

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lucia Molnárová

Validace LC-MS metody a monitoring léčiv ve vodách

Validation of LC-MS method and monitoring of
pharmaceuticals in water samples

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Konzultant diplomové práce: Ing. Taťana Halešová

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 12. července 2020.

podpis

Abstrakt

Výskyt, akumulace a následný osud léčiv v různých složkách životního prostředí představuje v současné době velmi aktuální téma. Celosvětově jsou ročně spotřebovávány tisíce tun různých farmaceutických látek, kdy velká část z nich je, ať už v nezměněné podobě nebo ve formě metabolitů, odváděna do systému odpadních vod. Vzhledem k faktu, že procesy probíhající na čistírnách odpadních vod nedokáží tyto látky účinně odstranit, prolínají farmaka postupně do koloběhu vod a stále tak stoupá zamoření podzemních i povrchových vod. Otázka soustavné kontroly a postupného odstraňování reziduí léčiv ze životního prostředí stále není komplexně a systematicky řešena. Vývoj a dostupnost citlivých komerčních analytických metod jsou tak velmi žádané.

V rámci této diplomové práce byla v laboratořích ALS Czech Republic optimalizována a validována multireziduální analytická UHPLC–MS/MS metoda pro stanovení 52 různých léčiv v pitných a odpadních vodách. Metoda byla dále použita pro monitoring těchto léčiv jak v pitných, tak odpadních vodách, a dále byla také stanovena účinnost odstranění těchto látek v čistírnách odpadních vod analýzou dvojic vzorků přítoků a odtoků. Získaná data korespondují s již publikovanými studiemi zabývajícími se danou problematikou.

Klíčová slova

Léčiva, UHPLC–MS/MS, optimalizace, validace, monitoring, pitná voda, odpadní voda.

Abstract

Occurrence, accumulation and subsequent fate of pharmaceuticals in environment currently represent a very actual topic. Worldwide, thousands of tons of pharmaceutical substances are consumed every year. A large portion of pharmaceuticals is, in unchanged or metabolized forms, disposed *via* sewage systems and wastewater treatment plants. Considering the fact that wastewater treatment processes are not able to completely eliminate all active substances or their metabolites, pharmaceuticals are systematically washing out into the water system and increasingly contaminate the ground and surface waters. The problematics of continuous control and progressive elimination of pharmaceutical residues from environment are still not completely solved. Thus, the development and availability of accurate and fast commercial analyses are highly desired.

The aim of this diploma thesis was the optimization and validation of multi-residue UHPLC–MS/MS analytical method designated for the determination of 52 pharmaceuticals in drinking and waste waters. The work was carried out in laboratories of ALS Czech Republic. An analytical method was subsequently used for monitoring of pharmaceuticals in both drinking and waste waters, as well as for the determination of efficiency of removing these compounds within the wastewater treatment processes. The obtained data correspond with the recently published studies devoted to this problem.

Key words

Pharmaceuticals, UHPLC–MS/MS, optimization, validation, monitoring, drinking water, waste water.

Poděkování

Touto cestou bych chtěla vyslovit vděk doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za odborné vedení diplomové práce, Ing. Taťaně Halešové za poskytnutí prostředků a vybavení v ALS Czech Republic. V neposlední řadě můj obrovský vděk patří Ing. Martě Václavíkové, Ph.D. za trpělivost a čas, který mi věnovala v průběhu samotného měření v laboratoři, a taktéž za poskytnutí jejích odborných zkušeností a rad.

Zároveň bych chtěla poděkovat i svojí rodině, která vytvářela podmínky pro moje studium a v průběhu celého studia mi poskytovala velkou podporu.

Obsah

1	Úvod	11
1.1	Cíle diplomové práce	12
2	Teoretická část	13
2.1	Léčiva	13
2.1.1	Charakteristika léčiv	13
2.1.2	Obecná klasifikace léčiv	13
2.2	Klasifikace a popis vybraných léčiv	15
2.3	Spotřeba léčiv v ČR	18
2.4	Monitoring léčiv	20
2.4.1	Monitoring léčiv v České republice	21
2.4.2	Monitoring léčiv v Evropě	21
2.5	Analýza léčiv ve vzorcích pitných a odpadních vod	24
2.5.1	Úprava vzorku před stanovením	24
2.5.2	Extrakce a přečištění vzorků před LC-MS analýzou	24
2.6	Separace a detekce farmak metodu LC-MS	27
2.6.1	Kapalinová chromatografie (LC)	29
2.6.2	Hmotnostní spektrometrie	30
2.7	Validace metody	32
2.7.1	Přesnost metody	32
2.7.2	Preciznost metody	32
2.7.3	Lineární a pracovní rozsah metody	33
2.7.4	Mez detekce a mez stanovitelnosti	33
2.7.5	Selektivita metody	34
2.7.6	Robustnost metody	34
3	Experimentální část	35

3.1	Standardní látky.....	35
3.2	Používané chemikálie.....	42
3.3	Přístroje a pomůcky.....	43
3.4	Výpočetní technika a software	43
3.4.1	Parametry UHPLC–MS/MS analýzy.....	43
3.5	Ředění standardů, příprava kalibračních a pracovních roztoků	48
3.5.1	Příprava a ředění analytických standardů	48
3.5.2	Příprava kalibrační řady	49
3.6	Validace metody.....	50
3.6.1	Příprava slepých vzorků.....	50
3.6.2	Příprava laboratorních kontrolních vzorků (LCS).....	50
3.6.3	Příprava fortifikovaných matric pro validaci.....	50
3.7	Monitoring léčiv v odpadních vodách.....	51
3.7.1	Příprava reálných vzorků pro monitoring.....	51
4	Výsledky a diskuze.....	52
4.1	Optimalizace podmínek – výběr vhodné mobilní fáze.....	52
4.2	Validace.....	54
4.2.1	Selektivita metody	57
4.2.2	Mez detekce a mez stanovitelnosti	58
4.2.3	Lineární a pracovní rozsah metody.....	62
4.2.4	Přesnost metody	64
4.2.5	Správnost metody	72
4.2.6	Robustnost metody	75
4.2.7	Odhad nejistoty stanovení.....	76
4.3	Monitoring reálných vzorků.....	79
4.3.1	Výsledky monitoringu léčiv ve vzorcích pitných vod.....	79

4.3.2	Výsledky monitoringu léčiv ve vzorcích odpadních vod	82
4.3.3	Porovnání účinnosti čistíren odpadních vod v ČR.....	86
5	Závěr.....	90
6	Seznam použitých zdrojů.....	92

Seznam použitých zkratek a symbolů

ATC	Anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace (z anglického: „Anatomical Therapeutic Chemical“)
BEH	Hybridní stacionární fáze modifikovaná ethylenovými můstky (z anglického: „Bridged ethylene hybrid“)
CE	Kolizní energie (z anglického: „Collision energy“)
CV	Napětí na vstupu do hmotnostního analyzátoru (z anglického: „Cone voltage“)
C ₈ /C ₁₈	Oktyl/oktadecyl
ČOV	Čistírna odpadních vod
DI	Přímý nástřik (z anglického: „Direct injection“)
ESI	Ionizace elektrosprejem (z anglického: „Electrospray ionization“)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického: „High performance liquid chromatography“)
ISTD	Isotopově značený standard (z anglického: „Isotopic standard“)
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (z anglického: „International Union of Pure and Applied Chemistry“)
LC	Kapalinová chromatografie (z anglického: „Liquid chromatography“)
LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
LCS	Laboratorní kontrolní vzorek (z anglického: „Laboratory control sample“)
LOD	Limit detekce (z anglického: „Limit of detection“)
LOQ	Limit kvantifikace (z anglického: „Limit of quantification“)
LP	Léčivý přípravek
MB	Slepý vzorek (z anglického: „Method blank“)
MF	Mobilní fáze

MS	Hmotnostní spektrometrie (z anglického: „Mass spektrometry“)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (z anglického: „Tandem mass spektrometry“)
MRM	Monitorování více reakcí (z anglického: „Multiple reaction monitoring“)
<i>m/z</i>	Poměr hmotnost/náboj
NP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normální fázi (z anglického: „Normal-phase HPLC“)
SF	Stacionární fáze
NSAID	Nesteroidní protizánětlivá a protirevmatická léčiva (z anglického: „Non-steroidal anti-inflammatory drugs“)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (z anglického: „Organisation for Economic Co-operation and Development“)
PTFE	Polytetrafluoretylén
PVDF	Polyvinyliden difluorid
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (z anglického: „Reversed-phase HPLC“)
RPM	Počet otáček za minutu (z anglického: „Rotation per minute“)
QqQ/ TQ	Trojité kvadrupól
SPE	Extrakce na tuhé fázi (z anglického: „Solid-phase extraction“)
SPIKE	Obohacení vzorku přídavkem známého množství analytu
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
TOF	analyzátor doby letu (z anglického: „Time-of-flight“)
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z anglického: „Ultra-high performance liquid chromatography“)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z anglického: „World Health Organization“)

1 Úvod

Voda je důležitou součástí života na Zemi. Tvoří více než dvě třetiny zemského povrchu, je základním rozpouštědlem a účastní se všech chemických reakcí. Jedním z nejvíce diskutovaných témat, které zvyšují zájem lidí a vědecké komunity, je znečištění pitné vody i vodních zdrojů různými polutanty a xenobiotiky. Tato diplomová práce se zabývá stanovením různých skupin léčiv metodou UHPLC–MS/MS ve vzorcích pitných a odpadních vod.

Farmakologické látky jsou po průchodu trávicím traktem organismu metabolizovány a vyloučeny. Degradací původních účinných látek mohou vznikat metabolity, které mohou často být biologicky aktivnější a stabilnější než původní mateřské látky. Vysoká biologická stabilita těchto látek způsobuje, že farmaka mohou projít čistírnou odpadních vod do environmentálního prostředí, kde se dále, v závislosti na jejich biodegradabilitě, hromadí. [1]

Farmaceutika se do prostředí dostávají z různých bodových zdrojů, např. lidskou a zvířecí exkrecí, komunálními odpadními vodami, industriálním odpadem z průmyslové výroby, odpadem z nemocničních a veterinárních zařízení, ze zemědělství nebo různými výluhy z půdy. [2] Z dosavadních mezinárodních studií vyplývá, že nízké koncentrace (ng L^{-1}) léčiv a jejich metabolitů byly stanoveny téměř ve všech typech vodních zdrojů, tedy v podzemních, povrchových, odpadních i pitných vodách. Neustálý nárůst spotřeby těchto látek, jejich rostoucí koncentrace v prostředí a dlouhodobé vystavení organismů a ekosystémů tomuto koktejlu léčiv, zvyšuje potenciální hrozbu nežádoucích účinků na živé organismy a lidskou populaci. [3]

Léčiva a hormonální přípravky mohou ovlivnit vodní organismy i kvalitu surové vody, která slouží k výrobě pitné vody. Mnoho studií poukazuje na fakt, že tyto látky jsou schopné narušovat hormonální rovnováhu živých organismů, zvyšují jejich mortalitu a počet vývojových abnormalit. Výsledky testů ukazují, že individuální toxicita látek v nízkých koncentracích není největší problém. Větší hrozbou je to, že léčiva ve vodném prostředí mezi sebou navzájem interagují, a tím zvyšují svůj účinek. [4] Z těchto důvodů je důležitý vývoj nových metod pro stanovení léčiv a jejich monitoring v prostředí.

1.1 Cíle diplomové práce

- Optimalizace složení mobilní fáze UHPLC–MS/MS metody pro stanovení různých skupin léčiv ve vzorcích pitných a odpadních vod
- Validace metody pro stanovení léčiv ve vzorcích pitných a odpadních vod
- Monitoring výskytu léčiv ve vzorcích pitných a odpadních vod v České republice
- Stanovení účinnosti procesů čistíren odpadních vod analýzou jejich přítoků a odtoků

2 Teoretická část

2.1 Léčiva

2.1.1 Charakteristika léčiv

Jako léky jsou označovány léčivé látky a přípravky upravené k požití a vydané nemocnému. Léčivá látka je látka nebo směs látek, přírodního nebo syntetického původu, určena k prevenci, terapii nemoci nebo k ovlivnění fyziologických funkcí. Léčivým přípravkem je léčivá látka upravena do lékové formy, musí být opatřena obalem a řádně označena. Většina léčivých přípravků obsahuje pomocné látky, které nemají vlastní léčebné účinky, ale ulehčují výrobu, uchovávání nebo aplikaci. [5] Léčivé přípravky se dělí na hromadně vyráběné (HVLP) a individuálně připravované (IPLP), které jsou připravené v lékárně. HVLP jsou vyráběny ve farmaceutických společnostech a mohou být volně prodejné nebo vázané na lékařský předpis. [6] Humánní léčivé přípravky jsou určeny pro podání lidem, veterinární léčivé přípravky a medikovaná krmiva jsou podávána zvířatům. [7]

2.1.2 Obecná klasifikace léčiv

Dělení léčiv do skupin je možné z několika hledisek: podle chemické struktury (arylalkylaminy, fenanthreny, alkylaminoethery, barbituráty, benzodiazepiny, sulfonamidy), podle charakteru složky (hlavní účinná látka, vedlejší účinná látka, pomocná látka), podle původu (léčiva přírodního původu, léčiva polosyntetická, léčiva syntetická), podle způsobu podání (perorální, intravenózní apod.), podle způsobu přípravy (hromadně vyráběná HVLP, individuálně připravovaná IPLP) a podle způsobu výdeje (vázaná na lékařský předpis, vázaná na lékařský předpis s modrým pruhem, volně prodejná, vyhrazená a výdej s omezením). [8]

Klasifikace dle Světové zdravotnické organizace (WHO) třídí léčiva do anatomicko-terapeutických (ATC) skupin podle svého klinického účinku na orgány nebo celý systém. ATC kód je alfanumerický mezinárodní kód jednoznačně označující každé jednotlivé léčivo sedmimístným kódem. Léčiva jsou klasifikována ve skupinách, které jsou dále rozčleněny do pěti úrovní. První úroveň se skládá ze 14 anatomicko-farmaceutických skupin a každá skupina je označena jednopísmennou zkratkou (viz *Tab. 2.1*). [9]

Tab. 2.1: ATC klasifikace – první úroveň.

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

Druhá úroveň značí hlavní farmakologicko-terapeutickou podskupinu a je značena dvojcíselným kódem. Třetí a čtvrtá úroveň vyjadřuje chemicko-farmakologicko-terapeutickou podskupinu, označenou dvěma písmeny. Konečně pátá úroveň vyjadřuje konkrétní chemickou látku nebo sloučeninu a je označována dvěma číslicemi (viz Tab. 2.2). [9]

Tab. 2.2 – Příklad ATC značení a klasifikace Ibuprofenu.

Značka	Klasifikace
M	Muskuloskeletární systém
M01	Protizánětlivá a protirevmatická léčiva
M01A	Nesteroidní protizánětlivá a protirevmatická léčiva
M01AE	Deriváty kyseliny propionové
M01AE01	Ibuprofen

2.2 Klasifikace a popis vybraných léčiv

V této části jsou obecně popsány jednotlivé skupiny léčiv, které jsou obsaženy v řešené multireziduální LC-MS analytické metodě (viz *Tab. 2.3*).

Antidiarotika (léčiva trávicího traktu a metabolismu) jsou používána k léčbě akutního a chronického průjmu. Loperamid a thebain se řadí mezi opioidní antipropulziva, která stimulují opioidní receptory střeva, a tím snižují peristaltiku střevní hladké svaloviny. [10]

Antikoagulancia (léčiva krve a krvetvorných orgánů) způsobující snížení srážlivosti a koagulaci krve. Warfarin působí jako kofaktor při syntéze koagulačních faktorů. [6]

Antihypertenziva (léčiva kardiovaskulárního systému) snižují zvýšený krevní tlak a jsou používána k terapii arteriální hypertenze, snížení srdečné frekvence a snížení vzrušivosti myokardu. Mezi β -blokátory patří metoprolol, atenolol, propranolol a sotalol. Ze skupiny léčiv ovlivňující renin-angiotenzinový systém byly vybrány enalapril a valsartan. Benzafribrát, kyselina klofibróvá a gemfibrozil jsou látky upravující hladinu lipidů v krvi. Furosemid a hydrochlorothiazid patří do skupiny léčiv vyvolávající zvýšení diurézy a exkrece moči – diuretika. [10]

Mezi antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci patří antibiotika a chemoterapeutika, které slouží k léčbě bakteriálních, protozárních a mykobakteriálních infekcí. Z této skupiny byly vybrány léčiva – chloramfenikol, linkomycin, metronidazol, sulfamethazin, sulfamethoxazol a trimethoprim. [6]

Vybraná cytostatika (paklitaxel, cyklofosfamid, kapecitabin a ifosfamid) jsou léčiva používána při chemoterapeutické léčbě nádorových onemocnění, která způsobují dlouhodobou kompletní remisi nádoru spolu s přijatelnou toxicitou zdravé tkáně. V nádorových buňkách se nacházejí receptorové proteiny, na které se mohou vázat steroidní hormony (anastrozol a flutamid) a způsobovat tak inhibici růstu nádorových buněk. [6]

Imunosupresiva (azothioprin, mykofenolát mofetil) potlačují nepřiměřenou odpověď imunitního systému, tlumí aktivitu lymfocytů a inhibují alergickou reakci organismu. [10]

Vybrané látky ovlivňující muskuloskeletární systém se řadí do dvou skupin podle účinku. První skupinou jsou myorelaxancia (cyklobenzaprin), která uvolňují křeče kosterního svalstva. Druhou skupinou jsou nesteroidní antiflogistika (diklofenak, indomethacin, ketoprofen, naproxen a piroxican) potlačující bolest nebo vznik či rozvoj zánětu. [10]

Stanovovaná léčiva ovlivňující centrální nervovou soustavu je možné rozdělit do pěti skupin – analgetika, psycholeptika, psychoanaleptika, antiepileptika a jiná léčiva nervového systému. Analgetika (butorfanol, paracetamol, tramadol) jsou schopna při celkovém podání snížit vnímání bolesti, případně snížit zvýšenou tělesnou teplotu či potlačit zánět. Psycholeptika (oxazepam, zolpidem) jsou látky potlačující psychotické nebo úzkostné stavy. Psychoanaleptika potlačující depresivní stavy (setralin, citalopram, diazepam, fluoxetin) se nazývají antidepresiva, a naopak látky zlepšující psychické nebo mentální funkce (kofein) jsou nazývané nootropní látky. [10]

Antiastmatika (salbutamol, terbutalin) slouží k terapii onemocnění spojených s obstrukcí dýchacích cest, k prevenci astmatických záchvatů a navození bronchodilatace.

V diagnostice využívané jodové kontrastní látky (iomeprol, iopamidol, iopromid) jsou látky, které pohlcují rentgenové záření. [10]

Tab. 2.3: Seznam analytů a zařazení do ATC klasifikace první a druhé kategorie.

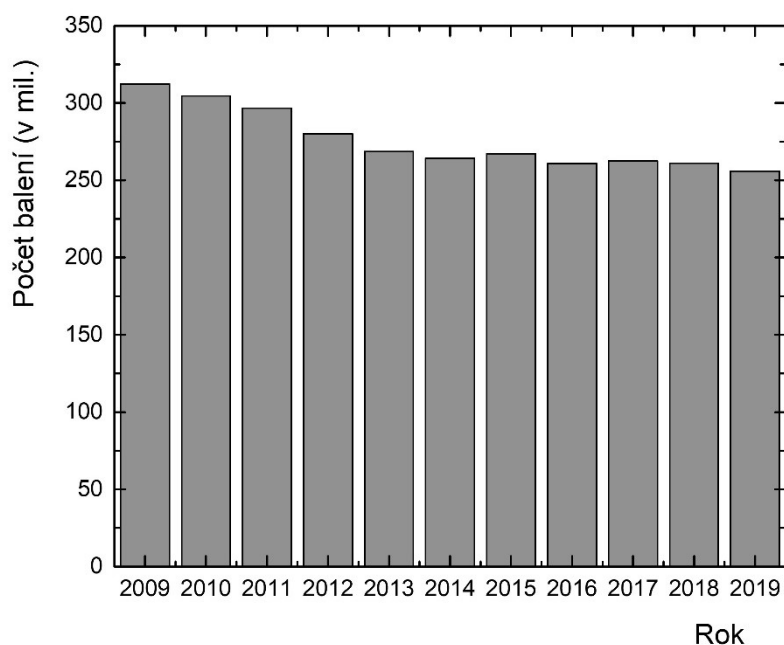
Analyt	ATC	2. Kategorie
Anastrozol	L	Hormonální léčiva používaná v onkologii
Atenolol	C	β-blokátory
Azathioprin	L	Imunosupresiva
Bezafibrat	C	Látky upravující hladinu lipidů
Buprenorfin	N	Jiná léčiva nervového systému
Butorfanol	N	Analgetika
Citalopram	N	Psychoanaleptika
Cyklobenzaprin	M	Myorelaxancia
Cyklofosfamid	L	Cytostatika
Diazepam	N	Psychoanaleptika
Diklofenak	M	Protizánětlivá a protirevmatická léčiva
Enalapril	C	Léčiva ovlivňující renin-angiotenzinový systém

Analyt	ATC	2. Kategorie
Fluoxetin	N	Psychoanaleptika
Flutamid	L	Hormonální léčiva používaná v onkologii
Furosemid	C	Diuretika
Gabapentin	N	Antiepileptika
Gemfibrozil	C	Látky upravující hladinu lipidů
Hydrochlorothiazid	C	Léčiva ovlivňující renin-angiotenzinový systém
Chloramfenikol	J	Antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci
	S	Oftalmologika
Ifosfamide	L	Cytostatika
Indomethacin	M	Lokální léčiva k terapii bolestí svalů a kloubů
Iomeprol	V	Kontrastní látky
Iopamidol	V	Kontrastní látky
Iopromid	V	Kontrastní látky
Kapcitabin	L	Cytostatika
Karbamazepin	N	Antiepileptika
Ketoprofen	M	Lokální léčiva k terapii bolestí svalů a kloubů
Kofein	N	Psychostimulancia, látky užívané k léčbě ADHD a nootropika
Kyselina klofibrová	C	Látky upravující hladinu lipidů
Linkomycin	J	Antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci
Loperamid	A	Antidiaroeika, střevní protizánětlivá a protiinfekční léčiva
Metoprolol	C	β -blokátory
Metronidazol	J	Antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci
	G	Gynekologická antiinfektiva a antiseptika
	P	Antiprotozoika
	A	Léčiva k terapii onemocnění spojených s poruchou acidity
	D	Antibiotika a chemoterapeutika pro použití v dermatologii
Mykofenolát Mofetil	L	Imunosupresiva
Naproxen	M	Lokální léčiva k terapii bolestí svalů a kloubů
Oxazepam	N	Psycholeptika
Paklitaxel	L	Cytostatika
Paracetamol (Acetaminofen)	N	Analgetika
Piroxicam	M	Lokální léčiva k terapii bolestí svalů a kloubů
Propranolol	C	β -blokátory

Analyt	ATC	2. Kategorie
Salbutamol	R	Léčiva k terapii onemocnění spojených s obstrukcí dých. cest
Sertralin	N	Psychoanaleptika
Sotalol	C	β -blokátory
Sulfamethazin	J	Antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci
Sulfamethoxazol	J	Antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci
Terbutalin	R	Léčiva k terapii onemocnění spojených s obstrukcí dých. cest
Thebain	A	Antidiaroeika, střevní protizánětlivá a protiinfekční léčiva
Tramadol	N	Analgetika
Trimethoprim	J	Antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci
Valsartan	C	Léčiva ovlivňující renin-angiotenzinový systém
Warfarin	B	Antianemika
Zolpidem	N	Psycholeptika

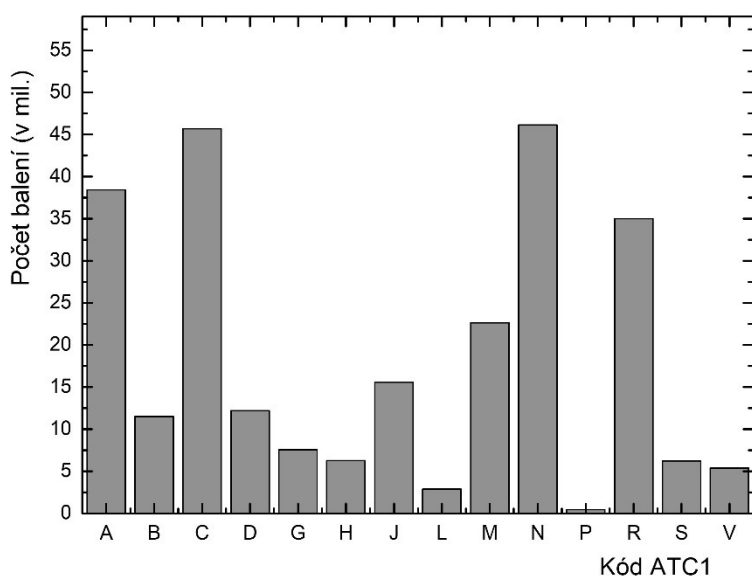
2.3 Spotřeba léčiv v ČR

Spotřeba léčiv v České republice je v posledních pěti letech relativně stabilní (viz Obr. 2.1). Podle Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL) se v roce 2019 do sítě zdravotnických zařízení v ČR dovezlo 256 milionů balení farmaceutických přípravků.



Obr. 2.1: Meziroční porovnání dodávky přípravků do sítě zdravotnických zařízení v roce 2019.

Podle souhrnného hodnocení vývoje dodávek léčivých přípravků podle ATC skupiny v roce 2019 (viz *Obr. 2.2*) bylo do sítě zdravotnických zařízení dodáno nejvíc farmak působících na nervový systém (46,11 milionů balení), kardiovaskulární systém (45,68 milionů balení), trávicí trakt a metabolismus (38,42 milionů balení), respirační systém (35,01 milionů balení) a muskuloskeletární systém (22,64 milionů balení). [11]

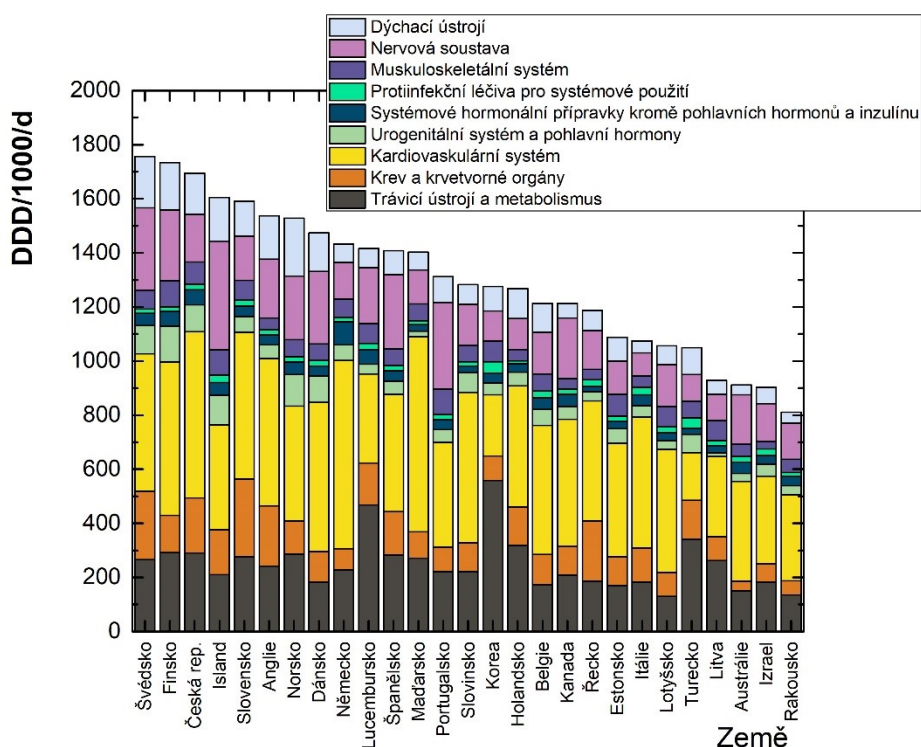


Obr. 2.2: Dodávky farmak do sítě zdravotnických zařízení v ČR v roce 2019 rozděleny v ATC1 skupinách (ATC1 klasifikace viz Tab. 2.1).

Dle ATC klasifikace třetí úrovně bylo v roce 2019 dodáno do sítě zdravotnických zařízení největší množství počtu balení analgetik, protizánětlivých a protirevmatických léčiv, léčiv ovlivňující renin-angiotenzinový systém, antibakteriální léčiva pro systémovou aplikaci, léčiva proti nachlazení a kašli, a léčiva k terapii diabetu. Počty dodaných balení těchto LP překračuje množství 10 milionů balení, v případě analgetik 19 milionů balení. [11]

Spotřebu farmaceutik ve světě sleduje Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*). Tato mezinárodní organizace sdružuje 36 ekonomicky rozvinutých zemí. OECD monitoruje spotřebu léčiv ve 26 zemích poskytujících informace o definované denní dávce na tisíc obyvatel za den. Tyto informace mohou poskytovat hrubý odhad podílu sledované populace léčené denně konkrétní skupinou farmaceutik. Dle dostupných informací

(viz Obr. 2.3) od OECD z roku 2017 patří České republice třetí místo ve spotřebě léčiv (data z roku 2018 a 2019 nejsou uvedena nebo neposkytují komplexní informace). [12] [13]



Obr. 2.3: Přehled zemí a jejich spotřeba léčiv dle dostupných informací od OECD v roce 2017 (DDD/1000/d – definovaná denní dávka na 1000 obyvatel na den).

2.4 Monitoring léčiv

Léčiva pocházející z různých zdrojů jsou jedním z největších kontaminantů životního prostředí. V současné době jsou ve výzkumných i kontrolních laboratořích vyvíjeny nové a účinnější metody sledování výskytu farmak v životním prostředí. Z publikovaných studií vyplývá, že mezi hlavní zdroje kontaminace environmentálního prostředí patří nemocniční zařízení, individuální konzumace volně prodejných léčiv a v neposlední řadě také odtoky z čistíren odpadních vod (ČOV), na kterých, bohužel, neprobíhá dostatečná zadrž a degradace léčiv a jejich metabolitů. Následující studie poskytují přehled nejčastěji se vyskytujících léčiv v monitorovaných vodních zdrojích.

2.4.1 Monitoring léčiv v České republice

V roce 2014 a 2015 byla v České republice provedena studie stanovující 31 léčiv, v které byla sledována účinnost přírodních ČOV. Studie uvádí, že ve všech vzorcích přítékající odpadní vody byla nalezena léčiva: ibuprofen, diklofenak, metoprolol, furosemid, hydrochlorothiazid, paracetamol a kofein. V 75 % vzorků byla nalezena léčiva klaritromycin, gabapentin, ketoprofen, triklosan, triklokarban, warfarin a tramadol. V rámci přečištění dosáhl nejvyšší účinnosti v odstranění paracetamol (91 %), kofein (84 %) a furosemid (75 %). Naopak nejnižší účinnost odstranění byla zjištěna pro gabapentin (14 %). [14]

V roce 2019 byl v České republice a na Slovensku proveden monitoring 29 psychoaktivních drog a léčiv v odpadních vodách. Výsledkem pozorování byly vyšší koncentrace léčiv kotininu, tramadolu, metamfetaminu a venlafaxinu. Omezená účinnost odstranění (maximální účinnost 30 %) na ČOV byla sledovaná u tramadolu, venlafaxinu, oxazepamu a citalopramu. Na rozdíl od České republiky byl na Slovensku zjištěn výskyt rezistentních koliformních bakterií a stafylokoků. [15]

Další studie z roku 2017 sledovala přítomnost pěti nejčastěji užívaných nesteroidních protizánětlivých léčiv ve vodních zdrojích na 29 místech České republiky. Nejčastěji a v nejvyšších koncentracích se vyskytoval ibuprofen (3210 ng L^{-1}), následovaný naproxenem (1424 ng L^{-1}), diklofenakem (1080 ng L^{-1}) a ketoprofenem ($929,8 \text{ ng L}^{-1}$). Na několika místech byl detekován také indomethacin s maximální koncentrací ($69,3 \text{ ng L}^{-1}$). Na místech s nižším průtokem vody byla koncentrace všech stanovovaných léčiv vyšší, s výjimkou ibuprofenu. [16]

2.4.2 Monitoring léčiv v Evropě

V rámci monitoringu provedeného ve Španělsku v roce 2017 byla sledována kontaminace odpadních vod. Ve všech testovaných vzorcích byl detekován 4-aminoantipyrin (metabolit analgetického metamizolu) s průměrnou koncentrací $27 \mu\text{g L}^{-1}$, β -blokátory atenolol, 4-formylaminoantipyrin (metabolit metamizolu), diatrizoová kyselina (jodované rentgenové kontrastní médium), diuretický hydrochlorothiazid a antibiotikum ofloxacin. Ve 40 % odpadních vod byl nalezen paracetamol s průměrnou koncentrací $7,8 \mu\text{g L}^{-1}$. [17] Studie prováděná v roce 2015 na

území východního Španělska a severní Itálie sledovala léčiva a drogy v odpadních a povrchových vodách. Celkově bylo detekováno 28 látek, nejčastěji se vyskytující byl irbesartan a valsartan, sloužící k léčbě vysokého krevního tlaku, antibiotikum ofloxacin a antiinfektikum sulfamethoxazol. [18] Ve třetí studii z roku 2016 byl nejčastěji detekované analgetikum ibuprofen, který byl nalezen v 17 z 20 vzorků povrchových vod a koncentrace dosahovala až $42 \mu\text{g L}^{-1}$. V menším množství vzorků byly nalezeny nižší koncentrace metabolitu kofeinu paraxantinu, paracetamolu a karbamazepinu. [19] Čtvrtá studie z roku 2017 sledovala odpadní vody a účinek ČOV na Kanárských ostrovech. Kofein byl nalezen ve všech vzorcích odebraných v různých místech ČOV v koncentracích $36,6 - 59,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Další léčiva, která byla detekována na vysokých koncentračních hladinách ($\mu\text{g L}^{-1}$) jsou ibuprofen, nikotin, paraxantin, metamizol, ciprofloxacin a gemfibrozil. Účinnost odstranění léčiv z odpadní vody u konvenční ČOV dosahovala 99,7 %, u přírodní vody 80 %. Karbamazepin, fluoxetin a ibuprofen však byly odstraněny pouze s účinností 40 %. [20] Další multiresiduální metoda stanovující léčiva byla aplikovaná na neošetřenou odpadní vodu odtékající ze zdravotnických zařízení v Barceloně v roce 2019. Byly také sledované domovy pro seniory. Nejčastěji detekovaná léčiva byla ibuprofen, aspirin (acetylsalicylová kyselina), makrogol, levofloxacin, cyklofosfamid, diklofenak, paracetamol, karbamazepin, levetiracetam, pregabalín, quetiapin, chlormetiazol, trazodon a kofein. [21]

Studie provedená v Římě v Itálii v roce 2014 sledovala účinnost odstranění léčiv na rostlinných ČOV. Nejvyšší perzistenci při odstraňování vykazoval karbamazepin, diklofenak, ibuprofen a gemfibrozil, kde koncentrace v přítoku byla o řád nižší než na odtoku ČOV. [22]

Odpadní vody testované v roce 2015 a 2016 ve Velké Británii obsahovaly vysoké koncentrace paracetamolu a paraxantinu (nad $100 \mu\text{g L}^{-1}$). V nižších koncentracích ($1 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$) se vyskytoval ibuprofen, metformin, naproxen, klaritromycin a cetirizin. Po průchodu ČOV byly, v porovnání s přítokem, zjištěny vyšší koncentrace metabolitů karbamazepinu a tramadolu. Ve vzorcích povrchové vody byly zjištěny nejvyšší koncentrace metforminu (sloužícímu k léčbě diabetu), antiinfektika sulfamethoxazolu, karbamazepinu, diazepam, temazepam a warfarinu. [23] [24]

V povrchových vodách z Řecka byly v roce 2014 nalezeny nejvyšší koncentrace salicylové kyseliny, kofeinu, ibuprofenu, diklofenaku a gemfibrozilu. [25] Odpadní vody obsahovaly karbamazepin, antiepileptika levetiracetam a valproovou kyselinu v koncentracích vyšších než $6 \mu\text{g L}^{-1}$. [26]

V odpadních vodách hlavního města Lotyšska byly pozorovány nejvyšší koncentrace centrálního nervového stimulantu kofeinu (až $12 \mu\text{g L}^{-1}$), analgetika paracetamolu ($4,2 \mu\text{g L}^{-1}$), antibiotika ciprofloxacinu ($0,4 \mu\text{g L}^{-1}$) a nesteroidního protizánětlivého léčiva ibuprofenu ($0,33 \mu\text{g L}^{-1}$). [27]

V Norsku byla v roce 2016 vyvinuta multiresiduální metoda pro stanovení 51 léčiv a psychoaktivních drog v odpadních vodách. V každém vzorku byly nalezeny relativně vysoké koncentrace léčiv, např. atenolol, paracetamol, metoprolol, propranolol, citalopram, karbamazepin a oxazepam, a psychoaktivních drog a jejich metabolitů jako jsou heroin a morfin. [28]

Multireziduální stanovení farmak proběhlo v roce 2018 také ve vzorcích povrchových vod ze šesti řek a jednoho jezera na území Slovinska. Ve všech vzorcích byly stanoveny tři analyty: kofein ($1,1 - 3,1 \text{ ng L}^{-1}$), irbesartan ($0,2 - 9,3 \text{ ng L}^{-1}$) a valsartan ($0,8 - 47 \text{ ng L}^{-1}$). [29]

Monitoring povrchových vod z roku 2016 ve Francii sledoval výskyt léčiv v řece Seině v Paříži. Celkově byly detekovány relativně vysoké koncentrace gabapentinu (182 ng L^{-1}), tramadolu ($62,6 \text{ ng L}^{-1}$), oxazepamu ($45,3 \text{ ng L}^{-1}$), diklofenaku (28 ng L^{-1}) a karbamazepinu (22 ng L^{-1}). [30]

Testování pitných a balených vod z roku 2016 v Portugalsku odhalilo přítomnost karbamazepinu, fluoxetinu, ibuprofenu a ketoprofenu. Koncentrace metabolitů salicylové kyseliny v balené vodě dosahovala $30,6 \text{ ng L}^{-1}$ a v pitné vodě $66,0 \text{ ng L}^{-1}$. V šesti analyzovaných vzorcích mořské vody byl nalezen paracetamol, ibuprofen, ketoprofen, metabolity salicylové kyseliny, fluoxetin, karbamazepin a sulfomethoxazol. Odpadní vody obsahovaly vysoké koncentrace paracetamolu ($615 \mu\text{g L}^{-1}$), naproxenu, ibuprofenu, karbamazepinu, salicylové kyseliny a jejich metabolitů. [31]

2.5 Analýza léčiv ve vzorcích pitných a odpadních vod

Vzhledem k relativně snadné dostupnosti LC-MS instrumentace ve státních i kontrolních laboratořích, je dnes sledování farmak ve vzorcích vod prováděno zejména metodou LC-MS. Využití této citlivé a přesné instrumentace umožňuje, v porovnání s jinými metodami, ověřit v relativně krátkém časovém úseku i velmi nízké hladiny různých typů farmak, a to v rámci jediného zpracování a nástřiku vzorku. [32]

2.5.1 Úprava vzorku před stanovením

Vzhledem k velmi nízkým hladinám cílových analytů a relativně široké variabilitě a komplexnosti analyzovaných matric vod, je často nutná úprava vzorku a zakoncentrování analytů před samotným LC-MS stanovením. Prvním krokem úpravy vzorků bývá nejčastěji odstranění tuhých částic matrice, které se provádí filtrací pomocí filtrů tvořených ze skleněných mikrovláken (1 nebo 0,7 mm), z nylonu (0,45 mm) nebo celulózy (0,45 mm). [33] K zabránění degradace farmak během přepravy a skladování jsou vzorky často okyselovány nebo se k nim přidává chelatační činidlo (ethyldiamintetraoctová kyselina, EDTA). [34] [31]

Nutno zmínit, že již v rámci uvedených přípravných kroků analýzy, bývá ke vzorkům přidávána směs izotopicky značených standardů cílových analytů, které slouží jak ke korekci potenciálních ztrát analytů v rámci přípravy vzorků před LC-MS stanovením, tak také korigují matričních efekty LC-MS stanovení.

2.5.2 Extrakce a přečištění vzorků před LC-MS analýzou

V závislosti na typu matrice analyzované vody (pitná, balená, kohoutková, užitková, povrchová, podzemní, odpadní) a citlivosti MS techniky, bývají vzorky vod různě přečišťovány, extrahovány a zakoncentrovány.

V některých případech analýzy čistých vod (pitná a balená voda) se s výhodou používá pouze metoda přímého nástřiku (DI, z anglického: *Direct Injection*). Vzorky vody tak nejsou nijak zpracovávány, přidá se pouze směs interních standardů, vzorek je přefiltrován přes mikrofiltr (např. PTFE filtry, poréznost 0,2 μm) do vialky a postoupen dále k LC-MS analýze. [17] [35]

Další specifická metoda, která se někdy používá i v analýze vod, je extrakční a přečišťovací metoda QuEChERS (zkratka z anglického: *quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe*), tzn. rychlá, bezpečná, levná, účinná, robustní a bezpečná. Metoda QuEChERS je vhodná pro analýzu léčiv, pesticidů, mykotoxinů a polycyklických aromatických uhlovodíků ve vodách i dalších komplexních maticích. [36] [37]

Univerzální technikou cílené izolace léčiv z vodných matic je extrakce analytů na pevné fázi (SPE, zkratka z anglického: *Solid Phase Extraction*). Jedná se o plastové kolonky naplněné specifickým sorbentem (princip vysvětlen níže). Mezi nejčastěji používané sorbenty patří polymerní sorbenty s obrácenými fázemi (např. Oasis HLB) a s iontově-výměnnými vlastnostmi (např. Strata XC, Oasis MCX). SPE přečištění se provádí manuálně pomocí podtlakového manifoldu, nebo za pomoci automatizovaného systému, který umožňuje online připojení k systému LC-MS. Tím je možné minimalizovat manipulaci, práci a čas, a tím zvýšit reprodukovatelnost stanovení. [33] V *Tab. 2.4* je uvedený přehled nejčastěji používaných metod přípravy vzorků vod pro stanovení léčiv zahrnutých v této diplomové práci a použité SPE kolonky.

Tab. 2.4: Přehled používaných metod přípravy vzorků vodných matic pro stanovení vybraných léčiv a použité SPE kolonky.

Studie	Matrice	SPE-kolonka	Ref.	Studie	Příprava vzorku	SPE kolonka	Ref.
1	SPE	Oasis HLB	[28]	16	SPE	SDB-RPS	[25]
2	SPE	Oasis HLB	[21]	17	SPE	Strata X	[22]
		(200 mg, 6 ml)		18	SPE	Oasis HLB	
3	SPE	(200 mg, 6ml)	[39]	19	SPE	Oasis HLB	[40]
		Oasis HLB				(500 mg, 6 ml)	
4	SPE	Strata X	[27]	20	SPE	Octadecyl C8/18	[41]
		(200 mg, 3 ml)				(500 mg, 3 ml)	
5	SPE	Oasis HLB	[42]	21	SPE	Oasis HLB	[43]
		(200 mg, 6 ml)				(200 mg, 6 ml)	
6	SPE	Strata X	[29]	22	SPE	Oasis HLB	[24]
		(60 mg, 3 ml)				(200 mg, 6 ml)	
7	SPE	Strata X	[31]	23	SPE	Oasis HLB	[44]
		(200 mg, 3 ml)				(sorbent 50 mg)	
8	SPE	Oasis HLB	[34]	24	DI	-	[35]
		(200 mg, 6 ml)					

Studie	Matrice	SPE-kolonka	Ref.	Studie	Příprava vzorku	SPE kolonka	Ref.
9	QuEChERS	-	[37]	25	SPE	Oasis MCX (60 mg, 3 ml)	[30]
10	DI	-	[17]	26	SPE	Oasis HLB (200 mg, 6 ml)	[45]
11	SPE	Strata XC (200 mg, 6 ml)	[26]	27	Online SPE	Shim-pack MAYI-ODS	[46]
12	SPE	Oasis HLB (60 mg, 3 ml)	[47]	28	SPE	Oasis HLB (500 mg, 6 ml)	[20]
13	SPE	Oasis MCX	[23]	29	SPE	HReX SPE	[48]
14	SPE	Strata X 33U (200 mg, 6 ml)	[49]	30	SPE	Oasis HLB Plus (225 mg)	[50]
15	SPE	Oasis HLB (200 mg, 6 ml)	[51]	31	SPE	Oasis HLB	[18]

2.5.2.1 Princip extrakce na pevné fázi (SPE)

Extrakce na pevné fázi (SPE) je jednou z nejčastěji používaných metod úpravy vzorků před chromatografickým stanovením cílových látek. SPE je určena k přečištění analyzované matrice a zakoncentrování stopových hladin analytů. Princip SPE je založen na navázání (selektivní interakci) a zadržení analytu na pevném sorbentu kolonek v závislosti na rozdílných afinitách dalších složek vzorku k danému sorbentu a následném vymytí analytu z kolonek pomocí malého množství elučního rozpouštědla. Pokud jsou analyty přítomné ve vzorku v nízkých koncentracích, používá se princip extrakce, kdy se analyty zachytí na sorbentu a nežádoucí složky matrice projdou se vzorkem do odpadu. V případě, že se ve vzorku nachází analyty o vysoké koncentraci, je možné použít extrakci založenou na adsorpci matričních složek na sorbent a stanovované analyty projdou sorbentem bez zadržení. Pro řízení selektivity a účinnosti extrakce je důležitý výběr správného rozpouštědla, pH a iontové síly vodného roztoku a chemická povaha povrchu sorbentu. SPE snižuje spotřebu organických rozpouštědel potřebných pro extrakci analytu, zároveň nabízí vysokou selektivitu, výtěžnost a reprodukovatelnost. [52] [53] Hlavními interakcemi podílející se na zadržování analytu na pevné fázi jsou polární, nepolární nebo iontově-výměnné interakce. Polární pevná fáze je nejčastěji založena na bázi silikagelu (oxidu křemičitého), florisilu (aktivovaného křemičitanu hořečnatého) nebo alumině (oxidu hlinitého), u kterých je adsorpce založena hlavně na vodíkových vazbách. Pro nepolární pevné fáze, využívající převážně van der Waasových interakcí, jsou používány převážně sorbenty ze silikagelu s chemicky vázanými alkylovými řetězci,

např. C₁₈, C₈ nebo fenyl. Iontově-výměnné interakce využívají sorbenty obsahující sulfonovou skupinu (katexy) nebo kvartérní aminy (anexy). [54] Často používané SPE kolonky jsou složené z polyethylenových fritových disků, které udržují sorbent v polypropylénovém válečku. Postup použití kolonky se skládá ze čtyř kroků. Prvním krokem je kondicionace, tzn. promytí a navlhčení sorbentu vhodným rozpouštědlem, které je složením a pH kompatibilní s rozpouštědlem vzorku. Tím je zajištěna reprodukovatelnost analytické metody. V druhém kroku prochází roztok vzorku kolonkou s cílem zadržet analyt, zatímco matriční složky a rozpouštědlo prochází skrz. Třetím krokem je promytí kolonky a odstranění složek, které nebyly zadrženy. Čtvrtým krokem je eluce, tzn. uvolnění zadržovaných analytů promytím kolonky malým množstvím rozpouštědla. [33]

2.6 Separace a detekce farmak metodu LC-MS

Propojení kapalinové chromatografie s různými typy hmotnostních detektorů (LC-MS) je v současnosti jednou z nejpoužívanějších metod pro analýzu různých typů léčiv v reálných vzorcích vod. U některých vzorků vod, jako jsou například odpadní vody, se jedná o analýzu velmi komplexních matic, které obsahují velké množství komponent rušících stanovení cílových analytů. Pokud nejsou látky odstraněny pomocí výše diskutovaných technik, je nutné použít separační techniky se specifickým detektorem. LC-MS instrumentace se používá k stanovení molekulové hmotnosti, identifikaci a kvantifikaci látek. [55] V Tab. 2.5 je uveden přehled LC-MS instrumentace použité pro analýzu léčiv v multireziduálních metodách v různých typech vod zahrnující analyty sledované v této diplomové práci.

Tab. 2.5: Přehled LC-kolon, průtoku mobilní fáze, objemu nastříkovaného vzorku, MS-detektoru a ionizační technik použitých ke stanovení vybraných léčiv ve vodních maticích. Parametr: A (matrice), B (LC-kolona), C (průtok mobilní fáze LC-kolonou v mL min⁻¹), D (objem nástřiku v μL), E (MS-detektor), F (ionizační technika).

	A	B	C	D	E	F	Ref.
1	odpadní voda	RP-UPLC Acquity HSS C ₁₈ (150 × 2,1 mm; 1,8 μm)	0,4	5	Xevo G2-S Q-TOF, Waters	ESI	[28]
2	odpadní voda	Luna C ₁₈ (150 × 2,00 mm; 5 μm)	0,4	10	Xevo TQS, Acquity Waters	ESI	[21]
3	mořská voda	Zorbax C ₁₈ (100 × 2,1 mm; 3,5 μm)	0,25	20	1100 series MSD Trap (Agilent)	ESI	[39]

	A	B	C	D	E	F	Ref.
4	odpadní voda	Kinetex C ₁₈ (100 × 2,1 mm; 2,6 μm)	0,2	5	Q-Orbitrap-HRMS	ESI	[27]
5	povrchová, podzemní voda	Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈ (75 × 4,6 mm; 3,5 μm)	0,6	10	LCQ Advantage Q-IT (Thermo Fisher Scientific)	ESI	[42]
6	povrchová voda	Poroshell EC-C ₁₈ (100 × 3,0 mm; 2,7 μm)	0,5-0,65	2	Agilent 6460 QqQ-MS	ESI	[29]
7	pitná, povrchová, odpadní voda	Cortecs UHPLC C ₁₈ (100 × 2,1 mm; 1,6 μm)	0,3	5	Nexera LC-QqQ-MS-8030	ESI	[31]
8	povrchová voda	XTerra MS C ₁₈ (30 × 2,1 mm; 3,5 μm)	0,4	5	Agilent 6540 Series Accurate QTOF-MS	ESI	[34]
9	pitná voda	Acquity BEH C ₁₈ (50 × 2,1 mm; 1,7 μm)	0,23	10	Xevo TQ MS, Waters	ESI	[37]
10	odpadní voda	ZORBAX Eclipse XDB C ₁₈ (50 × 4,6 mm; 1,8 μm)	0,4	10	QqLIT-MS/MS Agilent 1200, 5500 QTRAP analyser	ESI	[17]
11	odpadní voda	Kinetex PFP (50 × 2,1 mm; 1,7 μm)	0,1	10	TSQ Quantum Access Thermo Electron Corporation	ESI	[26]
12	pitná voda	Acquity BEH C ₁₈ (50 × 2,1 mm; 1,7 μm)	0,3	20	QqQ, Waters	ESI	[47]
13	odpadní, povrchová voda	Acquity BEH C ₁₈ (150 × 1,0 mm; 1,7 μm)	0,4	15	Xevo TQD, Waters	ESI	[23]
14	odpadní, povrchová voda	Kinetex XB-C ₁₈ (50 × 2,1 mm; 1,7 μm)	0,2	5	QqQ Agilent	ESI	[49]
15	odpadní voda	Hypersil Gold (150 × 2,1 mm; 3 μm)	-	10	QqQ-MS		[51]
16	povrchová voda	C ₁₈ (150 × 4,6 mm; 5 μm)	-	20	UV/VIS-ESI-MS	ESI	[25]
17	povrchová voda	Hypersil Gold (100 × 2,1 mm; 5 μm)	0,3	10	LCQ DECA XP MAX (Thermo Finnigan)	ESI	[22]
18	odpadní voda	C ₁₈ (25,0 × 0,46 cm; 5 μm)	-	5-15	Agilent 6460 series QqQ	ESI	[38]
19	odpadní voda	SunFire C ₁₈ (3,0 × 100 mm; 3,5 μm)	0,2	10	Variansystem 320-MS system (QqQ)	ESI	[40]
20	povrchová voda	Zorbax SB-C ₁₈ (75 × 4,6 mm; 3,5 μm)	0,5	-	QqQ 6210 (Agilent)	ESI	[41]
21	odpadní voda	Phenomenex Luna C ₁₈ (150 × 2,0 mm; 3 μm)	-	10	Orbitrap (LC-HRMS)	ESI	[43]
22	povrchová voda	SunFire C ₁₈ (150 × 2,1 mm; 3,5 μm)	0,2	20	Waters Quattro TQ	ESI	[24]
23	odpadní voda	Brownlee SPP-C ₁₈ (75 × 2,1 mm; 2,7 μm)	0,3	10	TOF/MS	ESI	[44]
24	odpadní voda	Acquity BEH C ₁₈ (100 × 2,1 mm; 1,7 μm)	0,3	5	Acquity waters MS	ESI	[35]
25	povrchová voda	Acquity BEH C ₁₈ (100 × 2,1 mm; 1,7 μm)	-	-	Xevo TQ-MS, Waters	ESI	[30]
26	odpadní voda	Symmetry C ₁₈ (50 × 2,1 mm; 3,5 μm)	0,3	20	QqQ Quattro Micro API MS	ESI	[45]
27	odpadní voda	ACE5 C ₁₈ -PFP (150 × 2,1 mm; 5,0 μm)	0,2	300	LC-MS-805, Shimadzu, Kyoto, Japan (QqQ)	ESI	[46]

	A	B	C	D	E	F	Ref.
28	odpadní voda	SunFire C ₁₈ (100 × 3,0 mm; 3,5 μm)	0,2	10	320-MS system QqQ	ESI	[20]
29	odpadní voda	Phenomenex Kinetex (100 × 4,6 mm; 2,6 μm)	0,4	-	Agilent 6410B QqQ	ESI	[48]
30	odpadní voda	InertSustain AQC ₁₈ (100 × 2,1 mm; 2,6 μm)	0,5	-	QqQ, 4000 QTRAP (SCIEX, USA)	ESI	[50]
31	odpadní, povrchová voda	Acquity BEH C ₁₈ (100 × 2,1 mm; 1,7 μm)	0,3	20	QTOF (hybrid quadrupole-orthogonal)	ESI	[18]

2.6.1 Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinová chromatografie využívá separace analyzovaných látek na základě rozdílných distribucí mezi dvě fáze. Pohyblivou (mobilní) fází je kapalina procházející kolonou, která je naplněna nepohyblivou (stacionární) fází. Stacionární fází ve formě sorbentu je tuhá látka nebo kapalina, která je ukotvena na tuhém nosiči. Separace látek může být založena na adsorpci, rozdělení na základě rozdílných rozpustností, iontové výměně, molekulovém síťovém efektu nebo specifických interakcích v afinitní chromatografii. Podle uspořádání stacionární fáze dělíme LC na planární (papírovou, tenkovrstvou) nebo sloupcovou (kolonovou, extrakční nebo vysokoúčinnou). [55]

Před analytickou kolonu, ve které probíhá separace analytů, je často zařazena předkolona nebo předkolonový filtr zabraňující kontaminaci a znečištění analytické kolony. Analytická kolona je nejčastěji vytvořena z nerezové oceli s vnitřním průměrem mezi 2 mm a 5 mm a délkou od 50 mm do 300 mm. Kolona je naplněna částicemi sorbentu o definovaném průměru a velikosti pórů, na kterých jsou navázané funkční skupiny. [56]

Dnes je nejrozšířenějším typem eluční chromatografie vysokoúčinná (nebo ultraúčinná) kapalinová chromatografie, která slouží k separaci a stanovení analytů v materiálech. HPLC/UHPLC se vyznačuje vysokou selektivitou, robustností a reprodukovatelností. [53]

HPLC rozlišujeme podle polaritý stacionární a mobilní fáze na chromatografii s normální (NP-HPLC) nebo reverzní fází (RP-HPLC). NP-HPLC využívá mobilní fází, která je nepolární nebo míň polární než fáze stacionární. Mobilní fáze je tvořena směsí organických rozpouštědel, jako je hexan nebo dichlormethan a stacionární fáze je tvořena nejčastěji silikagelem. Majoritní je technika RP-HPLC, využívající polární mobilní fází

a nepolární stacionární fázi. Mobilní fáze je obvykle složena z vodné složky (voda případně zředěný roztok báze, kyseliny či pufru) a z organické složky tvořené organickým rozpouštědlem, která je mísitelná s vodou (acetonitril nebo methanol). Nepolární stacionární fáze je nejčastěji tvořena nosičem s navázanými uhlíkatými řetězci (C_{18} a C_8). HPLC využívá stacionární fáze s velikostí částic od 2,3 do 10 μm , které zabezpečují dostatečný průtok. Konstantní tok mobilní fáze systémem HPLC zabezpečuje nejčastěji lineární nebo reciproční čerpadlo. [53]

Při distribuci látek na fázovém rozhraní tvořeném mobilní a stacionární fází dochází k neustálému ustalování rovnováhy. Dělní složek mezi dvě fáze popisuje distribuční konstanta K_D , která vyjadřuje poměr mezi koncentrací složky ve stacionární fázi (c_S) a v mobilní fázi (c_M). Látky s vyšší hodnotou distribuční konstanty jsou zadržovány ve stacionární fázi delší dobu a mají větší retenci. Pro účinnou separaci látek pomocí kapalinové chromatografie je důležitá rozdílná hodnota distribuční konstanty. Eluci látek ze stacionární fáze je možné provést isokratickou nebo gradientovou elucí. Isokratická eluce je eluce látek mobilní fází o konstantním složení, která se používá pro látky s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Gradientová eluce mobilní fází se zvyšující se eluční silou je využívána pro látky s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a výrazně zkracuje dobu eluce. Za kolonou následuje detektor zaznamenávající separované zóny analytů, které vycházejí z kolony. Detektor zaznamenává časovou závislost intenzity veličiny (signálu) do chromatogramu. [55]

UHPLC využívá stacionární fáze s částicemi menšími než 2 μm a tlak více než 100 MPa, což poskytuje výrazně větší účinnost, kratší dobu analýzy a úsporu rozpouštědla. UHPLC systémy musí být schopny pracovat za ultra-vysokých tlaků, které poskytují robustní čerpadla a dávkovací systémy. Dalšími požadavky jsou rychlé dávkovací cykly s přesným dávkováním velmi malých objemů, nejmenší možné zpoždění gradientu, vysoká frekvence sběru dat, minimální mimokolonové objemy a použití vhodné stacionární fáze s mechanickou stabilitou při vysokých tlacích. [55] [53]

2.6.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je specifická, citlivá a destruktivní instrumentální metoda, která na základně poměru hmotnosti a náboje (m/z) separuje ionty v plynné fázi, ve vakuu, a analyzuje jejich četnost. Podle typu látky, kterou analyzuje, rozlišujeme

atomovou a molekulovou hmotnostní spektrometrii. MS poskytuje kvalitativní a kvantitativní informace o sledovaných analytech, a to až v ultra-stopových množstvích. [53] [32]

Hmotnostní spektrometr je tvořen vakuovým systémem, iontovým zdrojem, hmotnostním analyzátozem a detektorem iontů. Ve spojení s kapalinovou chromatografií vzorek vstupuje do MS nejčastěji ve formě kapaliny, kde je v důsledku vakua nebo vysoké teploty část vzorku odpařena. Následuje iontový zdroj, kde dojde k ionizaci neutrální molekuly a následně se může ionizovaná molekula rozdělit na fragmentové ionty. Dostatečně těkavé a termostabilní látky jsou ionizované ve vakuu elektronovou nebo chemickou ionizací. Netěkavé vysokomolekulární látky jsou ionizovány desorpčně-ionizačními technikami za atmosférického tlaku. Jednou z nejrozšířenějších ionizačních technik používaných zejména ve spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je elektrosprej. Elektrosprej je založen na principu tvorby malých, silně nabitých kapek, vznikajících prouděním kapaliny tenkou kovovou kapilárou, která tvoří silné elektrostatické pole. Následně jsou analyty ionizovány odpařováním z kapičky pomocí proudícího inertního plynu. [32]

Kladné a záporné ionty jsou elektrostaticky urychlovány a putují do analyzátoru. Použitím vysokého vakua (až 10^{-5} Pa), hlavně v analyzátoru, se eliminuje výměna energie při vzájemných kolizích mezi částicemi a odchýlení iontů z dráhy letu. Analyzátor je založen na principu rozdělování urychlovaných iontů na základě různých kinetických energií podle velikosti náboje (podle zakřivení trajektorie). Hmotnostní analyzátozem používané v MS jsou: magnetický a elektrostatický sektorový analyzátozem, kvadrupólový analyzátozem, iontová past, průletový analyzátozem (TOF), iontová cyklotronová rezonance (ICR) a orbitrap. [32] [53]

V detektoru je energie dopadajících iontů přeměňována na elektrický signál, který zaznamenává počítač. Nejčastěji používanými detektory jsou elektronové násobiče, Faradayův detektor a plošné detektory. [53]

Tandemová hmotnostní spektrometrie zlepšuje parametry kvalitativní a kvantitativní analýzy pomocí vícenásobné fragmentace využitím sériového zapojení hmotnostních analyzátozem. V prvním hmotnostním analyzátozem jsou ionty z iontového zdroje separovány a do dalšího analyzátozem – kolizní cely, putují pouze prekurzorové ionty o

konkrétní hodnotě m/z . V kolizní cele probíhá samovolná fragmentace prekurzorových iontů nebo fragmentace za pomoci dodání energie za vzniku produktových iontů. Ve třetím analyzátoru jsou produktové ionty opět separovány podle hodnot m/z . [53]

2.7 Validace metody

Obecně vzato je validace postup ověření metody, který poskytuje objektivní důkaz, že s použitím vhodného analytického systému získáme výsledný produkt odpovídající stanovené specifikaci. Splněním validačních kritérií objektivně prokážeme kvalitu a vhodnost použití analytické metody pro daný účel analýzy a ověříme spolehlivost a reprodukovatelnost generovaných dat. Při validaci analytické metody je důležité správně nastavit akceptační kritéria jednotlivých validovaných parametrů a jednoznačně je definovat. [56]

2.7.1 Přesnost metody

Přesnost metody nám poskytuje informaci, jak těsná je shoda mezi výsledky měření a přijatými referenčními hodnotami. Chyba výsledku je definovaná jako rozdíl mezi zjištěnou hodnotou měření a hodnotou referenční. Přesnost metody lze vyjádřit jako výtěžnost postupu [% Rec], tzn. poměr nalezeného množství analytu ve vzorku po extrakci a množství analytu do vzorku přidaného [56]:

$$\text{Výtěžnost [\% Rec]} = 100 \cdot c_i / c_{\text{spike}}, \quad (2.1)$$

kde c_i je naměřený obsah analytu a c_{spike} je koncentrace s přidavkem analytů (úroveň obohacení vzorku).

2.7.2 Preciznost metody

Preciznost metody udává těsnost shody mezi výsledky zkoušek nezávislého měření provedeného při předem stanovených podmínkách. Míru přesnosti lze vyjádřit jako relativní směrodatnou odchylku výsledků zkoušek. Přesnost metody je možné vyjádřit jako opakovatelnost a reprodukovatelnost. [56]

Opakovatelnost metody je vyjádřena jako těsnost shody mezi výsledky nezávislých zkoušek, které byly získané za podmínek opakovatelnosti (opakované použití metody, materiálů a přístrojů stejným pracovníkem provedené v krátkém časovém rozsahu ve

stejně laboratoři). Opakovatelnost je vyjádřena jako hodnota RSD [%] pro každý analyt [56]:

$$RSD [\%] = SD/\bar{x} \cdot 100, \quad (2.2)$$

kde SD je výběrová směrodatná odchylka a \bar{x} je průměr naměřených koncentrací daného analytu na jedné koncentrační hladině.

Reprodukovatelnost metody se realizuje prostřednictvím mezilaboratorních testů a je vyjádřena jako těsnost shody mezi výsledky nezávislých zkoušek, které byly získané za podmínek reprodukovatelnosti (měření stejného vzorku a analytu za použití stejné metody provedena za jiných podmínek, např. pracovník, přístroj, místo a čas). [56]

2.7.3 Lineární a pracovní rozsah metody

Lineární rozsah lze definovat jako schopnost metody poskytovat lineární korelaci, v daném rozsahu, mezi odezvou detektoru a koncentrací stanovovaného analytu. Linearita zobrazuje přímou kalibrační závislost měřené veličiny (signálu) na nezávislé proměnné (koncentraci). Korelační koeficient (R) vyjadřuje těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných. [56]

Pracovní rozsah metody vyjadřuje validací ověřený uzavřený interval hodnot pro stanovovanou veličinu, který potvrzuje aplikovatelnost metody. Zdola je ohraničená mezí stanovitelnosti nebo nejnižším bodem kalibrace. [56]

2.7.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (limit detekce, LOD) vyjadřuje koncentraci, při které lze statisticky výrazně odlišit šum od signálu analytu. Mez detekce je vyjádřena jako koncentrace odpovídající násobku výběrové směrodatné odchylky (vyjádřena v ng mL^{-1}) [56]:

$$LOD = k \cdot SD, \quad (2.3)$$

kde SD je výběrová směrodatná odchylka, k je koeficient Studentova rozdělení pro $n-1$ počet opakování (hodnota $k = 3,747$; jednostranný test na hladině pravděpodobnosti 99 % pro 5 opakování).

Mez stanovitelnosti (limit kvantifikace, LOQ) vyjadřuje koncentraci, kdy dovoluje přesnost a správnost stanovení kvantitativní vyhodnocení. Mez stanovitelnosti je vyjádřena jako trojnásobek meze detekce (vyjádřena v ng mL^{-1}) [56]:

$$LOQ = 3 \cdot LOD, \quad (2.4)$$

2.7.5 Selektivita metody

Selektivita vyjadřuje schopnost metody (za definovaných podmínek) poskytovat kvalitativní a kvantitativní informaci o jednotlivých analytech v komplexní matici za přítomnosti možných interferujících látek. Testování selektivity se provádí porovnáním výsledků hodnot analytů standardních látek s výsledky měření sledovaných analytů v reálných maticích. Mírou selektivity je vliv matrice, který je vyjádřený kvantitativně. [56]

2.7.6 Robustnost metody

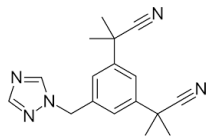
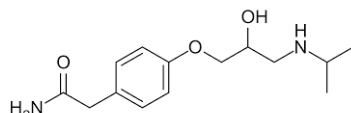
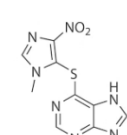
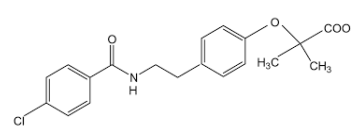
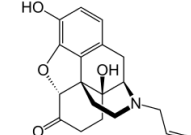
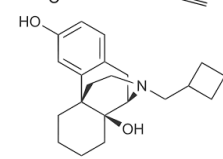
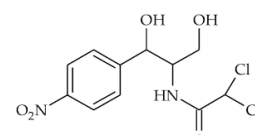
Robustnost metody poskytuje informaci, do jaké míry bude opakovaná metoda poskytovat shodné a správné výsledky při malých změnách experimentálních podmínek (např. mezilaboratorní zkoušky, změna koncentrace a doby extrakce). Testování robustnosti se nejčastěji provádí pomocí jednorozměrné analýzy postupnou změnou vždy jednoho parametru při zachování ostatních faktorů. [56]

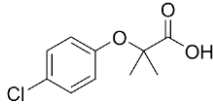
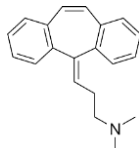
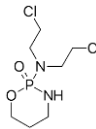
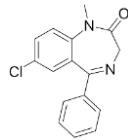
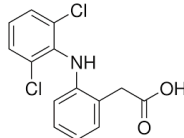
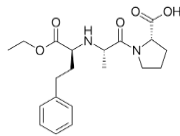
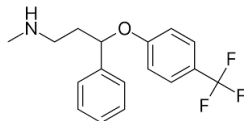
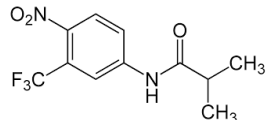
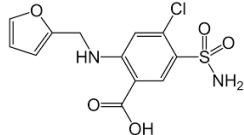
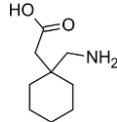
3 Experimentální část

3.1 Standardní látky

V níže uvedené *Tab. 3.1* je uveden seznam analytických standardů léčiv a v *Tab. 3.2* seznam izotopově značených standardů (ISTD) léčiv, které byly zahrnuty do validace LC-MS metody.

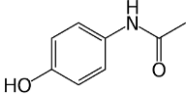
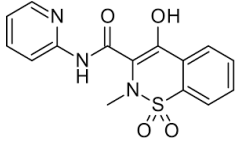
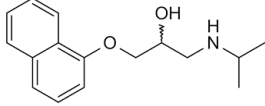
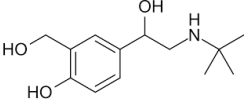
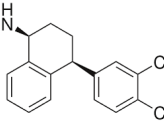
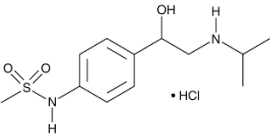
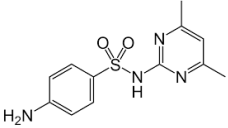
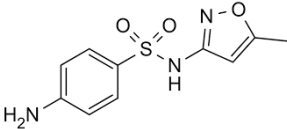
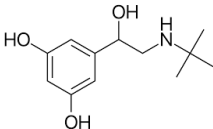
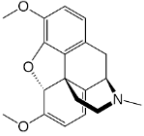
Tab. 3.1: Seznam analytických standardů léčiv zahrnutých do validace a jejich charakteristika – CAS číslo, sumární vzorec, relativní molekulová hmotnost a struktura.

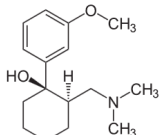
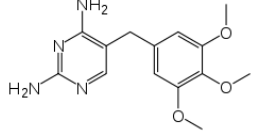
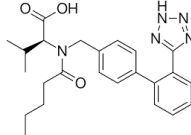
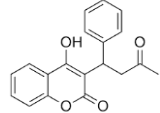
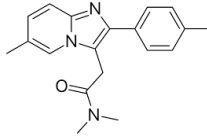
Analyt	CAS	Sumární vzorec (Relativní molekulová hmotnost)	Struktura
1 Anastrozol	120511-73-1	C ₁₇ H ₁₉ N ₅ (293,4)	
2 Atenolol	29122-68-7	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃ (266,3)	
3 Azathioprin	446-86-6	C ₉ H ₇ N ₇ O ₂ S (277,3)	
4 Bezafibrat	41859-67-0	C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄ (361,8)	
5 Buprenorfin	52485-79-7	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄ (467,6)	
6 Butorfanol	42408-82-2	C ₂₁ H ₂₉ NO ₂ (327,5)	
7 Citalopram	56-75-7	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅ (323,1)	

Analyt	CAS	Sumární vzorec (Relativní molekulová hmotnost)	Struktura	
8	Cyklobenzaprin	882-09-7	$C_{10}H_{11}ClO_3$ (214,7)	
9	Cyklofosfamid	303-53-7	$C_{20}H_{21}N$ (275,4)	
10	Diazepam	50-18-0	$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$ (261,1)	
11	Diklofenak	439-14-5	$C_{16}H_{13}ClN_2O$ (284,7)	
12	Enalapril	15307-86-5	$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ (296,2)	
13	Fluoxetin	75847-73-3	$C_{20}H_{28}N_2O_5$ (376,5)	
14	Flutamid	54910-89-3	$C_{17}H_{18}F_3NO$ (309,3)	
15	Furosemid	13311-84-7	$C_{11}H_{11}F_3N_2O_3$ (276,2)	
16	Gabapentin	54-31-9	$C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ (330,8)	
17	Gemfibrozil	60142-96-3	$C_9H_{17}NO_2$ (171,2)	

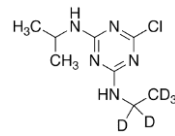
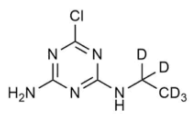
Analyt	CAS	Sumární vzorec (Relativní molekulová hmotnost)	Struktura
18 Hydrochlorothiazid	25812-30-0	C ₁₅ H ₂₂ O ₃ (250,3)	
19 Chloramfenikol	58-93-5	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂ (297,7)	
20 Ifosfamid	3778-73-2	C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P (261,1)	
21 Indomethacin	53-86-1	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄ (357,8)	
22 Iomeprol	78649-41-9	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₈ (777,1)	
23 Iopamidol	60166-93-0	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₈ (777,1)	
24 Iopromid	73334-07-3	C ₁₈ H ₂₄ I ₃ N ₃ O ₈ (791,1)	
25 Kapecitabin	154361-50-9	C ₁₅ H ₂₂ FN ₃ O ₆ (359,4)	
26 Karbamazepin	298-46-4	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O (236,3)	
27 Ketoprofen	22071-15-4	C ₁₆ H ₁₄ O ₃ (254,3)	

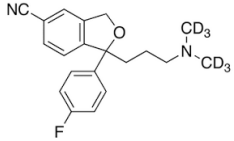
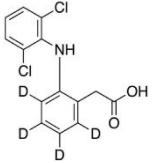
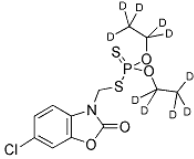
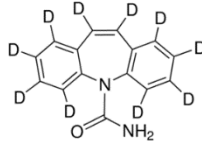
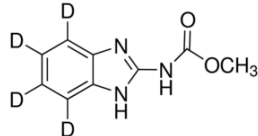
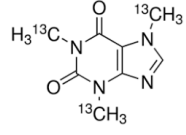
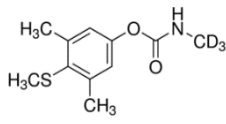
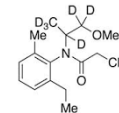
Analyt	CAS	Sumární vzorec (Relativní molekulová hmotnost)	Struktura	
28	Kofein	58-08-2	$C_8H_{10}N_4O_2$ (194,2)	
29	Kyselina klofibrová	59729-33-8	$C_{20}H_{21}FN_2O$ (324,4)	
30	Linkomycin	154-21-2	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$ (406,5)	
31	Loperamid	53179-11-6	$C_{29}H_{33}ClN_2O_2$ (477,0)	
32	Metoprolol	37350-58-6	$C_{15}H_{25}NO_3$ (267,4)	
33	Metronidazol	443-48-1	$C_6H_9N_3O_3$ (171,1)	
34	Mykofenolát Mofetil	115007-34-6	$C_{23}H_{31}NO_7$ (433,5)	
35	Naproxen	22204-53-1	$C_{14}H_{14}O_3$ (230,3)	
36	Oxazepam	604-75-1	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ (286,7)	
37	Paklitaxel	33069-62-4	$C_{47}H_{51}NO_{14}$ (853,9)	

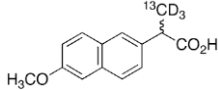
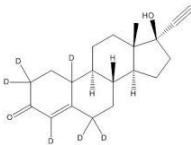
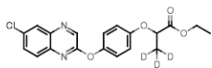
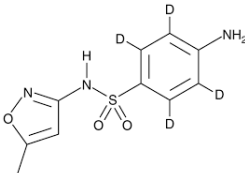
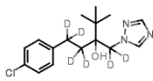
Analyt	CAS	Sumární vzorec (Relativní molekulová hmotnost)	Struktura
38 Paracetamol (Acetaminofen)	103-90-2	C ₈ H ₉ NO ₂ (151,2)	
39 Piroxicam	36322-90-4	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S (331,4)	
40 Propranolol	525-66-6	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂ (259,3)	
41 Salbutamol	18559-94-9	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃ (239,3)	
42 Sertralin	79617-96-2	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N (306,2)	
43 Sotalol	959-24-0	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S (272,4)	
44 Sulfamethazin	57-68-1	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S (278,3)	
45 Sulfamethoxazol	723-46-6	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S (253,3)	
46 Terbutalin	23031-25-6	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃ (225,3)	
47 Thebain	115-37-7	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃ (311,4)	

Analyt	CAS	Sumární vzorec (Relativní molekulová hmotnost)	Struktura	
48	Tramadol	27203-92-5	$C_{16}H_{25}NO_2$ (263,4)	
49	Trimethoprim	738-70-5	$C_{14}H_{18}N_4O_3$ (290,3)	
50	Valsartan	137862-53-4	$C_{24}H_{29}N_5O_3$ (435,5)	
51	Warfarin	81-81-2	$C_{19}H_{16}O_4$ (308,3)	
52	Zolpidem	82626-48-0	$C_{19}H_{21}N_3O$ (307,4)	

Tab. 3.2: Seznam ISTD léčiv zahrnutých do validace a jejich charakteristik – CAS číslo ISTD, sumární vzorec, relativní molekulová hmotnost a struktura.

Název	CAS	Sumární vzorec (Relativní molekulová hmotnost)	Struktura	
1	Atrazin D5	163165-75-1	$C_8H_{14}ClN_5$ (215,68)	
2	Atrazin-desisopropyl D5	1189961-78-1	$C_8H_{14}ClN_5$ (215,68)	

Sumární vzorec				
Název	CAS	(Relativní molekulová hmotnost)	Struktura	
3	Citalopram D6	1190003-26-9	$C_{20}H_{15}D_6FN_2O$ (330,43)	
4	Diklofenak D4	153466-65-0	$C_{14}H_7D_4Cl_2NO_2$ (300,17)	
5	Fosalon D10	-	$C_{12}H_5ClD_{10}NO_4PS_2$ (377,87)	
6	Karbamazepin D10	132183-78-9	$C_{15}D_{10}H_2N_2O$ (246,33)	
7	Karbendazim D4	291765-95-2	$C_9H_9N_3O_2$ (195,21)	
8	Kofein-13C	202282-98-2	$^{13}C_3C_5H_{10}N_4O_2$ (197,17)	
9	Methiokarb D3	1581694-94-1	$C_{11}D_3H_{12}NO_2S$ (228,33)	
10	Metolachlor D6	1219803-97-0	$C_{15}H_{16}D_6ClNO_2$ (289,83)	

		Sumární vzorec		
Název	CAS	(Relativní molekulová hmotnost)	Struktura	
11	Naproxen 13C D3	1216704-11-8	$C_{13}^{13}CH_{11}D_3O_3$ (234,27)	
12	Norethindron D6	-	$C_{20}H_{20}D_6O_2$ (304,46)	
13	Quizalofop D3	1398065-84-3	$C_{19}H_{14}D_3ClN_2O_4$ (375,82)	
14	Sulfamethoxazol D4	1020719-86-1	$C_{10}H_7D_4N_3O_3S$ (257,30)	
15	Tebukonazol D6	-	$C_{16}H_{16}ClN_3OD_6$ (313,86)	

3.2 Používané chemikálie

- Deionizovaná voda Milli-Q (MQ)
- Octová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo)
- Mravenčí kyselina, MS grade, 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Methanol, LC-MS grade, 99,95 % (Honeywell, USA)
- Acetonitril, LC-MS grade, 99,95 % (Honeywell, USA)

3.3 Přístroje a pomůcky

Laboratorní pomůcky a materiál

- Automatické pipety 10 – 10000 μ l (Brand, Německo)
- Kalibrované odměrné baňky 5 – 50 ml (Fisherbrand, Německo)
- Pomocné laboratorní sklo, odměrné válce, baňky a kádinky (Fisherbrand, Německo)
- Jednorázové 10ml plastové zkumavky (Sarstedt, Německo)
- Centrifugační zkumavky (Sarstedt, Německo)
- 2ml tmavé LC-MS vialky (12 x13 mm, amber, Chromservis)
- Krimpovací víčka na vialky (Red PTFE, White silica, Chromservis)
- Diskové celulozové filtry 0,20 μ m (Chromafil)
- Centrifuga (Hettich, Německo)
- Analytické váhy s váživostí 0,0001 g (Kern, Německo)
- Zařízení na úpravu vody Millipore Milli-Q (Merck, Německo)
- Další běžné laboratorní pomůcky

LC-MS instrumentace

- Kapalinový chromatograf UPLC I-class (Waters, USA)
- MS analyzátor XEVO TQ-S (Waters, USA)
- Chromatografická kolona Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μ m, 2,1 x 100 mm), (Waters, USA)
- Předkolonka Acquity UPLC BEH C₁₈ (1,7 μ m), (Waters, USA)

3.4 Výpočetní technika a software

- MassLynx (Waters, USA)
- TargetLynx (Waters, USA)

3.4.1 Parametry UHPLC–MS/MS analýzy

Původní verze UHPLC–MS/MS metody byla vyvinuta na projektovém oddělení ALS Czech Republic pracovníky ALS. Některé analyty ovšem vykazovaly špatnou chromatografickou separaci a nízké odezvy. Z tohoto důvodu byla v rámci této diplomové práce provedena optimalizace nastavení LC separační metody, se zaměřením

na složení mobilní fáze. V Tab. 3.3 – 3.6 jsou uvedené optimalizované parametry UHPLC–MS/MS metody.

Tab. 3.3: Parametry kapalinového chromatografu.

Název metody	Leciva_DirectInjection
Chromatografická kolona	Acquity UPLC BEH C ₁₈ (2,1 x 100 mm, velikost částic 1,7 µm)
Čas analýzy	9 min
Mobilní fáze	Gradientová eluce: (viz Tab. 3.4) A: 0,01% HCOOH v Milli-Q vodě B: 100% MeOH (LC-MS grade)
Průtok mobilní fáze	0,4 mL min ⁻¹
Teplota kolony	40 °C
Teplota autosampleru	10 °C
Nástřikový objem	50 µl

Tab. 3.4: Časové rozložení gradientové eluce.

Čas [min]	A (%)	B (%)	Gradientová
0,00	98	2	-
0,50	98	2	6
5,00	5	95	6
5,10	0	100	6
7,00	0	100	6
7,10	98	2	6
9,00	98	2	6

Tab. 3.5: Parametry a nastavení MS detektoru.

Název metody	PHALMS05_FINAL
Iontový zdroj	ESI+, ESI-
Napětí kolony	0,75 kV
Napětí kapiláry	Individuální dle analytu (viz Tab. 3.6)

Teplota zdroje	150 °C
Teplota desolvatace	600 °C
Průtok plynu – desolvatace	800 L hod ⁻¹
Průtok plynu – kóna	150 L hod ⁻¹
Nebulizér	7,0 bar
Kolizní průtok plyn	0,19 mL min ⁻¹
MRM okno	0,4 min

Tab. 3.6: Parametry MS/MS metody pro stanovení léčiv (MRM přechody analytů, kolizní energie a retenční čas analytů) – tučně označené přechody jsou použity jako kvantifikační (* označení prekurzorových iontů obsahujících 2 izotopy atomů chlóru).

Analyt	Ionizace	Prekurzor (m/z)	Produktové ionty (m/z)	Napětí na kóně (V)	Kolizní energie (V)	Retenční čas (tr)
Anastrozol	ESI+	294,1	225,0 /114,8	30	20/52	4,24
Atenolol	ESI+	267,0	145,0 /190,0	30	23/16	2,56
Azathioprin	ESI+	278,0	141,8 /232,0	30	11/13	2,92
Bezafibrat	ESI+	362,0	139,0 /121,0	30	25/29	4,70
Buprenorfin	ESI+	468,3	396,1 /414,2	30	39/32	3,83
Butorfanol	ESI+	328,0	124,0 /282,0	30	26/29	3,47
Citalopram	ESI+	332,1	288,1 /231,1	30	18/40	2,95
Cyklobenzaprin	ESI-	213,0	127,0 /85,0	30	15/11	4,59
Cyklofosfamid	ESI+	276,0	216,0 /231,0	30	24/16	3,93
Diazepam	ESI+	261,0	140,0 /106,0	30	22/18	3,70
Diklofenak	ESI+	285,0	154,0 /193,0	30	26/30	4,94
Enalapril	ESI-	294,0/296,0*	250,0 /252,0	30	11/11	5,21
Fluoxetin	ESI+	377,1	234,0 /91,0	30	20/55	3,66

Analyt	Ionizace	Prekurzor (m/z)	Produktové ionty (m/z)	Napětí na kóně (V)	Kolizní energie (V)	Retenční čas (tr)
Flutamid	ESI+	310,1	148,0/44,0	30	8/7	4,05
Furosemid	ESI-	275,0	202,0/205,0	30	23/22	5,09
Gabapentin	ESI-	329,0	205,0/285,0	30	22/14	4,06
Gemfibrozil	ESI+	172,2	154,3/137,3	25	15/18	2,72
Hydrochlorothiazid	ESI-	249,0	121,0/127,0	30	15/10	5,47
Chloramfenikol	ESI-	296,0	269,0/205,0	30	19/22	2,88
Ifosfamid	ESI-	321,0	152,1/257,1	30	18/12	3,73
Indomethacin	ESI+	261,0	92,0/154,0	30	25/21	3,64
Iomeprol	ESI+	358,0	139,0/174,0	30	22/11	5,20
Iopamidol	ESI+	822,1	804,1/603,1	30	20/27	2,41
Iopromid	ESI+	777,8	405,0/531,8	30	38/30	2,46
Kapcitabin	ESI+	360,0	173,8/244,0	30	19/10	3,94
Karbamazepin	ESI+	237,0	194,0/179,0	35	20/35	4,16
Ketoprofen	ESI+	777,8	387,0/313,8	30	39/52	1,93
Kofein	ESI+	195,0	138,0/110,0	30	17/23	2,89
Kyselina klofibrová	ESI+	325,2	109,0/262,2	30	24/19	3,72
Linkomycin	ESI+	791,8	300,0/572,8	30	56/23	2,65
Loperamid	ESI+	255,1	209,0/105,0	30	15/23	4,67
Metoprolol	ESI+	407,0	126,0/359,0	35	20/18	2,83
Metronidazol	ESI+	477,2	210,1/266,1	30	45/12	4,29
Mykofenolát Mofetil	ESI+	268,2	116,0/72,0	30	18/22	3,25

Analyt	Ionizace	Prekurzor (m/z)	Produktové ionty (m/z)	Napětí na kóně (V)	Kolizní energie (V)	Retenční čas (tr)
Naproxen	ESI+	172,0	128,0/82,0	30	15/21	2,71
Oxazepam	ESI+	434,0	114,0/195,0	30	24/33	3,82
Paklitaxel	ESI+	231,0	185,0/170,0	30	14/29	4,63
Paracetamol (Acetaminofen)	ESI+	287,0	241,0/269,0	30	23/15	4,30
Piroxicam	ESI+	876,4	308,1/591,3	30	27/23	5,08
Propranolol	ESI+	152,0	110,0/65,0	30	15/30	2,68
Salbutamol	ESI+	332,0	95,0/121,0	30	18/25	4,33
Sertralin	ESI+	260,0	116,0/183,0	30	16/16	3,65
Sotalol	ESI+	240,0	148,0/166,0	30	20/12	2,52
Sulfamethazin	ESI+	306,0	159,0/275,0	30	23/11	4,04
Sulfamethoxazol	ESI+	273,0	133,0/213,0	30	27/17	2,52
Terbutalin	ESI+	279,0	124,0/186,0	30	20/18	3,26
Thebain	ESI+	254,0	156,0/92,0	30	16/26	3,58
Tramadol	ESI+	226,1	152,0/107,0	30	16/26	2,47
Trimethoprim	ESI+	312,0	58,0/266,0	30	30/40	3,29
Valsartan	ESI+	264,0	58,0/246,0	30	15/10	3,26
Warfarin	ESI+	291,0	230,0/123,0	39	24/27	2,90
Zolpidem	ESI+	436,0	207,0/235,0	30	28/22	4,72
Anastrozol	ESI+	309,0	163,0/251,0	30	14/22	4,91
Atenolol	ESI+	308,0	235,0/263,0	30	33/27	3,44
Atrazin D5	ESI+	221,0/223,0*	179,0/181,0	35	18/18	4,53

Analyt	Ionizace	Prekurzor (m/z)	Produktové ionty (m/z)	Napětí na kóně (V)	Kolizní energie (V)	Retenční čas (tr)
Atrazin-desisopropyl D5	ESI+	179,0	101,0/137,0	35	18/16	3,10
Ciprofloxacin D8	ESI+	340,1	296,1/235,1	30	18/30	2,95
Citalopram D6	ESI+	331,3	109,1/262,2	30	26/19	3,78
Diklofenak D4	ESI-	298,0/300,0*	254,0/256,0	30	12/12	5,20
Fosalon D10	ESI+	378,0	182,0/111,0	35	16/38	5,77
Iohexol D5	ESI+	827,2	809,1/608,1	30	21/26	2,41
Karbamazepin D10	ESI+	247,0	204,0/201,0	30	21/22	4,14
Karbendazim D4	ESI+	196,0	164,0/136,0	35	20/28	2,90
Kofein-13C	ESI+	198,0	140,0/112,0	30	19/22	2,89
Methiokarb D3	ESI+	229,0	169,0/121,0	30	19/17	4,96
Metolachlor D6	ESI+	290,0	258,0/182,0	35	16/25	5,39
Naproxen 13C D3	ESI+	235,0	189,0/170,0	30	15/25	4,62
Noreethindron D6	ESI+	305,3	113,0/237,2	30	30/21	4,71
Quizalofop D3	ESI+	348,0	302,0/244,0	35	18/31	5,07
Sulfamethoxazol D4	ESI+	258,0	160,0/96,0	30	16/26	3,57
Tebukonazol D6	ESI+	314,0	71,8/124,8	30	21/38	5,24

3.5 Ředění standardů, příprava kalibračních a pracovních roztoků

3.5.1 Příprava a ředění analytických standardů

Standardy léčiv a izotopově značené interní standardy (ISTD) byly dodány v roztoku acetonitrilu nebo methanolu o koncentraci 10 µg mL⁻¹, 100 µg mL⁻¹ a 1000 µg mL⁻¹, nebo jako pevná látka. Z těchto základních roztoků byl ředěn směsný zásobní roztok analytů a ISTD o koncentraci 100 ng mL⁻¹.

Zásobní roztok standardů o koncentraci 10 ng mL^{-1} byl připraven ředěním zásobního roztoku 100 ng mL^{-1} do acetonitrilu nebo methanolu. Používal se pro přípravu spiků a kalibrační řady standardů.

Zásobní roztok ISTD o koncentraci 10 ng mL^{-1} byl připraven ze zásobního roztoku ISTD 100 ng mL^{-1} o objemu 10 mL do acetonitrilu nebo methanolu a byl použitý k přípravě slepých pokusů (blanků), vzorků, kalibrační řady standardů a spiků.

3.5.2 Příprava kalibrační řady

Kalibrační řada byla připravena v rozmezí $0,0025 - 1,00 \text{ ng mL}^{-1}$ dle *Tab. 3.7*. Kalibrační body byly připraveny ze zásobních roztoků standardů a ISTD o koncentraci 10 ng mL^{-1} . Jednotlivé kalibrační body byly připraveny přidáním příslušného objemu zásobních standardů do vialek a ty byly doplněny příslušným objemem MQ vody do objemu $1,0$ a $1,5 \text{ mL}$ pomocí automatické pipety.

Tab. 3.7: Postup přípravy kalibrační řady, koncentrace kalibračních bodů, odebírané objemy zásobních roztoků a finální objemy jednotlivých kalibračních bodů.

Kalibrační úroveň	Odebraný objem zásobního standardu [μL]	Koncentrace kalibračního bodu [ng mL^{-1}]	Konečný objem [mL]
STD 10	150 (roztok standardů – $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$)	1,00	1,50
	150 (roztok ISTD – $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$)		
STD 9	50 (roztok standardů – $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$)	0,50	1,00
	50 (roztok ISTD – $10,0 \text{ ng mL}^{-1}$)		
STD 8	250 (STD 10 – $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$)	0,25	1,00
STD 7	100 (STD 10 – $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$)	0,10	1,00
STD 6	75 (STD 10 – $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$)	0,075	1,00
STD 5	50 (STD 10 – $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$)	0,050	1,00
STD 4	25 (STD 10 – $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$)	0,025	1,00
STD 3	100 (STD 7 – $0,10 \text{ ng mL}^{-1}$)	0,010	1,00
STD 2	50 (STD 7 – $0,10 \text{ ng mL}^{-1}$)	0,0050	1,00
STD 1	25 (STD 7 – $0,10 \text{ ng mL}^{-1}$)	0,0025	1,00

3.6 Validace metody

Validace metody byla provedena na reálných vzorcích pitných a odpadních vod.

3.6.1 Příprava slepých vzorků

Do plastové centrifugační kyvety bylo kalibrovanou automatickou pipetou odměřeno 10 ml vzorku vody (pitná voda nebo odpadní voda). V případě odpadních vod byl vzorek odstředěn na odstředivce (5 min, 10 000 RPM). Vzorek odpadní vody byl připraven v původním neředěném stavu (v originálu), ten byl potom naředěný 10-krát a 100-krát. Do vzorků vod byl pak přidán roztok ISTD o koncentraci 10 ng mL⁻¹ pro vytvoření dvou koncentračních hladin – 0,01 ng mL⁻¹ a 0,1 ng mL⁻¹, odebráním příslušného objemu ze zásobního roztoku standardů (*Tab. 3.8*). Vzorky testovaných matric byly připraveny ve třech opakováních pro každou koncentrační úroveň. Vzorek byl následně protřepán v ruce. Vzorek byl dále přefiltrován přes 0,20 µm diskové celulosové filtry. V průběhu filtrace vzorku bylo prvních 6 mL vzorku zfiltrováno do odpadu a následný alikvotní podíl vzorku (cca 1 mL) byl přefiltrován do tmavé 2 ml vialky určené k LC-MS analýze.

3.6.2 Příprava laboratorních kontrolních vzorků (LCS)

Do plastové centrifugační kyvety bylo kalibrovanou automatickou pipetou odměřeno 10 ml MQ vody. Pro správné provedení analýzy bylo do odměřeného objemu MQ vody přidáno nejdříve množství přídavku zásobního roztoku standardů (spike) o koncentraci 10 ng mL⁻¹, vzorek byl řádně protřepán a teprve poté byl přidán i spike zásobního roztoku ISTD o koncentraci 10 ng mL⁻¹. LCS vzorky byly připraveny na dvou koncentračních hladinách 0,01 ng mL⁻¹ a 0,1 ng mL⁻¹ (dle *Tab. 3.8*) a byly dále přefiltrovány přes 0,20 µm diskové celulosové filtry. V průběhu filtrace vzorku bylo prvních 6 mL vzorku zfiltrováno do odpadu a následný alikvotní podíl vzorku (cca 1 ml) byl přefiltrován do tmavé 2mL vialky určené k LC-MS analýze.

3.6.3 Příprava fortifikovaných matric pro validaci

Vzorky byly připraveny pomocí reálných vzorků vod dle postupu uvedeného výše. Stejně jako u přípravy LCS vzorků, byly do vzorků vod přidány roztoky ISTD a zásobní roztok analytů na určitých koncentračních hladinách. Spikování vzorků vod (10 mL) bylo v rámci validace provedeno na dvou koncentračních hladinách, 0,01 ng mL⁻¹ a 0,1 ng mL⁻¹, a to odebráním příslušného objemu ze zásobního roztoku standardů

(Tab. 3.8). Vzorčky testovaných matic byly připraveny v pěti opakováních pro každou koncentrační úroveň.

Tab. 3.8: Příprava laboratorních kontrolních vzorků a fortifikovaných matic.

Testovaná úroveň	Spikovací roztok [ng mL ⁻¹]	Spikované množství [μL]	Výsledná koncentrace [ng mL ⁻¹]
L1	10,0	10,0	0,01
L2	10,0	100,0	0,10

3.7 Monitoring léčiv v odpadních vodách

Sledování analytů léčiv bylo prováděno na komerčních vzorcích doručených do laboratoře ALS Czech Republic. Vzorčky odpadních vody byly odebrány z čistíren odpadních vod na území ČR, kde byla sledovaná koncentrace analytů léčiv ve vodách před vstupem do čistírny a odtoků z čistírny. Vzorčky vody byly komerčně zaslané na analýzu, z toho důvodu nebylo možné uvádět přesnou polohu místa odběru.

3.7.1 Příprava reálných vzorků pro monitoring

Do plastové centrifugační kyvety bylo kalibrovanou automatickou pipetou odměřeno 10 mL vzorku vody (pitná voda) a přidáno 100 μL roztoku ISTD o koncentraci 10 ng mL⁻¹. V případě odpadních vod se vzorek nechal odstředit na odstředivce (5 min, 10 000 RPM). Vzorek odpadní vody byl připraven v originálu, naředěný 10-krát a 100-krát. Do každého, tedy i naředěného vzorku, bylo přidáno 100 μL roztoku ISTD o koncentraci 10 ng mL⁻¹. Vzorek byl následně protřepán v ruce. Vzorek byl dále přefiltrován přes 0,20 μm diskové celulosové filtry. V průběhu filtrace vzorku bylo prvních 6 mL vzorku zfiltrováno do odpadu a následný alikvotní podíl vzorku (cca 1 mL) byl přefiltrován do tmavé 2mL vialky určené k LC-MS analýze.

4 Výsledky a diskuze

Diplomová práce byla realizována v laboratoři ALS Czech Republic v Praze. V roce 2019 byla validačními specialisty vyvinuta metoda pro stanovení léčiv v pitných, povrchových a podzemních vodách. Validovaná metoda slouží pro stanovení 52 léčiv, které byly vyselektovány dle poptávky zákazníků a publikovaných studií zabývajících se screeningem vod. Vzhledem k problematice stanovení některých analytů byly v rámci této diplomové práce navrženy a otestovány určité optimalizační kroky, týkající se především složení mobilní fáze, které by mohly vést ke zlepšení separace a odezvy těchto analytů (více v kapitole 4.1). Původní metoda zároveň nebyla validována pro stanovení léčiv v odpadních vodách. Z důvodu optimalizace a změny mobilní fáze byla provedena zkrácená validace původní metody na matricích pitných vod a dále validace odpadních vod.

4.1 Optimalizace podmínek – výběr vhodné mobilní fáze

Optimalizace složení mobilní fáze bylo prováděno za účelem zlepšení tvaru píků jednotlivých analytů (viz *Tab. 4.1*). Píky 16 analytů (atenolol, buprenorfin, butorfanol, citalopram, cyklobenzaprin, enalapril, gabapentin, loperamid, metoprolol, mykofenolát mofetil, propranolol, setralin, thebain, trimethoprim, tramadol a zolpidem) byly deformovány a vykazovaly chvostování. Chvostující píky mohly být způsobeny příliš vysokou nástřikovou koncentrací, nekompatibilním rozpouštědlem vzorku s mobilní fází, kontaminovanou nebo degradovanou kolonou, ale taky je to běžný jev při separaci bazických látek na reverzních fázích za použití kolony naplněné C₈ nebo C₁₈.

Vysoká nástřiková koncentrace byla vyloučena z důvodu chvostování píku i při nízkých nástřikových koncentracích a menších nástřikových objemech.

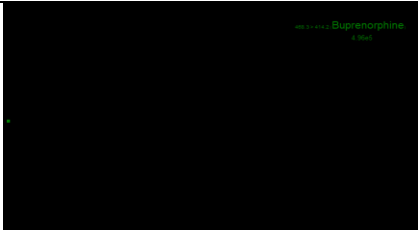
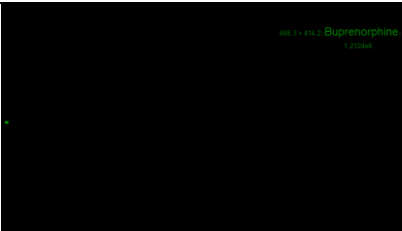
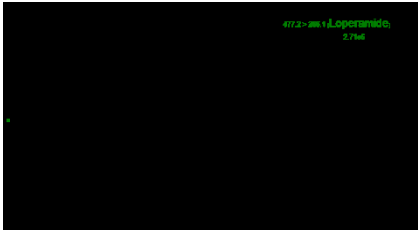
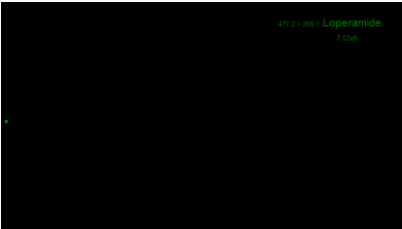
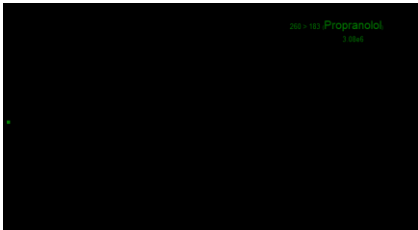
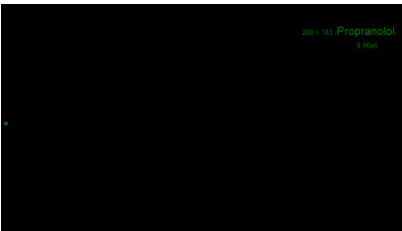
Nekompatibilita rozpouštědla vzorku s mobilní fází byla také vyloučena z důvodu přímého nástřiku vodného vzorku za použití mobilní fáze s vysokým obsahem vody na začátku gradientu.

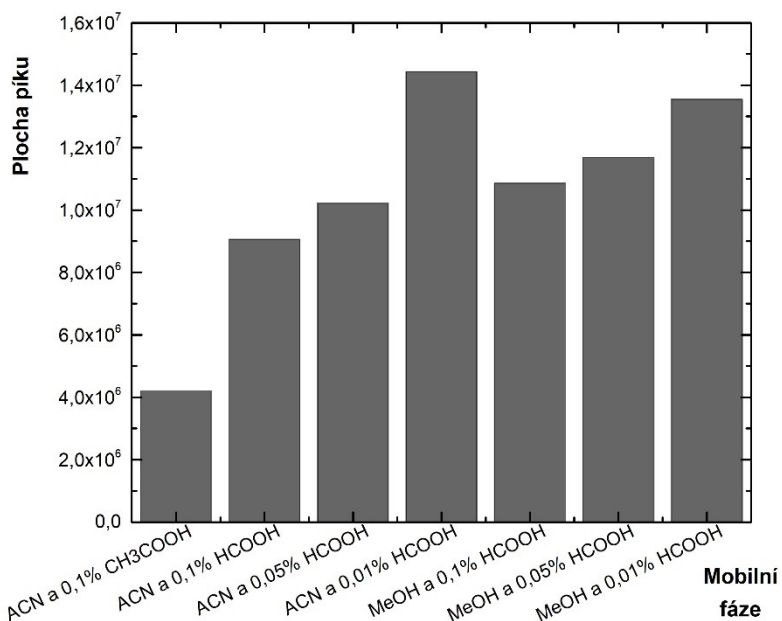
Kontaminace kolony byla nepravděpodobná z důvodu měření kontrolních slepých vzorků, které byly vždy negativní. Kolona použitá k validaci byla relativně nová a používána pouze pro separaci dané multireziduální metody.

Testování různého složení mobilní fáze bylo prováděno měřením stejného fortifikovaného blanku rozpouštědla s přidavkem standardu analytů na hladině 0,1 ng L⁻¹ v 5 opakováních pro každou mobilní fázi. Z dostupné literatury bylo vybráno 7 nejčastěji používaných mobilních fází. [44]

Nejlepších výsledků (plochy píků, viz *Obr. 4.1*) bylo dosaženo při použití 0,01% kyseliny mravenčí v kombinaci s organickým rozpouštědlem methanolem nebo acetonitrilem. Původní mobilní fáze s přítomností 0,01% mravenčí kyseliny s acetonitrilem způsobovala chvostování píků 16 analytů, proto byla zvolena mobilní fáze o složení 0,01% mravenčí kyselina s methanolem.

Tab. 4.1: Ukázka změny tvaru píku jednotlivých analytů po optimalizaci mobilní fáze.

Analyt	Mobilní fáze	
	0,01% HCOOH/acetonitril	0,01% HCOOH/methanol
Buprenorfn		
Loperamid		
Propranolol		



Obr. 4.1: Graf závislosti porovnání součtu ploch píků všech analytů na složení mobilní fáze. (Plocha píků je vyjádřena v jednotkách CPS, z anglického: Counts per Second)

4.2 Validace

Optimalizovaná UHPLC–MS/MS metoda byla validována pro stanovení 52 látek v pitných a odpadních vodách. Jako referenční matrice validace byla použita MQ voda. Všechny tři matrice, které byly do validace zahrnuty, byly validovány na dvou koncentračních hladinách ($0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ a $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$), které byly připraveny v pěti opakováních. Validace metody byla provedena s cílem zjištění základních validačních charakteristik, tedy: přesnosti, preciznosti, linearity, pracovního rozsahu, meze detekce, meze kvantifikace, selektivity a robustnosti. Cílové analyty byly kvantifikovány metodou vnějšího standardu, a to pomocí izotopově značených standardů (dále jen ISTD) léčiv. ISTD byly k fortifikovaným matricím i analyzovaným vzorkům přidány na hladině $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Korekce výtěžnosti analytů a matričních efektů byla provedena přepočtem na výtěžnost přiřazeného ISTD (viz Tab. 4.2 A a B). Vzhledem k tomu, že ne pro každý analyt zařazený do metody existuje komerčně dostupný ISTD, laboratorní praxe ukázala, že je možné přesně odpovídající izotopově značený analog nahradit jiným ISTD, a to na základě podobnosti struktury molekuly, podobnosti retenčního času a podobnosti

výtěžností analytů a ISTD v jednotlivých maticích. ISTD byly ke každému cílovému analytu přiřazeny především na základě odpovídajícího chování v testovaných maticích.

V *Tab. 4.2 A* je uvedený seznam ISTD a cílových analytů tak, jak byly na základě validace jednotlivých matic k sobě přiřazeny a dále používány pro kvantifikaci léčiv v reálných vzorcích. V *Tab. 4.2 B* jsou uvedeny výtěžnosti ISTD vypočtené jako poměr zjištěné koncentrace ISTD ve fortifikovaném vzorku k přijaté referenční hodnotě (množství přidaného ISTD). Výtěžnost jednotlivých analytů byla provedena na pěti fortifikovaných maticích MQ vody a pěti fortifikovaných vzorcích pitné a odpadní vody na dvou koncentračních hladinách ($0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ a $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$).

Tab. 4.2 A: Seznam ISTD a přiřazených analytů v MQ, pitných a odpadních maticích.

ISTD – MQ, pitné vody	Analyt	ISTD – odpadní vody	Analyt
Atrazin D5	Anastrozol	Atrazin D5	Anastrozol
	Bezafibrat		Bezafibrat
	Cyklofosfamid		Cyklofosfamid
	Diazepam		Diazepam
	Enalapril		Enalapril
	Flutamid		Indomethacin
	Indomethacin		Kapecitabin
	Kapecitabin		Oxazepam
	Oxazepam		Piroxicam
	Piroxicam		Sulfamethazin
Atrazin-desisopropyl D5	Sulfamethazin	Atrazin-desisopropyl D5	Iopamidol
	Linkomycin		Paracetamol
Atrazin-desisopropyl D5	Paracetamol	Kofein-13C	Ketoprofen
	Kofein-13C		Kofein
Kofein-13C	Iopamidol	Karbamazepin D10	Buprenorfin
	Iopromid		Cyklobenzaprin
Karbamazepin D10	Kofein		Iopromid
	Fluoxetin		Karbamazepin
	Karbamazepin		Valsartan
Karbamazepin D10	Valsartan	Karbendazim D4	Flutamid
	Karbendazim D4		Azathioprin

ISTD – MQ, pitné vody	Analyt	ISTD – odpadní vody	Analyt	
Karbendazim D4	Cyklobenzaprin	Karbendazim D4	Gabapentin	
	Gabapentin		Hydrochlorothiazid	
	Chloramfenikol		Chloramfenikol	
	Ifosfamid		Thebain	
	Metronidazol		Citalopram D6	Atenolol
	Trimethoprim			Azathioprin
	Zolpidem			Butorphanol
Citalopram D6	Atenolol	Citalopram D6	Citalopram	
	Buprenorfin		Diklofenak	
	Butorfanol		Furosemid	
	Citalopram		Iomeprol	
	Iomeprol		Kyselina klofibrová	
	Loperamid		Loperamid	
	Metoprolol		Salbutamol	
	Salbutamol		Sotalol	
	Sotalol		Terbutalin	
	Terbutalin		Diklofenak D4	Tramadol
	Thebain			Trimethoprim
	Tramadol			Zolpidem
	Diklofenak D4		Diklofenak	Methiokarb D3
Metolachlor D6	Gemfibrozil	Metolachlor D6	Gemfibrozil	
Naproxen 13C D3	Naproxen	Naproxen 13C D3	Naproxen	
Noreethindron D6	Kyselina klofibrová	Noreethindron D6	Paklitaxel	
	Paklitaxel		Propranolol	
	Propranolol		Sertralin	
	Sertralin		Quizalofop D3	
Fosalon D10	Furosemid	Sulfamethoxazol D4	Fluoxetin	
	Ketoprofen		Sulfamethoxazol	
Sulfamethoxazol D4	Mykofenolát Mofetil	Tebukonazol D6	Ifosfamide	
	Sulfamethoxazol		Linkomycin	
Tebukonazol D6	Hydrochlorothiazid		Mycofenolát Mofetil	
	Warfarin		Warfarin	

Tab. 4.2 B: Přehled výtěžnosti ISTD v MQ, pitné a odpadní vodě (L1 – úroveň obohacení vzorku na koncentrační hladinu 0,01 ng mL⁻¹, L2 – úroveň obohacení vzorku na koncentrační hladinu 0,1 ng mL⁻¹).

Analyt	Výtěžnost [%]					
	MQ voda		Pitná voda		Odpadní voda	
	L1	L2	L1	L2	L1	L2
Atrazin D5	95,6	91,9	94,4	95,3	87,8	82,1
Atrazin-desisopropyl D5	97,8	95,9	94,9	96,3	88,1	73,2
Citalopram D6	136,6	116,9	100,2	97,2	77,9	66,6
Diklofenak D4	87,6	80,0	n. d.	85,4	n. d.	40,5
Karbamazepin D10	97,6	95,9	98,7	98,6	115,1	101,4
Karbendazim D4	94,1	92,0	96,9	97,7	61,7	60,4
Kofein-13C	96,4	99,1	95,1	95,3	120,9	83,7
Methiokarb D3	116,4	73,6	n. d.	63,1	38,4	65,6
Metolachlor D6	97,2	93,5	96,1	95,7	79,9	74,0
Naproxen 13C D3	120,7	80,6	144,2	94,1	126,3	73,8
Noreethindron D6	90,4	77,8	109,2	95,9	99,7	78,3
Fosalon D10	90,3	84,3	83,7	83,4	14,6	13,5
Quizalofop D3	103,8	77,4	125,1	95,6	107,5	80,5
Sulfamethoxazol D4	97,3	97,0	95,7	95,5	104,0	80,9
Tebukonazol D6	98,3	93,3	96,2	93,3	98,3	89,5

4.2.1 Selektivita metody

Ověření selektivity LC-MS metody je provedeno sledováním 2 MRM přechodů každého analytu pomocí MS detekce v určitém retenčním čase daného analytu. Retenční čas a poměr MRM přechodů musí být v definovaném poměru zachován pro jednotlivé analyty ve standardu i ve vzorku a je monitorován vyhodnocovacím softwarem (MassLynx, Waters) v rámci integrace kvantifikačních a konfirmačních píků jednotlivých cílových analytů. Ověřením těchto dvou parametrů metoda splňuje požadavky na provádění analytických metod a interpretaci výsledků dle rozhodnutí Komise 2002/657/ES [57]. V průběhu validace nebyly v testovaných maticích pozorovány žádné nežádoucí interference, které by vedly ke zpochybnění selektivity metody.

4.2.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly určovány současně s ověřením správnosti a přesnosti metody analýzou pěti fortifikovaných matričních blanků MQ vody a pěti fortifikovaných vzorků pitné a odpadní vody na dvou koncentračních hladinách ($0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ a $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$). Princip výpočtu obou limitů je uveden v kapitole 2.7.4. Hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v *Tab. 4.3 A* pro MQ a pitnou vodu a v *Tab. 4.3 B* pro odpadní vodu.

Při vzájemném porovnání LOD a LOQ pro celou skupinu analytů byly relativně vyšší limity ($> 0,01 \text{ ng L}^{-1}$) získány např. pro analyt cyklobenzaprin, fluoxetin, iomeprol kofein, paklitaxel nebo sertralin. Vzhledem k tomu, že pro léčiva nejsou (zatím) stanoveny legislativně přípustné hygienické limity, nejsou tedy definovány ani maximální možné přípustné limity stanovení. Kromě látek uvedených výše byly pro ostatní látky získány nízké detekční limity, které vyhovují rutinnímu stanovení v prostředí komerčních laboratoří.

Tab. 4.3 A: Přehled hodnot limitů detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé analyty v MQ a pitné vodě.

Analyt	Průměr [ng L⁻¹]	SD [ng L⁻¹]	LOD [ng L⁻¹]	LOQ [ng L⁻¹]
Anastrozol	9,57	0,26	0,96	2,89
Atenolol	11,47	0,88	3,30	9,89
Azathioprin	9,87	0,48	1,80	5,39
Bezafibrat	8,88	0,86	3,22	9,66
Buprenorfin	12,04	0,40	1,51	4,52
Butorfanol	11,92	1,12	4,21	12,62
Citalopram	13,39	1,37	5,14	15,41
Cyklobenzaprin	67,31	7,70	28,85	86,56
Cyklofosfamid	9,26	0,56	2,10	6,30
Diazepam	9,79	0,19	0,72	2,16
Diklofenak	8,12	2,27	8,50	25,49
Enalapril	9,89	0,46	1,71	5,14

Analyt	Průměr [ng L⁻¹]	SD [ng L⁻¹]	LOD [ng L⁻¹]	LOQ [ng L⁻¹]
Fluoxetin	93,57	17,08	64,00	192,01
Flutamid	8,69	0,55	2,05	6,16
Furosemid	8,14	1,47	5,49	16,48
Gabapentin	88,59	2,97	11,14	33,41
Gemfibrozil	10,59	1,05	3,92	11,75
Hydrochlorothiazid	8,44	1,38	5,18	15,54
Chloramfenikol	11,42	1,39	5,19	15,58
Ifosamid	10,02	0,62	2,31	6,93
Indomethacin	8,44	0,70	2,62	7,85
Iomeprol	157,95	25,87	96,93	290,78
Iopamidol	9,96	0,92	3,46	10,38
Iopromid	8,13	1,09	4,10	12,30
Kapecitabin	88,04	17,02	63,78	191,35
Karbamazepin	9,54	0,36	1,36	4,07
Ketoprofen	7,79	0,58	2,18	6,55
Kofein	90,94	15,60	58,45	175,36
Kyselina klofibrová	66,05	12,59	47,19	141,55
Linkomycin	10,28	0,64	2,41	7,22
Loperamid	145,68	19,76	74,04	222,11
Metoprolol	11,55	0,90	3,36	10,09
Metronidazol	9,90	0,19	0,70	2,09
Mykofenolát Mofetil	8,10	1,50	5,62	16,86
Naproxen	79,33	6,37	23,87	71,60
Oxazepam	9,56	0,32	1,18	3,55
Paklitaxel	64,46	12,44	46,60	139,81
Paracetamol	9,25	1,20	4,49	13,48
Piroxicam	9,93	0,31	1,15	3,45
Propranolol	9,42	0,63	2,35	7,04
Salbutamol	11,96	0,94	3,50	10,51
Sertralin	73,65	14,35	53,78	161,34

Analyt	Průměr [ng L⁻¹]	SD [ng L⁻¹]	LOD [ng L⁻¹]	LOQ [ng L⁻¹]
Sotalol	10,97	0,81	3,03	9,09
Sulfamethazin	9,68	0,24	0,90	2,71
Sulfamethoxazol	9,46	0,55	2,05	6,14
Terbutalin	11,93	1,37	5,13	15,38
Thebain	11,92	1,38	5,18	15,55
Tramadol	11,54	1,09	4,08	12,24
Trimethoprim	8,04	1,19	4,47	13,40
Valsartan	9,09	1,27	4,77	14,31
Warfarin	8,04	0,51	1,92	5,75
Zolpidem	9,29	0,68	2,55	7,64

Tab. 4.3 B: Přehled hodnot limitů detekce a stanovitelnosti pro jednotlivé analyty v odpadní vodě.

Analyt	Průměr [ng L⁻¹]	SD [ng L⁻¹]	LOD [ng L⁻¹]	LOQ [ng L⁻¹]
Anastrozol	8,52	0,12	0,456	1,37
Atenolol	5,03	0,61	2,29	6,85
Azathioprin	7,37	0,53	1,99	5,98
Bezafibrat	8,14	0,27	0,99	2,98
Buprenorfin	11,86	1,00	3,75	11,25
Butorfanol	6,68	0,36	1,34	4,03
Citalopram	7,42	0,10	0,38	1,14
Cyklobenzaprin	99,33	4,32	16,19	48,56
Cyklofosamid	10,17	0,62	2,31	6,92
Diazepam	9,81	0,11	0,42	1,27
Diklofenak	20,18	3,67	13,77	41,30
Enalapril	8,80	0,38	1,41	4,22
Fluoxetin	80,93	2,94	11,00	33,00
Flutamid	4,43	0,20	0,76	2,29
Furosemid	34,06	4,66	17,45	52,36

Analyt	Průměr [ng L⁻¹]	SD [ng L⁻¹]	LOD [ng L⁻¹]	LOQ [ng L⁻¹]
Gabapentin	432,50	4,73	17,72	53,15
Gemfibrozil	2,65	0,53	1,98	5,94
Hydrochlorothiazid	46,21	3,64	13,62	40,86
Chloramfenikol	4,45	0,51	1,91	5,73
Ifosfamid	9,98	0,59	2,20	6,60
Indomethacin	8,03	0,38	1,44	4,31
Iomeprol	548,52	5,66	21,21	63,64
Iopamidol	9,41	1,61	6,04	18,13
Iopromid	28,66	5,20	19,49	58,47
Kapцитabin	153,59	10,92	40,92	122,77
Karbamazepin	23,27	0,21	0,78	2,33
Ketoprofen	29,85	1,14	4,26	12,77
Kofein	744,37	22,31	83,59	250,77
Kyselina klofibrová	26,71	5,33	19,96	59,87
Linkomycin	7,63	0,25	0,94	2,81
Loperamid	128,29	1,84	6,88	20,63
Metoprolol	11,30	0,35	1,30	3,91
Metronidazol	3,40	0,21	0,80	2,38
Mykofenolát Mofetil	9,69	1,18	4,42	13,24
Naproxen	67,95	9,02	33,79	101,36
Oxazepam	8,38	0,28	1,04	3,11
Paklitaxel	66,95	13,03	48,81	146,43
Paracetamol	19,97	0,88	3,30	9,90
Piroxicam	8,56	0,13	0,48	1,45
Propranolol	8,20	0,36	1,33	4,00
Salbutamol	8,07	0,27	1,00	3,00
Sertralin	66,28	4,45	16,69	50,06
Sotalol	18,45	0,28	1,04	3,10
Sulfamethazin	9,34	0,32	1,21	3,62
Sulfamethoxazol	10,99	0,47	1,75	5,24

Analyt	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	LOD [ng L ⁻¹]	LOQ [ng L ⁻¹]
Terbutalin	2,51	0,18	0,66	1,97
Thebain	6,49	0,63	2,37	7,12
Tramadol	18,52	0,46	1,71	5,14
Trimethoprim	6,81	0,29	1,08	3,25
Valsartan	21,36	1,37	5,15	15,44
Warfarin	9,67	0,15	0,58	1,73
Zolpidem	7,13	0,12	0,45	1,35

4.2.3 Lineární a pracovní rozsah metody

Lineární a s tím i pracovní rozsah metody byl testován pomocí směsných roztoků standardů léčiv na deseti koncentračních hladinách v rozsahu 0,0025 – 1,00 ng mL⁻¹. V uvedeném koncentračním rozsahu většina analytů vykazovala nelineární závislost, a proto byla pro všechny analyty a vyhodnocování zvolena polynomická závislost 2. řádu. Pro vzorky pitné a odpadní vody je lineární a pracovní rozsah metody uveden v *Tab. 4.4*. Koeficienty determinace jsou uvedeny tak, jak byly v uvedeném koncentračním rozsahu vyexportovány z vyhodnocovacího programu TargetLynx. V případě, že koncentrace analytů ve vzorcích vod přesáhne hladinu 1 ng mL⁻¹, je nutno vzorky vhodně naředit a znovu analyzovat. Většina testovaných analytů vykazovala hodnotu determinačního koeficientu > 0,999, výjimku představoval například analyt kofein, který díky nižší citlivosti a vyšším limitům detekce/stanovení má i užší lineární rozsah ve srovnání s ostatními analyty.

Tab. 4.4: Přehled lineárního rozsahu, hodnot koeficientu determinace (R^2) a pracovního rozsahu pro jednotlivé analyty v pitné a odpadní vodě.

Analyt	Lineární rozsah [ng L ⁻¹]	Koeficient determinace (R^2)	Pracovní rozsah pro pitné/odpadní vody [ng L ⁻¹]
Anastrozol	2,5 – 500	0,9998	5,0 – 500/2,5 – 500
Atenolol	2,5 – 500	0,9997	10,0 – 500/10,0 – 500
Azathioprin	2,5 – 500	0,9997	10,0 – 500/10,0 – 500

Analyt	Lineární rozsah [ng L⁻¹]	Koeficient determinace (R²)	Pracovní rozsah pro pitné/odpadní vody [ng L⁻¹]
Bezafibrat	2,5 – 1000	0,9999	10,0 – 1000/5,0 – 1000
Buprenorfin	2,5 – 1000	0,9994	5,0 – 1000/25,0 – 1000
Butorfanol	2,5 – 1000	0,9997	25,0 – 500/5,0 – 1000
Citalopram	2,5 – 1000	0,9993	25,0 – 1000/2,5 – 1000
Cyklobenzaprin	50,0 – 1000	0,9997	100,0 – 1000/50,0 – 1000
Cyklofosamid	2,5 – 1000	0,9999	10,0 – 1000/10,0 – 1000
Diazepam	2,5 – 1000	0,9999	2,5 – 1000/2,5 – 1000
Diklofenak	5,0 – 1000	0,9996	50,0 – 1000/75,0 – 1000
Enalapril	2,5 – 1000	0,9999	10,0 – 1000/5,0 – 1000
Fluoxetin	50,0 – 1000	0,9993	250,0 – 1000/50,0 – 1000
Flutamid	2,5 – 1000	0,9999	10,0 – 1000/2,5 – 1000
Furosemid	5,0 – 1000	0,9995	25,0 – 1000/75,0 – 1000
Gabapentin	50,0 – 1000	0,9997	50,0 – 1000/75,0 – 1000
Gemfibrozil	5,0 – 1000	0,9997	25,0 – 1000/10,0 – 1000
Hydrochlorothiazid	2,5 – 500	0,9997	25,0 – 500/50,0 – 500
Chloramfenikol	2,5 – 1000	0,9992	25,0 – 1000/10,0 – 1000
Ifosamid	2,5 – 1000	0,9999	10,0 – 1000/10,0 – 1000
Indomethacin	2,5 – 1000	0,9999	10,0 – 1000/5,0 – 500
Iomeprol	50,0 – 1000	0,9994	500,0 – 1000/75,0 – 1000
Iopamidol	2,5 – 1000	0,9991	25,0 – 1000/25,0 – 1000
Iopromid	2,5 – 500	0,9991	25,0 – 500/75,0 – 500
Kapcitabin	5,0 – 1000	0,9992	250,0 – 1000/250,0 – 1000
Karbamazepin	2,5 – 1000	1,0000	5,0 – 1000/2,5 – 1000
Ketoprofen	2,5 – 1000	0,9998	10,0 – 1000/25,0 – 1000
Kofein	50,0 – 1000	0,9988	250,0 – 1000/250,0 – 1000
Kyselina klofibrová	50,0 – 1000	0,9996	250,0 – 1000/75,0 – 1000
Linkomycin	2,5 – 1000	0,9999	10,0 – 1000/5,0 – 1000
Loperamid	50,0 – 1000	0,9997	250,0 – 1000/25,0 – 1000
Metoprolol	2,5 – 1000	0,9996	10,0 – 1000/5,0 – 1000

Analyt	Lineární rozsah [ng L⁻¹]	Koeficient determinace (R²)	Pracovní rozsah pro pitné/odpadní vody [ng L⁻¹]
Metronidazol	2,5 – 500	0,9999	2,5 – 500/2,5 – 500
Mykofenolát Mofetil	2,5 – 1000	0,9998	25,0 – 1000/25,0 – 1000
Naproxen	50,0 – 1000	0,9993	75,0 – 1000/100,0 – 1000
Oxazepam	2,5 – 1000	0,9999	5,0 – 1000/5,0 – 1000
Paklitaxel	5,0 – 1000	0,9995	250,0 – 1000/250,0 – 1000
Paracetamol	2,5 – 500	0,9998	25,0 – 500/10,0 – 500
Piroxicam	2,5 – 1000	1,0000	5,0 – 1000/2,5 – 1000
Propranolol	2,5 – 1000	0,9998	10,0 – 1000/5,0 – 1000
Salbutamol	2,5 – 500	0,9997	25,0 – 500/5,0 – 500
Sertralin	50,0 – 1000	0,9990	250,0 – 1000/75,0 – 1000
Sotalol	2,5 – 500	0,9996	10,0 – 500/5,0 – 500
Sulfamethazin	2,5 – 1000	0,9999	5,0 – 1000/5,0 – 1000
Sulfamethoxazol	2,5 – 1000	0,9999	10,0 – 1000/10,0 – 1000
Terbutalin	2,5 – 500	0,9997	25,0 – 500/2,5 – 500
Thebain	2,5 – 1000	0,9998	25,0 – 1000/10,0 – 1000
Tramadol	2,5 – 1000	0,9998	25,0 – 1000/10,0 – 1000
Trimethoprim	2,5 – 1000	0,9999	25,0 – 1000/5,0 – 1000
Valsartan	2,5 – 1000	0,9999	25,0 – 1000/25,0 – 1000
Warfarin	2,5 – 1000	0,9999	10,0 – 1000/2,5 – 1000
Zolpidem	2,5 – 500	0,9998	10,0 – 500/2,5 – 500

4.2.4 Přesnost metody

Preciznost metody (*Precision*) je vyjádřena pomocí opakovatelnosti stanovení jednotlivých analytů a je vypočítána jako relativní směrodatná odchylka stanovení (RSD) za podmínek opakovatelnosti. Opakovatelnost metody byla stanovena na základě LC-MS měření vždy pěti fortifikovaných blanků MQ vody, pitné vody a odpadní vody, na dvou koncentračních hladinách (0,01 ng mL⁻¹ a 0,1 ng mL⁻¹). Výsledky opakovatelnosti metody jsou vyjádřeny jako RSD (%) a jsou uvedeny v *Tab. 4.5 A, B a C*.

Ze získaných výsledků je patrné, že bez ohledu na testovanou matici, RSD (%) pro většinu analytů nepřekračuje hodnotu 20 % (splňuje tedy doporučení dokumentu SANTE/11945/2015 [58]). Vyšší hodnoty RSD byly nalezeny u analytů, které vykazovaly horší i další validační parametry, např. vyšší LOD/LOQ. Vyšší hodnoty RSD, tedy větší rozptyl stanovených výsledků, je pravděpodobně způsoben tím, že spikovací hladina 0,1 ng mL⁻¹ je pro tyto problematické analyty také velmi blízká jejich limitu stanovení (viz Tab. 4.3 A/B), a získaná data více kolísají.

Tab. 4.5 A: Souhrn výsledků opakovatelnosti vyjádřené jako RSD (%), průměr naměřených koncentrací daného analytu na jedné koncentrační hladině a směrodatná odchylka jednotlivých analytů v MQ vodě.

Analyt	MQ voda					
	L1 (0,01 ng mL ⁻¹)			L2 (0,1 ng mL ⁻¹)		
	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]
Anastrozol	9,57	0,26	2,69	94,09	2,56	2,72
Atenolol	11,47	0,88	7,67	113,00	4,05	3,58
Azathioprin	9,87	0,48	4,86	94,84	2,02	2,13
Bezafibrat	8,88	0,86	9,67	82,09	6,82	8,31
Buprenorfin	12,04	0,40	3,34	113,34	6,63	5,85
Butorfanol	11,92	1,12	9,42	115,00	7,19	6,25
Citalopram	13,39	1,37	10,23	112,12	5,22	4,66
Cyklobenzaprin	n.d.*	-	-	67,31	7,70	11,44
Cyklofosfamid	9,26	0,56	6,05	95,57	2,51	2,63
Diazepam	9,79	0,19	1,96	93,73	1,90	2,03
Diklofenak	n.d.*	-	-	77,64	10,55	13,59
Enalapril	9,89	0,46	4,62	98,87	1,53	1,55
Fluoxetin	n.d.*	-	-	93,57	17,08	18,26
Flutamid	8,69	0,55	6,31	80,21	9,53	11,88
Furosemid	8,14	1,47	18,00	68,79	11,83	17,20
Gabapentin	n.d.*	-	-	88,59	2,97	3,36
Gemfibrozil	10,59	1,05	9,88	90,92	5,25	5,77

Analyt	MQ voda					
	L1 (0,01 ng mL ⁻¹)			L2 (0,1 ng mL ⁻¹)		
	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]
Hydrochlorothiazid	n.d.*	-	-	97,86	6,27	6,41
Chloramfenikol	11,42	1,39	12,14	92,78	4,56	4,92
Ifosfamid	10,02	0,62	6,16	95,11	2,32	2,44
Indomethacin	8,44	0,70	8,28	73,56	8,58	11,66
Iomeprol	n.d.*	-	-	87,95	25,87	16,38
Iopamidol	9,96	0,92	9,26	103,09	0,92	0,89
Iopromid	8,13	1,09	13,46	105,72	5,11	4,83
Kapcitabin	n.d.*	-	-	88,04	17,02	19,34
Karbamazepin	9,54	0,36	3,80	95,47	1,75	1,83
Ketoprofen	7,79	0,58	7,48	76,60	7,72	10,07
Kofein	n.d.*	-	-	95,94	15,60	17,15
Kyselina klofibrová	n.d.*	-	-	66,05	12,59	19,07
Linkomycin	10,28	0,64	6,24	100,96	1,68	1,67
Loperamid	n.d.*	-	-	145,68	19,76	13,56
Metoprolol	11,55	0,90	7,77	103,46	2,72	2,63
Metronidazol	9,90	0,19	1,88	98,19	0,74	0,75
Mykofenolát Mofetil	8,10	1,50	18,52	86,08	4,92	5,72
Naproxen	n.d.*	-	-	79,33	6,37	8,03
Oxazepam	9,56	0,32	3,30	94,31	2,40	2,54
Paklitaxel	n.d.*	-	-	74,46	12,44	19,29
Paracetamol	9,25	1,20	12,96	92,01	1,32	1,43
Piroxicam	9,93	0,31	3,09	97,59	1,10	1,12
Propranolol	9,42	0,63	6,65	82,26	10,54	16,94
Salbutamol	11,96	0,93	7,81	113,13	3,82	3,38
Sertralin	n.d.*	-	-	73,65	14,35	19,49
Sotalol	10,97	0,81	7,37	107,08	3,48	3,25
Sulfamethazin	9,68	0,24	2,49	97,16	1,85	1,91
Sulfamethoxazol	9,46	0,55	5,78	97,58	1,44	1,48

Analyt	MQ voda					
	L1 (0,01 ng mL ⁻¹)			L2 (0,1 ng mL ⁻¹)		
	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]
Terbutalin	11,93	1,37	11,46	117,22	6,27	5,35
Thebain	11,92	1,38	11,61	106,99	5,53	5,17
Tramadol	11,54	1,09	9,44	105,59	3,67	3,48
Trimethoprim	8,04	1,19	14,81	77,05	8,88	11,52
Valsartan	9,09	1,27	14,00	82,81	7,58	9,15
Warfarin	8,04	0,51	6,36	80,45	3,35	4,16
Zolpidem	9,29	0,68	7,32	88,92	4,02	4,52

n.d. - limit detekce analytu je vyšší než nižší koncentrační hladina spiku L1 = 0,01 µg L⁻¹*

Tab. 4.5 B: Souhrn výsledků opakovatelnosti vyjádřené jako RSD (%), průměr naměřených koncentrací daného analytu na jedné koncentrační hladině a směrodatná odchylka jednotlivých analytů v pitné vodě.

Analyt	Pitná voda					
	L1 (0,01 ng mL ⁻¹)			L2 (0,1 ng mL ⁻¹)		
	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]
Anastrozol	9,47	0,35	3,66	94,30	1,65	1,75
Atenolol	10,75	0,48	4,43	101,98	1,67	1,64
Azathioprin	9,39	0,38	4,09	91,88	2,35	2,56
Bezafibrat	8,27	0,79	9,57	91,29	6,00	6,57
Buprenorfin	8,93	1,03	11,53	90,03	5,83	6,48
Butorfanol	9,47	0,32	3,36	94,51	0,99	1,05
Citalopram	9,71	0,65	6,65	96,71	4,37	4,52
Cyklobenzaprin	n.d.*	-	-	113,73	2,64	2,32
Cyklofosfamid	9,11	0,51	5,61	95,43	1,84	1,92
Diazepam	9,48	0,18	1,91	96,55	1,13	1,17
Diklofenak	n.d.*	-	-	82,51	6,30	7,63

Analyt	Pitná voda					
	L1 (0,01 ng mL ⁻¹)			L2 (0,1 ng mL ⁻¹)		
	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]
Enalapril	10,87	0,22	2,03	112,76	1,24	1,10
Fluoxetin	n.d.*	-	-	117,24	4,19	3,58
Flutamid	8,09	0,99	12,18	85,38	6,96	8,15
Furosemid	9,42	0,93	9,90	78,48	9,72	12,39
Gabapentin	n.d.*	-	-	104,98	4,19	3,99
Gemfibrozil	8,86	1,54	17,37	89,48	5,16	5,77
Hydrochlorothiazid	n.d.*	-	-	101,70	8,25	8,11
Chloramfenikol	10,40	1,59	15,33	93,80	4,58	4,88
Ifosfamid	9,80	0,51	5,17	94,23	1,40	1,48
Indomethacin	8,01	1,00	12,43	84,73	6,74	7,96
Iomeprol	n.d.*	-	-	255,86*	45,18	17,66
Iopamidol	7,04	0,45	6,37	97,52	4,41	4,52
Iopromid	7,58	1,23	16,24	118,59	6,36	5,37
Kapecitabin	n.d.*	-	-	220,97*	15,88	7,19
Karbamazepin	10,01	0,30	3,01	95,98	0,96	1,00
Ketoprofen	8,74	0,34	3,87	89,44	4,37	4,89
Kofein	n.d.*	-	-	66,84	5,50	8,24
Kyselina klofibrová	n.d.*	-	-	72,59	9,94	13,69
Linkomycin	9,66	0,27	2,82	98,26	2,10	2,13
Loperamid	n.d.*	-	-	134,31*	1,98	1,48
Metoprolol	9,56	0,74	7,69	97,64	2,62	2,69
Metronidazol	9,28	0,16	1,70	96,58	0,72	0,74
Mykofenolát Mofetil	9,19	0,95	10,34	88,63	3,86	4,35
Naproxen	n.d.*	-	-	88,65	9,70	10,94
Oxazepam	9,18	0,54	5,93	94,50	2,08	2,20
Paklitaxel	n.d.*	-	-	73,22	7,83	10,69
Paracetamol	9,44	0,70	7,45	99,41	5,00	5,03
Piroxicam	9,28	0,38	4,11	96,09	3,29	3,43

Analyt	Pitná voda					
	L1 (0,01 ng mL ⁻¹)			L2 (0,1 ng mL ⁻¹)		
	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]
Propranolol	9,69	0,68	7,01	99,35	3,50	3,52
Salbutamol	10,04	0,12	1,21	104,25	2,20	2,11
Sertralin	n.d.*	-	-	116,22	1,66	1,43
Sotalol	9,64	0,28	2,93	99,98	1,47	1,47
Sulfamethazin	9,75	0,42	4,34	94,80	1,19	1,25
Sulfamethoxazol	9,48	0,42	4,42	93,47	1,69	1,81
Terbutalin	9,32	0,39	4,18	99,91	2,00	2,00
Thebain	9,19	0,73	7,94	87,18	4,11	4,72
Tramadol	9,40	0,60	6,40	92,89	3,24	3,49
Trimethoprim	8,96	0,51	5,65	92,89	3,78	4,07
Valsartan	7,95	1,06	13,36	94,91	6,68	7,04
Warfarin	9,25	0,68	7,34	89,21	2,20	2,46
Zolpidem	9,03	0,35	3,93	94,05	1,36	1,45

n.d. - limit detekce analytu je vyšší než nižší koncentrační hladina spiků L1 = 0,01 µg L⁻¹*

** Dané analyty byly v surových validačních vzorcích stanoveny na hladinách, které mnohonásobně převyšovaly hladinu fortifikace. Pro tyto analyty byly hodnoty RSD (%) počítány z koncentrací stanovených opakovanou analýzou spiků.*

Tab. 4.5 C: Souhrn výsledků opakovatelnosti vyjádřené jako RSD (%), průměr naměřených koncentrací daného analytu na jedné koncentrační hladině a směrodatná odchylka jednotlivých analytů v odpadní vodě.

Analyt	Odpadní voda					
	L1 (0,01 ng mL ⁻¹)			L2 (0,1 ng mL ⁻¹)		
	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]
Anastrozol	8,52	0,12	1,43	81,00	1,91	2,36
Atenolol	5,03	0,61	12,11	30,53	0,97	3,16
Azathioprin	7,37	0,53	7,21	64,64	2,35	3,64

Analyt	Odpadní voda					
	L1 (0,01 ng mL ⁻¹)			L2 (0,1 ng mL ⁻¹)		
	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]
Bezafibrat	8,14	0,26	3,25	71,90	5,85	8,13
Buprenorfin	11,86	1,00	8,44	99,54	3,28	3,29
Butorfanol	6,68	0,36	5,37	61,04	1,11	1,81
Citalopram	7,42	0,10	1,37	66,50	2,97	4,47
Cyklobenzaprin	n.d.*	-	-	99,33	4,32	4,35
Cyklofosfamid	10,17	0,62	6,05	94,52	2,41	2,55
Diazepam	9,81	0,11	1,15	92,16	2,10	2,28
Diklofenak	n.d.*	-	-	20,18	3,67	18,20
Enalapril	8,80	0,38	4,27	88,00	1,98	2,25
Fluoxetin	n.d.*	-	-	80,93	2,94	3,63
Flutamid	4,43	0,20	4,61	37,89	5,96	15,72
Furosemid	n.d.*	-	-	34,06	4,66	13,68
Gabapentin	n.d.*	-	-	475,92*	11,80	2,48
Gemfibrozil	n.d.*	-	-	2,65	0,53	19,95
Hydrochlorothiazid	n.d.*	-	-	46,21	3,63	7,87
Chloramfenikol	4,45	0,51	11,46	26,17	1,79	6,86
Ifosfamid	9,98	0,59	5,89	103,61	3,16	3,05
Indomethacin	8,03	0,38	4,78	73,28	7,34	10,02
Iomeprol	n.d.*	-	-	596,92*	13,94	2,33
Iopamidol	9,41	1,61	17,13	48,60	1,12	2,30
Iopromid	28,66	5,20	18,15	105,09	7,07	6,72
Kapecitabin	n.d.*	-	-	153,59	10,92	7,11
Karbamazepin	23,27	0,21	0,89	110,08	1,54	1,40
Ketoprofen	29,85	1,14	3,81	89,62	7,42	8,28
Kofein	n.d.*	-	-	744,37*	22,31	3,00
Kyselina klofibrová	n.d.*	-	-	6,71	5,33	19,94
Linkomycin	7,63	0,25	3,28	89,42	1,65	1,84
Loperamid	n.d.*	-	-	128,29	1,83	1,43

Analyt	Odpadní voda					
	L1 (0,01 ng mL ⁻¹)			L2 (0,1 ng mL ⁻¹)		
	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]	Průměr [ng L ⁻¹]	SD [ng L ⁻¹]	RSD [%]
Metoprolol	11,30	0,35	3,08	66,77	2,84	4,26
Metronidazol	3,40	0,21	6,25	48,83	1,16	2,37
Mykofenolát Mofetil	9,69	1,18	12,16	92,40	4,87	5,27
Naproxen	n.d.*	-	-	67,95	9,02	13,27
Oxazepam	8,38	0,28	3,30	83,56	2,66	3,18
Paklitaxel	n.d.*	-	-	66,95	13,03	19,46
Paracetamol	19,97	0,88	4,41	69,11	0,90	1,31
Piroxicam	8,56	0,13	1,51	82,81	1,53	1,84
Propranolol	8,20	0,36	4,34	74,95	1,47	1,96
Salbutamol	n.d.*	-	-	8,07	0,27	3,30
Sertralin	n.d.*	-	-	66,28	4,45	6,72
Sotalol	n.d.*	-	-	18,45	0,28	1,50
Sulfamethazin	9,34	0,32	3,45	85,05	1,89	2,22
Sulfamethoxazol	10,99	0,47	4,24	82,00	2,92	3,56
Terbutalin	n.d.*	-	-	2,51	0,17	6,97
Thebain	6,49	0,63	9,76	50,56	3,76	7,44
Tramadol	18,52	0,46	2,47	62,48	1,07	1,71
Trimethoprim	6,81	0,29	4,24	62,59	0,71	1,13
Valsartan	21,36	1,37	6,43	92,11	8,21	8,91
Warfarin	9,67	0,15	1,59	85,04	5,99	7,05
Zolpidem	7,13	0,12	1,68	68,20	1,62	2,38

n.d. - limit detekce analytu je vyšší než nižší koncentrační hladina spíku L1 = 0,01 µg L⁻¹*

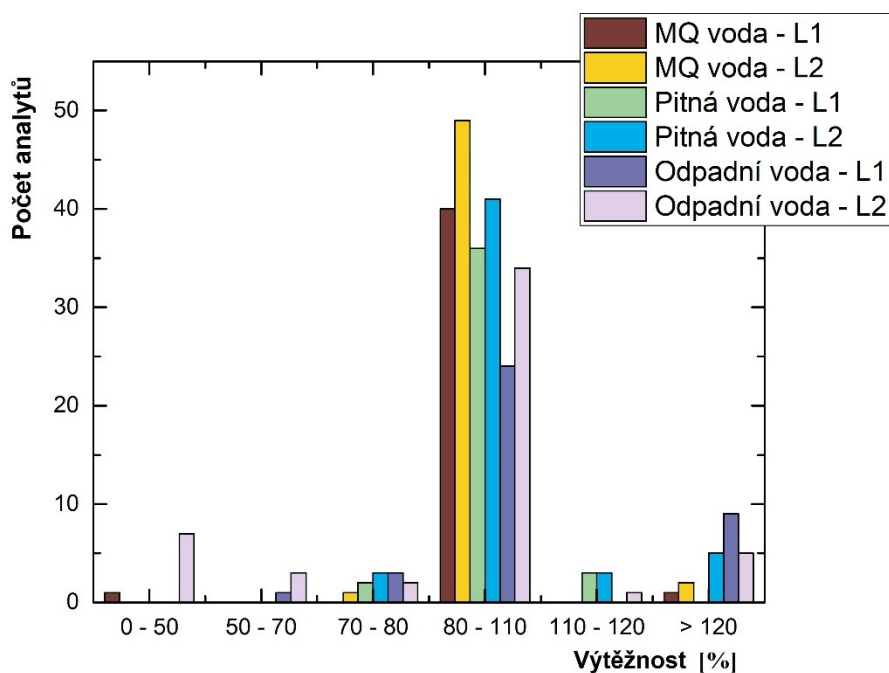
** Dané analyty byly v surových validačních vzorcích stanoveny na hladinách, které mnohonásobně převyšovaly hladinu fortifikace. Pro tyto analyty byly hodnoty RSD (%) počítány z koncentrací stanovených opakovanou analýzou spíků.*

4.2.5 Správnost metody

Ověření správnosti metody (*Accuracy*) bylo provedené zároveň s testováním opakovatelnosti a je vyjádřeno pomocí výtěžnosti vypočtené jako poměr zjištěné koncentrace analytu ve fortifikovaném vzorku k přijaté referenční hodnotě (množství přidaného analytu). Výtěžnost jednotlivých analytů byla provedena na pěti fortifikovaných matričních blancích MQ vody a pěti fortifikovaných vzorcích pitné a odpadní vody na dvou koncentračních hladinách ($0,01 \text{ ng mL}^{-1}$ a $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$). Výtěžnost jednotlivých analytů byla přepočtena na výtěžnost přiřazeného ISTD (viz *Tab. 4.2 A a B*). Výsledky správnosti metody, vyjádřeny jako výtěžnost (%), jsou uvedeny v *Tab. 4.6* a graficky zobrazeny na *Obr. 4.2*.

Ze získaných výsledků stanovení je patrné, že výtěžnost se pro většinu analytů pohybuje v rozmezí 70 – 120 % (splňuje doporučení dokumentu SANTE/11945/2015 [58]). Nižší koncentrační hladina byla připravována pro analyty s větším lineárním rozsahem. U některých analytů (např. cyklobenzaprin, fluoxetin, gabapentin, iomeprol, kapecitabin, kofein, kyselina klofibrová, loperamid, naproxen, paklitaxel a setralin) není výtěžnost na nižší spikovací hladině uvedena z toho důvodu, že LOD těchto analytů byl vyšší než testovaná koncentrační hladina. Vyšší nebo nižší hodnoty výtěžnosti, než je doporučováno při stanovení jednotlivých analytů ve fortifikovaných blancích MQ vody a fortifikovaných vzorcích pitné vody mohou být způsobeny matričními vlivy z důvodu vyhodnocování na rozpouštědlovou kalibraci.

U odpadních vod je rozptyl výtěžností u některých analytů větší. Nízké hodnoty výtěžnosti jsou způsobeny výrazným matričním efektem. Vyšší hodnoty jsou pravděpodobně zapříčiněny kontaminací matrice odpadní vody. Pro analyty kofeinu, gabapentinu, iomeprolu jsou nalezené hodnoty několikanásobně vyšší. Při stanovení léčiv v odpadních vodách je přepočet na ISTD nutný ke korekci matričních efektů.



Obr. 4.2: Grafické znázornění rozptylu výtěžností v rámci testovaných matic.

Tab. 4.6: Výsledky správnosti metody vyjádřené jako výtěžnost pro tři typy vodních matic – MQ, pitná a odpadní voda (L1 – úroveň obohacení vzorku na koncentrační hladinu 0,01 ng mL⁻¹, L2 – úroveň obohacení vzorku na koncentrační hladinu 0,1 ng mL⁻¹).

Analyt	Výtěžnost [%]					
	MQ voda		Pitná voda		Odpadní voda	
	L1	L2	L1	L2	L1	L2
Anastrozol	100,1	102,4	100,3	98,9	97,0	98,7
Atenolol	84,0	96,7	107,3	104,9	64,6	45,8
Azathioprin	104,9	103,1	96,9	94,1	94,5	97,1
Bezafibrat	92,9	89,4	87,6	95,8	92,8	87,6
Buprenorfin	88,1	97,0	89,2	92,6	103,0	98,2
Butorfanol	87,2	98,4	94,6	97,2	85,7	91,7
Citalopram	98,0	95,9	96,9	99,4	95,3	99,9
Cyklobenzaprin	n.d.*	73,1	n.d.*	116,5	n.d.*	98,0
Cyklofosfamid	96,9	104,0	96,5	100,1	103,4	105,6
Diazepam	102,4	102,0	99,2	101,3	99,8	103,0
Diklofenak	n.d.*	97,0	n.d.*	86,5	n.d.*	30,3

Analyt	Výtěžnost [%]					
	MQ voda		Pitná voda		Odpadní voda	
	L1	L2	L1	L2	L1	L2
Enalapril	103,5	107,6	115,2	118,3	100,3	107,2
Fluoxetin	n.d.*	97,5	n.d.*	118,9	n.d.*	100,0
Flutamid	91,0	87,3	85,7	89,6	71,7	62,8
Furosemid	90,2	81,6	112,5	94,1	n.d.*	84,1
Gabapentin	n.d.*	96,3	116,9	107,5	n.d.**	n.d.**
Gemfibrozil	108,9	97,3	92,2	93,5	n.d.*	3,6
Hydrochlorothiazid	n.d.*	104,9	n.d.*	109,0	n.d.*	76,5
Chloramfenikol	121,3	100,8	107,3	96,0	72,1	43,4
Ifosfamid	106,5	103,4	101,1	96,5	101,5	115,8
Indomethacin	88,3	80,1	84,8	88,9	91,5	89,3
Iomeprol	n.d.*	135,1	n.d.*	263,1	n.d.**	n.d.**
Iopamidol	103,4	104,0	74,0	102,3	106,9	66,4
Iopromid	84,4	106,6	79,7	124,4	249,0	103,6
Kapecitabin	n.d.*	95,8	n.d.*	231,8	n.d.*	187,1
Karbamazepin	97,7	99,5	101,4	97,3	202,1	108,6
Ketoprofen	86,3	90,8	104,4	107,3	246,9	107,1
Kofein	n.d.*	91,7	n.d.*	70,1	n.d.**	n.d.**
Kyselina klofibrová	n.d.*	84,9	n.d.*	75,7	n.d.*	66,0
Linkomycin	105,2	105,3	101,8	102,1	77,6	99,9
Loperamid	n.d.*	124,6	n.d.*	138,1	n.d.*	192,7
Metoprolol	84,5	88,5	95,4	100,4	105,2	83,0
Metronidazol	105,2	106,7	95,7	98,9	88,5	74,5
Mykofenolát Mofetil	83,3	88,7	96,1	92,8	98,5	103,2
Naproxen	n.d.*	98,4	n.d.*	94,2	n.d.*	92,1
Oxazepam	100,0	102,7	97,2	99,1	95,4	101,8
Paklitaxel	n.d.*	82,9	n.d.*	76,3	n.d.*	85,6
Paracetamol	94,6	95,9	99,4	103,3	226,7	94,4
Piroxicam	103,9	106,2	98,3	100,8	97,6	100,9
Propranolol	14,7	80,1	88,8	103,6	82,2	95,8

Analyt	Výtěžnost [%]					
	MQ voda		Pitná voda		Odpadní voda	
	L1	L2	L1	L2	L1	L2
Salbutamol	87,5	96,8	100,2	107,2	n.d.*	12,1
Sertralin	n.d.*	94,7	n.d.*	121,2	n.d.*	95,4
Sotalol	80,3	91,6	96,2	102,8	n.d.*	27,7
Sulfamethazin	101,3	105,8	103,3	99,4	106,4	103,6
Sulfamethoxazol	97,2	100,6	99,1	97,9	105,7	101,4
Terbutalin	87,3	100,3	93,0	102,7	n.d.*	3,8
Thebain	87,2	91,5	91,7	89,6	105,2	83,8
Tramadol	84,5	90,3	93,8	95,5	237,6	93,8
Trimethoprim	85,5	83,7	92,4	95,1	87,4	94,0
Valsartan	93,1	86,3	80,6	96,2	185,5	90,8
Warfarin	81,7	86,3	96,1	95,6	98,4	95,0
Zolpidem	98,7	96,6	93,2	96,3	91,5	102,4

n.d. - limit detekce analytu je vyšší než nižší koncentrační hladina spiku $L1 = 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$*

*n.d.** - Pro uvedené analyty nebylo možné stanovit přesnou hodnotu výtěžnosti, a to z důvodu, že vzorky použité pro validaci byly těmito látkami kontaminovány na dosti vysokých hladinách, které mnohonásobně převyšovaly koncentraci, kterou byly vzorky fortifikovány. Výtěžnosti těchto analytů lze tedy stanovit pouze z analýzy MQ vody.*

4.2.6 Robustnost metody

Testování robustnosti celého analytického procesu, tedy stanovení, do jaké míry změna jednotlivých parametrů metody a/nebo kroky přípravy vzorků ovlivní správnost a přesnost výsledků, byla vzhledem k jednoduchosti přípravy vzorků (přímý nástřik) omezena na testování stability standardů a testování účinnosti použitých mikrofiltrů.

- **Testování stability standardů a vzorků:**

Stabilita standardů a vzorků byla testována celkově po dobu jednoho týdne, konkrétně jeden, tři a sedm dní od jejich laboratorní přípravy (= den 0). Každý následující den kontrolní analýzy byla připravena nová kalibrační řada standardů, na kterou bylo proměřeno 6 fortifikovaných vzorků (3 spiky pitné vody na koncentrační hladině $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ a 3 spiky odpadní vody fortifikované

na hladině 0,1 ng mL⁻¹), připravené v den 0. Na základě porovnání výsledků bylo zřejmé, že většina analytů dávala stabilní odezvu i po 7 dnech skladování vzorků. Výjimku tvořila skupina iodových kontrastních látek, dále kofein, gabapentin a paklitaxel, které po 1 týdnu od přípravy vzorků vykazovaly nálezy 30 %, 54 %, 42 % a 58 % ve srovnání se dnem 0. Vzhledem k tomuto faktu byla stabilita vzorků určena na 3 dny, během kterých je nutno provést LC-MS analýzu.

- **Testování mikrofiltrů:**

V rámci optimalizace metody byly testovány různé typy mikrofiltrů a jejich vlivu na finální výtěžnosti analytů. Testovány byly celulosové, PTFE, nylonové a PVDF mikrofiltry o porozitě 0,20 μm. Pro daný experiment byly analyty spikovány na hladinu 0,1 ng mL⁻¹ do MQ vody, přetaženy přes filtry a analyzovány. Na základě výsledků tohoto testu byly pro finální filtraci vzorků zvoleny celulózové filtry, které nemají prakticky žádný vliv na finální koncentraci analytů. Nejvíce analytů bylo zachyceno na PTFE a nylonových filtrech, kdy došlo k poklesu koncentrace až na 4 % původní spikované hladiny.

4.2.7 Odhad nejistoty stanovení

Odhad nejistoty měření byl proveden tzv. „top-down“ přístupem pomocí metody ANOVA, na základě opakovaných (vždy alespoň 6-krát pro každou matici/fortifikovanou hladinu) měření fortifikovaných matic a MQ vody. Tento způsob odhadu zahrnuje příspěvky nejistot z navažování standardů, odměřování objemů, dávkování vzorku, ředění, vliv testovaných reálných matic a opakovatelnost měření přístroje. Rozšířená nejistota měření je vyjádřena jako

$$U_c = k \cdot u_c \quad (4.1)$$

kde k je faktor rozšíření a hodnota k je 2, což odpovídá přibližně 95% spolehlivosti výsledku a u_c je celková nejistota měření z výpočtu ANOVA.

Nejistota měření byla odhadnuta pomocí těchto matic/koncentrací fortifikace:

1. MQ voda 0,01 μg.L⁻¹
2. MQ voda 0,1 μg.L⁻¹

3. pitná voda 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$
4. pitná voda 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$
5. odpadní voda 0,01 $\mu\text{g.L}^{-1}$
6. odpadní voda 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Pro přesný výpočet byl použit interní ALS-Excel dokument, kde je celý výpočet přednastaven. Výsledky jsou shrnuty v *Tab. 4.7*.

Tab. 4.7: Odhad nejistoty měření pro jednotlivé parametry v pitných a odpadních vodách.

Analyt	Pitné vody		Odpadní vody	
	Kombinovaná nejistota [% , $k = 1$]	Rozšířená nejistota U_c [% , $k = 2$]	Kombinovaná nejistota [% , $k = 1$]	Rozšířená nejistota U_c
Anastrozol	5,3	10,6	2,7	5,3
Atenolol	5,7	11,3	10,1	20,1
Azathioprin	5,8	11,5	4,1	8,1
Bezafibrat	12,6	25,2	4,2	8,4
Buprenorfin	5,8	11,6	3,7	7,4
Butorfanol	3,3	6,6	2,3	4,5
Citalopram	3,4	6,8	4,8	9,5
Cyklobenzaprin	4,6	9,2	2,9	5,9
Cyklofosfamid	5,9	11,8	4,6	9,2
Diazepam	3,8	7,6	7,5	15,0
Diklofenak	12,1	24,2	5,9	11,8
Enalapril	4,1	8,2	3,0	6,0
Fluoxetin	9,0	18,1	7,9	15,7
Flutamid	8,6	17,1	7,8	15,6
Furosemid	11,7	23,3	5,9	11,7
Gabapentin	6,5	13,1	7,6	15,2
Gemfibrozil	13,3	26,6	8,5	17,1
Hydrochlorothiazid	11,1	22,3	7,6	15,1

Analyt	Pitné vody		Odpadní vody	
	Kombinovaná nejistota [% , $k = 1$]	Rozšířená nejistota U_c [% , $k = 2$]	Kombinovaná nejistota [% , $k = 1$]	Rozšířená nejistota U_c
Chloramfenicol	11,2	22,4	4,8	9,5
Ifosfamid	5,8	11,7	1,7	3,4
Indomethacin	5,4	10,8	4,0	8,0
Iomeprol	8,0	16,1	8,0	16,0
Iopamidol	5,8	11,6	2,7	5,4
Iopromid	13,4	26,9	6,6	13,3
Kapecitabin	11,2	22,4	3,8	7,6
Karbamazepin	11,3	22,5	7,0	13,9
Ketoprofen	5,6	11,3	3,3	6,6
Kofein	14,2	28,3	0,3	0,5
Kyselina klofibrová	10,6	21,3	8,8	17,7
Linkomycin	5,7	11,5	3,6	7,3
Loperamid	8,6	17,2	3,8	7,5
Metoprolol	3,5	7,1	3,0	5,9
Metronidazol	8,8	17,7	3,1	6,1
Mykofenolát Mofetil	6,2	12,5	6,6	13,1
Naproxen	12,4	24,8	3,0	6,0
Oxazepam	6,6	13,2	6,1	12,1
Paklitaxel	8,3	16,6	5,5	11,0
Paracetamol	10,1	20,2	0,4	0,9
Piroxicam	12,3	24,5	3,2	6,4
Propranolol	3,6	7,2	4,8	9,5
Salbutamol	7,5	15,0	3,1	6,2
Sertralin	5,9	11,7	5,6	11,2
Sotalol	5,5	10,9	5,2	10,3
Sulfamethazin	3,0	6,0	1,5	3,1

Analyt	Pitné vody		Odpadní vody	
	Kombinovaná nejistota [% , $k = 1$]	Rozšířená nejistota U_c [% , $k = 2$]	Kombinovaná nejistota [% , $k = 1$]	Rozšířená nejistota U_c
Sulfamethoxazol	2,9	5,7	2,8	5,5
Terbutalin	4,6	9,2	6,4	12,7
Thebain	5,4	10,7	7,6	15,1
Tramadol	3,9	7,9	1,8	3,6
Trimethoprim	4,4	8,8	3,5	6,9
Valsartan	4,8	9,6	3,6	7,3
Warfarin	5,9	11,9	4,4	8,8
Zolpidem	4,8	9,5	3,4	6,8

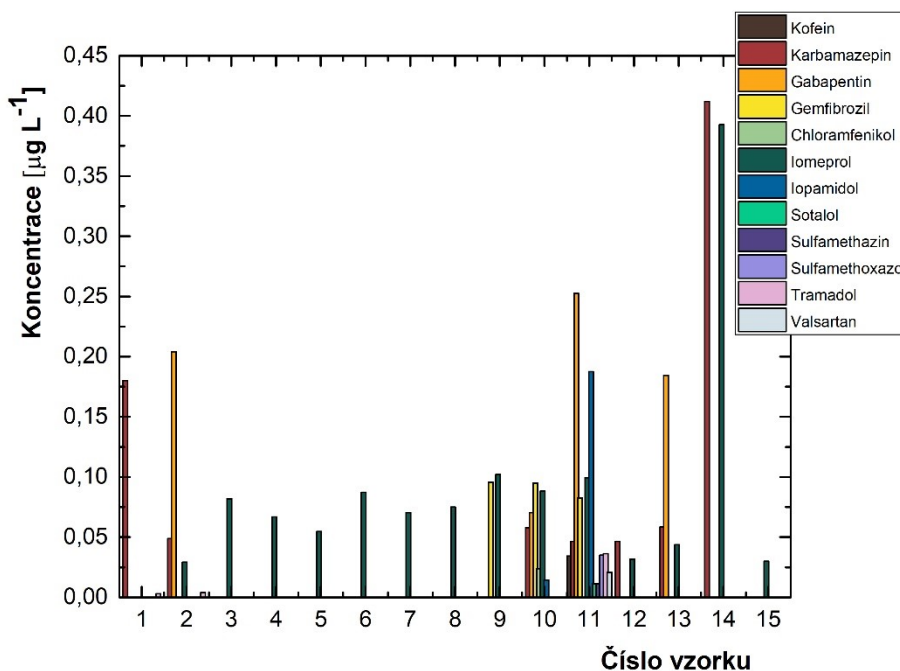
4.3 Monitoring reálných vzorků

4.3.1 Výsledky monitoringu léčiv ve vzorcích pitných vod

Validovaná UHPLC–MS/MS metoda byla v rámci diplomové práce použita pro monitoring léčiv v pitných vodách odebíraných na území České republiky, jednalo se o kombinaci kohoutkových a pitných podzemních vod. Výsledky jsou shrnuty v *Tab. 4.8* a graficky zobrazeny na *Obr. 4.3*. Analyzováno bylo 15 vzorků, kdy v každém vzorku byl stanoven alespoň jeden analyt nad LOD.

Analyt, který byl detekován prakticky ve všech testovaných vzorcích (14 pozitivních z 15 analyzovaných) napříč Českou republikou, byla jodová kontrastní látka iomeprol. Průměrná hodnota výskytu této látky byla $0,090 \mu\text{g L}^{-1}$. V případě jodových látek se jedná o skupiny farmak využívaných v nemocnicích, a to v relativně vysokých dávkách. Při kontaminaci všech typů vod těmito látkami platí, že procesy uplatňované na čistírnách odpadních vod, tedy ozonizace, UV záření, chlorace nebo mikrobiální degradace, nemají na odstranění těchto látek žádný vliv. Jako druhý analyt byl, co do počtu pozitivně kontaminovaných vzorků, detekován karbamazepin. Byl stanoven zhruba v polovině vzorků (7/15), na průměrné koncentraci $0,122 \mu\text{g L}^{-1}$. Dále byl ve 4 vzorcích detekován gabapentin s průměrnou hodnotou koncentrace $0,178 \mu\text{g L}^{-1}$. Dále byly ve vzorkách stanovena léčiva iopamidol ($0,101 \mu\text{g L}^{-1}$), gemfibrozil ($0,091 \mu\text{g L}^{-1}$), tramadol

(0,044 $\mu\text{g L}^{-1}$), sulfamethoxazol (0,035 $\mu\text{g L}^{-1}$), kofein (0,034 $\mu\text{g L}^{-1}$), chloramfenikol (0,024 $\mu\text{g L}^{-1}$), valsartan (0,021 $\mu\text{g L}^{-1}$), sulfamethazin (0,011 $\mu\text{g L}^{-1}$) a sotalol (0,011 $\mu\text{g L}^{-1}$). Kofein, karbamazepin, gabapentin a jodové látky byly ve vzorcích pitných vod detekovány nad hladinu 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, což je hodnota, která se používá jako limitní a hygienicky povolená při stanovení pesticidů. Jak již bylo zmíněno, toto je hodnota pouze orientační, protože pro léčiva zatím nejsou legislativní limity stanoveny.



Obr. 4.3: Přehled výskytu analytů léčiv stanovených ve vzorcích pitných vod v ČR.

Tab. 4.8: Přehled koncentrací stanovených analytů léčiv v pitných vodách v České republice.

Analyt	Koncentrace [$\mu\text{g L}^{-1}$]														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Kofein	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,034	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Gabapentin	n. d.	0,204	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,071	0,252	n. d.	0,185	n. d.	n. d.
Gemfibrozil	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,096	0,095	0,083	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Chloramfenikol	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,024	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Iomeprol	n. d.	0,029	0,082	0,067	0,055	0,087	0,070	0,075	0,102	0,088	0,099	0,032	0,044	0,393	0,030
Iopamidol	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,014	0,188	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Karbamazepin	0,180	0,049	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,058	0,047	0,047	0,058	0,412	n. d.
Sotalol	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,011	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfamethazin	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,011	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfamethoxazol	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,035	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Tramadol	0,003	0,004	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,036	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Trimethoprim	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Valsartan	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,021	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

4.3.2 Výsledky monitoringu léčiv ve vzorcích odpadních vod

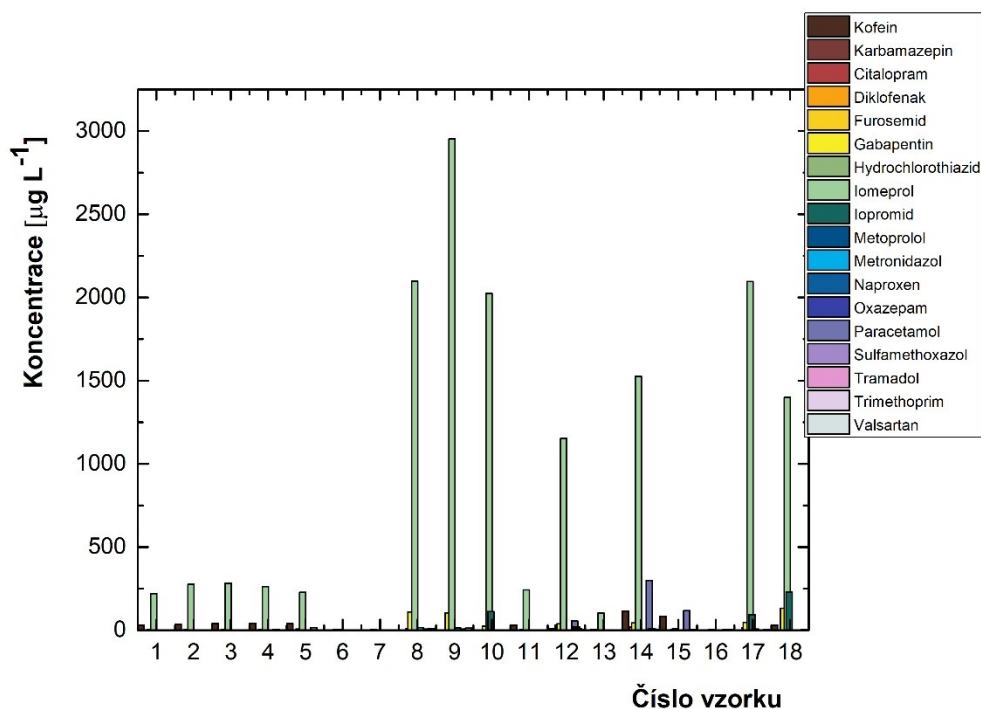
Validovaná UHPLC–MS/MS metoda byla v rámci diplomové práce použita pro monitoring léčiv v odpadních vodách vytékajících ze zdravotnických zařízení v České republice. Výsledky jsou shrnuty v *Tab. 4.9* a graficky zobrazeny na *Obr. 4.4*. Analyzováno bylo 18 vzorků, kdy v každém vzorku byl stanoven alespoň jeden analyt nad limitem stanovitelnosti.

Iomeprol, jodová kontrastní látka, byla stanovena v 17 vzorcích na průměrné koncentrační hladině $875 \mu\text{g L}^{-1}$ a v 10 vzorcích byl stanoven iopromid s průměrnou hodnotou koncentrace $48,8 \mu\text{g L}^{-1}$. Jodové kontrastní látky, hojně využívané v nemocnicích při diagnostice, jsou problematické z důvodu jejich vysoké rozpustnosti ve vodě a vysoké stabilitě. Gabapentin byl stanoven ve všech vzorcích, jeho průměrná koncentrace byla $29,9 \mu\text{g L}^{-1}$. Kofein byl stanoven v 10 vzorcích s průměrnou hodnotou koncentrace $38,5 \mu\text{g L}^{-1}$ a v 8 vzorcích byl nalezen furosemid s průměrnou hodnotou koncentrace $9,66 \mu\text{g L}^{-1}$. V 6 vzorcích byl stanoven také paracetamol s průměrnou hodnotou koncentrace $82,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Mezi další léčiva stanovená ve vzorcích s relativně vysokou průměrnou koncentrací patří: metronidazol ($7,50 \mu\text{g L}^{-1}$), sulfamethoxazol ($4,93 \mu\text{g L}^{-1}$), tramadol ($3,52 \mu\text{g L}^{-1}$), trimethoprim ($3,06 \mu\text{g L}^{-1}$), hydrochlorothiazid ($2,38 \mu\text{g L}^{-1}$), diklofenak ($1,33 \mu\text{g L}^{-1}$), naproxen ($0,98 \mu\text{g L}^{-1}$), metoprolol ($0,97 \mu\text{g L}^{-1}$), valsartan ($0,91 \mu\text{g L}^{-1}$) a karbamazepin ($0,73 \mu\text{g L}^{-1}$).

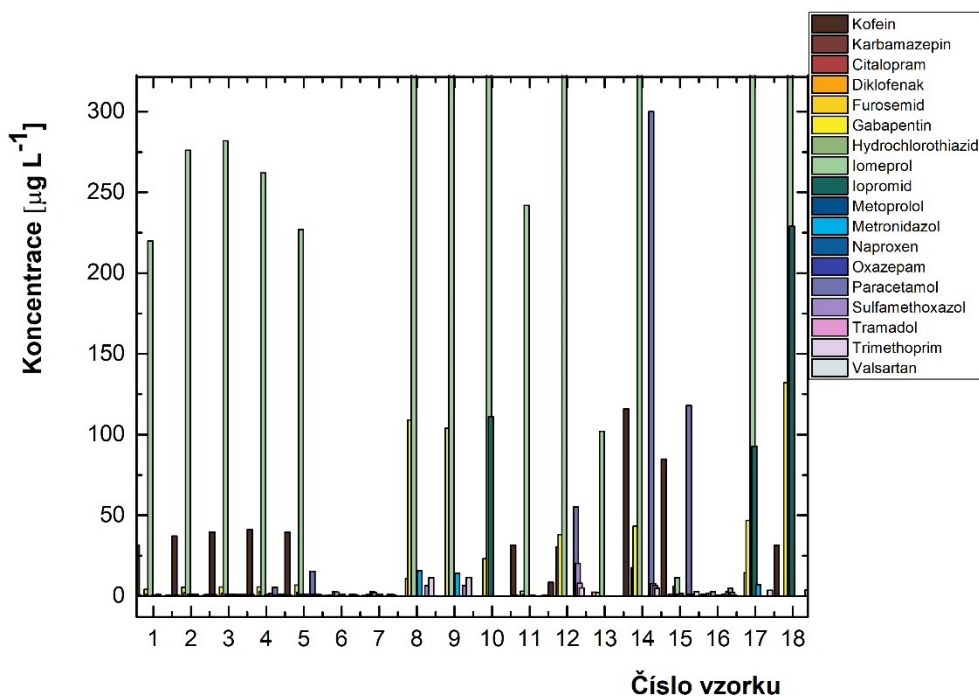
Výsledky monitoringu léčiv v odpadních vodách, které byly v uplynulých letech prováděny v České republice a na Slovensku potvrdily výskyt léčiv stanovených pomocí této metody. Ve studii prováděné v roce 2014 a 2015 byl nalezen gabapentin ($16,8 \mu\text{g L}^{-1}$), diklofenak ($1,4 \mu\text{g L}^{-1}$) a ketoprofen ($0,45 \mu\text{g L}^{-1}$). [14] V roce 2019 byl stanoven tramadol ($0,53 \mu\text{g L}^{-1}$) a citalopram ($0,07 \mu\text{g L}^{-1}$). Naproxen ($1,4 \mu\text{g L}^{-1}$), diklofenak ($1,1 \mu\text{g L}^{-1}$), a ketoprofen ($0,9 \mu\text{g L}^{-1}$) byl stanoven v roce 2017. [16]

V porovnání se studii prováděnými ve Španělsku byly v České republice nalezeny desetinásobně vyšší koncentrace paracetamolu, dále byla také nalezena léčiva atenolol, hydrochlorothiazid, sulfamethoxazol, karbamazepin a kofein. [17] [18] Přibližně stejná koncentrace kofeinu, jako v České republice, byla naměřena v průběhu studie na Kanárských ostrovech. [20] Zjištěné hodnoty koncentrace paracetamolu a naproxenu v České republice byly v porovnání s Velkou Británií nižší. [23] [24] V odpadních

vodách Lotyšska byly ve srovnání s Českou republikou nalezeny mnohonásobně nižší koncentrace kofeinu ($12 \mu\text{g L}^{-1}$), a paracetamolu ($4,2 \mu\text{g L}^{-1}$). [27]



Obr. 4.4 A: Přehled výskytu analytů léčiv stanovených ve vzorcích odpadních vod ze zdravotnických zařízení v ČR.



Obr. 4.4 B: Přibližení Obr. 4.4 A – přehled výskytu analytů léčiv stanovených ve vzorcích odpadních vod ze zdravotnických zařízení v ČR.

Tab. 4.9: Přehled stanovených léčiv v odpadních vodách vytékajících ze zdravotnických zařízení v České republice.

Analyt	Koncentrace [$\mu\text{g L}^{-1}$]																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Atenolol	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,301	0,305	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Citalopram	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,205	0,203	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,319	1,04	n. d.	n. d.
Cyklofosamid	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	5,17	n. d.	n. d.	n. d.
Diklofenak	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,817	0,880	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	2,37	n. d.	n. d.	1,27	n. d.	n. d.
Furosemid	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,378	0,366	10,8	n. d.	n. d.	n. d.	30,5	n. d.	17,7	1,30	1,83	14,4	n. d.
Gabapentin	4,13	5,40	5,77	5,74	6,78	2,58	2,59	109	104	23,2	2,97	38,2	2,28	43,2	1,24	1,56	46,8	132
Hydrochlorothiazid	1,16	2,09	1,69	2,58	2,16	2,39	2,09	n. d.	n. d.	n. d.	0,987	n. d.	n. d.	n. d.	5,91	2,77	n. d.	n. d.
Indomethacin	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,074	0,065	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Iomeprol	n. d.	276	282	n. d.	227	0,214	0,268	n. d.	n. d.	2024	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	11,4	n. d.	2095	1399
Iopromid	n. d.	1,20	1,28	n. d.	1,20	0,607	0,777	n. d.	n. d.	111	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,32	n. d.	92,7	229
Kapcitabin	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Karbamazepin	0,742	0,812	0,917	0,846	0,803	0,331	0,333	n. d.	n. d.	n. d.	0,699	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,05	n. d.	n. d.
Ketoprofen	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	15,4	0,090	n. d.	n. d.
Kofein	31,7	37,2	39,7	41,2	39,6	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	31,5	8,49	n. d.	116,0	84,8	0,597	n. d.	31,5

Analyt	Konzentrace [$\mu\text{g L}^{-1}$]																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Metoprolol	0,632	0,740	0,786	0,902	0,843	1,31	1,30	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,46	0,708	n. d.	n. d.
Metronidazol	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	15,7	14,1	n. d.	0,597	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,123	6,96	n. d.
Naproxen	1,21	1,22	1,17	1,64	1,25	0,194	0,169	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Oxazepam	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,117	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,27	n. d.	n. d.
Paklitaxel	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Paracetamol	n. d.	n. d.	0,943	5,42	15,3	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	55,3	n. d.	300	118	n. d.	n. d.	n. d.
Sertralin	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,207	n. d.	n. d.	n. d.
Sotalol	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,055	0,052	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfamethoxazol	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,14	1,04	6,49	6,62	n. d.	n. d.	20,3	n. d.	7,86	1,15	2,78	n. d.	n. d.
Tramadol	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,918	0,930	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	7,87	n. d.	6,48	0,291	4,66	n. d.	n. d.
Trimethoprim	0,441	0,759	0,846	0,909	0,877	0,522	0,511	11,4	11,5	n. d.	0,343	5,11	n. d.	4,83	1,40	2,30	3,51	3,71
Valsartan	0,817	0,900	0,697	1,10	0,747	0,242	0,242	n. d.	n. d.	n. d.	0,780	n. d.	n. d.	n. d.	2,81	0,773	n. d.	n. d.
Zolpidem	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,052	n. d.	n. d.

4.3.3 Porovnání účinnosti čistíren odpadních vod v ČR

Validovaná UHPLC–MS/MS metoda byla v rámci diplomové práce použita také pro porovnání účinnosti odstranění léčiv v čistírnách odpadních vod na území České republiky. Výsledky jsou shrnuty v *Tab. 4.10* a graficky zobrazeny na *Obr. 4.5*. Analyzováno bylo 20 vzorků z 10 čistíren (ČOV), kdy byl vždy analyzován přítok a odtok z dané ČOV.

Z *Obr. 4.5* je patrné, že většina analytů byla po průchodu ČOV odstraněna s účinností vyšší jako 70 %. Paracetamol byl nalezen v přítocích všech 10 ČOV v průměrné koncentraci 38,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ a byl odstraněn s 100% účinností. Ve všech analyzovaných vzorcích byl taky nalezen kofein dosahující průměrné koncentrace 82,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, který byl odstraňován s úspěšností 97 %. Mezi analyty, které byly odstraněny s účinností větší, jako 80 % patří: ketoprofen (96 %), naproxen (92 %), atenolol (88 %), valsartan (85 %) a gabapentin (83 %). Nižší účinnost odstranění byla zjištěna u léčiv: furosemid (75 %), metoprolol (75 %), iomeprol (71 %), citalopram (53 %), sulfamethoxazol (52 %), zolpidem (47 %), hydrochlorothiazid (45 %), iopromid (43 %), tramadol (39 %), karbamazepin (35 %), oxazepam (12,4 %) a diklofenak (2,5 %). U čtyř analytů léčiv byla nalezena vyšší koncentrace v odtoku ČOV, účinnost je tedy záporná: warfarin (-9,5 %), indomethacin (-53 %), trimethoprim (-54 %) a metronidazol (-110%).

Vyšší obsah léčiva na výstupu ČOV než na vstupu může být způsoben několika faktory. První možností je přítomnost matrice potlačující nebo zesilující signál analytu v průběhu stanovení, případně náhodnou chybou při přípravě nebo odebrání vzorků. Další možností je uvolňování metabolizovaného farmaka, které může být dekonjugováno zpět do původní formy v průběhu čistícího procesu v ČOV.

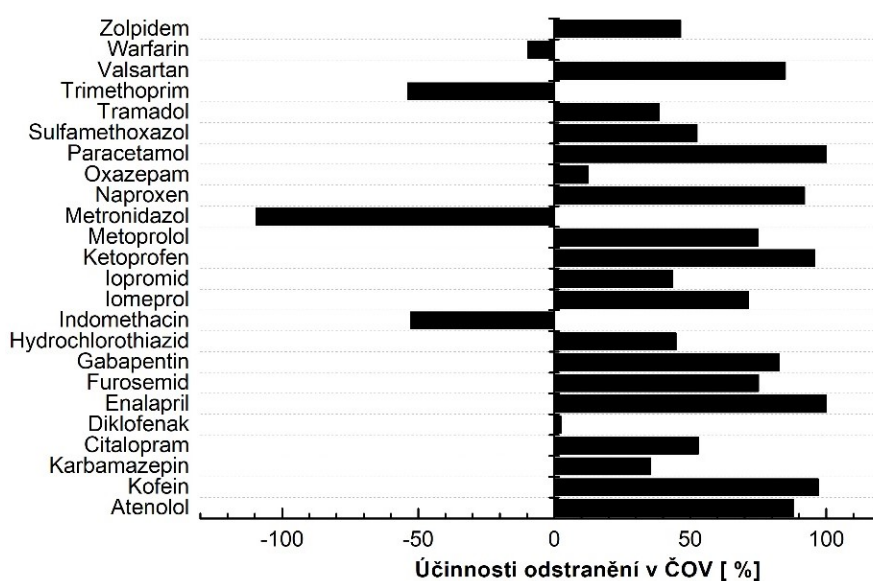
V roce 2014 a 2015 byla v České republice provedena studie, která porovnávala účinnost ČOV. Bylo zjištěno, že nejvyšší účinnosti odstranění dosahoval paracetamol (91 %), kofein (84 %) a furosemid (75 %), naopak nejnižší účinnost byla zjištěna pro gabapentin (14 %). [14] Kromě gabapentinu, u kterého byla pomocí validované metody zjištěna 83% účinnost odstranění, se výsledky shodují.

Ve studii z roku 2019 bylo v České republice a na Slovensku zjištěno, že tramadol, oxazepam a citalopram jsou odstraňovány v ČOV maximálně s účinností 30 %. [15] Ve

srovnání s touto studií byla zjištěna vyšší účinnost odstranění u citalopramu (53 %) a tramadolu (39 %).

Maximálně 40% účinnost odstranění karbamazepinu v ČOV byla stanovena ve studii prováděné na Kanárských ostrovech v roce 2017. [20] Tato hodnota se shoduje s výsledkem zjištěným v této diplomové práci.

V dalších studiích prováděných v Itálii v roce 2014 [22] a ve Velké Británii v roce 2015 a 2016 [23] [24] byly po průchodu ČOV nalezeny vyšší koncentrace léčiv karbamazepinu, diklofenaku a tramadolu.



Obr. 4.5: Porovnání průměrné účinnosti odstranění stanovených léčiv v ČOV (v %).

Tab. 4.10: Přehled koncentrací stanovených analytů léčiv v odpadních vodách v České republice.

Analyt	Koncentrace [$\mu\text{g L}^{-1}$]																			
	ČOV 1	ČOV 1	ČOV 2	ČOV 2	ČOV 3	ČOV 3	ČOV 4	ČOV 4	ČOV 5	ČOV 5	ČOV 6	ČOV 6	ČOV 7	ČOV 7	ČOV 8	ČOV 8	ČOV 9	ČOV 9	ČOV 10	ČOV 10
	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok
Atenolol	0,093	0,152	n. d.	0,014	0,234	0,214	0,528	0,025	1,87	0,102	3,59	0,088	0,773	0,025	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,421	0,300
Citalopram	0,206	0,210	0,164	0,150	0,186	0,195	0,825	0,494	4,44	1,44	1,86	0,521	1,35	0,640	0,493	0,711	n. d.	n. d.	0,186	0,222
Diklofenak	3,14	2,03	0,308	0,275	0,213	0,367	3,01	1,79	6,53	3,10	5,21	2,06	5,70	0,496	0,205	0,553	0,050	13,1	0,343	0,322
Enalapril	0,033	n. d.	0,007	n. d.	0,007	n. d.	n. d.	n. d.	0,076	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Furosemid	1,08	1,98	1,71	1,20	1,14	1,19	3,03	1,57	43,2	10,7	2,44	1,16	16,3	1,29	25,8	4,96	2,11	0,009	0,080	0,168
Gabapentin	10,9	12,6	2,00	2,16	4,30	7,33	27,9	3,16	51,7	7,79	19,9	3,92	69,1	3,79	109,9	3,67	2,04	0,372	4,59	8,23
Hydrochlorothiazid	0,635	1,71	0,800	1,27	0,974	1,39	3,96	3,30	11,1	2,52	8,28	3,37	9,03	4,78	9,38	8,76	6,25	0,149	3,04	2,33
Indomethacin	0,104	0,112	0,020	0,046	0,056	0,077	0,049	0,110	0,121	0,103	0,012	0,102	0,164	0,171	0,009	0,090	n. d.	n. d.	0,055	0,088
Iomeprol	0,133	2,90	0,079	n. d.	4,57	1,12	0,110	0,122	222,4	144,0	6,68	2,33	298,1	2,05	n. d.	0,074	n. d.	n. d.	5,33	0,995
Iopromid	n. d.	0,077	n. d.	n. d.	0,052	0,029	0,019	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,071	0,804	0,112	n. d.	0,251	n. d.	n. d.	0,083	n. d.
Karbamazepin	0,671	0,849	0,964	0,179	0,139	0,265	0,380	0,432	n. d.	0,003	2,44	0,880	1,42	0,935	0,239	0,336	0,037	n. d.	0,135	0,270
Ketoprofen	0,089	0,045	3,88	0,004	0,031	0,036	0,012	0,051	1,39	0,070	0,196	0,044	1,26	0,019	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,034	0,032

Analyt	Koncentrace [$\mu\text{g L}^{-1}$]																			
	ČOV 1	ČOV 1	ČOV 2	ČOV 2	ČOV 3	ČOV 3	ČOV 4	ČOV 4	ČOV 5	ČOV 5	ČOV 6	ČOV 6	ČOV 7	ČOV 7	ČOV 8	ČOV 8	ČOV 9	ČOV 9	ČOV 10	ČOV 10
	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok	přítok	odtok
Kofein	38,5	2,21	17,1	1,89	21,4	0,959	117,3	1,98	140,7	4,92	160,4	2,09	195,7	1,55	61,6	1,21	45,7	5,90	22,1	2,18
Metoprolol	0,643	0,985	0,700	0,438	0,600	0,800	2,90	1,76	30,8	3,63	12,0	1,82	8,64	2,77	2,40	2,53	3,11	0,026	0,622	0,902
Metronidazol	0,034	0,024	0,006	0,015	0,033	0,112	0,040	0,032	n. d.	0,018	n. d.	0,007	n. d.	0,011	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,042	0,118
Naproxen	0,265	0,094	3,49	n. d.	0,270	0,085	4,90	0,651	3,93	0,509	2,49	1,16	12,6	0,078	1,82	n. d.	2,18	0,012	0,867	0,045
Oxazepam	0,095	0,183	0,008	0,020	0,037	0,077	n. d.	0,012	n. d.	0,020	0,192	0,151	0,216	0,150	n. d.	n. d.	0,202	n. d.	0,040	0,081
Paracetamol	28,7	n. d.	30,3	n. d.	11,0	n. d.	28,6	n. d.	54,5	n. d.	104,2	n. d.	83,7	n. d.	21,4	n. d.	14,7	n. d.	11,8	n. d.
Sulfamethoxazol	0,006	0,009	0,041	0,028	0,503	0,961	1,95	0,678	0,024	0,126	1,82	0,568	4,09	0,557	1,21	0,759	n. d.	n. d.	0,431	1,10
Tramadol	0,231	0,396	0,123	0,247	0,164	0,405	1,97	1,89	17,1	7,11	0,666	1,40	3,59	1,93	n. d.	0,839	0,375	0,022	0,315	0,782
Trimethoprim	0,009	0,106	0,030	0,167	0,152	0,340	0,333	0,316	0,408	0,629	0,206	0,117	0,333	0,160	0,099	0,455	n. d.	n. d.	0,152	0,357
Valsartan	0,347	0,946	0,550	0,038	0,475	0,142	5,45	0,146	29,0	8,11	4,48	0,134	11,3	0,109	8,20	0,145	5,19	0,011	0,477	0,145
Warfarin	0,003	0,006	0,004	0,003	0,003	0,004	0,022	0,007	0,022	0,033	0,024	0,017	0,016	0,019	n. d.	0,016	n. d.	n. d.	0,0030	0,003
Zolpidem	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002	0,004	0,005	0,055	0,019	0,005	0,005	0,019	0,006	0,003	0,008	n. d.	n. d.	0,001	0,002

5 Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na optimalizaci a validaci multireziduální analytické UHPLC–MS/MS metody, která slouží pro stanovení 52 léčiv. Na začátku vypracování diplomové práce byla provedena odborná rešerše doposud publikovaných vědeckých prací, která potvrdila zvolené podmínky UHPLC–MS/MS analytické metody a poskytla poznatky vhodné pro optimalizaci složení mobilní fáze.

V rámci optimalizace metody byly testovány různé modifikátory mobilní fáze, které následně vedly ke zlepšení analýzy některých problematických analytů (např. loperamidu, buprenorfinu a propranololu). Původní mobilní fáze, složená z 0,01% mravenčí kyseliny a acetonitrilu, byla po optimalizaci nahrazena mobilní fází složenou z 0,01% mravenčí kyseliny a methanolu. Tato výměna organické fáze upravila odezvy 16 problémových analytů s nesymetrickým a chvostujícím tvarem píku. Následně byla provedena zkrácená validace analytické metody pro pitné a odpadní vody. Validací byly ověřeny základní validační parametry a pro většinu analytů bylo dosaženo výtěžnosti 70 – 120 %, s opakovatelností stanovení do 20 %.

V druhé části praktické diplomové práce byl proveden monitoring 52 analytů léčiv v reálných vzorcích pitných a odpadních vod na území České republiky. Pro monitoring léčiv v pitných vodách bylo analyzováno 15 vzorků kohoutkových a podzemních vod, kdy v každém vzorku byl stanoven alespoň jeden analyt nad limitem stanovitelnosti. Analyt, detekovaný prakticky ve všech vzorcích, byl iomeprol, tedy jodová kontrastní látka s průměrnou hodnotou koncentrace $0,090 \mu\text{g L}^{-1}$. Karbamazepin byl nalezen v 7 vzorcích s průměrnou koncentrací $0,122 \mu\text{g L}^{-1}$. Ve 4 vzorcích byl nalezen gabapentin s nejvyšší průměrnou hodnotou koncentrace $0,178 \mu\text{g L}^{-1}$. Dále byly ve vzorcích stanoveny na relativně nízkých koncentračních hladinách léčiva iopamidol, gemfibrozil, tramadol, sulfamethoxazol, kofein, chloramfenikol, valsartan, sulfamethazin, a sotalol.

Vedle vzorků pitných vod byly analyzovány i vzorky odpadních vod (celkem 18 vzorků), kdy v každém vzorku byl detekován alespoň jeden analyt nad limitem stanovitelnosti. Iomeprol byl stanoven v 17 vzorcích, a to na relativně vysoké koncentraci, (průměrná hodnota $875 \mu\text{g L}^{-1}$), v 10 vzorcích byl stanoven iopromid s průměrnou hodnotou koncentrace $48,8 \mu\text{g L}^{-1}$. Gabapentin byl stanoven ve všech testovaných vzorcích, jeho průměrná koncentrace byla $29,9 \mu\text{g L}^{-1}$. Kofein byl detekován

v 10 vzorcích s průměrnou hodnotou koncentrace $38,5 \mu\text{g L}^{-1}$ a v 8 vzorcích byl nalezen furosemid s průměrnou hodnotou koncentrace $9,66 \mu\text{g L}^{-1}$. V 6 vzorcích byl stanoven také paracetamol s průměrnou hodnotou koncentrace $82,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Mezi další léčiva, stanovená ve vzorcích s relativně vysokou průměrnou koncentrací patří: metronidazol ($7,50 \mu\text{g L}^{-1}$), sulfamethoxazol ($4,93 \mu\text{g L}^{-1}$), tramadol ($3,52 \mu\text{g L}^{-1}$), trimethoprim ($3,06 \mu\text{g L}^{-1}$), hydrochlorothiazid ($2,38 \mu\text{g L}^{-1}$), diklofenak ($1,33 \mu\text{g L}^{-1}$), naproxen ($0,98 \mu\text{g L}^{-1}$), metoprolol ($0,97 \mu\text{g L}^{-1}$), valsartan ($0,91 \mu\text{g L}^{-1}$) a karbamazepin ($0,73 \mu\text{g L}^{-1}$). Výsledky získané analýzou odpadních vod byly téměř shodné s hodnotami získanými z monitoringů, které byly v uplynulých letech publikovány v českých i světových odborných studiích.

Metoda UHPLC–MS/MS byla dále použita pro porovnání účinnosti odstranění léčiv v čistírnách odpadních vod na území České republiky. Analyzováno bylo 20 vzorků z 10 čistíren, kdy byl vždy analyzován přítok a navazující odtok z dané ČOV. Většina analytů byla po průchodu ČOV odstraněna s účinností vyšší jako 70 %. Paracetamol byl nalezen v přítocích všech 10 ČOV v průměrné koncentraci $38,9 \mu\text{g L}^{-1}$ a byl odstraněn s 100% účinností. Ve všech analyzovaných vzorcích byl taky nalezen kofein, který byl odstraňován s úspěšností 97 %. Mezi analyty, které byly odstraněny s účinností vyšší jak 80 % patří: ketoprofen (96 %), naproxen (92 %), atenolol (88 %), valsartan (85 %) a gabapentin (83 %). Nižší účinnost odstranění byla zjištěna u léčiv: furosemid (75 %), metoprolol (75 %), iomeprol (71 %), citalopram (53 %), sulfamethoxazol (52 %), zolpidem (47 %), hydrochlorothiazid (45 %), iopromid (43 %), tramadol (39 %), karbamazepin (35 %), oxazepam (12,4 %) a diklofenak (2,5 %). U čtyř analytů léčiv byla nalezena vyšší koncentrace v odtoku ČOV, účinnost je tedy záporná: warfarin (-9,5 %), indomethacin (-53 %), trimethoprim (-54 %) a metronidazol (-110%).

Na základě získaných výsledků je zřejmé, že léčiva představují pro environmentální prostředí stejnou zátěž, jako například pesticidy. Do budoucna by se tedy i těmto kontaminantům měla věnovat soustavná pozornost, nastavit legislativní limity, ale především testovat a definovat procesy, které povedou k degradaci a postupnému odbourávání těchto látek z vod a životního prostředí.

6 Seznam použitých zdrojů

- [1] Sýkora V.; Kujalová H.; Pitter P.: *Hydrochemie: pro studenty bakalářského studia*. Praha, VŠCHT Praha 2016.
- [2] World Health Organization: *Pharmaceuticals in drinking-water*. Switzerland, WHO 2011.
- [3] Silva B.; Costa F.; Neves C. I.; Tavares T.: *Psychiatric Pharmaceuticals as Emerging Contaminants in Wastewater*. Springer 2015.
- [4] Cizmas L.; Sharma V. K.; Gray C. M.; McDonald T. J.: Pharmaceuticals and personal care products in waters: occurrence, toxicity, and risk. *Environmental chemistry letters* **13**:4, 381–394 (2015).
- [5] Hynie S.: *Farmakologie v kostce*. Praha, TRITON 2001.
- [6] Slíva J.; Votava M.: *Farmakologie*. Praha, TRITON 2011.
- [7] Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech). [on-line] Dostupné z URL: <<https://www.podnikatel.cz/zakony/zakon-o-lecivech-a-o-zmenach-nekterych-souvisejicich-zakonu-zakon-o-lecivech/f3827712/#aktualni-zneni>> [cit. 12.5.2020]
- [8] Švihovec J.; Bultas J.; Anzenbacher P.; Chládek J.; Příborský J.; Slíva J.; Votava M. a kol.: *Farmakologie*. Praha, Grada Publishing 2018.
- [9] World Health Organization: *Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification*. [on-line] Dostupné z URL: <https://www.who.int/medicines/regulation/medicines-safety/toolkit_atc/en/> [cit. 4.3.2020]
- [10] Martínková J.; Chládek J.; Mičuda S.; Chládková J.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha, Grada Publishing 2018.

- [11] Státní ústav pro kontrolu léčiv: *Dodávky léčivých přípravků v ČR v jednotlivých letech*. [on-line] Dostupné z URL: <<http://www.sukl.cz/dodavky-leciv-v-ceske-republice-v-jednotlivych-letech>> [cit. 28.4.2020]
- [12] World Health Organization: *Introduction to DDD Indicators*. [on-line] Dostupné z URL: <https://www.who.int/medicines/regulation/medicines-safety/toolkit_indicators/en/> [cit. 4.3.2020]
- [13] Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj: *Pharmaceutical Market*. [on-line] Dostupné z URL: <https://stats.oecd.org/Index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC#> [cit. 4.3.2020]
- [14] Vymazal J.; Dvořáková Březinová T.; Koželuh M.; Kule L.: Occurrence and removal of pharmaceuticals in four full-scale constructed wetlands in the Czech Republic – the first year of monitoring. *Ecological Engineering* **98**, 354–364 (2016).
- [15] Mackuřák T.; Medvecká E.; Staňová A. V.; Brandeburová P.; Grabic R.; Golovko O.; Marton M.; Bodík I.; Medved'ová A.; Gál M.; Planý M.; Kromka A.; Špalková V.; Škulcová A.; Horáková I.; Vojs M.: Boron doped diamond electrode – The elimination of psychoactive drugs and resistant bacteria from wastewater. *Vacuum* **171** (2020).
- [16] Marsik P.; Rezek J.; Židková M.; Kramulová B.; Tauchen J.; Vaňek T.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the watercourses of Elbe basin in Czech Republic. *Chemosphere* **171**, 97–105 (2017).
- [17] Campos-Manas M. C.; Plaza-Bolanos P.; Sánchez-Pérez J. M.; Sixto M.; Agüera A.: Fast determination of pesticides and other contaminants of emerging concern in treated wastewater using direct injection coupled to highly sensitive ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1507**, 84–94 (2017).

- [18] Bade R.; Rousis I. N.; Bijlsma L.; Gracia-Lor E.; Castiglioni S.; Sancho V. J.; Hernandez F.: Screening of pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and surface waters of Spain and Italy by high resolution mass spectrometry using UHPLC-QTOF MS and LC-LTQ-Orbitrap MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **407**, 8979–8988 (2015).
- [19] Ferrer-Aguirre A.; Romero-González R.; Vidal J. M.; Frenich A. G.: Simple and quick determination of analgesics and other contaminants of emerging concern in environmental waters by on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1446**, 27–33 (2016).
- [20] Afonso-Olivares C.; Sosa-Ferrera Z.; Santana-Rodríguez J.: Occurrence and environmental impact of pharmaceutical residues from conventional and natural wastewater treatment plants in Gran Canaria (Spain). *Science of the Total Environment* **559–600**, 5934–5943 (2017).
- [21] Gómez-Canela C.; Sala-Comorera T.; Pueyo V.; Barata C.; Lacorte S.: Analysis of 44 pharmaceuticals consumed by elderly using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **168**, 55–63 (2019).
- [22] Patrolecco L.; Capri S.; Ademollo N.: Occurrence of selected pharmaceuticals in the principal sewage treatment plants in Rome (Italy) and in the receiving surface waters. *Environmental Science and Pollution Research* **22**:8, 5864–5876 (2014).
- [23] Bruce P.; Jane Y.; Barden R.; Kasprzyk-Hordern B.: Multi-residue analysis of 90 emerging contaminants in liquid and solid environmental matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1431**, 64–78 (2016).
- [24] Miller H. T.; McEneff L. G.; Brown J. R.; Owen F. S.; Bury R. N.; Barron P. L.: Pharmaceuticals in the freshwater invertebrate, *Gammarus pulex*, determined using

pulverised liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment* **511**, 153–160 (2015).

- [25] Nannou I. Ch.; Kosma I. Ch.; Albanis A. T.: Occurrence of pharmaceuticals in surface waters: analytical method development and environmental risk assessment. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **95**, 1242–1262 (2015).
- [26] Borova L. V.; Maragou C. N.; Gago-Ferrero P.; Pistos C.; Thomaidis S. N.: Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**, 4273–4285 (2014).
- [27] Pugajeva I.; Rusko J.; Perkons I.; Lundanes E.; Bartkevics V.: Determination of pharmaceutical residues in wastewater using high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **133**, 64–74 (2017).
- [28] Baz-Lomba J. A.; Reid J. M.; Thoma V. K.: Target and suspect screening of psychoactive substances in sewagebased. *Analytica Chimica Acta* **914**, 81–90 (2016).
- [29] Klančar A.; Trontelj J.; Roštar R.: Development of a Multi-Residue Method for Monitoring 44 Pharmaceuticals in Slovene Surface Water by SPE-LC-MS/MS. *Water, Air, & Soil Pollution*, **229**:192 (2018).
- [30] Brieudes V.; Lardy-Fontan S.; Lalere B.; Vaslin-Reimann S.; Budzinski H.: Validation and uncertainties evaluation of an isotope dilution-SPE-LC-MS/MS for the quantification of drug residues in surface waters. *Talanta* **146**, 138–147 (2016).
- [31] Paíga P.; Santos L. H. M. L. M.; Delerue-Matos C.: Development of a multi-residue method for the determination of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in aqueous environmental matrices by SPE-UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **135**, 75–86 (2016).

- [32] McCullagh J.; Oldham N.: *Mass Spectrometry*. Oxford, Oxford University Press 2019.
- [33] Buchberger W. W.: Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Analytica Chimica Acta* **593**, 129–139 (2007).
- [34] Jakimska A.; Śliwka-Kaszyńska M.; Reszczyńska J.; Namieśnik J.; Kot-Wasik A.: Elucidation of transformation pathway of ketoprofen, ibuprofen, and furosemide in surface water and their occurrence in the aqueous environment using UHPLC-QTOF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **406**:15, 3667–3680 (2014).
- [35] Saikh M. W.; AlOthman A. Z.; Siddiqui R. M.; Mohsin K.; Bousiakou G. L.; Karikas A. G.: UPLC–MS method for the simultaneous determination of naproxen, fluvastatin and ibuprofen in waste water samples. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **24**, 302–307 (2015).
- [36] González-Curbelo M.; B., Socas-Rodríguez Á.; Herrera-Herrera A. V.; González-Sálamo J.; Hernández-Borges J.; Rodríguez-Delgado M. Á.: Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry* **71**, 169–185 (2015).
- [37] Cerqueira B. R. M.; Guilherme R. J.; Caldas S. S.; Martins L. M.; Zanella R.; Primel G. E.: Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. *Chemosphere* **107**, 74–82 (2014).
- [38] Khan A.; Shams D. F.; Khan W.; Ijaz A.; Qasim M.; Saad M.; Hafeez A.; Baig A. S.; Ahmed N.: Prevalence of selected pharmaceuticals in surface water receiving untreated sewage in northwest Pakistan. *Environmental Monitoring and Assessment* **190**:324 (2018).
- [39] Primrose N. N.; Naicker D.; Ncube S.; Chimuka L.; Mzukisi M. L.: Determination of naproxen, diclofenac and ibuprofen in Umgeni estuary and seawater: A case of

northern Durban in KwaZulu–Natal Province of South Africa. *Regional Studies in Marine Science* **29** (2019).

- [40] Afonso-Olivares C.; Čadková T.; Sosa-Ferrera Z.; Santana-Rodríguez J. J.; Nováková L.: Simplified solid-phase extraction procedure combined with liquid chromatography tandem–mass spectrometry for multiresidue assessment of pharmaceutical compounds in environmental liquid samples. *Journal of Chromatography A* **1487**, 54–63 (2017).
- [41] Vávrová M.; Landová P.; Švestková T.; Burešová J.: Stanovení ibuprofenu a diklofenaku v povrchových vodách metodou LC-MS-MS. *Chemické Listy* **112**, 329–332 (2018).
- [42] Radović T.; Grujić S.; Petković A.; Dimkić M.; Laušević M.: Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. *Environmental Monitoring and Assessment* **187**:4092 (2015).
- [43] Vergeynst L.; K'oreje K.; De Wispelaere P.; Harinck L.; Van Langenhove H.; Demeestere K.: Statistical procedures for the determination of linearity, detection limits and measurement uncertainty: a deeper look into SPE-LC-Orbitrap mass spectrometry of pharmaceuticals in wastewater. *Journal of Hazardous Materials* **323**, 2–10 (2016).
- [44] Becerra-Herrera M.; Honda L.; Richter P.: Ultra-high-performance liquid chromatography - Time-of-flight high resolution mass spectrometry to quantify acidic drugs in wastewater. *Journal of Chromatography A* **1423**:4, 96–103 (2015).
- [45] Boix C.; Ibáñez M.; Fabregat-Safont D.; Morales E.; Pastor L.; Sancho J. V.; Sánchez-Ramírez J. E.; Hernández F.: Analytical methodologies based on LC–MS/MS for monitoring selected emerging compounds in liquid and solid phases of the sewage sludge. *MethodsX* **3**, 33–342 (2016).

- [46] Hong Y.; Lee I.; Lee W.; Kim H.: Mass-balance-model-based evaluation of sewage treatment plant contribution to residual pharmaceuticals in environmental waters. *Chemosphere* **225**, 378–387 (2019).
- [47] Aristizabal-Ciro C.; Botero-Coy M. A.; López J. F.; Penuela A. G.: Monitoring pharmaceuticals and personal care products in reservoir water used for drinking water supply. *Environmental Science and Pollution Research* **24**:8, 7335–7347 (2017).
- [48] Greenham T. R.; Miller Y. K.; Tong A.: Removal efficiencies of top-used pharmaceuticals at sewage treatment plants with various technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **7** (2019).
- [49] Carmona E.; Andreu V.; Picó Y.: Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish - Turia River as case study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **146**, 117–125 (2017).
- [50] He K.; Yonetani T.; Asada Y.; Echigo S.; Itoh S.: Simultaneous determination of carbamazepine-N-glucuronide and carbamazepine phase I metabolites in the wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal* **145**, 1191–1198 (2019).
- [51] Subedi B.; Kannan K.: Occurrence and fate of select psychoactive pharmaceuticals and antihypertensives in two wastewater treatment plants in New York State, USA. *Science of the Total Environment* **514**, 273–280 (2015).
- [52] Fifield F. W.; Kealey D.: *Principles and practice of analytical chemistry*. Oxford, Blackwell Science Ltd 2000.
- [53] Skoog D. A.; West D. M.; Holler F. J.; Crouch S. R.: *Analytická chemie*. Praha, VŠCHT 2019.
- [54] Fifield F. W.; Kealey D.: *Principles and practice of analytical chemistry*. Oxford, Blackwell Science Ltd 2000.

- [55] Nováková L.; Douša M.; Blatný P.; Jandera P.; Planeta J.; Maier V.; Znaleziiona J.: *Moderní HPLC v teori a praxi I*. Praha, Lucie Nováková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy) 2013.
- [56] Nováková L.; Douša M.; Blatný P.; Jandera P.; Planeta J.; Maier V.; Znaleziiona J.: *Moderní HPLC v teori a praxi II*. Praha, Lucie Nováková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy) 2013.
- [57] Rozhodnutí Komise evropských společenství (2002/657/ES): směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků. [on-line] Dostupné z URL: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32002D0657&from=EN>> [cit. 18.6.2020]
- [58] European commission: Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document SANTE/11813/2017. [on-line] Dostupné z URL: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf> [cit. 18.6.2020]