

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Bc. Anna Schmidová

Optimalizace metody QuEChERS pro stanovení farmaceutických látek v pevných matricích
Optimisation of QuEChERS method for determination of pharmaceuticals in solid matrices

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Sobotníková, Ph.D.

Konzultanti: Ing. Taťána Halešová

Ing. Marta Václavíková, Ph.D.

Praha, 2025

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 13. 5. 2025

Abstrakt

Farmaceutické látky představují významný zdroj environmentální zátěže, přičemž jejich přítomnost v čistírenských kalech může omezovat možnosti využití kalů v zemědělství. Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci extrakční metodiky QuEChERS pro stanovení farmaceutických látek v čistírenských kalech za použití kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Optimalizace extrakčního procesu byla rozčleněna do tří experimentů, které byly vždy zaměřeny na klíčové kroky úpravy vzorků pevné matrice tak, aby byl extrakční postup co nejefektivnější a výtěžnosti cílových analytů nejvyšší.

Optimalizovaný postup byl aplikován na vzorky čistírenských kalů z České republiky. Výsledky potvrdily, že optimalizovaná metoda umožňuje stanovení farmaceutických látek i v tak komplexní matici jako je čistírenský kal. Provedená analýza a monitoring několika reálných kalů zároveň odhalily přítomnost farmaceutických látek v těchto vzorcích, a to na koncentracích, které mohou představovat potenciální riziko pro životní prostředí.

Optimalizovaná metoda poskytuje spolehlivý nástroj pro přesné monitorování farmaceutických látek v pevných maticích. Metoda může být také využita pro rozsáhlejší monitoring osudu farmaceutik v environmentálních systémech.

Klíčová slova: kapalinová chromatografie (LC), hmotnostní spektrometrie (MS), léčiva, metabolity, QuEChERS metoda, odpadní vody, kaly a sedimenty, životní prostředí

Abstract

Pharmaceutical compounds represent a significant source of environmental burden, and their presence in sewage sludge can limit the potential use of sludge in agriculture. This study focuses on optimizing the QuEChERS method for the determination of pharmaceutical compounds in sewage sludge using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The optimization of the extraction process was divided into three experiments, each addressing key steps in the preparation of solid matrix samples to ensure the extraction process is as efficient as possible and achieves the highest recovery of target analytes.

The optimized procedure was applied to sewage sludge samples collected in the Czech Republic. The results confirmed that the optimized method is capable of detecting pharmaceutical compounds even in a complex matrix such as sewage sludge. The analysis and monitoring of several real-world sludge samples also revealed the presence of pharmaceutical compounds at concentrations that could pose potential risks to the environment.

The optimized method provides a reliable tool for accurately monitoring pharmaceutical compounds in solid matrices. It can also be employed for broader monitoring of the fate of pharmaceuticals in environmental systems.

Key words: liquid chromatography (LC), mass spectrometry (MS), pharmaceuticals, metabolites, QuEChERS method, wastewater, sludges and sediments, environment

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Janě Sobotníkové, Ph.D., za její odborné vedení diplomové práce. Dále Ing. Taťáně Halešové a Ing. Martě Václavíkové, Ph.D., vyjadřuji upřímné poděkování za jejich výjimečnou pomoc a dohled nad mou diplomovou prací v ALS Czech Republic.

V poslední řadě bych ráda poděkovala své rodině a všem blízkým za podporu a pomoc po celou dobu mého studia.

Obsah

Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Poděkování.....	5
Obsah	6
Použité zkratky.....	8
1. Úvod	10
2. Cíle práce.....	11
3. Teoretická část	12
3.1. Léčiva	12
3.1.1. Popis léčiv.....	12
3.1.2. Klasifikace léčiv.....	12
3.1.3. Farmakologické skupiny.....	13
3.1.4. Osud léčiv v těle.....	21
3.1.5. Spotřeba léčiv.....	22
3.2. Léčiva v životním prostředí.....	24
3.2.1. Koloběh léčiv v životním prostředí.....	24
3.3. Čistírny odpadních vod	25
3.3.1. Čistící kroky na ČOV	26
3.3.2. Kalové hospodářství	29
3.3.3. Legislativa spojená s použitím kalů na zemědělské půdě	32
3.3.4. Kumulace léčiv v kalech a jejich monitoring	33
3.4. Analýza léčiv	35
3.4.1. QuEChERS	35
3.4.2. Kapalinová chromatografie.....	36
3.4.3. Hmotnostní spektrometrie.....	37

4.	Experimentální část	40
4.1.	Laboratorní a přístrojové vybavení	40
4.2.	Chemikálie	40
4.3.	Zásobní roztoky a vzorky	41
4.4.	Kalibrace	41
4.5.	Optimalizace metody	42
4.5.1.	Klíčoví zástupci měřených farmaceutických látek	43
4.5.2.	Experiment 1	49
4.5.3.	Experiment 2	51
4.5.4.	Experiment 3	52
4.6.	Analýza reálných vzorků	53
4.7.	Parametry metody	59
5.	Výsledky a diskuse	68
5.1.	Experiment 1	70
5.2.	Experiment 2	77
5.3.	Experiment 3	81
5.4.	Monitoring kalů z ČOV v ČR	86
6.	Závěr	89
7.	Literatura	90
8.	Naměřená data vzorků kalů z ČOV v ČR	96

Použité zkratky

1Q – první čtvrtletí

5-FU – 5-fluorouracil

ACN – acetonitril

AOX – halogenované organické sloučeniny

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

ATC – anatomicko-terapeuticko-chemická klasifikace léčiv

BSK – biochemická spotřeba kyslíku

CAS RN – registrační číslo podle Chemical Abstracts Service

CHSK – chemická spotřeba kyslíku

CNS – centrální nervová soustava

COX – cyklooxygenáza

ČOV – čistírna odpadních vod

ČR – Česká republika

DC – stejnosměrné napětí

DDD/1000/den – definovaná denní dávka na 1000 obyvatel za den

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EO – ekvivalentní počet obyvatel

ESI – elektrosprejová ionizace

GABA – kyselina gama-aminomáselná

GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-MS/MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

HVLP – hromadně vyráběný léčivý přípravek

IVLP – individuálně vyráběný léčivý přípravek

LC – kapalinová chromatografie

LDL – nízkodenzitní lipoprotein

MF – mobilní fáze

MS – hmotnostní spektrometrie

n. c. – nevypočítáno (z ang. *not calculated*)

n. d. – nedetekováno (z ang. *not detected*)

NP – normální fáze

NSAID – nesteroidní protizánětlivé léky

PAU – polyaromatické uhlovodíky

PCB – polychlorované bifenyly

PSA – primární a sekundární aminy

QuEChERS – rychlá, snadná, levná, efektivní, robustní a bezpečná metoda přípravy vzorků

(z ang. *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*)

RF – střídavé napětí

RNA – ribonukleová kyselina

RP – reverzní fáze

SF – stacionární fáze

SPE – extrakce na pevné fázi

TCC – triklokarban

USA – Spojené státy americké

UV – ultrafialové záření

1. Úvod

V posledních letech se stále častěji vede diskuse o vlivu farmaceutických látek a jejich metabolitů na životní prostředí. Tyto látky se do odpadních vod dostávají především prostřednictvím lidské činnosti, například vylučováním farmaceutik a jejich metabolitů po užívání léčiv nebo jejich nesprávnou likvidací. Problémem je, že čistírny odpadních vod nejsou běžně navrženy k jejich úplnému odstranění, což vede k jejich hromadění v různých složkách prostředí, včetně čistírenských kalů¹.

Čistírenské kaly jsou významným vedlejším produktem zpracování odpadních vod a mají potenciální využití například v zemědělství jako hnojivo. Přítomnost farmaceutických látek v čistírenských kalech však může představovat významná environmentální i zdravotní rizika, zejména pokud jsou tyto kaly využívány například v zemědělství². Navzdory těmto rizikům zatím neexistuje žádná závazná legislativa, která by nařizovala povinné sledování farmaceutických látek v kalech či odpadních vodách. Tato absence právních předpisů zdůrazňuje potřebu vědeckého výzkumu, který by poskytl údaje pro lepší pochopení rozsahu tohoto problému a jeho potenciálních dopadů na životní prostředí.

Jednou z metod, které se ukazují jako vhodné pro analýzu farmaceutických látek v kalech, je extrakční a předčišťovací metoda QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) spojená s kapalinovou chromatografií a tandemovou hmotnostní detekcí analytů (LC-MS/MS). Tato metoda byla původně vyvinuta pro analýzu pesticidů v potravinách³, avšak ukázalo se, že její flexibilita a jednoduchost umožňuje aplikaci tohoto postupu na jiné komplexní a složité matrice, včetně čistírenských kalů⁴. Ve spojení s technikou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) představuje QuEChERS efektivní nástroj pro kvantifikaci farmaceutických látek v těchto matricích i při jejich nízkých koncentracích⁵.

Cílem této diplomové práce je optimalizace přípravné metody QuEChERS pro stanovení farmaceutických látek v čistírenských kalech z čistíren odpadních vod. Tento výzkum přispěje ke zlepšení monitorování farmaceutických látek v odpadech a k pochopení jejich osudu v environmentálním systému.

2. Cíle práce

Hlavní cíle této diplomové práce jsou:

- Optimalizovat kroky extrakční přípravné metody QuEChERS metody tak, aby byla vhodná pro multireziduální LC-MS analýzu farmak a jejich metabolitů v pevných maticích.
- Využít a otestovat optimalizovanou metodu LC-MS/MS pro rutinní stanovení a monitoring farmaceutických látek v reálných vzorcích čistírenských kalů.

3. Teoretická část

3.1. Léčiva

3.1.1. Popis léčiv

Léčivem označujeme látky nebo jejich směsi, které slouží k výrobě léčivých přípravků. Hromadně vyráběné léčivé přípravky (HVLP) se produkují průmyslově ve velkých množstvích, na rozdíl od individuálně vyráběných léčivých přípravků (IVLP), které jsou vyrobeny na základě konkrétního lékařského předpisu pro jednotlivého pacienta v lékárně. Tyto přípravky jsou určeny k podávání lidem nebo zvířatům za účelem diagnózy, prevence nebo zmírnění průběhu onemocnění. Léčiva mohou mít různé formy podání, jako je perorální, injekční, inhalační, nebo lokální aplikace na kůži či sliznice. Kromě účinných léčivých látek obsahují lékové formy také pomocné látky, které nemají vlastní léčebný účinek, ale zajišťují stabilitu, účinnost, bezpečnost a přijatelnou formu přípravku pro pacienta (např. chuť, vůně, konzistence).

3.1.2. Klasifikace léčiv

Léčiva lze klasifikovat podle různých kritérií. V předchozím odstavci bylo zmíněno dělení podle způsobu výroby (HPLP, IVLP) a podle formy podání (perorální, injekční, inhalační, lokální). Dalšími způsoby klasifikace jsou například podle: i) terapeutického použití (kardiovaskulární systém, nervová soustava, dýchací ústrojí); ii) mechanismu účinku (antihypertenziva, analgetika, antiastmatika); iii) chemické struktury (tetracykliny, betalaktamy, benzodiazepiny); iv) a podle režimu výdeje (volný prodej, léčiva na předpis, kontrolované látky).

Pro zajištění lepší přehlednosti byl vyvinut systém anatomicko-terapeuticko-chemické klasifikace (ATC), který standardizuje klasifikaci léčiv na základě mezinárodně uznávaných kritérií. Každému léčivu je přiřazen unikátní ATC kód, který se skládá z písmen a číslic, označujících pět úrovní:

- a. První úroveň, reprezentovaná jedním písmenem, rozděluje léčiva podle anatomické soustavy, na kterou účinná látka působí (viz Tabulka 1, strana 13).
- b. Druhá úroveň, označená dvěma číslicemi, specifikuje hlavní terapeutickou nebo farmaceutickou podskupinu.

- c. Třetí a čtvrtá úroveň, označena dvěma písmeny, poskytuje informace o chemické, terapeutické a farmakologické podskupině.
- d. Pátá úroveň, tvořena dvěma číslicemi, identifikuje konkrétní účinnou látku.

Například diazepam spadá do hlavní skupiny léčiv ovlivňujících nervovou soustavu (N). Z hlediska terapeutického účinku patří mezi psychotropní látky (05). V rámci farmakologického účinku je klasifikován jako anxiolytikum, sedativum a hypnotikum (B). Podle chemické struktury patří mezi benzodiazepiny (A), přičemž poslední dvojčíslí (01) označuje konkrétně diazepam. Celý ATC kód diazepamu je tedy N05BA01.⁶

Tabulka 1: Seznam anatomických soustav přiřazených k písmenným označením první úrovně⁷

Písmeno první úrovně	Příslušná anatomická soustava
A	Trávicí trakt a metabolismus
B	Krev a krve tvorné orgány
C	Kardiovaskulární systém
D	Dermatologika
G	Urogenitální trakt a pohlavní hormony
H	Systémová hormonální léčiva kromě pohlavních hormonů a insulinů
J	Antiinfektiva pro systémovou aplikaci
L	Cytostatika a imunomodulační léčiva
M	Muskuloskeletární systém
N	Nervový systém
P	Antiparazitika, insekticidy a repelenty
R	Respirační systém
S	Smyslové orgány
V	Různé přípravky

3.1.3. Farmakologické skupiny

α -blokátory

Mezi α_1 -sympatolytika patří např. alfuzosin, který se používá při terapii benigní hyperplazie prostaty. Způsobuje snížení tonu hladké svaloviny v oblasti krčku močového měchýře a prostaty a usnadňuje tak močení^{8,9}.

β -blokátory (β -sympatolytika)

Antagonisté β -adrenoreceptorů jsou první volbou při léčbě srdečního selhání. Používají se také při ischemické chorobě srdeční (ICHS), fibrilaci síní, hypertenzi komplikované srdečním selháním, angině pectoris nebo po infarktu myokardu. Systematicky se tyto látky vyznačují společnou koncovkou „-ol“, například acebutolol, atenolol, bisoprolol, celiprolol, metoprolol, propranolol, sotalol¹⁰.

β -sympatomimetika

Salbutamol, známý také jako albuterol, a terbutalin jsou selektivní agonisté β_2 -adrenoreceptorů, které vedou k relaxaci hladkého svalstva dýchacích cest. Tyto léky se aplikují lokálně inhalací při bronchiálním astmatu a dalších obstrukčních plicních nemocech. Mohou být tak použity preventivně^{11,12}.

Analgetika

Opioidní analgetika jsou látky, které se vážou na opioidní receptory nervových buněk. Mají tlumivé účinky – snižují bolesti a tlumí kašel. Zástupci této skupiny jsou buprenorfin, butorfanol a tramadol¹³.

Antipyretická analgetika kromě tlumení bolesti také snižují zvýšenou tělesnou teplotu. Jejich mechanismus účinku není dosud plně objasněn. Řadíme sem paracetamol a fenazon⁸.

Antiarytmika

Mechanismus účinku disopyramidu spočívá v blokování sodíkových kanálů v srdci, což vede k prodloužení trvání akčního potenciálu buněk srdečního svalu a upravuje tak nepravidelnosti srdečního rytmu⁸.

Antibiotika

Antibiotika jsou farmakologické látky používané k léčbě bakteriálních infekcí. Rozlišujeme dva hlavní účinky antibiotik: baktericidní, který bakterie usmrcuje, a bakteriostatický, který zabraňuje jejich množení. Pokud bakterie na danou látku nereaguje, jde o rezistenci, která může být buď získaná, nebo přirozená. Antibiotika lze také klasifikovat podle spektra účinku na úzkospektrální nebo širokospektrální, v závislosti na tom, na kolik bakteriálních druhů mají efekt. Dále antibiotika rozdělíme podle jejich mechanismu účinku⁸.

Inhibitory syntézy buněčné stěny, například β -laktamy, jako jsou amoxicilin, benzylpenicilin a kloxacilin, působí tak, že se vážou na penicilinové vazebné proteiny

(PBPs) a inhibují enzym transpeptidázu. Tento zásah brání tvorbě peptidoglykanové sítě, která je nezbytná pro pevnost a integritu bakteriální stěny, což vede k oslabení buněčné stěny a následnému usmrcení bakterie¹⁴. Vankomycin, glykopeptidové antibiotikum, také inhibuje syntézu buněčné stěny, ale váže se přímo na D-alanyl-D-alaninové zbytky prekurzorů peptidoglykanu, čímž zabraňuje jejich polymerizaci¹⁵.

Inhibitory biosyntézy proteinů dělíme na inhibitory 30S a 50S ribozomálních podjednotek. Inhibitory 30S, například tetracykliny (oxytetracyklin, doxycyklin, tetracyklin, chlortetracyklin, metacyklin), blokují vazbu tRNA na mRNA, čímž brání přidávání aminokyselin do rostoucího polypeptidového řetězce¹⁶. Inhibitory 50S, zahrnující chloramfenikol, makrolidy (azithromycin, klarithromycin, erythromycin, roxithromycin, tiamulin) a linkosamidy (klindamycin a linkomycin), ovlivňují proces translace tím, že blokují vazbu aminoacyl-tRNA nebo zabraňují tvorbě peptidových vazeb. Tento zásah brání syntéze bílkovin a vede k zastavení růstu bakterií (bakteriostatický účinek)^{17,18}.

Chinolony inhibují replikaci DNA tím, že narušují enzymy topoizomerázu IV a DNA gyrázu, což vede k usmrcení bakterií. Do této skupiny patří ciprofloxacin, enoxacin, kyselina oxolinová, ofloxacin, enrofloxacin, flumechin, lomefloxacin, kyselina nalidixová, norfloxacin a sarafloxacin¹⁹.

Inhibitory metabolismu kyseliny listové zahrnují sulfonamidy (sulfadiazin, sulfamerazin, sulfamethazin, sulfamethizol, sulfamethoxazol, sulfamethoxypyridazin, sulfamonomethoxin, sulfanilamid, sulfapyridin, sulfathiazol, sulfachlorpyridazin) a diaminopyrimidiny (trimethoprim, ormetoprim). Sulfonamidy působí inhibicí enzymu dihydropteroát syntetázy díky své strukturální analogii s PABA (kyselina para-aminobenzoová), což brání vzniku dihydropteroátu, klíčového prekurzoru kyseliny listové^{20,21}. Diaminopyrimidiny inhibují enzym dihydrofolát reduktázu, který je nezbytný pro přeměnu dihydrofolátu na tetrahydrofolát²². Tyto zásahy narušují syntézu DNA a proteinů a vedou k zastavení růstu bakterií. Ormetoprim se využívá především ve veterinární medicíně. Na trhu jsou dostupné také kombinované přípravky obsahující sulfonamidy a diaminopyrimidiny, jako například kotrimoxazol (kombinace sulfamethoxazolu a trimetoprimu)²³.

Metronidazol a ornidazol patří do skupiny nitroimidazolů a jsou odvozené od imidazolu. V anaerobních podmínkách jsou tyto látky redukovány na aktivní formu, která poškozuje DNA mikroorganismů. Tímto mechanismem dochází k přerušení replikace a transkripce genetické informace, což způsobuje zastavení růstu a smrt bakterií a prvoků^{24,25}.

Antidepresiva

Léčiva používaná při léčbě deprese, která se může projevovat pocity úzkosti až se suicidálním rizikem, zahrnují několik skupin antidepresiv.

Tricyklická antidepresiva (TCA) působí blokadou zpětného vychytávání neurotransmiterů, jako jsou serotonin, dopamin a noradrenalin, čímž napomáhají zlepšení nálady. Příkladem je amitriptylin, který má navíc sedativní účinky, což může být vhodné pro některé pacienty.

Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI) zvyšují koncentraci serotoninu v mozku, což přispívá k úlevě od depresivních symptomů. Mezi zástupce této skupiny patří fluoxetin, citalopram a sertralin.

Venlafaxin, zástupce selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI), zvyšuje nejen hladinu serotoninu, ale také noradrenalinu, to může poskytovat širší spektrum účinků⁸.

Mirtazapin, atypické antidepresivum, působí zvýšením hladin noradrenalinu a dopaminu v mozku, čímž napomáhá zlepšení nálady a snížení úzkosti²⁶.

Antidiabetika

Perorální antidiabetika se používají k léčbě diabetu 2. typu, který vzniká v důsledku relativního nedostatku inzulinu. Metformin, derivát biguanidu, snižuje hladinu glykémie. Přesný mechanismus účinku není zcela objasněn, avšak předpokládá se, že omezuje uvolňování glukózy z jater a zlepšuje citlivost tkání na inzulin⁸. Deriváty sulfonylmočoviny, jako je glimepirid, působí stimulací sekrece inzulinu z B-buněk pankreatu, což vede ke snížení hladiny glukózy v krvi²⁷.

Antidiarotika

Antidiarotika se používají při léčbě průjmu a zahrnují různé látky s odlišnými mechanismy účinku. Zástupcem, který bude diskutován v této práci, je loperamid. Loperamid je agonista opioidních receptorů, který nepůsobí na CNS (centrální nervová soustava), ale pouze na periferní receptory ve střevech, čímž zpomaluje peristaltiku a zvyšuje vstřebávání vody, což vede ke zmírnění průjmu^{8,28}.

Antiepileptika

Epilepsie se projevuje záchvaty, které jsou způsobeny nekontrolovatelnými elektrickými výboji v mozku. Terapie závisí na lokalizaci postižené oblasti mozku, příčině výbojů a typu záchvatů. Výběr léčiva se také odvíjí od toho, zda se jedná o profylaxi nebo

akutní léčbu při *status epilepticus*. Mezi používané látky patří tricyklické antiepileptikum karbamazepin a jeho analog oxkarbazepin, dále gabapentin, lamotrigin a primidon⁸. Benzodiazepin klonazepam navíc vykazuje myorelaxační a anxiolytické účinky (viz níže).

Antihistaminika

Fexofenadin je selektivní antagonist H₁-receptorů, který blokuje účinek histaminu a zmírňuje alergické reakce. Patří mezi H₁-antihistaminika 2. generace, která na rozdíl od 1. generace nemají sedativní účinek, protože nepronikají do CNS⁸.

Antihyperlipidemika

Léčiva snižující hladinu lipidů v krvi lze rozdělit do dvou hlavních skupin: statiny a fibráty. Statiny působí inhibicí enzymu HMG-CoA reductázy, který je klíčový pro syntézu cholesterolu v játrech, čímž snižují hladinu LDL cholesterolu. Léčiva v této skupině mají společnou příponu „-statin“, například atorvastatin, lovastatin a simvastatin. Fibráty, jako jsou bezafibrát, kyselina klofibrová a gemfibrozil, primárně snižují hladinu triacylglycerolů a mohou rovněž přispět ke snížení hladiny LDL cholesterolu⁸.

Antihypertenziva

Antihypertenziva jsou léky používané při léčbě hypertenze (vysokého krevního tlaku). Existuje několik skupin těchto léků, z nichž každá působí odlišným mechanismem. Níže jsou uvedeny hlavní skupiny.

Enalapril patří do skupiny inhibitorů angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE inhibitory). Tyto látky blokují přeměnu angiotenzinu I na angiotenzin II, což vede k vazodilataci cév a následného snížení krevního tlaku.

Další významnou skupinou antihypertenziv jsou blokátory receptorů pro angiotensin II (ARBs), které také zasahují do systému renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS). Mechanismus jejich účinku spočívá v blokaci účinků angiotenzinu II díky vysoké afinitě k receptoru AT₁. Tato skupina, často označovaná jako „sartany“ podle jejich přípony, zahrnuje léky jako eprosartan, irbesartan, losartan, telmisartan a valsartan.

Blokátory kalciových kanálů zabraňují vstupu Ca²⁺ do hladkých svalových buněk cév a srdečního svalu, což vede k relaxaci cévního svalstva, vazodilataci a snížení srdeční frekvence. Selektivní účinek léků jako diltiazem a verapamil zvyšuje jejich účinnost v srdečním svalu oproti hladkému svalstvu cév²⁹.

Kromě těchto skupin jsou základními antihypertenzivy také diuretika a β-blokátory (viz výše).

Antikoagulancia

Antikoagulancia se používají k prevenci vzniku trombóz tím, že snižují srážlivost krve. Mezi ně patří antagonisté vitamínu K, jako jsou 4-hydroxykumariny, například warfarin, které blokují účinky vitamínu K potřebného pro syntézu srážecích faktorů⁸.

Antimykotika

K léčbě onemocnění způsobené houbami radíme například triazolový derivát flukonazol a imidazolový derivát klímbazol. Plísňová onemocnění nejčastěji postihují sliznice a kůži, avšak při snížené imunitě mohou vést i k systémovým mykózám. Tyto látky působí jako inhibitory biosyntézy ergosterolu, hlavní složky buněčné membrány hub, čímž narušují její integritu, což vede k úhynu hub^{8,30,31}.

Antiseptika

Triklokraban (TCC) je syntetický biocid využívaný v široké škále antimikrobiálních přípravků. Studie ukazují, že z odpadních vod je TCC odstraněn z 97 %, nicméně značná část této látky se hromadí v čistírenských kalech³². Hlavním rizikem je jeho schopnost pronikat do plodin, jako je ječmen, mrkev či fazole, a dále také způsobovat úhyn ryb a poškození řas v povrchových vodách³³. V České republice (ČR) je maximální povolená koncentrace TCC v oplachových přípravcích stanovena na 1,5 hm. %³⁴.

Benzodiazepiny

Benzodiazepiny jsou psychofarmaka s širokým spektrem účinků, včetně sedativních, hypnotických, anxiolytických, myorelaxačních a antiepileptických. Jejich mechanismus účinku spočívá v navázání na benzodiazepinové receptory v mozku, kde zesilují účinek neurotransmiteru GABA, což vede k tlumení nervové aktivity. Názvy benzodiazepinů často končí příponou „-am“, například diazepam nebo oxazepam⁸.

Blokace UV-B záření

Ensulizol je chemický UV filtr, který absorbuje UV-B záření a přeměňuje ho na infračervené záření, čímž chrání pokožku před škodlivými účinky slunečního záření³⁵.

Cytostatika

Cytotoxické látky se používají k chemoterapii zhoubných (maligních) nádorů. Jejich užití je doprovázeno řadou nežádoucích účinků (neplodnost, alopecie, zvracení, atd.). Cytostatika působí různými mechanismy.

Paklitaxel je tzv. *vřeténkový jed*, který působí jako inhibitor mikrotubulů, čímž zabráňuje jejich depolymerizaci a blokuje mitózu. Cyklofosfamid a ifosfamid jsou alkylující cytostatika, které se vážou kovalentně na DNA, naruší její replikaci a vyvolají buněčnou smrt⁸. Další látkou zasahující do syntézy DNA a RNA je metotrexát, jedná se o antimetabolit zasahující do metabolismu kyseliny listové³⁶.

Nesteroidní inhibitor aromatázy – anastrozol se uplatňuje při léčbě karcinomu prsu. Antiandrogen flutamid se využívá u mužů při karcinomu prostaty⁸.

Kapцитabin je prolečivo užívané perorálně, které se v těle metabolizuje na aktivní formu 5-fluorouracil (5-FU). 5-FU indukuje apoptózu nádorových buněk dvěma mechanismy: zasahuje do replikace DNA a jeho metabolity se začleňují do RNA a DNA³⁷.

Diuretika

Diuretika jsou látky, které působí na ledviny a zvyšují tvorbu moči (diurézu). Mezi sulfonamidová diuretika patří furosemid a hydrochlorthiazid, které se liší svým mechanismem účinku. Furosemid, jako kličkové diuretikum, působí ve vzestupném raménku Henleovy kličky, zatímco hydrochlorthiazid ovlivňuje funkci distálního stočeného kanálku⁸.

Hypnotika

Hypnotika jsou léčiva používaná k léčbě nespavosti. Kromě benzodiazepinů se často používají i látky s nebenzodiazepinovou strukturou, jako například zolpidem. Tyto léky pomáhají navodit spánek a zlepšit jeho kvalitu tím, že se vážou na GABA_A receptory, čímž zvyšují inhibiční účinky GABA v CNS⁸.

Imunosupresiva

Látky potlačující imunitní reakce jsou důležité při transplantacích orgánů a při autoimunitních onemocněních. Cytostatikum azathioprin se používá jako imunosupresivum v nižších dávkách než při léčbě malignit. Mykofenolát mofetil působí jako inhibitor enzymu inozinmonofosfát dehydrogenázy, který je klíčový pro syntézu purinů v lymfocytech. Tím dochází ke snížení proliferace T- a B-lymfocytů, což vede k oslabení imunitní odpovědi⁸.

Kontrastní látky

Amidotrizoát, iohexol, iomeprol, iopamidol a iopromid jsou jódované kontrastní látky. Používají se v diagnostické radiologii pro lepší vizualizaci orgánů a struktur v těle. Jódované látky absorbují rentgenové paprsky, zvyšují tak kontrast na snímcích³⁸.

Léčiva používaná k terapii peptidického vředu a refluxní choroby jícnu

K terapii žaludečního nebo duodenálního vředu se používají látky, které snižují produkci kyseliny, chrání sliznici nebo eliminují infekci *Helicobacter pylori*. V žaludku jsou přítomny H_2 receptory, jejichž blokace pomocí H_2 -antihistaminik, jako je ranitidin, vede ke snížení sekrece žaludeční kyseliny (HCl). V současné době není v České republice dostupný žádný přípravek obsahující ranitidin. Omeprazol je inhibitor protonové pumpy, který blokuje H^+/K^+ -ATPázu, a tím účinně inhibuje sekreci kyseliny v žaludku⁸.

Léčiva na Alzheimerovu chorobu

Galantamin se podává pro zlepšení kognitivních funkcí u pacientů v počátečních fázích Alzheimerovy choroby. Působí centrálně jako inhibitor enzymu acetylcholinesterázy, čímž se zvyšuje koncentrace acetylcholinu na synapsi⁸. Při pokročilém stádiu nemoci se může podávat memantin, ten funguje jako agonista N-methyl-D-aspartátu (NMDA)^{39,40}.

Myorelaxancia

Cyklobenzaprin, centrálně působící svalový relaxant, se používá k léčbě svalových křečích⁴¹. Tento lék však není dostupný jako léčivý přípravek v České republice.

Nesteroidní antiflogistika (NSAID)

Nesteroidní antiflogistika (NSAID) působí jako reverzibilní inhibitory cyklooxygenáz (COX), což ovlivňuje syntézu prostaglandinů. Díky tomu mají analgetický, antipyretický a protizánětlivý účinek. Mezi běžně používané NSAID patří diklofenak, ibuprofen, meloxicam, indomethacin, ketoprofen, naproxen, nimesulid, piroxicam^{8,42,43}. Kyselina acetylsalicylová se od ostatních NSAID liší tím, že je ireverzibilním inhibitorem COX, přesto však vykazuje stejné účinky⁸. Po podání se v gastrointestinálním traktu metabolizuje na kyselinu salicylovou, která je jejím hlavním metabolitem⁴⁴.

Kolchicin je přírodní alkaloid izolovaný z ocunu, používaný především při akutních záchvatech dny. Přesný mechanismus účinku kolchicinu není zcela známý⁸.

Psychostimulancia

Kofein je široce rozšířený psychostimulant, váže se na adenosinové receptory v CNS a PNS (periferní nervová soustava) a také v různých orgánech. Stimuluje uvolňování neurotransmiterů jako dopamin a norepinefrin. Zlepšuje kognitivní funkce a fyzickou výkonnost. Přestože je široce konzumován ve formě kávy, čaje a energetických nápojů, může způsobovat vedlejší účinky jako nervozitu, nespavost, zvýšený srdeční tep

a gastrointestinální potíže. Terapeuticky se využívá především k léčbě migrény a často je součástí analgetických antipyretik v kombinaci s paracetamolem⁴⁵.

3.1.4. Osud léčiv v těle

Procesy, které probíhají s léčivem po jeho podání, spadají do oblasti farmakokinetiky. Farmakokinetika zkoumá čtyři základní fáze, jimiž léčivo v těle prochází: **vstřebávání** (absorpce), **distribuci**, **metabolismus a vylučování** (ang. zkratka ADME). Tyto fáze určují, jak dlouho a v jaké koncentraci bude léčivo v organismu působit. Základním farmakokinetickým parametrem, který pomáhá sledovat jak se léčivo šíří, metabolizuje a vylučuje z těla je plazmatická koncentrace, vyjadřuje množství léčiva přítomného v krevní plazmě v čase. V některých případech se procesy metabolismu a vylučování shrnují pod termín eliminace, která označuje celkové odstranění léčiva z těla⁴⁶. Po podání cizorodé látky tělo aktivuje obranné mechanismy, které se snaží zabránit toxickým účinkům, zejména prostřednictvím metabolismu a následné eliminace⁴⁷.

Aby léčivo mohlo působit na cílový orgán, musí se nejprve dostat do krevního řečiště. Biologická dostupnost (F) udává procento podané dávky, které se v nezměněné formě dostane do systémové cirkulace. Při intravenózním podání je biologická dostupnost 100 %. Nejčastěji se léčivo podává perorálně, kde je resorbováno sliznicí trávicího ústrojí, avšak biologická dostupnost je nižší kvůli presystémové eliminaci. Tento proces zahrnuje degradaci léčiva ještě před vstupem do oběhu. Biologickou dostupnost vypočítáme jako poměr AUC (plocha pod křivkou plazmatické koncentrace v čase) při intravenózním podání a jiných způsobech podání⁸.

Z krevního oběhu se léčivo distribuuje do různých částí těla, přičemž rychlost distribuce je vyšší u dobře prokrvených orgánů, jako jsou mozek, srdce, játra a ledviny, zatímco v tkáních, jako jsou tuk, kůže a svaly, je pomalejší. Distribuci léčiva kvantifikuje pojem distribuční objem (VD), což je teoretický objem tekutiny, ve kterém by se muselo celé množství léčiva v těle rovnoměrně rozpustit, aby odpovídalo koncentraci léčiva v krvi⁴⁸.

Játra jsou hlavním orgánem biotransformace léčiv, ale i jiné orgány, jako GIT (gastrointestinální trakt), ledviny a plíce, se mohou na tomto procesu podílet. Cílem metabolických procesů je snížit účinnost léčiva a zvýšit jeho rozpustnost ve vodě (hydrofilitu), což usnadňuje jeho eliminaci. Tento proces probíhá ve dvou fázích. V první fázi dochází ke změnám struktury léčiva prostřednictvím oxidace, redukce a hydrolýzy, za pomoci enzymů cytochromů P450 (CYP). Ve druhé fázi enzymy transferáz vytvářejí konjugáty, které zvyšují rozpustnost léčiva pro snadnější vyloučení žlučí nebo ledvinami. U proléčiv je biotransformace

klíčová, protože dochází k jejich přeměně na aktivní formu^{8,48}. Klíčovým parametrem pro určení rychlosti vyloučení léčiv je clearance, která udává objem plazmy očištěný od léčiva za jednotku času. Poločas eliminace ($t_{1/2}$) pak určuje dobu, za kterou poklesne plazmatická koncentrace léčiva na polovinu.

K vyloučení nezměněných forem léčiva nebo jeho metabolických produktů dochází převážně ledvinami prostřednictvím moči. Většina látek prochází glomerulární filtrací do primární moči. Některé látky se mohou do moči dostat také aktivní sekrecí díky specifickým transportním mechanismům. V závislosti na pH moči a pK_A vylučované látky může dojít k zpětné tubulární resorpci, což ovlivňuje konečnou rychlost a účinnost vylučování léčiva z těla⁸.

3.1.5. Spotřeba léčiv

V Tabulce 2 (strana 23) jsou uvedeny údaje o dodávkách léčivých přípravků podle léčivé látky do lékáren a jiných zdravotnických zařízení v ČR za první čtvrtletí roku 2024. Použité statistické měřítko, vyjádřené jako DDD/1000/den, udává denní definovanou dávku na 1000 obyvatel za den. Pro porovnání byly doplněny hodnoty DDD/1000/den za první čtvrtletí roku 2014. Tabulka 2 obsahuje údaje pouze pro prvních 10 látek s nejvyšší hodnotou DDD/1000/den pro první čtvrtletí (1Q) roku 2024⁴⁹.

Tabulka 2: Porovnání spotřeby léčivých látek v ČR v letech 2014 a 2024⁴⁹

Název ATC	Kód ATC	1Q 2014		1Q 2024	
		pořadí	DDD/1000/den	pořadí	DDD/1000/den
Cholekalciferol	A11CC05	5.	47	1.	111
Kyselina listová	B03BB01	1.	89	2.	107
Rosuvastatin	C10AA07	11.	31	3.	93
Atorvastatin	C10AA05	3.	55	4.	78
Kyselina acetylsalicylová	B01AC06	4.	54	5.	49
Sodná sůl levothyroxinu	H03AA01	10.	32	6.	43
Perindopril	C09AA04	8.	37	7.	38
Omeprazol	A02BC01	7.	42	8.	37
Ramipril	C09AA05	2.	63	9.	37
Ibuprofen	M01AE01	9.	32	10.	35

Zastoupení deseti nejčastěji používaných léčivých látek se za posledních deset let nezměnilo, změny však nastaly v jejich pořadí a ve spotřebě vyjádřené v DDD/1000/den. Tato relativní stabilita v první desítce nejpoužívanějších léčiv naznačuje, že potřeby populace a používané léčebné postupy zůstávají dlouhodobě konzistentní, přestože se jednotlivé hodnoty spotřeby mění. Největší nárůst spotřeby zaznamenáváme u rosuvastatinu, jehož spotřeba je v roce 2024 trojnásobně vyšší než v roce 2014. V prvním čtvrtletí roku 2024 patří mezi tři nejčastěji užívané látky po cholekalciferolu (vitamin D₃) a kyselině listové (vitamin B₉). Rosuvastatin je antihyperlipidemikum a na rozdíl od atorvastatinu je hydrofilním zástupcem statinů. Tento nárůst může indikovat zvýšenou potřebu léčby hyperlipidémie v populaci, což má také dopady na znečištění odpadních vod, protože rosuvastatin se vylučuje stolicí (90 %) nebo močí (5 %) převážně v nezměněné formě (76,8 % dávky)⁵⁰. Pokud předpokládáme počet obyvatel České republiky na 10,7 milionu, každý den se v prvním čtvrtletí roku 2024 vydalo v lékárnách přibližně 9,94 kg rosuvastatinu. Vzhledem k jeho vysokému podílu v nezměněné formě ve výkalech a moči existuje riziko jeho akumulace v kalech z ČOV, pokud není efektivně odstraněn během procesu čištění.

Otázkou zůstává, kolik z celkového množství vydaných léčiv je skutečně užito pacienty a jak je nakládáno s léčivy v případě jejich nevyužití nebo po uplynutí doby použitelnosti. Zjišťování skutečného množství léčiv, které skončí v odpadních vodách, zůstává náročné, protože údaje o nevyužitých nebo nesprávně likvidovaných léčivech nejsou systematicky sledovány.

3.2. Léčiva v životním prostředí

Léčiva jsou navržena jako biologicky aktivní látky, což znamená, že mohou ovlivňovat ekosystémy i v nízkých koncentracích. I malé množství může mít významné účinky, zejména u léčiv s vysokou účinností a nízkým terapeutickým indexem, což představuje riziko pro volně žijící organismy a ekologickou rovnováhu⁵¹.

3.2.1. Koloběh léčiv v životním prostředí

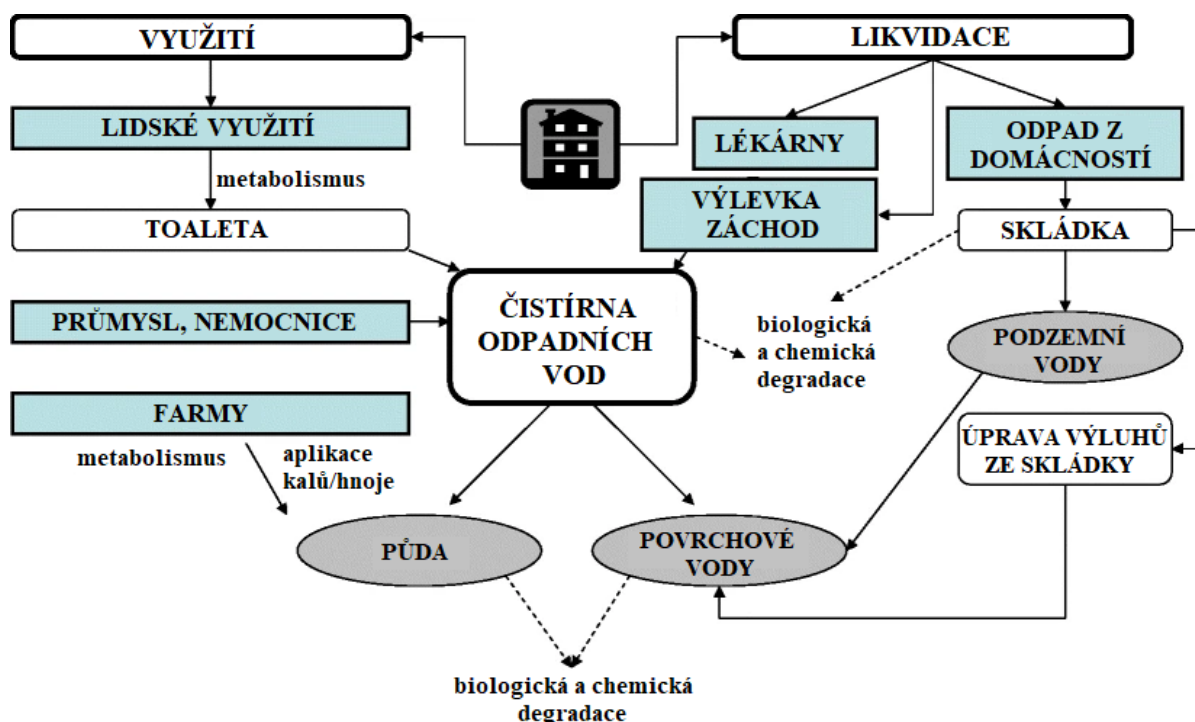
Farmaceutické látky pronikají do životního prostředí několika způsoby, jak ilustruje Obrázek 1 (strana 25). Proces začíná už při výrobě, kdy mohou být léčiva nebo chemikálie uvolňovány do odpadních systémů v rámci odpadu výroby. Hotová léčiva jsou obecně distribuována do nemocnic, lékáren či obchodů, kde jsou předepisována nebo prodávána pro užití u lidí i zvířat. Po užití dochází k jejich vylučování z těla močí, stolicí nebo uvolňováním z externích přípravků (krémy a masti), které následně vstupují do kanalizačního systému a dále do odpadních vod⁵². U veterinárních léčiv pak vzniká problém při využití výkalů hospodářských zvířat na polích jako hnojiva, což může vést k šíření reziduí léčiv v půdě, které následně pronikají do okolního prostředí. Rezidua těchto léčiv mohou postupně pronikat do podzemních vod nebo se kumulovat v potravinovém řetězci, což představuje riziko nejen pro ekosystémy, ale i pro zdraví lidí⁵³.

Další zdroj kontaminace představuje nesprávná likvidace nepoužitých nebo expirovaných léčiv, například splachováním do toalety či vyhazováním do běžného směsného odpadu. Správným postupem je odevzdat tato léčiva do lékáren, odkud je jejich ekologická likvidace zajištěna ve spalovnách prostřednictvím specializovaných firem. Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) upozorňuje, že v posledních letech se zvyšuje množství nespotrebovaných léků v domácnostech zejména těch na předpis⁵⁴.

V USA existuje výjimka daná Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), která doporučuje u některých vysoce rizikových léků, jako jsou opioidy, splachování do toalety,

pokud není dostupná možnost zpětného odběru. Tato výjimka má zabránit náhodnému požití látek, zejména u dětí, ale také zamezit riziku otrav v domácnosti⁵⁵.

Do čistíren odpadních vod se dostává odpadní voda z kanalizace, která je upravována před dalším vypouštěním do povrchových vod, jako jsou řeky nebo jezera. Vedlejším produktem čištění je čistírenský kal (viz kapitola 3.3.2.), který obsahuje nejen organický materiál, ale také stopy léčiv a dalších chemikálií. Tento kal se dále zpracovává různými způsoby, včetně kompostování nebo aplikace na zemědělskou půdu jako hnojivo, což může vést k dalšímu šíření farmaceutických látek v životním prostředí⁵⁶.



Obrázek 1: Zdroje a osud farmaceutických látek v životním prostředí, přeloženo do češtiny⁵⁶

3.3. Čistírny odpadních vod

Odpadní vody se podle původu dělí na splaškové, srážkové, průmyslové, zemědělské, podzemní a městské⁵⁷. Průmyslové vody zahrnují kromě splaškových a srážkových vod také technologické vody, které výrazně přispívají k jejich celkovému znečištění. Každý typ odpadní vody má specifické složení, které vyžaduje různě přizpůsobené čisticí procesy. Zatímco splaškové vody jsou primárně organického původu, průmyslové vody často obsahují syntetické a toxické látky, které vyžadují speciální chemické nebo fyzikální metody čištění⁵⁸. Městské vody zahrnují splaškové, srážkové, průmyslové a místy i podzemní vody. Zastoupení

průmyslové složky v městských vodách závisí na velikosti města a na míře jeho průmyslové zaměřenosti. Ve městech s vysokou koncentrací průmyslových podniků je podíl průmyslových složek v městských odpadních vodách významný a ovlivňuje celkové složení vody, a tedy i náročnost jejího čištění.

Charakteristiky odpadních vod poskytují informace o jejich složení, kvalitě a stupni znečištění. Ukazatele znečištění se dělí na fyzikální (např. teplota, zákal, vodivost), chemické (např. pH, tvrdost vody), mikrobiologické (např. koliformní bakterie) a skupinové. Mezi hlavní skupinové ukazatele míry organického znečištění patří:

- **Chemická spotřeba kyslíku (CHSK)** udává množství kyslíku v miligramech potřebného k chemickému rozkladu všech organických látek v 1 litru odpadní vody. Podle použitého oxidačního činidla se rozlišuje $CHSK_{Cr}$ (při použití dichromanu draselného) nebo $CHSK_{Mn}$ (při použití manganistanu draselného).
- **Biochemická spotřeba kyslíku (BSK)** udává množství kyslíku v miligramech, které mikroorganismy spotřebují při biologickém rozkladu organických látek v 1 litru odpadní vody během stanoveného časového období. Nejčastěji se měří BSK_5 , což je biochemická spotřeba kyslíku za 5 dní.

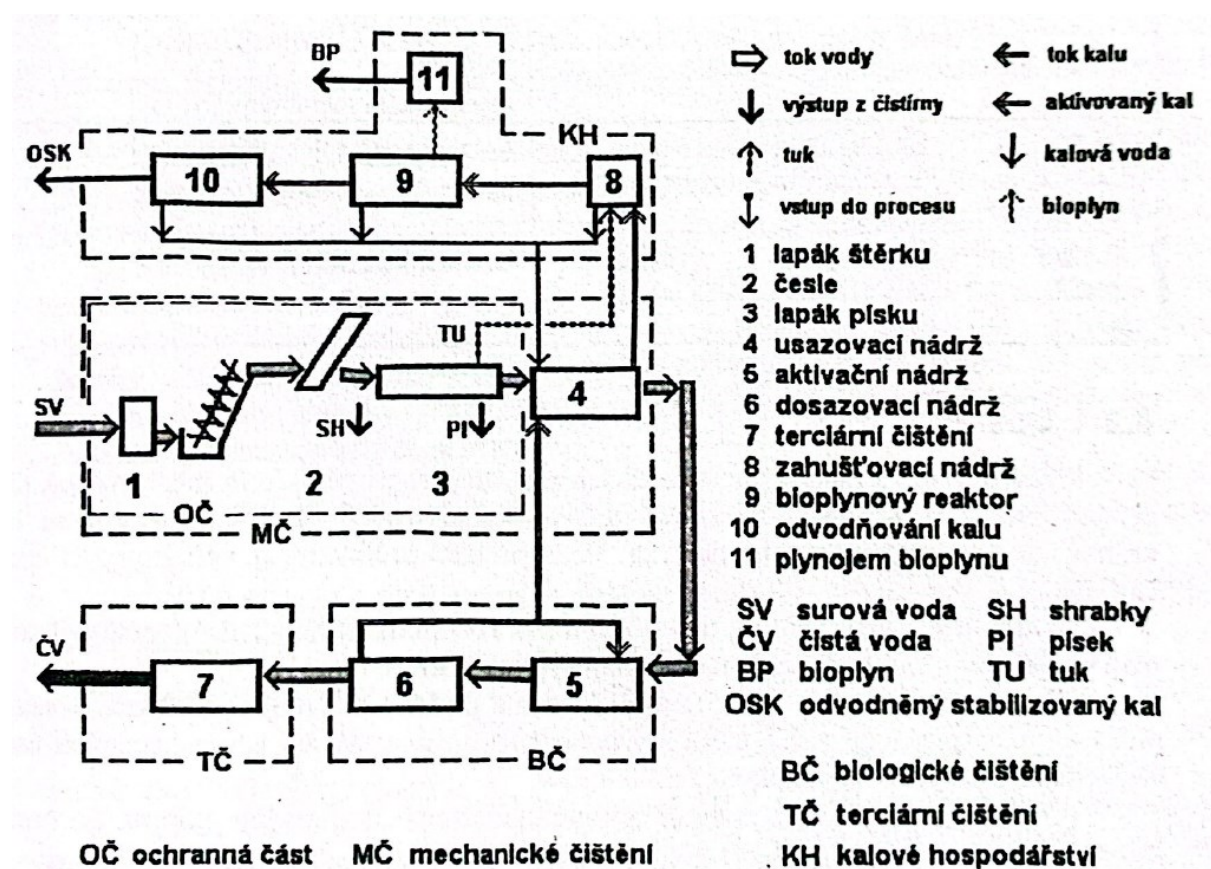
Tyto ukazatele a jejich poměr jsou klíčové pro stanovení optimálních metod čištění a sledování účinnosti čisticích procesů, což zajišťuje, že vyčištěná voda splňuje všechny ekologické normy a může být bezpečně vypouštěna do životního prostředí⁵⁷.

Čistírny odpadních vod (ČOV) se rozdělují podle velikosti vyjádřené počtem EO (ekvivalentních obyvatel). Tato jednotka vyjadřuje denní produkci 60 g BSK_5 na jednoho obyvatele za den⁵⁹. Ekvivalent obyvatel vychází z normované hodnoty produkce znečištění na jednoho obyvatele, tzv. populačního ekvivalentu. Tato hodnota se používá při výpočtu EO také pro provozy jako jsou továrny, průmyslové podniky nebo zemědělská zařízení, jejichž znečištění lze vyjádřit jako ekvivalent znečištění produkovaného určitým počtem obyvatel. Do 5000 EO se jedná o malé čistírny, nad 5000 EO o střední čistírny a velké čistírny mají počet připojených EO nad 20000. Velké čistírny obvykle zahrnují celkové technologické schéma čištění odpadních vod včetně kalového hospodářství⁵⁷.

3.3.1. Čistící kroky na ČOV

Na Obrázku 2 (strana 27) je znázorněno technologické schéma velké ČOV. Prvním stupněm čištění je vždy mechanické čištění, které se používá ve všech čistírnách odpadních vod. Po příchodu odpadní vody do ČOV se voda nejprve dostává do lapáku šterku (1), kde se

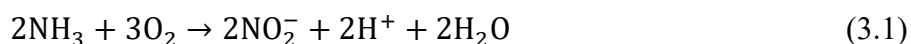
zachytí velké a těžké předměty. Následně mohou být použita čerpadla, například Archimédův šroub, k navýšení hladiny odpadní vody v případě, že není v ČOV dostatečný samospád. Dalším krokem je průtok vody přes česle (2), což je rám s mříží ponořený ve směru proudu pod úhlem 30° až 60°. Tyče česlí, označované jako česlice, jsou navrženy tak, aby voda protékala prostorem mezi nimi, tzv. průlinami. Na základě velikosti průlin se rozlišují hrubé a jemné česle. Na česlích se zachytávají shrabky, které jsou shromažďovány buď strojně, nebo ručně. Tento odpad obsahuje zejména materiály z domácností (plasty, textilie, zbytky potravin, papír), listů, větvičky, hygienické potřeby a fekálie. Kvůli vysokému biologickému a chemickému znečištění jsou shrabky považovány za nebezpečný odpad. Likvidují se spalováním nebo po stabilizaci vápnem uložením na skládky pro nebezpečný odpad. Česle jsou někdy nahrazeny mělnicím čerpadlem, používají se k rozmělnění pevných částic. V lapáku písku (3) se proud vody zpomalí, čímž se umožní sedimentace těžších částic, jako je písek, na dno nádrže. Tuky, které plavou na hladině, jsou následně odstraněny pomocí hladinové lišty. Dále se voda dostává do usazovací nádrže (4), na dno sedimentuje organický materiál, tzv. primární kal. Tento kal je odváděn do kalového hospodářství, kde je dále upravován a u velkých čistíren se využívá k tvorbě bioplynu⁵⁷.



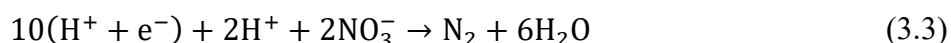
Obrázek 2: Schéma čistírny odpadních vod⁵⁷

Biologické čištění je dalším stupněm úpravy vody, kde se v aktivační nádrži mísí odpadní voda s vratným aktivovaným kalem a směs je provzdušňována. Aktivovaný kal tvoří vločky – shluky mikroorganismů obklopené slizovou matricí, která je součástí biofilmu. Tato funkční polykultura obsahuje především heterotrofní a autotrofní bakterie, v menší míře houby, plísně, kvasinky a organismy jednobuněčné (prvoci) i mnohobuněčné (např. červi a roztoči). Organické látky jsou v této matrici zachyceny v blízkosti mikrobiálních buněk, které je mohou rozložit na menší fragmenty a následně využít buď pro tvorbu energie, nebo pro tvorbu nové biomasy. V dosazovací nádrži se aktivovaný kal oddělí od vyčištěné vody, která odtéká dále do procesu čištění. Část zahuštěného kalu se vrací zpět do aktivační nádrže, aby se zajistila stabilní koncentrace mikroorganismů, a přebytečný kal je odváděn k dalšímu zpracování.

Terciární čištění je zaměřeno na biologické odstranění nutrientů, jako jsou dusík a fosfor, čímž se předchází jejich nežádoucímu působení v odpadních vodách vypouštěných z čistíren. Vypouštění vod obsahujících sloučeniny těchto prvků může způsobit eutrofizaci povrchových vod, což vede ke zhoršení kvality vody v důsledku růstu řas a sinic a následnému nedostatku kyslíku pro vodní organismy. Dalším problémem pro vodní organismy je toxicita amoniaku, zejména v jeho nedisociované formě. Amoniak se vyskytuje v odpadních vodách buď v disociované formě jako iont NH_4^+ , nebo v nedisociované formě NH_3 , přičemž jejich poměr závisí na teplotě a pH vody⁵⁷. Odstranění amoniaku probíhá ve dvou hlavních fázích. Nejprve při nitrifikaci dochází k oxidaci amoniaku na dusitany a následně dusičnany podle rovnic⁶⁰:



Na tomto procesu se podílejí nitrifikační bakterie, zejména z rodu *Nitrosomonas* (přeměna amoniaku na dusitany) a *Nitrobacter* (přeměna dusitanů na dusičnany). V dalším kroku, denitrifikaci, jsou dusičnany redukovány na plynný dusík (N_2), lze jej popsat rovnicí⁵⁷:



Tento proces spočívá v použití dusičnanů jako konečných akceptorů elektronů při anoxické respiraci organotrofními bakteriemi, jako jsou rody *Pseudomonas* a *Micrococcus*. Dusík je zde využit disimilačně, zatímco při asimilaci se dusičnany redukují na amoniak, který slouží jako zdroj dusíku pro tvorbu nové biomasy⁶⁰. Fosfor lze odstraňovat fyzikálně-chemickými procesy, například srážením pomocí přídavku solí, jako je chlorid železitý, přičemž vzniklé nerozpustné

fosforečnany jsou následně odstraněny mechanickými postupy. Nevýhodou je vznik anorganických kalů, jejichž likvidace je nákladná a ekologicky náročná^{60,61}. Biologické odstraňování fosforu je možné díky bakteriím rodu *Acinetobacter* nebo *Moraxella*, kterým se také říká poly-P bakterie. Tyto mikroorganismy mají schopnost intenzivně přijímat fosfor ve formě polyfosfátů ve svých buňkách jako zásobu energie⁶⁰. Tento proces probíhá za specifických podmínek, kdy jsou bakterie vystaveny střídavým fázím aerobního a anaerobního prostředí. V anaerobní fázi bakterie uvolňují fosfor do okolního prostředí, zatímco v aerobní fázi jej intenzivně přijímají a ukládají ve formě polyfosfátů⁵⁷.

3.3.2. Kalové hospodářství

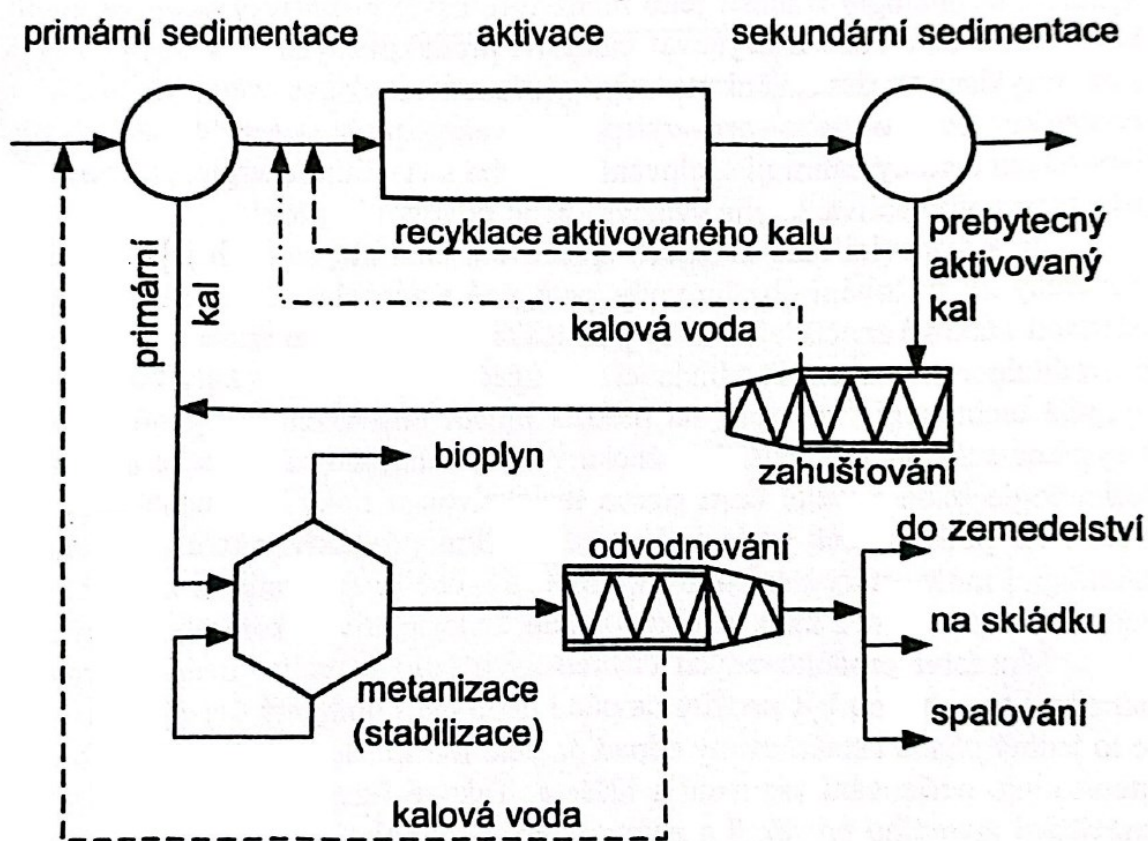
Kalové hospodářství v ČOV se zaměřuje na zpracování a další využití kalů, které jsou neodvratným vedlejším produktem čištění odpadních vod. Složení kalů se odvíjí od původu odpadní vody a použité technologie čištění. Kaly tvoří suspenzi pevných a koloidních částic rozptýlených ve vodě, které pocházejí přímo z odpadních vod nebo vznikají během některého kroku čištění. Množství kalu se obvykle vyjadřuje obsahem sušiny v procentech nebo jako hmotnost sušiny obsažené v daném množství kapalného kalu. Až 60 % této sušiny tvoří netoxické organické látky a živiny, jako jsou sloučeniny dusíku a fosforu. Kaly mohou obsahovat i toxické látky, například těžké kovy (Zn, Pb, Cu), polychlorované bifenylly (PCB), polyaromatické uhlovodíky (PAU), pesticidy nebo zbytky farmaceutických látek. Navíc mohou být zdrojem patogenních mikroorganismů a obsahují i různé anorganické sloučeniny⁵⁷. Během procesu čištění odpadních vod v ČOV vznikají různé druhy kalů, které jsou přehledně uvedeny v Tabulce 3 (strana 30).

Tabulka 3: Přehled upravených a neupravených kalů, pozměněno⁶²

Typ kalu	Popis
Neupravené kaly	
Surový	Vzniká filtrací surové odpadní vody, obsahuje suspendované pevné látky
Primární	Obsahuje 92-98 % vody, zbytek tvoří pevné částice. Je produktem primárního čištění.
Sekundární	Má menší velikost částic než primární kal, vzniká při sekundárním čištění.
Smíšený	Směs primárního a sekundárního kalu.
Lagunový kal	Hromadí se na dně nádrží, kde se odpadní vody skladují dlouhodobě.
Upravené kaly	
Vyhnílý kal	Kal, který prošel stabilizací (anaerobní vyhnívání), což snižuje obsah organických látek a patogenů, redukuje zápach a zmenšuje objem.
Kompostovaný kal	Vzniká aerobní stabilizací, kdy se organické látky rozkládají pomocí mikroorganismů.
Biosolids (stabilizovaný kal)	Termín pro stabilizovaný kal, který je bezpečný pro použití jako půdní doplněk nebo hnojivo.
Upravený kal	Vzniká snížením obsahu vody, například přidáním FeCl_3 .
Sušený kal	Kal, u kterého byl snížen obsah vody tepelným zpracováním (zahříváním).
Zahuštěný a odvodněný kal	K odstranění vody je využita gravitace nebo mechanické lisování.
Jiné typy upravených kalů	Speciální úpravy, jako dezinfekce, pasterizace, termální hydrolýza, pokročilá oxidace a úprava amoniakem.

Schéma kalového hospodářství v ČOV je znázorněno na Obrázku 3 (strana 31). Cílem zpracování čistírenských kalů je snížení jejich objemu odstraněním přebytné vody, využití k výrobě energie a příprava na další zpracování. Kaly vznikají sedimentací během mechanického a biologického čištění a obsahují vysoké množství vody, obvykle v rozmezí

93 až 99 %. Zahušťování kalů redukuje obsah vody a může být podpořeno kondicionací, která zlepšuje jejich vlastnosti a usnadňuje proces. Kaly se poté stabilizují anaerobně – methanizací, což je proces, při kterém mikroorganismy štěpí biologický materiál. Tento proces produkuje plyny, zejména metan a oxid uhličitý, a pevný zbytek, který je již stabilní a neškodný. Vzniklý bioplyn je využit pro potřeby ČOV nebo výrobu elektrické energie. Stabilizace může být provedena i aerobně, kdy termofilní mikroorganismy rozkládají organickou hmotu exotermním procesem, při kterém se uvolňuje teplo. Další snížení obsahu vody u anaerobně stabilizovaného kalu může zvýšit podíl sušiny na 30 až 40 %. Při anaerobní i aerobní stabilizaci dochází k hygienizaci, tedy k redukci patogenních mikroorganismů, což zajišťuje zdravotní nezávadnost kalu. Hygienizace však může být prováděna i v jiných fázích procesu, například před stabilizací chemicky (ozon) nebo termicky. Po stabilizaci se hygiena kalu může dále zlepšit sušením, pasterizací nebo přidáním vápna⁵⁷.



Obrázek 3: Schéma kalového hospodářství v ČOV, upraveno⁵⁷

Stabilizované kaly nacházejí široké uplatnění zejména v zemědělství. Díky obsahu organické hmoty a živin (dusík a fosfor) slouží jako hnojivo zlepšující úrodnost půdy a podporující růst rostlin⁵⁷. V Praze se většina kalů zpracovává tímto způsobem, jak je uvedeno v Tabulce 4. V České republice se kaly nejčastěji kompostují, přičemž výsledný kompost je využíván jako půdní kondicionér⁶³. Kompostovat lze surový i anaerobně stabilizovaný kal, který se nejprve smíchá s jinými organickými složkami (piliny, štěpky, sláma) a za aerobních podmínek dochází k jeho rozkladu. Během tohoto procesu se uvolňuje teplo, které přispívá k hygienizaci eliminací patogenů. Dalším možností zpracování je spalování v teplárnách, elektrárnách nebo cementárnách. Tento postup umožňuje energetické využití, redukuje objem a zároveň likviduje patogenní mikroorganismy, přičemž je nezbytné zajistit kontrolu emisí a bezpečnou likvidaci popelovin⁵⁷. Ministerstvo životního prostředí udává, že v České republice je zakázáno ukládat kaly na skládky⁶⁴. Tato problematika je podmíněna zákonem č. 541/2020 Sb., který stanovuje, že upravený kal se řadí mezi ostatní odpad, zatímco neupravený kal je klasifikován jako nebezpečný odpad, který lze za daných podmínek ukládat na skládku⁶⁵. To může být pravděpodobným důvodem, proč je ve Zlínském kraji největší množství skládkovaného kalu z České republiky⁶³.

Tabulka 4: Produkce a způsoby nakládání s kaly ČOV v tunách sušiny v Praze, Zlínském kraji a celé ČR⁶³

Způsob nakládání	Hl. město Praha	Zlínský kraj	Česká republika
Přímá aplikace a rekultivace	19 041	4 890	63 266
Kompostování	2 647	1 664	80 961
Skládkování	0	12 160	16 591
Spalování	0	0	19 270
Jinak	0	66	9 151
Kaly produkované v ČOV celkem	21 688	18 780	189 239

3.3.3. Legislativa spojená s použitím kalů na zemědělské půdě

Nevýhodou využití kalů jako hnojiva je přítomnost cizorodých látek, které mohou omezovat jejich bezpečné využití⁵⁷. Podmínky pro používání kalů z ČOV v České republice jsou řízeny zákonem č. 541/2020 Sb., o odpadech, a vyhláškou č. 273/2021 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady. V příloze č. 38 k vyhlášce č. 273/2021 Sb. se nachází

podmínky použití kalů na zemědělské půdě. Zahrnují mikrobiologická kritéria a mezní hodnoty koncentrací vybraných rizikových látek a prvků v kalech pro jejich použití na zemědělské půdě. Jako rizikové látky jsou uvedeny těžké kovy (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn), halogenované organické sloučeniny (AOX), PCB a PAU. Mezní hodnoty rizikových látek jsou uvedeny v Tabulce 5. Nastavení a kontroly plnění podmínek zajišťují resorty Ministerstva životního prostředí a zemědělství^{65,66}. Obsah léčiv v kalech pro využití v zemědělské půdě není nijak limitován.

Tabulka 5: Mezní hodnoty koncentrací rizikových látek v kalech pro jejich použití na zemědělské půdě⁶⁶

Riziková látka	Mezní hodnoty koncentrací v kalech
	(mg kg ⁻¹ sušiny)
As	30
Cd	5
Cr	200
Cu	500
Hg	4
Ni	100
Pb	200
Zn	2500
AOX	500
PCB*	0,6
PAU**	10

*polychlorované bifenylly (suma kongenerů č. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180)

**polycyklické aromatické uhlovodíky (suma antracenu, benzo(a)antracenu, benzo(b)fluoranthenu, benzo(k)fluoranthenu, benzo(a)pyrenu, benzo(ghi)perylenu, fenantrenu, fluoranthenu, chrasenu, indeno(1,2,3-cd)pyrenu, naftalenu a pyrenu)

3.3.4. Kumulace léčiv v kalech a jejich monitoring

Většina současných studií se zaměřuje na analýzu farmaceutických látek ve vodách (odpadní, pitné, podzemní, povrchové) v České republice i ve světě^{67,68}. Farmaceutické látky a jejich metabolity, které vstupují do čistíren odpadních vod, se mohou v čistírenském kalu

kumulovat nebo vázat v závislosti na své lipofilitě či iontových vazbách⁶⁹. Tyto látky se mohou navázat na lipidové struktury bakterií a tukové složky kalu prostřednictvím hydrofobních interakcí, nebo se mohou adsorbovat na polysacharidové vrstvy bakteriálních buněk, které mají často záporný náboj. Dále mohou farmaceutické látky vytvářet chemické vazby s proteiny nebo nukleovými kyselinami přítomnými v bakteriálních buňkách⁷⁰. S ohledem na možná environmentální rizika spojená s využitím kalu se monitoruje také přítomnost těchto látek v jeho složení.

Mezi lety 2003 a 2020 bylo v 54 člancích z různých zemí publikováno hodnocení koncentrací farmaceutických látek a jejich metabolitů analyzovaných ve vzorcích různých druhů kalů. Celkem bylo sledováno 180 farmaceutických látek a 45 metabolitů. Tyto studie zahrnovaly země jako Faerské ostrovy, Čínu, Indii, Island, Japonsko, Jihoafrickou republiku, Kanadu, Keňu, Koreu, Německo, Pákistán, Polsko, Francii, Španělsko, Švédsko, Švýcarsko, Velkou Británii, Řecko, Slovensko a USA⁷¹.

Slovenská studie byla zaměřena na monitoring léčiv a nelegálních drog v kalech z pěti čistíren odpadních vod. Vzorky byly připraveny dvoustupňovou kapalnou extrakcí a analyzovány pomocí LC-MS/MS. Nejčastěji byl detekován fexofenadin (průměrná koncentrace 2340 ng g⁻¹ sušiny) a telmisartan (průměrná koncentrace 1170 ng g⁻¹ sušiny)⁷².

Kal lze aplikovat jako přísadu do půdy, přičemž látky v něm obsažené mohou přecházet do rostlin a hromadit se v těch, které rostou na takto ošetřené půdě. Studie z roku 2024 zaměřená na tento proces zjistila, že v kalu z ČOV Hrdějovice u Českých Budějovic byly naměřeny nejvyšší průměrné koncentrace (nad 100 ng g⁻¹) u telmisartanu, 1H-benzotriazolu a u psychoaktivních látek (diklofenak, citalopram, norsertralin, sertralin, trazodon a venlafaxin) metodou SPE/LC-MS/MS. Kal byl použit na obohacení půdy, kde byla pěstována kukuřice. V jejích kořenech byly identifikovány nízké koncentrace karbamazepinu (3 ng g⁻¹) a telmisartanu (17 ng g⁻¹) pomocí LC-MS/MS⁷³. Schopnost rostlin přijímat látky z půdy nebo vody se využívá také k účelovému čištění kontaminovaných ploch, tzv. fytoremediaci⁷⁴.

Mezi lety 2017 a 2018 byla v největší čistírně odpadních vod v Jižní Brazílii (oblast Porto Alegre hlavního města státu Rio Grande do Sul) provedena monitorovací studie farmaceutických látek ve vzorcích odpadních vod a kalu. Vzorky byly analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS. Na přítoku do ČOV bylo detekováno celkem 13 sloučenin. Z toho 3 farmaceutika byla adsorbována kalem (kofein, ciprofloxacín a ofloxacín). Další 4 látky, které byly kvantifikovány pouze ve vzorcích kalu a jejich koncentrace se pohybovala od 0,026 do 5,034 mg kg⁻¹, byly doxycyklin, fenbendazol, norfloxacín a tetracyklin⁷⁵.

3.4. Analýza léčiv

Velký význam při detekci léčiv mají metody postavené na kapalinové chromatografii (LC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS)⁵. Tato metoda se vyznačuje vysokou efektivitou a schopností provádět rychlé a sériové analýzy s vynikající rozlišovací schopností. Díky fyzikálně-chemickým vlastnostem léčiv, jako je polarita, ionizovatelnost a vhodná molekulová hmotnost, jsou tyto látky ideálními kandidáty pro analýzu technikou LC-MS⁷⁶.

3.4.1. QuEChERS

Před samotnou analýzou je nutné vzorek pevné matrice, jako je kal, vhodně připravit tak, aby byl kompatibilní s technikou LC-MS. Jednou z efektivních metod přípravy vzorků je metoda QuEChERS (zkratka z ang. *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*), která byla poprvé představena v roce 2003 pro stanovení reziduí pesticidů v ovoci a zelenině³. Tato metoda je však vhodná i pro přípravu vzorků obsahujících farmaceutické látky a další skupiny analytů⁴. Jak napovídá její název, metoda je rychlá, snadná, levná, efektivní, robustní a bezpečná.

Původní optimalizovaná metoda QuEChERS, popsaná Anastassiadem a kol. (2003), zahrnovala dva hlavní kroky. V prvním kroku bylo 10 g vzorku intenzivně třepáno s 10 ml acetonitrilu (ACN). Hmotnost vzorku může být přizpůsobena, pokud je vzorek dostatečně homogenizován, což zajistí maximální efektivitu extrakčního kroku cílových analytů. Metoda byla původně navržena pro vzorky ovoce a zeleniny s vysokým obsahem vody. U matric s nižším obsahem vody se proto doporučuje přidání vody, aby se zajistila optimální separace fází⁷⁷. Následně bylo přidáno 4 g bezvodého síranu hořečnatého (MgSO_4) a 1 g chloridu sodného (NaCl), směs byla znovu důkladně protřepána a přidán vnitřní standard. Tento krok umožnil extrakci analytů z matrice a vytvoření fázového rozhraní. Ve druhém kroku byla za účelem odstranění interferujících složek provedena disperzní extrakce na pevné fázi (d-SPE, *dispersive solid-phase extraction*). Při tomto kroku bylo odebráno 1 ml horní organické vrstvy (acetonitrilového extraktu), které bylo přeneseno do zkumavky obsahující 150 mg bezvodého MgSO_4 a 25 mg sorbentu PSA (Primary Secondary Amine). Směs byla ručně protřepána a poté odstředěna pro odstranění interferujících složek matrice. Z takto vyčištěného extraktu bylo odebráno 0,5 ml, které bylo následně analyzováno pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)³.

Problematické výsledky u některých pesticidů vedly k dalšímu vývoji této metody. Upravená verze zahrnovala použití acetonitrilu obsahujícího 1% kyselinu octovou (CH_3COOH)

místo původního čistého ACN. Složení extrakční směsi se také změnilo – na každý 1 gram vzorku bylo přidáno 0,4 g bezvodého MgSO_4 a 0,1 g bezvodého octanu sodného (CH_3COONa). Tato úprava přispěla k efektivnějšímu zpracování vzorků a zlepšení výtěžností kyselých i bazických pesticidů⁷⁸. Další úprava metody z roku 2007 souvisela s další změnou složení extrakční směsi na 4 g bezvodého MgSO_4 , 1 g NaCl , 1 g dihydrátu trisodné soli kyseliny citronové (trisodium citrate dihydrate) a 0,5 g seskvihydrátu disodné soli hydrogencitronové kyseliny (disodium hydrogencitrate sesquihydrate)⁷⁹.

3.4.2. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie se řadí mezi analytické metody využívané k separaci složek směsi, jejich identifikaci a kvantifikaci. Principem této techniky je vstříknutí vzorku obsahujícího analyty do kolony naplněné se stacionární fází (SF). Mobilní fáze (MF) působí jako médium, které unáší analyty kolonou. Během průchodu kolonou dochází k interakcím mezi analyty se SF a MF, což vede k jejich retenci, tedy zadržení v SF, na základě jejich afinity k této fázi⁸⁰. Látka s nízkou afinitou ke stacionární fázi je v koloně zadržena méně a je eluována rychleji než látka s vyšší afinitou.

Složení MF má zásadní vliv na efektivitu separace a může být během analýzy konstantní nebo měněné. Pokud se složení MF v průběhu analýzy nemění, hovoříme o isokratické eluci, která je vhodná pro jednodušší směsi nebo analyty s podobnými retenčními vlastnostmi. Naopak při gradientové eluci se složení mobilní fáze postupně mění. Tato technika je užitečná především při analýze složitějších směsí, jelikož umožňuje lepší separaci látek s odlišnou polaritou nebo retencí. Pokud je mobilní fáze do systému dodávána čerpadlem pod vysokým tlakem, jedná se o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC).

Podle separačního módu se stacionární fáze mimo jiné dělí na normální fázi (NP) a reverzní fázi (RP), které se liší polaritou. Při NP-HPLC je separace látek zajištěna pomocí polární SF (např. silikagel) a nepolární MF (např. hexan, isooktan). Naopak při RP-HPLC je situace obrácená. Stacionární fázi tvoří nepolární uhlíkaté řetězce navázané na nosič (silikagel). Nejběžnější chemicky vázaná fáze na silikagelu obsahuje alkylovou skupinu C_{18} (ODS, oktadecylsilikagel). V RP-HPLC je mobilní fáze směsí vody a organických složek, jako jsou methanol a acetonitril. Její složení hraje klíčovou roli v efektivitě oddělení složek směsi.

Po separaci v koloně jsou analyty unášeny v MF do detektoru, kde jsou detekovány a generuje se odpovídající signál. Výběr detektoru závisí na typu analytu a zamýšleném účelu analýzy. V kapalinové chromatografii se často používají detektory, jako jsou UV-VIS nebo

fluorescenční, avšak stále častěji jsou nahrazovány moderními hmotnostními detektory díky jejich vyšší citlivosti, selektivitě a schopnosti přesně identifikovat analyty⁸¹.

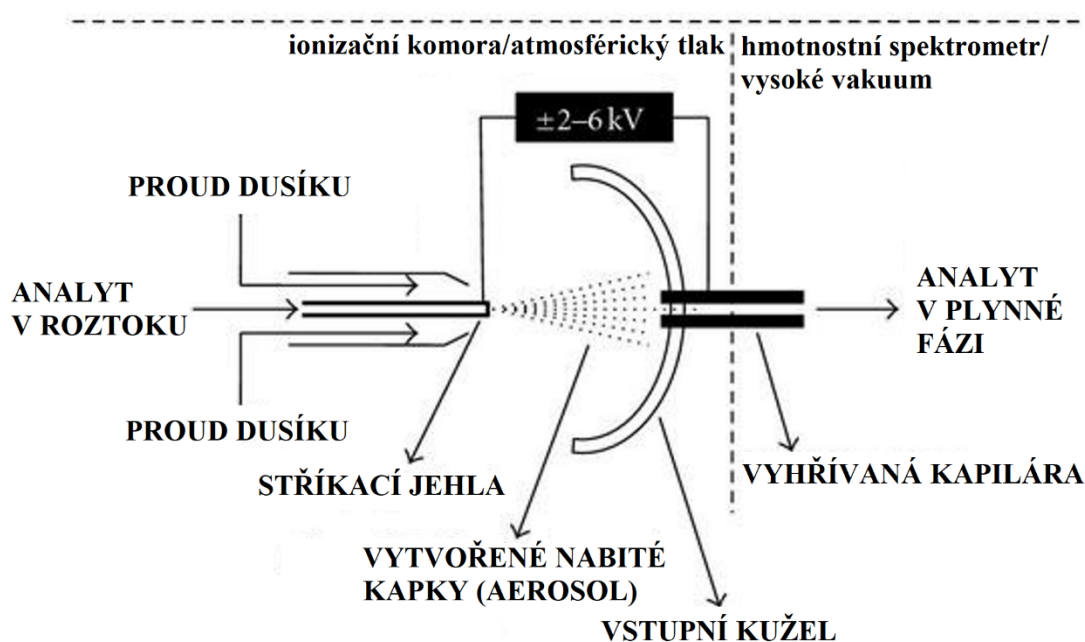
3.4.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je technika využívaná k detekci a identifikaci látek na základě jejich molekulové hmotnosti a poměru hmotnosti k náboji (m/z). Kombinace HPLC s detekcí MS (HPLC-MS) je nástroj využitelný pro analýzu vzorků z různorodých oblastí, jako farmacie, potravinářství, environmentální chemie či biotechnologie. Postup hmotnostní spektrometrie zahrnuje tři kroky: ionizaci molekul, separaci iontů podle poměru m/z a jejich detekci⁸¹.

Iontový zdroj převádí neutrální molekuly analytu na ionty, které jsou dále analyzovány v hmotnostním spektrometru. Výběr vhodné ionizační metody závisí na povaze analytu, složení vzorku a požadovaném typu analýzy. Mezi nejčastěji používané ionizační techniky patří elektrosprejová ionizace (ESI) a ionizace za atmosférického tlaku (APCI), které jsou obzvláště vhodné pro spojení s kapalinovou chromatografií při analýze polárních a iontových látek⁸². Ionizační techniky lze podle míry fragmentace rozdělit na měkké a tvrdé. Měkké ionizační techniky, jako ESI a APCI, minimalizují fragmentaci molekul, což umožňuje detekci iontů ve formě protonovaných $[M+H]^+$ nebo deprotonovaných $[M-H]^-$ molekul. Tyto techniky jsou ideální pro analýzu biomolekul, léčiv nebo jiných látek, kde je klíčová zachovalá struktura molekuly^{81,82}. Naproti tomu tvrdé ionizační techniky, jako je elektronová ionizace (EI), způsobují rozsáhlou fragmentaci molekul a poskytují podrobné informace o jejich struktuře, což je užitečné například v organické chemii. Naměřená spektra lze porovnávat s databázemi nebo knihovnami referenčních spekter⁸¹.

V rámci praktické části této práce byla použita elektrosprejová ionizace, znázornění tohoto typu iontového zdroje je na Obrázku 4 (strana 38). Princip této techniky spočívá v aplikaci vysokého elektrického napětí na kapiláru, kterou je veden vzorek rozpuštěný v těkavém rozpouštědle. Na výstupu kapiláry se vytváří tzv. Taylorův kužel, z jehož špičky vychází jemný sprej nabitých kapének. Pro podporu efektivní tvorby aerosolu je často využíván nebulizační plyn, obvykle inertní plyn, jako je dusík, který napomáhá rozprašování kapalného vzorku do menších kapének. Při režimu ESI v pozitivním módu jsou kapénky kladně nabitý protonací analytů, zatímco v negativním módu jsou ionty vytvářeny deprotonací. Nabitý aerosol postupuje směrem k vyhřívané kapiláře, během čehož dochází k postupnému odpařování rozpouštědla (desolvaci). Na kapénky působí dvě protichůdné síly:

povrchové napětí, které udržuje kapénku pohromadě a Coulombova odpudivost způsobená odpuzováním nábojů na povrchu kapénky. Jak dochází k odpařování rozpouštědla, kapénky se postupně zmenšují a náboj na jejich povrchu se koncentruje. Ve chvíli, kdy elektrostatická odpudivost překoná povrchové napětí, dojde k Coulombově explozi, při níž se kapénka rozpadne na menší částice nebo jednotlivé ionty. Tyto ionty jsou následně uvolněny z povrchu kapének procesem desorpce a přeneseny do plynné fáze⁸³.



Obrázek 4: Znázornění iontového zdroje s elektrosprejovou ionizací, přeloženo do češtiny⁸³

Ionty jsou dále vedeny do analyzátoru, kde dochází k převodu z atmosférického tlaku do vakua a zahájení jejich separace podle m/z . Mezi nejčastěji používané analyzátory patří kvadrupól (Q), iontová past (IT), analyzátor doby letu (TOF) nebo iontová cyklotronová rezonance (ICR). Každý z těchto analyzátorů má své specifické výhody a je vhodný pro různé typy analýz⁸¹. Kvadrupól je složen ze čtyř tyčových elektrod, které jsou uspořádány ve čtvercové konfiguraci. Na každou dvojici protilehlých tyčí je aplikováno stejnosměrné (DC) a střídavé (RF) napětí, přičemž protilehlé tyče mají shodný potenciál a sousední dvojice mají opačně polarizované napětí. Tato kombinace DC a RF napětí vytváří dynamické elektrické pole, které ovlivňuje pohyb iontů procházejících mezi tyčemi. Ionty s určitým m/z mají stabilní trajektorii a mohou kvadrupólem projít. Naopak ionty s jiným m/z jsou destabilizovány a jejich trajektorie je vychýlena, což vede k jejich odklonění nebo zachycení na tyčích. Změnou parametrů DC a RF napětí lze selektivně propouštět ionty s různými hodnotami m/z , což

umožňuje kvadrupólu pracovat buď jako hmotnostní filtr, nebo jako analyzátor při skenování celého spektra⁸⁴.

Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) je analytická metoda, která využívá dva nebo více analyzátorů (kvadrupólů) k postupné separaci iontů. Je mimořádně užitečná při analýze složitých směsí, protože poskytuje nejen informace o molekulární hmotnosti původních iontů, ale také o jejich fragmentaci, což umožňuje podrobnou identifikaci a charakterizaci analyzovaných látek. Jedním z nejpoužívanějších typů analyzátorů v MS/MS je trojitý kvadrupól (QqQ), který se skládá ze tří za sebou uspořádaných kvadrupólů. První kvadrupól (Q1) slouží k výběru iontů s konkrétním poměrem m/z , zatímco druhý kvadrupól (q2) funguje jako kolizní komora, kde dochází k fragmentaci vybraných iontů prostřednictvím srážek s inertním plynem, jako je argon nebo dusík. Fragmenty vytvořené v kolizní komoře jsou poté analyzovány třetím kvadrupólem (Q3), který měří jejich poměr m/z ⁸⁴. Trojitý kvadrupól umožňuje různé typy skenování:

- základní sken (MS sken) – záznam hmotnostního spektra v celém rozsahu m/z , poskytuje informace o všech iontech ve vzorku,
- selektivní záznam iontu (SIM) – záznam konkrétního iontu s daným m/z v čase,
- sken produktových iontů – Q₁ vybere konkrétní m/z , ionty jsou fragmentovány v Q₂ a vzniklý produktový iont je skenován v Q₃,
- sken prekurzorových iontů – Q₁ skenuje celý rozsah spektra, ionty jsou fragmentovány v Q₂ a vybere konkrétní m/z v Q₃,
- sken neutrálních ztrát – Q₁ skenuje celý rozsah spektra, v Q₂ dochází k fragmentaci iontů a v Q₃ je skenován rozsah m/z odpovídající iontům, které ztratily specifickou neutrální část molekuly,
- selektivní monitorování reakce (SRM a MRM) – Q₁ vybere konkrétní m/z , který jsou fragmentovány v Q₂ a konkrétní fragmentu s určeným m/z je skenován v Q₃⁸⁵.

4. Experimentální část

4.1. Laboratorní a přístrojové vybavení

- Automatické kalibrované pipety o objemech: 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l a 5-10 ml (Brand, Německo)
- Pomocné laboratorní sklo: kádinky, odměrné válce (Fisherbrand, Německo)
- Plastové zkumavky o objemu 10 ml (Sarstedt, Německo)
- Skleněné zkumavky o objemu 10 ml (VWR Avantor, ČR)
- Plastové zkumavky o objemu 50 ml (Sarstedt, Německo)
- Překlopná třepačka Reax 2 (Heidolph, Německo)
- Centrifuga (Hettich, Německo)
- Aparatura pro zkoncentrování pod proudem dusíku (Hangzhou Ruicheng Instrument Co.,Ltd, Čína)
- Tmavé vialky LC-MS krimpovací o objemu 10 ml a rozměrech 12x32 mm (Chromservis, ČR)
- Krimpovací víčka na vialky (Chromservis, ČR)
- Kapalinový chromatograf UPLC I-class (Waters, USA)
- MS analyzátor XEVO TQ-S (Waters, USA)
- Chromatografická kolona Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 150 mm, 2,7 μ m, 1000 bar) (Agilent, USA)
- Millipore Milli-Q (Merck, Německo)
- Analytické váhy s váživostí 0,0001 g (Sartorius, Německo)

4.2. Chemikálie

- Deionizovaná voda Milli-Q (MQ) – připravována přímo v laboratořích ALS na přístroji Millipore Milli-Q
- Acetonitril, LC-MS kvalita, čistota 99,95 % (Honeywell, USA)
- Síran hořečnatý, čistota 99,5 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Chlorid sodný, p. a. (Lach-ner, ČR)
- Methanol, LC-MS kvalita, čistota 99,95 % (Honeywell, USA)
- Kyselina mravenčí, MS kvalita, čistota 98 % (Sigma-Aldrich, Německo)

- Dihydrát trisodné soli kyseliny citronové, ACS reagent (Sigma-Aldrich, Německo)
- Seskvihydrát disodné soli hydrogencitronové kyseliny, čistota 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)
- Octan sodný (Honeywell, USA)
- PSA Supelclean (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina medronová (Agilent, USA)
- Standardy a vnitřní standardy analytů, viz Tabulka 16 a 17 (strana 62 a 67) (Cerilliant, Chromservis, HPC Standards GmbH, HPST, Lipomed, Merck, Neochema, Sigma-Aldrich, TEVA, Toronto Research Chemicals)

4.3. Zásobní roztoky a vzorky

- SPIKE A: směsný zásobní roztok analytů o koncentraci 50 ng ml⁻¹ (rozpuštědlo acetonitril)
- SPIKE B: směsný zásobní roztok analytů o koncentraci 50 ng ml⁻¹ (rozpuštědlo methanol)
- SPIKE C: směsný zásobní roztok analytů o koncentraci 100 ng ml⁻¹ (rozpuštědlo acetonitril)
- ISTD A: směsný zásobní roztok vnitřních standardů o koncentraci 50 ng ml⁻¹ (rozpuštědlo acetonitril)
- ISTD B: směsný zásobní roztok vnitřních standardů o koncentraci 50 ng ml⁻¹ (rozpuštědlo methanol)
- Vzorek pevné matrice pro optimalizaci (testované na přítomnost interferentů)
- Vzorky kalů z ČOV, viz Tabulka 13 (strana 58)

4.4. Kalibrace

Do vialek byla připravena kalibrační sada standardů, jak je uvedeno v Tabulce 6 (strana 42). Nejprve byl připraven pracovní roztok PR 10 a zásobní roztok vnitřního standardu IS 10 naředěním směsných zásobních roztoků SPIKE A, SPIKE B, SPIKE C, ISTD A a ISTD B. Pracovní roztok PR 10 byl následně dále ředěn na roztoky označené jako PR 1, PR 0,1 a PR 0,01. Požadované objemy pracovních roztoků byly přesně odměřeny automatickou

pipetou a přeneseny do vialek obsahujících odpovídající objem MQ vody. Každý výsledný roztok měl konečný objem 1 ml.

Tabulka 6: Přehled roztoků k přípravě kalibrační sady standardů

Označení	Úroveň kalibrace ng ml ⁻¹	Odebíraný objem μl	Objem IS 10 μl	Objem MQ μl
IS 10	10	200 (ISTD A) 200 (ISTD B)	-	600
PR 10	10	200 (SPIKE A) 200 (SPIKE B) 100 (SPIKE C)	-	500
PR 1	1,00	100 (PR 10)	-	900
PR 0,1	0,10	100 (PR 1)	-	900
PR 0,01	0,01	100 (PR 0,1)	-	900
STD 8	2,5	250 (PR 10)	50	700
STD 7	1,00	100 (PR 10)	50	850
STD 6	0,50	50 (PR 10)	50	900
STD 5	0,10	100 (PR 1)	50	850
STD 4	0,05	50 (PR 1)	50	900
STD 3	0,01	100 (PR 0,1)	50	850
STD 2	0,005	50 (PR 0,1)	50	900
STD 1	0,001	100 (PR 0,01)	50	850

4.5. Optimalizace metody

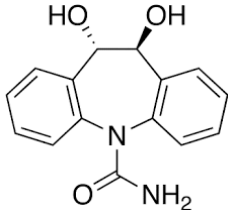
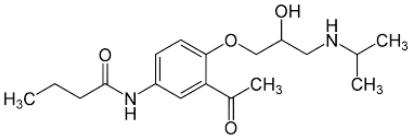
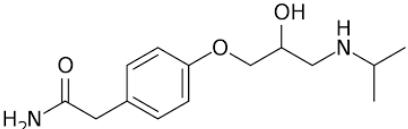
QuEChERS metoda nabízí v zásadě širokou škálu kombinací solí, rozpouštědel, extrakčních časů či zakoncentrovacích postupů, které všechny vycházejí z principů této techniky, avšak každý z nich je vhodný pro odlišnou skupinu cílových analytů. V laboratořích ALS se metoda LC-MS/MS využívá pro stanovení farmaceutických látek ve vodách, přičemž zahrnuje více než 100 cílových analytů s různými chemickými strukturami a vlastnostmi. Cílem této diplomové práce bylo využít validovanou metodu LC-MS, včetně jejího komplexního nastavení, a navrhnout a otestovat optimální postup QuEChERS, který by mohl sloužit

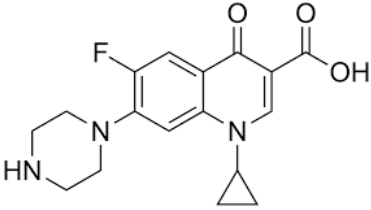
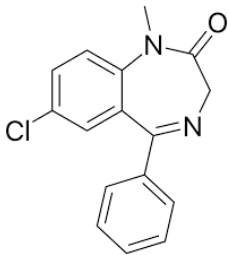
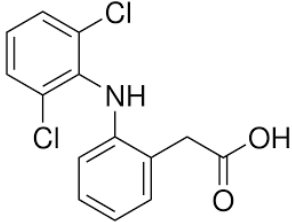
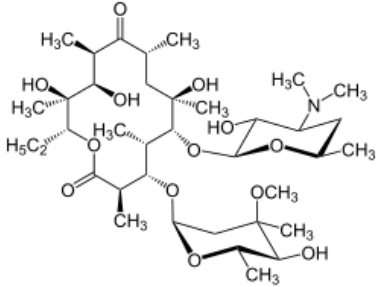
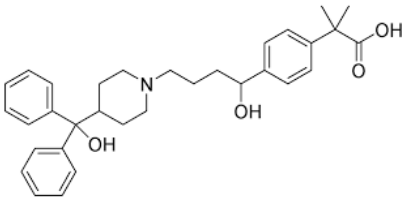
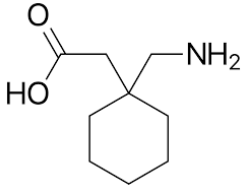
k precizní a správné analýze farmaceutických látek v pevných matricích, zejména v čistírenských kalech.

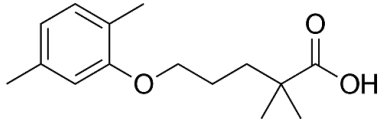
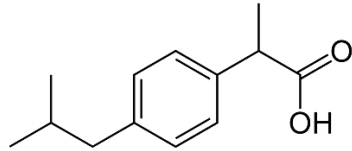
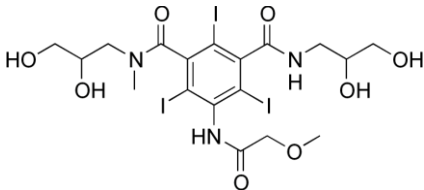
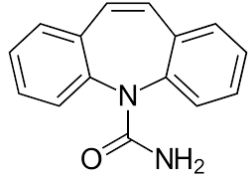
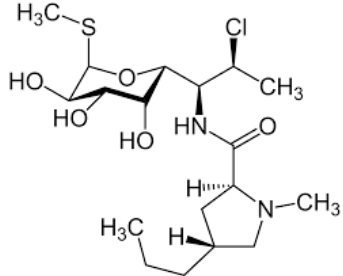
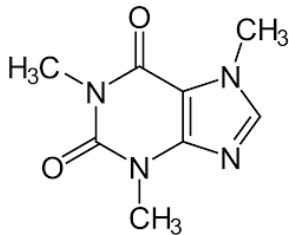
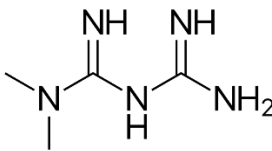
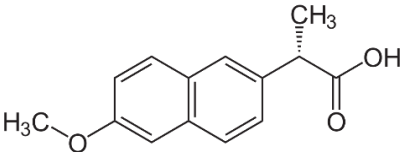
4.5.1. Klíčoví zástupci měřených farmaceutických látek

Vzhledem k rozsáhlému počtu cílových analytů metody LC-MS, byli z každé chemicky a strukturně příbuzné skupiny vybráni reprezentativní zástupci, pomocí kterých budou dále diskutovány výsledky (grafické znázornění výsledků pro více než 100 analytů by bylo velmi nepřehledné). Naopak, vedle reprezentativních zástupců byly také vybrány analyty (antibiotika), u kterých je známo problematické LC-MS stanovení. Pro vyhodnocení optimalizačních kroků QuEChERS techniky bylo vybráno 25 klíčových farmaceutik z různých terapeutických skupin. Jejich přehled je uveden v Tabulce 7, která zahrnuje ATC kódy, CAS RN, molární hmotnosti, sumární a strukturní vzorce. V Tabulce 8 (strana 47) jsou uvedeny ISTD (interní standardy) použité pro kvantifikaci těchto analytů.

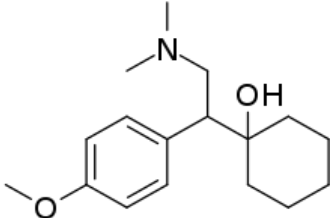
Tabulka 7: Analyty vybrané k optimalizačním krokům, jejich ATC kód, CAS RN, molární hmotnost M a sumární a strukturní vzorec

Analyt	ATC kód	CAS RN	Sumární vzorec M / g mol ⁻¹	Strukturní vzorec
10,11-dihydroxy-karbamazepin	-	35079-97-1	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃ (270,3)	
Acebutolol	C07AA17	37517-30-9	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₄ (336,4)	
Atenolol	C07AB03	29122-68-7	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃ (266,3)	

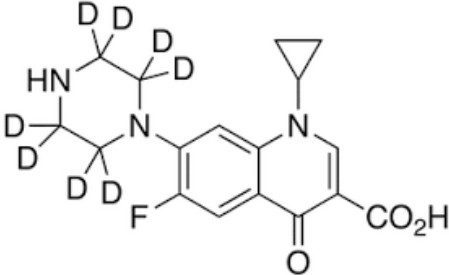
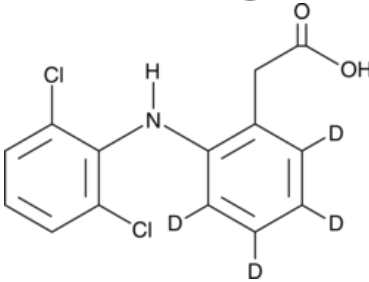
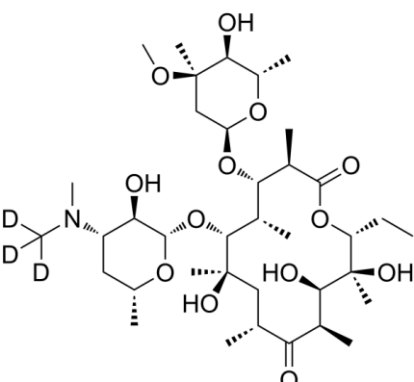
Analyt	ATC kód	CAS RN	Sumární vzorec M / g mol ⁻¹	Strukturní vzorec
Ciprofloxacin	J01MA02	85721-33-1	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃ (331,3)	
Diazepam	N05BA01	439-14-5	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O (284,7)	
Diklofenak	M01AB05	15307-86-5	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂ (296,1)	
Erythromycin	J01FA01	643-22-1	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃ (733,9)	
Fexofenadin	R06AX26	83799-24-0	C ₃₂ H ₃₉ NO ₄ (501,7)	
Gabapentin	N03AX12	60142-96-3	C ₉ H ₁₇ NO ₂ (171,2)	

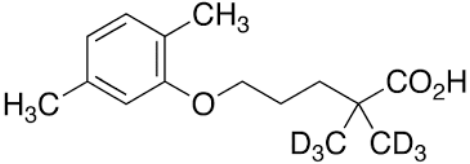
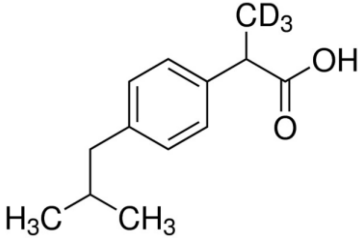
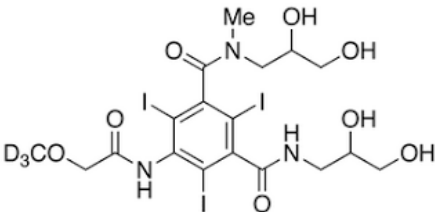
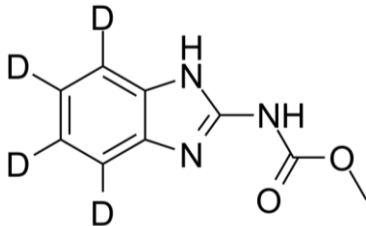
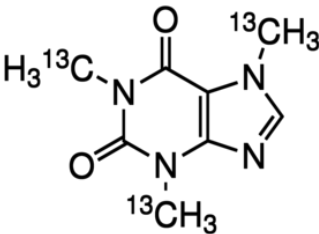
Analyt	ATC kód	CAS RN	Sumární vzorec M / g mol ⁻¹	Strukturní vzorec
Gemfibrozil	C10AB04	25812-30-0	C ₁₅ H ₂₂ O ₃ (250,3)	
Ibuprofen	M01AE01	15687-27-1	C ₁₃ H ₁₈ O ₂ (206,3)	
Iopromid	V08AA04	73334-07-3	C ₁₈ H ₂₄ I ₃ N ₃ O ₈ (791,1)	
Karbamazepin	N03AF01	298-46-4	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O (236,3)	
Klindamycin	J01FF01	18323-44-9	C ₁₈ H ₃₃ ClN ₂ O ₅ S (425,0)	
Kofein	N06BC01	58-08-2	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ (194,2)	
Metformin	A10BA02	657-24-9	C ₄ H ₁₁ N ₅ (129,2)	
Naproxen	M01AE02	22204-53-1	C ₁₄ H ₁₄ O ₃ (230,3)	

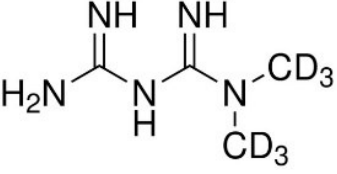
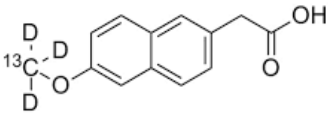
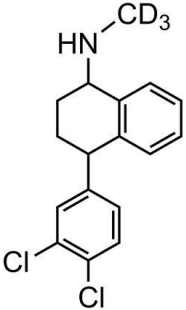
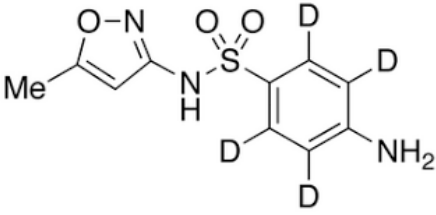
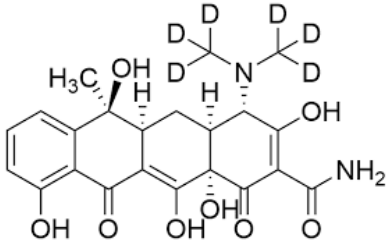
Analyt	ATC kód	CAS RN	Sumární vzorec M / g mol ⁻¹	Strukturní vzorec
Norfloxacin	J01MA06	70458-96-7	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃ (319,3)	
Paracetamol	N02BE01	103-90-2	C ₈ H ₉ NO ₂ (151,2)	
Sertralin	N06AB06	79617-96-2	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N (306,2)	
Sulfamethoxazol	J01EC01	723-46-6	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S (253,3)	
Tetracyklin	J01AA07	60-54-8	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ (444,4)	
Tramadol	N02AX02	123154-38-1	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂ (263,4)	
Valsartan	C09CA03	137862-53-4	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃ (435,5)	

Analyt	ATC kód	CAS RN	Sumární	Strukturní vzorec
			vzorec $M / g \text{ mol}^{-1}$	
Venlafaxin	N06AX16	93413-69-5	$C_{17}H_{27}NO_2$ (277,4)	

Tabulka 8: Izotopově značené ISTD příslušných analytů vybrané k optimalizačním krokům, jejich CAS RN, molární hmotnost M a sumární a strukturní vzorec

Analyt (ISTD)	CAS RN	Sumární	Strukturní vzorec
		vzorec $M / g \text{ mol}^{-1}$	
Ciprofloxacin D ₈	1130050-35-9	$C_{17}H_{10}D_8FN_3O_3$ (339,4)	
Diklofenak D ₄	153466-65-0	$C_{14}H_7D_4Cl_2NO_2$ (300,2)	
Erythromycin D ₃	959119-26-7	$C_{37}H_{64}D_3NO_{13}$ (737,0)	

Analyt (ISTD)	CAS RN	Sumární	Strukturní vzorec
		vzorec $M / g\ mol^{-1}$	
Gemfibrozil D ₆	1184986-45-5	$C_{15}H_{16}D_6O_3$ (256,4)	
Ibuprofen D ₃	121662-14-4	$C_{13}H_{15}D_3O_2$ (209,3)	
Iopromid D ₃	1189947-73-6	$C_{18}H_{21}D_3I_3N_3O_8$ (794,1)	
Karbamazepin D ₁₀	132183-78-9	$C_{15}H_2D_{10}N_2O$ (246,3)	
Karbendazim D ₄	291765-95-2	$C_9H_5D_4N_3O_2$ (195,2)	
Kofein ¹³ C	78072-66-9	$^{13}C_3C_5H_{10}N_4O_2$ (197,2)	

Analyt (ISTD)	CAS RN	Sumární	Strukturní vzorec
		vzorec $M / g \text{ mol}^{-1}$	
Metformin D ₆	1185166-01-1	C ₄ H ₆ D ₆ ClN ₅ (171,7)	
Naproxen ¹³ C D ₃	1216704-11-8	¹³ CC ₁₃ H ₁₁ D ₃ O ₃ (234,3)	
Sertralin D ₃	1126784-49-3	C ₁₇ H ₁₄ D ₃ Cl ₂ N (309,3)	
Sulfamethoxazol D ₄	1020719-86-1	C ₁₀ H ₇ D ₄ N ₃ O ₃ S (257,3)	
Tetracyklin D ₆	2373374-42-4	C ₂₂ D ₆ H ₁₈ N ₂ O ₈ (450,5)	

4.5.2. Experiment 1

Cílem experimentu 1 bylo porovnat a vybrat optimální materiál zkumavky, ve které dochází k odfoukávání organického rozpouštědla (ACN) použitého při samotné extrakci metodou QuEChERS. Zvoleny byly plastové a skleněné zkumavky, do nichž byl odebrán vzorek, který byl následně odfoukán pod proudem dusíku. Experiment zahrnuje rovněž porovnání výtěžnosti analyzovaných látek ze vzorků odfoukaných do sucha a do zbytkové kapky.

Samotný extrakční krok metody QuEChERS byl proveden v zkumavce o objemu 50 ml, do které bylo naváženo na vahách 1,0 g testované pevné matrice. Následně byly automatickou pipetou přidány zásobní roztoky analytů: 200 μ l SPIKE A, 200 μ l SPIKE B a 100 μ l SPIKE C (výsledná koncentrace 1 ng ml⁻¹), které simulují kontaminaci pevného vzorku. Pro kvantifikaci byly dále přidány zásobní roztoky vnitřních standardů: 100 μ l ISTD A a 100 μ l ISTD B (výsledná koncentrace 0,5 ng ml⁻¹). Poté bylo ke vzorku přidáno 10,0 ml MQ vody pomocí automatické pipety a zkumavka byla protřepána ručně. Automatickým dávkovačem bylo přidáno 10,0 ml ACN a zkumavka byla umístěna na třepačku na 15 minut. Do plastové zkumavky byla předem připravena směs extrakčních solí navážením 4 g MgSO₄ a 1,5 g NaCl. Tato směs byla následně přidána do 50ml plastové zkumavky se vzorkem a ihned důkladně po dobu několika minut třepána v ruce. Vzniklá směs byla centrifugována při 10 000 RPM po dobu 5 minut. Po centrifugaci došlo k jasnému oddělení spodní vodné fáze a horní acetonitrilové fáze. Z horní acetonitrilové fáze bylo odebráno po 1 ml do dvou (v tomto kroku experimentu testovaných) skleněných a dvou plastových 10ml zkumavek a 1 ml do skleněné vialky pro přímou analýzu (vzorek acetonitrilu připravený s pevnou matricí, SM-ACN). Odebrané vzorky ve zkumavkách byly následně odfoukávány pod proudem dusíku ve dvou režimech:

- Odfoukání do sucha: Provedeno na jedné plastové a jedné skleněné zkumavce.
- Odfoukání do zbytkové kapky: Provedeno na druhé plastové a druhé skleněné zkumavce.

Po odfoukání byl vzorek v každé zkumavce rozpuštěn v 1 ml MQ vody a přenesen do vialky pro analýzu. Celý postup byl opakován třikrát, což vedlo k přípravě 15 vzorků. Stejným způsobem bylo připraveno dalších 15 vzorků, s tím rozdílem, že na začátku nebyla do zkumavky přidána testovaná pevná matrice. Přehled jednotlivých vzorků je uveden v Tabulce 9 (strana 51). Kontrolní vzorek byl připraven napipetováním 850 μ l MQ vody do vialky a přidáním 100 μ l pracovního roztoku PR 10 a 50 μ l zásobního roztoku vnitřního standardu IS 10.

Tabulka 9: Přehled vzorků experimentu 1

Typ vzorku	Materiál zkumavky	Režim odfoukání	Kód vzorku
S maticí (SM)	-	-	SM-ACN1, SM-ACN2, SM-ACN3
	Plast	Do sucha	SM-PS1, SM-PS2, SM-PS3
		Do kapky	SM-PK1, SM-PK2, SM-PK3
	Sklo	Do sucha	SM-SS1, SM-SS2, SM-SS3
		Do kapky	SM-SK1, SM-SK2, SM-SK3
	-	-	BM-ACN1, BM-ACN2, BM-ACN3
Bez matrice (BM)	Plast	Do sucha	BM-PS1, BM-PS2, BM-PS3
		Do kapky	BM-PK1, BM-PK2, BM-PK3
	Sklo	Do sucha	BM-SS1, BM-SS2, BM-SS3
		Do kapky	BM-SK1, BM-SK2, BM-SK3

4.5.3. Experiment 2

V experimentu 2 bylo cílem stanovit nejvhodnější složení rozpouštěcího roztoku, který se přidává po odfoukání vzorku pod proudem dusíku za účelem jeho rozpuštění před samotnou LC-MS analýzou.

První sada vzorků označená písmenem A sloužila jako referenční sada pro porovnání. Nejprve bylo do skleněné vialky přidáno 910 μl MQ vody, aby se předešlo navázání analytů na povrch skla. Následně bylo postupně přidáno 20 μl SPIKE A, 20 μl SPIKE B, 10 μl SPIKE C, 20 μl ISTD A a 20 μl ISTD B, čímž vznikl celkový objem 1 ml. Sada A byla připravena v triplikátech.

Sady vzorků B, C, D a E byly připraveny následujícím způsobem. Do 50ml plastové zkumavky bylo napipetováno 10,0 ml 0,1% HCOOH v MQ vodě. Poté byly přidány zásobní roztoky analytů: 200 μl SPIKE A, 200 μl SPIKE B a 100 μl SPIKE C (výsledná koncentrace 1 ng ml^{-1}), které simulují kontaminaci vzorku. Pro kvantifikaci byly dále přidány zásobní roztoky vnitřních standardů: 100 μl ISTD A a 100 μl ISTD B (koncentrace 0,5 ng ml^{-1}). Směs byla ručně protřepána. Následně bylo automatickým dávkovačem přidáno 10,0 ml ACN a zkumavka byla umístěna na třepačku na 15 minut. Směs extrakčních solí (4 g MgSO_4 + 1,5 g NaCl) byla následně přidána do 50ml plastové zkumavky se vzorkem a ihned důkladně po dobu několika minut třepána v ruce. Poté byla směs centrifugována při 10 000 RPM po dobu 5 minut. Z horní acetonitrilové fáze bylo odebráno po 1 ml do skleněné zkumavky pro každou

sadu (B, C, D, E), které byly zvoleny na základě předchozího experimentu 1. Každá sada byla připravena v triplicátech. Vzorky byly následně odfoukány pod proudem dusíku do sucha (na základě experimentu 1) a rozpuštěny v různých rozpouštěcích roztocích:

- Sada B: Rozpuštěna v 1 ml MQ vody.
- Sada C: Rozpuštěna v 1 ml 0,1% HCOOH v MQ vodě.
- Sada D: Rozpuštěna v 1 ml směsi MQ vody a methanolu v poměru 1:1.
- Sada E: Rozpuštěna v 1 ml směsi 0,1% HCOOH v MQ vodě a methanolu v poměru 1:1.

4.5.4. Experiment 3

Cílem experimentu 3 byla optimalizace samotného extrakčního kroku metody QuEChERS pro stanovení farmaceutických látek. Experiment se zaměřuje na složení rozpouštědla pevné matrice, výběr složení extrakční soli a přídavek PSA.

Na vahách bylo naváženo do 50ml plastové zkumavky 2,0 g testované pevné matrice. Automatickou pipetou byly přidány zásobní roztoky standardů: 20 μ l SPIKE A, 20 μ l SPIKE B a 10 μ l SPIKE C (výsledná koncentrace 1 ng g⁻¹) a zásobní roztoky vnitřních standardů: 20 μ l ISTD A a 20 μ l ISTD B (výsledná koncentrace 0,5 ng g⁻¹). Vzorek byl rozpuštěn v 10,0 ml MQ vody nebo v 10 ml 0,1% HCOOH v MQ vodě. Po protřepání v ruce bylo automatickým dávkovačem přidáno 10,0 ml ACN a zkumavka byla umístěna na třepačku na 15 minut. Směs byla extrahována směsí solí, které byly pracovníě označeny jako „sodná“ sůl (4 g MgSO₄ + 1 g NaCl), „citrátová“ sůl (4 g MgSO₄ + 1 g NaCl + 1 g dihydrát trisodné soli kyseliny citronové + 0,5 g seskvihydrát disodné soli hydrogencitronové kyseliny) a „octanová“ sůl (6 g MgSO₄ + 1,5 g CH₃COONa). Po přidání extrakční soli byla směs ihned důkladně po dobu několika minut třepána v ruce. Do poloviny připravovaných vzorků bylo přidáno 50 mg PSA + 50 mg MgSO₄ a protřepáno. Poté byla směs centrifugována při 10 000 RPM po dobu 5 minut. Z horní acetonitrilové fáze bylo odebráno 5 ml do skleněné zkumavky a vzorek byl odfoukán pod proudem dusíku do sucha. Vzorek byl následně rozpuštěn v 1 ml směsi MQ vody a methanolu v poměru 1:1. Vzorky byly připraveny v triplicátech. Tímto způsobem bylo připraveno 36 vzorků, jejich přehled je uveden v Tabulce 10 (strana 53). Kontrolní vzorek byl připraven napipetováním 850 μ l MQ vody do vialky a přidáním 100 μ l pracovního roztoku PR 10 a 50 μ l zásobního roztoku vnitřního standardu IS 10.

Tabulka 10: Přehled vzorků experimentu 3

Složení rozpouštědla	Extrakční sůl	50 mg PSA + 50 mg MgSO ₄	Kód vzorku
10 ml MQ vody	„sodná“	Ano	SMP1, SMP2, SMP3
		Ne	SMB1, SMB2, SMB3
	„citrátová“	Ano	CMP1, CMP2, CMP3
		Ne	CMB1, CMB2, CMB3
	„octanová“	Ano	OMP1, OMP2, OMP3
		Ne	OMB1, OMB2, OMB3
10 ml 0,1% HCOOH v MQ vodě	„sodná“	Ano	SKP1, SKP2, SKP3
		Ne	SKB1, SKB2, SKB3
	„citrátová“	Ano	CKP1, CKP2, CKP3
		Ne	CKB1, CKB2, CKB3
	„octanová“	Ano	OKP1, OKP2, OKP3
		Ne	OKB1, OKB2, OKB3

4.6. Analýza reálných vzorků

Optimalizovaný postup byl aplikován na vzorky kalů z ČOV v ČR, poskytnuté laboratoří ALS. Kromě analytů zahrnutých do optimalizace byly v připravených vzorcích sledovány i další farmaceutické látky, včetně jejich vybraných metabolitů. Přehled těchto látek je uveden v Tabulce 11. V Tabulce 12 (strana 57) jsou uvedeny ISTD použité pro kvantifikaci těchto analytů.

Tabulka 11: Analyty mimo klíčových zástupců, jejich ATC kód, CAS RN, sumární vzorec a molární hmotnost M.

Analyt	ATC kód	CAS RN	Sumární vzorec	M g mol ⁻¹
10,11-dihydro-10-hydroxykarbamazepin	-	29331-92-8	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂	254,3
10,11-dihydroxykarbamazepin	-	35079-97-1	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃	270,3
10,11-epoxidkarbamazepin	-	36507-30-9	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,3
2-hydroxykarbamazepin	-	68011-66-5	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,3
3-hydroxykarbamazepin	-	68011-67-7	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,3

Analyt	ATC kód	CAS RN	Sumární vzorec	M g mol⁻¹
4-acetamidoantipyrin	-	83-15-8	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂	245,3
4-formylaminoantipyrin	-	1672-58-8	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂	231,3
4-hydroxydiklofenak	-	64-118-84-9	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₃	312,1
Alfuzosin	G04CA01	81403-80-7	C ₁₉ H ₂₇ N ₅ O ₄	389,4
Amidotrizoát	V08AA01	117-96-4	C ₁₁ H ₉ I ₃ N ₂ O ₄	613,9
Amitriptylin	N06AA09	50-48-6	C ₂₀ H ₂₃ N	277,4
Amoxicillin	J01CA04	26787-78-0	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	365,4
Anastrozol	L02BG03	120511-73-1	C ₁₇ H ₁₉ N ₅	293,4
Atorvastatin	C10AA05	134523-00-5	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅	558,6
Azathioprin	L04AX01	446-86-6	C ₉ H ₇ N ₇ O ₂ S	277,3
Azithromycin	J01FA10	83905-01-5	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	749,0
Benzylpenicilin	J01CE01	61-33-6	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	334,4
Bezafibrát	C10AB08	41859-67-0	C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄	361,8
Bisoprolol	C07AB07	66722-44-9	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	325,4
Buprenorfin	N02AE01	52485-79-7	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	467,6
Butorfanol	N02AF01	42408-82-2	C ₂₁ H ₂₉ NO ₂	327,5
Celiprolol	C07AB08	56980-93-9	C ₂₀ H ₃₃ N ₃ O ₄	379,5
Citalopram	N06AB04	59729-33-8	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	324,4
Cyklobenzaprin	M03BX08	303-53-7	C ₂₀ H ₂₁ N	275,4
Cyklofosfamid	L01AA01	50-18-0	C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P	261,1
Diltiazem	C08DB01	56209-45-1	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄ S	414,5
Disopyramid	C01BA03	3737-09-5	C ₂₁ H ₂₉ N ₃ O	339,5
Doxycyklin	J01AA02	564-25-0	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	444,4
Enalapril	C09AA02	75847-73-3	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₅	376,4
Enoxacin	J01MA03	74011-58-8	C ₁₅ H ₁₇ FN ₄ O ₃	320,3
Enrofloxacin	J01MA90	93106-60-6	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	359,4
Ensulizol	-	27503-81-7	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	274,3
Eprosartan	C09CA02	133040-01-4	C ₂₃ H ₂₄ N ₂ O ₄ S	424,5
Fenazon	N02BB02	60-80-0	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	188,2
Flukonazol	J02AC01	86386-73-4	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O	306,3
Flumechin	J01FA06	42835-25-6	C ₁₄ H ₁₂ FN ₃ O ₃	261,3
Fluoxetin	N06AB03	54910-89-3	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	309,3
Flutamid	L02BB01	13311-84-7	C ₁₁ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₃	309,3
Furosemid	C03CA01	54-31-9	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	330,7

Analyt	ATC kód	CAS RN	Sumární vzorec	M g mol⁻¹
Galantamin	N06DA04	357-70-0	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287,4
Glimepirid	A10BB12	261361-60-8	C ₂₄ H ₃₄ N ₄ O ₅ S	490,6
Hydrochlorothiazid	C03AA03	58-93-5	C ₇ H ₈ ClN ₃ O ₄ S ₂	297,7
Chloramfenikol	J01BA01	56-75-7	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	323,1
Chlortetracyklin	J01AA06	57-62-5	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	323,1
Ifosfamid	L01AA06	3778-73-2	C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P	261,1
Indometacin	M01AB01	53-86-1	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357,8
Iohexol	V08AB01	66108-95-0	C ₁₉ H ₂₆ I ₃ N ₃ O ₉	821,1
Iomeprol	V08AB05	78649-41-9	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₈	777,1
Iopamidol	V08AA01	60166-93-0	C ₁₇ H ₂₂ I ₃ N ₃ O ₈	777,1
Irbesartan	C09CA04	138402-11-6	C ₂₅ H ₂₈ N ₆ O	428,5
Kapcitabin	L01BC06	154361-50-9	C ₁₅ H ₂₂ FN ₃ O ₆	359,4
Ketoprofen	M01AE03	22071-15-4	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254,3
Klaritromycin	J01FA09	81103-11-9	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	748,0
Klimbazol	D01AC08	38083-17-9	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₂ O ₂	292,8
Klonazepam	N03AE01	1622-61-3	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	315,7
Kloxacin	J01CF04	61-72-3	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₅ S	435,9
Kolchicin	M04AC01	64-86-8	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	399,4
Kotinin	-	486-56-6	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176,2
Kyselina klofibrová	C10AB02	882-09-7	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	214,6
Kyselina nalidixová	J01XE02	389-08-2	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	232,2
Kyselina oxolinová	D08AX05	14698-29-4	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	261,2
Kyselina salicylová	N02BA01	69-72-7	C ₇ H ₆ O ₃	138,1
Kyselina valsartanová	-	164265-78-5	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₂	266,3
Lamotrigin	N03AX09	84057-84-1	C ₉ H ₇ Cl ₂ N ₅	256,1
Linkomycin	J01FF01	154-21-2	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	406,5
Lomefloxacin	J01MA06	98079-51-7	C ₁₇ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	351,4
Loperamid	A07DA03	53179-11-6	C ₂₉ H ₃₃ ClN ₂ O ₂	477,0
Losartan	C09CA01	114798-26-4	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₆ O	422,9
Lovastatin	C10AA02	75330-75-5	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	404,5
Meloxicam	M01AC06	71125-38-7	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₄ S ₂	351,4
Memantin	N06DX01	19982-08-2	C ₁₂ H ₂₁ N	179,3
Metacyklin	J01AA08	914-00-1	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₈	442,4
Metotrexát	L01BA01	59-05-2	C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅	454,4

Analyt	ATC kód	CAS RN	Sumární vzorec	M g mol⁻¹
Metoprolol	C07AB02	51384-51-1	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	267,4
Metronidazol	J01XD01	443-48-1	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	171,2
Mirtazapin	N06AX11	85650-52-8	C ₁₇ H ₁₉ N ₃	265,4
Mykofenolát mofetil	L04AA06	128794-94-5	C ₂₃ H ₃₁ NO ₇	433,5
Nimesulid	M01AX17	51803-78-2	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₅ S	308,3
Norverapamil	-	67018-85-3	C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₄	440,6
O-Desmetylnaproxen	-	52079-10-4	C ₁₃ H ₁₂ O ₃	216,2
Ofloxacin	J01MA01	82419-36-1	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	361,4
Omeprazol	A02BC01	73590-58-6	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S	345,4
Ormetoprim	J01EE06	6981-18-6	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₂	274,3
Ornidazol	J01XD02	16773-42-5	C ₇ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	219,6
Oxazepam	N05BA04	604-75-1	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	286,7
Oxkarbazepin	N03AF02	28721-07-5	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,2
Oxypurinol	-	2465-59-0	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	151,2
Oxytetracyklin	-	79-57-2	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	460,4
Paklitaxel	L01CD01	33069-62-4	C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄	853,9
Paraxantin	-	611-59-6	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	180,2
Piroxikam	M01AC01	36322-90-4	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	331,3
Primidon	N03AA02	125-33-7	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	218,3
Propranolol	C07AA05	525-66-6	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	229,3
Ranitidin	A02BA02	66357-35-5	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₃ S	314,4
Roxithromycin	J01FA06	80214-83-1	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁	837,0
Salbutamol	R03AC02	18559-94-9	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	293,3
Sarafloxacin	J01MA10	98105-99-8	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	385,4
Simvastatin	C10AA01	79902-63-9	C ₂₅ H ₃₈ O ₅	418,6
Sotalol	C07AA07	3930-20-9	C ₁₂ H ₂₀ N ₂ O ₃ S	272,4
Sulfadiazin	J01EB04	68-35-9	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250,3
Sulfachlorpyridazin	J01MB03	1672-91-9	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	284,7
Sulfamerazin	J01EB02	127-79-7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	264,3
Sulfamethazin	J01EB01	57-68-1	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278,3
Sulfamethizol	J01EB08	144-82-1	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	270,3
Sulfamethoxypyridazin	J01MB06	80-35-3	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	280,3
Sulfamonomethoxin	J01EC02	1220-83-3	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	280,3
Sulfanilamid	J01EB03	63-74-1	C ₆ H ₈ N ₂ O ₂ S	172,2

Analyt	ATC kód	CAS RN	Sumární vzorec	M g mol⁻¹
Sulfapyridin	J01EB05	144-83-2	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	249,3
Sulfathiazol	J01EB06	72-14-0	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	255,3
Telmisartan	C09CA07	144701-48-4	C ₃₃ H ₃₀ N ₄ O ₂	514,6
Terbutalin	R03AC02	23031-25-6	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	255,3
Thebain	N02AA01	115-37-7	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	311,4
Tiamulin	QJ01XX90	55297-95-5	C ₂₈ H ₄₇ NO ₄ S	493,7
Triklorbarban	D08AE02	101-20-2	C ₁₃ H ₉ Cl ₃ N ₂ O	315,5
Trimethoprim	J01EA01	738-70-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,3
Vankomycin	J01XA01	1404-90-6	C ₆₆ H ₇₅ Cl ₂ N ₉ O ₂₄	1449,2
Venlafaxin	N06AX16	93413-69-5	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	277,4
Verapamil	C08DA01	52-53-9	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	454,6
Warfarin	B01AA03	81-81-2	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308,3
Zolpidem	N05CF02	82626-48-0	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	307,4

Tabulka 12: Izotopově značené ISTD příslušných analytů mimo klíčových zástupců, jejich CAS RN, sumární vzorec a molární hmotnost.

Analyt (ISTD)	CAS RN	Sumární vzorec	M g mol⁻¹
4-acetaminoantipyrin D ₃	342821-66-3	C ₁₃ H ₁₂ D ₃ N ₃ O ₂	248,3
Amoxicillin D ₄	2673270-36-3	C ₁₆ H ₁₅ D ₄ N ₃ O ₅ S	367,4
Atrazin D ₅	163165-75-1	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,7
Atrazin-desizopropyl D ₅	1189961-78-1	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,7
Azithromycin D ₃	163921-65-1	C ₃₈ H ₆₉ D ₃ N ₂ O ₁₂	752,0
Bentazon D ₆	2733969-39-4	C ₁₀ H ₆ D ₆ N ₂ O ₃ S	246,3
Benzylpenicilin draselný D ₇	352323-25-2	C ₁₆ H ₁₀ D ₇ KN ₂ O ₄ S	379,5
Citalopram D ₆	1190003-26-9	C ₂₀ H ₁₅ D ₆ FN ₂ O	330,4
Diazinon D ₁₀	100155-47-3	C ₁₂ H ₁₁ D ₁₀ N ₂ O ₃ PS	314,4
Fosalon D ₁₀	2734007-51-1	C ₁₂ H ₅ D ₁₀ ClNO ₄ PS ₂	377,9
Hydrochlorothiazid D ₂	1219798-89-6	C ₇ H ₆ D ₂ ClN ₃ O ₄ S ₂	299,8
Iohexol D ₅	928623-33-0	C ₁₉ H ₂₁ D ₅ I ₃ N ₃ O ₉	826,2
Iomeprol D ₃	1185146-41-1	C ₁₇ H ₁₉ D ₃ I ₃ N ₃ O ₈	780,1
Iopamidol D ₃	1217831-76-9	C ₁₇ H ₁₉ D ₃ I ₃ N ₃ O ₈	780,1
Kyselina salicylová D ₄	78646-17-0	C ₇ H ₂ D ₄ O ₃	142,2

Analyt (ISTD)	CAS RN	Sumární vzorec	M g mol⁻¹
Metiokarb D ₃	1581694-94-1	C ₁₁ H ₁₂ D ₃ NO ₂ S	228,3
Metolachlor D ₆	1219803-97-0	C ₁₅ H ₁₆ D ₆ ClNO ₂	289,8
Norethindron D ₆	2376036-05-2	C ₂₀ H ₂₀ D ₆ O ₂	304,5
Quizalofop D ₃	1398065-84-3	C ₁₉ H ₁₄ D ₃ ClN ₂ O ₄	375,8
Tebukonazol D ₆	2242739-42-8	C ₁₆ H ₁₆ D ₆ ClN ₃ O	313,9

Tabulka 13 poskytuje přehled vzorků kalů použitých k ověření optimalizovaného postupu na reálných vzorcích. Do analýzy byly zahrnuty také vzorky kalové vody, které se svým složením liší od vzorků odpadních vod běžně analyzovaných původním postupem bez použití QuEChERS extrakce.

Tabulka 13: Přehled vzorků kalů použitých k ověření optimalizovaného postupu

Kód ČOV	Kód vzorku	Skupenství vzorku	Typ vzorku
ČOV1	1P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV2	2P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV3	3P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV4	4P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV5	5P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV6	6P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV7	7K	Kapalné	Kalová voda
ČOV8	8P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV9	9P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV10	10P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV10	10K	Kapalné	Kalová voda
ČOV11	11K	Kapalné	Kalová voda
ČOV12	12P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV13	13P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV14	14P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV15	15P	Pevné	Aktivovaný kal
ČOV16	16K	Kapalné	Kalová voda

Finální postup QuEChERS: Do 50ml plastových zkumavek bylo naváženo 2 g pevného vzorku kalu nebo 10 g kalové vody. Ke každému vzorku bylo přidáno 40 µl ISTD A a 40 µl ISTD B. Pevné vzorky kalů byly následně rozpuštěny v 10 ml 0,1% HCOOH v MQ vodě, zatímco ke vzorkům kalové vody bylo přímo přidáno 10 µl HCOOH. Směsi byly ručně protřepány, poté bylo automatickým dávkovačem přidáno 10 ml ACN a zkumavky byla třepány na třepačce po dobu 15 minut. Extrakce byla provedena pomocí směsi „citrátové“ soli, která obsahovala 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g dihydrátu trisodné soli kyseliny citronové a 0,5 g seskvihydrátu disodné soli hydrogencitronové kyseliny. Po přidání extrakční soli byly vzorky okamžitě důkladně třepány v ruce po dobu několika minut, aby byla zajištěna maximální účinnost extrakce. Směsi byly následně centrifugovány při 10 000 RPM po dobu 5 minut. Z horní acetonitrilové fáze byl odebrán 1 ml do skleněné zkumavky. Vzorek byl odfoukán pod proudem dusíku do sucha a poté rozpuštěn v 1 ml směsi MQ vody a methanolu v poměru 1:1. Analyzovány poté byly nejen tyto vzorky, ale i jejich 100x naředěné aliquoty.

4.7. Parametry metody

Pro stanovení farmaceutických látek byl využit analytický postup převzatý z laboratoře ALS, kde se používá akreditovaná metoda. Tato metoda splňuje všechny požadavky na preciznost, pravdivost a správnost při analýze environmentálních vzorků a poskytuje robustní výsledky pro kvantifikaci cílových látek. Pro komerční účely je metoda individuálně rozšiřována o další analyty. Aktuálně je zahrnuto v sekvenci 145 analytů.

Kapalinová chromatografie je prováděna na koloně Poroshell 120 EC-C18 o rozměrech 3,0 x 150 mm s částicemi o velikosti 2,7 µm a maximálním povoleným tlakem 1000 barů. Teplota kolony při analýze je udržována na 40 °C, autosampler je temperován na 10 °C. K analýze byl dávkován vzorek o objemu 100 µl. Parametry gradientové eluce jsou uvedeny v Tabulce 14 (strana 60) a v Tabulce 15 (strana 60). Složení mobilní fáze je následující:

- MF A: 500 ml MQ vody, 100 µl kyseliny medronové, 50 µl kyseliny mravenčí
- MF B: 400 ml methanolu, 100 ml acetonitrilu, 50 µl kyseliny mravenčí

Tabulka 14: Parametry gradientová eluce v čase pro ESI+

t_r min	MF A %	MF B %	Průtok MF ml min ⁻¹
0,00	95	5	0,4
1,50	95	5	0,4
2,00	70	30	0,4
14,10	0	100	0,4
17,00	0	100	0,6
17,10	95	5	0,6
19,00	95	5	0,6

Tabulka 15: Parametry gradientová eluce v čase pro ESI–

t_r min	MF A %	MF B %	Průtok MF ml min ⁻¹
0,00	95	5	0,4
1,50	95	5	0,4
6,00	0	100	0,4
8,00	0	100	0,6
8,10	95	5	0,6
10,00	95	5	0,6

Detekce pomocí hmotnostní tandemové spektroskopie s elektrosprejovou ionizací probíhá v pozitivním (ESI+) i negativním (ESI–) módu v závislosti na vlastnostech analyzovaných látek. Podrobné parametry MS/MS detekce, včetně retenčních časů, prekursorových iontů, kolizních energií a detekovaných hodnot m/z , jsou uvedeny v Tabulce 16 (strana 61) pro všechny analyty a v Tabulce 17 (strana 66) pro všechny ISTD. První fragmentový iont byl využit jako kvantifikační. Ionizace je zajištěna napětím 2,8 kV aplikovaným na kapiláru. Iontový zdroj je vyhříván na teplotu 150 °C a desolvatace probíhá při teplotě 600 °C. Při desolvataci proudí plyn rychlostí 700 l hod⁻¹, zatímco v oblasti kónického vstupu je průtok plynu nastaven na 250 l hod⁻¹. Nebulizační plyn je hnán pod tlakem 7,0 bar. Kolizní průtok plynu je nastaven na 0,15 ml min⁻¹. Při režimu skenování MRM je časové okno detekce stanoveno na 0,4 minuty.

Tabulka 16: Parametry metody MS/MS pro všechny analyty

Analyt	Ionizace	t_r min	Prekurzorový iont m/z	Kolizní energie eV	1. fragment. iont m/z	2. fragment. iont m/z
10,11-dihydro-10-hydroxykarbamazepin	ESI+	7,80	255	15/15	194	237
10,11-dihydroxykarbamazepin	ESI+	7,37	271	12/15	236	210
10,11-epoxidkarbamazepin	ESI+	8,00	253	35/25	167	210
2-hydroxykarbamazepin	ESI+	7,69	253,1	20/14	210,1	182,1
3-hydroxykarbamazepin	ESI+	8,34	253	30/25	210	208
4-acetamidoantipyrin	ESI+	5,38	246,2	13/13	228,2	204,2
4-formylaminoantipyrin	ESI+	5,34	232,2	13/20	214	104
4-hydroxydiklofenak	ESI+	5,65	313	12/25	267	232
Acebutolol	ESI+	5,83	337,3	21/17	116,2	319,3
Alfuzosin	ESI+	6,46	390,2	26/30	235,2	275,2
Amidotrizoát	ESI+	4,31	615	35/20	233	361
Amitriptylin	ESI+	9,42	278,2	19/19	105	233
Amoxicillin	ESI+	4,33	366	15/13	208	349
Anastrozol	ESI+	8,55	294,1	20/52	225	114,8
Atenolol	ESI+	4,38	267	23/16	145	190
Atorvastatin	ESI+	12,33	559,2	20/15	440	466
Azathioprin	ESI+	5,16	278	11/13	141,8	232
Azithromycin	ESI+	7,53	749,5	27/40	591,2	83
Benzylpenicilin	ESI+	8,97	335	22/20	160	176
Bezafibrát	ESI+	11,37	362	25/29	139	121
Bisoprolol	ESI+	7,34	326,2	17/22	116	74
Buprenorfin	ESI+	8,32	468,3	39/32	396,1	414,2
Butorfanol	ESI+	6,84	328	26/29	124	282
Celiprolol	ESI+	6,59	380,2	22/18	251	307
Ciprofloxacin	ESI+	5,34	332,1	18/20	288,1	314,1
Citalopram	ESI+	7,89	325,2	19/24	109	262,2
Cyklobenzaprin	ESI+	9,10	276	24/16	216	231

Analyt	Ionizace	t_r min	Prekurzorový iont m/z	Kolizní energie eV	1. fragment. iont m/z	2. fragment. iont m/z
Cyklofosfamid	ESI+	8,02	261	22/18	140	106
Diazepam	ESI+	11,71	285	26/30	154	193
Diklofenak	ESI–	7,98	296/294	11/11	252	250
Diltiazem	ESI+	8,48	415,2	20/17	178	370
Disopyramid	ESI+	6,33	340,2	15/15	239,2	195,1
Doxycyklin	ESI+	7,51	445	25/22	154	410
Enalapril	ESI+	8,32	377,1	20/55	234	91
Enoxacin	ESI+	5,13	320,97	22/18	233,74	256,82
Enrofloxacin	ESI+	5,47	360	24/25	245	342
Ensulizol	ESI-	5,49	279	25/45	193	80
Eprosartan	ESI+	8,03	425,2	26/30	207,2	163,2
Erytromycin	ESI+	9,24	734,5	33/20	158,18	576,5
Fenazon	ESI+	6,21	189,2	22/25	131	104
Fexofenadin	ESI+	9,22	502,3	25/23	466,3	484,3
Flukonazol	ESI+	6,54	307,2	18/18	220	238
Flumechin	ESI+	9,35	262	10/23	244	202
Fluoxetin	ESI+	9,64	310,1	7/8	44	148
Flutamid	ESI-	7,66	275,1	23/22	202,1	205,1
Furosemid	ESI-	6,74	329	22/14	205	285
Gabapentin	ESI+	4,88	172,2	15/18	154,3	137,3
Galantamin	ESI+	4,37	288,1	25/15	213	231,1
Gemfibrozil	ESI-	8,30	249	13/13	121	127
Glimepirid	ESI+	12,87	491	20/10	126,1	352
Hydrochlorothiazid	ESI-	5,14	296	18/23	205	269
Chloramfenikol	ESI-	6,53	321	16/10	152	257
Chlortetracyklin	ESI+	6,87	480	21/17	445	463
Ibuprofen	ESI-	8,08	205	8/2	161	205
Ifosfamid	ESI+	7,61	261	25/21	92	154
Indometacin	ESI+	12,82	358	22/11	139	174
Iohexol	ESI+	4,33	822,1	27/21	603,1	804,1
Iomeprol	ESI+	4,36	777,8	38/30	405	531,8
Iopamidol	ESI+	4,07	777,8	39/52	387	313,8

Analyt	Ionizace	t_r min	Prekurzorový iont m/z	Kolizní energie eV	1. fragment. iont m/z	2. fragment. iont m/z
Iopromid	ESI+	4,61	791,8	56/23	300	572,8
Irbesartan	ESI+	11,28	429,2	23/22	207	195
Kapecitabin	ESI+	9,4	360	10/19	244	173,8
Karbamazepin	ESI+	9,53	237	20/35	194	179
Ketoprofen	ESI+	10,88	255,1	15/23	209	105
Klaritromycin	ESI+	10,38	749	16/21	592	560
Klimbazol	ESI+	10,27	293,2/295,2	17/17	197	199
Klindamycin	ESI+	7,71	425	27/22	377	172
Klonazepam	ESI+	9,75	316	25/35	270	214
Kloxacin	ESI+	10,31	436	16/17	160	277
Kofein	ESI+	5,36	195	17/23	138	110
Kolchicin	ESI+	8,43	400,3	30/35	310,2	295,1
Kotinin	ESI+	4,26	177,2	20/20	80	98,2
Kyselina klofibrová	ESI-	7,59	213	15/9	127	84,5
Kyselina nalidixová	ESI+	9,05	233	10/14	215	187
Kyselina oxolinová	ESI+	7,63	262	16/28	244	216
Kyselina salicylová	ESI-	6,6	137	15/23	93	65
Kyselina valsartanová	ESI+	8,18	267	17/11	206	249
Lamotrigin	ESI+	6,05	256/258	25/23	211	213
Linkomycin	ESI+	4,88	407	20/18	126	359
Lomefloxacin	ESI+	5,46	352	22/18	265	308
Loperamid	ESI+	10,07	477,2	45/12	210,1	266,1
Losartan	ESI+	10,53	423	10/17	405	207
Lovastatin	ESI+	14,36	405	17/17	199,3	225,2
Meloxicam	ESI+	10,83	352	20/20	115	141
Memantin	ESI+	8,01	180,2	16/22	163	107
Metacyklin	ESI+	7,06	443	14/23	426	381
Metformin	ESI+	1,93	130,18	10/20	60	71
Metotrexát	ESI+	4,81	455	17/38	308	175
Metoprolol	ESI+	6,01	268,2	18/22	116	72
Metronidazol	ESI+	4,82	172	12/18	128	82
Mirtazapin	ESI+	6,21	266	22/22	195	209

Analyt	Ionizace	t_r min	Prekurzorový iont m/z	Kolizní energie eV	1. fragment. iont m/z	2. fragment. iont m/z
Mykofenolát mofetil	ESI+	8,49	434	24/33	114	195
Naproxen	ESI+	11,15	231	14/29	185	170
Nimesulid	ESI-	7,42	307	19/25	229	197,7
Norfloxacin	ESI+	5,33	320	16/20	276	302
Norverapamil	ESI+	8,67	441,2	23/35	165	150
O-Desmetylnaproxen	ESI-	6,88	215	20/8	169,2	171,2
Ofloxacin	ESI+	5,43	362	15/21	318	261
Omeprazol	ESI+	8,65	346,1	15/25	198	136
Ormetoprim	ESI+	5,20	275,3	25/26	123	259,2
Ornidazol	ESI+	6,30	220	14/22	128	82
Oxazepam	ESI+	10,37	287	23/15	241	269
Oxkarbazepin	ESI+	7,99	253	12/20	236	208
Oxypurinol	ESI+	2,01	153,1	5/7	137	98
Oxytetracyklin	ESI+	5,57	461,2	18/14	426,2	443
Paklitaxel	ESI+	12,35	876,4	25/25	308	591
Paracetamol	ESI+	4,66	152	15/30	110	65
Paraxantin	ESI+	4,82	181,1	17/27	124	69
Piroxikam	ESI+	9,61	332	18/25	95	121
Primidon	ESI+	6,63	219	15/20	162	91
Propranolol	ESI+	7,70	260	16/16	116	183
Ranitidin	ESI+	4,43	315,3	20/25	176,2	124,2
Roxithromycin	ESI+	10,54	840	21/27	682	117
Salbutamol	ESI+	4,38	240	20/12	148	166
Sarafloxacin	ESI+	5,93	386	17/24	342	368
Sertralin	ESI+	10,09	306	11/23	275	159
Simvastatin	ESI+	14,75	419,2	9/16	285,2	199,2
Sotalol	ESI+	4,35	273	27/17	133	213
Sulfadiazin	ESI+	4,74	251	14/20	156	108
Sulfachlorpyridazin	ESI+	6,04	284,86	18/24	155,62	91,71
Sulfamerazin	ESI+	5,2	265,03	16/30	156,03	92,08
Sulfamethazin	ESI+	5,69	279	17/23	186	124
Sulfamethizol	ESI+	5,48	270,92	12/26	155,61	91,7

Analyt	Ionizace	t_r min	Prekurzorový iont m/z	Kolizní energie eV	1. fragment. iont m/z	2. fragment. iont m/z
Sulfamethoxazol	ESI+	6,11	254	26/17	92	156
Sulfamethoxypyridazin	ESI+	5,69	281	16/17	156	126
Sulfamonomethoxin	ESI+	6,12	281	15/19	156	108
Sulfanilamid	ESI+	2,45	173	16/10	108	156
Sulfapyridin	ESI+	5,04	250,1	17/17	156	184,1
Sulfathiazol	ESI+	4,85	255,83	16/28	155,63	91,71
Telmisartan	ESI+	13,45	515,3	37/35	497,3	276,2
Terbutalin	ESI+	4,36	226,1	16/26	152	107
Tetracyklin	ESI+	5,58	445	17/20	410	154
Thebain	ESI+	5,65	312	30/40	58	266
Tiamulin	ESI+	9,06	494,2	15/35	192	119
Tramadol	ESI+	5,96	264	15/10	58	246
Triklokarban	ESI+	13,82	315	18/18	162	128
Trimethoprim	ESI+	4,93	291	24/27	230	123
Valsartan	ESI+	11,73	436	28/22	207	235
Vankomycin	ESI+	4,32	725	14/17	144	100
Venlafaxin	ESI+	7,34	278	14/14	215	260
Verapamil	ESI+	8,72	455,3	25/28	165,2	303,2
Warfarin	ESI+	11,57	309	14/22	163	251
Zolpidem	ESI+	6,54	308	33/27	235	263

Tabulka 17: Parametry metody MS/MS pro všechny izotopově značené ISTD

Analyt/ISTD	Ionizace	t_r min	Prekurzorový	Kolizní energie eV	1.	2.
			iont m/z		fragment. iont m/z	fragment. iont m/z
4-acetaminoantipyrin D ₃	ESI+	5,36	249	14/14	231	207
Amoxicillin D ₄	ESI+	4,33	370	13/15	353	212
Atrazin D ₅	ESI+	10,18	221	18/18	179	181
Atrazin-desizopropyl D ₅	ESI+	5,90	179	18/16	101	137
Azithromycin D ₃	ESI+	8,89	752,52	26/40	594,18	82,73
Bentazon D ₆	ESI-	7,01	245	28/21	132	181
Benzylpenicilin draselný D ₇	ESI+	8,89	342	20/22	183	160
Ciprofloxacin D ₈	ESI+	5,60	340,1	18/20	296,1	322,1
Citalopram D ₆	ESI+	7,89	331,3	26/19	109,1	262,2
Diazinon D ₁₀	ESI+	13,23	315	21/21	154	170
Diklofenak D ₄	ESI-	7,97	298/300	12/12	254	256
Erythromycin D ₃	ESI+	9,24	737,54	26/46	160,8	82,66
Fosalon D ₁₀	ESI+	13,40	378	16/38	182	111
Gemfibrozil D ₆	ESI-	9,58	255	5/5	255	255
Hydrochlorothiazid D ₂	ESI-	5,13	298	23/19	270	206
Ibuprofen D ₃	ESI-	8,08	208	7/2	164	208
Iohexol D ₅	ESI+	4,32	827,2	21/26	809,1	608,1
Iomeprol D ₃	ESI+	4,36	781	38/30	408	535
Iopamidol D ₃	ESI+	4,05	780,8	39/52	390	316,8
Iopromid D ₃	ESI+	4,60	795	56/23	300	576
Karbamazepin D ₁₀	ESI+	9,43	247	21/22	204	189
Karbendazim D ₄	ESI+	5,32	196	20/28	164	136
Kofein ¹³ C	ESI+	5,36	198	19/22	140	112
Kyselina salicylová D ₄	ESI-	6,59	141	15/23	97	69
Metformin D ₆	ESI+	1,94	136,1	10/20	60,1	77,1

Analyt/ISTD	Ionizace	t_r min	Prekurzorový iont m/z	Kolizní energie eV	1. fragment. iont m/z	2. fragment. iont m/z
Metiokarb D ₃	ESI+	11,38	229	9/17	169	121
Metolachlor D ₆	ESI+	12,65	290	16/25	258	182
Naproxen ¹³ C D ₃	ESI+	11,11	235	15/25	189	170
Norethindron D ₆	ESI+	11,29	305,3	30/21	113	237,2
Quizalofop D ₃	ESI+	12,75	348	18/31	302	244
Sertralin D ₃	ESI+	10,08	309,2	25/12	159	275
Sulfamethoxazol D ₄	ESI+	6,10	258	26/16	96	160
Tebukonazol D ₆	ESI+	12,94	314	21/38	71,8	124,8
Tetracyklin D ₆	ESI+	5,56	451	17/20	416	160

Pro vyhodnocení výsledků analýzy farmaceutických látek byly použity následující softwary a Microsoft Excel:

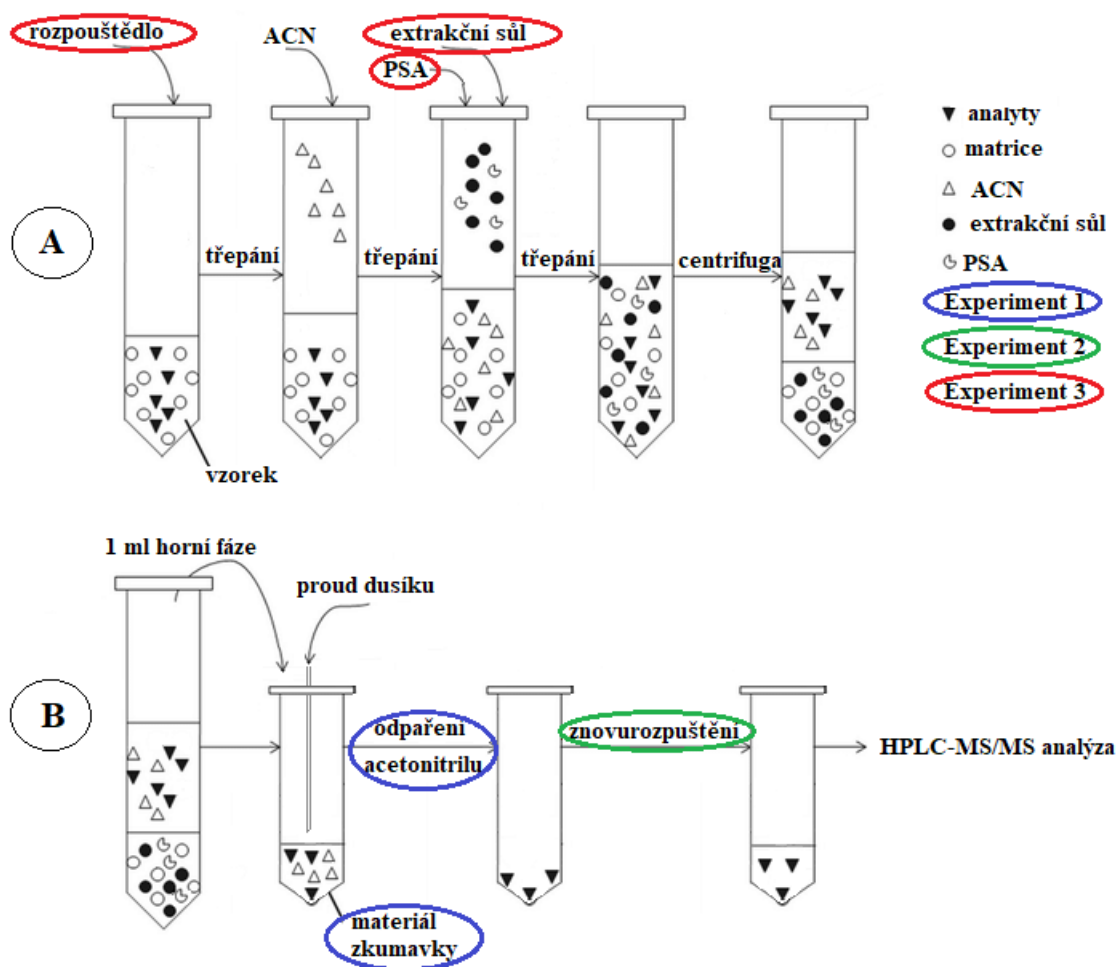
- MassLynx (Waters, USA)
- TargetLynx (Waters, USA)

5. Výsledky a diskuse

Precizní a pravdivá analýza farmaceutických látek v pevných matricích představuje výrazně složitější výzvu, než je tomu u analýzy kapalných vzorků, jako jsou pitné nebo odpadní vody. Příprava kapalných vzorků při farmaceutických multireziduálních analýzách je prováděna pouze pomocí mikrofiltrace, v případě vzorků odpadních vod je vzorek naředěn. Jedná se tedy o metodu „direct injection“, kdy jsou vzorky bez další úpravy nastříknuty do systému LC-MS a analyzovány⁸⁶.

Při vývoji metody pro analýzu pevných matric je však nutné řešit složitější a komplexnější problémy. Klíčovým krokem byl výběr vhodného extrakčního činidla, které umožní co nejefektivnější uvolnění cílových analytů z matrice. Multireziduální analýza představuje ještě složitější výzvu, protože zahrnuje široké spektrum farmaceutických látek s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. V literatuře se často vyskytují metody zaměřené na látky ze stejných farmaceutických skupin, což usnadňuje optimalizaci extrakčních podmínek. Při analýze látek z různých skupin farmak je však nutné volit kompromisní extrakční strategii, která zajistí co nejvyšší výtěžnost maximálního počtu sledovaných cílových analytů⁸⁷.

Samozřejmě, v případě farmaceutických látek spíše polárního charakteru by se jako nejefektivnější činidlo nabízela okyselená destilovaná voda. V daném případě bylo ovšem potřeba také myslet na to, že voda rozpouští i matrici a vznikaly by tak silné matriční efekty, které by ničily citlivé systémy LC-MS a nebylo by dosaženo potřebné nízké meze detekce. Z tohoto důvodu je nutné dbát na výběr extrakčního činidla velký důraz. Vzhledem k podobnosti farmaceutických a pesticidních látek (struktura molekuly, atd.), se jako vhodná extrakční metoda nabízí metoda QuEChERS, která je dnes v multireziduální analýze pesticidů brána jako „zlatý standard“. Technika QuEChERS ve svém principu nabízí optimální řešení, kdy pro základní extrakci analytů z pevné matrice (kaly, zemina apod.) je použita voda, dále je přidán acetonitril a extrakční soli, které způsobí „vysolení“ cílových analytů do organické fáze, tedy acetonitrilu. K oddělení jednotlivých fází dochází při centrifugaci vzorků. Alikvotní podíl acetonitrilu se dále odfouká lehkým proudem dusíku a odparek je opět rozpuštěn v rozpouštědle, které je kompatibilní a vhodné pro nastavenou LC-MS analýzu. Příklad průběhu extrakce metodou QuEChERS je znázorněn na Obrázku 5 (strana 69). Cílem této diplomové práce bylo otestovat, optimalizovat a nastavit kroky extrakční a předčišťovací metodiky QuEChERS tak, aby mohla být dále používána v provozu profesionálních laboratoří ALS.



Obrázek 5: Schématický náčrt metody QuEChERS, upraveno a přeloženo do češtiny⁸⁸

Optimalizace metodiky QuEChERS byla rozdělena do tří navazujících experimentů, přičemž jejich pořadí bylo záměrně upraveno oproti běžnému průběhu přípravy vzorku. Tento přístup umožnil systematické hodnocení jednotlivých kroků a postupnou eliminaci nevhodných variant. Na obrázku 5 je celý postup rozdělen do dvou fází, přičemž fáze A zahrnuje samotnou extrakci vzorku a fáze B se zaměřuje na jeho následnou úpravu.

V experimentu 1 bylo nejprve nutné určit optimální materiál zkumavky pro odpařování pod proudem dusíku a zároveň porovnat, zda je výhodnější odpařovat acetonitrilový extrakt do sucha, nebo ponechat „zbytkovou kapku“. Experiment 2 navázal na tato zjištění a byl zaměřen na výběr nejvhodnějšího rozpouštědla pro opětovné rozpuštění vzorku. Po optimalizaci finálních kroků fáze B bylo možné přistoupit k experimentu 3, zaměřenému na samotný extrakční proces metodou QuEChERS (fáze A). V rámci něj se hodnotilo složení extrakční soli, výběr rozpouštědla pevné matrice a vliv přídavku PSA.

Tento systematický přístup zajistil, že každý krok optimalizace byl proveden s ohledem na předchozí výsledky, což vedlo k dosažení maximální efektivity celého postupu.

Kromě technických nároků je rovněž důležité zohlednit ekonomickou stránku analýzy, přičemž výsledná cena analýzy je ovlivněna nejen použitými materiály, ale i složitostí celkového extrakčního procesu, která zahrnuje větší pracovní náročnost analytika, delší dobu strávenou na přípravě vzorku a vyšší množství použitých chemikálií a vybavení. V následujících experimentech bude podrobně rozebráno, jak byly jednotlivé kroky extrakčního procesu optimalizovány, aby byla zajištěna maximální účinnost a minimalizována ztráta analytů a jaké byly dílčí výsledky experimentů.

5.1. Experiment 1

V rámci experimentu 1 bylo testováno nastavení samotného finálního kroku přípravy vzorku před LC-MS analýzou, tedy podmínky fáze B (viz Obrázek 5, strana 69). Primárně byl řešen materiál zkumavky, ve které bude probíhat odfoukávání acetonitrilového extraktu, a to pomocí termobloků a regulovaného proudu dusíku. Další krok, který bylo v tomto stádiu nutné otestovat je to, zda acetonitrilový extrakt bude odfoukáván do sucha nebo „do poslední kapky“. Oba tyto kroky jsou zdánlivě zanedbatelné, ale přitom velmi důležité.

Při odfoukávání extraktu do sucha v nevhodném materiálu může docházet k nechtěné adsorpci cílových analytů na stěny zkumavky. Důležitý byl potom fakt, zda rozpouštědlo (v našem případě voda), je natolik silné, aby všechny analyty byly převedeny do finálně analyzovaného roztoku. Pokud tomu tak není, bývá někdy u QuEChERS analýz přistoupeno ke kroku, že se odparek hlídá a nenechá se kompletně vysušit. Vzorky byly testovány jak v přítomnosti matrice, tak i bez ní. Nejprve byl optimalizován postup na vzorcích bez matrice, aby se vybrala nejvhodnější varianta, která byla následně ověřena na vzorcích s matricí.

V souhrnu, cílem tohoto experimentu bylo získat informace o tom, zda typ použité zkumavky (plastová nebo skleněná) a stupeň odfoukání (do sucha nebo do kapky) ovlivňují stabilitu a výtěžnost analytů. Plastové zkumavky jsou levnější, lehčí a odolnější proti rozbití, což usnadňuje manipulaci při analýze většího množství vzorků. Jejich hydrofobní povrch však může adsorbovat lipofilní farmaceutické látky, což snižuje výtěžnost. Skleněné zkumavky díky inertnímu povrchu minimalizují adsorpci lipofilních látek, ale u hydrofilních nebo iontových analytů mohou způsobovat nežádoucí interakce. Z ekologického hlediska jsou skleněné zkumavky výhodnější, protože sklo je možné recyklovat.

Dále bylo hodnoceno odfoukání vzorků dusíkem do sucha nebo do zbytkové kapky. Odfoukání do sucha umožňuje maximální odstranění rozpouštědla, což je vhodné pro koncentraci analytů, ale může vést k jejich degradaci nebo adsorpci na stěny zkumavek. Odfoukání do zbytkové kapky tento problém minimalizuje, protože analyty zůstávají

ve stabilnějším prostředí tekuté fáze, což může být výhodné zejména pro citlivější látky. Přestože proces odfoukání do sucha trvá o něco déle, je méně náročný na přesné sledování, protože nevyžaduje pečlivé hlídání momentu, kdy je dosaženo zbytkové kapky. To zjednodušuje manipulaci a snižuje riziko lidské chyby během přípravy vzorku.

Dle výše uvedeného principu byly do plastových i skleněných zkumavek napipetovány směsné roztoky standardů a ty odfoukány lehkým proudem dusíku do sucha nebo do poslední kapky. Vzorky byly označeny následovně: PS (plast-do sucha), PK (plast-kapka), SS (sklo-do sucha) a SK (sklo-kapka) (viz Tabulka 9, strana 51). Tento experiment tak dává možnost podrobněji zhodnotit vliv podmínek zakonzentrování vzorku a jeho opětovného rozpuštění na analytické výsledky.

Naměřená data byla porovnána s kontrolním vzorkem (analytickým standardem) o známé koncentraci 1 ng ml^{-1} , který sloužil jako referenční hodnota pro výpočet výtěžnosti. Pro každý vzorek byla vypočítána relativní výtěžnost jako procentuální podíl naměřené koncentrace vůči kontrolní hodnotě. Výsledky pro vzorky bez matrice (BM) jsou shrnuty v Tabulce 18 a výsledky pro vzorky s matricí (SM) v Tabulce 19 (strana 72).

Porovnání vzorků bez matrice a s testovanou pevnou matricí bylo klíčovým krokem experimentu, protože umožňuje zjistit, zda pevná matrice rozpuštěná v extraktu ovlivňuje účinnost finálního kroku rozpuštění analytů před LC-MS analýzou. Tento krok byl zásadním pro pochopení, zda přítomnost extrahované matrice ovlivňuje chování analytů při odfoukání nebo jejich následném rozpouštění.

Tabulka 18: Výtěžnosti vzorků experimentu 1 (test materiálu zkumavky a odfoukání) v rozpouštědle vůči kontrolnímu vzorku (1 ng ml^{-1})

Analyt	BM-ACN %	BM-PS %	BM-PK %	BM-SS %	BM-SK %
10,11-dihydroxy-karbamazepin	32,91	47,29	45,97	46,90	45,58
Acebutolol	41,66	55,75	58,37	48,61	44,81
Atenolol	33,96	39,88	37,99	37,51	37,43
Ciprofloxacin	99,35	98,46	81,72	60,54	39,35
Diazepam	91,13	55,68	59,26	101,07	144,19
Diklofenak	110,55	105,04	99,15	104,96	97,89
Erythromycin	48,59	45,23	45,18	45,48	45,28
Fexofenadin	61,33	45,78	44,43	52,03	75,42

Analyt	BM-ACN	BM-PS	BM-PK	BM-SS	BM-SK
	%	%	%	%	%
Gabapentin	0,75	3,14	2,19	3,28	5,03
Gemfibrozil	6,17	37,94	41,74	84,01	84,15
Ibuprofen	65,44	53,67	55,06	54,97	55,87
Iopromid	80,74	55,37	61,62	58,34	50,64
Karbamazepin	40,80	48,85	48,94	48,28	48,66
Klindamycin	24,19	36,37	35,86	56,40	64,04
Kofein	60,26	53,57	51,79	54,75	53,65
Metformin	n. d.*	52,34	50,96	50,55	50,09
Naproxen	49,04	58,35	58,35	57,62	58,94
Norfloxacin	96,96	128,70	110,43	75,19	52,47
Paracetamol	162,15	98,52	73,52	116,97	170,96
Sertralin	61,76	50,51	51,26	50,84	50,57
Sulfamethoxazol	49,49	60,00	60,41	61,15	60,55
Tetracyklin	n. c.**	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.
Tramadol	143,66	72,07	69,25	66,54	68,65
Valsartan	77,12	30,62	30,60	30,42	27,91
Venlafaxin	185,51	63,09	67,42	65,38	65,88

*n. d. – nedetekováno, ** n. c. – nevypočítáno

Tabulka 19: Výťažnosti vzorků experimentu 1 (test materiálu zkumavky a odfoukání) s pevnou maticí vůči kontrolnímu vzorku (1 ng ml⁻¹)

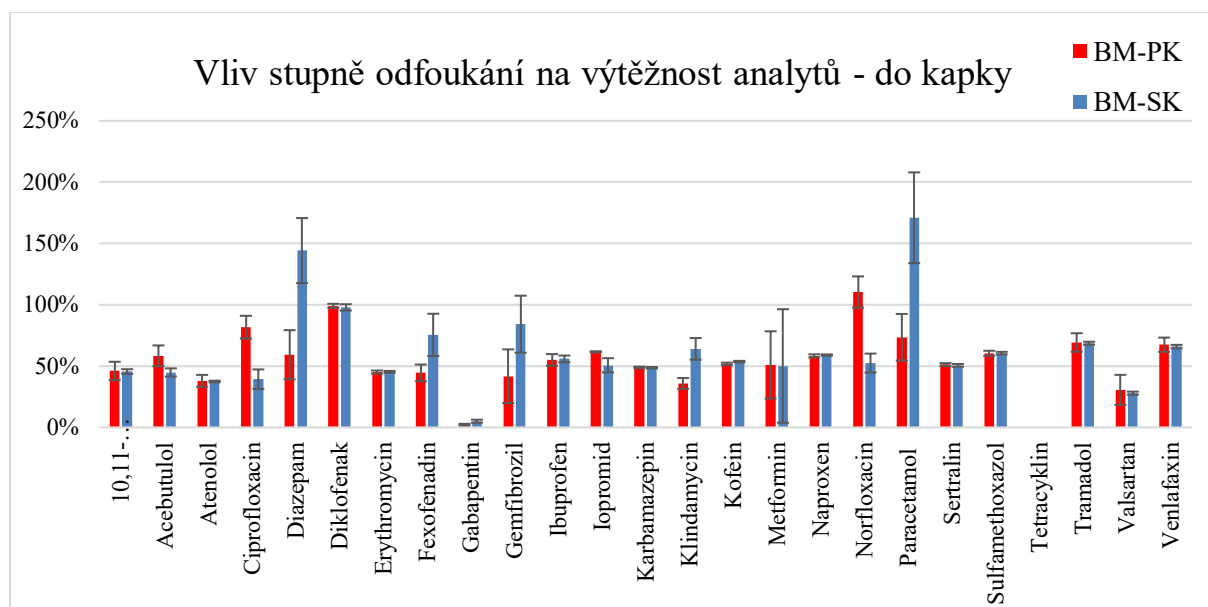
Analyt	SM-ACN	SM-PS	SM-PK	SM-SS	SM-SK
	%	%	%	%	%
10,11-dihydroxy-karbamazepin	34,50	50,58	52,94	48,76	55,07
Acebutolol	43,41	38,67	35,85	34,98	43,06
Atenolol	28,73	48,22	50,11	48,14	59,27
Ciprofloxacin	64,06	90,65	57,51	34,84	90,25
Diazepam	92,28	171,00	158,73	104,80	78,78
Diklofenak	118,29	105,19	101,24	99,92	102,87
Erythromycin	50,02	45,92	46,28	46,98	46,54
Fexofenadin	60,59	67,87	57,75	33,35	30,02
Gabapentin	0,71	12,69	10,36	4,12	3,47

Analyt	SM-ACN	SM-PS	SM-PK	SM-SS	SM-SK
	%	%	%	%	%
Gemfibrozil	6,10	65,65	112,54	140,49	67,16
Ibuprofen	63,90	54,28	54,88	55,30	54,88
Iopromid	43,17	58,56	55,73	53,20	64,70
Karbamazepin	42,22	50,20	49,65	49,20	49,30
Klindamycin	23,73	91,08	97,25	79,02	83,38
Kofein	56,54	59,39	56,43	58,39	58,72
Metformin	n. d.	51,93	52,65	52,55	52,28
Naproxen	51,38	61,19	60,13	60,75	59,87
Norfloxacin	66,86	375,34	92,45	86,94	118,14
Paracetamol	30,27	268,15	256,87	151,55	126,91
Sertralin	66,12	54,74	54,73	53,13	52,36
Sulfamethoxazol	52,79	64,57	63,64	63,88	62,70
Tetracyklin	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.
Tramadol	130,59	68,75	66,03	86,74	85,08
Valsartan	80,39	27,30	23,53	20,56	26,40
Venlafaxin	159,92	63,62	62,20	80,79	77,57

Z reprezentativních analytů, které byly vybrány k diskusi výsledků, nebyl metformin detekován ve vzorcích BM-ACN a SM-ACN, přestože vzorky byly odebrány přímo z acetonitrilové fáze po extrakci QuEChERS. U analytu tetracyklin nebylo možné koncentraci kvantifikovat, protože došlo k výraznému snížení signálu interního standardu na úroveň přibližně 5 % jeho běžných hodnot. V daném případě bylo zřejmé, že výsledky analytu získané přepočtem a výsledné koncentrace by nemusely odpovídat reálné kontaminaci vzorku. Je nutné podotknout, že již od prvních experimentů bylo zřejmé, že skupina antibiotik zřejmě nebude pro daný typ analýzy vhodná. Analyt, u kterého bylo zřejmé, že pro něj navržený postup nebude vhodný je například gabapentin, protože jeho výtěžnost ve všech měřených vzorcích dosahovala pouze hodnot v rozmezí 0,71 % až 12,69 %.

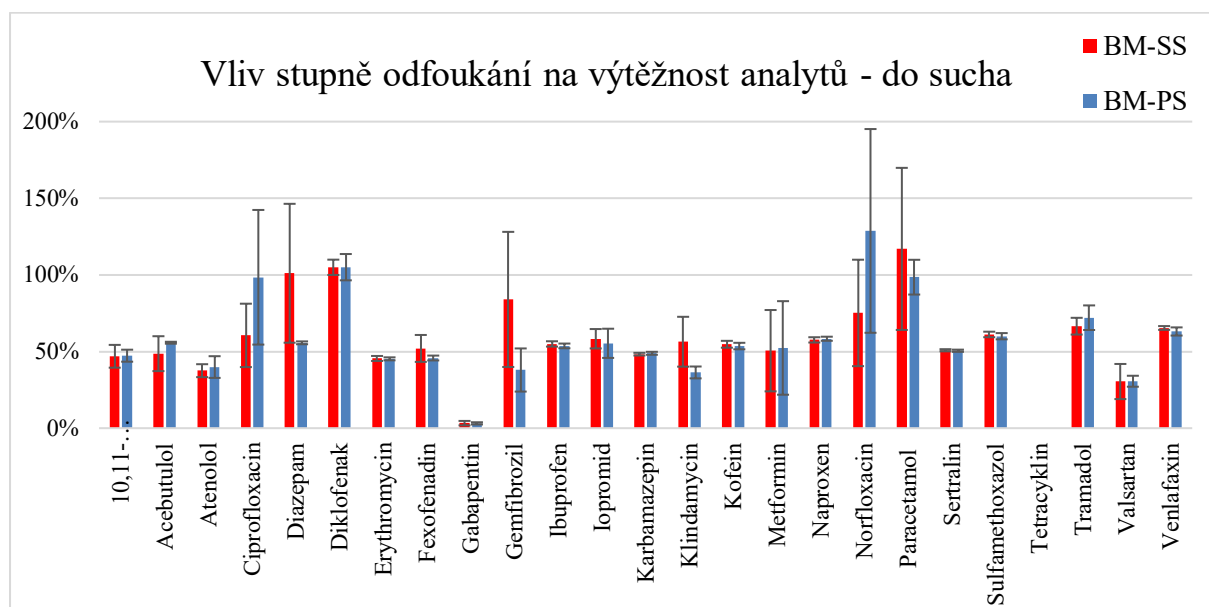
Cílem experimentu 1 bylo tedy porovnat vliv typu zkumavky (skleněné vs. plastové) a způsobu odpaření vzorků (odfoukání do kapky vs. odpaření do sucha) na dosaženou výtěžnost vybraných analytů. Dále bylo testováno, zda zvolená kombinace materiálu zkumavky a stupně odpaření zůstane funkční i pro reálné vzorky s pevnou matricí, a zda přítomnost této matrice nezpůsobuje výrazné změny ve výtěžnosti analytů. Následující text shrnuje dosažené výsledky, jejich vzájemné porovnání a diskusi klíčových jevů a odchylek.

Nejprve byly hodnoceny vzorky připravené metodou odfoukání do kapky pro různé materiály zkumavek. Na základě naměřených dat (viz Obrázek 6) bylo možné říci, že výtěžnosti u obou zkoumaných typů zkumavek se při odfoukání do kapky nejčastěji pohybují v rozmezí 40 až 70 %. Z 25 klíčových analytů byl u 15 z nich zaznamenán rozdíl ve výtěžnosti mezi plastovými a skleněnými zkumavkami maximálně 2,83 %, což naznačuje, že v těchto případech nemá volba materiálu významný vliv na výslednou výtěžnost. Přesto byl sledován pozitivní vliv použití plastových zkumavek u acebutololu (58,37 %), ciprofloxacinu (81,72 %) a iopromidu (61,62 %), zatímco u skleněných zkumavek stanoveny vyšší výtěžnosti pro fexofenadin (75,42 %), gemfibrozil (84,15 %) a klindamycin (64,04 %). Skleněné zkumavky vykazovaly u některých analyzovaných látek výrazné nárůsty výtěžnosti nad 100 %, jako je diazepam (144,19 %) a paracetamol (170,96 %). U plastových zkumavek byl tento jev pozorován pouze u jediného analytu, a to norfloxacinu (110,43 %). Vysoké hodnoty byly způsobeny matričními efekty, které ve skutečnosti představují nadhodnocení signálu vlivem použitých rozpouštědel, nikoli vlivem samotné matrice. Plastové zkumavky obecně dosahují hodnot pod 100 %, avšak jejich výsledky byly konzistentnější a méně ovlivněné těmito matričními efekty. Pokud vezmeme v úvahu lepší konzistentnost a příznivý vliv na výtěžnost u problematických analytů (zejména ciprofloxacinu a norfloxacinu), je v této fázi experimentu (odfoukání do kapky) výhodnější použít plastové zkumavky.



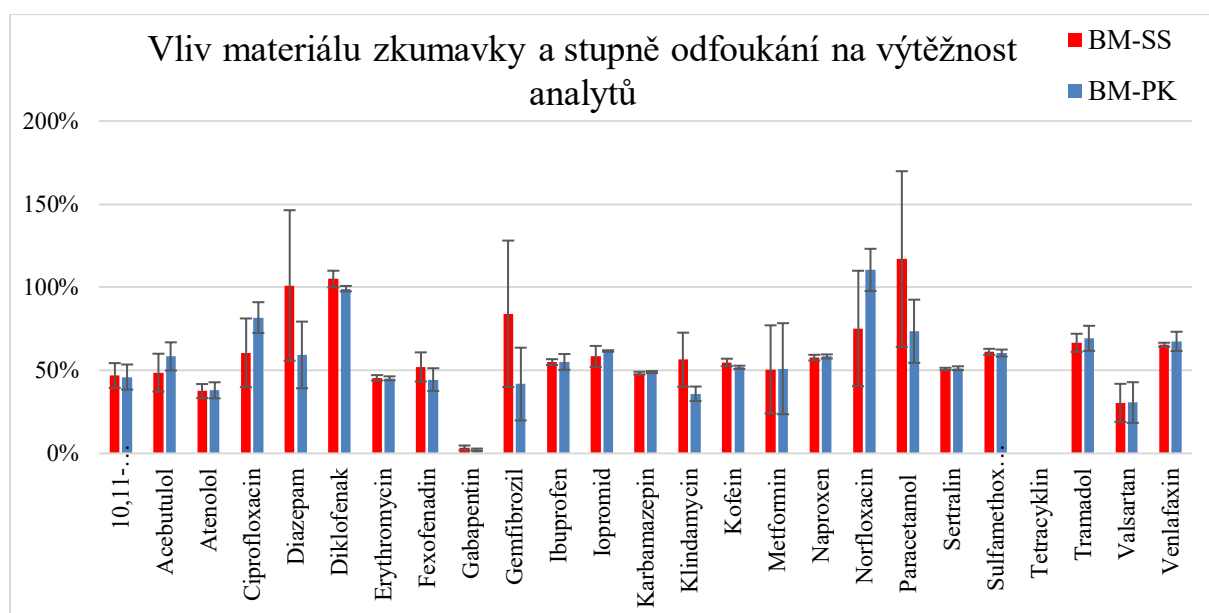
Obrázek 6: Porovnání vzorků BM-PK (bez matrice, plast-kapka) a BM-SK (bez matrice, sklo-kapka)

V další části byl hodnocen postup odfoukání acetonitrilového extraktu do sucha (Obrázek 7). Výsledky ukázaly, že u 14 ze sledovaných analytů byly rozdíly ve výtěžnosti mezi skleněnými a plastovými zkumavkami maximálně do 3 %, což naznačuje, že samotný způsob přípravy v této podobě nemá u většiny analytů zásadní vliv. Výtěžnosti obou variant se totiž většinou pohybovaly v rozmezí 40 až 60 %. U tří dalších analytů byl rozdíl výtěžnosti do 7,14 % ve prospěch plastové zkumavky u acebutololu (55,75 %) a tramadolu (72,07 %), a ve prospěch skleněné zkumavky u fexofenadinu (52,03 %). Diklofenak nebyl mezi tyto analyty zahrnut, přestože rozdíl mezi plastovou (105,04 %) a skleněnou (104,96 %) zkumavkou činí pouze 0,09 %, jelikož v obou případech byla výtěžnost lehce nad 100 %. Pozitivní přínos plastu se projevil jen u ciprofloxacinu (98,46 %), zatímco u skleněných zkumavek byla lepší výtěžnost u gemfibrozilu (84,01 %), klindamycinu (56,40 %) a diazepam (101,7 %), který se těsně dostal nad hodnotu kontrolního vzorku. Vliv použitých rozpouštědel vedl k nadhodnocení signálu zejména u plastových zkumavek, kde došlo ke zvýšení odezvy norfloxacinu (128,70 %), zatímco ve skleněných zkumavkách byl obdobný efekt pozorován u paracetamolu (116,97 %). V celkovém souhrnu se tak při odpaření vzorku do sucha jeví jako vhodnější skleněné zkumavky, a to kvůli vyšší výtěžnosti klíčových analytů (např. gemfibrozil, klindamycin) a menší náchylnosti k nadhodnocení signálu u problematických látek, jako je norfloxacin.



Obrázek 7: Porovnání vzorků BM-SS (bez matrice, sklo-do sucha) a BM-PS (bez matrice, plast-do sucha)

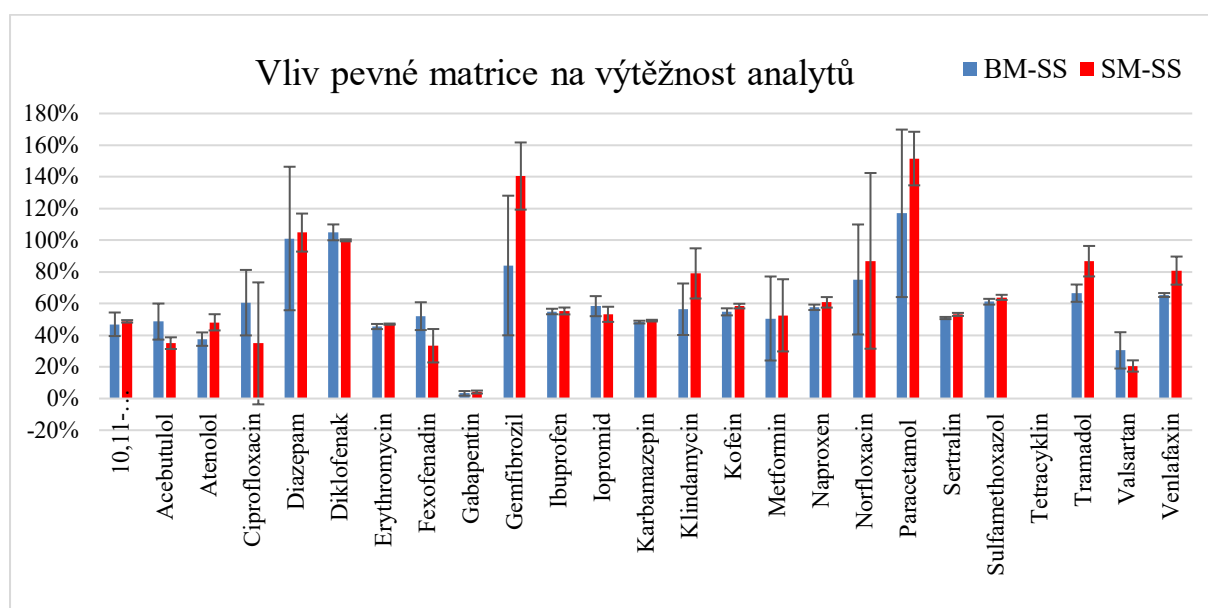
Následně bylo potřeba porovnat obě nejlépe hodnocené varianty z předchozích kroků, tedy skleněné zkumavky s odふうáním do sucha (SS) a plastové zkumavky s odふうáním do kapky (PK). Obrázek 8 zobrazuje výtěžnosti jednotlivých analytů pro obě metody. Celkem u 15 analytů se rozdíly pohybovaly do 3,28 % a hodnoty lze označit za víceméně srovnatelné. U acebutololu byla při použití PK přibližně o 10 % vyšší výtěžnost než u SS, naopak u fexofenadinu došlo při PK k poklesu výtěžnosti o 7,6 %. Lepší výtěžnost při použití SS byla patrná u diazepamu (101,07 %), gemfibrozilu (84,01 %) a klindamycinu (56,40 %), zatímco u PK byl pozorován kladný efekt u ciprofloxacinu (81,71 %). Nadhodnocení signálu vykazoval diklofenak (104,96 %) a paracetamol (116,97 %) u SS a norfloxacin (110,43 %) u PK. Na základě těchto komplexních zjištění byla jako vhodnější metoda celkově vybrána varianta SS – tedy skleněné zkumavky s odpařením vzorku do sucha. Přináší spolehlivější výtěžnost u důležitých analytů (např. gemfibrozil, klindamycin) a méně se u ní projevuje vliv matrice na intenzitu signálu. Kromě toho je tato metoda méně náročná na přesné hlídání momentu ukončení odparu a je ekologičtější díky možnosti recyklace skla.



Obrázek 8: Porovnání vzorků BM-SS (bez matrice, sklo-do sucha) a BM-PK (bez matrice, plast-kapka)

V posledním kroku bylo nutné ověřit, jestli je tato zvolená varianta (sklo + odふうání do sucha) použitelná i pro reálné vzorky s pevnou matricí. Výsledky (viz Obrázek 9, strana 77) potvrzují, že metoda SS zůstává spolehlivá i při analýze pevné matrice. V některých případech byly zaznamenány silné matriční efekty s nadhodnocením signálu, zejména u gemfibrozilu (140,49 %) a paracetamolu (151,55 %), přičemž u paracetamolu byla hodnota nad 100 % už i ve

vzorku bez matrice (116,97 %). U acebutololu, ciprofloxacinu, fexofenadinu a valsartanu naopak přítomnost pevné matrice snižuje výtěžnost, přičemž u valsartanu (20,56 %) byl tento propad vůbec nejvýraznější ze všech měřených vzorků a metoda se tak pro něj nehodí. U atenololu, klindamycinu, norfloxacinu, tramadolu a venlafaxinu byl ovšem vliv matrice opačný a vede ke zvýšení výtěžnosti ve srovnání se vzorky bez pevné matrice. U ostatních 13 analytů zůstává trend stabilní, bez zásadních odchylek. Celkově se tedy potvrdilo, že postup zvolený na základě předchozího hodnocení (skleněné zkumavky s odfoukáním do sucha) lze úspěšně využít i pro reálné pevné matrice.



Obrázek 9: Porovnání vzorků BM-SS (bez matrice, sklo-do sucha) a SM-SS (s matricí, sklo-do sucha)

5.2. Experiment 2

V experimentu 2 byl testován vliv různých rozpouštědel použitých k rozpuštění odparku po odfoukání acetonitrilu proudem dusíku do sucha ve skleněných zkumavkách. Tento krok byl důležitý pro zajištění maximálního rozpuštění reziduí analytů z odparku před samotnou LC-MS analýzou. Bylo nutné mít na paměti, že rozpouštědlo musí obsahovat velký poměr vody, vzhledem k použití reverzní kolony v LC systému.

Rozpuštění odfoukaného vzorku tak bylo provedeno v různých rozpouštědlech: (i) čisté deionizované vodě (MQ voda, sada B); (ii) 0,1% kyselině mravenčí v MQ vodě (sada C); (iii) směsi MQ vody a methanolu v poměru 1:1 (sada D); (iv) směsi 0,1% kyseliny mravenčí v MQ vodě a methanolu v poměru 1:1 (sada E). Sada A, která byla použita jako referenční hodnota

(100 %), obsahovala standardy analytů a ISTD v MQ vodě. Naměřené hodnoty, vyjádřené v procentech jako poměr plochy píků jednotlivých analytů vůči referenční sadě A, jsou uvedeny v Tabulce 20.

Tabulka 20: Porovnání ploch píků analytů mezi jednotlivými sadami rozpouštědel (B–E) vůči referenční sadě A (100 %).

Analyt	B %	C %	D %	E %
10,11-dihydroxy-karbamazepin	89,15	108,72	97,49	94,35
Acebutolol	91,02	116,22	113,42	59,15
Atenolol	100,08	102,70	38,75	36,34
Ciprofloxacin	91,75	80,82	67,86	26,94
Diazepam	90,38	67,40	102,39	86,71
Diklofenak	101,44	97,29	125,58	121,19
Erythromycin	19,47	1,18	121,74	2,03
Fexofenadin	55,68	26,81	63,55	59,91
Gabapentin	49,24	44,27	22,88	22,59
Gemfibrozil	104,71	73,53	120,99	109,64
Ibuprofen	104,02	91,44	124,71	124,85
Iopromid	54,50	48,96	18,43	15,78
Karbamazepin	96,01	91,24	105,26	100,68
Klindamycin	52,45	81,03	96,02	87,94
Kofein	81,08	79,43	38,97	35,27
Metformin	75,34	119,96	81,34	n. d.
Naproxen	90,02	82,29	96,10	90,83
Norfloxacin	105,87	92,69	72,24	28,68
Paracetamol	93,13	89,34	44,33	42,42
Sertralin	18,26	62,45	110,70	104,34
Sulfamethoxazol	94,15	88,13	38,35	34,74
Tetracyklin	40,29	51,72	22,27	12,29
Tramadol	65,20	68,83	84,04	36,67
Valsartan	54,61	30,88	54,79	50,93
Venlafaxin	86,83	117,46	136,81	126,44

Data z Tabulky 20 (strana 78) byla vložena do Obrázku 10 (strana 80) pro porovnání sady B, C, D a E vůči referenční sadě A (čisté standardy).

V sadě B (rozpouštědlo MQ voda) byly u většiny analytů dosaženy stabilní výsledky. Celkem jedenáct analytů vykazovalo výtěžnost vyšší než 70 %, například ciprofloxacin (91,75 %) nebo karbamazepin (96,01 %). Lehké nadhodnocení signálu bylo pozorováno u pěti analytů, přičemž maximální hodnota nepřesáhla 105,87 % (norfloxacin). U sedmi analytů se výtěžnost pohybovala v rozmezí 40–70 %, například u fexofenadinu (55,68 %) a tetracyklinu (40,29 %). Výrazný pokles výtěžnosti byl zaznamenán pouze u dvou analytů, sertralinu (18,26 %) a erythromycinu (19,47 %), což mohlo být způsobeno vlivem použitého rozpouštědla. Celkově lze konstatovat, že použití MQ vody jako rozpouštědla vedlo ke konzistentním a spolehlivým výsledkům napříč většinou analytů.

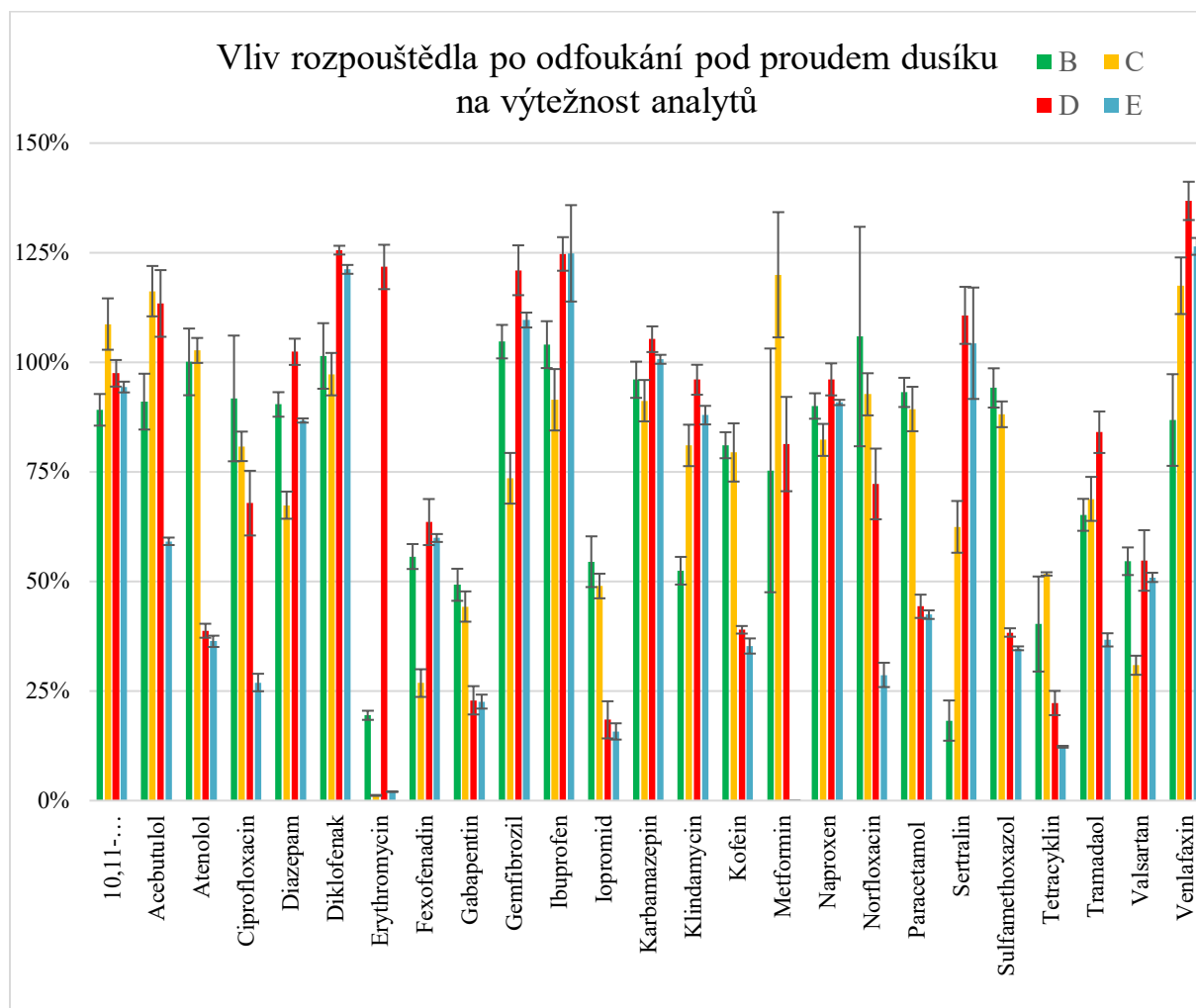
Sada C (0,1 % kyselina mravenčí v MQ vodě) vykázala podobné výsledky jako sada B. Jedenáct analytů dosáhlo výtěžnosti mezi 70 a 100 %, například diklofenak (97,29 %) a naproxen (82,29 %). U pěti analytů byla naměřena výtěžnost nad 100 %, přičemž nejvyšší hodnota byla zaznamenána u metforminu (119,96 %). Šest analytů, například gabapentin (44,27 %) a sertralin (62,45 %), mělo výtěžnost mezi 40 a 70 %. Pokles pod 40 % byl zaznamenán u fexofenadinu (26,81 %), valsartanu (30,88 %) a erythromycinu, kdy výtěžnost dosahovala pouhých 1,18 %, což potvrzuje výraznou nestabilitu tohoto antibiotika.

Sada D (MQ voda/methanol; 1:1 v/v) přinesla celkově nejvyšší výtěžnosti u mnoha analytů. Šest analytů vykazalo hodnoty mezi 70 a 100 %, například klindamycin (96,02 %) a tramadol (84,04 %). Devět analytů překročilo hodnotu 100 %, například diklofenak (125,58 %), ibuprofen (124,71 %) a venlafaxin (136,81 %). U čtyř analytů se výtěžnost pohybovala mezi 40 a 70 %, například u fexofenadinu (63,55 %) a valsartanu (54,79 %), kde tyto látky dosáhly svých maximálních hodnot v rámci celého experimentu. Přesto bylo zaznamenáno i několik velmi nízkých výtěžností, například u gabapentinu (22,88 %) nebo iopromidu (18,43 %), což může naznačovat horší stabilitu těchto analytů v tomto rozpouštědle. Naopak erythromycin zde dosáhl nejlepší hodnoty ze všech sad (121,74 %), což ukazuje vysokou kompatibilitu tohoto antibiotika právě s tímto prostředím.

V sadě E (0,1 % kyselina mravenčí v MQ vodě/methanol; 1:1 v/v) bylo dosaženo výtěžnosti 70–100 % u čtyř analytů, například klindamycin (87,94 %) a naproxen (90,83 %). Výtěžnost nad 100 % byla zaznamenána stejně jako v sadě D u diklofenaku (121,19 %), ibuprofenu (124,85 %) a venlafaxinu (126,44 %). Čtyři analyty dosáhly výtěžnosti mezi 40 a 70 %, například acebutolol (59,15 %) a paracetamol (42,42 %), přičemž pro některé šlo zároveň o jejich nejnížší hodnoty v průběhu celého experimentu. Celkem deset analytů

vykazovalo výtěžnost pod 40 %, přičemž nejnižší hodnota byla naměřena u erythromycinu (2,03 %) a tetracyklinu (12,29 %). Metformin nebyl v této sadě detekován vůbec.

Z výsledků vyplývá, že sada B (MQ voda) poskytla stabilnější a vyrovnanější výsledky pro většinu analytů. Pokud však uvážíme jako cíl také maximalizovat odezvu u specifických látek, jako je erythromycin nebo tramadol, je vhodnější zvolit sadu D (MQ voda/methanol; 1:1 v/v), která navíc vykazuje lepší kompatibilitu s postupem nástřiku a měření. Na základě těchto faktorů byla jako nejvhodnější pro další použití zvolena právě sada D.



Obrázek 10: Porovnání výsledků sady B (MQ voda), C (0,1% kyselina mravenčí v MQ vodě), D (směs MQ vody a methanolu v poměru 1:1) a E (směs 0,1% kyseliny mravenčí v MQ vodě a methanolu v poměru 1:1) vyjádřené v procentech ploch píků jednotlivých analytů vůči referenční sadě A

5.3. Experiment 3

Experiment 3 byl zaměřen na hodnocení vlivu různých podmínek samotné extrakce metodou QuEChERS na výtěžnost farmaceutických látek z pevné matrice. Optimalizační kroky tohoto procesu jsou znázorněny na Obrázku 5: fáze A (strana 69). Cílem experimentu bylo optimalizovat klíčové parametry extrakce, včetně výběru rozpouštědla, složení extrakčních solí a použití sorbentu PSA. Tyto faktory mohou významně ovlivnit stabilitu analytů a jejich přechod do acetonitrilové fáze extraktu.

Výběr dvou různých rozpouštědel pro pevnou matrici (MQ voda a 0,1% kyselina mravenčí v MQ vodě) umožňuje zjistit, zda mírně kyselé prostředí zlepšuje extrakční účinnost, zejména pro analyty náchylné k degradaci nebo vyžadující stabilnější podmínky. Tři testované směsi extrakčních solí („sodná“, „citrátová“ a „octanová“) byly zvoleny na základě literatury, která se zabývá podrobným vývojem a optimalizací metody QuEChERS. Tyto směsi byly vybrány pro jejich schopnost zlepšit účinnost extrakce a minimalizovat interferující efekty v závislosti na vlastnostech analyzovaných látek a typu matrice. Citrátová a octanová sůl navíc poskytují pufrací kapacitu, která je výhodná pro stabilizaci citlivějších látek během procesu extrakce. Tento přístup napodobuje ověřené postupy z literatury, přizpůsobené pro multireziduální analýzu farmaceutických látek v pevných maticích. Jako poslední byl hodnocen vliv přídavku PSA na celkovou výtěžnost analytu. Tento primární a sekundární amin odstraňuje různé polární složky z matrice, čímž zlepšuje čistotu extraktu a kvalitu analytického signálu.

Naměřená data byla porovnána s kontrolním vzorkem o známé koncentraci 1 ng ml^{-1} , který sloužil jako referenční hodnota pro výpočet výtěžnosti. Pro každý vzorek byla vypočítána relativní výtěžnost jako procentuální podíl naměřené koncentrace vůči kontrolní hodnotě. Výsledky pro vzorky bez přídavku PSA jsou shrnuty v Tabulce 21 (strana 82) a výsledky pro vzorky s přídavkem PSA v Tabulce 22 (strana 83). První písmeno ve zkratce vzorku označuje extrakční sůl (S – „sodná“, C – „citrátová“, O – octanová“), druhé písmeno složení rozpouštědla (M – MQ voda, K – 0,1% HCOOH v MQ vodě) a poslední písmeno označuje, zda byla příprava vzorku doplněna o extrakci pomocí PSA (P – PSA), či nikoliv (B – bez PSA). Přehled přípravy vzorků experimentu 3 je také popsán v Tabulce 10 (strana 53).

Tabulka 21: Výtěžnosti vzorků experimentu 3 (test extrakce do acetonitrilové fáze) bez
přídavku PSA vůči kontrolnímu vzorku (1 ng ml⁻¹)

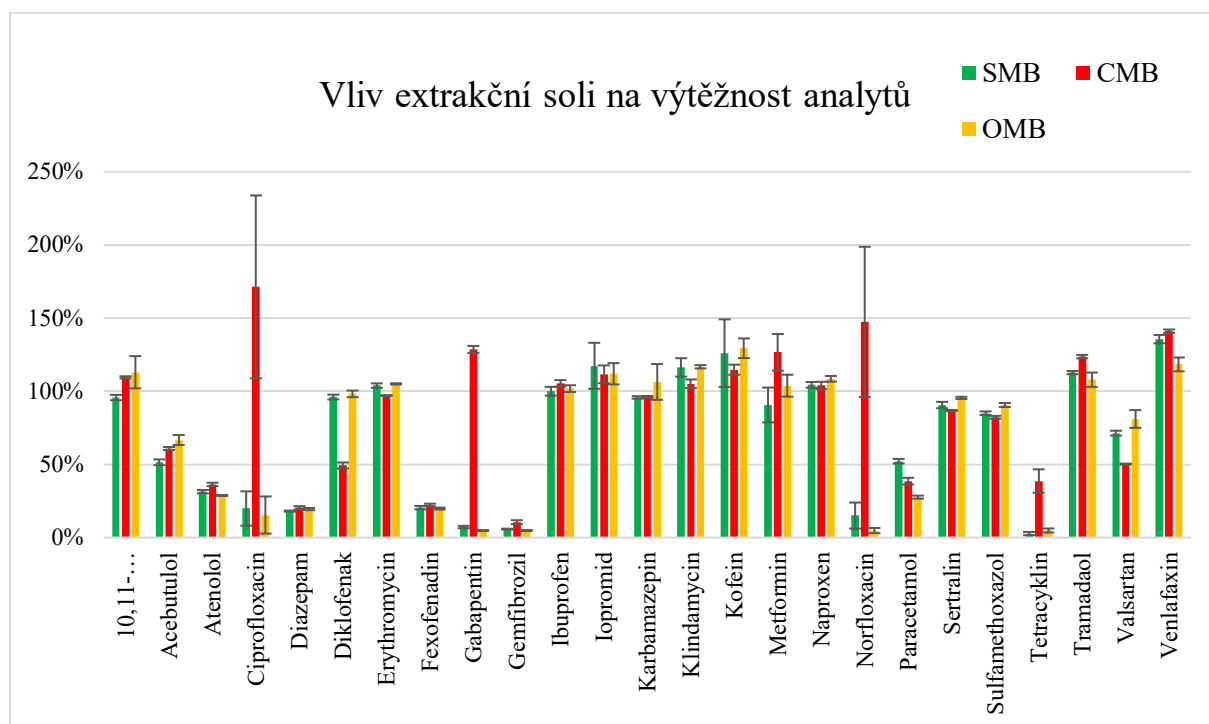
Analyt	SMB %	CMB %	OMB %	SKB %	CKB %	OKB %
10,11-dihydroxy- karbamazepin	95,67	109,48	113,00	107,28	119,41	114,80
Acebutolol	51,44	60,87	66,64	58,32	71,45	60,06
Atenolol	31,37	36,32	28,75	35,71	44,16	29,68
Ciprofloxacin	19,85	171,33	15,39	71,34	141,49	3,16
Diazepam	18,09	20,30	19,45	18,34	20,63	19,03
Diklofenak	96,03	49,25	98,20	94,65	39,08	96,08
Erythromycin	103,87	97,05	105,00	102,76	99,42	101,87
Fexofenadin	20,44	22,25	19,81	17,64	22,60	23,27
Gabapentin	7,19	128,52	4,79	128,37	131,30	5,20
Gemfibrozil	5,77	10,52	4,80	6,89	6,48	3,94
Ibuprofen	100,00	105,37	101,78	111,35	108,17	106,48
Iopromid	117,39	111,57	111,94	106,38	111,67	110,08
Karbamazepin	95,77	96,11	106,36	97,03	99,18	95,70
Klindamycin	116,28	105,10	116,70	104,48	100,63	120,02
Kofein	126,06	114,71	129,38	125,33	128,21	125,42
Metformin	90,62	126,64	103,80	111,86	144,78	110,08
Naproxen	104,36	103,97	108,48	105,91	106,35	105,77
Norfloxacin	15,04	147,41	4,81	58,31	109,07	3,48
Paracetamol	52,19	38,54	27,62	14,87	11,58	10,21
Sertralin	90,57	86,79	95,43	88,37	88,24	92,81
Sulfamethoxazol	85,00	82,19	90,59	82,68	84,67	85,39
Tetracyklin	2,72	38,63	4,84	38,64	63,56	9,16
Tramadol	112,72	123,68	107,88	131,91	164,38	92,25
Valsartan	71,36	50,21	81,06	48,19	51,53	82,24
Venlafaxin	135,60	141,06	118,34	156,16	182,11	123,17

Tabulka 22: Výtěžnosti vzorků experimentu 3 (test extrakce do acetonitrilové fáze) s přidavkem PSA vůči kontrolnímu vzorku (1 ng ml⁻¹)

Analyt	SMP %	CMP %	OMP %	SKP %	CKP %	OKP %
10,11-dihydroxy-karbamazepin	92,72	95,50	100,28	100,14	101,00	100,91
Acebutolol	68,22	66,70	69,96	76,76	79,90	65,54
Atenolol	31,31	35,09	27,07	39,20	41,01	30,16
Ciprofloxacin	5,52	10,69	7,06	8,27	26,75	5,50
Diazepam	19,35	19,35	17,34	18,65	18,91	18,52
Diklofenak	95,65	93,25	97,31	95,77	97,35	94,85
Erythromycin	103,03	107,64	103,80	98,55	99,87	105,11
Fexofenadin	7,11	5,96	4,92	11,68	7,77	9,57
Gabapentin	2,82	31,20	3,61	51,87	36,28	3,29
Gemfibrozil	7,78	5,60	15,98	6,60	4,45	17,70
Ibuprofen	96,14	103,72	91,84	101,45	98,77	99,65
Iopromid	106,35	99,26	106,95	101,63	114,43	112,42
Karbamazepin	98,68	99,89	107,66	101,22	108,00	105,84
Klindamycin	93,94	81,24	78,19	82,23	72,49	87,68
Kofein	153,70	148,20	138,22	127,87	143,05	131,39
Metformin	98,16	107,89	89,31	110,08	139,61	104,12
Naproxen	106,02	104,09	107,86	111,21	110,93	109,85
Norfloxacin	2,07	6,67	n. d.	6,10	13,57	n. d.
Paracetamol	22,25	21,09	36,26	8,23	11,24	11,00
Sertralin	93,24	95,93	91,88	91,64	94,53	90,24
Sulfamethoxazol	84,42	83,70	90,31	96,27	94,59	88,50
Tetracyklin	2,25	1,31	2,20	2,26	0,99	1,76
Tramadol	108,69	115,07	105,51	130,21	136,83	113,60
Valsartan	10,56	7,93	3,77	18,04	9,88	4,79
Venlafaxin	120,18	125,70	112,38	140,59	141,17	125,83

Pro účely výběru nejvhodnější extrakční soli byly porovnány vzorky zpracované pouze s MQ vodou, bez přidavku PSA (SMB, CMB a OMB). Naměřená data z Tabulky 21 (strana 82) byla následně vložena do Obrázku 11 (strana 84) k vyhodnocení vlivu extrakčních solí na výtěžnost a stabilitu stanovených farmaceutických látek. Tento graf ukazuje, že u většiny

analytů, jako jsou například atenolol (28,75–36,32 %), gemfibrozil (4,80–10,52 %) či naproxen (103,97–108,48 %), se výtěžnosti při použití různých extrakčních solí příliš neliší. Naopak u ciprofloxacinu (171,33 %), gabapentinu (128,52 %), metforminu (126,64 %), norfloxacinu (147,41 %) a tetracyklinu (38,63 %) dosahuje metoda s „citrátovou“ solí výrazně vyšších výtěžností. U diklofenaku (49,25 %) a valsartanu (50,21 %) se však u „citrátové“ soli objevil pokles výtěžnosti ve srovnání s metodami využívajícími „sodnou“ či „octanovou“ sůl. Přesto byla jako optimální zvolena „citrátová“ sůl, zejména díky vyšší výtěžnosti u analytů, jejichž extrakce byla u jiných solí obtížná (ciprofloxacin, gabapentin, norfloxacin a tetracyklin).

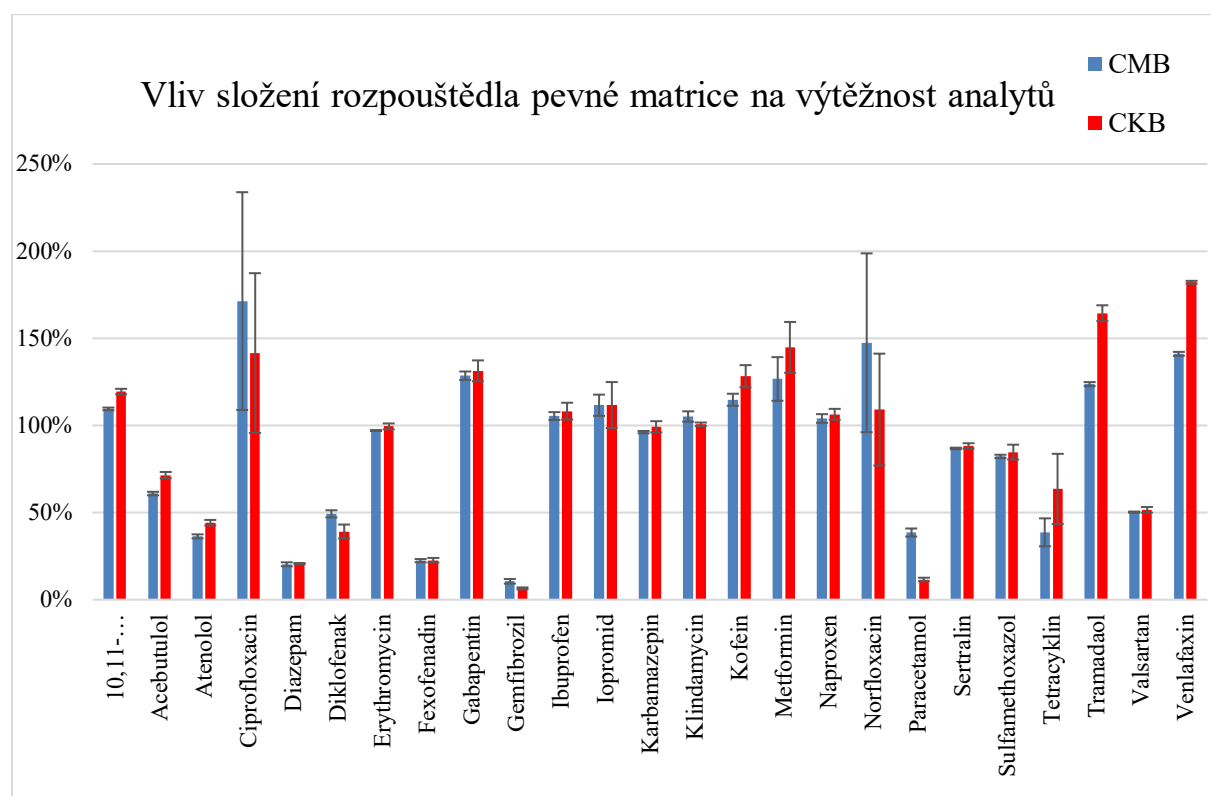


Obrázek 11: Porovnání výtěžností vzorků SMB („sodná“ sůl), CMB („citrátová“ sůl) a OMB („octanová“ sůl)

Pro vyhodnocení vlivu přídavku kyseliny do extrakčního rozpouštědla byly porovnány vzorky zpracované pomocí „citrátové“ soli bez přídavku PSA – konkrétně varianty CMB (MQ voda) a CKB (0,1% HCOOH v MQ vodě). Data z Tabulky 21 (strana 82) byla znázorněna na Obrázku 12 (strana 85). U deseti analytů nebyly mezi oběma variantami pozorovány zásadní rozdíly, například u diazepamu (20,30–20,64 %), iopromidu (111,56–111,68 %) či sertralínu (86,79–88,24 %), kde rozdíly nepřesáhly 3 %. To naznačuje, že kyselé prostředí v těchto případech nehraje klíčovou roli. Vyšší výtěžnost u varianty CMB byla dosažena pouze u šesti analytů – u ciprofloxacinu (+29,84 %), diklofenaku (+10,17 %), gemfibrozilu (+4,04 %), klindamycinu (+4,47 %), norfloxacinu (+38,34 %) a paracetamolu (+26,96 %). Naopak

u zbývajících devíti analytů byla při použití okyseleného rozpouštědla pozorována vyšší výtěžnost, kdy rozdíly dosahovaly hodnot mezi 3,07 a 41,05 %. Nejvýraznější nárůst byl zaznamenán u venlafaxinu (+41,05 %), dále například u acebutololu (+10,58 %) nebo kofeinu (+13,50 %). Tyto výsledky ukazují, že přídavek kyseliny může mít pozitivní vliv na extrakci některých analytů, zatímco u jiných není významný.

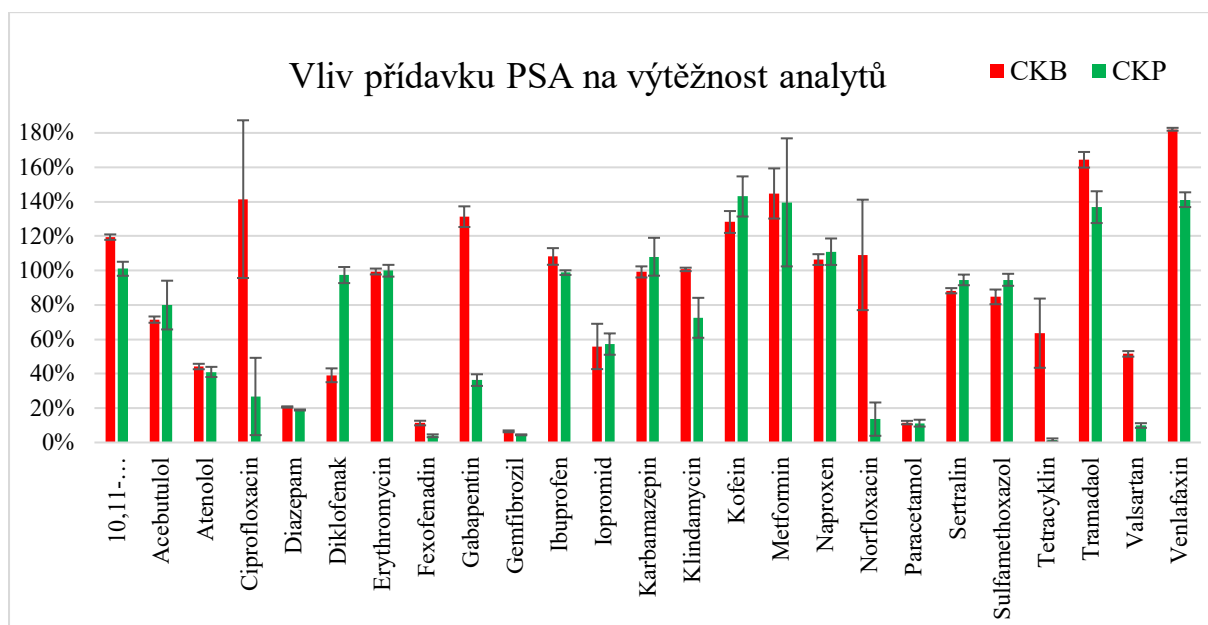
I když hodnoty přesahující 100 % naznačují přítomnost matricových efektů, nejsou natolik výrazné, aby převážily přínos vyšší účinnosti extrakce, a jsou v praxi kompenzovány použitím ISTD. Celkově se tedy ukázalo, že při použití „citrátové“ soli je okyselené prostředí rozpouštědla výhodnější, neboť zlepšuje stanovení klíčových látek, aniž by výrazně ovlivňovalo výsledky u ostatních analytů.



Obrázek 12: Porovnání výtěžností vzorků CMB (MQ voda) a CKB (0,1% kyselina mravenčí v MQ vodě)

Posledním krokem vyhodnocení experimentu 3 bylo porovnání, zda má přídavek PSA jako dodatečný extrakční krok zásadní vliv na převedení analytů z pevné do kapalné matrice. Do Obrázku 13 (strana 86) byla vložena data z Tabulky 21 (strana 82) a Tabulky 22 (strana 83) pro vzorky připravené pomocí „citrátové“ soli a okyseleného rozpouštědla s přídavkem PSA (CKP), které byly porovnány se vzorky bez přídavku PSA (CKB). U většiny analytů, například u diazepamu (18,91–20,63 %), +gemfibrozilu (4,45–6,48 %), iopromidu (111,67–114,43 %)

a dalších jedenácti látek, nepřinesl přidavek PSA výrazné změny, přičemž rozdíly ve výtěžnosti se pohybovaly mezi 0,34 a 9,92 %. Pozitivní vliv přidavku PSA byl pozorován pouze u dvou analytů – diklofenaku (+58,27 %) a kofeinu (+14,84 %) ve srovnání s variantou CKB. Naopak u devíti analytů vedl přidavek PSA k výraznému poklesu výtěžnosti. Tento negativní účinek byl zaznamenán například u ciprofloxacinu (–114,74 %), gabapentinu (–95,02 %), norfloxacinu (–95,50 %) a tetracyklinu (–62,57 %), rozdíly se pohybovaly v rozmezí 14,83 až 114,74 %. Vzhledem k tomu, že přidavek PSA nepřinesl celkové zlepšení výtěžnosti a u některých analytů naopak negativně ovlivnil extrakci, nebyl tento krok do finálního postupu začleněn. Jeho vynechání nejen zjednodušuje přípravu vzorků, ale zároveň nemá dopad na ekonomickou stránku analýzy.

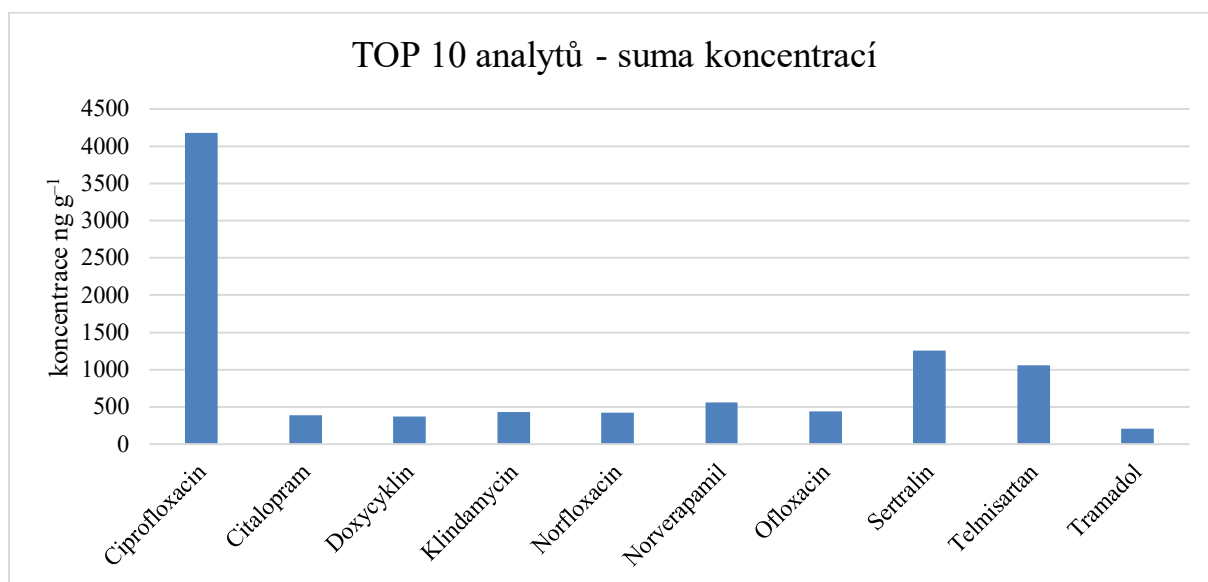


Obrázek 13: Porovnání výtěžností vzorků CKB (bez PSA) a CKP (s přidavkem PSA)

5.4. Monitoring kalů z ČOV v ČR

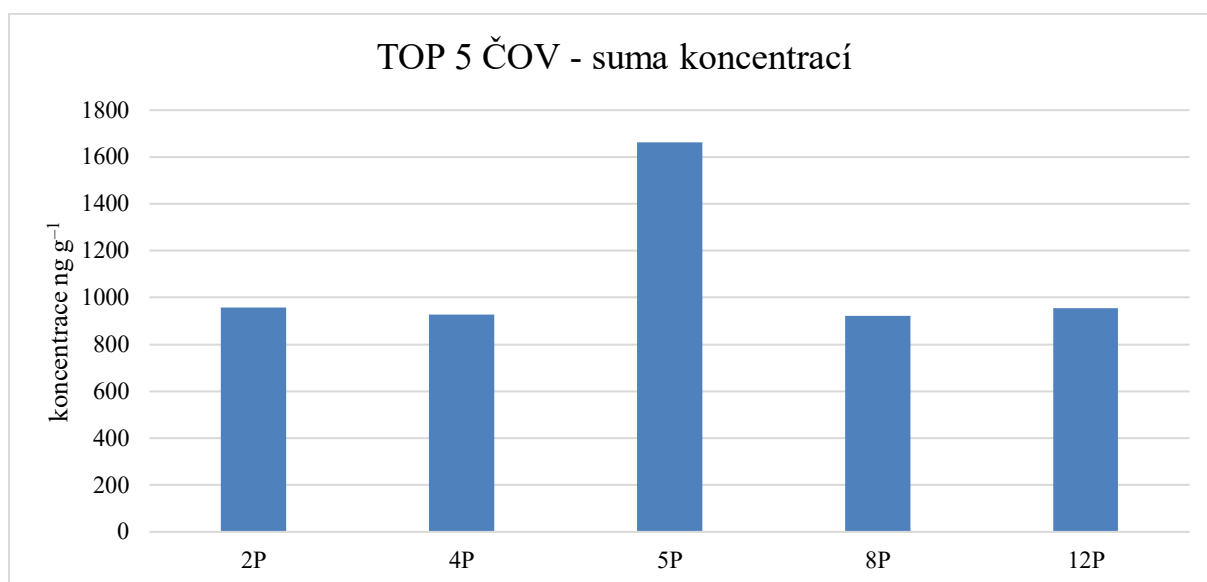
Na základě experimentálního testování byl vybrán nejvhodnější postup, který zajišťuje maximální efektivitu a spolehlivost při analýze farmaceutických látek. Tento postup byl použit na přípravu vzorků z čistírenských kalů a jejich analýzu. Naměřená data byla převedena na obsah analytu v 1 g původního vzorku (číselná hodnota odpovídá původní koncentraci v ng ml^{-1}) a jsou uvedena v kapitole 8 pro všechny analyty, které jsou zahrnuty v metodě ve všech vzorcích čistírenských kalů nebo kalové vodě.

Z naměřených dat bylo vybráno deset analytů, které dosahovaly nejvyšších součtových koncentrací napříč všemi vzorky. Pro každý analyt byla vypočtena suma koncentrací ze všech vzorků, aby bylo možné identifikovat látky s nejvýraznějším zastoupením. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 14, kde je vidět, že nejvíce zastoupený analyt ve všech vzorcích byl ciprofloxacin ($4179,82 \text{ ng g}^{-1}$), následovaný sertralinem ($1254,09 \text{ ng g}^{-1}$), telmisartanem ($1059,66 \text{ ng g}^{-1}$), a dalšími analyty. Nutné je také zmínit, že polovina těchto analytů (ciprofloxacin, doxycyklin, klindamycin, norfloxacin a ofloxacin) se řadí mezi antibiotika, což může poukazovat na zvýšenou spotřebu těchto látek mezi populací. Na čtvrtém místě v tomto seznamu je norverapamil, u kterého byla stanovena součtová koncentrace ve všech vzorcích na $558,01 \text{ ng g}^{-1}$. Tato látka, jakožto hlavní aktivní metabolit verapamilu – blokátoru kalciového kanálu, ukazuje, že sledování nejen mateřských látek, ale i jejich metabolitů je nezbytné pro komplexní hodnocení vlivu farmaceutik na životní prostředí.



Obrázek 14: Suma koncentrací deseti nejzastoupenějších analytů ve všech vzorcích

Stejný postup byl aplikován i na jednotlivé vzorky kalů z ČOV. Pro každý vzorek byla vypočtena suma koncentrací všech analyzovaných látek, aby bylo možné identifikovat vzorky s nejvyšším celkovým obsahem farmaceutických látek. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 15, je zřejmé, že nejvyšší koncentrace byla zjištěna ve vzorku 5P (1662,05 ng g⁻¹), zatímco ostatní vzorky vykazovaly nižší, ale stále významné hodnoty. Nejvyšší naměřená hodnota v rámci této analýzy byla zjištěna právě ve vzorku 5P u ciprofloxacinu, kde koncentrace dosahovala 890,53 ng g⁻¹. Ciprofloxacin byl také analyt s nejvyšší koncentrací ve všech ostatních vzorcích uvedených na Obrázku 15. Druhý nejvýznamněji zastoupený analyt v rámci celé analýzy byl sertralin, jehož nejvyšší koncentrace (198,33 ng g⁻¹) byla zjištěna ve vzorku 14P.



Obrázek 15: Suma koncentrací v pěti nejzastoupenějších ČOV napříč všemi analyty

6. Závěr

Tato diplomová práce se zaměřila na optimalizaci metody QuEChERS pro stanovení farmaceutických látek v pevných matricích, konkrétně čistírenských kalech. Teoretická část poskytla potřebný kontext k porozumění této problematice, kterým je sledování farmaceutických látek v životním prostředí. Zvláštní pozornost byla věnována aktuálnímu problému absence legislativních limitů pro farmaceutika v kalech používaných na zemědělské půdě.

Optimalizační kroky, rozdělené do tří experimentů, se soustředily na nalezení nejefektivnějšího postupu QuEChERS pro přípravu reálných vzorků. Pro vyhodnocení postupu byly vybrány klíčové analyty, které umožnily ověřit výtěžnost metody, posoudit vliv matrice a optimalizovat podmínky extrakce. První experiment se zaměřil na výběr materiálu zkumavek a určení optimálního režimu odふうání pod proudem dusíku. Druhý experiment hodnotil vliv různých rozpouštědel použitých po odふうání na výtěžnost farmaceutických látek. Třetí experiment porovnával vliv rozpouštědla pevné matrice, účinnost různých směsí extrakčních solí a zkoumal přínos použití PSA jako čistícího kroku. Na základě získaných výsledků byl jako nejvhodnější zvolen postup zahrnující rozpuštění pevné matrice v 0,1% kyselině mravenčí v MQ vodě, extrakci směsí solí obsahující 4 g MgSO_4 , 1 g NaCl , 1 g dihydrátu trisodné soli kyseliny citronové a 0,5 g seskvihydrátu disodné soli hydrogencitronové kyseliny, přenesení acetonitrilové fáze do skleněné zkumavky, odふうání pod proudem dusíku do sucha a následné rozpuštění ve směsi MQ vody a methanolu v poměru 1:1. Použití PSA nebylo zahrnuto, protože nepřineslo výrazné zlepšení extrakce. Tento optimalizovaný postup byl aplikován na vzorky čistírenských kalů z ČR, kde potvrdil přítomnost většiny sledovaných analytů. Nejvyšší koncentrace byla naměřena u antibiotika ciprofloxacinu ($890,53 \text{ ng g}^{-1}$) ve vzorku 5P. Tento analyt zároveň vykazoval nejvyšší součtovou koncentraci napříč všemi vzorky ($4179,82 \text{ ng g}^{-1}$). Vzorku 5P rovněž obsahoval nejvyšší celkový obsah zaznamenaných analytů ($1662,05 \text{ ng g}^{-1}$).

Naměřená data poskytují jasný obraz o přítomnosti farmaceutických látek v čistírenských kalech, čímž potvrzují jejich významnou roli jako environmentální zátěže. Výsledky této práce zdůrazňují potřebu zavedení spolehlivých analytických metod i legislativních opatření, která by stanovila limity pro obsah farmaceutik v kalech využívaných například v zemědělství.

7. Literatura

- (1) Kar, S.; Roy, K.; Leszczynski, J. Impact of Pharmaceuticals on the Environment: Risk Assessment Using QSAR Modeling Approach. In *Computational Toxicology: Methods and Protocols*; Nicolotti, O., Ed.; Springer: New York, NY, 2018; pp 395–443. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7899-1_19.
- (2) Bolesta, W.; Głodniok, M.; Styszko, K. From Sewage Sludge to the Soil—Transfer of Pharmaceuticals: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19* (16), 10246. <https://doi.org/10.3390/ijerph191610246>.
- (3) Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86* (2), 412–431.
- (4) González-Curbelo, M. Á.; Socas-Rodríguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; González-Sálamo, J.; Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Á. Evolution and Applications of the QuEChERS Method. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2015**, *71*, 169–185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>.
- (5) Beccaria, M.; Cabooter, D. Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis. *The Analyst* **2020**, *145* (4), 1129–1157. <https://doi.org/10.1039/c9an02145k>.
- (6) ATCDDD - Structure and principles. Dostupné z URL: <https://atcddd.fhi.no/atc/structure_and_principles/> (cit. 15.9.2024).
- (7) SÚKL - Přehled léčiv. SÚKL - Přehled léčiv. Dostupné z URL: <https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/atc-skupiny> (cit. 15.9.2024).
- (8) Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L. *Barevný Atlas Farmakologie*; Grada; Vol. 2007.
- (9) Mari, A.; Antonelli, A.; Cindolo, L.; Fusco, F.; Minervini, A.; De Nunzio, C. Alfuzosin for the Medical Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia and Lower Urinary Tract Symptoms: A Systematic Review of the Literature and Narrative Synthesis. *Ther. Adv. Urol.* **2021**, *13*, 1756287221993283. <https://doi.org/10.1177/1756287221993283>.
- (10) Dézsi, C. A.; Szentes, V. The Real Role of β -Blockers in Daily Cardiovascular Therapy. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **2017**, *17* (5), 361–373. <https://doi.org/10.1007/s40256-017-0221-8>.
- (11) Marques, L.; Vale, N. Salbutamol in the Management of Asthma: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (22), 14207. <https://doi.org/10.3390/ijms232214207>.
- (12) Martin, C.; Cocchio, C. Effect of Phenylephrine and Terbutaline on Ischemic Priapism: A Retrospective Review. *Am. J. Emerg. Med.* **2016**, *34* (2), 222–224. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2015.10.029>.
- (13) Paul, A. K.; Smith, C. M.; Rahmatullah, M.; Nissapatorn, V.; Wilairatana, P.; Spetea, M.; Gueven, N.; Dietis, N. Opioid Analgesia and Opioid-Induced Adverse Effects: A Review. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (11), 1091. <https://doi.org/10.3390/ph14111091>.
- (14) Lima, L. M.; Silva, B. N. M. D.; Barbosa, G.; Barreiro, E. J. β -Lactam Antibiotics: An Overview from a Medicinal Chemistry Perspective. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *208*, 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>.
- (15) Rubinstein, E.; Keynan, Y. Vancomycin Revisited - 60 Years Later. *Front. Public Health* **2014**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00217>.

- (16) Rusu, A.; Buta, E. L. The Development of Third-Generation Tetracycline Antibiotics and New Perspectives. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (12), 2085. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122085>.
- (17) Vázquez-Laslop, N.; Mankin, A. S. How Macrolide Antibiotics Work. *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43* (9), 668–684. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.011>.
- (18) Kapoor, G.; Saigal, S.; Elongavan, A. Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* **2017**, *33* (3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- (19) Pham, T. D. M.; Ziora, Z. M.; Blaskovich, M. A. T. Quinolone Antibiotics. *MedChemComm* **2019**, *10* (10), 1719–1739. <https://doi.org/10.1039/C9MD00120D>.
- (20) Tačić, A.; Nikolic, V.; Nikolic, L.; Savic, I. Antimicrobial Sulfonamide Drugs. *Adv. Technol.* **2017**, *6*, 58–71. <https://doi.org/10.5937/savteh1701058T>.
- (21) Ovung, A.; Bhattacharyya, J. Sulfonamide Drugs: Structure, Antibacterial Property, Toxicity, and Biophysical Interactions. *Biophys. Rev.* **2021**, *13* (2), 259–272. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00795-9>.
- (22) Fernández-Villa, D.; Aguilar, M. R.; Rojo, L. Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (20), 4996. <https://doi.org/10.3390/ijms20204996>.
- (23) Papich, M. G. Ormetoprim + Sulfadimethoxine. In *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*; Elsevier, 2016; pp 583–585. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-24485-5.00424-1>.
- (24) Singh, P.; Mittal, R.; Sharma, G. C.; Singh, S.; Singh, A. Ornidazole: Comprehensive Profile. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; Elsevier, 2003; Vol. 30, pp 123–184. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(03\)30007-3](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(03)30007-3).
- (25) Dingsdag, S. A.; Hunter, N. Metronidazole: An Update on Metabolism, Structure–Cytotoxicity and Resistance Mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73* (2), 265–279. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx351>.
- (26) Sheffler, Z. M.; Patel, P.; Abdijadid, S. Antidepressants. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2024.
- (27) Nakamura, I.; Oyama, J.; Komoda, H.; Shiraki, A.; Sakamoto, Y.; Taguchi, I.; Hiwatashi, A.; Komatsu, A.; Takeuchi, M.; Yamagishi, S.; Inoue, T.; Node, K. Possible Effects of Glimepiride beyond Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes: A Preliminary Report. *Cardiovasc. Diabetol.* **2014**, *13* (1), 15. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-15>.
- (28) Wu, P. E.; Juurlink, D. N. Clinical Review: Loperamide Toxicity. *Ann. Emerg. Med.* **2017**, *70* (2), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2017.04.008>.
- (29) Laurent, S. Antihypertensive Drugs. *Pharmacol. Res.* **2017**, *124*, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.026>.
- (30) Govindarajan, A.; Bistas, K. G.; Ingold, C. J.; Patel, P.; Aboed, A. Fluconazole. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2024.
- (31) Richter, E.; Wick, A.; Ternes, T. A.; Coors, A. Ecotoxicity of Climbazole, a Fungicide Contained in Antidandruff Shampoo. *Environ. Toxicol. Chem.* **2013**, *32* (12), 2816–2825. <https://doi.org/10.1002/etc.2367>.

- (32) Higgins, C. P.; Paesani, Z. J.; Abbott Chalew, T. E.; Halden, R. U.; Hundal, L. S. Persistence of Triclocarban and Triclosan in Soils after Land Application of Biosolids and Bioaccumulation in *Eisenia Foetida*. *Environ. Toxicol. Chem.* **2011**, *30* (3), 556–563. <https://doi.org/10.1002/etc.416>.
- (33) Halden, R. U. On the Need and Speed of Regulating Triclosan and Triclocarban in the United States. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (7), 3603–3611. <https://doi.org/10.1021/es500495p>.
- (34) *Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích (přepřacované znění) (Text s významem pro EHP)*; 2009; Vol. 342. Dostupné z URL: <<http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj/ces>> (cit. 20.11.2024).
- (35) Mancuso, J. B.; Maruthi, R.; Wang, S. Q.; Lim, H. W. Sunscreens: An Update. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2017**, *18* (5), 643–650. <https://doi.org/10.1007/s40257-017-0290-0>.
- (36) Howard, S. C.; McCormick, J.; Pui, C.-H.; Buddington, R. K.; Harvey, R. D. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. *The Oncologist* **2016**, *21* (12), 1471–1482. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0164>.
- (37) Alzahrani, S.; Al Doghaither, H.; Al-ghafari, A.; Pushparaj, P. 5-Fluorouracil and Capecitabine Therapies for the Treatment of Colorectal Cancer (Review). *Oncol. Rep.* **2023**, *50* (4), 175. <https://doi.org/10.3892/or.2023.8612>.
- (38) Caschera, L.; Lazzara, A.; Piergallini, L.; Ricci, D.; Tuscano, B.; Vanzulli, A. Contrast Agents in Diagnostic Imaging: Present and Future. *Pharmacol. Res.* **2016**, *110*, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.04.023>.
- (39) Wilkinson, D. A Review of the Effects of Memantine on Clinical Progression in Alzheimer's Disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2012**, *27* (8), 769–776. <https://doi.org/10.1002/gps.2788>.
- (40) Státní ústav pro kontrolu léčiv. Souhrn údajů o přípravku – Galantamin Mylan. **2021**.
- (41) Commissiong, J. W.; Karoum, F.; Reiffenstein, R. J.; Neff, N. H. Cyclobenzaprine: A Possible Mechanism of Action for Its Muscle Relaxant Effect. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1981**, *59* (1), 37–44. <https://doi.org/10.1139/y81-007>.
- (42) Green, G. A. Understanding NSAIDs: From Aspirin to COX-2. *Clin. Cornerstone* **2001**, *3* (5), 50–59. [https://doi.org/10.1016/S1098-3597\(01\)90069-9](https://doi.org/10.1016/S1098-3597(01)90069-9).
- (43) Kress, H. g.; Baltov, A.; Basiński, A.; Berghea, F.; Castellsague, J.; Codreanu, C.; Copaciu, E.; Giamberardino, M. a.; Hakl, M.; Hrazdira, L.; Kokavec, M.; Lejčko, J.; Nachtnebl, L.; Stančík, R.; Švec, A.; Tóth, T.; Vlaskovska, M. v.; Woroń, J. Acute Pain: A Multifaceted Challenge – the Role of Nimesulide. *Curr. Med. Res. Opin.* **2016**, *32* (1), 23–36. <https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1100986>.
- (44) Státní ústav pro kontrolu léčiv. Souhrn údajů o přípravku – Acylpyrin. **2020**.
- (45) Temple, J. L.; Bernard, C.; Lipshultz, S. E.; Czachor, J. D.; Westphal, J. A.; Mestre, M. A. The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. *Front. Psychiatry* **2017**, *8*, 80. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2017.00080>.
- (46) Holford, N.; Heo, Y.-A.; Anderson, B. A Pharmacokinetic Standard for Babies and Adults. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102* (9), 2941–2952. <https://doi.org/10.1002/jps.23574>.

- (47) Tsaïoun, K.; Blaauboer, B. J.; Hartung, T. Evidence-Based Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion (ADME) and Its Interplay with Alternative Toxicity Methods. *ALTEX* **2016**, 33 (4), 343–358.
<https://doi.org/10.14573/altex.1610101>.
- (48) Blaschke, T. Pharmacokinetics: Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion Overview Chapter. In *Principles of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics*; Altman, R. B., Flockhart, D., Goldstein, D. B., Eds.; Cambridge University Press, **2012**; pp 21–26.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781139051194.005>.
- (49) SÚKL. *Spotřeba léčivých látek podle cesty podání*. Dostupné z URL: <<https://sukl.gov.cz/spotreba-leciv-hlaseni-distributoru/7-spotreba-lecivych-latek-podle-cesty-podani-3/>> (cit. 23.9.2024).
- (50) Martin, P. D.; Warwick, M. J.; Dane, A. L.; Hill, S. J.; Giles, P. B.; Phillips, P. J.; Lenz, E. Metabolism, Excretion, and Pharmacokinetics of Rosuvastatin in Healthy Adult Male Volunteers. *Clin. Ther.* **2003**, 25 (11), 2822–2835.
[https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(03\)80336-3](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(03)80336-3).
- (51) Fent, K.; Weston, A.; Caminada, D. Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* **2006**, 76 (2), 122–159.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>.
- (52) *The Life-Cycle of Pharmaceuticals in the Environment*; Braund, R., Tong, A. Y. C., Tremblay, L. A., Peake, B. M., Eds.; Woodhead Publishing series in biomedicine; Elsevier: Amsterdam, **2016**.
- (53) Boxall, A. B. A. The Environmental Side Effects of Medication: How Are Human and Veterinary Medicines in Soils and Water Bodies Affecting Human and Environmental Health? *EMBO Rep.* **2004**, 5 (12), 1110–1116.
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400307>.
- (54) Rakašová, G. *Průzkum SÚKL: Množství nevyužitých léčiv roste, v domácnostech je zbytečně hromadíme*. SÚKL. Dostupné z URL: <<https://sukl.gov.cz/tiskove-zpravy/pruzkum-sukl-mnozstvi-nevyuzitych-leciv-roste-v-domacnostech-je-zbytecne-hromadime/>> (cit. 18.11.2024).
- (55) Khan, U.; Bloom, R. A.; Nicell, J. A.; Laurenson, J. P. Risks Associated with the Environmental Release of Pharmaceuticals on the U.S. Food and Drug Administration “Flush List.” *Sci. Total Environ.* **2017**, 609, 1023–1040.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.269>.
- (56) Nikolaou, A.; Meric, S.; Fatta, D. Occurrence Patterns of Pharmaceuticals in Water and Wastewater Environments. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387 (4), 1225–1234.
<https://doi.org/10.1007/s00216-006-1035-8>.
- (57) Pošta, J. *Čistírný odpadních vod*, Vyd. 1.; Česká zemědělská univerzita, Technická fakulta: V Praze, **2005**.
- (58) Malý, J. *Čištění Průmyslových Odpadních Vod*, 1. vyd.; NOEL 2000, **1996**.
- (59) info@aion.cz, A. C.-. *416/2010 Sb. Nařízení vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění odpadních vod a náležitostech povole...* Zákony pro lidi. Dostupné z URL: <<https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2010-416>> (cit. 18.11.2024).
- (60) Dohányos, M.; Strnadová, N.; Koller, J. *Čištění odpadních vod*, Vyd. 2.; Vydavatelství VŠCHT: Praha, **2004**.
- (61) Bunce, J. T.; Ndam, E.; Ofiteru, I. D.; Moore, A.; Graham, D. W. A Review of Phosphorus Removal Technologies and Their Applicability to Small-Scale Domestic Wastewater Treatment Systems. *Front. Environ. Sci.* **2018**, 6.
<https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00008>.
- (62) Verlicchi, P.; Zambello, E. Pharmaceuticals and Personal Care Products in Untreated and Treated Sewage Sludge: Occurrence and Environmental Risk in the Case of Application

- on Soil — A Critical Review. *Sci. Total Environ.* **2015**, 538, 750–767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.108>.
- (63) *Vodovody, kanalizace a vodní toky - 2023*. Produkty. Dostupné z URL: <<https://csu.gov.cz/produkty/vodovody-kanalizace-a-vodni-toky-2023>> (cit. 16.11.2024).
- (64) ČR, M. *Kaly z čistíren odpadních vod*. Dostupné z URL: <http://www.mzp.cz/kaly_cistiren_odpadnich_vod> (cit. 16.11.2024).
- (65) info@aion.cz, A. C.-. *541/2020 Sb. Zákon o odpadech*. Zákony pro lidi. Dostupné z URL: <<https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2020-541>> (cit. 20.11.2024).
- (66) info@aion.cz, A. C.-. *273/2021 Sb. Vyhláška o podrobnostech nakládání s odpady*. Zákony pro lidi. Dostupné z URL: <<https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2021-273>> (cit. 20.11.2024).
- (67) Kozisek, F.; Pomykacova, I.; Jeligova, H.; Cadek, V.; Svobodova, V. Survey of Human Pharmaceuticals in Drinking Water in the Czech Republic. *J. Water Health* **2013**, 11 (1), 84–97. <https://doi.org/10.2166/wh.2013.056>.
- (68) Deo, R. P. Pharmaceuticals in the Surface Water of the USA: A Review. *Curr. Environ. Health Rep.* **2014**, 1 (2), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0015-y>.
- (69) Jørgensen, S. E.; Halling-Sørensen, B. Drugs in the Environment. *Chemosphere* **2000**, 40 (7), 691–699. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00438-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00438-5).
- (70) Radjenović, J.; Petrović, M.; Barceló, D. Fate and Distribution of Pharmaceuticals in Wastewater and Sewage Sludge of the Conventional Activated Sludge (CAS) and Advanced Membrane Bioreactor (MBR) Treatment. *Water Res.* **2009**, 43 (3), 831–841. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.043>.
- (71) Mejías, C.; Martín, J.; Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E. Occurrence of Pharmaceuticals and Their Metabolites in Sewage Sludge and Soil: A Review on Their Distribution and Environmental Risk Assessment. *Trends Environ. Anal. Chem.* **2021**, 30, e00125. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2021.e00125>.
- (72) Ivanová, L.; Mackuľak, T.; Grabic, R.; Golovko, O.; Koba, O.; Staňová, A. V.; Szabová, P.; Grenčíková, A.; Bodík, I. Pharmaceuticals and Illicit Drugs – A New Threat to the Application of Sewage Sludge in Agriculture. *Sci. Total Environ.* **2018**, 634, 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.001>.
- (73) Kodešová, R.; Švecová, H.; Klement, A.; Fér, M.; Nikodem, A.; Fedorova, G.; Rieznyk, O.; Kočárek, M.; Sadchenko, A.; Chroňáková, A.; Grabic, R. Contamination of Water, Soil, and Plants by Micropollutants from Reclaimed Wastewater and Sludge from a Wastewater Treatment Plant. *Sci. Total Environ.* **2024**, 907, 167965. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167965>.
- (74) Vidali, M. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* **2001**, 73 (7), 1163–1172. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>.
- (75) *Occurrence and fate of pharmaceuticals in effluent and sludge from a wastewater treatment plant in Brazil: Environmental Technology: Vol 42*. Dostupné z URL: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09593330.2019.1701561>> (cit. 29.11.2024).
- (76) D'Atri, V.; Fekete, S.; Clarke, A.; Veuthey, J.-L.; Guilleme, D. Recent Advances in Chromatography for Pharmaceutical Analysis. *Anal. Chem.* **2018**. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05026>.
- (77) Santana-Mayor, Á.; Socas-Rodríguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; Rodríguez-Delgado, M. Á. Current Trends in QuEChERS Method. A Versatile Procedure for Food, Environmental

- and Biological Analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *116*, 214–235. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.018>.
- (78) Lehotay, S. J.; Maštovská, K.; Lightfield, A. R. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. *J. AOAC Int.* **2005**, *88* (2), 615–629. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.2.615>.
- (79) Anastassiades, M.; Scherbaum, E.; Taşdelen, B.; Štajnbaher, D. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. In *Pesticide Chemistry*; Ohkawa, H., Miyagawa, H., Lee, P. W., Eds.; Wiley, **2007**; pp 439–458. <https://doi.org/10.1002/9783527611249.ch46>.
- (80) Bhardwaj, Dr. S. A Review: HPLC Method Development and Validation. **2015**.
- (81) Nováková, L. *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi*, 1. vyd.; Lucie Nováková; Michal Douša, **2013**.
- (82) Adaway, J. E.; Keevil, B. G. Therapeutic Drug Monitoring and LC–MS/MS. *J. Chromatogr. B* **2012**, *883–884*, 33–49. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.041>.
- (83) *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte - Banerjee - 2012 - International Journal of Analytical Chemistry - Wiley Online Library*. Dostupné z URL: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2012/282574>> (cit. 23.11.2024).
- (84) Gross, J. H. *Mass Spectrometry*; Springer International Publishing: Cham, **2017**. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>.
- (85) Grebe, S. K.; Singh, R. J. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here? *Clin. Biochem. Rev.* **2011**, *32* (1), 5–31.
- (86) Langford, K. H.; Thomas, K. V. Determination of Pharmaceutical Compounds in Hospital Effluents and Their Contribution to Wastewater Treatment Works. *Environ. Int.* **2009**, *35* (5), 766–770. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.007>.
- (87) Garcia-Rodríguez, A.; Sagristà, E.; Matamoros, V.; Fontàs, C.; Hidalgo, M.; Salvadó, V. Determination of Pharmaceutical Compounds in Sewage Sludge Using a Standard Addition Method Approach. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2014**, *94* (12), 1199–1209. <https://doi.org/10.1080/03067319.2014.921292>.
- (88) Ma, S.; Han, P.; Li, A.; Wang, J.; Feng, X.; Wang, M. Simultaneous Determination of Trace Levels of 12 Steroid Hormones in Soil Using Modified QuEChERS Extraction Followed by Ultra Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (UPLC–MS/MS). *Chromatographia* **2018**, *81*, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10337-017-3464-2>.

8. Naměřená data vzorků kalů z ČOV v ČR

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	1P ng g ⁻¹	2P ng g ⁻¹	3P ng g ⁻¹	4P ng g ⁻¹	5P ng g ⁻¹	6P ng g ⁻¹	7K ng g ⁻¹	8P ng g ⁻¹	9P ng g ⁻¹
10,11-dihydro-10-hydroxykarbamazepin	0,0005	0,0018	0,1282	0,0035	0,1351	0,0108	n. d.	0,2477	n. d.	<LOD	0,1217
10,11-dihydroxykarbamazepin	0,0004	0,0012	0,5977	0,4036	0,3187	0,1414	0,2512	0,6117	0,1727	0,0443	1,0245
10,11-epoxidkarbamazepin	0,0002	0,0008	0,4954	0,1731	0,1133	0,0479	0,0389	0,0657	0,0143	n. d.	0,2744
2-hydroxykarbamazepin	0,0001	0,0004	0,5109	0,2006	0,1548	0,0676	0,0611	0,1014	0,0139	0,0121	0,3848
3-hydroxykarbamazepin	0,0001	0,0004	0,2988	0,1166	0,0795	0,0536	0,0731	0,0674	0,0136	0,0056	0,1379
4-acetamidoantipyrin	0,0006	0,0020	4,9690	2,8461	4,4095	0,0463	0,1066	5,8579	0,3745	0,0432	2,1166
4-formylaminoantipyrin	0,0115	0,0385	2,5458	1,644	1,4788	0,0894	0,0951	1,3566	2,4599	0,0373	1,2590
4-hydroxydiklofenak	0,0214	0,0712	10,4887	3,6116	3,4124	1,0331	0,4449	4,4813	0,6094	0,7976	6,5733
Acebutolol	0,0003	0,0009	1,0711	0,4348	0,1080	0,1429	0,4739	0,1157	0,0370	0,2140	0,1891
Alfuzosin	0,0005	0,0015	0,3217	0,6195	0,1520	1,7077	2,7187	0,4739	<LOD	0,3986	2,3980
Amidotrizoát	0,0004	0,0015	n. d.	n. d.	0,0921	0,1419	0,1145	0,0607	n. d.	0,0963	n. d.
Amitriptylin	0,0004	0,0012	0,0677	8,0931	3,2322	3,4001	9,1189	6,1085	0,4496	3,2843	2,1984
Amoxicillin	0,0007	0,0023	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Anastrozol	0,0003	0,0009	0,0029	0,0037	0,0035	0,0030	0,0028	0,0045	0,0012	<LOD	0,0024
Atenolol	0,0005	0,0015	0,0626	0,0146	0,0168	0,0063	0,0021	0,0265	0,0075	0,0106	0,0471
Atorvastatin	0,0003	0,0010	4,0741	1,493	1,5928	0,6388	0,6996	1,5253	0,0239	0,7254	1,7011
Azathioprin	0,0047	0,0158	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Azithromycin	0,0004	0,0012	n. d.	18,4402	5,688	15,3913	14,3969	11,8003	0,7473	11,0701	13,8498

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	1P ng g ⁻¹	2P ng g ⁻¹	3P ng g ⁻¹	4P ng g ⁻¹	5P ng g ⁻¹	6P ng g ⁻¹	7K ng g ⁻¹	8P ng g ⁻¹	9P ng g ⁻¹
Benzylpenicilin	0,0000	0,0001	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Bezafibrát	0,0006	0,0019	n. d.	0,0111	0,0064	0,0044	n. d.	0,0035	<LOD	0,1019	0,0042
Bisoprolol	0,0051	0,0168	0,6095	2,7799	1,1825	0,9203	0,1384	1,6920	0,2200	0,3371	1,5510
Buprenorfin	0,0051	0,0171	n. d.	n. d.	0,0434	n. d.	1,1151	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Butorfanol	0,0006	0,0019	0,4784	0,0508	0,0376	0,0142	0,0069	0,0346	<LOD	0,0247	0,0636
Celiprolol	0,0008	0,0027	0,1098	0,0264	0,4033	0,4947	0,0344	0,2229	0,1495	0,1104	1,5887
Ciprofloxacin	0,0005	0,0017	160,8998	301,4998	210,2281	441,0508	890,5329	229,1021	12,8057	302,2834	114,1885
Citalopram	0,0004	0,0012	49,1436	39,8021	11,0796	28,1361	26,0297	25,8891	0,7472	25,6143	35,0822
Cyklobenzaprin	0,0005	0,0015	0,9117	0,0375	0,0086	0,0549	0,5029	0,0259	0,0018	0,0193	0,0076
Cyklofosfamid	0,0007	0,0023	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Diazepam	0,0063	0,0211	0,0563	0,1248	0,0598	0,1177	0,0209	0,0765	0,0538	0,2263	0,1111
Diklofenak	0,0006	0,0020	n. d.	2,9047	4,1975	1,4212	1,3216	3,6962	0,6149	2,7475	4,2659
Diltiazem	0,0002	0,0006	n. d.	0,0109	0,0031	0,0327	0,0100	n. d.	n. d.	0,0024	0,0063
Disopyramid	0,0003	0,0011	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	<LOD	n. d.	n. d.	0,0054	n. d.
Doxycyklin	0,0003	0,0011	n. d.	20,7966	24,6861	50,5723	38,3172	15,2328	4,7870	47,6725	37,1573
Enalapril	0,0104	0,0346	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Enoxacin	0,0047	0,0157	2,1708	6,1169	0,9538	2,6283	5,5804	0,4679	<LOD	22,4731	4,6815
Enrofloxacin	0,0046	0,0153	0,2657	0,5406	0,4221	0,6145	0,4747	1,0637	57,2831	2,6059	1,1657
Ensulizol	0,0037	0,0122	24,8354	6,3592	6,7792	1,954	0,9396	4,5140	n. d.	1,8251	0,2971
Eprosartan	0,0046	0,0153	0,0135	n. d.	n. d.	<LOD	0,0258	n. d.	<LOD	0,0242	<LOD
Erytromycin	0,0005	0,0016	n. d.	0,2358	0,0733	0,0985	0,0370	0,1161	0,0101	0,1224	n. d.
Fenazon	0,0002	0,0008	7,7817	4,2214	0,4566	1,4601	0,2052	2,1632	0,0409	0,2125	1,0045
Fexofenadin	0,0012	0,0039	0,0776	7,1523	1,7511	5,0257	2,1328	12,1502	0,0961	3,0737	11,3658

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	1P ng g ⁻¹	2P ng g ⁻¹	3P ng g ⁻¹	4P ng g ⁻¹	5P ng g ⁻¹	6P ng g ⁻¹	7K ng g ⁻¹	8P ng g ⁻¹	9P ng g ⁻¹
Flukonazol	0,0045	0,0150	0,4505	0,154	0,2162	0,2131	0,0998	0,3483	0,1608	0,0368	0,1802
Flumechin	0,0035	0,0116	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	<LOD	<LOD	n. d.
Fluoxetin	0,0048	0,0158	<LOD	0,3213	0,1071	0,2422	0,1799	0,2112	<LOD	1,2653	0,6063
Flutamid	0,0008	0,0025	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Furosemid	0,0015	0,0051	7,0636	1,4524	4,262	0,4556	0,1044	1,5528	1,6315	0,0492	1,9017
Gabapentin	0,0032	0,0108	0,6814	0,2961	0,1562	0,0965	0,2614	0,3748	0,1135	0,1594	0,2633
Galantamin	0,0003	0,0009	n. d.	0,0157	n. d.	n. d.	n. d.	0,0073	n. d.	n. d.	0,0248
Gemfibrozil	0,0047	0,0157	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Glimepirid	0,0002	0,0005	0,0929	0,0549	0,0113	0,0445	0,0538	0,0714	0,0040	0,1137	0,0270
Hydrochlorothiazid	0,0003	0,0008	0,1240	2,4888	1,8757	4,3379	1,4743	4,7171	1,8188	2,0668	3,1210
Chloramfenikol	0,0004	0,0014	0,1745	0,0300	0,0535	0,0085	0,0159	0,0078	0,0067	0,0036	0,0821
Chlortetracyklin	0,0003	0,0009	n. d.	n. d.	20,9755	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1713	1,7955
Ibuprofen	0,0042	0,0140	n. d.	7,7992	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	1,9104	10,2588
Ifosfamid	0,0018	0,0061	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Indometacin	0,0002	0,0006	0,1053	0,5781	0,7396	1,3672	0,9832	1,6854	0,2001	0,2685	0,6009
Iohexol	0,0001	0,0003	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Iomeprol	0,0016	0,0052	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Iopamidol	0,0001	0,0005	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Iopromid	0,0002	0,0008	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Irbesartan	0,0002	0,0006	<LOD	1,7346	0,8590	1,9199	0,3798	0,7314	0,2392	0,3808	0,5076
Kapcitabin	0,0023	0,0075	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0029	n. d.
Karbamazepin	0,0002	0,0005	6,5281	1,3704	1,397	0,6184	2,7582	0,8440	0,1225	0,1529	1,8548
Ketoprofen	0,0002	0,0007	0,0157	0,0117	0,0419	n. d.	0,0118	0,0106	0,0087	n. d.	0,0352

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	1P ng g ⁻¹	2P ng g ⁻¹	3P ng g ⁻¹	4P ng g ⁻¹	5P ng g ⁻¹	6P ng g ⁻¹	7K ng g ⁻¹	8P ng g ⁻¹	9P ng g ⁻¹
Klaritromycin	0,0001	0,0004	n. d.	26,9831	30,727	4,9762	15,0417	32,1476	2,6557	9,7279	15,0531
Klimbazol	0,0149	0,0496	0,1364	6,2982	8,2486	1,8542	2,1662	7,3663	1,7794	5,0615	1,8243
Klindamycin	0,0047	0,0156	n. d.	31,5136	28,6154	9,667	3,3222	48,0277	0,5691	14,7896	81,3054
Klonazepam	0,0004	0,0013	n. d.	n. d.	0,0029	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Kloxacin	0,0126	0,0418	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Kofein	0,0006	0,0021	3,4598	4,9414	3,2453	6,0352	9,7336	3,8536	0,1433	7,4849	5,2553
Kolchicin	0,0011	0,0036	n. d.	n. d.	n. d.	0,0580	0,1075	0,0094	0,0051	0,0148	0,0399
Kotinin	0,0002	0,0005	9,7585	0,1234	0,0688	0,0428	0,0605	0,1005	0,0119	0,0432	0,1628
Kyselina klofibrová	0,2080	0,6932	n. d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kyselina nalidixová	0,0031	0,0104	1,2854	0,0680	<LOD	0,0643	0,0387			0,1361	
Kyselina oxolinová	0,0002	0,0006	0,5867	0,2389	0,1594	0,7005	0,8059	0,4309	0,0026	0,1080	0,1348
Kyselina salicylová	0,2074	0,6913	6,5810	7,5356	0,8004	1,9133	<LOD	1,8226	<LOD	0,9413	5,4281
Kyselina valsartanová	0,0017	0,0055	5,2018	4,2149	3,8045	8,1558	3,3529	3,1644	1,9107	3,4212	6,0573
Lamotrigin	0,0002	0,0006	0,2064	3,0153	1,7074	3,8198	1,6530	2,7282	0,2857	1,1543	3,9685
Linkomycin	0,0005	0,0017	n. d.	0,0778	0,5929	n. d.	n. d.	0,0068	n. d.	<LOD	0,0222
Lomefloxacin	0,0050	0,0166	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Loperamid	0,0004	0,0012	<LOD	1,0242	1,0359	2,6657	2,2810	0,8028	0,1047	1,7293	1,9851
Losartan	0,0045	0,0148	2,9970	0,7008	0,7460	0,2540	0,4721	0,3111	0,0435	0,3591	1,5148
Lovastatin	0,0043	0,0144	0,2417	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0670	n. d.	n. d.	n. d.
Meloxicam	0,0002	0,0007	0,0183	0,0048	0,0061	0,0022	0,0011	0,0158	0,0057	0,0430	0,0264
Memantin	0,0002	0,0008	0,0215	0,2177	0,1970	0,2284	0,1293	0,1613	0,0140	0,1003	0,4891
Metacyklin	0,0001	0,0003	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	2,3996	n. d.	0,1382	1,2329	0,2709
Metformin	0,0002	0,0007	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	1P ng g ⁻¹	2P ng g ⁻¹	3P ng g ⁻¹	4P ng g ⁻¹	5P ng g ⁻¹	6P ng g ⁻¹	7K ng g ⁻¹	8P ng g ⁻¹	9P ng g ⁻¹
Metotrexát	0,0004	0,0014	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Metoprolol	0,0003	0,0009	7,0561	6,1548	7,8747	3,578	0,3214	6,6434	0,6615	1,6196	6,4859
Metronidazol	0,0010	0,0033	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Mirtazapin	0,0003	0,0011	0,5240	3,0611	2,5686	7,7446	6,1720	3,0162	0,1534	2,9330	2,9783
Mykofenolát mofetil	0,0006	0,0020	n. d.	0,0049	<LOD	0,0145	0,0167	<LOD	n. d.	n. d.	0,0229
Naproxen	0,0001	0,0004	0,2718	0,0871	0,1630	0,0277	n. d.	0,3368	0,0274	0,0083	0,1080
Nimesulid	0,0092	0,0306	n. d.	n. d.	n. d.	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Norfloxacin	0,0004	0,0014	2,1100	21,8718	4,0298	32,1681	34,2323	3,8681	0,0809	173,8873	40,2850
Norverapamil	0,0023	0,0077	1,0206	95,3222	6,8468	48,1431	91,7531	56,6710	0,2228	39,4803	44,0132
O-Desmetylnaproxen	0,0039	0,0131	n. d.	5,2542	2,3811	n. d.	n. d.	1,0177	0,1123	0,2695	1,0703
Ofloxacin	0,0023	0,0077	16,1003	17,922	2,3878	13,5666	194,4692	8,3479	0,0510	7,7794	8,5537
Omeprazol	0,0002	0,0006	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0015	n. d.	n. d.	0,0010
Ormetoprim	0,0002	0,0007	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Ornidazol	0,0002	0,0006	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Oxazepam	0,0001	0,0005	0,1626	0,8593	1,3346	0,4264	0,0593	0,6986	0,0059	0,0931	1,6510
Oxkarbazepin	0,0003	0,0011	n. d.	n. d.	0,1209	0,0183	n. d.	0,1040	n. d.	n. d.	0,0651
Oxypurinol	0,0002	0,0006	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Oxytetracyklin	0,0002	0,0006	n. d.	2,5726	0,7781	n. d.	0,9367	0,7085	0,0190	0,7114	0,2954
Paklitaxel	0,0002	0,0006	n. d.	0,0114	0,1387	0,2343	0,2647	0,0766	0,0205	n. d.	0,0473
Paracetamol	0,0002	0,0005	1,1209	0,8015	0,6454	n. d.	n. d.	1,4965	n. d.	0,0668	3,4971
Paraxantin	0,0001	0,0004	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Piroxikam	0,0021	0,0070	<LOD	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	<LOD	<LOD	n. d.
Primidon	0,0011	0,0035	0,0396	0,0281	0,0721	0,0599	0,0173	0,1040	0,3241	0,0106	0,0994

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	1P ng g ⁻¹	2P ng g ⁻¹	3P ng g ⁻¹	4P ng g ⁻¹	5P ng g ⁻¹	6P ng g ⁻¹	7K ng g ⁻¹	8P ng g ⁻¹	9P ng g ⁻¹
Propranolol	0,0003	0,0011	0,0317	0,1071	0,0797	1,3172	0,2960	0,1861	<LOD	0,6723	0,5076
Ranitidin	0,0001	0,0004	n. d.	0,0038	0,0016	0,0033	0,0036	0,0011	<LOD	0,0038	0,0077
Roxithromycin	0,0003	0,0008	n. d.	0,4381	0,0497	0,9703	0,6736	n. d.	0,0253	1,0074	0,8187
Salbutamol	0,0002	0,0007	0,0126	0,0017	0,0017	n. d.	n. d.	0,0063	<LOD	n. d.	0,0058
Sarafloxacin	0,0082	0,0274	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sertralin	0,0006	0,0019	0,0521	86,1914	48,3942	74,6447	98,9828	129,0775	2,5033	75,4728	143,8964
Simvastatin	0,0002	0,0005	0,7492	0,0674	0,0336	0,0228	0,0201	0,0353	n. d.	0,0498	0,0604
Sotalol	0,0005	0,0018	0,0943	0,1351	0,0502	0,0574	0,0376	0,1034	0,1937	0,2070	0,6198
Sulfadiazin	0,0011	0,0038	0,0636	0,1573	0,0302	0,0644	0,0289	0,0842	0,0827	0,0229	0,1979
Sulfachlorpyridazin	0,0011	0,0037	0,0446	0,0697	0,1172	0,0361	n. d.	0,1669	n. d. n. d.	0,0195	
Sulfamerazin	0,0011	0,0038	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfamethazin	0,0008	0,0026	0,0249	0,0080	n. d.	0,0152	0,0034	0,0382	<LOD	0,0323	n. d.
Sulfamethizol	0,0007	0,0022	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfamethoxazol	0,0008	0,0026	n. d.	0,0394	0,1064	0,2412	0,273	0,2747	0,1303	0,4436	0,0680
Sulfamethoxypyridazin	0,0012	0,0040	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfamonomethoxin	0,0009	0,0031	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	<LOD	n. d.	n. d.
Sulfanilamid	0,0026	0,0085	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfapyridin	0,0009	0,0031	0,7432	1,5284	0,2759	0,6526	0,1178	0,7461	0,8737	0,2349	1,6903
Sulfathiazol	0,0015	0,0051	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,1136	n. d.	n. d.	n. d.	0,0147
Telmisartan	0,0007	0,0022	0,0119	95,6603	101,3278	82,4392	63,2024	90,1411	7,7202	97,2890	105,7730
Terbutalin	0,0008	0,0026	0,0475	0,0058	0,0070	n. d.	0,0065	0,0103	<LOD	0,0058	0,0045
Tetracyklin	0,0020	0,0068	n. d.	3,3709	n. d.	n. d.	52,923	2,0679	0,0591	8,3641	11,3310
Thebain	0,0009	0,0029	0,1750	0,4486	0,4292	0,8492	4,7413	1,2482	0,0219	0,6302	3,6283

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	1P ng g ⁻¹	2P ng g ⁻¹	3P ng g ⁻¹	4P ng g ⁻¹	5P ng g ⁻¹	6P ng g ⁻¹	7K ng g ⁻¹	8P ng g ⁻¹	9P ng g ⁻¹
Tiamulin	0,0007	0,0022	0,0033	<LOD	0,2762	<LOD	<LOD	n. d.	n. d.	<LOD	0,0079
Tramadol	0,0004	0,0012	6,9863	18,7978	14,4535	21,0976	5,8542	32,7848	5,8972	11,8385	22,8158
Triklokarban	0,0129	0,0429	0,1429	0,0635	2,7789	0,2136	2,3561	0,1535	<LOD	0,4142	0,0947
Trimethoprim	0,0003	0,0011	n. d.	0,3620	0,1385	0,9395	1,9887	1,1433	0,0078	0,6809	0,4451
Valsartan	0,0014	0,0046	25,7909	2,6739	1,1261	0,7679	1,4709	1,8164	0,0209	0,0409	4,6998
Vankomycin	0,0430	0,1433	n. d.	<LOD	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	<LOD	n. d.	n. d.
Venlafaxin	0,0024	0,0081	6,7208	20,3913	7,0440	14,6935	13,122	23,3154	2,7186	11,2181	15,4768
Verapamil	0,0005	0,0018	0,3445	40,1753	3,7913	16,155	43,3943	22,6351	0,0653	7,6111	10,2585
Warfarin	0,0017	0,0056	0,0511	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,0079
Zolpidem	0,0002	0,0007	0,2275	0,2358	0,0925	0,2875	0,284	0,3289	0,0084	0,1804	0,2040

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	10P ng g ⁻¹	10K ng g ⁻¹	11K ng g ⁻¹	12P ng g ⁻¹	13P ng g ⁻¹	14P ng g ⁻¹	15P ng g ⁻¹	16K ng g ⁻¹
10,11-dihydro-10-hydroxykarbamazepin	0,0005	0,0018	0,3684	0,0170	0,0797	n. d.	n. d.	n. d.	0,0372	<LOD
10,11-dihydroxykarbamazepin	0,0004	0,0012	1,9510	0,1021	0,4358	0,1390	0,5249	0,1090	3,9147	1,0386
10,11-epoxidkarbamazepin	0,0002	0,0008	0,2375	0,0349	0,0318	0,0232	0,1465	0,0532	1,3866	0,0095
2-hydroxykarbamazepin	0,0001	0,0004	0,2731	0,0460	0,0376	0,0214	0,1633	0,0683	1,2599	0,0178
3-hydroxykarbamazepin	0,0001	0,0004	0,1937	0,0307	0,0266	0,0390	0,1230	0,0452	0,9275	0,0267
4-acetamidoantipyrin	0,0006	0,0020	8,1695	0,5100	0,8126	0,0107	0,0416	0,2095	1,5732	0,3946
4-formylaminoantipyrin	0,0115	0,0385	4,2276	0,1768	1,0363	<LOD	0,1167	0,2345	0,4277	2,0808
4-hydroxydiklofenak	0,0214	0,0712	4,1940	0,6776	0,6644	1,5761	0,5193	0,9230	2,4772	0,0231
Acebutolol	0,0003	0,0009	0,0670	0,0158	0,0252	0,1648	1,2258	0,7541	0,5781	0,0151
Alfuzosin	0,0005	0,0015	0,4178	0,2074	0,0061	2,1911	1,7898	2,3102	<LOD	<LOD
Amidotrizoát	0,0004	0,0015	0,0311	n. d.	0,0175	0,0589	0,1664	0,0864	0,1956	n. d.
Amitriptylin	0,0004	0,0012	0,1034	0,1279	0,1897	4,7593	1,4459	0,0793	1,0154	0,0171
Amoxicillin	0,0007	0,0023	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Anastrozol	0,0003	0,0009	0,0088	0,0013	<LOD	0,0048	0,0061	0,0358	<LOD	n. d.
Atenolol	0,0005	0,0015	0,0053	0,0018	0,0030	0,0060	0,0028	<LOD	0,0036	<LOD
Atorvastatin	0,0003	0,0010	0,8117	0,1876	0,1262	0,2171	0,6954	1,0263	0,8241	0,0061
Azathioprin	0,0047	0,0158	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Azithromycin	0,0004	0,0012	7,7642	2,4112	1,3344	12,0105	14,7133	5,9538	12,6176	0,1222
Benzylpenicilin	0,0001	0,0001	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Bezafibrát	0,0006	0,0019	0,0054	<LOD	n. d.	0,0028	0,0054	<LOD	<LOD	n. d.
Bisoprolol	0,0051	0,0168	1,2241	0,1991	0,1512	0,5769	0,5508	8,2728	0,9963	0,0399
Buprenorfin	0,0051	0,0171	0,0427	0,0270	n. d.	n. d.	0,0487	n. d.	n. d.	n. d.

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	10P ng g ⁻¹	10K ng g ⁻¹	11K ng g ⁻¹	12P ng g ⁻¹	13P ng g ⁻¹	14P ng g ⁻¹	15P ng g ⁻¹	16K ng g ⁻¹
Butorfanol	0,0006	0,0019	0,0178	0,0056	0,0041	0,0176	0,0081	0,0038	0,0053	n. d.
Celiprolol	0,0008	0,0027	0,4103	0,1475	0,0043	0,0272	1,1198	0,0416	5,9479	0,9682
Ciprofloxacin	0,0005	0,0017	149,0516	37,1798	20,3528	395,6754	254,1417	311,3303	244,8821	124,6102
Citalopram	0,0004	0,0012	10,2345	5,1773	1,0958	24,5781	28,1733	43,4148	29,4678	3,7904
Cyklobenzaprin	0,0005	0,0015	0,0054	<LOD	<LOD	0,0214	0,0804	0,0192	0,0117	<LOD
Cyklofosfamid	0,0007	0,0023	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Diazepam	0,0063	0,0211	<LOD	<LOD	<LOD	0,0361	0,0743	<LOD	<LOD	0,1283
Diklofenak	0,0006	0,0020	3,8535	0,7801	0,7109	1,2244	2,2073	2,8631	3,3092	0,0609
Diltiazem	0,0002	0,0006	<LOD	<LOD	n. d.	n. d.	0,0055	<LOD	n. d.	0,0028
Disopyramid	0,0003	0,0011	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	<LOD	<LOD	n. d.	<LOD
Doxycyklin	0,0003	0,0011	15,6633	5,4829	5,1081	31,3613	37,2635	7,6162	30,7177	0,8532
Enalapril	0,0104	0,0346	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Enoxacin	0,0047	0,0157	0,5527	0,1963	0,1468	2,2146	1,0313	1,8257	5,7327	1,2479
Enrofloxacin	0,0046	0,0153	1,7677	0,5404	1,0630	n. d.	91,3411	9,5505	0,2635	0,0263
Ensulizol	0,0037	0,0122	5,4355	0,2483	2,7730	n. d.	n. d.	5,7719	3,9979	0,2084
Eprosartan	0,0046	0,0153	<LOD	n. d.	n. d.	<LOD	<LOD	0,0278	<LOD	n. d.
Erytromycin	0,0005	0,0016	0,0573	0,0136	0,0087	0,0889	0,0769	0,1418	0,0092	0,0064
Fenazon	0,0002	0,0008	0,2398	0,0759	0,0587	0,4913	0,3231	0,4980	0,7652	0,3755
Fexofenadin	0,0012	0,0039	13,7052	2,4924	1,5736	9,5874	3,8325	6,2813	0,2114	0,0525
Flukonazol	0,0045	0,0150	1,2999	0,1804	0,2118	0,1963	0,1355	0,2476	<LOD	0,2296
Flumechin	0,0035	0,0116	n. d.	n. d.	n. d.	1,8907	0,3749	n. d.	n. d.	n. d.
Fluoxetin	0,0048	0,0158	0,0545	0,0226	0,0366	1,4670	0,5900	0,8805	<LOD	0,0244
Flutamid	0,0008	0,0025	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	10P ng g ⁻¹	10K ng g ⁻¹	11K ng g ⁻¹	12P ng g ⁻¹	13P ng g ⁻¹	14P ng g ⁻¹	15P ng g ⁻¹	16K ng g ⁻¹
Furosemid	0,0015	0,0051	2,2281	0,0614	0,9630	0,0831	0,1984	0,9641	8,0611	0,4863
Gabapentin	0,0032	0,0108	1,1003	<LOD	0,1127	0,0343	0,0413	0,3990	0,3495	2,3362
Galantamin	0,0003	0,0009	0,0088	<LOD	n. d.	n. d.	n. d.	0,0068	0,0030	n. d.
Gemfibrozil	0,0047	0,0157	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Glimepirid	0,0002	0,0005	0,0154	0,0021	0,0025	0,0221	0,0119	0,0338	0,0311	0,0031
Hydrochlorothiazid	0,0003	0,0008	6,4995	0,4929	0,9534	1,8015	3,1796	3,6546	3,1713	1,1954
Chloramfenikol	0,0004	0,0014	0,0487	<LOD	0,0146	0,0092	0,0081	0,0548	n. d.	n. d.
Chlortetracyclin	0,0003	0,0009	0,4901	n. d.	0,0474	0,2034	0,4661	0,4795	n. d.	0,0693
Ibuprofen	0,0042	0,0140	2,5674	0,4990	0,5192	0,5572	n. d.	n. d.	1,9447	<LOD
Ifosfamid	0,0018	0,0061	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Indometacin	0,0002	0,0006	1,5167	0,2437	0,0228	0,0242	0,5907	0,4489	0,0235	0,0317
Iohexol	0,0001	0,0003	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Iomeprol	0,0016	0,0052	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Iopamidol	0,0001	0,0005	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Iopromid	0,0002	0,0008	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Irbesartan	0,0002	0,0006	0,4140	0,0911	0,0513	0,5627	0,9028	0,0842	0,0091	0,0048
Kapcitabin	0,0023	0,0075	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Karbamazepin	0,0002	0,0005	2,9221	0,4916	0,1384	0,6142	2,2501	1,1759	8,8323	1,0360
Ketoprofen	0,0002	0,0007	0,0370	<LOD	0,0198	n. d.	0,0050	0,0041	0,0152	0,0005
Klaritromycin	0,0001	0,0004	3,5281	2,3100	7,6453	12,2621	6,2689	7,5406	17,9887	0,5088
Klimbazol	0,0149	0,0496	0,4126	0,4492	0,1142	1,9836	0,7355	0,7706	0,2648	<LOD
Klindamycin	0,0047	0,0156	19,2159	31,9232	4,9492	65,9044	19,0896	32,4812	40,8732	2,3619
Klonazepam	0,0004	0,0013	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	<LOD

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	10P ng g ⁻¹	10K ng g ⁻¹	11K ng g ⁻¹	12P ng g ⁻¹	13P ng g ⁻¹	14P ng g ⁻¹	15P ng g ⁻¹	16K ng g ⁻¹
Kloxacin	0,0126	0,0418	n. d.	n. d.	n. d.	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.	n. d.
Kofein	0,0006	0,0021	2,5182	0,9826	0,3648	4,1848	9,8816	5,8953	2,4563	0,3415
Kolchicin	0,0011	0,0036	0,0044	0,0060	0,0047	0,0215	0,0629	<LOD	0,0064	<LOD
Kotinin	0,0002	0,0005	0,0405	0,0135	0,0099	0,0991	0,0362	0,0453	0,0459	0,0010
Kyselina klofibrová	0,2080	0,6932	0,0197	0,0065	0,0127	0,0432	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kyselina nalidixová	0,0031	0,0104	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0432	n. d.	n. d.	n. d.
Kyselina oxolinová	0,0002	0,0006	0,0048	0,0028	0,0029	0,1924	0,1930	0,6409	n. d.	0,0066
Kyselina salicylová	0,2074	0,6913	5,6451	<LOD	0,7576	<LOD	0,9929	1,2906	0,8529	<LOD
Kyselina valsartanová	0,0017	0,0055	5,0642	1,2909	1,6577	5,7976	2,4119	3,9285	4,3228	0,5579
Lamotrigin	0,0002	0,0006	1,4645	0,2894	0,7066	2,0728	3,2481	0,3285	6,8472	0,6931
Linkomycin	0,0005	0,0017	0,0462	n. d.	0,0135	<LOD	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Lomefloxacin	0,0050	0,0166	<LOD	<LOD	n. d.	n. d.	0,0255	n. d.	n. d.	<LOD
Loperamid	0,0004	0,0012	0,8608	0,4244	0,1362	2,0329	2,9422	0,9487	1,2262	0,0690
Losartan	0,0045	0,0148	0,8972	0,1997	0,1021	0,3385	0,2737	5,3107	1,0499	0,0293
Lovastatin	0,0043	0,0144	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Meloxicam	0,0002	0,0007	0,0055	<LOD	0,0027	0,0043	0,0084	0,0049	0,0033	n. d.
Memantin	0,0002	0,0008	0,0729	0,0199	0,0074	0,0331	0,2518	0,0918	0,0017	0,2110
Metacyklin	0,0001	0,0003	n. d.	n. d.	0,0596	2,4034	1,1682	n. d.	n. d.	n. d.
Metformin	0,0002	0,0007	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Metotrexát	0,0004	0,0014	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Metoprolol	0,0003	0,0009	6,3971	3,2829	1,3112	16,2276	3,0731	17,9845	2,9131	0,1880
Metronidazol	0,0010	0,0033	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0171
Mirtazapin	0,0003	0,0011	1,5594	0,6805	0,1079	3,1009	5,3420	1,6194	1,5952	0,5542

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	10P ng g ⁻¹	10K ng g ⁻¹	11K ng g ⁻¹	12P ng g ⁻¹	13P ng g ⁻¹	14P ng g ⁻¹	15P ng g ⁻¹	16K ng g ⁻¹
Mykofenolát mofetil	0,0006	0,0020	<LOD	<LOD	<LOD	0,0070	0,0088	<LOD	n. d.	n. d.
Naproxen	0,0001	0,0004	0,1421	0,3409	0,0209	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Nimesulid	0,0092	0,0306	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Norfloxacin	0,0004	0,0014	5,4343	1,5367	0,7759	19,2771	15,0705	9,0302	37,6144	17,8858
Norverapamil	0,0023	0,0077	18,5139	12,6673	1,8566	72,4565	30,8235	26,7557	11,0965	0,3673
O-Desmetylnaproxen	0,0039	0,0131	0,8111	0,1258	0,2751	0,2719	0,7439	0,8217	0,3383	n. d.
Ofloxacin	0,0023	0,0077	79,6814	28,4747	0,4079	5,3790	7,5631	48,6098	2,2224	0,1789
Omeprazol	0,0002	0,0006	0,0031	<LOD	<LOD	n. d.	<LOD	<LOD	<LOD	n. d.
Ormetoprim	0,0002	0,0007	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0035	0,0029	n. d.
Ornidazol	0,0002	0,0006	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Oxazepam	0,0001	0,0005	0,0664	0,0144	0,0111	0,1544	0,2423	0,1653	0,4390	0,2676
Oxkarbazepin	0,0003	0,0011	0,1661	0,0170	0,0360	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Oxypurinol	0,0002	0,0006	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Oxytetracyklin	0,0002	0,0006	0,1989	n. d.	0,1171	n. d.	2,1348	0,2060	0,1121	0,0038
Paklitaxel	0,0002	0,0006	0,0206	0,0070	<LOD	0,0536	0,1071	0,1241	2,3549	<LOD
Paracetamol	0,0002	0,0005	0,5351	0,1717	0,0078	0,0350	0,1723	0,2426	0,6190	n. d.
Paraxantin	0,0001	0,0004	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Piroxikam	0,0021	0,0070	n. d.	n. d.	n. d.	<LOD	0,0010	n. d.	n. d.	n. d.
Primidon	0,0011	0,0035	0,1256	0,0024	0,1077	n. d.	0,0913	n. d.	n. d.	0,0086
Propranolol	0,0003	0,0011	0,0914	0,0383	0,0079	1,5271	0,7292	0,0688	0,0040	n. d.
Ranitidin	0,0001	0,0004	0,0036	<LOD	0,0027	0,0023	0,0056	0,0012	<LOD	n. d.
Roxithromycin	0,0003	0,0008	0,0469	0,0908	0,0168	n. d.	0,7678	0,7943	n. d.	n. d.
Salbutamol	0,0002	0,0007	0,0075	<LOD	0,0013	0,0014	0,0021	<LOD	0,0044	n. d.

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	10P ng g ⁻¹	10K ng g ⁻¹	11K ng g ⁻¹	12P ng g ⁻¹	13P ng g ⁻¹	14P ng g ⁻¹	15P ng g ⁻¹	16K ng g ⁻¹
Sarafloxacin	0,0082	0,0274	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sertralin	0,0006	0,0019	45,0151	17,7329	4,3546	83,6181	127,3932	198,325	103,7972	14,6410
Simvastatin	0,0002	0,0005	0,0366	0,0172	0,0110	0,0190	0,0447	0,0089	0,0236	n. d.
Sotalol	0,0005	0,0018	0,0032	<LOD	<LOD	0,0033	0,0195	<LOD	n. d.	0,0267
Sulfadiazin	0,0011	0,0038	0,4335	0,0524	<LOD	0,0421	0,0996	0,3304	n. d.	0,0045
Sulfachlorpyridazin	0,0011	0,0037	0,0245	0,0057	<LOD	0,0075	0,0458	0,0252	0,0190	n. d.
Sulfamerazin	0,0011	0,0038	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfamethazin	0,0008	0,0026	0,0807	0,0089	n. d.	0,0569	0,0103	0,5284	0,0082	n. d.
Sulfamethizol	0,0007	0,0022	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfamethoxazol	0,0008	0,0026	0,0556	0,0146	0,0185	0,0430	0,1291	0,0650	0,2668	0,1030
Sulfamethoxypyridazin	0,0012	0,0040	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0033	<LOD	<LOD
Sulfamonomethoxin	0,0009	0,0031	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfanilamid	0,0026	0,0085	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Sulfapyridin	0,0009	0,0031	3,3489	0,2808	<LOD	0,5141	0,9539	2,0359	0,0175	0,0336
Sulfathiazol	0,0015	0,0051	0,0260	0,0085	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0,0167	n. d.
Telmisartan	0,0007	0,0022	86,5693	47,3719	12,6100	91,3191	94,3666	75,5761	n. d.	8,2833
Terbutalin	0,0008	0,0026	<LOD	<LOD	<LOD	n. d.	n. d.	<LOD	0,0032	<LOD
Tetracyklin	0,0020	0,0068	1,6440	n. d.	0,6919	23,8207	6,2293	1,5176	0,0544	<LOD
Thebain	0,0009	0,0029	0,3560	0,2102	0,0490	5,1875	1,5581	0,2733	0,1173	0,0534
Tiamulin	0,0007	0,0022	<LOD	n. d.	<LOD	0,1497	0,0043	<LOD	<LOD	n. d.
Tramadol	0,0004	0,0012	12,0182	4,4732	1,0706	6,6177	10,8507	13,8660	5,8792	9,1890
Triklokarban	0,0129	0,0429	<LOD	<LOD	<LOD	0,2851	0,1390	0,0717	<LOD	<LOD
Trimethoprim	0,0003	0,0011	0,1380	0,1469	0,0327	0,0728	0,0302	0,2592	1,3537	1,7514

Analyt	LOD ng ml ⁻¹	LOQ ng ml ⁻¹	10P ng g ⁻¹	10K ng g ⁻¹	11K ng g ⁻¹	12P ng g ⁻¹	13P ng g ⁻¹	14P ng g ⁻¹	15P ng g ⁻¹	16K ng g ⁻¹
Valsartan	0,0014	0,0046	1,7993	0,2184	0,2776	0,4333	0,5359	1,5240	1,6801	0,0458
Vankomycin	0,0430	0,1433	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Venlafaxin	0,0024	0,0081	3,2725	2,9926	1,6248	7,6322	10,4679	5,2346	0,4638	4,0544
Verapamil	0,0005	0,0018	5,4426	3,6869	0,6967	24,6062	10,5664	9,2330	4,3587	0,3248
Warfarin	0,0017	0,0056	0,0081	<LOD	<LOD	<LOD	0,0079	<LOD	<LOD	<LOD
Zolpidem	0,0002	0,0007	0,0558	0,0207	0,0084	0,4274	0,4002	0,2866	0,4033	0,1266