

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2020**

**Bc. Martina Poncarová**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Identifikace produktů fotochemické degradace  
antibiotik ze skupiny fluorochinolonů**

Diplomová práce

**Bc. Martina Poncarová**

Školitelka: doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2020

Poncarová, M., 2020: Identifikace produktů fotochemické degradace antibiotik ze skupiny fluorochinolonů. [Identification of products of photochemical degradation of fluoroquinolone antibiotics. Mgr. Thesis, in Czech] – p.94, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Diplomová práce zkoumá tři antibiotika ze skupiny fluorochinolonů – ciprofloxacin, enrofloxacin a norfloxacin. Úvod diplomové práce má dvě části, první popisuje metodu HPLC / MS, její historii, instrumentaci a využití pro analýzy produktů odbourávání xenobiotických látek v životním prostředí, druhá část sumarizuje vlastnosti studovaných antibiotik a údaje o jejich výskytu v přírodních vodách.

Experimentální část je zaměřena na fotochemickou degradaci ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu v různém pH, kinetiku těchto degradací a identifikaci degradačních produktů pomocí LC / MS.

Anotation:

The Master thesis investigates three fluoroquinolone antibiotics – ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. The introductory part of the thesis has two sections: the first section covers the method of HPLC / MS, its history and instrumentation, and usage of mass spectrometry for the analyses of products of degradation of xenobiotic substances in environment, the second section summarises the properties of the antibiotics and, data about their occurrence in natural waters.

The experimental is focused on photochemical degradation of ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin at different pH values, kinetics of the degradations and identification of degradation products with LC / MS.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č.111 / 1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 28.3.2020

### **Poděkování**

Ráda bych věnovala poděkování doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc., za její cenné rady nejen v průběhu experimentální práce, ale též při psaní diplomové práce a také za pomoc s kreslením vzorců a schémat. Ing. Davidovi Kahounovi, Ph.D. děkuji za pomoc při vytvoření HPLC / MS metody pro analýzu fluorochinolonových antibiotik a jejich degradačních produktů a za pomoc při obsluze přístroje a za cenné rady a připomínky k části úvodu zabývajícím se hmotnostní spektrometrií. Za pomoc s obsluhou přístroje HPLC bych rovněž ráda poděkovala Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D.

## **OBSAH:**

1. ÚVOD.....	1
1.1. Hmotnostní spektrometrie.....	1
1.1.1. Iontový zdroj.....	2
1.1.1.1. Tvrdé ionizační techniky.....	2
1.1.1.2. Měkké ionizační techniky.....	3
1.1.2. Hmotnostní analyzátory.....	5
1.1.2.1. Analyzátor magnetický.....	6
1.1.2.2. Analyzátor s dvojitou fokusací.....	6
1.1.2.3. Analyzátor kvadrupólový.....	6
1.1.2.4. Iontová past.....	7
1.1.2.5. Analyzátor doby letu (TOF – time of flight).....	7
1.1.2.6. Orbitrap (elektrostatická orbitální past).....	7
1.1.3. Detektory.....	8
1.1.4. Interpretace hmotnostních spekter.....	9
1.1.5. Využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu xenobiotických látek a produktů jejich odbourávání v životním prostředí.....	10
1.2. Fluorochinolonová antibiotika.....	12
2. CÍLE PRÁCE.....	16
3. MATERIÁLY A METODY.....	17
4. VÝSLEDKY.....	18
5. DISKUZE.....	55
6. ZÁVĚR.....	59
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	60
8. PŘÍLOHY.....	69
8.1. PŘÍLOHA 1.....	69
8.2. PŘÍLOHA 2.....	74
8.3. PŘÍLOHA 3.....	78
8.4. PŘÍLOHA 4.....	82
8.5. PŘÍLOHA 5.....	89

## **1. ÚVOD:**

### **1.1. Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie je založena na ionizaci molekul v plynné fázi nevratným odštěpením valenčních elektronů. Takto vzniklé tzv. molekulové ionty a jejich případným dalším štěpením vzniklé produktové ionty jsou separovány podle tzv. efektivní hmotnosti  $m/e^a$  ( $m$  je hmotnost iontu,  $e$  je náboj elektronu - tedy  $1,602 \times 10^{-19}$  C) a po dopadu na detektor je určeno jejich množství. Hmotnostní spektrum představuje závislost intenzity iontů na jejich efektivní hmotnosti. <sup>[1,2]</sup>

Počátky historie metody hmotnostní spektrometrie sahají do konce 19. století, kdy byly prozkoumány principy pohybu nabitých částic v elektrickém a magnetickém poli. Za zakladatele hmotnostní spektrometrie je považován anglický fyzik Sir Joseph J. Thompson (1856 - 1940) se svou prací zaměřenou na analýzu pohybu nabitých částic v parabolickém hmotnostním spektrografu. Poprvé předpověděl využití této nové techniky v chemické analýze. <sup>[3]</sup> Jak je uvedeno v publikaci Hanuše et al. <sup>[4]</sup>, podařilo se Francisu Williamu Astonovi (1877–1945) díky hmotnostní spektrometrii charakterizovat řadu izotopů neradioaktivních prvků a tím vysvětlit odchylky jejich hmotností od celistvých čísel. Za tento objev získal v roce 1922 Nobelovu cenu.

Friedecký et al. <sup>[3]</sup> ve své práci uvádějí, že hmotnostní spektrometrie našla ve 40. letech 20. století uplatnění také ve vojenských projektech a to zejména v rámci projektu „Manhattan“ při výrobě atomové bomby v USA či jako analytický nástroj při monitorování produktů ropného průmyslu, což v následujících letech odstartovalo výrobu komerčních hmotnostních spektrometrů.

---

<sup>a</sup> zápis  $m/e$  byl hodně používán v literatuře před rokem 1980. Dnes se častěji používá symbol  $m/z$  ( $m$  značí hmotnost iontu a  $z$  jeho náboj) ačkoliv by bylo správnější používat zápis  $u/z$  ( $u$  je atomová hmotnostní jednotka a  $z$  náboj iontu). Z tohoto zápisu také vychází Dalton (Da), který je často používán v biochemii. <sup>[2]</sup>

V Československu byl prvním a po dlouhou dobu hlavním střediskem hmotnostní spektrometrie Ústav fyzikální chemie ČSAV, kde počátkem 50. let pod vedením prof. Jaroslava Heyrovského (1890 – 1967) a prof. Rudolfa Brdličky (1906 – 1970) čtyři mladí pracovníci tohoto ústavu – Vladimír Čermák (1920 - 1980), Vladimír Hanuš (1923 - 2009), Josef Cabicar (1923 - 1998) a Čestmír Jech (1925 - 2002) zkonstruovali v roce 1953 první hmotnostní spektrometr v tehdejší Československu. [5] Friedecký et al. [3] dále ve své práci uvádějí, že významným pokrokem bylo spojení hmotnostní spektrometrie s plynovou chromatografií, k němuž došlo v 60. letech 20. století a s kapalinovou chromatografií v 70. letech 20. století. Obě tato spojení předznamenala široké využití v multikomponentní analýze složitých směsí organických látek. Hlavní problém však spočíval v omezených možnostech ionizačních technik, zejména v problematické ionizaci velmi polárních látek a biomakromolekul. Tento problém byl vyřešen zavedením nových technik ionizace v 80. letech - např. ionizací pomocí elektrospreje nebo MALDI techniky (matrix assisted laser desorption ionization), tj. laserovou desorpce a ionizací za účasti matrice. [3,4]

Hmotnostní spektrometr je tvořen 3 hlavními částmi: iontovým zdrojem, hmotnostním analyzátozem a detektorem. [6]

#### 1.1.1. Iontový zdroj

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice. Univerzální ionizační technika vhodná pro ionizaci všech organických sloučenin ovšem neexistuje. Volba vhodné ionizační techniky je dána nejen fyzikálně – chemickými vlastnostmi analytu, ale také použitou chromatografickou technikou nebo zamýšleným použitím hmotnostního spektrometru. V současné době se používá desítek ionizačních technik pracujících na různých principech ionizace. [6]

Podle množství vnitřní energie, které molekula získá při procesu ionizace je obvyklé dělit ionizační techniky na tzv. tvrdé (získaná vnitřní energie je vysoká, což se projeví fragmentací molekulových iontů) a měkké (získaná vnitřní energie je nízká – téměř výhradně přítomnost pouze molekulových iontů). [6,7]

##### 1.1.1.1. Tvrdé ionizační techniky

Příkladem nejčastějšího způsobu tvrdé ionizace je elektronová ionizace (EI), při níž dochází k odstranění jednoho nebo více elektronů z atomu nebo molekuly prostřednictvím interakce s elektrony, které jsou typicky urychleny na energie mezi 10 – 150 eV. [7]

Tato ionizace se používá ve spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC / MS).

Předností této ionizace je vznik bohatých fragmentačních spekter umožňujících identifikaci analyzované sloučeniny. Naopak nevýhodou je, že analyzovaná molekula musí být dostatečně těkavá, jelikož samotná plynová chromatografie je z principu schopná separovat pouze látky v plynném skupenství. V řadě případů se musí analyty derivatizovat za účelem zvýšení těkavosti (reakcí s trimethylchlorsilanem, chloroformiátem apod.), což může mít za následek horší analytické parametry především v případech kvantitativních analýz směsí obsahujících velké množství komponent. Problémem při identifikaci může být úplný rozpad molekulového iontu v iontovém zdroji, což může v případě nezkušeného uživatele vyhodnocujícího takové hmotnostní spektrum způsobit nesprávné určení molekulového iontu. Tento problém lze řešit buď snížením hodnoty ionizační energie nebo použitím „měkké“ ionizační techniky, v případě spojení GC / MS např. chemickou ionizací, kdy ionty jsou produkovány kolizemi analytu s ionty reakčního plynu.<sup>[3]</sup>

#### 1.1.1.2. Měkké ionizační techniky

Lze je rozdělit podle toho, v jaké fázi k ionizaci dochází.

V plynné fázi se používají ionizační techniky za vakua (EI - elektronová ionizace), kdy je hodnota tlaku 0,00001 - 0,001 Pa, sníženého tlaku (CI - chemická ionizace), kdy je hodnota tlaku cca 100 Pa. Tyto techniky se používají ve spojení s GC. Ve spojení s LC se používají ionizační techniky za atmosférického tlaku (ESI - ionizace elektrosprejem, APCI- chemická ionizace za atmosférického tlaku, APPI - fotoionizace za atmosférického tlaku aj.).

Primárním zdrojem energie v případě chemické ionizace je proud urychlených elektronů, které přenášejí svou energii na analyzovanou látku prostřednictvím reakčního media (obvykle methanu), který je v ionizační komůrce pod relativně vysokým tlakem (50-150 Pa). Po zavedení vzorku do tohoto prostředí dojde k přenosu protonu a reakčních kationtů (vzniklých primární ionizací methanu a vzájemnou interakcí produktových iontů s molekulou methanu -  $\text{CH}_5^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5^+$ ) na neutrální molekulu za vzniku iontů  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Ion  $[\text{M}+\text{H}]^+$  s relativní hmotností o jednotku vyšší než hmotnost molekuly před ionizací bývá označován jako molekulární ion.<sup>[1,6]</sup>

V případě chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) není ionizační napětí vloženo na kapiláru iontového zdroje, ale na výbojovou jehlu (elektrodu) umístěnou v blízkosti jejího konce. Na konci kapiláry dochází k rozprášení eluátu pneumatickým zmlžovačem. Vzniklý aerosol je rychle odpařen v krátké zóně vyhřívané na vysokou teplotu (až 600 °C). Vložením napětí na výbojovou jehlu dochází ke vzniku koronárního výboje, jímž jsou ionizovány molekuly mobilní fáze přítomné v plynné fázi ve velkém nadbytku vůči analytu. Ionty vzniklé



z mobilní fáze (tzv. reakční plyn) následně ionizují molekuly analytu, podobně jako při klasické chemické ionizaci. Dříve se místo koronárního výboje používala k ionizaci radioaktivní fólie  $^{63}\text{Ni}$  jako zdroj  $\beta$  záření. [8]

Při použití ionizace elektrickým polem (FI) dojde působením nehomogenního elektrického pole vytvořeného mezi ostrým hrotem pracovní elektrody a výstupní štěrbinou iontového zdroje k uvolnění valenčního elektronu z ionizované molekuly. [1]

V případě měkkých ionizačních technik z kondenzované fáze lze k ionizaci použít také elektromagnetické záření o dostatečné intenzitě a vhodné vlnové délce, tzv. fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). [1]

Významnou ionizační technikou patřící do kategorie měkkých ionizačních technik v kondenzované fázi patří technika laserové desorpce a ionizace za účasti matrice tzv. MALDI. [3]

Jako zdroje záření se v této technice používají lasery pracující v infračervené případně ultrafialové části spektra (Nd -YAG laser, dusíkový laser, Er - YAG laser, CO<sub>2</sub> laser). [1,9]

V případě, že by byly molekuly analytu ionizovány laserem přímo, mohlo by dojít k nežádoucímu štěpení (např. příliš velké fragmentaci biomolekuly). Z tohoto důvodu je nutné před samotnou ionizací vzorek nejprve smíchat s matricí, která snadno absorbuje energii laseru, a posléze se odstraní vysušením. [10] Jako matrice se využívají aromatické organické kyseliny (např. kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová či kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová, která je známá jako kyselina sinapová). [9] Proces ionizace zahrnuje krátký intenzivní puls laseru, který se zahřeje a desorbuje matrici a analyty. Současně dochází k ionizaci matrice, která předává náboj analytu. Celý proces probíhá ve vakuu, odpadá tedy problém přenosu iontů mezi atmosférickým tlakem a provozním vakuem analyzátoru, i když i tuto ionizaci lze realizovat za atmosférického tlaku. [3] Tato technika se ve spojení s analyzátozem doby letu (TOF – time of flight) využívá pro analýzu biopolymerů. [1]

Pro analýzu teplotně nestálých makromolekulárních látek se využívá ionizace ostřelováním urychlenými atomy (FAB – fast atom bombardment). [1]

Nejčastějšími ionizačními technikami z kapalně fáze (někdy označovaných jako „sprejové“) bývá využíván termosprej (TSI) a elektrosprej (ESI). Uvedené přístupy se od sebe liší způsobem rozprašování kapalně fáze se vzorkem. Převodu iontů z kapalně fáze přímo do vakua hmotnostního spektrometru je dosaženo rychlým odsušením mikrokapiček spreje. Obě sprejové techniky vyžadují neustálý přívod kapalně fáze, velmi dobře se proto uplatňují při

spojení s průtokovými analytickými metodami, zejména vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).<sup>[1]</sup> HPLC - MS umožňuje použití průtoků mobilní fáze až do 2 ml/min pro mobilní fáze v rozsahu od 100 % organické složky do 100 % vody, což umožňuje práci s mikrokolonami i s konvenčními kolonami v systémech s obrácenými i s normálními fázemi při běžných pracovních podmínkách používaných v HPLC.<sup>[8]</sup>

Jediným omezením je nutnost použití pouze těkavých elektrolytů jako přísad do mobilní fáze (např. mravenčan amonný, octan amonný, kyselina mravenčí, kyselina octová aj.). Netěkavé pufrы, např. fosfátové nebo borátové, se nedoporučují používat vzhledem k možnosti usazování netěkavých anorganických solí v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru.<sup>[8]</sup>

Termosprej použili poprvé Blakney a Vestal r. 1983.<sup>[9]</sup> Roztok obsahující sůl a vzorek k analýze je nastříknutý do ocelové kapiláry, která je vyhřívána na vysokou teplotu (kapalina se rychle zahřeje). Roztok projde skrz vakuovanou komoru jako nadzvukový paprsek, objeví se sprej z jemných kapiček obsahující ionty rozpouštědla a molekuly vzorku. Ionty z roztoku jsou extrahovány a urychleny k analyzátoru odpuzovačem a fokusujícím systémem kruhových elektrod.

Ionizaci elektrosprejem poprvé využili pro ionizaci biomakromolekul a celý tento postup publikovali v r. 1988 John Fenn et al.<sup>[11]</sup> Zředěný roztok analytu se v množství několika mikrolitrů za minutu zavádí velmi úzkou kapilárou z vodivého materiálu do rozprašovací komůrky. Na kapiláru se vkládá vysoké napětí (jednotky kV), což způsobí, že se kapalina rozprašuje ve formě nabitého aerosolu. Rozpouštědlo se z povrchu aerosolových částic rychle odpařuje, hustota náboje stoupá, až dojde k tzv. coulombické explozi a vzniknou podstatně menší částice, z nichž se molekuly rozpouštědla vypařují ještě rychleji. Ve zředěné plynné fázi tak rychle vznikají ionty zbavené rozpouštědla. Přidávaný plyn pomáhá ionizovaným částicím zbavovat se rozpouštědla a také nadbytečné kinetické energie, a nakonec se systémem vakuových clon a kruhových elektrod vytvoří svazek iontů, který je veden do vlastního hmotnostního analyzátoru. Metodu lze použít i pro látky o velmi vysoké molekulové hmotnosti, neboť měřený poměr hmotnosti a náboje je při velké hmotnosti, ale zároveň i náboji, v rozsahu těchto přístrojů.<sup>[4,9]</sup>

### 1.1.2. Hmotnostní analyzátory

Z iontového zdroje vstupují částice do elektrostatického urychlovače iontů a z něj dále do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k rozdělení iontů podle jejich efektivní hmotnosti. K tomuto účelu se využívají interakce iontů s magnetickým a elektrickým polem, případně různé rychlosti iontů různé hmotnosti.<sup>[1]</sup>

### 1.1.2.1. Analyzátor magnetický

Rozdělení iontů v homogenním magnetickém poli je nejstarším postupem. Ionty z iontového zdroje jsou urychleny elektrickým polem a po průchodu štěrbinou prochází ionty homogenním magnetickým polem. Na ion působí v magnetickém poli dostředivá síla úměrná intenzitě tohoto pole a tím dochází k zakřivení drah letících iontů. Při určité konstantní hodnotě intenzity magnetického pole a urychlujícího napětí je poloměr zakřivení dráhy úměrný efektivní hmotnosti iontu. Za těchto podmínek mohou projít výstupní štěrbinou analyzátoru pouze ionty s jedinou určitou hodnotou  $m/z$ . Ostatní ionty zůstávají odcloněny. Hmotnostní spektrum je získáno postupným měřením v určitém rozsahu intenzit magnetického pole. Jedná se o uspořádání s jednoduchou fokusací. <sup>[1]</sup>

### 1.1.2.2. Analyzátor s dvojitou fokusací

Snaha o zvýšení rozlišovací schopnosti spektrometrů vedla k vývoji přístrojů s dvojitou fokusací. Nevýhodou jednoduché fokusace je skutečnost, že ionty o stejné efektivní hmotnosti mohou mít různou kinetickou energii, což neumožňuje dosažení vysoké rozlišovací schopnosti analyzátoru. Je proto žádoucí získat nejprve ionty o stejné kinetické energii a ty pak separovat. K dosažení tohoto cíle se používá elektrostatický sektor, předřazený magnetickému separátoru. Elektrostatický sektor je tvořen dvěma zakřivenými kovovými deskami, na které je vložen elektrický potenciál a které fungují jako válcový kondenzátor s nehomogenním elektrickým polem. Na výstupní štěrbinu elektrostatického sektoru jsou fokusovány ionty s různými efektivními hmotnostmi, ale se stejnou kinetickou energií (ostatní ionty jsou zachyceny). <sup>[1]</sup>

Do magnetického sektoru vstupuje svazek iontů o stejné kinetické energii, což umožňuje podstatným způsobem zvýšit rozlišovací schopnost spektrometru. Zařízení využívající kombinace elektrického a magnetického sektoru jsou označovány jako přístroje s dvojitou fokusací. <sup>[1]</sup>

### 1.1.2.3. Analyzátor kvadrupólový

Jedná se o nemagnetický analyzátor, v němž dochází k separaci iontů ve vysokofrekvenčním elektrickém poli. Je sestaven ze čtyř tyčí kruhového průřezu, které jsou symetricky rozloženy kolem společné podélné osy. Na tyče je vloženo stejnosměrné napětí se superponovanou vysokofrekvenční složkou tak, že vždy dvě protilehlé tyče jsou na společném potenciálu. Ionty se pohybují v dlouhém poli, které má dvě složky, statickou a vysokofrekvenční. Za určitých podmínek se v poli analyzátoru pohybují po stabilní dráze pouze ionty s určitou hodnotou  $m/z$ ,

zatímco ostatní vykonávají oscilace, až dopadnou na některou z elektrod nebo na clonku na konci analyzátoru. Tyto analyzátory jsou v současné době široce užívány jako detektory při spojení hmotnostní spektrometrie jak s plynovou (GC - MS) <sup>[1]</sup> tak s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC – MS). <sup>[9]</sup>

#### 1.1.2.4. Iontová past

Iontová past je zařízení, které po aplikaci vhodných poměrů napětí vložených na kruhovou a dvě koncové elektrody umožňuje zadržení iontu o určitém rozmezí specifických hmotností. Následnou postupnou změnou těchto napětí začne docházet k oscilacím zadržených iontů a jejich postupnému vypuzování na detektor. Jako první iontové pasti byly zkonstruovány 3D iontové pasti roku 1960 Paulem a Steinwedelem. <sup>[12]</sup> Byly vyrobené z kruhové elektrody se dvěma elipsoidními čepičkami na vrchu a na spodu, které vytvářely 3D kvadrupólové pole. Nyní jsou častěji využívány 2D iontové pasti (ozn. LIT, linear ion trap). Ty jsou složeny ze 4 tyčí (často rozdělených do 3 segmentů) podobně jako kvadrupólový analyzátor, ionty jsou uvnitř těchto tyčí a jsou ochlazovány kolizí s inertním plynem a pohybují se podél osy mezi elektrodami. Zároveň dochází k oscilaci v rovině xy vlivem aplikace jediného RF potenciálu na tyče. <sup>[9]</sup> K dosažení optimální fragmentace prekurzorového iontu je potřeba zvolit optimální kolizní energii. Tu je možno nastavit v rozmezí 0 – 100 % v závislosti na predikované  $m/z$  studovaného analytu. Nastavení parametru kolizní energie je jedním ze zásadních parametrů tandemové hmotnostní spektrometrie ( $MS^n$ ), který je nutno optimalizovat. <sup>[13]</sup>

#### 1.1.2.5. Analyzátor doby letu (TOF – time of flight)

Z konstrukčního hlediska se jedná o nejjednodušší hmotnostní analyzátor, v principu je tvořen jen evakuovanou trubicí. K časovému rozdělení iontů s různým poměrem  $m/z$  dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. Ionty s odlišným  $m/z$  vystupující z iontového zdroje mají při stejné kinetické energii rozdílnou rychlost. Hmotnější ion se pohybuje nižší rychlostí a dorazí do detektoru později. Tento analyzátor však vyžaduje použití iontového zdroje pracujícího v pulzním režimu s použitím laseru. <sup>[1]</sup>

#### 1.1.2.6. Orbitrap (elektrostatická orbitální past)

Je nejnovějším typem hmotnostního analyzátoru, poprvé byl popsán ruským fyzikem Alexandrem Makarovem v roce 1999 <sup>[14]</sup>. Komercializován byl ale až v roce 2005. Jelikož princip funkce orbitrapu vychází z orbitálního záchytu iontů, který byl popsán roku 1923 K.H.Kingdonem, <sup>[15]</sup> je někdy orbitrap nazýván Kingdonova past. Orbitrap je typ iontové pasti, kde není potřeba aplikovat vysokofrekvenční napětí ani magnetické pole. Skládá se z vnější

a středové vřetenové elektrody, na tyto elektrody je vloženo napětí. Ionty se pohybují okolo a podél středové elektrody, přičemž elektrostatická přitažlivá síla musí být v rovnováze s odstředivou silou rotujícího iontu. Pro správné rozložení potenciálové distribuce elektrostatického pole je velice důležitá geometrie elektrod. Tvarem elektrody se dají kontrolovat frekvence oscilace iontu. Frekvence v ose z (podél středové elektrody) je nepřímo úměrná odmocnině z hodnoty  $m/z$ . Na vnějších elektrodách se měří ionty indukovaný proud a hmotnostní spektrum se získá po Fourierově transformaci signálu.<sup>[6]</sup>

### 1.1.3. Detektory

Ionty z analyzátoru (s výjimkou analyzátorů FTICR a Orbitrap) dopadají na detektor, kde se úměrně jejich počtu generuje elektrický proud, který je měřen. Volba detektoru závisí především na instrumentaci analýzy a výběru analytické aplikace. Existuje několik typů detektorů, ale jelikož většina detektorů nedokáže efektivně detekovat vysokomolekulární ionty, je snaha je neustále vylepšovat a vynalézat nové – např. nábojový detektor, kryogenní detektor.<sup>[9]</sup>

Za historicky první detektor používaný v hmotnostní spektrometrii je považována fotografická deska, která byla umístěna za analyzátozem. Principem této detekce je, že ionty, které mají shodný poměr  $m/z$  narazí do fotografické desky ve stejném místě. Po provedení kalibrace je možné určit hodnotu  $m/z$  analytu a na základě intenzity „tmavosti“ vzniklých bodů také množství těchto iontů.<sup>[9]</sup>

FC detektor (Faraday cup) byl používán již u prvních sestavených MS přístrojů a je používán dodnes.<sup>[12]</sup> Je vyrobený z kovového válce, ve kterém je malý otvor. Toto zařízení je propojeno k zemi prostřednictvím rezistoru. Ionty prochází otvorem válce, narazí do jeho zdi a „vybíjejí se“, což vede k tomu, že vzniká elektrický proud, který je následně zesílen a detekován. Zároveň také mohou vznikat sekundární elektrony, což je však nutné potlačit (např. tím, že je FC detektor obalen materiálem z uhlíku či vhodným tvarem detektoru nebo použitím slabého magnetického pole), aby nedocházelo k chybným detekcím. Jedná se o jednoduchý, robustní detektor s vysokou přesností. Jeho nevýhodami jsou nízká citlivost a pomalá odezva. Dnes se využívá především v IRMS (hmotnostní spektrometrii izotopického poměru) a AMS (urychlená hmotnostní spektrometrie).<sup>[9]</sup>

Od roku 2006 se jako detektory v hmotnostní spektrometrii nejčastěji používají elektronásobiče.<sup>[1,9,13]</sup> Pro lepší detekci jsou ionty z analyzátoru urychleny pomocí elektrody,

kteřá bývá označována jako konverzní dynoda. Tato dynoda má potenciál v rozmezí  $\pm 3$  kV až  $\pm 30$  kV. Pokud do dynody o negativním potenciálu narazí kation, vzniknou jako sekundární částice anionty a elektrony. Naopak v případě, že má dynoda kladný potenciál, narazí do ní anionty a sekundárními emitovanými částicemi jsou kationty. Sekundární částice jsou na tzv. první dynodě přeměněny na elektrony, které jsou amplifikovány kaskádovým efektem v elektronásobiči, aby vznikl měřitelný elektrický proud. Používají dva typy dynod – diskrétní dynoda (tento systém obsahuje 12 – 20 dynod s klesajícími negativními potenciály v řetězci rezistorů, přičemž první dynoda má potenciál – 1 až – 5 kV) nebo kontinuální dynoda (možnosti uspořádání jako „channeltron“; „microchannel plate“ nebo „microsphere plate“).<sup>[9]</sup>

Elektrooptické detektory iontů (EOID) přeměňují ionty vycházející z analyzátorů na elektrony poté je elektrický signál přeměněn na světelný, tj. fotony. Nejběžnějším EOID je tzv. „Daly“ detektor, který se skládá ze dvou konverzních dynod, scintilační nebo fosforescenční obrazovky a fotonásobiče.<sup>[9]</sup>

V pozitivním módu jsou ionty urychlovány k dynodě nesoucí záporný potenciál, v negativním módu k dynodě s kladným potenciálem. Sekundární elektrony jsou urychleny k obrazovce emitující fotony, jež jsou detekovány fotonásobičem umístěným za obrazovkou. Obrazovka musí být pokryta hliníkovým vodičem, aby nevznikl náboj, který by bránil v nárazu sekundárních elektronů do obrazovky. Dalšími typy EOID je CCD detektor, photodiode array detektor nebo elektrooptický paprskový detektor kombinující tzv. microchannel plate (plochou destičku schopnou detekovat jednotlivé nabitě částice) s Daly detektorem.<sup>[9]</sup>

Hmotnostní spektrometry jsou vždy vybaveny systémem pro vyhodnocení a zpracování dat.<sup>[1,9]</sup>

#### 1.1.4. Interpretace hmotnostních spekter

Existují dva základní způsoby použití hmotnostních spekter pro identifikaci neznámých látek. V případě prvního způsobu je struktura výchozí sloučeniny, ze které reakcí vznikají nové produkty známá. V tomto případě je změřeno hmotnostní spektrum dané výchozí sloučeniny a poté je změřeno hmotnostní spektrum produktu. Rozdílem molekulových hmotností je určeno, jaký produktový iont reprezentující určitou strukturní část molekuly se mohl odtrhnout nebo připojit. Poté je teprve určena struktura molekuly vlastního produktu. V případě druhého způsobu použití hmotnostních spekter nejsou k dispozici informace ani o struktuře výchozí sloučeniny, ani o struktuře nového produktu. Tento případ vyžaduje obvykle kombinaci spektrálních technik nejčastěji tandemové hmotnostní spektrometrie (MS / MS) a 2D NMR.

V praxi mohou být dedukovány některé informace pro zjednodušení interpretace – např. na základě historie vzorku, preparace, typických metabolitů pro danou rostlinu nebo živočicha. <sup>[17]</sup> S výhodou se využívají knihovny hmotnostních spekter, které v případě EI ionizace probíhající za standardních podmínek (urychlující potenciál 70 eV) tvoří nezbytnou součást vyhodnocení, protože za těchto podmínek jsou získaná hmotnostní spektra nezávislá na použité instrumentaci. <sup>[3]</sup> Pokud tyto knihovny nejsou k dispozici, musí být struktura sloučeniny vyhodnocená z hmotnostního spektra na základě obecných pravidel v závislosti na použitém způsobu ionizace.

#### 1.1.5. Využití hmotnostní spektrometrie pro analýzu xenobiotických látek a produktů jejich odbourávání v životním prostředí

Xenobiotika („cizorodé látky“) jsou látky organické i anorganické povahy, které buď nejsou přirozenou složkou ekosystému, nebo potravního řetězce, anebo se v jednotlivých složkách ekosystému respektive potravního řetězce vyskytují v koncentracích výrazně vyšších než je přirozené, což se může projevit škodlivě až toxicky. <sup>[18]</sup> Látky, které mohou potenciálně představovat riziko zvláště pro vodní ekosystém a měly by být tedy ve vzorkách vod sledovány, jsou uvedené v Prováděcím rozhodnutí komise EU 2018/ 840, kterým bylo aktualizováno Prováděcí rozhodnutí komise EU 2015 / 495. Seznam z roku 2015 obsahoval názvy 17 xenobiotik (3 hormony – estron, 17- $\beta$ - estradiol, 17-  $\alpha$  – ethinylestradiol, 3 makrolidová antibiotika – azithromycin, klarithromycin a erythromycin, protizánětlivé léčivo diklofenak, 5 neonicotinoidových pesticidů – acetamiprid, thiakloprid, klothianidin, imidakloprid a thiamethoxam, karbamátový pesticid methiokarb, 2 herbicidy – oxadiazon a triallát, antioxidant BHT – 2,6-di-terc-butyl-4-methylfenol a UV filtr EHMC - 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamát). Ze seznamu byly nově odstraněny oxadiazon, triallát, BHT a EHMC, ale nově na seznam přibyla 2 antibiotika amoxicillin a ciprofloxacin a také pesticid metaflumizon. Jako indikační metody se dle těchto Prováděcích rozhodnutí používají metody extrakce (extrakce kapalina – kapalina, LLE a extrakce na pevné fázi, SPE) a jako analytické metody GC / MS (plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) a HPLC / MS / MS (kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií). <sup>[19,20]</sup>

Gusmaroli et al. <sup>[21]</sup> ve své práci monitorovali všechny látky zapsané na seznamu Prováděcího nařízení komise EU 2015 / 495 ve vzorkách vod ze 14 různých lokalit v deltě řeky Ebro ve Španělsku.

Jako extrakční metodu použili SPE a pro detekci metodu UHPLC – MS/MS (ultravysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní spektrometrií s trojitým kvadrupólem) s ionizací elektrosprejem, s použitím kolony Phenomenex Kinetex Biphenyl zaručující vysokou separační účinnost. Touto metodou bylo zjištěno, že nejvíce znečištěnou oblastí byla oblast okolo čistírny odpadních vod Sant Carles de la Rápita, kde celková koncentrace těchto látek byla 2,39 µg/l. Nejvyšší koncentrace z těchto látek měl diklofenak (1,65 µg/l), makrolidová antibiotika (arythromycin 636 ng/l) a pesticidy (imidakloprid 591 ng/l), které byly všudypřítomné, a jejich koncentrace závisela na sezónních zemědělských pracích.

Xenobiotika, zejména málo polární sloučeniny, se ukládají do sedimentů. Jestliže jsou pak sedimenty využity k aplikaci na zemědělskou půdu, může dojít ke kontaminaci půd.

Půdy mohou být kontaminovány i v důsledku průmyslové činnosti. Caporale et al. [22] zkoumali koncentraci karcinogenního Cr(VI) ve vzorcích půd ze dvou lokalit v Itálii potenciálně znečištěných činností kožedělného průmyslu. Cr(VI) byl extrahován komplexačními činidly a pomocí zvýšení pH bylo zabráněno oxidaci přítomného Cr(III) na Cr(VI). Koncentrace Cr(VI) v půdních vzorcích pak byla stanovena metodou ICP / MS (hmotnostní spektrometrie s ionizací indukčně vázaným plazmatem) s oktapólovou kolizní celou a kvadrupólovým analyzátozem. Zjištěné koncentrace Cr(VI) se pohybovaly v rozmezí 0,15 - 11,18 µg/g, ale byla naměřena také koncentrace 107,1 µg/g.

Sun et al. [23] zjišťovali, jak okurky (*Cucumis sativus L.*) rostoucí na zemědělských půdách přijímají, transportují a odbourávají prostředky denní péče a jaké jsou jejich fyziologické odezvy, např. tvorba stresových hormonů, změny v metabolitech. Analýza byla provedena pomocí UHPLC-MS/MS na koloně C18. Bylo zjištěno, že se xenobiotika ukládají převážně do kořenů. Dospělé listy však vykazovaly „spálené“ konce a redukci fotosyntetických pigmentů při koncentracích xenobiotik nad 5 µg/l.

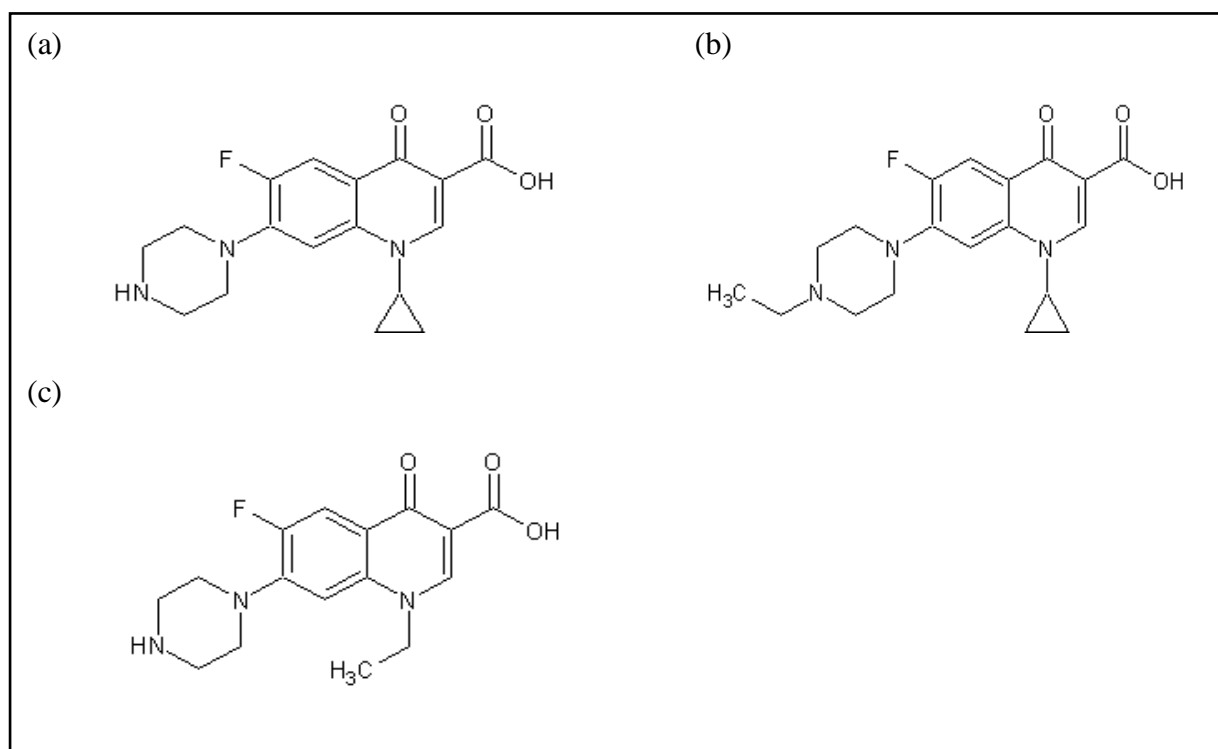
Soria et al. [24] zkoumali vliv nanočástic CuO na modelovou rostlinu *Arabidopsis thaliana*. Bylo zjištěno, že v důsledku expozice rostliny těmito nanočásticím došlo ke změně 65 metabolitů v metabolické cestě kyseliny jasmínové a glukosinolátů, což nasvědčuje stresové reakci rostliny na vystavení nanočásticím CuO. K detekci metabolitů byly použity dva typy metod, a to jednak kapalinová chromatografie s MS detektorem s analyzátozem doby letu TOF a jednak kapalinová chromatografie s MS detektorem s orbitální iontovou pastí Orbitrap.



## 1.2. Fluorochinolonová antibiotika

Fluorochinolony byly syntetizovány jako antibiotika pro humánní i veterinární lékařství, kde se používají k léčbě chorob působených patogenními enterobakteriemi. Využívají se hlavně proti gramnegativním bakteriím (*Pseudomonas aeruginosa*).<sup>[25]</sup> Inhibují enzymy účastnící se DNA replikace a prokaryotické transkripce (topoizomerázu II a IV), v důsledku čehož se bakterie nemůže rozmnožovat.<sup>[26]</sup> Kvůli mutaci v DNA polymeráze jsou grampozitivní koky (*Staphylococcus aureus*) částečně rezistentní, a proto se fluorochinolony proti těmto bakteriím používají až jako antibiotika druhé volby.<sup>[27]</sup> Fluorochinolony mají ve své struktuře v pozici C6 vložen atom fluoru, který usnadňuje pronikání do bakteriální buňky<sup>[26]</sup> a v pozici C7 piperazinylovou skupinu či jiný dusíkatý heterocyklus.<sup>[28]</sup>

Struktury 3 zástupců fluorochinolonu jsou znázorněny na Obr.1.



Obr.1: Struktura ciprofloxacinu (a), enrofloxacinu (b) a norfloxacinu (c).

Protože se jedná o širokospektrá antibiotika s nízkými vedlejšími účinky, jsou velice populární.<sup>[29]</sup> V lidském organismu podléhají metabolické přeměně jen zčásti (více jak 50 % je z organismu vyloučeno močí),<sup>[25]</sup> a tak se dostávají do splaškových vod.

Vzhledem k tomu, že čističky odpadních vod je nezachytí, dostávají se dál do životního prostředí, zejména povrchových vod. Jejich přítomnost v životním prostředí vede následně k tomu, že některé bakterie si mohou proti nim vyvinout rezistenci – např. *Campylobacter jejuni*, která byla objevena u drůbeže, je vůči fluorochinolonům rezistentní. <sup>[30]</sup> Naměřené koncentrace fluorochinolonů ve vybraných vzorcích odpadních vod jsou uvedeny v Tab.I.

Tab.I: Koncentrace fluorochinolonů v několika vzorcích odpadních vod.

Místo	Antibiotikum	Koncentrace [ $\mu\text{g/l}$ ]	Zdroj
Nemocnice Viet Duc v Hanoi (Vietnam)	ciprofloxacin	10,9	[31]
	norfloxacin	3,4	
Univerzitní nemocnice v Curychu (Švýcarsko)	ciprofloxacin	21,2	[32]
	norfloxacin	5,6	
Odpadní voda ze zvířecích farem v Jiangu (Čína)	ciprofloxacin	7,5	[33]
	enrofloxacin	8,8	

Jak je patrné z Tab.I, koncentrace fluorochinolonů v odpadních vodách dosahuje jednotek až desítek  $\mu\text{g/l}$ . Obsah antibiotik v odpadní vodě ze zvířecí farmy je důsledkem toho, že antibiotika se ve velkochovech zvířat používají preventivně.

V práci Wei et al. <sup>[33]</sup> je uvedeno, že koncentrace antibiotik v odpadních vodách se liší v závislosti na tom, jaké zvíře je chováno – nejvyšší zaznamenané koncentrace byly při chovu skotu a vepřů (skot: 0,60 – 4,13  $\mu\text{g/l}$  ciprofloxacinu a 0,05 – 8,77  $\mu\text{g/l}$  enrofloxacinu; vepři: 0,29 – 7,49  $\mu\text{g/l}$  ciprofloxacinu a 0,05 – 8,25  $\mu\text{g/l}$  enrofloxacinu, zatímco u drůbeže se naměřené hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,37 – 3,42  $\mu\text{g/l}$  ciprofloxacinu a 0,05 – 5,64  $\mu\text{g/l}$  enrofloxacinu). Důvodem je preventivní používání antibiotik v největší míře u chovů skotu a vepřů.

Lillenberget al. <sup>[34]</sup> měřili koncentrace fluorochinolonových antibiotik v odpadních kalcích a kompostech. V městě Tartu v Estonsku naměřili koncentrace norfloxacinu v kompostu 22  $\mu\text{g/kg}$  a ciprofloxacinu 20  $\mu\text{g/kg}$ , v hlavním městě Estonska Tallinnu pak naměřili 162  $\mu\text{g/kg}$  norfloxacinu a 426  $\mu\text{g/kg}$  ciprofloxacinu v odpadním kalu.

Je známo, že fluorochinolony nepodléhají hydrolyze ani biodegradaci, podléhají však fotodegradaci – ciprofloxacin lze úplně eliminovat po 46 minutách ozáření UV lampou s výkonem 150 W, přičemž vznikají fotodegradační produkty. <sup>[35]</sup>

V práci Hubičky et al. <sup>[36]</sup> byly identifikovány fotodegradační produkty antibiotik ciprofloxacinu (6 produktů: m/z= 330,1; 378,1; 348,1; 362,1; 291,1 a 263,1) a norfloxacinu (5 produktů: m/z = 294,1; 279,1; 251,1; 363,1 a 348,1) pomocí UHPLC – MS / MS s ionizací elektrosprejem a s kvadrupólovým analyzátozem. Tyto produkty vznikaly v důsledku dehydrogenace na piperazinovém jádře, roztržení piperazinového kruhu, hydroxylace na piperazinovém kruhu, oxidace nebo úplného odštěpení piperazinového jádra. Vzorky byly nejprve ozařovány v reaktoru s použitím UV-A záření s maximální emisí při vlnové délce 365 nm za teploty 20 °C a relativní hmotnosti 60 %, dávka UV-A  $5,09 \times 10^{-3} \text{ J}/(\text{cm}^2 \text{ min})$ . Odbourávání probíhalo podle kinetiky 1.řádu.

Wammer et al. <sup>[37]</sup> ozařoval xenonovou lampou s výkonem  $765 \text{ W} / \text{m}^2$  roztoky enrofloxacinu, norfloxacinu a ofloxacinu o koncentraci těchto antibiotik 100  $\mu\text{mol/l}$  jednak v přírodní vodě z jezera Josephine ležícího v blízkosti St.Paul, hlavního města amerického státu Minnesota, s obsahem rozpuštěného uhlíku 6 mg/l a filtrované přes filtr 0,2  $\mu\text{m}$  a jednak v deionizované vodě. Hodnoty pH vzorků před ozářením byly pomocí NaOH nebo HCl upraveny tak, aby u všech studovaných antibiotik byla na počátku buď dvojnásobně protonovaná forma (na karboxylu i na dusíku), nebo forma protonovaná jen na dusíku nebo deprotonovaná forma. Bylo zjištěno, že rychlost fotodegradace byla nejvyšší v neutrálním nebo lehce alkalickém pH, teda v prostředí, kde v roztoku převažovala deprotonovaná forma. Všechny fotodegradační reakce probíhaly podle kinetiky 1.řádu, v deionizované vodě byla reakce dvakrát rychlejší než v přírodní vodě, pravděpodobně kvůli rozptylu světla rozpuštěným organickým uhlíkem. V téže práci Wammera et al. <sup>[37]</sup> byly produkty fotodegradace norfloxacinu, ofloxacinu a enrofloxacinu testovány na antibakteriální aktivitu (*E.coli*), přičemž bylo zjištěno, že tuto aktivitu vykazovaly pouze fotodegradační produkty enrofloxacinu. Pro určení struktury fotodegradačních produktů enrofloxacinu byl použit hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosprejem, s TOF analyzátozem za využití polyethylenglykolu jako vnitřního standardu. Takto byly identifikovány 4 degradační produkty: produkt A vznikl substitucí atomu fluoru za OH skupinu; produkt B vznikl odtržením atomu fluoru a rozštěpením piperazinylového kruhu. Produkt C byl identifikován jako ciprofloxacin. Produkt D vznikl nahrazením atomu fluoru hydroxylovou skupinou a hydroxylací ethylové skupiny na piperazinylovém kruhu.

Babić et al. <sup>[38]</sup> ozařovali xenonovou lampou (300 - 800 nm;  $500 \text{ W}/\text{m}^2$ , teplota: 25 °C) vodné roztoky norfloxacinu, enrofloxacinu a ciprofloxacinu o koncentracích 100  $\mu\text{g/l}$  a 10 mg/l při pH 4 a pH 8 v roztoku obsahujícím přídavek huminových kyselin 0,5 mg/l, respektive 1 mg/l. Analýzu prováděli pomocí HPLC – MS/MS s trojitým kvadrupólem a elektrosprejem na koloně C18. Zjistili, že fotodegradace byla velmi rychlá v nízkých

koncentracích (100 µg/l), a proto nebyla pozorována změna v rychlosti odbourávání v důsledku změny pH při těchto nízkých koncentracích. Při vyšších koncentracích (10 mg/l) hodnoty rychlostní konstanty rostla s hodnotou pH (např. pro roztok enrofloxacinu pH 4 byla hodnota rychlostní konstanty  $k = 0,0193 \text{ min}^{-1}$ ; při pH = 8 je  $k = 0,0381 \text{ min}^{-1}$ ). Bylo také zjištěno, že s rostoucí koncentrací antibiotika zároveň klesá hodnota rychlostní konstanty (např. pro norfloxacin o koncentraci 0,1 mg/l, byla hodnota  $k = 0,6329 \text{ min}^{-1}$  a pro 10 mg/l, byla hodnota  $k = 0,0084 \text{ min}^{-1}$ ). Struktury fotodegradačních produktů a schémata degradací ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu při hodnotách pH = 4 a pH = 8 byly určeny pomocí HPLC / MS. Enrofloxacin vykazoval v kyselém pH tři cesty degradace: vznik ciprofloxacinu; odštěpení piperazinového kruhu s navázaným ethylem jako samostatného produktu; nahrazení atomu fluoru OH skupinou a rozštěpením cyklopropanového kruhu s následným odtržením ethylu a navázáním aldehydové skupiny na atom dusíku a posléze rozštěpením piperazinylového jádra. Při hodnotě pH = 8 byly u enrofloxacinu identifikovány jen 2 cesty odbourávání: první vedla přes rozštěpení piperazinylového jádra, a navázání 2 aldehydových skupin, následné nahrazení atomu fluoru OH skupinou, rozštěpení cyklopropanového kruhu, následná demethylace z roztrženého cyklopropylu, zatímco druhá cesta vedla k odštěpení piperazinylového jádra stejně jako při pH = 4. Ciprofloxacin při pH = 4 vykazoval jednu cestu degradace, při níž došlo k navázání aldehydové skupiny na atom dusíku na piperazinylovém jádře a zároveň rozštěpení cyklopropanového kruhu, v dalším kroku se pak rozštěpil piperazinylový kruh. Při pH = 8 u ciprofloxacinu vznikly v prvním kroku dva produkty (první z nich totožný s produktem degradace ciprofloxacinu při pH = 4), druhý produkt vznikl odštěpením piperazinylového kruhu. Následně došlo k nahrazení atomu fluoru OH skupinou a oxidaci této OH skupiny na skupinu COOH. Norfloxacin se odbourával při pH = 4 i pH = 8 na shodné produkty, ale při pH = 8 docházelo k rychlejšímu průběhu odbourávání (byly identifikovány až více stabilní produkty). V prvním kroku docházelo k rozštěpení piperazinylového kruhu a navázání dvou aldehydových skupin na atomy dusíku (tři různé produkty). Druhým krokem bylo nahrazení atomu fluoru OH skupinou. Ve třetím kroku došlo k oxidaci OH skupiny na aldehydovou CHO skupinu a karboxylovou COOH skupinu.

V práci Vasconcelos et al. <sup>[39]</sup> byl vodný roztok ciprofloxacinu o koncentraci 100 µg/l s hodnotou pH = 9 (odtoky z nemocnic mají alkalické pH, zde nastaveno pomocí 0,1 M KOH) ozařovaný v reaktoru středotlakou rtuťovou výbojkou (150 W). Analýza fotoproduktů tohoto roztoku byla provedena pomocí HPLC-MS/MS na koloně s reverzní fází C18. Touto metodou bylo identifikováno 5 degradačních produktů ciprofloxacinu: produkt 1 vznikl rozštěpením

piperazinylového kruhu, produkt 2 vznikl rozštěpením piperazinylového kruhu a následnou oxidací (CHO skupina na dusíku), produkt 3 pak rozštěpením piperazinylového kruhu a odštěpením atomu fluoru, produkt 4 nahrazením atomu fluoru skupinou OH a produkt 5 odštěpením COOH skupiny. Bylo také zjištěno, že nejrychleji se ciprofloxacin odbourával v neutrálním pH, o něco pomaleji se odbourával v alkalickém pH a nejpomaleji v kyselém prostředí.

Li et al. <sup>[40]</sup> ozařoval xenonovou výbojkou vzorek vody obsahující enrofloxacin, huminové kyseliny a NaNO<sub>3</sub> v koncentraci typické pro povrchové a podzemní vody. Pomocí HPLC s UV-VIS detektorem a kolonou s reverzní fází C18 bylo zjištěno, že enrofloxacin se odbourává dle kinetiky 1.řádu. Pro identifikaci fotoproduktů enrofloxacinu byl použit HPLC-MS/MS s trojitým kvadrupólem, elektrosprejem jako iontovým zdrojem. Touto metodou bylo identifikováno pět degradačních produktů, přičemž hlavními cestami byla dekarboxylace, defluorinace, fragmentace piperazinylového kruhu a piperazinyl N<sup>4</sup> – dealkylace (tvorba ciprofloxacinu). Toxicita produktů vůči luminiscenční bakterii *Vibrio fischeri* nejprve rostla (u fotoproduktů vznikajících v první fázi ozařování), a pak s dobou ozařování klesala.

Ahmad et al. <sup>[41]</sup> pomocí HPLC-MS/MS s elektrosprejem a analyzátozem doby letu TOF identifikoval pět degradačních produktů norfloxacinu (počáteční koncentrace  $5 \times 10^{-5}$  mol/l, tj. 16,5 mg/l) objevil dvě hlavní cesty fotodegradace – první oxidace na piperazinylovém kruhu, druhá cesta rozštěpení piperazinylového kruhu s následnou deaminací a deethylací.

Metoda hmotnostní spektrometrie byla použita pro identifikaci struktur fotoproduktů fluorochinolonů v řadě dalších prací. <sup>[42,43,44,45,46]</sup>

## **2. CÍLE PRÁCE:**

Cílem této práce bylo identifikovat hlavní produkty fotokatalyzované degradace ciprofloxacinu prováděné za podmínek relevantních přírodním vodám, za týchž podmínek prostudovat kinetiku fotochemického odbourávání enrofloxacinu a norfloxacinu a pokusit se o identifikaci hlavních produktů i u těchto substrátů.

### **3. MATERIÁLY A METODY:**

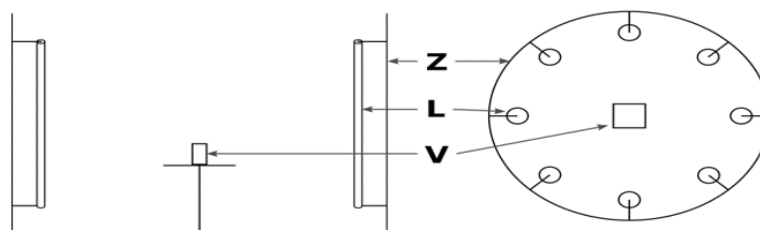
Ciprofloxacin ( $M = 331,3 \text{ g/mol}$ ), enrofloxacin ( $M = 359,39 \text{ g/mol}$ ) a norfloxacin ( $M = 319,33 \text{ g/mol}$ ) byly zakoupeny od firmy Sigma – Aldrich, všechny v čistotě  $\geq 98 \%$ . Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním cca 5 mg antibiotika ve 4 ml 0,1M HCl a 96 ml deionizované vody. Pro úpravu pH byl použit hydroxid sodný o koncentraci 10 %.

UV – VIS spektra byla měřena přístrojem UV – VIS spectrophotometer SHIMADZU typu UV – 1601 s použitím softwaru UV Probe.

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

Ozařování vzorků bylo prováděno v reaktoru Ravonet RPR 100 osazeném 16 lampami RPR 3000Å, které emitují záření v rozmezí 250 – 350 nm. Vzorek o objemu 3 ml byl ozařován ve skleněných kyvetách s víčkem, aby bylo odstraněno záření o vlnových délkách kratších než 300 nm.

Schéma aparatury používané pro ozařování zobrazuje Obr.2.



Obr.2: Schéma aparatury na ozařování: Z – zrcadlo, L – lampa, V - vzorek k ozáření.

Zářivý tok byl měřen měřičem Lutron A, celkový výkon elektromagnetického záření v oblasti vlnových délek 320 – 390 nm (oblast detekovaná měřičem) emitovaný za jednotku času byl vypočten pro ozařovanou plochu vzorku, jeho hodnota činí 4,5 W.<sup>[47]</sup>

Identifikace degradačních produktů ciprofloxacinu, enrofloxacinu i norfloxacinu byla prováděna pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu Thermo Ultimate 3000 s hmotnostním spektrometrem Velos Pro (s lineární iontovou pastí) s kolonou Thermo Scientific™ Acclaim™ RSLC 120 C18 (100 × 3 mm, 2,2mm) vyhřátou na 30 °C. Jako mobilní fáze byla použita směs 0,1 % HCOOH ve vodě a 0,1 % HCOOH v acetonitrilu – pro ciprofloxacin a norfloxacin v poměru 85: 15, pro enrofloxacin v poměru 92 : 8. Eluce byla prováděna isokraticky. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min v případě enrofloxacinu a norfloxacinu, 0,5 ml/min v případě ciprofloxacinu, nastříkovaný objem vzorku byl 5 µl. Hmotnostní detektor měl typ iontového zdroje HESI (vyhříváný elektrosprej), teplota iontového zdroje při všech analýzách byla 350 °C; hodnoty tlaku byly pro zmlžovací plyn 60 arb, pro pomocný plyn 20 arb. Vzorky byly proměřovány v pozitivním i v negativním módu. Hmotnostní spektra byla zpracována pomocí programu Xcalibur.

#### **4. VÝSLEDKY**

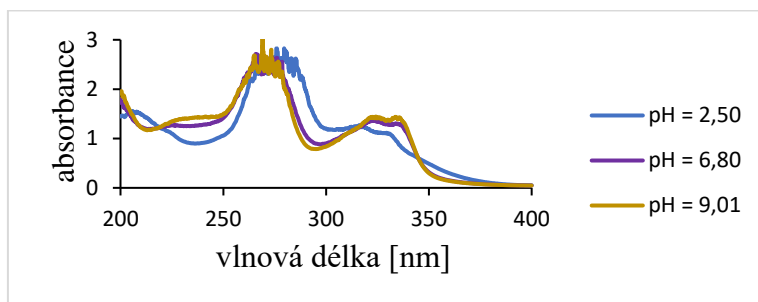
Absorpční spektra antibiotik ze skupiny fluorochinolonů – ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu jsou znázorněna na Obr.3. Jak je patrné z Obr.3 tato tři antibiotika významně absorbují v UV oblasti, a to i v oblasti nad 300 nm. Mohou tedy absorbovat krátkovlnnou část slunečního záření dopadajícího na zemský povrch.

U roztoku enrofloxacinu i norfloxacinu byla testována stabilita rozpuštěného antibiotika v závislosti na pH při 25 °C, ve tmě, po dobu 96 hodin.

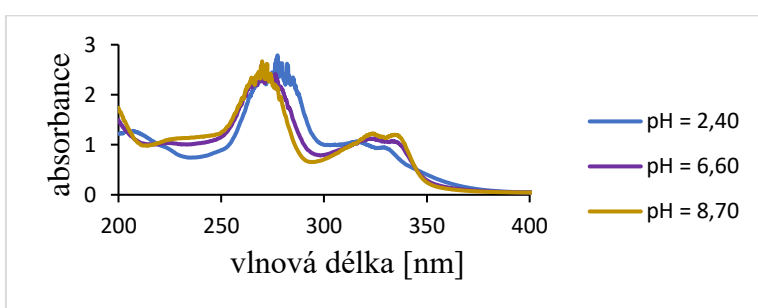
Pro test stability vodného roztoku enrofloxacinu byly zvoleny čtyři hodnoty pH (pH = 2,0; pH = 4,0; pH = 7,0 a pH = 8,13), pro roztok norfloxacinu byl test stability proveden při pH = 4,0; pH = 7,1 a pH = 8,8. Ani v jednom případě nedošlo k poklesu koncentrace enrofloxacinu. Hodnota pH neměla na stabilitu vodného roztoku enrofloxacinu vliv a vodný roztok tohoto antibiotika byl stabilní po celou dobu testování (96 h).

Test stability ciprofloxacinu je popsán v práci Poncarové<sup>[48]</sup>, kde bylo zjištěno, že na stabilitu ciprofloxacinu nemá vliv hodnota pH, teplota ani přídavek železitých iontů.

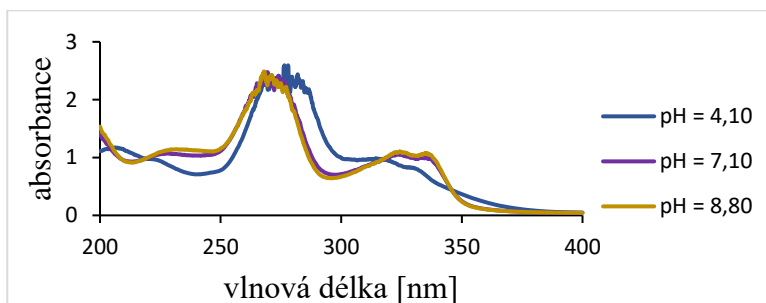
a) ciprofloxacin



b) enrofloxacin



c) norfloxacin

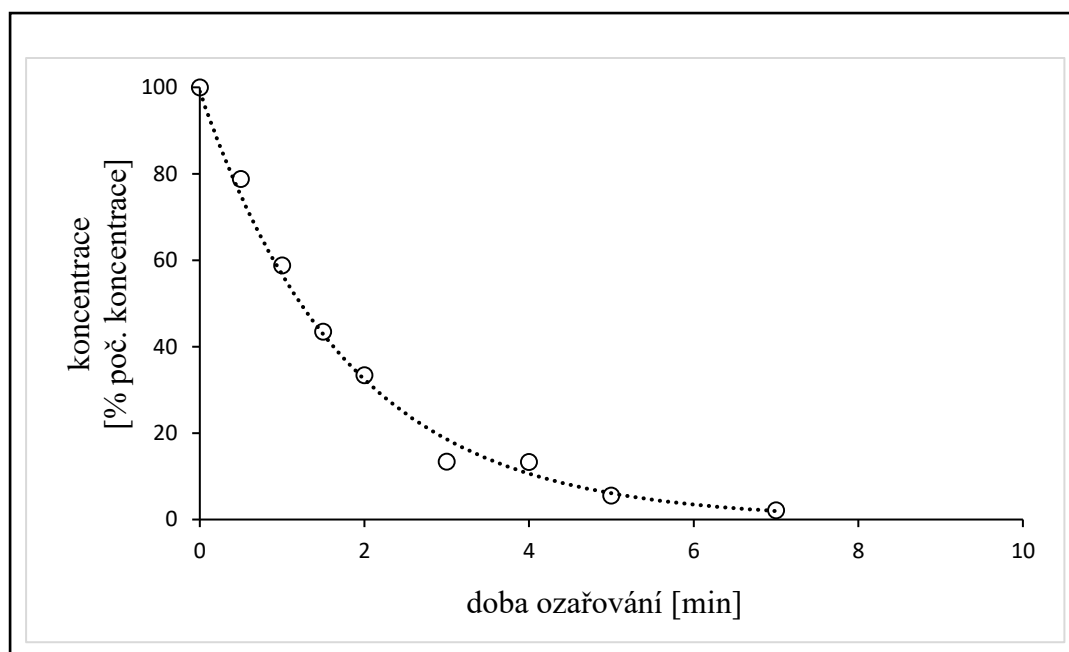


Obr.3: Absorpční spektra vodných roztoků fluorochinolonů při různých hodnotách pH – a) ciprofloxacin, b) enrofloxacin, c) norfloxacin.

Fotochemické odbourávání ciprofloxacinu v kyselém ( $\text{pH} = 4,0$ ) a v neutrálním prostředí je popsáno taktéž v práci Poncarové [48]. Bylo zjištěno, že hodnota pH měla vliv na rychlost odbourávání antibiotika, přičemž v kyselém prostředí ( $\text{pH} = 4,0$ ) se ciprofloxacin odbourával pomaleji než v neutrálním prostředí. Fotochemickou degradaci ciprofloxacinu v zásaditém prostředí lze popsat kinetikou 1.řádu, stanovená rychlostní konstanta má hodnotu  $0,558 \text{ min}^{-1}$ .



Průběh fotochemické degradace ciprofloxacinu v zásaditém prostředí ukazuje Obr.4.



Obr.4: Fotochemická degradace ciprofloxacinu v zásaditém prostředí.

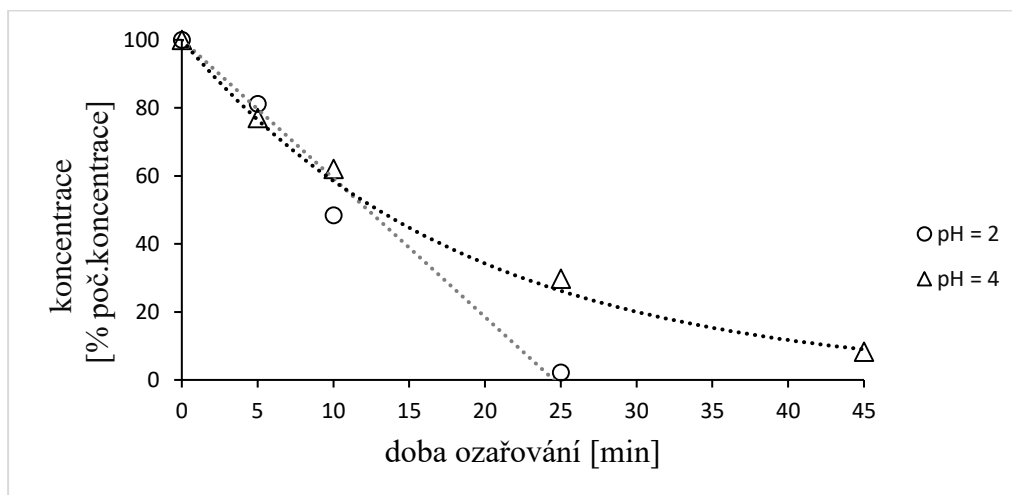
Průběh degradační produktů ciprofloxacinu v zásaditém prostředí je znázorněn v Příloze 1. Průběhy produktů ciprofloxacinu v neutrálním a v kyselém pH jsou uvedeny v Přílohách v práci Poncarové. <sup>[48]</sup>

Fotochemická degradace enrofloxacinu byla prováděna při čtyřech hodnotách pH – v kyselém prostředí při pH = 2,0 a pH = 4,0; v neutrálním prostředí při pH = 7,0 a v zásaditém prostředí při pH = 8,13.

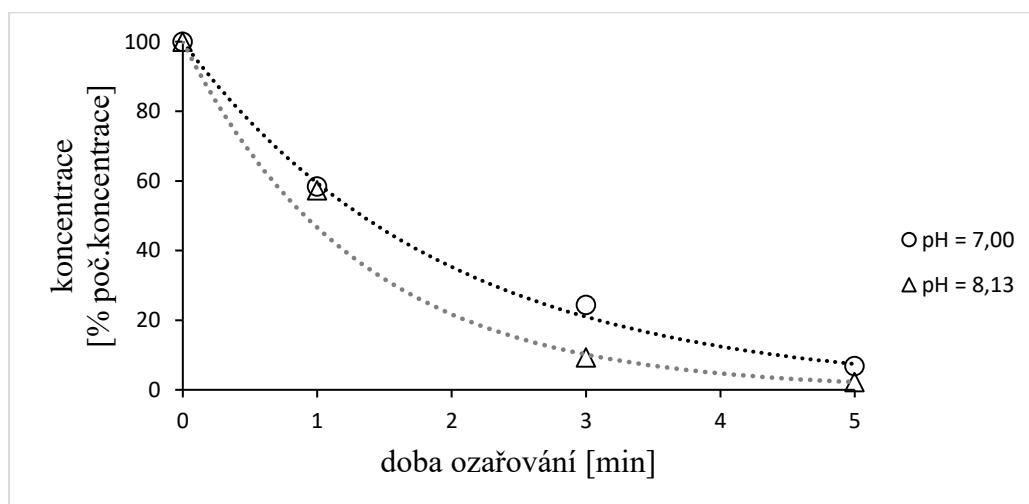
Výsledky fotochemické degradace enrofloxacinu v závislosti na pH ukazuje Obr.5. Jak je z tohoto obrázku patrné, hodnota pH má vliv na rychlost odbourání enrofloxacinu.

V kyselém prostředí při pH = 4 dochází k odbourávání, které lze popsat kinetikou 1. řádu s rychlostní konstantou  $0,055 \text{ min}^{-1}$ . Při pH = 2 nelze ke kinetickému popisu odbourávání enrofloxacinu použít model kinetiky 1. řádu, úbytek enrofloxacinu je prakticky lineární.

a) fotochemická degradace vodného roztoku enrofloxacinu v kyselém prostředí



b) fotochemická degradace vodného roztoku enrofloxacinu v neutrálním a zásaditém prostředí



Obr.5: Fotochemická degradace vodného roztoku enrofloxacinu a) v kyselém prostředí; b) v neutrálním a v zásaditém prostředí.

Jak je vidět z Obr.5, je patrné rychlejší odbourávání při vyšším pH (k v neutrálním prostředí má hodnotu  $0,521 \text{ min}^{-1}$ , v zásaditém  $0,763 \text{ min}^{-1}$ ).

Průběh vzniklých degradačních produktů enrofloxacinu při různých hodnotách pH zobrazuje Příloha 2.

Fotochemické odbourávání norfloxacinu bylo také ovlivněno hodnotou pH. V neutrálním a zásaditém prostředí se norfloxacin odbourával rychleji než v kyselém prostředí – s použitím

kinetiky 1.řádu byly stanoveny rychlostní konstanty odbourávání norfloxacinu v kyselém prostředí  $k = 0,015 \text{ min}^{-1}$ , v neutrálním  $k = 0,341 \text{ min}^{-1}$  a v zásaditém  $k = 0,254 \text{ min}^{-1}$ .

Průběhy vzniklých degradačních produktů norfloxacinu při různých hodnotách pH jsou uvedeny v Příloze 3.

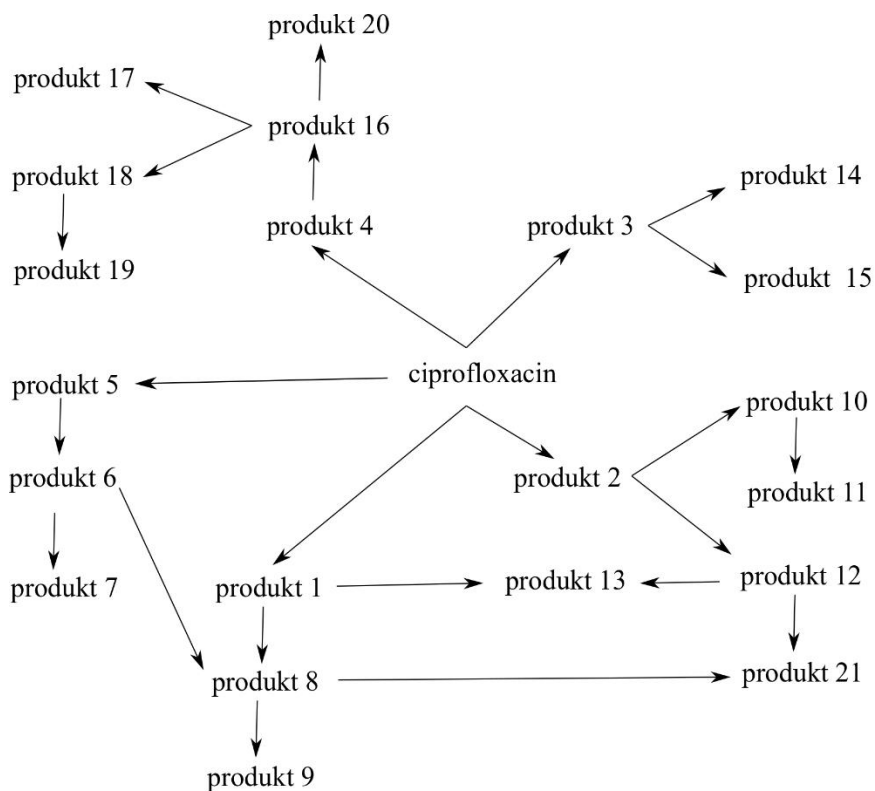
Při fotochemickém odbourávání tří uvedených zástupců fluorochinolonových antibiotik vzniká velké množství meziproductů a produktů. Doby ozařování jednotlivých roztoků pro následnou identifikaci struktur produktů pomocí HPLC / MS / MS, byly voleny tak, aby bylo v reakční směsi přítomno co nejvíce vzniklých produktů. Tyto doby ozařování jsou uvedeny v Tab.II. V případě enrofloxacinu byla identifikace produktů provedena i v kyselém prostředí, doba ozařování byla 25 minut. V tomto roztoku byla relativní koncentrace antibiotika 26,38 %.

Tab.II: Doby ozařování roztoků ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu v neutrálním a alkalickém pH pro identifikaci produktů ozařování a zbytkové koncentrace substrátu v ozářené směsi.

<b>název ATB</b>	<b>pH</b>	<b>čas ozařování [min]</b>	<b>rel. koncentrace ATB [%]</b>
ciprofloxacin	7	3	11
ciprofloxacin	8,55	2,5	25
enrofloxacin	6,8	5	7
enrofloxacin	8,13	3	3
norfloxacin	7,14	5	20
norfloxacin	8,95	4,5	31

HPLC chromatogramy ozářených roztoků vybraných fluorochinolonů jsou shrnuty v Příloze 4. Tyto chromatogramy znázorňují složení reakční směsi v takovém ozařovacím čase, kde byly všechny produkty dobře patrné, a tedy v čase, který byl následně použit pro HPLC / MS analýzu produktů.

Mechanismus degradace ciprofloxacinu v neutrálním pH zobrazuje Obr. 6.



Obr.6: Schéma degradace ciprofloxacinu v neutrálním pH.

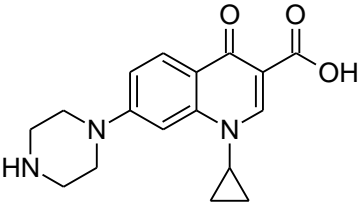
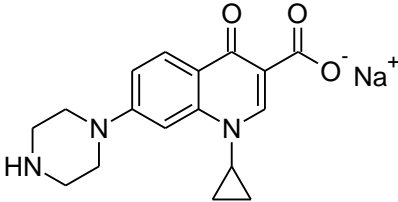
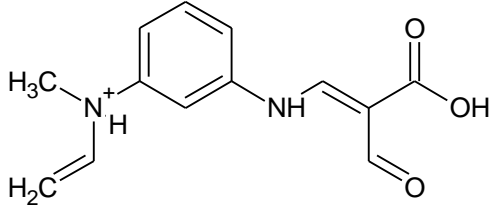
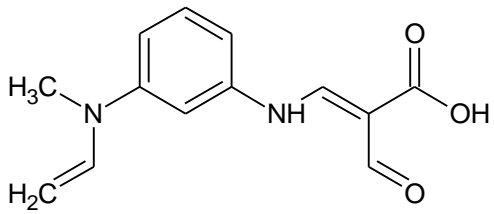
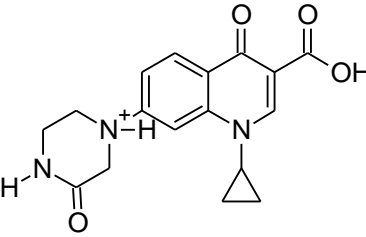
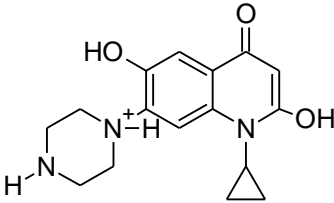
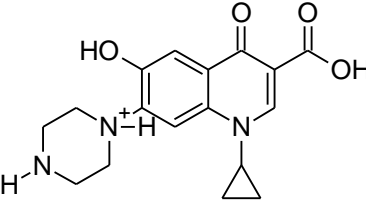
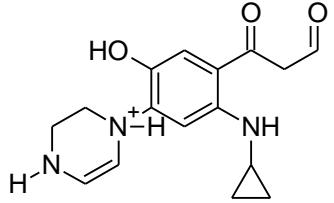
Struktury fotodegradačních produktů ciprofloxacinu byly zaznamenány do Tab.III.

Jak je vidět Tab.III, vzniká při degradaci 24 produktů. Pokud jde o struktury, bylo pozorováno odštěpení fluoru, případně jeho nahrazení OH skupinou, dekarboxylace i otevření a částečné odbourání či úplné odbourání cyklických struktur.

Tab.III: Fotodegradační produkty ciprofloxacinu v neutrálním prostředí.

Název	Vzorec	m/z
ciprofloxacin		332,0

Produkt 1		288,1
Produkt 2		314,1
Produkt 3		346,1
Produkt 4	adukt ciprofloxacinu se složkou mobilní fáze (acetonitrilem)	376,1
Produkt 5		290,0
Produkt 6		272,0
Produkt 7		229,0
Produkt 8		271,0
Produkt 9	Struktura neidentifikována	253,1

Produkt 10		313,3
Produkt 11		295,1
Produkt 12		245,0
Produkt 13		244,0
Produkt 14		328,2
Produkt 15		302,1
Produkt 16		330,1
Produkt 17		286,1

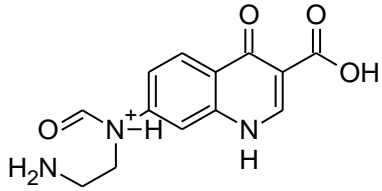
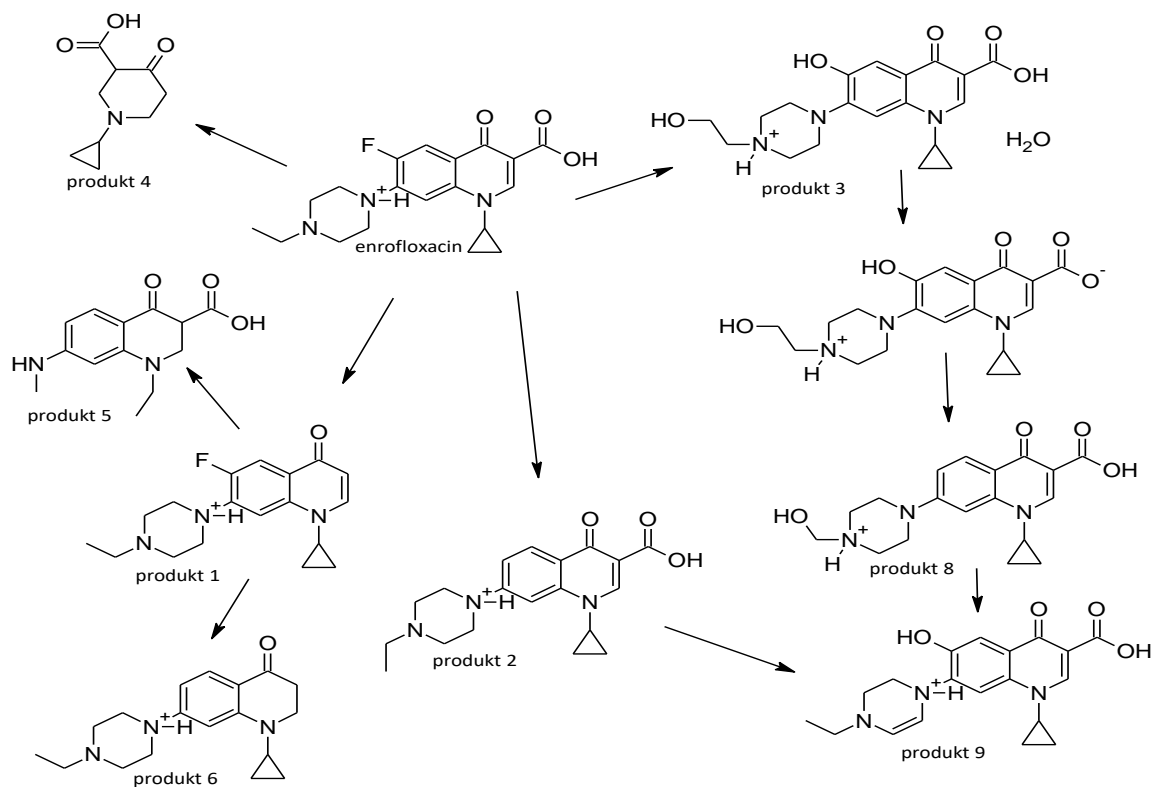
Produkt 18		316,1
Produkt 19	Struktura neidentifikována	298,1
Produkt 20	Struktura neidentifikována	312,1
Produkt 21	Struktura neidentifikována	227,1
Kyselina mravenčí	Identifikace pomocí IC	-
Kyselina octová	Identifikace pomocí IC	-
Fluoridový anion	Identifikace pomocí IC	-

Schéma a struktury degračních produktů enrofloxacinu v neutrálním prostředí zobrazuje Obr.7.



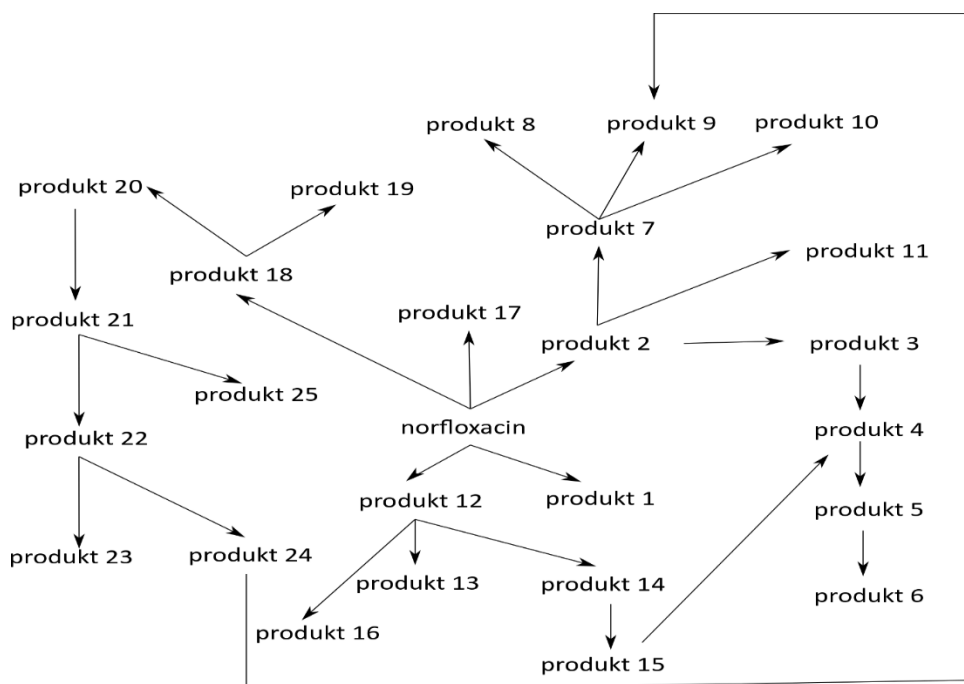
Obr.7: Schéma odbourávání vodného roztoku enrofloxacinu v neutrálním pH.

Hodnoty m/z vzniklých produktů enrofloxacinu v neutrálním prostředí zobrazuje Tab.IV. Většina produktů byla detekována v + ESI módu, jeden pouze v - ESI módu. U enrofloxacinu a produktů 1, 2, 7 a 8 byla detekce možná v obou módech.

Tab.IV: Naměřené hodnoty m/z degradačních produktů enrofloxacinu (pH =7).

název	m/z	
	v + ESI	v - ESI
enrofloxacin	360,2	358,4
produkt 1	316,2	314,1
produkt 2	342,1	
produkt 3		394,0
produkt 4	179,6	
produkt 5	245,1	
produkt 6	298,1	
produkt 7	374,2	372,2
produkt 8	358,2	356,2
produkt 9	340,0	

Schéma degradace norfloxacinu v neutrálním prostředí zobrazuje Obr.8.



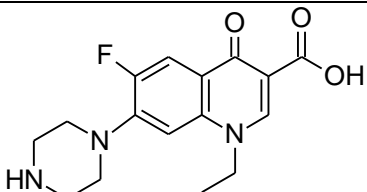
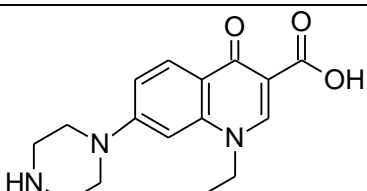
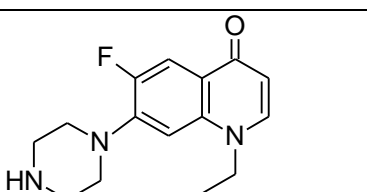
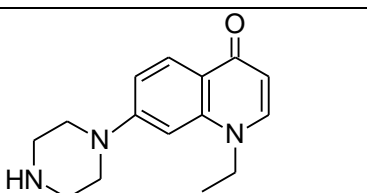
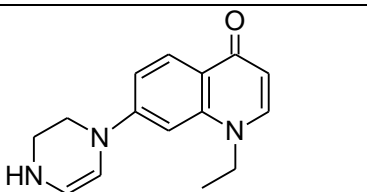
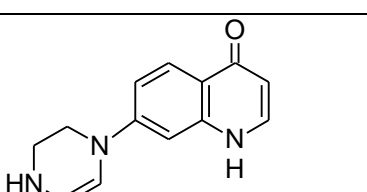
Obr.8: Schéma degradace norfloxacinu v neutrálním prostředí (pH = 7,14).

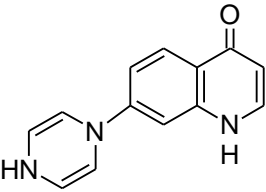
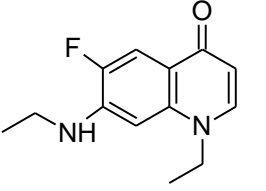
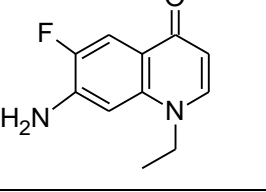
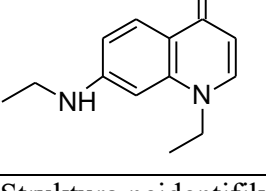
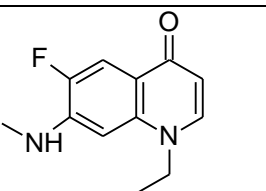
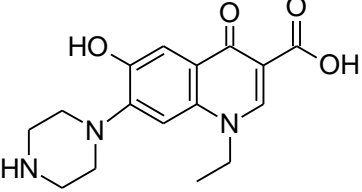
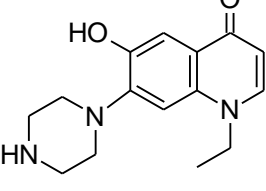
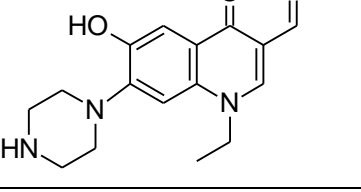


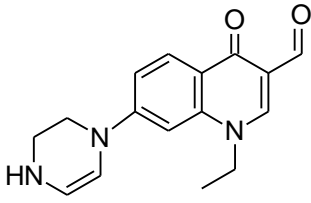
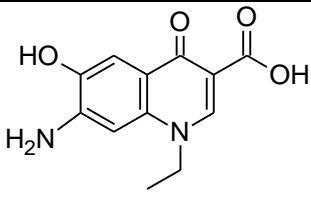
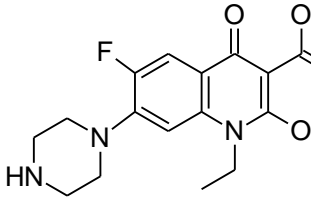
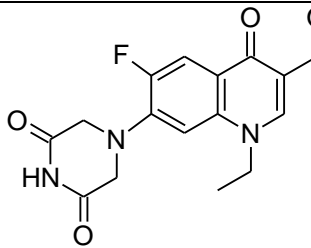
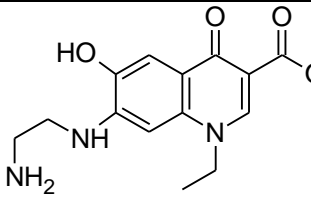
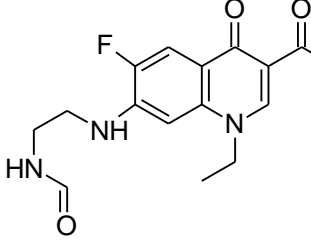
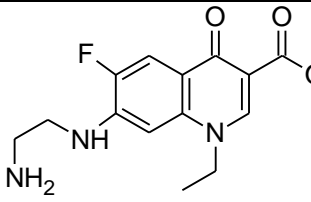
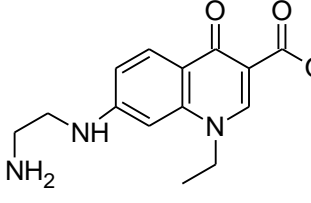
I v tomto případě byly hlavními cestami degradace odštěpení fluoru a dekarboxylace.

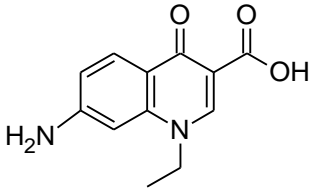
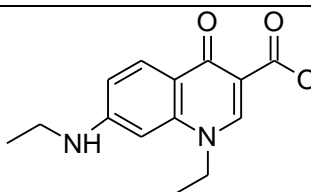
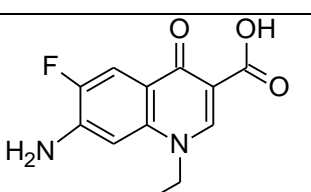
Struktury fotodegradačních produktů norfloxacinu v neutrálním prostředí byly zaznamenány do Tab.V.

Tab.V: Struktury produktů norfloxacinu v neutrálním prostředí.

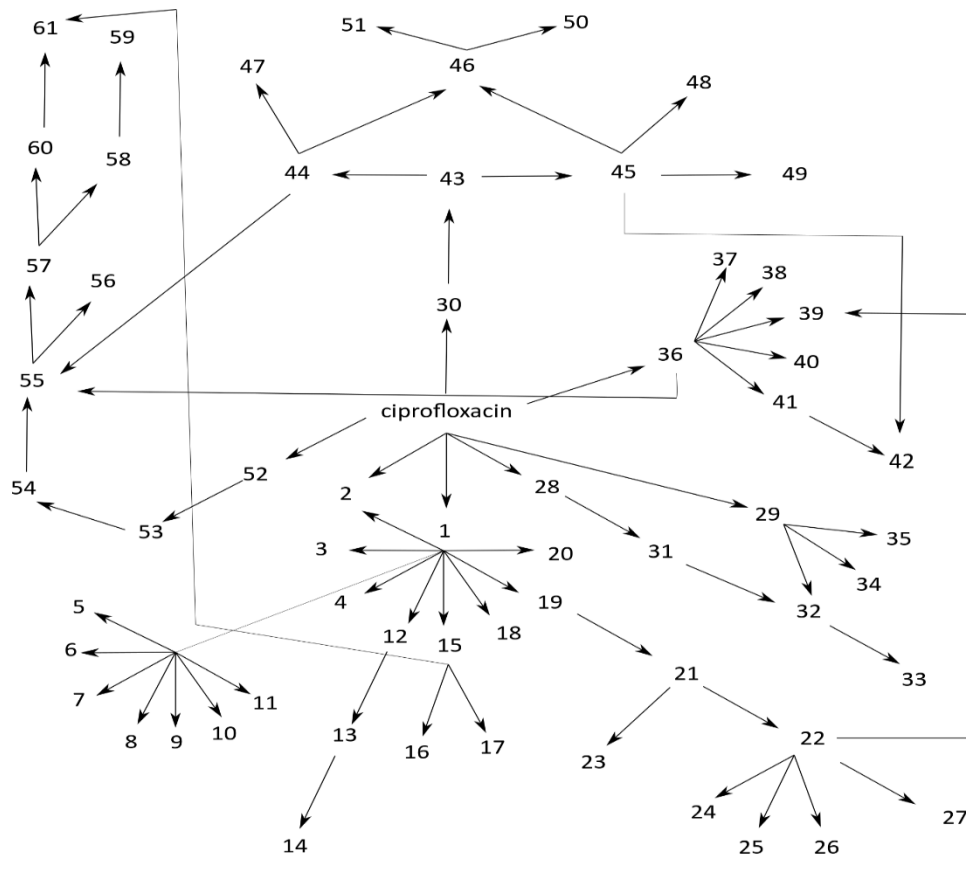
Název	Vzorec	m/z
norfloxacin		320,2 v +ESI
Produkt 1		302,2 v + ESI
Produkt 2		276,2; 7,54 min
Produkt 3		258,2 v + ESI
Produkt 4		256,2 v + ESI
Produkt 5		228,1 v + ESI

Produkt 6		226,1 v + ESI
Produkt 7		233,2 v + ESI
Produkt 8		205,1 v + ESI
Produkt 9		215,1 v + ESI
Produkt 10	Struktura neidentifikována	218,1 v + ESI
Produkt 11		219,1 v + ESI
Produkt 12		318,2 v + ESI
Produkt 13		274,2 v + ESI; 3,01
Produkt 14		300,2 v + ESI

Produkt 15		282,2 v + ESI
Produkt 16		244,1 v – ESI
Produkt 17		334,2 v – ESI
Produkt 18	 H <sub>2</sub> O	364,2 v – ESI
Produkt 19		290,3 v – ESI
Produkt 20		320,2 v – ESI;
Produkt 21		294,1 v – ESI; 3,40
Produkt 22		276,1 v + ESI 274,1 v – ESI; 3,40 min

Produkt 23		230,2 v -ESI
Produkt 24		259,1 v + ESI
Produkt 25		251,1 v + ESI

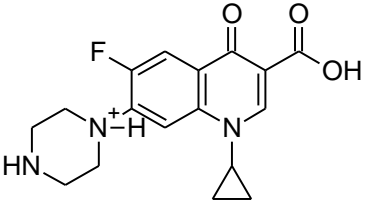
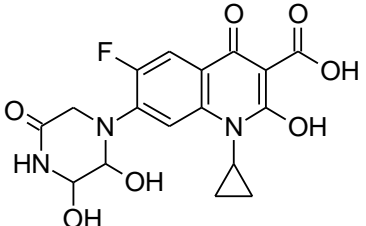
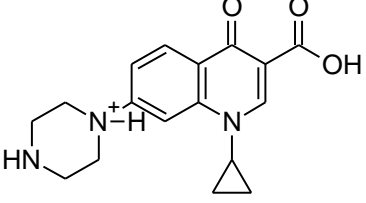
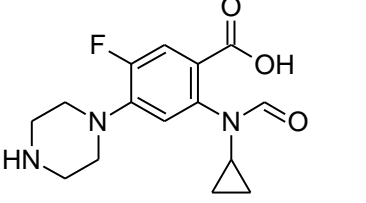
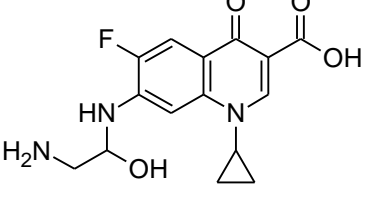
Mechanismus degradace ciprofloxacinu v zásaditém prostředí (pH = 8,55) znázorňuje Obr.9.

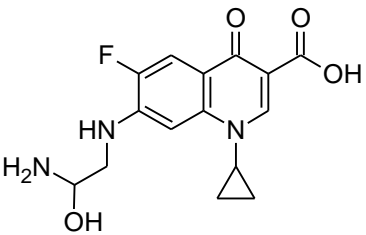
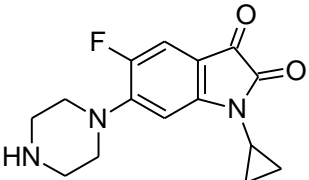
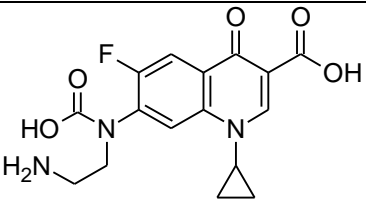
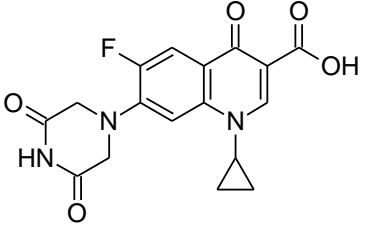
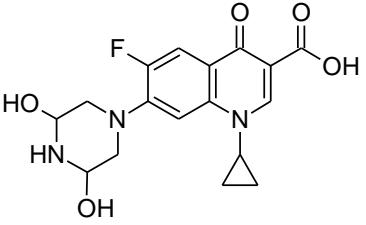
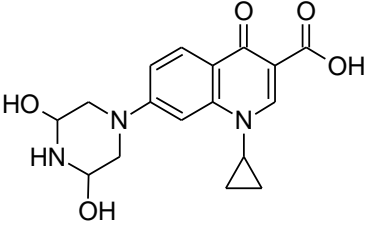


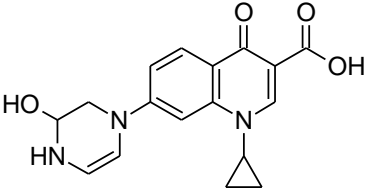
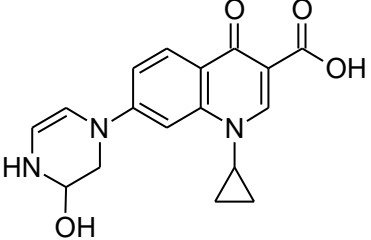
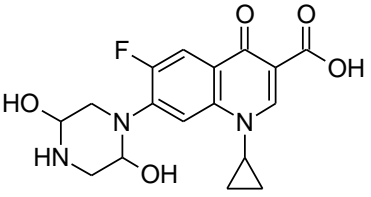
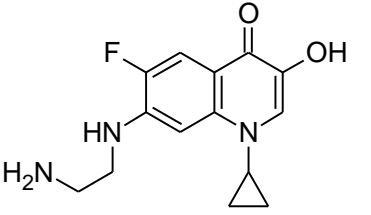
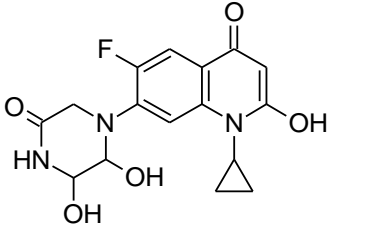
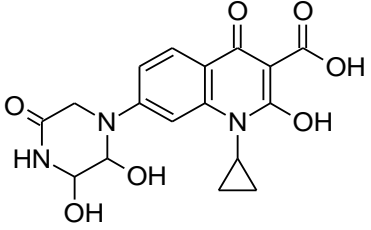
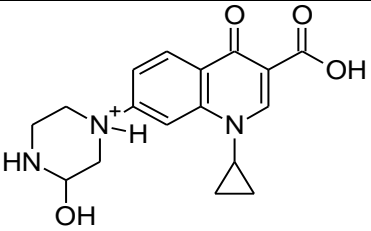
Obr.9: Schéma fotodegradace ciprofloxacinu (pH = 8,55).

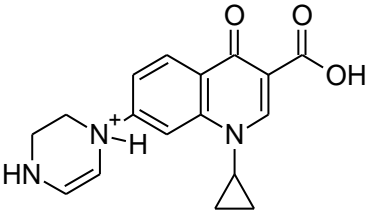
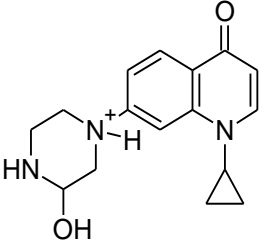
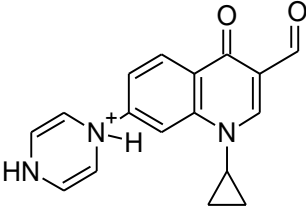
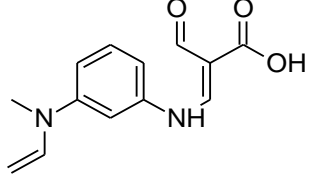
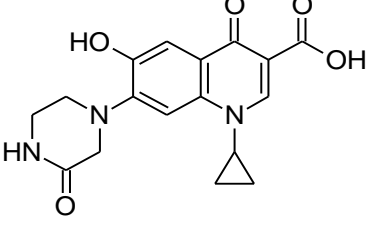
V zásaditém prostředí (pH = 8,55) vznikalo z ciprofloxacinu 61 degradačních produktů. Jejich struktury byly zaznamenány do Tab.VI.

Tab.VI: Fotodegradační produkty ciprofloxacinu (pH = 8,55).

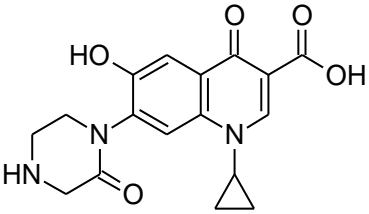
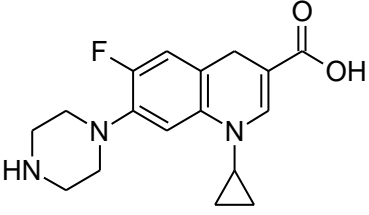
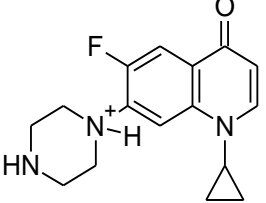
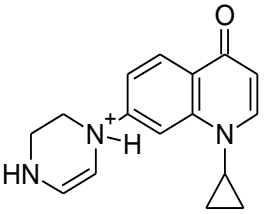
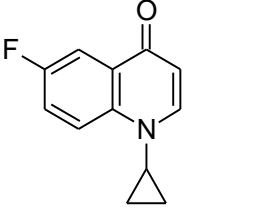
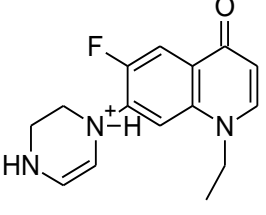
Název	Vzorec	m/z
ciprofloxacin		332,2 v + ESI 330,2 v - ESI
Produkt 1		393,2 v - ESI
Produkt 2		314,2 v + ESI
Produkt 3	Struktura neidentifikována	367,1 v - ESI
Produkt 4		305,1 v - ESI 307,1 v + ESI
Produkt 5	 nebo	319,0 v - ESI 321,0 v + ESI

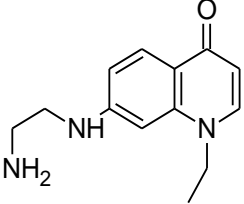
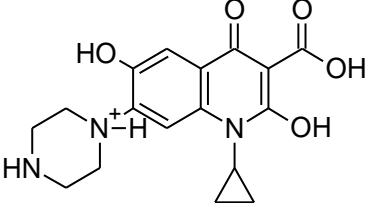
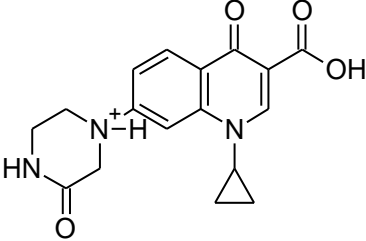
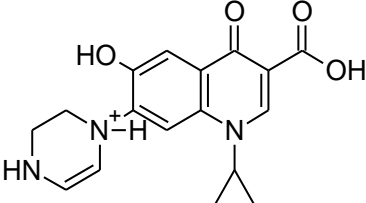
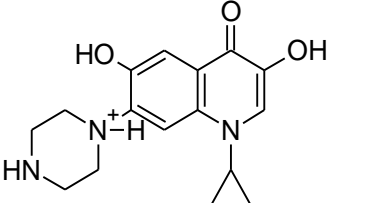
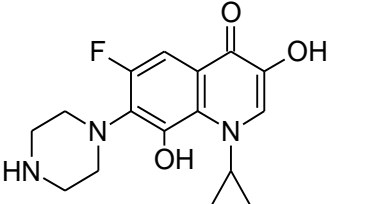
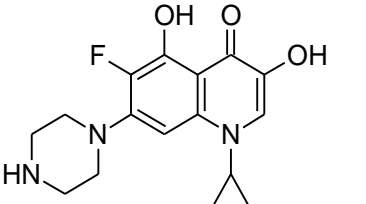
		
Produkt 6	Struktura neidentifikována	296,2 v - ESI
Produkt 7		287,3 v - ESI
Produkt 8	Struktura neidentifikována	273,3 v - ESI
Produkt 9		347,1 v - ESI 349,1 v + ESI
Produkt 10		357,1 v - ESI
Produkt 11	Struktura neidentifikována	339,1 v - ESI
Produkt 12		362,9 v + ESI
Produkt 13		345,2 b + ESI

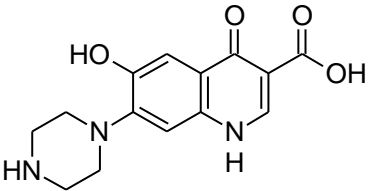
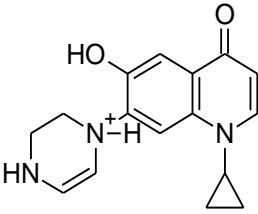
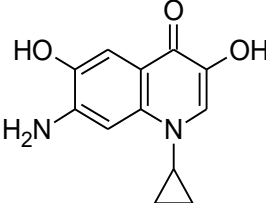
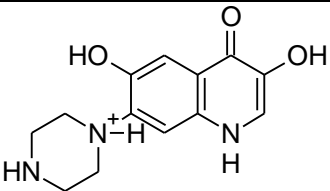
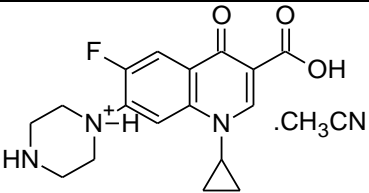
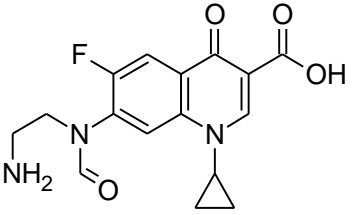
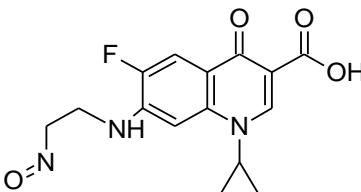
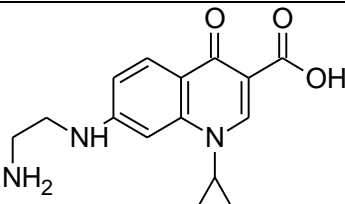
Produkt 14	 <p>nebo</p> 	325,0 v – ESI 327,2 v - ESI
Produkt 15		362,9 v + ESI
Produkt 16		277,1 v + ESI
Produkt 17	Struktura neidentifikována	226,9
Produkt 18		349,2 v - ESI
Produkt 19		374,9 v – ESI
Produkt 20	Struktura neidentifikována	250,2 v - ESI
Produkt 21		328,2 v – ESI 330,2 v + ESI

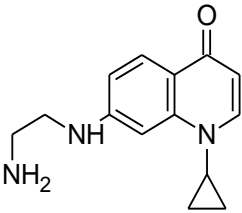
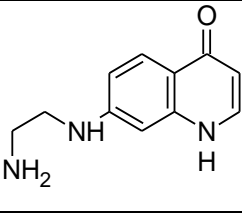
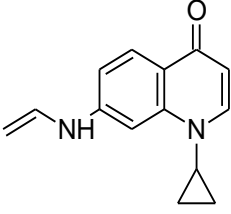
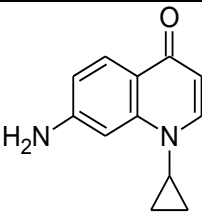
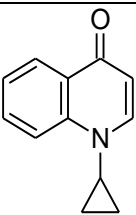
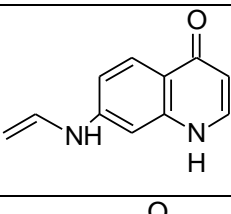
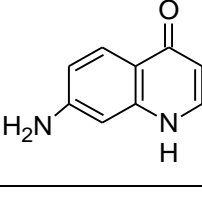
Produkt 22		312,1 v + ESI
Produkt 23		284,3 v – ESI 286,3 v + ESI
Produkt 24	Struktura neidentifikována	213,1 v + ESI
Produkt 25		294,1 v + ESI
Produkt 26	Struktura neidentifikována	196,1 v + ESI
Produkt 27		243,1 v + ESI
Produkt 28	Struktura neidentifikován	388,2 v – ESI
Produkty 29 a 30	Struktury neidentifikovány, stereoizomery	380,2 v – ESI, 6,52 min; 3,62 min
Produkt 31	Struktura neidentifikována	378,2 v - ESI
Produkt 32	  nebo	342,1 v – ESI 344,2 v + ESI



		
Produkt 33	Struktura neidentifikována	326,1 v + ESI
Produkt 34	Struktura neidentifikována	326,1 v + ESI
Produkt 35		316,1 v – ESI 318,1 v + ESI
Produkt 36		286,2 v – ESI 288,2 v + ESI, 4,43 min
Produkt 37	Struktura neidentifikována	253,1 v + ESI
Produkt 38	Struktura neidentifikována	240,1 v + ESI
Produkt 39		268,2 v + ESI
Produkt 40		205,1 v + ESI
Produkt 41		274,1 v + ESI

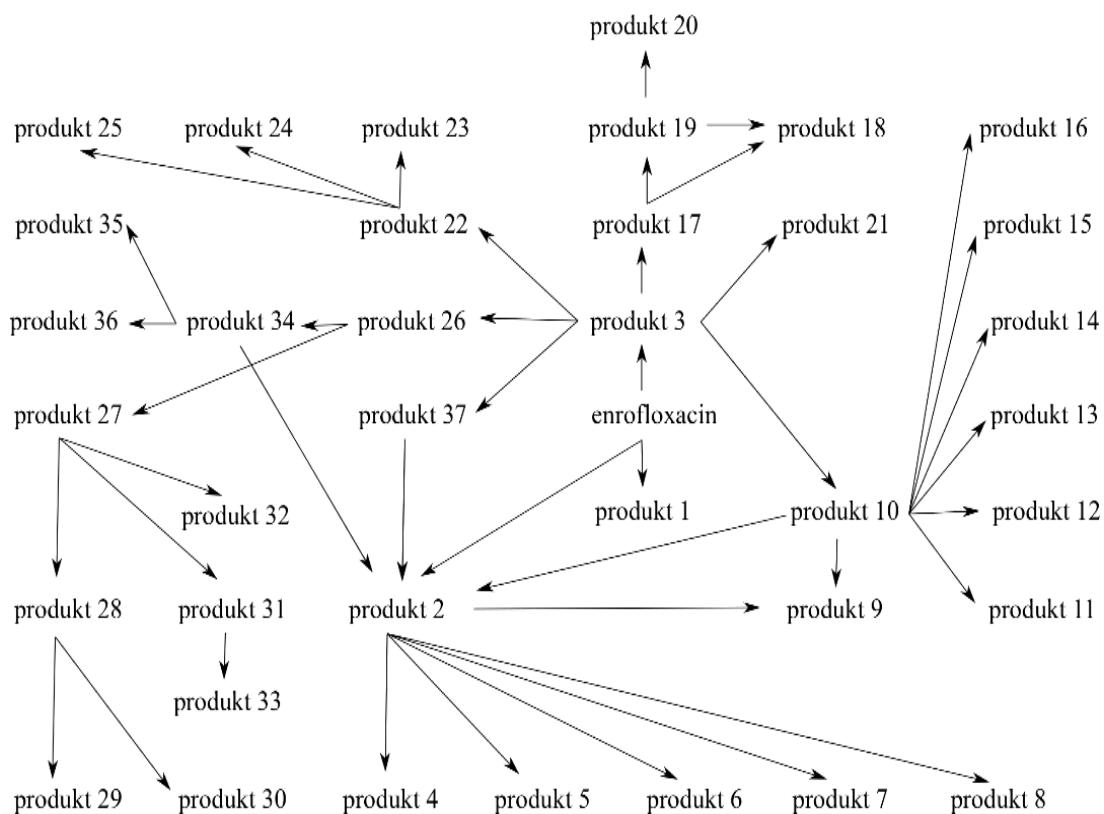
Produkt 42		231,1 v + ESI
Produkt 43		344,2 v - ESI 346,2 v + ESI
Produkt 44		328,17 v + ESI, 1,33 min
Produkt 45		328,17 v + ESI, 3,62 min
Produkt 46		300,19 v - ESI 302,19 v + ESI
Produkt 47	  nebo 	319,13 v + ESI

Produkt 48		287,06 v + ESI
Produkt 49		285,07 v + ESI
Produkt 50		230,10 v - ESI
Produkt 51		259,13 v - ESI
Produkt 52		376,19 v - ESI
Produkt 53	 nebo 	332,22 v - ESI 334,22 v + ESI
Produkt 54		286,12 v - ESI 288,12 v + ESI, 2,37 min

Produkt 55		244,16 v + ESI
Produkt 56		202,15 v - ESO
Produkt 57		227,10 v + ESI
Produkt 58		199,05 v + ESI
Produkt 59		185,08 v + ESI
Produkt 60		186,02 v + EXI
Produkt 61		159,05 v + ESI

Mechanismus odbourávání enrofloxacinu v zásaditém prostředí (pH = 8,13) zobrazuje Obr.10.

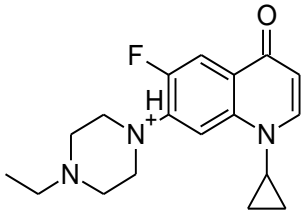
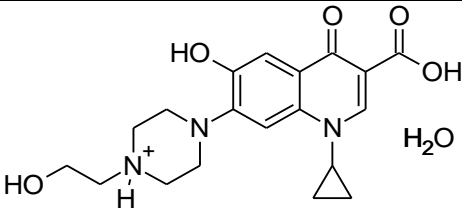
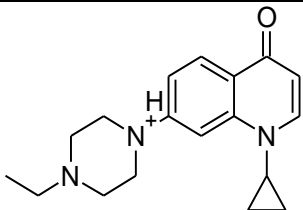
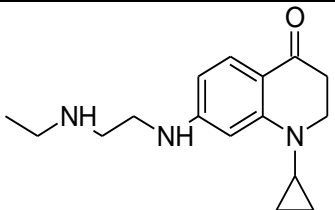
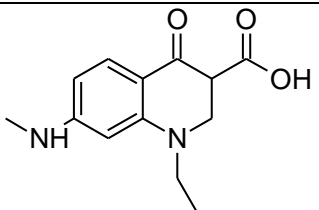
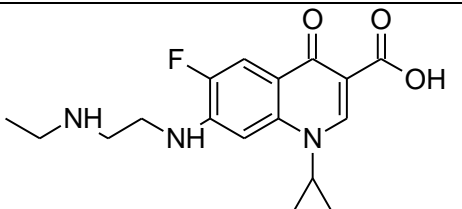
V zásaditém prostředí (pH = 8,13) vznikalo mnohem více degradačních produktů enrofloxacinu, jejich struktury byly zakresleny do Tab.VII.

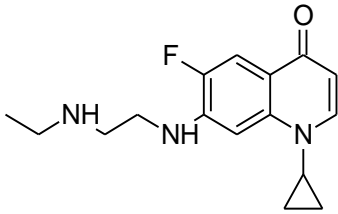
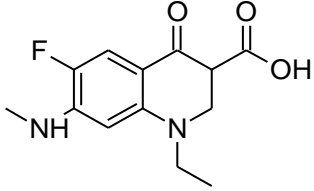
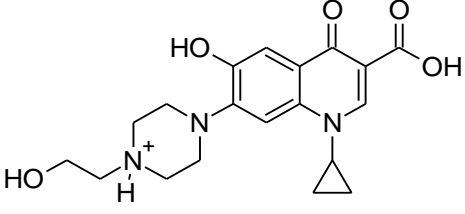
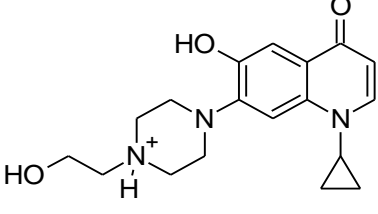
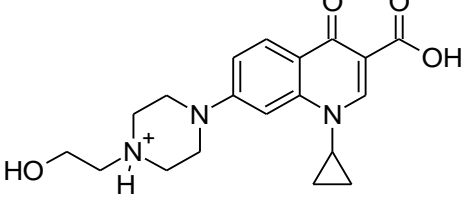
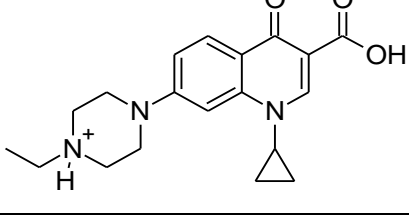
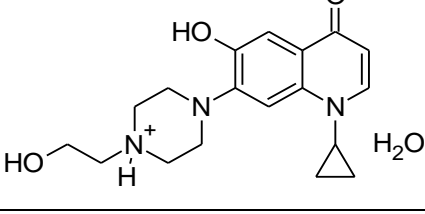
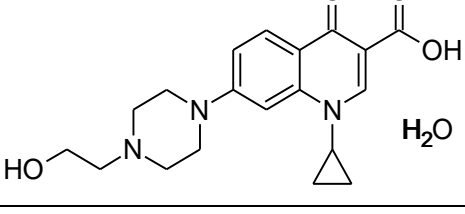


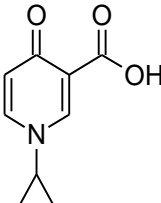
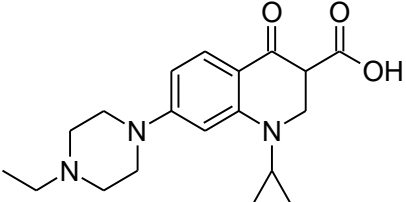
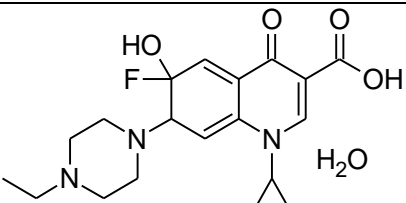
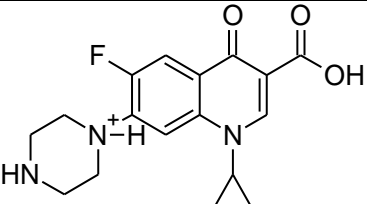
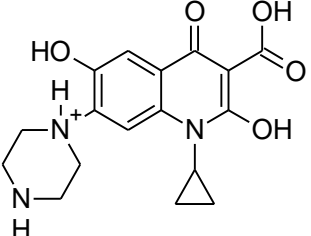
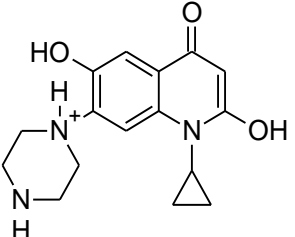
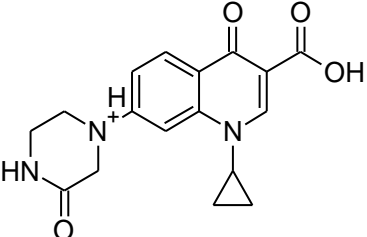
Obr.10: Schéma fotodegradace enrofloxacinu (pH = 8,13).

Tab.VII: Fotodegradační produkty enrofloxacinu (pH = 8,13).

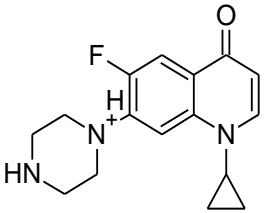
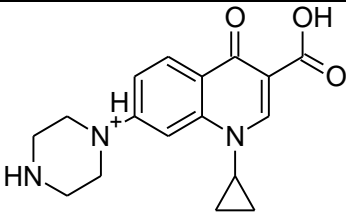
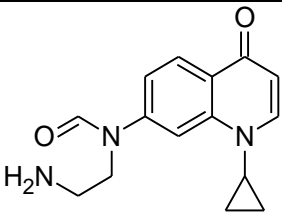
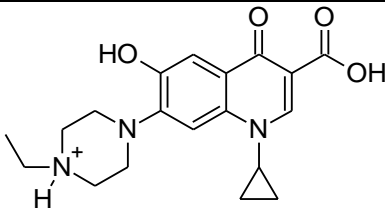
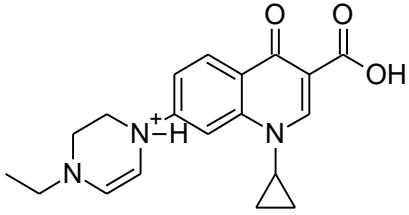
Název	Vzorec	m/z
enrofloxacin		360,0 v + ESI, 358,2 v - ESI
Produkt 1		342,2 v + ESI

Produkt 2		316,2 v + ESI, 314,2 v - ESI
Produkt 3		394,2 v - ESI
Produkt 4		298,1 v + ESI
Produkt 5		274,1 v - ESI
Produkt 6	Struktura neidentifikována	230,2 v - ESI
Produkt 7	Struktura neidentifikována	227,0 v + ESI
Produkt 8	Struktura neidentifikována	271,1 v + ESI
Produkt 9		245,1 v + ESI
Produkt 10		331,8 v - ESI, 334,0 v + ESI
Produkt 11	Struktura neidentifikována	292,1 v - ESI
Produkt 12	Struktura neidentifikována	248,0 v - ESI
Produkt 13	Struktura neidentifikována	288,1 v - ESI

Produkt 14		289,1 v + ESI
Produkt 15	Struktura neidentifikována	219,1 v + ESI
Produkt 16		263,1 v + ESI
Produkt 17		372,2 v - ESI, 374,2 v + ESI
Produkt 18		325,9 v - ESI, 328,0 v + ESI
Produkt 19		356,2 v + ESI
Produkt 20		257,1 v + ESI
Produkt 21		348,0 v - ESI, 350,0 v + ESI
Produkt 22		377,2 v - ESI

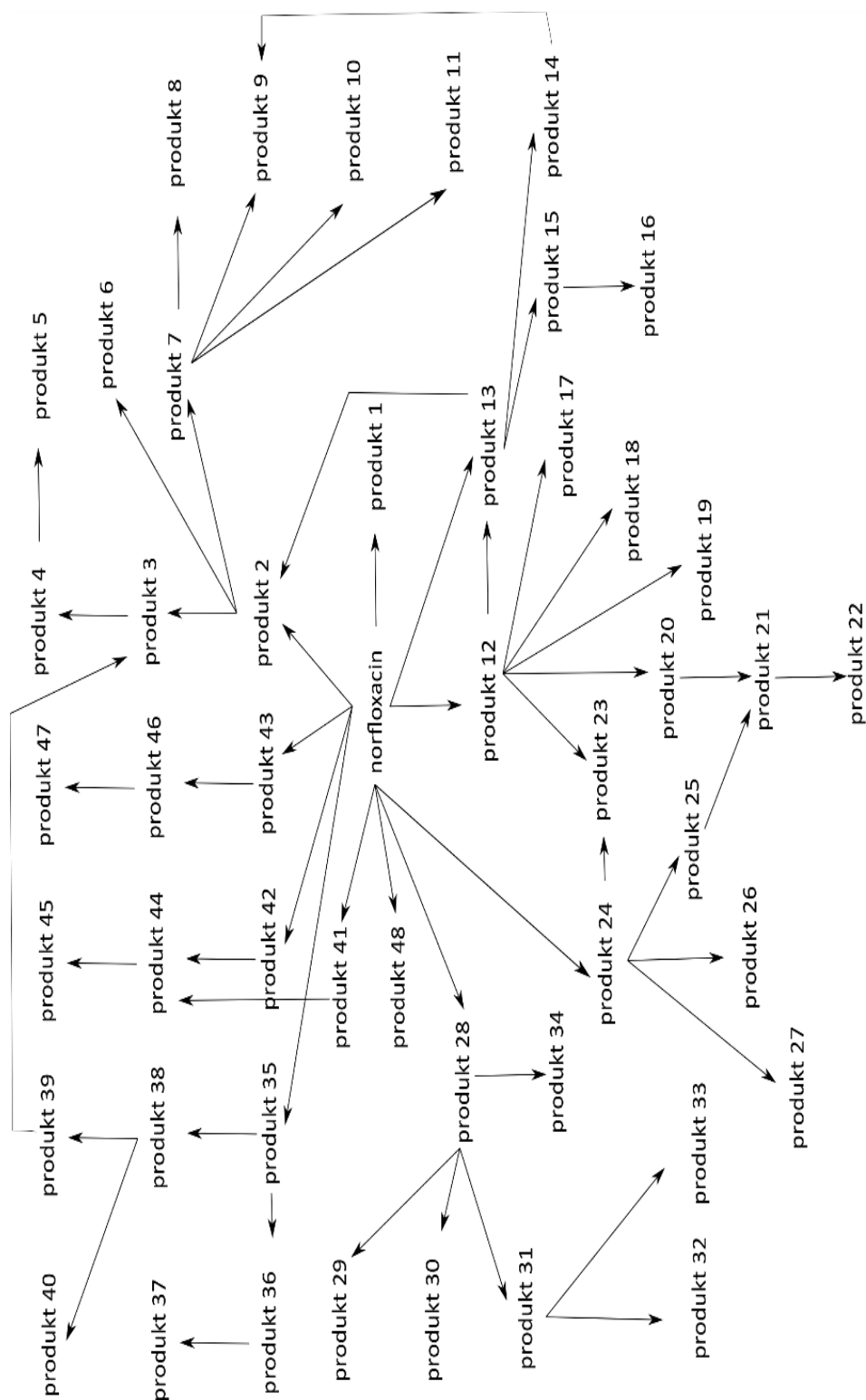
Produkt 23		179,0 v - ESI
Produkt 24	Struktura neidentifikována	215,0 v - ESI
Produkt 25		341,1 v - ESI
Produkt 26		375,9 v - ESI, 376,2 v + ESI
Produkt 27 (ciprofloxacin)		332,2 v + ESI
Produkt 28		346,2 v + ESI
Produkt 29		300,1 v - ESI
Produkt 30		328,2 v + ESI



Produkt 31		288,2 v + ESI
Produkt 32		314,1 v + ESI
Produkt 33		270,1 v + ESI
Produkt 34		358,2 v + ESI
Produkt 35	Struktura neidentifikována	271,0 v - ESI
Produkt 36		340,2 v + ESI

Opět je ale vidět, že při degradaci dochází k odštěpení fluoru, dekarboxylaci, hydroxylaci, odbourávání postranních řetězců a rozevírání až odbourávání cyklických struktur.

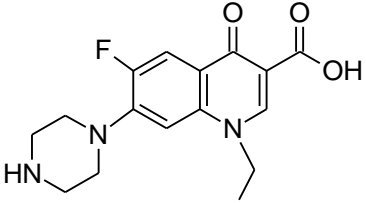
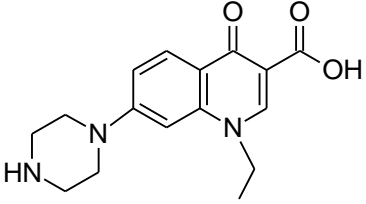
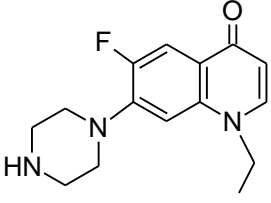
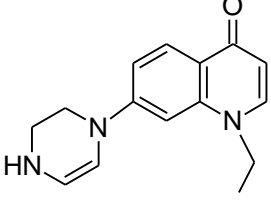
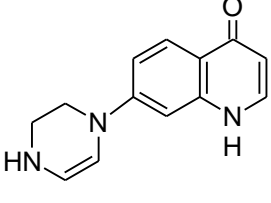
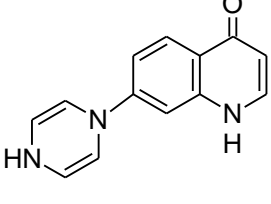
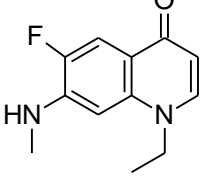
Schéma degradace norfloxacinu v zásaditém prostředí je znázorněn na Obr.11.

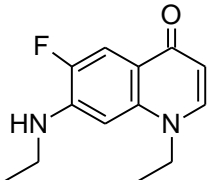
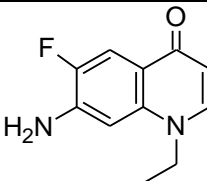
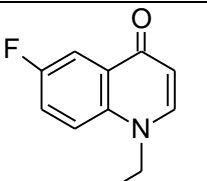
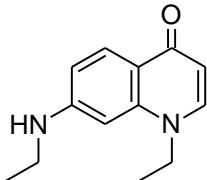
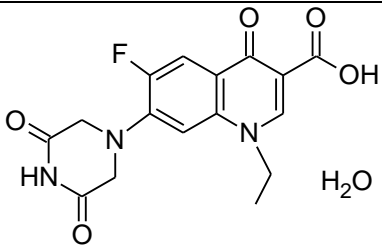
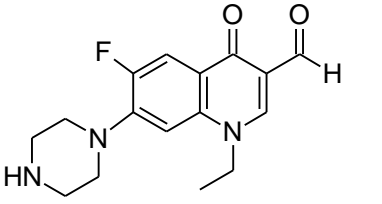
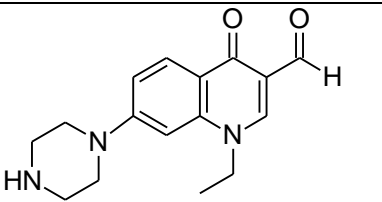
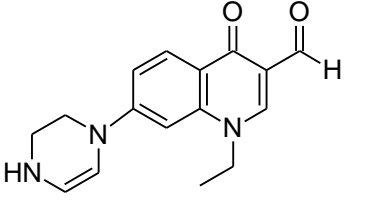


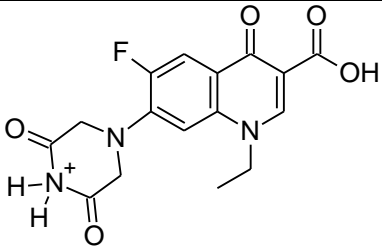
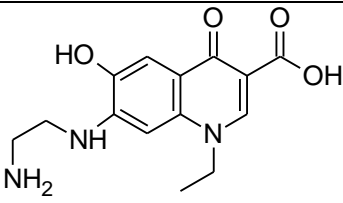
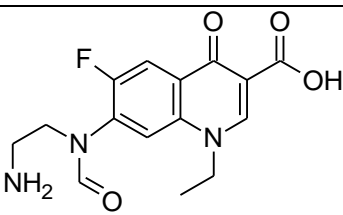
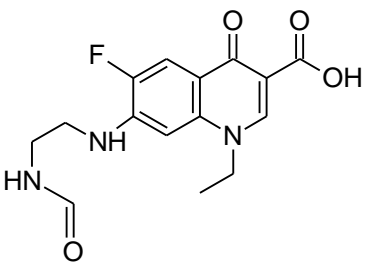
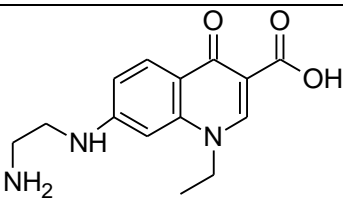
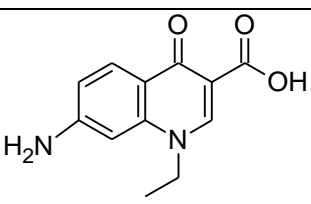
Obr.11: Mechanismus degradace norfloxacinu v zásaditém prostředí (pH = 8,9).

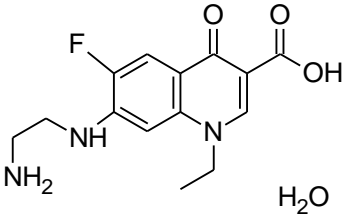
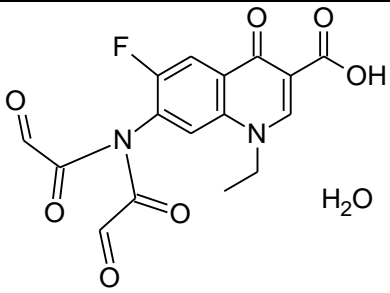
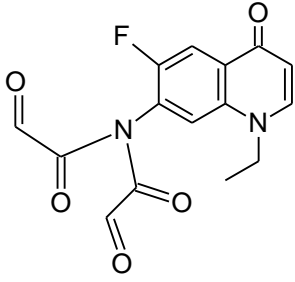
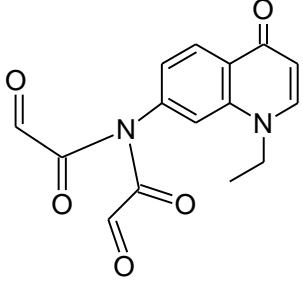
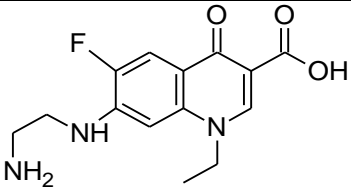
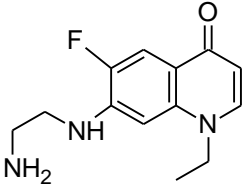
Produkty degradace norfloxacinu v zásaditém prostředí (pH = 8,9) shrnuje Tab.VIII.

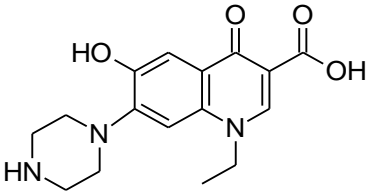
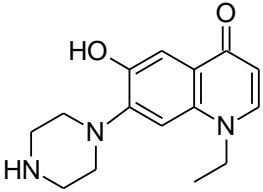
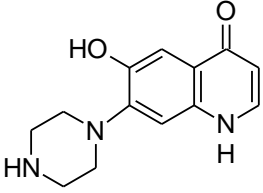
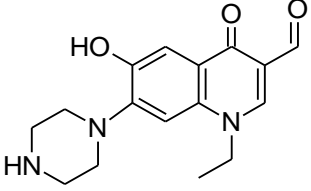
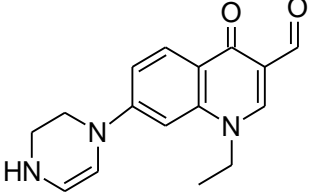
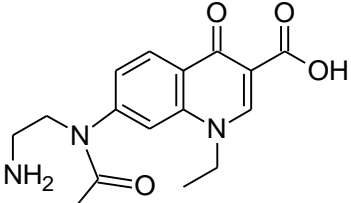
Tab.VIII: Fotodegradční produkty norfloxacinu (pH = 8,9).

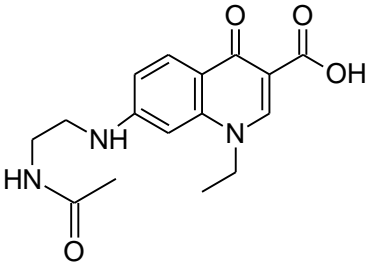
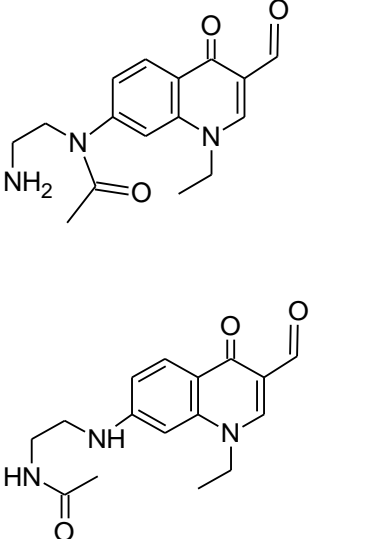
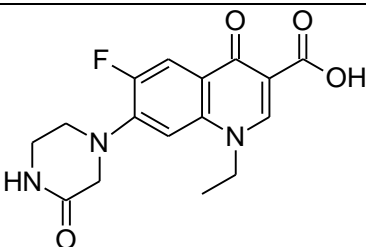
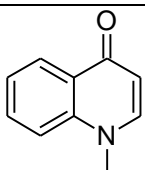
Název	Vzorec	m/z
norfloxacin		320,2 v + ESI, 318,2 v - ESI
Produkt 1		302,2 v + ESI
Produkt 2		276,2 v + ESI
Produkt 3		256,2 v + ESI
Produkt 4		228,2 v + ESI
Produkt 5		226,1 v + ESI
Produkt 6		219,1 v + ESI

Produkt 7		233,1 v + ESI
Produkt 8		205,1 v + ESI
Produkt 9	Struktura neidentifikována	218,1 v + ESI
Produkt 10		191,1 v + ESI
Produkt 11		215,1 v + ESI
Produkt 12		364,2 v - ESI
Produkt 13		304,2 v + ESI, 301,9 v - ESI
Produkt 14	Struktura neidentifikována	316,3 v + ESI
Produkt 15		286,2 v + ESI
Produkt 16		284,2 v + ESI

Produkt 17	Struktura neidentifikovaná	328,0 v – ESI
Produkt 18		346,0 v – ESI,
Produkt 19		290,1 v - ESI
Produkt 20	 Nebo 	320,2 v - ESI
Produkt 21		274,1 v – ESI
Produkt 22		230,2 v - ESI
Produkt 23	Struktura neidentifikovaná	336,3 v - ESI
Produkt 24	Struktura neidentifikovaná	354,2 v - ESI

Produkt 25		310,1 v - ESI
Produkt 26	Struktura neidentifikována	286,0 v – ESI
Produkt 27	Struktura neidentifikována	263,9 v - ESI
Produkt 28		381,1 v - ESI
Produkt 29		319,2 v - ESI
Produkt 30		345,1 v - ESI
Produkt 31		292,1 v - ESI
Produkt 32		248,1 v - ESI
Produkt 33	Struktura neidentifikována	220,1 v - ESI
Produkt 34	Struktura neidentifikována	313,0 v - ESI

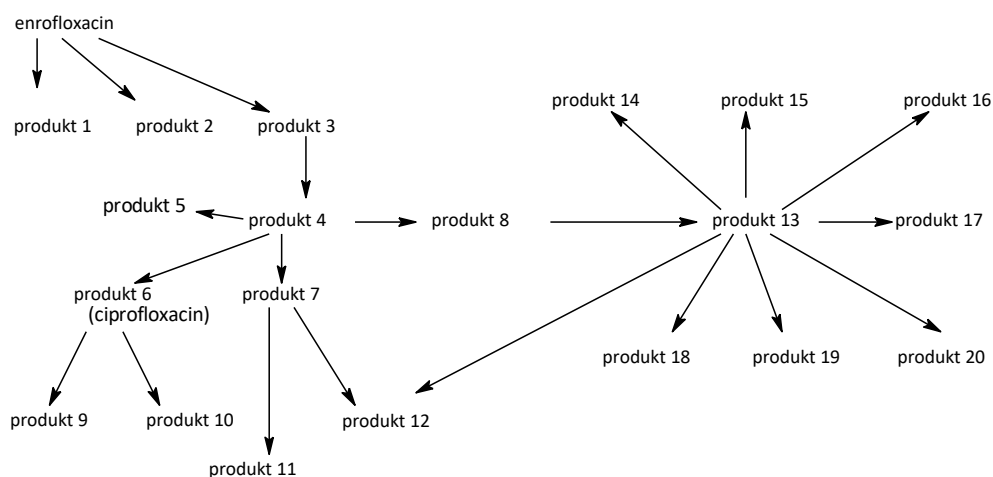
Produkt 35		318,2 v + ESI, 316,2 v - ESI
Produkt 36		274,2 v + ESI, 272,2 v - ESI
Produkt 37		243,1 v - ESI
Produkt 38		300,2 v + ESI
Produkt 39		282,2 v + ESI
Produkt 40	Struktura neidentifikována	201,1 v + ESI
Produkt 41	Struktura neidentifikována	352,1 v - ESI
Produkt 42	Struktura neidentifikována -stereoizomer produktu 43	362,2 v – ESI, retenční čas: 2,72 min
Produkt 43	Struktura neidentifikována	362,2 v – ESI retenční čas: 1,95 min
Produkty 44 a 46		318,2 v + ESI 316,2 v – ESI; retenční časy: 2,72 a 1,95 min

		
Produkty 45 a 47		300,1 v + ESI, retenční časy: 2,75 min a 1,97 min
Produkt 48		334,2 v + ESI, 332,2 v - ESI
Produkt 49		159,6 v + ESI

Jako v předchozích případech, i tady byla pozorována degradace odštěpením fluoru, dekarboxylací, hydroxylací, odbouráváním postranních řetězců a rozevíráním až odbouráváním cyklických struktur.

Mechanismus fotodegradace enrofloxacinu v kyselém prostředí (pH = 4,0) zobrazuje Obr.12.



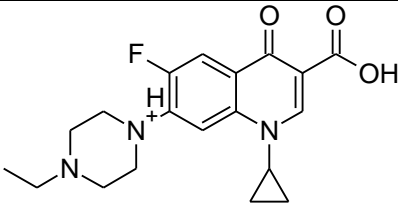
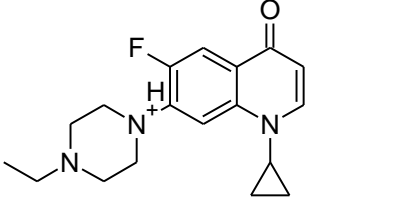
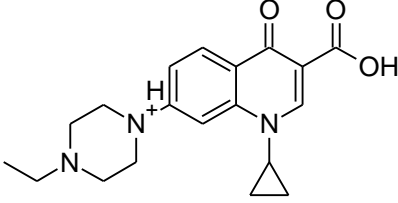


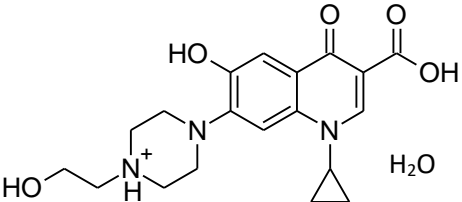
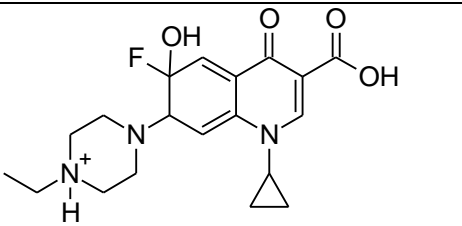
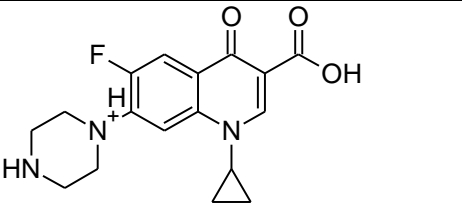
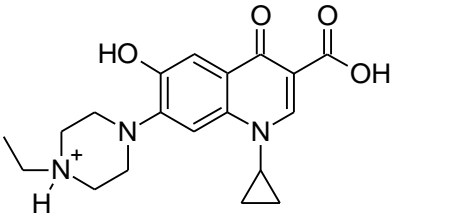
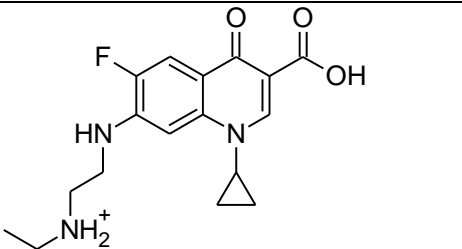
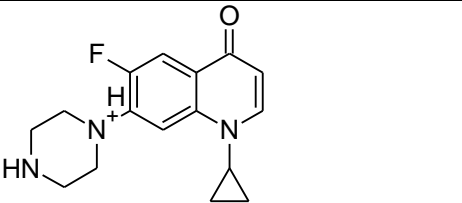
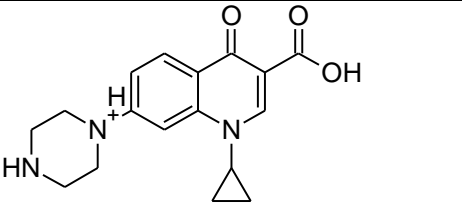
Obr.12: Schéma fotodegradace enrofloxacinu (pH = 4,0).

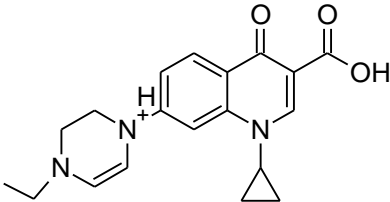
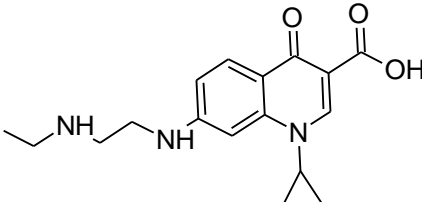
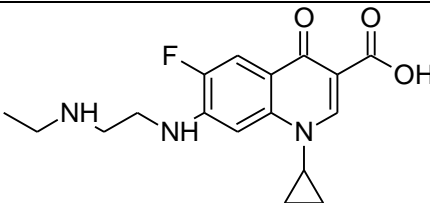
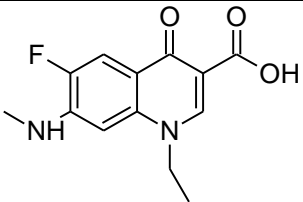
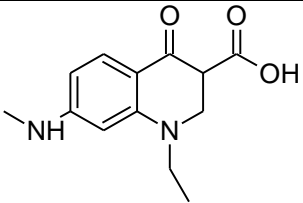
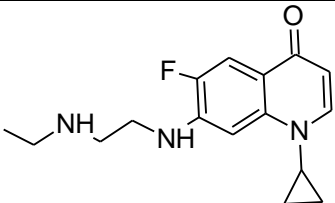
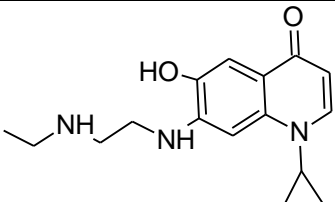
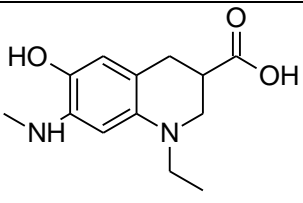
Jak je patrné z Obr.12 jeden z produktů fotodegradace v kyselém prostředí (pH = 4,0) byl identifikován jako ciprofloxacin.

Produkty degradace enrofloxacinu v kyselém prostředí (pH = 4,0) byly zakresleny do Tab.IX.

Tab.IX: Fotodegradační produkty enrofloxacinu (pH = 4,0).

Název	Vzorec	m/z
enrofloxacin		360,2 v + ESI, 358,2 v -ESI
Produkt 1		316,1 v + ESI
Produkt 2		342,1 v + ESI

Produkt 3		394,1 v - ESI
Produkt 4		374,1 v - ESI, 376,1 v + ESI
Produkt 5	Struktura neidentifikována	276,0 v - ESI
Produkt 6 (ciprofloxacin)		330,1 v - ESI, 332,1 v + ESI
Produkt 7		358,1 v + ESI, 356,1 v - ESI
Produkt 8		333,0 v - ESI
Produkt 9		288,1 v + ESI
Produkt 10		314,1 v + ESI, 312,2 v - ESI

Produkt 11		340,1 v + ESI
Produkt 12		314,2 v + ESI
Produkt 13		332,1 v - ESI, 334,1 v + ESI
Produkt 14		263,0 v + ESI
Produkt 15		245,0 v + ESI
Produkt 16	Struktura neidentifikována	219,0 v + ESI
Produkt 17		289,0 v + ESI
Produkt 18		288,1 v - ESI
Produkt 19		248,1 v - ESI
Produkt 20	Struktura neidentifikována	292,1 v - ESI

Ciprofloxacin minoritně vznikal také při degradaci enrofloxacinu v zásaditém prostředí (pH = 8,13).

Doplňující údaje k mechanismu jednotlivých studovaných látek, degradačních cest a shodných produktů jsou v Příloze 5.

## **5. DISKUZE**

Z výsledků prezentovaných v této diplomové práci plyne, že ciprofloxacin, enrofloxacin a norfloxacin byly zcela stabilní při testu stability po dobu 96 hodin. To je v souladu s výsledky práce Ge et al. [49], kteří studovali stabilitu vůči hydrolýze u osmi zástupců ze skupiny fluorochinolonů, mezi nimiž byly ciprofloxacin a enrofloxacin. Zjistili, že tyto látky jsou hydrolyticky stabilní jak v čisté vodě, tak ve sladké či mořské vodě i po 50 dnech, pokud roztoky těchto antibiotik byly uchovávány ve tmě. Úbytek relativní koncentrace byl v obou případech největší v čisté vodě (9,6 % u ciprofloxacinu a 5,3 % u enrofloxacinu) a nejmenší v mořské vodě (3,8 % u ciprofloxacinu a 2,4 % u enrofloxacinu). Navíc bylo zjištěno, že na stabilitu těchto látek nemá vliv teplota ani pH.

Zkoumaná antibiotika mají nezanedbatelnou absorpci v UV oblasti, a to v oblasti až do cca 370 nm v kyselém, neutrálním i zásaditém pH. Mohou tedy absorbovat krátkovlnnou část slunečního záření dopadajícího na zemský povrch. Přímá fotodegradace je tedy jedním z procesů, kterým může dojít k transformacím fluorochinolonů v povrchových vodách vystavených slunečnímu záření.

Kinetikou odbourávání fluorochinolonů se zabývá řada prací [42,43,44,45,46], přičemž pro průběh odbourávání většinou vyhovuje kinetika 1.řádu. Kinetiku odbourávání je možné i u zde zkoumaných zástupců v neutrálním a alkalickém prostředí popsat modelem kinetiky prvního řádu. Rychlostní konstanty se liší v závislosti na pH daného roztoku. Wammer et al. [37] došli k závěru, že nejrychlejší reakce je v neutrálním nebo lehce alkalickém prostředí, kde se vyskytují deprotonované formy jednotlivých substrátů. Výsledky předkládané práce jsou ve shodě s tímto závěrem, i v použitých podmínkách v této práci byla degradace v mírně zásaditém prostředí o něco rychlejší než v prostředí neutrálním. Lehce alkalické pH je obvyklé např. pro odpadní vody z nemocnic, ale běžné je také u oligotrofních povrchových vod vlivem fotosyntézy, proto se i tato práce soustředila na odbourávání v neutrálním a mírně alkalickém (do hodnoty pH = 8,5) prostředí. Naopak kyselé pH s hodnotami nižšími než cca 4,5 není z environmentálního hlediska relevantní, odbourávání v kyselém prostředí bylo v této

studii zkoumáno jen okrajově u jednoho zástupce fluorochinolonů, enrofloxacinu, jako pilotní studie, zda se v kyselém prostředí bude kinetika a mechanismus vzniku produktů zásadně lišit.

Rychlostní konstanty ciprofloxacinu  $0,701 \text{ min}^{-1}$  v neutrálním prostředí <sup>[48]</sup> a  $0,558 \text{ min}^{-1}$  v zásaditém prostředí jsou ve shodě s výsledkem Babiće et al. <sup>[38]</sup>, jejichž hodnota rychlostní konstanty odbourávání ciprofloxacinu při  $\text{pH} = 8$  činí  $0,6297 \text{ min}^{-1}$ . V neutrálním a alkalickém prostředí roztoku enrofloxacinu jsou stanovené rychlostní konstanty  $0,521 \text{ min}^{-1}$  v neutrálním prostředí, respektive  $0,763 \text{ min}^{-1}$  v alkalickém prostředí. Tyto hodnoty jsou řádově srovnatelné s hodnotami naměřeným Wammerem et al. <sup>[37]</sup> ( $0,91 \text{ min}^{-1}$  v neutrálním prostředí) a Babićem et al. <sup>[38]</sup> ( $0,6473 \text{ min}^{-1}$  v zásaditém prostředí).

U norfloxacinu činily naměřené hodnoty rychlostních konstant  $0,341 \text{ min}^{-1}$  v neutrálním a  $0,254 \text{ min}^{-1}$  v alkalickém prostředí. Wammer et al. <sup>[37]</sup> pozorovali v neutrálním prostředí rychlejší odbourávání norfloxacinu, rychlostní konstantu stanovili na  $0,84 \text{ min}^{-1}$ , obdobně Babić et al. <sup>[38]</sup> pozorovali o dost rychlejší odbourávání norfloxacinu v zásaditém prostředí, když stanovili rychlostní konstantu na  $0,6372 \text{ min}^{-1}$ . Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišnou koncentrací vodného roztoku antibiotika neboť, jak Babić et al. <sup>[38]</sup> ve své práci uvádí, s rostoucí koncentrací roztoku dochází k pomalejšímu odbourávání tohoto antibiotika a koncentrace použité v této práci byly vyšší než koncentrace v práci Babić et al. <sup>[38]</sup>.

U ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu byla pro doplnění informací změřena kinetika reakce i v kyselém prostředí při  $\text{pH} = 4$ , u enrofloxacinu navíc ještě při hodnotě  $\text{pH} = 2$ . U ciprofloxacinu ( $\text{pH} = 4$ ) a enrofloxacinu ( $\text{pH} = 2$ ) nebylo možné fotochemickou degradaci v kyselém prostředí popsat kinetikou 1.řádu, průběh odbourávání měl lineární charakter. Nelze uvažovat, že by toto bylo způsobeno tím, že reakce byla sledována jen na počátku exponenciálního průběhu, kdy by exponenciála mohla být nahrazena přímkou, protože např. u enrofloxacinu po 25 minutách ozařování zbývalo jen 2,2 % neodbouraného antibiotika. Vysvětlení může spočívat v autokatalýze či autosensitizaci reakce některým z produktů. Porovnání s literaturou nebylo možné udělat, protože data o degradaci v kyselém prostředí nejsou k dispozici.

U norfloxacinu vyhovoval i v kyselém prostředí ( $\text{pH} = 4$ ) model kinetiky 1.řádu, reakce byla ale výrazně pomalejší než v neutrálním či zásaditém prostředí s rychlostní konstantou  $0,015 \text{ min}^{-1}$ . Obdobně tomu bylo také v případě enrofloxacinu ( $\text{pH} = 4$ ), kdy stanovená rychlostní konstanta měla hodnotu  $0,055 \text{ min}^{-1}$ .

Fotodegradacemi všech zkoumaných antibiotik vzniká celá řada produktů (jejich kinetické profily jsou znázorněny v Přílohách 1,2,3).

Za pomoci kapalinové chromatografie s tandemovou MS / MS spektrometrií bylo provedeno vyhodnocení degradačních cest jednotlivých látek za různých podmínek. Doby ozařování jednotlivých roztoků byly voleny tak, aby bylo možné identifikovat co nejvíce struktur fotoproduktů studovaných antibiotik.

Ciprofloxacin se v zásaditém prostředí (pH = 8,55) degradoval sedmi různými mechanismy, z nichž byly rozpoznány čtyři hlavní cesty a to hydroxylace, jež byla majoritní cestou přeměny, defluorace, dekarboxylace a tvorba aduktu se složkou mobilní fáze – acetonitrilem. Tyto cesty vedly ke vzniku 61 fotodegradačních produktů, z nichž 45 se podařilo identifikovat.

V neutrálním prostředí vzniklo z ciprofloxacinu pěti různými degradačními mechanismy „jen“ 21 fotoproduktů. Většina struktur, které byly identifikovány v neutrálním prostředí se shodovaly s těmi, jež byly identifikovány v prostředí zásaditém. Opět jako v zásaditém prostředí docházelo k dekarboxylaci, defluoraci, hydroxylaci, tvorbě aduktu s acetonitrilem. Pátou a rozdílnou cestou degradace byla oxidace a rozevření piperazinového kruhu. Na rozdíl od degradace ciprofloxacinu v zásaditém prostředí nebyla však hydroxylace majoritní cestou odbourávání.

V případě enrofloxacinu byl zkoumán průběh fotodegradace ve třech prostředích dle hodnoty pH (v zásaditém prostředí, v neutrálním prostředí a v kyselém prostředí).

V zásaditém prostředí (pH = 8,13) se enrofloxacin odbourával třemi různými mechanismy a to defluorací, hydroxylací a dekarboxylací a těmito mechanismy bylo identifikováno 36 vzniklých fotoproduktů.

V neutrálním prostředí se enrofloxacin odbourával pěti různými mechanismy (tři mechanismy shodné jako v zásaditém prostředí - dekarboxylace, defluorace, hydroxylace). Dalšími dvěma cestami byl rozpad chinonového jádra a oxidace, v jejímž důsledku došlo k rozštěpení piperazinového kruhu a cyklopropanového kruhu. Celkem vzniklo 9 produktů.

V kyselém prostředí (pH = 4) se enrofloxacin odbourával třemi různými cestami: defluorací, dekarboxylací a hydroxylací, přičemž vzniklo 20 produktů.

Norfloxacin se v zásaditém prostředí (pH = 8,95) odbourával jedenácti cestami degradace, přičemž první tři cesty lze nazvat jako oxidace, ke které došlo po prvotním navázání hydroxylové skupiny na různé polohy původní struktury, čtvrtou nejvíce zastoupenou cestou bylo nahrazení atomu fluoru skupinou OH. Některé primární produkty přímé degradace se nepodařilo identifikovat, ale vzhledem k dalšímu reakčnímu průběhu z nich vznikajících

struktur výsledných produktů, se jednalo pravděpodobně také o oxidace na různých částech původní struktury norfloxacinu.

Dalšími reakcemi byla dekarboxylace, defluorace a redukce COOH skupiny na CHO.

V neutrálním prostředí vznikalo z norfloxacinu 25 různých produktů a to pěti cestami degradace: dekarboxylací, oxidací po prvotním navázání hydroxylové skupiny, nahrazením atomu fluoru skupinou OH a defluorací. Tyto základní reakce se objevují v různých krocích, v pozdějších krocích se objevuje také hydratace, dehydratace, dehydrogenace, deaminace a dealkylace.

Obecně lze říci, že v zásaditém prostředí převládá hydroxylace díky nadbytku OH skupin nebo oxidace po předchozí hydroxylaci, dalšími reakcemi jsou pak dekarboxylace a defluorace. V kyselém prostředí by pak převládala defluorace, hydroxylace by byla druhou nejvíce zastoupenou cestou degradace (OH skupiny by byly přítomny z rozkladu vody), dekarboxylace by se také objevila, ale jen minoritně neboť v kyselém prostředí má skupina COOH tendenci zůstat navázána a neodštěpovat se. V neutrálním prostředí převládala dekarboxylace nad hydroxylací a defluorací. Ke stejnému závěru došli Ge et al. <sup>[49]</sup>, kteří navíc zdůraznili, že v případě ciprofloxacinu a norfloxacinu v neutrálním prostředí převládá defluorace a dekarboxylace, jelikož nemají navázaný substituent na piperazinovém kruhu, zatímco v případě enrofloxacinu navíc identifikovali jako jednu z možných degračních cest deethylaci (= „piperazinyl N<sup>4</sup> dealkylace“). Dále potvrdili, že dekarboxylace a defluorace se objevuje v různých krocích degradace u všech 3 antibiotik ve všech pH.

Hydroxylace měla oproti jiným pozorovaným reakcím odlišný průběh v závislosti na daném antibiotiku – u ciprofloxacinu a norfloxacinu docházelo k přímé hydroxylaci piperazinového jádra, což dále vedlo k oxidaci na keto skupinu / skupiny a následnému rozštěpení piperazinového kruhu, dále k nahrazení atomu F skupinou OH a navázání OH skupiny vedle substituentu COOH na chinonové jádro. Naproti tomu u enrofloxacinu docházelo k navázání OH skupiny na ethylovou skupinu vedoucí z piperazinového jádra, ethyl stabilizoval piperazinové jádro.

Bylo zjištěno, že ciprofloxacin tvoří s acetonitrilem, což byla složka mobilní fáze, adukt v neutrálním i v kyselém pH, enrofloxacin a norfloxacin tvoří hydroxylovaný adukt s vodou.

Jedním z meziproduktů enrofloxacinu v kyselém a zásaditém pH byl ciprofloxacin. Ten byl identifikován také v rámci studie Babiće et al. <sup>[38]</sup>, kde ale vznikaly odlišné produkty od produktů identifikovaných v této práci jako důsledek skutečnosti, že pro studii degradace

těchto antibiotik obohatili vodu o huminové látky. Wammer et al. <sup>[37]</sup> identifikovali kromě ciprofloxacinu také produkt s hodnotou m/z 358,1769, který odpovídal mé struktuře produktu 34 u enrofloxacinu v zásaditém prostředí. Navíc struktura produktu 17 u enrofloxacinu v zásaditém prostředí odpovídala struktuře s hodnotou m/z 374,2 u Wammera. Li et al. <sup>[40]</sup> identifikovali tři produkty, které byly strukturně shodné s produkty enrofloxacinu v zásaditém prostředí a to produkt s m/z 316,2, který odpovídal navíc produktu 1 v neutrálním prostředí a produktu 2 v zásaditém prostředí; produkt s m/z 263,2, jenž byl shodný s produktem 16 v zásaditém prostředí v této práci a produkt s m/z 374,2, který se shodoval s produktem 17 v zásaditém prostředí v této práci.

Také v případě norfloxacinu se některé ze struktur identifikovaných v této práci shodují se strukturami, které byly nalezeny dalšími autory. Ahmad et al. <sup>[41]</sup> identifikovali v neutrálním prostředí tři struktury shodné se strukturami této práce: produkt s hodnotou m/z 294,1253 (shodný s produktem 21 u norfloxacinu v neutrálním prostředí v této práci), produkt s hodnotou m/z 251,0831 (shodný s produktem 25 v neutrálním pH v této práci) a produkt s m/z 348,1011, který strukturně odpovídal produktu 18 v pH neutrálním u norfloxacinu, ovšem tento produkt 18 byl navíc hydratovaný. Tyto tři shodné produkty z celkových pěti degradačních produktů u norfloxacinu identifikovali metodou UHPLC/MS také Hubička et al. <sup>[36]</sup>. Ti se ve své práci zabývali rovněž ciprofloxacinem, u něhož identifikovali šest degradačních produktů v neutrálním prostředí, avšak tyto struktury nebyly shodné se strukturami v této práci, což může být zapříčiněno tím, že ozařovali rozdrčenou tabletu v komůrce s definovanou vlhkostí, takže další ingredience v tabletě mohly ovlivnit degradační průběh. Vasconcelos et al. <sup>[39]</sup> se zabývali degradací ciprofloxacinu při pH = 9, přičemž pro ozařování použili středotlakou rtuťovou výbojku (150 W). V důsledku ozařování vzniklo v tomto případě pět degradačních produktů, z nichž dva byly shodné s produkty prezentovanými v této práci. U obou těchto látek prokázaných v této práci a v práci Vasconcelose et al. <sup>[39]</sup> byla potvrzena tvorba stereoizomerů, což znamená, že tyto látky mají shodnou hodnotu m/z (288), liší se jen v retenčním čase.

## **6. ZÁVĚR**

Ciprofloxacin, enrofloxacin i norfloxacin mají nezanedbatelnou absorpční schopnost v oblasti nad 300 nm, proto u nich může docházet k jejich fotodegradaci slunečním zářením v přírodě.

Stabilita všech tří jmenovaných antibiotik není ovlivněna hodnotou pH ani teplotou.



Fotochemická degradace v homogenním prostředí je ovlivněna hodnotou pH. Nejrychleji dochází k odbourání ciprofloxacinu a norfloxacinu v neutrálním prostředí (hodnoty rychlostních konstant  $0,701 \text{ min}^{-1}$  pro ciprofloxacin,  $0,341 \text{ min}^{-1}$  pro norfloxacin), poněkud pomaleji v mírně alkalickém prostředí (hodnoty rychlostních konstant  $0,558 \text{ min}^{-1}$  pro ciprofloxacin,  $0,254 \text{ min}^{-1}$  pro norfloxacin). Naopak u enrofloxacinu probíhá fotochemická degradace rychleji v mírně alkalickém prostředí ( $k = 0,763 \text{ min}^{-1}$ ) oproti neutrálnímu prostředí ( $k = 0,521 \text{ min}^{-1}$ ). Pomalé odbourávání v kyselém prostředí není relevantní k přírodním povrchovým vodám.

Metodou HPLC / MS byly identifikovány produkty degradace. V neutrálním prostředí bylo identifikováno 21 produktů ciprofloxacinu, 9 enrofloxacinu a 25 produktů norfloxacinu. V mírně alkalickém prostředí bylo nalezeno 61 produktů ciprofloxacinu, 36 enrofloxacinu a 49 produktů norfloxacinu. Bylo zjištěno, že u všech těchto antibiotik dochází k dekarboxylaci, defluoraci, hydroxylaci a tvorbě oxidovaných produktů. To, která cesta je majoritní, je dáno především hodnotou pH – v alkalickém převažuje hydroxylace, v neutrálním dekarboxylace, v kyselém převažovala defluorace.

## **7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:**

- [1] Křížek M., Šíma J. (2015): Analytická chemie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 1.vydání, ISBN 978-80-7394-486-5, 138 -142.
- [2] Busch K.L. (2001): Units in Mass Spectrometry, Spectroscopy 16 (11), 28 – 31.  
[https://www2.chemistry.msu.edu/courses/cem832/units\\_of\\_mass.pdf](https://www2.chemistry.msu.edu/courses/cem832/units_of_mass.pdf),  
staženo dne 15.5.2019.
- [3] Friedecký D, Lemr K. (2012): Úvod do hmotnostní spektrometrie, Klin. Biochem. Metab., 20 (41), No.3, 152 -157.  
<https://docplayer.cz/4820358-Uvod-do-hmotnostni-spektrometrie.html>,  
staženo dne 28.8.2019.
- [4] Hanuš V., Herman Z., Lemr K. (2003): Hmotnostní spektrometrie a velké molekuly, Ionizační metody analýzy biologických makromolekul, Vesmír 82, 312 – 316.  
<https://adoc.tips/hmotnostni-spektrometrie-a-velke-molekuly.html> , staženo 29.8.2019.

- [5] Herman Z. (2010): Počátky hmotnostní spektrometrie u nás : Hmotnostní spektrometrie v Ústavu fyzikální chemie Akademie věd (část I), Chem.Listy 104, 955 – 990.  
<http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1201>,  
staženo 1.9.2019.
- [6] Jirásko R., Holčapek M. (2017): Hmotnostní spektrometrie v organické analýze, přednášky, Mass Spectrometry Group @ University of Pardubice,  
[http://holcapek.upce.cz/teaching/01\\_Uvod.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf), staženo dne 9.3.2020.
- [7] Havliš J., Holčapek M., Volný M., (2016): Česká terminologie hmotnostní spektrometrie, Projekt vznikl a vyvíjel se pod záštitou České společnosti pro hmotnostní spektrometrii a Spektroskopické společnosti Jana Marka Marci.  
<http://terminologie-ms.sci.muni.cz/info>, staženo dne 9.3.2020.
- [8] Holčapek M., Jandera P. (1998): Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS), Chem.Listy 92, 276 – 286.  
[http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998\\_04\\_278-286.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_278-286.pdf) , staženo dne 5.9.2019.
- [9] de Hoffmann E., Stroobant V. (2014): Mass Spectrometry, Principles and Applications, Wiley Library, Third Edition, p.41, 100 - 122.  
[www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf](http://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf) , staženo dne 27.10.2019.
- [10] Havliš J.(1999): Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF, VESMÍR 78, 448.  
<https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-8/hmotnostni-spektrometrie-maldi-tof.html>, staženo dne 6.12.2019.
- [11] Wong S.F., Meng C.K., Fenn J.B. (1988): Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols), Journal of Physical Chemistry 92, 546 – 550.  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100313a058>, staženo dne 27.10.2019.
- [12] Paul W., Steinwedel H. (filed 1954, patented 1960): Apparatus for separating charged particles of different specific charges, United States Patent Office, 2 939 952.

<https://patentimages.storage.googleapis.com/e6/2a/25/77853fc2626c60/US2939952.pdf>,  
staženo dne 6.12.2019.

[13] Thermo: Normalized Collision Energy TM Technology, PSB 104

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific.html>,

staženo dne 9.10.2018.

[14] Makarov A.A. (1999): United States Patent, Patent Number: 5,886,346.

<https://patentimages.storage.googleapis.com/c0/be/cd/87d8cc2f5588ba/US5886346.pdf>,

staženo dne 9.3.2020.

[15] Drupal: Mass Spec Pro ORBITRAP Technology Mass Analyzer Orbitrap,

<http://www.massspecpro.com/mass-analyzers/orbitrap>, staženo dne 9.3.2020.

[16] Spectroscopy Editors (2011): Detecting Ions in mass Spectrometers with Faraday Cup,  
Spectroscopy Vol.26, Issue 11.

<http://www.spectroscopyonline.com/detecting-ions-mass-spectrometers-faraday-cup?id=&pageID=1&sk=&date=>, staženo dne 6.12.2019.

[17] Holčapek M., Jirásko R., Lída M. (2010): Basic rules for the interpretation of atmospheric  
pressure ionization mass spectra of small molecules, Journal of Chromatography A, 1217,  
3908 – 3921,

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967310002682>,

staženo dne 22.10.2018.

[18] Kalač P. a kolektiv (2010): Chemie životního prostředí, Jihočeská univerzita v Českých  
Budějovicích, Zemědělská fakulta, ISBN 978-80-7394-232-8.

[www.kch.zf.jcu.cz/](http://www.kch.zf.jcu.cz/), staženo dne 2.11.2019.

[19] Úřední věstník Evropské unie, Prováděcí rozhodnutí komise (EU) 2015/495  
ze dne 20. března 2015, kterým se stanoví seznam sledovaných látek pro monitorování  
v rámci celé Unie v oblasti vodní politiky podle směrnice Evropského parlamentu a Rady  
2008/105/ES

<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/a90868de-d1f9-11e4-9de8-01aa75ed71a1/language-cs>, staženo dne 8.11.2019.

[20] Úřední věstník Evropské unie, Prováděcí rozhodnutí komise (EU) 2018/840 ze dne 5. června 2018, kterým se stanoví seznam sledovaných látek pro monitorování v rámci celé Unie v oblasti vodní politiky podle směrnice Evropského parlamentu a Rady 2008/105/ES a zrušuje prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2015/495

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018D0840>

[&from=HU](#), staženo dne 8.11.2019.

[21] Gusmaroli L., Buttiglieri G., Petrovic M. (2019) The EU watch list compounds in the Ebro delta region: Assessment of sources, river transport, and seasonal variations. *Environmental Pollution* 253, 606 -615.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749119321669>,

staženo dne 20.11.2019.

[22] Caporale A.G., Agrelli D., Rodríguez – González P., Adamo P., Alonso J.I.G. (2019) Hexavalent chromium quantification by isotope dilution mass spectrometry in potentially contaminated soils from south Italy. *Chemosphere* 233, 92 – 100.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653519311324>,

staženo dne 20.11.2019.

[23] Sun Ch., Dudley S., Trumble J., Gan J. (2018) Pharmaceutical and personal care products – induced stress symptoms and detoxification mechanisms in cucumber plants. *Environmental Pollution* 234, 39 – 47.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117331238>,

staženo dne 20.11.2019.

[24] Soria N.G.Ch., Bisson M.A., Atilla - Gokcumen G.E., Aga D.S. (2019) High – resolution mass spectrometry – based metabolomics reveal the disruption of jasmonic pathway in *Arabidopsis thaliana* upon copper oxide nanoparticle exposure. *Science of the Total Environment* 693, 133443.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719333637>,

staženo dne 20.11.2019.

- [25] Sharma P.CH., Jain A., Jain S. (2009). Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*, 66, 587 – 604.  
[http://www.ptfarm.pl/pub/File/acta\\_pol\\_2009/6\\_2009/587-604.pdf](http://www.ptfarm.pl/pub/File/acta_pol_2009/6_2009/587-604.pdf) ,  
staženo dne 30.10. 2017 v rámci bakalářské práce.
- [26] Andriole V.T., Ed. (2000). *The quinolones: past, present, and future*. 3rd edition. Academic press, San Diego, California.  
<https://books.google.cz/books?id=zQiHMXb1RwcC&pg=PA412&1pg=PA412&dq=genotoxicity+of+fluoroquinolones&source=bl&ots=Favon1ACqK&sig=raXqZPT51DshODDO7Mn&ewuuz94&h1=cs&sa=X&ved=0ahUKEwj2haSRtLHXAhVB2aQKHTbjBCoQ6AE1PjAC#v=onepage&q=genotoxicity%20of%20fluoroquinolones&f=false>,  
staženo dne 30.10.2017 v rámci bakalářské práce.
- [27] Hooper D.(2002) Fluoroquinolone resistance among gram-positive cocci, *The Lancet Infectious diseases*, 2, 530 -538.  
[http://www.thelancet.com/pdfs/journals/laninf/PIIS1473-3099\(02\)00369-9.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/laninf/PIIS1473-3099(02)00369-9.pdf),  
staženo dne 30.10. 2017 v rámci bakalářské práce.
- [28] Sturini M., Speltini A., Maraschi F., Pretali L., Ferri E.N., Profumo A. (2015) Sunlight – induced degradation of fluoroquinolones in wastewater effluent: Photoproducts identification and toxicity. *Chemosphere* 134, 313 -318.  
[http://www.academia.edu/15481104/Sunlightinduced\\_degradation\\_of\\_fluoroquinolones\\_in\\_wastewater\\_effluent\\_Photoproducts\\_identification\\_and\\_toxicity](http://www.academia.edu/15481104/Sunlightinduced_degradation_of_fluoroquinolones_in_wastewater_effluent_Photoproducts_identification_and_toxicity),  
staženo dne 30.10. 2017 v rámci bakalářské práce.
- [29] Andersson M.I., MacGowan A.P. (2003) Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial. Chemotherapy*, 51, 1 – 11.  
[https://watermark.silverchair.com/dkg212.pdf?token=AQECAHi208BE49Oan9kkhW\\_Ercy7Dm3ZL\\_9Cf3qfKAc485ysgAAAb0wggG5bgkqhkiG9w0BBwagggGqMIIBpgIBADCAZ8GCSqGSIb3DQEHATAeBg1ghkgBZQMEAS4wEQQMCUTNs1Dd8XyBz7rWAgEQgIIBcAuaEDO2nQv-Pntef\\_GhOoEawximbDh-4jWXirZ3F15a061m65j94xAAu-1y8LGWa8x8Fxotnh-](https://watermark.silverchair.com/dkg212.pdf?token=AQECAHi208BE49Oan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAb0wggG5bgkqhkiG9w0BBwagggGqMIIBpgIBADCAZ8GCSqGSIb3DQEHATAeBg1ghkgBZQMEAS4wEQQMCUTNs1Dd8XyBz7rWAgEQgIIBcAuaEDO2nQv-Pntef_GhOoEawximbDh-4jWXirZ3F15a061m65j94xAAu-1y8LGWa8x8Fxotnh-)

[oOCE1cqMrn9tqd1cLh\\_fy4UjxZTSpwtxbgbeqvs237uNFF\\_dLvXOY1JxpFRc4RhZA1qTXvskZzZpf5itZZTAAzSxR5Od5PzbLLCNziIJI6Qm\\_hNItMd6Qs\\_u2ceYdE1TC03Br41BcyTbe4o9wH-vaf0vhkIziE25ImplibAdh5yJuq0eyXWkagT-F-yCYgSWK9ma2Itf8B6y-nihlBBIW-k\\_w0b3stojhtHh6uWbIoeHd8\\_ZDk4yd9fb8FPWB3q4Kcu9FhEO1dzhYjKySM\\_CtkP0001iiJsnVVVDmblueJs4CejtlaXWtdJiltO4B0OL1dLwgmerY2ILRUaG6OPpJoa\\_jW7NhrdExRDJq-duLqQDEfH0Nfc11BwvLNUCCfnaH0VhbQxjTBcxthjE7CcYyLPhHXuGR5hkX,](https://www.researchgate.net/publication/323709111)  
staženo dne 30.10. 2017 v rámci bakalářské práce.

- [30] Gaunt P.N., Piddock L.J.V. (1996) Ciprofloxacin resistant *Campylobacter jejuni* spp. in humans: an epidemiological and laboratory study, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37, 747 – 757.

[\[31\] Duong H.A., Pham N.H., Nguyen H.T., Hoang T.T., Pham H.V., Pham V.C., Berg M., Giger W., Alder A.C. \(2008\) Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. \*Chemosphere\*, 72, 968 – 973.  
<https://www.researchgate.net/publication/5366030> Occurrence Fate and Antibiotic Resistance of Fluoroquinolone Antibacterials in Hospital Wastewaters in Hanoi Vietnam, staženo dne 30.10.2017 v rámci bakalářské práce.](https://watermark.silverchair.com/37-4-747.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7DM3ZL_9Cf3qfKAac485ysgAAAbcwggGzBgkqhkiG9w0BBwagggGkMIIBoAIBADCCAZkGCSqGSIb3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMdya4R112vtIuLB1wAgEQgIIBajcucLmvNvh4rm5g839ffUXNd3L_5y6wtN9mWy959JPZkKOb-5PkGJcq2IBFOVxzfE7ID-mK7f98FmAWc9LNFb4fbOrO3mTUDDONhnYzNgCvaZIABiZGQb9fBGkrsE2CuKueRmbpsLY4m9mayuGVDOZui4I-LwkVYud69i7JNkuREoVEOaaacq1A-tR4WDeiDtDprhe-7U-P3SSKiE-tTW6mEZ09wnqiZGwAycrGKzdGaYVKOzBVtmmj5D3OOYSv16gPLAfTXDGyipioN05hWCAPLRF8t4av2HgKA63mraeCsnNHkInr9owF1AD1ij9vuaibP-tg2pNeys3B4FV5z2SZI_bDvPeGNfOmcqIvpqzmRsowsB9hyRUZpeOmyXrGocduHgd oj8cD9Cq1r8wq6Xo1v_ZABbN4vQk6rSnejFSi7OiWwNQvOQz_geypqkr2M6OvALcF1Pdw8uO_peIvjebvYzZwU-jaX3I,</a> staženo dne 30.10. 2017 v rámci bakalářské práce.</p></div><div data-bbox=)

- [32] Alder A.C., McArdel C.S., Golet E.M., Kohler H.-P. E., Molnar E., Pham T.N.A., Siegrist H., Suter M.J.F., Giger W. (2004) Environmental exposure of antibiotics in wastewaters, sewage sludges and surface waters, chapter from book *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks* (pp. 55 -66).  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-09259-0\\_5](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-09259-0_5), staženo dne 30.10.2017 v rámci bakalářské práce.
- [33] Wei R., Ge F., Chen M., Wang R. (2012) Occurrence of Ciprofloxacin, Enrofloxacin, and Florfenicol in Animal Wastewater and Water Resources. *Journal of Environmental Quality*.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23099939>, staženo dne 20.11.2019.
- [34] Lillenberg M., Yurchenko S., Kipper K., Herodes K., Pihl V., Löhmus R., Ivask M., Kuu A., Kutti S., Litvin S.V., Nei L. (2010) Presence of fluoroquinolones and sulfonamides in urban sewage sludge and their degradation as a result of composting. *Int.J.Envirn.Sci.Tech.*, 7 (2), 307 – 312.  
<http://www.bioline.org.br/pdf?st10030>, staženo dne 15.11.2019.
- [35] Sahlin S., Larsson D.G.J., Agerstrand M. (2018) Ciprofloxacin, EQS data overview, department of Environmental Science and Analytical Chemistry (ACES).  
<https://www.aces.su.se/aces/wp-content/uploads/2018/11/Ciprofloxacin-EQS-data-overview-2018.pdf> , staženo dne 14.11.2019.
- [36] Hubička U., Zmudzki P., Talik P., Zuromska – Wirtek B., Krzek J. (2013) Photodegradation assessment of ciprofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin and ofloxacin in the presence of excipients from tablets by UPLC-MS/MS and DSC. *Chemistry Central Journal* 7:133.  
<https://link.springer.com/article/10.1186/1752-153X-7-133>, staženo dne 14.11.2019.
- [37] Wammer K.H., Korte A.R., Lundeen R.A., Sundberg J.E., McNeill K., Arnold W.A. (2013) Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: Norfloxacin, ofloxacin and enrofloxacin. *Water Research* 47, 439 – 448.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135412007397?via%3Dihub>, staženo dne 14.11.2019.

- [38] Babić S., Periša M., Škorić I. (2013): Photomytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media, *Chemosphere* 91, 1635-1642  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23394957>, staženo dne 15.5.2018.
- [39] Vasconcelos T.G., Henriques D.M., König A., Martins A.F., Kümmerer K. (2009) Photo – degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: Identification and biodegradability assessment of the primary by-products. *Chemosphere* 76, 487 – 493.  
[https://www.researchgate.net/publication/230734046\\_Photo-degradation\\_of\\_the\\_antimicrobial\\_ciprofloxacin\\_at\\_high\\_pH\\_Identificationand\\_biodegradability\\_assessment\\_of\\_the\\_primary\\_by-products](https://www.researchgate.net/publication/230734046_Photo-degradation_of_the_antimicrobial_ciprofloxacin_at_high_pH_Identificationand_biodegradability_assessment_of_the_primary_by-products), staženo dne 14.10.2019.
- [40] Li Y., Niu J., Wang W. (2011) Photolysis of Enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: Kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products. *Chemosphere* 85, 892 – 897.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21807396>, staženo dne 15.5.2018.
- [41] Ahmad I., Bano R., Musharraf S.G., Sheraz M.A., Ahmed S., Tahir H., ul Arfeen Q., Bhatti M.S., Shad Z., Hussain S.F. (2015): Photodegradation of norfloxacin in aqueous and organic solvents: A kinetics study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 302, 1-10.  
<https://daneshyari.com/article/preview/25855.pdf>, staženo dne 15.5.2018.
- [42] Wen X-J., Niu CH-G., Huang D-W., Zhang L., Liang CH., Zheng G.-M. (2017): Study of the photocatalytic degradation pathway of norfloxacin and mineralization activity using a novel ternary Ag/AgCl- CeO<sub>2</sub> photocatalyst. *Journal of Catalysis* 355, 73-86.  
[https://www.researchgate.net/publication/322865650\\_Photocatalytic\\_degradation\\_of\\_levofloxacin\\_by\\_ternary\\_Ag\\_2\\_CO\\_3\\_CeO\\_2\\_AgBr\\_photocatalyst\\_under\\_visible-light\\_irradiation\\_Degradation\\_pathways\\_mineralization\\_ability\\_and\\_an\\_accelerated\\_interfaces](https://www.researchgate.net/publication/322865650_Photocatalytic_degradation_of_levofloxacin_by_ternary_Ag_2_CO_3_CeO_2_AgBr_photocatalyst_under_visible-light_irradiation_Degradation_pathways_mineralization_ability_and_an_accelerated_interfaces), staženo dne 9.9.2019.
- [43] Triethol A., Möder M., Rodil R., Adrian L., Marco-Urrea E. (2011): Degradation of the antibiotics norfloxacin and ciprofloxacin by white-rot fungus and identification of degradation products. *Bioresource Technology* 102, 10987-10995.



<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21937221>, staženo dne 9.9.2019.

[44] Parshikov I.A., Heinze T.M., Moody J.D., Freeman J.P., Williams A.J., Sutherland J.B. (2001): The fungus *Pestalotiopsis guelpini* as a model for biotransformation of ciprofloxacin and norfloxacin. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 56,474-477.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11549022>, staženo dne 9.9.2019.

[45] Nekouei S., Nekouei F. (2018): Photocatalytic degradation of norfloxacin and its intermediate degradation products using nitrogen-doped activated carbon-CuS nanocomposite assisted by visible irradiation, *Appl. Organometal Chem*, 32: e4418.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/aoc.4418>, staženo dne 9.9.2019.

[46] Liu CH., Nanaboina V., Korshin G.V., Jiang W.(2012) : Spectroscopic study of degradation products of ciprofloxacin, norfloxacin and lomefloxacin formed in ozonated wastewater, *Water research* 46, 5235-5246.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863026>, staženo dne 9.9.2019.

[47] Klementova S., Kahoun D., Doubkova L., Frejlichova K., Dusakova M., Zlamal M. (2017): Catalytic photodegradation of pharmaceuticals – homogeneous and heterogenous photocatalysis. *Photochem. Photobiol. Sci.* 16, 67 -71.

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/pp/c6pp00164e>, staženo dne 6.12.2019.

[48] Poncarová M. (2018): Fotochemická degradace antibiotika ciprofloxacinu, bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.

<https://wstag.jcu.cz/StagPortletsJSR168/CleanUrl?urlid=prohlizeni-prace-detail&praceIdno=49989>, staženo dne 6.12.2019.

[49] Ge L., Chen J., Wei X., Zhang S., Qiao X., Cai X, Xie Q. (2010): Aquatic Photochemistry of Fluoroquinolone Antibiotics: Kinetics, Pathways, and Multivariate Effect of Main Water Constituents; *Environ.Sci.Technol.*, 44, 2400 – 2405.

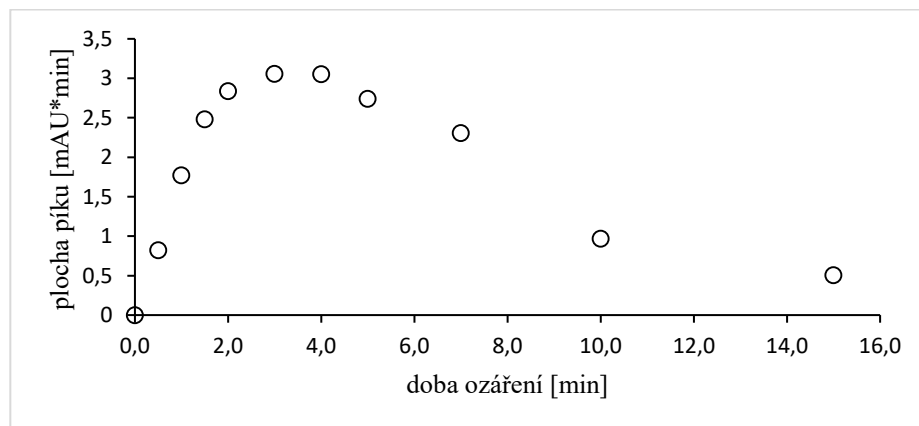
[https://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/es902852v/suppl\\_file/es902852v\\_si\\_001.pdf](https://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/es902852v/suppl_file/es902852v_si_001.pdf),

staženo dne 12.1.2020.

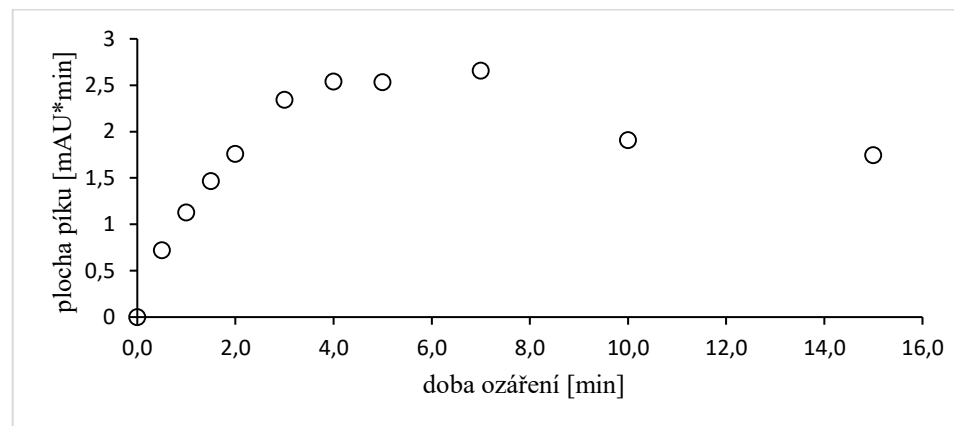
## 8. PŘÍLOHY:

### 8.1. Příloha 1: Průběh degradačních produktů ciprofloxacinu v zásaditém prostředí (pH = 8,55).

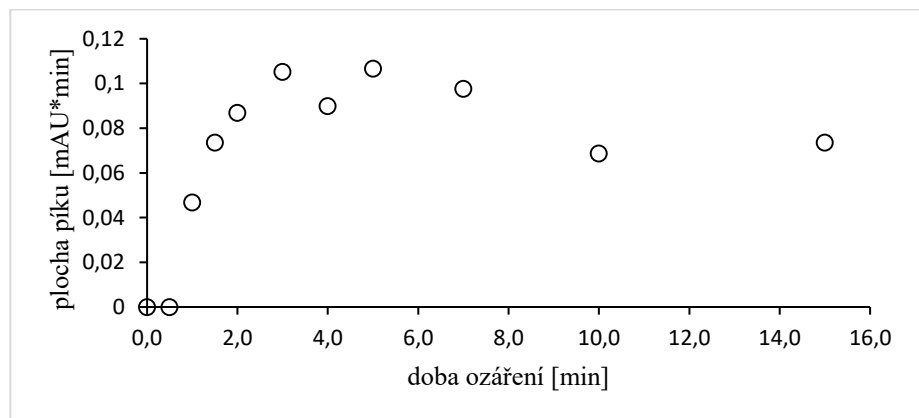
Produkt B



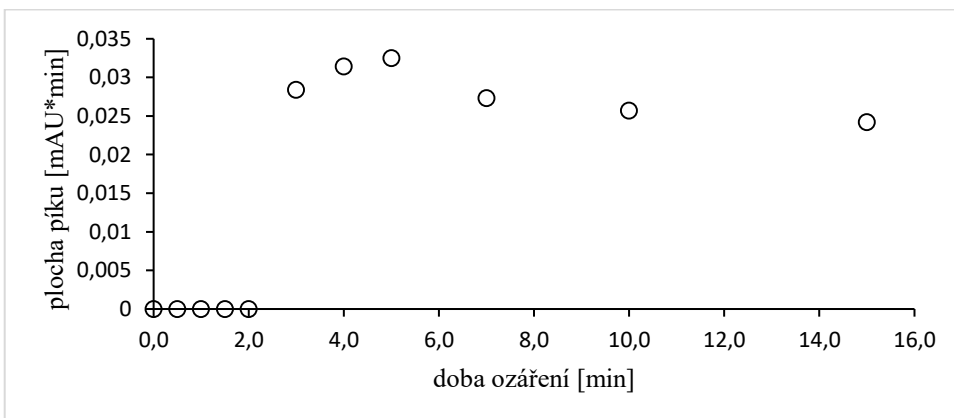
Produkt C



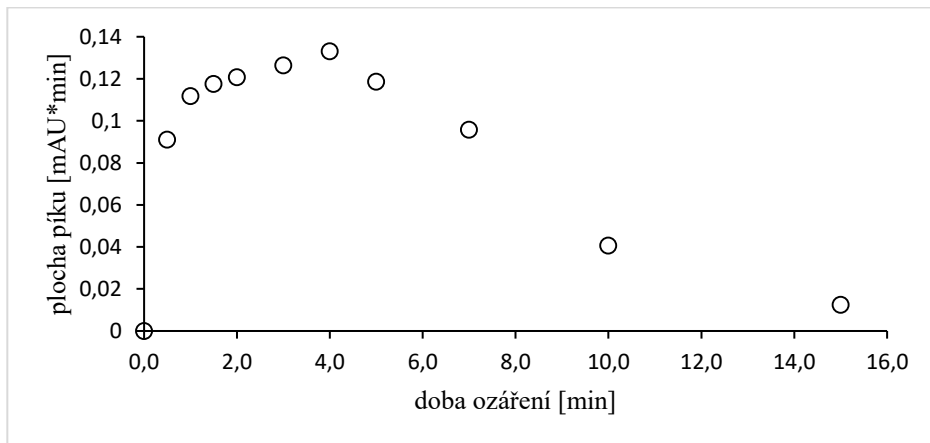
Produkt D



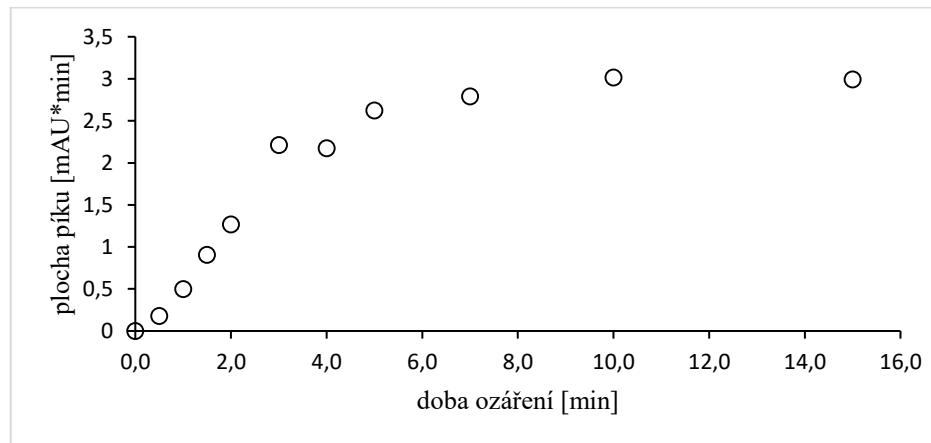
Produkt E



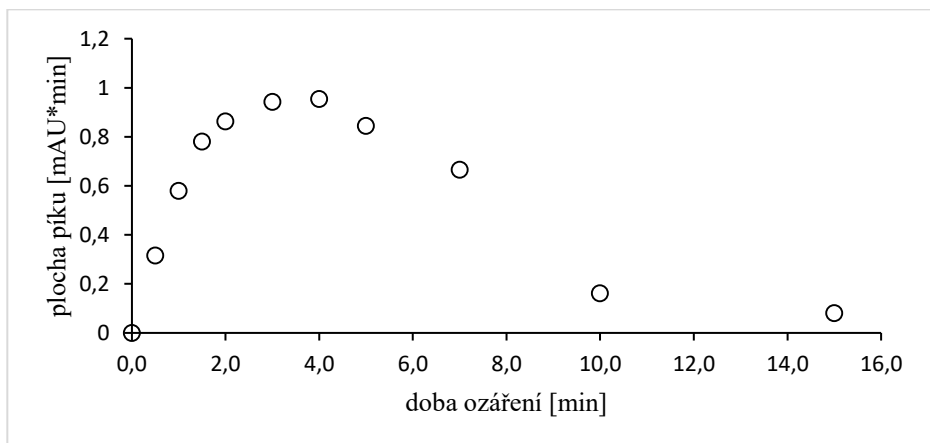
Produkt F



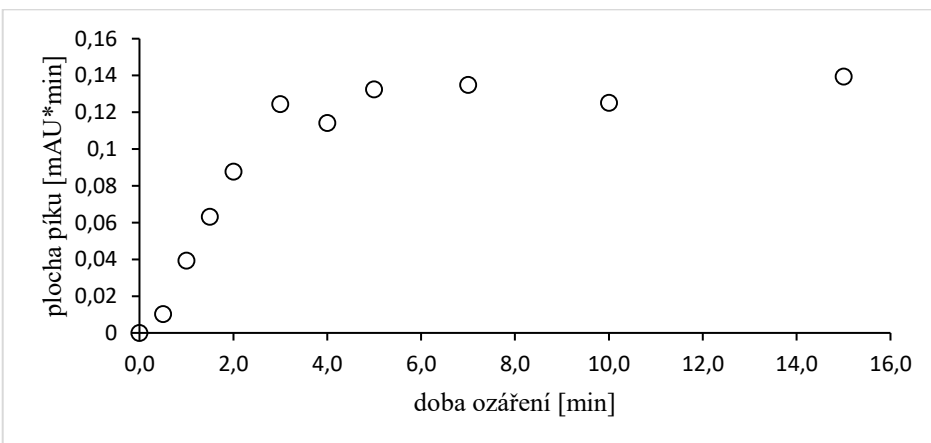
Produkt G



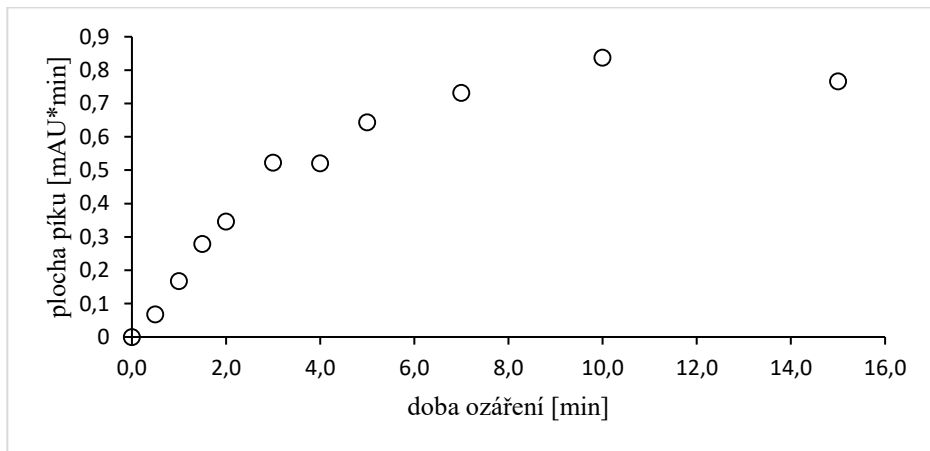
Produkt H



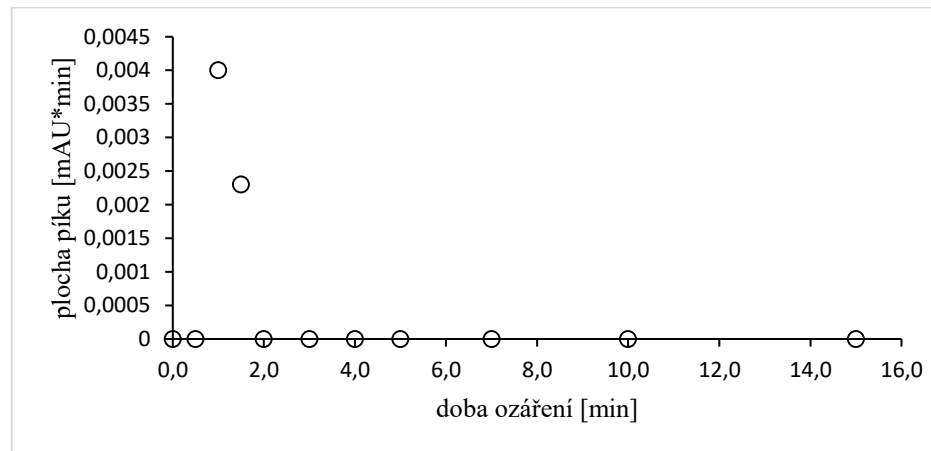
Produkt I



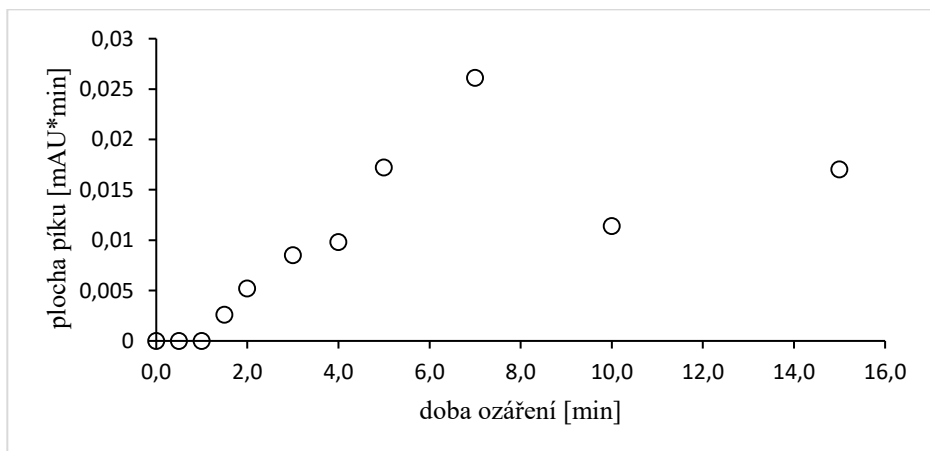
Produkt J



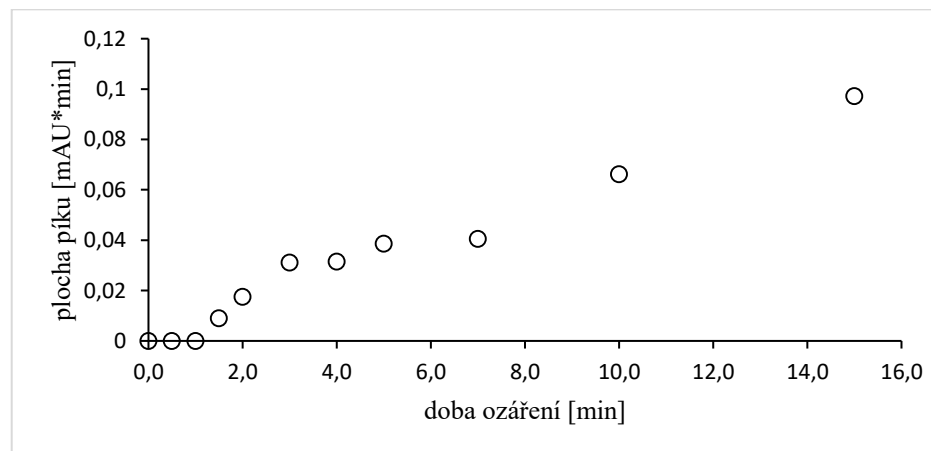
Produkt K



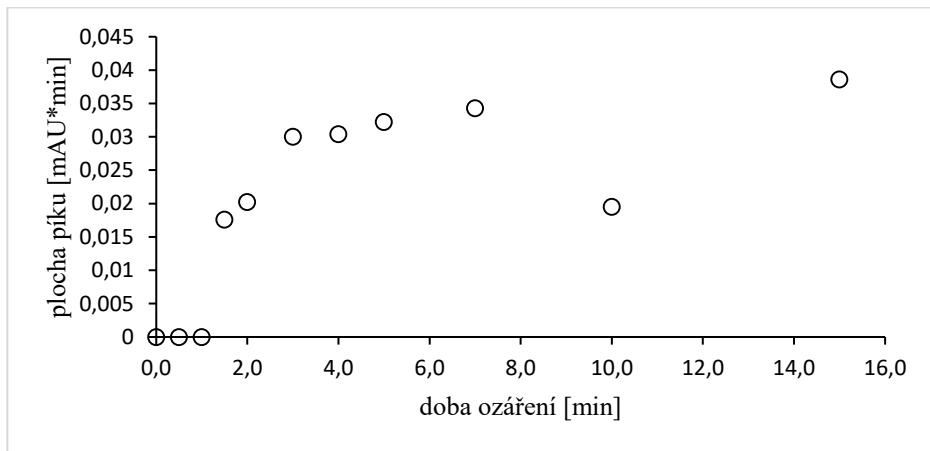
Produkt L



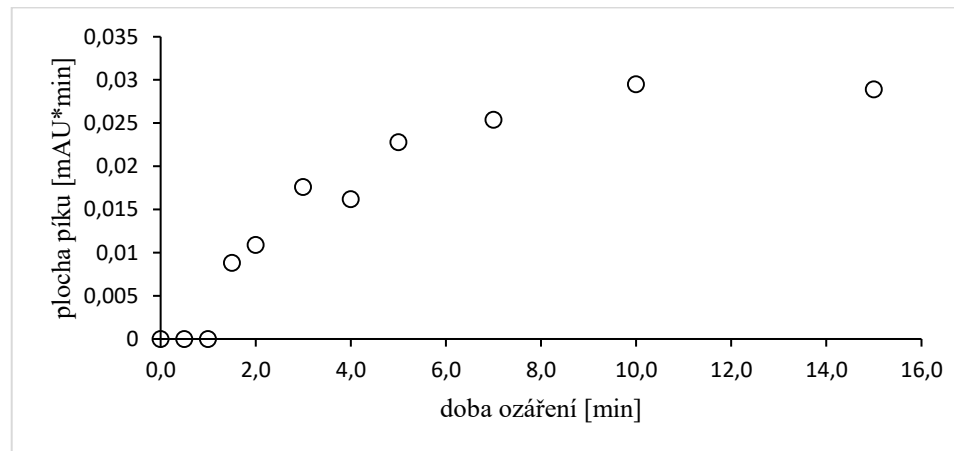
Produkt M



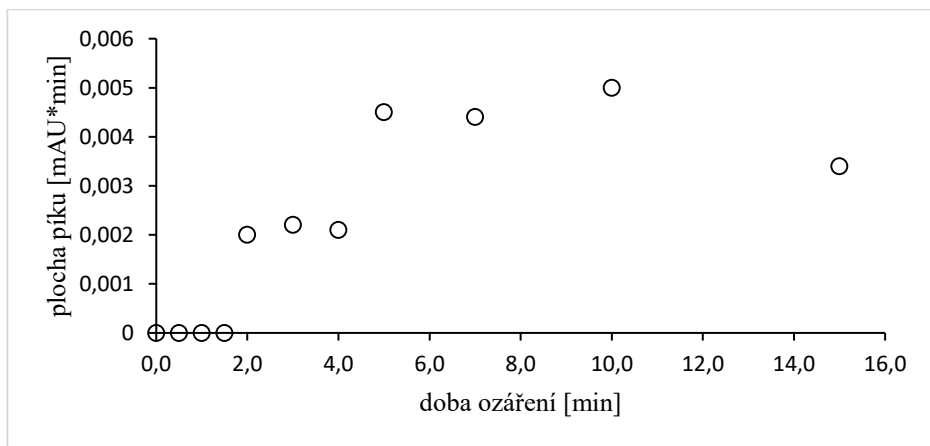
Produkt N



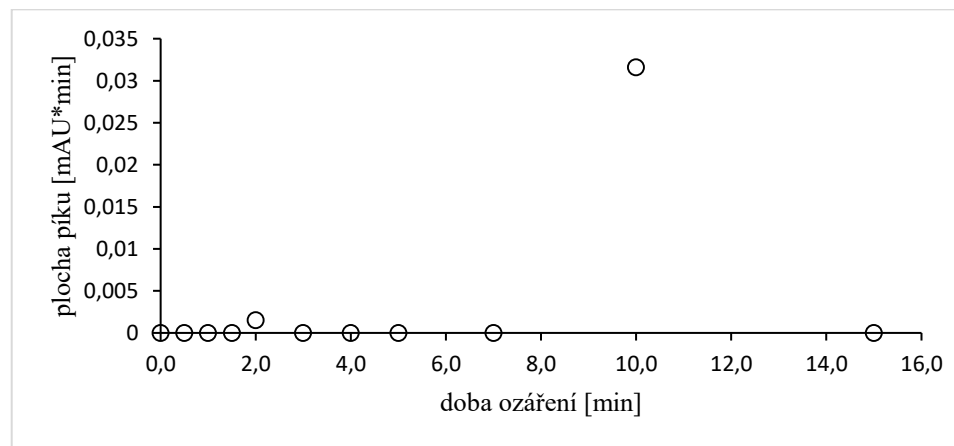
Produkt O



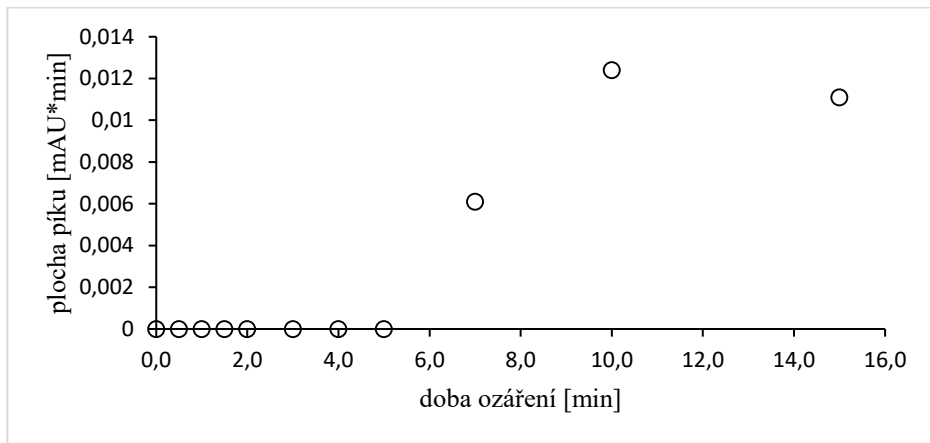
Produkt P



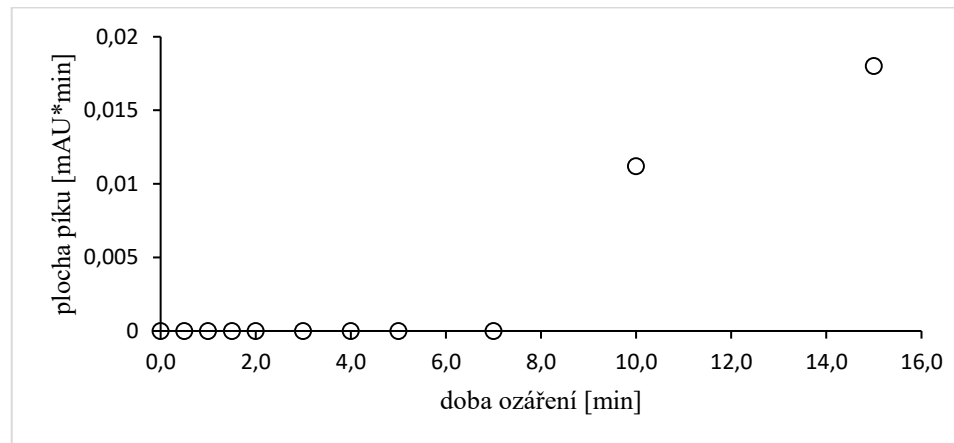
Produkt Q



Produkt R

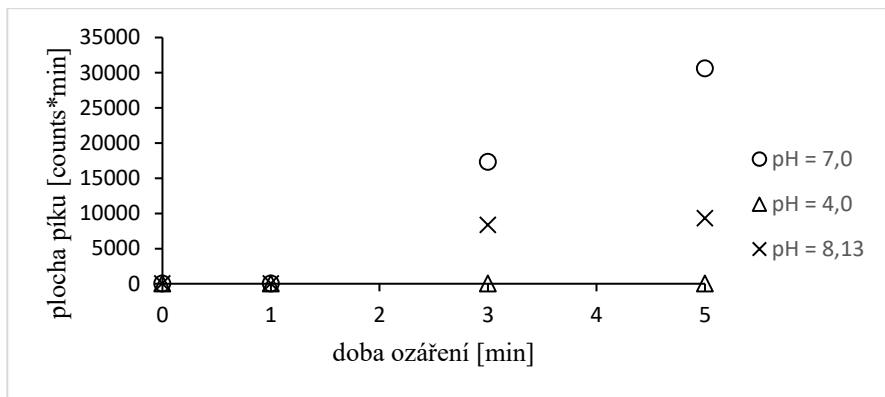


Produkt S

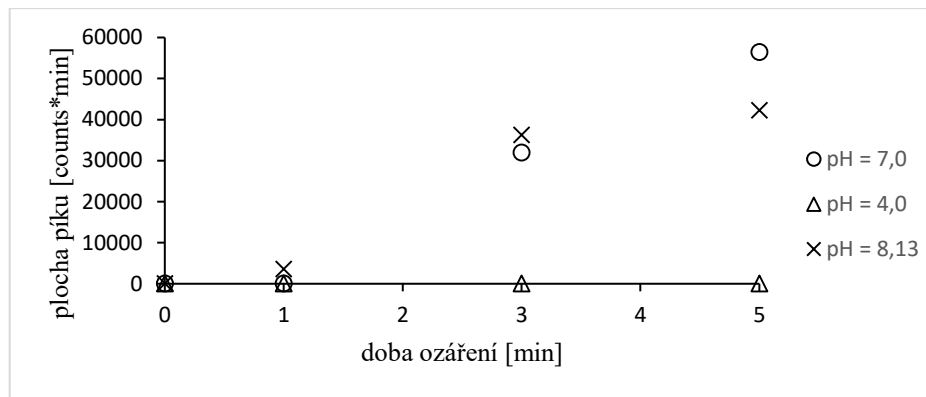


**8.2. Příloha 2:** Průběh produktů degradace enrofloxacinu v kyselém (pH = 4,0), neutrálním (pH = 7,0) a zásaditém prostředí (pH = 8,13) - porovnání podle retenčních časů.

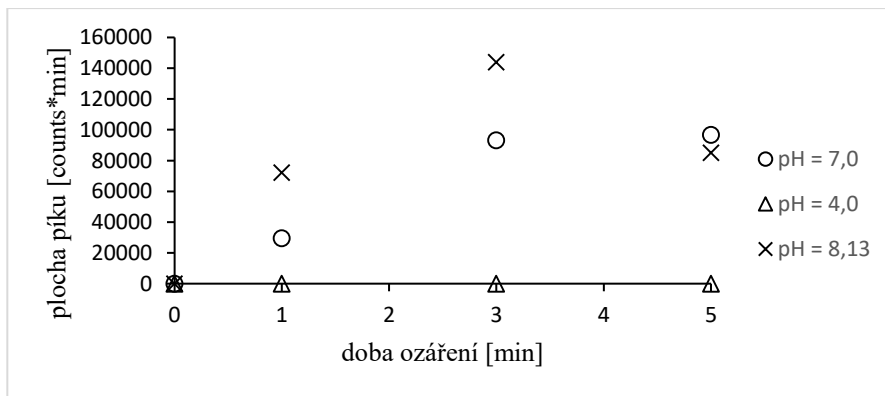
Produkt A



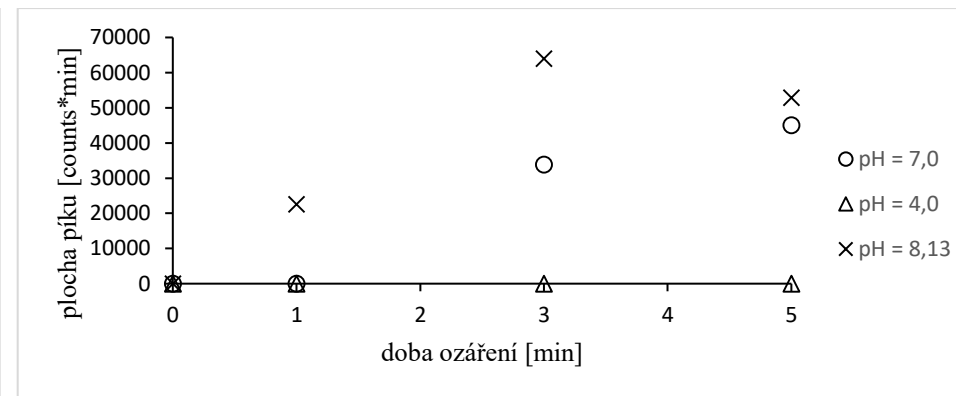
Produkt B



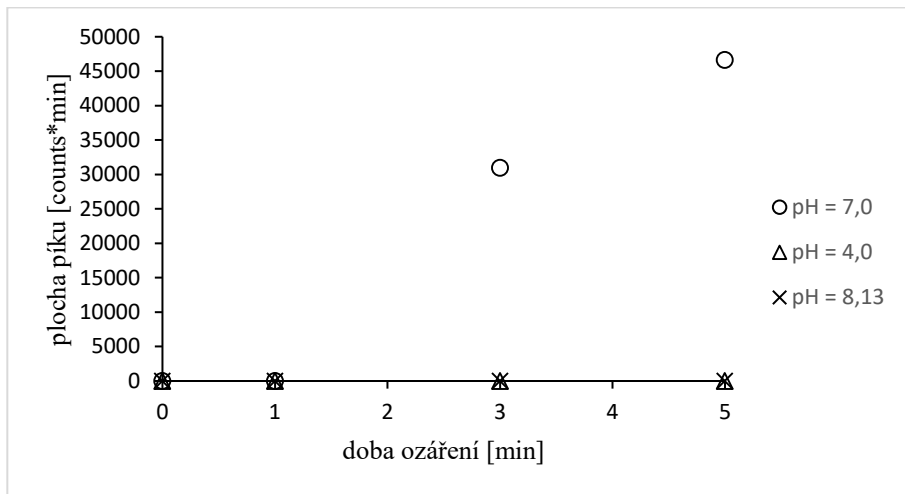
Produkt C



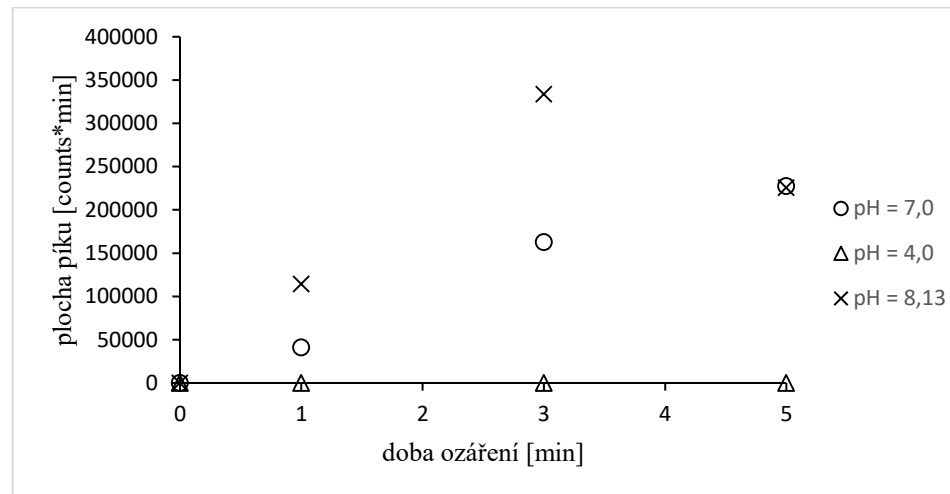
Produkt D



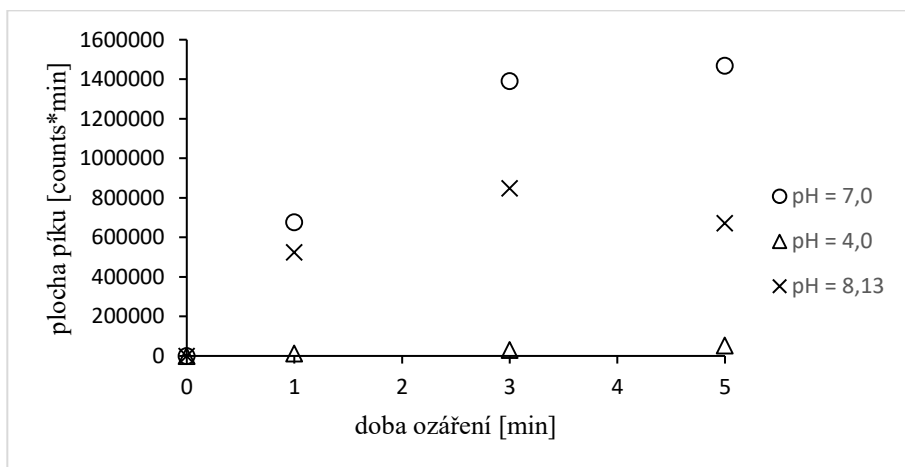
Produkt E



Produkt F



Produkt G

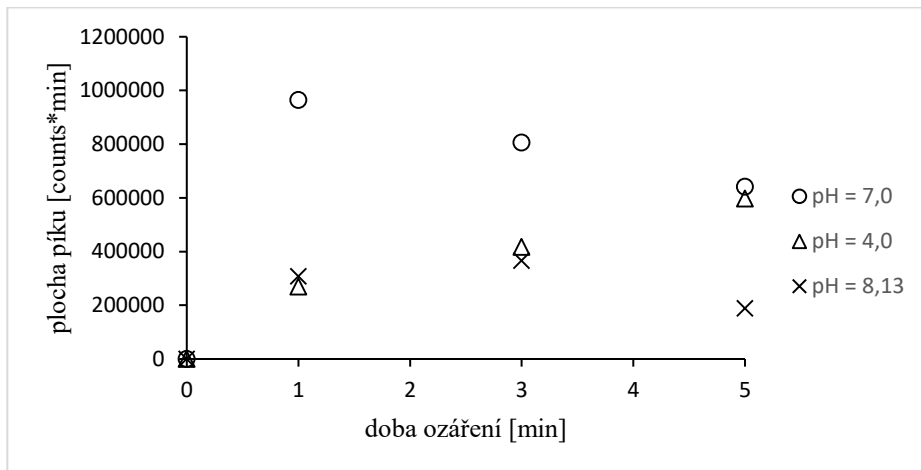


Produkt H

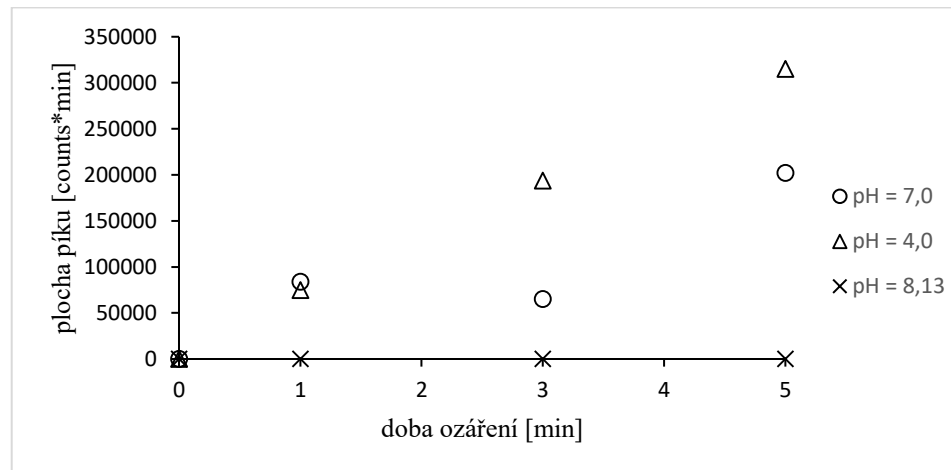




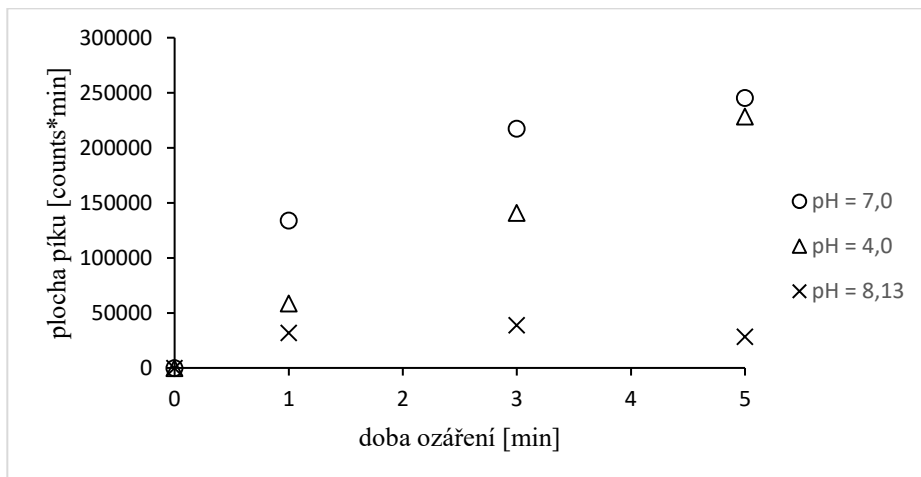
Produkt I



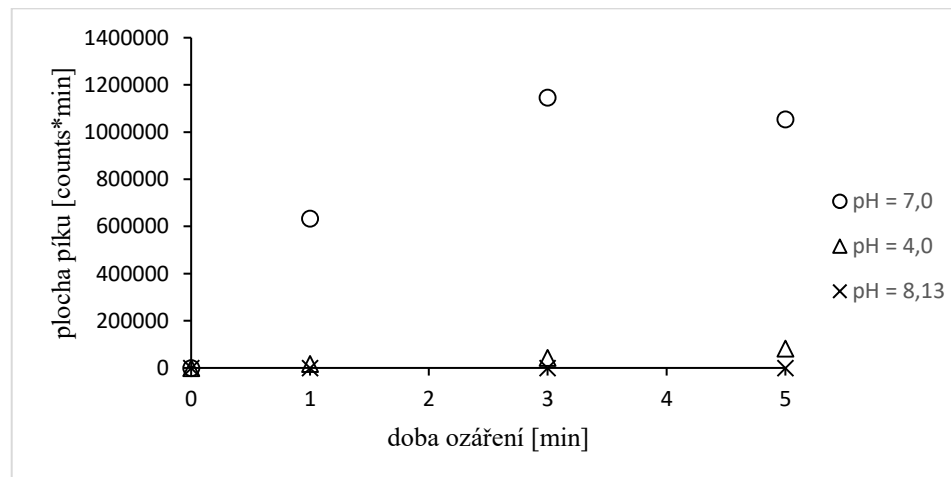
Produkt J



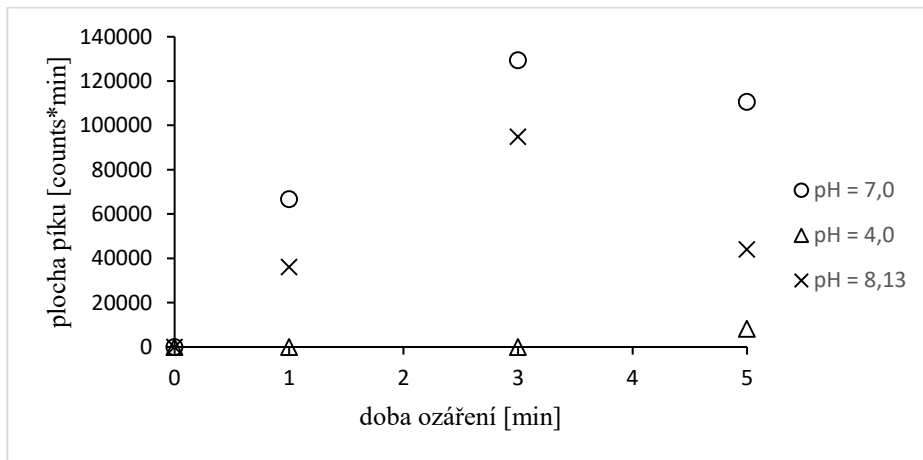
Produkt K



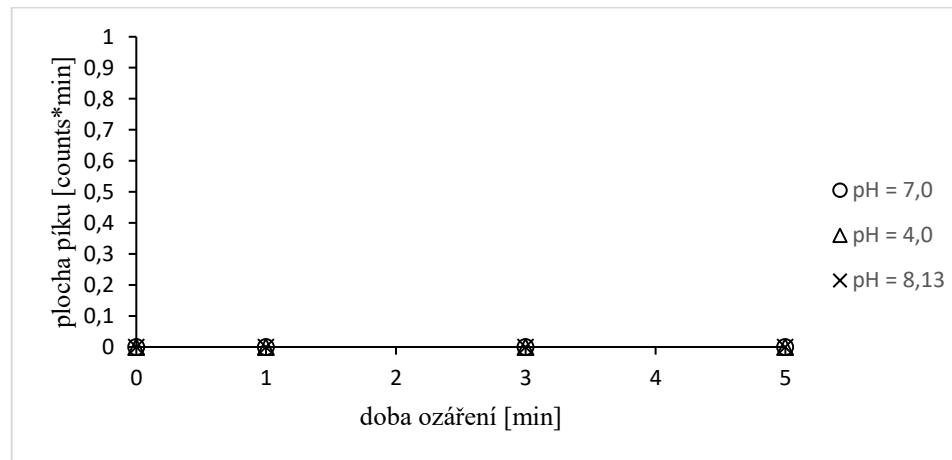
Produkt L



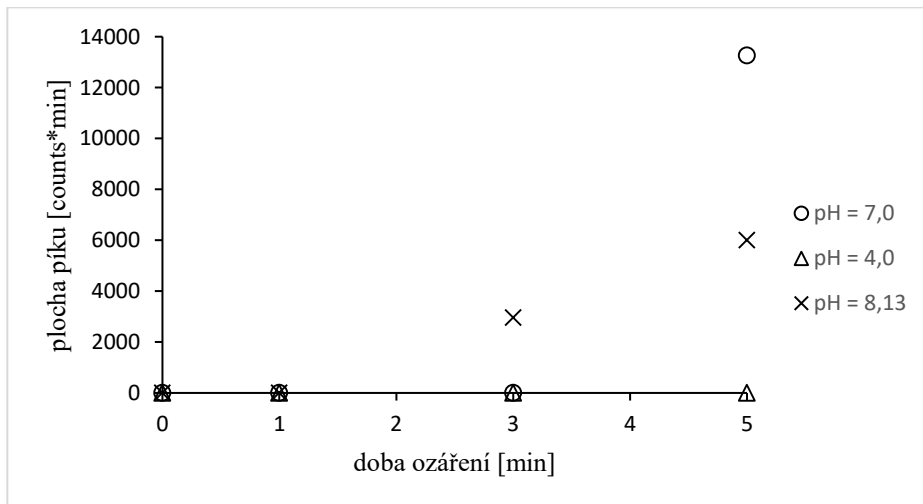
Produkt M



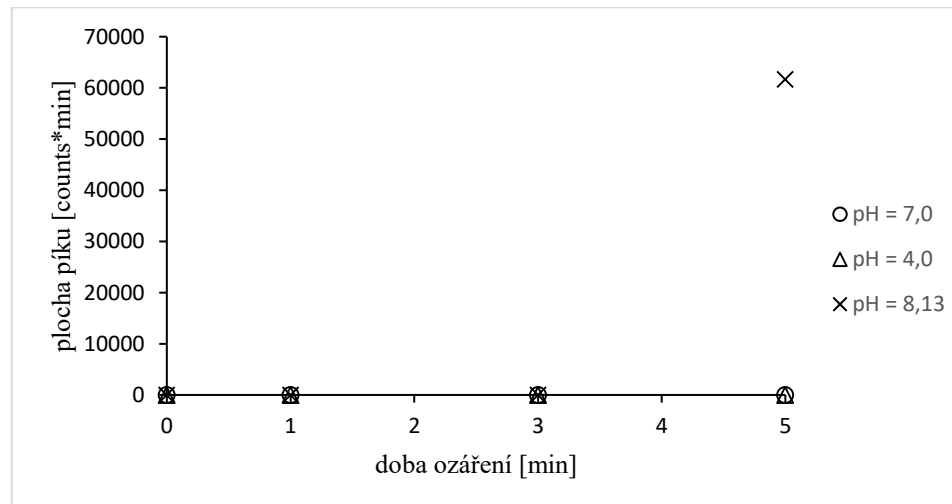
Produkt N



Produkt O

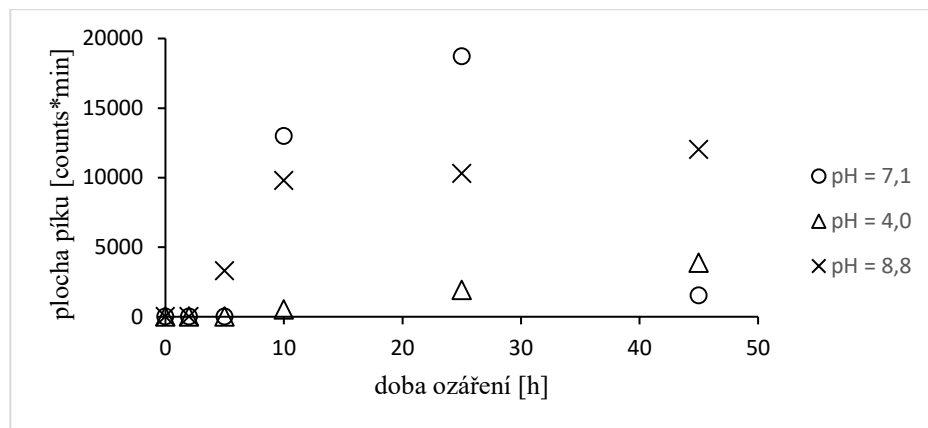


Produkt P

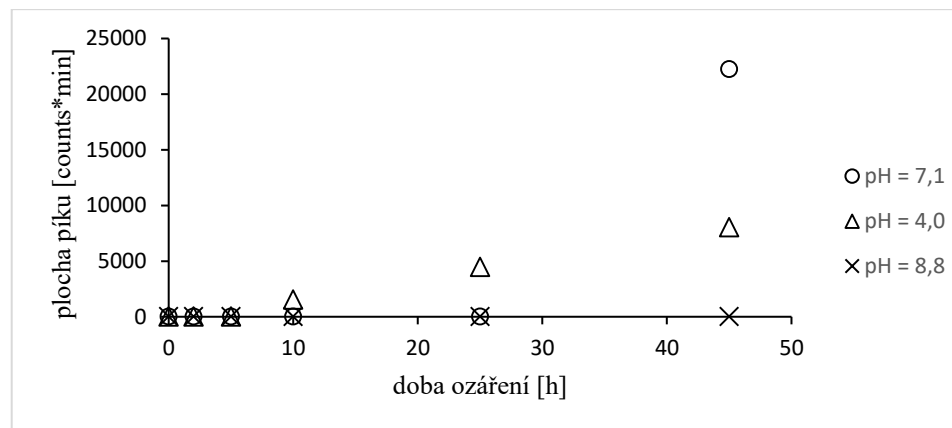


**8.3. Příloha 3:** Průběh produktů degradace norfloxacinu v kyselém (pH = 4,0), neutrálním (pH = 7,0) a zásaditém prostředí (pH = 8,13) - porovnání podle retenčních časů.

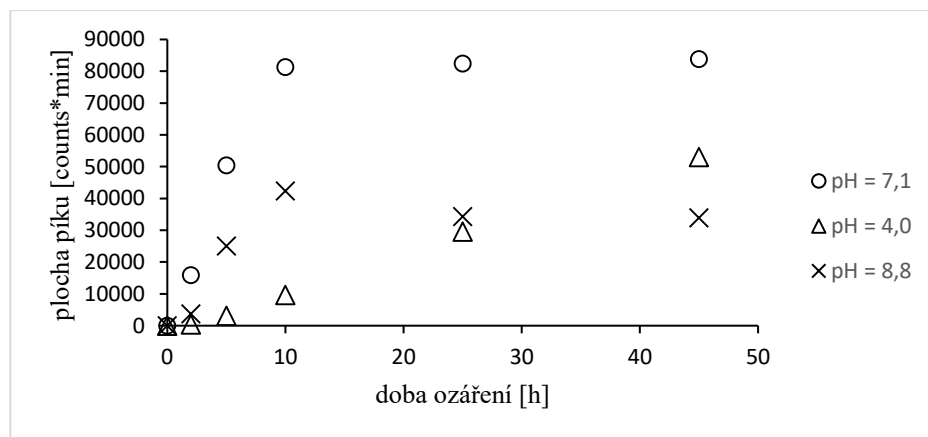
Produkt A



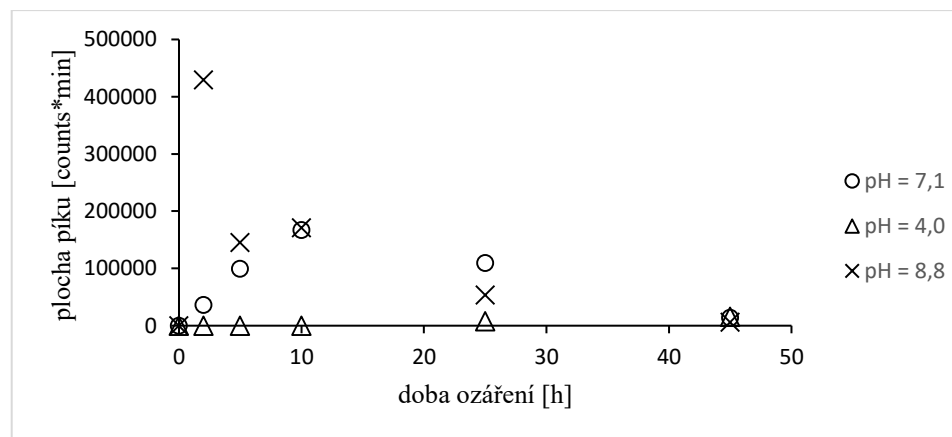
Produkt B



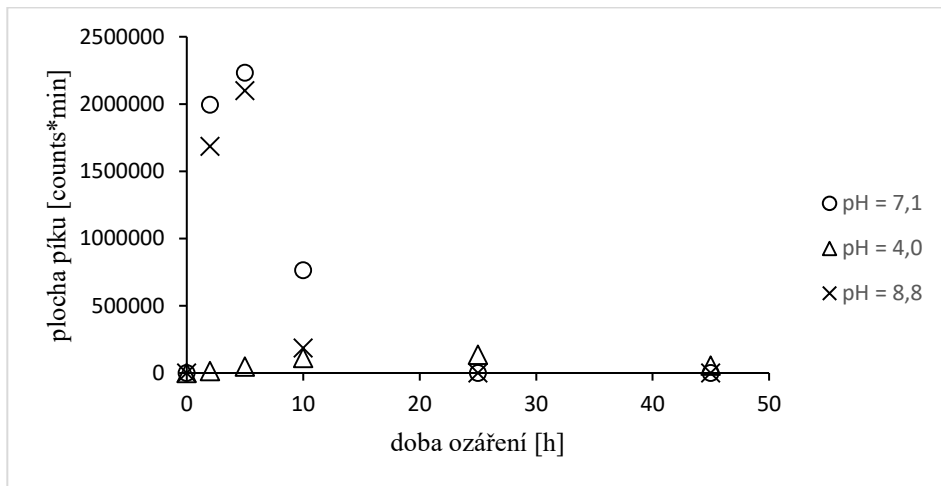
Produkt C



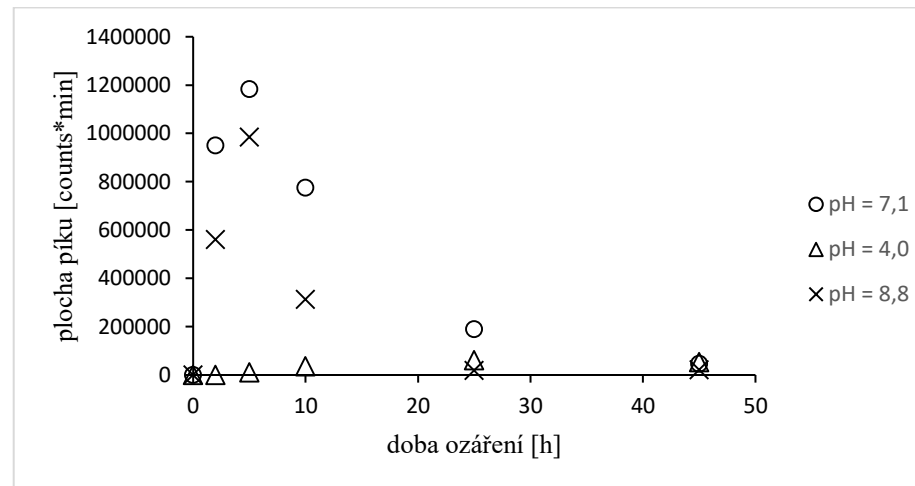
Produkt E



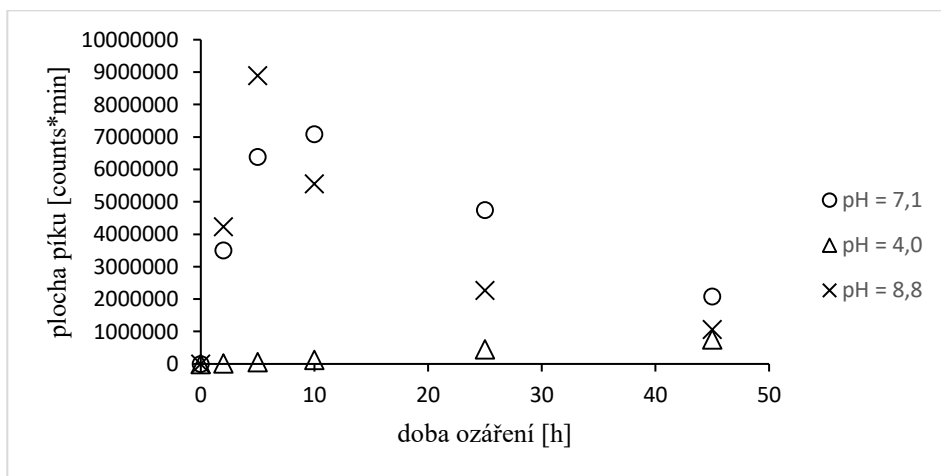
Produkt F



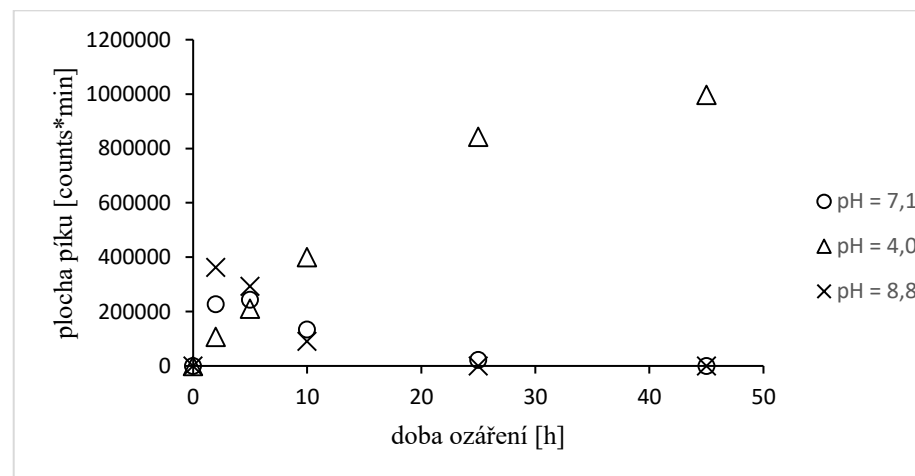
Produkt G



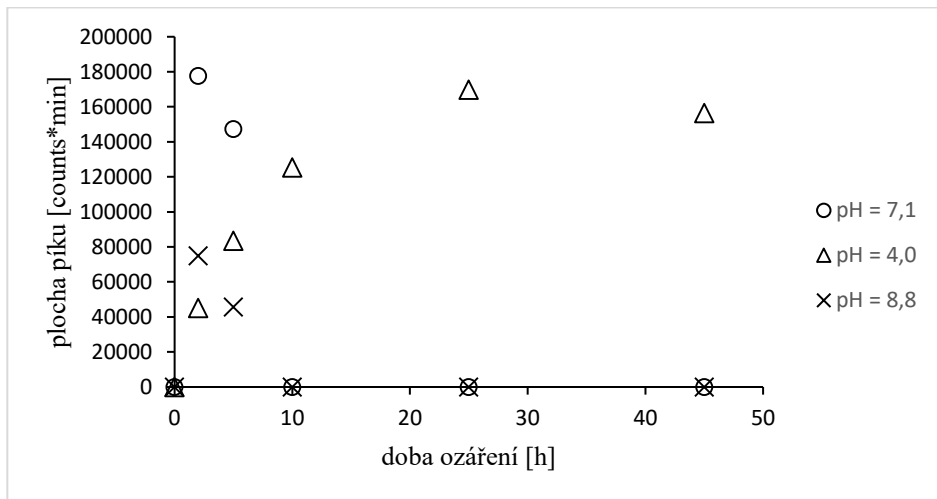
Produkt H



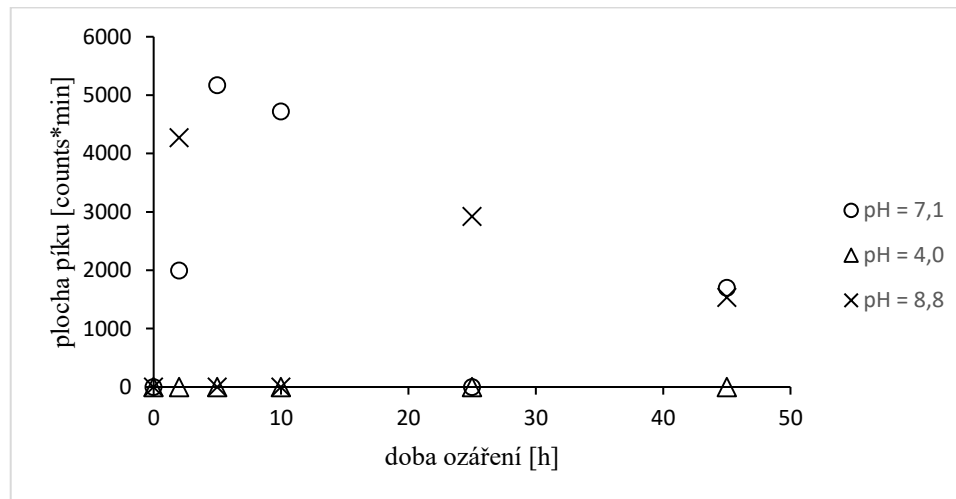
Produkt I



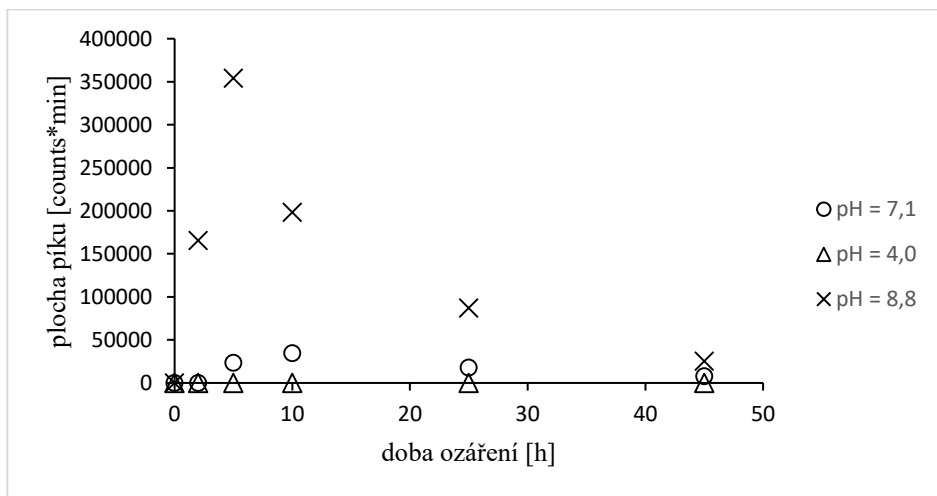
Produkt K



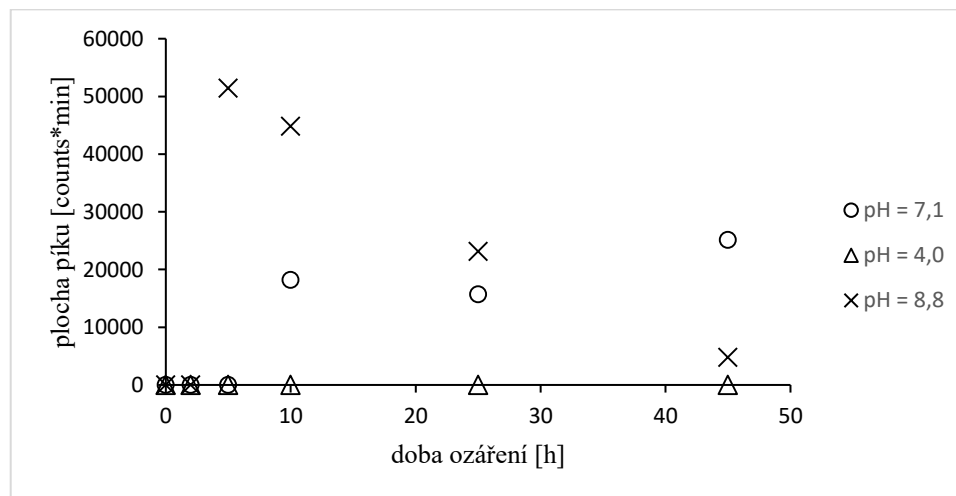
Produkt M



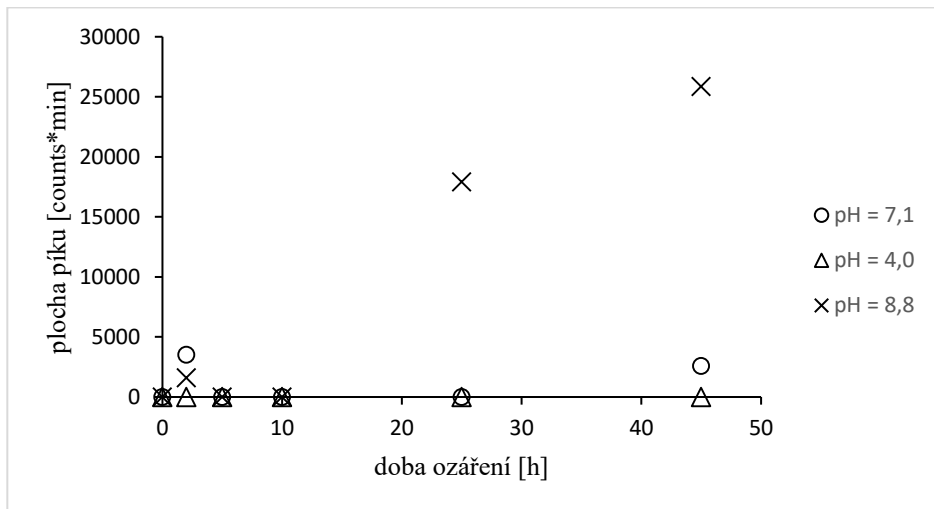
Produkt N



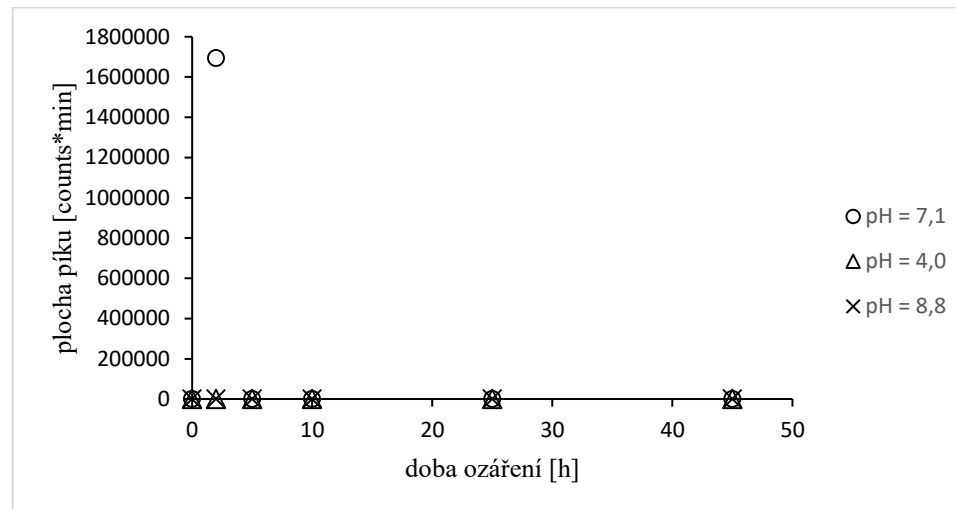
Produkt O



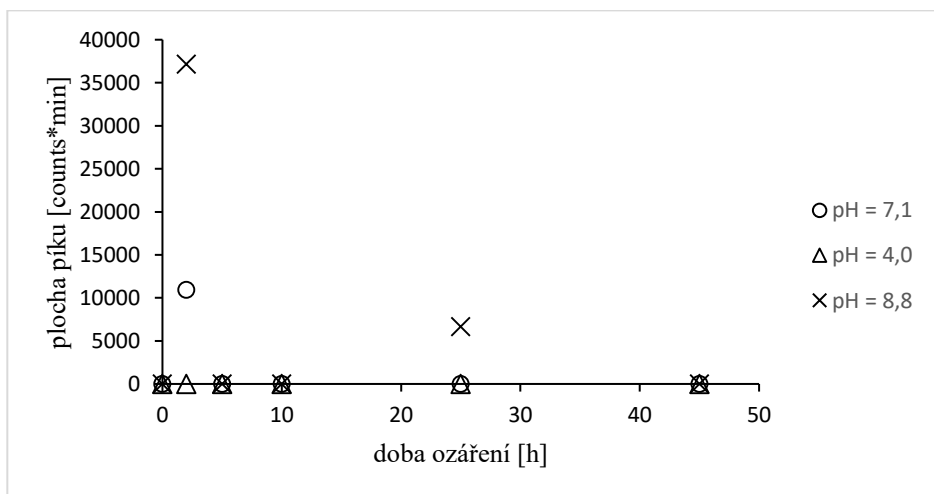
Produkt Q



Produkt S

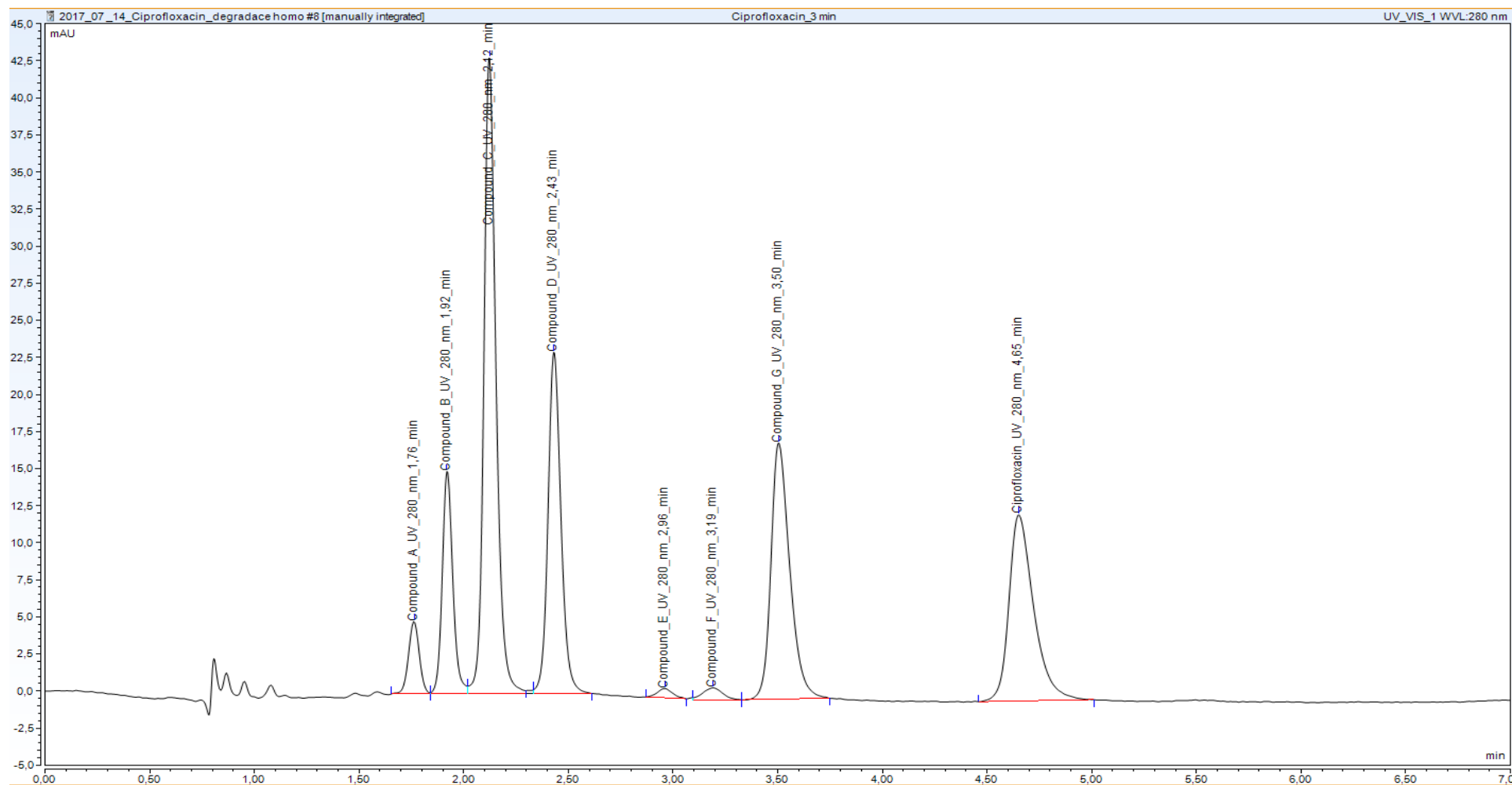


Produkt T

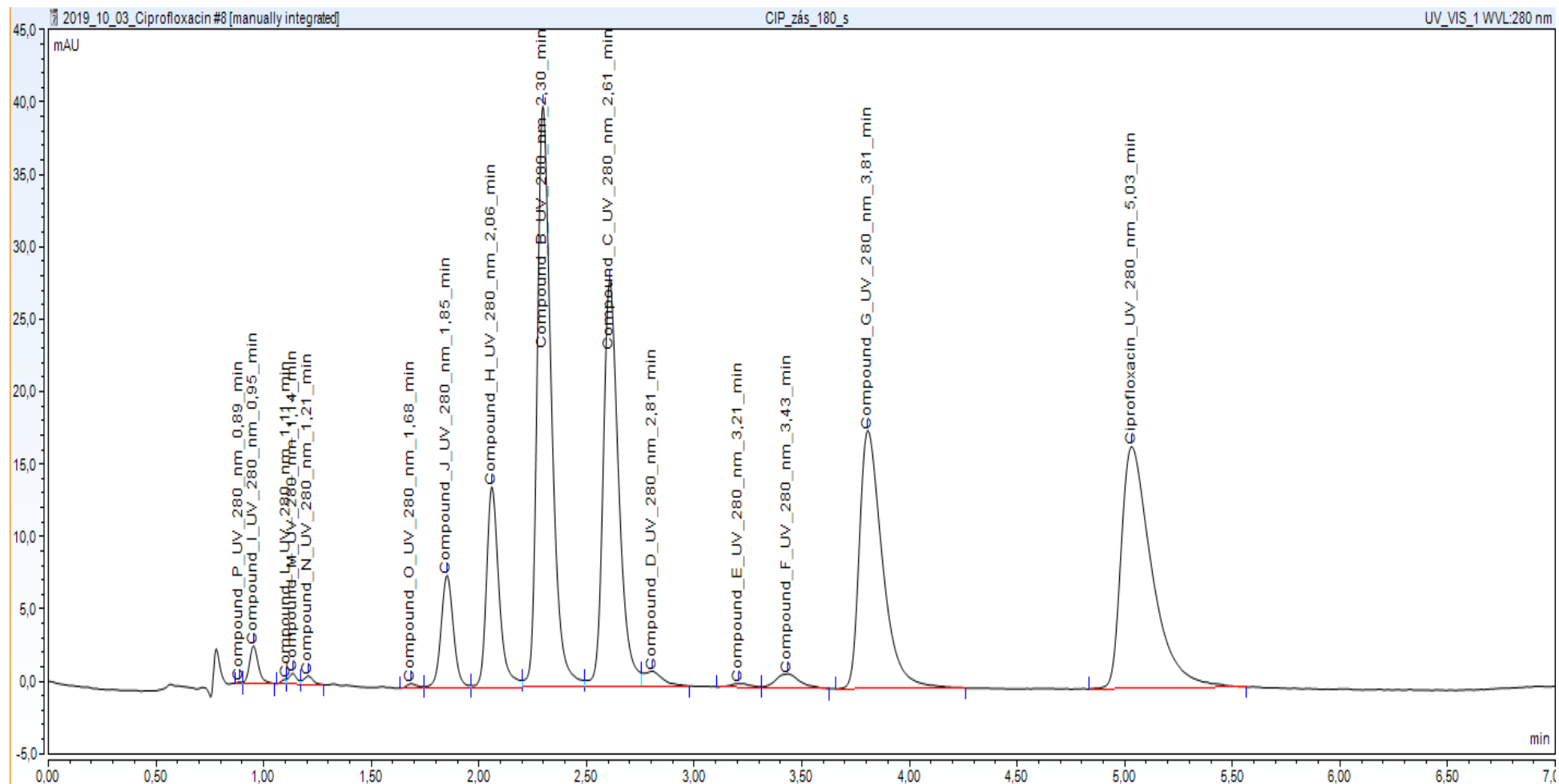


**8.4. Příloha 4:** HPLC chromatogramy antibiotik ciprofloxacinu, enrofloxacinu a norfloxacinu v neutrálním a zásaditém prostředí v časech ozařování.

Chromatogram ciprofloxacinu ve 3 minutách ozařování, pH neutrální.

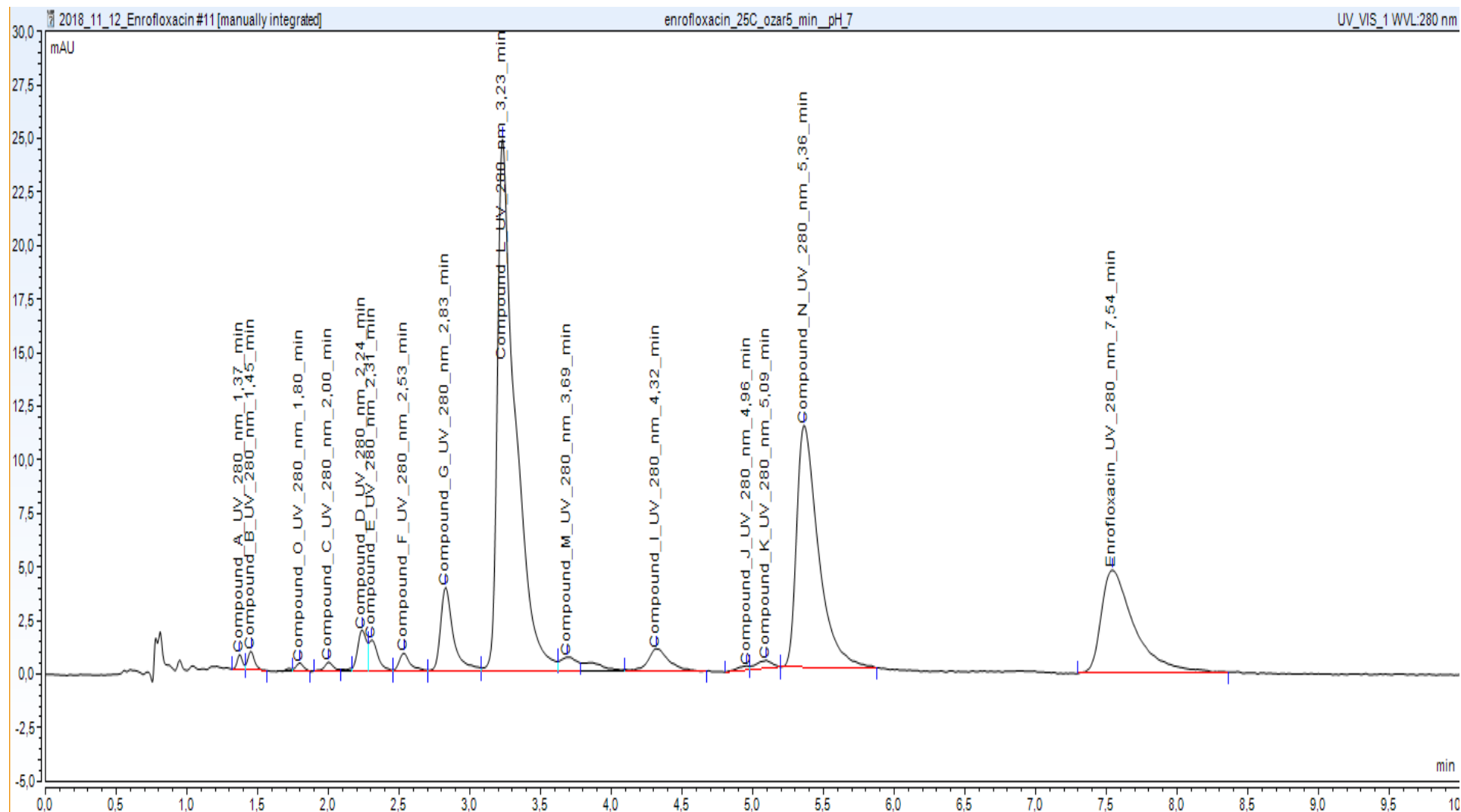


Chromatogram ciprofloxacinu ve 3 minutách ozařování, pH zásadité.

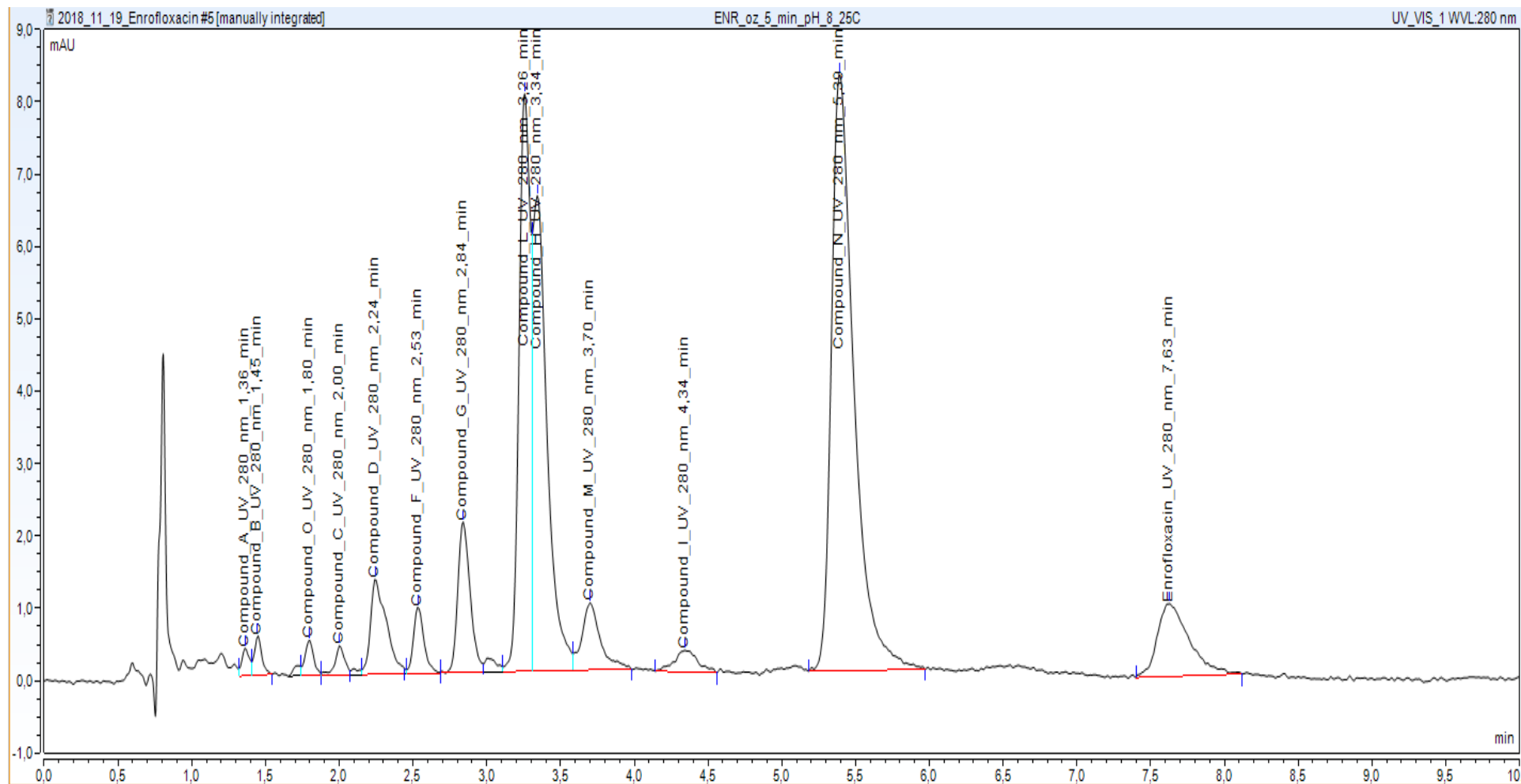




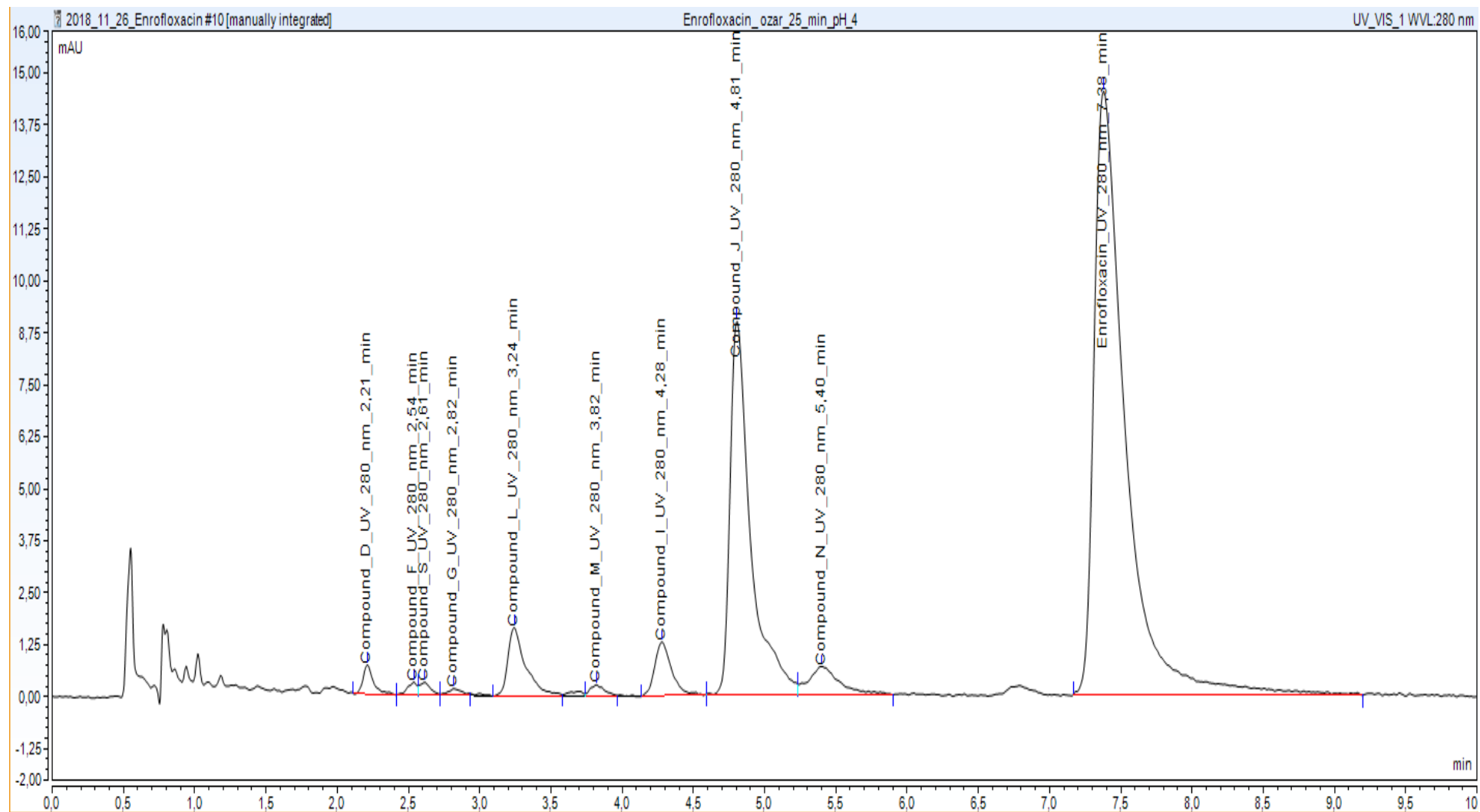
Chromatogram enrofloxacinu v 5 minutách ozařování, pH neutrální.



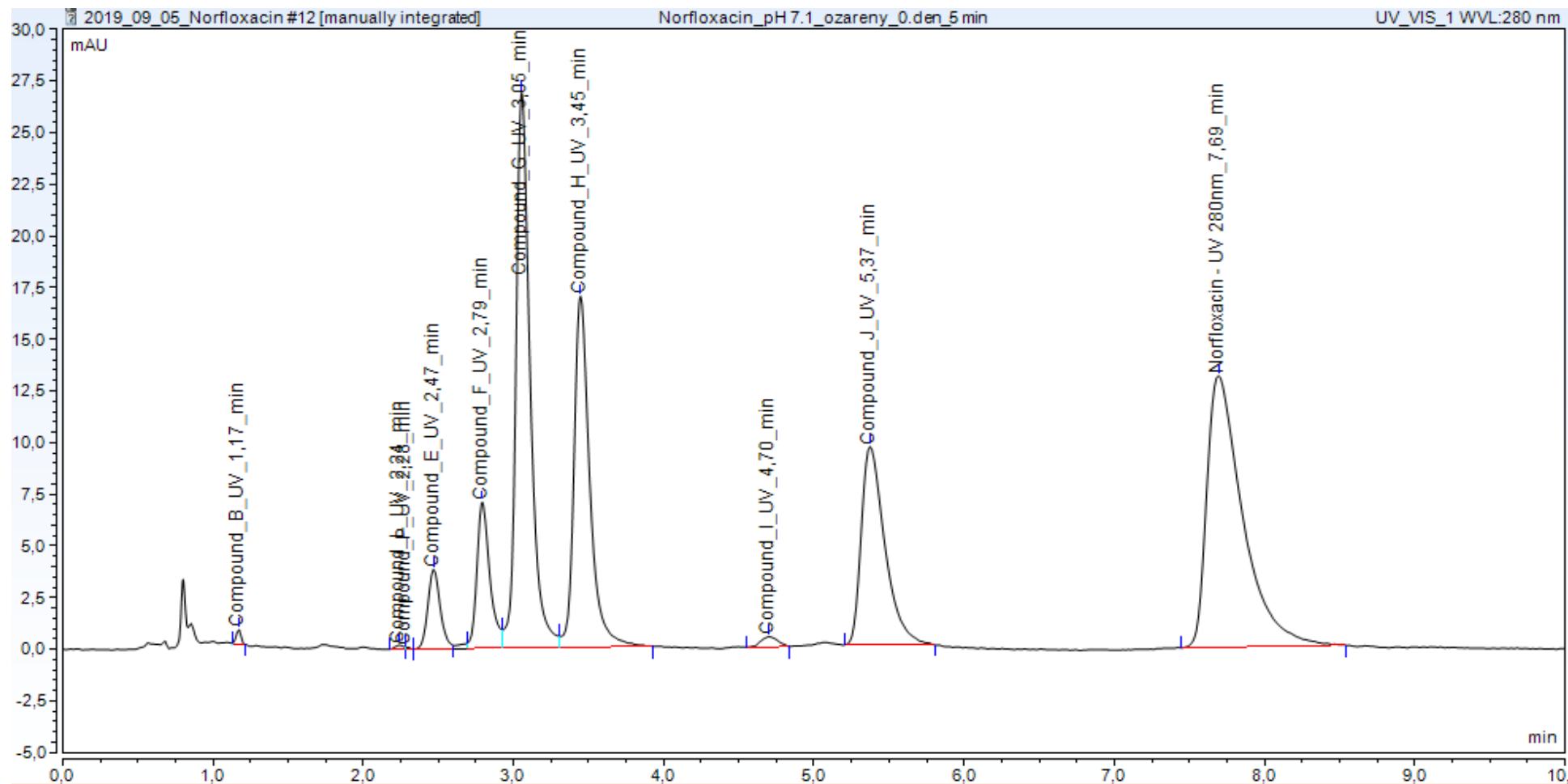
Chromatogram enrofloxacinu v 5 minutách ozařování, pH zásadité.



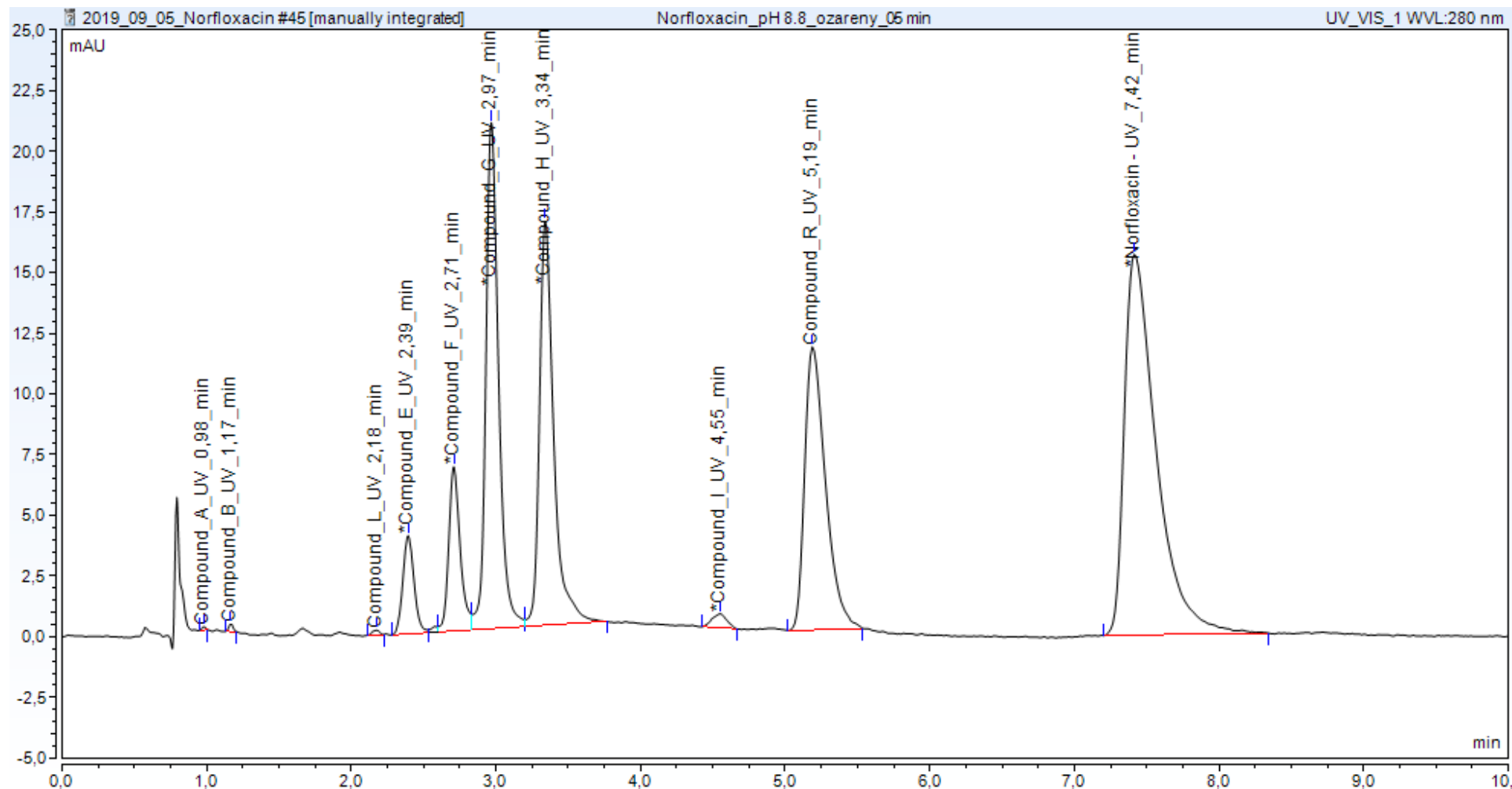
Chromatogram enrofloxacinu ve 25 minutách ozařování, pH kyselé.



Chromatogram norfloxacinu v 5 minutách ozařování, pH neutrální.



Chromatogram norfloxacinu v 5 minutách ozařování, pH zásadité.



## **8.5. Příloha 5: Poznámky k mechanismu degradace jednotlivých fluorochinolonů**

### **Ciprofloxacin zásadité pH:**

-počet degradačních produktů: 61

Bylo určeno 7 degradačních cest ciprofloxacinu v zásaditém prostředí:

**I. nejmajoritnější hydroxylací** (navázání OH skupiny na piperazinový kruh a na chinonové jádro + navázání karbonylové keto skupiny na piperazinový kruh) vznikl produkt 1. Z něho vzniklo velké množství produktů, které se dále degradovaly:

- defluorací (odštěpení atomu F) vznikl produkt 19;
- Dekarboxylací vznikl produkt 18;
- Redukcí keto skupiny a částečnou dehydroxylací vznikly izomerní produkty 12 a 15
- Rozštěpením piperazinového jádra vznikly produkty 5 a 9
- Oxidací OH skupin na piperazinovém kruhu vznikl produkt 10
- Oxidací OH skupin na chinonovém jádře vznikl produkt 4.

U dalších produktů, které vznikly z těchto „meziproduktů“, byla dále pozorována nejčastěji dehydratace nebo rozevření piperazinového kruhu.

II. Druhou nejmajoritnější cestou degradace ciprofloxacinu, byla **defluorace**, kterou vznikl stabilní produkt 2 (dále se nedegradoval)

III. Třetí pozorovaná cesta degradace ciprofloxacinu, byla **dekarboxylace**, kterou vznikl produkt 36. Tento produkt nebyl stabilní a docházelo u něho k defluoraci, dehydrogenaci, rozštěpení cyklopropanového kruhu, částečnému rozštěpení nebo úplnému odštěpení piperazinového kruhu.

IV. Čtvrtou cestou vznikl **adukt ciprofloxacinu se složkou mobilní fáze acetonitrilem** (produkt 52). U tohoto aduktu byly pozorovány všechny výše popsání cesty I. – III. Došlo tedy nejprve k rozštěpení piperazinového kruhu v důsledku oxidace (produkt 53, cesta I.), dále pak k defluoraci (produkt 54, cesta II.), poté k dekarboxylaci (produkt 55, cesta III.), který se dále rozkládal -došlo k rozštěpení piperazinového kruhu, odštěpení cyklopropylu; odštěpení piperazinového kruhu.

V.a VI. Cestou vznikly izomerní produkty 29 a 30, které se bohužel nepodařilo identifikovat.

VII. cestou vznikl produkt 28, který také bohužel nebyl identifikován.

### **Degradace ciprofloxacinu pH neutrální:**

-počet produktů: 21

-Bylo identifikováno 5 degradačních cest (dle majoritnosti):

**I. Dekarboxylací** vznikl produkt 1, který dále podléhal defluoraci a rozštěpení piperazinového kruhu vlivem oxidace

**II. Defluorací** vznikl produkt 2, který dále buď vytvořil sodný adukt (produkt 11) nebo podlehl rozštěpení piperazinového kruhu a odštěpení cyklopropylu (produkt 12, 13)

**III. Hydroxylace** nebyla příliš majoritní cestou degradace, nicméně došlo k substituci OH skupiny za F a navázání OH skupiny na chinonové jádro (vedle COOH skupiny). Vzniklý produkt 3 dále podléhal buď dekarboxylaci (produkt 15) nebo dehydroxylaci a oxidaci (produkt 14).

**IV.** Další cestou bylo opět, jako v případě degradace ciprofloxacinu v zásaditém prostředí, tvorba **aduktu ciprofloxacinu se složkou mobilní fáze – acetonitrilem** (produkt 4). U tohoto produktu byla pozorována náhrada atomu F hydroxylovou skupinou (produkt 16) a dále pak rozštěpení chinonového jádra (produkt 17) nebo rozštěpení piperazinového kruhu a odštěpení cyklopropylu a OH skupiny (produkt 18).

**V.** Poslední a velmi minoritní cestou degradace, byla **oxidace**, která vedla v rozevření piperazinového kruhu a dekarboxylaci (produkt 5).

### **Degradace enrofloxacinu, zásadité pH (8,13):**

Počet produktů: 36

3 cesty degradace:

**I.** Nejmajoritněji **defluorace**- vzniká stabilní produkt 1.

**II. Hydroxylace** (takto vzniká nejvíce produktů)- dochází k nahrazení atomu fluoru OH skupinou, navázání OH skupiny na ethylovou skupinu vedoucí z piperazinového kruhu (piperazinový kruh je ethylem stabilizován, proto nedochází k navázání OH skupiny přímo na piperazinový kruh) a hydratací vznikl produkt 3. Z produktu 3 vznikalo velké množství dalších produktů vlivem dekarboxylace, dehydroxylace, odštěpení piperazinového kruhu.

**III. Dekarboxylace** – touto cestou vznikl produkt 2, který dále podléhal defluoraci, rozštěpení piperazinového kruhu a rozštěpení cyklopropanového kruhu.

**Degradace enrofloxacinu, neutrální pH:**

Počet produktů: 9

5 cest degradace (opět dle majoritnosti)

**I. Dekarboxylace** (produkt 1) a následná defluorace (produkt 6) nebo minoritně následné odštěpení piperazinového kruhu a rozštěpení kruhu cyklopropanového (produkt 5).

**II. Defluorace** (produkt 2) a jeho následná dehydrogenace (produkt 9)

**III. Hydroxylace** (stejně jako u pH zásaditý produkt 3, ale následně dochází jen k dehydroxylaci a dehydrogenaci.

**IV. Úplným rozpadem** chinonového jádra vznikl produkt 4

**V. Oxidací** došlo k rozštěpení piperazinového jádra, cyklopropanového kruhu a současně k odštěpení atomu fluoru (produkt 5).

**Degradace enrofloxacinu, kyselé pH:**

Počet produktů: 20

3 cesty degradace:

**I. Defluorace** – z toho produkt 2

**II. Hydroxylace** – produkt 3, z něhož dehydroxylací, dehydratací vzniká produkt 6 (ciprofloxacin, ten více podléhá defluoraci, pak teprve dekarboxylaci) a řada dalších produktů přes rozštěpení piperazinového kruhu, cyklopropanového kruhu, substituci F za OH, defluoraci a dehydroxylaci.

**III. Dekarboxylace**- produkt 1

-odštěpení COOH skupiny málo – kyselé pH, má tendenci zůstat navázaná

-nejmajoritnější cesty I. a II. s převahou I. (OH skupin je málo, pouze z rozštěpené vody).



### **Shodné produkty:**

Produkt 1 ENR neu = produkt 2 ENR zás = produkt 1 ENR kys

Produkt 5 ENR neu = produkt 9 ENR zás = produkt 15 ENR kys

Produkt 6 ENR neu = produkt 4 ENR zás

Produkt 2 ENR neu = produkt 1 ENR zás = produkt 2 ENR kys

Produkt 3 ENR neu = produkt 3 ENR zás = produkt 3 ENR kys

Produkt 7 ENR neu = produkt 17 ENR zás

Produkt 8 ENR neu = produkt 19 ENR zás = produkt 7 ENR kys

Produkt 4 ENR neu = Produkt 23 ENR zás

Produkt 9 ENR neu = produkt 1 ENR kys

### **Degradace norfloxacinu, zásadité pH:**

Počet produktů: 49

11 cest degradace:

**I. Oxidací piperazinového jádra** (navázání 2 karbonylových keto skupin) **a hydratací** vznikl produkt 12. Ten se dále rozkládal, přičemž hlavní cestou jeho degradace bylo rozštěpení piperazinového kruhu (produkt 20) s následnou defluorací (produkt 21), u něhož dále došlo k odštěpení zbytku piperazinového jádra (produkt 22). Druhou hlavní cestou degradace produktu 12 byla náhrada atomu F skupinou OH a současné rozštěpení piperazinového kruhu (stabilní produkt 19). Třetí hlavní cestou degradace byla dehydratace, která vedla ke vzniku produktu 18. Poslední a zároveň minoritní cestou odbourávání produktu 12 byla redukce COOH skupiny na aldehydovou CHO skupinu se současnou dehydratací, kterou vznikl produkt 13, u něhož byly pozorovány 3 cesty degradace, přičemž významně podléhal defluoraci (produkt 15) a následně dehydrogenaci (produkt 16); dále minoritně docházelo k odtržení aldehydové skupiny CHO, což dávalo vzniknout produktu 2, který mimo jiné vznikal rovněž přímo z norfloxacinu dekarboxylací. Tento produkt 2 pak podléhal rozštěpení piperazinového kruhu (vznikl tak produkt 6 a 7, jenž dal vzniku produktům 8,9,10,11) přes další štěpení alkyl. Zbytků a odštěpení fluoru nebo docházelo k dehydrogenaci (produkt 3), který dále dealkyloval (produkt 4) a ten následně dehydrogenoval (produkt 5). Z produktu

13 vznikal ještě jeden produkt a to produkt 14, jehož strukturu se bohužel nepodařilo identifikovat.

**II. vícenásobnou oxidací (v důsledku navázání 2 keto a 2 aldehydových skupin --- rozštěpení piperazinového kruhu) a současnou hydratací** vznikl produkt 28, který dále podléhal buď:

- Dehydrataci a současnou dekarboxylaci (produkt 29)
- Dehydrataci a současnou defluoraci (produkt 30)
- Redukci a dehydrataci (produkt 31) – dále karboxylace (produkt 32)

**III. oxidací piperazinového jádra (navázání 1 keto skupiny)** vznikl produkt 48.

**IV. nahražením atomu F skupinou OH vznikl** produkt 35, jenž dále dekarboxyloval (produkt 36) a následně dealkyloval (produkt 37). Jen minoritně u produktu 35 docházelo k redukci karboxylové skupiny na aldehydovou CHO (produkt 38, jenž dále dehydrogenoval --- produkt 39, který posléze odštěpil karboxylovou CHO skupinu úplně a vznikl produkt 3)

**Struktury produktů 23,41 a izomerních produktů 42 a 43 nebyly bohužel identifikovány, ale dle jejich dalších produktů, můžeme usuzovat, že také oni vznikly oxidací v důsledku hydroxylace – cesty V., VI., VII., VIII.**

**IX.** Devátou identifikovanou cestou degradace norfloxacinu byla **dekarboxylace**, při níž vznikl dále se rozkládající produkt 2.

**X.** Předposlední identifikovanou cestou degradace norfloxacinu v zásaditém prostředí byla **defluorace**, pomocí níž vznikl stabilní produkt 1.

**XI.** A poslední identifikovanou cestou byla **redukce COOH skupiny na aldehydovou CHO** skupinu, kdy vznikl produkt 13.

### **Degradace norfloxacinu pH neutrální:**

Počet produktů: 25

5 degradačních cest:

**I. Dekarboxylací** vznikl produkt 2, který 1. podléhal defluoraci (majoritně) – vznikl produkt 3, který dále dehydrogenoval na produkt 4, z něhož dealkylací vznikl produkt 5, který dehydrogenoval na produkt 6.

**2.došlo k rozštěpení piperazinového kruhu a jeho dalšímu štěpení** (produkty 7, 8 a 11)

**Cesty II. a III. – oxidace**

**II. oxidací a současnou hydratací** vznikl produkt 18, který dále podléhal rozštěpení piperazinového kruhu (produkt 20) s následnou defluorací (produkt 22) a dedeaminací (produkt 24) nebo nahrazení atomu fluora skupinou OH se současným rozštěpením piperazinového kruhu a dehydratací (produkt 19)

**III. oxidací a roztržením piperazinového kruhu** v důsledku této oxidace popř. hydroxylace vznikl produkt 17.

**IV. Nahrazení atomu fluoru OH skupinou** vznikl produkt 12, který se odbourával 3 cestami:

1. nejvíce podléhal dekarboxylaci (produkt 13)
2. odštěpení piperazinového kruhu (produkt 16)
3. redukce COOH skupiny na aldehydovou CHO (produkt 14) s následnou dehydrogenací (produkt 15).

**V. defluorací** vznikl stabilní produkt 1.