

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Fotochemická degradace vybraných
fluorchinolonových antibiotik na TiO₂
a antibakteriální aktivita fotoproduktů**

Diplomová práce

Bc. Pavla Petráňová

Školitelka: Doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

Školitel-specialista: RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.

České Budějovice 2022

Petráňová, P., 2022: **Fotochemická degradace vybraných fluorchinolonových antibiotik na TiO₂ a antibakteriální aktivita fotoproduktů.** [Photochemical degradation of selected fluoroquinolone antibiotics on TiO₂ and antibacterial activity of photoproducts. Master Thesis, in Czech.] – počet stran práce 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The Master thesis deals with three representatives of the fluoroquinolone antibiotics – ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. In the theoretical part, their development, characteristics and mechanism of action is described.

The experimental part is focused on photochemical degradation of ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin at neutral and alkaline pH in the presence of heterogenous catalyst (TiO₂). Rate constants of antibiotics photodegradation were determined, degradation products of photodegradation in the presence of TiO₂ were compared with degradation products formed under irradiation in homogeneous aqueous solution using LC-MS/MS, and toxic effect of photoproduct mixtures from heterogeneous photocatalytic reaction on two bacteria species were tested.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 11. dubna 2022

.....

Podpis

Cíl práce:

- Proměřit kinetiku degradace ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu s použitím TiO_2 jako fotokatalyzátoru.
- Porovnat produkty této degradace s produkty vznikajícími fotochemickou degradací v homogenní fázi pomocí LC-MS/MS.
- Otestovat antibakteriální aktivitu směsi fotoproduktů vzniklých při degradaci s použitím TiO_2 jako fotokatalyzátoru na vybraných druzích bakterií.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce paní doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. za cenné rady, věnovaný čas a nesmírnou ochotu odpovědět na jakýkoliv dotaz nejen ohledně magisterské práce, ale i studia. Vždy si na mě udělala čas, výborně mi poradila a měla se mnou velkou trpělivost.

Dále bych chtěla poděkovat mé školitelce-specialistce paní RNDr. Heleně Langhansové, Ph.D. za provedení testů antibakteriální aktivity a za rady týkajících se interpretace výsledků a ochotu odpovědět a poradit s jakýmkoliv problémem.

Poděkování patří také paní Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D., a panu Ing. Davidovi Kahounovi, Ph.D., z laboratoře environmentální a analytické chemie, za pomoc s obsluhou HPLC analyzátoru, za provedení HPLC analýz, za vytvoření HPLC/MS metody a za rady týkajících se interpretace výsledků.

Na závěr bych ráda poděkovala své nejbližší rodině za podporu nejen během psaní magisterské práce, ale i během celého studia.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Charakteristika vybraných fluorchinolonů	6
1.1.1	Ciprofloxacin	6
1.1.2	Enrofloxacin	7
1.1.3	Norfloxacin	8
1.2	Fluorchinolony v přírodních vodách	9
2	Materiál a metody	11
3	Výsledky	15
4	Diskuze	24
5	Závěr	28
6	Seznam použité literatury	29
7	Přílohy	38
	Příloha 1: HPLC chromatogram reakční směsi ciprofloxacinu - neutrální	38
	Příloha 2: HPLC chromatogram reakční směsi ciprofloxacinu - zásaditý	39
	Příloha 3: HPLC chromatogram reakční směsi enrofloxacinu - neutrální	40
	Příloha 4: HPLC chromatogram reakční směsi enrofloxacinu - zásaditý	41
	Příloha 5: HPLC chromatogram reakční směsi norfloxacinu - neutrální	42
	Příloha 6: HPLC chromatogram reakční směsi norfloxacinu - zásaditý	43
	Příloha 7: Tabulka shodných fotoproduktů – porovnání ozařování na TiO ₂ a v homogenní fázi	44
	Příloha 8: Souhrnná tabulka retenčních časů a hodnot m/z všech fotoproduktů	47
	Příloha 9: Antibakteriální aktivita ciprofloxacinu a jeho fotoproduktů	53
	Příloha 10: Antibakteriální aktivita enrofloxacinu a jeho fotoproduktů	54
	Příloha 11: Antibakteriální aktivita norfloxacinu a jeho fotoproduktů	55

Seznam použitých zkratk a symbolů

- ESI \pm – pozitivní/negativní polarita ionizace (Electrospray ionization)
- FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv USA (Food and drug administration)
- FS MS/MS – hmotnostní spektrum iontů prekurzoru získané tandemovou hmotnostní spektrometrií
- HESI – vyhřívaný elektrosprej (Heated Electrospray Ionization)
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
- LC/MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)
- LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
- m/z – poměr hmotnosti a náboje
- MIC - minimální inhibiční koncentrace (Minimum Inhibitory Concentration)
- TOC – celkový organický uhlík (Total Organic Carbon)

1 Úvod

Fluorchinolony patří do skupiny tzv. širokospektrálních antibiotik, která se hojně využívají jak v humánní, tak ve veterinární medicíně s celosvětovou spotřebou přes 100 000 tun ročně (Danner et al., 2019). Fluorchinolonová antibiotika jsou účinná proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím, mohou být důležitá u infekcí respiračních (Cowling & Farrah, 2019) nebo močových cest (Daneman et al., 2020), včetně život ohrožujících infekcí, kde alternativní antibiotika neprokázala dostatečnou účinnost (SÚKL, 2018).

Historie vývoje chinolonů vychází z kyseliny nalidixové, systematickým názvem 1-ethyl-7-methyl-4-oxo-1,8-naftyridine-3-carboxylic acid (Domagala, 1994; Pubchem, 2021). Tato látka byla vedlejším produktem syntézy antimalarika chlorochinu, byla poprvé syntetizována v roce 1962 a následně v roce 1967 získala licenci pro léčbu močových infekcí (Emmerson & Jones, 2003), většinou způsobených gramnegativními bakteriemi, s výjimkou *Pseudomonas aeruginosa* (Barlow, 1963). Kvůli nevýhodám kyseliny nalidixové, které spočívají v její nízké sérové koncentraci a vysoké minimální inhibiční koncentraci (MIC), která činí 700 mg/l (Bahry et al., 2012), a také skutečnosti, že se u řady organismů velmi rychle vyvinula rezistence na tuto látku, byly vyvíjeny další deriváty. Bohužel u nich bylo pozorováno jen nepatrné zlepšení v jejich vlastnostech oproti kyselině nalidixové. Až do vývoje flumechinu, prvního monofluorchinolonu, v roce 1973 (Appelbaum & Hunter, 2000), žádná z dřívějších sloučenin nenabízela žádné významné zlepšení oproti kyselině nalidixové. Flumechin byl první sloučeninou, která přinesla náznak, že modifikace základní chemické struktury může zlepšit reakci proti grampozitivním bakteriím (Appelbaum & Hunter, 2000).

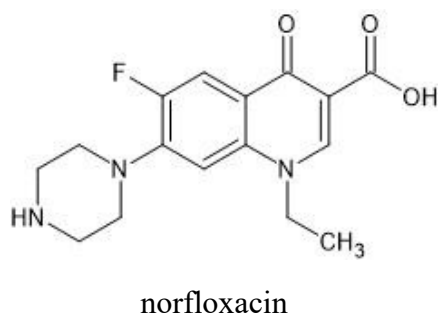
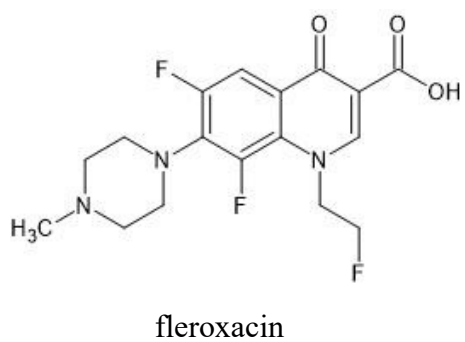
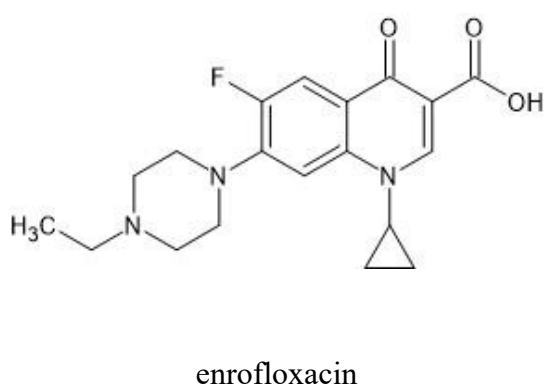
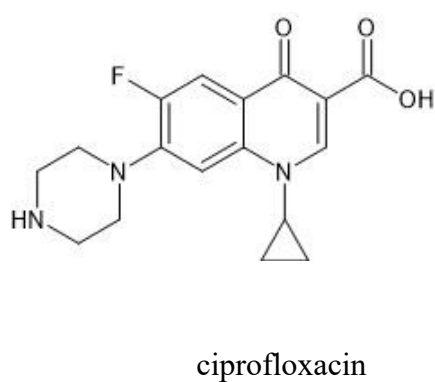
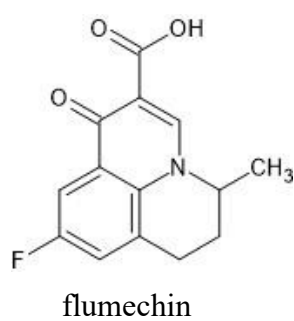
V roce 1978 byl syntetizován norfloxacin. Jedná se o fluorovaný chinolon s piperazinylovým postranním řetězcem. V roce 1986 byl norfloxacin ve Spojených státech amerických povolen k použití u genito-urinárních infekcí (Emmerson & Jones, 2003).

V letech 1979 až 1982 byla vyvinuta a patentována řada fluorochinolonů (Naber, 1996), včetně ciprofloxacinu, který byl patentován v roce 1983 německou společností Bayer A.G. a v roce 1987 byl schválen americkým FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) pro použití ve Spojených státech amerických (Sharma et al., 2010). Tyto sloučeniny byly mnohem účinnější než dřívější deriváty proti mnoha gramnegativním i grampozitivním kmenům bakterií (Emmerson & Jones, 2003).

Enrofloxacin je chemicky syntetizovaný fluorchinolon třetí generace (Attili et al., 2016). FDA schválil enrofloxacin v roce 1996 jako chinolonové antibiotikum pro hospodářská zvířata (Pei et al., 2019).

Fluorchinolony se obvykle podávají perorálně i intravenózně (Oliphant & Green, 2002). Nejvýznamnější zástupci této skupiny léků (ciprofloxacin, enrofloxacin, fleroxacin a norfloxacin) jsou spolu s kyselinou nalidixovou a flumechinem zobrazeny na Obr. 1.

Mechanismus účinku fluorchinolonů je zprostředkován inhibicí dvou enzymů účastnících se DNA syntézy a to DNA gyrázy a topoizomerázy IV (Blondeau, 2004). Oba tyto enzymy patří do skupiny topoizomeráz, které se nevyskytují v lidských buňkách, ale jsou esenciální pro replikaci bakteriální DNA, což umožňuje specifitu a baktericidní účinky. DNA gyráza způsobuje negativní suprahelikální stočení bakteriální DNA před replikační vidličkou, čímž katalyzuje separaci dceřiných chromosomů. Tento krok je nezbytný pro iniciaci DNA replikace, neboť umožňuje navázání iniciačních proteinů (Wang & Lynch, 1993). Topoizomeráza IV je zodpovědná za dekatenci, tedy odstranění vazeb mezi dceřinými chromozomy a tím umožní oddělení dvou dceřiných buněk po replikaci (Zechiedrich & Cozzarelli, 1995).

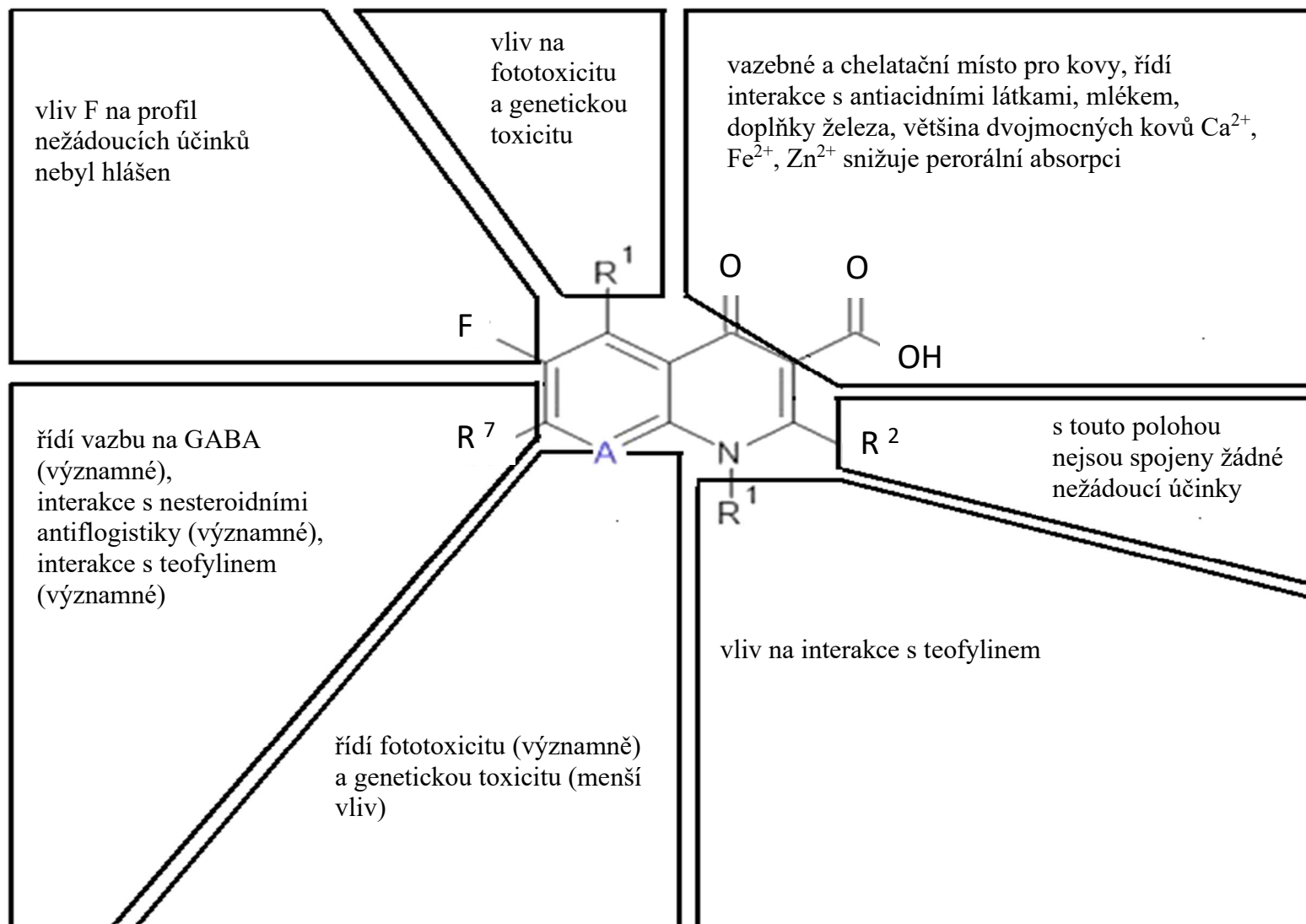


Obr. 1: Strukturální vzorce kyseliny nalidixové, flumechinu, ciprofloxacinu, enrofloxacinu, fleroxacinu a norfloxacinu (upraveno dle PubChem, 2021).

Existují důkazy o tom, že se fluorchinolony hromadí v zánětem napadených buňkách, což přináší ještě větší aktivitu v oblastech s významným buněčným zánětem (Carlier et al., 1990). Vzhledem ke skutečnosti, že se většina fluorchinolonů vylučuje močí v nezměněné formě, jsou vhodnou volbou pro léčbu urogenitálních infekcí. Běžně se používají jako empirická léčba první volby také u infekcí horních a dolních cest dýchacích nebo střevních infekcí. Jsou zvláště užitečné proti hlubokým infekcím, které jsou způsobené gramnegativními bakteriemi, včetně bakterií rodu *Pseudomonas*, které jsou rezistentní vůči jiným perorálně podávaným antimikrobiálním léčivům (Greenfield, 1993). Je známo, že specifická chinolonová antimikrobiální léčiva podávaná domácím zvířatům a zvířatům určeným k produkci potravin přenášejí zkříženou rezistenci na člověka (Acar & Goldstein, 1997).

I přes jejich účinnost v léčbě infekcí FDA evidoval závažné nežádoucí účinky, mezi které patří poškození stěn aorty, výrazný pokles hladiny cukru v krvi (hypoglykémie), bolesti svalů a kloubů a psychické problémy. Tyto příznaky jsou nejčastěji pozorovány po perorálním podání a některé, jako bolesti či hypoglykémie, často samy vymizí po vysazení léků (FDA, 2017).

Obr. 2 ukazuje, jak jednotlivé substituenty ovlivňují nežádoucí účinky fluorchinolonů (Domagala, 1994).



Obr. 2: Souhrn struktur způsobující nežádoucí účinky fluorchinolonů (upraveno dle Domagala, 1994).

1.1 Charakteristika vybraných fluorchinolonů

1.1.1 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin, jehož sumární vzorec je $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ a název dle IUPAC¹ 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-ylquinoline-3-carboxylic acid (PubChem, 2021), je účinný proti širokému spektru bakterií. Nejcitlivější jsou aerobní gramnegativní bakterie, zejména enterobakterie a bakterie rodu *Neisseria* (Brunner et al., 2004). Ciprofloxacin je dostupný ve více perorálních formách s účinnou látkou 250 a 500 mg na tabletu v rozmezí 10-500 tablet v jediném balení (ZAM, 2020), genericky pod několika obchodními názvy Cetraxal, Ciloxan, Cipro nebo Proquin (Fraunfelder & Fraunfelder, 2020).

Ciprofloxacin se využívá jak v humánní, tak i veterinární medicíně. Po perorálním podání ciprofloxacinu je dosaženo maximální koncentrace po 1–4 hodinách. Ciprofloxacin se váže z 20–30 % na bílkoviny (SÚKL, 2021; Šíma et al., 2021). Ciprofloxacin je v těle metabolizován z malé části na čtyři metabolity, které jsou také baktericidně aktivní, a to desethyleneciprofloxacin, sulfo-ciprofloxacin, oxo-ciprofloxacin a N-acetylciprofloxacin (Al-Omar, 2005). K vylučování ciprofloxacinu a jeho metabolitů dochází močí a stolicí. Průměrný eliminační poločas ciprofloxacinu činí přibližně 4–5 hodin.

1 IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry.

1.1.2 Enrofloxacin

Enrofloxacin je lék třetí generace fluorchinolonů (Paudel et al., 2019), jehož sumární vzorec je $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ a název dle IUPAC 1-cyclopropyl-7-(4-ethylpiperazin-1-yl)-6-fluoro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid (PubChem, 2021).

Enrofloxacin vykazuje antibakteriální aktivitu proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím a je účinný i proti některým intracelulárním parazitům (López-Cadenas et al., 2013). Enrofloxacin je dostupný v perorální formě s účinnou látkou v množství 22,7 mg, 68 mg a 136 mg na tabletu v rozmezí 50–500 tablet v jediném balení (Dechra, 2017) pod několika obchodními názvy např. Baytril, Enroquin nebo Zobuxa (Mar Vista, 2021).

Enrofloxacin se používá ve veterinární medicíně, a to pro léčbu infekcí respiračních a močových cest, trávicího traktu, zánětu kloubů, pohlavních orgánů, mléčných žláz a kůže, převážně u koček, psů, ale i u hospodářských zvířat (Trouchon & Lefebvre, 2016). Po podání zůstává enrofloxacin z 93 % nemetabolizován (Cester & Toutain, 1997), jen malá část enrofloxacinu je u většiny druhů metabolizována na ciprofloxacin (Tyczkowska et al., 1989). Farmakokinetika enrofloxacinu je různá u odlišných zvířat, např. u psů při dávce 10 mg/kg se dosáhne maximální koncentrace, která činí 2,10 mg/l, v rozmezí téměř 3 hodin a poločas eliminace činí cca 5 hodin (Boothe et al., 2002). U brojlerů při stejné dávce (10 mg/kg) je dosaženo maximální koncentrace (1,35 mg/l) po 4 hodinách a poločas činí přibližně 24 hodin (Bonassa et al., 2021). Lze proto předpokládat, že jaterní clearance² enrofloxacinu bude záviset pouze na jaterní enzymatické aktivitě (Tyczkowska et al., 1989).

² Jaterní clearance slouží ke kvantifikaci jaterní eliminace, je definována jako součin průtoku krve játry a tzv. extrakčního poměru, což je vlastně relativní snížení množství léčiva v játrech (počítá se jako zlomek, kde v čitateli vystupuje rozdíl koncentrace příslušného léčiva v krvi do jater vstupující a z jater vystupující a ve jmenovateli koncentrace léčiva v krvi do jater vstupující).

1.1.3 Norfloxacin

Norfloxacin má sumární vzorec $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ a název dle IUPAC 1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-ylquinoline-3-carboxylic acid (PubChem, 2021).

Norfloxacin je jedním z nových 4-chinolonových antibakteriálních přípravků, který je podáván perorálně s účinnou látkou 200, 400 a 800 mg na tabletu v baleních po 14, 30, 50, 100, 500 nebo 1000 tabletách (SÚKL, 2012). Genericky je dostupný pod několika obchodními názvy jako např. Alflox, Norflox, Noroxin, nebo Nolicin (MED, 2017).

U norfloxacinu se absorbuje asi jen 30–40 % perorální dávky (Nada et al., 2007). Vrcholové plazmatické koncentrace, které představují 1,35–1,58 mg/l, se objevují přibližně 1–2 hodiny po podání dávky činící 400 mg (Holmes et al., 1985). Norfloxacin se váže na plazmatické bílkoviny asi z 10–15 %, snadno proniká do tkání genito-urinárního traktu a prochází placentou, jeho plazmatický poločas je 3–4 hodiny (Nada et al., 2007). Norfloxacin je částečně metabolizován játry a ledvinami (DrugBank, 2022), z cca 26–32 % (Cofsky et al., 1984), vylučován je močí.

Biologická dostupnost je přibližně 70 % a absorpce je pouze mírně zpožděna, pokud je norfloxacin podáván s jídlem (Holmes et al., 1985). Přibližně 30 % perorální dávky se vylučuje močí jako nezměněný norfloxacin. V moči bylo nalezeno šest metabolitů, u čtyřech z nich byla určena struktura (Parshikov et al., 2001). Eliminační poločas norfloxacinu u zdravých osob se pohybuje v rozmezí 3,5–6,5 hodin (Holmes et al., 1985). Snížená funkce jater nemá významný vliv na farmakokinetiku norfloxacinu, ale při selhání ledvin se poločas norfloxacinu v séru zvyšuje s klesající clearance kreatininu. U hemodialyzovaných pacientů se poločas pohybuje kolem 8 hodin (Holmes et al., 1985).

1.2 Fluorchinolony v přírodních vodách

Protože fluorochinolony nejsou v organismu zcela metabolizovány, dostávají se formou moči či stolice do odpadních vod (Liu et al., 2014) podobně jako mnoho dalších léčivých přípravků. Z důvodu velkého množství a různorodému charakteru těchto látek nejsou čistírny odpadních vod schopné tyto látky zcela zachytit a ty se tak dostávají do povrchových vod, v nichž byly detekovány v různých zemích. Larsson et al. (2007) detekovali v Indii v čistírně odpadních vod PETL (Patancheru Enviro-Tech Limited) ciprofloxacin v koncentraci v rozmezí 28–31 mg/l (Larsson et al., 2007). Rodriguez-Mozaz et al. (2015) ve své práci uvedli, že v nemocničních odtocích u řeky Ter ve Španělsku, byl ciprofloxacin detekován v koncentraci 13,78 µg/l (Rodriguez-Mozaz et al., 2015). V Africe v provincii Kwazulu-Natal v Jihoafrické republice byl ciprofloxacin detekován v pitné vodě v koncentraci 27,13 µg/l (Agunbiade & Moodley, 2016) a v Ghaně ve vesnici Kumasi byly odebrány vzorky z odpadních nemocničních vod a potoků, kde byl ciprofloxacin naměřen v koncentraci 1,17 µg/l (Azanu et al., 2018). V řece Atibaia u města Campinas (Brazílie) byly naměřeny maximální koncentrace ciprofloxacinu v hodnotách 0,003 a 0,12 µg/l a norfloxacinu v hodnotě 0,05 µg/l (Locatelli et al., 2011). V odpadních vodách v Teheránu byl ciprofloxacin nalezen v rozmezí 0,03–0,21 ng/l (Mirzaei et al., 2018). Studie Hanna et al. (2018) byla provedena ve 12 vesnicích v provincii Šan-tung ve východní Číně, kde byl detekován ciprofloxacin, enrofloxacin a norfloxacin s koncentrací v jednotkách nanogramů na litr (Hanna et al., 2018). V České republice byl detekován ciprofloxacin v koncentraci nepřesahující hodnotu 0,32 µg/l (Ministerstvo zemědělství, 2020), jiné fluorochinolony nebyly stanovovány.

Protože odstranění fluorochinolonů a dalších farmak biologickou úpravou v čistírkách není stoprocentně účinné, studují se dodatečné postupy k odstranění těchto látek, např. adsorpce aktivním uhlím (Katsigiannis et al., 2015), membránové filtrační procesy (Kim et al., 2007) nebo oxidace na bázi ultrafialového záření v kombinaci s peroxidem vodíků či ozonu (Kurt et al., 2017; Rekhate & Srivastava, 2020). Široce studovanými postupy je využití tzv. heterogenní fotokatalýzy, při níž se používají jako fotokatalyzátory polovodičové materiály, nejčastěji TiO₂ (Arifin et al., 2022; Machín et al., 2022; Sharma et al., 2022) případně jeho modifikace jako jsou oxidy a sulfidy dalších kovů (Varma et al., 2020; Wang & Zhuan, 2020).

Biologické testy ukazují, že některá antibiotika, nalezená v povrchových vodách, působí na mikroby v koncentracích pod 10 µg/l (Halling-Sørensen et al., 2000). Mezi nejsilnější antibiotika patří ta, jejichž koncentrace je v potocích a řekách převládající, jako je ciprofloxacin (Campoli-Richards et al., 1988). Subletální koncentrace nemusí prokaryota zabít, ale přispívají ke zvýšení bakteriální rezistence a ke změně ve složení jednobuněčných komunit. To má důsledky pro mikrobiální potravní řetězec a případně pro větší organismy a zdraví ekosystémů (Tamminen et al., 2012; Jackson et al., 2016).

2 Materiál a metody

Ciprofloxacin ($M = 331,30 \text{ g/mol}$), enrofloxacin ($M = 359,39 \text{ g/mol}$) a norfloxacin ($M = 319,33 \text{ g/mol}$) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, všechny v čistotě $\geq 98 \%$. Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním cca $2,50 \text{ mg}$ ($\pm 0,1 \text{ mg}$) antibiotika ve 2 ml $0,1 \text{ M HCl}$ a přidáním 48 ml deionizované vody. Pro úpravu pH byl použit NaOH (hydroxid sodný) o koncentraci 10% , přičemž jednotlivé hodnoty pH reakčních směsí před ozářením jsou uvedeny v Tab. I.

Tab. I: Hodnoty pH jednotlivých antibiotik po úpravě pH.

Antibiotikum	Neutrální pH	Zásadité pH
Ciprofloxacin	7,05	8,80
Enrofloxacin	6,90	8,30
Norfloxacin	7,00	8,90

Pro ozařování při reakci s TiO_2 byla jako zdroj světla použita lampa Philips TL-D 15W/08, která emituje záření o vlnových délkách $350\text{--}400 \text{ nm}$, s maximem u 365 nm . Pro ozařování bylo pipetou odměřeno 5 ml roztoku fluorochinolonových antibiotik do jednotlivých krystalizačních misek o průměru 4 cm . Dále bylo do misek vloženo mikroskopické sklíčko o ploše 4 cm^2 s imobilizovanou vrstvou TiO_2 (sklíčka s imobilizovaným TiO_2 byla poskytnuta z VŠCHT) a malé magnetické míchadlo. Krystalizační misky byly umístěny na pětimístnou magnetickou míchačku JK IKA, typ RO. Světelný výkon lampy na jednotlivých pozicích míchačky byl proměřen pomocí luxmetru UVA Light meter, model UVA-365, jeho hodnota činila $0,913 \text{ mW/cm}^2$ a $0,956 \text{ mW/cm}^2$ pro dvě krajní pozice a $1,623 \text{ mW/cm}^2\text{--}1,692 \text{ mW/cm}^2$ pro tři vnitřní pozice. K ozařování vzorků byly tedy používány pouze tři vnitřní pozice.

Reakční směsi antibiotik byly po ozáření kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 10 ml a doplněny Milli-Q[®] vodou na daný objem. Tento krok eliminoval různé odpaření vzorku při různých ozařovacích časech.

Ozařování při reakci v homogenní směsi bylo prováděno v reaktoru Rayonet RPR 100 osázeném 16 lampami RPR 3000Å, které emitují záření v rozmezí 250–350 nm. Vzorky o objemu 3 ml byly ozařovány ve skleněných kyvetách s víčkem, aby bylo odstraněno záření o vlnových délkách kratších než 300 nm.

Ke sledování kinetiky odbourávání ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu byla použita metoda HPLC na přístroji Thermo Scientific Dionex Ultimate system (USA) s kolonou Phenomenex Kinetex® 5 µm EVO C18, 100Å LC, 30 x 2,1 mm. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,1 % HCOOH ve vodě a acetonitrilu (1 : 1 ve vodě) v poměru 92 : 8 (ciprofloxacin a enrofloxacin), 94 : 6 (norfloxacin). Eluce byla prováděna isokraticky. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, nastříkovaný objem vzorku byl 20 µl. Pro detekci byl použit jednak spektrofotometrický detektor s diodovým polem PDA 3000RS a jednak fluorescenční FLD 3000RS. Hodnoty excitační a emisní vlnové délky byly 289 nm a 446 nm pro ciprofloxacin, 276 nm a 443 nm pro enrofloxacin a 277 nm a 444 nm pro norfloxacin. Vlnová délka spektrofotometrické detekce byla pro všechna antibiotika shodná – 280 nm. Pro zpracování chromatografických dat byl použit program Chromeleon 7.

Pro analýzu vzorků metodou LC/MS byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ionizací vyhřívaným elektrosprejem a s tandemovou hmotnostní detekcí (HPLC-HESI-MS/MS), MS detekci byla předřazena UV detekce. Analýza ciprofloxacinu, enrofloxacinu, norfloxacinu a jejich degradačních produktů byla prováděna pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu Thermo UltiMate 3000 s UV detektorem DAD-3000RS a hmotnostním detektorem Velos Pro s lineární iontovou pastí. Byla použita chromatografická kolona Phenomenex, Kinetex EVO C18 (150 × 3 mm, 5 µm), kolonový prostor byl vyhříván na 30 °C. Separace probíhala při isokratické eluci. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,1 % HCOOH ve vodě a 0,1 % HCOOH v acetonitrilu pro ciprofloxacin a enrofloxacin v poměru (v/v) 92 : 8 a v poměru 94 : 6 pro norfloxacin. Vzorky byly analyzovány jak při pozitivní (ESI +) tak při negativní (ESI -) polaritě ionizace. Hodnoty průtoku byly pro hlavní zmlžovací plyn 60 arb, pro pomocný plyn 20 arb. Teplota zmlžovacího plynu, transferové trubice a kapiláry byla při všech analýzách 350 °C. Napětí na HESI kapiláře bylo +3 kV. Kolidní energie byla 35 V. Doba plnění pasti pro full-scan MS byla 10 ms a pro full-scan MS/MS byla 50 ms. Hmotnostní spektra byla zpracována pomocí programu Thermo Scientific Xcalibur 4.2.47. Pro všechny vzorky byla nejprve provedena analýza všech hmot. Následně byla provedena FS MS/MS (hmotnostní spektrum iontů prekurzoru získané tandemovou hmotnostní spektrometrií) pro vybrané prekurzorové hmoty.

Specifická hmotnost protonovaných a deprotonovaných molekul byla pro ciprofloxacin 332 a 330 m/z, enrofloxacin 360 a 358 m/z a norfloxacin 320 a 318 m/z. Výběr hmot (m/z) pro cílenou analýzu byl proveden na základě výsledků necílené analýzy. Byla využita zobrazení iontových map jednotlivých výsledků analýz.

Pro analýzu roztoků se směsí fotoproduktů pomocí LC-MS/MS, byly pro jednotlivá antibiotika zvoleny ozařovací časy tak, aby bylo v reakční směsi přítomno co nejvíce vzniklých produktů, ale bylo stále přítomno původní antibiotikum. Pro reakci s použitím TiO₂ jako fotokatalyzátoru byla u všech tří zkoumaných antibiotik zvolena doba ozařování 30 minut. Pro reakci v homogenní fázi byly doby ozařování převzaty z práce Poncarové (2020), jejich hodnoty jsou uvedeny v Tab. II.

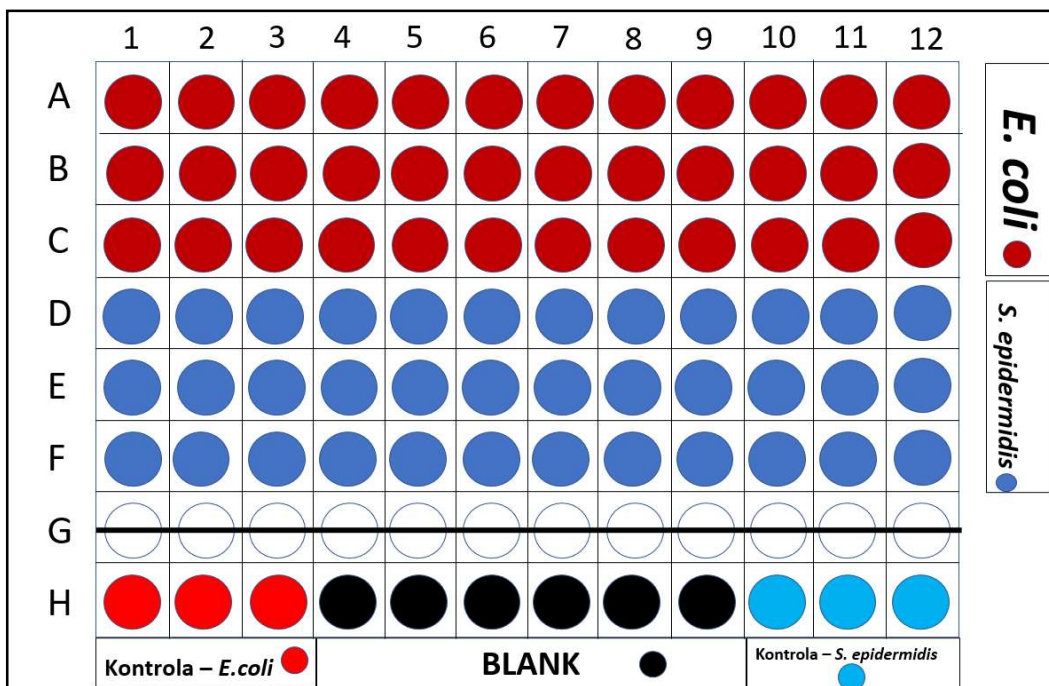
Tab. II: Časy ozařování jednotlivých antibiotik v neutrálním nebo zásaditém pH.

Antibiotikum	pH	Čas [min]
Ciprofloxacin	neutrální	3
	zásadité	2,5
Enrofloxacin	neutrální	5
	zásadité	3
Norfloxacin	neutrální	5
	zásadité	4,5

Celkový organický uhlík (TOC) byl stanoven pomocí přístroje Elementar Vario TOC cube (Německo) po odstranění anorganického uhlíku acidifikací a probubláním inertním plynem spálením organického uhlíku při 850 °C s Pt katalyzátorem.

Pro test antibakteriální aktivity byly použity 2 bakteriální kmeny: *Escherichia coli* Seattle 1946 (ATCC 25922) a *Staphylococcus epidermidis* RP62A (ATCC 35984). Bakterie z glycerol stocku se nechaly narůst přes noc do log fáze v LB médiu při 37 °C za stálého míchání. Poté byly bakterie naředěny na 200 000 buněk/ml kultivačního média DMEM s přídavkem 10 % fetálního telecího séra a vysety do 96 jamkové destičky. K bakteriím byly přidány vzorky antibiotik a vzorky směsí fotoproduktů (v takovém objemu, aby koncentrace zbytkového antibiotika byla stejná jako ve vzorku samotného antibiotika), pro každý vzorek byl test proveden v koncentracích: neředěný vzorek, 10krát a 100krát ředěný vzorek. Všechny vzorky byly vedeny v biologických triplikátech. Následovala kultivace, která byla prováděna v přístroji SANYO CO₂ inkubátor, při 5 % obsahu CO₂, při 37 °C po dobu 6 a 9 hodin.

Schéma testu antibakteriální aktivity antibiotik (v 96 jamkové destičce) a produktů jejich fotochemické degradace je znázorněno na Obr. 3. Metabolická aktivita bakterií byla identifikována za pomoci fluorescenčního barviva alamarBlue™ Cell Viability Reagent od firmy ThermoFisher a byla změřena spektrometrem BioTek Synergy H1 s použitím excitační vlnové délky 560 nm a emisní vlnové délky 590 nm. Pro zpracování získaných dat byl použit program GraphPad Prism 9.2.0. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí dvoucestné ANOVY.



Obr. 3: Schéma testu antibakteriální aktivity. Řady A+D – neředěné vzorky a kontroly, B+E – 10x zředěné vzorky, C+F – 100x zředěné vzorky. Sloupce 1-3 – neozářené kontroly v neutrálním prostředí, 4-6 – ozářené vzorky (směs fotoproduktů) v neutrálním prostředí, 7-9 – neozářené kontroly v zásaditém prostředí, 10-12 – ozářené vzorky (směs fotoproduktů) v zásaditém prostředí. V řadě H ve sloupcích 1-3 je kontrola pouze s *E. coli* bez antibiotika, stejně tak ve sloupcích 10-12 je kontrola pouze s *S. epidermidis* bez antibiotika.

3 Výsledky

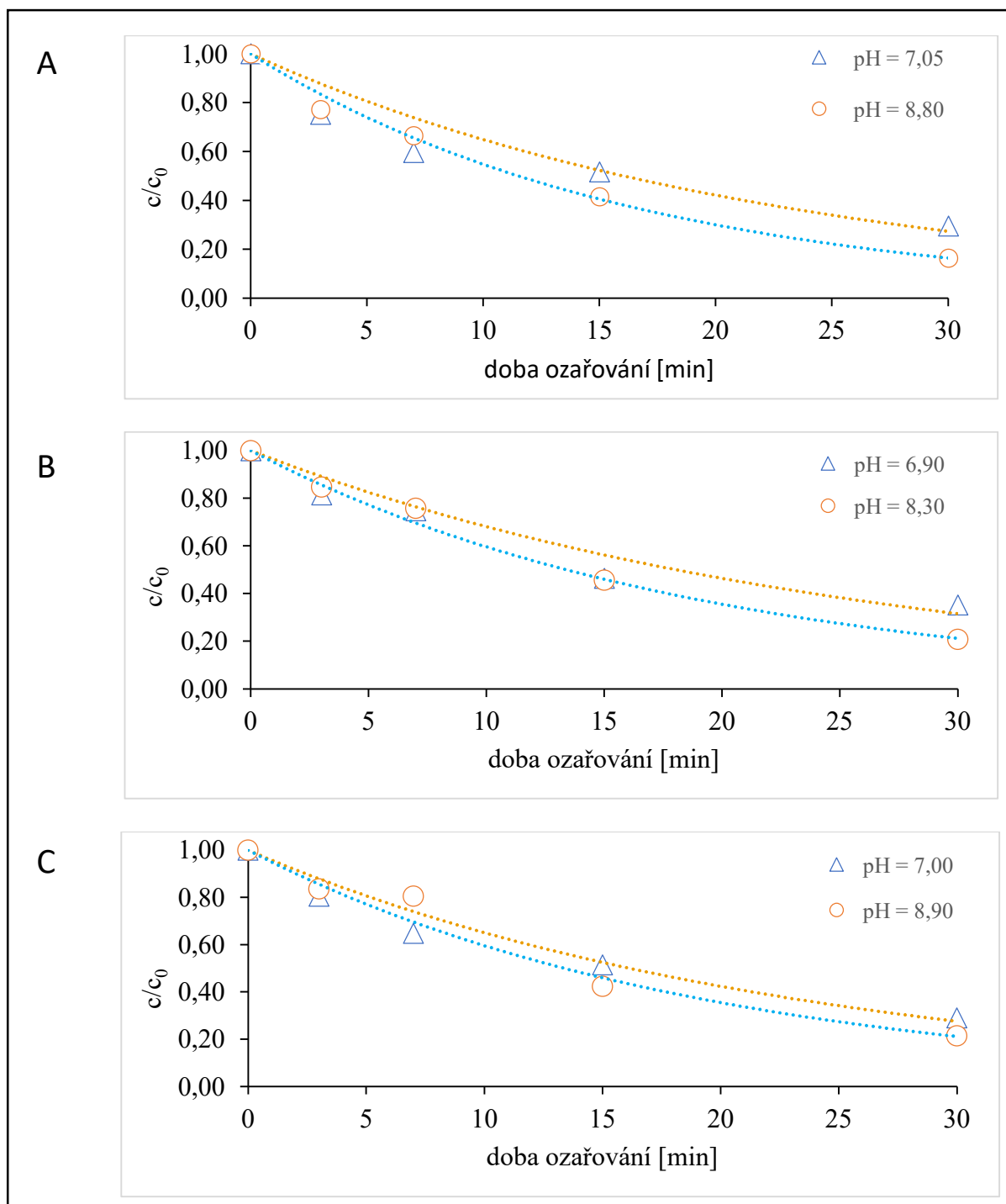
Fotochemická degradace antibiotik ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu s použitím TiO₂ jako katalyzátoru byla prováděna při dvou různých pH – v neutrálním a mírně zásaditém prostředí. Úbytky jednotlivých antibiotik stanovených metodou HPLC v závislosti na době ozařování jsou uvedeny v Obr. 4.

Rychlostní konstanty reakcí jednotlivých zkoumaných fluorochinolonů v neutrálním a zásaditém prostředí jsou uvedeny v Tab. III. Počáteční koncentrace ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu byly 52,2 mg/l, 50,4 mg/l a 52,4 mg/l v tomto pořadí.

Tab. III: Hodnoty rychlostních konstant odbourávání ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu na TiO₂.

Antibiotikum	pH roztoku	Rychlostní konstanta [min ⁻¹]
Ciprofloxacin	neutrální	0,041
	zásadité	0,061
Enrofloxacin	neutrální	0,035
	zásadité	0,052
Norfloxacin	neutrální	0,041
	zásadité	0,052

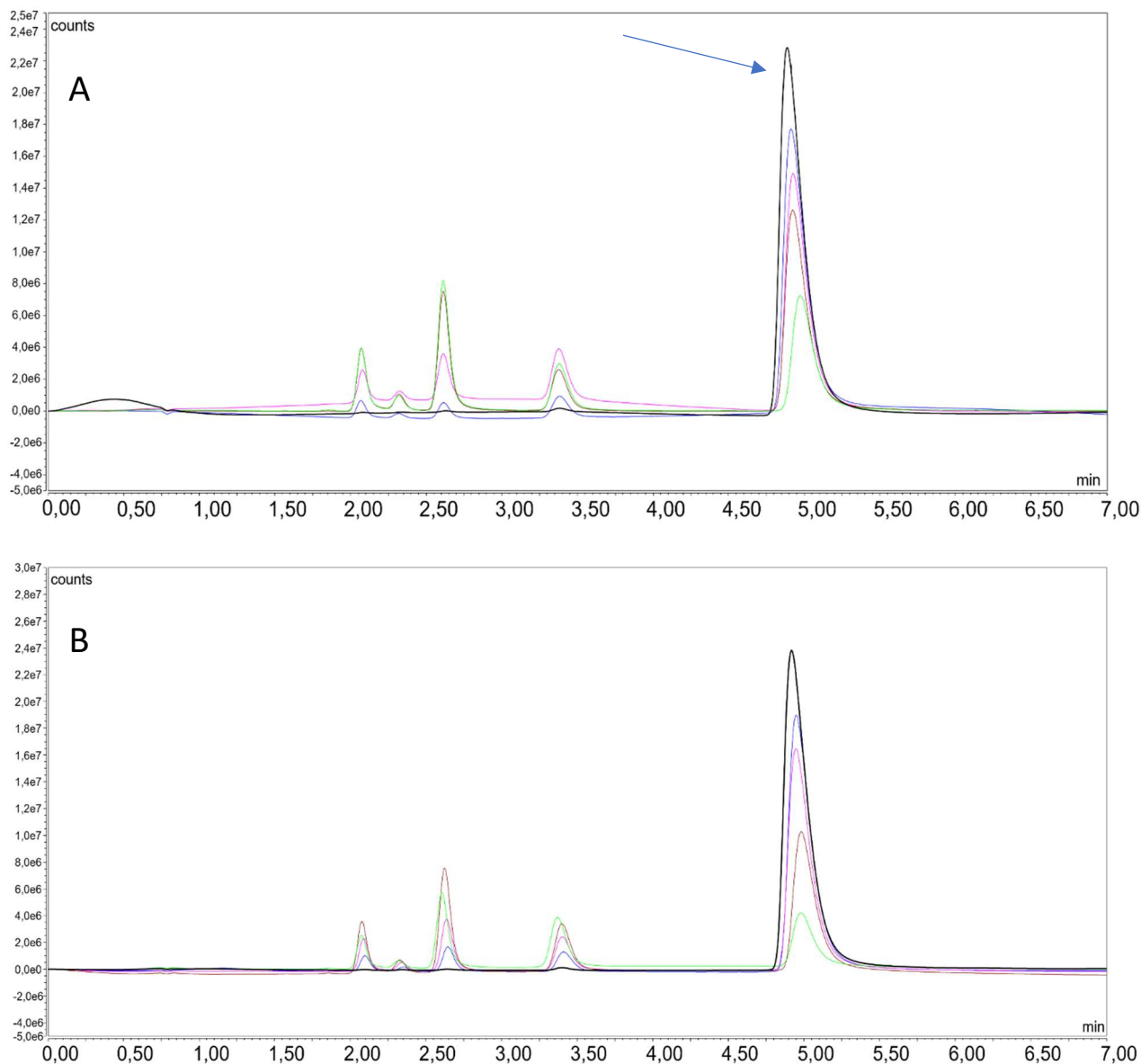
Během experimentu byly měřeny hodnoty pH před ozařováním a po něm. Výsledky ukázaly, že hodnoty pH se snížily o několik desetín, s výjimkou enrofloxacinu v zásaditém prostředí, kde došlo ke snížení o dvě jednotky pH. Větší snížení hodnoty pH (o dvě až čtyři desetiny) bylo pozorováno při ozařování v homogenním uspořádání.



Obr. 4: Fotochemická degradace ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu v neutrálním a v zásaditém prostředí. A – ciprofloxacin, B – enrofloxacin, C – norfloxacin.

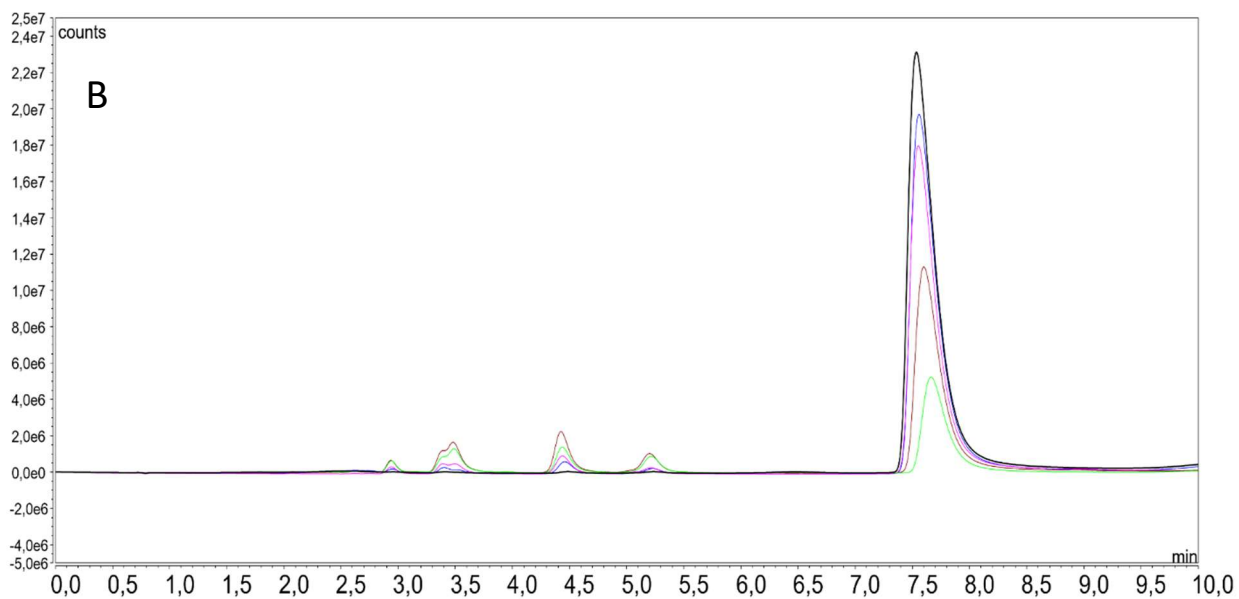
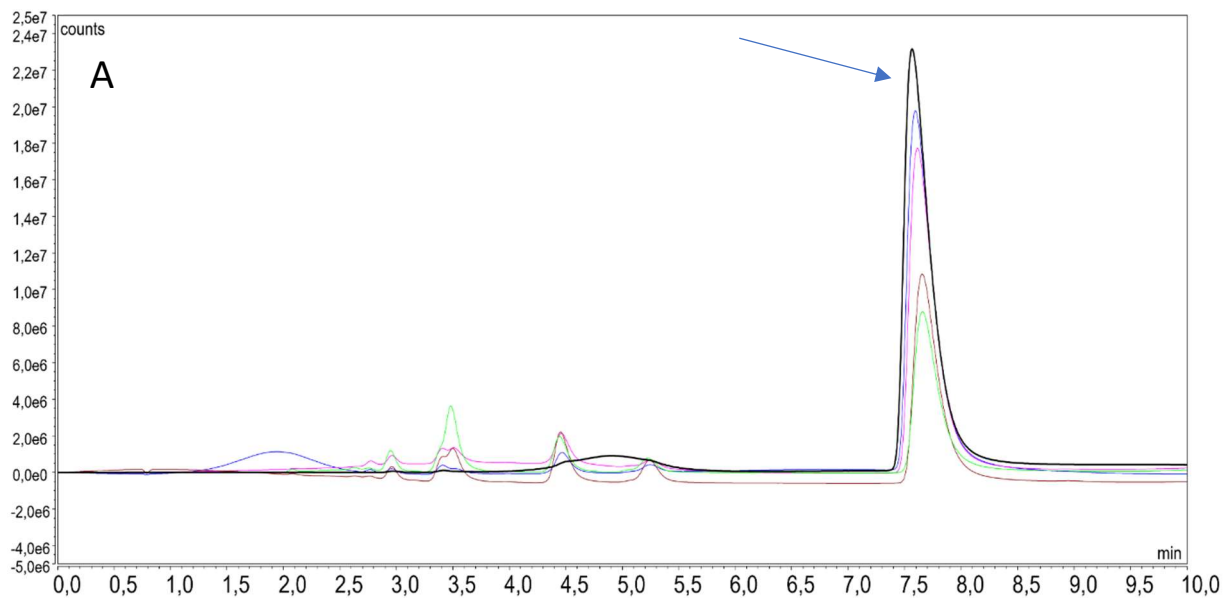
Z Obr. 4 je patrné, že odbourávání na TiO₂ probíhá o něco rychleji v zásaditém prostředí ve srovnání s prostředím neutrálním, nicméně rozdíl reaktivit není významně odlišný, rozdíly v množství výchozích látek (jednotlivých antibiotik) po 30 minutách ozáření na TiO₂ činí mezi neutrálním a zásaditým prostředím 13 % u ciprofloxacinu, 14 % u enrofloxacinu a 8 % u norfloxacinu.

Chromatogramy reakčních směsí v neutrálním a zásaditém prostředí v jednotlivých ozařovacích časech 0 – 30 minut (na TiO₂) pořízené fluorescenčním detektorem jsou uvedeny pro ciprofloxacin na Obr. 5, pro enrofloxacin na Obr. 6 a pro norfloxacin na Obr. 7. Zvětšené chromatogramy se zvýrazněnými retenčními časy jsou v Přílohách 1 – 6.



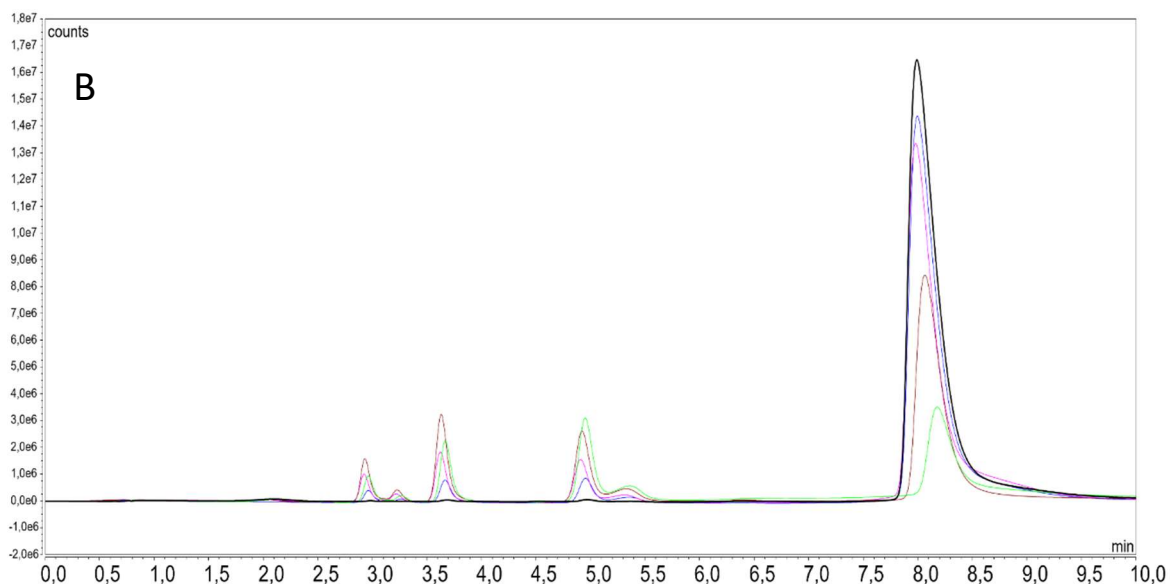
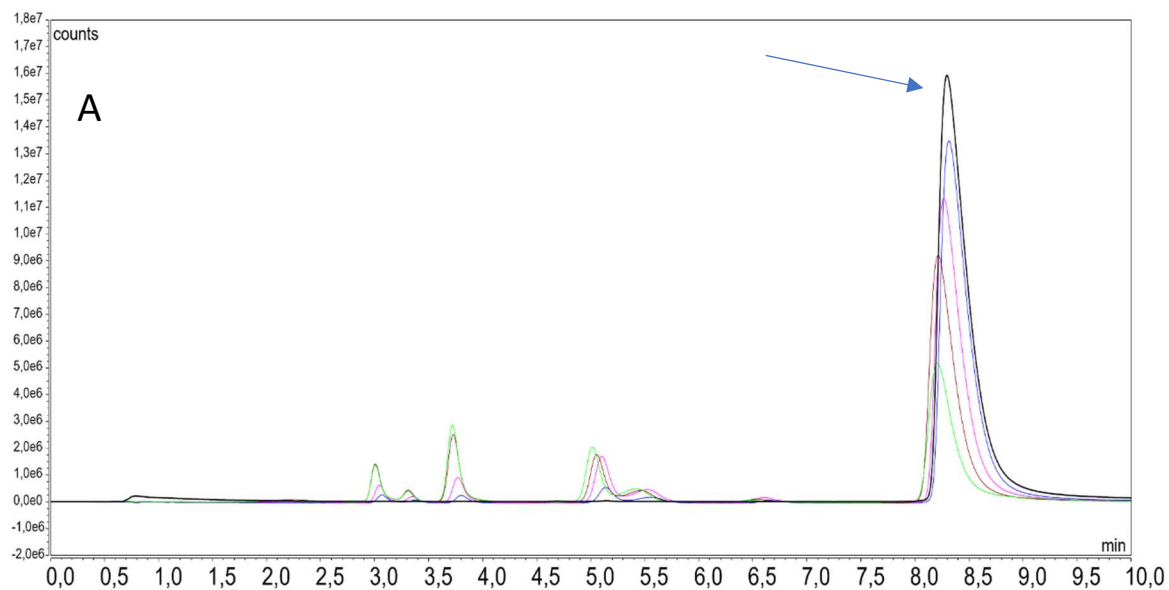
Obr. 5: HPLC chromatogramy ciprofloxacinu v neutrálním a zásaditém prostředí v časovém rozmezí ozařování 0 – 30 minut: A – chromatogram při pH = 7,05; B – chromatogram při pH = 8,80. 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 7 min – růžová křivka, 15 min – hnědá křivka, 30 min – zelená křivka. Šipka označuje pík ciprofloxacinu.

Z Obr. 5 je vidět, že při fotochemické degradaci ciprofloxacinu v neutrálním i zásaditém prostředí vznikají čtyři produkty s retenčními časy kratšími než je retenční čas ciprofloxacinu.



Obr. 6: HPLC chromatogramy enrofloxacinu v neutrálním a zásaditém prostředí v časovém rozmezí ozařování 0 – 30 minut: A – chromatogram při pH = 6,90; B – chromatogram při pH = 8,30. 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 7 min – růžová křivka, 15 min – hnědá křivka, 30 min – zelená křivka. Šipka označuje pík enrofloxacinu.

Z Obr. 6 je vidět, že při fotochemické degradaci enrofloxacinu v neutrálním i zásaditém prostředí vznikají čtyři produkty s retenčními časy kratšími než je retenční čas enrofloxacinu.



Obr. 7: HPLC chromatogramy norfloxacinu v neutrálním a zásaditém prostředí v časovém rozmezí ozařování 0 – 30 minut: A – chromatogram při pH = 7,00; B – chromatogram při pH = 8,90. 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 7 min – růžová křivka, 15 min – hnědá křivka, 30 min – zelená křivka. Šipka označuje pík norfloxacinu.

Z Obr. 7 je vidět, že při fotochemické degradaci norfloxacinu v neutrálním i zásaditém prostředí vzniká pět produktů s retenčními časy kratšími než je retenční čas norfloxacinu.

Analýza celkového organického uhlíku (TOC) ukázala, že nedochází k úbytku organického uhlíku a tedy k mineralizaci u žádného ze studovaných vzorků.

Další fází experimentu bylo porovnání produktů vzniklých při ozařování na TiO₂ s produkty vznikajícími fotochemickou degradací v homogenní fázi pomocí metody LC-MS/MS.

V Tab. IV jsou uvedeny počty detekovaných fotoproduktů při ozařování na TiO₂ a v homogenní fázi. Hodnoty retenčních časů a hodnot m/z v ESI - a ESI + módu jednotlivých produktů fotodegradace jsou zaznamenány v Příloze 8.

Tab. IV: Počty fotoproduktů vzniklých po ozáření na TiO₂ a v homogenní fázi (časy ozařování v homogenní fázi): ciprofloxacin – 3 minuty při neutrálním a 2,5 minuty při zásaditém pH, enrofloxacin – 5 minut při neutrálním a 3 minuty při zásaditém pH, norfloxacin – 5 minut při neutrálním a 4,5 minuty při zásaditém pH.

Antibiotikum	pH	ESI +		ESI -	
		TiO ₂ ozařování 30 minut	homogenní fáze ozařování	TiO ₂ ozařování 30 minut	homogenní fáze ozařování
Ciprofloxacin	neutrální	6	14	7	18
	zásadité	4	17	11	21
Enrofloxacin	neutrální	11	21	18	28
	zásadité	6	22	12	29
Norfloxacin	neutrální	6	24	8	23
	zásadité	8	11	8	6

Z Tab. IV je vidět, že ve většině případů vzniká při ozařování v homogenní fázi větší množství produktů detekovatelných jak v ESI + tak ESI - módu, výjimkou je reakční směs norfloxacinu v zásaditém prostředí, kde v ESI - módu byl počet produktů detekovatelný ve směsi ozáření s TiO₂ jako katalyzátorem vyšší.

U dvojic reakčních směsí TiO₂ – homogenní směs byla provedena analýza, zda se v reakční směsi s TiO₂ a v reakční směsi ozařované v homogenním prostředí vyskytují shodné produkty, přičemž za shodné byly považovány takové produkty, které měly shodný retenční čas, shodnou hodnotu (m/z) a vykazovaly shodnou fragmentaci.

V Tab. V jsou uvedeny počty shodných fotoproduktů v neutrální a zásaditém prostředí v ESI - a ESI + módu. Hodnoty retenčních časů a hodnot m/z pro jednotlivé látky sumarizované v Tab. V jsou uvedeny v Příloze 7.

Tab. V: Shodné fotoprodukty fotodegradace ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu při ozařování jednak s TiO₂ jako fotokatalyzátorem a jednak v homogenní reakční směsi bez katalyzátoru prováděné s reakční směsí v neutrálním a zásaditém prostředí.

Antibiotikum	pH	ESI +	ESI -
Ciprofloxacin	neutrální	5	4
	zásadité	4	8
Enrofloxacin	neutrální	4	7
	zásadité	5	10
Norfloxacin	neutrální	4	3
	zásadité	5	2

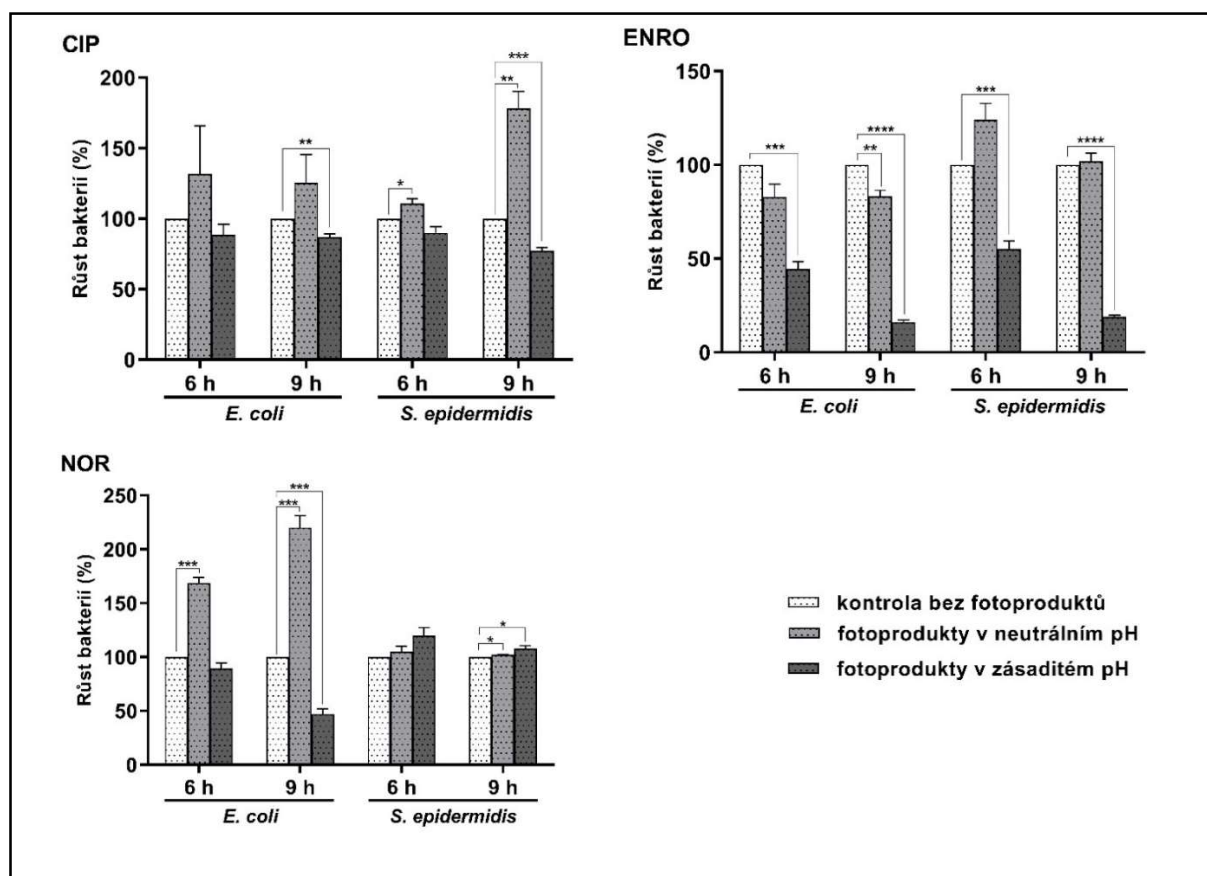
Z Tab. V je vidět, že pro ciprofloxacin bylo nalezeno pět shodných fotoproduktů v ESI + a čtyři v ESI - v neutrální reakční směsi a čtyři a osm v zásadité. U enrofloxacinu byly nalezeny čtyři shodné produkty v ESI + a sedm v ESI - v neutrální reakční směsi a pět a deset v zásadité. U norfloxacinu to byly čtyři produkty v ESI + a tři v ESI - v neutrální reakční směsi a pět a dva v zásadité.

Pro následné testy antibakteriální aktivity směsi fotoproduktů ve srovnání s antibakteriální aktivitou původního antibiotika byla testována stabilita jednotlivých reakčních směsí. Za dva dny nedošlo ke změně větší než 10 % (rozmezí 0–10 %). Pro test antibakteriální aktivity byly roztoky antibiotik ozařovány po dobu 30 minut na TiO₂. Aby bylo dodrženo shodné množství antibiotika v ozářeném vzorku jako v referenčním neozářeném vzorku, bylo ozářeného vzorku přidáváno tolikrát víc (objemově), kolikrát méně v něm bylo zbytkového antibiotika. Násobky objemu pro ozářenou směs jednotlivých antibiotik pro testy antibakteriální aktivity ukazuje Tab. VI.

Tab. VI: Násobky objemu pro ozářenou směs jednotlivých antibiotik pro test antibakteriální aktivity.

Antibiotikum	pH	Násobky objemu
Ciprofloxacin	neutrální	3,5
	zásadité	6,3
Enrofloxacin	neutrální	2,9
	zásadité	4,8
Norfloxacin	neutrální	3,5
	zásadité	4,8

Výsledky testování antibakteriální aktivity jsou uvedeny na Obr. 8.



Obr. 8: Antibakteriální aktivita ozářených roztoků fluorchinolonových antibiotik v neutrálním a zásaditém prostředí na *Escherichia coli* a *Staphylococcus epidermidis* po 6 a 9 hodinách kultivace: CIP – ciprofloxacin, ENRO – enrofloxacin, NOR – norfloxacin. Jedna hvězdička pro $p \leq 0,05$, dvě hvězdičky pro $p \leq 0,01$, tři hvězdičky pro $p \leq 0,001$ a čtyři hvězdičky $p \leq 0,0001$.

Pro ciprofloxacin při inkubaci s *E. coli* po dobu 6 a 9 hodin se ukazuje, že reakční směs s fotoproducty v neutrálním prostředí vykazuje zdánlivě nižší antibakteriální aktivitu (tedy vyšší přírůstek bakterií) než kontrola s ciprofloxacinem, ovšem statisticky nebyl rozdíl vyhodnocen jako významný kvůli velkému rozptylu hodnot (hodnoty parametru p 0,402 pro šestihodinovou a 0,266 pro devítihodinovou inkubaci). Inkubace s fotoproducty vzniklými při ozařování v zásaditém prostředí po šesti hodinách nevykazuje rozdíl oproti samotnému ciprofloxacinu, ale při prodloužené inkubaci je patrný statisticky významný pokles počtu bakterií ($p \leq 0,01$). Inkubace s *S. epidermidis* ukázala po šestihodinové inkubaci sníženou antibakteriální aktivitu u směsi fotoproductů vzniklých v neutrálním prostředí ($p \leq 0,05$), trend se prohloubil při delší inkubaci ($p \leq 0,01$). Produkty fotochemické degradace v neutrálním prostředí byly pro *S. epidermidis* výrazně méně toxické než ciprofloxacin ($p \leq 0,05$) při šestihodinové inkubaci a $p \leq 0,01$ při devítihodinové inkubaci.

Pro enrofloxacin vyplývá z Obr. 8, že fotoproducty vzniklé v zásaditém prostředí jsou ve všech případech významně toxičtější (vykazují výrazně vyšší antibakteriální aktivitu než samotné antibiotikum). Zvýšená antibakteriální aktivita je pro obě použité bakterie patrná již po 6 hodinách inkubace, účinek se prohlubuje při delší inkubaci. Fotoproducty vzniklé v neutrálním prostředí vykazují náznak zvýšené antibakteriální aktivity u šestihodinové inkubace s *E. coli*, tento náznak je ale statisticky nevýznamný ($p = 0,057$), nicméně při devítihodinové inkubaci je již zvýšení antibakteriální aktivity statisticky významné ($p \leq 0,01$). U *S. epidermidis* nemá směs fotoproductů vzniklých v neutrálním prostředí vliv na antibakteriální aktivitu.

U norfloxacinu je opět patrná zvýšená antibakteriální aktivita pro *E. coli* u fotoproductů vzniklých v zásaditém prostředí při devítihodinové inkubaci ($p \leq 0,001$) s náznakem tohoto trendu u šestihodinové inkubace ($p = 0,094$). Produkty fotochemické degradace v neutrálním prostředí byly statisticky významně méně toxické než norfloxacin ($p \leq 0,001$). U *S. epidermidis* nebyl při šestihodinové kultivaci prokázán žádný efekt, devítihodinová kultivace ukázala statisticky hraniční snížení toxicity produktů vzniklých jak v neutrálním tak v zásaditém prostředí ($p \leq 0,05$).

4 Diskuze

Rychlostní konstanty zkoumaných antibiotik ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu při fotochemické degradaci v přítomnosti TiO_2 jako fotokatalyzátoru byly ve všech případech mírně vyšší v zásaditém prostředí než v neutrálním, jednotlivé hodnoty se ale příliš nelišily – pohybují se od 0,035 do 0,061 min^{-1} . Tyto hodnoty jsou ovšem řádově nižší než hodnoty v homogenní fotochemické reakci, kdy degradace probíhala jen v přítomnosti daného antibiotika bez přítomnosti přidaného katalyzátoru (Klementová et al., 2022) – jednotlivé hodnoty se v tomto případě pohybovaly v rozmezí 0,254–0,763 min^{-1} .

Pozorovaná skutečnost, že rychlost odbourávání na TiO_2 je mírně vyšší v zásaditém prostředí než v neutrálním (rozdíl mezi hodnotami 7,05 a 8,80 činil u ciprofloxacinu 13 %) je ve shodě s výsledky Usmana et al. (2021), kde vzrůst odbouraného množství ciprofloxacinu s použitím nanočástic TiO_2 P25 Degussa mezi hodnotami pH 5,5 a 8 činil 11,7 %.

Odbourávání enrofloxacinu v přítomnosti TiO_2 studovali Nguyen et al. (2020). Pro roztok enrofloxacinu o stejné počáteční koncentraci, jaká byla použita v této práci (50 mg/l) byla naměřena degradace 51,4 % po 30 minutách ozařování při pH = 6,53. V této práci činilo množství odbouraného enrofloxacinu 65 % při pH = 6,90. Výsledek je v dobré shodě s prací autorů Nguyena et al. (2020), když vezmeme v úvahu, že vyšší pH má za následek zvýšení (byť mírné) rychlosti odbourávání. Dalším faktorem, který mohl být zodpovědný za větší rychlost odbourávání zjištěnou v této práci, je skutečnost, že v této práci byl použit imobilizovaný TiO_2 , zatímco v práci Nguyena et al. (2020) to byla suspenze (0,5 g P25/l), což mohlo vést k rozptylu světla v reakční směsi a tím snížení intenzity záření. Autoři neuvádějí světelný výkon lampy, proto není možné provést porovnání, zda i ten mohl mít vliv na rychlost reakce.

Odbourávání norfloxacinu při použití UV/ TiO_2 studovali Shankaraiah et al. (2016) v neutrálním prostředí. Nezabývali se závislostí na pH, ale závislostí na dávce TiO_2 . Jejich pozorování potvrdila vcelku očekávanou skutečnost, že účinnost procesu se zvyšovala se zvyšující se dávkou TiO_2 , pouze do určité úrovně a při vyšších dávkách se účinnost snižovala v důsledku zhoršeného průniku světla do suspenze. Jako nejúčinnější byla stanovena dávka 0,3 g na 150 mg/l norfloxacinu v destilované vodě. Při optimální dávce dosáhli 90 % odbourání norfloxacinu po 180 minutovém ozařování.

V práci Klementové et al. (2022) byly zkoumány produkty fotochemické degradace ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu při ozařování v homogenní fázi v reakčních směsích při neutrálním a zásaditém prostředí. U všech studovaných látek byly reakční cesty významně ovlivněny pH reakčního systému, přičemž více produktů vznikalo při zásaditém pH než při neutrálním pH. Poměry produktů při neutrálním a zásaditém pH byly 16/26 pro ciprofloxacin, 9/19 pro enrofloxacin a 15/23 pro norfloxacin. V této práci byla provedena LC/MS/MS analýza produktů vzniklých při ozařování na TiO₂ a zopakováno ozařování v homogenní fázi a analýza takto vzniklých produktů – původní data pro práci Klementové et al. (2022) naměřená také na katedře chemie PřF JU nemohla být použita, neboť byla ztracena při napadení počítače u LC/MS přístroje v roce 2020. Porovnání počtu produktů nalezených v jednotlivých reakčních směsích (Tab. IV) ukazuje, že počty produktů v reakční směsi s TiO₂ jsou ve všech případech významně nižší než počty produktů v reakční směsi vzniklé při ozařování v homogenní fázi. V obou případech (heterogenní i homogenní fotodegradace) dochází ke snižování pH. V práci Poncarové (2020) bylo prokázáno pomocí metody iontové chromatografie, že v reakční směsi se jako produkt objevuje kyselina mravenčí a ta může být tedy zodpovědná za pokles pH. Pokles pH, pozorovaný při pokusech fotodegradace na TiO₂, je pravděpodobně způsoben stejným způsobem.

Dvojice reakčních směsí získaných ozařováním na TiO₂ a ozařováním v homogenní fázi byly podrobeny analýze za účelem zjištění, zda se v nich vyskytují shodné produkty, přičemž za shodné byly považovány takové produkty, které měly shodný retenční čas, shodnou hodnotu m/z a vykazovaly shodnou fragmentaci. Tato analýza ukázala, že v každé reakční směsi lze nalézt několik shodných produktů – nejvíce jich bylo nalezeno v enrofloxacinu ozařovaném v zásaditém pH v analytickém MS módu ESI⁻ (10 shodných produktů), nejméně (dva) u norfloxacinu ozařovaném v zásaditém prostředí v analytickém MS módu ESI⁻.

Toxicita produktů degradace ciprofloxacinu nanočásticemi TiO₂ studovaná v práci Usmana et al. (2021) byla založena na vyhodnocování inhibičních zón růstu bakterie *E. coli*. Autoři dospěli k názoru, že produkt degradace ciprofloxacinu s nanočásticemi TiO₂ má nízkou toxicitu. Výsledky získané v této práci s *E. coli* u fotoproduktů vzniklých v přítomnosti TiO₂ v neutrálním prostředí jsou ve shodě s prací Usmana et al. (2021), neboť ovlivnění antibakteriální aktivity se neukázalo jako statisticky významné, tedy fotoprodukty vznikající fotochemickou degradací v neutrálním prostředí nevykazují vůči *E. coli* toxické účinky.

Inkubace s fotoprodukty ciprofloxacinu vzniklými při ozařování v zásaditém prostředí po šesti hodinách nevykazuje rozdíl oproti samotnému ciprofloxacinu, ale při prodloužené inkubaci je patrný statisticky významný pokles počtu bakterií ($p \leq 0,01$). To potvrzuje, že fotoprodukty vzniklé fotochemickou degradací ciprofloxacinu v zásaditém prostředí vykazují vůči *E. coli* toxické účinky, tedy vyšší antibakteriální aktivitu než samotný ciprofloxacin.

Inkubace fotoproduktů ciprofloxacinu s *S. epidermidis* ukázala po šestihodinové inkubaci hraničně sníženou antibakteriální aktivitu u směsi fotoproduktů vzniklých v neutrálním prostředí ($p \leq 0,05$), trend se prohloubil při delší, devítihodinové, inkubaci, kdy hodnota parametru p poklesla na hodnotu $p \leq 0,01$, což už je statisticky významný ukazatel. Směs produktů fotochemické degradace ciprofloxacinu v neutrálním prostředí je tedy pro *S. epidermidis* výrazně méně toxická než čistý ciprofloxacin ($p \leq 0,05$ při šestihodinové inkubaci a $p \leq 0,01$ při devítihodinové inkubaci), přestože v reakční směsi fotoproduktů je přítomen ciprofloxacin ve stejné koncentraci jako v kontrole s čistým ciprofloxacinem. Je tedy nutno v tomto případě předpokládat, že fotoprodukty nějakým mechanismem potlačují toxicitu ciprofloxacinu, neboť bakterie ve směsi ciprofloxacin + fotoprodukty rostou lépe.

Klementová et al. (2022) pozorovali u fotoproduktů ciprofloxacinu v testech s *E. coli* a *S. epidermidis* antibakteriální aktivitu významně zvýšenou oproti samotnému ciprofloxacinu: Pro *E. coli* měl parametr p hodnotu 0,0001 pro neutrální prostředí a 0,01 pro zásadité prostředí v porovnání se samotným ciprofloxacinem po šestihodinové inkubaci, pro *S. epidermidis* byly hodnoty parametru $p = 0,05$ pro neutrální prostředí a 0,0001 pro zásadité prostředí.

Vzhledem k rozdílnosti produktů mezi ozařováním s TiO_2 a ozařováním v homogenní fázi není tento rozdíl v toxicitě produktů překvapivý, nicméně velmi významný je fakt, že produkty odbourávání mohou mít větší toxické účinky než samotná původní látka.

Nguyen et al. (2020) studovali toxicitu enrofloxacinu a produktů fotodegradace enrofloxacinu s použitím TiO_2 jako fotokatalyzátoru na bakterii *Bacillus subtilis*. Pozorovali sníženou antibakteriální aktivitu po 60 minutách ozařování roztoku enrofloxacinu a úplné vymizení po 90 minutách ozařování, což značí, že produkty ozařování nevykazovaly žádnou biologickou toxicitu vůči této bakterii.

Z výsledků této práce (Obr. 8) naopak plyne, že fotoprodukty enrofloxacinu vzniklé v zásaditém prostředí jsou významně toxičtější (vykazují výrazně vyšší antibakteriální aktivitu) než samotné antibiotikum jak u *E. coli* tak u *S. epidermidis*. Zvýšená antibakteriální aktivita je pro obě použité bakterie patrná již po 6 hodinách inkubace ($p \leq 0,001$ u obou typů bakterií), účinek se prohlubuje při delší inkubaci ($p \leq 0,0001$ u obou typů bakterií). Tyto hodnoty parametru p prokazují významné zvýšení antibakteriální aktivity a tedy toxicity fotoproduktů enrofloxacinu. Fotoprodukty vzniklé v neutrálním prostředí vykazují náznak zvýšené antibakteriální aktivity u šestihodinové inkubace s *E. coli*, tento náznak je ale statisticky nevýznamný ($p = 0,067$), nicméně při devítihodinové inkubaci je již zvýšení antibakteriální aktivity statisticky významné ($p \leq 0,01$), takže i u fotoproduktů enrofloxacinu vzniklých při ozařování v neutrálním prostředí lze konstatovat, že pro *E. coli* vykazují vyšší toxicitu než samotné antibiotikum enrofloxacin. U *S. epidermidis* nemá směs fotoproduktů vzniklých v neutrálním prostředí vliv na antibakteriální aktivitu (zdánlivé snížení antibakteriální aktivity u šestihodinové inkubace není statisticky vyhodnoceno jako významné).

V práci Klementové et al. (2022) bylo prokázáno, že u fotoproduktů enrofloxacinu vzniklých ozařováním v homogenní fázi je nárůst antibakteriální aktivity ještě významnější než u fotoproduktů ciprofloxacinu. Hodnoty parametru p jsou 0,0001 pro oba typy bakterií a oba typy reakčních směsí, ale z publikovaných dat vyplývá, že zejména fotoprodukty vzniklé v zásaditém prostředí vedou k téměř úplné eliminaci populace *E. coli* již po šestihodinové inkubaci a *S. epidermidis* po devítihodinové inkubaci.

U norfloxacinu bylo v této práci pozorováno statisticky významné snížení antibakteriální aktivity pouze u *E. coli* po devítihodinové inkubaci v reakční směsi fotoproduktů vzniklých v zásaditém prostředí ($p \leq 0,001$). V jiných případech buď změny nebyly statisticky významné nebo (u *E. coli* v neutrálním prostředí) došlo k výraznému snížení antibakteriální aktivity oproti samotnému norfloxacinu. Obdobně jako u ciprofloxacinu to znamená, že fotoprodukty snižují toxicitu původního antibiotika, neboť to je v inkubačním roztoku s fotoprodukty přítomno ve stejné koncentraci jako v kontrolním čistém norfloxacinu. O mechanismu takového snížení lze jen spekulovat, může to být např. tvorba aduktů s antibiotikem.

5 Závěr

Fluorchinolony ciprofloxacin, enrofloxacin a norfloxacin podléhají degradaci při fotochemické reakci s TiO_2 jako fotokatalyzátorem. Reakční rychlosti závisejí na pH reakční směsi, v níž k fotodegradaci došlo, rychlost degradace je větší v mírně zásadité reakční směsi ve srovnání s neutrální reakční směsí.

Fotoprodukty degradace s TiO_2 jako fotokatalyzátorem jsou ve všech případech významně méně početné než fotoprodukty vznikající při ozařování samotného antibiotika v homogenní fázi. Pouze malá část fotoproduktů byla na základě retenčního času, m/z poměru a způsobu fragmentace identifikována jako shodná pro reakční směsi s TiO_2 a směsi vzniklé při ozařování v homogenní reakční směsi samotných antibiotik.

Fotoprodukty degradace s TiO_2 vykazují za určitých reakčních podmínek vyšší toxicitu k bakteriím *E. coli* a *S. epidermidis* ve srovnání s původním antibiotikem. Statisticky významně vyšší toxicita byla nalezena pro *E. coli* u ciprofloxacinu v zásaditém prostředí, u enrofloxacinu v neutrálním i zásaditém prostředí, a u norfloxacinu v zásaditém prostředí. Pro *S. epidermidis* zvýšenou toxicitu vykazovaly fotoprodukty ciprofloxacinu a enrofloxacinu v zásaditém prostředí. Snížení toxicity přítomného antibiotika v přítomnosti směsi fotoproduktů bylo pozorováno u *E. coli* u norfloxacinu v neutrálním prostředí, pro *S. epidermidis* u ciprofloxacinu v neutrálním prostředí a norfloxacinu v neutrálním i zásaditém prostředí.

6 Seznam použité literatury

- Acar, J. F., & Goldstein, F. W. (1997): Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*, **24** (1), 67-73. https://doi.org/10.1093/clinids/24.Supplement_1.S67 (staženo 21. 2. 2022).
- Agunbiade, F. O., & Moodley, B. (2016): Occurrence and distribution pattern of acidic pharmaceuticals in surface water, wastewater, and sediment of the Msunduzi River, Kwazulu-Natal, South Africa. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **35** (1), 36–46. <https://doi.org/10.1002/etc.3144> (staženo 25. 6. 2021).
- Al-Omar, M. A. (2005): Ciprofloxacin: drug metabolism and pharmacokinetic profile. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, **31**, 209-214. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(04\)31006-3](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(04)31006-3) (staženo 8. 8. 2021).
- Appelbaum, P. C., & Hunter, P. A. (2000): The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **16** (1), 5–15. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00192-8) (staženo 6. 6. 2021).
- Arifin, N., Tarek, M., & Khan, M. R. (2022): Efficient treatment of organic pollutants by boron doped TiO₂ photocatalysts under visible light radiation. *Chemical Engineering Research and Design*, **180**, 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.02.016> (staženo 22. 2. 2022).
- Attili, A. R., Preziuso, S., Ngu, Ngwa, V., Cantalamessa, A., Moriconi, M., & Cuteri, V. (2016): Clinical evaluation of the use of enrofloxacin against *Staphylococcus aureus* clinical mastitis in sheep. *Small Ruminant Research*, **136**, 72–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.004> (staženo 21. 2. 2022).
- Azanu, D., Styrihave, B., Darko, G., Weisser, J. J., & Abaidoo, R. C. (2018): Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *Science of the Total Environment*, **622–623**, 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.287> (staženo 25. 6. 2021).
- Bahry, S. A., Sivakumar, N., & Al-Khambashi, M. (2012): Effect of nalidixic acid on the morphology and protein expression of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **5** (4), 265-269. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60037-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60037-6) (staženo 10. 2. 2022).

- Barlow, A. M. (1963): Nalidixic acid in infections of urinary tract. Laboratory and clinical investigations. *British Medical Journal*, **2** (5368), 1308-1310. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5368.1308> (staženo 7. 6. 2021).
- Blondeau, J. M. (2004): Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology*, **49** (2), 73-78. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2004.01.005> (staženo 1. 4. 2022).
- Bonassa, K. P. D., Miragliotta, M. Y., Simas, R. C., Eberlin, M. N., Anadón, A., Moreno, R. A., & Reyes, F. G. R. (2021): Pharmacokinetics, Pharmacodynamic Efficacy Prediction Indexes and Monte Carlo Simulations of Enrofloxacin Hydrochloride Against Bacterial Strains That Induce Common Clinical Diseases in Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, **7**, 606872. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.606872> (staženo 9. 8. 2021).
- Boothe, D. M., Boeckh, A., Boothe, H. W., Wilkie, S., & Jones, S. (2002): Plasma concentrations of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in dogs following single oral administration of enrofloxacin at 7.5, 10, or 20 mg/kg. *Veterinary therapeutics: Research in applied veterinary medicine*, **3** (4), 409-419.
- Brunner, M., Langer, O., Dobrozemsky, G., Müller, U., Zeitlinger, M., Mitterhauser, M., Wadsak, W., Dudczak, R., Kletter, K., & Müller, M. (2004): [18F] Ciprofloxacin, a new positron emission tomography tracer for noninvasive assessment of the tissue distribution and pharmacokinetics of ciprofloxacin in humans. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **48** (10), 3850–3857.
- Campoli-Richards, D. M., Monk, J. P., Price, A., Benfield, P., Todd, P. A., & Ward, A. (1988): Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, **35** (4), 373-447. <https://doi.org/10.2165/00003495-198835040-00003> (staženo 16. 6. 2021).
- Carlier, M. B., Scorneaux, B., Zenebergh, A., Desnottes, J. F., & Tulkens, P. M. (1990): Cellular uptake, localization and activity of fluoroquinolones in uninfected and infected macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **26**, 27-39. https://doi.org/10.1093/jac/26.suppl_B.27 (staženo 8. 8. 2021).

- Cester, C. C., & Toutain, P. L. (1997): A comprehensive model for enrofloxacin to ciprofloxacin transformation and disposition in dog. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **86** (10), 1148-1155. <http://dx.doi.org/10.1021/js9603461> (staženo 8. 8. 2021).
- Cofsky, R. D., duBouchet, L., & Landesman, S. H. (1984): Recovery of norfloxacin in feces after administration of a single oral dose to human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **26** (1), 110-111. <https://doi.org/10.1128/AAC.26.1.110> (staženo 8. 8. 2021).
- Cowling, T., & Farrah, K. (2019): Fluoroquinolones for the Treatment of Respiratory Tract Infections: A Review of Clinical Effectiveness, Cost-Effectiveness, and Guidelines [Internet]. *Ottawa (ON): CADTH (Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health) Rapid Response Report: Summary with Critical Appraisal*.
- Daneman, N., Chateau, D., Dahl, M., Zhang, J., Fisher, A., Sketris, I. S., Quail, J., Marra, F., Ernst, P., & Bugden, S. (2020): Fluoroquinolone use for uncomplicated urinary tract infections in women: a retrospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection*, **26** (5), 613-618. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.016> (staženo 11. 6. 2021).
- Danner, M. - C., Robertson, A., Behrends, V., & Reiss, J. (2019): Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. *Science of the Total Environment*, **664**, 793-804. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.406> (staženo 25. 6. 2021).
- Dechra – Veterinary Products. (2017): Enroquin™ Flavored Tablets (enrofloxacin). https://www.dechra-us.com/Files/Files/SupportMaterialDownloads/US/enroquin_detailer.pdf (staženo 27. 2. 2022).
- Domagala, J. M. (1994): Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **33** (4), 685-706.
- DrugBank. (2022): Norfloxacin. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01059> (staženo 27. 2. 2022).
- Emmerson, A. M., & Jones, A. M. (2003): The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **51**, 13–20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg208> (staženo 10. 2. 2022).

- FDA (U.S. Food and Drug Administration. Drug Safety Communication.) (2017): FDA warns about increased risk of ruptures or tears in the aorta blood vessel with fluoroquinolone antibiotics in certain patients. <https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm628753.htm>.
- Fraunfelder, F.T., & Fraunfelder, F. W. Jr. (2020): Drug-Induced Ocular Side Effects: Clinical Ocular Toxicology. (8th Edition). V "Anti-Infectives." Elsevier., 2021, str. 19-87, ISBN-13: 978-0323653756.
- Greenfield, R. A. (1993): Symposium on antimicrobial therapy. VII. The fluoroquinolones. *OSMA (Journal of the Oklahoma State Medical Association)*, **86** (4), 166-174.
- Halling-Sørensen, B., Lützhøft, H. - C. H., Andersen, H. R., & Ingerslev, F. (2000): Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **46**, 53–58. https://doi.org/10.1093/jac/46.suppl_1.53 (staženo 25. 6. 2021).
- Hanna, N., Sun, P., Sun, Q., Li, X., Yang, X., Ji, X., Zou, H., Ottoson, J., Nilsson, L. E., Berglund, B., Dyar, O. J., Tamhankar, A. J., & Stålsby, Lundborg, C. (2018): Presence of antibiotic residues in various environmental compartments of Shandong province in eastern China: Its potential for resistance development and ecological and human risk. *Environment International*, **114**, 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.003> (staženo 25. 6. 2021).
- Holmes, B., Brogden, R. N., & Richards, D. M. (1985): Norfloxacin. A Review of Its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use. *Drugs*, **30**, 482-513. <https://doi.org/10.2165/00003495-198530060-00003> (staženo 24. 2. 2022).
- Jackson, M. C., Loewen, C. J. G., Vinebrooke, R. D., & Chimimba, C. T. (2016): Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Global Change Biology*, **22** (1), 180–189. <https://doi.org/10.1111/gcb.13028> (staženo 9. 2. 2022).
- Katsigiannis, A., Noutsopoulos, C., Mantziaras, J., & Gioldasi, M. (2015): Removal of emerging pollutants through Granular Activated Carbon. *Chemical Engineering Journal*, **280**, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.109> (staženo 23. 6. 2021).
- Kim, S. C., & Carlson, K. (2007): Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **387** (4), 1301 1315. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0613-0> (staženo 25. 6. 2021).

- Klementová Š., Poncarová M., Langhansová H., Lieskovská J., Kahoun D., & Fojtíková P. (2022): Photodegradation of fluoroquinolones in aqueous solution under light conditions relevant to surface waters, toxicity assessment of photoproduct mixtures. *Environmental Science and Pollution Research*, **29**, 13941-13962. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16182-6> (staženo 20. 2. 2022).
- Kurt, A., Mert, B. K., Özengin, N., Sivrioğlu, Ö., & Yonar, T. (2017): Treatment of Antibiotics in Wastewater Using Advanced Oxidation Processes (AOPs). *IntechOpen*.
- Larsson, D. G. J., de Pedro, C., & Paxeus, N. (2007): Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, **148** (3), 751-755. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.008> (staženo 10. 2. 2021).
- Liu, P., Zhang, H., Feng, Y., Yang, F., & Zhang, J. (2014): Removal of trace antibiotics from wastewater: a systematic study of nanofiltration combined with ozone-based advanced oxidation processes. *Chemical Engineering Journal*, **240**, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.11.057> (staženo 15. 6. 2021).
- Locatelli, M. A. F., Sodr e, F. F., & Jardim, W. F. (2011): Determination of antibiotics in brazilian surface waters using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **60** (3), 385–393. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9550-1> (staženo 25. 6. 2021).
- López-Cadenas, C., Sierra-Vega, M., García-Vieitez, J. J., Diez-Li bana, M. J., Sahag n-Prieto, A., & Fernández-Martínez, N. (2013): Enrofloxacin: pharmacokinetics and metabolism in domestic animal species. *Current Drug Metabolism*, **14** (10), 1042-1058. <https://doi.org/10.2174/1389200214666131118234935> (staženo 25. 6. 2021).
- Mach n, A., Font nez, K., Duconge, J., Cotto, M. C., Petrescu, F. I., Morant, C., & Márquez, F. (2022): Photocatalytic Degradation of Fluoroquinolone Antibiotics in Solution by Au@ZnO-rGO-gC₃N₄ Composites. *Catalysts*, **12** (2), 166. <https://doi.org/10.3390/catal12020166> (staženo 8. 8. 2021).
- Mar Vista (Animal Medical Center). (2021): Enrofloxacin. <https://www.marvistavet.com/enrofloxacin.pml> (staženo 27. 2. 2022).
- MED India Empowering Better Health (2017): Norfloxacin Price of 61 Brands. <https://www.medindia.net/drug-price/norfloxacin.htm> (staženo 27. 2. 2022).

- Ministerstvo zemědělství. (2020): Zpráva o stavu vodního hospodářství České republiky v roce 2020.
https://www.vakinfo.cz/wp-content/uploads/2021/12/Modra_zprava_2020_web.pdf
(staženo 20. 2. 2022).
- Mirzaei, R., Yunesian, M., Nasser, S., Gholami, M., Jalilzadeh, E., Shoeibi, S., & Mesdaghinia, A. (2018): Occurrence and fate of most prescribed antibiotics in different water environments of Tehran, Iran. *Science of the Total Environment*, **619–620**, 446-459. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.272> (staženo 25. 6. 2021).
- Naber, K. G. (1996): Fleroxacin overview. *Chemotherapy*, **42**, 1-9. <https://doi.org/10.1159/000239485> (staženo 10. 2. 2022).
- Nada, A. H., Sharaf, M. A., El Gholmy, Z. A., & Khalafallah, N. M. (2007): Comparative Bioavailability of Norfloxacin Tablets Based on Blood and Urine Data. *Medical Principles and Practice*, **16**, 426-431. <https://doi.org/10.1159/000107746> (staženo 24. 2. 2022).
- Nguyen, T. C. T., Trinh, T. B. H., Nguyen, T. T. Dang, V. T., Nguyen, T. T., & Nguyen, N. H. (2020): Degradation of enrofloxacin by photocatalysis using titanium dioxide nanomaterials. *Earth and Environmental Science*, **799**, 012033. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/799/1/012033> (staženo 22. 3. 2022).
- Oliphant, C. M., & Green, G. M. (2002): Quinolones: A Comprehensive Review. *American Family Physician*, **65** (3), 455-465.
- Parshikov, I. A., Heinze, T. M., Moody, J. D., Freeman, J. P., Williams, A. J., & Sutherland, J. B. (2001): The fungus *Pestalotiopsis guepini* as a model for biotransformation of ciprofloxacin and norfloxacin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56** (3-4), 474-477. <https://doi.org/10.1007/s002530100672> (staženo 27. 2. 2022).
- Paudel, S., Cerbu, C., Astete, C. E., Louie, S. M., Sabliov, C., & Rodrigues, D. F. (2019): Enrofloxacin-Impregnated PLGA Nanocarriers for Efficient Therapeutics and Diminished Generation of Reactive Oxygen Species. *ACS Applied Nano Materials*, **2** (8), 5035–5043. <https://doi.org/10.1021/acsnm.9b00970> (staženo 23. 2. 2022).

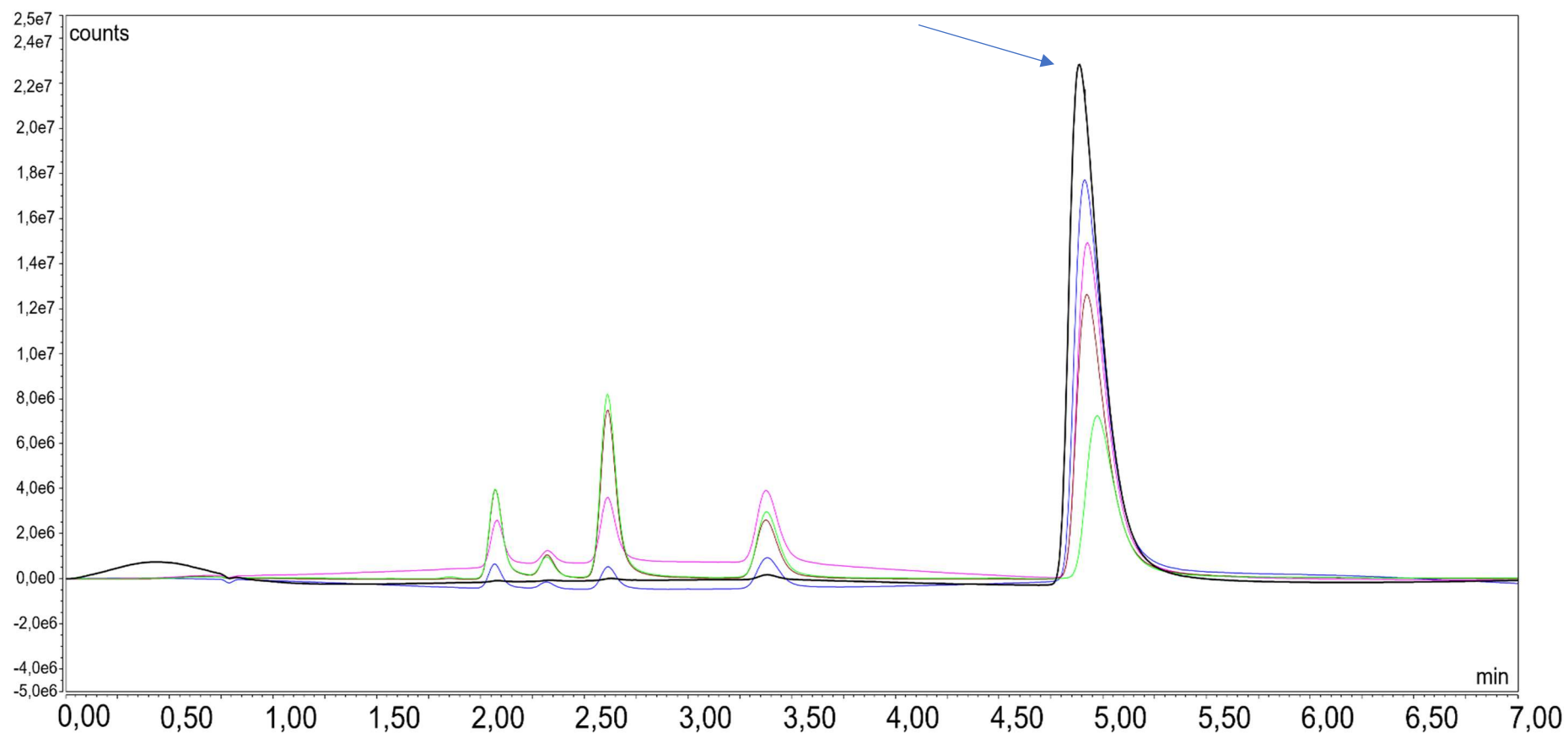
- Pei, L. L., Yang, W. Z., Fu, J. Y., Liu, M. X., Zhang, T. T., Li, D. B., Huang, R. Y., Zhang, L., Peng, G. N., Shu, G., Yuan, Z. X., Lin, J. C., Zhang, W., Zhong, Z. J., Zhao, L., & Fu, H. L. (2019): Synthesis, Characterization, and Pharmacodynamics Study of Enrofloxacin Mesylate. *Drug Design, Development and Therapy*, **14**, 715—730. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S239307> (staženo 21. 2. 2022).
- Poncarová, M., 2020: Identifikace produktů fotochemické degradace antibiotik ze skupiny fluorochinolonů. [Identification of products of photochemical degradation of fluoroquinolone antibiotics. Mgr. Thesis, in Czech] – p.94, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Pubchem. (2021): Ciprofloxacin.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciprofloxacin#section=2D-Structure>
(staženo 19. 2. 2022).
- Pubchem. (2021): Enrofloxacin.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enrofloxacin#section=2D-Structure>
(staženo 19. 2. 2022).
- Pubchem. (2021): Fleroxacin.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fleroxacin#section=2D-Structure>
(staženo 19. 2. 2022).
- Pubchem. (2021): Flumechin.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flumequine#section=2D-Structure>
(staženo 19. 2. 2022).
- Pubchem. (2021): Kyselina nalidixová.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nalidixic-acid#section=2D-Structure>
(staženo 19. 2. 2022).
- Pubchem. (2021): Norfloxacin.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Norfloxacin#section=2D-Structure>
(staženo 19. 2. 2022).
- Rekhate, C. V., & Srivastava, J. K. (2020): Recent advances in ozone-based advanced oxidation processes for treatment of wastewater- A review. *Chemical Engineering Journal Advances*, **3**, 100031. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2020.100031>
(staženo 14. 2. 2022).

- Rodriguez-Mozaz, S., Chamorro, S., Marti, E., Huerta, B., Gros, M., Sànchez-Melsió, A., Borrego, C. M., Barceló, D., & Balcázar, J. L. (2015): Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *Water Research*, **69**, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021> (staženo 25. 6. 2021).
- Shankaraiah, G., Poodari, S., Bhagawan, D., Himabindua, V., & Vidyavathi, S. (2016): Degradation of antibiotic norfloxacin in aqueous solution using advanced oxidation processes (AOPs)—A comparative study. *Desalination and Water Treatment*, **57** (57), 27804-27815. <https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1176960> (staženo 25. 3. 2022).
- Sharma, P. C., Jain, A., Jain, S., Pahwa, R., & Yar, M. S. (2010): Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **25** (4), 577-589.
- Sharma, M., Yadav, A., Mandal, M. K., & Dubey, K. K. (2022): TiO₂ based photocatalysis: a valuable approach for the removal of pharmaceuticals from aquatic environment. *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03894-y> (staženo 22. 2. 2022).
- SÚKL. (2012): Souhrn údajů o přípravku – GyraBlock 400. <https://www.sukl.cz/download/spc/SPC35775.pdf> (staženo 27. 2. 2022).
- SÚKL. (2018): Fluorochinolonová antibiotika - omezení používání potvrzeno. <https://www.sukl.cz/fluorochinolonova-antibiotika-omezeni-pouzivani-potvrzeno> (staženo 10. 9. 2021).
- SÚKL. (2021): Souhrn údajů o přípravku – Ciprofloxacin Kabi. <https://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC172240.pdf&type=spc&as=ciprofloxacin-kabi-spc>. (staženo 8. 8. 2021).
- Šíma, M., Michaličková, D., Ryšánek, P., Cihlářová, P., Kuchař, M., Lžičarová, D., Beroušek, J., Hartinger, J. M., Vymazal, T., & Slanař, O. (2021): No Time Dependence of Ciprofloxacin Pharmacokinetics in Critically Ill Adults: Comparison of Individual and Population Analyses. *Pharmaceutics*, **13** (8), 1156. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081156> (staženo 20. 8. 2021).
- Tamminen, M., Virta, M., Fani, R., & Fondi, M. (2012): Large-scale analysis of plasmid relationships through gene-sharing networks. *Molecular Biology and Evolution*, **29** (4), 1225–1240. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr292> (staženo 9. 2. 2022).

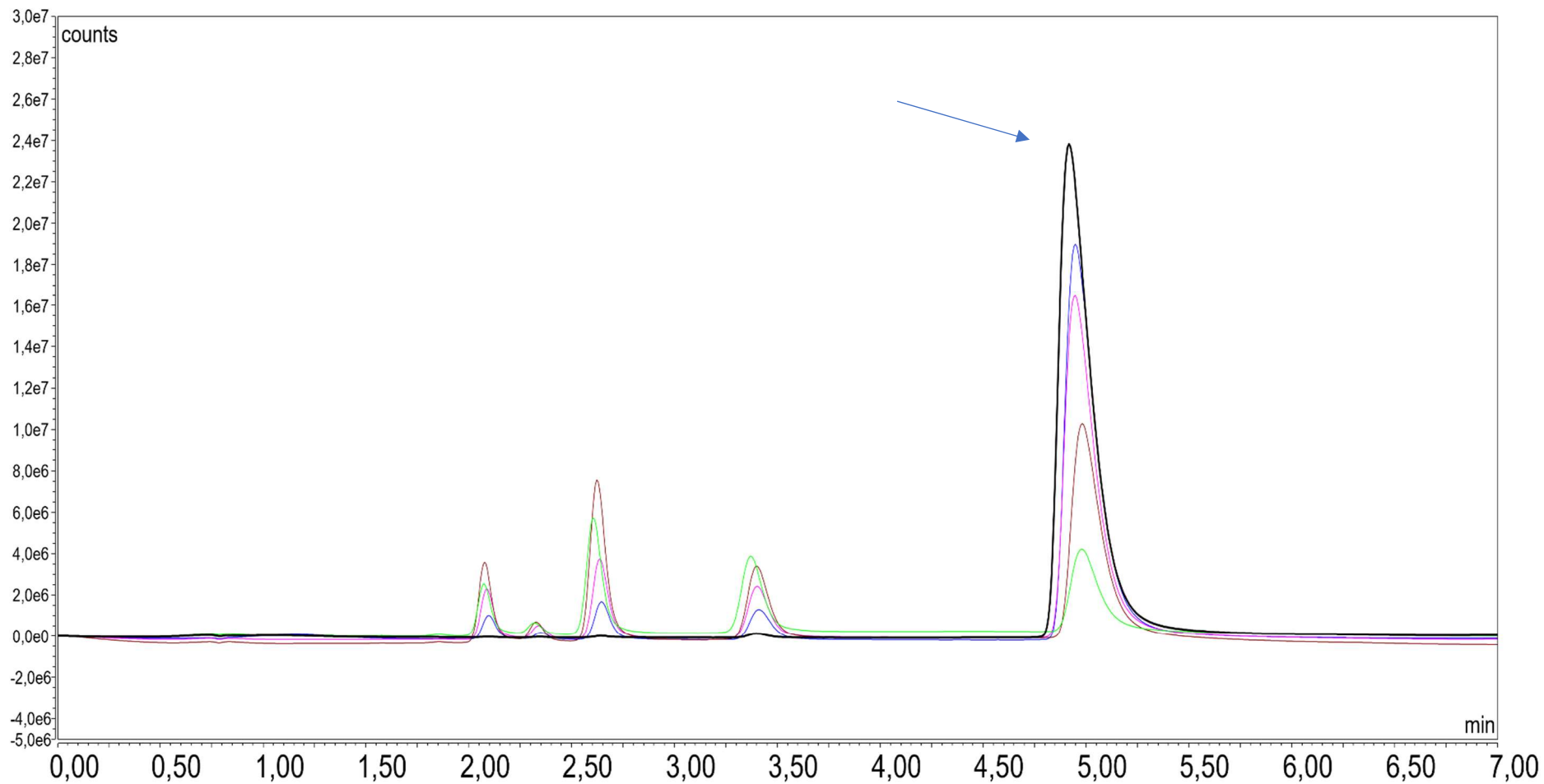
- Trouchon, T., & Lefebvre, S. (2016): A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use. *Open Journal of Veterinary Medicine*, **6** (2), 40-58. <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2016.62006> (staženo 20. 8. 2021).
- Tyczkowska, K., Hedeem, K. M., Aucoin, D. P., & Aronson, A. L. (1989): High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in canine serum and prostatic tissue. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **493** (2), 337-346. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)82739-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(00)82739-5) (staženo 8. 8. 2021).
- Usman, M. R., Prasasti, A., Islamiah, S., Firdaus, A. N., Marita, A. W., Fajriyah, S., Noviyanti, A. R., & Eddy, D. R. (2021): Degradation of Ciprofloxacin by Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles: Optimization of Conditions, Toxicity, and Degradation Pathway. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, **16** (4), 752-762. <https://doi.org/10.9767/bcrec.16.4.11355.752-762> (staženo 27. 3. 2022).
- Varma, K. S., Tayade, R. J., Shah, K. J., Joshi, P. A., Shukla, A. D., & Gandhi, V. G. (2020): Photocatalytic degradation of pharmaceutical and pesticide compounds (PPCs) using doped TiO₂ nanomaterials: A review. *Water-Energy Nexus*, **3**, 46–61. <https://doi.org/10.1016/j.wen.2020.03.008> (staženo 15. 6. 2021).
- Wang, J. C., & Lynch, A. S. (1993): Transcription and DNA supercoiling. *Current Opinion in Genetics & Development*, **3** (5), 764-768. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(05\)80096-6](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(05)80096-6) (staženo 5. 4. 2022).
- Wang, J., & Zhuan, R. (2020): Degradation of antibiotics by advanced oxidation processes: An overview. *Science of the Total Environment*, **701**, 135023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135023> (staženo 15. 6. 2021).
- ZAM (Zdravotnictví a medicína). (2020): Ciplox 250 a 500 a CIPLOX kapky příbalový leták. <https://zdravi.euro.cz/leky/ciplox-pribalovy-letak/> (staženo 20. 2. 2022).
- Zechiedrich, E. L., & Cozzarelli, N. R. (1995): Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, **9** (22), 2859-2869. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.9.22.2859> (staženo 5. 4. 2022).

7 Přílohy

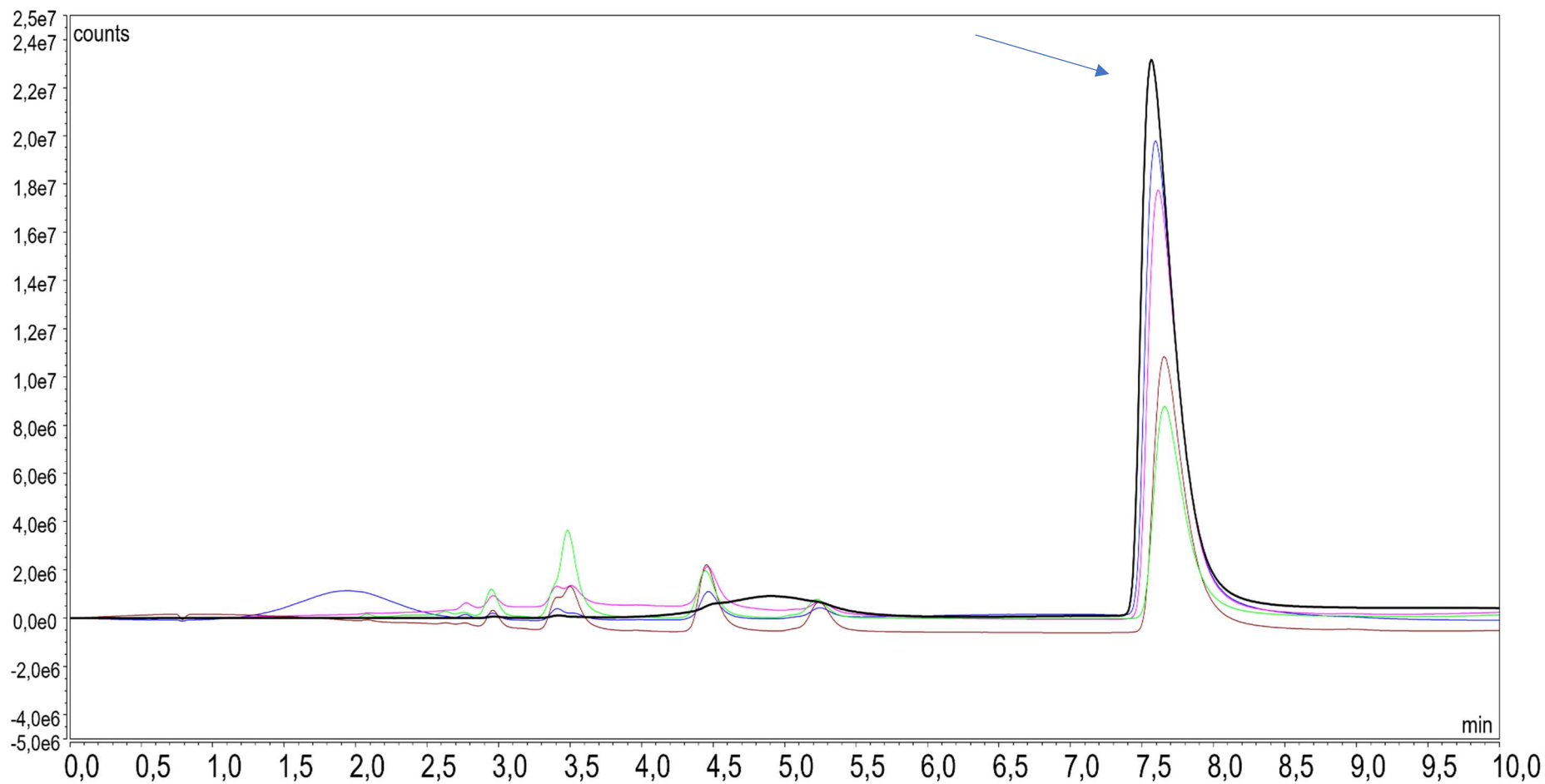
Příloha 1: HPLC chromatogram reakční směsi ciprofloxacinu (označen šipkou) ozářené na TiO₂ při pH = 7,05 (fluorescenční detektor). Časové rozmezí ozařování 0 – 30 minut: 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 7 min – růžová křivka, 15 min – hnědá křivka, 30 min – zelená křivka.



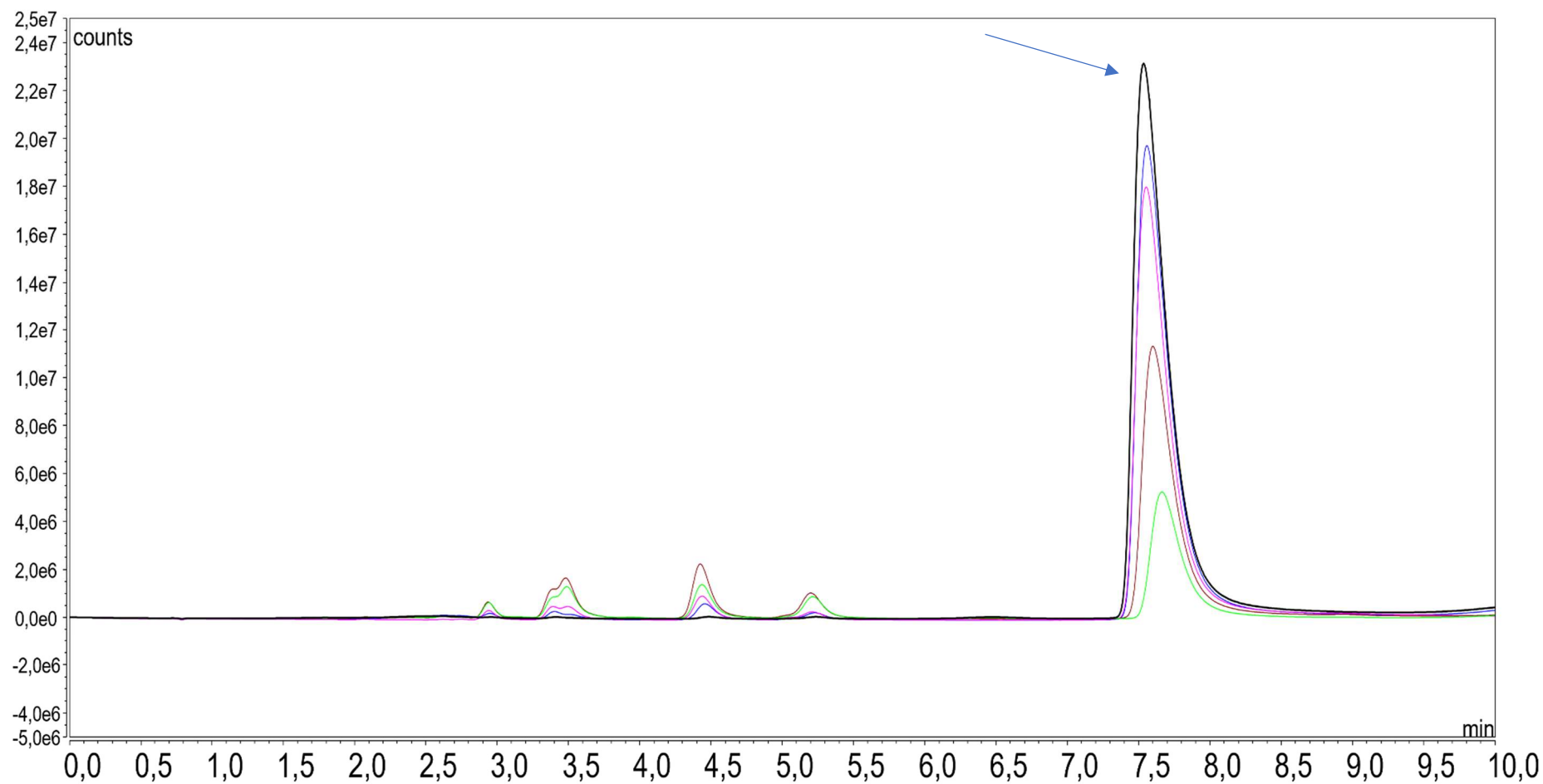
Příloha 2: HPLC chromatogram reakční směsi ciprofloxacinu (označen šipkou) ozářené na TiO₂ při pH = 8,80 (fluorescenční detektor). Časové rozmezí ozařování 0 – 30 minut: 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 7 min – růžová křivka, 15 min – hnědá křivka, 30 min – zelená křivka.



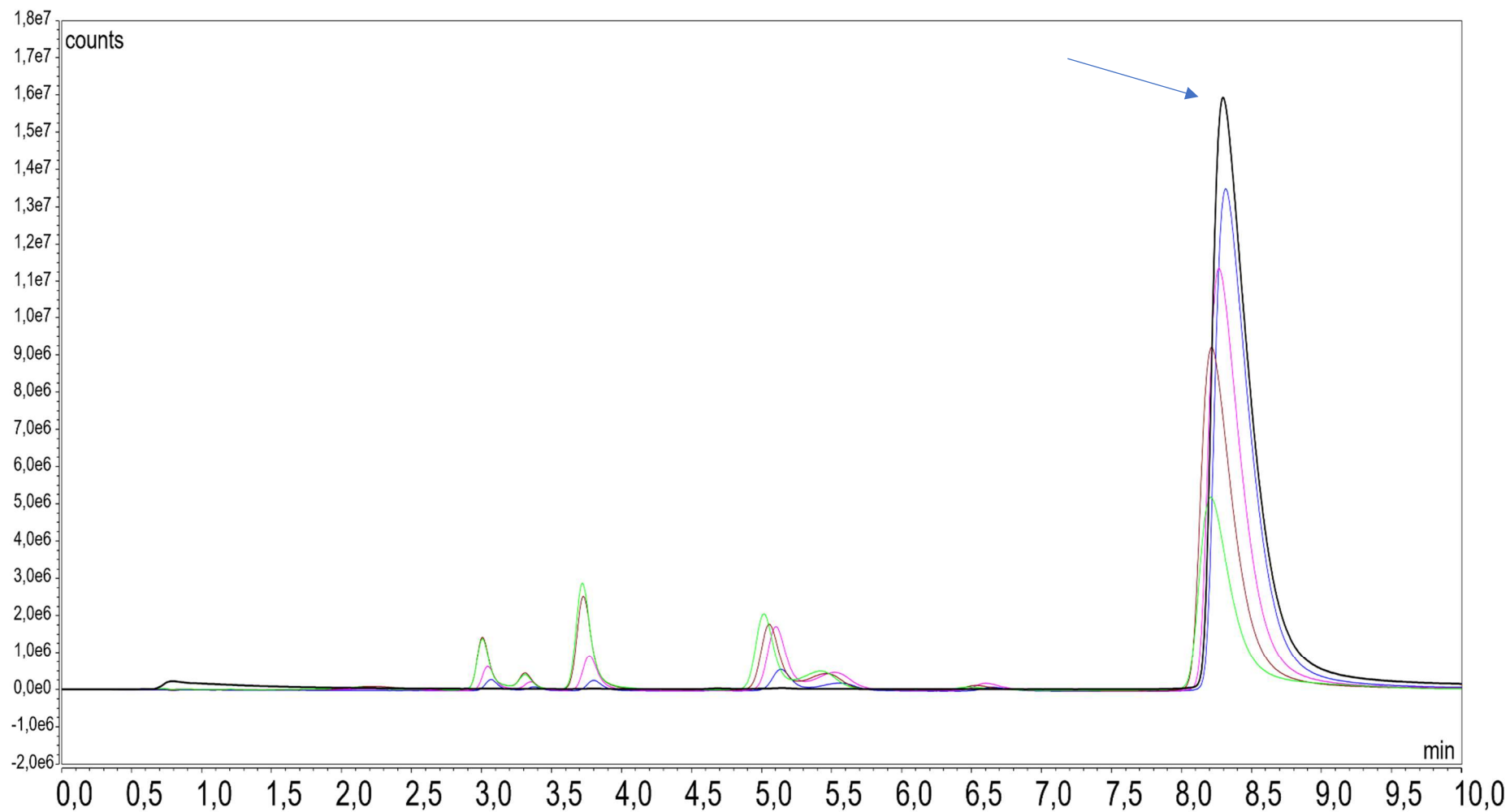
Příloha 3: HPLC chromatogram reakční směsi enrofloxacinu (označen šipkou) ozářené na TiO₂ při pH = 6,90 (fluorescenční detektor). Časové rozmezí ozařování 0 – 30 minut: 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 7 min – růžová křivka, 15 min – hnědá křivka, 30 min – zelená křivka.



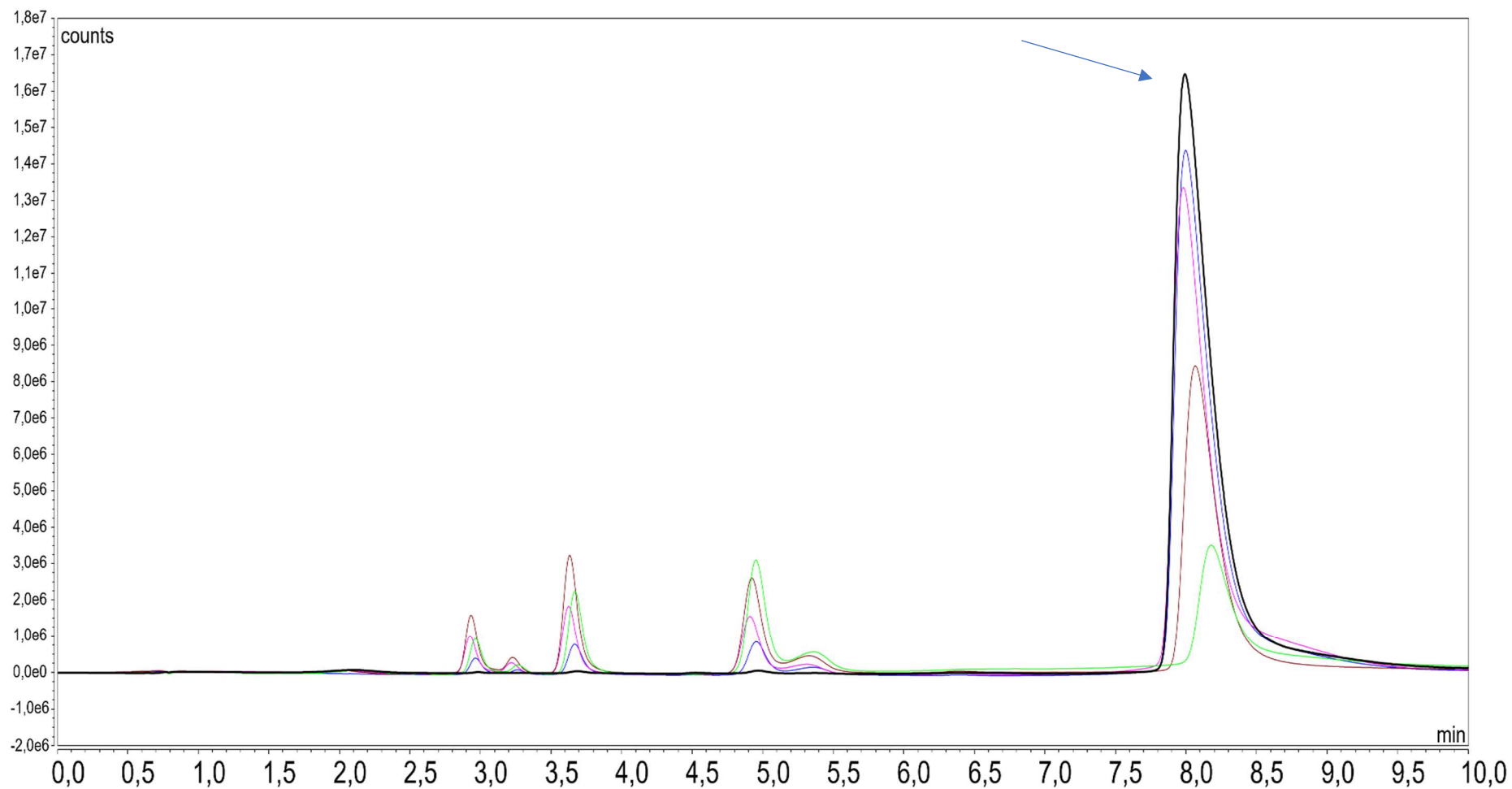
Příloha 4: HPLC chromatogram reakční směsi enrofloxacinu (označen šipkou) ozářené na TiO₂ při pH = 8,30 (fluorescenční detektor). Časové rozmezí ozařování 0 – 30 minut: 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 7 min – růžová křivka, 15 min – hnědá křivka, 30 min – zelená křivka.



Příloha 5: HPLC chromatogram reakční směsi norfloxacinu (označen šipkou) ozářené na TiO₂ při pH = 7,00 (fluorescenční detektor). Časové rozmezí ozařování 0 – 30 minut: 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 7 min – růžová křivka, 15 min – hnědá křivka, 30 min – zelená křivka.



Příloha 6: HPLC chromatogram reakční směsi norfloxacinu (označen šipkou) ozářené na TiO₂ při pH = 8,90 (fluorescenční detektor). Časové rozmezí ozařování 0 – 30 minut: 0 min – černá křivka, 3 min – modrá křivka, 7 min – růžová křivka, 15 min – hnědá křivka, 30 min – zelená křivka.



Příloha 7: Přehled fotoproduktů nalezených při ozařování ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu jak v homogenních reakčních směsích tak při ozařování na TiO₂.

Ciprofloxacin:

Ciprofloxacin – neutrální ESI +		Ciprofloxacin – zásadité ESI +	
TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 3 min	TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 2,5 min
1,9/312	2,0/312	1,9/312	1,9/312
2,0/300	2,0/300	2,2/330	2,2/330
2,2/330	2,2/330	2,5/288	2,5/288
2,5/288	2,4/288	3,6/346	3,6/346
3,6/346	3,5/346		
Ciprofloxacin – neutrální ESI -		Ciprofloxacin – zásadité ESI -	
TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 3 min	TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 2,5 min
1,8/360	1,7/360	1,8/360	1,7/360
1,9/328	1,9-2,5/328	1,9/328	1,9-2,5/328
1,9/374	2,0/374	1,9/374	2,0/374
2,5/286	2,5/286	2,5/286	2,5/286
		2,5/322	2,5/322
		3,2/304	3,1/304
		3,6/300	3,5/300
		3,6/344	3,5/344

Enrofloxacin:

Enrofloxacin – neutrální ESI +		Enrofloxacin – zásadité ESI +	
TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 5 min	TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 3 min
3,2/314	3,2/314	3,2/358	3,2/358
3,2/358	3,2/358	4,2/334	4,1/334
3,2/360	3,2/360	4,7/332	4,7/332
3,3/316	3,2/316	5,2/374	5,1-5,6/374
		6,6/376	6,5/376
Enrofloxacin – neutrální ESI -		Enrofloxacin – zásadité ESI -	
TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 5 min	TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 3 min
2,8/356	2,7/356	2,1/370	2,1/370
3,2/356	3,1/356	2,7/356	2,7/356
3,2/392	3,2/392	3,2/270	3,2/270
3,3/314	3,3/314	3,2/356	3,1/356
3,3/350	3,3/350	3,3/314	3,2/314
3,7/318	3,7/318	3,3/360	3,2/360
6,5/374	6,5/374	3,7/318	3,7/318
		4,1/378	4,1/378
		4,8/374	4,8/374
		6,5/374	6,5/374

Norfloxacin:

Norfloxacin – neutrální ESI +		Norfloxacin – zásadité ESI +	
TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 5 min	TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 4,5 min
2,8/300	2,7/300	2,6/288	2,6/288
3,0/274	3,0/274	2,7/300	2,7/300
3,0/318	2,9-3,1/318	3,0/274	3,0/274
5,3/334	5,1-5,7/334	3,0/318	3,0/318
		3,4/276	3,4/276
Norfloxacin – neutrální ESI -		Norfloxacin – zásadité ESI -	
TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 5 min	TiO₂ ozařování 30 min	Homogenní fáze ozařování 4,5 min
2,7/362	2,7/362	2,6/348	2,4/348
3,0/316	3,0/316	3,0/316	3,0/316
3,4/274	3,4/274		

Příloha 8: Hodnoty retenčních časů a hodnot m/z pro fotoproducty detekované v reakčních směsích jednotlivých antibiotik v neutrálním a zásaditém pH vzniklých při ozařování na TiO₂ (30 minut) a při ozařování v homogenní fázi.

Ciprofloxacin – ESI + :

Ciprofloxacin – neutrální ESI +		Ciprofloxacin – zásadité ESI +	
TiO₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 3 min	TiO₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 2,5 min
1,9/312	1,7/316	1,9/312	1,7/255
2,0/300	1,9/268	2,2/330	1,7/316
2,2/330	1,9/352	2,5/288	1,9/268
2,5/288	2,0/290	3,6/346	1,9/300
3,2/306	2,0/300		1,9/312
3,6/346	2,0/312		1,9/330
	2,0/330		2,0/290
	2,2/286		2,0/352
	2,2/330		2,2/286
	2,4/271		2,2/330
	2,4/288		2,2/352
	2,5/310		2,4/310
	3,5/328		2,5/225
	3,5/346		2,5/288
			3,6/328
			3,6/346
			3,6/368

Ciprofloxacin ESI - :

Ciprofloxacin – neutrální ESI -		Ciprofloxacin – zásadité ESI -	
TiO₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 3 min	TiO₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 2,5 min
1,8/360	1,7/360	1,8/360	1,7/315
1,9/328	1,9/364	1,9/374	1,8/350
1,9/374	1,9-2,5/328	2,0/328	1,8/360
2,2/328	2,0/298	2,2/284	1,9/366
2,5/286	2,0/374	2,2/328	1,9-2,6/328
3,2/259	2,2/284	2,5/286	2,0/374
3,2/304	2,2/320	2,5/289	2,2/283
	2,2/364	2,5/322	2,2/320
	2,2/391	3,2/304	2,2/364
	2,4/322	3,6/300	2,2/391
	2,5/242	3,6/344	2,4/349
	2,5/286		2,5/242
	2,5/290		2,5/286
	2,5/332		2,5/290
	2,8/285		2,5/322
	3,0/292		2,5/324
	3,5/300		3,1/292
	3,5/344		3,1/304
			3,5/300
			3,5/344
			3,6/380

Enrofloxacin – ESI + :

Enrofloxacin – neutrální ESI +		Enrofloxacin – zásadité ESI +	
TiO ₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 5 min	TiO ₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 3 min
2,9/328	1,7/356	3,2/358	2,1/372
3,2/314	1,8/372	4,2/334	2,2/330
3,2/358	1,8/388	4,7/332	2,2/344
3,2/360	2,1/372	4,8/358	2,3/282
3,3/316	2,2/330	5,2/374	2,3/326
4,1/334	2,2/344	6,6/376	2,4/356
4,7/332	2,3/282		2,7/296
4,7-6,7/316	2,3/326		2,7/340
4,8/358	2,7/296		2,7/358
4,8/376	2,7/340		2,8/318
6,5/376	2,7/358		3,0/328
	2,8/356		3,2/314
	2,9/318		3,2/316
	3,2/314		3,2/358
	3,2/316		3,4/328
	3,2/358		3,6/346
	3,2/360		4,1/334
	3,6/346		4,7/332
	5,0/334		5,1-5,6/374
	5,1/356		5,2/356
	5,1-6,4/374		6,4/328
			6,5/376

Enrofloxacin – ESI - :

Enrofloxacin – neutrální ESI -		Enrofloxacin – zásadité ESI -	
TiO ₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 5 min	TiO ₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 3 min
1,8/250	1,8/326	2,1/370	2,1/370
1,8/294	1,8/341	2,7/356	2,2/328
1,8/360	1,8/370	3,2/270	2,2/342
1,9/332	1,8/386	3,2/304	2,2/364
1,9/338	1,9/292	3,2/356	2,2/378
2,1/370	2,1/370	3,3/314	2,2/388
2,8/356	2,2/328	3,3/360	2,4/322
3,1/304	2,2/342	3,7/318	2,5/286
3,2/356	2,2/388	4,1/368	2,7/356
3,2/381	2,3/356	4,1/378	2,7/392
3,2/392	2,4/372	4,8/374	3,0/292
3,3/314	2,7/356	6,5/374	3,0/332
3,3/350	2,8/392		3,1/314
3,7/318	3,0/291		3,1/356
4,1/368	3,1/292		3,1/392
4,1/378	3,1/356		3,2/270
4,8/374	3,2/377		3,2/314
6,5/374	3,2/392		3,2/350
	3,3/312		3,2/360
	3,3/314		3,4/326
	3,3/350		3,6/344
	3,3/360		3,7/318
	3,6/344		4,1/378
	3,7/318		4,2/356
	5,1/328		4,8/374
	5,1/372		5,1/372
	5,7/314		5,2/328
	6,5/374		6,3/326
			6,5/374

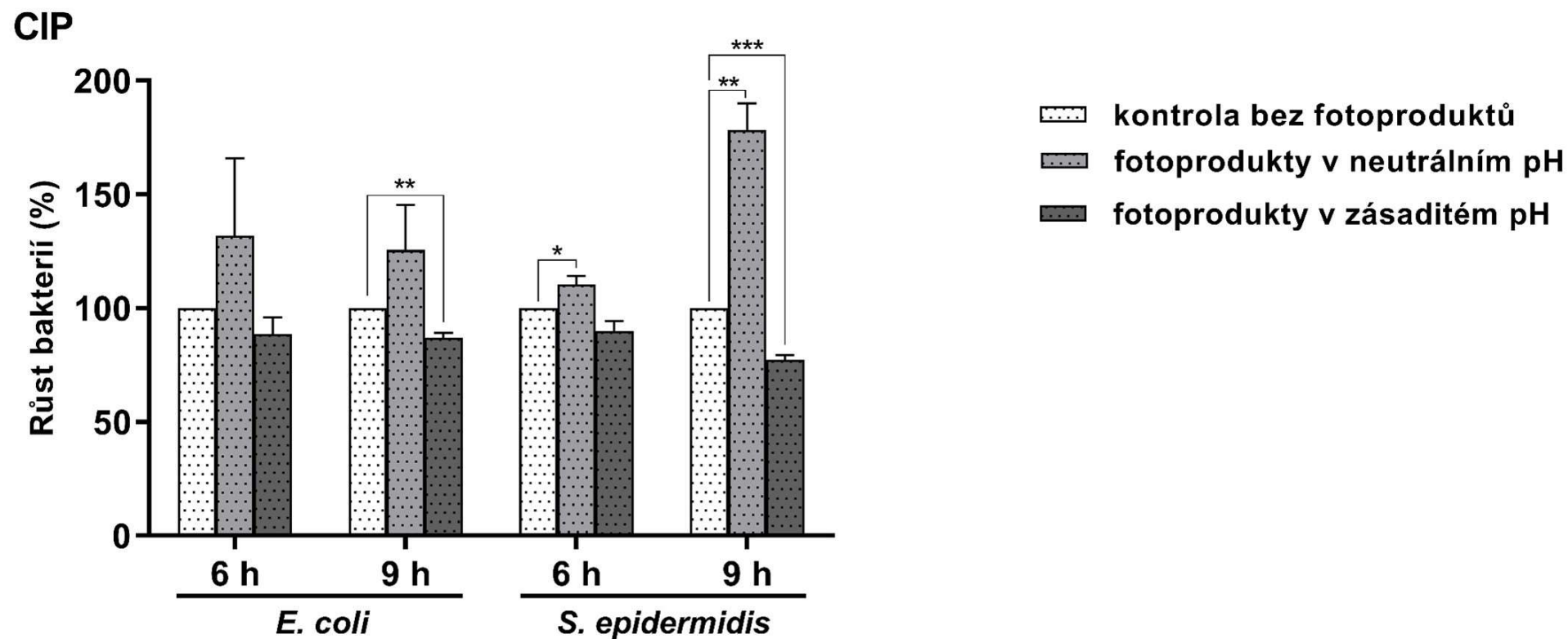
Norfloxacin – ESI + :

Norfloxacin – neutrální ESI +		Norfloxacin – zásadité ESI +	
TiO ₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 5 min	TiO ₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 4,5 min
2,8/300	1,2/316	2,6/288	2,1/354
3,0/274	1,9/317	2,7/300	2,4/304
3,0/318	2,0/354	3,0/274	2,6/288
3,4/276	2,4/304	3,0/318	2,7/300
4,6/294	2,6/287	3,4/276	3,0/274
5,3/334	2,7/256	4,0-5,7/332	3,0/319, 318
	2,7/289	4,5/294	3,0/340
	2,7/300	5,3/332	3,3/288
	2,7/318		3,4/276
	2,9/277		5,2/316
	2,9/288		5,2/334
	3,0/121		
	3,0/134		
	3,0/138		
	3,0/171		
	3,0/230		
	3,0/274		
	3,0/287		
	3,0/318		
	3,0/339		
	3,3/276		
	3,3/287		
	5,1-5,7/334		
	5,3/315		

Norfloxacin – ESI - :

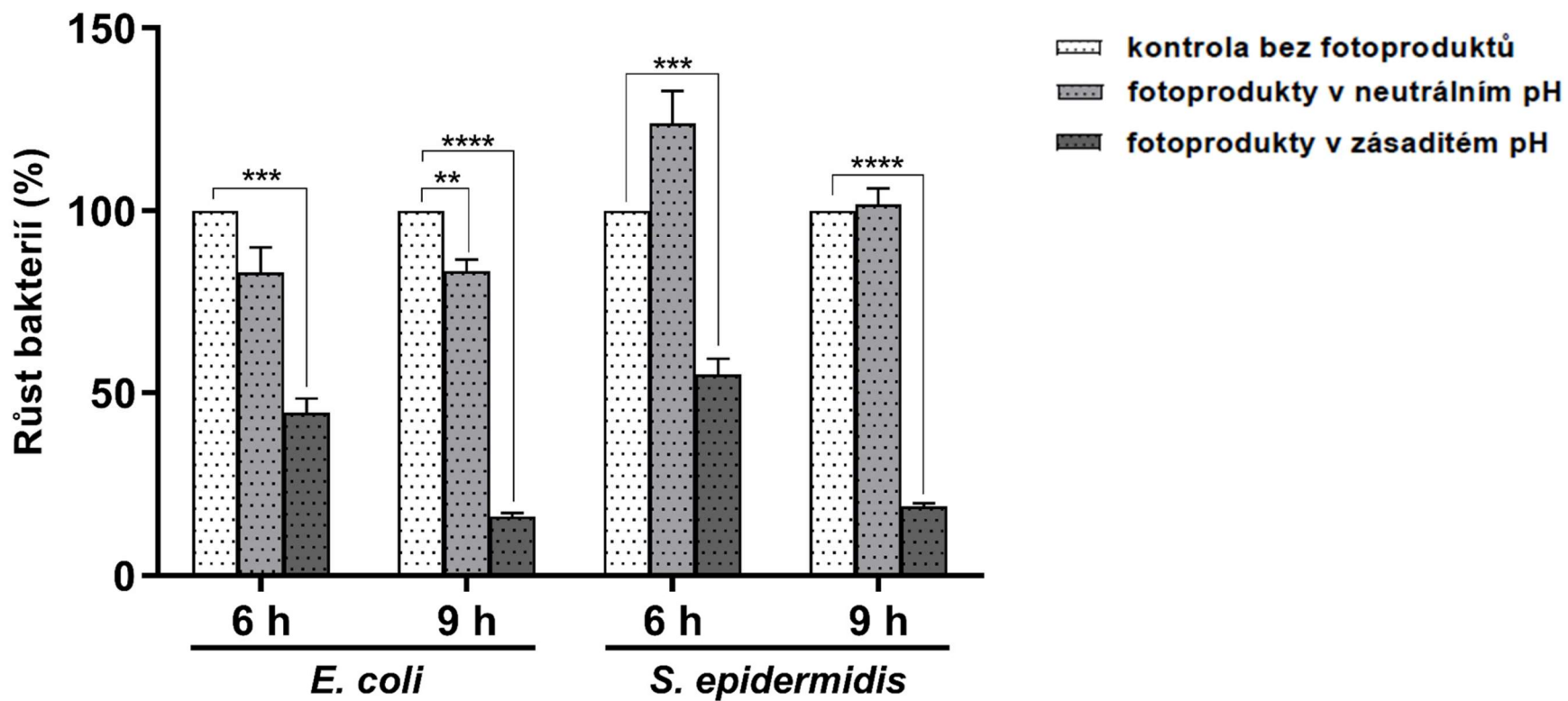
Norfloxacin – neutrální ESI -		Norfloxacin – zásadité ESI -	
TiO ₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 5 min	TiO ₂ ozařování 30 minut	Homogenní fáze ozařování 4,5 min
2,7/348	1,9/362	2,6/348	2,4/348
2,7/362	2,1/338	2,7/316	3,0/161
2,8/317	2,4/302	2,7/362	3,0/316
3,0/316	2,4/348	3,0/316	3,4/274
3,0/352	2,7/316	3,0/352	5,2/158
3,4/274	2,7/362	3,4/275	5,2/332
3,4/320	2,8/350	3,4/320	
4,6/292	3,0/243	4,5/292	
	3,0/271		
	3,0/316		
	3,0/351		
	3,0/362		
	3,0/379		
	3,3/286		
	3,4/230		
	3,4/274		
	3,4/310		
	3,4/316		
	3,4/320		
	3,4/337		
	4,0/377		
	5,2/368		
	5,3/288		

Příloha 9: Antibakteriální aktivita fotoproduktů ciprofloxacinu proti *E. coli* a *S. epidermidis* po 6 a 9 hodinách inkubace. Hodnoty pH: ciprofloxacin neutrální = 7,05; ciprofloxacin zásaditý = 8,80. Počet hvězdiček odráží p-hodnotu: * $p \leq 0,5$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.



Příloha 10: Antibakteriální aktivita fotoproduktů enrofloxacinu proti *E. coli* a *S. epidermidis* po 6 a 9 hodinách inkubace. Hodnoty pH: enrofloxacin neutrální = 6,90; enrofloxacin zásaditý = 8,30. Počet hvězdiček odráží p-hodnotu: * $p \leq 0,5$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

ENRO



Příloha 11: Antibakteriální aktivita fotoproduktů norfloxacinu proti *E. coli* a *S. epidermidis* po 6 a 9 hodinách inkubace. Hodnoty pH: norfloxacin neutrální = 7,00; norfloxacin zásaditý = 8,90. Počet hvězdiček odráží p-hodnotu: * $p \leq 0,5$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

NOR

