



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

**VYUŽITÍ METODY QUECHERS PRO ANALÝZU
FLUOROCHINOLONOVÝCH ANTIBIOTIK V
PŮDĚ**

USE OF THE QUECHERS METHOD FOR THE ANALYSIS OF FLUOROQUINOLONE
ANTIBIOTICS IN SOIL

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kristýna Brabcová

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1675/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Studentka: **Bc. Kristýna Brabcová**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany
životního prostředí
Vedoucí práce: **Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Využití metody QuEChERS pro analýzu fluorochinolonových antibiotik v půdě

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši se zaměřením na možnosti využití metody QuEChERS pro extrakci léčiv z půdy a jejich výskytu v půdním ekosystému.
2. Optimalizovat metodu pro analýzu fluorochinolonů v půdě, případně v dalších pevných maticích (např. podestýlka, hnůj).
3. Provést analýzu modelových nebo reálných vzorků pevné matrice.
4. Zpracovat a vhodně diskutovat získané výsledky.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kristýna Brabcová
studentka

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Náplní této diplomové práce je aplikace hojně využívaného extrakčního postupu QuEChERS na půdu, či na další matrice, jako je podestýlka nebo hnůj, obsahující fluorochinolonová antibiotika. V teoretické části práce jsou kapitoly věnované obecně léčivům, dále pak antibiotikům a antibiotické rezistenci. Fluorochinolony jsou popsány detailněji z hlediska jejich vlastností, výskytu a chování v životním prostředí. Poslední kapitola je zaměřena na analytické metody. V experimentální části práce je na základě dostupných publikací vyzkoušen a vybrán nejvhodnější extrakční postup pro půdní matrici, který je pak dále optimalizován. Optimalizovaný postup je aplikován na reálné vzorky půdy a drůbeží podestýlky za účelem stanovení obsahu ciprofloxacinu a enrofloxacinu. Extrakční postup je také vyzkoušen na dalších antibiotikách z řady fluorochinolonů (norfloxacinu, ofloxacinu, pefloxacinu, moxifloxacinu) v půdě. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí LC-MS.

ABSTRACT

The content of this master's thesis is an application of frequently used extraction method QuEChERS on soil or other samples like litter or manure containing fluoroquinolone antibiotics. In the theoretical part of this thesis are chapters describing drugs, antibiotics and antibiotic resistance. Fluoroquinolones are described in more details with their properties, appearance and behaviour in the environment. The last chapter is focused on analytical methods. In the experimental part of this thesis is chosen in accordance with available publications the most suitable extraction method. This method is tested and optimized on soil samples. The optimized method is applied on the real soil and poultry litter samples to determine the amount of ciprofloxacin and enrofloxacin. This extraction method is used on other fluoroquinolone antibiotics (norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, moxifloxacin) in soil. All of the samples were analyzed by LC-MS.

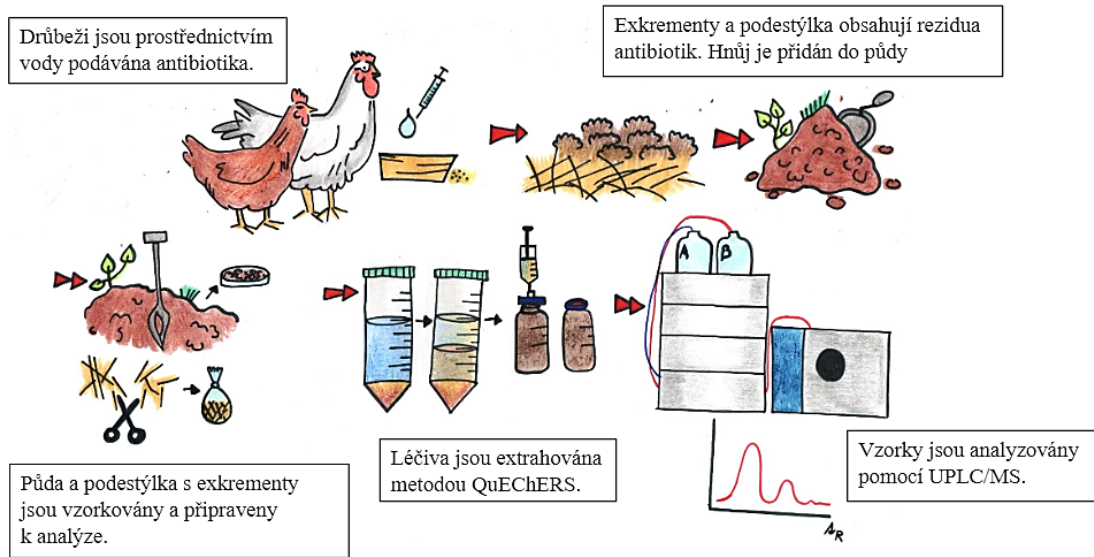
Klíčová slova

antibiotika, fluorochinolony, ciprofloxacin, enrofloxacin, půda, QuEChERS, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

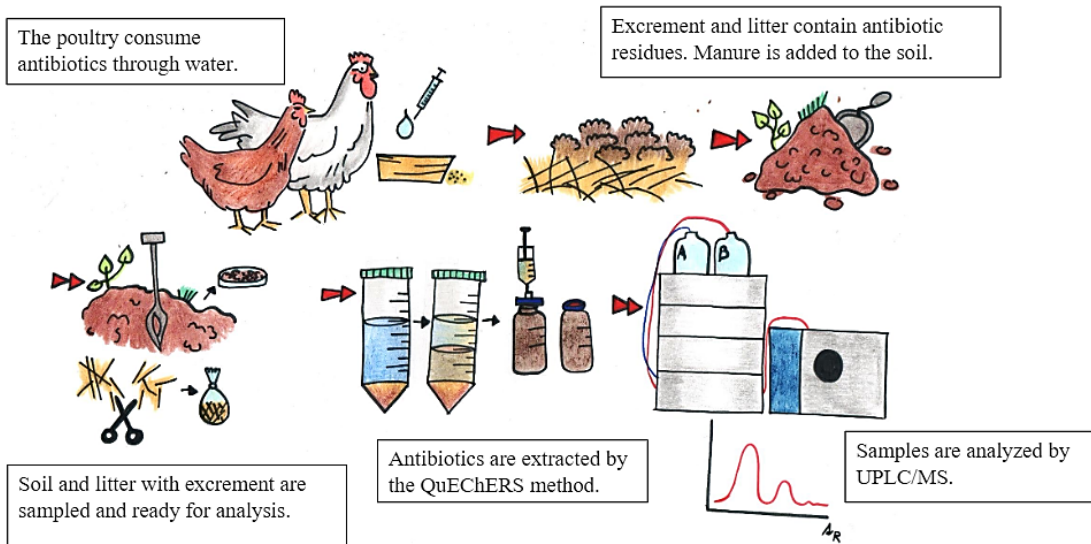
Keywords

antibiotics, fluoroquinolones, ciprofloxacin, enrofloxacin, soil, QuEChERS, liquid chromatography, mass spectrometry

GRAFICKÝ ABSTRAKT



GRAPHICAL ABSTRACT



BRABCOVÁ, Kristýna. *Využití metody QuEChERS pro analýzu fluorochinolonových antibiotik v půdě*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139328>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí . Vedoucí práce Ludmila Mravcová.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat své vedoucí Ing. Ludmile Mravcové, Ph.D. za její ochotu, vstřícný a přátelský přístup při realizaci této diplomové práce. Dále patří poděkování Ing. Janu Fučíkovi za odborné rady, ochotu a pomoc při práci v laboratoři a Ing. Pavlíně Landové za rady a nápady k danému tématu. Děkuji Ústřednímu kontrolnímu a zkušebnímu ústavu zemědělskému za poskytnutí vzorků pro analýzu. Zároveň děkuji své rodině a příteli za podporu nejen při psaní práce, ale i při celém studiu. Poděkování rovněž patří i Fakultě chemické a všem, kteří nám během studia věnovali svůj čas.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Léčiva	10
2.1.1	Charakteristika pojmů	10
2.1.2	Názvosloví	11
2.1.3	Rozdělení léčiv	11
2.2	Antimikrobiální léčiva – antibiotika a chemoterapeutika	13
2.2.1	Mechanismy působení antimikrobiálních léčiv	14
2.2.2	Původ antimikrobiálních léčiv	14
2.2.3	Spektra účinnosti antimikrobiálních léčiv	14
2.2.4	Antibiotická rezistence	14
	Mechanismy vzniku antibiotické rezistence	15
2.2.5	Antibiotika a chemoterapeutika v životním prostředí	16
	Antibiotika ve vodě	17
	Antibiotika v půdě	18
2.3	Fluorochinolony	19
2.3.1	Antibiotická rezistence na fluorochinolony	20
2.3.2	Fluorochinolony v životním prostředí	21
2.3.3	Enrofloxacin	21
2.3.4	Ciprofloxacin	22
2.3.5	Norfloxacin	23
2.3.6	Ofloxacin	23
2.3.7	Pefloxacin	24
2.3.8	Moxifloxacin	25
2.4	Analýza léčiv v životním prostředí	25
2.4.1	Sběr a uchování vzorků obsahujících léčiva	26
	Vzorky vody	26
	Pevné vzorky	26
2.4.2	Extrakce vzorků obsahujících léčiva	26
	QuEChERS	26
2.4.3	Instrumentace využívaná při analýze vzorků obsahujících léčiva	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1	Použité chemikálie	32
3.1.1	Rozpouštědla	32

3.1.2 Kyseliny	32
3.1.3 Soli	32
3.1.4 Sorbenty	33
3.1.5 Standardy	33
3.1.6 Deuterované standardy.....	33
3.2 Použité přístroje a laboratorní vybavení.....	33
3.3 Použitý software	34
3.4 Vzorky	34
3.4.1 Vzorky drůbeží podestýlky pro zjištění obsahu enrofloxacinu a ciprofloxacinu	34
Popis vzorků podestýlek.....	34
3.4.2 Vzorky půdy pro zjištění obsahu enrofloxacinu a ciprofloxacinu.....	35
Popis vzorků půdy č. 1.....	35
3.5 Příprava zásobních a kalibračních roztoků.....	36
3.5.1 Příprava zásobních roztoků standardů	36
3.5.2 Příprava kalibračních roztoků.....	37
3.5.3 Příprava pufrů	39
3.6 Výběr vhodného extrakčního postupu.....	40
3.7 Optimalizace parametrů vybraného extrakčního postupu	42
3.8 Aplikace optimalizovaného postupu na vzorky půdy a podestýlek	45
3.9 Stanovení obsahu ciprofloxacinu a enrofloxacinu v půdě a podestýlkách.....	47
3.10 Aplikace optimalizovaného postupu na skupinu fluorochinolonů v půdě	48
3.11 Stanovení fluorochinolonů v půdě – optimalizace metody LC-MS.....	49
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
4.1 Kalibrační závislost	51
4.2 Chromatogramy	53
4.3 Výběr vhodného extrakčního postupu.....	54
4.4 Optimalizace vybraného extrakčního postupu	55
4.4.2 Optimalizace parametru vodná fáze.....	56
4.4.3 Optimalizace parametru organická fáze.....	57
4.4.4 Optimalizace parametru doba působení ultrazvuku.....	58
4.4.5 Optimalizace parametru složení směsi solí.....	59
4.4.6 Optimalizace parametru doba ručního třepání.....	60
4.4.7 Optimalizace parametru složení sorbentů pro dSPE.....	61
4.4.8 Ověření funkčnosti postupu na vzorcích půdy a podestýlky obohacených na různých koncentračních hladinách.....	61

4.5 Stanovení enrofloxacinu a ciprofloxacinu ve vzorcích půdy a podestýlek	63
4.6 Aplikace optimalizovaného postupu na skupinu fluorochinolonů v různě definovaných půdách.....	65
4.6.1 Optimalizace metody UPLC-ESI-TQ pro analýzu fluorochinolonů	65
4.6.2 Aplikace optimalizovaného postupu na skupinu fluorochinolonů v různě definovaných půdách	66
4.7 Shrnutí výsledků	67
5 ZÁVĚR	68
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	69
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	76
8 SEZNAM PŘÍLOH.....	78

1 ÚVOD

Od objevení penicilinu roku 1928 sirem Alexandrem Flemingem se antibiotika stala nedílnou a běžně využívanou součástí lékařské praxe. Ve většině případů si bez nich neumíme náš život představit. Antibiotika jsou podávána jak v humánní, tak ve veterinární medicíně. Ve veterinární medicíně jsou využívána nejen k léčbě, ale i k prevenci chorob [1]. V humánní medicíně jsou antibiotika často předepisována zbytečně, nebo je lidé užívají preventivně. Obecně tedy dochází k rostoucí spotřebě těchto látek, což s sebou nese úskalí. Vyloučená nebo nevhodně likvidovaná antibiotika se prostřednictvím různých médií dostávají do životního prostředí [2]. Dochází ke vzniku a přenosu genů antibiotické rezistence, které mají pro zdraví fatální dopad [3]. Dle rozsáhlé studie podlehlo infekcím způsobeným bakteriemi rezistentními vůči antibiotikům v roce 2019 více než 1,2 milionu lidí [4]. Fluorochinolonová antibiotika byla tak zařazena do seznamu WHO (2019) v 6. vydání mezi HP CIAs (antimikrobika s kritickým významem nejvyšší priority pro humánní medicínu [5]).

V rámci této diplomové práce byla ve spolupráci s ÚKZUZ (Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským) řešena problematika výskytu a analýzy enrofloxacinu a ciprofloxacinu v drůbeží podestýlce a půdě obohacené touto podestýlkou. V experimentální části této diplomové práce byla pro extrakci léčiv z půdy a podestýlky aplikována metoda QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe; česky rychlé, jednoduché, levné, efektivní, robustní a bezpečné). Metoda je v laboratořích hojně využívána pro extrakci různých analytů z různých typů matric, avšak pro extrakci léčiv je její využití poměrně nové. Výhodou je její jednoduchost, rychlost a efektivnost, a proto je užitečné ji pro extrakci daných analytů z půdní a podestýlkové matrice vyzkoušet.

Spolehlivou a využívanou analytickou instrumentací pro analýzu léčiv je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s trojitým kvadrupólem a ionizací pomocí elektrospreje. Tato instrumentace byla využita i pro účely této diplomové práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Léčiva

Zákon 378/2007 Sb. (Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů) definuje léčivý přípravek jako látku nebo kombinaci látek s léčebnými nebo preventivními vlastnostmi při onemocnění lidí a zvířat. Dále jde také o látku nebo kombinaci látek, kterou lze použít u lidí (zvířat) nebo podat lidem (zvířatům) za účelem obnovy, úpravy nebo ovlivnění fyziologických funkcí prostřednictvím farmakologického, metabolického nebo imunologického účinku. Dalším účelem je použití nebo podání za účelem stanovení lékařské diagnózy [6].

2.1.1 Charakteristika pojmů

Léčivé látky jsou látky přírodního či syntetického původu s farmakologickým nebo imunologickým účinkem a látky s účinkem na metabolismus. Slouží k prevenci, léčení, mírnění chorob, k diagnostice a ovlivnění fyziologických funkcí [7].

Léčivé přípravky jsou přípravky získané pomocí technologického zpracování léčivých a pomocných látek do lékové formy, která je balena ve vhodném obalu a řádně označena. Léčivé přípravky jsou děleny na humánní (podávané lidem) a veterinární (podávané zvířatům) [7].

Pomocné látky jsou látky bez vlastního léčebného účinku. Používají se za účelem umožnění a usnadnění výroby, přípravy, uchovávání a aplikace léčivých přípravků. Mohou také příznivě ovlivňovat farmakokinetické vlastnosti léčivých látek [7]. Mezi pomocné látky patří plniva, pojiva, kluzné látky, rozvolňovadla, barviva, rozpouštědla, antimikrobiální látky nebo chuťová a čichová korigencia [8]. Příklad složení 1 tablety léčiva, konkrétně PARALENU 500, je uvedeno v *Tabulce 1*.

Například 1 tableta PARALENU 500 obsahuje:

Tabulka 1: Složení tablety PARALENU 500 (převzato z [9])

Léčivá látka	500 mg Paracetamol
Pomocné látky	Předbobtnalý kukuřičný škrob, povidon 30, sodná sůl kroskarmelosy, kyselina stearová

Léková forma je způsob úpravy léčiva do formy vhodné pro léčebné účely. Je přizpůsobena cestě přívodu léčiva do organismu. Lékové formy jsou děleny na enterální (podávané trávicí trubici) a parenterální (podávané mimo trávicí trubici). Mezi enterální lékové formy patří například tablety, dražé, kapsle, roztoky; konečným jsou pak podávány čípky. Parenterální lékové formy zahrnují injekce, infúze, zásypy, masti, krémy, náplasti aj. [7].

Proléčiva jsou prekurzory bez účinku, ze kterých vznikají účinné látky až pochody metabolismu v organismu. Důvodem jejich přípravy je eliminace nevhodných vlastností, jako jsou například nízká rozpustnost, nestabilita nebo nepříjemná chuť či zápach [7].

2.1.2 Názvosloví

Každé syntetické léčivo, jakožto chemickou sloučeninu, lze pojmenovat systematickým názvoslovím dle IUPAC (Mezinárodní unie pro čistou a užitnou chemii). Tyto názvy se však běžně v praxi neužívají, neboť jsou příliš dlouhé či matoucí. Léčiva mají tedy svůj generický název či INN (mezinárodní nechráněný název), který běžně vznikne zkrácením názvu systematického. WHO (Světová zdravotnická organizace) eviduje název generický, který se objevuje ve farmaceutické nebo chemické literatuře. Léčiva nesou též různé obchodní názvy (trade names) díky rozmanitosti farmaceutického průmyslu [7]. Typy názvů jsou uvedeny v *Tabulce 2*.

Tabulka 2: Příklad názvosloví Ibuprofenu (převzato z [10])

Systematický název (IUPAC)	(RS)-2-(4-(2-methylpropyl)fenyl)propanová kyselina
Generický název	Ibuprofen
INN název	Ibuprofen
Obchodní názvy	AKTREN, BRUFEN, DOLGIT, EXNEURAL, IBUMERCK, MOTRIN, NUROFEN, aj.

2.1.3 Rozdělení léčiv

Tabulka 3: Rozdělení léčiv (převzato z [7])

Analgetika	
<i>Nenarkotická analgetika</i>	Deriváty anilinu, deriváty kyseliny salicylové, deriváty kyseliny anthranilové, arylalkanové kyseliny, deriváty pyrazonolu a pyrazolidindionu, arylsulfonamidy (oxikamy), inhibitory COX-2
<i>Narkotická analgetika</i>	
Léčiva ovlivňující centrální nervový systém	
<i>Celková anestetika</i>	Inhalační anestetika, intravenózní anestetika
<i>Sedativa a hypnotika</i>	Karbamáty, alifatické acylmočoviny (ureidy), deriváty barbiturové kyseliny a dioxopiperidiny, benzodiazepiny, hypnotika 3. generace
<i>Psychofarmaka</i>	Neuroleptika, antidepresiva, anxiolytika, psychostimulancia, nootropika a léčiva Alzheimerovy choroby, psychodysleptika
<i>Antiepileptika, antiparkinsonika, antimigrenika</i>	
Léčiva ovlivňující vegetativní nervový systém	
<i>Adrenergika</i>	α -adrenergika, α 2-adrenergika, β 1-adrenergika, β 2-adrenergika, nepřímá adrenergika
<i>Antiadrenergika</i>	α -antiadrenergika, β -antiadrenergika
<i>Cholinergika</i>	Přímá cholinergika, nepřímá cholinergika, ireverzibilní inhibitory acetylcholinesterasy
<i>Anticholinergika</i>	Neurotropní a neurotropně-myotropní spasmolytika, myotropní spasmolytika

Tabulka 4: Rozdělení léčiv – pokračování (převzato z [7])

Lokální anestetika a myorelaxancia	
<i>Lokální anestetika</i>	
<i>Myorelaxancia</i>	Periferní myorelaxancia – kurarimimetika, centrální myorelaxancia
Antialergika a antihistaminika	
<i>Antialergika</i>	Hypohistaminika, H1 Antihistaminika
<i>H2 Antihistaminika</i>	
Léčiva oběhové soustavy	
<i>Antihyperlipidemika</i>	Pryskyřice vážící žlučové kyseliny, léčiva ovlivňující syntézu lipoproteinů, deriváty α -aryloxyalkanových kyselin – fibráty, inhibitory HMG-CoA reductasy – statiny, ostatní antihyperlipidemika
<i>Léčiva ovlivňující srážlivost krve</i>	Antitrombotika, hemostatika
<i>Vasodilatancia</i>	Estery kyseliny dusité a dusičné, antagonisté iontů vápníku, periferní vasodilatancia, léčiva erektilních poruch
<i>Antihypertenziva</i>	Látky blokující sympatikus, přímá antihypertenziva, inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACE) a antagonisté angiotensinu II
<i>Léčiva ovlivňující činnost srdečního svalu</i>	Kardiotonika, antidysrytmika
Léčiva trávicí a vylučovací soustavy	
<i>Antacida, antiulceróza a cytoprotektiva</i>	Antacida, antiulceróza, cytoprotektiva
<i>Léčiva používaná k terapii jaterních poruch</i>	Cholagoga, hepatoprotektiva
<i>Perorální antidiabetika</i>	Deriváty sulfonylmočoviny, deriváty biguanidu, thiazolidindiony
<i>Léčiva ovlivňující vylučování</i>	Diuretika a saluretika, laxativa, antidiaroika
Antitusika a expektorancia	
<i>Antitusika</i>	Antitusika opioidního typu, antitusika neopoidního typu
<i>Expektorancia</i>	

Tabulka 5: Rozdělení léčiv – pokračování (převzato z [7])

Látky používané k prevenci a terapii infekčních a parazitárních chorob	
<i>Dezinfekční látky a antiseptika</i>	Oxidační činidla, halogeny, sloučeniny kovů, alkoholy, fenoly, aldehydy, kyseliny, povrchově aktivní látky, trifenylmethanová barviva
<i>Antibakteriální chemoterapeutika</i>	Sulfonamidy, deriváty chinolonů
<i>Antimykotika</i>	Karboxylové kyseliny a jejich deriváty, deriváty imidazolu, ostatní antimykotika
<i>Antiprotozoální léčiva</i>	Antimalarika, ostatní antiprotozoika
<i>Antibiotika</i>	β -Laktamová antibiotika, tetracykliny a anthracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, peptidová antibiotika, ostatní antibiotika
<i>Antivirotika, antimykobakteriální léčiva</i>	
Cytostatika	
<i>Alkylační činidla, antimetabolity, ostatní protinádorová léčiva</i>	
Vitaminy	
<i>Vitaminy rozpustné v tucích</i>	Vitaminy skupiny A, vitaminy skupiny D, vitaminy skupiny E (tokoferoly), vitaminy skupiny K
<i>Vitaminy rozpustné ve vodě</i>	Vitaminy skupiny B, kyselina listová - vitamin M, vitamin C - kyselina askorbová, vitamin H – biotin, ostatní sloučeniny s účinky vitaminů
Hormony	
<i>Hormony – aminokyseliny</i>	
<i>Peptidové hormony</i>	Hormony hypothalamu a hypofýzy, hormony slinivky břišní
<i>Steroidní hormony</i>	Estrogeny, inhibitory estrogenů, gestageny, androgeny a anabolika, hormony kůry nadledvin (adrenokortikosteroidy)

2.2 Antimikrobiální léčiva – antibiotika a chemoterapeutika

K infekci dochází, proniknou-li choroboplodné (patogenní) mikroorganismy (bakterie, viry, plísňe, prvoci) nebo cizopasně mnohobuněčné organismy (červi) do organismu a dojde následně k jejich pomnožení. Tyto procesy následně vedou ke vzniku infekční choroby. K prevenci infekce se užívají především dezinfekční látky, antiseptika a germicidy. K potlačení již vzniklé infekce jsou používány antibiotika, antibakteriální chemoterapeutika, antimykotika, antivirotika či antiprotozoální léčiva [7].

V ideálním případě vykazuje antimikrobiální léčivo selektivní toxicitu vůči parazitům, aniž by došlo k poškození hostitele. Většinou je ale selektivita toxicity spíše relativní a znamená to, že léčivo poškozuje mikroorganismy v množství, které je pro hostitele stále únosné [7].

Léčiva s antibakteriálními účinky dělíme na dvě skupiny, a to na **antibiotika**, která jsou získávána zpravidla biosynteticky a na **chemoterapeutika**, která jsou připravena synteticky [6]. Zástupci antibiotik a chemoterapeutik jsou uvedeny v *Tabulce 5*. Antibiotikum či chemoterapeutikum je činidlo, které inhibuje (**bakteriostatická léčiva**) nebo zastavuje (**bakteriocidní léčiva**) růst bakterií [12, 13].

2.2.1 Mechanismy působení antimikrobiálních léčiv

- Inhibice syntézy buněčné stěny (β -laktamová antibiotika)
- Změna permeability buněčné membrány a změna aktivního transportu přes tuto membránu (antifungální azoly)
- Inhibice syntézy proteinů (tetracykliny)
- Inhibice syntézy nukleových kyselin (**chinolony** a sulfonamidy) [7]

2.2.2 Původ antimikrobiálních léčiv

- Produkce aktinomycetami (streptomycin)
- Produkce bakteriemi (polypeptidy)
- Produkce plísněmi (penicilin)
- Syntetická produkce (chemoterapeutika) [11]

2.2.3 Spektra účinnosti antimikrobiálních léčiv

- Úzké spektrum působení
- Střední spektrum působení
- Široké spektrum působení [11]

Antimikrobiální spektrum je výčet mikrobiálních kmenů a druhů citlivých k dané substanci. **Antimikrobiální účinnost** stanovuje míru účinku substance. Lze ji vyjádřit pomocí **MIC** (minimální inhibiční koncentrace), což je nejnižší koncentrace dané substance, která zastaví růst příslušného mikroorganismu, nebo prostřednictvím **MBC** (minimální baktericidní koncentrace), charakterizované jako nejnižší koncentrace dané substance, která způsobí usmrcení příslušného mikroorganismu [7, 13].

2.2.4 Antibiotická rezistence

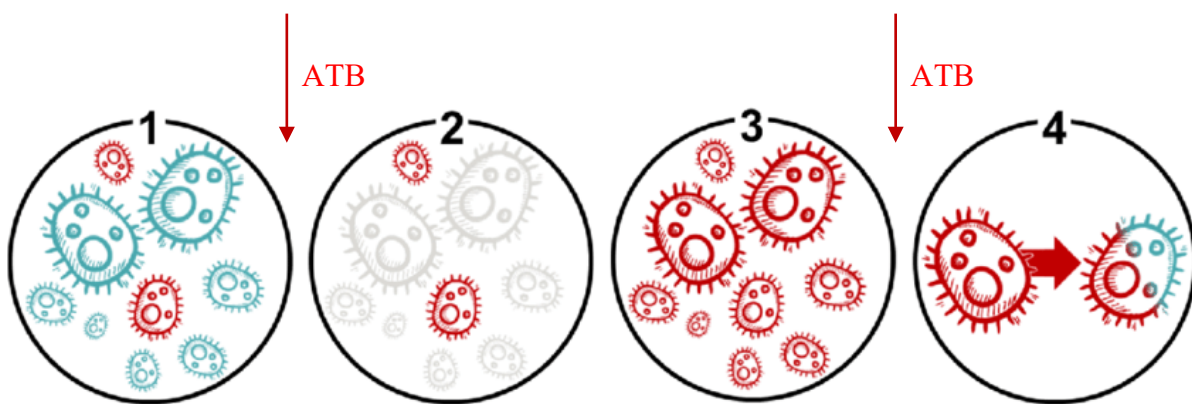
Rezistence mikroorganismu je charakterizována jako schopnost odolávat účinkům antimikrobiální substance [7]. Dnes je tato rezistence velmi diskutovanou a sledovanou záležitostí v globálním měřítku ať už pro lidské zdraví nebo potravinovou bezpečnost a rozvoj. Její výskyt je přirozený, ale nesprávné a nadměrné zacházení s antibiotiky v humánní i veterinární medicíně tyto procesy značně podporují a urychlují. Například u nemocí jako je zápal plic či tuberkulóza jsou nároky na léčbu stále obtížnější, protože antibiotika ztrácejí na své účinnosti. To může mít následující dopady, a to prodloužení pobytu v nemocnici, nasazení dražších a účinnějších léků, což představuje především ekonomickou zátěž. Dále jsou pak ohroženy některé náročné zákroky, jako jsou transplantace orgánů nebo císařské řezy. Tyto zákroky jsou bez účinných antibiotik mnohem více ohrožující kvůli možnému vzniku infekce. Preventivní opatření pro předcházení antibiotické rezistence jsou: používání antibiotik pouze po předepsání certifikovaným zdravotníkem, nesdílení a nepožívání zbytků antibiotik z předchozí léčby, dodržování správné hygieny, předepisování antibiotik pouze v případě

nutnosti, šíření povědomí o problematice, podávání antibiotik zvířatům pouze pod přísným dohledem veterináře, nepoužívání antibiotik k podpoře růstu a prevenci zdravých zvířat, vakcinace zvířat, aj. [3].

Antibiotická rezistence může být **primární** (přirozená), která je dána genetickou výbavou mikroorganismu, nebo **sekundární** (získaná), která vzniká mutacemi nebo přenosem genu rezistence pomocí plazmidů a transpozonů [7, 14].

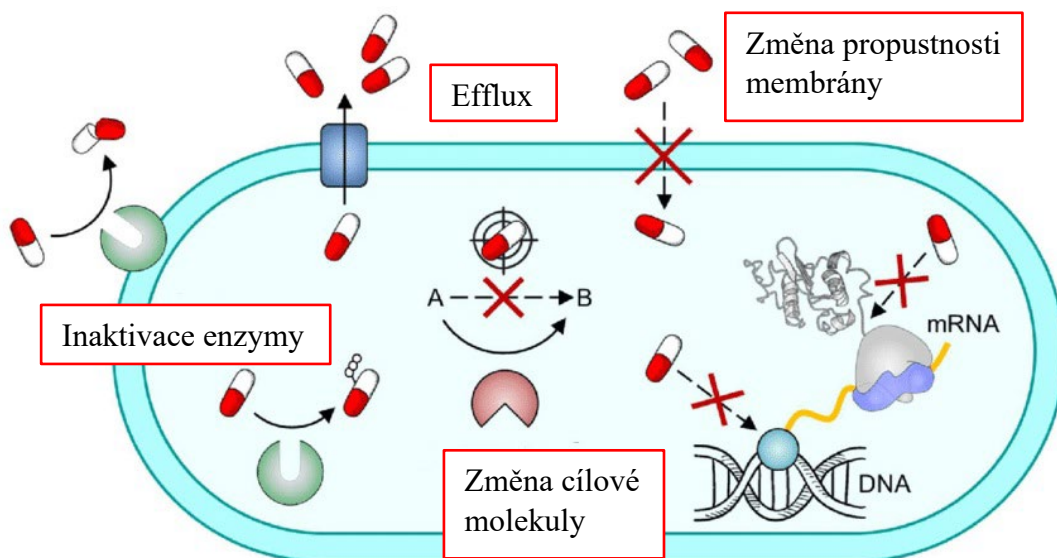
Mechanismy vzniku antibiotické rezistence

- Změna cílové molekuly
- Zhoršený průnik do buňky (změna propustnosti membrány)
- Efflux (aktivní transport substance z buňky)
- Inaktivace enzymy [14, 15]



Populace bakterií (modré), v níž se vyskytuje subpopulace rezistentních bakterií (červené).	Běžné bakterie jsou působením antibiotik usmrceny, rezistentní subpopulace přežije.	Dochází k rozmnožení rezistentních bakterií.	Dalším působením antibiotik dojde k upevnění genetické informace rezistence, geny se přenášejí.
---	---	--	---

Obrázek 1: Obecné schéma vzniku a nárůstu kolonií rezistentních bakterií (převzato z [16], upraveno)

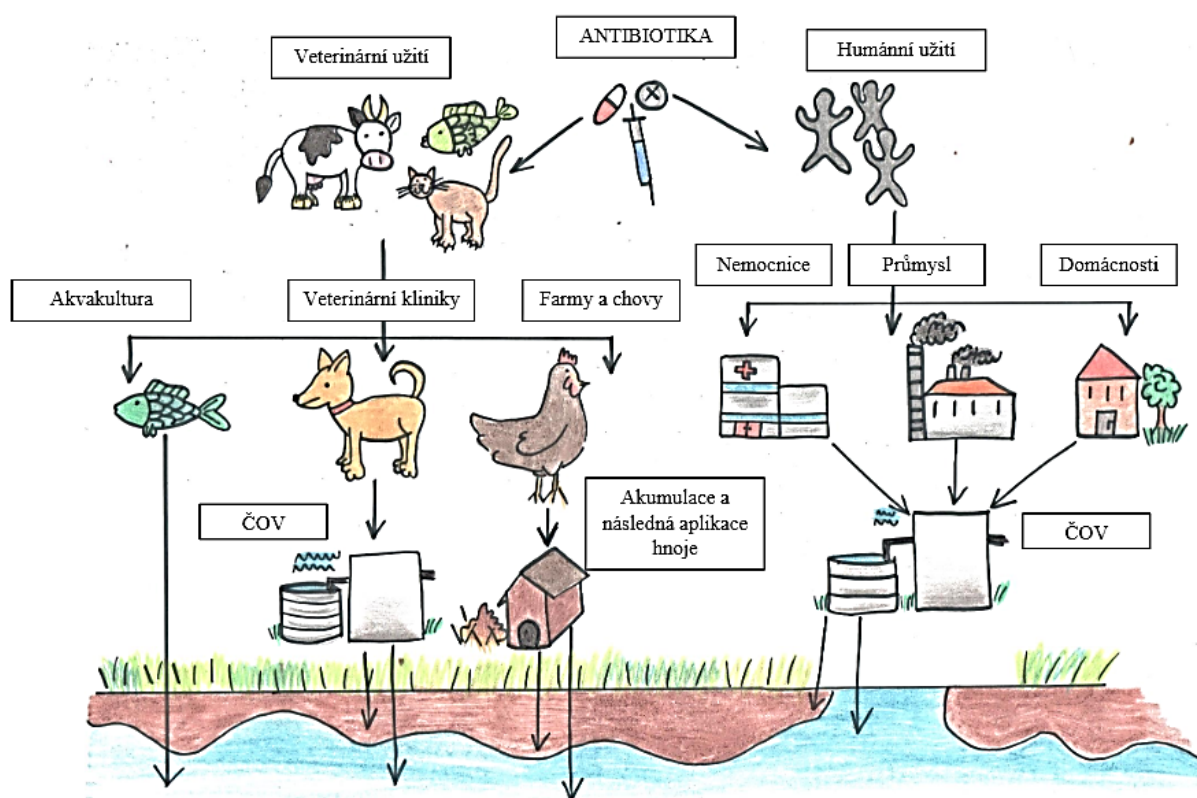


Obrázek 2: Znázornění mechanismů v bakteriální buňce vedoucích ke vzniku antibiotické rezistence (převzato z [17], upraveno dle [15])

2.2.5 Antibiotika a chemoterapeutika v životním prostředí

Od objevení penicilinu roku 1928 sirem Alexandrem Flemingem, jsou antibiotika běžnou součástí léčby infekcí vyvolaných bakteriemi. Dnes jsou antibiotika běžně využívána jak v humánní, tak ve veterinární medicíně. Ve veterinární medicíně jsou využívána nejen k léčbě, ale i k prevenci chorob [1]. V humánní medicíně jsou antibiotika často předepisována zbytečně, nebo je lidé užívají preventivně. Obecně tedy dochází k rostoucí spotřebě těchto látek [2].

Zdroji antibiotik, která se dostávají do životního prostředí, jsou odpady a odpadní vody z domácností, z nemocnic, z farmaceutického průmyslu, z veterinárních klinik nebo z živočišných farem. V domácnosti lidé vylučují zbytky léčiv nebo je nevhodně likvidují. Na farmách jsou zbytky léčiv vylučována zvířaty prostřednictvím exkrementů a moči. Hnůj obohacený o léčiva bývá aplikován do půdy [2, 19]. Dojde k šíření antibiotik v životním prostředí a vzniku antibiotické rezistence, která je dnes velmi diskutovaným a obávaným problémem (popsána v kapitole 2.2.4) [3]. V bakteriální buňce dojde k mutaci, přežije, přizpůsobí se a dále se množí jako ARB (bakterie rezistentní vůči antibiotikům) nesoucí ARG (geny antibiotické rezistence). Šíření rezistence dále podporují také mobilní genetické elementy (MGE), u kterých dochází k horizontálnímu přenosu. ARG se stávají mobilní [20].



Obrázek 3: Schématické znázornění transportu antibiotik v životním prostředí (přepřacováno podle publikací [18] a [1])

Antibiotika ve vodě

Léčiva se do vody dostávají prostřednictvím odpadních vod ať už z domácností (exkrementy, moč) nebo z nemocnic a farmaceutického průmyslu. Odpadní vody jsou vedeny do ČOV (čistírny odpadní vody), kde mnohdy nejsou dostatečně ošetřeny a vody obsahující rezidua léčiv jsou vypouštěny do povrchových vod a dochází k jejich transportu. Metody využívané pro eliminaci léčiv z vody mohou být koagulace, flokulace, využití aktivního uhlí, pokročilé oxidační procesy (např. aplikace UV záření a peroxidu vodíku), membránové technologie nebo biologické procesy (anaerobní digesce) [19]. V závislosti na vlastnostech se léčiva mohou ukládat i v sedimentech a tvořit tak rezervoáry [21]. Dalším zdrojem mohou být akvakultury. V rámci mezinárodní studie provedené v roce 2021 byla sledována tato léčiva: ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, metronidazol, trimethoprim, erythromycin a sulfomethoxazol. Kvůli zaměření diplomové práce na fluorochinolony jsou v *Tabulce 6* pro ilustraci uvedeny maximální zjištěné koncentrace ciprofloxacinu pro vybrané země [19].

Tabulka 6: Maximální zjištěné koncentrace ciprofloxacinu pro vybrané země a vybrané typy vod (převzato z [19])

Země - typ vody	Maximální zjištěná koncentrace ciprofloxacinu [ng/l]
Španělsko - odpadní voda	13625
Austrálie - odpadní voda	6900
Keňa - povrchová voda	1300
SAE - odpadní voda	1028
Kostarika - povrchová voda	740
USA - odpadní voda	377
Brazílie - odpadní voda	33,7

Antibiotika v půdě

Způsoby, jak se antibiotika dostávají do půdy, nejčastěji bývají zavlažování půdy odpadní vodou obsahující antibiotika, nebo aplikace kejdy či kalu obsahující antibiotika. Odpadní vody se k zavlažování používají běžně v oblastech sucha kvůli nedostatku vody vlivem změny klimatu, urbanizace nebo znečištění. Zvířecí hnůj nebo kal z ČOV jsou rozmetány do půdy a mohou tak přispívat ke kontaminaci životního prostředí. Hnůj může obsahovat značný podíl vyloučených antibiotik, protože zvířata jsou schopna metabolizovat pouze určitý podíl. V závislosti na vlastnostech může dané léčivo následně setrvávat v půdě, nebo je přijímáno rostlinami [22]. Pro studium a kontrolu osudu antibiotik v půdě je důležité zjistit co nejvíce o jejich transportu, degradabilitě či sorpčním chování. Vše závisí jak na vlastnostech daného léčiva (např. struktura, polarita, hydrofobicita), tak na vlastnostech půdy (pH, půdní typ, obsah půdní organické hmoty) [23]. Alternativou, jak zabránit šíření genů rezistence a omezit výskyt antibiotik v životním prostředí, může být zpracování odpadů obsahující antibiotika pomocí anaerobní digesce, kompostování nebo vermikompostování [24].

→ *Adsorpční procesy*

Adsorpce antibiotik v půdě ovlivňuje jejich mobilitu, degradaci a biologickou dostupnost [23]. Adsorpci ovlivňují především funkční skupiny antibiotik. Z vlastností půdy jsou to textura, pH, obsah iontů (např. Ca^{2+} , Mg^{2+}) a obsah půdní organické hmoty. Podle provedené studie se v hlinito-jílovité zemědělské půdě ochotně sorbují tetracykliny a rovněž i fluorochinolony. Dochází u nich ke kationtové výměně a tvorbě vodíkových můstků. Interagují s půdní organickou hmotnou. Naopak sulfonamidy bývají velmi mobilní [22, 23].

→ *Transportní procesy*

Antibiotika mohou být transportována do vodního prostředí. Transport je ovlivněn klimatickými podmínkami (srážky), vlastnostmi antibiotik (funkční skupiny) a vlastnostmi půdy (porozita, pH) [23]. Dlouhodobé srážky a kyselé deště výrazně ovlivňují migraci antibiotik z hnoje do půdy. Vyluhovatelnost úzce souvisí se sorpčními procesy. Například sulfonamidy vykazují potenciál pro snadnou migraci z půdy do vody [22].

→ Degradční procesy

Antibiotika jsou degradována biotickými nebo abiotickými procesy. Mezi abiotické procesy patří fotodegradace a chemické přeměny (hydrolýza, oxidace, redukce). Hlavní roli při degradaci antibiotik hraje biodegradace, která je zprostředkována mikroorganismy v půdě. Je závislá na přítomnosti a množství kyslíku, pH, teplotě, vlhkosti, stupněm adaptace populace mikroorganismů, dostupnosti živin, struktuře odbourávané látky a její dostupnosti [22]. V půdě také mohou některá antibiotika vzájemně interagovat, což může biodegradaci také ovlivnit. Některá antibiotika mohou inhibovat mikroby, kteří se podílejí na degradaci jiných antibiotik [23].

→ Příjem rostlinami

Podmínky pro příjem léčiv rostlinou opět závisí na mnoha faktorech, ať už na vlastnostech daného léčiva nebo na charakteristice daného prostředí, v němž se rostliny pěstují. Pro studium transportu léčiv se zakládají skleníkové nebo hydroponické experimenty. Látky jsou přijímány kořeny rostlin a následně vedeny do stonku, listů a v některých případech i do plodů [22].

2.3 Fluorochinolony

Tato skupina léčiv byla do klinické praxe uvedena koncem 60. let 20. století. Mechanismus účinku je inhibice DNA gyrázy. DNA gyráza (topoizomeráza II) je enzym, který zprostředkuje uspořádání DNA dvoušroubovice do chromozomů. Chinolony se dělí do 4 generací (Tabulka 7). Oproti první generaci derivátů chinolonů, které působily pouze proti gramnegativním bakteriím, působí poslední generace proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím. Většina derivátů chinolonů nachází uplatnění pro léčbu infekcí močových cest. Novější generace se využívá při léčbě respiračních onemocnění [7].

Tabulka 7: Rozdělení chinolonů podle generací a jejich použití v praxi, kurzívou označeny antibiotika používaná výhradně veterinárně (zpracováno dle [25] a [26]).

Generace	Zástupci	Použití
I.	Kyselina nalidixová, kyselina oxolinová, cinoxacin	Již nejsou v ČR dostupné, užívané pro léčbu infekcí močových cest
II.	Norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, prulifloxacin, pefloxacin, <i>enrofloxacin,</i> <i>marbofloxacin,</i> <i>danofloxacin, orbifloxacin,</i> <i>sarafloxacin</i>	Užívané proti bakteriím <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium avium-intracellulare</i> Užívané při laboratorních testech na antibiotickou rezistenci
III.	Gatifloxacin, pazufloxacin, sparfloxacin, atosufloxacin	Nejsou v ČR registrovány
IV.	Moxifloxacin	Užíván pro léčbu meningitidy u pacientů s alergií na β -laktamová antibiotika, chlamydií

Fluorované deriváty začaly vznikat během 90. let 20. století. Bylo zjištěno, že substituce fluorem na chinolonovém jádru až desetkrát zvyšuje antibakteriální účinky. Substituenty bylo dosaženo specifických vlastností látek, které se nyní využívají pro léčebné účely [27]. Fluorochinolony jsou rezervní antibiotika, slouží jako záložní, když primární léčba nefunguje [28, 29]. Jsou důležitou součástí klinické praxe, neboť mají široké spektrum účinku. Jejich výhodou je výborné vstřebání z gastrointestinálního traktu po perorálním podání. Nevýhodou je rychlý vznik antibiotické rezistence. Od roku 2001 je v ČR registrován moxifloxacin (IV. generace), který spolehlivě inhibuje růst bakterií *Streptococcus pneumoniae* [27]. Jsou to gram pozitivní, fakultativně anaerobní bakterie, které způsobují infekce plic, meningitidu nebo záněty středního ucha [30, 31].

Při použití fluorochinolonů veterinárně je nutno dbát na správnou diagnostiku původce a vyšetření citlivosti. Používají se na léčbu infekcí, kde jiná antibiotika měla slabou odezvu, nebo se slabá odezva očekává. Enrofloxacin je využíván k léčbě infekcí trávicího, urogenitálního a respiračního ústrojí. Marbofloxacin se využívá u malých zvířat při léčbě kožních infekcí, respiračních a močových cest, u prasat a skotu k léčbě respiračních infekcí. Orbifloxacin je podáván injekčně kočkám a psům. Sarafloxacin slouží k medikaci kuřat a krůt [26].

Fluorochinolony patří na seznamu WHO (2019) v 6. vydání mezi HP CIAs (antimikrobika s kritickým významem nejvyšší priority pro humánní medicínu [5]. Relevantním dokumentem pro veterinární medicínu je směrnice EU EMEA/CVMP/055, která stanovuje limity reziduí léčiv v hnoji, a to takové, aby nebylo nepřesáhnuo 100 µg léčiva na kg hnoje a 10 µg léčiva na kg půdy hnojené hnojem [32].

Co se týče spotřeby fluorochinolonů, v roce 2020 činila v rámci České republiky za rok 2020 1,94 mg/ PCU (populačně korekční jednotku). Od roku 2010 do roku 2022 narostla spotřeba fluorochinolonů o 48,6 %. Nejvyšší spotřeby fluorochinolonů v rámci Evropy mají Polsko (12,0 mg/PCU) a Maďarsko (11,6 mg/PCU) [5].

2.3.1 Antibiotická rezistence na fluorochinolony

V medicíně a mikrobiologii platí, že se na antibiotikum dříve či později vytvoří rezistentní kmeny bakterií. Ani u fluorochinolonů tomu není jinak. Podle EARSS (The European Antimicrobial Resistance Surveillance System) se za posledních deset let v ČR rezistence k fluorochinolonům u kmenů *Escherichia coli* nebo *Klebsiella pneumoniae* zvýšila. Počet rezistentních kmenů *Pseudomonas aeruginosa* se v ČR dlouhodobě pohybuje pod 50 %. Růst bakteriální rezistence je způsoben nadužíváním těchto léčiv. I když se ve veterinární medicíně používají většinou jiné přípravky než v humánní, existuje riziko přenosu rezistentních bakterií ze zvířat do lidské populace. V ČR se objevily rezistentní kmeny *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis* v drůbežích chovech [27].

Získaná antibiotická rezistence je nejčastěji zprostředkována mutací genů řídících replikaci a segregaci chromozomální DNA. Dalšími mechanismy vzniku rezistence je aktivní efflux fluorochinolonů z bakteriální buňky nebo změna propustnosti vnější membrány (Obrázek 2) [25].

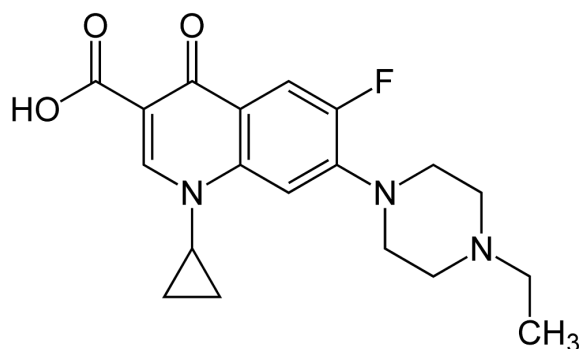
2.3.2 Fluorochinolony v životním prostředí

Fluorochinolony jsou široce využívány kvůli jejich širokému spektru působení, a proto antibiotická rezistence v posledních deseti letech narostla. Léčiva se šíří životním prostředím. Kontaminují odpadní vody, které jsou využívány k zavlažování. Hnůj obsahující rezidua léčiv je využit jako hnojivo. Hnůj je značně koncentrovaný, protože zvířata nejsou schopna velkou část antibiotik metabolizovat. Fluorochinolonomá antibiotika se používají k podpoře růstu hospodářských zvířat a k prevenci nebo léčbě několika chorob zvířat. Mohou se nacházet ve vodách, sedimentech a půdě [32, 33].

Fluorochinolony mají zanedbatelnou těkavost a velkou tendenci k sorpci na pevné útvary (sedimenty, půda). Jsou to zwitteriontové sloučeniny, takže jejich forma výskytu závisí na pH a umožňuje to různé interakce s médiem [32].

Chování fluorochinolonomů v půdě závisí na sorpčních procesech. Záleží na vlastnostech půdy (obsah půdní organické hmoty, obsah jílu, pH, přítomnost některých iontů). Jakmile antibiotika vstoupí do půdy, probíhají sorpční a desorpční procesy, což má vliv na perzistenci a toxicitu. Mají kyselou i zásaditou funkční skupinu a jejich forma závisí na pH. Mohou interagovat s půdou pomocí kationtové výměny či vodíkových vazeb. Půda také obsahuje ionty Ca^{2+} , Mg^{2+} a Al^{3+} . Fluorochinolony s nimi interagují a mohou tvořit stabilní komplexy [32].

2.3.3 Enrofloxacin



Obrázek 4: Struktura enrofloxacinu [34]

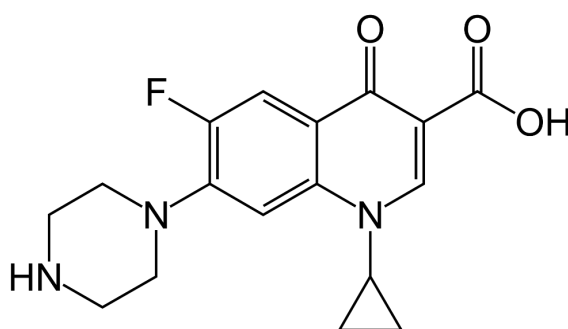
Tabulka 8: Charakteristické vlastnosti enrofloxacinu (zpracováno dle [32] a [35])

IUPAC název	1-cyklopropyl-7-(4-ethylpiperazin-1-yl)-6-fluor-4-oxochinolin-3-karboxylová kyselina
Sumární vzorec	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_3$
Molekulová hmotnost [g/mol]	359,4
Vzhled	Světle žlutá krystalická látka
$\text{pK}_{\text{a}1}$	6,27
$\text{pK}_{\text{a}2}$	8,3
$\log K_{\text{ow}}$	1,1

Enrofloxacin je baktericidní širokospektré fluorochinolonové antibiotikum. Je podáván výhradně ve veterinární medicíně, a to savcům, ptákům i plazům nejčastěji ve formě tablet nebo injekčně [36 – 38]. Je účinný proti kožním infekcím, infekcím močových cest či respiračním onemocněním [39]. Jako ostatní chinolony inhibuje syntézu DNA v bakteriální buňce. Po podání bývá metabolizován na ciprofloxacin [38]. Obchodní názvy používané pro toto antibiotikum jsou Baytril či Enroxil [37, 40].

Mnoho studií dnes poukazuje na nárůst kmenů rezistentních bakterií, především *Escherichia coli*. Mechanismus vzniku rezistence je hlavně mutace enzymu gyrázy [38].

2.3.4 Ciprofloxacin



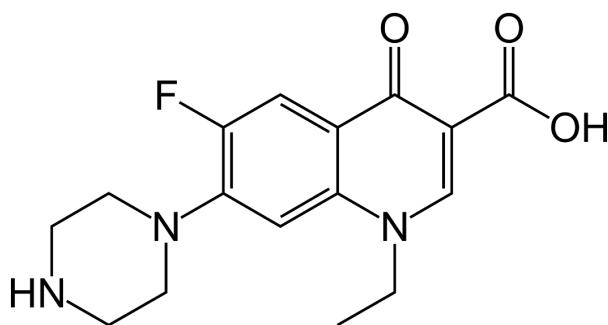
Obrázek 5: Struktura ciprofloxacinu [41]

Tabulka 9: Charakteristické vlastnosti ciprofloxacinu (zpracováno dle [32] a [42])

IUPAC název	1-cyklopropyl-6-fluor-4-oxo-7-piperazin-1-ylchinolin-3-karboxylová kyselina
Sumární vzorec	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃
Molekulová hmotnost [g/mol]	331,3
Vzhled	Světle žlutá krystalická prášková látka
pKa₁	5,9
pKa₂	8,89
logK_{ow}	0,4

Ciprofloxacin je baktericidní antibiotikum patřící ke II. generaci chinolonů. Využívá se k léčbě bakteriálních infekcí jak v humánní, tak ve veterinární medicíně [25]. Je podáván při onemocněních dýchacích a močových cest, kožních infekcích, pohlavních nemocích či při zánětech středního ucha a očí. Lze jej aplikovat ve formě tablet, roztoku (kapky, infúze) nebo masti. Ciprofloxacin se váže na DNA gyrázu a inhibuje syntézu DNA [43, 44]. Obchodní názvy používané pro toto antibiotikum jsou Ciprinol, Cifloxinal, Ciplox nebo Ciloxan [45]. Je aktivním metabolitem enrofloxacinu a v životním prostředí se vyskytuje v půdě, vodách i sedimentech [38, 46].

2.3.5 Norfloxacin



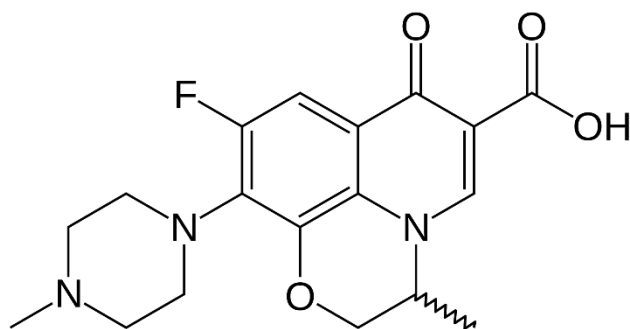
Obrázek 6: Struktura norfloxacinu [47]

Tabulka 10: Charakteristické vlastnosti norfloxacinu (zpracováno dle [48])

IUPAC název	1-ethyl-6-fluor-4-oxo-7-piperazin-1-ylchinolin-3-karboxylová kyselina
Sumární vzorec	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃
Molekulová hmotnost [g/mol]	319,33
Vzhled	Bílá až světle žlutá krystalická prášková látka
pKa₁	6,05
pKa₂	8,51
logK_{ow}	0,46

Norfloxacin je baktericidní antibiotikum patřící ke II. generaci chinolonů. Je účinný proti infekcím močových cest a prostatitidě [25, 48]. Lze jej využít i při léčbě kapavky [49]. Norfloxacin se váže na DNA gyrázu a inhibuje syntézu DNA [48]. Obchodní názvy používané pro toto antibiotikum jsou Nolicin či GyraBlock [50]. V životním prostředí se vyskytuje v půdě, vodě a velmi často se usazuje v sedimentech [51].

2.3.6 Ofloxacin



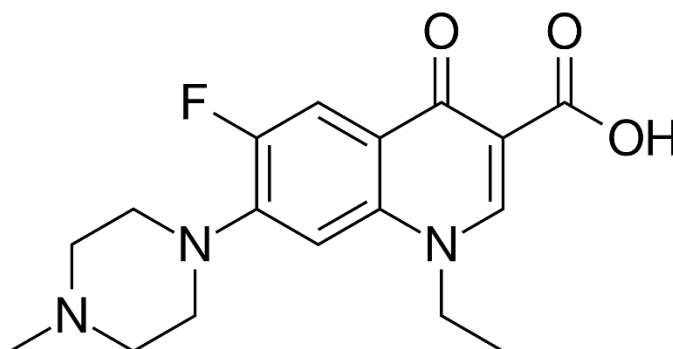
Obrázek 7: Struktura ofloxacinu [52]

Tabulka 11: Základní vlastnosti ofloxacinu (zpracováno dle [53])

IUPAC název	7-fluor-2-methyl-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-10-oxo-4-oxa-1-azatricyklo[7.3.1.0 ^{5'} 1 ³] trideka-5(13),6,8, 11-tetraen-11-karboxylová kyselina
Sumární vzorec	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄
Molekulová hmotnost [g/mol]	361,4
Vzhled	Šedobílá až světle žlutá krystalická prášková látka
pKa₁	5,97
pKa₂	9,28
logK_{ow}	-0,39

Ofloxacin je baktericidní antibiotikum patřící ke II. generaci chinolonů. Je účinný proti gramnegativním tyčinkám, infekcím močových a zažívacího traktu. Využívá se také ve formě kapek při léčbě infekcí očí a uší. Ofloxacin se váže na DNA gyrázu a inhibuje syntézu DNA [25, 53]. Obchodní názvy používané pro toto antibiotikum jsou Floxal, Ofloxin či Ofloxacin [54].

2.3.7 Pefloxacin



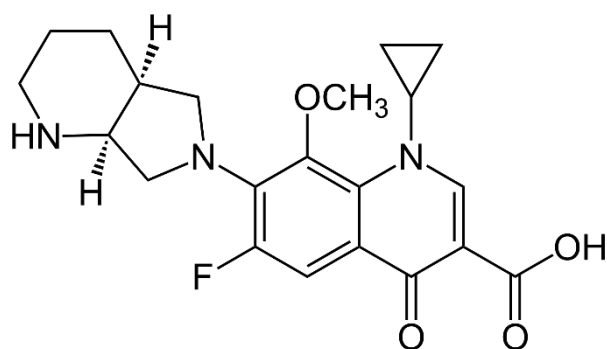
Obrázek 8: Struktura pefloxacinu [55]

Tabulka 12: Základní vlastnosti pefloxacinu (zpracováno dle [56])

IUPAC název	1-ethyl-6-fluor-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-4-oxochinolin-3-karboxylová kyselina
Sumární vzorec	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃
Molekulová hmotnost [g/mol]	333,36
Vzhled	Bílá až světle žlutá krystalická prášková látka

Pefloxacin je baktericidní antibiotikum patřící ke II. generaci chinolonů [25]. Funguje jako inhibitor DNA gyrázy a topoizomerázy IV. Účinkuje proti gramnegativním aerobním bakteriím, jako jsou *E. coli* a *Neisseria gonorrhoea*, tak i proti grampozitivním bakteriím. Nasazuje se např. při léčbě střevních infekcí [57]. Používaným obchodním názvem je Abaktal [58].

2.3.8 Moxifloxacin



Obrázek 9: Struktura moxifloxacinu [59]

Tabulka 13: Základní vlastnosti moxifloxacinu (zpracováno dle [59])

IUPAC název	1-Cyklopropyl-6-fluor-7-((4aS,7aS)-hexahydro-1H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-6(2H)-yl)-8-methoxy-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylová kyselina
Sumární vzorec	C ₂₁ H ₂₄ FN ₃ O ₄
Molekulová hmotnost [g/mol]	401,4
Vzhled	Světle žlutá krystalická prášková látka
pKa₁	6,3
pKa₂	9,14
logK_{ow}	0,95

Moxifloxacin patří ke IV. generaci fluorochinolonových antibiotik [25]. Blokuje enzymy, které jsou nezbytné pro opravu bakteriální DNA a bakterie nejsou schopny množení. Je účinný proti celé řadě bakterií. Využívá se u závažnějších akutních zánětů průdušek, u zápalů plic, u zánětů dutin a u gynekologických infekcí včetně hlubokých pánevních zánětů. Antibiotika obsahující moxifloxacin nejsou většinou předepisována primárně. Jsou nasazena spíše až dle doporučení lékaře, když primárně předepsaná antibiotika neúčinkují [60]. Obchodní názvy používané pro toto antibiotikum jsou Moxifloxacin, Avelox a Vigamox [61].

2.4 Analýza léčiv v životním prostředí

V dnešní době je snaha o multireziduální metody, aby v rámci jedné analýzy bylo sledováno co největší množství analytů. To má svá úskalí, protože je nutné zvolit kompromis v rámci stanovení. Při analýzách se využívají vnitřní standardy a laboratoře jsou často limitovány vybavením a instrumentací [62]. Léčiva se stanovují ve vodách, půdě, sedimentech a dalších pevných vzorcích (hnůj, podestýlky) [62, 63].

2.4.1 Sběr a uchování vzorků obsahujících léčiva

Vzorky vody

Vzorky vody jsou odebírány do lahví ručně či pomocí čerpadel [63, 64]. Jsou odebrány minimálně 2 litry vody. Pokud je ve vzorku přítomen zbytkový chlór, jsou k němu přidány thiosíran sodný nebo kyselina askorbová jako konzervační prostředky. Při transportu do laboratoře se vzorek udržuje pod teplotou 6°C. Pokud vzorky nejsou v co nejbližší době zpracovány, umisťují se do mrazničky [63].

Pevné vzorky

Vzorky mohou být pomocí vzorkovacího vybavení odebrány do příslušných nádob [63, 64]. Pokud vzorek obsahuje větší množství vody, je nutno mít dostatek pevné frakce. Při transportu do laboratoře se vzorek udržuje pod teplotou 6°C. Pokud vzorky nejsou v co nejbližší době zpracovány, umisťují se do mrazničky [63].

2.4.2 Extrakce vzorků obsahujících léčiva

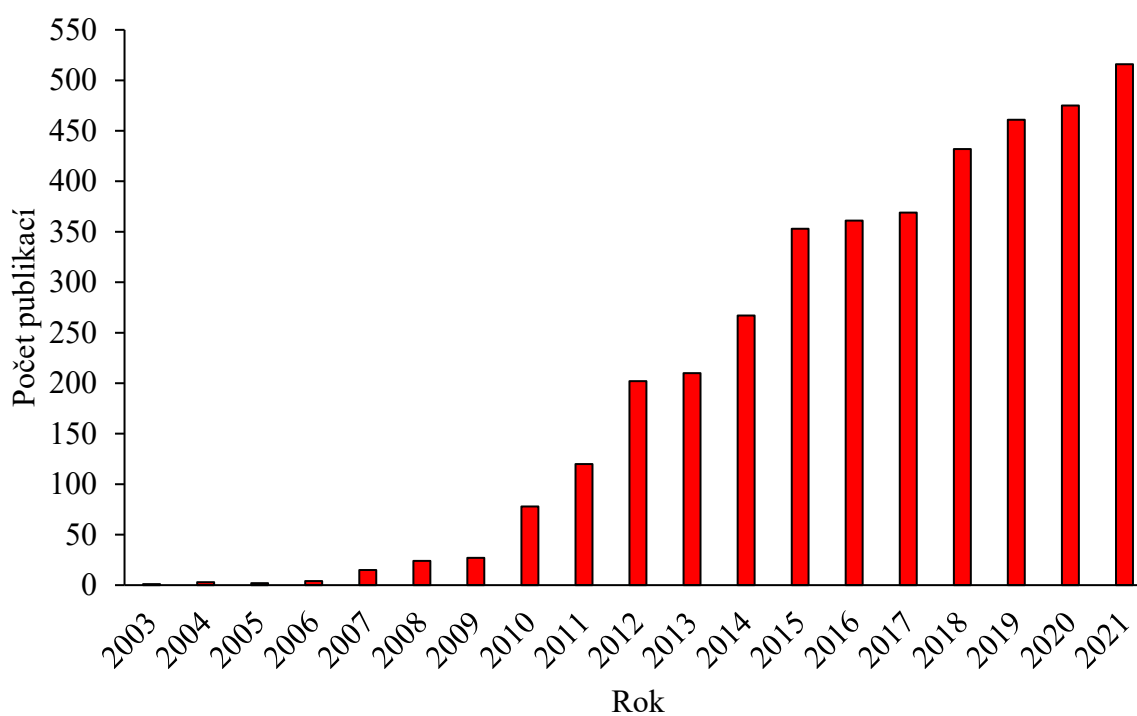
Dle typu vzorku je volen vhodný extrakční postup. Pokud jde o vzorek čisté vody, je možné jej analyzovat přímo bez předchozí úpravy. Na to je ale zapotřebí dostatečně citlivá instrumentace. U odpadní vody je třeba aplikovat čistící krok a vzorek zakonzentrovat. Lze použít metodu SPE (extrakce na tuhou fázi), kterou je nutno optimalizovat (např. výběr kolony, kondicionace, množství sorbentu, pH vzorku). U pevných vzorků je taktéž nutno analyty extrahovat, přechistit a poté i zakonzentrovat. Postup je závislý na vlastnostech dané matrice. Analýza je náročnější, je zde více kritických kroků. Často se objevuje matriční efekt [62, 63]. Analyty z pevných vzorků mohou být extrahovány pomocí ultrazvuku, SPE, mikrovlnnou extrakcí nebo metodou QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe; česky rychlé, jednoduché, levné, efektivní, robustní a bezpečné) [63, 65, 66]. Význam metody je uveden v *Tabulce 14*. Metoda QuEChERS je předmětem této diplomové práce a bude detailněji popsána.

QuEChERS

Laboratoře po celém světě se zabývají problematikou výskytu pesticidů ať už v potravinách nebo ve složkách životního prostředí již kolem 40 let [67]. Metoda QuEChERS byla vyvinuta Michelangelem Anastassiadesem v letech 2001 až 2002 během jeho pobytu na Eastern Regional Research Center ve Wyndmooru (Pennsylvánie, USA). Technika byla původně vyvinuta pro extrakci pesticidů ze vzorků ovoce a zeleniny. Představení nové techniky proběhlo poprvé v červnu 2002 v Římě na EPRW (European Pesticide Residue Workshop). Metoda byla postupem času různě upravována modifikována a její využití se tak rozšířilo i pro další analyty a matrice [68]. Využití metody postupem času nalézá čím dál širší uplatnění a počet publikací se od roku, kdy byla metoda uvedena, neustále zvyšuje (nárůst je graficky znázorněn na *Obrázku 6*) [69, 70].

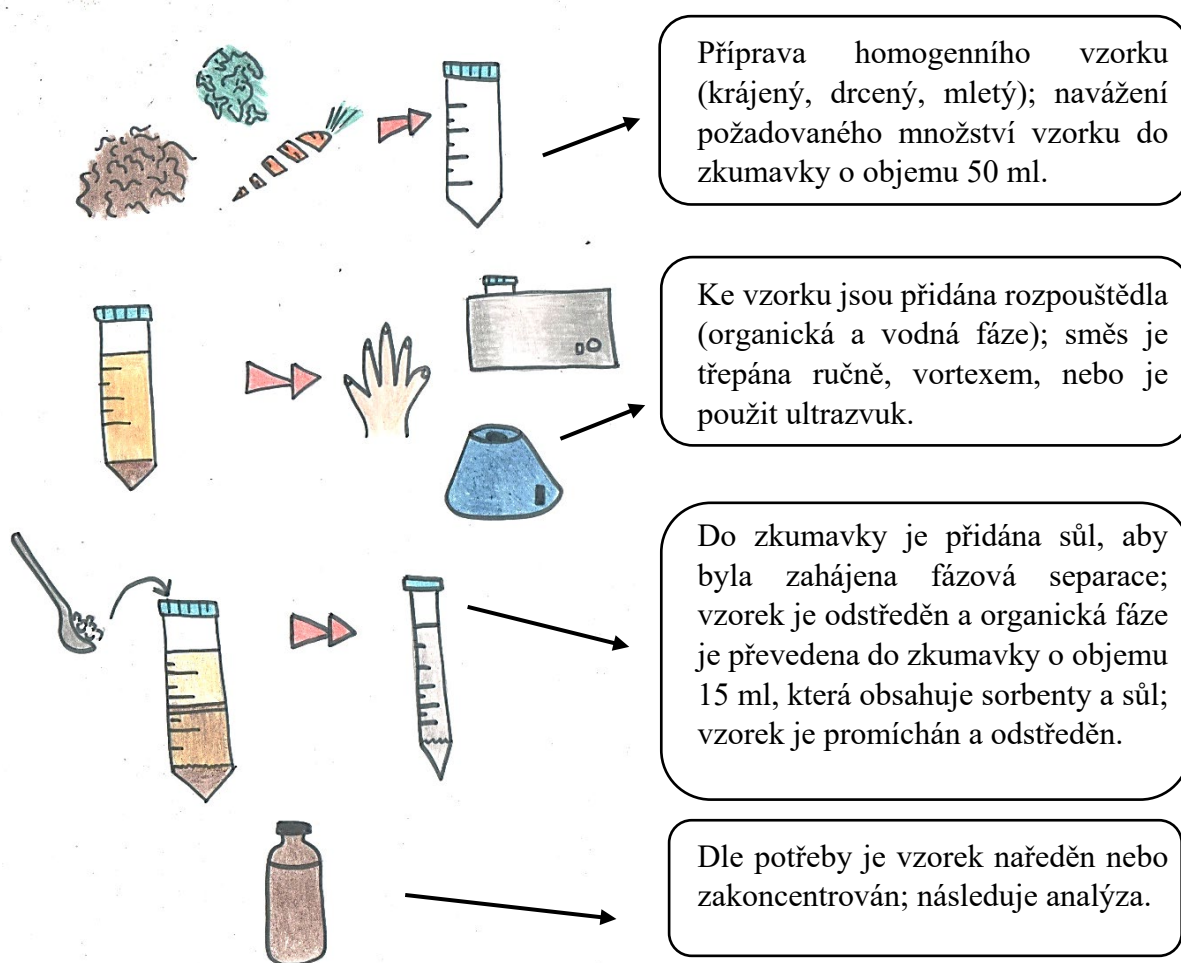
Tabulka 14: Význam metody QuEChERS a její výhody vyplývající z názvu (převzato z [69])

Quick (rychlé)	Zpracování relativně velkého množství vzorků v krátkém časovém úseku.
Easy (snadné)	Provedení není složité, kroky jsou jednoduché, nenáročné na vybavení.
Cheap (levné)	Je zapotřebí menší množství chemikálií (sorbentů, rozpouštědel).
Effective (efektivní)	Minimální ztráty analytů.
Rugged (robustní)	Metoda je vhodná pro různé látky, lze provést kdekoliv v laboratoři.
Safe (bezpečné)	Nejsou použita chlorovaná rozpouštědla, typický je acetonitril.



Obrázek 10: Grafické znázornění nárůstu publikací věnujících se metodě QuEChERS od roku 2003 do roku 2021 podle portálu Web of Science (vyhledáno dle [70])

Obecný postup extrakce



Obrázek 11: Znázornění a popis obecného postupu metody QuEChERS (převzato a přepracováno dle [68])

Účinnost extrakce je ovlivněna několika faktory. Jde o typ vzorku, volbu extrakčních rozpouštědel, množství rozpouštědel, typ soli, množství soli, pH, obsah vodné fáze, způsobu třepání a odstředění, typ sorbentu, (příklady jsou uvedeny v *Tabulce 15*) dobu extrakce apod. [71]. Konkrétní příklady využití metody QuEChERS jsou shrnuty v *Tabulce 16*.

Tabulka 15: Typy sorbentů využívaných v metodě QuEChERS a konkrétní příklady aplikací (převzato z [69])

Typ matrice (příklad)	Používaný sorbent
Běžná matrice (jablko, okurka)	PSA
Tukové matrice (cereálie)	PSA + C18
Pigmentované matrice (salát, víno)	PSA + C18 + aktivní uhlí
Velmi pigmentované matrice (špenát)	PSA + C18 + aktivní uhlí

Tabulka 16: Příklady využití metody QuEChERS pro různé analyty v různých maticích

Matrice	Analyty	Množství vzorku	Extrakční činidla	Způsob extrakce	Separační sůl	dSPE	Analýza	Odkaz
Zelenina (např. rajče, zelí, okurka)	Pesticidy	10 g	Acetonitril	Ruční třepání, vortex	MgSO ₄ , NaCl	PSA, C18, MgSO ₄	LC- MS/MS	[72]
Oliheň, makrela, tuňák	Estery kyseliny ftalové, di(2- ethylhexyl)adipát	5 g	Acetonitril	Míchání, vortex	Mravenčan amonný	PSA, C18, MgSO ₄	GC-MS	[73]
Med, včelí vosk	Pyriproxyfen	5 g	Voda, hexan, 1% kyselina mravenčí v acetonitrilu	Míchání, vortex	MgSO ₄ , NaCl, Na ₂ SO ₄	PSA, MgSO ₄	UPLC- MS/MS	[74]
Kal	β-Laktamová antibiotika	0,5 g	0,1 M EDTA, acetonitril	Ruční třepání, vortex	MgSO ₄ , NaCl,	PSA, C18	LC- MS/MS	[76]
Půda	Antibiotika	1 g	0,1 M EDTA, 1% kyselina octová v acetonitrilu	Ruční třepání, vortex	Octan sodný, Na ₂ SO ₄	PSA, C18, Na ₂ SO ₄	UPLC-MS (QTRAP)	[76]
Půda	Antibiotika	1 g	Mcllvainův pufr pH 2,6, acetonitril	Ruční třepání, vortex	Na ₂ SO ₄	PSA, C18, Na ₂ SO ₄	UPLC-MS (QTRAP)	[76]
Prasečí kejda	Veterinární antibiotika	1 g	Mcllvainův pufr pH 4, acetonitril, methanol	Ruční třepání, vortex, ultrazvuk	MgSO ₄ , NaCl	PSA, C18	LC- MS/MS	[77]
Odpadní voda	Fluorochinolony (ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin)	10 ml	0,1 M EDTA, acetonitril, methanol	Ruční třepání, vortex	Citronan disodný, citronan trisodný, MgSO ₄ , NaCl	PSA, MgSO ₄	HPLC	[78]

2.4.3 Instrumentace využívaná při analýze vzorků obsahujících léčiva

S rostoucím a častějším výskytem léčiv v životním prostředí je zapotřebí, aby v laboratořích byla k dispozici dostatečně robustní a spolehlivá analytická instrumentace pro kvantifikaci léčiv z reálných vzorků životního prostředí a pro odpovídající koncentrace, které se v nich mohou vyskytovat. Hlavními technikami využívanými při detekci léčiv jsou GC (plynová chromatografie) a LC (kapalinová chromatografie) v kombinaci s MS (hmotnostní spektrometrií) nebo tandemovou hmotnostní spektrometrií [79]. Lze využít i LC s detekcí pomocí UV/VIS (ultrafialové/viditelné světlo) či FLD (fluorescenčního) detektoru [80]. V případě GC je však nutný derivatizační krok nejčastěji komerčně dostupnými derivatizačními činidly např. MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid). Derivatizace vyžaduje více času i práce a je zde riziko kontaminace vzorků. I když patří GC-MS mezi rutinní analytický nástroj, pro analýzu léčiv se spíše využívá LC-MS, LC-MS/MS [62, 79].

Mezi využívané režimy LC při analýze léčiv patří např. RP (reverzní fáze), iontová výměna nebo SEC (vylučovací chromatografie). Stacionární fáze využívaná při analýze léčiv v režimu RP je nejčastěji silikagel modifikovaným C18 nebo C8. Co se týče mobilní fáze, je aplikován gradient ve složení acetonitril – voda či methanol – voda. Použité ionizační zdroje v hmotnostním spektrometru jsou nejčastěji ESI (elektrosprej) nebo APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku). Nejčastěji využívaný analyzátor je QqQ (trojitý kvadrupól), následuje IT (iontová past). Alternativním analyzátozem je TOF (analyzátor doby letu), což je technika vysokorozlišovací MS. Usnadňuje tak identifikaci sloučenin ve složitém vzorku jako je např. sediment [79]. Příklady využití kapalinové chromatografie při analýze léčiv jsou uvedeny v *Tabulce 17*.

V dnešní době jsou trendem multireziduální analýzy, při kterých lze simultánně stanovit více skupin léčiv, protože se v životním prostředí často vyskytují pohromadě. Většina úsilí se soustředí na analýzu mateřských nedegradovaných léčiv, avšak s rozvojem a pokrokem techniky jako je vysokorozlišovací MS je a bude možné identifikovat degradační produkty a také objasnit a stanovit jejich struktury. V tomto případě přichází na řadu hybridní analyzátozem jako např. Q-TOF (spojení kvadrupólu a analyzátozem doby letu) [81].

Tabulka 17: Příklady využití kapalinové chromatografie při analýze antibiotik v různých maticích

Matrice	Analyty	Extrakce	Analýza	Publikace
Půda	Chinolony	Ultrazvuk	HPLC s UV detekcí → Kolona: Atlantis™ dC 18 HPLC (150 mm × 3,0 mm, 3 μm) → Mobilní fáze: 3,16 mM HCOOH/acetonitril → Vlnové délky detekce: 260 nm, 280 nm	[82]
Kozí mléko	Chinolony	QuEChERS	UPLC-MS/MS → Kolona: ZORBAX Eclipse XDB C18 (1.8 μm, 2.1 × 50 mm) → Mobilní fáze: voda/acetonitril → Ionizace: ESI → Analyzátor: QqQ	[83]
Odpadní voda	Fluorochinolony (ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin)	QuEChERS	HPLC s UV a FLD (fluorescenční) detekcí → Kolona: Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) → Mobilní fáze: fosfátový pufr pH 3,9/acetonitril → Vlnové délky UV detekce: 274 nm, 280 nm → Vlnové délky FLD detekce: 230 nm, 460 nm	[78]
Vakcíny	β-Laktamová antibiotika	Vortex	LC-MS/MS → Kolona: SHISEIDO CAPCELL PAK C18 MG (150 mm × 2,0 mm, 5 μm) → Mobilní fáze: 0,1% HCOOH ve vodě/0,1% HCOOH v acetonitrilu → Ionizace: ESI → Analyzátor: QqQ-LIT	[84]
Mořská voda, mořský sediment	Antibiotika (flumechin, florfenikol, oxytetracyklin)	SPE	LC-MS → Kolona: Luna Omega 5 μm Polar C18 (100 Å, 100 mm × 2,1 mm) Phenomenex → Mobilní fáze: 0,1% HCOOH ve vodě/methanol → Ionizace: ESI → Analyzátor: TOF	[85]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V rámci experimentální části byl z dostupných publikací vybrán vhodný extrakční postup pro půdní matrici. Po výběru vyhovujícího postupu byly optimalizovány vybrané parametry, jako je složení vodné fáze, složení organické fáze, složení směsi solí pro separaci fází, složení směsi sorbentů pro dSPE, doba působení ultrazvuku, doba ručního třepání a přítomnost EDTA. Optimalizovaný extrakční postup byl aplikován na vzorky půdy a podestýlky (dodané od ÚKZUZ). Během semestru byly dokoupeny další standardy z řady fluorochinolonových antibiotik, které byly aplikovány do půdy a následně extrahovány pomocí optimalizovaného postupu. Byla vytvořena a optimalizována nová LC-MS metoda.

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Rozpouštědla

- Milli-Q voda
- Voda pro LC/MS, filtrovaná na 0,2 µm; VWR Chemicals BDH
- Acetonitril čistoty min. 99,9 % pro HPLC, Chromasolv, Sigma Aldrich (Německo)
- Methanol čistoty min. 99,9 % pro HPLC, Chromasolv, Sigma Aldrich (Německo)

3.1.2 Kyseliny

- Kyselina mravenčí čistoty min. 98 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Kyselina octová čistoty min. 99,8 %, Sigma Aldrich (Německo)

3.1.3 Soli

- Sodná sůl kyseliny octové čistoty 99 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Síran sodný bezvodý čistoty 99 %, Penta (Praha, ČR)
- Síran hořečnatý bezvodý čistoty min. 99,5 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Síran hořečnatý bezvodý, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Dusičnan hořečnatý hexahydrát čistoty min. 99 %, Penta (Praha, ČR)
- Chlorid sodný čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Citrát disodný seskvihydrát čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Citrát trisodný dihydrát čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Kyselina citronová monohydrát čistoty min. 99 %, Lach-Ner (Neratovice, ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát čistoty min. 99 % pro HPLC, Fluka (Švýcarsko)
- Chelaton III dihydrát čistoty min 99 %, Lach-Ner (Neratovice, ČR)

3.1.4 Sorbenty

- DSC-18 SPE; SUPELCO, Sigma Aldrich (Německo)
- PSA SPE; SUPELCO, Sigma Aldrich (Německo)

3.1.5 Standardy

- Enrofloxacin, Pharmaceutical Secondary Standard, CRM; Sigma Aldrich (Německo)
- Ciprofloxacin, Pharmaceutical Secondary Standard, CRM; Sigma Aldrich (Německo)
- Norfloxacin čistoty min. 98 % (TLC), Analytical standard; Sigma Aldrich (Německo)
- Ofloxacin čistoty min. 99 % (HPLC); Sigma Aldrich (Německo)
- Pefloxacin mesylate dihydrate; Sigma Aldrich (Německo)
- Moxifloxacin Hydrochloride, Pharmaceutical Secondary Standard, CRM; Sigma Aldrich (Německo)

3.1.6 Deuterované standardy

- Enrofloxacin - d₅ hydrochloride čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Ciprofloxacin - d₈ hydrochloride hydrate čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich (Německo)

3.2 Použité přístroje a laboratorní vybavení

- Přístroj pro přípravu Milli-Q vody Milli-Q Millipore, Academic
- Kapalinový chromatograf UHPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies (USA)
 - Kolona Luna® Omega Polar C18 Phenomenex, (100 x 2,1 mm; 1,6 µm)
- Generátor dusíku a vzduchu, Peak Scientific – Genius 3045
- Hmotnostní spektrometr Bruker Evoq LC-TQ
- Analytické váhy Kern 770
- Zařízení pro sušení dusíkem Evaterm, Labicom
- Ultrazvuková lázeň Teson 4, Tesla
- Centrifuga NF 800, Nüve
- Centrifuga ROTINA 420R, Hettich Zentrifugen
- Centrifuga EBA 20, Hettich Zentrifugen
- Vortex
- Automatické mikropipety
- Mikrostříkačky
- Plastové zkumavky 50 ml a 15 ml

- Stříkačkové nylonové filtry 0,22 µm, Chromservis
- Stříkačky pro filtrování, Braun
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.3 Použitý software

- Microsoft Office Excel 365
- Microsoft Office Word 365
- Bruker Compass HyStar version 5.1.8.1, Bruker Daltonik GmbH 2019
- Bruker Daltonics MS Workstation version 8.2.1, Bruker Daltonik GmbH 2017
- TASQ version 2.2.14 1533, Bruker Daltonik GmbH 2018

3.4 Vzorky

Vzorky půdy a podestýlek byly dodány od ÚKZUZ (Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského).

3.4.1 Vzorky drůbeží podestýlky pro zjištění obsahu enrofloxacinu a ciprofloxacinu

Vzorky drůbeží podestýlky byly rovnoměrně odebrány z chovné haly kvůli zjištění obsahu enrofloxacinu ve výkalech medikované drůbeže, a to před zahájením medikace, 3. den po medikaci a 7. den po medikaci. Vzorky byly uloženy do PE pytlů, transportovány na fakultu a uloženy při -80°C.

Popis vzorků podestýlek

Vzorky drůbeží podestýlky se skládají z papíru, slámy a trusu medikované drůbeže. Pro optimalizaci extrakčního postupu byla použita čerstvá podestýlka bez obsahu trusu.

Tabulka 18: Seznam vzorků podestýlek

Označení podestýlky	Popis	Datum sběru
1	Sláma + trus + papír (naskladnění kuřat)	18. 5. 2021
2	Sláma + trus (3. den medikace)	21. 5. 2021
3	Sláma + trus + papír (7 dní od začátku medikace)	25. 5. 2021
4	Sláma + trus + papír (7 dní od začátku medikace)	25. 5. 2021
5	Sláma + trus (7 dní od začátku medikace)	25. 5. 2021

3.4.2 Vzorky půdy pro zjištění obsahu enrofloxacinu a ciprofloxacinu

Drůbeží podestýlka byla na pokusnou plochu ručně aplikována. Výsledná aplikace činila 0,98 kg drůbeží podestýlky na 1 m². Pokusné políčko bylo rozděleno na dvě části. Na jednu část byla aplikována podestýlka obohacená o enrofloxacin (dávka 30 mg na m² půdy), na druhou byla aplikována podestýlka bez dodatečného obohacení enrofloxacinem. Před samotnou aplikací byla podestýlka v maximální možné míře homogenizována, zprvu ručně, poté v míchači. Po homogenizaci bylo naváženo přesné množství podestýlky a zředěno deionizovanou vodou tak, aby byla umožněna rovnoměrná aplikace na půdu.

Půdní vzorky pro stanovení enrofloxacinu a ciprofloxacinu byly odebrány před aplikací, v den aplikace, týden po aplikaci, za dva týdny po aplikaci podestýlky a dále pravidelně v čtrnáctidenních intervalech. K odběru vzorků sloužil Edelmanův vrták. Na místě byl proveden prosev na 5mm síť. Takto upravený vzorek byl vložen do PE sáčku a v chladícím boxu transportován na fakultu, kde byl zamražen na -80 °C.

Pro sledování meteorologických podmínek sloužila automatická meteostanice v Chrlicích. Podle údajů z této stanice činilo rozpětí teplot od zahájení (20. 5. 2021) do ukončení pokusu (7. 10. 2021) 0,1 – 34,6 °C. Srážkové úhrny činily od 12,2 mm (říjen) po 131,5 mm (srpnu).

Tabulka 19: Vlastnosti půdy č. 1

Označení půdy	Místo odběru	Půdní druh	pH (CaCl ₂)	C _{tot} [%]	N _{tot} [%]	Obsah [mg/kg]			
						P	K	Mg	Ca
1	Brno	Fluvizemě	7,1	1,83	0,19	161	315	336	6106

Tabulka 20: Obsahy rizikových prvků v půdě č. 1

Prvek	Celkový obsah prvků v půdě [mg/kg sušiny]										
	As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
Chrlice	13,6	1,25	0,43	16,1	67,4	30,2	45,5	31	52,7	113	0,14
Dlouhodobý monitoring (2013)	9,64	0,94	0,23	11,5	35,9	19,5	23,6	25,1	40,6	70,5	0,07

Popis vzorků půdy č. 1

Jde o půdu střední zrnitosti s neutrálním pH a vysokými obsahy živin. V půdě byly stanoveny celkové obsahy uhlíku a dusíku. Na základě jejich hodnot se jedná o ornou půdu. Poměr C:N je optimální (Tabulka 19). Byly stanoveny celkové obsahy prvků pomocí lučavky královské (Tabulka 20). Vzorek této půdy bez obsahu sledovaných léčiv (enrofloxacinu a ciprofloxacinu) byl použit pro výběr vhodného extrakčního postupu a jeho následnou optimalizaci.

Tabulka 21: Seznam vzorků půdy č. 1

Číslo vzorku půdy č.1	Čas [dny]	Datum odběru	Jméno vzorku	Popis vzorku
1	0	20. 5. 2021	20/05/2021-P	Půda před založením pokusu
2	0	20. 5. 2021	20/05/2021-PAO	O = po aplikaci, natural
3	0	20. 5. 2021	20/05/2021-PAE	E = po aplikaci, obohaceno
4	7	27. 5. 2021	27/05/2021-PAO	Týden po aplikaci
5	7	27. 5. 2021	27/05/2021-PAE	Týden po aplikaci
6	14	3. 6. 2021	03/06/2021-PAO	2 týdny po aplikaci
7	14	3. 6. 2021	03/06/2021-PAE	2 týdny po aplikaci
8	28	17. 6. 2021	17/06/2021-PAO	4 týdny po aplikaci
9	28	17. 6. 2021	17/06/2021-PAE	4 týdny po aplikaci
10	42	1. 7. 2021	1/07/2021-PAO	6 týdnů po aplikaci
11	42	1. 7. 2021	1/07/2021-PAE	6 týdnů po aplikaci
12	56	15. 7. 2021	15/07/2021-PAO	8 týdnů po aplikaci
13	56	15. 7. 2021	15/07/2021-PAE	8 týdnů po aplikaci
14	70	29. 7. 2021	29/07/2021-PAO	10 týdnů po aplikaci
15	70	29. 7. 2021	29/07/2021-PAE	10 týdnů po aplikaci
16	84	12. 8. 2021	12/08/2021-PAO	12 týdnů po aplikaci
17	84	12. 8. 2021	12/08/2021-PAE	12 týdnů po aplikaci
18	101	26. 8. 2021	26/08/2021-PAO	14 týdnů po aplikaci
19	101	26. 8. 2021	26/08/2021-PAE	14 týdnů po aplikaci
20	115	9. 9. 2021	09/09/2021-PAO	16 týdnů po aplikaci
21	115	9. 9. 2021	09/09/2021-PAE	16 týdnů po aplikaci

3.5 Příprava zásobních a kalibračních roztoků

3.5.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Na analytických vahách bylo s přesností na 4 desetinná místa naváženo 10 mg jednotlivých standardů léčiv. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 10 ml a následně doplněna po rysku směsí acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě pro UPLC (v poměru 20:80). Celkem bylo připraveno 6 zásobních roztoků s výslednou koncentrací 1 mg/ml.

Příprava směšného standardu ciprofloxacinu a enrofloxacinu

Do odměrné baňky o objemu 10 ml bylo mikrostríkačkou pipetováno 100 µl roztoku standardu o koncentraci 1 mg/ml (v odměrné baňce bylo před doplněním celkem 200 µl, protože jde o 2 léčiva). Odměrná baňka byla doplněna po rysku vodou pro UPLC. Byl připraven jeden směšný standard s výslednou koncentrací jednotlivých léčiv 10 µg/ml.

Příprava směšného standardu ciprofloxacinu a enrofloxacinu pro obohacení půdy

Do odměrné baňky o objemu 25 ml bylo pipetováno 2,5 ml roztoku směšného standardu o koncentraci 10 µg/ml. Odměrná baňka byla doplněna po rysku methanolem. Byl připraven směšný standard pro obohacení půdy s výslednou koncentrací jednotlivých léčiv 1 µg/ml.

Příprava směšného standardu ciprofloxacinu a enrofloxacinu pro obohacení podestýlky

Do odměrné baňky o objemu 10 ml bylo mikrostríkačkou pipetováno 250 µl roztoku standardu o koncentraci 1 mg/ml (v odměrné baňce bylo před doplněním celkem 500 µl, protože jde o 2 léčiva). Odměrná baňka byla doplněna po rysku methanolem. Byl připraven směšný standard pro obohacení podestýlky s výslednou koncentrací jednotlivých léčiv 25 µg/ml.

Příprava směšného standardu ciprofloxacinu, enrofloxacinu, pefloxacinu, norfloxacinu, ofloxacinu a moxifloxacinu

Do odměrné baňky o objemu 10 ml bylo mikrostríkačkou pipetováno 100 µl roztoku standardu o koncentraci 1 mg/ml (v odměrné baňce bylo před doplněním celkem 600 µl, protože jde o 6 léčiv). Odměrná baňka byla doplněna po rysku vodou pro UPLC. Byl připraven jeden směšný standard s výslednou koncentrací jednotlivých léčiv 10 µg/ml.

Příprava směšného standardu ciprofloxacinu, enrofloxacinu, pefloxacinu, norfloxacinu, ofloxacinu a moxifloxacinu pro obohacení půdy

Do odměrné baňky o objemu 25 ml bylo pipetováno 2,5 ml roztoku směšného standardu o koncentraci 10 µg/ml. Odměrná baňka byla doplněna po rysku methanolem. Byl připraven směšný standard pro obohacení půdy s výslednou koncentrací jednotlivých léčiv 1 µg/ml.

3.5.2 Příprava kalibračních roztoků

Příprava kalibrační řady ciprofloxacinu a enrofloxacinu

Byly připraveny směšné kalibrační roztoky o koncentracích jednotlivých léčiv 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 250, 300 a 500 ng/ml. Dále byly připraveny také roztoky pro kontrolu kvality (QC body) o koncentracích jednotlivých léčiv 30, 50 a 150 ng/ml. Celkově tedy kalibrační řada obsahuje 14 bodů. Všechny kalibrační body byly připraveny do směsi acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě pro UPLC (v poměru 5:95). Příprava je znázorněna v *Tabulce 23*. Ke každému kalibračnímu roztoku byl přidán IS (vnitřní standard) obsahující deuterovaná léčiva ciprofloxacin a enrofloxacin tak, že výsledná koncentrace jednotlivých léčiv byla 100 ng/ml.

Pro přípravu roztoků o koncentracích jednotlivých léčiv 10, 15, 20, 25, 50 a 75 ng/ml byly připraveny zásobní roztoky o koncentracích jednotlivých léčiv 100, 150, 200, 250, 500 a 750 ng/ml ředěním směšného standardu ciprofloxacinu a enrofloxacinu o koncentraci jednotlivých léčiv 10 µg/ml. Všechny zásobní roztoky byly připraveny do směsi acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě pro UPLC (v poměru 5:95). Jejich příprava je znázorněna v *Tabulce 22*.

Tabulka 22: Příprava zásobních roztoků pro přípravu kalibračních bodů ciprofloxacinu a enrofloxacinu

Koncentrace [ng/ml]	Objem standardu o koncentraci 10 µg/ml [µl]	Objem směsi [µl]
100	10	990
150	15	985
200	20	980
250	25	975
300	30	970
500	50	950
750	75	925

Tabulka 23: Příprava kalibrační řady ciprofloxacinu a enrofloxacinu

Označení bodu	c [ng/ml]	Způsob přípravy	Objem směsi [µl]
Kalibrace	10	10x poředěn zásobní roztok 100 ng/ml	900
Kalibrace	15	10x poředěn zásobní roztok 150 ng/ml	900
Kalibrace	20	10x poředěn zásobní roztok 200 ng/ml	900
Kalibrace	25	10x poředěn zásobní roztok 250 ng/ml	900
QC	30	10x poředěn zásobní roztok 300 ng/ml	900
Kalibrace	50	10x poředěn zásobní roztok 500 ng/ml	900
QC	50	10x poředěn zásobní roztok 500 ng/ml	900
Kalibrace	75	10x poředěn zásobní roztok 750 ng/ml	900
Označení bodu	c [ng/ml]	Objem standardu o koncentraci 10 µg/ml [µl]	Objem směsi [µl]
Kalibrace	100	10	990
QC	150	15	985
Kalibrace	200	20	980
Kalibrace	250	25	975
Kalibrace	300	30	970
Kalibrace	500	50	950

Příprava kalibrační řady ciprofloxacinu, enrofloxacinu, pefloxacinu, norfloxacinu, ofloxacinu a moxifloxacinu

Byly připraveny směsné kalibrační roztoky o koncentracích jednotlivých léčiv 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 a 500 ng/ml. Dále byly připraveny také roztoky pro kontrolu kvality (QC body) o koncentracích jednotlivých léčiv 30 a 50 ng/ml. Celkově tedy kalibrační řada obsahuje 14 bodů. Všechny kalibrační body byly připraveny do směsi acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě pro UPLC (v poměru 5:95). Příprava je znázorněna v *Tabulce 25*. Ke každému kalibračnímu roztoku byl přidán IS obsahující deuterovaná léčiva ciprofloxacin a enrofloxacin tak, že výsledná koncentrace jednotlivých léčiv byla 100 ng/ml.

Pro přípravu roztoků o koncentracích jednotlivých léčiv 10, 15, 20, 25, 50 a 75 ng/ml byly připraveny zásobní roztoky o koncentracích jednotlivých léčiv 100, 150, 200, 250, 500 a 750 ng/ml ředěním směsného standardu ciprofloxacinu a enrofloxacinu o koncentraci jednotlivých léčiv 10 µg/ml. Všechny zásobní roztoky byly připraveny do směsi acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě pro UPLC (v poměru 5:95). Jejich příprava je znázorněna v *Tabulce 24*.

Tabulka 24: Příprava zásobních roztoků pro přípravu kalibračních bodů ciprofloxacinu, enrofloxacinu, pefloxacinu, norfloxacinu, ofloxacinu a moxifloxacinu

Koncentrace [ng/ml]	Objem standardu o koncentraci 10 µg/ml [µl]	Objem směsi [µl]
100	10	990
150	15	985
200	20	980
250	25	975
300	30	970
500	50	950
750	75	925

Tabulka 25: Příprava kalibrační řady ciprofloxacinu, enrofloxacinu, pefloxacinu, norfloxacinu, ofloxacinu a moxifloxacinu

Označení bodu	c [ng/ml]	Způsob přípravy	Objem směsi [µl]
Kalibrace	10	10x poředěn zásobní roztok 100 ng/ml	900
Kalibrace	15	10x poředěn zásobní roztok 150 ng/ml	900
Kalibrace	20	10x poředěn zásobní roztok 200 ng/ml	900
Kalibrace	25	10x poředěn zásobní roztok 250 ng/ml	900
QC	30	10x poředěn zásobní roztok 300 ng/ml	900
Kalibrace	50	10x poředěn zásobní roztok 500 ng/ml	900
QC	50	10x poředěn zásobní roztok 500 ng/ml	900
Kalibrace	75	10x poředěn zásobní roztok 750 ng/ml	900
Označení bodu	c [ng/ml]	Objem standardu o koncentraci 10 µg/ml [µl]	Objem směsi [µl]
Kalibrace	100	10	990
Kalibrace	150	15	985
Kalibrace	200	20	980
Kalibrace	250	25	975
Kalibrace	300	30	970
Kalibrace	500	50	950

3.5.3 Příprava pufrů

Příprava McIlvaina pufru o pH 2,6

Pro přípravu McIlvaina pufru o pH 2,6 byly nejprve připraveny roztoky 0,1M kyseliny citronové a 0,2M hydrogenfosforečnanu disodného.

Bylo naváženo 10,507 g kyseliny citronové monohydrátu. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněna po rysku Milli-Q vodou.

Dále bylo naváženo 7,1196 g hydrogenfosforečnanu disodného dihydrátu. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 200 ml a doplněna po rysku Milli-Q vodou.

Puftr byl připraven smícháním 445,5 ml 0,1M kyseliny citronové a 54,5 ml 0,2M hydrogenfosforečnanu disodného ve výsledném objemu 500 ml. Hodnota pH byla ověřena pomocí pH metru. Byla dosažena hodnota pH 2,6 ± 0,1

Příprava McIlvainova pufru o pH 4,0

Pro přípravu McIlvainova pufru o pH 4,0 byly nejprve připraveny roztoky 0,1M kyseliny citronové a 0,2M hydrogenfosforečnanu disodného.

Bylo naváženo 10,507 g kyseliny citronové monohydrátu. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněna po rysku Milli-Q vodou.

Dále bylo naváženo 7,1196 g hydrogenfosforečnanu disodného dihydrátu. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 200 ml a doplněna po rysku Milli-Q vodou.

Pufr byl připraven smícháním 307,25 ml 0,1M kyseliny citronové a 192,75 0,2M hydrogenfosforečnanu disodného ve výsledném objemu 500 ml. Hodnota pH byla ověřena pomocí pH metru. Byla dosažena hodnota $\text{pH } 4,0 \pm 0,1$

Příprava McIlvainova pufru o pH 6,0

Pro přípravu McIlvainova pufru o pH 6,0 byly nejprve připraveny roztoky 0,1M kyseliny citronové a 0,2M hydrogenfosforečnanu disodného.

Bylo naváženo 10,507 g kyseliny citronové monohydrátu. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněna po rysku Milli-Q vodou.

Dále bylo naváženo 7,1196 g hydrogenfosforečnanu disodného dihydrátu. Navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 200 ml a doplněna po rysku Milli-Q vodou.

Pufr byl připraven smícháním 184,25 ml 0,1M kyseliny citronové a 315,75 0,2M hydrogenfosforečnanu disodného ve výsledném objemu 500 ml. Hodnota pH byla ověřena pomocí pH metru. Byla dosažena hodnota $\text{pH } 6,0 \pm 0,1$

3.6 Výběr vhodného extrakčního postupu

Pro výběr vhodného extrakčního postupu byly vybrány 3 různé publikace, podle kterých byl převzat postup a aplikován na vzorek půdy (půda č.1) obohacené léčivý. Vždy byl navážen 1 g půdy č. 1 (vlastnosti v *Tabulce 19*) do plastové zkumavky o objemu 50 ml. Navážená půda byla obohacena 1 ml směsného standardu ciprofloxacinu a enrofloxacinu v methanolu o koncentraci jednotlivých léčiv 1 $\mu\text{g/ml}$. Zkumavky byly ponechány otevřené přes noc, aby došlo k odpaření methanolu. Půda tak obsahovala 1 μg od každého léčiva. Každý experiment byl opakován třikrát. Vzorky byly analyzovány pomocí již optimalizované metody na LC-MS.

Tabulka 26: Postupy QuEChERS extrakcí převzaté z publikací a aplikované na vzorky půdy

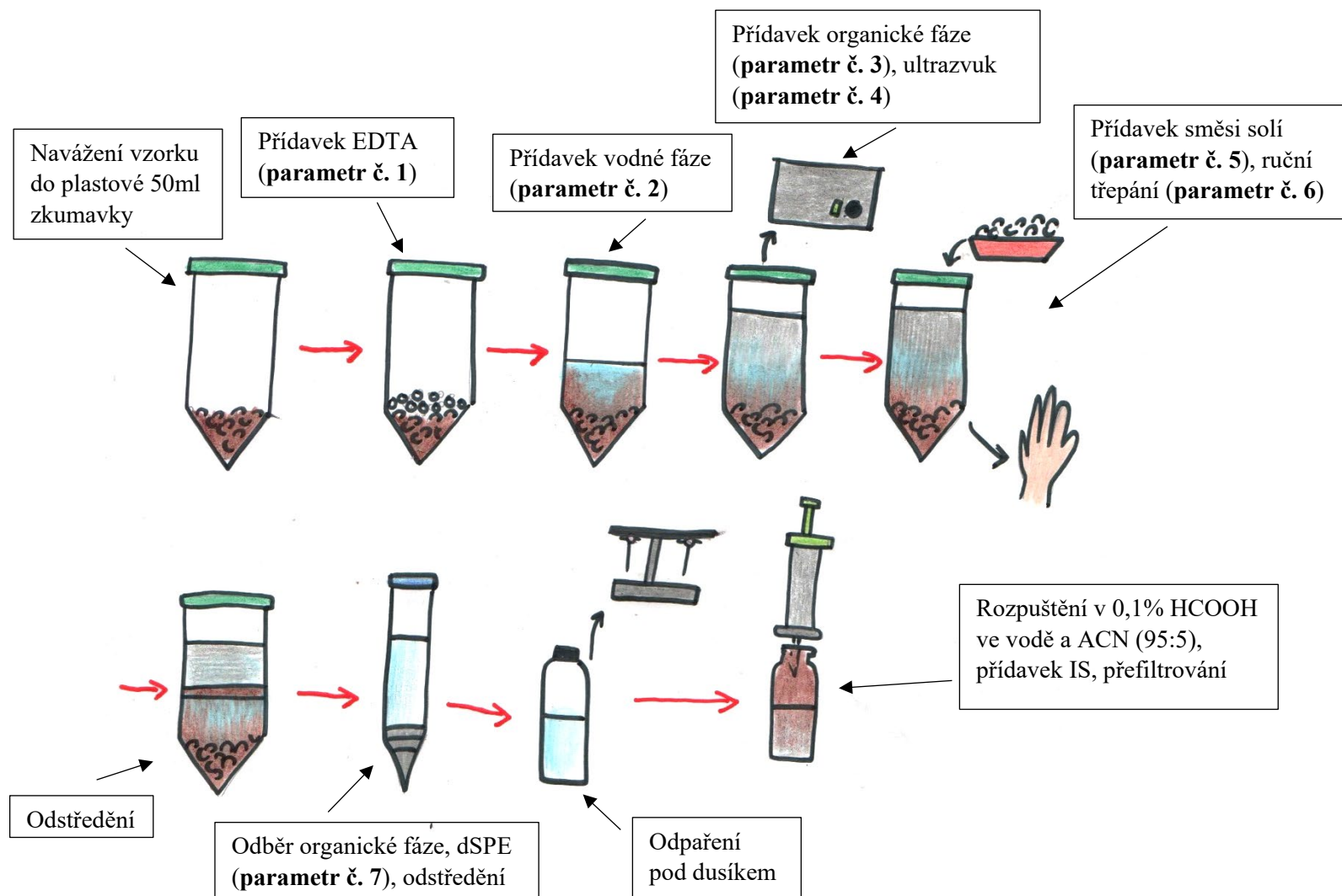
Označení	1	2	3
Matrice v publikaci	Prasečí kejda	Odpadní voda z nemocnice	Zemědělská půda
Postup	<ul style="list-style-type: none"> → Bylo přidáno 10 ml McIlvainova pufru o pH 4 → Bylo přidáno 0,4054 g EDTA, protřepáno kvůli rozpuštění EDTA → Bylo přidáno 7,5 ml acetonitrilu a 2,5 ml methanolu, vortex 1 min, ultrazvuk 15 min → Byla přidána separační sůl: 1 g NaCl + 4 g MgSO₄, ruční třepání 2 min → Odstředěno při 4500 rpm, 10 min → Odebráno 8 ml organické fáze pro disperzní SPE (dSPE) → dSPE: do 15 ml plastové zkumavky naváženo 320 mg PSA, 160 mg C18 a 1,8 mg Na₂SO₄ → 8 ml organické fáze přidáno do zkumavky se sorbenty, vortex 1 min → Odstředěno při 5000 rpm, 10 min → 6 ml supernatantu převedeno do skleněné 10 ml vialky, odpařeno pod dusíkem na 0,2 ml → Přidáno 0,8 ml rozpouštědla (0,1 % HCOOH ve vodě a ACN 95:5), přidán IS (výsledná koncentrace IS každého léčiva 100 ng/ml) → Přefiltrováno přes stříkačkový filtr do 2 ml skleněné vialky 	<ul style="list-style-type: none"> → Bylo přidáno 10 ml vody pro HPLC → Bylo přidáno 0,372 g EDTA, protřepáno kvůli rozpuštění EDTA 1 min → Bylo přidáno 8 ml acetonitrilu a 2 ml methanolu, vortex 1 min → Byla přidána separační sůl: 1 g NaCl + 4 g MgSO₄ + 1 g citronanu trisodného (dihydrát) + 0,5 g citronanu disodného (seskvihydrát), ruční třepání 5 min, vortex 2 min → Odstředěno při 4500 rpm, 10 min → Odebráno 8 ml organické fáze pro disperzní SPE (dSPE) → dSPE: do 15 ml plastové zkumavky naváženo 150 mg PSA a 450 mg Na₂SO₄ → 8 ml organické fáze přidáno do zkumavky se sorbenty, vortex 1 min → Odstředěno při 5000 rpm, 10 min → 6 ml supernatantu převedeno do skleněné 10 ml vialky, odpařeno pod dusíkem na 0,2 ml → Přidáno 0,8 ml rozpouštědla (0,1 % HCOOH ve vodě a ACN 95:5), přidán IS (výsledná koncentrace IS každého léčiva 100 ng/ml) → Přefiltrováno přes stříkačkový filtr do 2 ml skleněné vialky 	<ul style="list-style-type: none"> a) → Bylo přidáno 5 ml 0,1M EDTA, vortex 30 s → Bylo přidáno 6 ml acetonitrilu s 1 % kyseliny octové, ruční třepání 5 min → Byla přidána separační sůl: 6 g Na₂SO₄ + 1,5 g octanu sodného, vortex 30 s b) → Bylo přidáno 5 ml McIlvainova pufru o pH 2,6, vortex 30 s → Byla přidána 6 ml acetonitrilu, ruční třepání 5 min → Byla přidána separační sůl: 6 g Na₂SO₄, vortex 30 s → Odstředěno při 4500 rpm, 10 min → Odebrány 4 ml organické fáze pro disperzní SPE (dSPE) → dSPE: do 15 ml plastové zkumavky naváženo 50 mg PSA, 150 mg C18 a 900 mg Na₂SO₄ → 4 ml organické fáze přidány do zkumavky se sorbenty, vortex 30 s → Odstředěno při 5000 rpm, 10 min → 3 ml supernatantu převedeno do skleněné 10 ml vialky, odpařeno pod dusíkem na 0,2 ml → Přidáno 0,8 ml rozpouštědla (0,1 % HCOOH ve vodě a ACN 95:5), přidán IS (výsledná koncentrace IS každého léčiva 100 ng/ml) → Přefiltrováno přes stříkačkový filtr do 2 ml skleněné vialky
Publikace	[77]	[78]	[76]

3.7 Optimalizace parametrů vybraného extrakčního postupu

Po analýze všech vzorků z kapitoly 3.6 byl vybrán postup s nejlepší výtěžností extrakce. Jako nejvhodnější byl vybrán postup označen číslem 1 (detailní popis extrakce a odkaz na publikaci je uveden v *Tabulce 26*). Byly optimalizovány následující parametry: přítomnost EDTA, složení vodné fáze, složení organické fáze, doba působení ultrazvuku, složení směsi solí pro separaci fází, doba ručního třepání a složení směsi sorbentů pro dSPE (seznam uveden v *Tabulce 27*). Vždy byl změněn 1 parametr, jinak byl dodržen postup v *Tabulce 26* (schématické znázornění postupu je na *Obrázku 12*. Vždy byl navážen 1 g půdy č. 1 (vlastnosti v *Tabulce 19*) do plastové zkumavky o objemu 50 ml. Navážená půda byla obohacena 0,5 ml směšného standardu ciprofloxacinu a enrofloxacinu v methanolu o koncentraci jednotlivých léčiv 1 µg/ml. Zkumavky byly ponechány otevřené přes noc, aby došlo k odpaření methanolu. Půda tak obsahovala 500 ng od každého léčiva. Každý experiment byl opakován třikrát. Vzorky byly analyzovány pomocí již optimalizované metody na LC-MS.

Tabulka 27: Seznam optimalizovaných parametrů a způsob provedení

Číslo parametru	Parametr	Provedení	Označení
1	Přítomnost EDTA	Bez přítomnosti	1a
		S přítomností	1b
2	Vodná fáze	Voda	2a
		Pufr pH 4,0	2b
		0,1% HCOOH ve vodě	2c
		Pufr pH 6,0	2d
3	Organická fáze	MeOH	3a
		ACN	3b
		ACN/MeOH (1:1)	3c
		ACN/MeOH (9:1)	3d
		ACN/MeOH (37,5:12,5)	3e
4	Doba působení ultrazvuku	5 min	4a
		10 min	4b
		15 min	4c
5	Složení směsi solí	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	5a
		3 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g Mg(NO ₃) ₂	5b
		2 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 2 g Mg(NO ₃) ₂	5c
		4 g MgSO ₄ + 1 g Mg(NO ₃) ₂	5d
6	Doba ručního třepání	1 min	6a
		2 min	6b
		5 min	6c
		10 min	6d
7	dSPE, složení sorbentů	400 mg PSA	7a
		400 mg C18	7b
		320 mg PSA + 160 mg C18	7c
		200 mg PSA + 200 mg C18	7d



Obrázek 12: Schéma postupu extrakce a vyznačení optimalizovaných parametrů

Po provedení a vyhodnocení všech experimentů byly vybrány nejvíce vyhovující parametry a sestaven optimalizovaný postup QuEChERS.

Optimalizovaný postup QuEChERS extrakce

- Bylo přidáno 10 ml **McIlvainova pufru o pH 4**
- Bylo přidáno 0,4054 g **EDTA**, protřepáno kvůli rozpuštění EDTA
- Bylo přidáno 7,5 ml **acetonitrilu** a 2,5 ml **methanolu**, vortex 1 min, ultrazvuk 15 min
- Byla přidána separační sůl: 1 g **NaCl** + 4 g **MgSO₄**, ruční třepání 2 min
- Odstředěno při 4500 rpm, 10 min
- Odebráno 8 ml organické fáze pro disperzní SPE (dSPE)
- dSPE: do 15 ml plastové zkumavky naváženo 320 mg **PSA**, 160 mg **C18** a 1,8 mg **Na₂SO₄**
- 8 ml organické fáze přidáno do zkumavky se sorbenty, vortex 1 min
- Odstředěno při 5000 rpm, 10 min
- 6 ml supernatantu převedeno do skleněné 10 ml vialky, odpařeno pod dusíkem na 0,2 ml
- Přidáno 0,8 ml rozpouštědla (0,1 % HCOOH ve vodě a ACN 95:5), přidán IS (výsledná koncentrace IS každého léčiva 100 ng/ml)
- V případě koncentrovaného vzorku byl přečištěný extrakt naředěn dle rozsahu kalibrační závislosti směsí 0,1 % HCOOH ve vodě a ACN 95:5, přidán IS (výsledná koncentrace IS každého léčiva 100 ng/ml)
- Přefiltrováno přes stříkačkový filtr do 2 ml skleněné vialky

Optimalizovaný extrakční postup byl aplikován na vzorky čisté půdy č.1 s obohacením na 3 koncentračních úrovních. Vždy byl navážen 1 g půdy do plastové zkumavky o objemu 50 ml. Navážená půda byla obohacena 0, 0,15, 0,25 a 0,5 ml směsného standardu ciprofloxacinu a enrofloxacinu v methanolu o koncentraci jednotlivých léčiv 1 µg/ml. Zkumavky byly ponechány otevřené přes noc, aby došlo k odpaření methanolu. Půda tak obsahovala 0, 150, 250 a 500 ng od každého léčiva (seznam v *Tabulce 28*). Každý experiment byl opakován třikrát. Vzorky byly analyzovány pomocí již optimalizované metody na LC-MS.

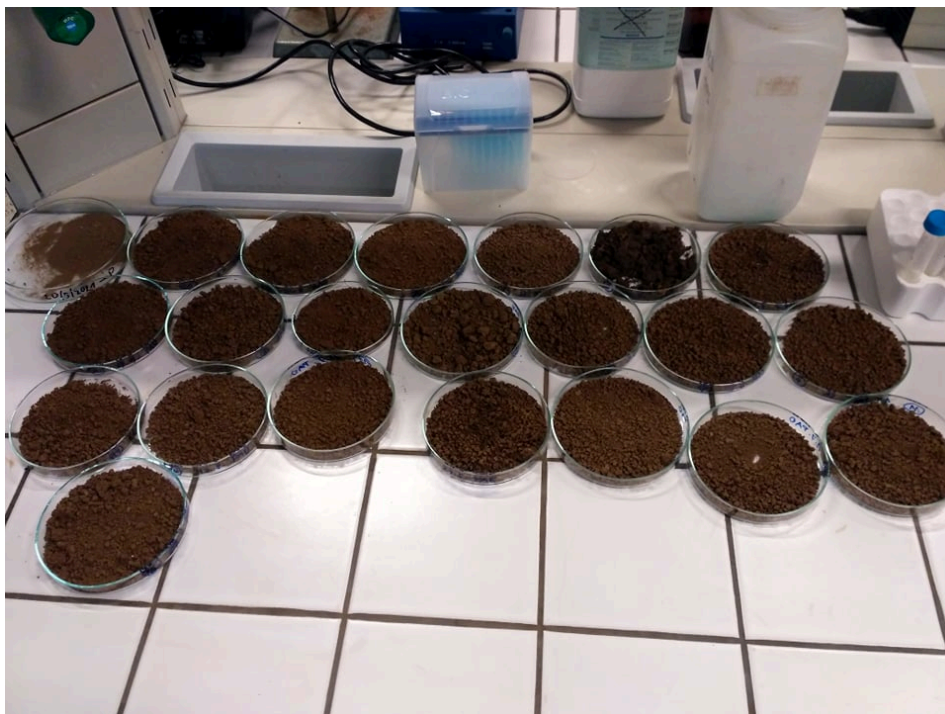
Optimalizovaný extrakční postup byl také aplikován na čistou podestýlku s obohacením na 2 koncentračních úrovních. Vždy byl navážen 1 g podestýlky do plastové zkumavky o objemu 50 ml. Navážená podestýlka byla obohacena 0, 0,2 a 1 ml směsného standardu ciprofloxacinu a enrofloxacinu v methanolu o koncentraci jednotlivých léčiv 25 µg/ml. Zkumavky byly ponechány otevřené přes noc, aby došlo k odpaření methanolu. Podestýlka tak obsahovala 0, 5 a 25 µg od každého léčiva (seznam v *Tabulce 28*). Každý experiment byl opakován třikrát. Vzorky byly analyzovány pomocí již optimalizované metody na LC-MS.

Tabulka 28: Koncentrační hladiny obohacených vzorků půdy a podestýlky

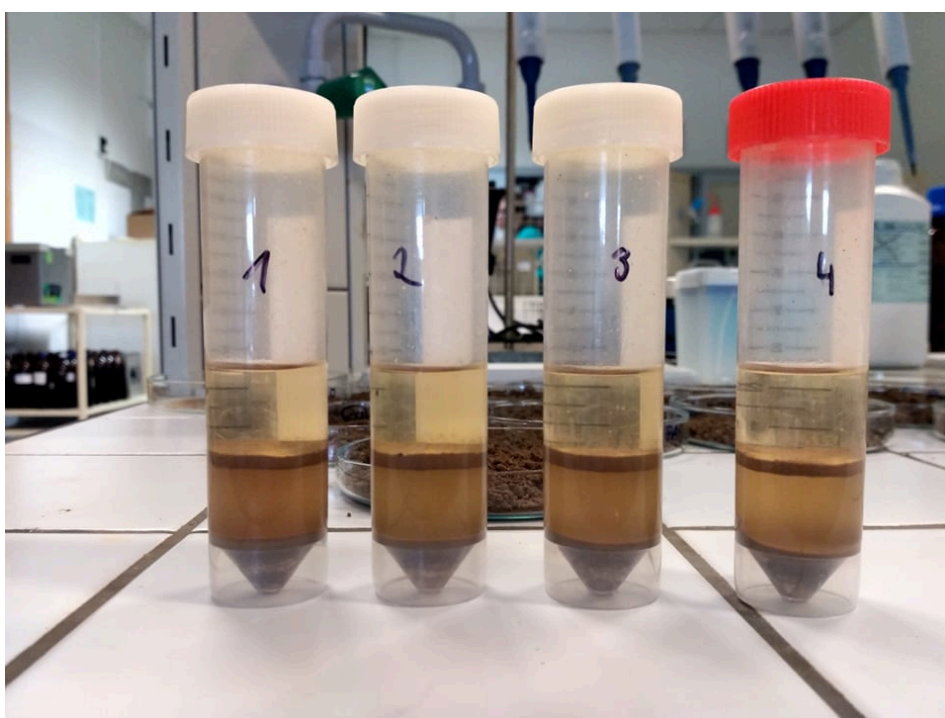
Matrice	Přídavek směsi léčiv	Označení
Půda	0 ng	P0
Půda	150 ng	P150
Půda	250 ng	P250
Půda	500 ng	P500
Podestýlka	0 µg	POD0
Podestýlka	5 µg	POD5
Podestýlka	25 µg	POD25

3.8 Aplikace optimalizovaného postupu na vzorky půdy a podestýlek

Vzorky podestýlek a vzorky půdy s obsahem podestýlky byly dodány od ÚKZUZ. Seznamy vzorků podestýlek a půdy jsou uvedeny v *Tabulce 18* a *Tabulce 21*. Na všechny vzorky byl aplikován optimalizovaný extrakční postup, který je podrobně popsán na *str.44*. Vždy byl navážen přibližně 1 g vzorku a zaznamenána přesná hmotnost. Pro každý vzorek byly provedeny 3 opakování.



Obrázek 13: Vzorky půdy od ÚKZUZ připravené pro analýzu



Obrázek 14: Vzorky půdy po provedení QuEChERS extrakce, oddělení vodné a organické fáze



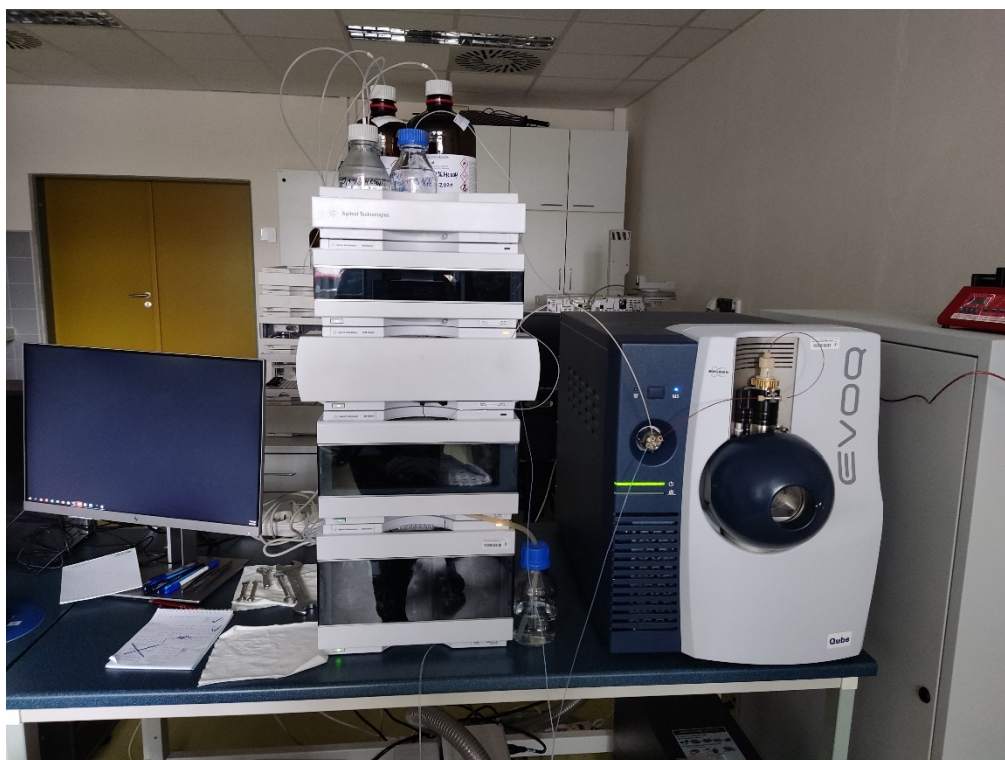
Obrázek 15: Vzorčky podestýlek od ÚKZUZ připravené k analýze



Obrázek 16: Vzorčky podestýlek po provedení QuEChERS extrakce, oddělení vodné a organické fáze

3.9 Stanovení obsahu ciprofloxacinu a enrofloxacinu v půdě a podestýlkách

Jako vhodná analytická metoda pro stanovení ciprofloxacinu a enrofloxacinu v půdě a podestýlce byla zvolena UPLC-ESI-TQ. Použitý kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem je na *Obrázku 17*. Byla použita již zavedená optimalizovaná metoda, jejíž parametry jsou uvedeny v *Tabulce 29* – v *Tabulce 31*.



Obrázek 17: Použitý kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity s hmotnostním spektrometrem Bruker EVOQ LC-TQ

Tabulka 29: Nastavení parametrů kapalinového chromatografu

Objem nástřiku	5 μ l	
Průtok mobilní fáze	0,35 ml/min	
Teplota kolony	30 °C	
Složení mobilní fáze	A: 0,1% HCOOH ve vodě B: Acetonitril	
Gradient mobilní fáze	t [min]	B [%]
	0	5
	0,5	5
	8,0	40
	8,2	100
	8,9	5
9,9	5	

Tabulka 30: Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru

Iontový zdroj	Elektrosprej (HESI)
Napětí elektrospreje	4500 V
Mód ionizace (polarita)	Pozitivní (ESI+)
Průtok pomocného plynu	20 a. u.
Teplota pomocného plynu	350 °C
Průtok sušícího plynu	50 a. u.
Teplota sušícího plynu	300 °C
Zmlžovací plyn	50 a. u.
Aktivní odtah	ON
Režim scanu	MRM
Tlak kolizního plynu	1,5 mTorr

Tabulka 31: MRM přechody pro ciprofloxacin, enrofloxacin a deuterované standardy

	Přechod	Retenční čas [min]	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)	Kolizní energie [eV]
Ciprofloxacin	Kvantitativní	5,0	332,4	288	10
	Kvalitativní	5,0	332,4	245	20
Enrofloxacin	Kvantitativní	5,5	360,4	316	10
	Kvalitativní	5,5	360,4	245	20
Ciprofloxacin Deut.	Kvantitativní	5,0	340,4	322,1	15
	Kvalitativní	5,0	340,4	296,1	15
Enrofloxacin Deut.	Kvantitativní	5,5	365,4	321,3	10
	Kvalitativní	5,5	365,4	347,4	10

3.10 Aplikace optimalizovaného postupu na skupinu fluorochinolonů v půdě

Během semestru byly dokoupeny další standardy fluorochinolonových antibiotik. Celkem tedy šlo o 6 léčiv: ciprofloxacin, enrofloxacin, pefloxacin, norfloxacin, ofloxacin a moxifloxacin. Tři půdy s různými parametry byly obohaceny směsným standardem obsahujícím všech 6 léčiv. Cílem tohoto experimentu bylo porovnat a ověřit, zda a v jaké míře se účinnost extrakce liší mezi různými půdami s různými vlastnostmi (vlastnosti a popis půdy č. 1 jsou uvedeny v *Tabulce 19* a *Tabulce 20*, vlastnosti půd č. 2 a 3 jsou uvedeny v *Tabulce 32* a *Tabulce 33*). Na všechny vzorky byl aplikován optimalizovaný extrakční postup, který je podrobně popsán na *str. 44*. Vždy byl navážen 1 g půdy do plastové zkumavky o objemu 50 ml. Navážená půda byla obohacena 0,5 ml směsného standardu ciprofloxacinu, enrofloxacinu, pefloxacinu, norfloxacinu, ofloxacinu a moxifloxacinu v methanolu o koncentraci jednotlivých léčiv 1 µg/ml. Zkumavky byly ponechány otevřené přes noc, aby došlo k odpaření methanolu. Půda tak obsahovala 500 ng od každého léčiva.

Tabulka 32: Popis půd č. 2 a 3

Označení půdy	Místo odběru	Půdní druh	Půdní typ	Písek [%]	Prach [%]	Jíl [%]
2	Jablonec nad Nisou	Kambizemě	Hlína	48 %	43 %	9 %
3	Ostrava	Luvizemě	Prachovitá jílovitá hlína	8 %	74 %	18 %

Tabulka 33: Vlastnosti a parametry půd č. 2 a 3

Označení půdy	pH (H ₂ O)	pH (CaCl ₂)	Organická hmota [%]	C _{org} [%]	N _{tot} [%]	Obsah [mg/kg]				
						P	K	Mg	Ca	Na
2	6,300	5,500	7,0864	4,12	1,57	853,5	1,57	30,7	99,7	0,58
3	5,825	5,25	2,3736	1,38	3,28	572,0	3,28	15,7	66,1	0,29

3.11 Stanovení fluorochinolonů v půdě – optimalizace metody LC-MS

Jako vhodná analytická metoda pro stanovení fluorochinolonů v půdě byla rovněž zvolena UPLC-ESI-TQ. Použitý kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem je na Obrázku 17. Metoda byla nejprve optimalizována a následně použita pro měření. Parametry optimalizované metody jsou v Tabulce 34 – Tabulce 36.

Tabulka 34: Nastavení parametrů kapalinového chromatografu

Objem nástřiku	7 µl	
Průtok mobilní fáze	0,5 ml/min	
Teplota kolony	40 °C	
Složení mobilní fáze	A: 0,1% HCOOH ve vodě B: Acetonitril	
Gradient mobilní fáze	t [min]	B [%]
	0,0	20
	1,0	20
	7,0	30
	8,0	20
	10,0	90
	11,9	90
	12,0	20

Tabulka 35: Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru

Iontový zdroj	Elektrosprej (HESI)
Napětí elektrospreje	3500 V
Mód ionizace (polarita)	Pozitivní (ESI+)
Průtok pomocného plynu	20 a. u.
Teplota pomocného plynu	250 °C
Průtok sušícího plynu	50 a. u.
Teplota sušícího plynu	300 °C
Zmlžovací plyn	60 a. u.
Aktivní odtah	ON
Režim scanu	MRM
Tlak kolizního plynu	1,5 mTorr

Tabulka 36: MRM přechody pro norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, moxifloxacin a deuterované standardy

	Přechod	Retenční čas [min]	Prekurzorový ion (m/z)	Produktový ion (m/z)	Kolizní energie [eV]
Norfloxacin	Kvantitativní	1,21	320,1	276,1	15
	Kvalitativní	1,21	320,1	233,0	20
Ofloxacin	Kvantitativní	1,26	362,2	318,1	15
	Kvalitativní	1,26	362,2	261,0	25
Pefloxacin	Kvantitativní	1,30	334,0	290,1	15
	Kvalitativní	1,30	334,0	316,0	15
Ciprofloxacin	Kvantitativní	1,32	332,4	314,1	20
	Kvalitativní	1,32	332,4	288,1	15
Ciprofloxacin Deut.	Kvantitativní	1,32	340,4	296,0	15
	Kvalitativní	1,32	340,4	322,0	20
Enrofloxacin	Kvantitativní	1,70	360,4	316,1	15
	Kvalitativní	1,70	360,4	341,9	20
Enrofloxacin Deut	Kvantitativní	1,70	365,4	321,1	15
	Kvalitativní	1,70	365,4	245,0	20
Moxifloxacin	Kvantitativní	2,87	402,0	384,1	20
	Kvalitativní	2,87	402,0	358,3	15

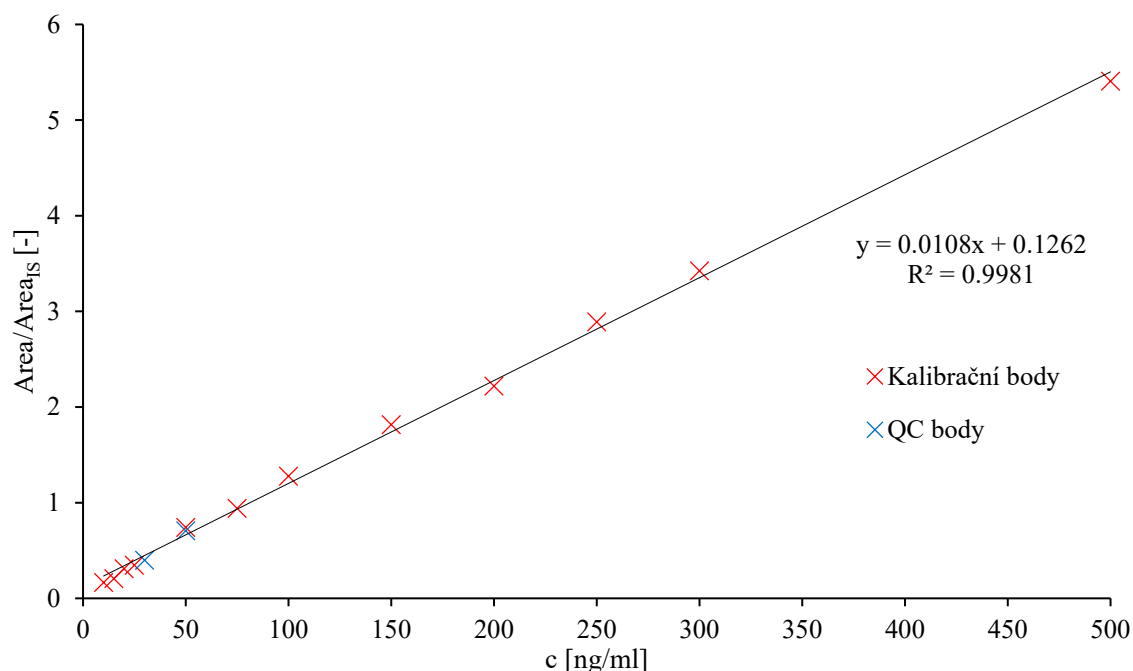
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Kalibrační závislost

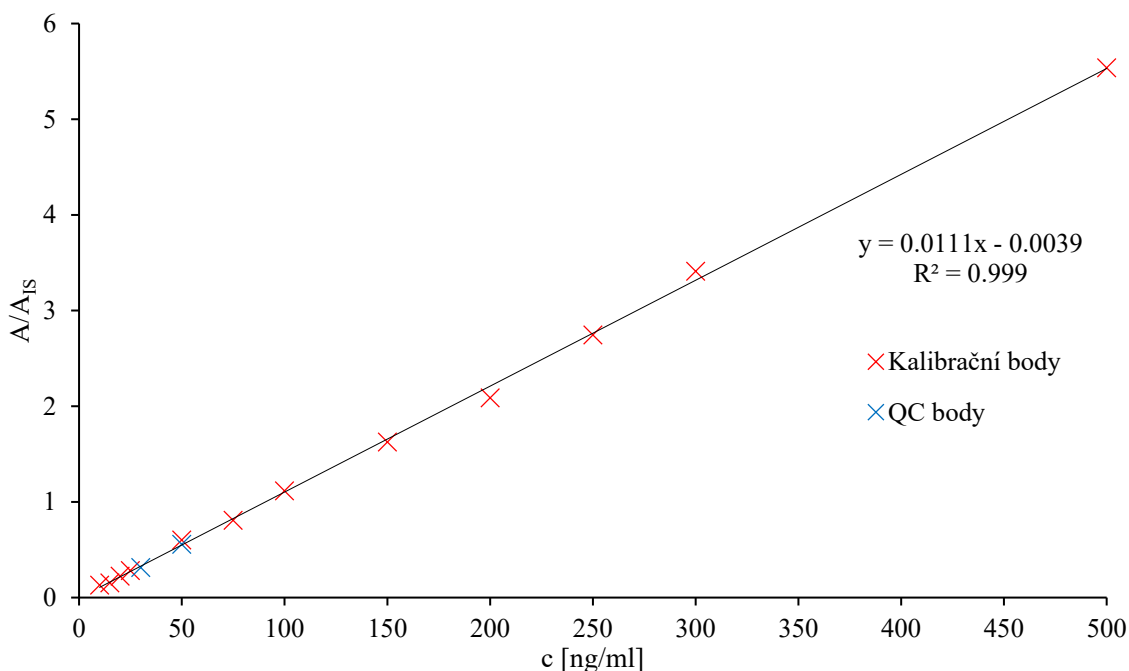
Pro kvantitativní analýzu daných látek ve vzorcích byly připraveny směsné kalibrační roztoky. Kalibrační řada pro stanovované látky byla vždy proměřena před každým měřením extraktů. Dle proměřené kalibrace byly následně vyhodnoceny výsledky. Pro výběr a optimalizaci extrakčního postupu a pro analýzu vzorků půdy a podestýlky byla použita kalibrační řada obsahující ciprofloxacin a enrofloxacin. Pro porovnání různých půd byla použita kalibrační řada obsahující ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin a moxifloxacin. Kalibrační řady byly připraveny vždy s přidavkem IS. Kalibrační závislosti pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v *Tabulce 37*. Příklady grafického znázornění kalibrační závislosti jsou zobrazeny na *Obrázku 18* a *Obrázku 19*.

Tabulka 37: Kalibrační závislosti jednotlivých analytů s uvedeným koeficientem determinace

Analyt	Kalibrační závislost	Rovnice kalibrační závislosti	R ² [-]
Ciprofloxacin	lineární	0,0108x + 0,1262	0,9981
Enrofloxacin	lineární	0,0111x - 0,0039	0,9990
Moxifloxacin	lineární	0,0174x - 0,1726	0,9938
Pefloxacin	lineární	0,0447x - 0,3391	0,9987
Norfloxacin	lineární	0,0415x + 0,2998	0,9968
Ofloxacin	lineární	0,0980x + 1,3691	0,9974



Obrázek 18: Kalibrační závislost ciprofloxacinu se zobrazením QC bodů



Obrázek 19: Kalibrační závislost enrofloxacinu se zobrazením QC bodů

Byly stanoveny LLOQ (limity kvantifikace) a LOD (limity detekce) pro jednotlivé kalibrační závislosti z *Tabulky 37*. LLOQ je definován jako nejnižší koncentrace analytu, která může být ve vzorku zjištěna s přesností 10 % až 20 % dle měřených koncentrací. LOD je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze detekovat.

$$LLOQ = c$$

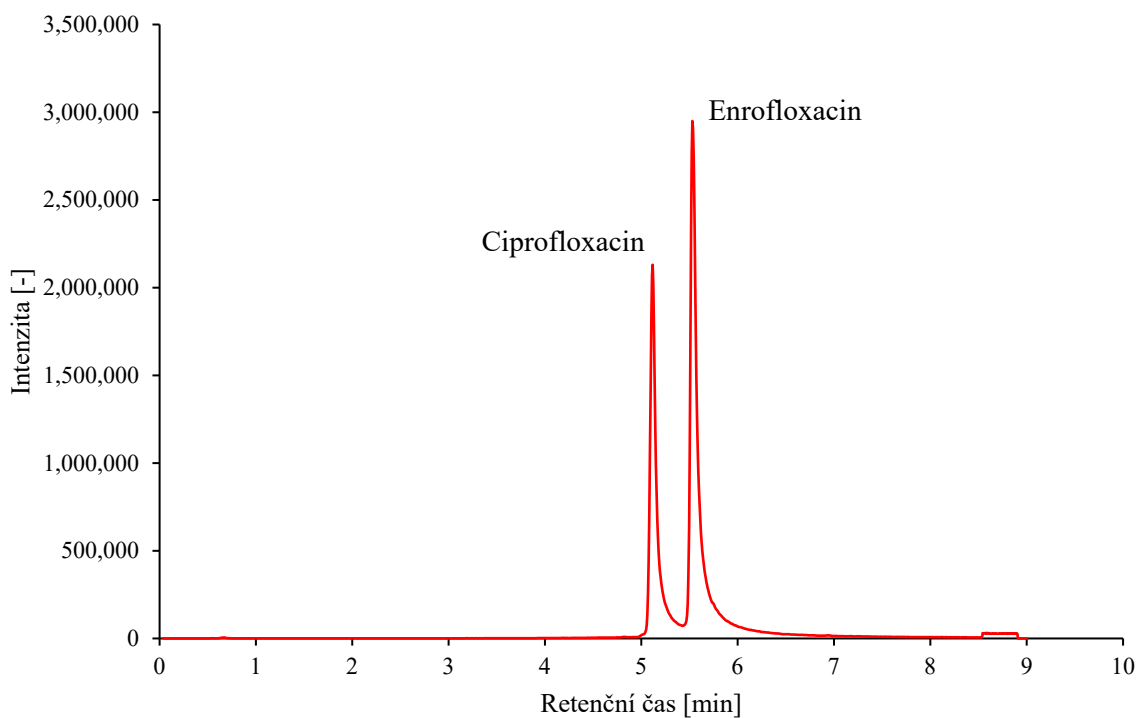
kde c je nejnižší koncentrace daného analytu splňující podmínky přesnosti uvedené výše [86, 87].

$$LOD = \frac{LLOQ}{3,3}$$

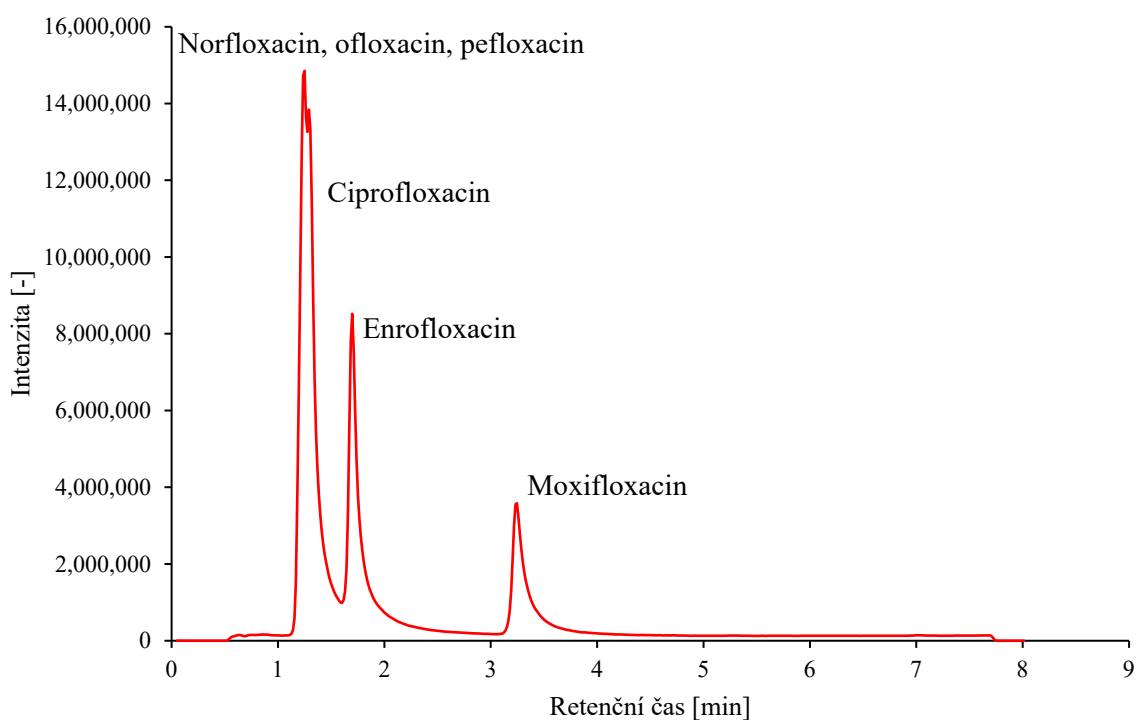
Tabulka 38: LLOQ a LOD metody pro jednotlivé analyty

Analyt	LLOQ [ng/g]	LOD [ng/g]
Ciprofloxacin	20	6,1
Enrofloxacin	10	3,0
Moxifloxacin	20	6,1
Pefloxacin	10	3,0
Norfloxacin	20	6,1
Ofloxacin	20	6,1

4.2 Chromatogramy



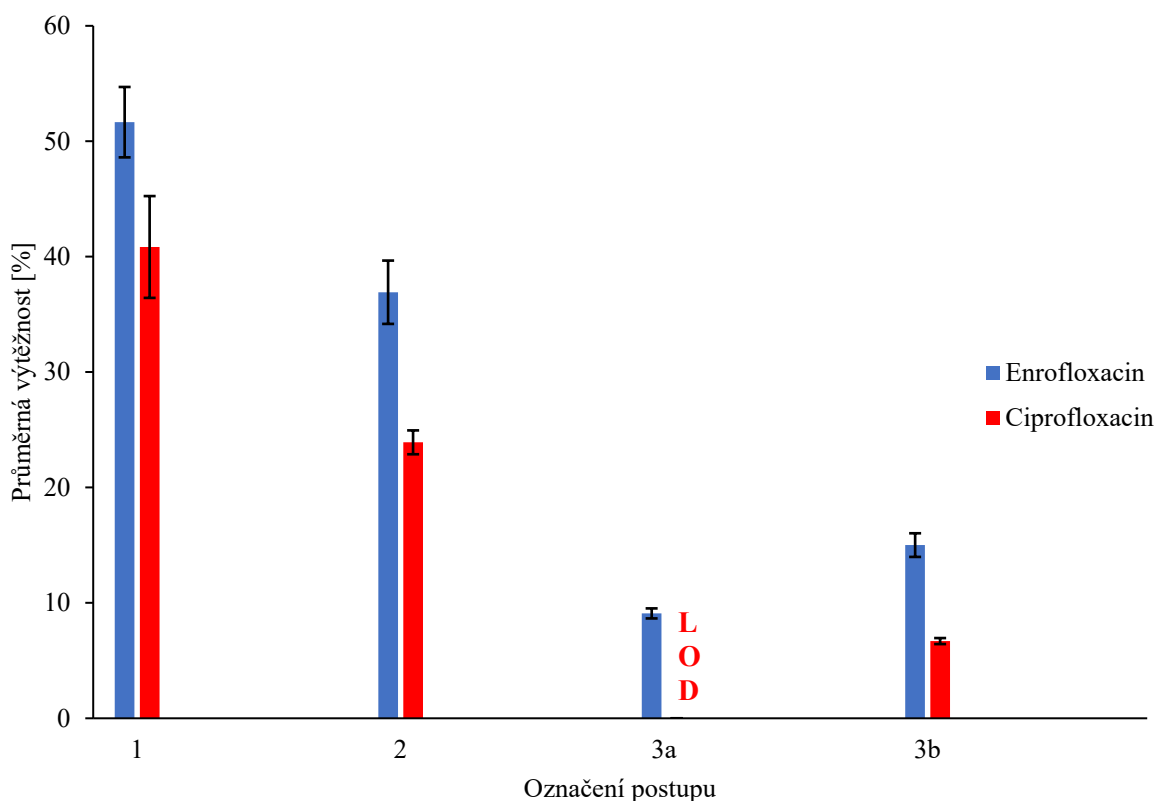
Obrázek 20: Chromatogram analýzy ciprofloxacinu a enrofloxacinu



Obrázek 21: Chromatogram analýzy skupiny fluorochinolonů

4.3 Výběr vhodného extrakčního postupu

V první řadě bylo třeba vybrat dle dostupné literatury vhodný extrakční postup pro vzorky půdy a podestýlek obsahující fluorochinolonová antibiotika. Jelikož bylo dostupných publikací velmi omezené množství, byly převzaty různé postupy pro různé matrice a aplikovány na předem obohacenou půdu, aby byla zjištěna nejlepší výtěžnost extrakce. Byly vyzkoušeny postupy uvedené v *Tabulce 26*. Pro korekci matrice byl k finálnímu vzorku před filtrací přidán IS. Vzorky byly vyhodnoceny v programu TASQ pomocí připravené externí kalibrace. Výsledky jsou graficky znázorněny na *Obrázku 22* a zobrazeny v *Tabulce 39* (Příloha č. 1).



Obrázek 22: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na použitém postupu

Jako nejvhodnější postup byl vybrán postup č.1 (popsán v *Tabulce 26*), který byl v uvedené publikaci použit pro stanovení léčiv v prasečí kejďě. V tomto postupu je jako vodná fáze použit McIlvainův pufr o pH 4, což daným analytům vytvořilo příznivé prostředí pro uvolnění. Organickou fází tvořila směs methanolu a acetonitrilu. Nápomocné mohlo být i užití ultrazvuku, který se v postupech č. 2 a 3 nepoužil. Pro separaci fází byla použita směs síranu hořečnatého a chloridu sodného, která se běžně využívá a je pro separaci nejvhodnější. Pro čištění byla použita směs PSA, C18 a síranu sodného.

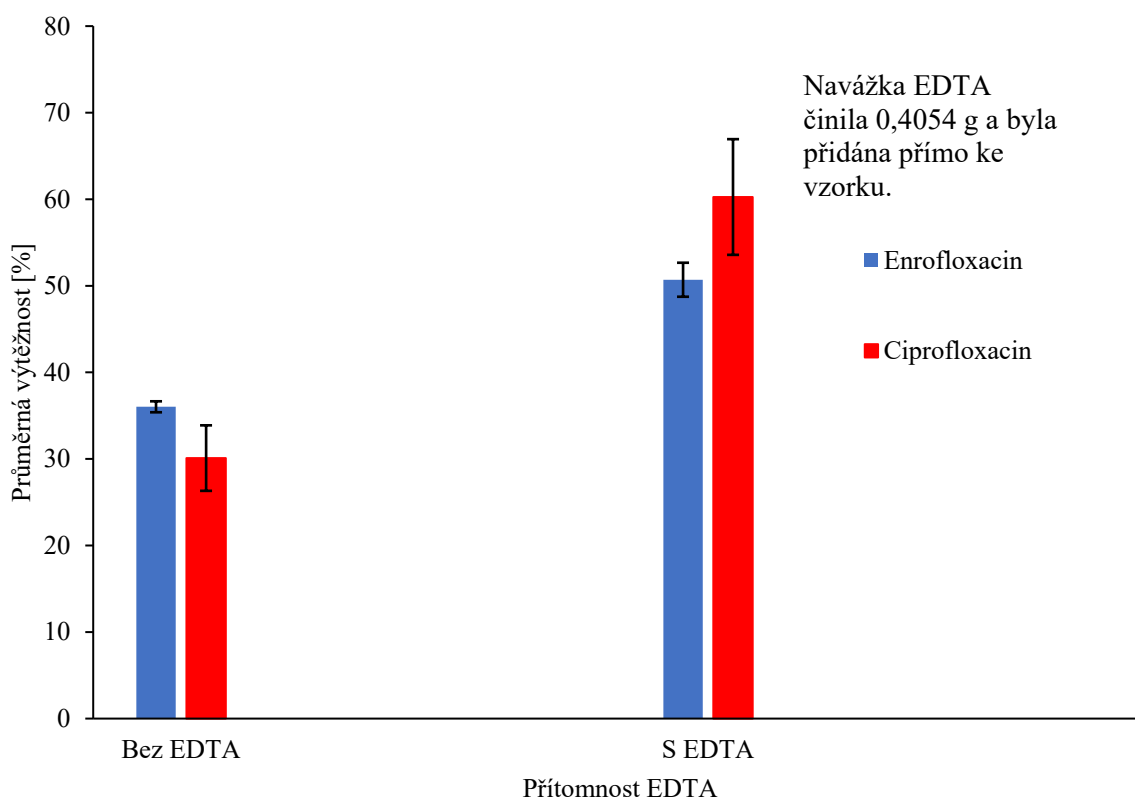
Co se týče postupu č. 2 (popsán v *Tabulce 26*, v publikaci [78] použit pro odpadní vodu obsahující léčiva), byla jako vodná fáze použita čistá voda. Organickou fází tvořila rovněž směs methanolu a acetonitrilu. Vzorky byly protřepány pouze v ruce, což mohlo být pro uvolnění analytů nedostatečné. Pro separaci fází byla použita směs síranu hořečnatého, chloridu sodného a citrátových solí, což mohlo vytvořit nepříliš vyhovující pH pro dané analyty. Pro čištění byla použita směs PSA a síranu sodného. Chybějící sorbent C18 mohl zapříčinit nedostatečné přečištění od matrice.

Postup č. 3 (popsán v *Tabulce 26*, v publikaci [76] použit pro zemědělskou půdu obsahující léčiva) byl rozdělen na dvě části s rozdílem ve vodné a organické fázi a v použitých solích pro separaci. V první části byla jako vodná fáze použita 0,1M EDTA, jako organická fáze acetonitril okyselený 1 % kyseliny octové. Separční sůl sestávala ze směsi síranu sodného a octanu sodného. V druhé části byl jako vodná fáze použit McIlvainův pufr o pH 2,6, který byl vhodnější než 0,1M EDTA, ale byl méně účinný McIlvainův pufr o pH 4 z postupu č.1. Jako organická fáze byl použit čistý acetonitril a pro separaci fází byl aplikován síran sodný. Vzorky byly vždy protřepány ručně bez použití ultrazvuku, což mohlo opět přispět k nižší výtěžnosti extrakce. Pro dSPE byla použita směs PSA, C18 a síranu hořečnatého, ale v menším množství než v postupu č.1, což mohlo výtěžnost extrakce také ovlivnit.

4.4 Optimalizace vybraného extrakčního postupu

Vybraný extrakční postup (postup č. 1) byl dále optimalizován. Seznam optimalizovaných parametrů je uveden v *Tabulce 27*. Pro korekci matrice byl k finálnímu vzorku před filtrací přidán IS. Vzorky byly vyhodnoceny v programu TASQ pomocí připravené externí kalibrace. Optimalizovaný extrakční postup je uveden na *str. 44*. Hromadné výsledky jsou zobrazeny v *Tabulce 40* (Příloha č. 1).

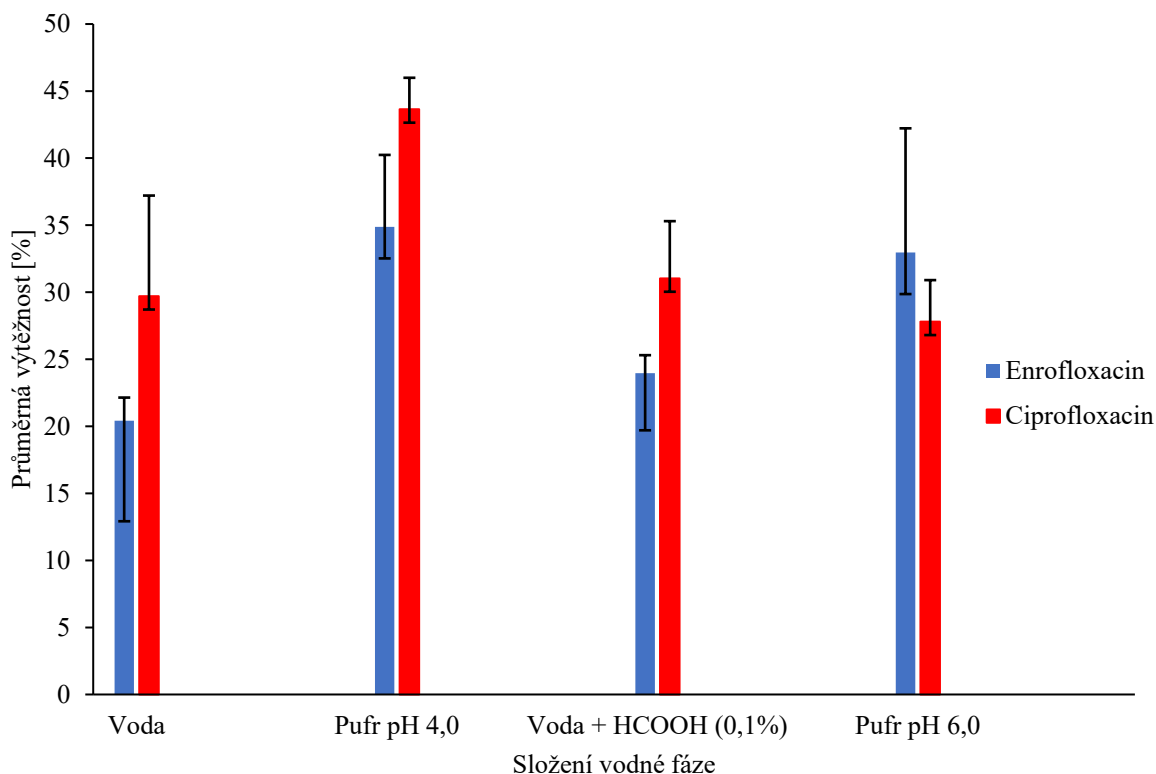
4.4.1 Optimalizace parametru přidavek EDTA



Obrázek 23: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na přítomnosti EDTA

U fluorochinolonů je problematické, že mohou tvořit komplexy jak s ionty obsaženými v půdě, tak i s hořčnatými ionty, které jsou přítomny po přidání separační soli (uvedeno v publikaci [23]). Cílem experimentu bylo porovnat, jak se výtěžnost extrakce změní, když EDTA bude přítomna a naopak, když přítomna nebude. EDTA by měla tvořit komplexy s danými ionty. Na grafu jde vidět, že přítomnost EDTA příznivě ovlivňuje extrakci.

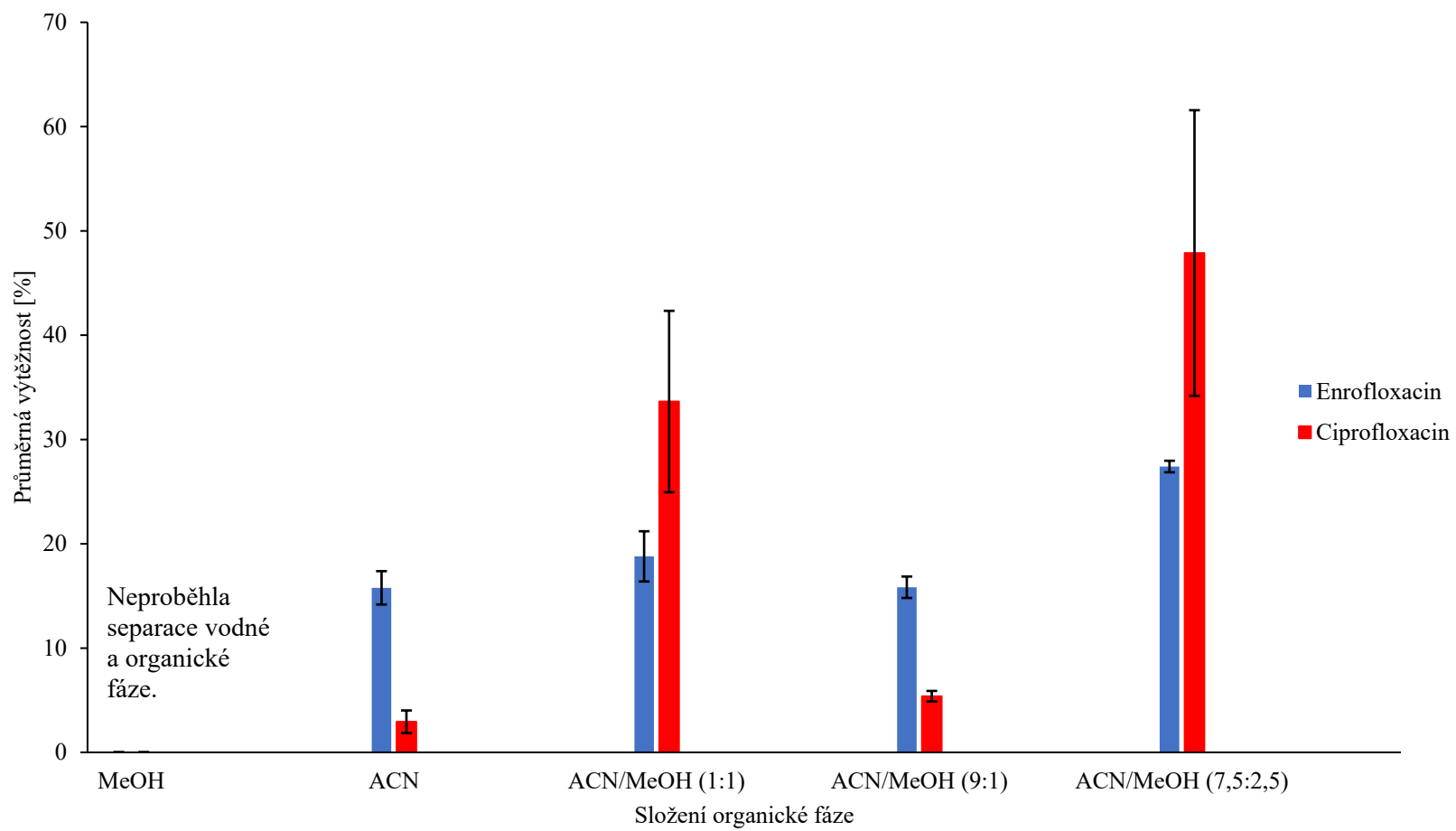
4.4.2 Optimalizace parametru vodná fáze



Obrázek 24: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na složení vodné fáze

Vodná fáze, která měla nejlepší vliv na výtěžnost extrakce byl McIlvainův pufr o pH 4. Toto pH vytvořilo příznivé podmínky pro extrakci analytů z půdy. Ostatní použité vodné fáze se v účinnosti extrakce příliš nelišily. V případech, kdy nebyl použit pufr, mohlo během extrakce docházet k výkyvům pH, což mohlo extrakci negativně ovlivnit.

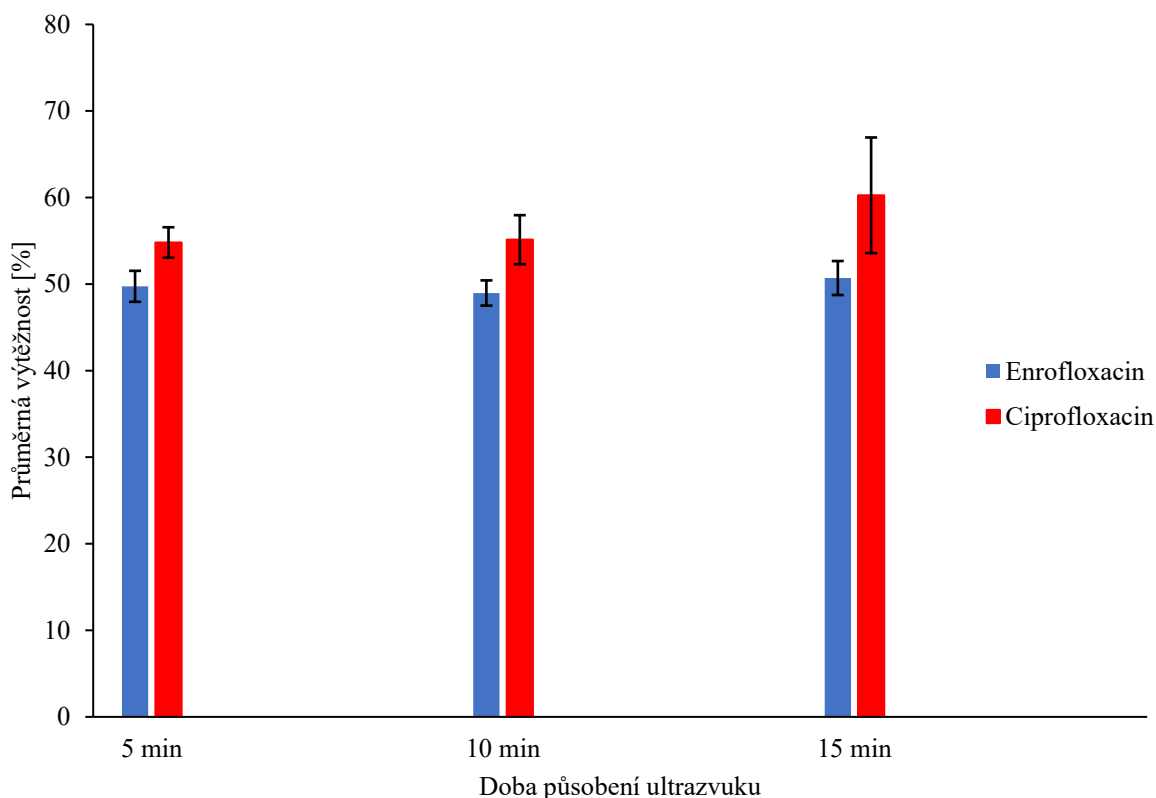
4.4.3 Optimalizace parametru organická fáze



Obrázek 25: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na složení vodné fáze

Pro optimalizaci složení organické fáze byla použita rozpouštědla methanol a acetonitril, buď čistá, nebo ve směsi v různém poměru. Výsledný objem organické fáze vždy činil 10 ml. Při použití čistého methanolu a po přidavku soli, neproběhla vůbec fázová separace. Výsledek byl tedy nevyhovující okamžitě. Nejvíce vyhovující byla směs pro extrakci byla směs ACN a MeOH v poměru 7,5 a 2,5. Čistý acetonitril nevytvořil příliš vyhovující prostředí pro analyty a vyšší i nižší přidavek methanolu než 2,5 ml do něj rovněž ne.

4.4.4 Optimalizace parametru doba působení ultrazvuku



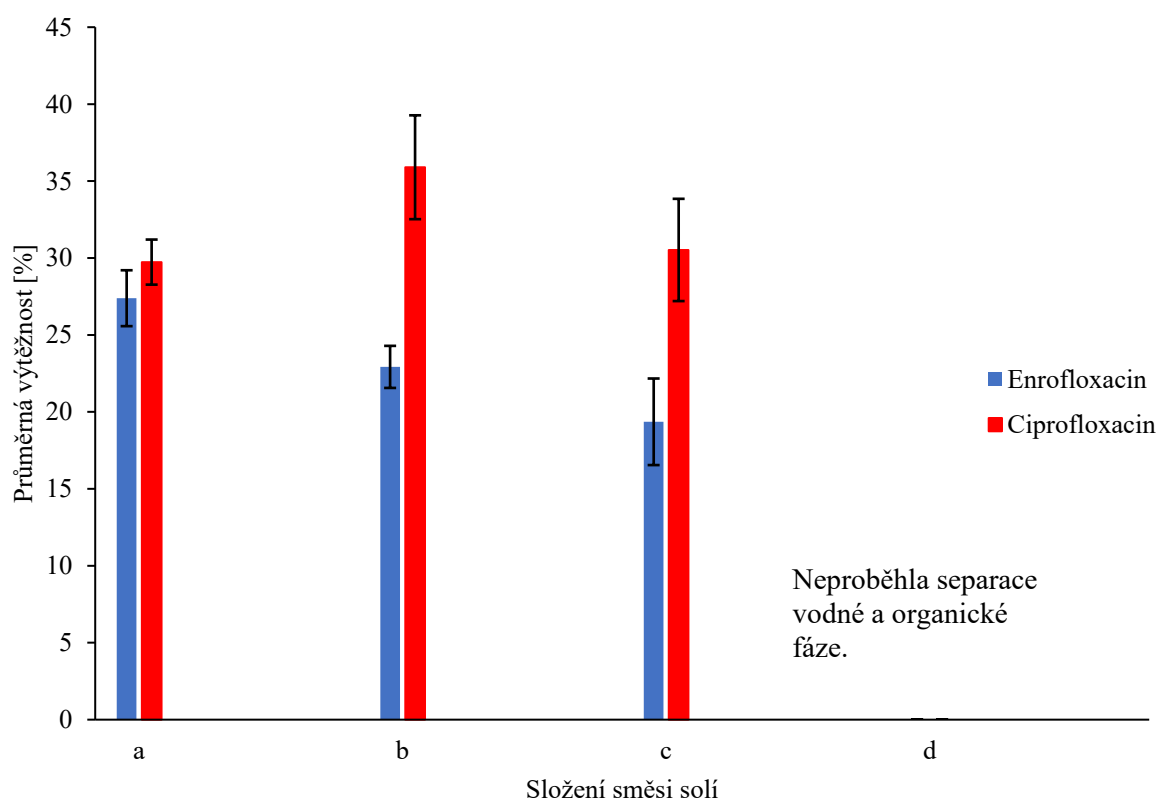
Obrázek 26: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na době působení ultrazvuku

Ultrazvuk byl v porovnání s ostatními postupy jednoznačně prospívající. Vzorky byly jeho působení vystaveny 5, 10 a 15 minut. Výtěžnost extrakce dobou působení příliš ovlivněna nebyla. Finálně bylo působení ultrazvuku nastaveno na dobu 15 minut, kde výtěžnost extrakce byla nejvyšší. Tato doba působení byla rovněž použita i v publikaci odkud byl postup převzat.

4.4.5 Optimalizace parametru složení směsi solí

Složení směsi solí bylo následující:

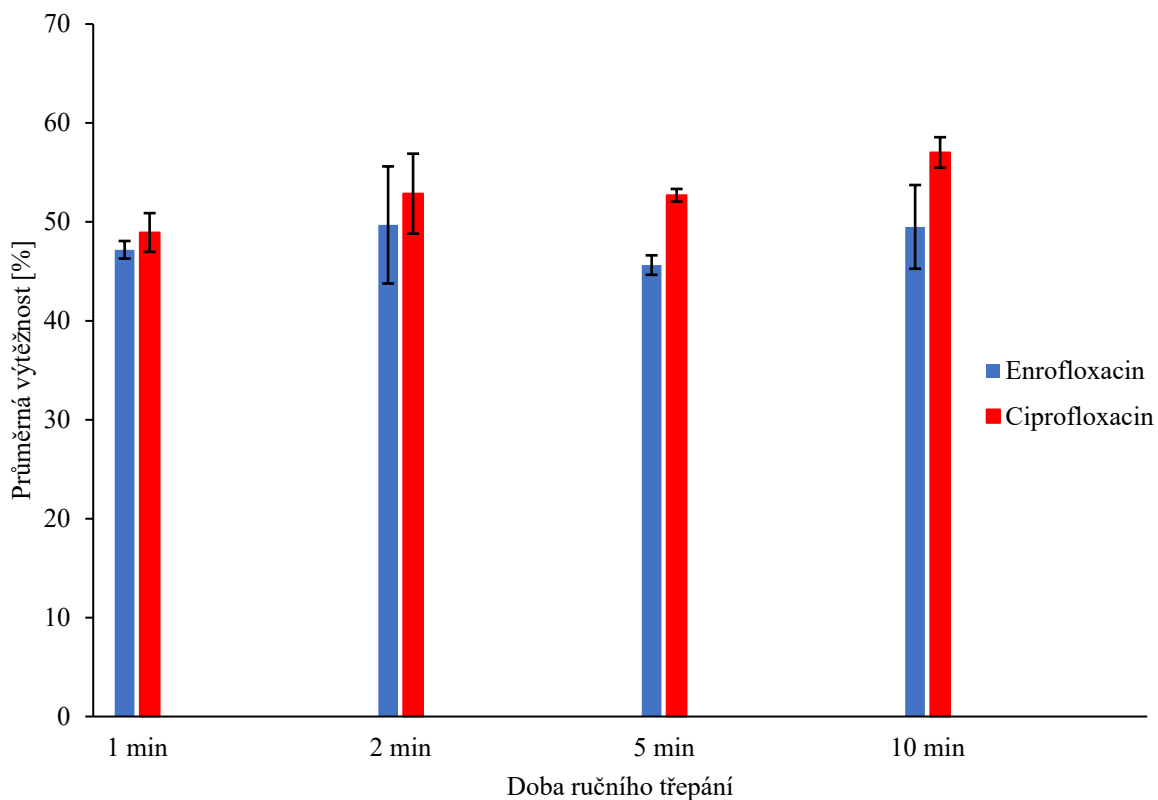
- a: 4 g MgSO₄ + 1 g NaCl
- b: 3 g MgSO₄ + 1 g NaCl + 1 g Mg(NO₃)₂
- c: 2 g MgSO₄ + 1 g NaCl + 2 g Mg(NO₃)₂
- d: 4 g MgSO₄ + 1 g Mg(NO₃)₂



Obrázek 27: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na složení směsi solí

Pro separaci fází byly použity soli síran hořečnatý, chlorid sodný a dusičnan hořečnatý. Tyto soli byly použity v různém složení a poměru. Směs musela dostatečně změnit iontovou sílu vodné fáze a tím indukovat separaci fází. Složení síranu hořečnatého a dusičnanu hořečnatého nebylo vyhovující, protože separace fází neproběhla vůbec. Jako nejvíce vyhovující byla vybrána směs síranu hořečnatého a chloridu sodného bez přídavku dusičnanu hořečnatého, protože pro enrofloxacin, který byl v reálných vzorcích klíčový, byla výtěžnost extrakce nejvyšší. Čím větší přídavek dusičnanu hořečnatého byl přidán, tím horší byla výtěžnost pro enrofloxacin. Čím nižší byl obsah síranu hořečnatého ve směsi, tím horší byla výtěžnost extrakce, neboť organická fáze nebyla dobře vysušena od vodné fáze.

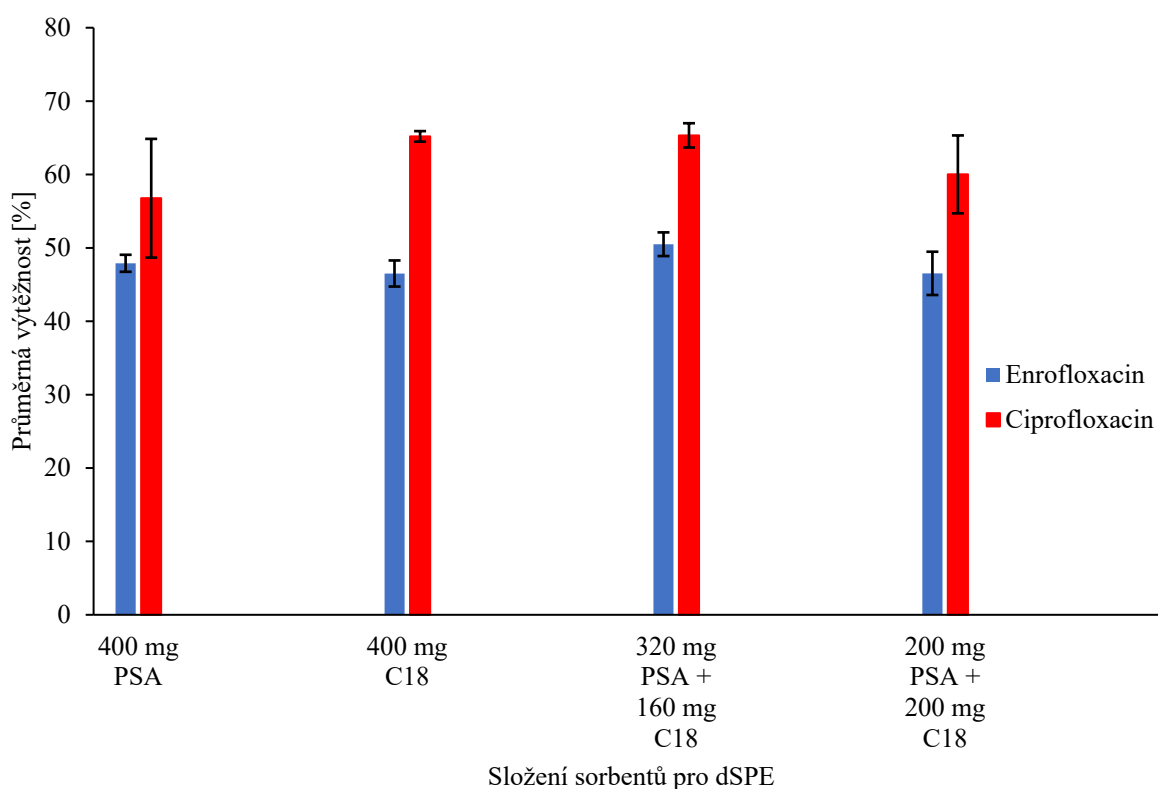
4.4.6 Optimalizace parametru doba ručního třepání



Obrázek 28: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na době ručního třepání

Vzorky byly třepány v ruce po různou dobu. Úskalím ručního třepání může být nerovnoměrnost intenzity, s jakou jsou vzorky v ruce třepány. Pro tyto účely bývají v laboratořích vertikální třepačky, které jsou schopny rovnoměrně a intenzivně protřepat velké množství vzorků najednou. Jako nejvíce vyhovující bylo vybráno třepání po dobu 2 minut, protože rovnoměrnost třepání je možno ještě uhlídat, a protože rozdíly v době třepání nebyly příliš znatelné.

4.4.7 Optimalizace parametru složení sorbentů pro dSPE

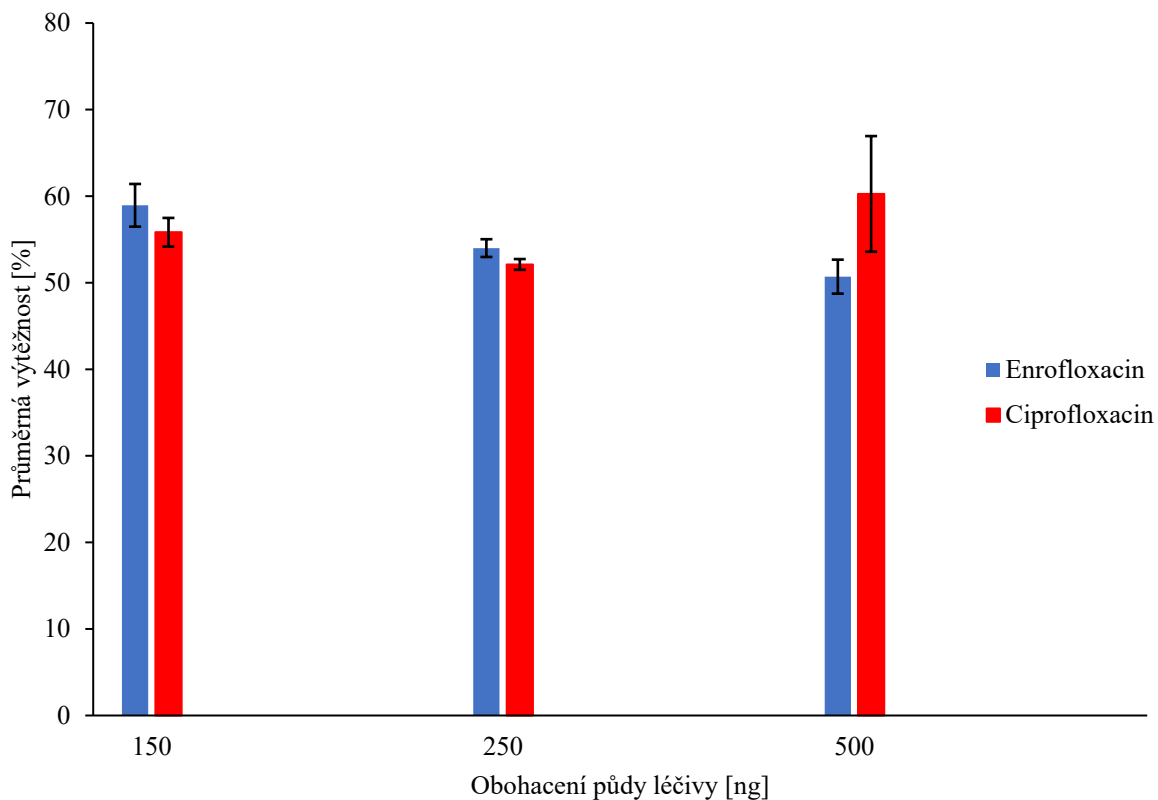


Obrázek 29: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na složení sorbentů pro dSPE

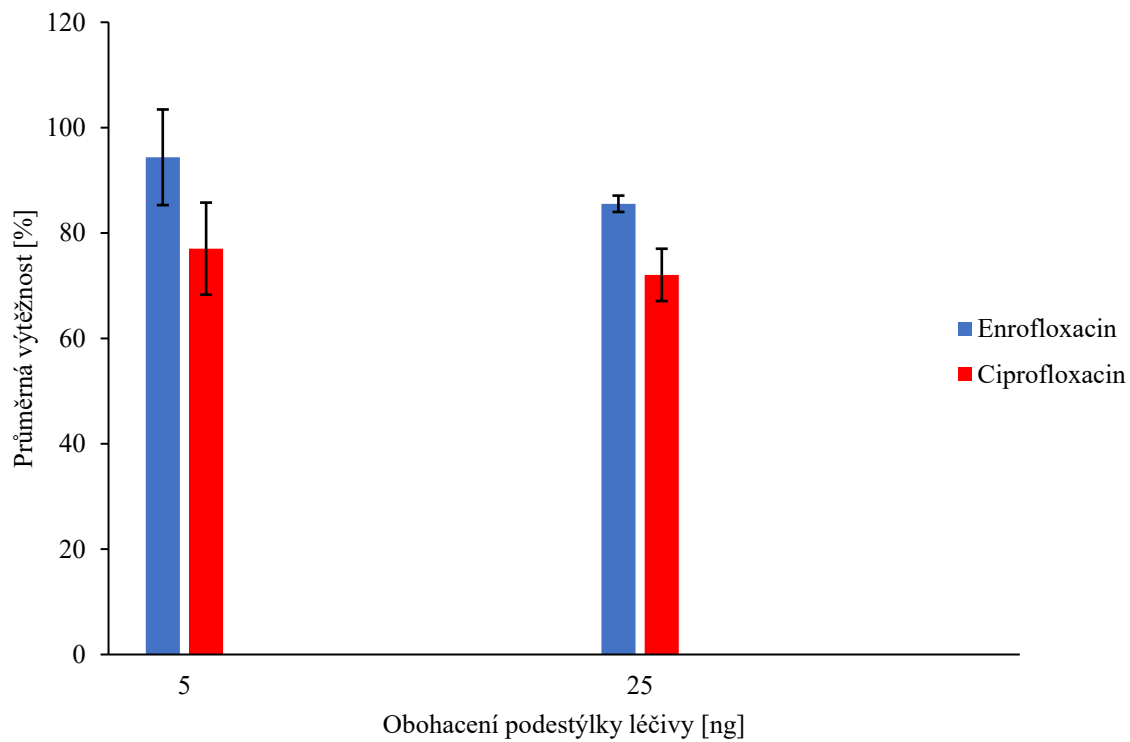
Pro dSPE byly použity dva typy sorbentů, a to PSA a C18. Aktivní uhlí použito nebylo, neboť se používá pro čištění extraktů obsahující barviva (např. chlorofyl, karotenoidy). Sorbenty byly použity buď jednotlivě, nebo ve směsi. Do každé zkumavky se sorbenty byl navíc přidán síran hořečnatý, aby organická fáze byla řádně vysušena. Nejvhodnější složení sorbentů pro čištění je dle grafu PSA a C18 (320 mg a 160 mg). U ostatních případů je výtěžnost extrakce o něco nižší. To může být způsobeno tím, že sorbentu je ve zkumavce o něco méně, tudíž není extrakt tak dobře přečištěn. Přídavek C18 k PSA zlepšil výtěžnost extrakce.

4.4.8 Ověření funkčnosti postupu na vzorcích půdy a podestýlky obohacených na různých koncentračních hladinách

Vzorky čisté půdy a podestýlky neobsahující daná léčiva byly obohaceny ciprofloxacinem a enrofloxacinem na různých koncentračních hladinách, aby byla ověřena funkčnost extrakčního postupu. Optimalizovaný extrakční postup je uveden na *str. 44*. Seznam koncentračních hladin je uveden v *Tabulce 28*. Pro korekci matrice byl k finálnímu vzorku před filtrací přidán IS. Vzorky byly vyhodnoceny v programu TASQ pomocí připravené externí kalibrace. Výsledky pro půdu jsou zobrazeny na *Obrázku 28* a pro podestýlku na *Obrázku 29*. Výsledky jsou rovněž uvedeny v *Tabulce 41* pro půdu a v *Tabulce 42* pro podestýlku (Příloha č. 1).



Obrázek 30: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na obohacení půdy

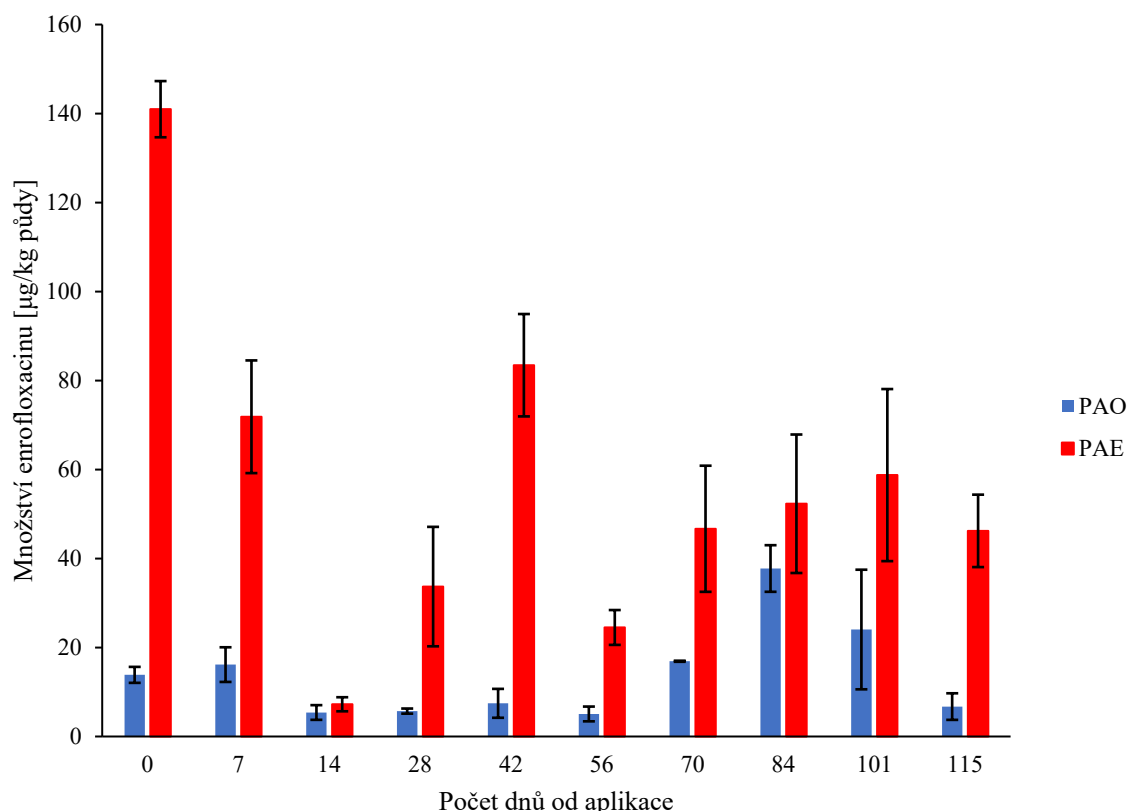


Obrázek 31: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na obohacení podestýlky

Cíly provedeného experimentu bylo aplikovat optimalizovaný extrakční postup na vzorky podestýlky, ověřit, zda je výtěžnost extrakce konstantní na různých koncentračních hladinách, nebo jestli dochází k fluktuaci a také jestli je extrakční postup reprodukovatelný. Bylo zjištěno, že výtěžnost extrakce je poměrně konstantní pro všechny zkoušené koncentrační hladiny jak pro půdu, tak i pro podestýlku. Co se týče opakovatelnosti, směrodatné odchylky u půdy jsou menší než u podestýlek. Může to být tím, že na objem je ve zkumavce menší množství a dojde k lepšímu promísení vzorku s rozpouštědly. V případě podestýlek je ve zkumavce objemově větší množství vzorku a vzorek není dokonale smočen v celém jeho objemu. Podestýlka s papírem také nasaje velké množství vody, ztěžkne a je obtížnější ji promíchat.

4.5 Stanovení enrofloxacinu a ciprofloxacinu ve vzorcích půdy a podestýlek

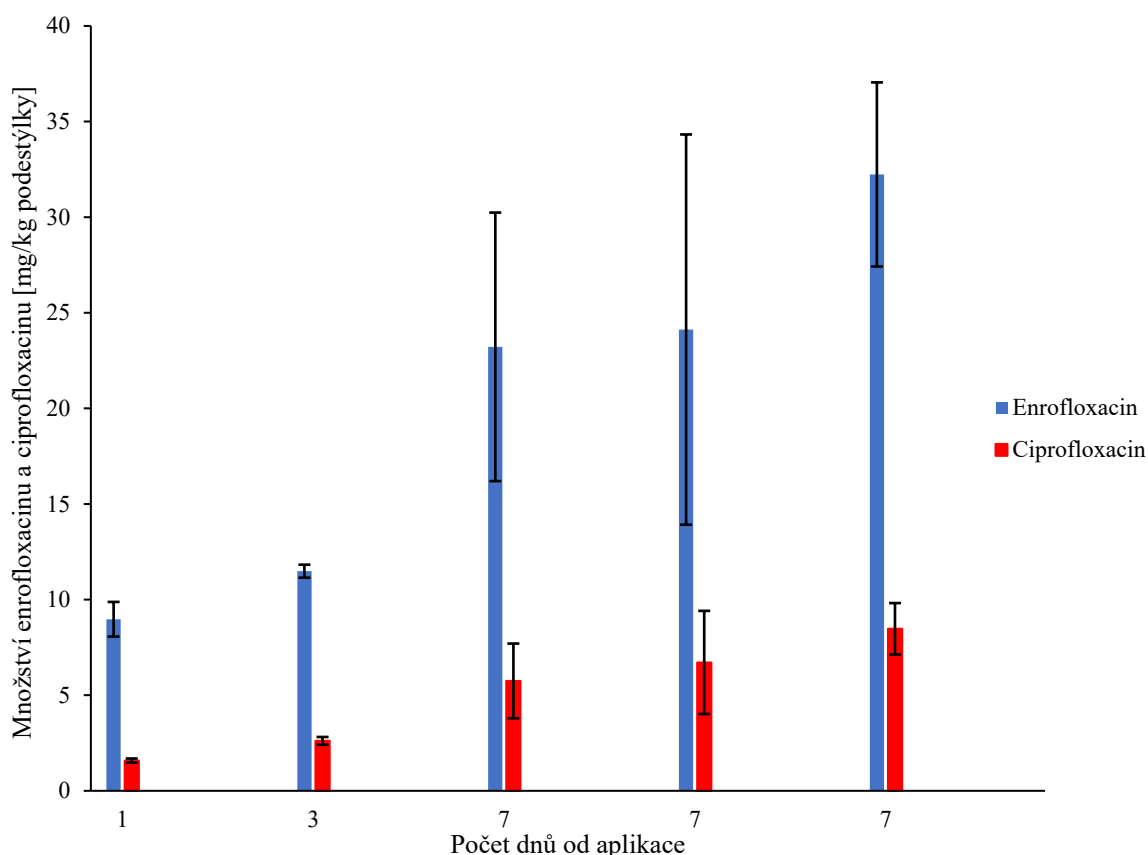
Optimalizovaný extrakční postup byl aplikován na vzorky půdy a podestýlky, aby byl zjištěn obsah enrofloxacinu, případně jeho metabolitu ciprofloxacinu. Tyto vzorky byly dodány od ÚKZUZ. Optimalizovaný extrakční postup je uveden na *str. 44*. Seznamy vzorků a jejich popis jsou uvedeny v *Tabulce 18* a *Tabulce 21*. Pro korekci matrice byl k finálnímu vzorku před filtrací přidán IS. Vzorky byly vyhodnoceny v programu TASQ pomocí připravené externí kalibrace. Výsledky pro půdu jsou graficky znázorněny na *Obrázku 32* a pro podestýlku na *Obrázku 33*. Výsledky jsou rovněž uvedeny v *Tabulce 43* pro půdu a v *Tabulce 44* pro podestýlku (Příloha č. 2).



Obrázek 32: Grafické znázornění množství enrofloxacinu v půdě v závislosti na době setrvání v půdě (PAO - vzorky po aplikaci kontaminované podestýlky, PAE - vzorky s obohacením enrofloxacinem)

Ve vzorcích půdy byl detekován pouze enrofloxacin. Fluktuace hodnot v čase může být způsobeno tím, že podestýlka byla aplikována na reálné prostředí pokusné plochy. Pokusná plocha byla vystavena působení srážek a větru. Analyty mohly být přemístěny a v místě odběru mohla být koncentrace vlivem migrace proměnlivá. Dále může být kolísání způsobeno samotnou analýzou. Půda je značně heterogenní materiál a výsledky mohou být díky tomu proměnlivé. Enrofloxacin v půdě setrval i po 3 měsících od aplikace v případech obou sad vzorků. Zpočátku je vidět vyšší pokles koncentrace. Po 70 dnech se koncentrace drží na velmi podobných hladinách.

Fluorochinolony mají dle dostupné literatury poločas rozpadu v půdě vyšší než 90 dnů, což je dle výsledků potvrzeno [5].



Obrázek 33: Grafické znázornění množství enrofloxacinu a ciprofloxacinu v podestýlkách v závislosti na době po medikaci drůbeže

Ve vzorcích podestýlek byl detekován jak enrofloxacin, tak jeho metabolit ciprofloxacin. Podestýlky obsahovaly trus, slámu a papír. Nebylo možné získat reprezentativní vzorek, neboť materiál byl značně heterogenní a bylo těžké ho před samotnou analýzou homogenizovat, proto jsou mezi výsledky relativně vysoké směrodatné odchylky. Nálezy jsou ve vzorcích poměrně vysoké, jedná se o mg/kg. Drůbež zmetabolizuje malou část dávky léčiva a zbytek vyloučí z těla exkrementy. Koncentrace léčiv se od podání drůbeži v podestýlce zvyšuje. Ve vzorcích byl detekován i ciprofloxacin, což se dalo očekávat, neboť je metabolitem enrofloxacinu.

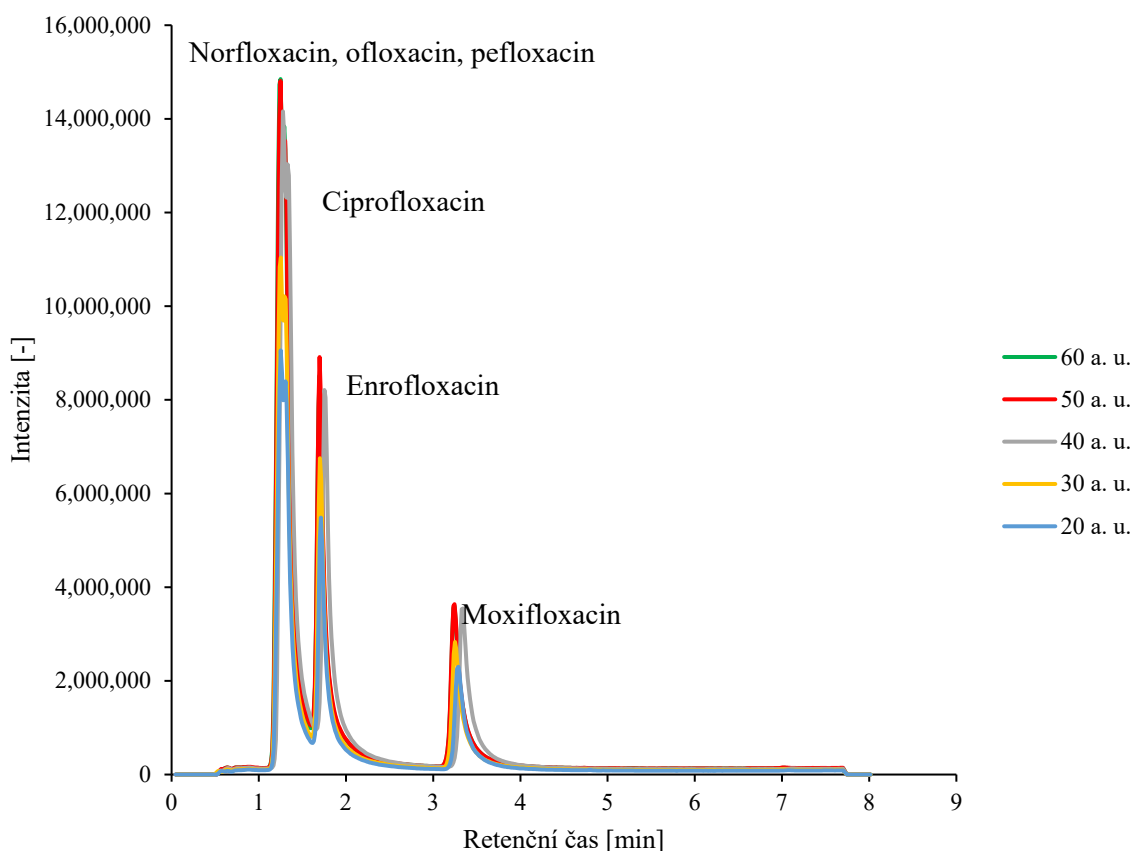
Jelikož je aplikace hnoje do půdy v rámci EU podporována, alternativním řešením, jak předejít kontaminaci půdy, by mohla být například úprava hnoje např. kompostováním [24].

4.6 Aplikace optimalizovaného postupu na skupinu fluorochinolonů v různě definovaných půdách

Během semestru byly dokoupeny další standardy z řady fluorochinolonových antibiotik. Tato antibiotika byla aplikována na 3 různě definované půdy (rovněž dodány od ÚKZUZ). Nejprve byla vytvořena a optimalizována metoda na UPLC-ESI-TQ. Optimalizovaný extrakční postup je uveden na *str. 44*. Půdy jsou charakterizovány v *Tabulce 19*, *Tabulce 32* a *Tabulce 33*. Pro korekci matrice byl k finálnímu vzorku před filtrací přidán IS. Vzorky byly vyhodnoceny v programu TASQ pomocí připravené externí kalibrace.

4.6.1 Optimalizace metody UPLC-ESI-TQ pro analýzu fluorochinolonů

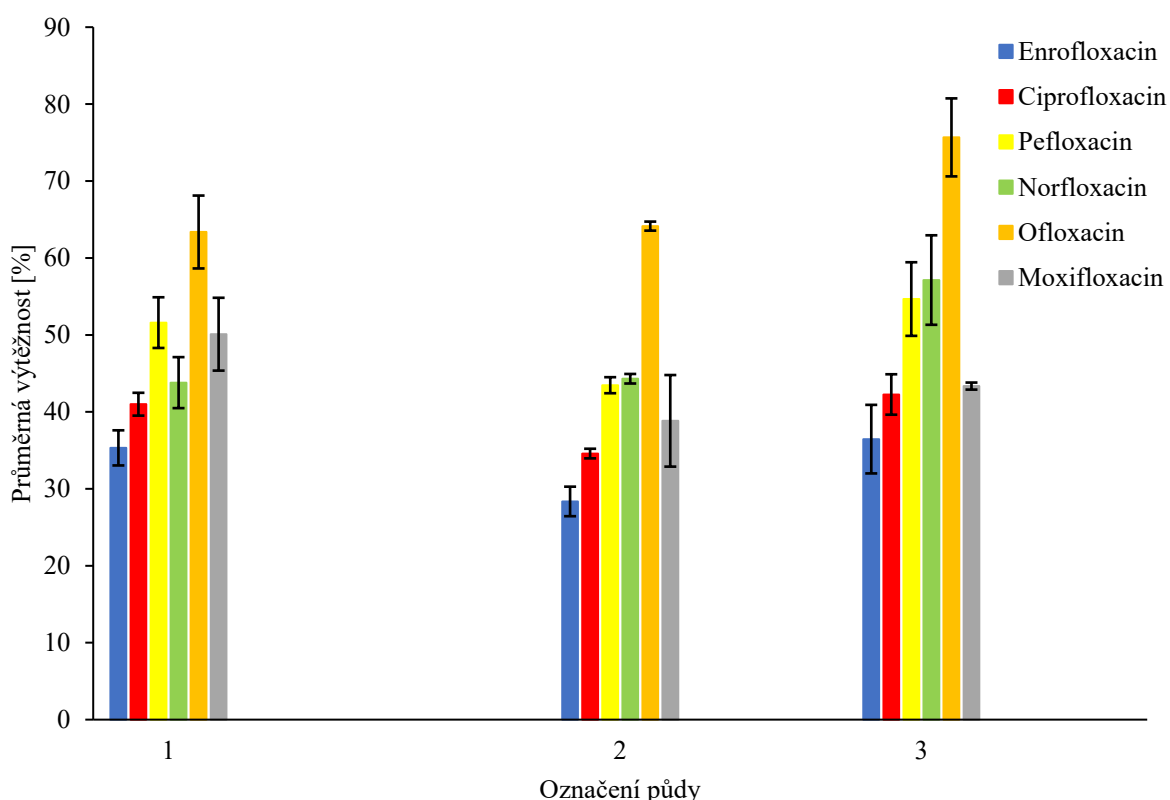
Jako mobilní fáze byla použita 0,1% HCOOH a acetonitril. Jako stacionární fáze byla zvolena kolona Luna Polar C18 o velikosti částic 1,6 μm . Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min a nástřik na 7 μl . Pro optimalizaci přístroje byl použit směsný kalibrační roztok o koncentraci jednotlivých léčiv 500 ng/ml. Byl optimalizován gradient mobilní fáze (uveden *Tabulce 34*). Následně proběhla optimalizace parametrů hmotnostního spektrometru. Byly optimalizovány následující parametry: napětí elektrospreje, teplota pomocného plynu, teplota sušícího plynu, průtok zmlžovacího plynu a kolizní energie. Nastavení hmotnostního spektrometru je uvedeno v *Tabulce 35* a *Tabulce 36*. Jako příklad grafického znázornění optimalizace MS parametrů byla vybrána optimalizace průtoku zmlžovacího plynu, kde byl rozdíl v nastavení nejvíce viditelný (*Obrázek 34*).



Obrázek 34 Optimalizace průtoku zmlžovacího plynu

4.6.2 Aplikace optimalizovaného postupu na skupinu fluorochinolonů v různě definovaných půdách

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit, zda optimalizovaný postup bude funkční i pro ostatní fluorochinolonová antibiotika v půdě, popřípadě zhodnotit jejich výtěžnosti extrakce a dále porovnat, zda je výtěžnost extrakce ovlivněna vlastnostmi dané půdy. Půda č. 1 obsahovala nejvíce vápníku a hořčíku. Půda č. 2 byla nejbohatší v obsahu organické hmoty. Naproti tomu půda č. 3 byla, co se týče obsahu vápníku, hořčíku a organické hmoty, nejchudší. Výsledky jsou graficky znázorněny na *Obrázku 35*. Výsledky jsou rovněž uvedeny v *Tabulce 45*. (Příloha č. 3)



Obrázek 35: Grafické znázornění výtěžnosti v závislosti na analyzované půdě

Bylo zjištěno, že optimalizovaný postup je funkční pro extrakci dalších léčiv z řady fluorochinolonů. Nejvyšší výtěžnosti extrakce bylo dosaženo u ofloxacinu v průměru kolem 70 %. Další fluorochinolony byly extrahovány s výtěžností extrakce v průměru kolem 50 %. Lze říci, že chování dané skupiny látek je při aplikovaném postupu velmi podobné.

Byly porovnány různě definované půdy s různým obsahem organické hmoty, vápníku a hořčíku. Tyto parametry mohou dle dostupné literatury ovlivnit chování fluorochinolonů v půdě, protože se mohou vázat na půdní organickou hmotu nebo tvořit komplexy s vápníkem a hořčíkem. Půda č. 3 obsahovala nejméně organické hmoty a měla nejmenší obsah vápníku i hořčíku. Zde byla výtěžnost extrakce nejvyšší, takže tyto charakteristiky mohou mít na účinnost extrakčního postupu vliv. Půda č. 1 obsahovala nejvíce vápníku a hořčíku, půda č. 2 nejvíce organické hmoty. Z půdy č. 2 byla extrakce nejméně účinná. Analyty se na půdní organickou hmotu mohly z části navázat a extrakci tak nepodlehly. U analýzy půd tedy záleží, jak je daná půda charakterizována.

4.7 Shrnutí výsledků

Experimentální práce byla rozdělena do následujících částí: výběr vhodného extrakčního postupu, jeho optimalizace, aplikace optimalizovaného postupu na vzorky půdy a podestýlek a ověření funkčnosti extrakčního postupu pro ostatní fluorochinolonová antibiotika, kterými byly obohaceny různě definované půdy.

Dostupné literatury, zabývající se aplikací metody QuEChERS, není příliš mnoho, a proto byly aplikovány různé postupy z publikací [76 – 78], které se lišily ve zkoumané matici. V publikacích se řešila problematika multireziduálních analýz, byly stanoveny různé skupiny léčiv najednou a byl hledán kompromis, co se týče extrakčního postupu. Tato práce byla zaměřena pouze na fluorochinolony, tudíž byl extrakční postup uzpůsoben těmto léčivům. Byla tak dosažena vyšší výtěžnost extrakce než např. v publikaci [76]. Dle vyhodnocených výsledků byl vybrán vhodný postup. V tomto postupu byl oproti jiným využit ultrazvuk, který mohl uvolnění léčiv z půdy podpořit, protože je zde pravděpodobnost sorpce na organickou hmotu [22, 23]. Byla zde použita směs solí síranu hořečnatého a chloridu sodného, který se běžně užívá [68].

Vybraný postup byl dále optimalizován. V literatuře bylo uvedeno, že fluorochinolony mohou tvořit s ionty hořčíku z půdy nebo z přidané soli komplexy [22, 23]. Tato skutečnost by mohla být ošetřena přidavkem EDTA. Po porovnání vzorku bez přidavku a s přidavkem EDTA bylo zjištěno, že s přidavkem se výtěžnost extrakce jednoznačně zvýšila. Fluorochinolony jsou zwitteriontové sloučeniny a jejich forma závisí na pH [32]. Pro porovnání nejpříznivějšího prostředí byla vyzkoušena různě definovaná vodná fáze. Pro extrakci bylo nejpříznivější prostředí o pH 4. Složení separační soli také může pH ovlivnit a zároveň ovlivňuje i separaci fází. Nejvíce vyhovovalo složení síranu hořečnatého v kombinaci s chloridem sodným. Parametry, jako doba ručního třepání a doba působení ultrazvuku, výtěžnost extrakce příliš neovlivnily, ale bez nich by se extrakce určitě neobešla. Směs je nutno dobře protřepat a zabránit tak srážení síranu hořečnatého. Pro tyto účely se využívají vymražené kamínky, které se ke směsi přidávají. Čistící krok dSPE byl aplikován při různém složení sorbentů. Nejvíce vyhovovala kombinace PSA a C18, která byla při čištění složitě matrice jako je půda účinná. Složení sorbentů je totiž závislé na dané matici [68, 69]. Optimalizovaný postup byl vyzkoušen na půdě a podestýlce obohacených léčiv na různých koncentračních hladinách s výsledkem uspokojivé reprodukovatelnosti.

Optimalizovaný postup byl využit pro stanovení enrofloxacinu a ciprofloxacinu ve vzorcích půdy a podestýlky. Vlivem procesů probíhajících v půdě mohou fluorochinolony v půdě setrvávat po dlouhou dobu [22, 23]. Tato skutečnost byla potvrzena, protože enrofloxacin byl v půdě detekován i po 115 dnech od aplikace hnoje. Podestýlky byly koncentrované, protože drůbež zmetabolizuje pouze část antibiotika a zbytek vyloučí výkaly.

Dle dostupné literatury ovlivňuje chování fluorochinolonů v půdě rovněž její charakteristika (hlavně obsah vápníku, hořčíku a půdní organické hmoty [22, 23]). Tato skutečnost byla potvrzena na 3 různě definovaných půdách. Nejvyšší výtěžnosti extrakce se projeví u půdy nejchudší na obsah vápníku, hořčíku i půdní organické hmoty.

5 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla řešena aktuální problematika výskytu léčiv v životním prostředí a na ni navazující vznik a šíření genů antibiotické rezistence. Úkolem této diplomové práce bylo vybrat a následně optimalizovat extrakční metodu pro stanovení fluorochinolonových antibiotik (přednostně enrofloxacinu a ciprofloxacinu) v půdě a drůbeží podestýlce.

Z dostupné literatury byl vybrán vyhovující postup QuEChERS extrakce, který byl následně optimalizován pro stanovení enrofloxacinu a ciprofloxacinu v půdě a drůbeží podestýlce. Optimalizovaný postup QuEChERS byl následně ještě vyzkoušen a použit pro extrakci dalších zástupců z řady fluorochinolonů z půdy (ofloxacinu, pefloxacinu, norfloxacinu a moxifloxacinu). Byl proveden také experiment pro porovnání, zda charakteristika půdy ovlivňuje výtěžnost extrakčního postupu.

Vzorky byly analyzovány pomocí UPLC-ESI-TQ. Pro stanovení enrofloxacinu a ciprofloxacinu v půdě a podestýlce byla použita již optimalizovaná metoda. Pro stanovení skupiny fluorochinolonů bylo nutné optimalizovat metodu novou.

Optimalizovaný QuEChERS postup byl funkční jak pro půdu, tak i pro podestýlku s relativně konstantními výtěžnostmi extrakce a uspokojivou úrovní reprodukovatelnosti. Enrofloxacin byl detekován jak v půdě, tak i v podestýlce. Ciprofloxacin, jako metabolit enrofloxacinu, byl detekován pouze v podestýlce. Optimalizovaný QuEChERS postup byl také funkční pro extrakci ostatních fluorochinolonů z půdy. Při porovnání různě charakterizovaných půd bylo ověřeno tvrzení z dostupné literatury, že přítomnost určitých prvků a vyšší obsah organické hmoty v půdě může ovlivnit výtěžnost extrakce, konkrétně fluorochinolonů. Postup je tedy třeba optimalizovat a ověřit vždy pro každou půdu se svou jedinečnou charakteristikou.

Na tuto práci budou následně navazovat další práce, které budou zaměřeny na analýzu léčiv v salátu, pěstovaném na půdě kontaminované léčivými, která budou extrahována také metodou QuEChERS. Další zaměření bude na žížaly, které budou chovány taktéž v půdě kontaminované léčivými, následně budou usmrceny a léčiva z nich budou extrahována rovněž metodou QuEChERS.

Závěrem bych dodala, že využití metody QuEChERS je velmi efektivní, a pokud je to možné je její použití určitě na místě. V laboratorní praxi je metoda často a rutinně využívána. V blízké budoucnosti budou léčiva v životním prostředí důkladněji sledována a monitorována, protože se stávají čím dál častějším polutantem a jejich výskyt, zejména antibiotik, může mít pro zdraví velmi negativní dopad.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ALDUINA, Rosa, 2020. Antibiotics and Environment. Antibiotics [online]. 9(202) [cit. 2022-01-11]. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9040202www.mdpi.com/journal/antibiotics
- [2] Antibiotics in the Environment: A Review, 2015. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences [online]. 4(11), 278-285 [cit. 2022-01-11]. ISSN 2319-7706. Dostupné z: <https://www.ijcmas.com/vol-4-11/Smita%20Pareek,%20et%20al.pdf>
- [3] Antibiotic resistance, c2021. World Health Organization [online]. WHO [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- [4] Studie: Bakterie vysoce odolné vůči antibiotikům připraví o život víc lidí, než HIV nebo malárie. In: IRozhlas [online]. c1997-2022: Český Rozhlas [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: https://www.irozhlas.cz/zivotni-styl/zdravi/antibiotika-lek-nemoc-zdravi-rezistence_2201202305_voj?fbclid=IwAR3KIFQcNPHbOl3rgs0IWCVMGCLqneGQWVUyuunzMP0Lia-HZj7d6VuRCHo
- [5] ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V PŮDĚ A PŘÍPADNĚ DALŠÍCH ČÁSTECH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ, Zpráva z funkčního úkolu MZe za rok 2021, c2021. In: Bezpečnost potravin [online]. Ministerstvo zemědělství [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/Benes/Zprava_AMR_2021_FINAL.pdf
- [6] Zákon č. 378/2007 Sb.: Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů, ze dne 6. prosince 2007.
- [7] HAMPL, F. a J. PALEČEK, 2002. Farmakochemie [online]. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [cit. 2021-11-01]. ISBN 80-7080-495-5. Dostupné z: http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-495-5/pages-pdf/001.html
- [8] Z čeho se lék skládá? Co je léčivá a pomocná látka? In: Olecich.cz [online]. QCM [cit. 2021-11-01]. Dostupné z: <http://www.olecich.cz/encyklopedie/z-ceho-se-lek-sklada-co-je-leciva-a-pomocna-latka>
- [9] Paralen 500 - příbalový leták, c2021. In: Pribalove-letaky.cz [online]. pribalove-letaky.cz [cit. 2021-11-01]. Dostupné z: <https://pribalove-letaky.cz/paralen-500>
- [10] Originální léčiva, generika, biosimilars, léčiva pro moderní terapii, orphans. In: IS MUNI [online]. Brno: MUNI [cit. 2021-11-01]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/jaro2013/ZLFA0621p/um/II._originalni_LP_generika_moder ni_terapie_orphans.txt
- [11] Antimikrobiální léky - antibiotika a chemoterapeutika, 2002. In: Otázky z medicíny [online]. [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: <http://otazkyzmediciny.sweb.cz/HTML/Interna/I02A.htm>
- [12] KÜMMERER, Klaus, 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere [online]. 75(4), 417-434 [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2008.11.086
- [13] Antibiotika a chemoterapeutika, 2021. In: Univerzita Karlova [online]. Praha: Univerzita Karlova [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: <http://fb.cuni.cz/Data/files/UIM/materials/doc/Osetrovatelstvi%20rocnik/5-antibiotika.pdf>

- [14] VERMA, Tanya, Anchal AGGARWAL, Shikha SINGH, Sumit SHARMA a Saurabh Jyoti SARMA, 2022. Current challenges and advancements towards discovery and resistance of antibiotics. *Journal of Molecular Structure* [online]. 1248 [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2021.131380
- [15] Citlivost a rezistence mikroorganismů na antimikrobiální léčiva, c2021. In: Univerzita Pardubice [online]. Pardubice: Univerzita Pardubice [cit. 2021-11-29]. Dostupné z: https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/uechi/crp-msmt-2015/ci-re-mi.pdf
- [16] 2020. Vzrůstající rezistence k antibiotikům a racionální antibiotická terapie. *MEDICÍNA PRO PRAXI* [online]. 17(1), 8-12 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2020/01/01.pdf>
- [17] GRITSCH, Lukas, 2019. An investigation on antibiotic-free antibacterial materials combining bioresorbable polyesters, chitosan and therapeutic ions [online]. Norimberg [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/336563688_An_investigation_on_antibiotic-free_antibacterial_materials_combining_bioresorbable_polyesters_chitosan_and_therapeutic_ions. Disertace. Erlangensko-norimberská univerzita (Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg).
- [18] KRAEMER, Susanne, Arthi RAMACHANDRAN a Gabriel G. PERRON, 2019. Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms* [online]. 7(6) [cit. 2022-01-14]. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7060180
- [19] Antibiotic removal processes from water & wastewater for the protection of the aquatic environment - a review, 2021. *Journal of Water Process Engineering* [online]. 45 [cit. 2022-01-11]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jwpe.2021.102474
- [20] ZHAO, Renxin, Jie FENG, Jin HUANG, Xiaoyan LI a Bing LIAB, 2021. Responses of microbial community and antibiotic resistance genes to the selection pressures of ampicillin, cephalexin and chloramphenicol in activated sludge reactors. *Science of The Total Environment* [online]. 755 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142632
- [21] Occurrence, distribution, and health risk assessment of quinolone antibiotics in water, sediment, and fish species of Qingshitan reservoir, South China, 2020. *Scientific Reports* [online]. 10 [cit. 2022-01-11]. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-72324-9
- [22] PAN, Min a L.M. CHU, 2017. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Science of The Total Environment* [online]. 599-600, 500-512 [cit. 2022-01-15]. Dostupné z: doi:doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.214
- [23] Current progress in the adsorption, transport and biodegradation of antibiotics in soil, 2019. *Journal of Environmental Management* [online]. 251 [cit. 2022-01-15]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2019.109598

- [24] Dynamika výskytu genů antibiotické rezistence při biokonverzi odpadů larvami *Hermetia illucens* [online], 2020. Brno [cit. 2022-05-06]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/tesgf/Dynamika-vyskytu-genu-antibioticke-rezistence-pri-biokonverzi-odpadu-larvami-Hermetia-illucens.pdf>. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita.
- [25] Konsensus používání antibiotik: Fluorochinolony 2019, c2022. In: Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně [online]. Praha: ČLS JEP, z.s [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://www.cls.cz/media/document/6e25ae726f9ccef045b2db6b5b777687.pdf>
- [26] PAPOUŠKOVÁ, Aneta, Martina MASAŘÍKOVÁ a Alois ČÍŽEK, 2020. VYBRANÉ KAPITOLY Z VETERINÁRNÍ BAKTERIOLOGIE II [online]. Brno: VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: https://www.vfu.cz/files/upload/prorektor%20pro%20strategii%20a%20rozvoj/1240_05_v%C3%BDstup_Vybran%C3%A9%20kapitoly%20z%20veterin%C3%A1rn%C3%AD%20bakteriologie%20II%202020.pdf
- [27] Možnosti fluorochinolonů v současné klinické praxi, 2010. Klinická farmakologie a farmacie [online]. 24(4), 184-186 [cit. 2022-01-17].
- [28] FLUOROCHINOLONY. In: Ústav mikrobiologie CUNI [online]. Praha [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/atb/fluorochinolony.htm>
- [29] Užíváme příliš antibiotik, ztrácejí tak účinnost, varoval hlavní hygienik, c1996-2021. In: Česká televize [online]. Česká televize [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://ct24.ceskatelevize.cz/domaci/1619841-uzivame-prilis-antibiotik-ztraceji-tak-ucinnost-varoval-hlavni-hygienik>
- [30] *Streptococcus pneumoniae*, 2022. In: Centers for Disease Control and Prevention [online]. Centers for Disease Control and Prevention [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/>
- [31] About Pneumococcal Disease - Types of infection, 2022. In: Centers for Disease Control and Prevention [online]. Centers for Disease Control and Prevention [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/pneumococcal/about/infection-types.html>
- [32] Fluoroquinolones (FQs) in the environment: A review on their abundance, sorption and toxicity in soil, 2018. Chemosphere [online]. 191, 704-720 [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.092
- [33] Occurrence of fluoroquinolones and fluoroquinolone-resistance genes in the aquatic environment, 2013. Science of The Total Environment [online]. 444, 508-514 [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2012.11.077
- [34] Enrofloxacin, 2022. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Enrofloxacin#/media/File:Enrofloxacin_Structural_Formula_e.png
- [35] Enrofloxacin. In: PubChem [online]. PubChem [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enrofloxacin>

- [36] Pharmacokinetic profile of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in Asian house geckos (*Hemidactylus frenatus*) after single-dose oral administration of enrofloxacin, 2020. *Veterinary and Animal Science* [online]. 9 [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: doi:10.1016/j.vas.2020.100116
- [37] Enrofloxacin, c2022. In: *VCA animal hospitals* [online]. VCA Animal [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: <https://vcahospitals.com/know-your-pet/enrofloxacin>
- [38] A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use, 2016. *Open Journal of Veterinary Medicine* [online]. 6(2), 48-50 [cit. 2022-01-18]. ISSN 2165-3364. Dostupné z: doi:10.4236/ojvm.2016.62006.
- [39] 2016. PAPICH, Mark G. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs* [online]. Fourth edition. W.B. Saunders, s. 287-289 [cit. 2022-01-18]. ISBN 9780323244855. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323244855002400>
- [40] Enroxil tablety, c2019. In: *MetropoleVet* [online]. Praha: MetropoleVet [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: <https://www.metropolevet.cz/produkt/tablety-a-leciva/enroxil-tablety/>
- [41] Ciprofloxacin, 2022. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ciprofloxacin#/media/File:Ciprofloxacin.svg>
- [42] Ciprofloxacin. In: *PubChem* [online]. PubChem [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin>
- [43] RILEY, Michael, 2021. *The Essential Guide to Ciprofloxacin: Usage, Precautions, Interactions and Side Effects*. New Orleans, USA: Interactive Media Licensing.
- [44] Ciprofloxacin. *DrugBank Online* [online]. Educe Design & Innovation [cit. 2022-01-21]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00537>
- [45] Účinné látky, c2009. *Moje lékárna* [online]. Moje lékárna [cit. 2022-01-21]. Dostupné z: <https://www.mojelekarna.cz/leky/ucinne-latky/ciprofloxacin.html>
- [46] SODHI, Kushneet Kurr a Dileep Kuma SINGH, 2021. Insight into the fluoroquinolone resistance, sources, ecotoxicity, and degradation with special emphasis on ciprofloxacin. *Journal of Water Process Engineering* [online]. 43 [cit. 2022-01-21]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jwpe.2021.102218
- [47] Norfloxacin, 2022. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Norfloxacin#/media/File:Norfloxacin.svg>
- [48] Norfloxacin. In: *PubChem* [online]. PubChem [cit. 2022-01-17]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4539>
- [49] Norfloxacin, c2000-2022. *Drugs.com* [online]. Drugs.com [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/mtm/norfloxacin.html>
- [50] Léky obsahující účinnou látku NORFLOXACIN (NORFLOXACINUM). In: *Nonstop-lékárna* [online]. [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://nonstop-lekarna.cz/leky-podle-ucinne-latky/norfloxacin-norfloxacinum-2605>
- [51] Effects of antibiotic norfloxacin on the degradation and enantioselectivity of the herbicides in aquatic environment, 2021. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 208 [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111717

- [52] Ofloxacin, 2022. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ofloxacin>
- [53] Ofloxacin. In: PubChem [online]. PubChem [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4583>
- [54] Ofloxacin, 2009. In: Moje lékárna [online]. Moje lékárna [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://www.mojelekarna.cz/leky/ucinne-latky/ofloxacin.html>
- [55] Pefloxacin, 2022. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Pefloxacin#/media/File:Pefloxacin.svg>
- [56] Pefloxacin. In: PubChem [online]. PubChem [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/51081#section=Depositor-Supplied-Synonyms>
- [57] Pefloxacin. In: DrugBank Online [online]. [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00487>
- [58] Pefloxacin, 2009. In: Moje lékárna [online]. Moje lékárna [cit. 2022-03-14]. Dostupné z: <https://www.mojelekarna.cz/leky/ucinne-latky/pefloxacin.html>
- [59] Moxifloxacin. In: PubChem [online]. PubChem [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Moxifloxacin>
- [60] Moxifloxacin, c2011. In: Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK [online]. MUDr. Jiří Štefánek [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/moxifloxacin>
- [61] Moxifloxacin, c2009. In: Moje lékárna [online]. Moje lékárna [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.mojelekarna.cz/leky/ucinne-latky/moxifloxacin.html>
- [62] MRAVCOVÁ, Ludmila, c2022. STANOVENÍ LÉČIV V ŽP: Přednášky doktorky Ludmily Mravcové (Fakulta chemická, VUT Brno) z předmětu Environmentální analýzy. In: VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ [online]. Brno: VUT [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: Výukový software Moodle VUT Brno
- [63] EPA Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS, 2022. In: EPA [online]. US EPA [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf
- [64] JANKŮ, Josef a Jiří J. ČERMÁK. Vzorkování odpadů: Učební texty - první vydání. In: VŠCHT [online]. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: https://uchop.vscht.cz/files/uzel/0011054/Vzorkovani_070104_4.pdf?redirected
- [65] Microwave-assisted extraction and determination of enrofloxacin and danofloxacin photo-transformation products in soil, 2012. Analytical and Bioanalytical Chemistry [online]. 404, 1565–1569 [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-6249-3
- [66] Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil, 2012. Journal of Chromatography A [online]. 1245, 122-133 [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.05.034

- [67] Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, 2003. *Journal of AOAC International* [online]. 86(2), 412-431 [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: doi:10.1093/jaoac/86.2.412
- [68] QuEChERS [online], c2011. Stuttgart: CVUA [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: <https://www.quechers.eu/index.htm>
- [69] QuEChERS, c2022. In: Pragolab [online]. Pragolab [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: <https://www.pragolab.cz/chromatografie-a-ms/spotrebni-material/priprava-vzorku/quechers-hypersep-dispersive-spe->
- [70] Web of Science [online], c2021. Clarivate [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: <https://www.webofscience.com/wos/woscc/basic-search>
- [71] MRAVCOVÁ, Ludmila, c2022. QuEChERS: Přednášky doktorky Ludmily Mravcové (Fakulta chemická, VUT Brno) z předmětu Environmentální analýzy. In: VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ [online]. Brno: VUT [cit. 2022-01-24]. Dostupné z: Výukový software Moodle VUT Brno
- [72] Integrated QuEChERS strategy for high-throughput multi-pesticide residues analysis of vegetables, 2021. *Journal of Chromatography A* [online]. 1659 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2021.462589
- [73] Determination of phthalic acid esters and di(2-ethylhexyl) adipate in fish and squid using the ammonium formate version of the QuEChERS method combined with gas chromatography mass spectrometry, 2022. *Food Chemistry* [online]. 380 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.1321747
- [74] Quantitative determination of pyriproxyfen and its metabolite residues in bee products of China using a modified QuEChERS approach with UPLC-MS/MS, 2021. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 220 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112388
- [75] Improvement of the QuEChERS extraction step by matrix-dispersion effect and application on beta-lactams analysis in wastewater sludge by LC-MS/MS, 2022. *Talanta* [online]. 237 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2021.122923
- [76] DA SILVA, Josiel José, Bianca Ferreira DA SILVA, Nelson Ramos STRADIOTTO, Mira PETROVIC, Pablo GAGO-FERRERO a Meritxell GROS, 2020. Pressurized Liquid Extraction (PLE) and QuEChERS evaluation for the analysis of antibiotics in agricultural soils. *MethodsX* [online]. 7 [cit. 2021-10-19]. ISSN 2215-0161. Dostupné z: doi:10.1016/j.mex.2020.101171
- [77] GUO, Chunna, Mingru WANG, Hui XIAO, Binbin HUAI, Feng WANG, Guangfang PAN, Xiaoping LIAO a Yahong LIU, 2016. Development of a modified QuEChERS method for the determination of veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 1027, 110-118 [cit. 2021-10-19]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2016.05.034

- [78] AJIBOLA, Akinranti S., Oluwasegun A. AMONIYAN, Faith O. EKOJA a Florence O. AJIBOLA, 2021. QuEChERS Approach for the Analysis of Three Fluoroquinolone Antibiotics in Wastewater: Concentration Profiles and Ecological Risk in Two Nigerian Hospital Wastewater Treatment Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 80, 389-401 [cit. 2021-10-19]. Dostupné z: doi:10.1007/s00244-020-00789-w
- [79] KIM, Sung-Chul a Kenneth CARLSON, 2005. LC–MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 24(7), 635-644 [cit. 2022-01-30]. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2005.04.006
- [80] UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters, 2014. *Chromatographia* [online]. 76, 1365-1427 [cit. 2022-01-30]. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-013-2477-8
- [81] GROS, Meritxell, Mira PETROVIĆ a Damià BARCELÓ, 2006. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 386, 941-952 [cit. 2022-01-30]. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-006-0586-z
- [82] Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV, 2006. *Analytica Chimica Acta* [online]. 562(1), 30-35 [cit. 2022-01-30]. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2006.01.054
- [83] QuEChERS sample pre-processing with UPLC–MS/MS: A method for detecting 19 quinolone-based veterinary drugs in goat's milk, 2022. *Food Chemistry* [online]. 373 [cit. 2022-01-30]. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.131466
- [84] Multi-residue method for the detection of 40 β -lactam-antibiotics in vaccines by LC-MS/MS, 2021. *Analytical Biochemistry* [online]. 631 [cit. 2022-01-30]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2021.114299
- [85] An optimized sample treatment method for the determination of antibiotics in seawater, marine sediments and biological samples using LC-TOF/MS, 2018. *Science of The Total Environment* [online]. 634, 994-1004 [cit. 2022-01-30]. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.06.079
- [86] Zajištění jakosti ve forenzní analýze, rozhodovací analýza, legislativní aspekty. In: VŠCHT [online]. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~poustkaj/AMFA%20JH1%20QA.pdf>
- [87] Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, 2011. *Chronicles of Young Scientists* [online]. 2(1), 21-25 [cit. 2022-05-09]. Dostupné z: doi:10.4103/2229-5186.79345

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

WHO	Světová zdravotnická organizace (anglicky <i>World Health Organization</i>)
HP CIAs	Antimikrobika s kritickým významem nejvyšší priority pro humánní medicínu
ÚKZUZ	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (Hroznová 2, 656 06 Brno)
QuEChERS	rychlé, jednoduché, levné, efektivní, robustní a bezpečné (anglicky <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>)
aj	a jiné
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitnou chemii (anglicky <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
INN	Mezinárodní nechráněný název (anglicky <i>International Nonproprietary Name</i>)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
ATB	Antibiotika
např	například
ARB	Bakterie rezistentní na antibiotika (anglicky <i>antibiotic resistant bacteria</i>)
ARG	Geny rezistence na antibiotika (anglicky <i>antibiotic resistant genes</i>)
MGE	Mobilní genetické elementy (anglicky <i>mobile genetic elements</i>)
ČOV	Čistírna odpadních vod
PCU	Populačně korekční jednotka (anglicky <i>population correction unit</i>)
UV	Ultrafialové záření
EARSS	The European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EU	Evropská unie
SPE	Extrakce na tuhou fázi (anglicky <i>Solid phase extraction</i>)
EPRW	European Pesticide Residue Workshop
apod.	a podobně
PSA	Primární sekundární amin
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
UPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

QTRAP	Spojení kvadrupólu s iontovou pastí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
GC	Plynová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
UV/VIS	Viditelné/ultrafialové světlo
MSTFA	N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
RP	Reverzní fáze
SEC	Vylučovací chromatografie
ESI	Elektrosprej
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
QqQ	Trojité kvadrupól
IT	Iontová past
TOF	Analyzátor doby letu
Q-TOF	Spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu
HCOOH	Kyselina mravenčí
FLD	Fluorescenční detekce
LIT	Lineární iontová past
QC	Kontrola kvality (anglicky <i>Quality control</i>)
IS	Vnitřní standard
MeOH	Methanol
ACN	Acetonitril
str.	strana
UPLC-ESI-TQ	Spojení ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s trojitým kvadrupólem a ionizací elektrosprejem
LLOQ	Limit kvantifikace
LOD	Limit detekce

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Výsledky výběru a optimalizace extrakčního postupu pro vzorky půdy a podestýlek

Příloha č. 2: Výsledky stanovení obsahu daných léčiv ve vzorcích půdy a podestýlek

Příloha č. 3: Výsledky aplikace optimalizovaného postupu na různě definované půdy obohacené skupinou fluorochinolonů

Príloha č. 1: Výsledky výberu a optimalizácie extrakčného postupu pro vzorky pôdy a podestýlek

Tabulka 39: Výťažnosti extrakce jednotlivých léčiv při aplikaci různých postupů QuEChERS

Postup	Výtěžnost extrakce enrofloxacinu [%]	Výtěžnost extrakce ciprofloxacinu [%]
1	52 ± 3	41 ± 4
2	37 ± 3	24 ± 1
3a	9,1 ± 0,4	LOD
3b	15 ± 1	6,7 ± 0,3

Tabulka 40: Optimalizované parametry postupu QuEChERS extrakce (zeleně vyznačeny vyhovující parametry)

Parametr	Vzorek	Výtěžnost extrakce enrofloxacinu [%]	Výtěžnost extrakce ciprofloxacinu [%]
Přítomnost EDTA	Bez přítomnosti	36,0 ± 0,6	30 ± 4
	S přítomností	51 ± 2	60 ± 7
Vodná fáze	Voda	20 ± 2	30 ± 7
	Pufř 4,0	35 ± 5	44 ± 2
	Voda + HCOOH (1 %)	24 ± 1	31 ± 4
	Pufř 6,0	33 ± 9	28 ± 3
Organická fáze	MeOH	Neproběhla separace fází.	Neproběhla separace fází.
	ACN	16 ± 2	3 ± 1
	ACN/MeOH (1:1)	19 ± 2	34 ± 1
	ACN/MeOH (9:1)	16 ± 1	5,4 ± 0,5
	ACN/MeOH (37,5:12,5)	27,4 ± 0,6	48 ± 14
Doba ultrazvuku	5 min	50 ± 2	55 ± 2
	10 min	49 ± 1	55 ± 3
	15 min	51 ± 2	60 ± 7
Sůl	4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl	27 ± 2	30 ± 1
	3 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 1 g Mg(NO ₃) ₂	23 ± 1	36 ± 3
	2 g MgSO ₄ + 1 g NaCl + 2 g Mg(NO ₃) ₂	19 ± 3	31 ± 3
	4 g MgSO ₄ + 1 g Mg(NO ₃) ₂	Neproběhla separace fází.	Neproběhla separace fází.
Doba třepání	1 min	47,2 ± 0,9	49 ± 2
	2 min	50 ± 6	53 ± 4
	5 min	46 ± 1	52,7 ± 0,6
	10 min	49 ± 4	57 ± 2
dSPE	400 mg PSA	48 ± 1	57 ± 8
	400 mg C18	47 ± 2	65 ± 1
	320 mg PSA + 160 mg C18	50 ± 2	65 ± 2
	200 mg PSA + 200 mg C18	47 ± 3	60 ± 5

Tabulka 41: Výtěžnosti extrakce jednotlivých léčiv na různých koncentračních hladinách pro půdu

Označení	Obohacení [ng]	Výtěžnost extrakce enrofloxacinu [%]	Výtěžnost extrakce ciprofloxacinu [%]
P0	0	x	x
P150	150	59 ± 2	56 ± 2
P250	250	54 ± 1	52,1 ± 0,6
P500	500	51 ± 2	60 ± 7

Tabulka 42: Výtěžnosti extrakce jednotlivých léčiv na různých koncentračních hladinách pro podestýlku

Označení	Obohacení [ug]	Výtěžnost extrakce enrofloxacinu [%]	Výtěžnost extrakce ciprofloxacinu [%]
POD0	0	x	x
POD5	5	94 ± 9	77 ± 9
POD25	25	86 ± 2	72 ± 5

Příloha č. 2: Výsledky stanovení obsahu daných léčiv ve vzorcích půdy a podestýlek

Tabulka 43: Výsledky stanovení enrofloxacinu ve vzorcích půdy (uvedeny i výsledky pod LLOQ)

Číslo	Čas [dny]	Datum odběru	Popis vzorku	Množství enrofloxacinu v půdě [µg/kg půdy]
1	0	20.05.2021	půda před založením pokusu	LOD
2	0	20.05.2021	O = po aplikaci, natural	14 ± 2
3	0	20.05.2021	E = po aplikaci, obohaceno	141 ± 6
4	7	27.05.2021	týden po aplikaci	16 ± 4
5	7	27.05.2021	týden po aplikaci	72 ± 13
6	14	03.06.2021	2 týdny po aplikaci	5 ± 2 (<LOQ)
7	14	03.06.2021	2 týdny po aplikaci	7 ± 2 (<LOQ)
8	28	17.06.2021	4 týdny po aplikaci	5,7 ± 0,6 (<LOQ)
9	28	17.06.2021	4 týdny po aplikaci	34 ± 13
10	42	01.07.2021	6 týdnů po aplikaci	7 ± 3 (<LOQ)
11	42	01.07.2021	6 týdnů po aplikaci	83 ± 12
12	56	15.07.2021	8 týdnů po aplikaci	5 ± 2 (<LOQ)
13	56	15.07.2021	8 týdnů po aplikaci	25 ± 4
14	70	29.07.2021	10 týdnů po aplikaci	16,91 ± 0,12
15	70	29.07.2021	10 týdnů po aplikaci	47 ± 14
16	84	12.08.2021	12 týdnů po aplikaci	38 ± 5
17	84	12.08.2021	12 týdnů po aplikaci	52 ± 16
18	101	26.08.2021	14 týdnů po aplikaci	24 ± 13
19	101	26.08.2021	14 týdnů po aplikaci	59 ± 19
19	115	09.09.2021	16 týdnů po aplikaci	7 ± 3 (<LOQ)
19	115	09.09.2021	16 týdnů po aplikaci	46 ± 8

Tabulka 44: Výsledky stanovení enrofloxacinu a ciprofloxacinu ve vzorcích podestýlek

Číslo	Čas [dny]	Datum sběru	Charakter vzorku	Množství enrofloxacinu v podestýlce [mg/kg podestýlky]	Množství ciprofloxacinu v podestýlce [mg/kg podestýlky]
1	1	18.05.2021	Sláma + trus + papír (naskladnění kuřat)	9,0 ± 0,9	1,58 ± 0,11
2	3	21.05.2021	Sláma + trus (3. den medikace)	11,5 ± 0,3	2,61 ± 0,20
3	7	25.05.2021	Sláma + trus + papír (7 dní od začátku medikace)	23 ± 7	6 ± 2
4	7	25.05.2021	Sláma + trus + papír (7 dní od začátku medikace)	24 ± 10	7 ± 3
5	7	25.05.2021	Sláma + trus (7 dní od začátku medikace)	32 ± 5	8 ± 1

Příloha č. 3: Výsledky aplikace optimalizovaného postupu na různě definované půdy obohacené skupinou fluorochinolonů

Tabulka 45: Výťažnosti extrakce jednotlivých léčiv v různě nadefinovaných půdách

Číslo půdy	Popis půdy	Výtěžnost extrakce ciprofloxacinu [%]	Výtěžnost extrakce enrofloxacinu [%]	Výtěžnost extrakce pefloxacinu [%]	Výtěžnost extrakce norfloxacinu [%]	Výtěžnost extrakce ofloxacinu [%]	Výtěžnost extrakce moxifloxacinu [%]
1	Nejvyšší obsah vápníku a hořčíku	41 ± 1	35 ± 2	52 ± 3	44 ± 3	63 ± 5	50 ± 5
2	Nejvyšší obsah organické hmoty	34,6 ± 0,6	28 ± 2	43 ± 1	44,3 ± 0,6	64,1 ± 0,6	39 ± 6
3	Nejnižší obsah organické hmoty, vápníku a hořčíku	42 ± 3	36 ± 4	55 ± 5	57 ± 6	76 ± 5	43,4 ± 0,5