

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Monitorování znečištění vod veterinárními léčivy

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233148854

Praha 2009

Jiří Rulc

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitelky Doc. RNDr. Evy Tesařové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1.6. 2009

.....
Eva Jiráčková
podpis

Předmětová hesla

veterinární léčiva, výskyt ve vodách, dělení antibiotik, separační metody, imunochemické metody

Klíčová slova

antibiotika, hormony, znečištění povrchových vod, metody stanovení, HPLC

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za odborné vedení, trpělivost, s níž se mi věnovala a pomoc při zpracování této bakalářské práce.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	6
1. ÚVOD	8
2. VÝSKYT VETERINÁRNÍCH LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ	9
3. NEJČASTĚJI POUŽÍVANÁ VETERINÁRNÍ LÉČIVA	10
3.1 Antibiotika	10
3.1.1 Dělení antibiotik	10
3.1.1.1 Dělení podle mechanismu účinku	11
3.1.1.2 Dělení podle chemické struktury	11
3.1.2 Aminoglykosidová antibiotika	11
3.1.3 β – laktámová antibiotika	12
3.1.4 Makrolidová antibiotika	14
3.1.5 Peptidová antibiotika	15
3.1.6 Sulfonamidová antibiotika	16
3.1.7 Tetracyklinová antibiotika	17
3.1.8 Chinolonová antibiotika	18
3.1.9 Chloramfenikol	19
3.2 Hormony	21
3.2.1 Anabolické steroidy	21
3.2.2 Kortikosteroidy	22
3.2.3 Thyreostatika	22
3.3 Kokcidiostatika	23
3.4 Anthelmintika	24
4. METODY POUŽÍVANÉ K ANALÝZE VETERINÁRNÍCH LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ	25
4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	25
4.1.1 Stacionární a mobilní fáze	26
4.1.2 Instrumentace	27
4.2 Plynová chromatografie	28
4.3 Kapilární elektromigrační metody	28
4.4 Imunochemické metody	29

5. APLIKACE METOD POUŽÍVANÝCH K ANALÝZE	
VETERINÁRNÍCH LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ	30
5.1 Antibiotika	30
5.1.1 Aminoglykosidová antibiotika	30
5.1.2 β -laktámová antibiotika	31
5.1.3 Makrolidová antibiotika	32
5.1.4 Peptidová antibiotika	33
5.1.5 Sulfonamidová antibiotika	33
5.1.6 Tetracyklinová antibiotika	34
5.1.7 Chinolonová antibiotika	35
5.1.8 Chloramfenikol	35
5.2 Hormony	36
5.3 Kokcidiostatika a anthelmintika	38
6. ZÁVĚR	39
7. POUŽITÁ LITERATURA	40

SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
CE	kapilární elektroforéza
DAD.....	detektor s diodovým polem
DNA.....	deoxyribonukleový kyselina
EDTA.....	ethylendiamintetraoctová kyselina
EI.....	ionizace elektronem
ELISA	enzymoimunoanalýza
ESI	ionizace elektrosprejem
EU	Evropská unie
FLD	fluorescenční detektor
GC.....	plynová chromatografie
HLB	sorbent pro extrakci tuhou fází (Hydrophilic-Lipophilic-Balanced)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC – MS – MS.....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LC	kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MeOH	methanol
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
PABA	kyselina <i>p</i> -aminobenzoová
PBP	protein vázající penicilín (penicillin-binding proteins)
PED.....	pulsní elektrochemická detekce
PTFE	polytetrafluorethylen
RIA.....	radioimunoanalýza

RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
SEC	vylučovací chromatografie na základě velikosti
SPE.....	extrakce pevnou fází
SPME	mikroextrakce pevnou fází
TLC	tenkovrstevná kapalinová chromatografie
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UV.....	ultrafialová oblast

1. ÚVOD

Znečištění vod polutanty jakéhokoliv druhu je velmi obezřetně sledováno, neboť jakákoliv změna koncentrace určitého polutantu by mohla mít nedozírné následky na celkový ekosystém. Do vod se dostávají polutanty různými cestami z různých odvětví lidské činnosti. V současné době velmi zásadní postavení v znečištění vod mají léčiva a jejich metabolity. Obzvláště veterinární medicína, která hojně využívá značné množství léčiv, je významným zdrojem znečištění vod.

Veterinární medicína využívá především antibiotika, která tvoří hlavní složku léčebných preparátů. Dále je poměrně rozšířené používání hormonů, kokcidiostatik a anthelmintik. Díky nadmernému používání těchto látek se jejich residua vyskytují v živočišných produktech, a také v životním prostředí, kam se dostávají z exkrementů živočichů.

Některé studie prokazují negativní vlivy na živé organismy, jako jsou hormonální změny u vodních živočichů či rezistence bakterií. Přítomnost veterinárních léčiv ve vodě představuje zatím neznámé zdravotní riziko pro živé organismy, neboť dochází k celoživotní chronické expozici těmto látkám. Z tohoto důvodu je velmi nutné sledovat koncentraci veterinárních léčiv jak v životním prostředí, tak také v biologických vzorcích. Tato fakta poukazují na nutnost vývoje nových analytických metod s vhodnou detekcí pro tyto látky v životním prostředí.

Cílem této práce je podat stručný přehled o základních typech veterinárních léčiv, jejich účincích a metodách stanovení.

2. VÝSKYT VETERINÁRNÍCH LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Použití veterinárních léčiv se za poslední léta velmi zvýšilo. V roce 1950 byla produkce 91 tun léčiv ročně a v roce 1999 to bylo už 10000 tun léčiv ročně. Většina veterinárních léčiv se používá k léčbě různých nemocí nebo k prevenci těchto nemocí. Některá léčiva (hlavně hormonální látky, ale také antibiotika) jsou však používána také pro podporu růstu zvířat (ekonomické důvody). Používání léčiv pro podporu růstu bylo postupně redukováno, v Evropské unii je nyní úplně zakázáno¹.

Veterinární léčiva jsou přidávána do krmných směsí pro zvířata nebo jsou aplikována jinou formou (např. injekčně). Biotransformace léčiv není nikterak rozsáhlá, převážně dochází ke konjugačním reakcím s kyselinou glukuronovou nebo sulfátem, tyto konjugáty jsou následně vylučovány. Mrva, obsahující veterinární léčiva, se používá k hnojení zemědělských půd, čímž může dojít ke kontaminaci povrchových vod, odkud se mohou dostat léčiva i do podzemních vod¹.

Některá humánní léčiva mají stejné účinné složky jako veterinární léčiva a biotransformace je velmi podobná. Residua humánních léčiv se s exkrementy dostávají do odpadního systému a následně do čistíren odpadních vod. Vzhledem k tomu, že čistírny odpadních vod nejsou v současné době schopny odstranit velké množství léčiv obsažených v odpadních vodách, dochází k vypouštění těchto látek do povrchových vod². Výskyt residuů léčiv byl v některých zemích potvrzen v koncentracích řádově desítek ng/l.

3. NEJČASTĚJI POUŽÍVANÁ VETERINÁRNÍ LÉČIVA

3.1 Antibiotika

Antibiotika představují jednu z nejdůležitějších skupin farmak používaných ve veterinární medicíně. Jedná se o látky, které inhibují růst mikroorganismů, tj. navozují bakteriostázu, nebo je usmrcují, tj. působí baktericidně³. V současnosti je známo přes 6000 látek s antibiotickým účinkem, ale jen asi 70 z nich našlo uplatnění v humánní a veterinární medicíně, ostatní mají příliš výrazné nežádoucí účinky nebo jsou pro pacienta toxicke. Princip účinku terapeuticky vhodných antibiotik je selektivní ovlivnění specifických pochodů v mikroorganismech bez výraznějšího vlivu na „hostitelský“ makroorganismus. První generace antibiotik byly sekundární metabolity mikroorganismů (plísni, bakterií), v současnosti se řada antibiotik připravuje uměle (různé syntetické nebo semisyntetické postupy)⁴.

3.1.1 Dělení antibiotik

Antibiotika se liší svou strukturou a svými fyzikálně-chemickými a farmakologickými vlastnostmi do té míry, že je prakticky velmi obtížné vytvořit jednoduchou, a při tom všeobecně vyhovující klasifikaci antibiotik.

Klasifikace antibiotik výhradně podle chemické struktury umožňuje charakterizovat společné vlastnosti (např. farmakokinetické a farmakodynamické účinky, obdobný výskyt žádoucích a nežádoucích účinků). Neposkytuje však dostatečnou představu o antimikrobiální účinnosti, což zase přináší spíše klasifikace antibiotik podle antimikrobiálního spektra, která je proto výhodnější pro klinické použití antibiotik.

S rozvojem poznatků o molekulárních mechanismech účinků antibiotik a vzniku bakteriální rezistence na účinky antibiotik vznikla klasifikace podle chemické struktury a předpokládaného mechanismu účinku. Tato klasifikace je východiskem i pro zvažování racionálních klinických postupů v antimikrobiální léčbě, zejména v případech kombinované léčby a smíšených infekci⁴.

3.1.1.1 Dělení podle mechanismu účinku

Na základě mechanismu účinku dělíme antibiotika do následujících podskupin⁵:

- 1, antibiotika způsobující inhibici syntézy bakteriální buněčné stěny (β -laktamová antibiotika, glykopeptidová antibiotika, bacitracin)
- 2, antibiotika způsobující porušení buněčné cytoplazmatické membrány (polyenová antibiotika, imidazoly)
- 3, antibiotika způsobující inhibici syntézy bílkovin (tetracykliny, aminoglykosidy, chloramfenicol, makrolidy, linkosaminy, mupirocin)
- 4, antibiotika způsobující inhibici nukleových kyselin (chinolonová antibiotika, rifampicin)
- 5, antibiotika způsobující inhibici metabolismu bakteriální buňky (sulfonamidy)

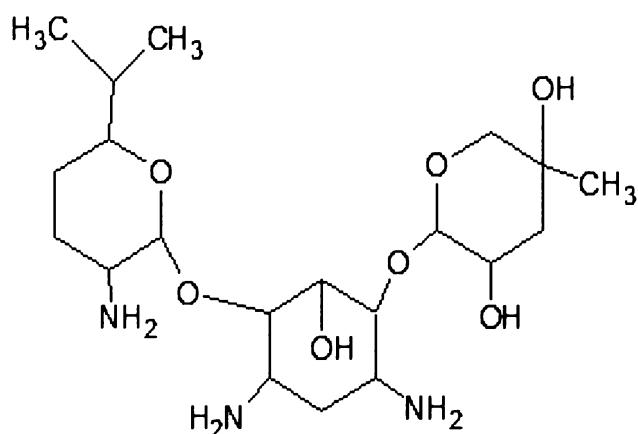
3.1.1.2 Dělení podle chemické struktury

Podle chemické struktury se dělí antibiotika na mnoho podskupin: makrolidy, tetracykliny, cefalosporiny, sulfonamidy, chloramfenikol, peniciliny a mnoho dalších³.

3.1.2 Aminoglykosidová antibiotika

Aminoglykosidová antibiotika patří mezi nejstarší a poměrně široce užívaná antibiotika. K jejím kladům patří mimořádně rychlý baktericidní účinek vůči většině gramnegativních mikrobů, naopak k záporům patří jejich nefrotoxicita a ototoxicita⁶.

Chemicky je základem aminoglykosidů hexosové jádro, na němž jsou glykosidickými vazbami připojeny aminocukry. Aminoglykosidy jsou hydrofilní látky, které špatně pronikají biologickými membránami⁶. Mezi základní aminoglykosidová antibiotika patří gentamicin, linkomycin, neomycin a streptomycin. Struktura gentamicinu je ukázána na obr. 1.



Obr. 1 Struktura gentamicinu

Mechanismus účinku aminoglykosidů spočívá v inhibici syntézy bílkovin, která vzniká zásahem na různých místech ribosomu. Aminoglykosidy se irreverzibilně vážou na receptor umístěný na 30S podjednotce a blokují vazbu na aminoacyl-tRNA na akceptorové místo na komplexu mRNA s ribosomem. Mechanismus účinku aminoglykosidů je však podstatně složitější a není zcela objasněn².

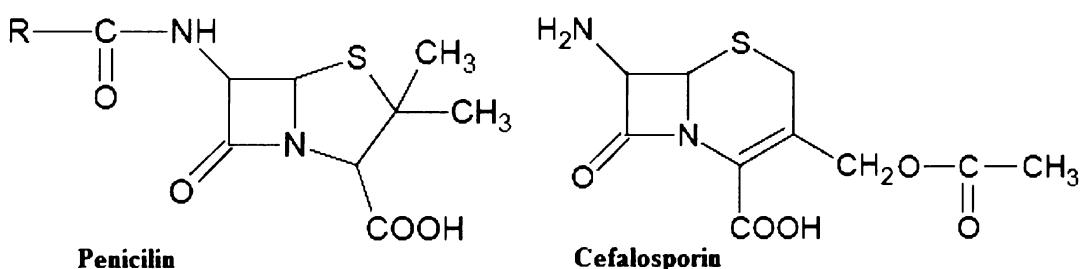
3.1.3 β -laktamová antibiotika

β -laktamová antibiotika jsou nejvíce rozšířenou skupinou antibiotik používaných ve veterinární medicíně k léčbě bakteriální infekce u dobytka. β -laktamová antibiotika rozdělujeme do dvou základních skupin: peniciliny a cefalosporiny. Užší rozdělení β -laktamových antibiotik uvádí tab. 1¹.

Tab. 1 Rozdělení β -laktamových antibiotik

Skupina	Podskupina	Významné analogy
peniciliny	benzylpeniciliny fenoxyopeniciliny aminobenzylpeniciliny acylaminopeniciliny karboxyopeniciliny izoxazolylpeniciliny amidopeniciliny	sodná sůl penicilinu G, klemizol penicilin V, propicilin ampicilin, amoxicilin, bakampicilin azlocilin, piperacilin, apalcilin karbenicilin, tikarcilin, temocilin oxacilin, kloxacilin, flukloxacilin mecilinam
cefalosporiny	cefazolin cefuroxim cefoxitin cefotaxim ceftazidim cefalexin cefixim	cefazolin, cefazedon cefuroxim, cefamandol, cefotiam cefoxitin, cefotetan, cefmetazol cefotaxim, ceftizoxim, cefodizim ceftazidim, cefpirom, cefepim cefalexin, cefaklor, cefadroxil cefixim, cefdinir, ceftibuten
karbapenemy	-----	imipenem, meropenem, biapenem
monobaktamy	-----	aztreonam
inhibitory β -laktamas	-----	kyselina klavulanová, sulbaktam

β -laktamová antibiotika mají ve své molekule čtyřčlenný „ β -laktamový“ kruh, který je společně s karboxylovou skupinou klíčovou strukturou zodpovědnou za biologickou aktivitu těchto látek. Struktura postranního řetězce ovlivňuje stabilitu vůči enzymovému štěpení, stálost vůči fyzikálně-chemickým vlastnostem prostředí a antimikrobní aktivitu vůči různým skupinám mikroorganismů³. Peniciliny mají pětičlenný thiazolidinový kruh. Cefalosporiny mají šestičlenný dihydrothiazinový kruh. Strukturu penicilinu a cefalosporinu je na obr. 2.



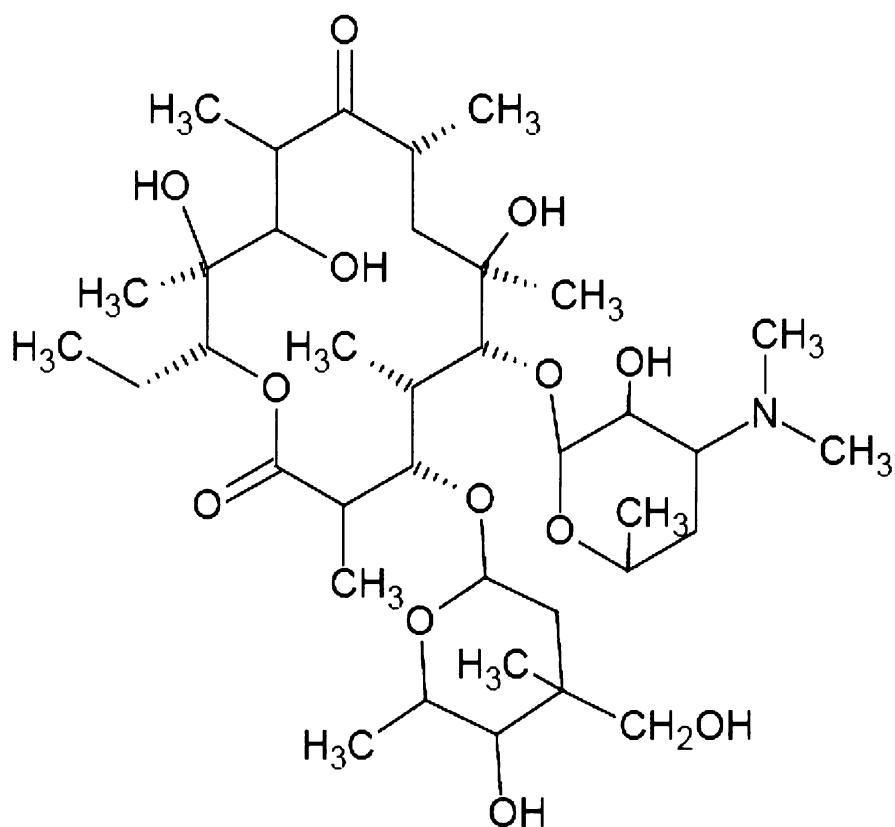
Obr. 2 Struktura základních β -laktamů

Mechanismus účinku β -laktamových antibiotik zahrnuje řadu kroků vedoucích k inhibici syntézy buněčné stěny. Jedná se o vazbu na enzymy PBP (penicillin-binding proteins), které představují buněčné receptory. Tyto receptory mají různou afinitou k antibiotikům a každý může zprostředkovávat odlišný způsob účinku. β -laktamová antibiotika acylují PBP, a tím je inaktivují. Inhibice syntézy bakteriální stěny je vyvolána blokádou transpeptidačních reakcí, a tak zábranou zpevnění peptidoglykanu ve stěně příčnými vazbami. Stěna bakteriálních buněk obsahuje i další enzymy, které řízeně katalyticky obměňují peptidoglykan a které β -laktamová antibiotika aktivují, a tím způsobují lýzu a smrt bakteriální buňky⁴.

3.1.4 Makrolidová antibiotika

Makrolidová antibiotika jsou velmi důležitou třídou antibiotik široce používaných ve veterinární praxi k léčbě respiračních onemocnění nebo jako aditiva krmiv ke zvýšení růstu chovného dobytka. Antimikrobní spektrum makrolidů zahrnuje grampozitivní i gramnegativní bakterie a intracelulární patogeny⁸.

Makrolidy jsou charakterizovány polyfunkčním makrocyclickým laktonovým kruhem (obsahujícím obvykle 14 až 16 atomů), ke kterému jsou připojeny cukry⁹. K nejznámějším patří erythromycin, semisyntetické analogy erythromycinu jsou roxithromycin a clarithromycin. Strukturu erythromycinu ukazuje obr. 3.



Obr. 3 Struktura erythromycinu

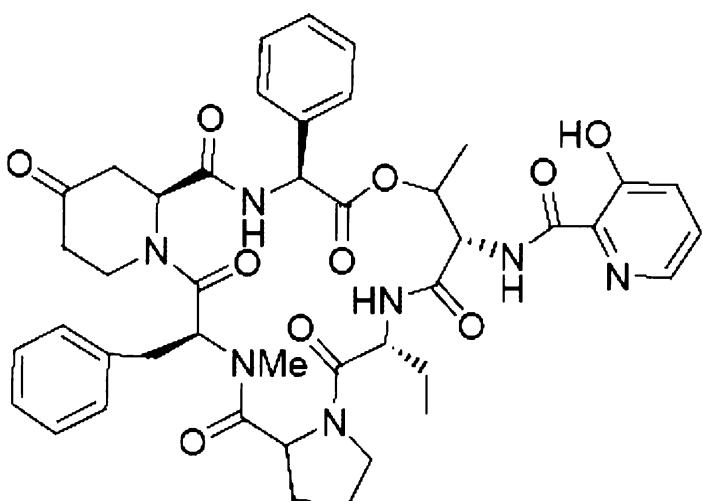
Mechanismus účinku makrolidových antibiotik spočívá v inhibici syntézy bílkovin. Makrolidy se váží irreverzibilně na receptor umístěný na 50S podjednotce ribosomu blízko receptorového místa pro chloramfenicol⁴.

3.1.5 Peptidová antibiotika

Hlavní peptidová antibiotika používaná ve veterinární medicíně jsou avoparcin, bacitracin a virginiamycin. Tato peptidová antibiotika se používají jako přísady do krmných směsí na jejich vylepšení. Prakticky veškerá peptidová antibiotika bývají poměrně rezistentní vůči působení proteolytických enzymů, tato skutečnost je obvykle důsledkem přítomnosti nepřirozených strukturních elementů (D-aminokyseliny)⁸.

Jedná se výhradně o nízkomolekulární oligopeptidy, jejichž relativní molekulová

hmotnost nepřesahuje hodnotu 1500. Peptidová antibiotika často obsahují aminokyseliny, které se obvykle v živočišných a rostlinných proteinech nevyskytují. Součástí molekuly těchto antibiotik bývají strukturní jednotky, které nejsou aminokyselinami. Na obrázku 4 je uvedena struktura virginiamycinu⁹.



Obr. 4 Struktura virginiamycinu

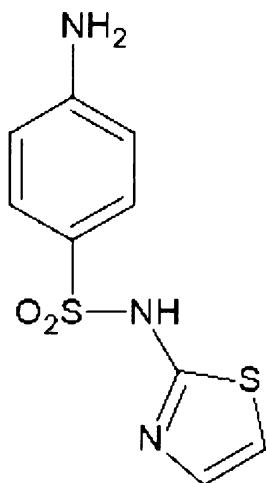
Mechanismus baktericidního účinku spočívá v inhibici syntézy bakteriální buněčné stěny, kdy inhibuje defosforylací undecaprenylfosfátu, který přenáší již hotový stavební blok do peptidoglykanové vrstvy bakteriální stěny⁵.

3.1.6 Sulfonamidová antibiotika

Tato původně široká skupina látek se v průběhu desítek let používání postupně zužovala tak, jak přicházela nová, účinnější a bezpečnější antibiotika. Nyní slouží jako veterinární léčivá k terapeutickým účelům (léčba močových infekcí), a samozřejmě se také používají k podpoře růstu⁵.

Strukturně jsou sulfonamidy velmi podobné kyselině *p*-aminobenzoové⁹. Převážnou většinu v současnosti využívaných sulfonamidů tvoří *N*-substituované deriváty. Na obr.

5 můžeme vidět strukturu sulfothiazolu.



Obr. 5 Struktura sulfothiazolu

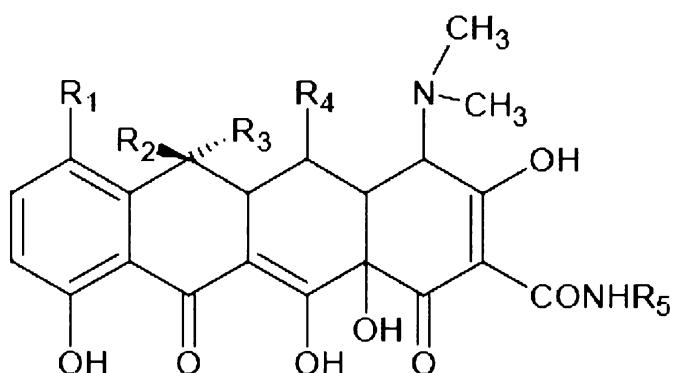
Mechanismus účinku sulfonamidů spočívá v kompetitivní inhibici metabolismu bakteriální buňky. Sulfonamidy jsou strukturálními analogy extracelulární kyseliny *p*-aminobenzoové (PABA), s níž soutěží o enzym dihydropteroátsyntetázu. Tímto způsobem sulfonamidy brání syntéze bakteriálního růstového faktoru kyseliny listové, protože se vytvářejí nefunkční analogy kyseliny listové. Jde však o kompetitivní antagonismus, takže přebytkem PABA může být sulfonamid vytěsněn a jeho bakteriostatický účinek zrušen. Sulfonamidy jsou proto účinné pouze na bakterie, které musí syntetizovat svoji kyselinu listovou³.

3.1.7 Tetracykliny

Jedná se o antibiotikum, které má široké antimikrobiální spektrum zahrnující grampozitivní i gramnegativní bakterie, mykoplazmata, chlamydie a spirochety. Mezi nejvýznamnější tetracyklinová antibiotika patří tetracyklin, oxytetracyklin, chlortetracyklin a doxycyklin.

Základem struktury tetracyklinů je částečně hydrogenovaný tetracen. Hydroxylové skupiny tetracyklinů jsou třech druhů: hydroxylové, alkoholické a enolické. Na obrázku

6 vidíme strukturu tetracyklinů (jednotlivé R představují různé substituenty).



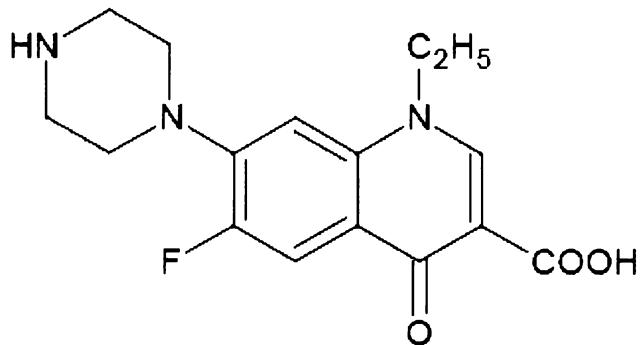
Obr. 6 Obecná struktura tetracyklinových antibiotik

Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy bílkovin⁵: tetracykliny se vážou reverzibilně na receptor umístěný na 30S podjednotce ribosomu a blokují vazbu aminoacyl-tRNA na akceptorové místo komplexu mRNA s ribosomem.

3.1.8 Chinolonová antibiotika

Chinolonová chemoterapeutika tvoří v současnosti malá skupina nefluorovaných chinolonů, která ustupuje podstatně větší skupině novějších fluorochinolonů. Chinolony jsou širokospektrální antibiotika využívaná k léčbě dobytka (respirační problémy, infekce různých tkání). Celkem se rozlišují čtyři generace chinolonu, mezi nejběžněji používané chinolony patří patří ciprofloxacin (třetí generace), dále sparfloxacin atd⁸.

Struktura chinolonů je velmi rozmanitá, již malá změna ve struktuře může velmi pozměnit jejich účinek. Chinolony se liší počtem heterocyklů, druhy bočních řetězců atd. Na obrázku 7 je pro názornost uveden norfloxacin⁹.



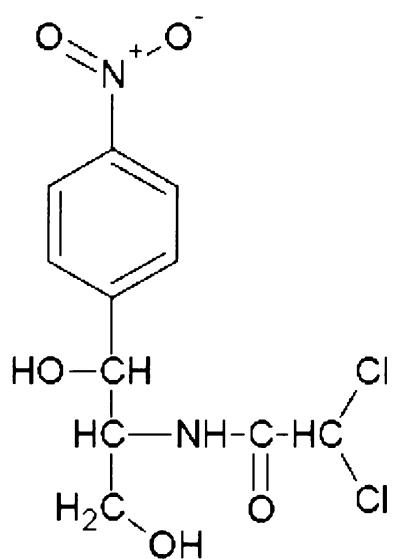
Obr. 7 Struktura norfloxacinu

Mechanismus účinku celé skupiny spočívá v inhibici syntézy nukleových kyselin⁵: chinolonová antibiotika jsou inhibitory dvou topoisomeras (DNA-gyrasy a topoisomerasy IV). Gyrasa je bakteriální enzym odpovědný za správné zřetězení a rozvolnění superhelikální DNA během replikace. Výsledný antimikrobiální účinek je baktericidní.

3.1.9 Chloramfenikol

Chloramfenikol byl desítky let široce používané antibiotikum, jehož použití bylo v 70. letech výrazně omezeno zjištěním, že hráje roli ve vzniku na dávce nezávislé aplastické anémie⁸. Určitá inovace přinesla možnost použití chloramfenikolu u těžkých anaerobních infekcí a těžkých infekcí vyvolaných kmeny *Haemophilus influenzae* rezistentními k ampicilinu. Chloramfenikol je širokospektré bakteriostatické antibiotikum.

Chloramfenikol je oproti ostatním antibiotikům relativně jednoduchá molekula skládající se z disubstitovaného benzenového jádra. Strukturu chloramfenikolu ukazuje obrázek 8.



Obr. 8 Struktura chloramfenikolu

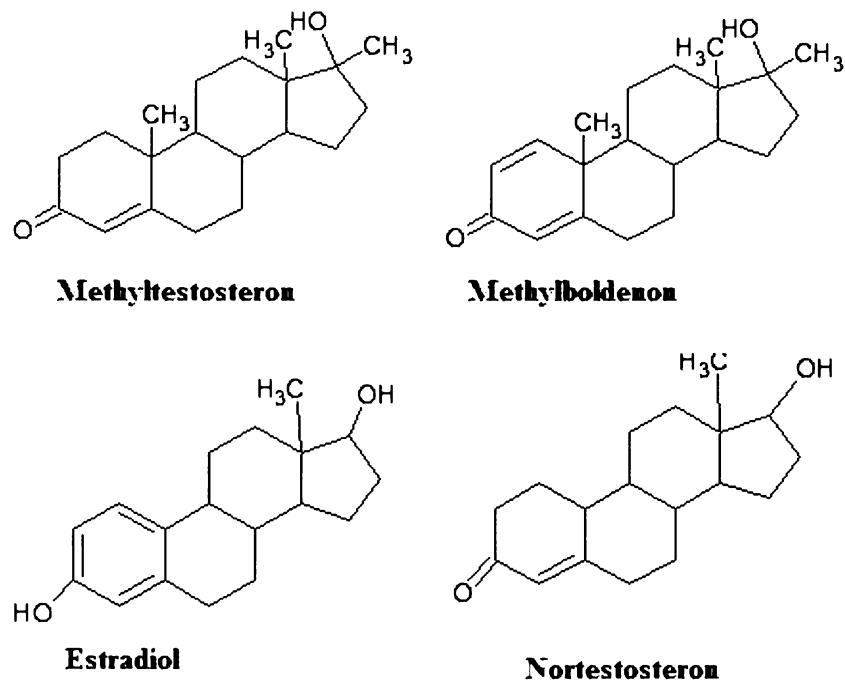
Účinek chloramfenikolu spočívá v inhibici syntézy proteinů vazbou na 50S ribosomální podjednotku. Antimikrobiální účinek zahrnuje většinu aerobních grampozitivních i gramnegativních bakterií⁵.

3.2 Hormony

Hormony jsou předepisovány ve veterinární medicíně k navýšení rychlosti růstu zvířat. Mohou být přidávány jako aditiva do krmiv, ale mnohem častěji jsou implantovány do zvířecích uší, kde může být aktivní látka vypouštěna do krevního řečiště v pulzech a po dlouhou dobu. V Evropské unii jsou hormonální látky podávané za účelem zvýšení rychlosti růstu zakázány, proto jsou jejich koncentrace bedlivě sledovány. Mezi hlavní hormonální látky používané ve veterinární medicíně patří: anabolické steroidy, kortikosteroidy, thyreostatika⁸.

3.2.1 Anabolické steroidy

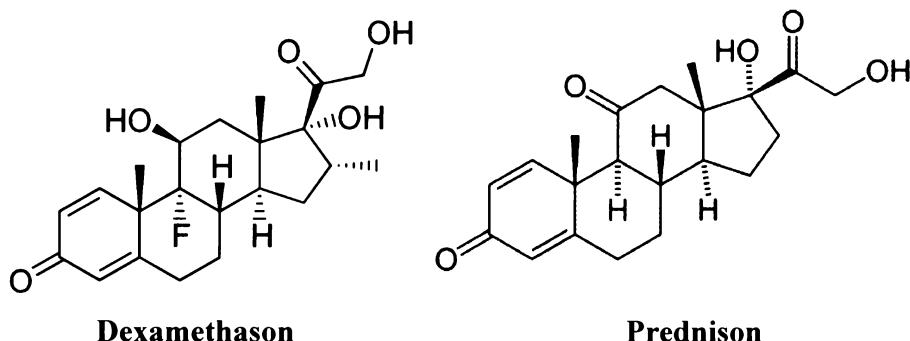
Ačkoliv monitorování anabolických steroidů u prasat a krav odhalila jen ojedinělé případy použití v EU, analýza ilegálních přípravků ukazuje, že anabolické steroidy jsou stále používány. Anabolické steroidy jsou produkované pro terapeutické účely a odtud se dostávají na černý trh². Mezi používané anabolické steroidy patří tři androgenní látky (methyltestosteron, methylboldenon, nortestosteron) a jeden estrogen (estradiol). Struktury anabolických steroidů jsou uvedeny na obrázku 9.



Obr.9 Struktury steroidních hormonů

3.2.2 Kortikosteroidy

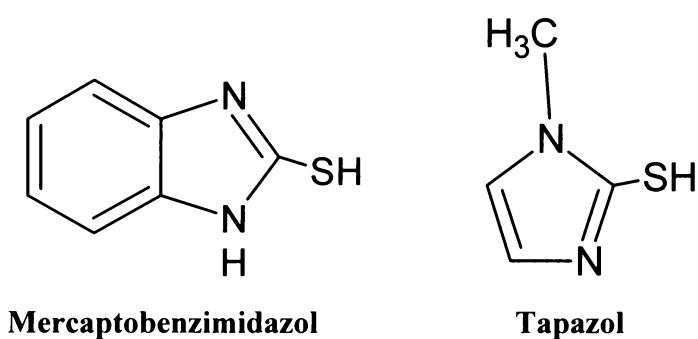
Kortikosteroidy jsou protizánětlivá léčiva, jedná se o látky syntetizované z cholesterolu, vznikající v buňkách kůry nadledvin¹. Na obrázku 10 můžeme vidět struktury některých kortikosteroidů.



Obr. 10 Struktury vybraných kortikosteroidů

3.2.3 Thyreostatika

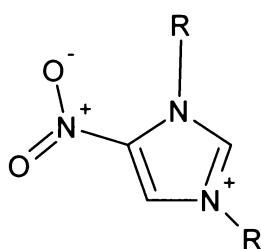
Thyreostatika jsou komplexní skupina látek, které dokáží inhibovat thyroidální funkci a redukovat oběh hormonů štítné žlázy⁸. Váhový přírůstek zvířat vzniklý používáním thyreostatik souvisí se zvýšenou schopností plnit gastrointestinální trakt a se zvýšenou schopností zadržovat vodu. Na obrázku 11 jsou struktury některých thyreostatik.



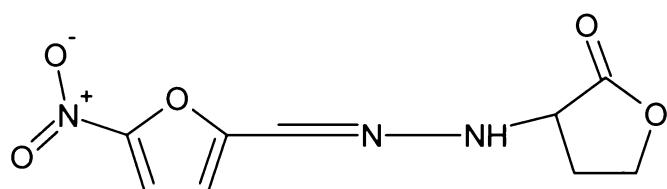
Obr. 11 Struktury vybraných thyreostatik

3.3 Kokcidiostatika

Kokcidiostatika jsou široce používané léky k prevenci a léčbě kokcidiosy. V mnoha zemích Evropské unie jsou kokcidiostatika povoleny jako přídavky do krmiv, které se podávají v předepsané koncentraci a po předepsanou dobu mladým kuřatům. Po aplikaci těchto léčiv musí zemědělci čekat předepsanou dobu než mohou být kuřata usmrčena a zpracována. Pokud je daná doba dodržena, nejsou v žádném produktu nalezena residua kokcidiostatik. Vzhledem k používání jiných preparátů, která obsahují rovněž nějaká kokcidiostatika, se vyskytují často residua těchto preparátů v kuřecích produktech^{8,10}. Mezi kokcidiostatika řadíme nitroimidazoly a nitrofurany. Struktura nitroimidazolů je uvedena na obrázku 12 a zástupce nitrofuranů na obrázku 13.



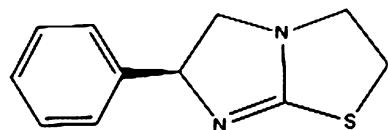
Obr. 12 Struktura nitroimidazolu



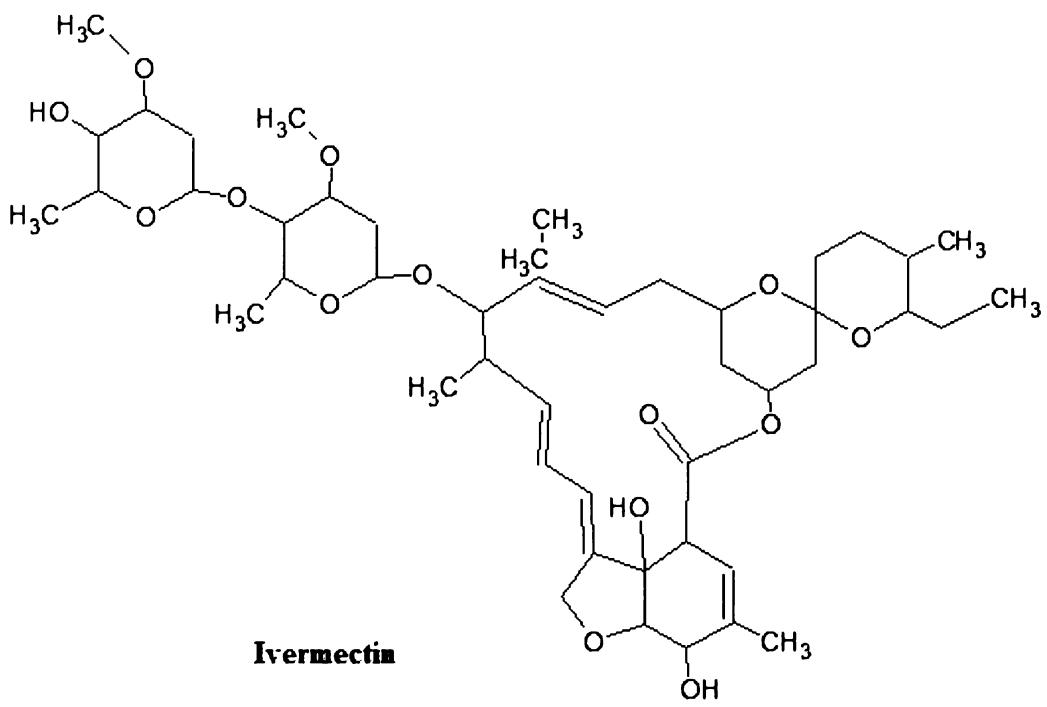
Obr. 13 Struktura furazolidonu

3.4 Anthelmintika

Anthelmintika jsou veterinární léčiva, která se používají proti parazitickým helmitům (červům)⁸. Nejčastěji používané anthelmintické látky jsou levamisol, řada látek odvozených od benzimidazolu a ivermectin. Struktury základních anthelmintik můžeme vidět na obrázku 14.



Levamisole



Obr. 14 Struktura základních anthelmintik

4. METODY POUŽÍVANÉ K ANALÝZE VETERINÁRNÍCH LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ

K analýze veterinárních léčiv a jejich metabolitů přítomných v životním prostředí se využívají hlavně chromatografické metody, a to v největší míře vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (proto je popsána podrobněji) a následně plynová chromatografie (GC). Další možnost pro analýzu léčiv představují kapilární elektromigrační metody. V poslední době se začaly využívat i imunochemické metody.

4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se vyvinula z chromatografie plynové na začátku 70. let minulého století¹¹.

Prostřednictvím HPLC lze analyzovat širokou škálu vzorků: ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Touto metodou můžeme rozdělit až 80 % všech známých látek. Separace daného analytu se dá velice dobře ovlivňovat změnami stacionární nebo mobilní fáze. Nejběžněji používanou technikou chromatografie je eluční technika, kdy látky, které mají být rozděleny, jsou nadávkovány na kolonu a poté unášeny kontinuálně protékající mobilní fází a postupně eluovány z kolony.

Princip metody je separační proces, při kterém se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, mezi pohyblivou mobilní a nepohyblivou stacionární fází, na základě fyzikálně-chemických interakcí, jako je adsorpce, rozpouštění, iontová výměna apod. Jednotlivé složky, přítomné v mobilní fázi, se pohybují podél stacionární fáze různou rychlostí, protože jsou interakcí se stacionární fází zpomalovány v závislosti na hodnotách příslušných distribučních konstant. Látky, které interagují silněji se stacionární fází, se pohybují pomaleji než látky, jejichž interakce jsou slabší. Pokud je dráha, kterou směs urazí, dostatečně dlouhá a distribuční konstanty dostatečně rozdílné, rozdělí se směs na jednotlivé zóny. Vysokých účinností tohoto typu chromatografie se dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, které homogenně vyplňují kolonu. Takto je dosaženo účinnosti řádově několik desítek tisíc pater na metr kolony¹¹.

4.1.1 Stacionární a mobilní fáze

U náplňových kolon je pro separaci důležitá velikost a uspořádání částic stacionární fáze. Jako stacionární fáze se používají adsorbenty, chemicky vázané fáze, měniče iontů atd. Nejběžnější jsou stacionární fáze na bázi silikagelu, který je chemicky modifikován navázáním vhodných funkčních skupin. Typ funkční skupiny navázaný na povrchu silikagelu určuje výslednou polaritu stacionární fáze. V HPLC jsou běžně používány hydrofobní stacionární fáze s navázanými uhlovodíkovými řetězci; stacionární fáze jsou rozlišovány podle délky uhlovodíkových řetězců (oktyl, oktadecyl atd.). Čím menšími částicemi je kolona naplněna, tím je účinnost separace větší. Běžně se používají částice velikosti 5 až 10 μm , dostupné jsou i náplně s částicemi o velikosti 2 μm i menšími. Čím menší velikost částic, tím vyšší je však zpětný tlak v koloně¹².

V poslední době byly vyvinuty monolitické kolony, které jsou vyplňeny polymerem o definované pórovitosti. Tyto kolony mají velkou mechanickou stabilitu a odolnost vůči změnám pH a zaručují vysokou účinnost separace i při vysokých průtocích mobilní fáze.

Nejběžněji používané náplňové kolony mají délku 5 – 25 cm, vnitřní průměr několik milimetrů (3,4 až 4,6 mm), objem nadávkovaného vzorku bývá v rozsahu 1 – 20 μl a průtok mobilní fáze se pohybuje v rozmezí 0,5 – 1,5 ml/min.

Mobilní fáze se v kapalinové chromatografii výrazně podílí na separačním procesu. Složení mobilní fáze se dá ovlivnit změnou typu rozpouštědla, typem pufru, hodnotou pH, iontové síly, přídavkem iontově-párových činidel apod. Mobilní fáze je charakterizována zejména polaritou (schopnost rozpouštědla podilet se na polárních interakcích) a selektivitou, v detektoru by měla dávat minimální signál, mít nízkou viskozitu, stlačitelnost, být málo toxická a nereagovat s analyty¹³.

Podle vzájemného vztahu stacionární a mobilní fáze rozlišujeme v HPLC dva druhy separačních módů:

- chromatografie s normálními fázemi (NP-HPLC) - stacionární fáze je polární a mobilní fáze je nepolární (nejčastěji pentan, heptan, chloroform, propan-2-ol a jejich směsi)
- chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC) - stacionární fáze je nepolární, mobilní fáze je polární¹² (nejčastěji methanol, acetonitril, tetrahydrofuran, voda (pufry) a jejich směsi)

4.1.2 Instrumentace

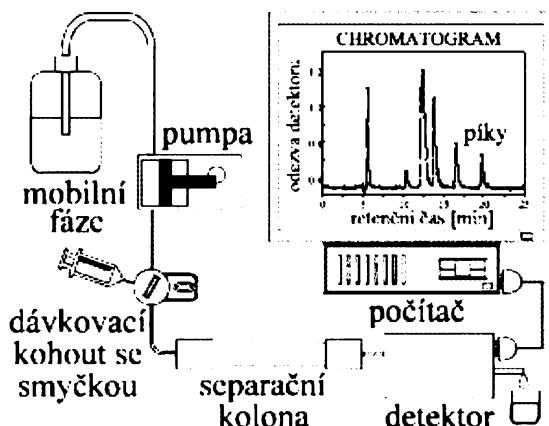
Schéma kapalinového chromatografu je na obr. 15. Skládá se z rezervoáru mobilní fáze, pumpy, dávkovacího kohoutu se smyčkou, separační kolony, detektoru a počítače.

Materiály, které se používají v HPLC, musí být mechanicky a chemicky odolné a povrchově neaktivní, aby nepřispívaly k rozmývání elučních křivek analytů. Proto se nejčastěji používá nerezová ocel, sklo nebo některé plasty.

Na detektory v HPLC jsou kladený vysoké nároky. Detektor by měl co nejméně přispívat k rozmytí elučních křivek, signál detektoru by měl být stabilní, reprodukovatelný, lineárně závislý na koncentraci v co nejširším rozsahu a dostatečně citlivý¹³.

Mezi nejběžnější detektory používané v HPLC patří:

- spektrofotometrický - nejpoužívanější z detektorů zejména pro svoji jednoduchost, univerzálnost a dostatečně široký lineární dynamický rozsah
- fluorimetrický - selektivní a citlivý detektor pro látky schopné fluorescence (jinak nutno analyt derivativizovat)
- refraktometrický - méně citlivý a selektivní detektor, založený na měření indexu lomu
- elektrochemické - selektivní detekce, měří se vodivost nebo elektrický proud odpovídající oxidaci nebo redukcí analytů
- hmotnostní (MS) - univerzální, vysoce selektivní a citlivý detektor, umožňuje identifikaci analytů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje



Obr. 15 Schéma kapalinového chromatografu – převzato z citace¹⁴

4.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie nese své označení podle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn. Využívá rozdělení koncentrace analytu mezi stacionární a mobilní fázi na základě adsorpce a rozpouštění, přičemž se předpokládá, že toto rozdělení je rovnovážné. Jako zdroje pohybu mobilní fáze využívá tlakový spád.

V plynové chromatografii je známo několik set různých stacionárních fází. Jejich variabilita je nejen v chemickém složení, ale v jejich makromolekulárních vlastnostech, způsobu deaktivace povrchu kolon, způsobu zakotvení na nosiči, způsobu vpravení do kolon atd. Obecně jsou stacionární fáze dvojího typu, a to pro adsorpční mechanismus a rozpouštěcí mechanismus retence. Stacionární fáze pro adsorpční mechanismus retence jsou založeny na bázi grafitizovaného uhlí, uhlíkových molekulových sítí, zeolitových uhlíkových sítí, polymerů a silikagelu. Stacionární fáze pro rozpouštěcí mechanismus retence jsou založeny na bázi polymeru poly(di-methyl-siloxanu) (nepolární fáze), nebo polymeru poly(ethylen-glykolu) (polární fáze)¹¹.

Jako analytická metoda využívá výše popsaný chromatografický děj ke kvalitativnímu a kvantitativnímu určení analytu.

4.3 Kapilární elektromigrační metody

Kapilární elektromigrační separační metody jsou moderní separační techniky založené na elektroforetické migraci iontů v elektrickém poli. Vlastní separace se provádí v kapilárách o vnitřním průměru několika desítek mikrometrů, zhotovených zpravidla z taveného křemene nebo z jiného materiálu, např. PTFE. Kapilární elektromigrační metody vynikají především malou spotřebou vzorku a činidel potřebných pro separaci, velkou účinností separace, velkou rychlostí analýzy a celkem snadnou optimalizací separačních podmínek. Menší opakovatelnost, reprodukovatelnost a trochu nižší citlivost naproti tomu patří k hlavním nevýhodám těchto separačních technik¹¹.

4.4 Imunochemické metody

V poslední době se pro identifikaci a kvantifikaci stále častěji využívají i imunochemické metody. Je to dáné především některými jejich přednostmi jako je vysoká citlivost, jednoduchá použitelnost a s tím spojená i možnost automatizace, relativně krátká doba potřebná k analýze a v neposlední řadě i cenová dostupnost. V oblasti zdravotnictví jsou tyto metody již velmi rozšířené a nyní se začínají používat i v environmentální analýze veterinárních léčiv¹⁵.

Princip imunochemických metod je specifická interakce mezi protilátkou a antigenem. Protilátky jsou např. proteiny, které se váží na antigen pomocí nekovalentních vazeb. Vyskytuje se dva druhy protilátek: monoklonální a polyklonální. Monoklonální protilátky reagují pouze s jednou specifickou sloučeninou, naproti tomu polyklonální protilátky mají menší specifitu a jsou schopny reagovat s více sloučeninami, jejich cena je díky tomu nižší¹⁶.

Z imunochemických metod se pro analýzu veterinárních léčiv nejvíce používá ELISA a to hlavně z důvodu komerční dostupnosti souprav pro analýzu. Díky poměrně silným interferencím a nižší specifitě imunochemických metod je vyžadováno jejich srovnání s nějakou přesnou analytickou metodou, ideálně HPLC-MS-MS¹⁷.

5. APLIKACE METOD POUŽÍVANÝCH K ANALÝZE VETERINÁRNÍCH LÉČIV A JEJICH METABOLITŮ

V této části práce bude pojednáno o některých konkrétních metodách stanovení vybraných veterinárních léčiv vyskytujících se v životním prostředí, především ve vodách, a v biologických vzorcích.

5.1 Antibiotika

5.1.1 Aminoglykosidová antibiotika

Gentamicin je velmi polární, netěkavá látka, která neobsahuje specifický chromofor, který by poskytoval absorpcní spektrum v UV oblasti. Bylo aplikováno mnoho separačních metod za účelem stanovení gentamicinu a jeho metabolitů ve vodné matrici počínaje od tenkovrstevné kapalinové chromatografie (TLC)¹⁸, přes reverzní kapalinovou chromatografii¹⁹ až po kapilární elektroforézu (CE)²⁰. Problémy s detekcí byly řešeny přímými i nepřímými metodami, využívalo se před a po kolonové derivatizace pomocí látky *o*-dialdehydftalátu nebo dansylchloridu. Tyto derivatizační metody se ukázaly být zdlouhavé a ne příliš účinné¹⁹. Vhodnou metodou stanovení gentamicinu je reverzní kapalinová chromatografie s pulsní elektrochemickou detekcí (PED) na zlaté elektrodě. Vyniká vysokou citlivostí, selektivitou, robustností a relativně nízkou cenou při rutinních analýzách. Ve studii aplikující tuto metodu byla použita kolona Gemini C18 (250 x 4,6 mm, 5µm). Jako mobilní fáze byl použit acetonitril/voda s přídavkem iontově párových činidel (trifluoroctová kyselina a pentafluorpropionová kyselina), pH bylo upraveno na 2,6. U této metody bylo dosaženo LOD 5,5 ng/ml a LOQ 16,5 ng/ml, relativní směrodatná odchylka jednotlivých měření byla 0,3²¹.

V jiné studii byl společně s gentamicinem (analyzovány čtyři deriváty gentamicinu) analyzován také neomycin. V této studii byla použita stejná metoda stanovení jako v předchozí studii HPLC–PED, ale za jiných chromatografických podmínek: Mobilní fáze byla tvořena ACN/H₂O s přídavkem síranu sodného, dihydrogen fosforečnanu sodného a kyseliny fosforečné, pH bylo upraveno na hodnotu 3,0. Byla použita kolona poly(styren-divinylbenzen) PLRP-S (250 mm x 4,6 mm, 8µm). V této studii bylo

dosaženo LOD pro jednotlivé deriváty gentamicinu od 0,27 µg/ml do 0,89 µg/ml, LOQ mezi 0,90 µg/ml a 2,7 µg/ml. U neomycinu bylo dosaženo LOD 0,037 µg/ml a LOQ 0,120 µg/ml²².

Ostatní aminoglykosidy, jako linkomycin a streptomycin, které nejsou hojně využívány veterinární medicínou se stanovují převážně metodou HPLC s MS-MS detekcí²³.

5.1.2 β -laktámová antibiotika

β -laktámová antibiotika byla v minulosti analyzována podle účelu stanovení rozsáhlou škálou metod mikrobiologických, biochemických a analytických. Ke stanovení přítomnosti β -laktámových antibiotik v matricích jako mléko, maso, voda, aj. byly využity imunochemické metody jako ELISA a RIA²⁴.

Přítomnost poměrně nestabilních čtyř kruhů v β -laktámové struktuře činí z těchto sloučenin látky náchylné k degradaci za tepla nebo v přítomnosti alkoholu. Díky těmto vlastnostem se tato antibiotika v životním prostředí vyskytují v minimálních koncentracích⁸. Naopak velmi často se provádí stanovení v různých živočišných produktech (mléko, maso) nebo v živočišných tkáních (játra, ledviny). β -laktámy jsou z mléka a zvířecích tkání extrahovány pufry, následně zakoncentrovány a přečištěny přes SPE. Poté se používá kapalinová chromatografie s iontově párovými činidly, pro detekci slouží UV nebo FL detektory. Použití těchto detekčních metod je často komplikováno interferujícími vlivy z matrice, tyto problémy řeší kapalinová chromatografie s MS detekcí⁸. U jedné studie byly stanovovány β -laktámy tak, že nejdříve byla provedena extrakce analytů ze vzorku ledvin acetonitrilem a vodou, poté byl extrakt přečištění přes C18-SPE kolonku a analýza byla provedena HPLC-MS. Jako mobilní fáze sloužila směs metanol/voda s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Použitá kolona byla C18. Autor uvádí, že reprodukovatelnost výsledů nebyla příliš dobrá, příčinu vidí v interferenci matrice. Jako řešení doporučuje vícekrokové přečištění vzorků. U této studie bylo dosaženo pro jednotlivé β -laktámy LOD 10-500 µg/kg²⁵.

Jiné studie využily podobný separačný postup, ale použily odlišnou detekci. S UV detekcí bylo dosaženo LOD 20-50 µg/kg²⁶.

Studie zabývající se stanovením β -laktámů v odpadních vodách použila metodu založenou na SPE a následně HPLC-UV-DAD. Jako SPE byla použita fáze C18.

Vlastní separace proběhla na koloně LUNA C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), použita byla gradientová eluce s mobilní fází ACN/H₂O s trifluorooctovou kyselinou, vlnová délka detekce byla 220 nm. Bylo prekoncentrováno 1000 ml odpadní vody, výtěžnost na SPE se pohybovala mezi 82-97 % pro všechna testovaná β -laktámová antibiotika. Bylo dosaženo LOD 8-24 ng/l²⁷.

Pro analýzu β -laktámů (konkrétně benzylpenicilínu) byla také použila kapilární elektroforéza, jejíž výsledky byly stejně selektivní jako při použití kapalinové chromatografie. Bylo dosaženo LOD 10 pg a LOQ 20 pg²⁸.

5.1.3 Makrolidová antibiotika

Makrolidová antibiotika se stanovují podobnými metodami jako β -laktámová antibiotika. Ze zvířecích tkání se získávají extrakcí nejčastěji acetonitrilem, chloroformem nebo dichlormethanem. Poté následuje prekoncentrace na C18-SPE a dále vlastní separace využívající kapalinovou chromatografií s kolonou s chemicky navázanými alkyly na silikagelu. Jako mobilní fáze se používají acetonitril s fosfátovým nebo acetátovým pufrem. Separace se provádí v mírně kyselém prostředí, toto prostředí není vhodné pro erytromycin, který se při nižších hodnotách pH stává nestabilní a degraduje. Jako detekce se používá UV spektrometrie, pro erytromycin a oleandomycin je preferována hmotnostní spektrometrie, neboť tato antibiotika neobsahují chromofor. V různých tkáních byly zjištěny limity detekce od 0,2 do 500 μ g/kg^{29, 30, 31}.

Pro stanovení makrolidů v odpadních vodách se používá mikroextrakce tuhou fází (SPME) s následovanou HPLC-MS-MS. V hmotnostní spektrometrii byla zvolena ionizace elektrosprejem, který relativně dobře eliminuje vlivy matrice. Voda k analýze byla odebírána před a za čistírnou odpadních vod. Ve vodě před čistírnou bylo dosaženo LOD 2,8 – 12 ng/l a LOQ 9,2 – 39 ng/l. Ve vodě za čistírnou bylo dosaženo LOD 4,1 – 20 ng/l a LOQ 14 – 66 ng/l. Reálné koncentrace makrolidů ve vodě před čistírnou byly 1,57 μ g/l a za čistírnou odpadních vod 1,24 μ g/l³². U další studie byly postupy velmi obdobné, jen byla použita místo mikroextrakce běžná SPE. Jednalo se o testování říční vody v severním Coloradu před a za čistírnou odpadních vod. Detekční limity se pohybovaly v přírodní vodné matrici od 0,03 po 0,07 μ g/l. Před čistírnou odpadních vod nebyla zaznamenána žádná makrolidová antibiotika. Za čistírnou odpadních vod byla zaznamenána koncentrace od 0,05 – 0,15 μ g/l³³.

5.1.4 Peptidová antibiotika

Peptidová antibiotika jsou si strukturně velmi podobná. Dříve byla analýza peptidových antibiotik založena na mikrobiologických metodách. Dnes se hledají citlivější a selektivnější instrumentální metody.

Hlavní důraz je kladen na stanovení peptidových antibiotik v biologických vzorcích. Jedná se převážně o různé modifikace kapalinové chromatografie s různým typem detekce. Byla zkoušena UV detekce při 230 nm, která nebyla příliš citlivá, dosahovala LOQ 2,7 mg/kg. O dost citlivější se jeví hmotnostní detekce či tandemová hmotnostní detekce³⁴, která dosahovala LOQ 0,5 mg/kg. Při stanovení peptidových antibiotik je hlavním faktorem ovlivňujícím stanovení kvalitní přečištění a zakoncentrování vzorku. U jedné studie byl vzorek extrahován ethylacetátem, následně centrifugován a poté aplikován na tandemové SPE (Sep a pak silika gel). Eluát z kolonky byl zakoncentrován odpařením rozpouštědla a poté analyzován HPLC s UV detekcí. U této metody bylo dosaženo LOQ 5 mg/kg³⁵.

Ve vodných vzorcích se nejčastěji využívá HPLC-MS -MS po předcházející SPE³⁶.

5.1.5 Sulfonamidová antibiotika

Při stanovení sulfonamidů v biologických vzorcích se naskytá problém s polárním charakterem analytů a složek matrice. Jako vhodné řešení tohoto problému se ukázala extrakce vzorku horkou vodou, nebo použití vylučovací chromatografie (SEC) na gelu Sephadex LH-20. Pro vlastní analýzu se používá kapalinová chromatografie s kolonou C18 a jednoduchou mobilní fází ACN/H₂O, nebo MeOH/H₂O v gradientovém módu. Jako detekce se osvědčila UV, pokud je vyžadována větší citlivost a selektivita používá se MS, kde se dosahuje LOD < 10 µg/kg^{8,37}.

Velmi selektivní a citlivá metoda pro stanovení sulfonamidů ve vodě je kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (použití lineárního kvadrupolu s iontovou pastí), u studie využívající tuto metodu byl kladen důraz na extrakci tuhou fází, kdy byly vyzkoušeny jednotlivé kolonky (Oasis HLB a Oasis MCX) a následně obě dvě v tandemovém uspořádání. Největší výtěžnost byla zaznamenána na Oasis HLB (přes

92 %). U této metody bylo dosaženo LOD 0,01 – 1,13 ng/l³⁸. Další relativně často používanou metodou pro stanovení sulfonamidů ve vodě je HPLC s fluorimetrickou detekcí, kdy se musí analyt před kolonou derivativizovat pomocí fluorescaminu. Separace proběhla na koloně C18 s gradientovou elucí acetátový pufr/acetonitril. Bylo dosaženo LOD 2,0 – 3,2 ng/l^{39, 40}.

Díky své hydrofilní povaze se sulfonamidy jednoduše vylučují z těla bez větší biotransformace. Takto se dostávají do životního prostředí. Jako velmi vhodná metoda pro analýzu sulfonamidů ve vodních vzorcích z životního prostředí se ukázala kapilární elektroforéza spojená on-line s SPE. On-line SPE má oproti off-line uspořádání jednoznačné výhody: je požadováno nižší množství vzorku, je potřeba menší objem organického rozpouštědla, eluát je ihned dávkován na kapilární elektroforézu, tj. analýza je rychlejší. Jako mobilní fáze byl použit 45 mM fosfátový pufr o pH 7,3, separační napětí 25 kV, teplota 27 °C a kapilára pro UV detekci 64,5 cm x 75 µm I.D. Jako SPE byla použita kolonka s HLB sorbentem. U této metody bylo dosaženo LOD 0,3 – 0,6 µg/l⁴¹.

5.1.6 Tetracyklinová antibiotika

Vzhledem ke dvěma laktonovým skupinám v poloze 1 a 11 v molekule (viz obr. 6) mohou být tetracykliny jednoduše chelatovány ionty kovů. Mohou také interagovat se silanolovými skupinami při kapalinové chromatografii na silikagelových stacionárních fázích. Pokud nejsou silanolové skupiny odstíněné, může docházet k rozmytí píků. Mnoho autorů řeší tento problém přidáním kyseliny šťavelové nebo EDTA do eluátu⁴². Při přídavku téhoto látek se používá UV detekce, neboť při použití ESI-MS dochází ke snížení intenzity signálu. V kombinaci s hmotnostní spektrometrií se doporučuje používat jako pufr octan amonný nebo kyselinu mravenčí, které nesnižují intenzitu signálu, i když mají negativní vliv na separaci. Bylo zjištěno, že některé tetracyklyny (chlortetracyklin, doxytetracyklin) podléhají ve vodním prostředí isomerizaci a tautomerizaci, což může stěžovat kvantifikaci⁴². Pro zakoncentrování tetracyklinů se využívají SPE-C18, nebo SPE-HLB. Při použití HPLC-MS-MS bylo dosaženo LOD 0,8 – 17,6 ng/l⁴³. Při analýze reálných vzorků na přítoku odpadní vody činila průměrná koncentrace tetracyklinů 0,05 – 1,09 µg/l a průměrná koncentrace na odtoku vody dosahovala 0,06 – 0,21 µg/l^{44, 45, 46}.

5.1.7 Chinolonová antibiotika

Karboxylová skupina v pozici 3 v molekule chinolonů činí z těchto látek látky kyselé povahy (viz. obr. 7). I když 7-piperazinyl obsahuje bazickou aminoskupinu. Bylo vyzkoušeno mnoho analytických metod pro stanovení jednotlivých chinolonů, ale nejvíce se uplatnila pro širší okruh chinolonů metoda LC-MS⁴⁷.

Většina chinolonů vykazuje fluorescenci, proto se běžně provádí rutinní stanovení chinolonů ve vodné matrici pomocí HPLC-FLD, kde se dosahuje LOD 20 – 60 ng/l⁴⁸, pro přečištění vodného vzorku se nejběžněji používá SPE s C18, C8, C2⁸.

5.1.8 Chloramfenikol

Z biologických vzorků se chloramfenikol získává extrakcí organickými činidly, nejčastěji ethylacetátem, nebo fosfátovým pufrem. Dalším krokem je přečištění extrakcí kapalina-kapalina nebo tuhým sorbentem. Výborné výsledky stanovení chloramfenikolu jsou dosahovány metodou GC-EI-MS, kde je limit detekce přibližně 0,1 µg/kg. Pro ještě větší zvýšení citlivosti se analyt může derivativizovat⁸.

Ve vodných vzorcích se využívá tradiční metoda pro stanovení antibiotik, LC-MS, po predešlé prekoncentraci vodného vzorku SPE⁴⁹.

5.2 Hormony

Sledování obsahu hormonů ve vodách se stalo v posledních letech velmi frekventované. Veterinární medicína se na výskytu hormonů ve vodách podílí pouze z části, větší vliv má humánní medicína, která produkuje obrovské množství těchto látek např. antikoncepcí. Hormonální látky jsou z organismů vylučovány v podobě konjugátů, které ve vodném prostředí hydrolyzují na své volné formy.

Pro analýzu anabolických steroidů se nejčastěji používá RP-HPLC. Jako typické mobilní fáze se používají směsi acetonitrilu s vodou nebo methanolu s vodou, a to v různých poměrech podle konkrétní analýzy. Nejvíce používané stacionární fáze uplatňující se při analýzách steroidních hormonů jsou chemicky vázané alkyly na silikagelovém nosiči. Převážná část studií zabývajících se stanovením anabolických steroidů využívá oktadecylsiloxanové stacionární fáze, v menší míře byly využity navázané kratší alkyly, jako je butyl- či oktyl-⁵⁰. Některé studie využily k separaci anabolických steroidů fenylovou kolonu⁵¹.

HPLC anabolických steroidů využívá více druhů detekce, mezi nejpoužívanější a zároveň nejúčinnější patří MS detekce, či MS-MS detekce. Dále se využívají spektrometrické metody (detektory s diodovým polem), bohužel tyto metody mají poměrně nízkou citlivost a zároveň dochází k řadě interferencí s látkami v matrici. Proto se před použitím těchto metod provádí vysoké zkonzentrování analyzovaného vzorku⁵². Zkonzentrování vzorku je prováděno nejčastěji SPE za použití náplní C18 nebo HLB. Získané LOD se podle literatury liší až o několik rádů, při použití HPLC s UV detekcí a mobilní fází methanol/voda bylo dosaženo LOD 5,6 – 78,1 ng/l⁵¹, při použití HPLC s MS-MS detekcí a mobilní fází acetonitril/voda bylo dosaženo LOD 0,4 – 2,0 ng/l⁵³. Pro analýzu anabolických steroidů je také využívána plynová chromatografie a to převážně s hmotnostní detekcí. Nevýhodou této metody je, že většina anabolických steroidů musí být derivativizována různými činidly například *N*-methyl-*N*-terc-butyl-dimethylsilyl-trifluoroacetamidem, aby se zvýšila těkavost a stabilita vzniklých iontů⁵⁴,⁵⁵.

U stanovení anabolických steroidů v biologických vzorcích musí nejdříve dojít k extrakci a následně k dekonjugaci (použití glukuronidasů nebo arylsulfatasů), poté následuje SPE (C18, HLB). Nejpoužívanější metody pro stanovení anabolických

steroidů v různých biologických matricích jsou HPLC a GC s hmotnostní detekcí. U HPLC se dosahuje LOD 0,2 – 2,0 µg/kg a u GC 0,5 – 6,0 µg/kg⁸.

Při analýze kortikosteroidů se používají stejné metody jako při analýze anabolických steroidů. Dříve se pro analýzu kortikosteroidů používaly převážně metody plynové chromatografie. Vzhledem ke složitému a zdlouhavému nakládání se vzorkem jsou tyto metody nahrazovány kapalinovou chromatografií. Ideální metoda pro monitorování kortikosteroidů v biologických vzorcích se jeví HPLC-MS, kde se dosahuje LOD 0,3 – 12 µg/kg⁸.

Analýza thyreostatik z biologických vzorků je stížena jejich polaritou. Nejběžnějším způsobem izolace a přečištění thyreostatik je použití iontově výměnné kolony⁸. Některé publikace používají ke stanovení thyreostatik TLC, nebo GC-MS⁵⁶. Jako vhodná metoda pro stanovení thyreostatik se ukázala být LC-ESI-MS. Nejdříve je vzorek extrahován methanolem, poté přečištěn SPE-SiOH a následně derivativizován 2-chloro-4-nitrobenzo-2-furazanem. Tyto derivatizační produkty jsou separovány na stacionární fázi C18 s mobilní fází methanol a 0,73% octová kyselina v gradientovém modu. Bylo dosaženo LOD 20 µg/kg⁵⁷.

6. ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce zpracovává údaje získané z literatury týkající se veterinárních léčiv hojně se vyskytujících v životním prostředí (jejich struktura, mechanismus účinku, metody stanovení).

Veterinární léčiva jsou hojně používaná, což má kromě pozitivních účinků (prevence, léčba nemocí) i negativní důsledky (rezistence bakterií, hormonální změny u živočichů). Nadmerným používáním veterinárních léčiv dochází k jejich akumulaci v různých tkáních nebo k vylučování z organismu. Z živočišných exkrementů se mohou dostávat do povrchové vody.

Z hlediska prováděných analýz je větší vliv kladen na stanovení veterinárních léčiv v biologických vzorcích, neboť ty mohou přímo působit na člověka (konzumace masa, vajíček atd.). Biologické vzorky mají složitější matrici a proto je často potřeba provádět pracnější předúprava vzorku. U vodních vzorků je nejběžnějším postupem úpravy SPE. Nejpoužívanější metodou pro vlastní stanovení veterinárních léčiv je kapalinová chromatografie s různými druhy detekce. Některá léčiva obsahují ve své molekule chromofor, proto se ke stanovení hodí UV detektor, jiné vykazují fluorescenci, proto se používá fluorescenční detektor. Nejcitlivější a nejselektivnější je hmotnostní detekce, nevýhodou je však vysoká pořizovací cena MS detektorů.

Se zlepšující se instrumentací se snižují hodnoty limitů detekce. Dosažení nízkých LOD je velmi důležité pro získání přesných údajů o koncentracích léčiv v životním prostředí.

Na základě citlivých analýz lze sledovat procesy v ekosystému a následně pozitivně ovlivňovat jeho kvalitu, tj. omezovat používání určitých léčiv, zajišťovat jejich účinější záchyt v čistírnách odpadních vod aj.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Kennedy, D. G.; Cannaven, A.; McCracken, R. J.: *J. Chromatogr. A* 882, 37 (2000)
2. Zhang, L. G.; Zhou, L. J.: *J. Chromatogr. A* 1154, 205 (2007)
3. Zahradnický, J.: *Antibiotika a chemoterapeutika*, 1. vydání, Praha, SPN (1982)
4. Lincová, D.; Farghali, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. vydání, Praha, Galen (2007)
5. Hynie, S.: *Farmakologie v kostce*, 2. vydání, Praha, Triton (2001)
6. Stabler, G. A.; Johs, T.: *Clin. Chem.* 1129, 44 (1998)
7. Heller, D. N.; Clark, S. B.; Righter, H. F.: *J. Mass Spectrom.* 35, 39 (2000)
8. Stolker, A. A. M.; Brinkham, U. A. Th.: *J. Chromatogr. A* 1067, 15 (2005)
9. Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J.: *Farmakochemie*, 2. vydání, Praha, VŠCHT (2007)
10. Corcia, D.; Nazzari, M.: *J. Chromatogr. A* 974, 53 (2002)
11. Bosákova, Z.; Coufal, P.; Jelínek, I.; Pacákova, V.; Ševčík, J. G. K.; Štulík, K.: *Analytické separační metody*, Praha, Karolinum (2005)
12. Pacákova, V.; Štulík, K.: *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*, Praha, SPN (1986)
13. Kellner, R.; Mermut, J. M.; Otto, M.; Balcárek, M.; Widmer, H.M.: *Analytical Chemistry*, 2nd edition, Wiley-VLH (2004)
14. Coufal, P.: *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*. Dostupné na URL: <<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>> [cit. 20.4.2009]
15. Watabe, Y.; Kubo, T.; Nishikawa, T.; Fujita, T.; Kunimitsu, K.; Hosoya, K.: *J Chromatogr. A* 1120, 252 (2006)
16. Ingerslev, F.; Sorensen B.: *Evaluation of Analytical chemical methods for Detection of Estrogens in the Environment*. Danish EPA (2003)
17. Beck, I. C.; Bruhn, R.; Gandrass, J.; Ruck, W.: *J. Chromatogr. A* 1090, 98 (2005)
18. Wilsone, W. L.; Richard, G.; Hughes, D. W.: *J. Chromatogr. A* 442, 78 (1973)
19. Kaale, E.; Leonard, S.; Schepdael, A.; Roets, E.; Hoogmartens, J.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 895, 67 (2000)
20. Yuan, L.; Wei, H.: *Electrophoresis* 196, 26 (2005)
21. Manyanga, V.; Kreft, K.; Divjak, B.; Hoogmartens, J.; Adams, E.: *J. Chromatogr. A* 1189, 347 (2008)
22. Cai, Y.; Cheng, J.; Mou, S.; Yiqiang, L.: *J. Chromatogr. A* 1085, 124 (2005)

23. Ye, Z.; Weinberg, H. S.; Meyer, M. T.: *Sci. Total Environ.* 225, 109 (1999)
24. Luiz, M. M.; Vidal, J. L.; González, R. R.; Frenich, A. G.: *J. Chromatogr A* 1205, 10 (2008)
25. Fagerquist, C. K.; Lightfield, A. R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 660, 17 (2003)
26. Ito, Y.; Ikai, Y.; Oha, H.; Matsumoto, H.; Kagami, T.; Takeba, K.: *J. Chromatogr. A* 880, 85 (2000)
27. Pena, E.; Rodera, A. I.; Gonzales, M. E.; Bondi, M. C.: *Anal. Chim. Acta* 556, 415 (2006)
28. Yongxin, Z.; Dalle, J.; Schepdael, A.; Roets, W.; Hoogmartens, J.: *J. Chromatogr. A* 792, 83 (1997)
29. Janeček, M.; Quilliam, M.: *J. Chromatogr.* 619, 63 (1993)
30. Civitareale, C.; Fiori, M.; Ballerini, A.; Brambilla, G.: *J. Pharm. Bio. Anal.* 36, 317 (2004)
31. Liu, L.; Roets, E.; Hoogmartens, J.: *J. Chromatogr. A* 761, 43 (1997)
32. McClure, E.; Wong, Ch.: *J. Chromatogr. A* 1169, 53 (2007)
33. Yang, S.; Carlson, K. H.: *J. Chromatogr. A* 1038, 141 (2004)
34. Tetler, L.; Morris, M.: *Biol. Mass Spectr.* 22, 712 (1993)
35. Vallvey, L. F.; Navas, N.; Titos, A.; Checa, R.: *Chromatographia* 54, 15 (2001)
36. Zhang, Z. L.; Zhou, J. L.: *J. Chromatogr. A* 1154, 205 (2007)
37. Roybal, J. E.; Pfenning, A. P.; Turnipseed, S. B.; Gonsales, A. S.: *Anal. Chim. Acta* 483, 147 (2003)
38. Cruz, M. S.; Galán, M. J. G.; Barcelo, D.: *J. Chromatogr. A* 1193, 50 (2008)
39. Montiu, J. R.; Folch, J.; Campano, R.; Grandos, M.; Prat, M. D.: *J. Chromatogr. A* 1172, 186 (2007)
40. Pang, G. F.; Cao, Y. Z.; Fan, Ch. L.; Zhang, J. J.; Li, X. M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 534 (2003)
41. Lara, F. J.; Campana, A. M.; Neususs, Ch.; Barrero, F. A.: *J. Chromatogr.A* 1216, 3372 (2009)
42. Oka, H.; Ito, Y.; Matsamuto, H.: *J. Chromatogr. A* 882, 109 (2000)
43. Sczesny, S.; Nau, H.; Hamscher, G.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 697 (2003)
44. Hirsch, R.; Ternes, T. A.; Haberer, K.; Mehlich, A.; Ballwanz, F.; Kratz, K. L.: *J. Chromatogr. A* 815, 213 (1998)

45. Shinwoo, Y.; Jongmun, Ch.; Carlson, K.: *J. Chromatogr. A* 1097, 40 (2005)
46. Zhu, J.; Snow, D. D.; Casada, D. A.; Monson, S. J.; Spalding R. F.: *J. Chromatogr. A* 928, 177 (2001)
47. Kafmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Widmer, M.: *J. Chromatogr. A* 1194, 66 (2008)
48. Prat, M. D.; Benito, J.; Compano, R.; Granados, M.: *J. Chromatogr. A* 1041, 27 (2004)
49. Posyniak, A.; Zmudzki, J.; Niedzielska, J.: *Anal. Chim. Acta* 483, 307 (2003)
50. Mitani, K.; Fujioka, M.; Katanka, H.: *J. Chromatogr. A* 1081, 218 (2005)
51. Hu, J.; Zhang, H.: *J. Chromatogr. A* 1070, 221 (2005)
52. Watabe, Y.; Kubo, T.; Nishikawa, T.; Fujita, T.; Kunimitsu, K.; Hosoya, K.: *J. Chromatogr. A* 1120, 252 (2006)
53. Sanwald, P.; Blankson, E. A.; Dulery, B. D.; Schoun, J.; Huebert, N. D.; Dow, J.: *J. Chromatogr. B* 672, 207 (1995)
54. Kelly, K.: *J. Chromatogr. A* 872, 309 (2000)
55. Zhang, Z. L.; Hibberd, A.; Zhou, J. L.: *Anal. Chim. Act.* 577, 52 (2006)
56. Wasch, K.; Brabander, H. F.; Ginkel, L. A.; Sterh, S. S.; Meiring, H. D.: *J. Chromatogr. A* 819, 99 (1998)
57. Wasch, K.; Brabander, H. F.; Impens, S.; Vandewiel, M.; Courtheym, D.: *J. Chromatogr. A* 912, 311 (2001)
58. Leitner, A.; Zollner, P.; Lindner, W.: *J. Chromatogr. A* 939, 49 (2001)
59. Ruyck, H.; Renterghem, R.; Ridder, H.; Brabander, D.: *Food Control* 11, 165 (2000)