1) (deuteriová výbojka) prošle štěrbinou (2), čočkou (3), clonou (4), průtokovou celou (5), se spektrálně rozkládá holografickou mřížkou (6)
=> na každou fotodiodu (7) dopadá zářivý tok Φ o určité λ zeslabený absorpcí v cele
- každá fotodioda spojena s předem nabitým kondenzátorem, po dopadu záření na fotodiodu vznikající **fotoelektrický proud úměrný intenzitě dopadajícího záření** kondenzátor vybije, v další fázi se kondenzátor dobíjí a **měří se proud potřebný na dobítí**
- sequence vybití / nabití se rychle opakuje (10 ms/ 190 – 600 nm) => **údaje o A při každé λ v každém okamžiku**

stanovení cílových analytů - instrumentální analytická koncovka

detekce FLD (fluorescenční detektor)

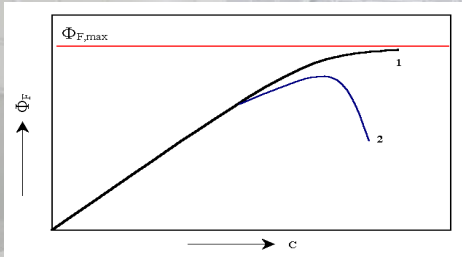
- absorpce primárního elektromagnetického záření (excitační) => molekuly látek přecházejí ze základního singletového elektronového stavu do různých vibračních hladin excitovaného elektronového stavu
- následuje návrat do základního elektronového stavu za uvolnění energie emisí fotonů - nastane fluorescence - doba trvání 10^{-8} až 10^{-5} s

závislost intenzity fluorescence na koncentraci fluoreskující látky

pro malou tloušťku absorbující vrstvy a pro nízké koncentrace

$$\Phi_F \sim k \cdot \Phi_0 \cdot 2,3 \cdot \epsilon_\lambda \cdot c \cdot l$$

l optická dráha průtokové cely
 Φ_F fluorescenční tok

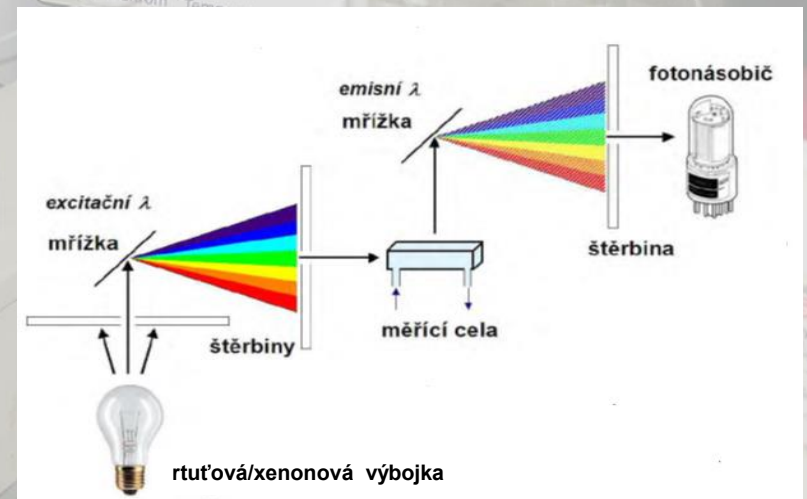


- 1 teoretická závislost
- 2 skutečná závislost

FLD detektory umožňují měřit:

excitační spektra při konstantní λ_{em} emitovaného záření
nebo

emisní spektra při konstantní λ_{ex} excitačního záření



stanovení cílových analytů - instrumentální analytická koncovka

detekce MS (QqQ)

ZÁKLADY MS

- hmotnostní spektrometrie MS** tj. metoda pro: převedení molekul na ionty, rozlišení vzniklých iontů dle poměru hmotnosti a náboje (m/z), záznam relativních intenzit jednotlivých iontů
- hmotnostní spektrometr** tj. iontově-optické zařízení, které měří hodnoty m/z a zaznamenává jejich intenzitu
- hmotnostní spektrum** tj. grafické znázornění závislosti absolutní / relativní intenzity iontů na hodnotě m/z , pík s nejvyšší intenzitou ve spektru tj. **základní pík spektra**
- ion prekurzoru** tj. ion reagující za vzniku **produktových iontů**
- produktový ion** vzniká jako produkt po reakci z jednotlivých iontů prekurzoru
- fragmentový ion** tj. ion vznikající disociací iontu prekurzoru
- aduktový ion** tj. ion vznikající po reakci iontu s jedním nebo více atomy či molekulami $[M+Na]^+$, $[M+Cl]^-$, ...
- molekulární ion** tj. ion vznikající odebráním nebo přidáním jednoho a více elektronů za vzniku kladného nebo záporného iontu
- protonovaná molekula** tj. ion vznikající interakcí molekuly s protonem $[M+H]^+$
- deprotonovaná molekula** tj. ion vznikající odštěpením protonu $[M-H]^-$
- celkový iontový proud** tj. suma iontových proudů všech m/z ve spektru
- celkový iontový chromatogram** tj. závislost sumy iontových proudů všech m/z ve spektru na čase
- extrahovaný iontový chromatogram** tj. závislost vybrané hodnoty m/z na čase
- záznam vybraného iontu** tj. měření vybrané hodnoty m/z na čase

instrumentace

iontový zdroj → **ionizace** neutrálních molekul analytu na nabitě částice

ionizační techniky tj. tvorba iontů

tvrdé (elektronová ionizace; EI): při ionizaci získává molekula analytu nadbytek vnitřní energie, vzniká **molekulový ion**, tento fragmentuje na menší části tzv. **fragmentové ionty**

měkké: molekula analytu získává v porovnání s EI nižší energii, vznikají majoritně **molekulové ionty**, minoritně **fragmentové ionty**

dle molární hmotnosti, polarity

ionizace za sníženého tlaku elektronová (EI), chemická (CI), MALDI, ...

ionizace za atmosférického tlaku elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI), ...

hmotnostní analyzátor → **selekce** iontů dle poměru m/z v plynné fázi za vakua na základě:

zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém (magnetický analyzátor) či elektrickém (elektrostatický analyzátor) poli

stability oscilace iontů v dvoj- (kvadrupól) či trojrozměrné (iontová past) kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí

doby letu iontů (analyzátor doby letu)

frekvence harmonických oscilací v Orbitrapu (se současnou detekcí)

míry energie absorbované při cyklickém pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli (iontová cyklotronová resonance)

ionizace elektrosprejem (ESI; Electro Spray Ionization)

měkká ionizační technika, k ionizaci dochází pomocí vysokého napětí (2 – 5 kV) za atmosférického tlaku

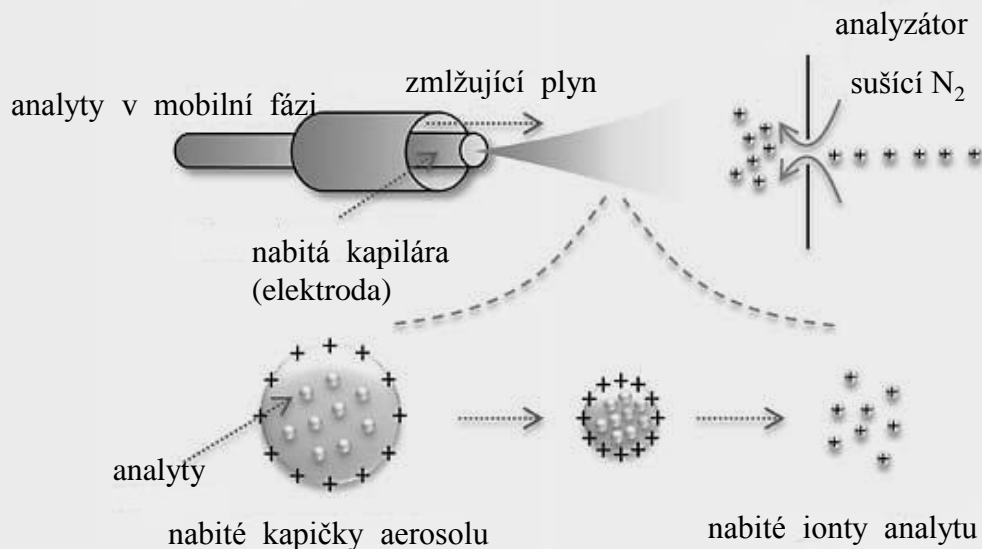
do kapiláry vstupují analyty v mobilní fázi,

aplikace silného elektrického pole na elektrodu → vznik nabitých kapiček – aerosolu na hrotu elektrody, (tvorba aerosolu podporována koaxiálně proudícím zmlžujícím plynem)

rozpuštědlo z nabitých kapiček rychle odpařeno proudem plynu o zvýšené teplotě (sušící plyn)

→ zvýšení povrchového náboje,

→ souhlasně nabité náboje se odpuzují → překonání povrchového napětí → exploze nabitých kapiček, uvolnění iontů z povrchu kapiček do plynné fáze



nevýhoda - **potlačení tvorby iontů analytu (ion suppression)**

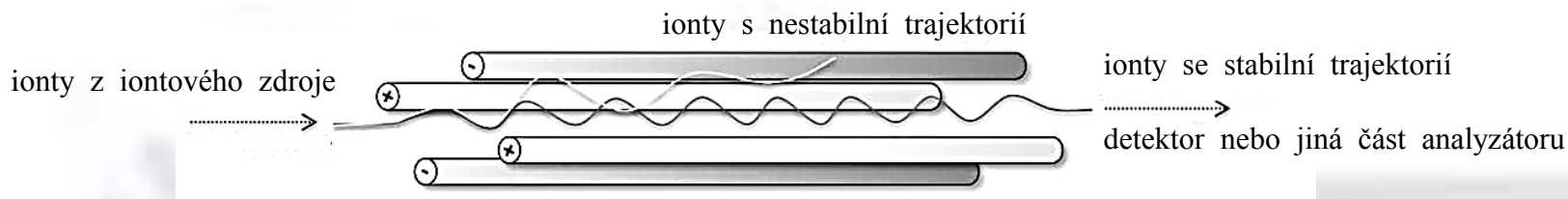
tj. ve stejném okamžiku vznikají **konkurenční ionty** ze složek vzorku přítomných ve vysoké koncentraci

eliminace jevu:

separací cílových analytů od složek snižujících iontový výtěžek **na LC-koloně** a současně

použití **interních standardů značených stabilními izotopy**

kvadrupól → selekce iontů dle poměru m/z v plynné fázi za vakua na základě stability oscilace iontů



čtyři paralelních tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu,
na které je přivedena kombinace střídavého a stejnosměrného napětí,
protilehlé elektrody mají stejnou polaritu,
z iontového zdroje vstupující ionty oscilují,

ionty s určitou hodnotou m/z se pohybují po stabilní trajektorii směrem k detektoru na základě

velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí v daném okamžiku,

ionty s nestabilní trajektorií jsou vychýleny a zachyceny na tyčích

analyzátor pracuje v režimech:

SCAN elektrické pole se kontinuálně mění

→ proměřeny všechny hodnoty m/z → kvadrupól propustí na detektor všechny ionty → celkové hmotnostní spek.

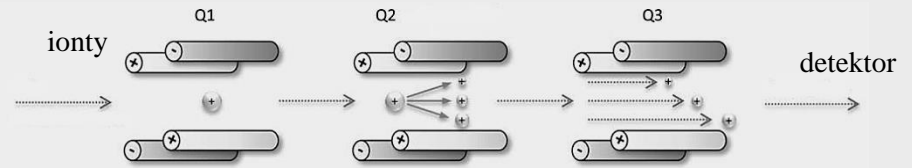
SIM (Selected Ion Monitoring) elektrické pole se nastaví tak, aby procházely ionty se zvolenou hodnotou m/z

→ kvadrupól propustí pouze ionty se zvoleným m/z – kvantitativní stanovení analytu se známou chem. strukturou

trojitý kvadrupól

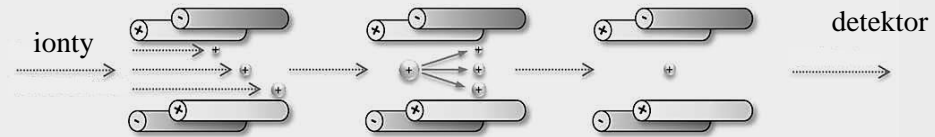
- Q1 propouští iont s definovanou hodnotou m/z
- Q2 fragmentace definovaného iontu
- Q3 v režimu skenování v definovaném rozsahu hodnot m/z
 - fragmenty zaznamenány detektorem
 - informace o fragmentaci vybraného iontu
 - kvalitativní analýza nebo určení přechodů vhodných pro kvantifikaci

sken produktových iontů

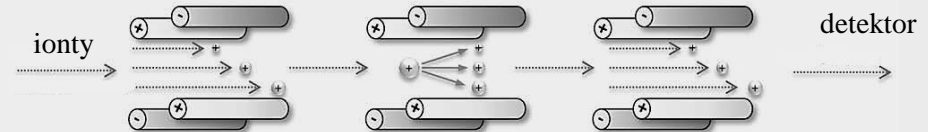


- Q1 v režimu skenování v definovaném rozsahu hodnot m/z
- Q2 fragmentace iontů se zvyšující se hodnotou m/z
- Q3 do detektoru propouští pouze jeden specifický fragment
 - sledování molekul se stejnou funkční skupinou s typickou fragmentací

sken prekurzorových iontů

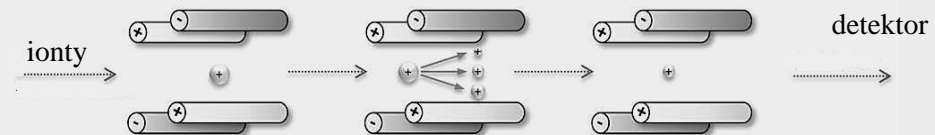


sken neutrální ztráty



Q1 a Q3 skenují ionty s konstantním rozdílem hodnot m/z , který představuje neutrální fragment vzniklý v Q2

SRM (MRM) sledování rozpadu iontů



SRM
MRM

Selected Reaction Monitoring
Multiple reaction Monitorin

- Q1 propouští iont s definovanou hodnotou m/z (prekurzorový)
- Q2 fragmentace definovaného iontu za optimální kolizní energie pro vznik nejintenzivnějšího produktu (produktový iont)
- Q3 projde iont (produktový) s definovanou hodnotou m/z

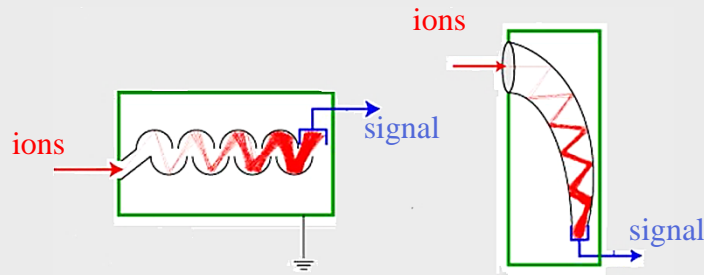
pár hodnot m/z odpovídající prekurzorovému a produktovému iontu tj. **iontový přechod** výběr vhodné kombinace prekurzorových a produktových iontů → vysoká selektivita → kvantitativní analýza

detekce iontů

po selekci v hmotnostním analyzátoru ionty dopadají do detektoru → detektor generuje signál

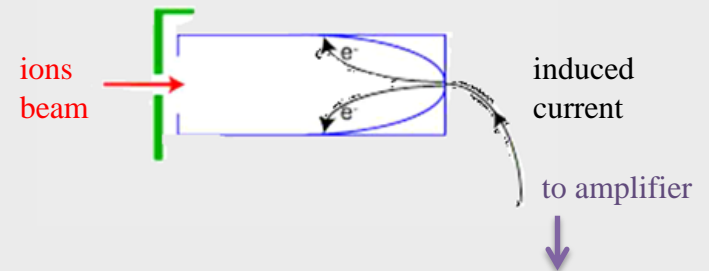
elektronový násobič

ionty dopadají na dynodu, ze které vyrazí 1 až 2 elektrony, elektrony jsou zesíleny systémem dynod nebo opakovanými kolizemi na zakřivené dynodě, zesílení až $10^8 \times$



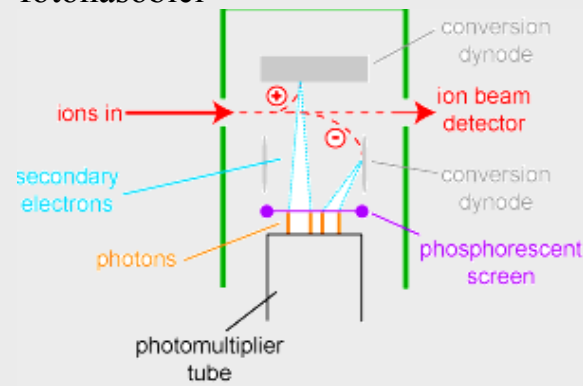
faradayova klec

ionty dopadají na dynodu, ze které vyrazí elektrony, tyto dopadají na anodu, indukovaný proud je zesílen a zaznamenán



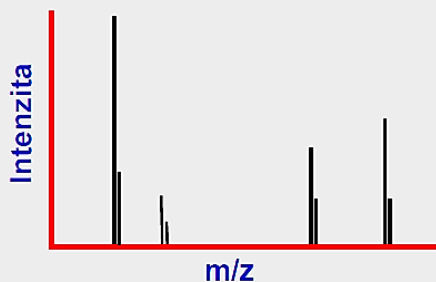
fotonásobič

ionty dopadají na konverzní dynodu, ze které vyrazí elektrony, elektrony dopadají na fosforescenční destičku, uvolní se fotony, zesíleny ve fotonásobiči zesílení až 10^5 až $10^7 \times$



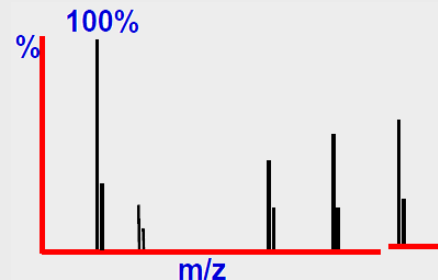
hmotnostní spektrum

měřená veličina **absolutní intenzita** iontů v závislosti na velikosti poměru hmotnosti a náboje (m/z)



normalizace spektra tj. převedení absolutních intenzit na **relativní intenzitu**, tzn.,

intenzita základního píku spektra = 100 %,
intenzity ostatních píků vztaženy k absolutní intenzitě základního píku



profilové spektrum tj.
profil z naměřených bodů,
gaussovský tvar píků,
pro kontrolu kvality píků

čarové spektrum tj.
píky převedené na čáry odpovídající jejich středům,
intenzita čáry odpovídá ploše nebo výšce píku

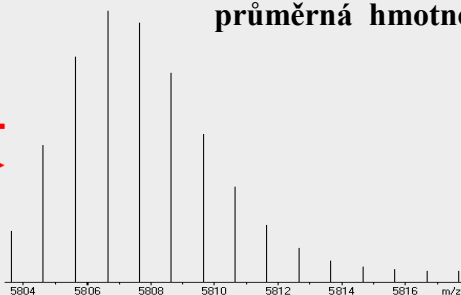
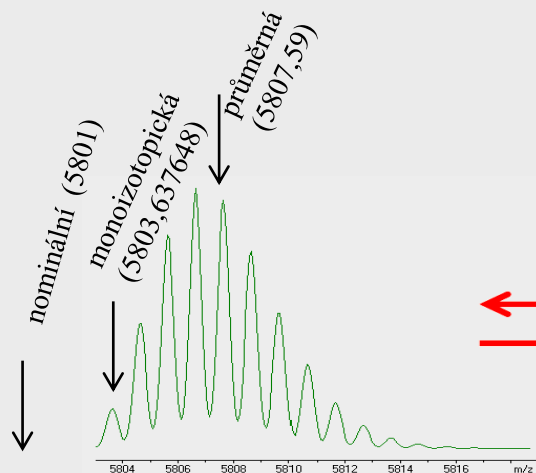
inzulín $C_{257}H_{383}N_{65}O_{77}S_6$

5801

nominální hmotnost vypočtená z celočíselných hmotností prvků,
5803,637643

monoizotopická hmotnost vypočtená z přesných hmotností prvků,
5807,59

průměrná hmotnost tj. vážený průměr hmotností jednotlivých izotopů



C = 12,000000
H = 1,007825
N = 14,003074
O = 15,994915
S = 31,972071

informace v hmotnostním spektru

hmotnostní spektrum (HS) tj. grafická závislost intenzity signálu na hodnotě poměru m/z ,

intenzita signálu přímo úměrná množství (kvantitě) iontu,

intenzita signálu vyjádřena jako **absolutní** (např. počet iontů za vteřinu) nebo

relativní - nejintenzivnější iontu přiřazena hodnota 100, intenzita signálu ostatních iontů k této hodnotě vztažena

hodnota poměru m/z je přímo úměrná molekulové (atomové) hmotnosti a nepřímo úměrná náboji iontu

informace o:

přítomnosti, zastoupení, vzájemném poměru různých iontů → **primární struktura sledovaných látek**

ve spektru lze identifikovat např. **molekulové** či **pseudomolekulové ionty**,

při jejich fragmentaci **fragmentové ionty**,

za určitých podmínek vznikají **aduktové ionty**

rozlišení charakterizuje HS

rozšíření píků v HS

počáteční energie iontů o stejné hodnotě m/z rozdílná \rightarrow rozdíl v čase dopadu do detektoru,

velké množství iontů dopadajících v jeden okamžik do detektoru \rightarrow přetečení do jiných m/z ,

dva či více druhů iontů různého elementárního složení, ale blízkých přesných hmotností \rightarrow objeví se v jednom širším píku

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

rozlišení pro jeden ion, Δm tj. šířka píku v polovině výšky

$$RP = \frac{m_1}{m_2 - m_1}$$

rozlišení pro dva ionty s 10% překryvem stejně vysokých píků obou iontů se stejným z

hmotnostní spektra inzulínu

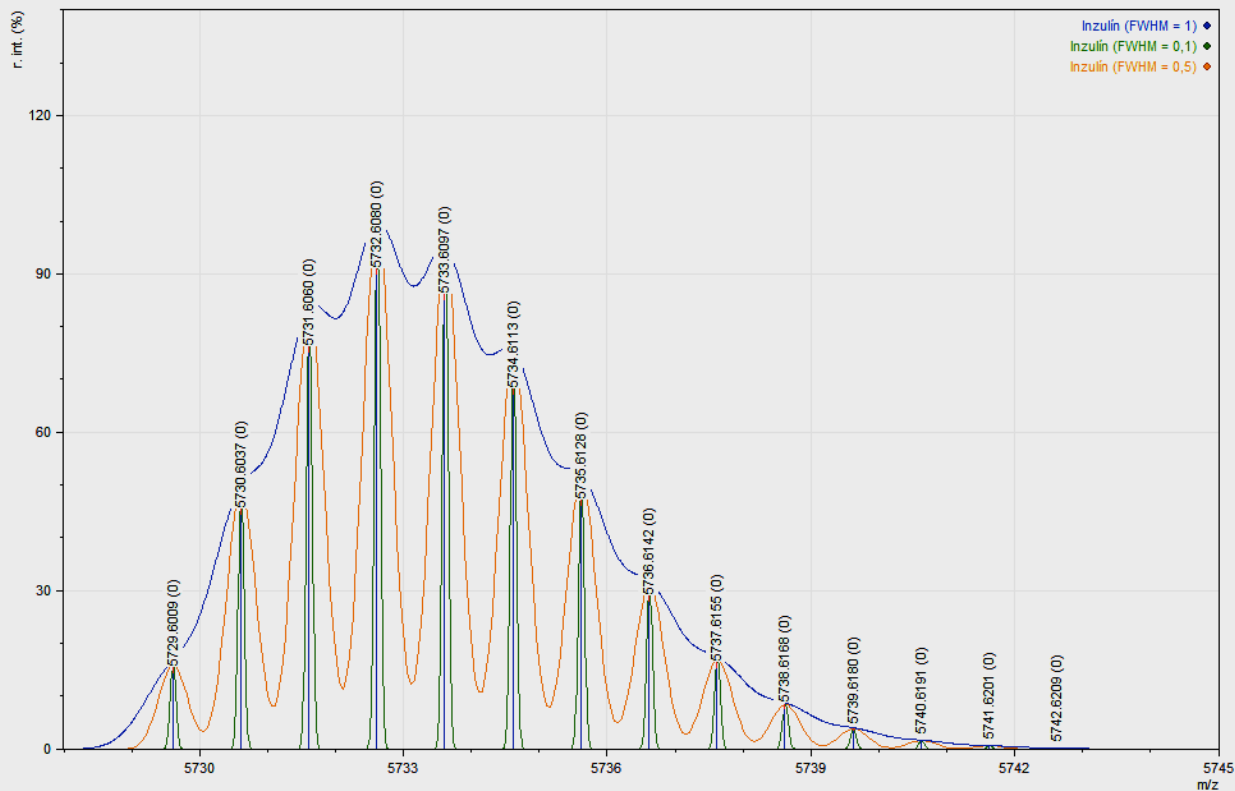
s FWHM = 1; 0,5 a 0,1.

sumární vzorec $C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$,

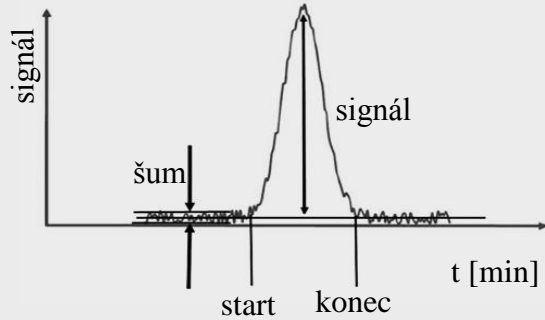
monoizotopická hmotnost 5729,60087,

průměrná hmotnost 5733,51076,

FWHM = Δm



porovnání 2 a více chromatografických systémů



poměr hodnot signálu a šumu (N/S)

vypočtený na základě jednoho chromatografického záznamu pro standard obvykle v ultračisté vodě, vhodné pro spektrofotometrický detektor, plamenově-ionizační detektor

šum tj. periodicky opakující se amplituda základní linie chromatografického záznamu

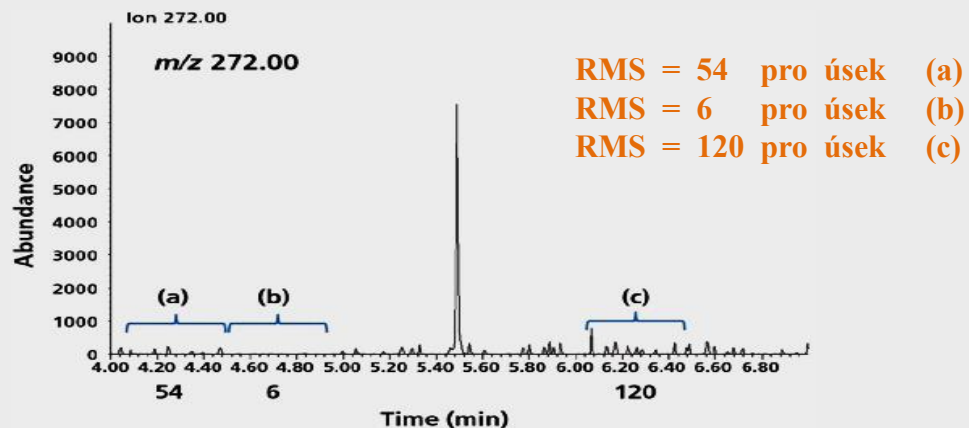
RMS (Root Mean Square) vyjadřuje odstup signálu od šumu tj. kolikrát lze snížit signál, než dosáhne šumu

několik způsobů, jak prezentovat chromatografický systém:

průměrná hodnota šumu **obvykle** určena z úseku základní linie 30s před startem a 30 s za koncem píku standardu (je-li pík rozmytý zezadu 60 s před startem), **ALE**

ruční výběr okna umožní výběr např. 5 s úseku či úseku příliš vzdáleného od startu a konce píku,

kde je šum nízký → **vysoká hodnota S/N**

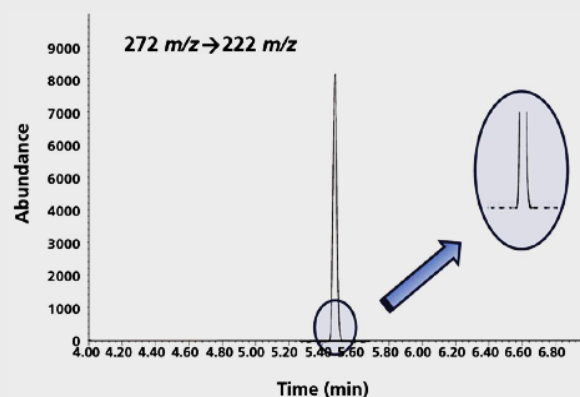


elektronické zesílení signálu → **signál roste**, ALE **množství detekovaných iontů nikoliv**

→ nedochází ke změně detekce

elektronický šum několika řádově nižší než šum chemický →

systémy s **hmotnostním analyzátozem** vykazují **téměř nulový šum** → **hodnota poměru S/N nekonečná**



chromatografické systémy je třeba porovnávat na základě objektivnějšího statistického postupu

U.S. EPA předepisuje pro odhad IDL a MDL statistický přístup

Ústřední věstník Evropského společenství (Rozhodnutí komise ze dne 12. srpna 2002, Prováděcí směrnice Rady 96/23/ES) o provádění analytických metod a interpretaci výsledků **předepisuje běžný standard pro stanovení IDL a MDL používaný v Evropě**

oba postupy identické:

8 nástřiků roztoku standardu

200 fg standardu v objemu nástřiku, tj. 200 fg na kolonu

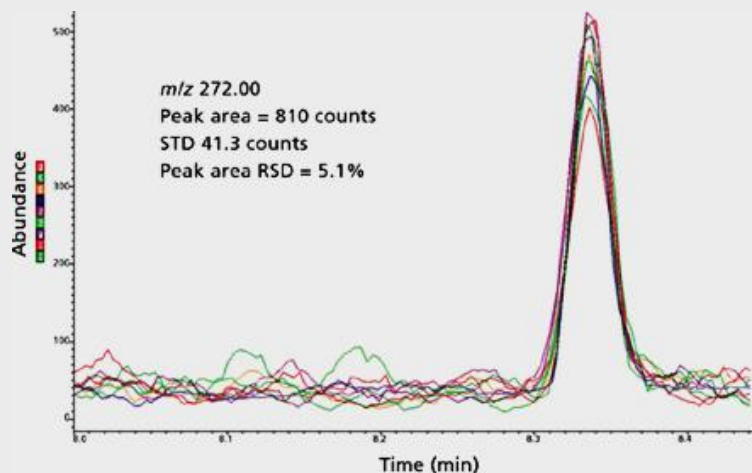
8 elučních křivek v jednom záznamu

→

$(n - 1)$ stupňů volnosti = 7

na 99% hladině spolehlivosti = 2,999 kritická hodnota

Studentova rozdělení



$IDL = (\text{relativní směrodatná odchylka plochy píku získaná z 8 měření} / 100) \cdot 2,999 \cdot \text{nástřikové množství standardu}$

$$IDL = (5,1 \% / 100) \cdot 2,999 \cdot 200 = 31 \text{ fg}$$

→ s 99% pravděpodobností je množství analytu vyšší nebo rovno 31 fg odlišitelné od základní linie chromatografického systému (detegovatelné)

- [1] Český lékopis 2005, Grada Publishing, Praha 2005.
- [2] *Medical Tribune Breviř 2014*, 23th ed.; Medical Tribune CZ, s.r.o., ve spolupřáci s INPHARMEX, spol. s.R.O.: Praha, 2014.
- [3] Lincová D., Farghali H. et al.: Zkladn a aplikovan farmakologie, Copyright c Galén, 2002, str. 12-17.
- [4] Breton H., Cociglio M., Bressolle F., Peyriere H., Blayac J. P., Buys D. H.: J. Chromatogr. B 828, 80 (2005).
- [5] Zaugg S., Zhang X., Sweedler J., Thormann W.: J. Chromatogr. B 752, 17 (2001).
- [6] Caubert M. S., Elbast W., Dubuc M. C., Brazier J. L.: J. Pharm. Biomed. Anal. 27, 261 (2002).
- [7] Pérez S., Barcel D.: Trends Anal. Chem. 26, 494 (2007).
- [8] Tan S. C., Patel B. K., Jackson S. H. D., Swift C. G., Hutt A. J.: Xenobiotica 32, 683 (2002).
- [9] Heitmeier S., Blaschke G.: J. Chromatogr. B 721, 109 (1999).
- [10] Tambosi J. L., de Sena R. F., Favier M., Gebhard W., José H. J., Schröder H. F., Moreira R. F. P. M.: Desalination 261, 148 (2010).
- [11] Bougie D., Aster R.: Blood 97, 3846 (2001).
- [12] Breton H., Cociglio M., Bressolle F., Peyriere H., Blayac J. P., Buys D. H.: J. Chromatogr. B 828, 80 (2005).
- [13] Li A. P., Hartman N. R., Lu C., Collins J. M., Strong J. M.: Br. J. Clin. Pharmacol. 48, 733 (1999).
- [14] Krueger S. K., van Dyke J. E., Williams D. E.: Drug Metab. Rev. 38, 139 (2006).
- [15] Ternes T. A., Hirsch R.: Environ. Sci. Technol. 34, 2741 (2000).
- [16] Steger-Hartmann T., Länge R., Schweinfurth H., Tschampel M., Reimann I.: Water Res. 36, 266 (2002).
- [17]]Batt A., Kim S., Aga D. S.: Environ. Sci. Technol. 40, 7367 (2006).
- [18] Pérez S., Eichhorn P., Celiz M. D., Aga D. S.: Anal. Chem. 78, 1866 (2006).
- [19] Schulz M., Löffler D., Wagner M., Ternes T. A.: Environ. Sci. Technol. 42, 7207 (2008).
- [20] Putschew A., Mche U., Tellez A. S., Jekel M.: Water Sci. Technol. 56, 159 (2007).
- [21] Kormos J. L., Schulz M., Kohler H.-P. E., Ternes T. A.: Environ. Sci. Tehcnol. 44, 4998 (2010).
- [22] Seitz W., Jiang J.-Q., Schulz W., Weber W. H., Maier D., Maier M.: Chemosphere 70, 1238 (2008).
- [23] Duirk S. E., Lindell C., Cornelison Ch., Kormos J., Ternes T. A., Attene-Ramos M., Osiol J., Wagner E. D., Plewa M. J., Richardson S. D.: Environ. Sci. Technol. 45, 6845 (2011).
- [24] Wendel F. M., Eversloh Ch. L., Machek E. J., Duirk S. E., Plewa M. J., Richardson S. D., Ternes T. A.: Environ. Sci. Technol. 48, 12689 (2014).
- [25] Redeker M., Wick A., Björn M., Ternes T. A.: Environ. Sci. Technol. 48, 10145 (2014).
- [26] Zonja B., Delgado A., Pérez S., Barceló D.: Environ. Sci. Technol. 49, 3464 (2015).
- [27] Pospchalov D.: Čistrensk listy 2 2009, Přiloha Vodnho hospodřstv, 59, 3 (2009).
- [28] Kule L., Babkov P., Koželuh M.: Listy CzWA 2, Přiloha Vodnho hospodřstv 60, 6 (2010).
- [29] Pomykačov V., Čadek V., Svobodov V., Kožišek F., Jeligov H.: Chemick Listy, 106, 143 (2012).
- [30] Postigo C., Richardson S. D.: J. Hazard. Mater 279, 461 (2014).
- [31] Busetti F., Linge K. L., Rodriguez C., Heitz A.: J. Environ. Sci. Health Part A: 45, 542 (2010).
- [32] Zhang Y., Geißen S-U., Gal C.: Chemosphere 73, 1151 (2008).
- [33] Richardson S. D.: Anal. Chem. 80, 4373 (2008).
- [34] Richardson S. D.: Anal. Chem. 78, 4021 (2006).
- [35] Flippin J. L., Huggett D., Foran Ch. M.: Aquat. Toxicol. 81, 73 (2007).
- [36] Pomati F., Castiglioni S., Zuccato E., Fanelli R., Vigetti D., Rossetti C., Calamari D.: Environ. Sci. Technol. 40, 2442 (2006).
- [37] Fent K., Weston A. A., Caminada D.: Aquat. Toxicol. 76, 122 (2006).
- [38] Taggart M. A., Cuthbert R., Das D., Sashikumar C., Pain D. J., Green R. E., Feltrer Y., Shultz S., Cunningham A. A., Meharg A. A.: Environ. Pollut. 147, 60 (2007).
- [39] Swan G. E., Cuthbert R., Quevedo M., Green R. E., Pain D. J., Bartels P., Cunningham A. A., Duncan N., Meharg A. A., Oaks J. L., Parry-Jones J., Shultz S., Taggart M. A., Verdoorn G., Wolter K.: Biol. Lett. 2, 279 (2006).
- [40] Daughton Ch. G., Ternes T. A.: Environ. Health Perspect. 107, 907 (1999).
- [41] Cargout M., Perdiz D., Mouatassim-Souali A., Tamisier-Karolak S., Levi Y.: Sci. Total. Environ. 324, 55 (2004).
- [42] Ternes T. A.: Trends Anal. Chem. 20, 419 (2001).
- [43] Pickford D. B., Morris I. A.: Aquat. Toxicol. 62, 179 (2003).
- [44] Kidd K. A., Blanchfield P. J., Mills K. H., Palace V. P., Evans R. E., Lazorchak J. M., Flick R. W.: PNAS 104, 8897 (2007).
- [45] Lajeunesse A., Gagnon C., Sauv S.: Anal. Chem. 80, 5325 (2008).
- [46] Caminada D., Escher C., Fent K.: Aquat. Toxicol. 79, 114 (2006).
- [47] Sanderson H., Thomsen M.: Toxicol. Lett. 187, 84 (2009).
- [48] <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>.
- [49] <http://www.hplc.cz/>.
- [50] Faktor J., Struhrov I., Fuikov A., Hublek M., Vojtšek B., Bouchal P.: Chem. Listy 105, 846 (2011).
- [51] Friedeck D., Lemr K.: Klin. Biochem. Metab. 20, 152 (2012).
- [52] holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf
- [53] holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf.
- [54] web.natur.cuni.cz/~kozlik/Prednasky/HPLC_MS_MS.pdf.
- [55] <http://www.chromatographyonline.com/why-use-signal-noise-measure-ms-performance-when-it-often-meaningless-0?id=&sk=&date=&%0A%09%09%09&pageID=2>

farmakologick terminologie

ATC skupiny

humánní biotransformace

humánní biotransformace CBZ

humánní biotransformace AcSALK

humánní biotransformace COF

transforman produkty

LITERRN ZDROJE

mra vskytu

AOPs


ICM; RO

dopad na necilov organismy

HPLC

MS

IDL

The image shows two brown trout swimming in a stream. The trout in the foreground is larger and more detailed, showing its characteristic brown and black spotted pattern. The second trout is slightly behind and to the right, appearing more faded. The water is clear, and some green aquatic plants are visible in the background.

DĚKUJI ZA POZORNOST