

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDĚCKÁ FAKULTA
LABORATOŘ RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ



VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PŘI PRŮKAZU
A STANOVENÍ ANTIBIOTIKA OFLOXACINU
V POVRCHOVÝCH A ODPADNÍCH VODÁCH V OLOMOUCI

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce:

Doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Andrea Kováčová

OLOMOUC 2017

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Andrea Kováčová
Název práce	Využití hmotnostní spektrometrie při průkazu a stanovení antibiotika ofloxacinu v povrchových a odpadních vodách v Olomouci
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D., Katedra analytické chemie – UP v Olomouci
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>Antibiotikum je v širším slova smyslu terapeutická látka, která inhibuje nebo znemožňuje růst organismů, jako jsou bakterie, houby nebo prvoci. Práce se zaměřuje na detekci a analýzu antibiotika ofloxacinu ve vzorcích životního prostředí. Cílem práce bylo nalezení vhodných parametrů HPLC separace a nalezení vhodných parametrů ionizace a hmotnostně spektrometrické detekce analytů. Dalším cílem byla příprava modelových a reálných vzorků pro HPLC/MS analýzu a následné stanovení validačních parametrů metody. Vzorky o objemu asi 0,5l vody byly odebrány z řeky Moravy (v Chomoutově, za kolejemi Bedřicha Václavka a za čističkou odpadních vod v Olomouci) a z odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci. Dále byl odebrán vzorek dešťové vody (Chomoutov) a sněhu (Břidličná) sloužící jako negativní kontrola. Pro extrakci analytu z vodné matrice byla použita extrakce na pevné fázi. Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií využívající ionizace elektrosprejem v pozitivním módu byla použita k separaci a identifikaci cílové sloučeniny. Pro validaci analytické metody byly vyhodnoceny jednotlivé validační parametry, jako je přesnost metody - opakovatelnost, mezilehlá preciznost; správnost metody;</p>

linearita; selektivita; mez detekce a mez stanovitelnosti. Ve vzorcích odebraných z řeky Moravy byla stanovena koncentrace ofloxacinu v rozmezí 0,0078 – 0,0554 ng/ml. Ve vzorcích odebraných z odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci byla stanovena koncentrace ofloxacinu v rozmezí 0,15 – 8,37 ng/ml. Ofloxacin detekovaný v takto nízkých koncentracích není toxický ani nijak škodlivý pro vodní a suchozemské organismy.

Klíčová slova	Antibiotika, ofloxacin, životní prostředí, voda, rezistence, SPE, UHPLC-MS
Počet stran	63
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Bc. Andrea Kováčová
Title of thesis	Use of mass spectrometry for identification and determination of ofloxacin in surface and waste waters in Olomouc
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D., Department of Analytical Chemistry – UP Olomouc
The year of presentation	2017
Abstract	<p>An antibiotic is broadly a therapeutic agent that inhibits or prevents the growth of organisms such as bacteria, fungi or protozoa. The work focuses on the detection and analysis of the antibiotic ofloxacin in environmental samples. The aim of this study was to find suitable parameters of HPLC separation and to find suitable parameters of ionization and mass spectrometric detection of the analyte. Another objective was to prepare model and real samples for HPLC/MS analysis and to subsequently determine the validation parameters of the method. Samples of about 0.5 l of water were taken from the Morava river (in Chomoutov, behind Bedřich Václavka's Dormitory and the wastewater treatment plant in Olomouc) and from the waste water of the University Hospital in Olomouc. In addition, a sample of rainwater (Chomoutov) and snow (Břidličná) was taken as a negative control. The solid phased extraction was used to extract the analyte from the aqueous matrix. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry using electrospray ionization in positive mode was used to separate and identify the target compound. To validate the</p>

analytical method, individual validation parameters were evaluated, such as the accuracy of the method - repeatability, intermediate precision; the correctness of the method; linearity; selectivity; detection limit and determination limit. The concentration of ofloxacin was detected in the range of 0.0078 – 0.0554 ng /ml in samples taken from the Morava River. The concentration of ofloxacin was detected in the range of 0.15 - 8.37 ng /ml in samples taken from wastewater of the University Hospital in Olomouc. Ofloxacin detected at such low concentrations is not toxic or harmful to aquatic and terrestrial organisms.

Keywords	Antibiotic, Ofloxacin, environment, water, resistance, SPE, UHPLC-MS
Number of pages	63
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem zadanou diplomovou práci zpracovala samostatně a citovala jsem všechny použité zdroje.

V Olomouci dne 30. 4. 2017

.....
podpis autora textu

Děkuji panu doc. RNDr. Petrovi Fryčákovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu, trpělivost a pomoc při vypracování diplomové práce, rodině a přátelům za podporu. Tato práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2016_016, IGA_PrF_2017_020).

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2. 1. Výskyt antibiotik v životním prostředí.....	8
2. 2. Zdroje antibiotik v životním prostředí	9
2. 2. 1. Povrchové vody	9
2. 2. 2. Odpadní vody a kanalizace.....	11
2. 2. 3. Čistírenské kaly a sedimenty	12
2. 3. Eliminace antibiotik ze životního prostředí	13
2. 4. Využití antibiotik.....	14
2. 6. Rezistence	15
2. 6. 1. Rezistence ve vodním prostředí.....	17
2. 6. 2. Role nemocnic	19
2. 6. 3. Odpadní voda, obecní kanalizace a čistírny odpadních vod.....	20
2. 6. 4. Povrchová voda	20
2. 6. 5. Podzemní vody	21
2. 6. 6. Pitná voda	22
2. 6. 7. Sedimenty	22
2. 7. Hlavní metody pro stanovení antibiotik v životním prostředí	23
2. 7. 1. Extrakce na pevné fázi, extrakce kapalina-kapalina a mikroextrakce pevnou fází	23
2. 7. 2. Plynová a kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	24
2. 7. 3. Vysoce účinná kapalinová chromatografie.....	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3. 1. Materiál, příprava roztoků a vzorků.....	26
3. 2. Analýza UHPLC-MS a optimalizace metody.....	28

3. 3. Validace metody a validační parametry	31
3. 3. 1. Přesnost metody.....	31
3. 3. 2. Správnost metody	34
3. 3. 3. Linearita.....	36
3. 3. 4. Selektivita metody	37
3. 3. 5. Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)	39
3. 4. Stanovení ofloxacinu v reálných vzorcích	40
4. DISKUZE	51
5. ZÁVĚR	53
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:	54

Seznam zkratk:

ARG	antibiotická rezistence
BCF	bioconcentration factor (biokoncentrační faktor - poměr koncentrace chemické látky v biotě vůči koncentraci v zevním prostředí)
ČOV	čistírny odpadních vod
DDD	defined daily dose – statistická hodnota spotřeby léků definována Světovou zdravotnickou organizací (WHO)
EC ₅₀	half maximal effective concentration (koncentrace rozpouštědel, která účinně inhibuje růst bakterie o 50%)
GC-MS	gas chromatography- mass spektrometry (plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií)
HPLC	high-performance liquid chromatography (vysoce účinná kapalinová chromatografie)
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration (inhibiční koncentrace)
ISO	International Organization for Standardization (mezinárodní organizace zabývající se tvorbou norem)
JIP	jednotky intenzivní péče
LC ₅₀	lethal concentration 50 (smrtná koncentrace 50 – koncentrace škodlivé látky, kdy mortalita testovaných jedinců je rovna 50%)
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spektrometry (kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií)
LLE	liquid-liquid extraction (extrakce kapalina-kapalina)
LOD	limit of detection (mez detekce)
LOQ	limit of quatification (mez stanovitelnosti)
LSSTP	the laboratory scale sewage treatment plant – laboratorní zařízení na čištění odpadních vod
MIC ₅₀	minimum inhibitory concentration (minimální inhibiční koncentrace)
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
Ofloxacin-D3	deuterovaný standard antibiotika ofloxacinu

PEC/PNEC	predicted environmental concentration/predicted no-effect concentration (pravděpodobnost, s jakou se při definované expozici určitou látkou projeví její toxicita)
SPE	solid phase extraction (extrakce na pevné fázi)
SPME	solid phase microextraction (mikroextrakce na pevné fázi)
UHPLC	Ultra-High Performance Chromatography (ultra účinná kapalinová chromatografie)
VRE	vankomycin-rezistentní enterokoky

1. ÚVOD

Antibiotikum v širším slova smyslu je terapeutická látka, která inhibuje nebo znemožňuje růst organismů, jako jsou bakterie, houby nebo prvoci. Jiné často využívané termíny bývají chemoterapeutika nebo antimikrobiální látky, nicméně tyto termíny nejsou synonyma. Například antimikrobiální látky mohou být účinné i proti virům. Termín „chemoterapeutické“ může také odkazovat na antibiotika („antibakteriální chemoterapie“). Termín antibiotikum původně odkazoval na všechny zástupce s biologickou aktivitou proti živým organismům; nicméně „antibiotikum“ teď odkazuje na látky s antibakteriální, anti-houbovou nebo anti-parazitární aktivitou.

V současné době existuje asi 250 různých chemických entit registrovaných pro použití v medicíně a veterinární medicíně jako antibiotika (Kümmerer and Henninger 2003). První antibiotika byla přírodního původu, např. peniciliny produkované houbami rodu *Penicillium* nebo streptomycin z bakterií rodu *Streptomyces*. Mnoho antibiotik jsou relativně malé molekuly s molekulovou hmotností nižší než 1000Da. Definice, že antibiotikum je sloučenina produkovaná mikroorganismem, která inhibuje růst jiných mikroorganismů, se rozšířila o syntetické a semi-syntetické produkty. Antibiotika, která nejsou toxická pro hostitele, se používají jako chemoterapeutická činidla při léčení infekčních onemocnění u člověka, zvířat a rostlin (Kümmerer 2009).

Antibiotika mohou být seskupena podle jejich chemické struktury nebo podle mechanismu účinku. Je to různorodá skupina chemických látek, které mohou být rozděleny do různých podskupin, jako jsou beta-laktamy, chinolony, tetracykliny, makrolidy, sulfonamidy a další (Kümmerer 2009).

Práce se zaměřuje na detekci a analýzu antibiotika ofloxacinu ve vzorcích životního prostředí. Ofloxacin je chinolin/fluorochinolinové antibiotikum. Je to širokospektré baktericidní antibiotikum, které blokuje replikaci bakteriální DNA a je účinné proti gram-pozitivní i gram-negativním bakteriím.

Cílem práce bylo nalezení vhodných parametrů HPLC separace pro standardy analytů a nalezení vhodných parametrů ionizace a hmotnostně spektrometrické detekce analytů. Dalším cílem byla příprava modelových a reálných vzorků pro HPLC/MS analýzu a následné stanovení validačních parametrů metody.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2. 1. Výskyt antibiotik v životním prostředí

Antibiotika mohou být více či méně metabolizována lidmi a zvířaty. Po podání, antibiotika pro lidské použití nebo jejich metabolity se vylučují do odpadních vod a mohou se tak dostat se do čističky odpadních vod (ČOV). Nemetabolizovaná frakce se vylučuje jako stále aktivní sloučenina, stejně jako mohou být farmakologicky aktivní i metabolity antibiotik. Při pohledu na všechny sloučeniny, asi 70% spotřebovaného množství antibiotik v Německu je vylučováno v nezměněné formě (Kümmerer and Henninger 2003). Antibiotika jsou jen částečně eliminována v čistírnách odpadních vod. Pokud nejsou odstraněna v průběhu procesu čištění, mohou skončit v životním prostředí a to především ve vodách. Zbytková množství mohou dosáhnout povrchových a podzemních vod nebo sedimentů. Účinné látky po vypouštění s kejdou mohou být smyty z orníc po dešti. Kromě toho přímé vypouštění, a to zejména při zpracování drůbeže, zpracování masa a akvakultuře, stejně jako z domácích zvířat (např. akvária), může přispět ke zvýšení celkové koncentrace antibiotik v odpadních a povrchových vodách (Kümmerer 2009).

V současné době je poměrně rozsáhlý výzkum přítomnosti antibiotik v životním prostředí. Stejně jako u jiných léčiv bylo zjištěno, že koncentrace antibiotik měřených v různých zemích jsou ve stejném rozmezí koncentrací v různých složkách, jako jsou odpadní a povrchové vody (Batt and Aga 2005; Botitsi et al. 2007; Hernández et al. 2007; Chang et al. 2008; Peng et al. 2008; Martins et al. 2008). Po hnojení byly ztráty sulfonamidových antibiotik z travních porostů do potoka silně ovlivněny klimatickými podmínkami (Stoob et al. 2007). Ty sloučeniny, které byly analyzovány, pochází z různých důležitých tříd antibiotik. Patří mezi ně především makrolidy (např. klaritromycin, erythromycin, roxithromycin), aminoglykosidy (která zahrnují například amikacin, gentamycin, kanamycin, neomycin, netilmycin, streptomycin, tobramycin, a z nichž pouze gentamicin byl vyšetřován), tetracykliny (tetracyklin, chlortetracyklin, oxytetracyklin, demecloxyklin (neanalyzován), doxycyklin), sulfonamidy (sulfadimethoxin (neanalyzován), sulfanilamidy (jen málo prozkoumány), sulfamethazol, sulfasalazin) a chinolony (1. generace: kyseliny nalidixová; 2. generace: např. levofloxacin, lomefloxacin (neanalyzován), tosufloxacin (neanalyzován); 3. generace: ciprofloxacin, ofloxacin, lomefloxacin; 4. generace (neanalyzována): clinafloxacin, gemifloxacin, moxifloxacin, sitafloxacin). V odtocích z nemocnic byly nalezeny chinolony

(ciprofloxacin byl nejčastěji analyzován) a jiné léčiva (Lindberg et al. 2004; Turiel et al. 2005).

Výskyt beta-laktamů (včetně penicilinů, cefalosporinů karbapenemů, monobaktamů a inhibitorů β -laktamázy) odpovídá největšímu podílu spotřeby antibiotik (Christian et al. 2003). Není jasné, zda nejsou přítomny ve vodním prostředí kvůli možnému štěpení β -laktamového kruhu, zda je tento nález jen kvůli tomu, že nebyly analyzovány, nebo zda je to v důsledku možných analytických nedostatků a potíží. Koncentrace nalezených β -laktamů jsou nízké ve srovnání s rozsáhlým využíváním β -laktamů (některé se našly v koncentraci $\mu\text{g/l}$ nebo méně místo očekávaných 20 až 30 $\mu\text{g/l}$). Antibiotika byla také vzácně nalezena v pitné vodě (Ye et al. 2007).

2. 2. Zdroje antibiotik v životním prostředí

Otázka přírodního pozadí koncentrace antibiotik je důležitá pro stanovení rizika v důsledku používání antibiotik. Do přirozených zdrojů antibiotik můžeme zahrnout např. půdní bakterie a do antropogenních zdrojů (související s lidskou činností) zahrnujeme humánní a veterinární medicínu. Několik antibiotik, jako jsou některé β -laktamy, streptomyciny, aminoglykosidy a další jsou produkovány půdními bakteriemi. Do skupiny aktinomycet zahrnujeme mnoho půdních bakterií, jako jsou Streptomycety. Streptomycety produkují antibiotika. Bakteriální hustota je mnohem nižší ve vodné fázi ve srovnání s čistírenskými kaly nebo půdami vzhledem k očekávanému měření koncentrace antibiotik přírodního původu. Lze očekávat, že tyto sedimenty se podobají půdám, protože jsou jako pevné médium s aerobními a anaerobními kompartmenty. V půdách i sedimentech jsou bakterie méně mobilní než ve volné vodné fázi a bakteriální hustota je vyšší. Dosud se neví o žádné zprávě, že by se produkovaly antibiotika v kalech nebo ve vodním prostředí (Kümmerer 2009).

2. 2. 1. Povrchové vody

Látky, které nejsou vůbec nebo jen částečně eliminovány v čistírnách odpadních vod mohou dosáhnout povrchových vod, kde mohou ovlivnit organismy různých trofických úrovní. V modelovém vodním systému s použitím syntetické čerstvé vody, byly nitrifikační bakterie významně ovlivněny antibiotiky akvakultury. K narušení procesu nitrifikace již došlo v koncentracích, které by mohly být nalezeny v rybních léčebných nádržích a sedimentech. Výsledky toxických testů s bakteriemi ukazují, že nelze vyloučit nežádoucí toxické účinky na přírodních bakteriálních společenstvech (Kümmerer 2009).

Citlivost řas vůči antibiotikům se velmi liší. V testu toxicity řas *Selenastrum capricornutum* bylo zjištěno, že jsou o dva až tři řády méně citlivé vůči většině antibiotik než řasa *Microcystis aeruginosa*. Růst *Microcystis aeruginosa* byl inhibován při koncentraci nižší než 0,1 mg/l (Halling-Sørensen 2000). Modro-zelené řasy (cyanobakterie) jsou citlivé na mnoho antibiotik, například amoxicilin, benzylpenicillin, sarafloxacin, spiramycin, tetracyklin a tiamulin (Boxal et al. 2003). Potenciální ekotoxikologický účinek antibakteriální látky metronidazolu na *Chlorella sp.* a *Selenastrum capricornutum* nastínili při zkoušce akutní toxicity Lanzky a Halling- Sørensen (1997). Jejich výsledky ukázaly, že nelze vyloučit nepříznivé účinky antibiotik na řasy. Jelikož řasy jsou základem potravinového řetězce, může pokles jejich populace narušit rovnováhu ve vodním systému (Kümmerer 2009).

Doba expozice antibiotik v prostředí může mít nepříznivé účinky na reprodukci v raných fázích života různých organismů. To může mít dramatický vliv na jejich populaci. Antibiotika významně ovlivňují líhnutí cyst *Artemia sp.* a způsobují vysokou mortalitu nauplií (larvální stádia), což má toxický vliv na reprodukci *Daphnia magna* (Macri et al. 1988; Migliore et al. 1993; Wollenberger et al. 2000). U antibiotika flumechinu bylo prokázáno, že schopnost měnit pigmentaci u nauplií *Artemia salina* má za následek poškození zdraví u těchto jedinců. To podtrhuje toxický potenciál antimikrobiálních činidel (Brambilla et al. 1994). LC₅₀ (lethal concentration 50) hodnoty pod 1 mg/l pro antibakteriální činidlo furazolidon prokázaly toxicitu na larvách komára pisklavého, *Daphnia magna* a *Artemia salina* (Macri et al. 1988). Na základě těchto výsledků autoři nastínili možnost poškození přírodní rovnováhy od nižších organismů, které tvoří potravu pro další vodní živočichy a proto jejich vymizení má vliv na další organismy.

Není pravděpodobné, že by antimikrobiální látky měly negativní vliv na ryby. Ve studiích byly účinky nalezeny jen ve vysokých, v přírodě nereálných, koncentracích nebo nebyly nalezeny žádné toxické účinky. Toxické zkoušky s různými druhy ryb (*Acartia tonsa*, *Brachydanio rerio*, *Leupp totes reticulatus*, *Salmo gairdneri*, *Salvelinus namayeuish*) nevykazovaly žádnou antibiotickou toxicitu proti testovaným druhům (Lanzky and Halling-Sørensen 1997). Antimikrobiální aplikace v akvakultuře způsobila kosterní deformaci. Nicméně látka byla aplikována v koncentracích vyšších, než ve kterých by se běžně vyskytovala v životním prostředí (Lunestad 1992).

Kim et al. (2007) zkoumali sulfamathoxazol, sulfachlorpyridazine, sulfathiazol, sulfamethazine, sulfadimethoxin a trimethoprim na akutní toxicitu pro vodní prostředí, ve kterém žijí mořské bakterie (*Vibrio fischeri*), sladkovodní bezobratlí (*Daphnia magna*) a

japonské ryby (*Oryzias latipes*). Park a Choi (2008) hodnotili běžně používané antibiotika zahrnující sulfonamidy, tetracykliny, aminoglykosidy, fluorochinoliny a β -laktamy na akutní a chronickou vodní toxicitu za použití standardních testovacích organismů jako je například *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna*, *Moina macrocopa* a *Oryzias latipes*. Mezi antibiotiky testovanými na akutní toxicitu byl nejtoxičtější neomycin, následuje trimethoprim, sulfamethoxazol a enrofloxacin. Sulfamethazin, oxytetracyklin, chlortetracyklin, sulfadimethoxin a sulfathiazol byly středně toxické, zatímco ampicilin a amoxicillin byly pro zkušební organismy nejméně toxické. Nebyla zjištěna žádná citlivost mezi zkušebními organismy a mezi různými skupinami antibiotik. Třída β -laktamů byla nejméně toxická. V testu chronické toxicity neomycin ovlivnil reprodukci a přežití dospělců *D. magna* a *M. macrocopa* (Park and Choi 2008).

Ciprofloxacin byl účinný proti *Vibrio fisheri* při vysoké koncentraci (5 mg/l) (Hernando et al. 2007). Mikrotesty s *V. fisheri* ukázaly, že tyto studované sloučeniny nejsou akutně toxické pro bakterie. Testy toxicity s bakterií ukázaly, že chronická expozice vůči antibiotikům je významnější než akutní. V testu inhibice růstu řas autoři zjistili, že levofloxacin a klaritromycin jsou oba toxické pro mikroskopické řasy. Fytotoxicita klarithromycinu byla asi 100x vyšší než levofloxacinu (EC_{50} - half maximal effective concentration). V reprodukčním testu s *Daphnia* levofloxacin a klarithromycin ukázaly chronickou toxicitu proti korýšům. Na základě poměru PEC/PNEC (pravděpodobnost, s jakou se při definované expozici určitou látkou projeví její toxicita) autoři považovali riziko způsobené přítomností látky v životním prostředí u levofloxacinu nízké avšak u klarithromycinu vyšší. Toto naznačuje, že klarithromycin může mít určitý vliv na organismy ve vodním prostředí (mohou se dostat do těl živočichů ovlivnit jejich chování a narušit rovnováhu ekosystému), (Kümmerer 2009).

2. 2. 2. Odpadní vody a kanalizace

Antibiotika mají potenciál ovlivnit mikrobiální komunity v kanalizačních systémech. Inhibice bakterií v odpadních vodách může vážně ovlivnit degradaci organické hmoty. Proto účinky antibakteriálních látek na mikrobiální populaci jsou předmětem velkého zájmu. Snížení počtu bakterií spolu se změnami v mikrobiální populaci byly pozorovány na modelu čištění kanalizace, kdy byly přidány různé běžné antibiotika v koncentracích, které se mohou vyskytnout v nemocničních odpadních vodách (Kümmerer 2009).

Nitrifikace je důležitým krokem při čištění odpadních vod, což eliminuje toxický amoniak. Druhý stupeň nitrifikace, tj. oxidace dusitanu na dusičnan je zvláště citlivý. Inhibice

tohoto kroku za nekontrolovatelných podmínek může vést k hromadění toxických dusitanů v odpadních vodách. Několik antibiotik ukázalo nízkou toxicitu ve vztahu k nitrifikačním bakteriím v akutních testech. Ty nevykazovaly žádný vliv na nitrifikaci v koncentraci vyšší, než jaká by se mohla očekávat z hlediska životního prostředí. Nicméně doba testu významně ovlivňuje výsledky (Halling- Sørensen 2000; Kümmerer et al. 2004).

Christensen a jeho spolupracovníci našli synergickou směs účinků antibiotik proti bakteriím kalů (Christensen et al. 2006). Podle ISO (International Organization for Standardization) 13641 testovaná antibiotika působící především proti gramnegativním bakteriím ukázaly mírný inhibiční účinek po sedmi denní inkubační době s hodnotami EC_{50} mezi 24 mg/l a 1000 mg/l (Gartiser et al. 2007). Ve stejné studii bylo zjištěno, že metronidazol, optimalizován proti grampozitivním bakteriím byl toxický pro anaerobní bakterie s EC_{50} 0,7 mg/l. Při testování degradace anaerobů podle ISO 11734 (1998) pouze benzylpenicillin ukázal konečnou biodegradaci po 60 dnech testování. To znamená, že inhibice anaerobních bakterií antibiotiky pozorovaných v testech degradace byla vyšší, než jak by se očekávalo z výsledků inhibičních testů. Pro toto je možné vysvětlení, že byly použity různé substráty (kvasinkový extrakt proti benzoátu sodnému). Účinek biodegradace se snižuje během promývacích kroků prováděných při degradačních testech a tak byla doba expozice v těchto testech 8 krát delší než v inhibičním testu (Gartiser et al. 2007).

2. 2. 3. Čistírenské kaly a sedimenty

Humánní a veterinární antibiotika jsou přítomna v sedimentech. Kim and Carlson (2007) detekovali tetracykliny, sulfonamidy a makrolidy. Koncentrace v sedimentech měřená v zemědělsky-ovlivněných řekách byla mnohem vyšší než ve stojaté vodě. To naznačuje, že antibiotika odtékají s povrchovou vodou ze zemědělských polí. V intenzivním chovu ryb se infekce léčí podáváním antimikrobiálního činidla přímo do vody. Látky používané při chovu ryb mohou vstoupit do sedimentů přímo z vody bez jakéhokoli čistícího procesu. To má za následek vysokou lokální koncentraci ve vodním prostoru a v přilehlých sedimentech. Tento jev byl zkoumán před více než 20 lety, kde výsledky prokázaly přítomnost antibiotik uplatněných v širokém chovu ryb nalezených v sedimentech pod rybími farmami (Migliore et al. 1995).

Několik článků se zabývalo dopadem antibiotik na organismy žijící v sedimentech. Antimikrobiální látky mohou mít kvalitativní a kvantitativní účinky na rezidentní mikrobiální komunitu nalezenou v sedimentu, což může mít vliv na odbourávání organických látek.

Kromě toho nemohou být vyloučeny přímé toxické účinky na rezidentní organismy (Kong et al. 2006).

Antibiotika přítomná v sedimentu mohou ztratit svou antimikrobiální aktivitu v důsledku vazby na částice sedimentu nebo vytvořením komplexu s ionty. Tato možnost byla prokázána u některých látek. Avšak výsledky zaměřující se na ztrátu antimikrobiální aktivity antibiotik v důsledku vazby nebo vytvoření komplexů v sedimentu byly nalezeny pro jednu a tutéž látku (Hektoen et al. 1995). Důvodem těchto výsledků mohlo být rozdílné složení sedimentu, které se zdá být klíčové v účincích látek na rezidentní populaci, protože složení sedimentu nebo půdy určuje sílu a stupeň sorpce. Například ciprofloxacín je širokospektrální antibiotikum a jeho vliv na mikrobiální společenstva sedimentů byl selektivní a nejvíce působil na sulfát redukující bakterie a gramnegativní bakterie (Córdova-Kreylos and Scow 2007).

Potenciálně znečišťující látky, které se akumulují v organismu, musí být považovány za nebezpečné. Antibiotika, která jsou špatně rozpustná ve vodě, zejména když je biokoncentrační faktor (poměr koncentrace chemické látky v biotě vůči koncentraci v zevním prostředí) mezi 500 a 1000 nebo když distribuční koeficient oktanol/voda překročí hodnotu 1000, mají tendenci se hromadit v organismech (Migliore et al. 1993).

2. 3. Eliminace antibiotik ze životního prostředí

Vyloučení antibiotik ze životního prostředí znamená, že původní sloučenina není zjištělná specifickou analýzou v prostředí nebo ve vzorku z prostředí. Vyloučení původní sloučeniny z prostředí se nazývá primární eliminace. Jestliže je sloučenina plně převedena na anorganickou sůl, došlo k úplné mineralizaci. Pouze měření produkce oxidu uhličitého může poskytnout měřítko stupně mineralizací, které vede k úplnému rozpadu molekuly, jejich metabolitů, k přeměně produktů na oxid uhličitý, vodu a anorganické soli jako je sulfát, fosfát, amoniak a dusičnan (Kümmerer 2009).

Znalosti o odstranění antimikrobiálních látek ze životního prostředí mají zásadní význam vzhledem k tomu, že tyto látky mohou mít nepříznivý dopad na vodní a suchozemské systémy. Odstranění organických látek z prostředí je výsledkem různých procesů. Tyto procesy mohou být biotické, tj. biologické odbourávání bakteriemi a houbami. Nebiotické eliminační procesy jsou sorpce, hydrolyza, fotolýza, oxidace a redukce. Avšak výsledky biologických nebo foto-degradačních studií závisí na podmínkách, jako je teplota, zeměpisná šířka atd. (Kümmerer 2009).

2. 4. Využití antibiotik

Antibiotika se používají ve velké míře v humánní a veterinární medicíně, jakož i v akvakultuře, za účelem prevence (profylaxe) nebo léčení mikrobiálních infekcí. Několik stovek různých antibiotických a antimykotických látek se používá v humánní a veterinární medicíně, například více než 250 antibiotik v Německu (Kümmerer and Henninger 2003).

V humánní medicíně se celková spotřeba antibiotik na obyvatele a individuální spotřeba sloučeniny liší země od země (Mölstad et al. 2002). Různé úrovně využití jednotlivých sloučenin jsou zcela běžné. Například vancomycin se často používá v USA, zatímco v Německu se používá jen v případech, ve kterých jsou ostatní možné sloučeniny neúčinné v důsledku rezistence. Používání antibiotik se vyjadřuje jako počet DDD (defined daily dose). DDD je průměrná denní udržovací dávka léku podávaná v léčbě daného onemocnění u dospělých pacientů (Mölstad et al. 2002).

2. 5. Účinky antibiotik

Pokud není látka jakýmkoliv způsobem eliminována, může se dostat do prostředí s potenciálem nepříznivě ovlivňovat vodní a suchozemské živočichy. K lidem by se mohla znovu dostat přes pitnou vodu. Vzácně byla nalezena antibiotika v pitné vodě. Nalezeny byly spíše některá léčiva a diagnostické prostředky, jako je kyselina klofibrová nebo amidotrizoic (Kümmerer 2009).

Účinky antibiotik na lidské zdraví byly popsány v lékařské literatuře. Dobře známé nežádoucí vedlejší účinky v rámci terapie jsou alergické reakce (např. u β -laktamů, jako je penicilin G nebo methicilin). Nemnoho antibiotik je nefrotoxických jako např. gentamicin. U chinolonů je známo, že může dojít ke zvýšené citlivosti na světlo. Tetracykliny by neměly být používány u malých dětí, protože dochází k negativní interakci s jejich vyvíjejícími se zuby (žluto-hnědé až modro-šedé zbarvení skloviny). Vzhledem k jejich antimikrobiální aktivitě může dojít během terapie k poškození střevní mikroflóry (Kümmerer 2009).

Antibiotika působí na bakterie, houby a mikrořasy, protože byla navržena tak, aby ovlivňovala mikroorganismy (Kümmerer 2009). Byly zjištěny nepříznivé dopady antibiotik na vyšší vodní organismy, ale koncentrace, které byly zjištěny, byly z hlediska životního prostředí irelevantní (Kümmerer 2009).

V dosavadních testech zahrnujících bakterie existuje několik nedostatků. Například si nemůžeme být jisti, zda člověk pracuje s nejcitlivějšími nebo nejdůležitějšími organismy. Kromě toho, v případě antibiotik mnoho z nich působí přednostně buď proti grampozitivním,

nebo gramnegativním bakteriím. To znamená, že sloučeniny účinné proti grampozitivním organismům nevykazují toxicitu při testu s gramnegativními bakteriemi a naopak. Jinak můžeme vybrat test, který se spoléhá na smíšené populace, jako jsou čistírenské kaly. V tomto případě účinky proti některým důležitým organismům mohou být maskovány jinými organismy, které jsou více či méně ovlivněny, ale stále přispívají k měřeným parametrům (Kümmerer 2009).

Akutní testy se jeví jako nevhodné pro stanovení účinku antibiotik na bakterie. Antibiotika mají specifické pracovní režimy a dopady se často projeví na prodloužení inkubační doby. Testy toxicity s bakteriemi ukázaly, že chronická expozice vůči antibiotikům je důležitější než akutní (Backhaus and Grimme 1999; Froehner et al 2000; Kümmerer et al. 2004). Srovnání výsledků krátkodobých a dlouhodobých biologických zkoušek s *V. fischeri* prokázaly riziko u látek se zpožděnou toxicitou u akutních testů. Backhaus and Grimme (1999) našli podobné hodnoty toxicity. V dlouhodobém bioluminescenčním inhibičním testu s *V. fischeri* byly hodnoty toxických účinků nalezeny u dvou antibiotik v rozsahu koncentrací očekávaných v životním prostředí. Proto bychom si měli být vědomi toho, že výsledky jsou uvedeny pro standardní testy bakteriální toxicity, jako jsou krátkodobé testy s luminescenční bakterií *V. fischeri* a další. Mohou být tedy podceněny účinky a rizika. Účinnost může být ovlivněna podmínkami prostředí, např. pokud je biologická dostupnost snížena sorpcí nebo je aktivita ovlivněna tvorbou komplexů. Aby bylo možné posoudit dopady na životní prostředí, musí být uvedeny přesné podmínky testování (např. teplota, hodnota pH, časové měřítko atd.) (Kümmerer 2009).

2. 6. Rezistence

Schopnost bakterií přizpůsobit se změnám v jejich prostředí se nazývá rezistence. Jinými slovy, když dochází ke změně citlivosti, která činí činidlo neúčinné proti určitému organismu, je organismus označován jako rezistentní. Některé organismy byli vždy rezistentní vůči konkrétním činidlům vzhledem k jejich fyziologii a biochemii (přirozená nebo vnitřní rezistence), zatímco jiné organismy získali rezistenci v důsledku použití antibiotik lidmi (získaná rezistence) (Kümmerer 2009).

Primární rezistence se přirozeně vyskytuje v mikroorganismech jako je například rezistence *Pseudomonas aeruginosa* vůči penicillinu G. Primární rezistence se „dědí“ od organismu stejného druhu pomocí buněčného dělení (vertikální přenos rezistence). Naopak sekundární rezistence se vyvíjí během léčby nebo při kontaktu mikroorganismu s antibiotikem. Plasmidem zprostředkovaná rezistence je přenosná mezi mikroorganismy.

V takovém případě je extra-chromozomální genetický materiál transferován mezi různé druhy bakterií pomocí konjugace (horizontální přenos rezistence). Rezistence může být později ztracena. Rezistence se tak může dostat do prostředí s potenciálem nepříznivě ovlivnit vodní a suchozemské organismy. Rezistentní bakterie by se mohli dostat zpět do člověka přes pitnou vodu (Kümmerer 2009).

Obecně platí, že vznik rezistence je velmi složitý proces, kterému není ještě dostatečně porozuměno v souvislosti s interakcí bakteriální populace a antibiotik, a to i v medicíně (Björkman et al. 2000; Martinez and Baquero 2000; Alanis 2005). Je například známo, že antibiotika v subinhibiční koncentraci mohou mít dopad na buněčné funkce, měnit genovou expresi virulencních faktorů nebo přenos antibiotické rezistence (Ohlsen et al. 1998). Ačkoliv tento jev není dosud ještě zcela znám. Například in vitro experimenty ukázaly, že gentamicin v koncentraci 100 µg/l může zvýšit transferovou rychlost rezistence u stafylokoků. Jiné látky, jako jsou makrolidy, chinoliny nebo vankomycin neměly podobný účinek (Ohlsen et al. 2003).

Rezistence vůči antibiotikům jako fenomén samo o sobě není překvapením ani nic nového. Rezistence je vývojově zachovaný přirozený proces. Proto je možné najít rezistentní bakterie všude v prostředí, kde probíhá časté léčení antibiotiky. Rezistentní bakterie mohou být přeneseny na člověka prostřednictvím vody nebo potravin, když jsou rostliny zalévány povrchovou nebo odpadní vodou, když je použito hnojivo nebo když jsou rezistentní bakterie přítomny v masě (Khachatourians 1998). Význam přenosu rezistentních antibiotik ze zvířat na člověka není jasný. Nicméně aby se minimalizovala tato cesta a nežádoucí příjem antibiotik, je obsah antibiotik z masa sledován příslušnými orgány v mnoha zemích. Zejména pro spotřebitele je důležité, že bakterie včetně jejich genů rezistence budou pravděpodobně zničeny, jestliže budou masné výrobky před použitím vařeny nebo se zahřejí (Kümmerer 2009).

Mnoho bakteriálních druhů se množí tak rychle, že se jejich počet zdvojnásobí každých 20-30 minut. Proto jejich schopnost přizpůsobit se změnám životního prostředí a přežít nepříznivé podmínky často vede k vývoji mutací, které umožňují druhům přežít. Dalším faktorem, který přispívá k jejich adaptaci, je nezávislost jednotlivých buněk na vlastních genetických zdrojích. Bakteriální rezistence se může šířit z jedné buňky bakterie (horizontální a vertikální přenos) do druhé prostřednictvím různých mobilních genetických elementů (Schlüter et al. 2007) k nimž patří plazmidy a transpozony. Genetický materiál může být také přijat z virů (Kümmerer 2009).

Antibiotika vykazují různé spektrální aktivity a mechanismy působení. Bylo zjištěno, že se citlivost na antibiotika po určitou dobu mění a to jak s různými skupinami organismů, tak v rámci těchto skupin. Z lékařské praxe jsme se naučili, že přenos rezistentních genů stejně jako již rezistentních bakterií samotných je způsoben aplikací antibiotik po dlouhou dobu v sub-terapeutických koncentracích, tedy v koncentracích, které neinhibují nebo nezabíjejí bakterie citlivé na antibiotika. Výsledky výzkumu v používání antibiotik v akvakultuře ukázaly podobné výsledky, jako bývají viděny při lékařském využívání antibiotik. Mezi významné nálezy související s rezistencí patří: 1. Použití jednoho antibakteriálního přípravku může zvýšit úroveň rezistence nejen pro toto konkrétní léčivo, ale i u těch, které mají velmi rozdílné antibakteriální působení (zkřížená rezistence). 2. Antibakteriální rezistence ne vždycky reaguje způsobem korelujícím s množstvím používaných léků nebo s koncentracemi reziduí v prostředí (Kümmerer 2009).

Pro antibiotika je rezistence obvykle kvantifikována jako minimální koncentrace potřebná pro uplatnění definovaného účinku (např. inhibice růstu) na populaci buněk. Různé mechanismy působení a metody používané k hodnocení citlivosti jsou klíčové pro výsledky testu citlivosti a hodnocení rezistence. Rezistence je popis relativní nevnímavosti mikroorganismu na určitou léčbu při určitých podmínkách. Z tohoto důvodu je třeba zaznamenat, že rezistence nebo alespoň nejnižší úroveň rezistence je silně závislá na typu testu a testových podmínkách stejně jako na typu sloučeniny a jejím působení. Při léčení infekce je bakteriostáze nebo usmrcení bakterií antibiotiky často účinná, protože usmrcení a eliminace patogenu jsou zprostředkovány imunitním systémem hostitele. Taková augmentace je typicky přítomna v životním prostředí. V kontrastu bakterie často tvoří biofilmy jako například odpadní kaly, které brání přístupu antibiotik. V tomto směru existuje jen málo poznatků z prostředí, jako jsou odpadní vody, kaly, povrchové vody a sedimenty ve srovnání s lékařským využitím a účinností antibiotik.

2. 6. 1. Rezistence ve vodním prostředí

Bakterie rezistentní na antibiotika byly nalezeny ve vodním prostředí (Kümmerer 2004; Schlüter et al. 2007; Watkinson et al. 2007; Caplin et al. 2008) a v půdě. V současné době se diskutuje, jestli se rezistence může vyvinout v čistírnách odpadních vod (ČOV). V biofilmech je bakteriální hustota velmi vysoká a to jak v aerobních a anaerobních žumpách, v trubkách pitné vody a v sedimentech. Biofilmy nejsou taxonomická bariéra pro horizontální přenos genetického materiálu. Předpokladem k přímému přenosu rezistence je, že bakterie jsou schopné přežít nebo že genetický materiál je alespoň dostatečně stabilní pro přenos do nového

prostředí, například z lidského těla do povrchové vody, která je chladnější a mnohem chudší na živiny. Proto je otázkou, zda je vstup antibiotik do životního prostředí důležitým zdrojem při vzniku rezistentních bakterií v prostředí, tj. koncentrace antibiotik a bakteriální hustota dostatečně vysoká, expozice dostatečně dlouhá, aby podporovala vznik rezistence nebo selektovala rezistentní bakterie nebo jestli je přenos rezistence z již rezistentních bakterií po nesprávném používání antibiotik mnohem více důležitý než vstup antibiotických látek samostatných? Zatím není stanovena souvislost mezi přítomností antimikrobiálních látek a výhodami rezistentních bakterií stejně jako přenos rezistence při nízkých koncentracích jako jsou ty nalezené u antimikrobiálních látek v prostředí. Často údaje použité k posouzení vlivů antibiotik na životní prostředí nejsou dostatečné k prokázání, jak dlouho bakterie udrží antibakteriální rezistenci při absenci selektivního tlaku pro vznik a šíření rezistence. Existují důkazy, že rezistence vůči antibiotikům je již přítomna v přirozeném prostředí, a že může být přenášena mezi bakteriemi po dobu nejméně deseti let. Davison (1999) a Schüter et al. (2007) dospěli k závěru, že zvířecí, lidské, rostlinné patogeny a jiné bakterie z různých stanovišť (mezi nimi i čistírny odpadních vod) sdílejí společné determinanty rezistence, které se snadno přenášejí. S největší pravděpodobností k přenosu stejně jako k nové kombinaci genů rezistence dochází v prostorech s vysokou bakteriální hustotou, tj. v bakteriálních biofilmech (Davison 1999, Schüter et al. 2007).

Některé výsledky ukazují, že přenos rezistence a selekce rezistentních bakterií není zvýhodněn vysokými antibiotickými koncentracemi, jako jsou ty nalezené v nemocničních odpadních vodách nebo ve vodních tocích (Ohlsen et al. 1998; Ohlsen et al. 2003). Významným zdrojem rezistentního materiálu v nemocničních odpadních vodách, odpadních vodách a ČOV jsou bakterie, které se již staly rezistentními pomocí léčení antibiotiky. Existují zprávy o nadměrném používání biocidů (triclosan a kvartérní amoniové sloučeniny) v nemocnicích a domácnostech, které by mohlo vést ke vzniku bakteriím odolným vůči antibiotikům (Russel 2000). Například triclosan byl vybrán z důvodu, že je účinný proti nízkým hladinám antibiotické rezistence v *Escherichia coli* (Mc Murry et al. 1998) a proti vysokým hladinám ciprofloxacin-rezistence v triclosan-citlivých *Pseudomonas aeruginosa* mutantech (Chuanchuen et al. 2001). Výsledky Al-Ahmada et al. v tisku Wiethan et al. 2000 ukazují, že bakterie, které se staly rezistentní prostřednictvím aplikace antibiotik, nemusí být nutně odolnější při čištění odpadních vod. Koncentrace antibiotik a dezinfekčních prostředků je obvykle o několik řádů nižší ve volné vodní fázi v životním prostředí než při terapeutickém využití (Lorian 2005). Koncentrace antibiotik může být mnohem vyšší v případě, že účinné sloučeniny jsou trvalé a hromadí se, například sorpcí na povrch pevných látek v určitých

složkách životního prostředí, jako jsou čistírenské kaly, sedimenty nebo půdy. Není známo, jak silné antibiotika jsou sorbovány a za jakých podmínek jsou stále biologicky dostupná a aktivní po sorpci. Tato zjištění naznačují, že vstup rezistentních bakterií do životního prostředí může být důležitější pro přítomnost bakterií v prostředí než pro účinnost sloučenin samotných (Kümmerer 2009).

2. 6. 2. Role nemocnic

Často se předpokládá, že nemocnice jsou nejdůležitějším zdrojem vstupu antibiotik a rezistentních bakterií do městských odpadních vod. Pro jednotlivé látky přesahují koncentrace vypočítané a naměřené v nemocničních odpadních vodách hodnoty MIC₅₀ (minimální inhibiční koncentrace). Vyšší hodnoty by mohly být dosaženy, kdyby se nezkoumaly pouze jednotlivé sloučeniny, ale celé skupiny sloučenin, které působí stejným mechanismem (Kümmerer and Henninger 2003). Výsledky, které byly publikovány, ukazují, že přenos rezistence a selekce rezistentních bakterií není rozdílná u vysoké koncentrace antibiotik nalezených v nemocničních odpadních vodách nebo u nižších koncentrací nalezených ve vodním prostředí (Ohlsen et al. 1998; Ohlsen et al. 2003).

V nemocničních odpadních vodách byly nalezeny některé bakteriální kmeny nesoucí různé geny rezistence (Kümmerer 2004; Schwartz et al. 2006). Koncentrace kvartérní amniové sloučeniny benzalkonium chloridu nalezené v odtoku evropských nemocnic byla vyšší než 5 mg/l. Koncentrace IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) nitrifikačních bakterií byla nalezena v řádu 1 až 2 mg/l. Vysoká rezistence byla nalezena v nemocničních odpadních vodách a v čistírnách odpadních vod (Kümmerer 2004). Když vezmeme v úvahu, že nemocniční odpadní vody zahrnují méně než 1% z celkových komunálních odpadních vod je pravděpodobné, že nemocnice nejsou hlavním zdrojem rezistentních bakterií v komunálních odpadních vodách. Protože se antibiotika používají v domácnostech, je pravděpodobné, že veřejnost je odpovědná za hlavní vstup rezistentních bakterií do ČOV. Například v Německu spotřeba antibiotik v nemocnicích nepřesahuje 25% z celkové spotřeby. Situace může být jiná pro multi-rezistentní bakterie. Předpokládá se, že multi-rezistentní bakterie byly selektovány v nemocnicích a následně se dostaly do odpadních vod. Počet multi-rezistentních bakterií v odpadní vodě koreluje s počtem nemocnic připojených k ČOV. Počty a typy rezistentních bakterií nacházejících se v odpadní vodě z nemocnice z jednotky intenzivní péče (JIP) s maximální lékařskou službou ukázaly, že číslo v JIP odpadní vodě a v přítoku do ČOV bylo v některých studiích stejné a v některých odlišné (Kümmerer 2004). Guardabassi et al. (1998) zjistili, že nemocniční odpadní voda měla jen malý dopad na prevalenci single nebo multi-

rezistentních druhů *Acinetobacter* na rozdíl od odtoku z farmaceutických zařízení, ve kterých byly vyrobeny produkty, které obsahují antibiotika. Na základě současného poznání je diskutabilní oddělené čištění nemocničních odpadních vod kvůli snížení vstupu rezistentních bakterií do vodního prostředí. Tento závěr může záviset na místních podmínkách (Kümerer 2009).

2. 6. 3. Odpadní voda, obecní kanalizace a čistírny odpadních vod

Koncentrace antibiotik v komunálních odpadních vodách a v ČOV jsou obvykle nižší ve srovnání s nemocničními odpadními vodami. Rezistentní a multi-rezistentní bakterie, jako je *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, pseudomonády, *Enterobacteriaceae* a fylogeneticky vzdálené bakterie, jako členové α - a β -proteobakterií jsou přítomny v komunálních odpadních vodách, jakož i v aktivačních nádržích a v anaerobním procesu digesce v ČOV. Rezistence proti β -laktamům, chinolinům, tetracyklinům a sulfamethoxazolu/trimethoprimu a jiných sulfonamidů byla nalezena v odpadních vodách a odpadních kalcích po celém světě s použitím klasických prostředků, jako je kultivace a testování rezistence, jakož i zjištění rezistenci kódujících genů (Kümmerer 2004; Schlüter et al. 2007). Nebylo dosud prokázáno, že trvalé působení antibiotik v kanalizačních systémech podporuje rozvoj rezistence proti antibiotikům a selektivní účinky na bakteriální komunity. Multi-rezistentní kmen *Acinetobacter*, který je znám tím, že je schopný přežít v odpadní vodě, byl testován na LSSTP (the laboratory scale sewage treatment plant) obsahující směs antibiotik v koncentraci 100krát vyšší než se očekávalo ve vodním prostředí v Německu a odrážející celostátní užívání antibiotik (Al-Ahmad et al. 2008, in press). Kmen byl odolný proti sedmi z přítomných antibiotik. Navzdory přítomným antibiotikům a profilu rezistence, tento bakteriální kmen nebyl zjištěn v LSSTP klasickými mikrobiologickými metodami nebo chemotaxonomií. Kromě toho 2 týdny po zavedení bakterie do čistírny odpadních vod, již nebylo možné detekovat genetický materiál zodpovědný za multi-rezistenci (Kümmerer 2009).

2. 6. 4. Povrchová voda

Bakterie, které jsou rezistentní vůči antibiotikům, mohou být přítomny v povrchových vodách. Byla nalezena korelace mezi rezistentními bakteriemi v řekách a v odpadních vodách (Kümerer 2004; Watkinson et al. 2007). Vanneste se spolupracovníky (2008) izolovali rostlinné patogenní bakterie, které byly rezistentní na měď nebo streptomycin z vodních toků nebo z oblastí, kde není provozováno zemědělství ani zahradnictví a vodní toky nejsou používány pro zavlažování plodin. Tyto výsledky ukazují, že přírodní vodní toky by mohly

být zdrojem genů, které způsobují rezistenci na streptomycin. Také u mořských bakterií a bakterií žijících v ústích řek nebo v pobřežních vodách znečištěných odpadními vodami byla nalezena antimikrobiální rezistence (Kümmerer 2004). Dokonce i ze Severního ledového moře nesou izoláty *E. coli* pocházející z arktických ptáků antimikrobiální rezistenci vůči lékům. Tyto výsledky ukazují, že geny rezistence se mohou nacházet v oblasti, kde neexistuje selekční tlak (Sjölund et al. 2008). Průměrné koncentrace ciprofloxacinu a ceftazimu nalezené v povrchových vodách budou jednoznačně nižší než koncentrace schopné změnit bakteriální populaci. Toto se sleduje pomocí klasických mikrobiálních metod jako je Gramovo barvení, testy aminopeptidázy a katalázy jakož i pracovní metabolické fingerprinty využívané biologickými systémy (Wiethan et al. 2001).

Peak et al. (2007) určili zastoupení šesti tetracyklin-rezistentních genů v odpadních vodách dobytčích výkrmů s různými možnostmi užívání antibiotik. Zastoupení šesti tetracyklinových rezistentních genů tet (O), tet (Q), tet (W), tet (M), tet (B) a tet (L) bylo kvantifikováno v odpadních vodách firmy, která zpracovává koncentrovaná zvířecí krmiva. Provoz výkrmny ovlivňuje geny rezistence v povrchových vodách. Hladiny rezistentních genů byly vyšší na podzim oproti létu s hojností 10 až 100 krát větší. Tyto výsledky ukazují, že používání antibiotik silně ovlivňuje jak množství, tak distribuci rezistentních genů v blízkých lagunách. Unikající odpadní jámy s prasečí kejdou a její využívání na hnojení půd může způsobit disperzi rezistentních bakterií do vodních zdrojů. Ve studii Sapkota et al. (2007) byla střední koncentrace enterokoků, fekálních koliformních bakterií a bakterií *E. coli* 4 až 33krát vyšší ve vzorcích podzemních a povrchových vod odebraných z prasečích farem. Byly také zvýšeny počty fekálních bakterií. Bylo zjištěno, že tetracyklinová rezistence ARG tet(W) a tet(O) byla přítomna v upravené pitné vodě a recyklované odpadní vodě, což naznačuje, že se jedná o potenciální cesty pro šíření ARG do a z člověka (Sapkota et al. 2007).

2. 6. 5. Podzemní vody

Antibiotika se v podzemních vodách nalézají zřídka, a když už se vyskytují tak pouze v koncentracích pod $\mu\text{g/l}$. Zdrojem antibiotik v podzemní vodě by mohlo být vyluhování polí nebo jejich prostupování sedimenty do podzemních vod (Pruden et al. 2006; Sapkota et al. 2007). Avšak zatížení antimikrobiálních látek v podzemní vodě se nacházelo v nízkých koncentracích ve venkovských oblastech s velkým výskytem hospodářských zvířat. Antibiotika rezistentní na *E. coli* měla vysoký výskyt ve venkovských podzemních vodách (Kümmerer 2004).

2. 6. 6. Pitná voda

Bakterie rezistentní vůči antibiotikům byla nalezena v pitné vodě již v roce 1980 a později v roce 1990. Tito autoři zjistili, že rezistentní bakterie identifikované pomocí klasických mikrobiálních metod (mikrotitrační destičky) byly distribuovány do pitné vody. Došli k závěru, že zpracování vody a následná distribuce selektuje bakterie rezistentní vůči antibiotikům. V souladu s těmito údaji byla zjištěna zvýšená fenotypová rezistence ve vzorcích pitné vody. Nejčastěji byla zkoumána *Aeromonas spp.* (Kümmerer 2004; Scoaris et al. 2007).

2. 6. 7. Sedimenty

Pro akvakulturu bylo zjištěno vysoké zatížení antibiotiky v sedimentech v koncentracích dostatečně silných k inhibici růstu bakterií. Rezistentní bakterie mohou být přítomny v sedimentech z důvodu aplikace antibiotik v rybím chovu nebo z důvodu selekce antibiotik přítomných v sedimentech. Látky používané v rybím chovu mohou vstoupit do sedimentu přímo z vody, aniž by došlo k nějakému čistícímu procesu. Některé výzkumy prokázaly přítomnost a přetrvávání antibiotik používaných výhradně k chovu ryb v sedimentech pod rybími farmami (Kümmerer 2004). Fluorochinoliny, sulfonamidy a tetracykliny jsou silně adsorbovány. Proto se mohou hromadit v sedimentech. Dosud není známo do jaké míry a za jakých okolností jsou tyto sloučeniny účinné po sorpci nebo jestli jsou uvolněny a mohou přispívat k rezistenci. Antimikrobiální látky mohou mít kvalitativní a kvantitativní vlivy na rezistentní mikrobiální komunity v sedimentech. V chovu ryb (akvakultuře, mořské akvakultuře atd.) bylo rozšířené používání antibiotik při léčbě bakteriálních chorob spojeno s rozvojem antibiotické rezistence *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Edwardsiella ictaluri*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida*, *Pasteurella piscicida* a *Yersinia ruckeri* (Serrano 2005).

2.7. Hlavní metody pro stanovení antibiotik v životním prostředí

Členové každé skupiny antibiotik jsou si velice podobní. Jejich výroba a nestabilita vedou k situaci, kdy mohou být přítomna malá množství strukturně příbuzných sloučenin a vedlejších produktů. Je velmi obtížné stanovit malé množství degradačního produktu v obrovském přebytku původního léku. Je také obtížné analyzovat rušivé látky v průběhu testování surovin a upravování výrobků. Tyto problémy jsou překážkou v analýze antibiotik, která je vyžadována v mnoha oblastech, jako je optimalizace fermentace, izolace produktu, řízení procesů a určení jejich optimální dávky a také při určování jejich koncentrace v tělních tekutinách. Mezi běžně používané metody kvantitativní analýzy antimikrobiálních sloučenin patří chromatografické metody, mikrobiologické testy a radioimunologické testy. Mikrobiologické metody, které jsou využívány u mikroorganismů velmi citlivých na daný lék, často postrádají specifitu ve srovnání s chromatografickými metodami plynové chromatografie (GC) a vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC) (Joshi 2002).

Zatím je většina publikovaných metod pro analýzu antibiotik zaměřena na konkrétní terapeutické třídy (Al-Odaini et al. 2010; Petrović et al. 2005), které se mnohou stát časově a finančně náročné pokud mají být použity na environmentální aplikaci pro studium multireziduí. Vývoj multireziduálních metod pro antibiotika je tedy prospěšný generováním významného množství dat, které jsou nezbytné při posuzování vodní toxicity směsí, tedy takzvaných směsných účinků (Pomati et al. 2008). Zavedené analytické metody budou důležitým nástrojem pro vedení vodárenské společnosti při odstranění antibiotik a jiných podobných vznikajících znečišťujících látek v ČOV (Zhou et al. 2012).

2.7.1. Extrakce na pevné fázi, extrakce kapalina-kapalina a mikroextrakce pevnou fází

Extrakce na pevné fázi (SPE) a extrakce kapalina-kapalina (LLE) jsou nejběžnější metody používané pro extrakci organických analytů z vodných matric. Využívají se pro extrakci léčiv, včetně antibiotik, nesteroidních protizánětlivých léků, β -blokátorů a léčiv používaných v psychiatrii. Mezi hlavní výhody SPE patří relativní rychlost a minimální spotřeba rozpouštědla. Bylo vyvinuto několik metod SPE a LLE pro extrakci z vody, z biologické hmoty a z podzemních a odpadních vod (Blanchflower et al. 1997). Metoda je založená na interakci mezi stacionární (sorbent) a mobilní (vzorek) fází. Po extrakci je většina

polárních organických sloučenin analyzována pomocí LC-MS, méně polární analyty mohou být analyzovány GC-MS. Nicméně kromě cílových analytů, vzorky extrahované SPE a LLE mohou obsahovat určité množství dalších organických látek, které byly extrahovány z původní matrice. Přítomnost necílových sloučenin ve vzorku (tj. sloučenin v matrici, které byly extrahovány s analyty pomocí SPE nebo LLE) může mít např. u elektrospreje vliv na tvorbu kapek nebo jejich odpaření, což má vliv na množství iontů v plynné fázi, které doletí k detektoru (King et al. 2000). Sloučeniny s velkou molekulovou hmotností (např. huminové kyseliny, které se běžně vyskytují v životním prostředí) nejvíce ovlivňují ionizaci molekul s nižší molekulovou hmotností s polárními analyty (jako jsou sulfonamidová antibiotika) (Sterner et al. 2000).

Mezi metody vycházející z extrakce na pevné fázi patří mikroextrakce na pevné fázi (SPME). SPME je extrakční technika využívající extrakční křemenné vlákno, které je pokryto stacionární fází. Tato technika je založena na rozdělení analytu mezi stacionární fází a matrici. Po ekvilibraci jsou adsorbované analyty desorbovány do organického rozpouštědla a následuje analýza pomocí LC-MS nebo GC-MS (podle potřeby). Hlavní výhodou metody je menší spotřeba vzorku a rozpouštědla. SPME vývoj metody vyžaduje optimalizaci ekvilibračních podmínek pro každou sloučeninu (Kumazawa et al. 2003).

2. 7. 2. Plynová a kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

V současné době je mnoho metod publikovaných pro analýzu antibiotik, založených na plynové chromatografii s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) (Lin et al. 2005) a kapalinové chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (Gros et al. 2006; Shaaban and Górecki 2011), ačkoliv LC-MS/MS je ve větší míře přijatelnější vzhledem k jeho výhodám oproti GC-MS včetně jeho lepší selektivity (Petrović et al. 2005) a kompatibility s antibiotiky s nízkou volalitou a vysokou polaritou. Metody GC jsou rychlé a selektivní, ale vyžadují zvýšené provozní teploty, které mohou způsobit v některých případech tepelné degradace nederivatizovaných léčiv, a proto je často derivatizací nutné zvýšit těkavost a zlepšit chromatografické chování. Tyto metody jsou obecně nepoužitelné pro analýzu vysoce polárních látek (např. síranu a glukuronidového konjugátu antibiotik a jejich metabolitů nebo látek s vysokou molekulovou hmotností) (Pryde and Gilbert 1999).

Kromě toho simultánní analýza několika skupin sloučenin s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi obecně vyžaduje pečlivý výběr experimentálních podmínek. Za

tímto účelem bylo velmi důležité, aby se optimalizovalo množství provozních parametrů, které mohou zlepšit chromatografické rozlišení, citlivost a přesnost pro cílová antibiotika, a aby se zajistila jejich přesná detekce v různých koncentracích ve vodě (Zhou et al. 2012).

2. 7. 3. Vysoce účinná kapalinová chromatografie

HPLC technice se dává přednost před jinými tradičními mikrobiologickými metodami z důvodu její vysoké citlivosti. Jejím úkolem je kvalitativní a kvantitativní stanovení definovaných sloučenin ve vzorcích. Citlivost jde dále zvýšit spojením s fluorimetrickými, elektrochemickými nebo hmotnostně-spektrometrickými detekčními metodami. Označuje se za metodu jak vysokotlakou tak vysokorychlostní. S použitím různých typů kolon a různých systémů rozpouštědel může být HPLC využita při analýze široké škály vzorků. Derivatizace může v případě aminoglykosidů zlepšit citlivost vzorku k detekci (Joshi 2002).

V poslední době byla vyvinuta nová HPLC technologie s názvem Ultra-High Performance Chromatography (UHPLC – ultra účinná kapalinová chromatografie). Používá nové generace HPLC kolon s malými hybridními hmotnými částicemi (průměr 1,7 μm) a pracuje při mnohem vyšším tlaku v koloně (až 15 000 psi) než HPLC. UHPLC pracuje s vyšším rozlišením, má lepší citlivost a separační účinnost. Analýza UHPLC probíhá v kratším čase a s menší spotřebou mobilní fáze (Li et al. 2009).

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1. Materiál, příprava roztoků a vzorků

Vzorky o objemu asi 0,5l vody byly odebrány z řeky Moravy a z odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci do plastových láhví. Řeka Morava se nachází ve střední Evropě a protéká mezi městy Mohelnice a Olomouc. Vzorky z řeky byly odebrány ze třech různých míst (v Chomoutově, za kolejemi Bedřicha Václavka a za čističkou odpadních vod v Olomouci). Dále byl odebrán vzorek dešťové vody (Chomoutov) a sněhu (Břidličná) sloužící jako negativní kontrola. Vzorky říční, dešťové vody a sněhu byly nasbírány ve dnech 22. 11. a 13. 12. 2016. Vzorky vody pocházející z odpadních vod Fakultní nemocnice byly odebrány dne 13. 3. 2017. Vzorky byly před extrakcí a analýzou uskladněny v mrazáku při -18°C.

Chemikálie a zařízení pro analýzu

- Vnitřní standard (IS): antibiotikum ofloxacin (361,37 g/mol), deuterovaný standard ofloxacinu (ofloxacin-D3), (354,39 g/mol), sitagliptin (407,31 g/mol)
- Methanol (CH₃OH) 100%, kyselina mravenčí p.a. (HCOOH) 85%, deionizovaná voda, hydroxid sodný p.a. (NaOH) M = 40 g/mol, acetonitril (CH₃CN) 99,9%
- Ultrazvuková čistička Elmasonic-S
- Pro extrakci na pevné fázi byla použita kolonka MCX Oasis (Waters).
- Block Heater Stuart
- LC kolona: Kinetex® 50 x 2,1 mm, 2,6 μm XB-C18 100 A (Phenomenex)
- Kapalinový chromatograf Waters Acquity UPLC I- Class spojený s hmotnostním spektrometrem (Xevo TQD)
- Zpracování dat pomocí programu Waters Mass Lynx 4.1.

Příprava standardních roztoků a roztoků pro kalibrační křivku

Primární zásobní roztok ofloxacinu byl připraven rozpuštěním 1 mg ofloxacinu v 5 ml methanolu. Pro urychlení rozpuštění antibiotika v roztoku byla využita ultrazvuková čistička po dobu 5min. Standardní roztoky pro kalibrační křivku byly zředěny směsí acetonitril-deionizovaná voda 5:95 (v/v) na koncentrace 0,5; 1, 2 a 5 ng/ml. Stejným způsobem byl připraven zásobní roztok deuterovaného standardu ofloxacinu (koncentrace 0,2 mg/ml). Deuterovaný ofloxacin byl v koncentraci 100 ng/ml následně přidán do vzorku před extrakcí.

Zásobní roztok sitagliptinu byl připraven rozpuštěním 1 mg sitagliptinu v 1 ml vody. Následně byl naředěn ve směsi acetonitril-deionizovaná voda 5:95 (v/v) na koncentraci 100 ng/ml.

Příprava vzorku a extrakce na pevné fázi (SPE)

Do vzorku 50 ml říční vody, dešťové vody a rozpuštěného sněhu a do vzorku 1 ml odpadní vody z Fakultní nemocnice bylo přidáno 100 ng deuterovaného standardu ofloxacinu. Vzorek byl okyselen přidavkem 2% kyseliny mravenčí (HCOOH). Byla použita kolona Oasis MCX (obr. 1), která kombinuje polymerní hydrofobní sorbent s katexovými skupinami. Sorbent je optimalizován tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší selektivity a citlivosti pro extrakci bazických sloučenin.

Obr. 1: Kolona Oasis MCX



Postup SPE extrakce:

1. Kolona byla nejdříve kondicionována 1 ml metanolu (MeOH)
2. Před nanesením vzorku byla kolona ekvilibrována 1 ml deionizované H₂O okyselené 2% HCOOH.
3. Aplikace vzorku: 50 ml vody (z řeky, dešťové nebo rozpuštěný sníh) se 2 ng ofloxacinu-D3 a 2% HCOOH nebo 1 ml odpadní vody (z Fakultní nemocnice) se 100 ng ofloxacinu-D3 a 2% HCOOH.
4. Promytí - 1 ml deionizované H₂O okyselené 2% HCOOH, 1 ml MeOH okyseleného 2% HCOOH
5. Eluce elučním činidlem. Antibiotika zachycená na koloně byla eluována 2krát 1 ml 5% hydroxidu sodného v poměru s metanolem 1:1 do vialek. Po eluci hydroxidem bylo k eluátům přidáno 25 µl HCOOH.

Po extrakci byly eluáty vysušeny pod proudem dusíku na Block Heater Stuart při 40°C a následně rekonstituovány ve směsi voda / metanol 90:10 (v/v). Extrakty byly následně analyzovány pomocí UHPLC-MS.

3. 2. Analýza UHPLC-MS a optimalizace metody

Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií využívající ionizace elektrosprejem v pozitivním módu byla použita k separaci a identifikaci cílové sloučeniny. Byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem vybavený zdrojem pro ionizaci elektrosprejem (ZsprayTM). Pro ovládání hmotnostního spektrometru a určení podmínek pro sběr dat byl použit program Mass Lynx 4.1. UHPLC systém se skládal z LC pump, zásobníku mobilních fází, odplyňovače mobilních fází a autosampleru (obr 2).

Obr. 2: UHPLC systém ve spojení s hmotnostním spektrometrem



Separace byla provedena na LC koloně: Kinetex® 2,6 µm XB-C18 100 A (Phenomenex). Mobilní fáze byla deionizovaná voda obsahující 0,5% kyselinu mravenčí (fáze A) a acetonitril obsahující 0,5% kyselinu mravenčí (fáze B). Průtok byl 0,4 ml/min a nastříkovaný objem činil 5µl. Separace léčiva byla dosažena s lineárním gradientem (tabulka 1).

Tabulka 1: Gradientová eluce - lineární. Chromatografie byla ukončena během pěti minut při průtokové rychlosti 0,4 ml/min.

	Čas (min)	Průtok (ml/min)	Fáze A (%)	Fáze B (%)
1	počáteční	0,4	95	5
2	0,5	0,4	95	5
3	3,5	0,4	60	40
4	4	0,4	0	100
5	4,5	0,4	0	100
6	5	0,4	95	5

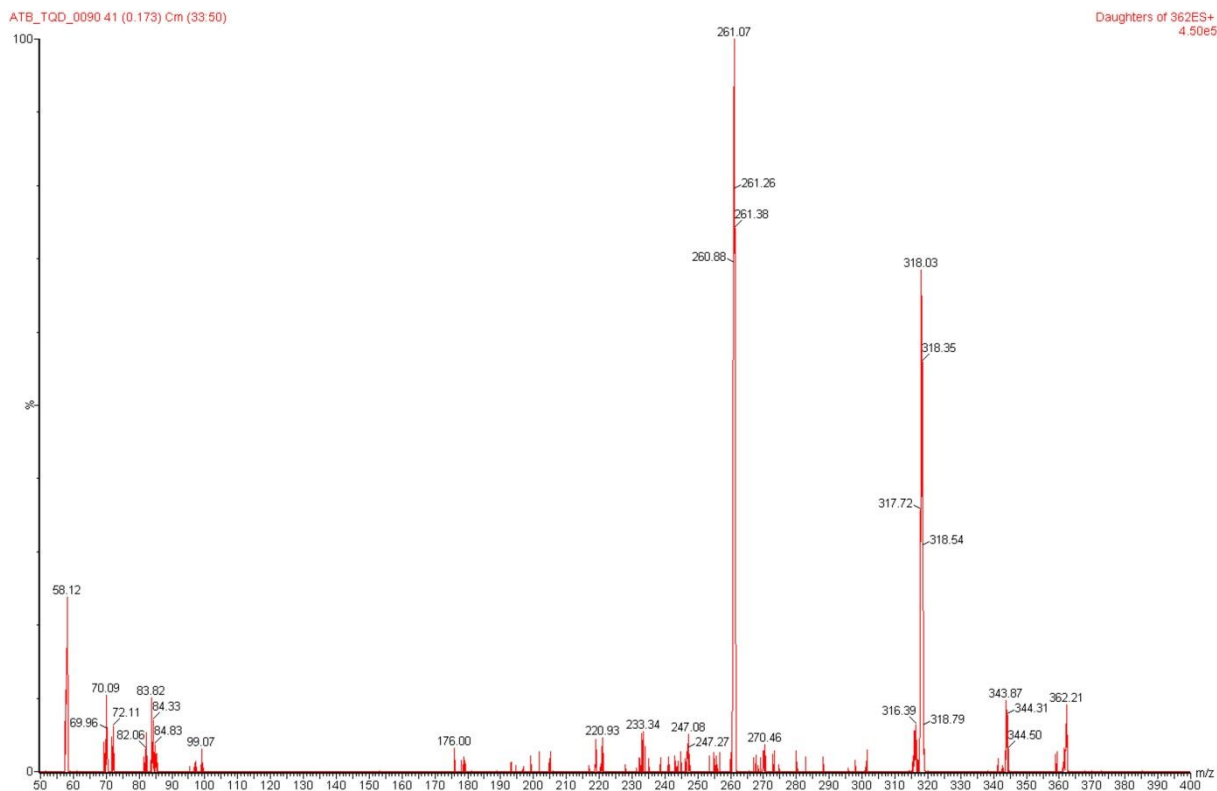
Analýza byla provedena v kladném módu ionizace, protože ofloxacin produkuje v pozitivním módu silnější signál než v režimu záporných iontů, vzhledem k přítomnosti aminoskupin ve své struktuře. Nejdříve byl proveden full scan, kdy kvadrupól propustí na detektor postupně všechny ionty a tím se získá celkové hmotnostní spektrum (obr. 3). V pozitivním iontovém módu byly postupně měněny jednotlivé parametry ionizace a iontové optiky (tabulka 2), aby se dosáhlo co nejvyšší intenzity protonované molekuly $[M + H]^+$ analyzovaných látek.

Tabulka 2: Spektrometrické parametry pro optimalizaci podmínek pro ESI (+) MSMS

Mód ionizace	Pozitivní
Napětí na kapiláře (kV)	2,3
Napětí na konusu (V)	45
Desolvatační teplota (°C)	500
Průtok desolvatačního plynu (L/hod)	400

Průtok plynu kolem konusu (L/hod)	20
--	----

Obr. 3: MS/MS spektrum ofloxacinu:



Protonovaný molekulární ion $[M + H]^+$ byl vybrán jako prekurzorový ion a detekce byla provedena v MRM režimu (multiple reaction monitoring). V MRM režimu prvním kvadrupólem projde definovaná m/z (prekurzorový ion), ten je rozštěpen v kolizní cele a třetím kvadrupólem projde definovaná m/z (produktový ion) a ten je detekován. Před MRM analýzou byly nastaveny vhodné parametry pro jednotlivé detekované látky (tabulka 3).

Tabulka 3: Parametry vnitřních standardů pro MRM analýzu

	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	Cone (V)	Collision (V)
Ofloxacin standard	362,2	261,1	30,0	30,0
Ofloxacin-D3	365,2	261,1	30,0	30,0
Sitagliptin	408,0	174,0	60,0	25,0

Kalibrace

Každý den před měřením vzorků byla provedena analýza roztoků pro kalibrační křivku. Kalibrační roztoky o koncentraci 0,5; 1; 2 a 5 ng/ml byly měřeny ve třech opakováních. Po analýze byly porovnány plochy standardu ofloxacin : ofloxacin-D3 a standardu ofloxacin : sitagliptinu.

3.3. Validace metody a validační parametry

Cílem validace bylo demonstrovat, že navržená procedura přípravy a analýzy vzorků je vhodná k zamýšlenému účelu, tj. ke stanovení ofloxacinu ve vzorcích povrchových a odpadních vod.

3.3.1. Přesnost metody

Údaj o míře těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek. Závisí na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah k pravdivé hodnotě. Míra přesnosti se počítá jako relativní směrodatná odchylka výsledků. Čím menší byla relativní směrodatná odchylka, tím byly výsledky měření přesnější.

Opakovatelnost

Je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti. Měří se na dvou koncentračních úrovních – koncentrace standardu ofloxacinu minimální (1 ng/ml) a maximální (10 ng/ml). Měření probíhalo v šesti opakováních v krátkém časovém rozmezí v rámci jednoho dne. Hodnoty poměrů ploch pík ofloxacinu standardu k sitagliptinu a k ofloxacinu-D3 byly zaznamenány do tabulek 4 a 5. Z těchto hodnot byla vypočítána těsnost shody pomocí relativní směrodatné odchylky.

Tabulka 4: Poměry ploch pík po analýze 1ng/ml: Ofloxacin 362,2 → 261,1 sitagliptin 408,0→174,0 a ofloxacin 362,2 → 261,1/ ofloxacin D3 365,2 → 261,1

	Ofloxacin/sitagliptin	Ofloxacin/Ofloxacin-D3
1.	0,002064	0,009707
2.	0,002869	0,014072
3.	0,002933	0,014223

4.	0,001755	0,009945
5.	0,002839	0,014933
6.	0,002716	0,011854

Výpočet relativní směrodatné odchylky z opakovaných měření koncentrace ofloxacinu 1 ng/ml:

$$S_r = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 [\%],$$

kde S je směrodatná odchylka a \bar{x} je aritmetický průměr.

Za využití standardu sitagliptinu:

$$S_r = 17,9 \%$$

Za využití standardu ofloxacinu-D3:

$$S_r = 16,7 \%$$

Tabulka 5: Poměry ploch píků po analýze 10ng/ml: Ofloxacin 362,2 → 261,1 : sitagliptin 408,0 → 174,0 a ofloxacin 362,2 → 261,1: ofloxacin-D3 365,2 → 261,1

	Ofloxacin/sitagliptin	Ofloxacin/Ofloxacin-D3
1.	0,024315	0,114345
2.	0,023590	0,118261
3.	0,024004	0,112959
4.	0,025527	0,115425
5.	0,024068	0,114158
6.	0,026758	0,128886

Výpočet relativní směrodatné odchylky z opakovaných měření koncentrace ofloxacinu 10 ng/ml:

$$S_r = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 [\%],$$

kde S je směrodatná odchylka a \bar{x} je aritmetický průměr.

Za využití standardu sitagliptinu:

$$S_r = 4,4 \%$$

Za využití standardu ofloxacinu-D3:

$$S_r = 4,6 \%$$

Opakovatelnost pro obě koncentrační úrovně byla shledána jako akceptovatelná. Vyšší hodnoty S_r zjištěné u koncentrace 1 ng/ml lze vysvětlit vyšším relativním vlivem náhodného šumu při nižší hodnotě signálu oproti koncentraci 10 ng/ml.

Mezilehlá preciznost

Vyjadřuje těsnost shody mezi naměřenými hodnotami výsledků, získanými opakovaným měřením dvou koncentračních úrovní (1 ng/ml a 10 ng/ml) v několika dnech (3dny). Těsnost shody mezi hodnotami v jednotlivých dnech se stanoví pomocí relativní směrodatné odchylky (tabulka 6).

Tabulka 6: Poměry ploch píků z měření 1 a 10 ng/ml ofloxacinu a relativní směrodatné odchylky z měření 1 a 10 ng/ml ofloxacinu

	$\bar{x}(3)$ pro 1 ng/ml ^a	$\bar{x}(3)$ pro 10 ng/ml ^b	S(3) pro 1 ng/ml ^c	S(3) pro 10 ng/ml ^d
Ofloxacin /sitagliptin	0,002750378	0,025003606	0,000584943	0,00252637
Ofloxacin /ofloxacin-D3	0,013483266	0,113707919	0,00249578	0,006041415

^aAritmetický průměr poměrů ploch píků ofloxacin/vnitřní standard pro koncentraci ofloxacinu 1 ng/ml ze tří dnů měření, ^bAritmetický průměr poměrů ploch píků ofloxacin/vnitřní standard pro koncentraci ofloxacinu 10 ng/ml ze tří dnů měření, ^cSměrodatná odchylka poměrů ploch píků ofloxacin/vnitřní standard pro koncentraci ofloxacinu 1 ng/ml ze tří dnů měření, ^dSměrodatná odchylka poměrů ploch píků ofloxacin/vnitřní standard pro koncentraci ofloxacinu 10 ng/ml ze tří dnů měření

Výpočet relativní směrodatné odchylky z opakovaných měření koncentrace ofloxacinu 1 ng/ml ve třech dnech:

$$S_r = \frac{S}{\bar{x}(3)} \cdot 100 [\%],$$

kde S je směrodatná odchylka ze tří dnů měření a $\bar{x}(3)$ je aritmetický průměr hodnot ze tří dnů měření.

Za využití standardu sitagliptinu:

$$S_r = 21,3 \%$$

Za využití standardu ofloxacinu-D3:

$$S_r = 18,7 \%$$

Výpočet relativní směrodatné odchylky z opakovaných měření koncentrace ofloxacinu 10 ng/ml ve třech dnech:

$$S_r = \frac{S}{\bar{x}(3)} \cdot 100 [\%],$$

kde S je směrodatná odchylka ze tří dnů měření a $\bar{x}(3)$ je aritmetický průměr hodnot ze tří dnů měření.

Za využití standardu sitagliptinu:

$$S_r = 10,0 \%$$

Za využití standardu ofloxacinu-D3:

$$S_r = 5,3 \%$$

Mezilehlá preciznost vykazuje mírně vyšší S_r než opakovatelnost (očekávatelný výsledek), nicméně je stále akceptovatelná. Vysvětlení vyšších hodnot S_r u koncentrační úrovně 1 ng/ml je stejné jako v případě opakovatelnosti.

3. 3. 2. Správnost metody

Statisticky významná rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou. Se správností metody souvisí výtěžnost metody neboli recovery. Recovery udává poměr množství analytu získaného danou analytickou metodou ke skutečnému množství. Před extrakcí byl do vzorku 1 ml deionizované vody přidán standard ofloxacinu na koncentraci 5 ng/ml. Po elučním kroku extrakce byl do vialek přidán ofloxacin-D3 na koncentraci 100 ng/ml. Eluáty byly následně odpařeny na vyhřívaném bloku, rozpuštěny v roztoku H₂O a metanolu a analyzovány (viz postup výše). Po analýze byla vypočtena změřená koncentrace standardu ofloxacinu (tabulka 7) pomocí rovnice kalibrační přímky. Počet opakování pro stanovení relativní směrodatné odchylky byl 7.

Tabulka 7: Koncentrace ofloxacinu ve vzorku 1 ml deionizované vody

	Ofloxacin/sitagliptin (ng/ml)	Ofloxacin/ofloxacin- D3 (ng/ml)
1.	4,29	4,92
2.	4,02	4,87
3.	4,22	4,31
4.	4,03	4,68
5.	3,49	4,62
6.	3,5	4,49
7.	4,04	4,53

Výpočet relativní směrodatné odchyly z opakovaných měření koncentrace ofloxacinu v 1 ml deionizované vody:

$$S_r = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 [\%],$$

kde S je směrodatná odchylnka a \bar{x} je aritmetický průměr.

Výpočet recovery:

$$R = \frac{\bar{x}}{c} \cdot 100,$$

kde \bar{x} je aritmetický průměr (referenční a získané koncentrace) a c je referenční koncentrace (5ng/ml)

Za využití standardu sitagliptinu:

$$S_r = 13,62 \%$$

Výpočet recovery pro standard sitagliptinu:

$$R = 78,8 \%$$

Za využití standardu ofloxacinu-D3:

$$S_r = 8,13 \%$$

Výpočet recovery pro standard ofloxacinu-D3:

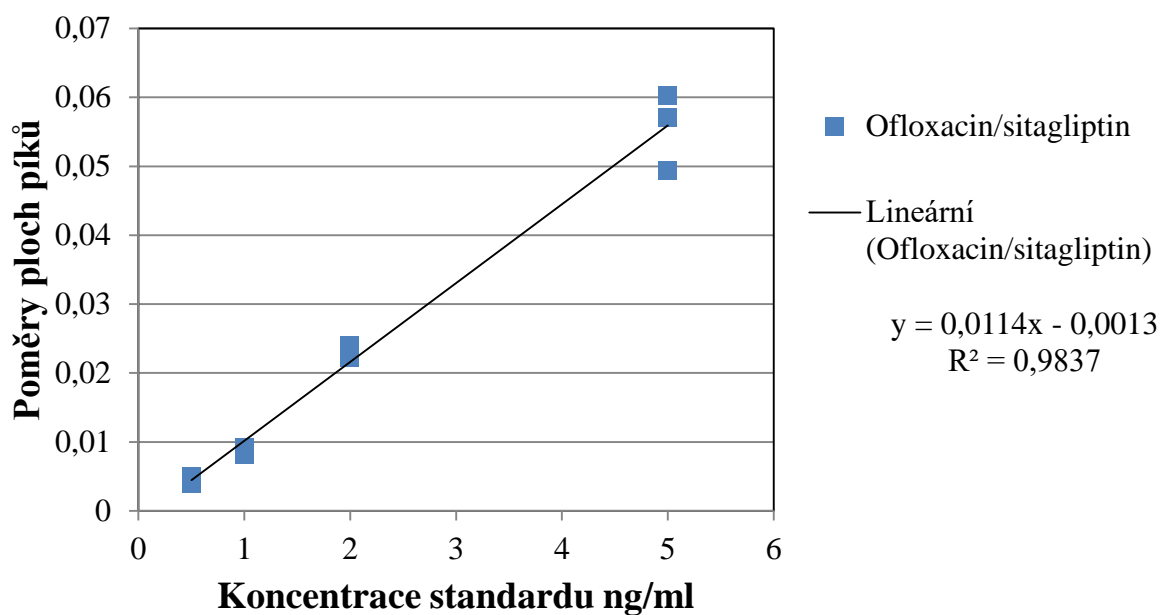
$$R = 92,6 \%$$

Vzhledem k referenční hodnotě koncentrace 5ng/ml ofloxacinu, která byla přidána před extrakcí, byla výtěžnost metody pro standard sitagliptinu 78,8 % a pro standard ofloxacinu-D3 92,6 %.

3. 3. 3. Linearita

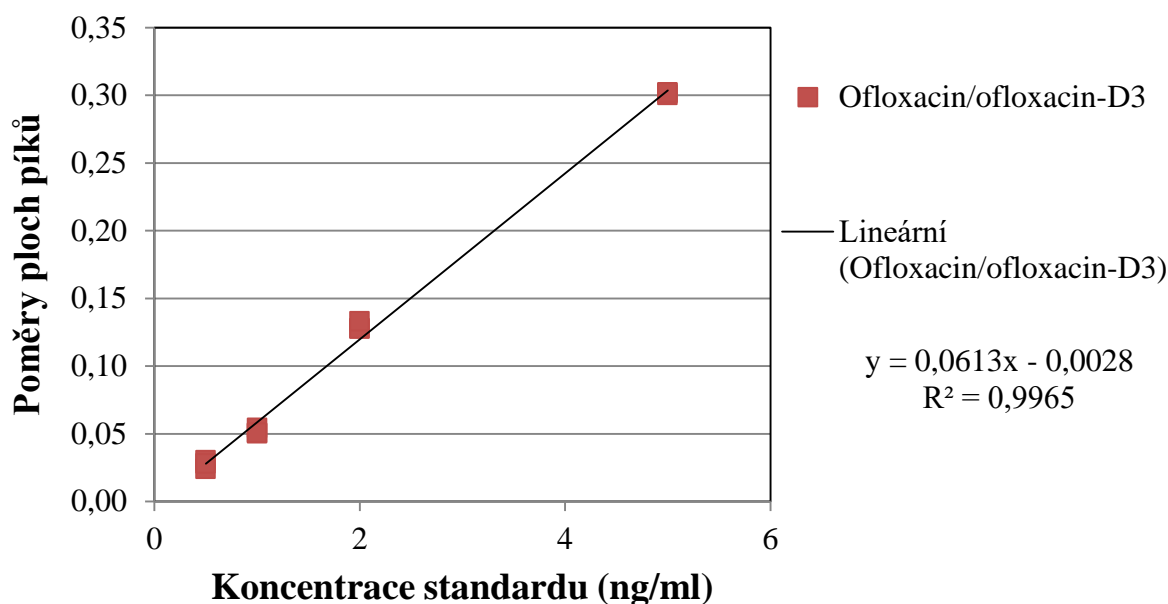
Přímková závislost mezi závislou a nezávislou proměnnou, tj. analytickým signálem a koncentrací analytu (obr. 4 a obr. 5). Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných určuje koeficient determinace (R^2). Čím více se při lineární závislosti blíží k jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější. Hodnota (R^2) by neměla klesnout pod hodnotu 0,98. Lineární závislost dvou náhodných proměnných je matematicky vyjádřena vztahem: $y = a + bx$, kde a je úsek, b je směrnice kalibrační přímky (regresní koeficient).

Obr. 4: Graf závislosti poměrů ploch pík ofloxacinu a sitagliptinu na koncentraci ofloxacinu ze dne 27. 3. 2017



Na základě rovnice $y = 0,0114x - 0,0013$ byla vypočtena koncentrace v analyzovaném vzorku v daném dni. Hodnota koeficientu determinace $R^2 = 0,9837$ se blíží hodnotě 1 a značí těsnou lineární závislost mezi koncentrací a odezvou.

Obr. 5: Graf závislosti poměrů ploch pík ofloxacinu a ofloxacinu-D3 na koncentraci ofloxacinu

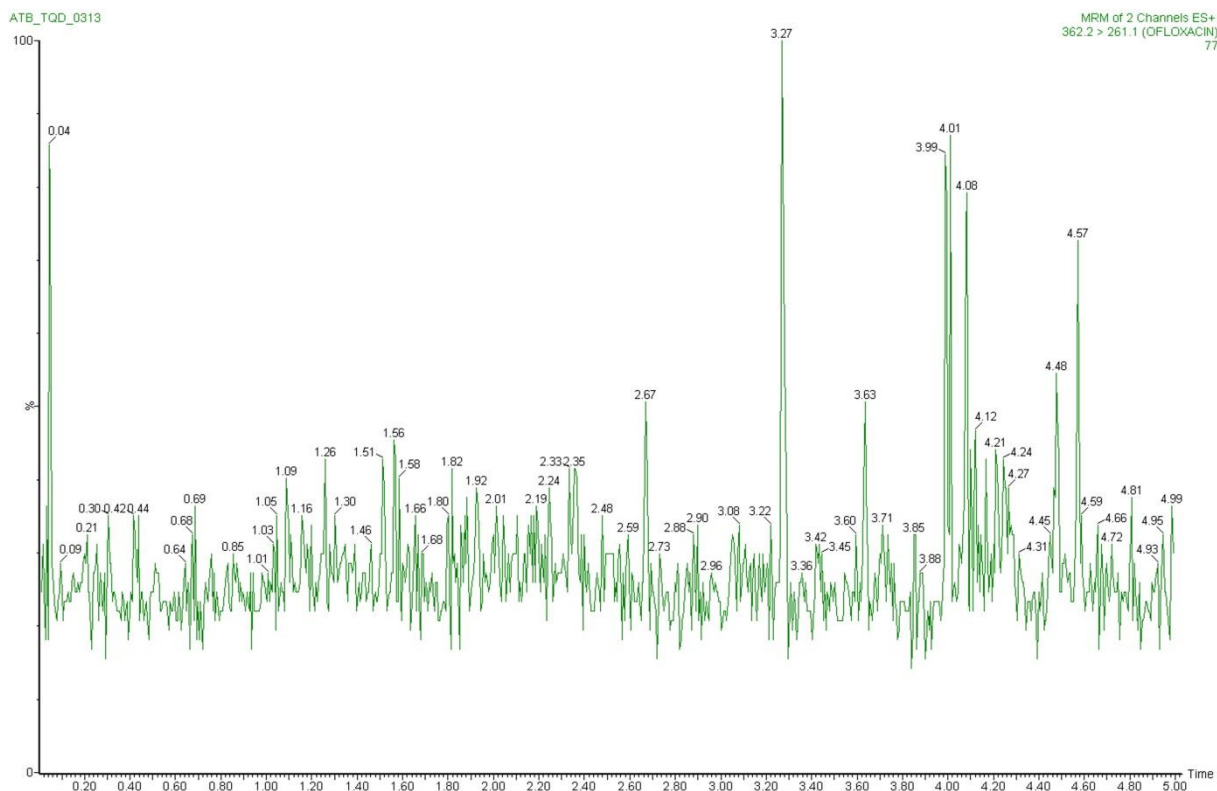


Na základě rovnice $y = 0,0613x - 0,0028$ byla vypočtena koncentrace v analyzovaném vzorku v daném dni. Hodnota koeficientu determinace $R^2 = 0,9965$ se blíží hodnotě 1 a značí těsnou lineární závislost mezi koncentrací a odezvou.

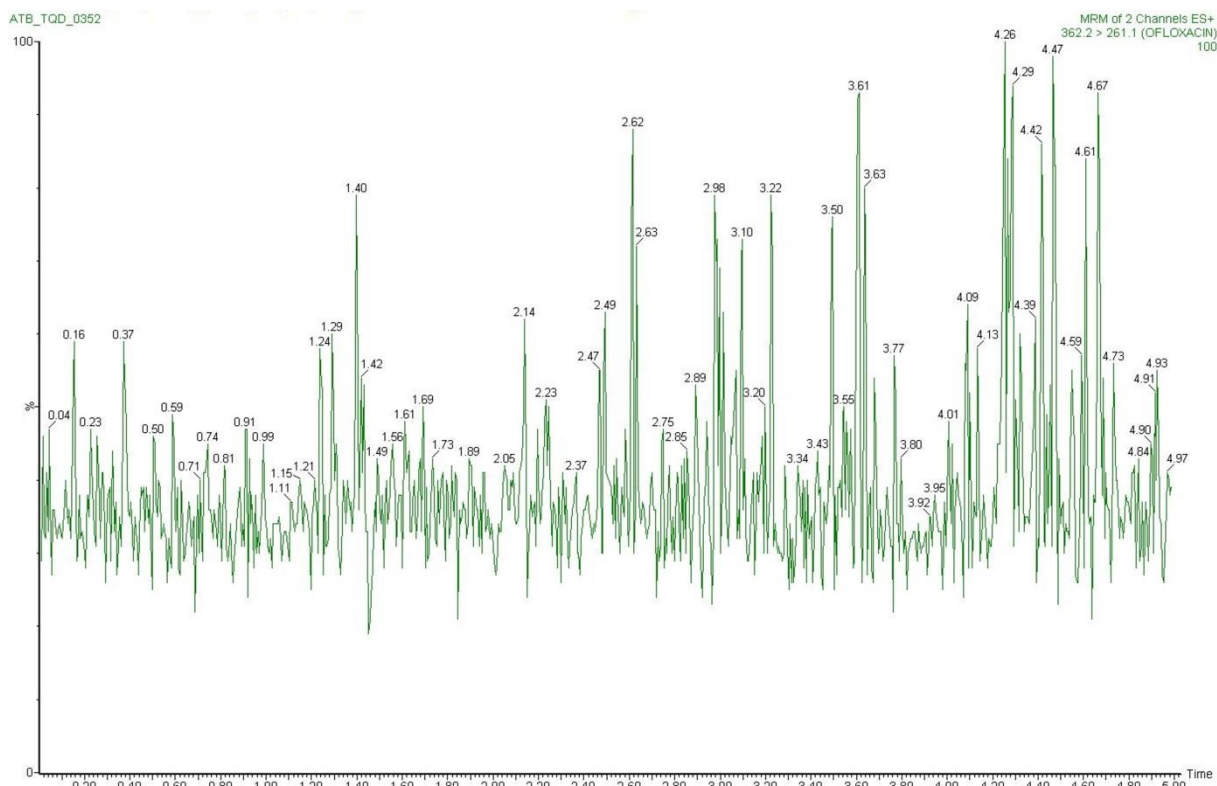
3. 3. 4. Selektivita metody

Je definována jako schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti interferujících látek (matrice). Odezva interferujících látek musí být menší než 1% odezvy nejnižší koncentrace analytu ve vzorku. Zcela selektivní metoda pro analyt je specifická. Selektivita byla posuzována na vzorku dešťové vody a sněhu (negativní kontrola), ve kterém nebyla nalezena žádná koncentrace ofloxacinu (obr. 6 a 7). Selektivita navrhované metody pro ofloxacin byla tedy vyhodnocena jako dostatečná.

Obr. 6: Chromatogram vzorku dešťové vody (z Chomoutova)



Obr. 7: Chromatogram vzorku sněhu (z Břidličné)



3. 3. 5. Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Je to nejmenší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni detekovat, ale které není nutně kvantifikovatelné. Hodnota LOD byla vypočtena pomocí regresní analytické funkce.

Výpočet LOD:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot \sigma}{m},$$

kde σ je standardní odchylka úseku kalibrační přímky a m je její směrnice.

Mez stanovitelnosti odpovídá koncentraci, při které je přesnost stanovení taková, že umožňuje kvantitativní vyhodnocení. Aby byla měřená látka kvantifikovatelná, musí obsahovat minimálně třikrát větší množství než je hodnota detekčního limitu.

Výpočet LOQ:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot \sigma}{m},$$

kde σ je standardní odchylka úseku kalibrační přímky a m je její směrnice.

Příklad stanovení LOD a LOQ z kalibrační křivky ze dne 27. 3. 2017:

Standard sitagliptin:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot 0,001279611}{0,011443836}$$

$$\text{LOD} = 0,37 \text{ ng/ml}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot 0,001279611}{0,011443836}$$

$$\text{LOQ} = 1,12 \text{ ng/ml}$$

Standard ofloxacinu-D3:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot 0,003153533}{0,061313473}$$

$$\text{LOD} = 0,17 \text{ ng/ml}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot 0,003153533}{0,061313473}$$

$$\text{LOQ} = 0,51 \text{ ng/ml}$$

3. 4. Stanovení ofloxacinu v reálných vzorcích

V reálných vzorcích byl ofloxacin detekován a kvantifikován dvěma způsoby. Jednak pomocí izotopicky značeného standardu ofloxacinu (ofloxacinu-D3), který obsahuje tři atomy deuteria způsobující posun m/z (+3 Da) ve spektru a tím odlišení signálu od neznačené látky. Pro řadu látek nejsou izotopicky značené standardy dostupné. V těchto případech je možné volit jako interní standard jinou sloučeninu, která nesmí být přítomna ve vzorku. V této práci byl pro druhý kvantifikační způsob využit sitagliptin, který byl jako vnější standard vybrán náhodně.

Kvantifikace pomocí sitagliptinu

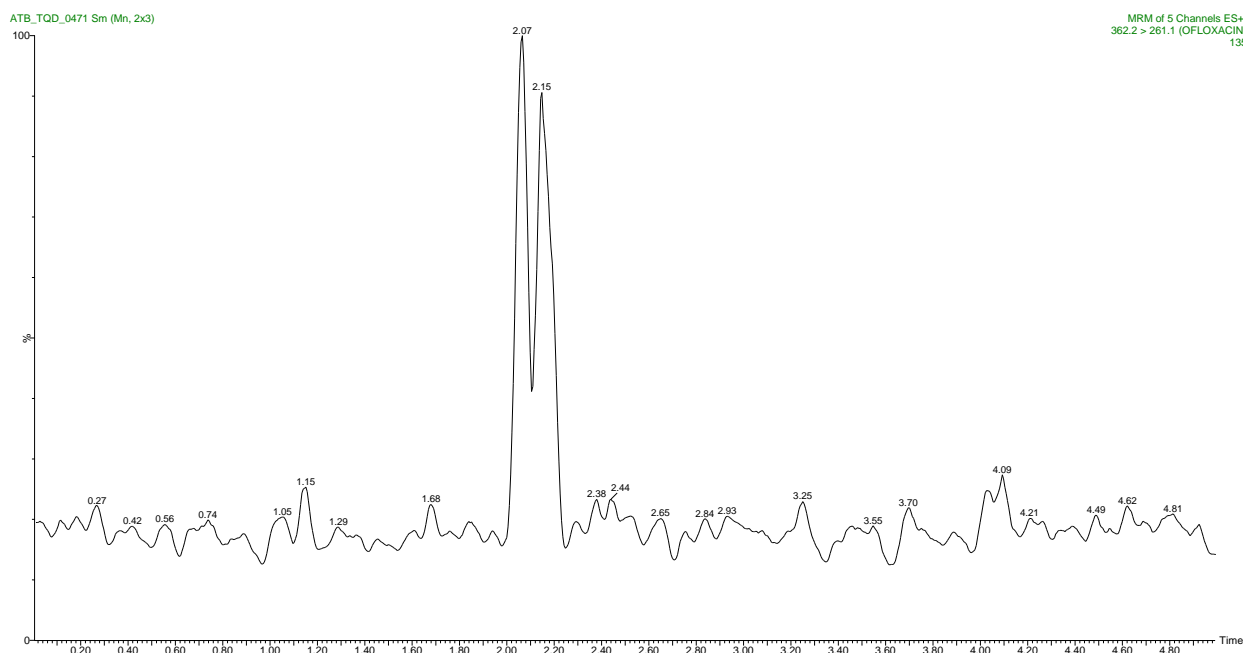
Sitagliptin patří mezi perorální antidiabetika a slouží k farmakologické léčbě diabetes mellitus 2. typu. Koncentrace 100ng/ml interního standardu sitagliptinu byla přidána k měřenému vzorku za kolonou. Roztok sitagliptinu byl kontinuálně přimícháván s průtokem 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ od 1 do 2,5 min analýzy. Po analýze vzorku byly porovnány plochy píku analytu a vnějšího standardu sitagliptinu (tabulka 8-12). Chromatogram znázorňuje jednotlivé analyty ve formě tzv. chromatografických píků (obr. 8, 10, 12, 14, 16). Grafy porovnávají koncentrace ofloxacinu detekované ve vzorcích vod s mezí detekce sitagliptinu (obr. 9, 11, 13, 15, 17).

Kvantifikace pomocí deuterovaného ofloxacinu

Do 1 ml a 50 ml vzorku před extrakcí bylo přidáno 100 ng deuterovaného ofloxacinu. Vzorek spolu s deuterovaným ofloxacinem byly po extrakci analyzovány. Po analýze vzorku byly porovnány plochy píku analytu a vnitřního standardu ofloxacinu-D3.

Podle rovnice ($y = a + bx$) lineární závislosti dvou náhodných proměnných z kalibrační přímky, byly vypočteny koncentrace pro jednotlivé vzorky. Vzorky z jednotlivých extrakcí a měření byly porovnány s detekčními limity pro sitagliptin a ofloxacin-D3 (tabulka 9-11). Data v tabulkách odpovídají dnům, kdy byly prováděny extrakce a analýzy vzorků. Chromatogram znázorňuje jednotlivé analyty ve formě tzv. chromatografických píků (obr. 10, 12, 14, 16). Grafy porovnávají koncentrace ofloxacinu detekované ve vzorcích vod s mezí detekce ofloxacinu-D3 (obr. 11, 13, 15, 17).

Obr. 8: Chromatogram ofloxacinu vzorku 50 ml říční vody (odběr za kolejemi Bedřicha Václavka v Olomouci)



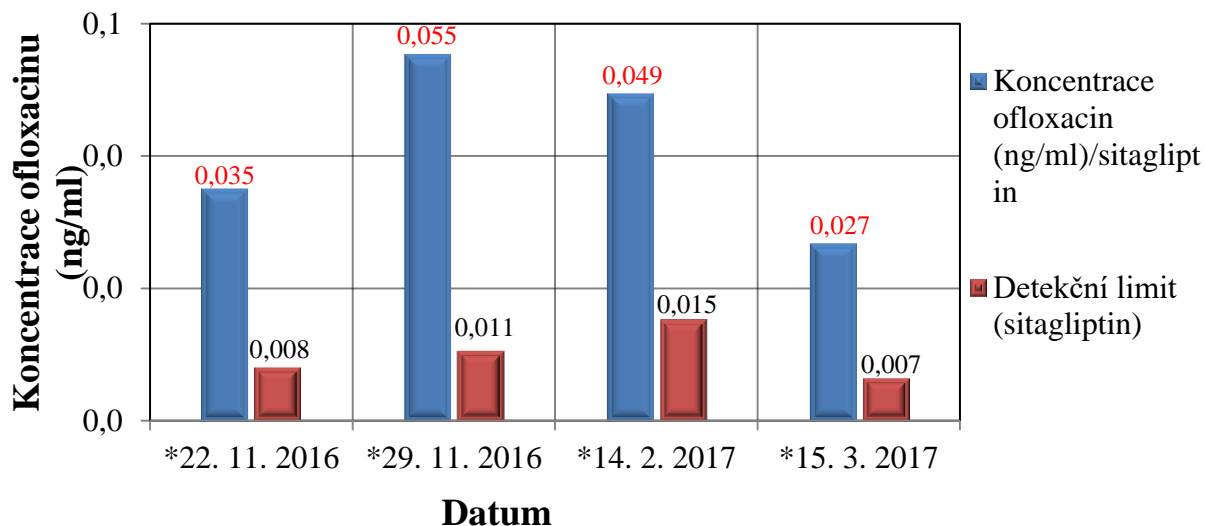
Tabulka 8: Koncentrace ofloxacinu ve vzorku 50 ml říční vody (odběr za kolejemi Bedřicha Václavka v Olomouci) a limity detekce při použití standardu sitagliptinu

Datum měření	Ofloxacin/ sitagliptin (ng/ml)^a	Detekční limit – sitagliptin (ng/ml)^b
22. 11. 2016	0,0351	0,0081
29. 11. 2016	0,0554	0,0106
14. 2. 2017	0,0495	0,0153
15. 3. 2017	0,0269	0,0065

^a Uvedené hodnoty koncentrace ofloxacinu jsou 50x menší oproti hodnotám získaným analýzou extraktů, jelikož extrakce byla provedena s 50 ml vzorku.

^b Uvedené hodnoty detekčního limitu jsou 50x menší oproti hodnotám získaným pomocí korelační analýzy, jelikož extrakce byla provedena s 50 ml vzorku.

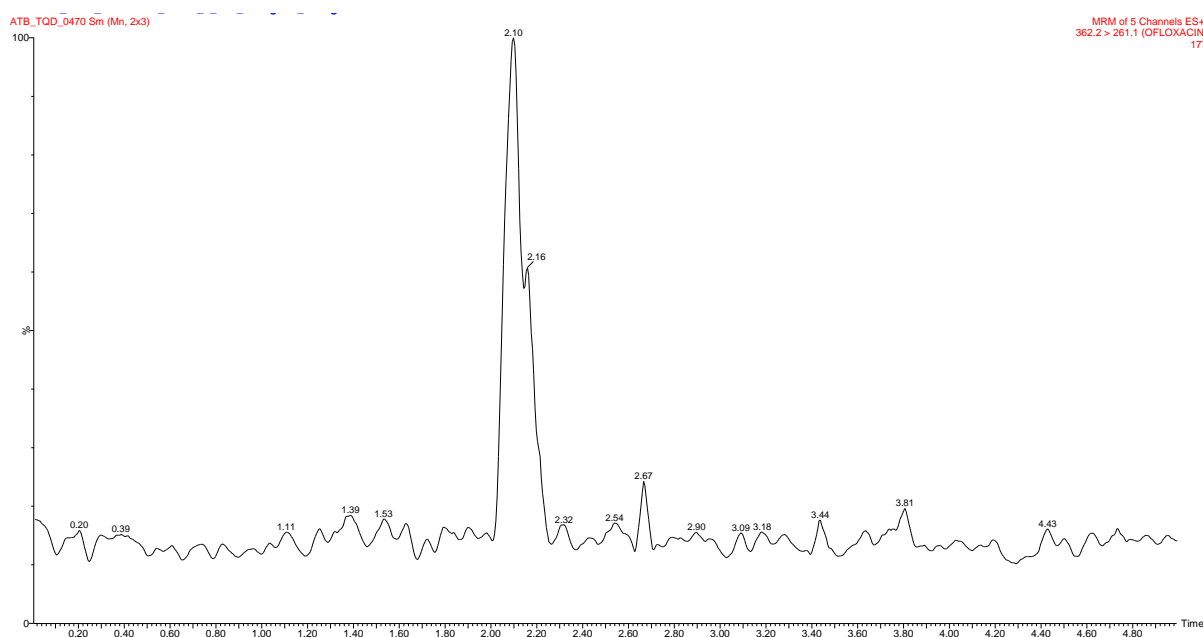
Obr. 9: Graf porovnávající koncentrace ofloxacinu ve vzorku 50 ml říční vody (odběr za kolejemi Bedřicha Václavka v Olomouci) s mezí detekce při použití sitagliptinu jako standardu



Červeně zvýrazněné hodnoty značí kvantifikovatelnou koncentraci ofloxacinu, tedy minimálně třikrát větší než je mez detekce.

Ve vzorku říční vody odebraného za kolejemi Bedřicha Václavka v Olomouci byl ofloxacin stanoven v rozmezí koncentrací od 0,0269 do 0,0554 ng/ml. Ofloxacin byl kvantifikován (hodnoty koncentrace vyšší než LOQ) pomocí standardu sitagliptinu ve všech analýzách v jednotlivých dnech.

Obr. 10: Chromatogram ofloxacinu vzorku 50 ml říční vody (odběr v Chomoutově)



Tabulka 9: Koncentrace ofloxacinu ve vzorku 50 ml říční vody (odběr v Chomoutově) a limity detekce standardu sitagliptinu a ofloxacinu-D3

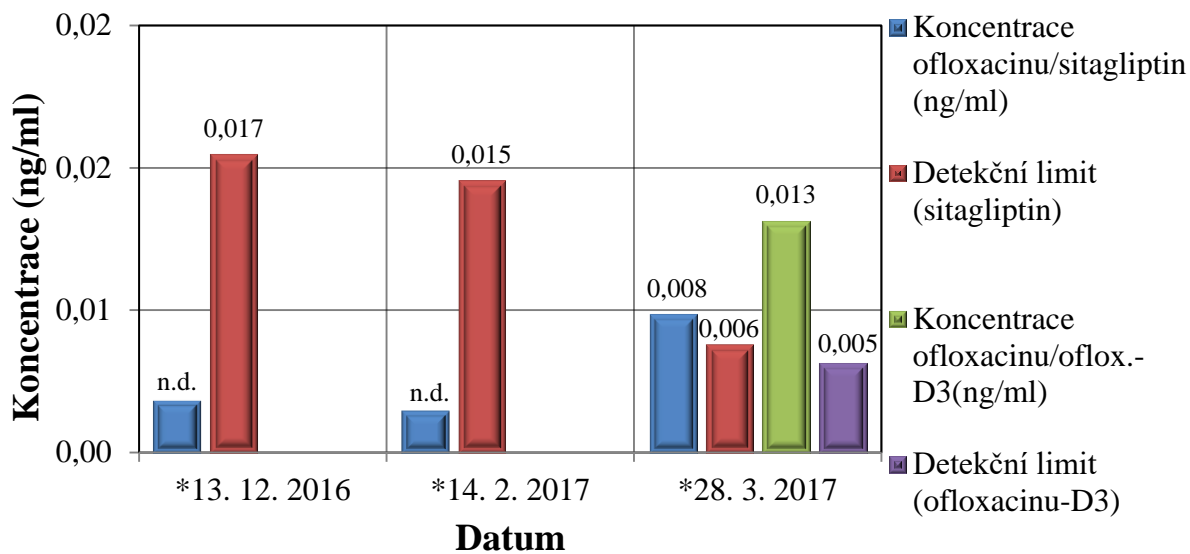
Datum měření	Ofloxacin/ sitagliptin (ng/ml) ^a	Detekční limit – sitagliptin (ng/ml) ^b	Ofloxacin/ ofloxacin-D3 (ng/ml) ^a	Detekční limit –ofloxacin-D3 (ng/ml) ^b
13. 12. 2016	n.d.	0,0167	-	-
14. 2. 2017	n.d.	0,0153	-	-
28. 3. 2017	0,0078	0,0061	0,0130	0,0050

n.d. – analyt nebyl detekován

^aUvedené hodnoty koncentrace ofloxacinu jsou 50x menší oproti hodnotám získaným analýzou extraktů, jelikož extrakce byla provedena s 50 ml vzorku.

^b Uvedené hodnoty detekčního limitu jsou 50x menší oproti hodnotám získaným pomocí korelační analýzy, jelikož extrakce byla provedena s 50 ml vzorku.

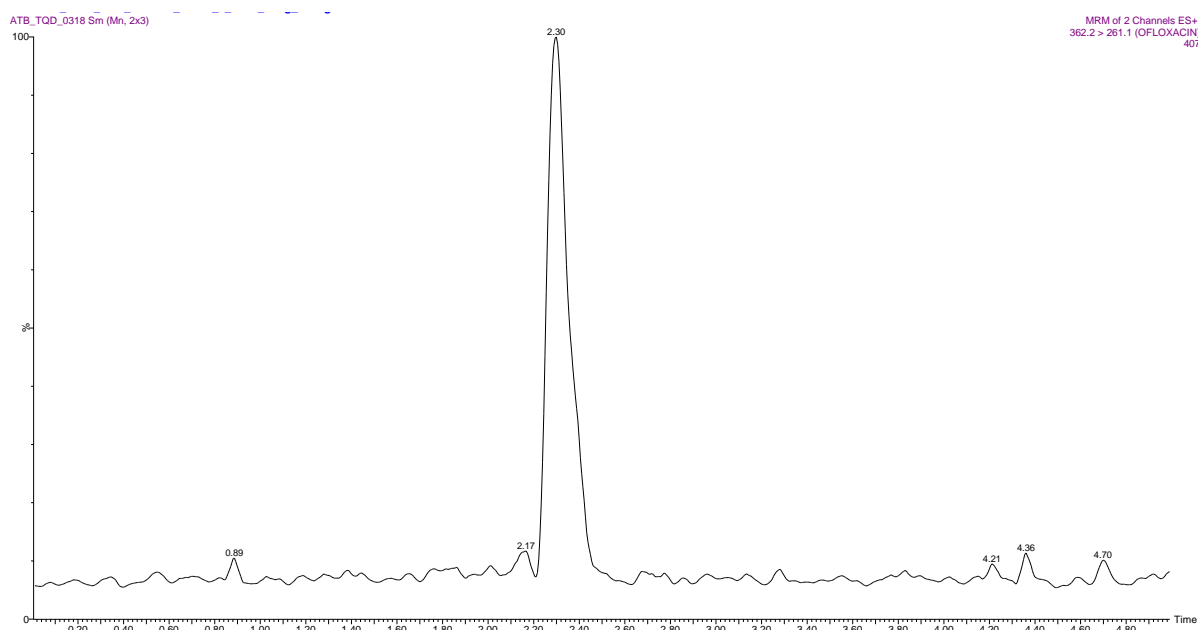
Obr. 11: Graf porovnávající koncentrace ofloxacinu ve vzorku 50 ml říční vody (odběr v Chomoutově) s mezí detekce sitagliptinu a ofloxacinu-D3



n.d. – analyt nebyl detekován

Ve vzorku říční vody odebraného v Chomoutově byl ofloxacin stanoven v koncentraci nižší než je hodnota LOQ (0,0024 – 0,013 ng/ml). V analýzách ze dne 13. 12. 2016 a 14. 2. 2017 nebyl ofloxacin detekován.

Obr. 12: Chromatogram ofloxacinu vzorku 50 ml říční vody (odběr za čističkou odpadních vod v Olomouci)



Tabulka 10: Koncentrace ofloxacinu ve vzorku 50 ml říční vody (odběr za čističkou odpadních vod v Olomouci) a limity detekce standardu sitagliptinu a ofloxacinu-D3

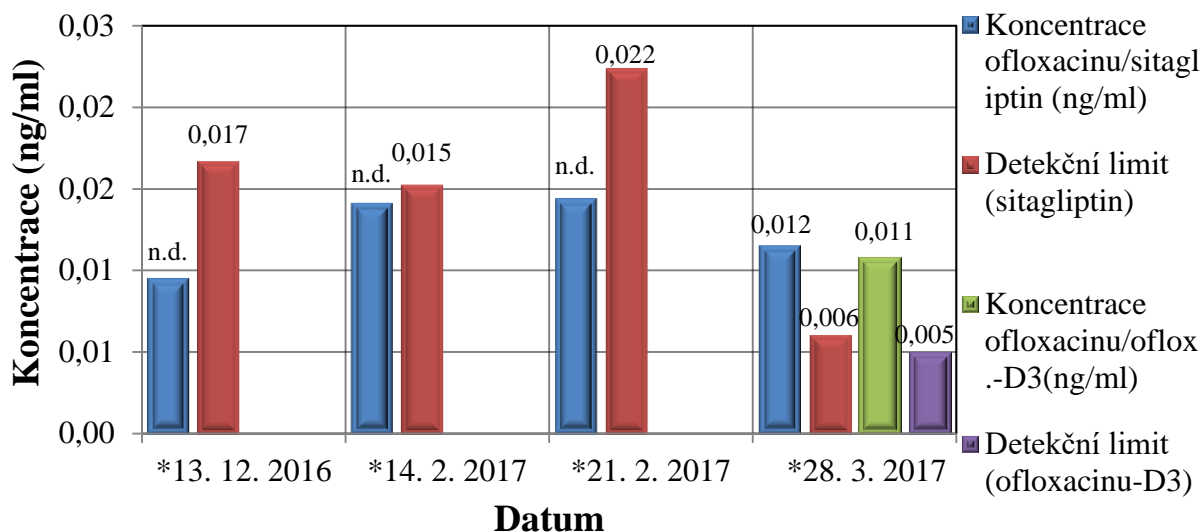
Datum měření	Ofloxacin/ sitagliptin (ng/ml) ^a	Detekční limit - sitagliptin (ng/ml) ^b	Ofloxacin/ ofloxacin-D3 (ng/ml) ^a	Detekční limit – ofloxacin-D3 (ng/ml) ^b
13. 12. 2016	n.d.	0,0167	-	-
14. 2. 2017	n.d.	0,0153	-	-
21. 2. 2017	n.d.	0,0224	-	-
28. 3. 2017	0,0116	0,0061	0,0108	0,0050

n.d. – analyt nebyl detekován

^a Uvedené hodnoty koncentrace ofloxacinu jsou 50x menší oproti hodnotám získaným analýzou extraktů, jelikož extrakce byla provedena s 50 ml vzorku.

^b Uvedené hodnoty detekčního limitu jsou 50x menší oproti hodnotám získaným pomocí korelační analýzy, jelikož extrakce byla provedena s 50 ml vzorku.

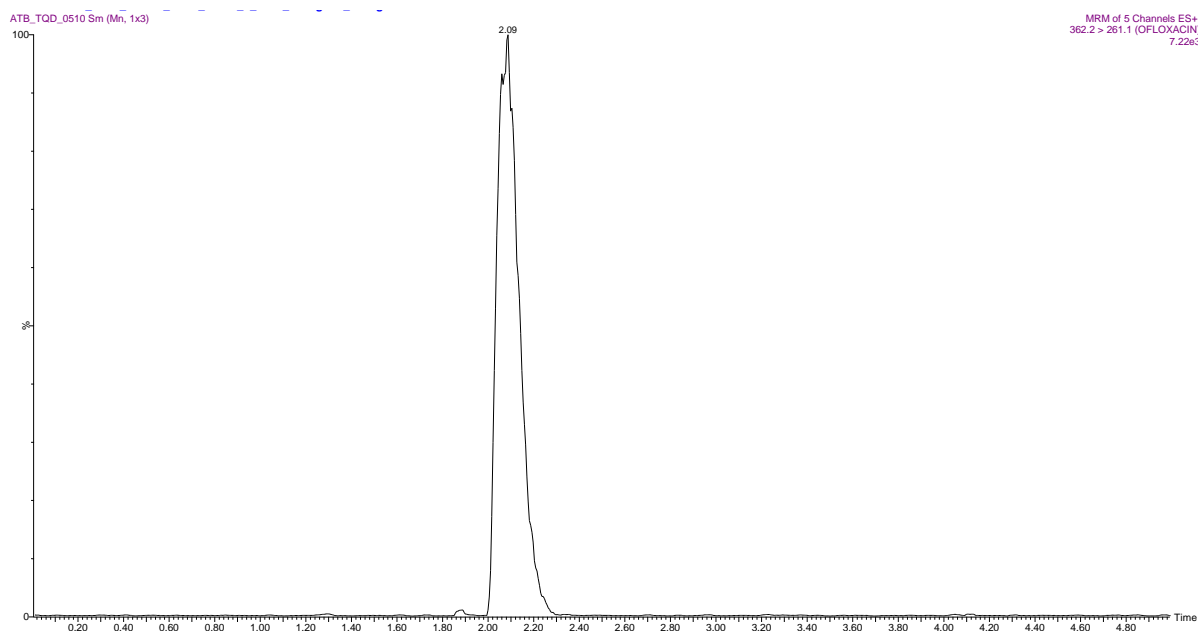
Obr. 13: Graf porovnávající koncentrace ofloxacinu ve vzorku 50 ml říční vody (odběr za čističkou odpadních vod v Olomouci) s mezí detekce sitagliptinu a ofloxacinu-D3



n.d. – analyt nebyl detekován

Ve vzorku řeky odebraného za čističkou odpadních vod v Olomouci byl ofloxacin detekován pouze při analýze ze dne 28. 3. 2017. Koncentrace ofloxacinu v této analýze byla nižší než je hodnota LOQ (0,0108 a 0,0116 ng/ml) V ostatních dnech nebyl ofloxacin detekován.

Obr. 14: Chromatogram ofloxacinu vzorku 1 ml z odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci (za čističkou odpadních vod)

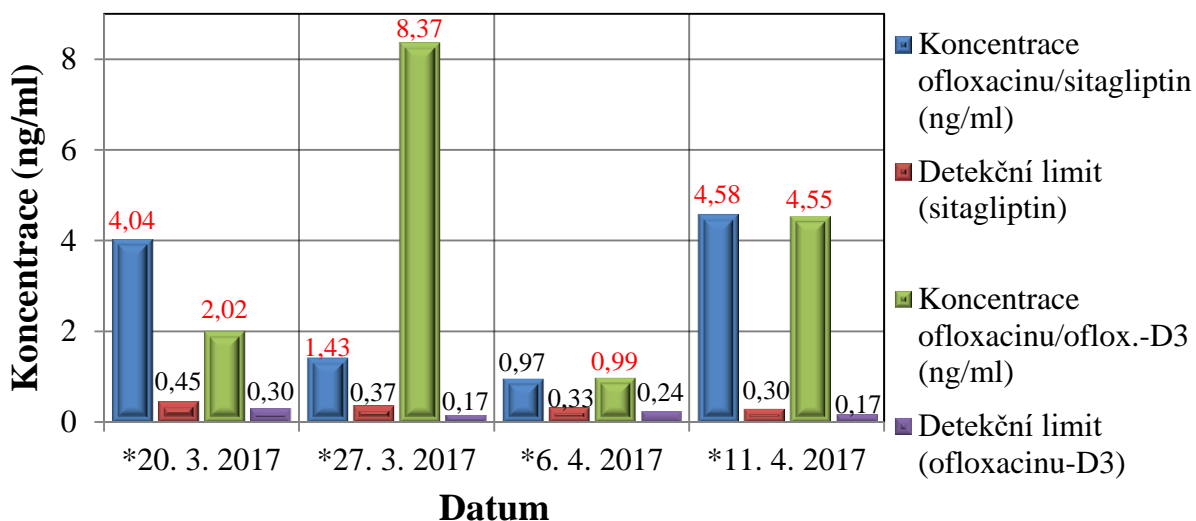


Tabulka 11: Koncentrace ofloxacinu ve vzorku 1 ml z odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci (za čističkou odpadních vod) a limity detekce standardu sitagliptinu a ofloxacinu-D3

Datum měření	Ofloxacin/ sitagliptin (ng/ml)	Detekční limit - sitagliptin (ng/ml)	Ofloxacin/ ofloxacin-D3 (ng/ml)	Detekční limit – ofloxacin-D3 (ng/ml)
20. 3. 2017	4,04 (1ml)	0,45	2,02 (1ml)	0,30
27. 3. 2017	1,43 (1ml)	0,37	8,37 (1ml)	0,17
6. 4. 2017	0,97 (1ml)	0,33	0,99 (1ml)	0,24
11. 4. 2017	4,58 ^a (1ml + 49ml H ₂ O)	0,30	4,55 ^a (1ml + 49ml H ₂ O)	0,17

^a 1 ml vzorku odpadní vody zředěn na 50 ml neionizovanou vodou a poté provedena extrakce; výsledek experimentu potvrzuje, že při nanášení objemu 50 ml vzorku nedochází ke ztrátám analytu

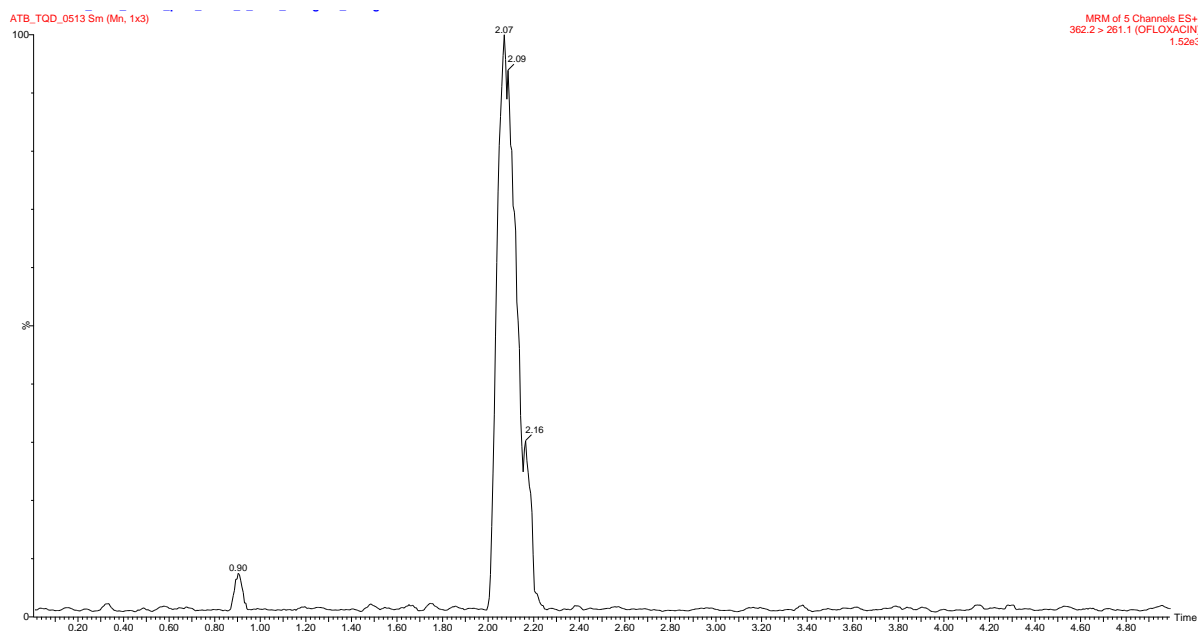
Obr. 15: Graf porovnávající koncentrace ofloxacinu 1 ml z odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci (za čističkou odpadních vod) s mezí detekce sitagliptinu a ofloxacinu-D3



Červeně zvýrazněné hodnoty značí kvantifikovatelnou koncentraci ofloxacinu, tedy minimálně třikrát větší než je mez detekce.

Ve vzorku odpadní vody odebraného za čističkou odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci byl ofloxacin stanoven v rozmezí koncentrací od 0,97 do 8,37 ng/ml. Variace stanovených koncentrací může být způsobena např. různou mírou sorpce ofloxacinu na pevné částice přítomné ve vzorku při opakovaném rozmrazování a zmrazování vzorku. V tomto vzorku byl ofloxacin kvantifikován (koncentrace vyšší než je hodnota LOQ) u všech analýz v jednotlivých dnech.

Obr. 16: Chromatogram ofloxacinu vzorku 1 ml z odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci (před čističkou odpadních vod)



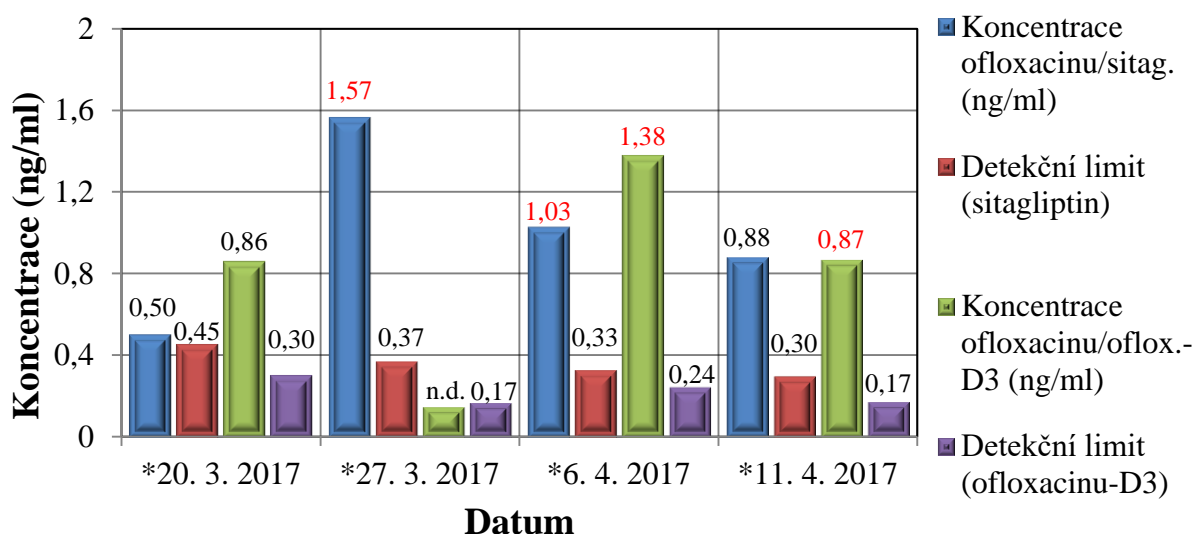
Tabulka 12: Koncentrace ofloxacinu ve vzorku 1 ml z odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci (před čističkou odpadních vod) a limity detekce standardu sitagliptinu a ofloxacinu-D3

Datum měření	Ofloxacin/ sitagliptin (ng/ml)	Detekční limit - sitagliptin (ng/ml)	Ofloxacin/ ofloxacin-D3 (ng/ml)	Detekční limit – ofloxacin-D3 (ng/ml)
20. 3. 2017	0,50 (1ml)	0,45	0,86 (1ml)	0,30
27. 3. 2017	1,57 (1ml)	0,37	n.d. (1ml)	0,17
6. 4. 2017	1,03 (1ml)	0,33	1,38 (1ml)	0,24
11. 4. 2017	0,88 ^a (1ml + 49ml H ₂ O)	0,30	0,87 ^a (1ml + 49ml H ₂ O)	0,17

n.d. – analyt nebyl detekován

^a 1 ml vzorku odpadní vody zředěn na 50 ml neionizovanou vodou a poté provedena extrakce; výsledek experimentu potvrzuje, že při nanášení objemu 50 ml vzorku nedochází ke ztrátám analytu

Obr. 17: Graf porovnávající koncentrace ofloxacinu 1 ml z odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci (před čističkou odpadních vod) s mezí detekce sitagliptinu a ofloxacinu-D3



Červeně zvýrazněné hodnoty značí kvantifikovatelnou koncentraci ofloxacinu, tedy minimálně třikrát větší než je mez detekce.

n.d. – analyt nebyl detekován

Ve vzorku odpadní vody odebraného před čističkou odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci byl ofloxacin stanoven v rozmezí koncentrací od 0,24 do 1,57 ng/ml. Odlišnost výsledků může být opět způsobena různou mírou sorpce analytu na pevné částice, příp. náhodnou chybou jednotlivých extrakcí a analýz. V tomto vzorku byl ofloxacin kvantifikován pomocí sitagliptinu i ofloxacinu-D3 jen dne 6. 4. 2017. Dne 27. 3. 2017 byl ofloxacin kvantifikován pouze pomocí standardu sitagliptinu a dne 11. 4. 2017 byl ofloxacin kvantifikován pouze pomocí ofloxacinu-D3. V ostatních vzorcích se hodnoty pohybovaly pod mezí stanovitelnosti. Při porovnání vzorků z odpadních vod Fakultní nemocnice byly detekovány vyšší hodnoty ofloxacinu u vzorku odebraného za čističkou odpadních vod.

4. Diskuze

Podmínky pro UHPLC-MS separaci a identifikaci antibiotika ofloxacinu byly optimalizovány. Pro validaci analytické metody byly vyhodnoceny jednotlivé validační parametry, jako je přesnost metody - opakovatelnost, mezilehlá preciznost; správnost metody; linearita; selektivita; mez detekce a mez stanovitelnosti. Validační studie dokázaly, že celý postup je přesný a opakovatelný. Popsaná UHPLC-MS metoda umožňuje rychlé (analýza 5 min) a selektivní stanovení ofloxacinu ve vodě. Výhodou této metody je automatizace, vysoká selektivita, nízká spotřeba rozpouštědla a vzorku. Metoda umožňuje detekovat antibiotikum ve vodách v minimálních koncentracích (ng/ml).

Ofloxacin byl ve vzorku říční vody odebraného za koleje Bedřicha Václavka stanoven v rozsahu koncentrací od 0,0269 do 0,0554 ng/ml. V tomto vzorku byl ofloxacin kvantifikován (koncentrace vyšší než je mez stanovitelnosti) ve všech analýzách v jednotlivých dnech. Ve vzorku říční vody odebraného v Chomoutově byl ofloxacin stanoven při analýze ze dne 28. 3. 2017 v koncentraci nižší než je mez stanovitelnosti (0,0078 - 0,0130 ng/ml) a v ostatních analýzách nebyl detekován (koncentrace nižší než je mez detekce). Ve vzorku říční vody odebraného za čističkou odpadních vod v Olomouci byl ofloxacin detekován v rozmezí koncentrací od 0,0116 do 0,018 ng/ml dne 28. 3. 2017. Při analýzách v ostatních dnech nebyl v tomto vzorku ofloxacin detekován. Hodnoty koncentrací a limit detekce metody byly 50x nižší ve srovnání s odpovídajícími instrumentálními parametry, jelikož extrakce byla provedena s 50 ml vzorku a tento objem byl zredukován na 1 ml k analýze.

V dalších studiích byly jiná antibiotika spolu s ofloxacinem detekována ve vyšších koncentracích. Pena et al. (2007) analyzovali fluorochinoliny (norfloxacin, ciprofloxacin a enrofloxacin) v řece Mondego v Portugalsku. Koncentrace těchto antibiotik byla stanovena v rozsahu 67 – 102, 5 ng/l. Zhou et al. (2012) analyzovali antibiotika ve vzorcích vodovodu, říčních vod a ČOV z výtoků ze Sussex County v Anglii. U vzorků říční vody našli maximální koncentraci silfathiazolu (1 ng/l) a erythromycinu (28 ng/l). Maximální koncentrace erythromycinu v odpadních vodách byla 230 ng/l. Koncentrace ofloxacinu v této studii byla pod mezí detekce jak v pitné, říční i odpadní vodě. Dinh et al. (2011) analyzovali 12 antibiotik ve vzorcích tří řek v oblasti pánve Seine v rozmezí koncentrací od 2,3 do 1434,7 ng/l. Ofloxacin byl v jejich studii stanoven v rozmezí koncentrací od 2,3 do 231 ng/l.

Ve vzorcích odebraných z odpadních vod Fakultní nemocnice v Olomouci byla stanovena koncentrace v rozmezí od 0,97 do 8,37 ng/ml za čističkou odpadních vod a od 0,15 do 1,57 ng/ml před čističkou odpadních vod. Ofloxacin u vzorku za čističkou odpadních vod byl kvantifikován ve všech analýzách v jednotlivých dnech. Ofloxacin ve vzorku před čističkou byl kvantifikován pomocí standardu sitagliptinu i ofloxacinu-D3 dne 6. 4. 2017. Dne 27. 3. 2017 byl ofloxacin kvantifikován pouze pomocí vnitřního standardu sitagliptinu a dne 11. 4. 2017 byl ofloxacin kvantifikován pouze pomocí standardu ofloxacinu-D3. Při porovnání vzorků odebraných před a za čističkou odpadních vod Fakultní nemocnice byly detekovány vyšší koncentrace ofloxacinu u vzorku odebraného za čističkou. Hodnoty se liší z toho důvodu, že koncentrace ofloxacinu na přítoku v čase kolísá a vzorek odebraný v proudu před čističkou v daném čase neodpovídá proudu za čističkou. Při porovnání vzorků odebraných v řece se vzorky odebranými z nemocniční odpadní vody, byla v odpadní vodě nalezena řádově více než stokrát vyšší koncentrace ofloxacinu.

Vieno et al. (2007) analyzovali ofloxacin v odpadních vodách ve Finsku v maximální koncentraci 350 ng/l. Eleni et al. (2007) detekovali léčiva v odpadních vodách v Řecku. Hodnoty koncentrace sulfamethazinu se pohybovaly v rozsahu 95 – 120 ng/l, trimethoprimu v rozsahu 12 – 300 ng/l a diklofenaku v rozsahu 30 – 120 ng/l. Chang et al. (2008) stanovovali antibiotika v odpadních a říčních vodách v Japonsku. Antibiotika jako sulfisomidin, sulfamethoxazol, sulfadimethoxin a sulfapyridin stanovovali ve vzorcích odpadních vod s koncentrací v rozmezí od 0,08 ng/l do 161 ng/l. Antibiotika jako sulfaquinoxalin, sulfamethizol, trimethoprim, sulfamethoxazol a sulfisomidin stanovovali ve vzorcích říčních vod Koyama povodí v koncentracích od 0,03 ng/l do 8,9 ng/l. Tylová et al. (2013) analyzovali antibiotika v šesti lokalitách odpadních vod v České Republice. Koncentrace antibiotik se pohybovaly v rozmezí od 5 ng/l (lincomycin) do 1287,9 (clarithromycin) ng/l. Minh et al. (2009) zjistili nejvyšší koncentrace ofloxacinu v odpadních vodách v Hong Kongu (až 7870 ng/l).

Ve své studii Tay et al. (2015) poukazuje na to, že ofloxacin je škodlivý pro vodní organismy (ryby, hrotnatka, řasy) ve formě OFX-336A v koncentracích od 15,6 do 31,1 mg/l a ve formě OFX-364 v koncentraci 75,4 mg/l. Koncentrace v rozmezí od 0,0078 do 8,37 ng/ml stanovené v této studii jsou tak nízké, že nejsou toxické ani nijak škodlivé pro vodní organismy.

5. Závěr

Cílem diplomové práce bylo nalezení vhodných parametrů HPLC separace, ionizace a hmotnostně spektrometrické detekce analytů. Dalším cílem bylo vypracování vhodného postupu přípravy modelových a reálných vzorků pro HPLC/MS analýzu a stanovení validačních parametrů metody.

V teoretické části diplomové práce byl popsán výskyt a zdroje antibiotik v životním prostředí, zejména ve vodách. Dále bylo v práci popsáno využití a účinky antibiotik a možná rezistence bakterií na antibiotika v různých prostředích. Další část diplomové práce se zaměřuje na popsání metod pro stanovení antibiotik v životním prostředí.

V experimentální části diplomové práce je popsán materiál a metodika pro stanovení antibiotika ofloxacinu v modelových a reálných vzorcích vody. Pro extrakci analytu z vodné matrice byla využita extrakce na pevné fázi. Pro separaci a identifikaci antibiotika ofloxacinu byla využita kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií využívající ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Parametry ionizace a hmotnostně spektrometrické detekce analytů byly optimalizovány. Validační studie dokázaly, že celý postup poskytuje dostatečně přesné a správné výsledky. Metoda umožňuje detekovat antibiotikum v minimálních koncentracích. Za využití objemu 50 ml vzorku bylo možné detekovat koncentraci v pg/ml.

V naší studii byl ofloxacin stanoven v povrchových a odpadních vodách v rozsahu koncentrací od 0,0078 do 8,37 ng/ml, které jsou mnohem nižší než koncentrace ofloxacinu nalezené v jiných zemích. Ofloxacin detekovaný v takto nízkých koncentracích není toxický ani nijak škodlivý pro vodní a suchozemské organismy.

6. Seznam použité literatury:

1. Al-Ahmad A., Haiß A., Unger J., Brunswick-Tietze A., Wiethan J., Kümmerer K. (2009). Effects of a Realistic Mixture of Antibiotics on Resistant and Nonresistant Sewage Sludge Bacteria in Laboratory-Scale Treatment Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online], vol. 57(2), p. 264–273
2. Al-Odaini N.A., Zakaria M.P., Yaziz M.I., Surif S. (2010). Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online], vol. 1217 (44), p. 6791-6806
3. Alanis A.J. (2005). Alanis Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research* [online], vol. 36, p. 697–705
4. Backhaus T., Grimme L.H. (1999). The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* [online], vol. 38, p. 3291–3301
5. Batt A.L, Aga D. (2005). Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 77, p. 2940–2947
6. Björkman J., Nagaev I., Berg O.G., Hughes D., Andersson D.I. (2000). Effects of Environment on Compensatory Mutations to Ameliorate Costs of Antibiotic Resistance. *Science* [online], vol. 287, p. 1479–1482
7. Blanchflower W.J., McCracken R.J., Haggan A.S., Kennedy D.G. (1997). Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online], vol. 692 (2), p. 351-360

8. Botitsi E., Frosyni C., D. Tsipi (2007). Determination of pharmaceuticals from different therapeutic classes in wastewaters by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 387(4), p. 1317-1327
9. Caplin J.L., Hanlon G.W., Taylor H.D. (2008). Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. *Environmental Microbiology* [online], vol. 10, p. 885–892
10. Córdova-Kreylos A.L., Scow K.M. (2007). Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. *The ISME Journal* [online], vol. 1, p. 585–595
11. Davison J. (1999). Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. *Plasmid* [online], vol. 42, p. 73–91
12. Dinh T., Alliot Q. F., Moreau-guigon E., Eurin J., Chevreuil M., Labadie P. (2011). Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC–MS/MS. *Talanta* [online], vol. 85(3), p. 1238-1245
13. Froehner K., Backhaus T., Grimme L.H. (2000). Grimme Bioassays with *Vibrio fischeri* for the assessment of delayed toxicity. *Chemosphere* [online], vol. 40, p. 821–828
14. Gartiser S., Urich E., Alexy R., Kümmerer K. (2007). Anaerobic inhibition and biodegradation of antibiotics in ISO test schemes. *Chemosphere* [online], vol. 66, p. 1839–1848
15. Gros M., Petrović M., Barceló D. (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], vol. 386 (4), p. 941-952
16. Guardabassi L., Petersen A., Olsen J.E., Dalsgaard A. (1998). Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, p. 3499–3502

17. Halling-Sørensen B. (2000). Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming. *Chemosphere* [online], vol. 40, p. 731–739
18. Hektoen H., Berge J.A., Hormazabal V., Yndestad M. (1995). Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture* [online], vol. 133, p. 175–184
19. Hernández F., Sancho J.V., Ibáñez M., Guerrero C. (2007). Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online], vol. 26, p. 466–485
20. Hernando M.D., De Vettori S., Martínez-Bueno M.J., Fernández-Alba A.R. (2007). Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture. *Chemosphere* [online], vol. 68, p. 724–730
21. Chang H., Hu J., Asami M., Kunikane S. (2008). Simultaneous analysis of 16 sulfonamide and trimethoprim antibiotics in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online], vol. 1190, p. 390–393
22. Christensen A.M., Ingerslev F., Braun A. (2006). Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquaculture. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online], vol. 25, p. 2208–2215
23. Christian T., Schneider R.J., Färber H.A., Skutlarek D., Meyer M.T., Goldbach H.E. (2003). Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters [online], vol. 3, p. 36–44
24. Chuanchuen R., Beinlich K., Hoang T.T., Becher A., Karkhoff-Schweizer R.R., Schweizer H.P. (2001). Cross-Resistance between Triclosan and Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by Multidrug Efflux Pumps: Exposure of a Susceptible Mutant Strain to Triclosan Selects *nfxB* Mutants Overexpressing *MexCD-OprJ*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online], vol. 45, p. 428–432

25. Joshi S. (2002). HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online], vol. 28(5), p. 795-809
26. Khachatourians G. (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association Journal*, vol. 159, p. 1129–1136
27. Kim S.C., Carlson K. (2007). Temporal and spatial trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in aqueous and river sediment matrices. *Environmental Science & Technology*, vol. 41, p. 50–57
28. Kim Y., Choi K., Jung J., Park S., Kim P.G., Park J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International* [online], vol. 33, p. 370–375
29. King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., Miller-Stein C., Olah, T. (2000). Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online], vol. 11 (11), p. 942-950
30. Kong W.D., Zhu Y.G., Fu B.J., Marschner P., He J.Z. (2006). The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community. *Environmental Pollution* [online], vol. 143, p. 129–137
31. Kumazawa T., Lee X.-P., Sato K., Suzuki O. (2003). Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. *Analytica Chimica Acta* [online], vol. 492(1-2), p. 49-67
32. Kümmerer K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online], vol. 52, p. 5–7

33. Kümmerer K., Henninger A. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 9, p. 1203–1214
34. Kümmerer K., Alexy R., Hüttig J., Schöll A. (2004). Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria. *Water Research* [online], vol. 38, p. 2111–2116
35. Kümmerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* [online], vol. 75(4), p. 417-434
36. Kümmerer K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. *Chemosphere* [online], vol. 75(4), p. 435-441
37. Lanzky P.F., Halling-Sørensen B. (1997). The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. *Chemosphere* [online], vol. 35, p. 2553–2561
38. Li B., Zhang T., Xu Z., Fang H. H. P. (2009). Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online], vol. 645 (1–2), p. 64–72
39. Lin W., Chen H., Ding W. (2005). Determination of pharmaceutical residues in waters by solid-phase extraction and large-volume on-line derivatization with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online], vol. 1065(2), p. 279-285
40. Lindberg R., Jarnheimer P.A., Olsen B., Johansson M., tysklind M. (2004). Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere* [online], vol. 57, p. 1479–1488

41. Lorian V. (2005). *Antibiotics in Laboratory Medicine* (fifth edition). Lippincott Williams & Wilkins, p- 832.
42. Macri A., Stazi A.V., Dojmi di Delupis G. (1988). Acute toxicity of furazolidone on *Artemia salina*, *Daphnia magna*, and *Culex pipiens molestus* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 16, p. 90–94
43. Martinez J.L., Baquero F. (2000). Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 44, p. 1771–1777
44. Martins A.F., Vasconcelos T.G., Henriques D.M., Frank C.D., König A., Kümmerer K. (2008). Concentration of Ciprofloxacin in Brazilian Hospital Effluent and Preliminary Risk Assessment: A Case Study. *CLEAN – Soil, Air, Water* [online], vol. 36, p. 264–269
45. Mc Ardell C., Alder A., Göbel A., Löffler D., Suter M. & Ternes T. (2006). Analytical Methods In: *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management*. IWA
46. McMurry L.M., Oethinger M. (1998). Levy Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* [online], vol. 166, p. 305–309
47. Minh T.B., Leung H.W., Loi I.H, Chan W.H., So M.K, Mao J.Q., Choi D., Lam J.C., Zheng G., Martin M., Lee J.H., Lam P.K., Richardson B.J. (2009). Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: Ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour. *Marine Pollution Bulletin* [online], vol. 58(7), p. 1052-1062
48. Migliore L., Brambilla G., Grassitellis A., Dojmi di Delupis G. (1993). Toxicity and bioaccumulation of sulphadimethoxine in *Artemia* (Crustacea, Anostraca). *International Journal of Salt Lake Research*, vol. 2, p. 141–152

49. Michel C., Aldermand D.J. (1992) Chemotherapy in Aquaculture: From theory to reality. Office International des Epizooties, Paris, p. 152–161
50. Mölsted S., Lundborg C.S., Karlsson A.K., Cars O. (2002). Antibiotic prescription rates vary markedly between 13 European countries Scandinavian Journal of Infectious Diseases [online], vol. 34, p. 366–371
51. Ohlsen K., Werner G., Ternes T., Ziebuhr W., Witte W., Hacker J. (2003). Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage. Environmental Microbiology [online], vol. 5, p. 711–716
52. Ohlsen K., Ziebuhr W., Koller K., Hell W., Wichelhaus T.A., Hacker J. (1998). Effects of sub inhibitory concentrations of antibiotics on *hla* gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrob Agents Chemother, vol. 42, p. 2817–2823
53. Pena A., Chmielova D., Lino C. M., Solich P. (2007). Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego River by high performance liquid chromatography using a monolithic column. Journal of Separation Science [online], vol. 30(17), p. 2924-2928
54. Park S., Choi K. (2008). Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. Ecotoxicology [online], vol. 17(6), p. 526-538
55. Peak N., Knapp C.W., Yang R.K., Hanfelt M.M., Smith M.S., Aga D.S., Graham D.W. (2007). Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. Environmental Microbiology [online], vol. 9, p. 143–151
56. Peng X., Tan J., Tang C., Yu Y., Wang Z. (2008). Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China. Environmental Toxicology and Chemistry [online], vol. 27, p. 73–79

57. Petrović M., Hernando MD, Díaz-Cruz MS, Barceló D. (2005). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A* [online], vol. 1067 (1-2), p. 1-14
58. Pomati F., Orlandi C., Clerici M., Luciani F., Zuccato E. (2008). Effects and interactions in an environmentally relevant mixture of pharmaceuticals. *Toxicological Sciences*, vol. 102 (1), p. 129-137
59. Pruden A., Pei R., Storteboom H., Carlson K.H. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental Science & Technology*, vol. 40, p. 7445–7450
60. Pryde A., Gilbert M.T. (1979). *Applications of High Performance Liquid Chromatography*. London:Chapman and Hall, London
61. Russel A.D. (2000). Do Biocides Select for Antibiotic Resistance?*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online], vol. 52, p. 227–233
62. Sapkota A.R., Curriero F.C., Gibson K.E., Schwab K.J. (2007). Antibiotic-resistant Enterococci and fecal indicators in surface water and groundwater impacted by a concentrated Swine feeding operation. *Environ Health Perspect*, vol. 115, p. 1040–1045
63. Scoaris D.O., Colacite J., Nakamura C.V., Ueda-Nakamura T., de Abreu Filho B.A., Dias Filho B.P. (2007). Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie van Leeuwenhoek* [online], vol. 93, p. 111–122
64. Serrano P.H. (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. *Fisheries Technical Paper* 469, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome

65. Shaaban H., Górecki T. (2011). High temperature–high efficiency liquid chromatography using sub-2 μ m coupled columns for the analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and veterinary antibiotics in environmental samples. *Analytica Chimica Acta* [online], vol. 702(1), p. 136-143
66. Schlüter A., Szczepanowski R., Pühler A., Top E.M. (2007). Top Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiology Reviews* [online], vol. 31, p. 449–477
67. Schwartz T., Volkmann H., Kirchen S., Kohnen W., Schön-Hölz K., Jansen B., Obst U. (2006). Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiology Ecology* [online], vol. 57, p. 158–167
68. Sjölund M., Bonnedahl J., Hernandez J., Bengtsson S., Pinhassi J., Kahlmeter G., Olsen B. (2008). Dissemination of Multidrug-Resistant Bacteria into the Arctic. *Emerging Infectious Diseases* [online], vol. 14(1), p. 70–72
69. Sterner J.L., Johnston M.V., Nicol G.R., Ridge D.P. (2000). Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples. *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 35 (3), p. 385-391
70. Stoob K., Singer H.P., Mueller S.R., Schwarzenbach R.P., Stamm C.H. (2007). Dissipation and Transport of Veterinary Sulfonamide Antibiotics after Manure Application to Grassland in a Small Catchment. *Environmental Science & Technology* [online], vol. 41, p. 7349–7355
71. Tay K. S., Madehi N. (2015). Ozonation of ofloxacin in water: By-products, degradation pathway and ecotoxicity assessment. *Science of The Total Environment* [online], vol. 520, p. 23-31

72. Turiel E., Bordin G., Rodríguez A.R. (2005). Determination of quinolones and fluoroquinolones in hospital sewage water by off-line and on-line solid-phase extraction procedures coupled to HPLC-UV. *Journal of Separation Science* [online], vol. 28, p. 257–267
73. Vanneste J.L., Cornish D.A., Yu J., Boyd R.J., Morris C.E. (2008). Isolation of copper and streptomycin resistant phytopathogenic *Pseudomonas Syringae* from lakes and rivers in the central north island of New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, vol. 61, p. 80–85
74. Vieno N., Tuhkanen T., Kronberg L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water Research* [online], vol. 41(5), p. 1001-1012
75. Watkinson A.J., Micalizzi G.B., Graham G.M., Bates J.B., Costanzo S.D. (2007). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* in wastewaters, surface waters, and oysters from an urban riverine system. *Applied and environmental microbiology*, vol. 73, p. 5667–5670
76. Wiethan J., Unger J., Brunswik-Titze A., Kümmerer K. (2001). Occurrence and reduction of antibiotic resistant (pathogenic) bacteria in municipal sewage treatment plants. In: International Water Association, World Congress, Berlin, 15.-19.10, Proceedings.
77. Wollenberger L., Halling-Sørensen B., Kusk K.O. (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere* [online], vol. 40, p. 723–730
78. Water Using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online], vol. 79, p. 1135–1144
79. Ye Z., Weinberg H.S., Meyer M.T. (2007). Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamide, Macrolide, Quinolone, and Tetracycline Antibiotics in Chlorinated Drinking, *Analytical Chemistry*, vol. 79(3), p. 1135 – 1144.
80. Zhou John L., Maskaoui K., Lufadeju A. (2012). Optimization of antibiotic analysis in water by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online], vol. 731, p. 32–39