



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# ANALÝZA LÉČIV V ŽÍŽALÁCH HNOJNÍCH S POUŽITÍM METODY QUECHERS

ANALYSIS OF DRUGS IN THE EARTHWORMS USING THE QUECHERS METHOD

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Jitka Navrkalová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.

BRNO 2023

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1771/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Jitka Navrkalová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: bez specializace  
Vedoucí práce: **Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Analýza léčiv v žížalách hnojných s použitím metody QuEChERS

### Zadání bakalářské práce:

1. Připravit literární rešerši týkající se výskytu, koloběhu, příjmu a analýze léčiv v půdě a žížalách, případně dalších složkách půdního ekosystému.
2. Optimalizovat metodu QuEChERS pro analýzu léčiv v žížalách hnojných.
3. Vymyslet a provést experimenty v laboratorním boxu a analyzovat léčiva v žížalách.
4. Výsledky zpracovat a vyhodnotit.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

-----  
Jitka Navrkalová  
studentka

-----  
Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tématem této bakalářské práce je stanovení léčiv v žížalách hnojních prostřednictvím metody QuEChERS s následnou LC-MS/MS analýzou. Teoretická část je zaměřena na konkrétní skupiny použitých léčiv, jejich vlastnosti a využití. Dále se zaměřuje na výskyt léčiv v životním prostředí od jejich vstupu až po s tím spojené negativní následky, včetně dopadu na žížaly hnojní. Teoretická část také pojednává o metodě QuEChERS a kapalinové chromatografii s hmotnostní spektrometrií. V rámci experimentální části byla nejdříve optimalizovaná metoda QuEChERS (konkrétně její parametry jako organické rozpouštědlo, složení vodné fáze, množství EDTA a způsob přečištění) pro extrakci 31 léčiv z žížal s analytickou koncovkou LC-MS/MS. Tato optimalizovaná a validovaná metoda je následně použita na extrakci léčiv z žížal hnojních, které byly podrobeny experimentům. Experimenty se zaměřují na vliv koncentrace léčiv v půdě a přítomnost biouhlu na příjem různých léčiv žížalami.

## **ABSTRACT**

The content of this Bachelor's thesis is an analysis of pharmaceuticals in earthworms using the QuEChERS method followed by the LC-MS/MS analysis. The theoretical part focuses on the specific groups of used drugs, their properties and applications. Furthermore, it focuses on the occurrence of drugs in the environment from their input to the negative consequences including the impact on earthworms. The theoretical part also discusses the QuEChERS method and liquid chromatography with mass spectrometry. At first in the experimental part, the QuEChERS method (concretely parameters like organic solvent, aqueous phase composition, amount of EDTA, purification method) was optimized for the extraction of 31 drugs from earthworms analytically completed by LC-MS/MS. This optimized and validated method is subsequently applied to the extraction of drugs from earthworms from the performed experiments. The experiments focus on the effect of drug concentration in soil and the presence of biochar on the uptake of different drugs by earthworms.

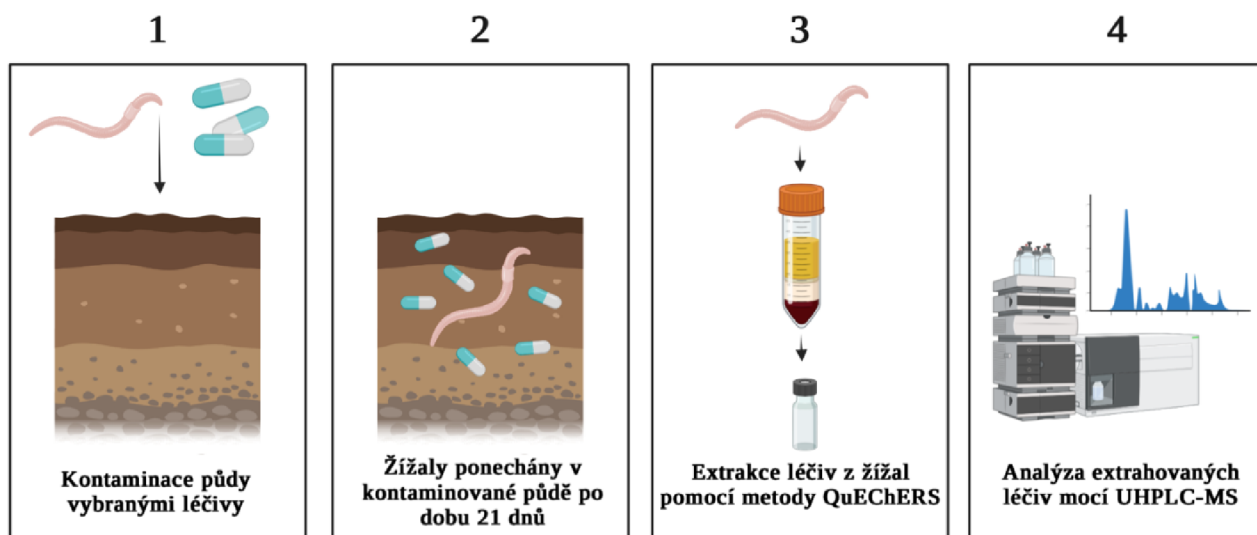
## **Klíčová slova**

Léčiva, žížaly, QuEChERS, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

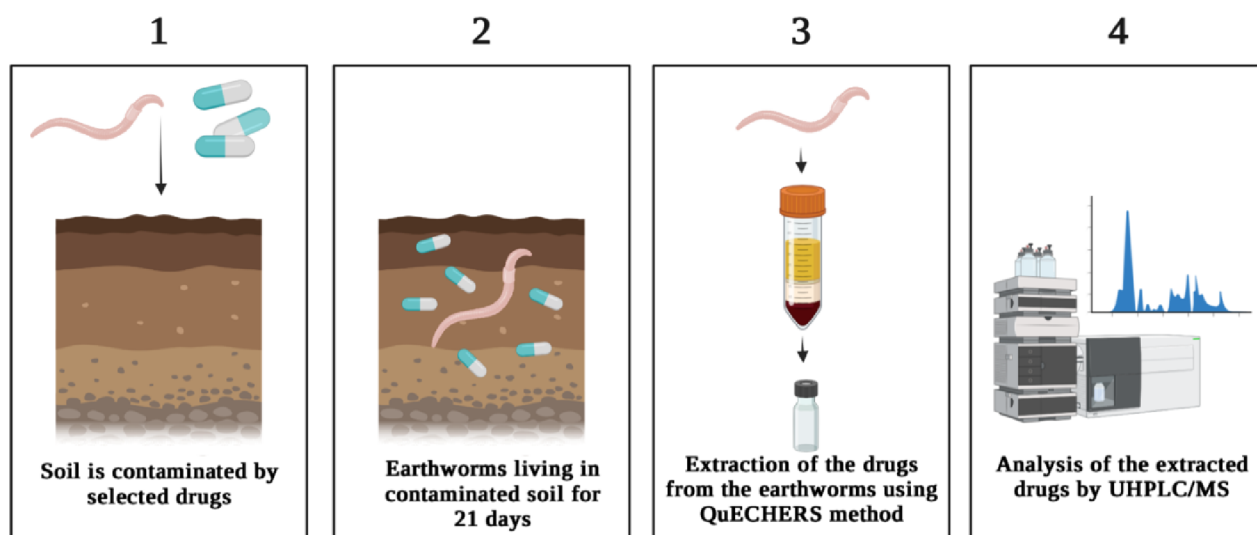
## **Key words**

Pharmaceuticals, earthworms, QuEChERS, liquid chromatography, mass spectrometry

## GRAFICKÝ ABSTRAKT



## GRAPHICAL ABSTRACT



NAVRKALOVÁ, Jitka. Analýza léčiv v žížalách hnojných s použitím metody QuEChERS [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-04-09]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148025>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ludmila Mravcová.

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych velmi ráda poděkovala vedoucí této práce Ing. Ludmile Mravcové, Ph.D. nejen za poskytnutí odborných rad, ale také velmi ochotný a milý přístup. Velké poděkování náleží také Ing. Janu Fučíkovi za pomoc při realizaci experimentů, cenné zkušenosti a poskytnuté konzultace. Dále bych také chtěla poděkovat Ing. Martinu Brtnickému z Mendelovy univerzity v Brně za poskytnutí biouhlu na experimenty.

# Obsah

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 ÚVOD</b> .....                                                       | <b>8</b>  |
| <b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b> .....                                            | <b>9</b>  |
| 2.1 LÉČIVA.....                                                           | 9         |
| 2.1.1 Makrolidová antibiotika.....                                        | 10        |
| 2.1.2 Nesteroidní protizánětlivá léčiva.....                              | 11        |
| 2.1.3 Beta-blokátory.....                                                 | 12        |
| 2.1.4 Chinolony a fluorochinolony.....                                    | 13        |
| 2.1.5 Sulfonamidy.....                                                    | 14        |
| 2.1.6 Tetracykliny.....                                                   | 15        |
| 2.1.7 Spotřeba veterinárních antimikrobik v Evropě.....                   | 16        |
| 2.1.8 Spotřeba antimikrobik u hospodářských zvířat v České republice..... | 16        |
| 2.2 LÉČIVA V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ.....                                      | 17        |
| 2.2.1 Následek výskytu léčiv v životním prostředí.....                    | 18        |
| 2.3 ŽÍŽALY.....                                                           | 19        |
| 2.3.1 Charakteristika žížal.....                                          | 19        |
| 2.3.2 Role žížal v půdním ekosystému.....                                 | 19        |
| 2.3.3 Žížaly a půdní kontaminanty.....                                    | 19        |
| 2.4 ANALÝZA LÉČIV.....                                                    | 20        |
| 2.5 METODA QUECHERS.....                                                  | 21        |
| 2.5.1 Extrakční fáze.....                                                 | 23        |
| 2.5.2 Fáze přečištění.....                                                | 24        |
| 2.5.3 Využití metody QuEChERS.....                                        | 26        |
| 2.6 KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE.....                                         | 27        |
| 2.6.1 Instrumentace techniky HPLC.....                                    | 27        |
| 2.6.2 UHPLC.....                                                          | 30        |
| 2.7 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....                                         | 30        |
| 2.7.1 Iontový zdroj.....                                                  | 30        |
| 2.7.2 Hmotnostní analyzátor – Kvadrupól.....                              | 32        |
| 2.7.3 Detektory v hmotnostní spektrometrii.....                           | 34        |
| <b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....                                        | <b>35</b> |
| 3.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....                                               | 35        |
| 3.1.1 Rozpouštědla.....                                                   | 35        |
| 3.1.2 Kyseliny.....                                                       | 35        |
| 3.1.3 Soli.....                                                           | 35        |
| 3.1.4 Sorbenty.....                                                       | 35        |
| 3.1.5 Standardy léčiv.....                                                | 35        |
| 3.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....                                      | 36        |

|          |                                                                                         |           |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3      | POUŽITÝ SOFTWARE PRO ZPRACOVÁNÍ A INTERPRETACI DAT .....                                | 36        |
| 3.4      | VZORKY .....                                                                            | 36        |
| 3.4.1    | <i>Vzorky žížal pro experimenty</i> .....                                               | 36        |
| 3.4.2    | <i>Vzorky půdy pro experimenty</i> .....                                                | 36        |
| 3.4.3    | <i>Vzorky biouhlu</i> .....                                                             | 37        |
| 3.5      | PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH A KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ .....                                         | 37        |
| 3.5.1    | <i>Příprava matričních kalibrací</i> .....                                              | 37        |
| 3.5.2    | <i>Příprava zásobních roztoků standardů</i> .....                                       | 37        |
| 3.5.3    | <i>Příprava zásobních roztoků pufrů</i> .....                                           | 37        |
| 3.5.4    | <i>Příprava zásobních roztoků rozpouštědel</i> .....                                    | 38        |
| 3.6      | VÝBĚR VHODNÉHO POSTUPU PRO EXTRAKCI .....                                               | 39        |
| 3.6.1    | <i>Optimalizované parametry extrakčního postupu</i> .....                               | 39        |
| 3.6.2    | <i>Výsledný optimalizovaný postup extrakce pomocí metody QuEChERS</i> .....             | 42        |
| 3.6.3    | <i>Příprava validace optimalizované metody</i> .....                                    | 42        |
| 3.7      | OPTIMALIZOVANÁ LC-MS METODA PRO STANOVENÍ LÉČIV V ŽÍŽALÁCH HNOJNÍCH .....               | 43        |
| 3.8      | VLIV KONCENTRACE LÉČIVÝCH LÁTEK V PŮDĚ NA PŘÍJEM ŽÍŽALAMI HNOJNÍMI .....                | 46        |
| 3.9      | VLIVU BIOUHLU NA PŘÍJEM LÉČIVÝCH LÁTEK ŽÍŽALAMI HNOJNÍMI S ODBĚRY V ČASE .....          | 47        |
| <b>4</b> | <b>VÝSLEDKY A DISKUSE</b> .....                                                         | <b>48</b> |
| 4.1      | VÝSLEDKY OPTIMALIZACE METODY EXTRAKCE POMOCÍ QUENCHERS .....                            | 48        |
| 4.1.1    | <i>Optimalizace parametru organické rozpouštědlo</i> .....                              | 48        |
| 4.1.2    | <i>Optimalizace parametru vodná fáze</i> .....                                          | 50        |
| 4.1.3    | <i>Optimalizace parametru navážka EDTA</i> .....                                        | 52        |
| 4.1.4    | <i>Optimalizace parametru způsob přečištění</i> .....                                   | 54        |
| 4.2      | VALIDACE METODY .....                                                                   | 56        |
| 4.3      | VÝSLEDKY VLIVU KONCENTRACE LÉČIVÝCH LÁTEK V PŮDĚ NA PŘÍJEM ŽÍŽALAMI HNOJNÍMI .....      | 57        |
| 4.4      | VLIV VLASTNOSTÍ LÉČIV NA JEJICH PŘÍJEM ŽÍŽALAMI HNOJNÍMI .....                          | 60        |
| 4.5      | VÝSLEDKY VLIVU BIOUHLU NA PŘÍJEM LÉČIVÝCH LÁTEK ŽÍŽALAMI HNOJNÍMI S ODBĚRY V ČASE ..... | 62        |
| 4.6      | EKOTOXIKOLOGIE VLIVU LÉČIV NA ŽÍŽALY HNOJNÍ .....                                       | 66        |
| <b>5</b> | <b>ZÁVĚR</b> .....                                                                      | <b>67</b> |
| <b>6</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ</b> .....                                                    | <b>68</b> |
| <b>7</b> | <b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ</b> .....                                         | <b>82</b> |
| <b>8</b> | <b>SEZNAM PŘÍLOH</b> .....                                                              | <b>84</b> |

# 1 ÚVOD

Léčiva jsou již dlouhé desetiletí běžně používána při léčbě, prevenci a diagnostice velkého spektra onemocnění. Jsou hojně využívána jak v humánní, tak veterinární medicíně [1, 2]. Celková spotřeba léčiv se neustále zvyšuje [3] a s tím narůstá i riziko distribuce léčiv do životního prostředí a jeho kontaminace.

Léčiva se do životního prostředí dostávají jako nemetabolizovaná či metabolizovaná po lidské spotřebě v odpadních vodách, pomocí statkových hnojiv po použití léčiv ve veterinární medicíně. Prostřednictvím statkových hnojiv a zavlažováním odpadní vodou se léčiva dostávají do půdy a následně mohou kontaminovat povrchové i podzemní vodní zdroje [1, 2]. Toto je způsobeno zejména díky snaze recyklovat odpadní vody a vývozu statkových hnojiv na pole za účelem obohacení půdy o prospěšné živiny [1, 4, 12].

Uvolňování léčiv do celého životního prostředí, zejména do vody a půdy, může mít velmi negativní následky, které se s časem začínají projevovat. Podílí se například na vzniku antimikrobiální rezistence, která má za následek úmrtí již miliónů lidí [1, 2]. S ohledem na předchozí scénáře nárůstu rezistence proti lékům u 6 patogenů je možné, že úmrtnost může narůst až na 10 miliónů životů ročně [6]. Například na infekce dolních cest dýchacích připadalo v roce 2019 více než 1,5 milionů úmrtí spojených s rezistencí, což z nich činí nejzatíženější infekční syndrom [7].

Aktivní farmaceutické látky, které se vyskytují v životním prostředí mohou mít negativní účinky na organismy, ale také mohou ovlivňovat produkci a kvalitu pěstovaných potravin nebo pitné vody [9]. Tyto aktivní farmaceutické látky mohou negativně ovlivňovat také žížaly hnojní žijící se v půdě. Negativní ovlivnění jejich funkce v půdě by mohlo mít velké následky na kvalitu půdy a s tím spojenou potravinovou produkci na kterou je v dnešní době kladen velký důraz. Jelikož žížaly tvoří základ potravního řetězce, hrozí zde riziko přenosu léčiv až do říše vyšších živočichů, kde by mohly mít negativní sekundární následky [16].



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Léčiva

Jako léčiva lze označit látky nebo směsi látek, které jsou určeny lidem či zvířatům z důvodu prevence před nemocemi, léčby nemocí, zmírnění jejich příznaků, diagnostiky a ovlivnění fyziologických funkcí [10, 35].

Účinné látky (léčivé látky) jsou látky přírodního či syntetického původu mající farmakologický účinek, imunologický účinek nebo ovlivňující metabolismus. Všechna syntetická léčiva jsou sloučeniny (nebo směsi sloučenin), které lze pojmenovat systematickými názvy dle IUPAC<sup>1</sup>. Tyto dlouhé nepřehledné názvy byly v praxi nahrazeny generickými názvy či INN<sup>2</sup>. Léčiva lze také identifikovat podle obchodních názvů, které společnosti uvádějí z důvodu chránění [10, 36].

Světová zdravotnická organizace rozděluje léčivé látky podle různých kritérií, jako je účinek na jednotlivé orgány či orgánové soustavy, farmakologické působení nebo chemická struktura, do systému tzv. anatomicko-terapeuticko-chemické klasifikace léčiv (klasifikace ATC). Klasifikace je rozdělena do 5 úrovní. Podle klasifikace se léčiva rozdělují v první úrovni do čtrnácti hlavních skupin označených velkými písmeny. Rozdělení do čtrnácti hlavních skupin zobrazuje Tabulka 1. Následuje druhá úroveň, která vyjadřuje terapeutickou skupinu, zde je označení dvoučíslím kódem. Třetí úroveň znázorňuje farmakologickou podskupinu, která je značena jedním písmenem. Čtvrtá úroveň znázorňuje chemickou podskupinu a opět je označena jedním písmenem. Poslední pátá úroveň charakterizuje konkrétní účinnou látku nebo určitou kombinaci účinných látek, je označena dvěma číslicemi [10, 38]. Například velmi běžně užívaný lék ibuprofen nalezneme pod označením M01AE01 [37].

Tabulka 1: Čtrnáct hlavních skupin anatomicko-terapeuticko-chemické klasifikace léčiv [10]

| Označení | Hlavní skupina                                          |
|----------|---------------------------------------------------------|
| A        | trávicí ústrojí                                         |
| B        | krev a krvetvorné orgány                                |
| C        | kardiovaskulární systém                                 |
| D        | dermatologika                                           |
| G        | urogenitální systém a pohlavní hormony                  |
| H        | systémové hormonální přípravky kromě pohlavních hormonů |
| J        | protiinfekční léčiva pro systémové použití              |
| L        | antineoplastika a imunomodulující léčiva                |
| M        | muskuloskeletální systém                                |
| N        | nervová soustava                                        |
| P        | antiparazitika, insekticidy, repelenty                  |
| R        | dýchací ústrojí                                         |
| S        | smyslové orgány                                         |
| V        | různé                                                   |

<sup>1</sup> International Union of Pure and Applied Chemistry

<sup>2</sup> International Non-Proprietary Name

### 2.1.1 Makrolidová antibiotika

Makrolidová antibiotika neboli makrolidy jsou přirozeně se vyskytující sloučeniny tvořené laktonovým kruhem s připojenými deoxy cukry. Některé makrolidy mají antibiotické nebo antimykotické vlastnosti a používají se ve farmaceutické antimikrobiální terapii. Mezi nejběžněji používaná makrolidová antibiotika se řadí **azithromycin**, **clarithromycin**, **erythromycin** [62], **roxithromycin** [89], spiramycin [90] a fidaxomicin [69]. Tučně zvýrazněná léčiva jsou použita v experimentální části (viz Tabulka 10).

Je to skupina léků používaných k léčbě různých bakteriálních infekcí. Azithromycin, clarithromycin a erythromycin se běžně používají k léčbě infekcí, jako je zápal plic, sinusitida, faryngitida a angína. Používají se také u nekomplikovaných kožních infekcí a zánětu středního ucha u dětských pacientů. Makrolidy se také běžně používají k léčbě sexuálně přenosných infekcí, jako jsou gonokokové a chlamydiové infekce [63–65]. Makrolidy jsou také jedním z hlavních léků používaných k léčbě atypických pneumonií, obvykle způsobených organismy jako *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* a *Chlamydia pneumoniae* [61].

Makrolidy inhibují syntézu bakteriálních proteinů. Mechanismus účinku makrolidů spočívá v jejich schopnosti vázat bakteriální ribozomální podjednotku 50S, což způsobuje zastavení syntézy bakteriálních proteinů [66]. Protizánětlivé a imunomodulační účinky makrolidů, zejména azithromycinu, se připisují interakcím s fosfolipidy a transkripčními faktory AP-1, NF-kappaB a dalšími zánětlivými cytokiny. Pozdější změny pozorované u makrofágů, které interagují s makrolidy, zahrnují inhibici buněčné funkce, buněčného transportu a regulaci exprese povrchových receptorů. Všechny tyto účinky vrcholí imunomodulačními účinky makrolidů v organismu [63]. Vlastností některých vybraných makrolidových antibiotik zobrazuje Tabulka 2.

Tabulka 2: Vlastnosti některých léčiv patřících mezi makrolidová antibiotika

| ATC     | Název          | Sumární vzorec          | $M_r$ [-] | $pK_a$ [-]     | $\log P$ [-] | Rozpustnost<br>ve vodě<br>[mg/L] | Zdroj |
|---------|----------------|-------------------------|-----------|----------------|--------------|----------------------------------|-------|
| J01FA10 | Azithromycin   | $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ | 749,0     | 8,50 a<br>8,74 | 0            | 2,370                            | [86]  |
| J01FA09 | Clarithromycin | $C_{38}H_{69}NO_{13}$   | 748,0     | 8,99           | 3,2          | 0,330                            | [87]  |
| J01FA01 | Erythromycin   | $C_{37}H_{67}NO_{13}$   | 733,9     | 8,88           | 2,7          | 4,200                            | [88]  |
| J01FA06 | Roxithromycin  | $C_{41}H_{76}NO_{15}$   | 837,0     | 9,27           | 1,7          | 0,0189                           | [89]  |
| J01FA02 | Spiramycin     | $C_{43}H_{74}NO_{14}$   | 843,1     | 7,88 a<br>9,28 | 2,1          | -                                | [90]  |

## 2.1.2 Nesteroidní protizánětlivá léčiva

Nesteroidní protizánětlivá léčiva jsou skupinou chemicky různorodých látek s podobnými terapeutickými a nežádoucími účinky. Všechny léky této skupiny působí na snížení zánětu, bolesti a horečky prostřednictvím inhibice enzymů syntézy endoperoxidů, známých jako enzymy cyklooxygenázy (COX). Oba izozymy cyklooxygenázy, COX-1 a COX-2, přeměňují kyselinu arachidonovou na její endoperoxidové metabolity, mezi něž patří prostacyklin, prostaglandiny a tromboxan. Tyto látky mají různou biologickou aktivitu, od zánětu, přes tonus hladkého svalstva až po trombózu [68].

Mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva patří fenoprofen, flurbiprofen, **ibuprofen**, indomethacin, **ketoprofen**, ketorolac, mefenamová kyselina, **meloxicam**, nabumeton, **naproxen**, oxaprozin, piroxicam, sulindac, tolmetin, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib a další [70]. Vlastnosti některých vybraných léčiv, spadajících mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva zobrazuje Tabulka 3.

Tabulka 3: Vlastnosti některých léčiv patřících mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva

| ATC     | Název                  | Sumární vzorec           | $M_r$ [-] | $\log P$ [-]   | $\log P$ [-] | Rozpustnost<br>ve vodě<br>[mg/L] | Zdroj |
|---------|------------------------|--------------------------|-----------|----------------|--------------|----------------------------------|-------|
| M01AE01 | Ibuprofen              | $C_{13}H_{18}O_2$        | 206,28    | 4,45           | 3,5          | 21,0                             | [91]  |
| M01AE03 | Ketoprofen             | $C_{16}H_{14}O_3$        | 254,28    | 3,98           | 3,1          | 51,0                             | [92]  |
| M01AG01 | Mefenamová<br>kyselina | $C_{15}H_{15}NO_2$       | 241,28    | 4,20           | 5,1          | 36,2                             | [93]  |
| M01AC06 | Meloxicam              | $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$  | 351,40    | 4,44 a<br>7,78 | 3,0          | 48,7                             | [93]  |
| M01AE02 | Naproxen               | $C_{14}H_{14}O_3$        | 230,26    | 4,15           | 3,3          | 15,9                             | [95]  |
| M01AH01 | Celecoxib              | $C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$ | 381,40    | 11,10          | 3,4          | 4,3                              | [96]  |
| M01AC01 | Piroxicam              | $C_{15}H_{13}N_3O_4S$    | 331,30    | 6,30           | 3,1          | 49,7                             | [97]  |

### 2.1.3 Beta-blokátory

Beta-blokátory se jako skupina léků používají především k léčbě kardiovaskulárních onemocnění a dalších stavů [71], konkrétně pro léčbu tachykardie, hypertenze, infarktu myokardu, městnavého srdečního selhání, srdečních arytmií, ischemické srdeční choroby, hypertyreózy, esenciálního třesu, disekce aorty, portální hypertenze, glaukomu, profylaxe migrény a dalších stavů. Používají se také k léčbě méně obvyklých stavů, jako je syndrom dlouhého QT intervalu a hypertrofická obstrukční kardiomyopatie. Beta-blokátory jsou k dispozici k podání ve třech základních formách: perorální, intravenózní a oftalmologické, přičemž způsob podání často závisí na akutnosti onemocnění, typu a chronicitě onemocnění [72].

Beta-blokátory se liší svou specifícností vůči různým receptorům, a proto vyvolané účinky závisí na typu blokování receptoru a také na příslušném orgánovém systému. Některé beta-blokátory se do určité míry vážou také na alfa receptory, což jim umožňuje vyvolat odlišný klinický výsledek při použití ve specifických podmínkách. Jakmile se beta-blokátory naváží na receptory B1 a B2, inhibují tyto účinky. Proto dochází k inhibici chronotropních a inotropních účinků na srdce a v důsledku toho se srdeční frekvence zpomaluje. Beta-blokátory také snižují krevní tlak prostřednictvím několika mechanismů, včetně snížení reninu a snížení srdečního výdeje. Negativní chronotropní a inotropní účinky vedou ke snížení potřeby kyslíku, a tak se po užívání betablokátorů zlepšuje angina pectoris. Tyto léky také prodlužují refrakterní periody síní a mají silný antiarytmický účinek [73, 74].

Mezi používané beta-blokátory se řadí **acebutolol hydrochlorid**, atenolol, betaxolol hydrochloride, bisoprolol fumarate, carteolol hydrochlorid, esmolol hydrochlorid, metoprolol, penbutolol sulfát, **nadolol**, nebivolol, pindolol, propranolol, timolol maleát, sotolol hydrochlorid [75]. Vlastnosti vybraných léčiv patřících mezi beta-blokátory zobrazuje Tabulka 4.

Tabulka 4: Vlastnosti některých léčiv patřících mezi beta-blokátory

| ATC     | Název       | Sumární vzorec       | $M_r$ [-] | $pK_a$ [-]     | $\log P$ [-] | Rozpustnost ve vodě [mg/L] | Zdroj |
|---------|-------------|----------------------|-----------|----------------|--------------|----------------------------|-------|
| C07AB04 | Acebutolol  | $C_{18}H_{28}N_2O_4$ | 336,43    | 9,52 a<br>9,67 | 1,7          | 259,0                      | [98]  |
| C07AB03 | Atenolol    | $C_{14}H_{22}N_2O_3$ | 266,34    | 9,58           | 0,2          | 40,0                       | [99]  |
| C07AB07 | Bisoprolol  | $C_{18}H_{31}NO_4$   | 325,4     | 9,50           | 1,9          | 2240,0                     | [100] |
| C07AB02 | Metoprolol  | $C_{15}H_{25}NO_3$   | 267,36    | 9,56           | 1,9          | > 1000,0                   | [101] |
| C07AA12 | Nadolol     | $C_{17}H_{27}NO_4$   | 309,4     | 9,69           | 0,7          | 46,4                       | [102] |
| C07AA03 | Pindolol    | $C_{14}H_{20}N_2O_2$ | 248,32    | 9,25           | 1,8          | 37,2                       | [103] |
| C07AA05 | Propranolol | $C_{16}H_{21}NO_2$   | 259,34    | 9,45           | 3,0          | 61,7                       | [104] |

#### 2.1.4 Chinolony a fluorochinolony

Chinolony lze použít k léčbě široké škály bakteriálních infekcí [76]. Tyto látky působí prostřednictvím inhibice DNA gyrázy, čímž narušují supercoiling bakteriálního chromozomálního materiálu. V důsledku toho jsou tyto látky rychle baktericidní především vůči gramnegativním bakteriím, mykoplazmě a některým grampozitivním bakteriím [131]. Jejich klinická využitelnost je omezená, zejména v ambulantním prostředí, kvůli jejich potenciálu závažných nežádoucích účinků. Pokud jsou k dispozici jiná antibiotika s menším potenciálem závažných nežádoucích účinků, nejsou úřadem FAD<sup>3</sup> doporučovány jako léky první volby [76].

Používají se na léčbu infekcí močových cest, pyelonefritidy, sexuálně přenosných infekcí, prostatitidy, gastrointestinálních a intraabdominálních infekcí, infekcí kůže a měkkých tkání, komunitní a nozokomiální pneumonie a infekcí kostí a kloubů. Kromě toho se chinolony, jako je moxifloxacin, gatifloxacin a levofloxacin, stále častěji používají mimo předpis při léčbě tuberkulózy rezistentní na léky nebo v případech nesnášenlivosti jiných antituberkulotik [76].

Ve veterinární medicíně jsou fluorochinolony schváleny pro nemoci, jako jsou infekce močových cest a infekce měkkých tkání u psů a koček a také kolibacilózy u drůbeže. O schválení pro respirační onemocnění skotu ve Spojených státech se usiluje. Mezi další nemoci, pro které byly fluorochinolony použity ve veterinární medicíně, patří hluboké infekce, prostatitida a další bakteriální infekce rezistentní na standardní antimikrobiální léčbu [131].

V současné době existují čtyři generace chinolonů. Mezi chinolony, které jsou v současné době schváleny FDA pro systémové použití, patří **moxifloxacin**, **ciprofloxacin**, gemifloxacin, levofloxacin, delafloxacin a **ofloxacin** [76]. Další potom mohou být **enrofloxacin** [106], **norfloxacin** [108], a **pefloxacin** [110]. Mezi jednotlivými chinolony existuje několik zásadních rozdílů ve spektru účinku [76]. Vlastnosti vybraných léčiv spadajících mezi chinolony a fluorochinolony zobrazuje Tabulka 5.

Tabulka 5: Vlastnosti některých léčiv patřících mezi chinolony a fluorochinolony

| ATC     | Název         | Sumární vzorec        | $M_r$ [-] | $pK_a$ [-]     | $\log P$ [-] | Rozpustnost<br>ve vodě<br>[mg/L] | Zdroj |
|---------|---------------|-----------------------|-----------|----------------|--------------|----------------------------------|-------|
| J01MA02 | Ciprofloxacin | $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ | 331,34    | 6,09 a<br>8,74 | -1,1         | <1mg/mL                          | [105] |
| J01MA06 | Enrofloxacin  | $C_{19}H_{22}FN_3O_3$ | 359,40    | -              | -0,2         | 53,9                             | [106] |
| J01MA14 | Moxifloxacin  | $C_{21}H_{24}FN_3O_4$ | 401,40    | 6,30 a<br>9,14 | 0,6          | 1 146,0                          | [107] |
| J01MA06 | Norfloxacin   | $C_{16}H_{18}FN_3O_3$ | 319,33    | 6,05 a<br>8,80 | -1,0         | 25 0000,0                        | [108] |
| J01MA01 | Ofloxacin     | $C_{18}H_{20}FN_3O_4$ | 361,40    | 5,97 a<br>9,28 | -0,4         | 28 300,0                         | [109] |
| J01MA03 | Pefloxacin    | $C_{17}H_{20}FN_3O_3$ | 333,36    |                | 0,3          | 11 400,0                         | [110] |

<sup>3</sup> Food and Drug Administration

### 2.1.5 Sulfonamidy

Sulfonamidy patří do významné skupiny syntetických antimikrobiálních léčiv, která se farmakologicky využívají jako širokospektrá léčba bakteriálních infekcí u lidí i zvířat [77]. Jsou to organické sirné sloučeniny obsahující skupinu  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$  nebo  $-\text{SO}_2\text{NH}-$  a jsou charakteristické existencí sulfanilamidové skupiny a výrazných 6-ti nebo 5-ti členných heterocyklických kruhů. Nejsou snadno biologicky odbouratelné a mají potenciál způsobovat různé nepříznivé vedlejší účinky včetně onemocnění trávicího a dýchacího traktu [78]. Mezi dosud vyvinutá sulfonamidová léčiva patří **sulfamethazin**, **sulfadiazin**, **sulfamethoxazol**, **sulfasalazin**, **sulfisoxazol**, **sulfamerazin**, **sulfadimethoxin**, **sulfafurazol** a **sulfanilamid** [79], **sulfacetamid** [111], **sulfamethoxy-pyridazine** [112], **sulfapyridin** [118], **sulfathiazol** [119], a částečně také **trimethoprim**, který svoji strukturou nespadá mezi sulfonamidy, ale velmi často se používá v kombinaci se sulfamethoxazolem [121].

Sulfamethazin a sulfadiazin patří mezi deriváty skupiny sulfonamidových antibiotik, které obsahují aromatickou aminovou skupinu. běžně se používají ve veterinární medicíně jako antibakteriální sloučeniny k léčbě onemocnění hospodářských zvířat, jako jsou infekce gastrointestinálního a respiračního traktu [80]. Sulfomethazin se používá v krmivech nebo krmných přísadách na podporu růstu zvířat [81] a naopak sulfadiazin se používá především na léčbu infekce způsobené popáleninami [82] a v kombinaci s antimalarikem pyrimetaminem k léčbě toxoplazmózy u savců [83]. Konkrétní vlastnosti molekul spadajících mezi sulfonamidy zobrazuje Tabulka 6.

Tabulka 6: Vlastnosti některých léčiv patřících mezi sulfonamidy

| ATC     | Název                       | Sumární vzorec                                           | $M_r$ [-] | $pK_a$ [-]     | $\log P$ [-] | Rozpustnost<br>ve vodě<br>[mg/L] | Zdroj |
|---------|-----------------------------|----------------------------------------------------------|-----------|----------------|--------------|----------------------------------|-------|
| S01AB04 | Sulfacetamid                | $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$    | 214,24    | -              | -1,0         | 32,1                             | [111] |
| J01ED05 | Sulfamethoxy-<br>pyridazine | $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$ | 280,31    | -              | 0,3          | -                                | [112] |
| J01EC02 | Sulfadiazin                 | $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ | 250,28    | 6,36           | -0,1         | 77,0                             | [113] |
| J01ED02 | Sulfadimethoxine            | $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ | 310,33    | -              | 1,6          | 343,0                            | [114] |
| J01ED07 | Sulfamerazin                | $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ | 264,31    | -              | 0,1          | 202,0                            | [115] |
| J01EB03 | Sulfamethazin               | $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ | 278,33    | 2,65 a<br>7,65 | 0,3          | 1 500,0                          | [116] |
| J01EC01 | Sulfamethoxazol             | $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ | 253,28    | 1,60 a<br>5,70 | 0,9          | 610,0                            | [117] |
| J01EB04 | Sulfapyridin                | $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ | 249,29    | 8,43           | 0,0          | 33,1                             | [118] |
| J01EB07 | Sulfathiazol                | $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$     | 255,30    | 2,20 a<br>7,24 | 0,1          | 373,0                            | [119] |
| J01EC02 | Sulfadiazin                 | $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$ | 250,28    | 6,36           | -0,1         | 77,0                             | [120] |
| J01EA01 | Trimethoprim                | $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3$         | 290,2     | 7,12           | 0,9          | 400,0                            | [121] |

## 2.1.6 Tetracykliny

Tetracykliny jsou antibiotika, která mají široké využití v humánní i veterinární medicíně. Jsou skupinou antibiotik, která inhibují syntézu bílkovin tím, že brání připojení aminoacyl-tRNA k ribozomálnímu akceptorovému místu. Tetracykliny jsou širokospektrální látky, které vykazují aktivitu proti širokému spektru gram pozitivních a gram negativních bakterií, atypickým organismům, jako jsou chlamydie, mykoplazmata a rickettsie, a protozoárním parazitům. Příznivé antimikrobiální vlastnosti těchto látek a nepřítomnost závažných nežádoucích vedlejších účinků vedly k jejich rozsáhlému používání při léčbě infekcí u lidí i zvířat. Kromě toho se v některých zemích, včetně Spojených států, tetracykliny přidávají v subterapeutických dávkách do krmiv pro zvířata, aby působily jako stimulatory růstu. Přestože si tetracykliny zachovávají důležitou roli v humánní i veterinární medicíně, vznik antimikrobiální rezistence omezil jejich účinnost [84, 85].

Mezi používaná tetracyklinová léčiva se řadí **chlortetracycline, oxytetracyclin tetracyclin, demethylchlortetracyclin, rolitetracyclin, limecyclin, clomocyclin, methacyclin, doxycyclin, minocyclin, tertiary-butylglycylamidominocyclin** [84]. Vlastnosti některých vybraných tetracyklinů zobrazuje Tabulka 7.

Tabulka 7: Vlastnosti některých léčiv patřících mezi tetracykliny

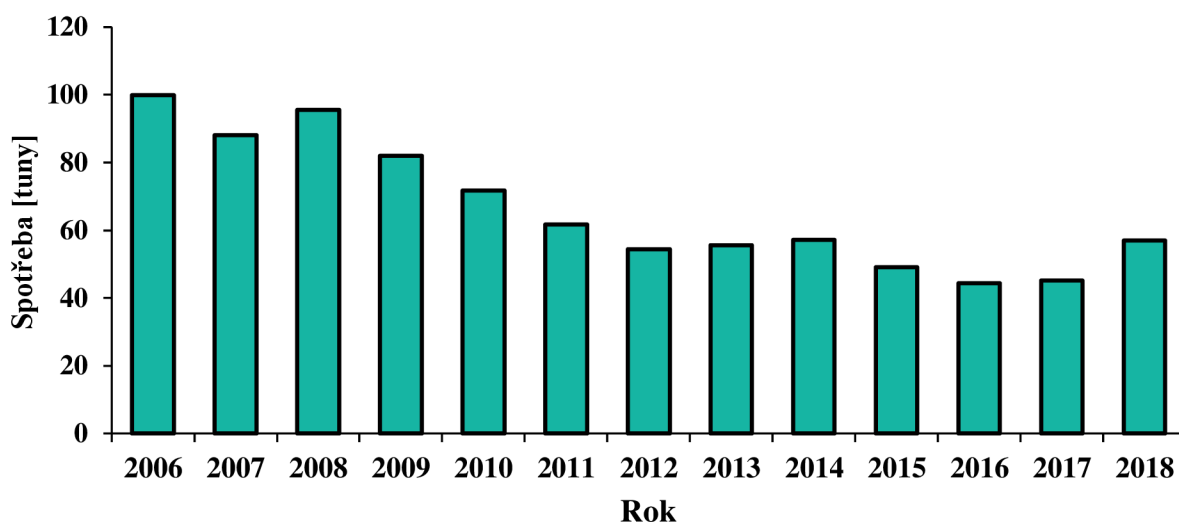
| ATC     | Název            | Sumární vzorec         | $M_r$ [-] | $pK_a$ [-]                   | $\log P$ [-] | Rozpustnost<br>ve vodě<br>[mg/L] | Zdroj |
|---------|------------------|------------------------|-----------|------------------------------|--------------|----------------------------------|-------|
| J01AA02 | Doxycyklin       | $C_{22}H_{24}N_2O_8$   | 444,4     | 3,09                         | -0,70        | 50                               | [122] |
| J01AA03 | Chlortetracyklin | $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$ | 478,9     | 7,435                        | -0,62        | -                                | [123] |
| J01AA08 | Minocyklin       | $C_{23}H_{27}N_3O_7$   | 457,5     | 2,80 a 5,00 a<br>7,80 a 9,30 | -0,60        | 52 000                           | [124] |
| J01AA06 | Oxytetracyklin   | $C_{22}H_{24}N_2O_9$   | 460,4     | 3,27 a 9,50                  | -1,60        | 47                               | [125] |
| J01AA07 | Tetracyklin      | $C_{22}H_{24}N_2O_8$   | 444,4     | 3,30 a 7,68                  | -20          | 231                              | [126] |

### 2.1.7 Spotřeba veterinárních antimikrobik v Evropě

Produkce antibiotik stále roste a jejich celková roční spotřeba dosáhla celosvětově 100 000 až 200 000 tun. Mezi roky 2000 a 2015 se spotřeba antibiotik v 76 zemích světa, vyjádřená v definovaných denních dávkách (DDD), zvýšila o 65 % a v roce 2015 dosáhla 42 miliard DDD. Předpokládá se, že v roce 2030 bude celosvětová spotřeba antibiotik o 200 % vyšší než v roce 2015, přičemž největší nárůst bude pocházet ze zemí s nízkými a středními příjmy. Nejvíce předepisovanými třídami antibiotik v USA a EU jsou peniciliny, makrolidy, cefalosporiny a fluorochinolony [11]. Evropská léková agentura uvedla, že v roce 2021 bylo ve 31 zemí Evropy (Belgie, Bulharsko, Česká republika, Dánsko, Estonsko, Finsko, Francie, Chorvatsko, Irsko, Island, Itálie, Kypr, Litva, Lotyšsko, Lucembursko, Maďarsko, Malta, Německo, Nizozemsko, Norsko, Polsko, Portugalsko, Rakousko, Rumunsko, Řecko, Slovensko, Slovinsko, Španělsko, Švédsko, Švýcarsko, Velká Británie) prodáno 5 219,5 tun antibiotik používaných ve veterinární medicíně. Tyto antibiotika byla použita u zvířat chovaných za účelem produkce potravin [44].

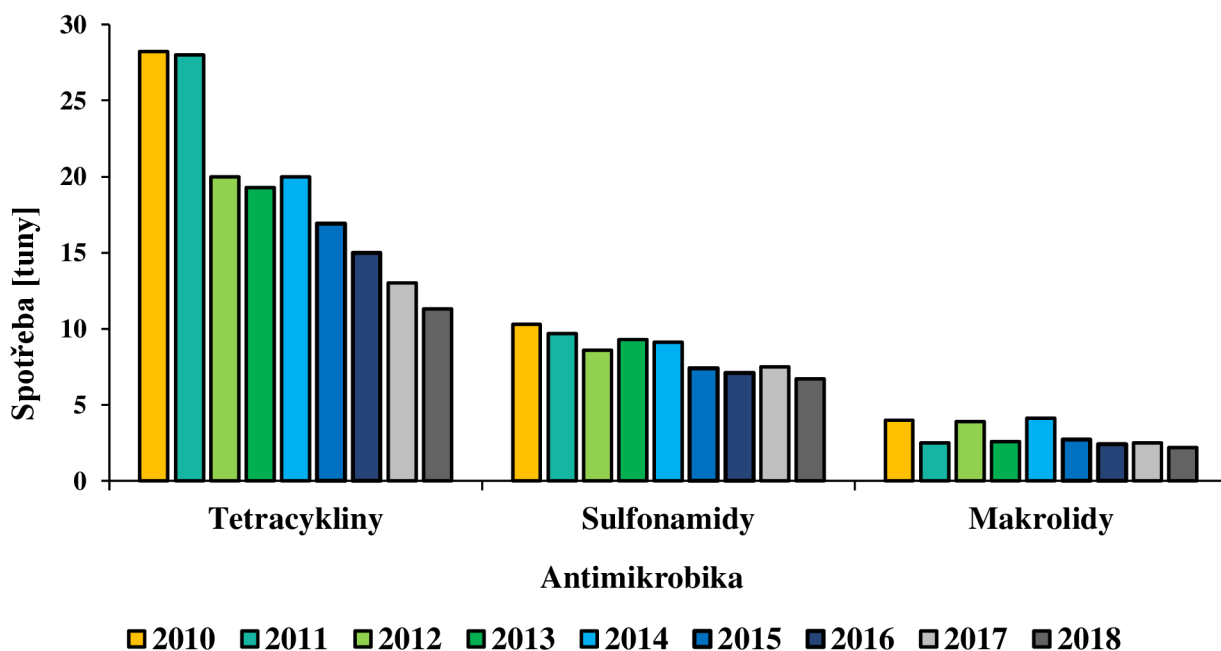
### 2.1.8 Spotřeba antimikrobik u hospodářských zvířat v České republice

S ohledem na shromážděná data Ústavem pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv celková spotřeba antimikrobik z let 2006–2018 nese znaky poklesu. Detailní data týkající se celkové spotřeby všech použitých antimikrobiálních léčiv u hospodářských zvířat jsou uvedena v grafu (Obrázek 1). Obrázek 2 zobrazuje celkovou spotřebu 3 konkrétních skupin antimikrobik od roku 2010 do roku 2018. Z grafu (Obrázek 2) lze vyčíst, že nejvíce se v minulosti využívaly tetracykliny, s nárůstem let však jejich spotřeba značně klesá. U sulfonamidů se také spotřeba začala mírně snižovat, zatímco u makrolidových léčiv se spotřeba v čase výrazně nemění [43].



Obrázek 1: Graf celkové spotřeby veterinárních antimikrobik v ČR v letech 2006–2018 [43]





Obrázek 2: Graf spotřeby vybraných antibiotik v ČR v letech 2010-2018 [43]

## 2.2 Léčiva v životním prostředí

Spotřeba léčiv se již několik desetiletí zvyšuje, což je dáno rostoucí potřebou léků u lidí na léčbu chronických onemocnění a onemocnění souvisejících s věkem a změnami v klinické praxi [3]. Také antibiotika jsou široce předepisována k léčbě infekčních onemocnění. Kromě toho se používají u hospodářských zvířat ke zvýšení produkce masa tak, že zabraňují infekcím nebo propuknutí nemocí a podporují růst. V Evropě je zakázáno používat antibiotika jako stimulatory růstu od roku 2006 [148], ale není tomu tak v některých rozvojových zemích světa.

S nárůstem spotřeby humánních a veterinárních léčiv roste také jejich uvolňování a distribuce do životního prostředí. Léčiva se do životního prostředí dostávají mnoha způsoby jako je únik léčiv během výrobních procesů nebo likvidace nepoužitých a prošlých přípravků [1, 2]. A protože větší část antibiotik není schopna se v lidském nebo zvířecím organismu zcela metabolizovat, je velké procento podávaných léčiv vypuštěno do vody a půdy pomocí komunální odpadní vody, organických statkových hnojiv nebo čistírenských kalů [11]. Uvádí se, že 75–80, 50–90, resp. 60 % dávek tetracyklinů, erytromycinů a linkomycinů se vylučuje močí a výkaly [130]. Některá léčiva se mohou vylučovat taktéž v aktivní metabolizované podobě. Tyto aktivní metabolity se také mohou následně vyskytovat ve statkových hnojivech a odpadní vodě od hospodářských zvířat, v menší míře také v odpadní vodě z lidských zdrojů [1, 2]. Tyto formy odpadů jsou používány zejména jako statková hnojiva a jejich aplikace na zemědělské půdy je podporovaná Evropskou unií v zájmu cirkulární ekonomiky [11, 149].

V posledních letech se používání statkových hnojiv na zemědělskou půdu stalo opět hojně využívanou metodou. Je to velmi dobrý způsob využití odpadu a zároveň jednoduchá cesta, jak obohatit zem o velmi prospěšné živiny. Například drůbeží podestýlka obsahuje prospěšné mikro a makroživiny. Zlepšuje vlastnosti půdy jako její pH, schopnost zadržovat vodu a organické látky.

Mnoho léčiv se také dostane do přírodního ekosystému prostřednictvím upravených kalů z čistíren odpadních vod a zavlažování odpadní vodou. Opětovné využití odpadních vod snižuje odběr přírodních povrchových a podzemních vod. Díky důrazu na cirkulaci vody, výrazně

klesla spotřeba zejména pitné vody, nese to s sebou ovšem i jistá rizika. Využití odpadní vody může mít negativní dopady zejména v rozvojových zemích, kde se na zavlažování často využívají špatně čištěné nebo nečištěné odpadní vody. S odpadní vodou, kterou jsou zavlažována pole především v suchých oblastech Země, se do půdy dostávají i kontaminanty. A například v Evropě neprochází čištěním přibližně třetina odpadních vod zachycených kanalizačními systémy. Země, které nejvíce využívají odpadní vodu k zavlažování jsou například Čína, Egypt, Indie, Mexiko, Pákistán nebo Jižní Afrika. Odhad z roku 2001 ukazuje, že se celosvětově zavlažuje 20 milionů ha půdy neřaděnou nebo částečně řaděnou odpadní vodou. Kvůli komplikacím s definicí a nedostatkem údajů je ovšem obtížné dospět k přesným údajům o celosvětovém opětovném využití odpadních vod pro zavlažování. Díky tomu všemu představuje jistou hrozbu degradace zemědělské půdy a kontaminace vodonosných vrstev a podzemních vod [4].

### **2.2.1 Následek výskytu léčiv v životním prostředí**

Množství léčiv a bioaktivních metabolitů uvolňujících se do životního prostředí je momentálně pravděpodobně nízké. Ovšem stálým uvolňováním může docházet k akumulaci a výskytu dlouhodobě vysoké koncentrace těchto látek, což může mít negativní vliv na vodní i suchozemské organismy. Následky se mohou dlouhodobě akumulovat a může docházet k nejspolitelným pomalým změnám, které se následně stanou nevratnými [2]. Již bylo prokázáno, že aktivní farmaceutické látky představují nejen riziko pro vodní organismy prostřednictvím různých specifických a nespecifických účinků, ale také ovlivňují kvalitu potravinářských plodin a pitné vody prostřednictvím zavlažování, respektive doplňování podzemních vod [9].

#### ***Antimikrobiální rezistence bakterií***

Nejvíce diskutovaná v dnešní době je rozšiřující se rezistence bakterií vůči antimikrobiálním látkám [2]. Antimikrobiální rezistence bakterií je definovaná jako schopnost bakterií bránit se působení jednoho nebo více antibiotik [14]. Tato rezistence je následkem hojného používání antibiotik v chovu zvířat a ryb, respektive přidáváním statkových hnojiv z těchto chovů na pole a také z novu používání čistírenských kalů [2]. Antibiotika se stávají stále méně účinná, což vede k obtížnější léčbě infekcí nebo dokonce k úmrtím. Je tak zapotřebí stále vyvíjet nové formy antibiotik, což přináší další problém, jelikož v dnešní době se tomu tak neděje. Firmy opustily od vývoje nových antibiotik zejména z ekonomických důvodů. Pokud však lidé nezmění přístup k nynějšímu používání antibiotik, je pravděpodobné, že i nově vyvinutá antibiotika stihne v budoucnosti stejný osud a stanou se neúčinná [8, 13].

Na následky antimikrobiální rezistence zemře ročně nespočet lidí. S tím, jak se snižuje účinnost antibiotik, která máme k dispozici, se zvyšuje riziko mnoha léčebných postupů, které jsou na antibiotikách závislé. To bude postupně podkopávat životaschopnost zákroků, které si mnozí s antibiotiky možná přímo nespojují. Chemoterapie rakoviny nebo transplantace orgánů jsou jen dva příklady lékařských zákroků, při nichž je pacient velmi zranitelný vůči bakteriální infekcím [5]. Bylo odhadnuto, že v roce 2014 na kmeny běžných bakteriálních infekcí, HIV, tuberkulózu a malárii odolné vůči lékům zemřelo celkem asi 700 000 lidí. Toto číslo je pravděpodobně podhodnocené vzhledem k nedostatečnému hlášení a dohledu. Téměř 200 000 lidí ročně zemřelo jen na multirezistentní a extrémně rezistentní tuberkulózu. Na základě předchozích scénářů nárůstů rezistence vůči lékům u 6 patogenů se odhaduje, že bez příjmu opatření může úmrtnost narůst až na 10 milionů životů ročně [6]. Další studie odhaduje to, že v roce 2019 došlo k 4,95 milionům úmrtí spojených s antimikrobiální rezistencí. Na regionální úrovni se odhaduje, že míra úmrtí ve všech věkových kategoriích přičitatelná rezistenci je nejvyšší v západní subsaharské Africe, a to 27,3 úmrtí na 100 000 obyvatel a nejnižší v Australasii, konkrétně 6,5 úmrtí na 100 000 obyvatel. Na infekce dolních cest dýchacích připadalo v roce 2019 více než 1,5 milionů úmrtí spojených s rezistencí, což z nich činí nejzatíženější infekční syndrom [7].

## 2.3 Žížaly

### 2.3.1 Charakteristika žížal

Žížaly, jako je žížala obecná (*Lumbricus terrestris*) nebo žížala hnojní (*Eisenia fetida*), jsou řazeny do řádu máloštetinatců. Vyskytují se po celém světě, výjimku tvoří místa s extrémními podmínkami jako pouště nebo trvale zmrzlé oblasti. Žijí jak v přirozených lesích, tak na pastvinách či agroekosystémech [134].

Jsou to dvoustraně symetrické velmi členěné organismy se stejně vnitřně rozdělenými segmenty. Nemají kostru, jejich kutikula je slabě zbarvená se štětinami na všech segmentech kromě prvních dvou. Mají vnější vrstvu kruhových svalů, vnitřní vrstva je složená z podélných svalů. Žížaly jsou hermafrodité. V době zralosti produkují kokony, do kterých se ukládají vajíčka, po jejichž oplození se uvnitř vajíček vyvíjejí mláďata bez larválního stádia. Nově vylíhlí jedinci se podobají dospělým žížalám. Žížaly mají rozsáhlou coelomovou dutinu obsahující coelo-mycety, uzavřený cévní systém s hřbetními a břišními cévami. Trávení zajišťuje trávicí trubice, která prochází celým tělem a je zakončena řitním otvorem. Vylučování škodlivých látek zajišťují také metanefridie. Dýchání probíhá přes celou pokožku těla [133].

### 2.3.2 Role žížal v půdním ekosystému

Obecně jsou žížaly jedním z klíčových organismů žijících v půdě. Jsou nejvíce se vyskytujícím organismem z bezobratlých živočichů v půdní biomase. Vyskytují se téměř ve všech půdách [24].

Dvě nejdůležitější činnosti žížal, které ovlivňují půdní vlastnosti jsou:

- Požití půdy, kdy dochází k částečnému rozložení organické hmoty, důkladnému promíchání a následné vyvržení v povrchových nebo podpovrchových částech půdy, přitom recyklací živin pomáhají vytvářet úrodné prostředí [24, 133].
- Prohrabávání půdy za účelem přemístění podpovrchových částí půdy s nižším obsahem humusu do povrchové vrstvy.

Díky těmto procesům je zajištěno důkladné promíchání půdy, vytvoření agregátů stálých ve vodním prostředí, zvýšení makroporéznosti půdy, provzdušnění půdy a zlepšení schopnosti půdy zadržovat vodu [133]. Vzhledem k jejich citlivosti na znečišťující látky se žížaly, jako například *Lumbricus terrestris*, využívají k bioindikaci kontaminantů v životním prostředí [24]. Žížaly jsou také základem potravinového řetězce, kde představují potravu pro ptáky, některé malé savce, kterými jsou například ježci, jezevci a krtci [1].

### 2.3.3 Žížaly a půdní kontaminanty

Žížaly představují živočichy, které jsou v kontaktu s horním povrchem půdy. Vzhledem k vysoké aktivitě žížal v půdním ekosystému, schopnosti bioakumulovat perzistentní sloučeniny a snadnému odebrání vzorků jsou dobrým organismem pro měření organických kontaminantů v půdě. Vzhledem k velkému frakčnímu objemu tkáně mají žížaly vysokou kapacitu na ukládání kontaminantů. K absorpci sloučenin rozpustných ve vodě dochází prostřednictvím difúze přes jejich pokožku. Biologická dostupnost polutantů rozpustných ve vodě se odlišuje v závislosti na hodnotě pH, obsahu organické hmoty a jílu [15].

Žížaly mohou být použity jako referenční vzorek pro měření akumulace a účinku látek vyskytujících se v půdě. Využití žížaly jako náhradního testovacího druhu může být aplikováno zejména pokud nelze měřit potřebné parametry vzhledem k etickým důvodům (např. u člověka) nebo z ekologických důvodů (např. při velkém množství druhů, které by bylo třeba testovat). Vzhledem k vnitrodruhovým a mezidruhovým rozdílům musí být výsledné změřené parametry extrapolovány na konkrétní druh. Žížaly mohou být využity zejména za účelem ochrany rostlin nebo půdních bezobratlých [22].

Příjem a kumulace kontaminantů představuje riziko pro samotné žížaly a také hrozí přenosu kontaminantů přes potravní řetězec až k vrcholným predátorům, jako jsou ptáci. Výskyt léčiv v žížalách může být nebezpečný i pro malé savce, u kterých jsou žížaly nedílnou součástí potravy. Díky tomuto přenosu přes potravní řetězec se zde vyskytuje riziko sekundární otravy vyšších živočichů [16].

## 2.4 Analýza léčiv

S čím dál větším výskytem léčiv v životním prostředí, se začal brát ohled na výši jejich koncentrace v různých matricích, například Evropská komise a Úřad pro kontrolu potravin a léčiv vydali normy pro maximální limity látek pro veterinární účely v potravinách [34]. Tyto maximální hodnoty jsou vztaženy na jednotlivé orgány zvířat a jejich průměrná hodnota se pohybuje ve stovkách  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [42]. S ohledem na tyto normy je potřeba vyvinout spolehlivé, citlivé analytické metody pro stanovení reziduí léčiv v různých matricích pro posouzení environmentálního i zdravotního rizika [31].

Bylo vyvinuto několik analytických metod pro extrakci, izolaci, zakoncentrování a čištění. Konkrétně byly vyvinuty metody jako je extrakce kapalina-kapalina, extrakce na pevné fázi (SPE), mikroextrakce na pevné fázi, extrakce pomocí mikrovln nebo extrakce tlakovou kapalinou [48]. Tyto techniky však mohou v některých případech vyžadovat specifickou manipulaci nebo ošetření. Velmi využívanou metodou pro zakoncentrování a přečištění je SPE. Z této techniky byla také vyvinuta metoda disperzní extrakce na pevné fázi (dSPE), kde se sorbent přidává přímo do extraktu obsahující analyt a je disperzně zprostředkován kontakt sorbentu s analytem. Po dispergaci je sorbent od analytu oddělen mechanicky za pomoci odstředění nebo filtrace. Dnes je tato disperzní extrakce na pevné fázi známa jako QuEChERS. Velikou výhodou při dSPE je krátká doba provedení a tím možnost analýzy více vzorků za kratší čas. Oproti ostatním technikám je vhodnou i větší přizpůsobivost a snadná manipulace. Od vynalezení byla technika využita již při extrakci, izolaci a čištění několika sloučenin ve složitých matricích, a to zejména veterinárních léčiv přítomných v živočišných tkáních, potravinách, mléčných produktech nebo vodě [31]. Co se týče například půdy, s ohledem na její složitost byla také využita metoda QuEChERS [15].

Při stanovení například veterinárních léčiv byla metoda dSPE použita s mnoha instrumentálními technikami. Při stanovení reziduí léčiv v potravinách byla využita kapilární elektroforéza spojená s DAD (diode array detector), UV detekcí nebo hmotnostní spektrometrií; kapalinová chromatografie spojená s UV, fluorescenční nebo DAD detekcí či hmotnostní spektrometrií [31].

Při použití fluorescenčního detektoru je nevýhodou dlouhá příprava derivátů léčiv s ionty dvojmocných kovů, které by vykazovaly fluorescenci, proto tato metody nenalezla moc velké uplatnění v laboratorní praxi [67]. Optické detektory jako je UV/VIS DAD detektor a fluorescenční detektor mají menší citlivost, než v případě použití hmotnostního spektrometru. Hmotnostní spektrometr nese výhody zejména díky rychlosti analýzy, její selektivity a citlivosti, která je potřebná vzhledem ke složitosti různých environmentálních a biologických matric [40, 41].

## 2.5 Metoda QuEChERS

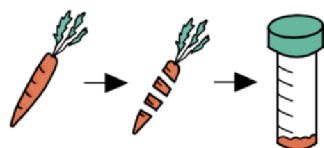
S ohledem na to, jak hojně je využívána analýza pesticidů v laboratořích jak státní, tak soukromé sféry po celém světě, a také na nové právní předpisy, celkový pokrok v oblasti zemědělství a vývoje nových technologií, bylo potřeba zlepšit celkovou kvalitu a efektivitu přípravy vzorků. Nejeфекtivnějším přístupem byly vždy metody, kterými bylo možné připravit vzorek, ze kterého je možné analyzovat více tříd a celkově více reziduí. Důraz začal být také kladen na velikost vzorku. Při nadměrně velkých vzorcích rostou objemy spotřebovaných rozpouštědel a velikost použitého nádobí, to vše následně vede k větší produkci odpadu, potřebě větších skladovacích a pracovních prostor, rozsáhlejší bezpečnostním problémům, časově a manuálně náročnější práci a větším nákladům, než je nutné. Postupem času se vyvíjely různé typy metod a extrakční postupy a tím vědci vyvinuli v té době novou metodu zvanou QuEChERS. QuEChERS jako nová metodika přípravy vzorků pro vícesložkovou analýzu pesticidů, byla vyvinuta v letech 2000-2002 a poprvé uvedena v roce 2003 [44].

Metoda QuEChERS neboli rychlá, jednoduchá, levná, účinná, robustní a bezpečná metoda, jejíž zkratka pochází z anglického překladu **Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective, **R**ugged and **S**afe. Metoda, původně popsána jako jednofázová extrakční technika kapalina-kapalina, se primárně využívá k extrakci nepolárních a polopolárních organických látek, konkrétně k vyextrahování pesticidů, polycyklických aromatických uhlovodíků, některých polychlorovaných bifenylyů a léčiv z půdního ekosystému, zpracovaných potravin, ovoce nebo zeleniny. Další použití zobrazuje Tabulka 9. Tato metoda se začala používat za účelem zlepšení výtěžnosti a snížení nákladů potřebných pro její provedení. Jeden člověk může touto metodou připravit 6-12 vzorků do půl hodiny. Další výhodou je schopnost extrahovat širší škálu sloučenin. Je velmi využívána jako metoda přípravy vzorku před GC/MS (plynová chromatografie s hmotnostní detekcí) nebo LC/MS (kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí) [48, 50, 127, 146].

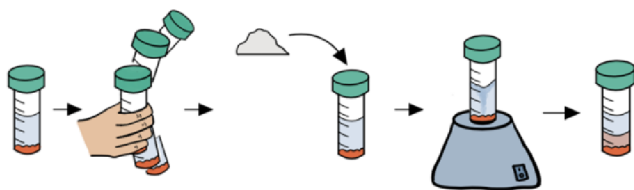
Metoda se skládá ze dvou hlavních fází, a to extrakční fáze a fáze přečištění. Celý postup metody spočívá v několika krocích, které znázorňuje Obrázek 3 [132].

U metody QuEChERS je možno nastavit mnoho parametrů, které ovlivňují samotnou výtěžnost extrakce a hledání optimálních podmínek může být v některých případech velmi náročné. Při hledání správných parametrů je potřeba dělat kompromisy, aby metoda splňovala svoji jednoduchost, časovou nenáročnost, širokou použitelnost, vysokou výtěžnost a přiměřenou selektivitu. Jednotlivé kroky mohou být ovlivněny faktory jako je [44]:

- Složení a s ním spojené vlastnosti vzorku (např. pH, zastoupení vody, lipidů, cukrů)
- Typ extrakčního rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel
- Poměr roztoku a vzorku
- Mechanismus extrakce (míchání, třepání), čas extrakce
- Teplota extrakce
- Metody rozdělení fází (přítomnost nepolárních rozpouštědel nebo přísad solí)
- Sorbenty použité k přečištění

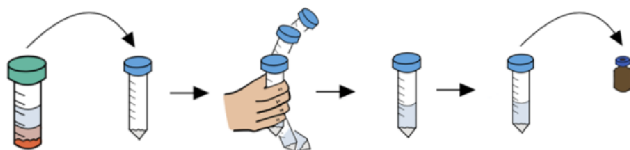


Nejprve je vzorek patřičně homogenizován, v některých případech homogenizaci předchází lyofilizace, která umožní stanovit analyzované látky na jednotku suché hmotnosti. Následně je naváženo potřebné množství do 50 mL zkumavky. Navážka se volí podle povahy vzorku, očekávaného množství analytu nebo množství rozpouštědel, které chceme na samotnou extrakci použít.



### I. EXTRAKČNÍ FÁZE

Ke vzorku jsou přidána rozpouštědla, vzorek je zamíchán pomocí vortexu nebo ručně protřepán. Následně jsou přidány separační soli, směs je opět promíchána a odstředěna.



### II. FÁZE PŘEČIŠTĚNÍ

Supernatant je přemístěn do 15 mL zkumavky s dSPE sorbenty. Směs je protřepána a následně oddělena pomocí centrifugy. Supernatant je odebrán a připraven k analýze.

Obrázek 3: Postup metody QuEChERS (převzato a přepracováno [19, 132])

### 2.5.1 Extrakční fáze

Extrakční fáze je založena především na přidání směsi rozpouštědel a mechanismu extrakce. Směs se skládá z organického málo polárního rozpouštědla a vodné části, která je tvořena především pufrům o požadovaném pH [19].

#### *Organická rozpouštědla*

Zvolení správného rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel je jedním z nejdůležitějších rozhodnutí při optimalizaci metody. Zvolené rozpouštědlo musí pokrýt požadované analytické spektrum, tedy umožnit extrakci látek nepolárních až po ty více polární. Mělo by zajišťovat dostatečnou separaci od vody. Zvolené rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel by měly být přístupné chromatografickým technikám jako je např. SPE, GC, LC, GPC. Důraz je také kladen na bezpečnostní a ekologické aspekty či aspekty manipulace (např. snadnost odpařování, přenosy objemu) [44].

Jako organická rozpouštědla je nejčastěji používán acetonitril, methanol, ethyl acetát, případně aceton. Může se také používat směs organických rozpouštědel. Rozpouštědla se volí v závislosti na matici a analytech [19]. U acetonu ovšem může dělat problém velká mísitelnost s vodou, kdy k dobré separaci fází je potřeba přidat nepolární rozpouštědlo. U ostatních rozpouštědel k dostatečné separaci fází stačí použít separačních solí, a tak se vyhnout spotřebě nadbytečného množství nepolárních rozpouštědel [44]. Pokud srovnáme acetonitril a aceton, acetonitril neextrahuje tolik lipofilních látek, jako jsou vosky, tuky a lipofilní pigmenty [46]. Acetonitril tvoří odlišné rozdělovací fáze s nepolárními rozpouštědly, jako je hexan, a to poskytuje možnost dalšího kroku přečištění, které vede k odstranění koextrahovaných lipofilních složek [47]. Z acetonitrilu oproti acetonu lze lépe odstranit zbytkovou vodu pomocí sušících činidel jako je  $MgSO_4$  [46]. Acetonitril je také velmi kompaktní s GC aplikacemi a díky své nízké viskozitě a střední polaritě je účinný při použití LC s reverzní fází či SPE aplikacích. Ethyl acetát a aceton se neprokázaly jako nejvhodnější rozpouštědla při použití LC. V případě ethyl acetátu může také docházet k hromadění kyseliny octové při dlouhodobém skladování [44].

#### *Pufry*

Pufry jsou nedílnou součástí extrakční směsi rozpouštědel, především protože umožňují extrakci pesticidů a reziduí závislých na pH. Pufry snižují polární interferenci a tím zlepšují extrakci. Velmi často se používají acetátové a citrátové pufry [17]. Použití acetátového pufru se již stalo oficiální analytickou metodou [52] a citrátový pufr hojně používaný v Evropě nese status evropské normy [60, 50].

#### *Separační soli*

Separační soli se v metodě používají zejména za účelem odstranění vody a navození dvoufázové separace mezi vodou a nepolárním rozpouštědlem. Jako separační soli se nejčastěji používají bezvodé soli jako jsou  $MgSO_4$ ,  $Na_2SO_4$  a  $NaCl$  v různých směsích a poměrech [5, 19].

## 2.5.2 Fáze přečištění

### *dSPE sorbenty*

Díky komplexitě matrice je velmi obtížné zbavit se látek, které interferují s analyty, dříve bylo potřeba více kroků a různých postupů, k tomu, aby tyto interferující látky koextrahované z matrice byly odstraněny. Jejich odstraněním se zvýšila nejenom účinnost extrakce, ale také její náklady. Za účelem snížit náklady, urychlit přípravu vzorků byla vyvinuta právě metoda disperzní extrakce na pevné fázi [19]. Název dSPE extrakce pochází z anglického překladu *dispersive solid-phase extraction* [132].

Tato metoda odstraňuje nečistoty, kterými mohou být cukry, lipidy, organické kyseliny, steroly, proteiny, pigmenty, přebytečnou vodu a další interferující látky. Právě podle typu matrice lze zvolit dPSE sorbenty, které jsou schopny podle svých specifických strukturních vlastností odstranit různé látky, které byly extrahovány s našimi analyty.

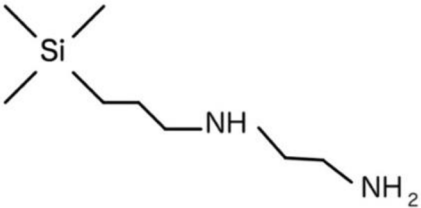
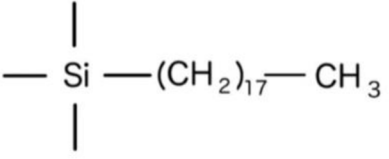
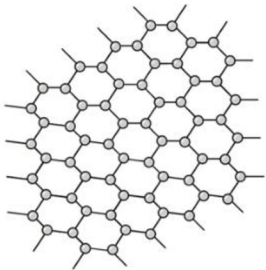
Koextrahované látky mohou zapříčinit tzv. matriční efekt, kterým ovlivňují citlivost a přesnost analýzy [53]. Konkrétně u kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií jsou účinky matrice důsledkem koeluce zbytkových složek matrice a při použití ESI jako iontového zdroje dochází k ovlivnění účinnosti ionizace cílových analytů, konkrétně k potlačení nebo zvýšení ionizace [55, 56]. Stejný analyt může dávat různé odezvy hmotnostního spektrometru v různých maticích a stejná matrice může ovlivňovat různé cílové analyty různým způsobem. A to může ovlivnit robustnost metody, přesnost a další parametry, jako je linearita, meze kvantifikace a detekce [57]. Účinnou metodou, jak kompenzovat matriční efekty je metoda standardního přídavku, kdy se přidává standard určitého analytu přímo k reálnému vzorku a následně se analyzuje. Další metoda pro snížení vlivu matričních efektů je metoda použití matriční kalibrace, kde se jako roztok pro přípravu matriční kalibrace používá extrakt z matrice nekontaminované požadovanými analyty. Dalšími způsoby kompenzace matričních efektů může být použití vnitřních standardů [39, 55]. Koextrahované látky mohou také přispívat ke znečištění samotné instrumentace dané analytické metody [53].

Některé dSPE sorbenty mohou mít částečně negativní efekt, kdy sorbenty mohou na svůj povrch sorbovat některé z cílových analytů. Například při použití sorbentu PSA (primární sekundární amin) může docházet k částečné sorpci kyselých sloučenin, protože PSA sorbent podle studií vykazuje alkalický charakter [58]. GCB sorbent (grafitizovaný uhlík) může způsobit ztrátu pesticidů s nízkou polaritou nebo planární strukturou. Množství nežádoucí sorpce cílových analytů závisí také na množství použitých sorbentů [59].

Nejvíce používané sorbenty a jejich funkce nám ukazuje Tabulka 8. Ke zmíněným sorbentům se také často přidávají bezvodé soli jako  $MgSO_4$  nebo  $Na_2SO_4$ , které slouží k odstranění zbytkové vody z organické fáze [54]. Kromě pevných sorbentů se jako způsob přečištění může používat tzv. vymrazování. Kdy je vzorek zmrazen na určitou teplotu dochází k vysrážení látek, které jsou málo rozpustné v použitém rozpouštědle. Například při použití acetonitrilu, jako extrakčního rozpouštědla, jsou pomocí vymrazování vysráženy látky jako lipidy, vosky nebo cukry [48].



Tabulka 8: dSPE sorbenty (převzato z [17–21, 23, 51, 132])

| Zkratka | Sloučenina                                                                                  | Funkce                                                                                                                                  | Typ vzorku                               | Struktura                                                                                                 |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PSA     | Polymerně vázaná ethylendiamin-N-propylová fáze, která obsahuje primární i sekundární aminy | Odstranění volných mastných kyselin, organických kyselin, kyselých koextrahovaných látek, polárních a antokyanových pigmentů nebo cukrů | Ovoce a zelenina obecně (jablka, hrušky) |                        |
| DSC-18  | polymerně vázaný oktadecyl na silikagelu                                                    | Odstranění tuků, sterolů a jiných nepolárních interferujících sloučenin                                                                 | Ovoce a zelenina obsahující tuky a vosky |                        |
| GCB     | Grafitizovaný uhlík                                                                         | Odstranění pigmentů a sterolů (např. chlorofyl, karotenoidy), nevhodné pro planární pesticidy                                           | Pigmentované ovoce a zelenina            |  <p>○ Atom uhlíku</p> |

### 2.5.3 Využití metody QuEChERS

Tabulka 9: Příklad použití metody QuEChERS

| Matrice         | Analyty                 | Množství vzorku | Extrakční rozpouštědla    | Mechanismus extrakce  | Soli                                                                                           | Sorbenty                     | Analýza          | Zdroj |
|-----------------|-------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------|-------|
| Žižaly          | Valsartan               | 0,5 g           | voda, ACN                 | Vortex, ruční třepání | MgSO <sub>4</sub> , NaCl                                                                       | patrony Oasis PRiME HLB      | LC-MS/MS         | [24]  |
| Losos           | PCB, PAH, PBDE, PCDD/Fs | 6,0 g           | voda, EA                  | Vortex, ruční třepání | Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , NaCl                                                         | SPE kolonky                  | GC-HRMS          | [25]  |
| Jeseter (játra) | PAH, PCB, PBT, PBDE     | 5,0 g           | ACN                       | Ultrazvuk, vortex     | MgSO <sub>4</sub> , NaCl                                                                       | MgSO <sub>4</sub> , PSA, C18 | GC-MS            | [26]  |
| Kal             | β-laktamy               | 0,5 g           | Roztok EDTA, ACN          | Vortex, ruční třepání | MgSO <sub>4</sub> , NaCl, dihydrát citrátu sodného, sekvihydrát hydrogencitrátu sodného        | MgSO <sub>4</sub> , PSA, C18 | LC-MS/MS         | [27]  |
| Půda            | pesticidy               | 5,0 g           | voda, ACN, 1% kys. octová | Vortex                | MgSO <sub>4</sub> , NaOAc                                                                      | MgSO <sub>4</sub> , PSA, C18 | GC-EI-Q-Orbitrap | [29]  |
| Špenát          | Pesticidy               | 10,0 g          | Voda, ACN                 | Mechanická třepačka   | MgSO <sub>4</sub> , NaCl, seskvihydrát hydrogen citrátu sodného, dihydrát citronanu trisodného | MgSO <sub>4</sub> , PSA      | LC-MS/MS         | [30]  |
| Rýže            | Pesticidy               | 5,0 g           | Voda, ACN                 | Mechanická třepačka   | MgSO <sub>4</sub> , NaCl, seskvihydrát hydrogen citrátu sodného, dihydrát citronanu trisodného | MgSO <sub>4</sub> , PSA      | LC-MS/MS         | [30]  |
| Mandarinky      | Pesticidy               | 10,0 g          | Voda, ACN                 | Mechanická třepačka   | MgSO <sub>4</sub> , NaCl, seskvihydrát hydrogen citrátu sodného, dihydrát citronanu trisodného | MgSO <sub>4</sub> , PSA      | LC-MS/MS         | [30]  |

## 2.6 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC, liquid chromatography) je metoda, která se používá k separaci a analýze látek ve vzorku, které jsou unášeny v chromatografické koloně pomocí kapalné mobilní fáze. Vzorek je unášen tokem mobilní fáze a zároveň interaguje nejen s fází stacionární, ale i s fází mobilní. Složky vzorku mohou být zpomalovány pomocí stacionární fáze na základě různých retenčních mechanismů. Vzájemné interakce mobilní fáze, stacionární fáze a složek vzorku jsou založeny na slabých mezimolekulárních interakcích jako jsou van der Waalovy síly mezi dvěma dipóly, mezi dipólem a indukovaným dipólem, vodíkové interakce nebo  $\pi - \pi$  interakce mezi aromatickými jádry [128].

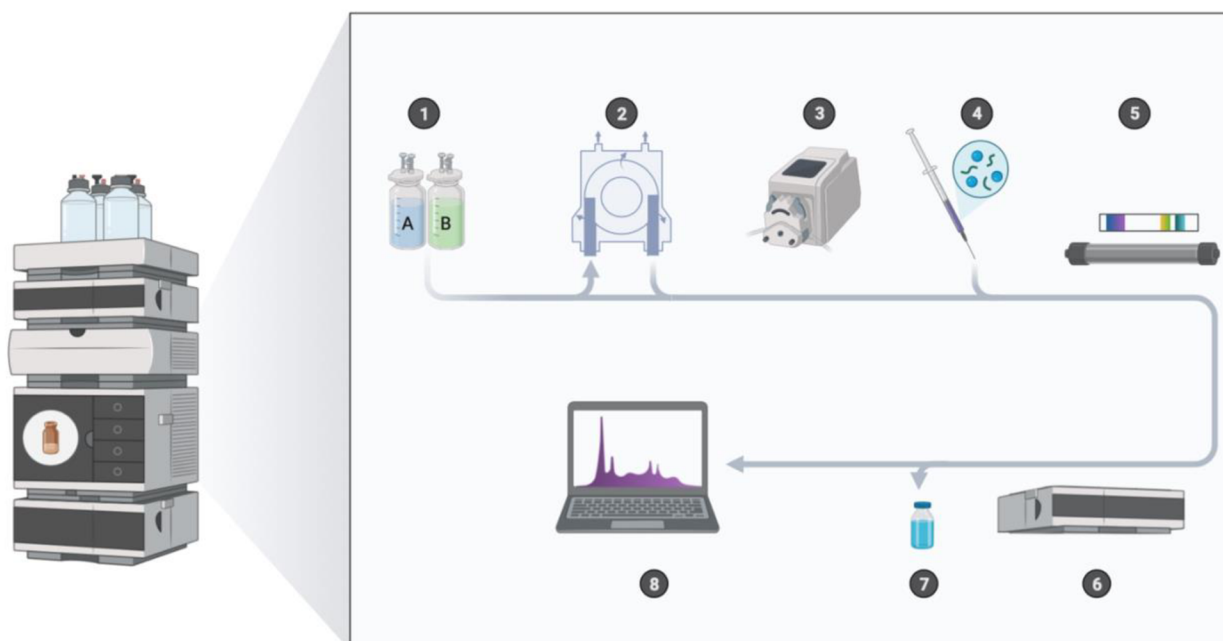
Podle umístění stacionární fáze se chromatografie rozděluje na tenkovrstvou (planární) a kolonovou. Analyzovaný vzorek je kapalina nebo roztok. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, high performance liquid chromatography) a ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC, ultra high performance liquid chromatography) jsou jedny z nejrozšířenějších metod.

### 2.6.1 Instrumentace techniky HPLC

Přístrojové zařízení techniky HPLC se skládá z 5 základních částí, kde každý zajišťuje svoji funkci.

- Transport a uchování mobilní fáze – zásobníky mobilní fáze a vysokotlaké čerpadlo
- Dávkování vzorku – automatické nebo manuální dávkovače
- Separace analytů – chromatografická kolona a termostat
- Detekce analytů – detektor
- Záznam dat s jejich vyhodnocením – počítač a software

Jednotlivé komponenty a řazení zobrazuje Obrázek 4.



Obrázek 4: Instrumentace HPLC (převzato [32])

1-zásobník mobilní fáze; 2-odplyňovač; 3-vysokotlaké čerpadlo; 4-dávkovač vzorku; 5-chromatografická kolona; 6-detektor; 7-sběrač frakcí (odpadu); 8-sběr dat [32]

Na základě různorodých potřeb pro konkrétní analýzy lze jednotlivé komponenty vyřadit, obměnit či přidat nové.

### ***Mobilní fáze***

V případě použití normální fáze v kapalinové chromatografii (NP-HPLC), která se dnes využívá poměrně v malé míře, je stacionární fáze polární a mobilní fáze je nepolární. Jako mobilní fáze se využívají nepolární nevodná rozpouštědla, jako je například n-hexan, n-heptan ve směsi s mírně polárnějším rozpouštědlem jako je isopropanol, chloroform, dichlormethan, diethyléter, tetrahydrofuran nebo ethylacetát [142].

Druhý systém uspořádání mobilní a stacionární fáze je HPLC s reverzní fází (RP-HPLC). Toto uspořádání se v dnešní době využívá mnohem více než NP-HPLC. V tomto uspořádání je mobilní fáze více polární než stacionární fáze. Eluent používaný v RP-HPLC se obvykle skládá ze směsi vody a mísitelných organických rozpouštědel, obvykle acetonitrilu, methanolu, nebo tetrahydrofuranu. Někdy se také přidávají pufrы, kyseliny nebo zásady ke zvýšení ionizace sloučenin nebo k řízení stupně ionizace volných nezreagovaných silanolových skupin, aby se snížil chvost píků a zlepšila chromatografická separace [142].

### ***Transport mobilní fáze***

Pokud se jedná o isokratickou eluci, kde se složení mobilní fáze po dobu analýzy nemění, je mobilní fáze vedena ze zásobníku do vysokotlakého čerpadla.

Naopak pokud se jedná o gradientovou eluci, kdy se v průběhu analýzy mění složení mobilní fáze a tím se zvyšuje eluční síla, jsou jednotlivé složky mobilní fáze přivedeny ze dvou zásobníků a míseny za použití dvou vysokotlakých čerpadel dle gradientového programu ve směšovači za vysokotlakým čerpadlem, smísení mobilní fáze tedy probíhá za vysokého tlaku. Takový systém se označuje jako binární pumpa. Složky mobilní fáze při gradientové eluci mohou být také smíseny ve směšovači předřazenému vysokotlakému čerpadlu a mísení fází tak probíhá za nízkého tlaku. Tento systém se označuje jako kvartérní pumpa [32, 141]. K odplynění mobilní fáze dochází v odplyňovači neboli degaseru.

Degaser slouží k odstranění rozpuštěného vzduchu v používaných rozpouštědlech. Vzduch v rozpouštědlech může způsobit kolísání průtoku, a to má za následek problémy s retenčním časem, v krajním případě může čerpadlo přestat s dodáváním mobilní fáze. Za použití detektorů jako je UV-detektor, fluorescenční detektor, detektor indexu lomu, může vzduch rozptylovat světlo procházející průtokovou kvyetou, což způsobuje šumové špičky v chromatogramu nebo signál mimo stupnici [143].

### ***Dávkování vzorku***

Mobilní fáze je dále vedena do zařízení na dávkování vzorku. Při dávkování je kladen důraz na to, aby byl kapalný vzorek vpraven v malém množství z podmínek atmosférického tlaku do vysokotlakého systému. Je zde kladen důraz na velkou správnost, přesnost a minimální rozmytí zón vzorku. Samotné nanesení ovlivňuje účinnost separace. Pokud je vzorek dávkován nevhodně, může docházet k rozmývání píků vlivem mimokolonového příspěvku dávkovacího zařízení. Faktory ovlivňující dávkování a tvar chromatografického píku jsou: Objem a koncentrace dávkovaného vzorku, rozpouštědlo vzorku, typ dávkovače, vnitřní objem chromatografického systému a parametry chromatografické kolony. V dnešní době jsou hojně využívané automatické dávkovače neboli autosamplery [32].

Obecně se doporučuje, aby objem nastříkovaného vzorku nebyl větší než 1-2 % celkového objemu kolony (při uvažované koncentraci 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Pokud máme například kolonu s průměrem

4,6 mm a délkou 50 až 250 mm, ideální vstříkovaný objem mezi 5,8 až 58  $\mu\text{L}$  nebo kolonu o průměru 3 mm a délkou 50 až 150 mm je ideální vstříkovaný objem mezi 2,5 až 14,8  $\mu\text{L}$  [145].

### **Chromatografické kolony**

Kolony se liší velikostí a materiálem a na trhu je k dispozici široká škála různých stacionárních fází. Podle nabídky výrobců si může uživatel zvolit druh sorbentu, velikost částic sorbentu nebo délku a průměr kolony [32].

Nejoblíbenější stacionární fází pro HPLC s reverzní fází je silikagel, jehož silanové skupiny jsou modifikované oktadecyly (C18), který poskytuje spolehlivou retenci široké škály hydrofobních molekul. Kolony se dodávají naplněny částicemi s různou velikostí a s různou velikostí pórů, sférických nebo nepravidelných tvarů a může být plně porézní nebo mít pevné jádro a porézní povrch, což se nazývá core-shell neboli povrchově porézní. Menší velikosti částic zlepšují rozlišení, ale způsobují vyšší tlak a mohou vést ke vzniku protitlaku, ale menší velikost pórů u povrchově porézních částic může pomoci dosáhnout vyššího rozlišení i při nižších tlacích. Menší velikost pórů také zajistí větší povrch a lepší rozlišení, ale nejsou vhodné pro větší molekuly, jako jsou proteiny. Pokud požadujete kratší retenční čas, můžete zvolit silikagel s kratším uhlíkatým řetězcem než C18, například C8, k dispozici jsou i další typy modifikovaného silikagelu, které nabízejí alternativní selektivitu pro specifické aplikace, například kyanopropylsilanově vázané a aminopropylsilanově vázané kolony, které lze použít v hydrofilní interakční chromatografii [141].

Délka, průměr a materiál kolony mají rovněž vliv na analytický proces. Použití kratších kolon zkrátí dobu analýzy, ale poskytne nižší rozlišení než delší kolony. Kolony o průměru menším než 4,6 mm poskytnou vyšší citlivost a nejlépe se kombinují s hmotnostní spektrometrií (MS), zatímco kolony větší než 4,6 mm, až stovky milimetrů, se obvykle používají pouze pro preparativní HPLC. Většina kolon je vyrobena z nerezové oceli, aby snesla vysoké tlaky, ale jiné materiály mohou být zapotřebí, pokud by chemické vlastnosti oceli narušovaly analýzu. Mezi alternativy patří sklo a polyether ether keton [141].

### **Chromatografické detektory**

Za chromatografickou kolonou následuje detektor, který má za úkol zaznamenávat rozdíly signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze s analyty. U HPLC detektoru jsou kladeny důrazy na následující vlastnosti: Vysoká citlivost, předvídatelná a univerzální odezva, selektivita, linearita, spolehlivé a snadné použití, nulový příspěvek k mikrokolonovému rozmývání elučních zón, signál nezávislý na změně průtoku, teplota a složení mobilní fáze, kvalitativní informace detekovaných píků. Ne všechny detektory splňují zmíněné požadavky, proto je potřeba vybrat vhodný detektor podle typu analýzy a analytů.

Detektory lze rozdělit na koncentrační a hmotnostní nebo destruktivní a nedestruktivní. Destruktivní detektory jsou například: CAD (*Change aerosol detector*), elektrochemický, ELSD (*Evaporative light scattering detector*), hmotnostní (MS), chemiluminiscenční, vodivostní. Mezi nedestruktivní detektory řadíme: Fluorescenční, infračervený, NMR (*Nuclear magnetic resonance*), radiometrický, refraktometrický, UV-VIS.

Z detektoru je signál převeden do počítače s příslušným chromatografickým softwarem [32, 141].

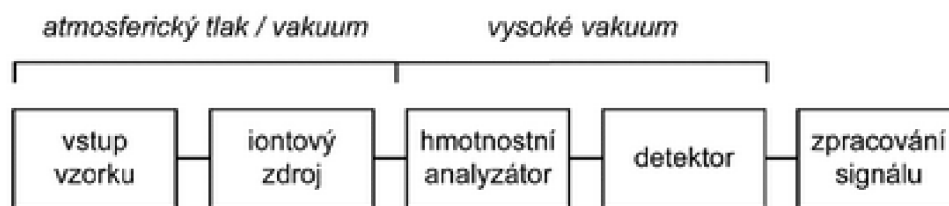
## 2.6.2 UHPLC

Technika UHPLC byla založena za účelem rychlejší chromatografické separace při stejné nebo vyšší kvalitě a zachování principů zelené chemie. Nástrojem pro získání těchto vlastností separace se stalo zmenšení částic chromatografického sorbentu až na velikost, která je menší než 2  $\mu\text{m}$ . To s sebou ovšem nese další nároky na instrumentaci, a především zvětšení tlaku v celém chromatografickém systému. U techniky UHPLC se pracuje s tlaky okolo 100 MPa a více (u HPLC je to 30-40 MPa). Díky používání takto malých částic bylo dosaženo lepší účinnosti, vyššího rozlišení a byla zkrácena doba analýzy. Díky částicím menším než 2  $\mu\text{m}$  bylo také možné zkrátit délku samotné chromatografické kolony. Na menších kolonách je tedy možno dosahovat velmi nízkých objemových průtoků, což vede k menší spotřebě rozpouštědel [32].

## 2.7 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda, jejíž základem je rozdělení iontů v plynné fázi podle jejich poměru hmotnosti a náboje  $m/z$  (efektivní hmotnosti) a následné analýze jejich množství. Sloučeniny v podobě iontů mohou být jak anorganické ionty, ionizované molekuly tak jejich fragmenty nebo asociáty.

Stanovované ionty jsou charakterizovány bezrozměrným poměrem  $m/z$ , kde  $m$  je hmotnostní číslo (nukleonové číslo) a  $z$  je nábojové číslo, které je poměrem náboje iontu a elementárního náboje. Schéma hmotnostního spektrometru ukazuje Obrázek 5 [128].



Obrázek 5: Blokové schéma hmotnostního spektrometru při spojení s kapalinovou chromatografií [128]

### 2.7.1 Iontový zdroj

V případě použití techniky LC-MS je možno využít několik typů iontových zdrojů, jako je elektrosprej (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Novější techniky používané jako iontové zdroje jsou například dopantem asistovaná fotoionizace za atmosférického tlaku (DA-APPI) nebo laserová ionizace za atmosférického tlaku (APLI) [139]. Tyto techniky umožňují snadnou fragmentaci mobilní fáze, a to i ve vysoce vodných podmínkách a při vysokých průtocích [140].

Pro analýzu léčiv se jako iontový zdroj nejčastěji používá elektrosprej většinou v pozitivním režimu, jelikož většina léčiv je slabá báze, a tudíž se snadno protonizují [139, 140].

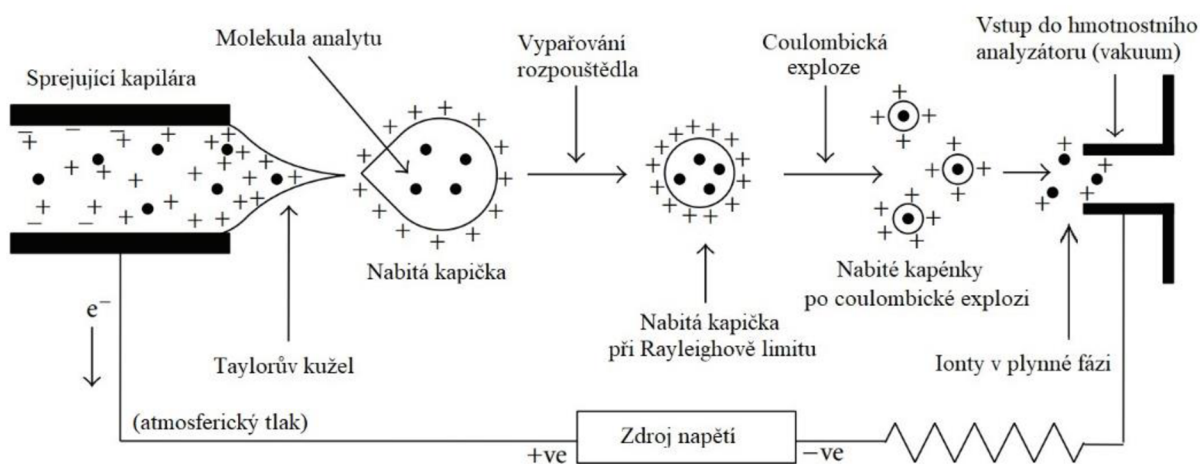
#### *Elektrosprej (ESI)*

Elektrosprej v pravém slova smyslu není ionizační technika, ale metoda, která převádí ionty z kapalné fáze do plynné fáze. Princip klasického elektrospreje zobrazuje Obrázek 6.

Vysoké napětí je vkládáno na sprejovací kapiláru, do které je přiváděn vzorek. Ten nejčastěji přichází ve formě eluátu z LC, při použití LC-MS. Dochází k vytvoření tzv. Taylorova kužele v kapiláře elektrospreje pomocí působení elektrostatických sil. Z vrcholku Taylorova kužele jsou sprejovány několikanásobně nabitě kapičky roztoku vzorku podle zvolené polarity elektrospreje. Díky zvýšené teplotě ve sprejovacím prostoru je odpařeno rozpouštědlo a dochází ke zmenšování kapiček a tím se zvětšují odpudivé síly mezi stejně nabitými molekulami vzorku. Oproti

odpudivým silám působí povrchové napětí, které drží kapičku pohromadě. Při Rayleighově limitu se tyto síly vyrovnají a po jeho překročení dochází k tzv. Coulombické explozi, při níž se kapička rozpadá na řadu menších kapiček. Dochází k opakování procesu, dokud nevznikají individuální ionty v plynné fázi. Další teorie vzniku iontů v plynné fázi je teorie vypuzení iontů, podle které intenzita elektrického pole uvnitř nabitě kapky dosáhne kritického bodu, kdy je kineticky a energeticky možné, aby byly ionty na povrchu kapek vyvrženy do plynné fáze. Vzniká tak mlha vysoce nabitých kapiček se stejnou polaritou, jakou má kapilární napětí. Vstup do hmotnostního spektrometru je protielektrodou. Emitované ionty jsou vzorkovány kuželovým odběrem a poté jsou urychleny do hmotnostního analyzátoru pro následnou analýzu  $m/z$  a měření intenzity iontů [128, 135].

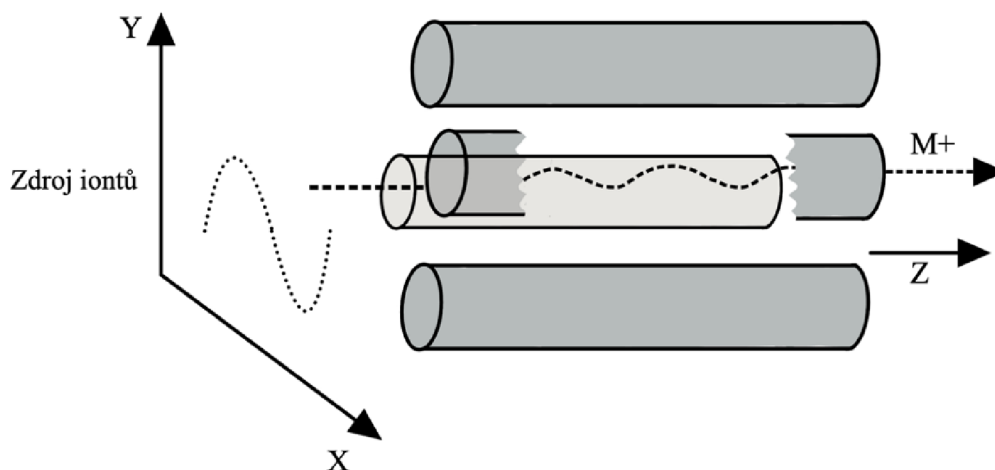
Nejčastěji se používá při spojení HPLC-MS. Je vhodný pro ionizaci látek středně polárních až iontové povahy. Nelze jej využít pro ionizaci nepolárních sloučenin a také se nehodí pro nepolární mobilní fáze. Jedná se o měkkou ionizační techniku, kde obvykle nevznikají fragmenty. Produktem jsou kvazimolekulární ionty  $[M + H]^+$  nebo  $[M - H]^-$  či případně další aduktové ionty s kationtem sodíku, draslíku a další.



Obrázek 6: Elektrosprej (upraveno [28])

### 2.7.2 Hmotnostní analyzátor – Kvadrupól

Nejčastěji se používá kvadrupólový hmotnostní analyzátor. Hlavní princip separace iontů je založen na průchodu iontů magnetickým nebo elektrickým polem, kde je pohyb iontů ovlivněn jejich poměrem  $m/z$ . V tomto systému se nachází 4 kovové tyče umístěné paralelně stejně daleko od sebe. Každá dvojice protilehlých tyčí je elektricky propojena. Na diagonálně umístěnou dvojici tyčí se přivádí stejně velké, ale opačné stejnosměrné napětí překryté střídavým napětím o rádiové frekvenci. Výsledné elektrické pole způsobuje, že ionty se pohybují vpřed ve směru osy Z s oscilačním pohybem v rovině X-Y. Amplituda oscilací má jedinečný vztah k poměru  $m/z$  a lze ji řídit současnou změnou stejnosměrného a vysokofrekvenčního napětí v předem stanoveném poměru. Tato stejnosměrná a vysokofrekvenční napětí lze nastavit tak, aby amplitudy oscilací pro žádoucí poměry  $m/z$  byly stabilní a ionty se pohybovaly podél osy z, aniž by narazily na tyče kvadrupólu, a nakonec dosáhly detektoru. Takovým iontům se říká ionty na stabilní trajektorii. Naproti tomu amplitudy oscilací nežádoucích iontů jsou velké a nestabilní, tyto ionty narážejí do kovových tyčí, neutralizují se a nedosáhnou detektoru. Tyto ionty se nazývají ionty na nestabilní trajektorii. Po kontaktu iontů s detektorem jsou generovány použitelné signály, které jsou zaznamenány počítačovým systémem. Počítač zobrazí signály graficky jako hmotnostní spektrum, které ukazuje relativní četnost signálů podle jejich poměru  $m/z$  [136]. Princip kvadrupólu zobrazuje Obrázek 7.

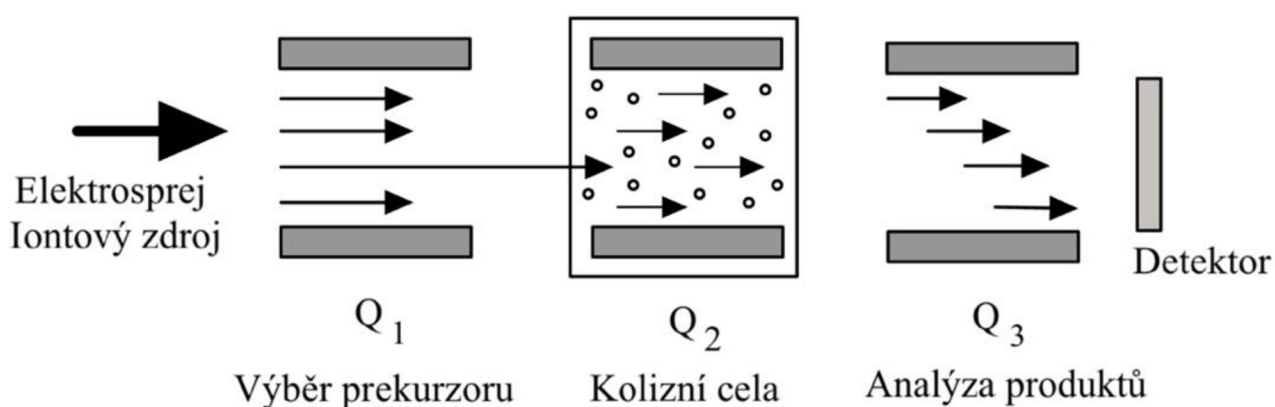


Obrázek 7: Schéma kvadrupólu (převzato [136])



### Trojité kvadrupól

Jak už napovídá sám název, trojitý kvadrupól se skládá ze 3 částí, respektive ze 3 kvadrupólů, proto také často nese označení QQQ nebo QqQ. První kvadrupól  $Q_1$  se nejčastěji používá k výběru prekursoru neboli iontu, který má být studován. Druhý kvadrupól  $Q_2$  se používá jako kolizní cela do níž je přiváděn kolizní plyn (nejčastěji argon, dusík nebo helium) a v níž dochází ke kolizně indukované disociaci (sražení iontů s neutrálními molekulami terčového plynu vyvolají fragmentaci iontů). Následně poslední třetí kvadrupól  $Q_3$  je určen pro skenování produktů nebo sledování vybraného fragmentu charakteristického pro zvolenou sloučeninu. Trojitý kvadrupól tak pracuje v tzv. MRM módu (monitorování vícenásobných reakcí z anglického překladu *multiple reaction monitoring*), to umožňuje detekci a kvantifikaci specifických molekul v komplexní směsi. Vysoká selektivita a dlouhá doba zadržení iontu, kterou tato metoda umožňuje, zabezpečuje značnou citlivost a multiplexing, neboli připojení více LC systémů k jednomu hmotnostnímu spektrometru [128, 147]. Schéma trojitého kvadrupólu zobrazuje Obrázek 8.



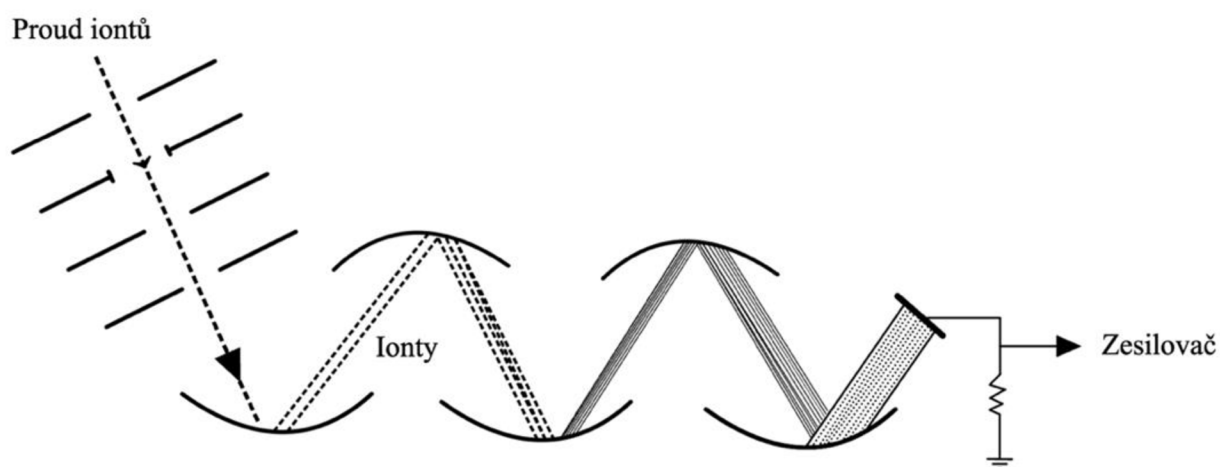
Obrázek 8: Schéma trojitého kvadrupólu (převzato [128])

### 2.7.3 Detektory v hmotnostní spektrometrii

Různé typy detektorů se používají v závislosti na faktorech, jako je dynamický rozsah, zadržení prostorové informace, šum a vhodnost pro hmotnostní analyzátor. Mezi běžně používané typy patří elektronové násobiče (EM), Faradayovy nálevky (FC), dynody pro konverzi fotonásobičů a maticové detektory [137].

#### *Elektronový násobič (EM)*

Elektronový násobič (*electron multiplier*) je nejvíce využívaným detektorem v MS. Podstatou EM je sériové spojení diskretních kovových destiček nazývaných dynody, které zesilují proud iontů násobkem  $\sim 10^8$  na měřitelný proud elektronů. Když do EM vstoupí jediný sekundární iont, je zastaven první konverzní dynodou. Energie nárazu se částečně rozptýlí vyvržením elektronů z materiálu dynody, čímž vznikne elektrický náboj. Další elektrony jsou vyvrženy kaskádovým procesem přes následující dynody. V poslední dynodě se nahromaděný náboj měří jako napěťový impuls [137, 138]. Obrázek 9 zobrazuje princip elektronového násobiče.



Obrázek 9: Schéma elektronového násobiče (převzato [137])

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Použité chemikálie

#### 3.1.1 Rozpouštědla

- Mili-Q voda
- Acetonitril – LC-MS Chromasolv® o čistotě  $\geq 99,9$  %, VWR
- Methanol – LC-MS Chromasolv® o čistotě  $\geq 99,9$  %, VWR
- Ethylacetát– LC-MS Chromasolv® o čistotě  $\geq 99,9$  %, VWR

#### 3.1.2 Kyseliny

- Kyselina mravenčí čistoty 98 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Kyselina citronová monohydrát čistoty min. 99 %, Lach-Ner (Neratovice, ČR)

#### 3.1.3 Soli

- Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát čistoty min. 99 % pro HPLC, Fluka (Švýcarsko)
- Síran sodný bezvodý čistoty 99 %, Penta (Praha, ČR)
- Chlorid sodný čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Chelaton III dihydrát čistoty min 99 %, Lach-Ner (Neratovice, ČR)

#### 3.1.4 Sorbenty

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

#### 3.1.5 Standardy léčiv

- Acebutolol o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Azitromycin o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Ciprofloxacin o čistotě  $\geq 98$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Claritromycin o čistotě  $\geq 95$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Doxycyklin o čistotě  $\geq 99,5$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Enrofloxacin o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Erytromycin o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Chlortetracyklin o čistotě  $\geq 90$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Ibuprofen o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Ketoprofen o čistotě  $\geq 98$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Kyselina salicylová o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Meloxicam o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Moxifloxacin o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Nadolol o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Naproxen o čistotě  $\geq 99,9$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Norfloxacin o čistotě  $\geq 98$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Ofloxacin o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Oxytetracyklin o čistotě  $\geq 95$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Pefloxacin o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Roxitromycin o čistotě  $\geq 90$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Sulfacetamid o čistotě  $\geq 98$  %, Sigma Aldrich (Německo)
- Sulfadiazin o čistotě  $\geq 99$  %, Sigma Aldrich (Německo)

- Sulfadimetoxin o čistotě  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich (Německo)
- Sulfamerazin o čistotě  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich (Německo)
- Sulfametazin o čistotě  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich (Německo)
- Sulfametroxazol o čistotě  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich (Německo)
- Sulfametroxypyridazin o čistotě  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich (Německo)
- Sulfapyridin o čistotě  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich (Německo)
- Sulfatiazol o čistotě  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich (Německo)
- Tetracyklín o čistotě  $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich (Německo)
- Trimetoprim o čistotě  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich (Německo)

### 3.2 Použité přístroje a pomůcky

- Přístroj pro přípravu Milli-Q vody Milli-Q Millipore, Academic
- Kapalinový chromatograf UHPLC 1290 Infinity, Agilent Technologies (USA) Kolona Luna® Omega Polar C18 Phenomenex, (100 x 2,1 mm; 1,6  $\mu\text{m}$ )
- Generátor dusíku a vzduchu, Peak Scientific – Genius 3045
- Hmotnostní spektrometr Bruker Evoq LC-TQ
- Analytické váhy Kern 770
- Zařízení pro sušení dusíkem Evaterm, Labicom
- Ultrazvuková lázeň Teson 4, Tesla
- Centrifuga NF 800, Nüve
- Centrifuga ROTINA 420R, Hettich Zentrifugen
- Centrifuga EBA 20, Hettich Zentrifugen
- Vortex
- Automatické mikropipety
- Míkostríkačky
- Plastové centrifugační zkumavky z PE 50 ml a 15 ml
- Stríkačkové nylonové filtry 0,22  $\mu\text{m}$  o průměru 13 mm, Chromservis (CZ)
- Stríkačky pro filtrování, Braun
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

### 3.3 Použitý software pro zpracování a interpretaci dat

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

### 3.4 Vzorky

#### 3.4.1 Vzorky žížal pro experimenty

Na experimenty prováděné na žížalách byly zakoupeny žížaly hnojní zakoupené u firmy Proryby (Jiří Tomíček).

#### 3.4.2 Vzorky půdy pro experimenty

Půda pro experimenty se žížalami (viz kapitoly 3.8 a 3.9) byla odebrána v Jemnici na Vysočině. Hloubka odběru se pohybovala od 0 do 25 cm. Jednalo se o půdní druh Fluvisol a půdní typ hlína.

Půda obsahovala 55,05 % písku, 32,65 % prachu a 15,30 % jílu. Další parametry půdy jsou zobrazeny v Tabulce 16 a Tabulce 17 (viz SEZNAM PŘÍLOH).

### **3.4.3 Vzorky biouhlu**

Pro experiment vliv biouhlu na absorpci léčiv do žížal (viz kapitola 3.8) byl použit biouhel od firmy Sonnenerde GmbH, Rakousko. Parametry jsou uvedeny v Tabulce 18 (viz SEZNAM PŘÍLOH).

## **3.5 Příprava zásobních a kalibračních roztoků**

### **3.5.1 Příprava matričních kalibrací**

Pro přípravu matričních kalibrací byly využity extrakty z žížal žijících v nekontaminované půdě. Extrakty byly připraveny pomocí metody QuEChERS (viz kapitola 3.6.2). Byly připraveny kalibrační body o koncentraci 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 50,0 a 100,0 ng/mL.

### **3.5.2 Příprava zásobních roztoků standardů**

Pomocí analytických vah bylo naváženo na 4 desetinná místa 10 mg jednotlivých standardů léčiv. Toto navážené množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 10 mL a následně doplněn po rysku 100% methanolem, 0,1% kyselinou mravenčí v roztoku acetonitril: MiliQ voda 50: 50 (obj./ obj.), 0,1% kyselinou mravenčí ve 100% methanolu nebo 50% methanolem v závislosti na vybraném léčivu. Odměrná baňka byla promíchána. Výsledná koncentrace každého standardu byla 1 mg/mL.

#### ***Příprava směšného standardu 31 léčiv o koncentraci 10 µg/mL***

Do odměrné baňky o objemu 10 mL bylo mikrostříkačkou Hamilton odměřeno 100 µL každého připraveného roztoku standardu léčiv o koncentraci 1 mg/mL. Odměrná baňka byla následně doplněna po rysku Mili-Q vodou. Výsledná koncentrace směšného roztoku léčiv byla 10 µg/mL.

#### ***Příprava směšného standardu 31 léčiv o koncentraci 1 µg/mL***

Do odměrné baňky o objemu 10 mL bylo mikrostříkačkou Hamilton odměřeno 1 mL každého připraveného roztoku standardu léčiv o koncentraci 10 µg/mL. Odměrná baňka byla následně doplněna po rysku Mili-Q vodou. Výsledná koncentrace směšného roztoku léčiv byla 1 µg/mL.

### **3.5.3 Příprava zásobních roztoků pufrů**

#### ***Příprava McIlvaina pufru o pH 2,6***

Pro přípravu McIlvaina pufru o pH 2,6 bylo na analytických vahách naváženo 3,91 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a 9,36 g kyseliny citrónové. Obě navážky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 500 mL a odměrná baňka byla doplněna Milli-Q vodou po rysku. Ověření hodnoty pH bylo provedeno pomocí pH metru. Hodnota pH pufru byla stanovena na  $2,6 \pm 0,1$ .

#### ***Příprava McIlvaina pufru o pH 4,0***

Pro přípravu McIlvaina pufru o pH 4,0 bylo na analytických vahách naváženo 13,82 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a 6,46 g kyseliny citrónové. Obě navážky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 500 mL a odměrná baňka byla doplněna Milli-Q vodou po rysku. Ověření hodnoty pH bylo provedeno pomocí pH metru. Hodnota pH pufru byla stanovena na  $4,0 \pm 0,1$ .

#### ***Příprava McIlvaina pufru o pH 6,0***

Pro přípravu McIlvaina pufru o pH 6,0 bylo na analytických vahách naváženo 23,64 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a 6,46 g kyseliny citrónové. Obě navážky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 500 mL a odměrná baňka byla doplněna Milli-Q vodou po rysku. Ověření hodnoty pH bylo provedeno pomocí pH metru. Hodnota pH pufru byla stanovena na  $6,0 \pm 0,1$ .

#### ***Příprava McIlvaina pufru o pH 7,0***

Pro přípravu McIlvaina pufru o pH 7,0 bylo na analytických vahách naváženo 29,52 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a 1,86 g kyseliny citrónové. Obě navážky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 500 mL a odměrná baňka byla doplněna Milli-Q vodou po rysku. Ověření hodnoty pH bylo provedeno pomocí pH metru. Hodnota pH pufru byla stanovena na  $7,0 \pm 0,1$ .

#### ***Příprava McIlvaina pufru o pH 8,0***

Pro přípravu McIlvaina pufru o pH 8,0 bylo na analytických vahách naváženo 34,82 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného a 0,28 g kyseliny citrónové. Obě navážky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 500 mL a odměrná baňka byla doplněna Milli-Q vodou po rysku. Ověření hodnoty pH bylo provedeno pomocí pH metru. Hodnota pH pufru byla stanovena na  $8,0 \pm 0,1$ .

### **3.5.4 Příprava zásobních roztoků rozpouštědel**

#### ***Příprava směsi voda: methanol 1:4 (obj./obj.)***

Při přípravě zásobního roztoku vody s methanolem v objemovém poměru 1:4 bylo do odměrné baňky napipetováno 40 Mili-Q vody a baňka byla doplněna methanolem na objem 200 mL.

#### ***Příprava směsi voda: acetonitril 1:4 (obj./obj.)***

Při přípravě zásobního roztoku vody s acetonitrilem v objemovém poměru 1:4 bylo do odměrné baňky napipetováno 40 Mili-Q vody a baňka byla doplněna acetonitrilem na objem 200 mL.

#### ***Příprava směsi voda: ethyl acetát 1:4 (obj./obj.)***

Při přípravě zásobního roztoku vody s ethyl acetátem v objemovém poměru 1:4 bylo do odměrné baňky napipetováno 40 Mili-Q vody a baňka byla doplněna ethyl acetátem na objem 200 mL.

#### ***Příprava směsi voda: methanol: acetonitril 20:8:72 (obj./obj./obj.)***

Při přípravě zásobního roztoku směsi rozpouštědel vody, methanolu a acetonitrilu v objemovém poměru 20:8:72 bylo do odměrné baňky napipetováno 40 Mili-Q vody a 16 mL methanolu, poté byla baňka byla doplněna acetonitrilem na objem 200 mL.

#### ***Příprava směsi pufr pH 2,6: methanol 1:4 (obj./obj.)***

Při přípravě zásobního roztoku pufru o pH=2,6 s methanolem v objemovém poměru 1:4 bylo do odměrné baňky napipetováno 40 mL McIlvaina pufru o pH=2,6 a doplněno methanolem na objem 200 mL.

#### ***Příprava směsi pufr pH 4,0: methanol 1:4 (obj./obj.)***

Při přípravě zásobního roztoku pufru o pH=4,0 s methanolem v objemovém poměru 1:4 bylo do odměrné baňky napipetováno 40 mL McIlvaina pufru o pH=4,0 a doplněno methanolem na objem 200 mL.

### ***Příprava směsi pufr pH 6,0: methanol 1:4 (obj./obj.)***

Při přípravě zásobního roztoku pufru o pH=6,0 s methanolem v objemovém poměru 1:4 bylo do odměrné baňky napipetováno 40 mL McIlvaina pufru o pH=6,0 a doplněno methanolem na objem 200 mL.

### ***Příprava směsi pufr pH 7,0: methanol 1:4 (obj./obj.)***

Při přípravě zásobního roztoku pufru o pH=7,0 s methanolem v objemovém poměru 1:4 bylo do odměrné baňky napipetováno 40 mL McIlvaina pufru o pH=7,0 a doplněno methanolem na objem 200 mL.

### ***Příprava směsi pufr pH 8: methanol 1:4 (obj./obj.)***

Při přípravě zásobního roztoku pufru o pH=8,0 s methanolem v objemovém poměru 1:4 bylo do odměrné baňky napipetováno 40 mL McIlvaina pufru o pH=8,0 a doplněno methanolem na objem 200 mL.

## **3.6 Výběr vhodného postupu pro extrakci**

Na základě již vyzkoušeného postupu metody QuEChERS na salátech byl vybrán extrakční postup metody QuEChERS, který byl použit v článku [129]. Tento postup byl následně optimalizovaný pro extrakci 31 léčiv z žižal (viz Tabulka 10).

### **3.6.1 Optimalizované parametry extrakčního postupu**

Metoda QuEChERS byla optimalizovaná na výtěžnost 31 léčiv. Konkrétní léčiva jsou uvedena v Tabulce 10.

*Tabulka 10: Vybraná analyzovaná léčiva*

| <b>Skupina léčiv</b>              | <b>Analyty</b>                                                                                                                                            |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Beta-blokátory                    | Acetobutolol, nadolol                                                                                                                                     |
| Chinolony a fluorochinolony       | Ciprofloxacin, enrofloxacin, moxifloxacin, norfloxacin, ofloxacin, pefloxacin                                                                             |
| Makrolidová antibiotika           | Azithromycin, clarithromycin, erythromycin, roxithromycin                                                                                                 |
| Nesteroidní protizánětlivá léčiva | Ibuprofen, kyselina salicylová, ketoprofen, meloxicam, naproxen                                                                                           |
| Sulfonamidy                       | Sulfacetamid, sulfamethoxyridazin, sulfadiazin, sulfadimethoxin, sulfamerazin<br>Sulfamethazin, sulfamethoxazol, sulfapyridin, sulfathiazol, trimethoprim |
| Tetracykliny                      | Doxycykline, chlortetracyklin, oxytetracyklin, tetracyklin                                                                                                |

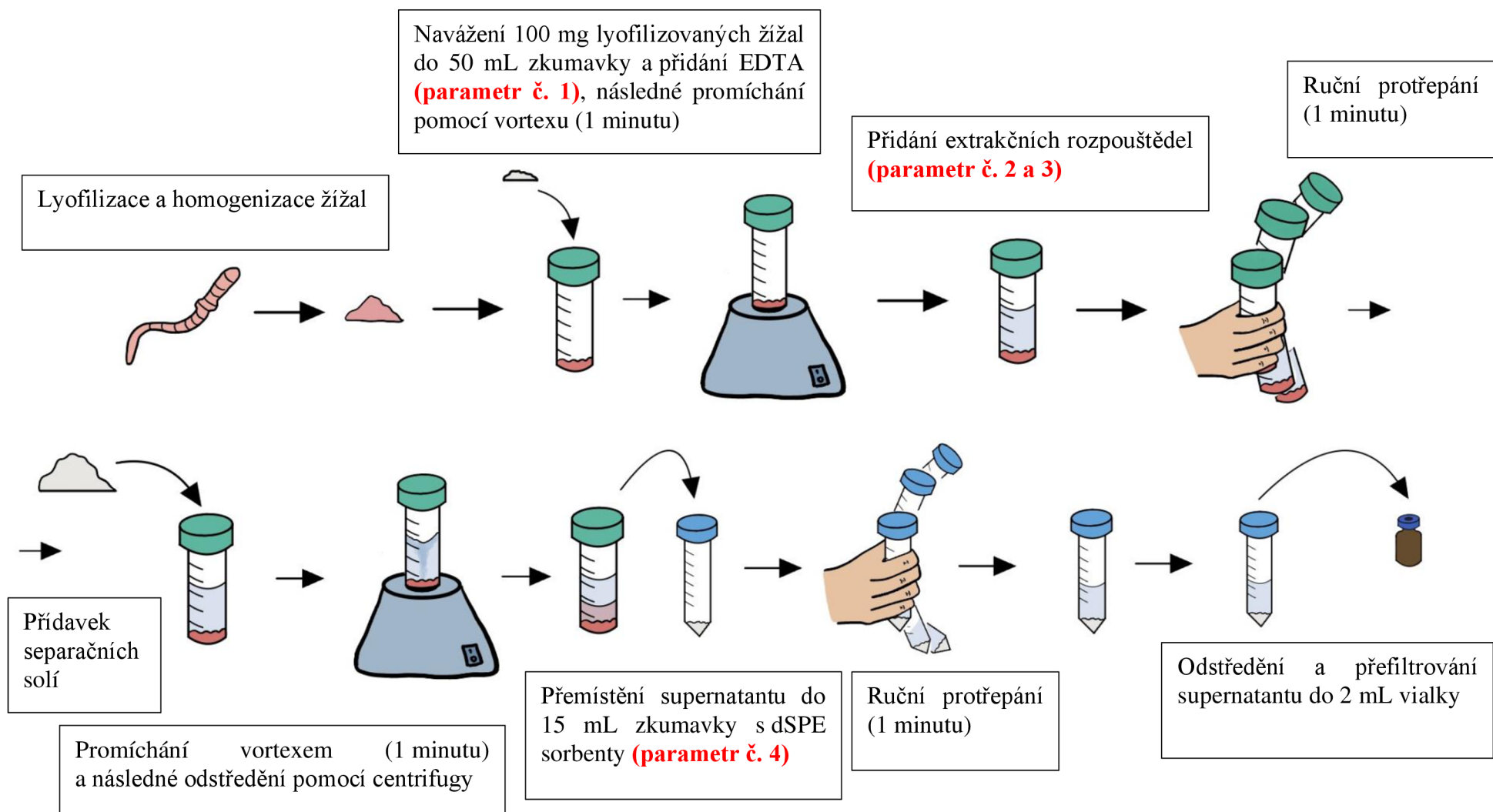
Při optimalizaci extrakce léčiv ze žižal byly optimalizovány tyto parametry: vhodné extrakční organické rozpouštědlo, složení vodné fáze, množství a přítomnost EDTA, vhodný způsob přečištění. Seznam optimalizovaných parametrů je uveden v Tabulce 11. Při postupu optimalizace byl vždy měněn 1 parametr, schématické znázornění extrakčního postupu je na Obrázku 10.

Vždy bylo naváženo 100 mg lyofylozovaných a zhomogenizovaných žižal na jemný prášek do plastové centrifugační zkumavky o objemu 50 mL. K naváženému množství žižal bylo přidáno 0,5 mL směsného standardu léčiv v methanolu (koncentrace 1 µg/mL). Zkumavky byly ponechány přes noc otevřené, aby se odpařil methanol a tím došlo k navázání léčiv na matici. Žižaly pak obsahovaly 500 ng každého léčiva. Pro jednotlivé parametry byly vždy připraveny 3 opakování. Připravené vzorky byly analyzovány pomocí optimalizované metody na LC/MS (viz kapitola 3.7).

Tabulka 11: Optimalizované parametry extrakčního postupu

| Číslo parametru | Parametr        | Provedení                                                                                | Označení |
|-----------------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 1               | Organická fáze  | Směs MeOH: H <sub>2</sub> O:ACN (8:20:72)                                                | 1A       |
|                 |                 | MeOH                                                                                     | 1B       |
|                 |                 | ACN                                                                                      | 1C       |
|                 |                 | EA                                                                                       | 1D       |
| 2               | Vodná fáze      | MiliQ voda                                                                               | 2A       |
|                 |                 | Pufr pH 2,6                                                                              | 2B       |
|                 |                 | Pufr pH 4,0                                                                              | 2C       |
|                 |                 | Pufr pH 6,0                                                                              | 2D       |
|                 |                 | Pufr pH 7,0                                                                              | 2E       |
|                 |                 | Pufr pH 8,0                                                                              | 2F       |
| 3               | Přítomnost EDTA | 0 mg                                                                                     | 3A       |
|                 |                 | 10 mg                                                                                    | 3B       |
|                 |                 | 20 mg                                                                                    | 3C       |
|                 |                 | 30 mg                                                                                    | 3D       |
|                 |                 | 40 mg                                                                                    | 3E       |
| 4               | dSPE sorbenty   | 225 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 12,5 mg PSA + 0 mg C18                          | 4A       |
|                 |                 | 225 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 12,5 mg PSA + 0 mg C18                          | 4B       |
|                 |                 | 225 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 12,5 mg PSA + 12,5 mg C18                       | 4C       |
|                 |                 | 225 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 12,5 mg PSA + 20 mg C18                         | 4D       |
|                 |                 | 225 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 12,5 mg PSA + 30 mg C18                         | 4E       |
|                 |                 | 225 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 12,5 mg PSA + 40 mg C18                         | 4F       |
|                 |                 | kit Thermofischer scientific<br>900 mg MgSO <sub>4</sub> + 45 mg GCB + 150 mg PSA        | 4G       |
|                 |                 | kit Agilent Q<br>150 mg MgSO <sub>4</sub> + 7,5 mg GCB + 50 mg PSA + 50mg C18            | 4H       |
|                 |                 | 225 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 12,5 mg PSA + 12,5 mg C18<br>přes noc v mrazáku | 4I       |





Obrázek 10: Postup optimalizované metody QuEChERS

Na základě provedení a vyhodnocení všech experimentů (viz kapitola 4.1) byly stanoveny nejvhodnější parametry. Pomocí těchto parametrů byl sestaven optimalizovaný postup metody QuEChERS.

### 3.6.2 Výsledný optimalizovaný postup extrakce pomocí metody QuEChERS

- Ke vzorku 100 mg lyofilizovaných žížal v plastové centrifugační zkumavce (50 mL) bylo přidáno **10 mg EDTA** a keramický kamínek
- Vzorek se vortexoval po dobu 1 minuty
- Ke vzorku bylo přidáno 5 mL směsi **methanolu a McIlvainova pufru o pH 2,6** v poměru 4:1 (obj./obj.)
- Směs se ručně protřepala po dobu 1 minuty
- Do směsi byly přidány separační soli (2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,5 g NaCl) a směs se znovu vortexovala po dobu 1,5 minuty
- Následovalo odstředění při 3500 rpm po dobu 10 minut
- Byly odebrány 2 mL organické fáze a přemístěny do zkumavky (15 mL) s dSPE sorbenty (**225 mg Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 12,5 mg SPE PSA + 12,5 mg C18**)
- Směs byla protřepána ručně po dobu 1 minuty
- Následovalo odstředění při 3500 rpm po dobu 10 minut
- Organická fáze byla přefiltrována pomocí nylonového filtru (0,22 μm) a přemístěna do skleněné vialky (2 mL)

### 3.6.3 Příprava validace optimalizované metody

U optimalizovaného postupu extrakční metody QuEChERS byly vyhodnoceny následující parametry LoD (limity detekce), LoQ (limity kvantifikace) a výtěžnosti na několika různých koncentracích (viz kapitola 4.2). A to tak, že bylo naváženo 100 mg lyofilizovaných žížal do 50 mL zkumavky a tyto žížaly byly obohaceny o směs 31 léčiv. Do zkumavek bylo přidáno 25, 50, 100 a 200 μL směsného roztoku 31 léčiv v methanolu a koncentraci 1 μg/mL jednotlivých léčiv. Zkumavky byly přes noc ponechány otevřené, aby došlo k odpaření methanolu. Žížaly tedy obsahovaly 25, 50, 100 a 200 ng každého léčiva. Vzorek s konkrétní koncentrací léčiv byl nachystán třikrát. Byly také připraveny vzorky pro matriční kalibraci. Připravené vzorky byly následující den extrahovány pomocí již optimalizované metody QuEChERS. Kalibrační přímka se skládala z 9 kalibračních bodů a koncentracích 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 50,0; a 100,0 ng/mL. Vzorky byly následně analyzovány pomocí optimalizované metody UHPLC-ESI-TQ (viz kapitola 3.7).

### 3.7 Optimalizovaná LC-MS metoda pro stanovení léčiv v žížalách hnojných

Pro stanovení vybraných léčiv v žížalách byla zvolena UHPLC-ESI-TQ. Použité přístroje jsou zobrazeny na Obrázku 11. Pro analýzu byla použita již optimalizovaná metoda, jejichž parametry jsou uvedeny v Tabulce 12–Tabuce 14.



Obrázek 11: Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity a hmotnostní spektrometr Bruker EVOQ LC-TQ

Tabulka 12: Nastavené parametry kapalinového chromatografu

| Parametry UHPLC                       |                          |                |
|---------------------------------------|--------------------------|----------------|
| <b>Objem nástřiku</b>                 | 7 $\mu$ l                |                |
| <b>Průtok mobilní fáze</b>            | 0,5 ml·min <sup>-1</sup> |                |
| <b>Teplota kolony</b>                 | 35 °C                    |                |
| <b>Složení mobilní fáze</b>           | A: 0,1 % HCOOH v MQ      |                |
|                                       | B: acetonitril           |                |
| <b>Gradient mobilní fáze</b>          | <b>t [min]</b>           | <b>t [min]</b> |
|                                       | 0,0                      | 0,0            |
|                                       | 0,5                      | 0,5            |
|                                       | 13,0                     | 13,0           |
|                                       | 13,1                     | 13,1           |
|                                       | 15,5                     | 15,5           |
| <b>posttime na ekvilibraci kolony</b> | 2,0 minuty               |                |

Tabulka 13: Nastavení parametrů ESI

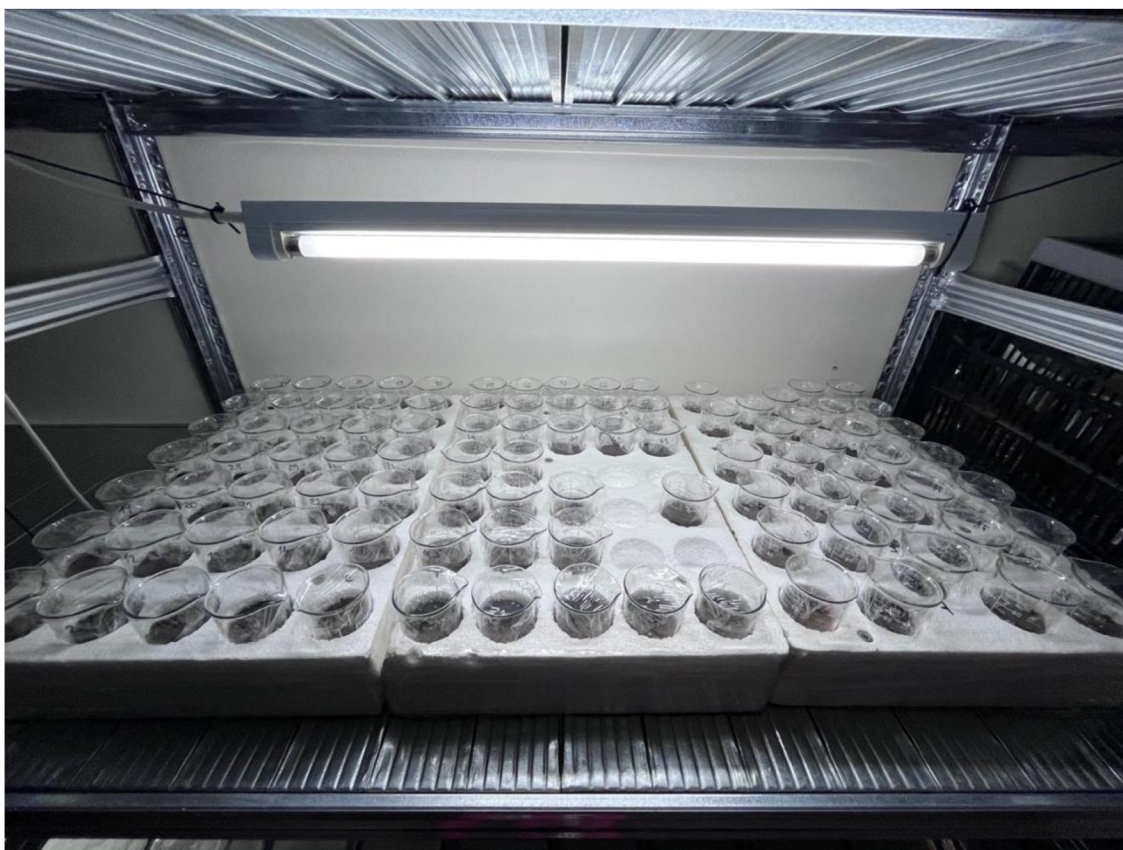
| Parametry HESI                  |                     |
|---------------------------------|---------------------|
| <b>Iontový zdroj</b>            | elektrosprej (HESI) |
| <b>Napětí elektrospreje</b>     | 4 500 V             |
| <b>Ionizační mód (polarita)</b> | pozitivní (ESI+)    |
| <b>Průtok pomocného plynu</b>   | 25                  |
| <b>Teplota pomocného plynu</b>  | 500 °C              |
| <b>Průtok sušícího plynu</b>    | 15                  |
| <b>Teplota sušícího plynu</b>   | 350 °C              |
| <b>Zmlžovací plyn</b>           | 45                  |
| <b>Aktivní odtah</b>            | ON                  |
| <b>Režim scanu</b>              | MRM                 |
| <b>Tlak kolizního plynu</b>     | 1,5 mTorr           |

Tabulka 14: Optimalizovaná metoda UPLC-ESI-TQ – parametry MRM přechodů

| Parametry MRM přechodů |                    |                       |               |                      |                      |               |                      |
|------------------------|--------------------|-----------------------|---------------|----------------------|----------------------|---------------|----------------------|
| Analyt                 | Retenční čas [min] | Kvantitativní přechod |               |                      | Kvalitativní přechod |               |                      |
|                        |                    | Prekurzor [m/z]       | Produkt [m/z] | Kolizní energie [eV] | Prekurzor [m/z]      | Produkt [m/z] | Kolizní energie [eV] |
| Acebutolol             | 3,65               | 337,2                 | 116,0         | 20                   | 337,2                | 319,0         | 10                   |
| Azithromycin           | 4,84               | 375,2                 | 591,3         | 10                   | 375,2                | 158,0         | 20                   |
| Ciprofloxacin          | 3,35               | 332,4                 | 314,2         | 10                   | 332,4                | 288,2         | 10                   |
| Clarithromycin         | 7,54               | 748,5                 | 158,1         | 20                   | 748,5                | 590,4         | 10                   |
| Doxycyclin             | 5,00               | 445,4                 | 428,1         | 10                   | 445,4                | 320,9         | 30                   |
| Enrofloxacin           | 3,78               | 360,4                 | 316,2         | 10                   | 360,4                | 342,2         | 20                   |
| Erythromycin           | 6,57               | 734,5                 | 158,2         | 30                   | 734,5                | 576,3         | 10                   |
| Chlortetracyclin       | 4,39               | 479,0                 | 462,3         | 10                   | 479,0                | 443,7         | 20                   |
| Ibuprofen              | 10,30              | 161,1                 | 119,1         | 10                   | 161,0                | 57,2          | 10                   |
| Ketoprofen             | 8,34               | 255,0                 | 209,0         | 10                   | 255,0                | 105,0         | 20                   |
| Meloxicam              | 8,63               | 352,0                 | 115,0         | 10                   | 352,0                | 141,0         | 20                   |
| Moxifloxacin           | 4,83               | 402,0                 | 358,2         | 20                   | 402,0                | 384,2         | 20                   |
| Nadolol                | 2,50               | 310,2                 | 253,8         | 10                   | 310,2                | 200,8         | 20                   |
| Naproxen               | 8,39               | 231,0                 | 185,2         | 10                   | 231,0                | 169,0         | 20                   |
| Norfloxacin            | 3,22               | 320,1                 | 276,1         | 10                   | 320,1                | 231,1         | 40                   |
| Ofloxacin              | 3,25               | 362,2                 | 318,1         | 10                   | 362,2                | 261,1         | 20                   |
| Oxytetracyclin         | 2,85               | 461,0                 | 426,2         | 20                   | 461,0                | 443,2         | 5                    |
| Pefloxacin             | 3,34               | 334,0                 | 317,0         | 10                   | 334,0                | 289,0         | 10                   |
| Roxithromycin          | 8,03               | 837,5                 | 679,5         | 20                   | 837,5                | 157,9         | 30                   |
| Kyselina salicylová    | 4,06               | 137,0                 | 93,0          | 10                   | 137,0                | 65,0          | 20                   |
| Sulfacetamid           | 1,62               | 215,2                 | 156,0         | 5                    | 215,2                | 108,2         | 10                   |
| Sulfadiazin            | 1,96               | 251,3                 | 156,0         | 10                   | 251,3                | 92,2          | 20                   |
| Sulfadimethoxin        | 5,48               | 255,0                 | 156,0         | 10                   | 255,0                | 92,1          | 15                   |
| Sulfamerazin           | 2,51               | 265,3                 | 156,0         | 10                   | 265,3                | 172,0         | 10                   |
| Sulfamethazin          | 3,02               | 279,3                 | 186,0         | 10                   | 279,3                | 92,0          | 30                   |
| Sulfamethoxazol        | 4,14               | 254,3                 | 156,0         | 10                   | 254,3                | 108,1         | 20                   |
| Sulfamethoxypridazin   | 3,20               | 281,1                 | 156,0         | 10                   | 281,1                | 92,2          | 20                   |
| Sulfapyridin           | 1,97               | 250,3                 | 156,0         | 10                   | 250,3                | 92,2          | 20                   |
| Sulfathiazol           | 2,27               | 256,0                 | 156,0         | 10                   | 256,0                | 92,2          | 20                   |
| Tetracyclin            | 5,00               | 445,0                 | 427,2         | 10                   | 445,0                | 428,0         | 10                   |
| Trimethoprim           | 2,68               | 291,2                 | 230,1         | 20                   | 291,2                | 261,0         | 20                   |

### 3.8 Vliv koncentrace léčivých látek v půdě na příjem žížalami hnojními

Do kádinky o objemu 100 mL bylo naváženo  $50 \pm 0,5$  g půdy s určitou koncentrací léčiv. Koncentrace léčiv byly zvoleny podobné jako v již publikovaných studiích [15, 24] dále také vyšší a nižší hodnoty (100, 500, 750, 1 000, 2 000, 5 000, 10 000, 20 000 ng léčiv/g půdy). Pro každou koncentraci, včetně vzorků pro přípravu kalibrace (žížaly v půdě bez léčiv), bylo připraveno minimálně 5 opakování s 1 žížalou. Průměrná žížala vážila okolo 0,4 g. U žížal byla provedena aklimatizace v čisté půdě po dobu 3 dnů a následná depurace na navlhčeném filtračním papíře po dobu 1 dne. Po depuraci byly žížaly zváženy (pro získání ekotoxikologických dat viz kapitola 4.6) a umístěny do půdy nachystané na experiment. Délka experimentu byla 21 dnů. Čas experimentu byl zvolen podle již provedených studií [15, 16, 24]. K půdě bylo přidáno 8,5 g vody, což odpovídá 40 % MHWC (maximální kapilární vodní kapacity půdy), kde MHWC bylo stanoveno na 44 %. Do půdy byly také přidány ovesné vločky jako krmivo pro žížaly. Následně se do kádinek umístily žížaly hnojní. Kádinka byla přikryta potravinářskou fólií, aby se žížaly nedostaly ven. Do potravinářské fólie byly následně udělány malé díry, aby měly žížaly potřebný přísun vzduchu (viz Obrázek 12). V průběhu trvání experimentu byla v půdě doplňována voda odpovídající 40 % MHWC a ovesné vločky jako krmivo, vše 1x týdně.



Obrázek 12: Experiment na žížalách hnojních – různé koncentrace

Po ukončení experimentu (po 21 dnech) byly žížaly vytaženy z půdy, opláchnuty destilovanou vodou a ponechány 24 hodin pro depuraci na navlhčeném filtračním papíře. Po 24 hodinách byly žížaly zváženy, kvůli stanovení změny hmotnostního rozdílu během experimentu (pro sběr ekotoxikologických dat viz kapitola 4.6) a vloženy do mrazáku při  $-80$  °C. Následně byly žížaly lyofilizovány. Z jednotlivých žížal byly extrahovány léčiva pomocí optimalizované metody QuEChERS (viz kapitola 3.6.2) a následně byly léčiva stanoveny pomocí UHPLC-ESI-TQ (viz kapitola 3.7) a byly vyhodnoceny výsledky (viz kapitola 3.8).

### **3.9 Vlivu biouhlu na příjem léčivých látek žížalami hnojními s odběry v čase**

Experiment byl připraven stejným postupem jako v kapitole 3.8. Rozdíl byl v parametrech půdy, kde byla použita půda o koncentraci 10 000 ng 31 léčiv/g půdy, a půda která kromě mixu 31 léčiv o koncentraci 10 000 ng/g půdy obsahovala také 2 % biouhlu. Opět byla připravena i půda bez kontaminace léčiv pro žížaly použité na matriční kalibraci. U experimentu se také měnila doba odběru žížal pro zjištění časové závislosti příjmu, kdy se odebíraly vzorky v čase po 1, 3, 7, 14 a 21 dnech. Bylo vždy připraveno 9 opakování pro jednotlivé parametry.

Po odebrání žížal bylo s žížalami nakládáno jako v kapitole 3.8. Opět byly z žížal vyextrahovány léčiva podle postupu v kapitole 3.6.2. Analýza byla provedena pomocí UHPLC-ESI-TQ (viz kapitola 3.7) a výsledky byly vyhodnoceny (viz kapitola 4.5).

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Výsledky optimalizace metody extrakce pomocí QuEChERS

Optimalizované parametry postupu QuEChERS jsou uvedeny v Tabulce 11. Vyhodnocení vzorků bylo provedeno v programu TASQ pomocí matriční kalibrace, za účelem kompenzace matričního efektu. Výsledný optimalizovaný postup je uveden v kapitole 3.6.2.

#### 4.1.1 Optimalizace parametru organické rozpouštědlo

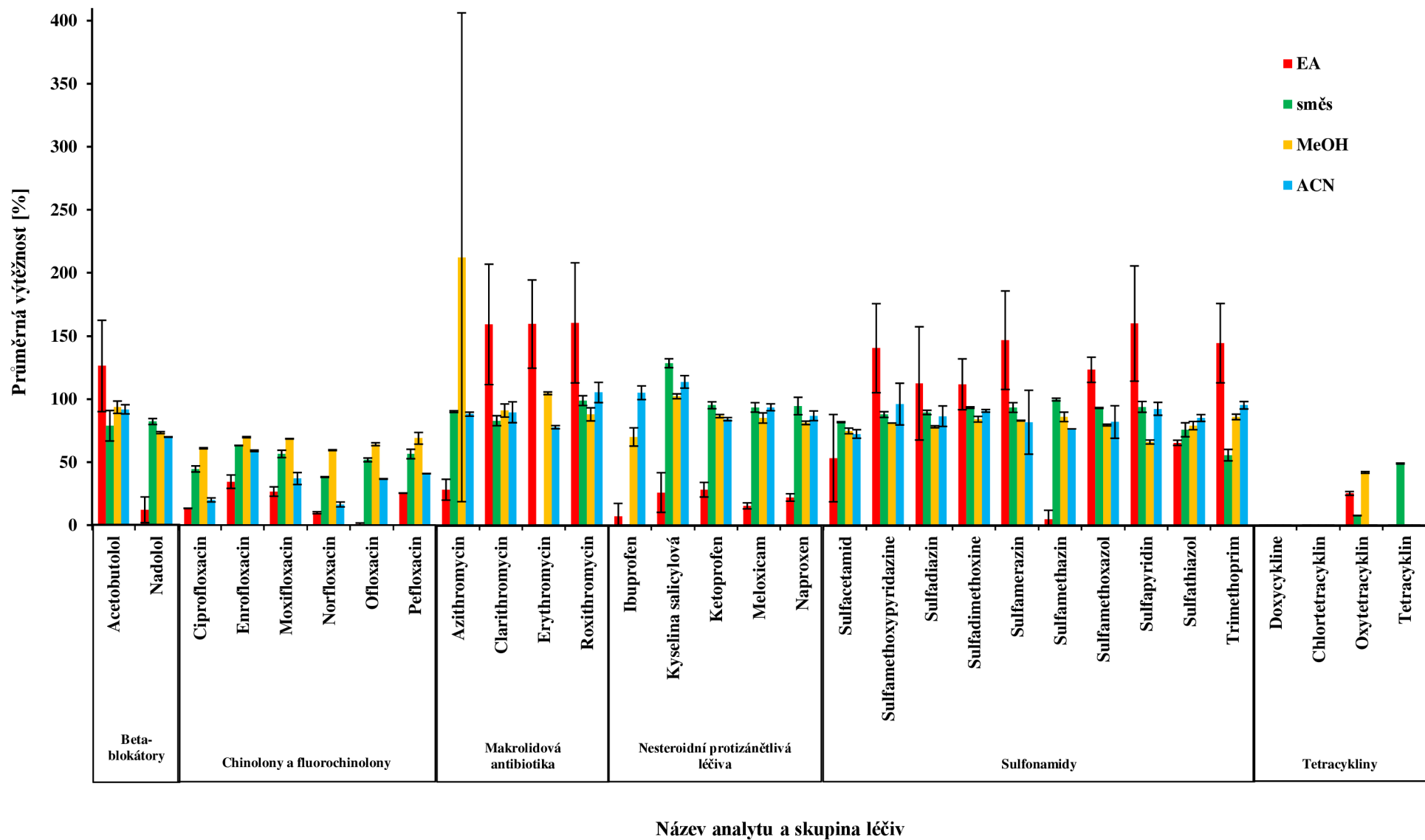
Zvolit vhodné organické rozpouštědlo je jeden z nejdůležitějších kroků při vývoji vhodné extrakční metody. Vhodné rozpouštědlo musí splňovat mnoho aspektů jako například pokrytí vybraného analytického spektra od polárních (jako je azithromycin) až po nepolární sloučeniny (jako například tetracyklin). Dále je to selektivita, dostatečná separace od vody, přístupnost separační technice jako je GC, GPC, SPE nebo v našem případě LC. Nesmíme opomenout ani náklady, bezpečnost, ekologie nebo dobré manipulace s rozpouštědlem [45].

Pro optimalizaci organického rozpouštědla byl použitý ethyl acetát, methanol, acetonitril a směs 3 rozpouštědel MeOH: H<sub>2</sub>O: ACN v poměru 8:20:72 (obj./obj./obj.). Stanovené výtěžnosti pro použitá organická rozpouštědla jsou vidět v grafu na Obrázku 13 (hodnoty jednotlivých výtěžností jsou uvedeny v Tabulce 19 (viz SEZNAM PŘÍLOH). Použitý objem organické fáze byl vždy 4 mL.

Největší výtěžnost u 31 extrahovaných léčiv byla zjištěna pro methanol. Methanol také prokázal pokrytí největší části požadovaného analytického spektra. O něco menší výtěžnost prokázal také acetonitril a směs rozpouštědel. Acetonitril ovšem nepokryl, tak velkou část celkového spektra analytů jako methanol, malá výtěžnost s použitím acetonitrilu se objevila zejména u skupiny chinolonů a fluorochinolonů anebo také u skupiny tetracyklinů. U použití směsi rozpouštědel byla průměrná výtěžnost a selektivita poměrně vysoká, ovšem stále zaostávala za methanolem.

Oproti tomu u ethyl acetátu byla výtěžnost průměrně nejmenší a nesplňoval požadavek na pokrytí celého analytického spektra, kdy pomocí ethyl acetátu nebylo možné extrahovat zejména tetracykliny. Ethyl acetát také neprokával dostatečnou selektivitu, kdy se za jeho použití vyskytovalo větší množství koextrahovaných látek ve vzorku a tím se ovlivnila výtěžnost požadovaných analytů až ke 150 %.



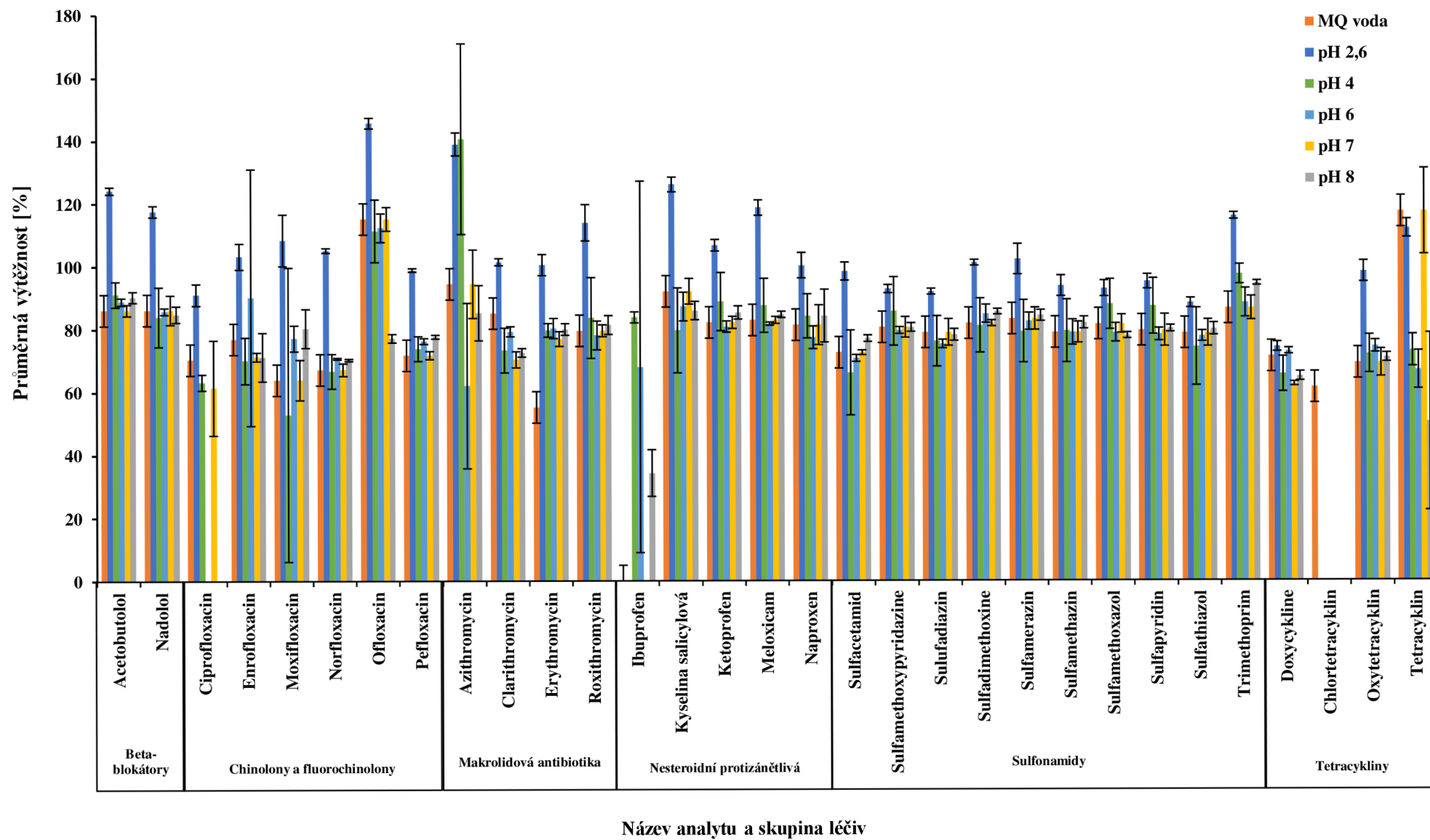


Obrázek 13: Graf průměrné výtěžnosti při použití různých organických rozpouštědel

#### 4.1.2 Optimalizace parametru vodná fáze

Stabilita léčiv je ovlivněna pH. Hodnota pH také ovlivňuje koextrakci nežádoucích složek z matrice [48].

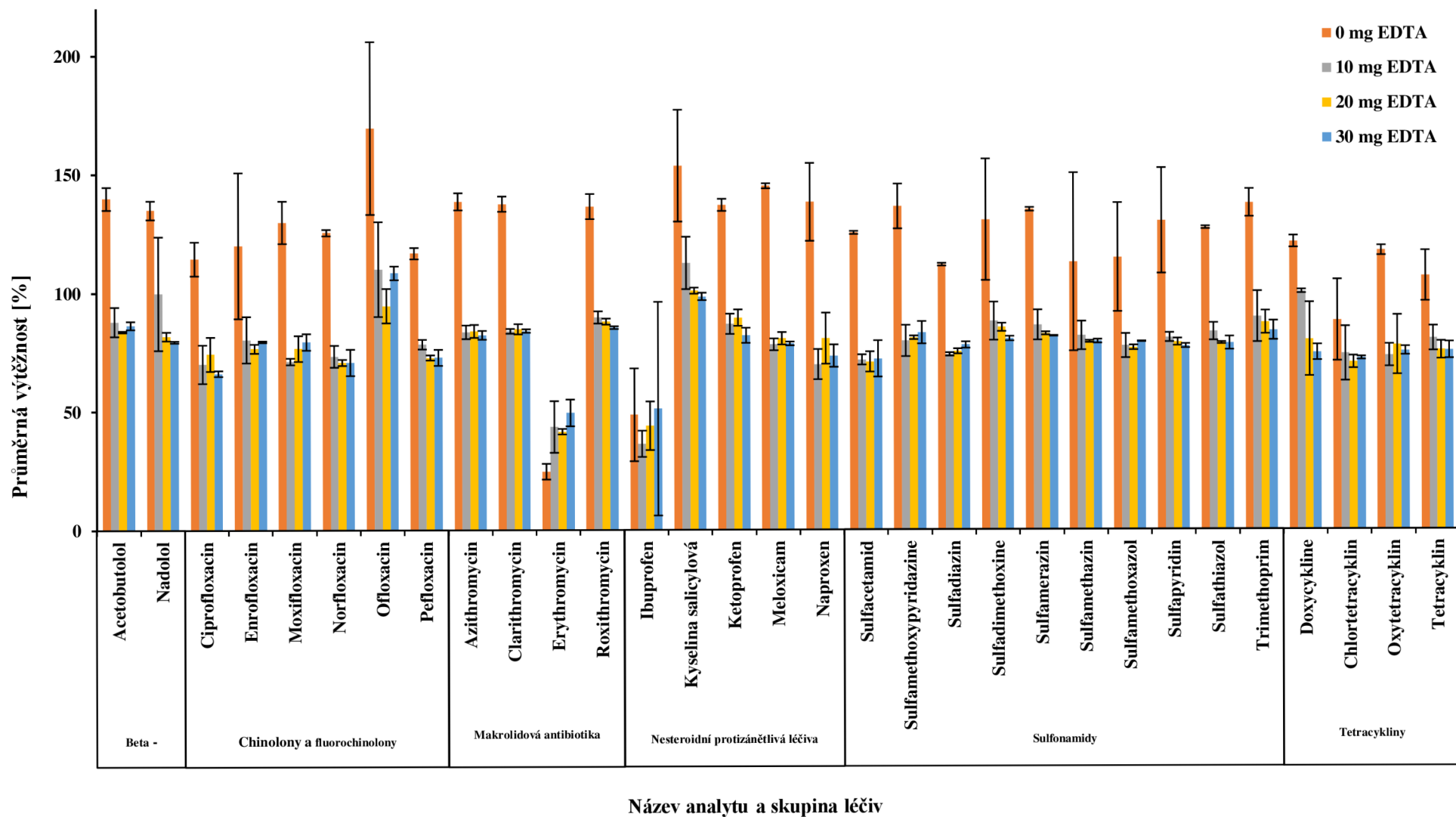
Jak se ukázalo vybraná léčiva jsou nejstabilnější v kyselějším pH. Výtěžnosti jednotlivých vodných fází pro 31 léčiv zobrazuje graf na Obrázku 14. Největší výtěžnost měl McIlvainův pufr o pH 2,6. Ostatní vodné fáze měly průměrnou výtěžnost nižší a navzájem se od sebe mnoho nelišily. Hodnoty vynesené do grafu jsou zobrazeny v Tabulce 20 (viz SEZNAM PŘÍLOH).



Obrázek 14: Graf průměrné výtěžnosti při různém složení vodné fáze

### 4.1.3 Optimalizace parametru navážka EDTA

Některá léčiva mohou tvořit komplexy s vápenatými a hořečnatými ionty, které se hojně vyskytují v půdě konkrétně v jílových částicích a v menším množství se vyskytují v žížalách samotných. Díky tomu, že léčiva mohou tvořit komplexy s těmito ionty, a tak může docházet k menší desorpci léčiv z matrice, a tudíž k menší výtěžnosti extrakce [156]. Aby bylo tomuto problému zabráněno, byla k žížalám před extrakcí přidána kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) [67]. Výtěžnost při jednotlivých navážkách EDTA zobrazuje Obrázek 15. Z naměřených výsledků bylo zjištěno, že nejvyšší výtěžnosti u 31 léčiv vykazovaly extrakce bez přítomnosti EDTA, ovšem protože bez přítomnosti EDTA se výtěžnosti pohybovali u většiny léčiv nad 100 %, byla zvolena navážka 10 mg. Vyšší navážka nebyla zvolena, protože s přidáním většího množství EDTA se výtěžnosti výrazně neměnily, tudíž by použití větší navážky bylo zbytečné. Za přítomnosti EDTA vytvořily vápenaté a hořečnaté ionty komplexy právě s EDTA, a ne s léčivem, tím nebyly ionty vyextrahovány z matrice a nezpůsobovaly zvýšení signálu, jako při analýze extraktů vzorků bez použití EDTA. Hodnoty vynesené do grafu jsou zobrazeny v Tabulce 21 (viz SEZNAM PŘÍLOH).



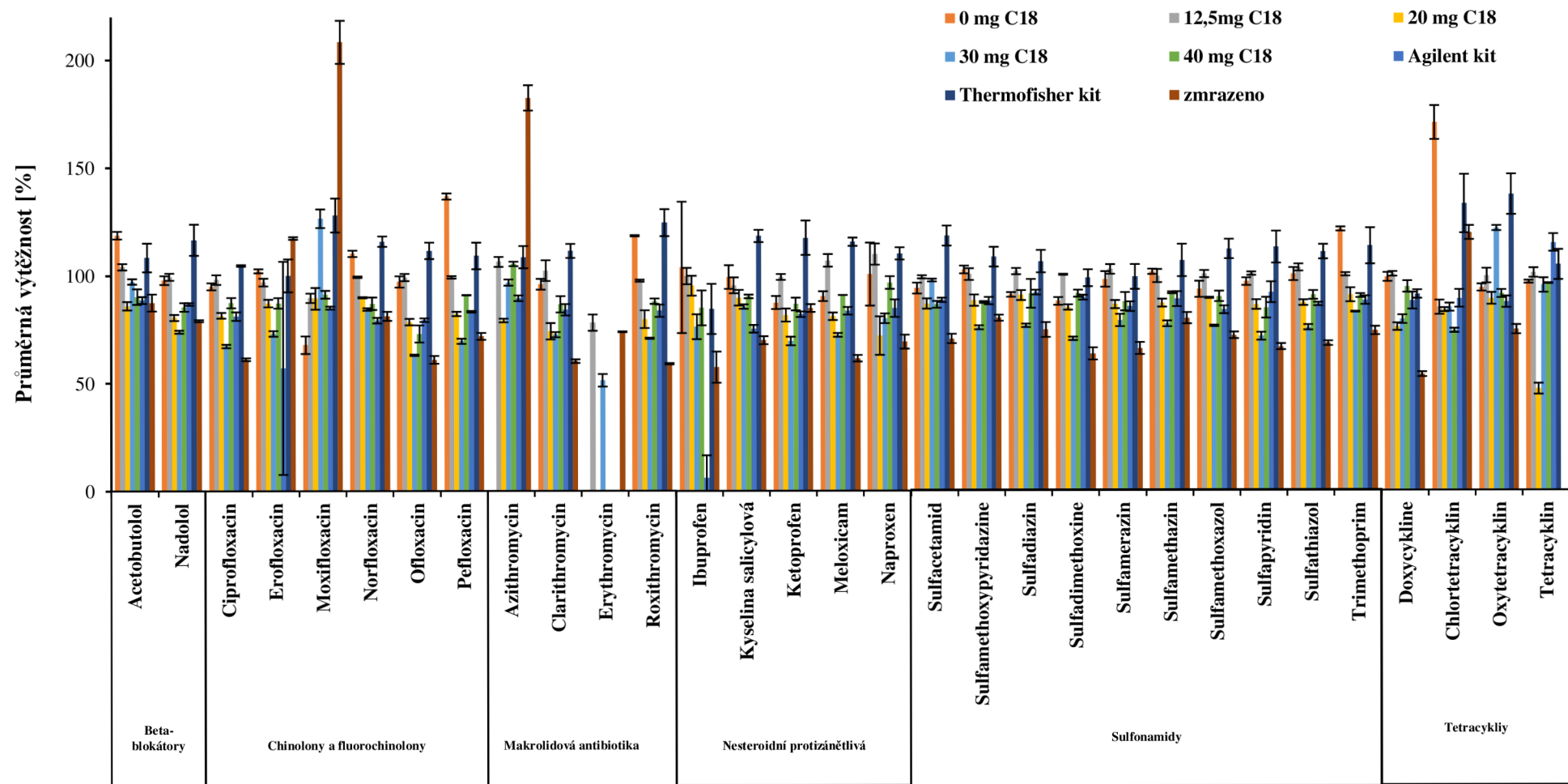
Obrázek 15: Graf průměrné výtěžnosti při různých navázkách EDTA

#### 4.1.4 Optimalizace parametru způsob přečištění

Při použití dSPE je důležité, aby sorbenty fungovaly jako “chemický filtr“, aby tedy zachytávaly matricové balastní složky, a naopak nezachytávaly analyty [45]. V případě extrakce léčiv z žížal byly zvoleny různé navážky sorbentu C18, který pomáhá odstraňovat koextrahované lipidy [19], které se vyskytují v žížalách ve vyšší míře [6]. Dále byl také vyzkoušen vliv zmrazení, kdy bylo předpokládáno, že dojde k vysrážení koextrahovaných lipidických složek [150].

Jako různé způsoby přečištění byly použity směsi sorbentů PSA, C18, sodné síranové soli nebo zmrazení. Vyzkoušeny byly také komerční kity od firmy Agilent a Thermofisher, které se dají zakoupit již předpřipravené. Parametry pro různá přečištění jsou uvedeny v Tabulce 11. Výsledky pro různé směsi přečištění jsou uvedeny v grafu na Obrázku 16. Hodnoty vynesené do grafu zobrazuje Tabulka 22 (viz SEZNAM PŘÍLOH).

Optimální výtěžnost okolo 100 % prokázala směs obsahující 12,5 mg PSA, 12,5 mg C18 a 225 mg síranu sodného, kde bylo dosaženo dostatečného odstranění matricových složek a zároveň minimální ztráty analytů vlivem sorpce na dSPE sorbenty. U komerčního kitu od firmy Thermofisher byly výtěžky často nad 100 %, což může být způsobeno nedostatečným odstraněním lipidických složek, které způsobovaly zvýšení signálu, protože tento kit neobsahoval sorbent C18. Naopak u kitu od firmy Agilent se výtěžky pohybovaly pod 100 % díky tomu, že v tomto kitu se nacházelo větší množství sorbentu C18 (konkrétně 50 mg) a léčiva se mohla nadbytečně sorbovat na toto větší množství sorbentu, a tak docházelo k menší výtěžnosti extrakce.



Název analytu a skupiny léčiv

Obrázek 16: Graf průměrné výtěžnosti při různých způsobech přečištění

## 4.2 Validace metody

Pro optimalizovaný postup (viz kapitola 3.6.2) byly stanoveny LoD – limity detekce neboli nejnižší koncentrace analytu, která může být ve vzorku detekována

$$LoD = 6 \cdot \frac{s_{blank}}{b},$$

a LoQ – limity kvantifikace neboli nejnižší koncentrace analytu, kterou lze spolehlivě kvantifikovat [154,155].

$$LoQ = 9 \cdot \frac{s_{blank}}{b},$$

kde  $s_{blank}$  je standardní odchylka rozsahu měřeného slepého vzorku a  $b$  je směrnice kalibrační přímky. Byla také stanovena výtěžnost (RR, recovery rate) pro různé koncentrace analytů při koncentracích 250 ng, 500, ng, 1 000 ng a 2 000 ng na 1 g lyofilizované žížaly. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu TASQ pomocí připravené matriční kalibrace. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15: Limity detekce optimalizovaného postupu QuEChERS

| Analyt                | LoD [ng/g] | LoQ [ng/g] | RR 250 ng/g žížaly [%] | RR 500 ng/g žížaly [%] | RR 1000 ng/g žížaly [%] | RR 2000 ng/g žížaly [%] |
|-----------------------|------------|------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Acebutolol            | 91,7       | 137,5      | 109,9 ± 0,8            | 96 ± 2                 | 89 ± 3                  | 83 ± 3                  |
| Azithromycin          | 133,7      | 200,6      | 109 ± 7                | 88 ± 10                | 37 ± 2                  | 25 ± 9                  |
| Ciprofloxacin         | 70,6       | 105,9      | 112 ± 10               | 91,9 ± 0,9             | 84 ± 5                  | 79 ± 3                  |
| Clarithromycin        | 16,3       | 24,4       | 103 ± 6                | 92,3 ± 0,7             | 85 ± 5                  | 81 ± 3                  |
| Doxycyclin            | 74,4       | 111,7      | 121 ± 16               | 100 ± 6                | 73 ± 15                 | 81 ± 12                 |
| Enrofloxacin          | 63,1       | 94,7       | 129 ± 13               | 102 ± 2                | 84,8 ± 1,6              | 77 ± 3                  |
| Erythromycin          | 56,2       | 84,2       | 121 ± 2                | 98 ± 3                 | 92 ± 3                  | 89 ± 0                  |
| Chlortetracyclin      | 39,9       | 59,8       | 118 ± 5                | 94 ± 2                 | 80 ± 5                  | 80 ± 8                  |
| Ibuprofen             | 48,1       | 72,2       | <LoD                   | <LoD                   | 97 ± 113                | 54 ± 61                 |
| Ketoprofen            | 44,0       | 66,0       | 125,9 ± 1,7            | 101 ± 4                | 86 ± 3                  | 82 ± 55                 |
| Kyselina salicylová   | 69,4       | 104,1      | 126 ± 5                | 116 ± 3                | 111 ± 2                 | 102 ± 2                 |
| Meloxicam             | 10,4       | 15,6       | 123 ± 8                | 95,7 ± 1,8             | 81 ± 4                  | 79,4 ± 0,9              |
| Moxifloxacin          | 53,0       | 79,4       | 109 ± 10               | 89 ± 5                 | 74 ± 6                  | 68 ± 7                  |
| Nadolol               | 53,4       | 80,1       | 121 ± 3                | 101,9 ± 0,8            | 88,8 ± 1,9              | 88 ± 5                  |
| Naproxen              | 31,8       | 47,7       | 125 ± 6                | 97 ± 6                 | 79 ± 6                  | 73 ± 10                 |
| Norfloxacin           | 35,2       | 52,8       | 122 ± 4                | 95 ± 5                 | 86,4 ± 0,4              | 81,9 ± 1,7              |
| Ofloxacin             | 95,8       | 143,6      | 122,1 ± 1,7            | 93,9 ± 1,7             | 84,5 ± 1,7              | 81,2 ± 1,6              |
| Oxytetracyclin        | 49,7       | 74,6       | 121 ± 7                | 96 ± 7                 | 79 ± 2                  | 79 ± 3                  |
| Pefloxacin            | 38,6       | 57,9       | 118 ± 8                | 90,4 ± 1,2             | 84 ± 4                  | 79,3 ± 0,3              |
| Roxithromycin         | 49,2       | 73,8       | 116 ± 8                | 100 ± 4                | 87 ± 2                  | 91 ± 6                  |
| Sulfacetamid          | 18,2       | 27,3       | 131 ± 6                | 90 ± 6                 | 87 ± 5                  | 77 ± 5                  |
| Sulfadiazin           | 50,2       | 75,3       | 114 ± 9                | 86,1 ± 1,8             | 83 ± 2                  | 82,3 ± 0,8              |
| Sulfadimethoxin       | 8,3        | 12,4       | 93 ± 5                 | 80 ± 3                 | 76 ± 5                  | 69,9 ± 1,4              |
| Sulfamerazin          | 16,4       | 24,6       | 115,7 ± 0,8            | 95,2 ± 1,4             | 82 ± 3                  | 78 ± 3                  |
| Sulfamethazin         | 131,2      | 196,7      | 117,9 ± 0,8            | 98 ± 3                 | 85 ± 2                  | 83 ± 3                  |
| Sulfamethoxazol       | 35,0       | 52,5       | 113 ± 4                | 94,1 ± 1,1             | 83,5 ± 0,2              | 79,2 ± 0,9              |
| Sulfamethoxypyridazin | 21,9       | 32,9       | 90,7 ± 1,7             | 82 ± 4                 | 80,7 ± 0,5              | 78,3 ± 0,9              |
| Sulfapyridin          | 54,9       | 82,4       | 122 ± 9                | 105 ± 10               | 84 ± 6                  | 83 ± 4                  |
| Sulfathiazol          | 20,7       | 31,0       | 102 ± 2                | 85 ± 6                 | 70 ± 4                  | 72 ± 3                  |
| Tetracyclin           | 28,0       | 42,0       | 102 ± 18               | 110 ± 13               | 69 ± 6                  | 80 ± 21                 |
| Trimethoprin          | 88,1       | 132,2      | 122 ± 14               | 98 ± 5                 | 85 ± 3                  | 84 ± 4                  |



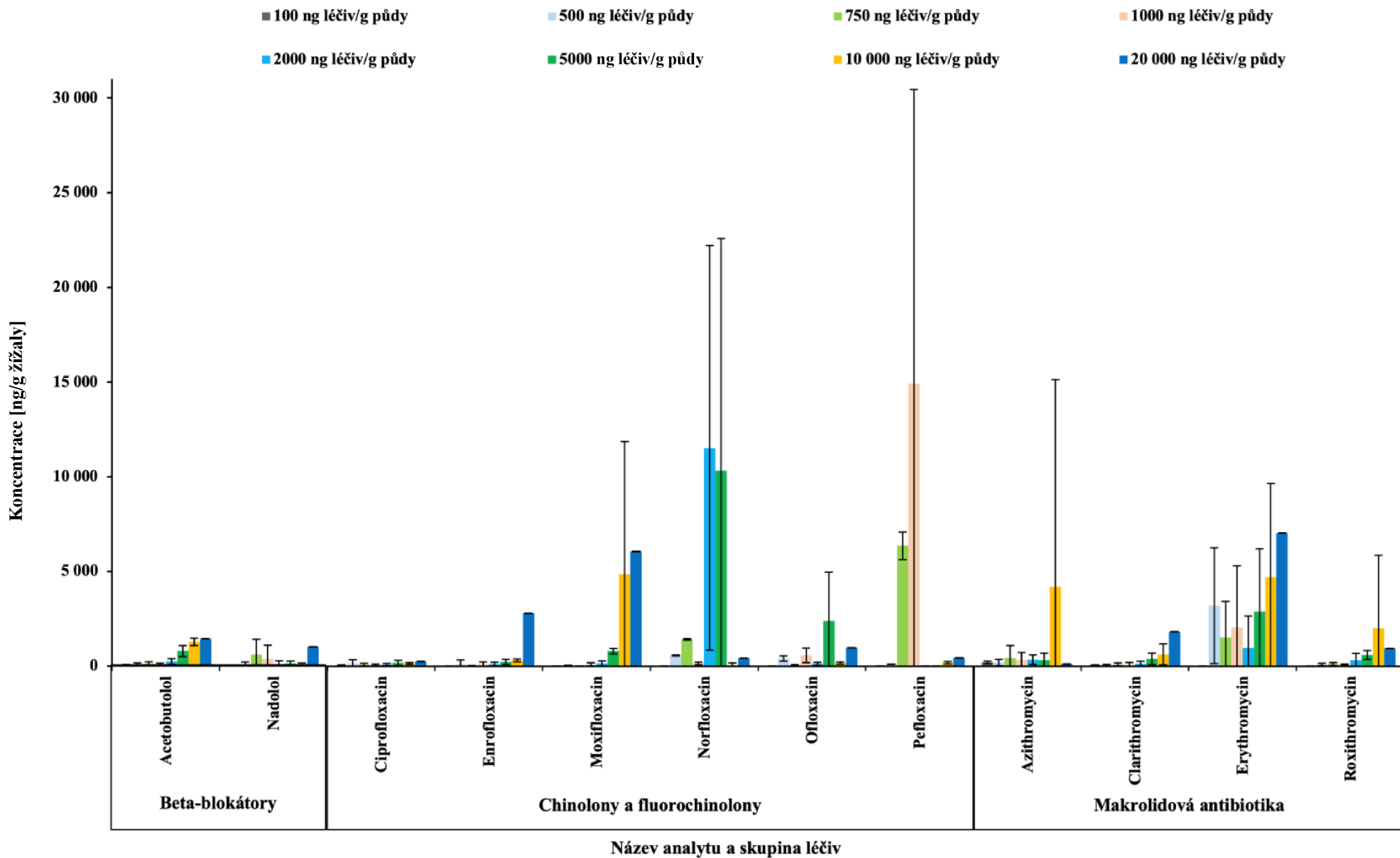
### 4.3 Výsledky vlivu koncentrace léčivých látek v půdě na příjem žížalami hnojními

Optimalizovaný postup (viz kapitola 3.6.2) byl použit pro extrakci léčiv z tkáně žížal v experimentu, kde byl sledován vliv počáteční koncentrace léčiv v půdě na výsledný příjem léčiv žížalami. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu TASQ a kvantifikována prostřednictvím matriční kalibrace z žížal žijících v půdě bez kontaminace léčiv. Jednotlivé naměřené hodnoty obsahu léčiv v žížalách byly přepočítány na 1 g suché (lyofilizované) váhy žížaly (živé žížaly měly průměrnou hmotnost okolo 0,4 g, což odpovídá 0,1 g průměrné váhy lyofilizované žížaly) a pro konkrétní koncentrace zprůměrovány (byly vynechány nulové hodnoty, tedy ty, kde nebyla zjištěna žádná koncentrace). Do grafu byly vyneseny průměrné naměřené hodnoty koncentrace léčiv v žížalách v závislosti na počátečním obsahu léčiv v půdě. Z důvodu přehlednosti byla získaná data rozdělena do dvou grafů (viz Obrázek 17 a Obrázek 18). Pro jednotlivé koncentrace byl také sledován ekotoxikologický vliv, který je shrnut v kapitole 4.6.

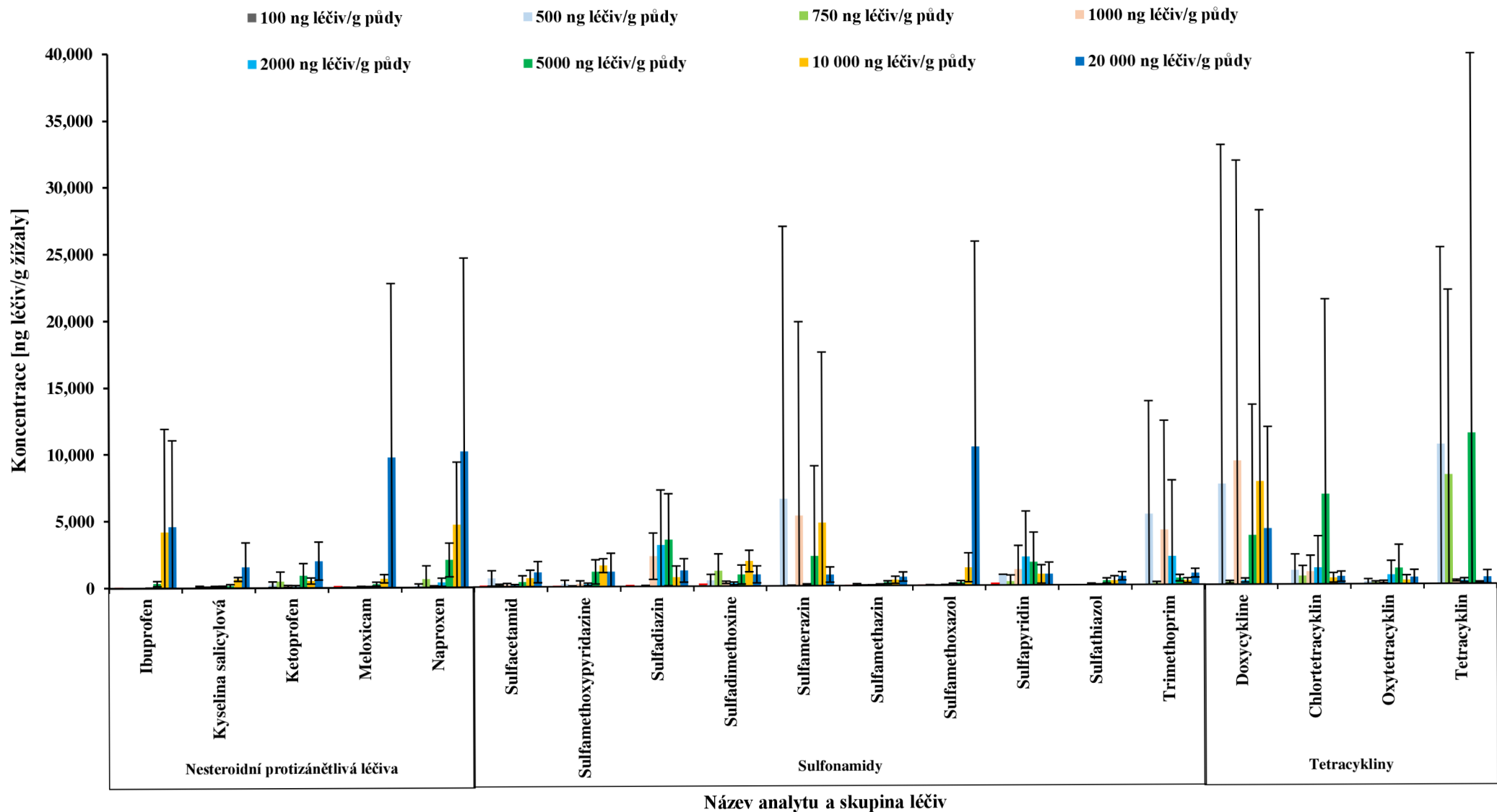
Jednotlivé koncentrace léčiv v půdě byly zvoleny podle již publikovaných studií, kde se koncentrace léčiv pohybovaly v rozmezí 100–5 000 ng léčiv/g půdy, léčiva jako je valsartan [24], karbamazepin, diklofenak, fluoxetin [16], léčiva ze skupiny sulfonamidů, makrolidových antibiotik, beta-lactamů, steroidních hormonů a estrogenů [1]. Zjištěné koncentrace léčiv v životním prostředí se pohybují od jednotek až po desítky ng/g půdy [157], u vody byla zjištěna koncentrace také jednotek až desítek ng/L vody [158,159]. Obsah léčiv ve statkových hnojivech se ovšem může pohybovat až v tisících ng/g [157]. Pro experimenty byly zvoleny i o mnoho vyšší koncentrace (10 000 a 20 000 ng léčiv/g půdy), aby byla lépe pozorována možná závislost příjmu léčiv žížalami.

Podle naměřených hodnot lze obecně říct, že při vyšší koncentraci léčiv v půdě docházelo také k vyššímu příjmu léčiv žížalami. Neplatí to ovšem pro všechna léčiva výjimku může tvořit například erythromycin, pefloxacin nebo léčiva ze skupiny sulfonamidů a tetracyklinů. Protože půda je velmi složitý a komplexní systém, je zde mnoho aspektů, jak mohou být léčiva ovlivňována. Důvodem nejednotné závislosti příjmu léčiv žížalami může být složitost žížal jako biologického systému. Protože žížaly jsou složitý biologický systém a v experimentu byl pouze omezený počet opakování, byly stanoveny poměrně velké směrodatné odchylky. Výsledky také mohly ovlivnit odchylky analýz. V úvahu se musí brát také degradace léčiv vlivem mikrobiální aktivity nebo působením jiných látek vyskytujících se v půdě. V již publikované studii byl prokázán silný vliv typu půdy, kde je důležitý zejména obsah jílu [16]. Ve studii [16] byla použita půda s větším obsahem jílu a je zde předpokládáno, že větší obsah jílu způsobuje pomalejší degradaci léčiv (karbamazepin, diklofenak fluoxetin). Což se v našem provedeném experimentu nepotvrdilo. Půda použitá v našich experimentech obsahovala méně jílu a množství vyextrahovaných léčiv bylo větší než ve zmiňované studii, tudíž je předpokládáno, že léčiva byla degradována pomaleji. To může být zapříčiněno vlastnostmi léčiv, kdy ve studii byla použita jiná léčiva a menší počáteční koncentrace léčiv v půdě než v našem experimentu.

Oproti jiným studiím [1, 16], byly celkově naměřeny vyšší koncentrace. To může být způsobeno zejména použitím jiné půdy, která má jiné fyzikálně chemické vlastnosti anebo již zmíněnými aspekty. Nejméně byly žížalami přijímány léčiva ze skupiny beta-blokátorů oproti tomu nejvíce žížaly přijímaly chinoliny a fluorochinolony, zejména při jejich vyšších koncentracích v půdě. Chinoliny a fluorochinolony patří mezi tzv. kriticky důležitá antibiotika, výsledky tedy jen potvrzují nutnost chránit tato léčiva pro humánní medicínu.



Obrázek 17: Graf koncentrace beta-blokátorů, chinolonů a fluorochinolonů a makrolidových antibiotik v žížalách žijících v půdě s různou koncentrací léčiv



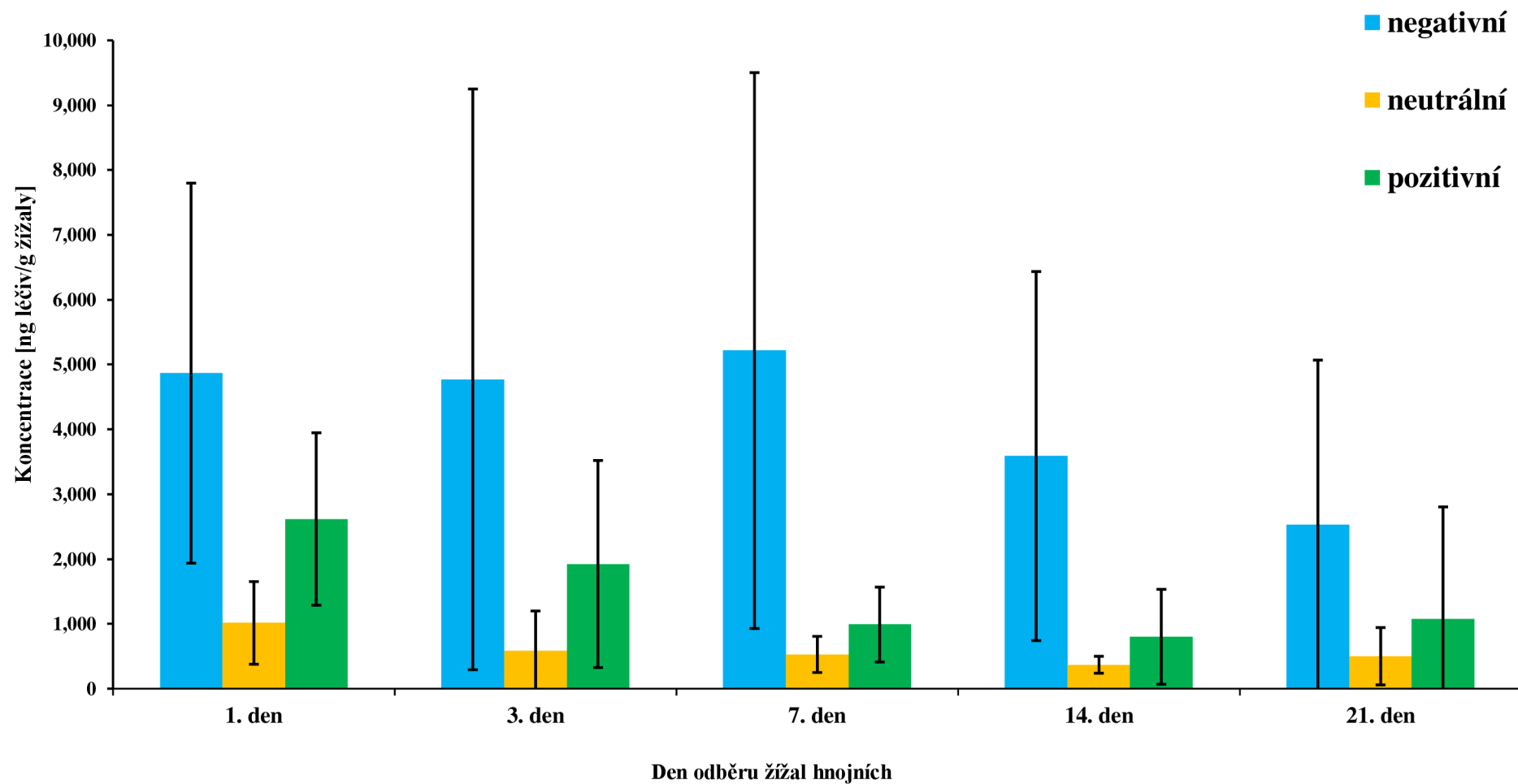
Obrázek 18: Graf koncentrace nesteroidních protizánětlivých léčiv, sulfonamidů a tetracyklinů v žížalách žijících v půdě s různou koncentrací léčiv

#### 4.4 Vliv vlastností léčiv na jejich příjem žížalami hnojními

Pro zjištění vlivu vlastností léčiv na jejich příjem žížalami hnojními byly sledovány tyto parametry: Molární hmotnost ( $M_r$ ), rozdělovací koeficient  $P$  (vyjadřující míru lipofility dané látky a tím i její schopnosti prostupovat biologickými membránami), náboj léčiva při daném pH půdy (pH=6,47).

Po vynesení závislostí koncentrace léčiv v ng/g suché váhy žížal hnojních na molární hmotnosti a na hodnotě rozdělovacího koeficientu  $P$ , nebyla zjištěna konkrétní závislost příjmu léčiv žížalami na těchto dvou parametrech. Nebyly tedy potvrzeny předpoklady z již publikovaných studií [16, 160]. Kde například ve studii [160], byla softwarově predikována závislost příjmu pesticidů na rozdělovacím koeficientu  $P$  a hydrofobicitě. Příjem léčiv žížalami může být ovlivněn více parametry současně nebo i celkovou strukturou samotných léčiv, jejich funkční skupiny a s nimi spojené fyzikálně chemické vlastnosti. Jak již bylo zmíněno v kapitole 4.3 velký vliv budou mít parametry půdy, ve které se žížaly chovaly během experimentu. Nezanedbatelný vliv má obsah jílu a organické hmoty [16]. Svoji roli hraje také mikrobiální aktivita, kdy mikroorganismy přítomné v půdě [151] mohou léčiva degradovat podle různých aspektů, a proto je narušena konkrétní závislost na parametrech jako je molární hmotnost nebo rozdělovací koeficient  $P$ .

U jednotlivých léčiv byl stanoven jejich náboj při pH půdy, ve které byl prováděn experiment. Hodnota pH půdy byla stanovena na 6,47. Pro porovnání byly vyneseny do grafu zprůměrované hodnoty negativně nabitých, neutrálních a pozitivně nabitých léčiv extrahovaných z žížal z druhého experimentu (viz kapitola 3.9). Závislost je zobrazena v grafu na Obrázku 19. V grafu lze pozorovat, že nejvíce žížaly přijímají záporně nabitá léčiva. Jeden z důvodů, proč žížaly přijímají negativně nabitá léčiva, může být díky velkému obsahu kolagenu v jejich kutikule [153], který má izoelektrický bod při pH 7, tedy při pH půdy 6,47 bude mírně kladně nabitý, tudíž bude přitahovat záporně nabitá léčiva.



Obrázek 19: Graf závislosti průměrné koncentrace léčiv v žižalách na základě náboje při pH=6,47

#### 4.5 Výsledky vlivu biouhlu na příjem léčivých látek žížalami hnojními s odběry v čase

Pomocí optimalizovaného postupu (viz kapitola 3.6.2) byly extrahovány žížaly z experimentu pro zjištění vlivu biouhlu a času na příjem léčiv žížalami (viz kapitola 3.9). Naměřená data byla zpracována pomocí programu TASQ a matriční kalibrace z žížal žijících v půdě bez kontaminace léčiv. Jednotlivé naměřené hodnoty obsahu léčiv v žížalách byly přepočítány na 1 g lyofilizované žížaly a pro konkrétní den odběru a druh půdy (s biouhlem a bez biouhlu) zprůměrovány (byly vynechány nulové hodnoty, tedy ty, kde nebyla zjištěna žádná koncentrace). Do grafu byly vyneseny průměrné hodnoty koncentrace léčiv v žížalách v závislosti na dnu odběru a použité půdy. Pro přehlednost byla data rozdělena do dvou grafů (viz Obrázek 20 a Obrázek 21). Data z 21 dne byla využita pro stanovení ekotoxikologického vlivu na žížaly hnojní (viz kapitola 4.6). Pro lepší posouzení vlivu koncentrace biouhlu na příjem léčiv v žížalách byla zvolena vyšší koncentrace léčiv (10 000 ng/g půdy) než se reálně vyskytuje v životním prostředí.

Z naměřených hodnot je patrné, že biouhel snižuje příjem léčiv žížalami. To může být způsobeno sorpcí léčiv na povrch biouhlu. Sorpce léčiv na biouhel může být zapříčiněna vlivem van der Waalsových sil, dále vodíkovými vazbami nebo iontovými interakcemi. Sorpce také závisí na chemické struktuře léčiva, zejména typu funkčních skupin [152].

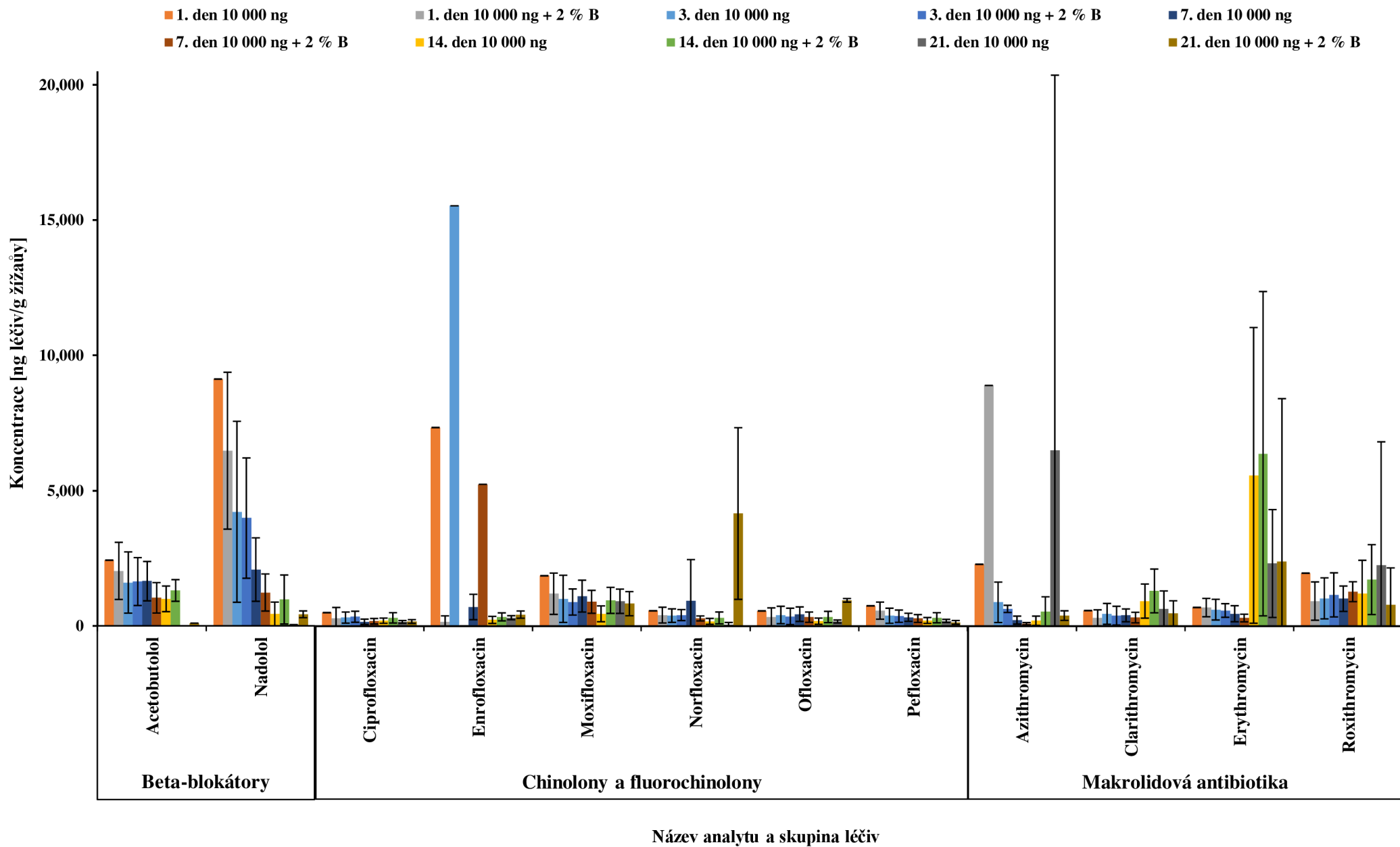
Při využití biouhlu se také musí brát v úvahu riziko obsahu PAH a PCB ve využívaném biouhlu. Při zavedení biouhlu s obsahem kontaminantů jako jsou PAH a PCB [161] může dojít k uvolnění těchto látek do půdy, což opět nese negativní následky. Tato kontaminanty mohou také ovlivňovat život žížal. Při použití vyššího množství biouhlu, by sice došlo k navázání více léčiv na biouhel a tím by se zamezilo distribuci léčiv dál, ale hrozila by vyšší kontaminace znečišťujícími látkami z použitého biouhlu. Při použití biouhlu na pole je doporučováno například 0,5–2 tuny biouhlu/ha [162]. S ohledem na laboratorní experimenty je těžké přenést stejné podmínky jako v aplikacích biouhlu na reálná pole, proto je často volena koncentrace 2 % biouhlu v půdě.

Další negativní aspekt při použití biouhlu, jako sorbentu pro vychytávání léčiv z půdy je fakt, že sorpce léčiv na biouhel může prodlužovat poločas rozpadu léčiv. Ač se tedy s použitím biouhlu zmírní příjem léčiv žížalami, může se zvýšit perzistence (poločas rozpadu) léčiv v půdě.

Z pohledu časového hlediska je příjem léčiv žížalami největší po prvním dni a s časovým nárůstem se příjem léčiv snižuje. Tato časová závislost se prokázala u většiny léčiv, výjimku tvoří například naproxen nebo chlortetrycyn. Jeden z důvodů, proč je největší příjem léčiv žížalami v první dnu a potom příjem klesá, je možná metabolizace přijatých léčiv. Žížaly mohou léčiva metabolizovat na jiné aktivní látky, které mají jinou strukturu a není možné je detekovat jako původní léčiva, která se vyskytovala v půdě. Bohužel nebylo možné studovat výskyt metabolitů léčiv, jelikož je k tomu potřeba vysokorozlišovací technika HR-MS (high resolution mass spectrometry) a potřebný software pro vyhodnocení struktur látek, které vznikly metabolizací léčiv žížalami.

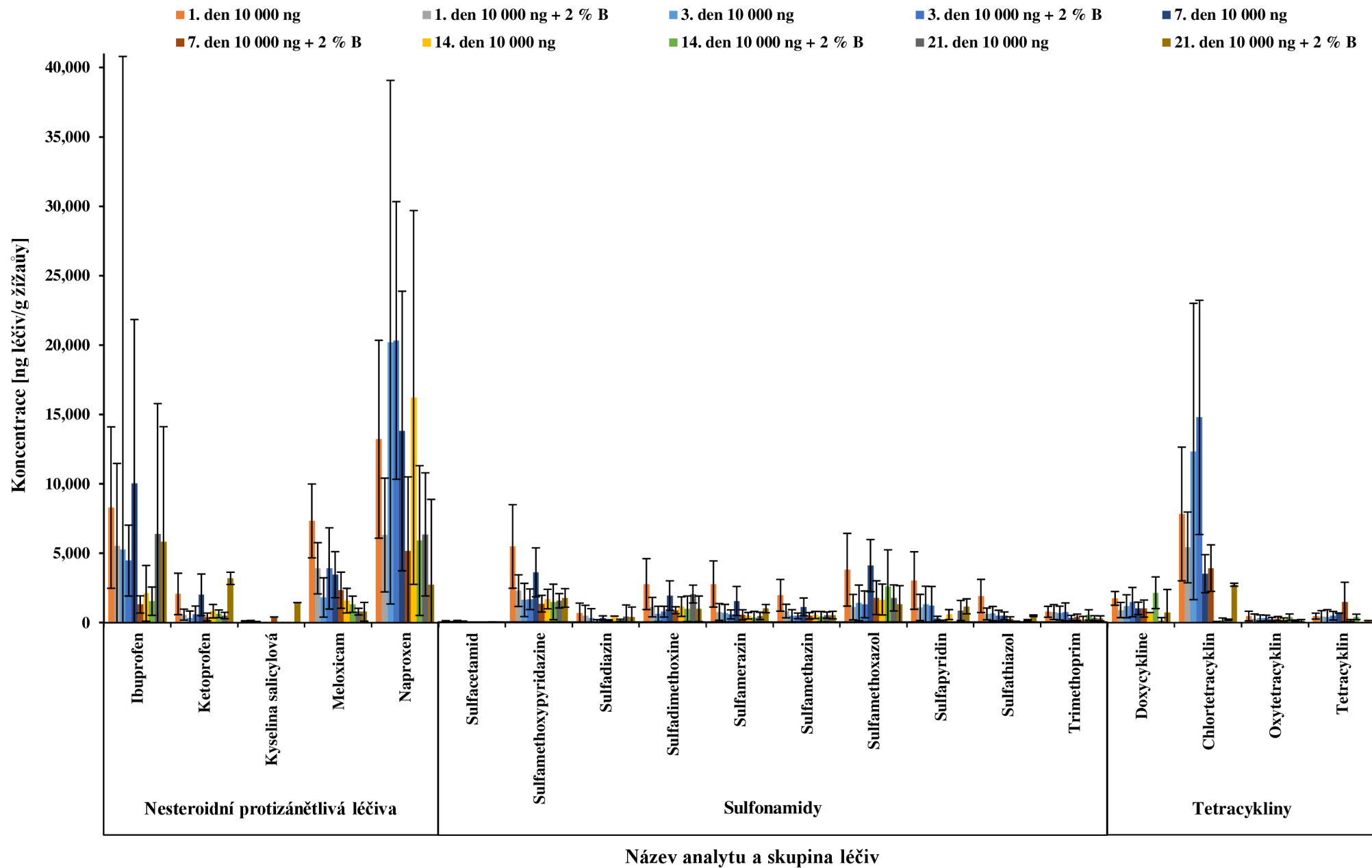
Další možný důvod, proč je obsah léčiv v žížalách největší po jednom dni je, že byly žížaly ponechány před zahájením experimentu a umístěním do půdy s léčivy 1 den na depuraci, kdy jim nebyla podávána žádná potrava (jak je běžné u ekotoxikologických testů). Pokud by žížaly přijímaly léčiva podobným způsobem, jako živiny z potravy, přijaly by jich tedy první den nejvíce, protože byly před experimenty depurovány (1 den) a až jim byla poskytnuta potrava, tak si živiny rychle doplnily a tím přijaly i léčiva z půdy.

S postupem času může také docházet k degradaci, anebo přeměně léčiv přítomných v půdě vlivem aktuálního půdního prostředí, a tím se také snižuje jejich koncentrace. Na degradaci léčiv má vliv zejména obsah organického uhlíku, mikrobiální aktivita [151], typ půdy a vlastnosti samotného léčiva. Osud a degradaci léčivých látek významně ovlivňují sorpční vlastnosti půdy. Bylo dokázáno, že některá léčiva (například naproxen) mají poločas rozpadu v půdě několik jednotek dnů, oproti tomu tetracyklinová antibiotika mají pomalý rozklad (31,5–43,3 dnů [163], zaleží ovšem na parametrech půdy). Další vliv má také obsah a schopnost zadržování vody, která jednak ovlivňuje mikrobiální aktivitu, ale také sorpční schopnosti půdy [164].



Obrázek 20: Graf koncentrace beta-blokátorů, chinolonů a fluorochinolonů a makrolidových antibiotik v žílačích žijících v půdě s biouhlem a bez biouhlu, t(den)=1, 3, 7, 14, 21

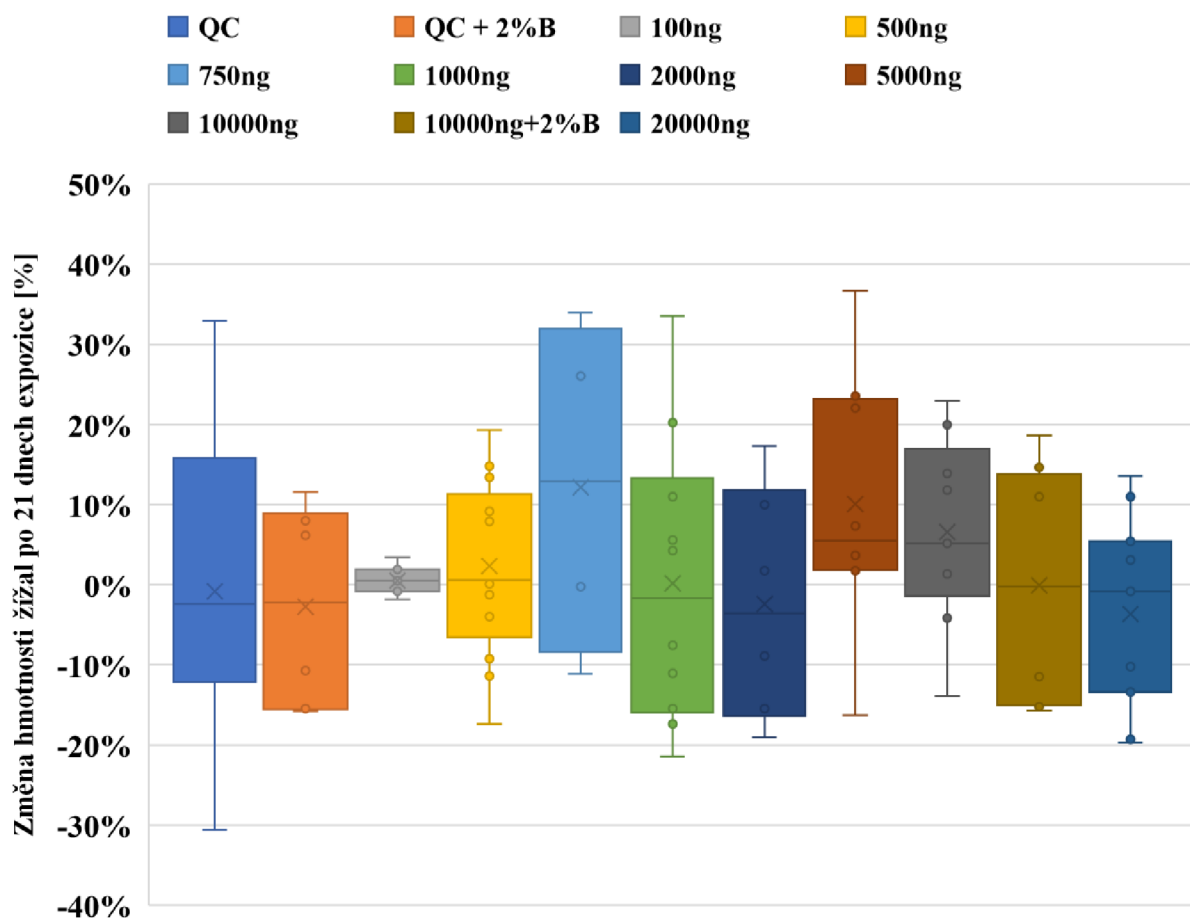




Obrázek 21: Graf koncentrace nesteroidních protizánětlivých léčiv, sulfonamidů a tetracyklinů v žížalách žijících v půdě s biouhlem a bez biouhlu, t(den)=1, 3, 7, 14, 21

#### 4.6 Ekotoxikologie vlivu léčiv na žížaly hnojní

Po 21 dnech expozice žížal hnojních půdě kontaminované léčivy, byla stanovena mortalita a relevantní úbytek hmotnosti žížal. Vzhledem k mortalitě nebyl prokázán statistický význam vlivu léčiv na mortalitu žížal, kdy v provedených experimentech byla mortalita žížal nulová. Ekotoxikologická data hmotnostního úbytku byla vynesena do grafu (viz Obrázek 22). Podle již zmíněného grafu nebyl nalezen významný vliv koncentrace léčiv na hmotnostní změnu žížal hnojních. Jedná se o předběžné výsledky, vzhledem k nižšímu počtu opakování, než je běžné u ekotoxikologického testování.



Obrázek 22: Graf hmotnostního úbytku biomasy žížal hnojních v půdách kontaminovaných léčivy

## 5 ZÁVĚR

Obsahem této bakalářské práce byla problematika spojená s výskytem léčiv v životním prostředí a s ním spojená rizika jako je potenciální přenos aktivních farmakologických látek napříč živočišných systémem pomocí žížal, u kterých bylo hlavním účelem zjistit možný příjem léčiv z kontaminované půdy.

Pro účinnou extrakci 31 léčiv z žížal byla nejprve optimalizována metoda QuEChERS. Výsledná optimalizovaná metoda byla následně validována, byly stanoveny LoD, LoQ a RR při čtyřech různých koncentracích. Za účelem zjištění příjmu léčiv žížalami byly provedeny dva experimenty s žížalami hnojnými a půdou kontaminovanou 31 léčivy. U prvního experimentu byl zkoumán vliv koncentrace léčiv v půdě. Druhý experiment byl zaměřen na vliv biouhlu a časovou závislost množství přijatých léčiv žížalami.

Vzorky žížal byly vždy analyzovány pomocí UHPLC-ESI-TQ pomocí již optimalizované metody.

U prvního experimentu bylo zjištěno, že s narůstající koncentrací léčiv v půdě se zvyšuje i jejich příjem žížalami. U velmi malých koncentrací jako je 100 ng léčiv/g půdy dochází k poměrně malému příjmu oproti tomu u vysokých koncentrací je příjem znatelně vyšší. Výše příjmu záleží i na povaze léčiva, ne u všech léčiv je závislost příjmu léčiv žížalami přímo úměrná rostoucí koncentraci. To může být způsobeno odlišnými fyzikálně chemickými vlastnostmi nebo odlišnou degradací a distribucí léčiv v půdě. Bylo také účelem zjistit, na čem závisí příjem léčiv žížalami. Zde se neprokázala předpokládaná korelace s molekulovou hmotností ani s rozdělovacím koeficientem  $P$ . Celkově lze ovšem říct, že žížaly přijímaly více negativně nabitá léčiva při pH půdy využitá na experimenty oproti těm pozitivně, respektive neutrálně nabitým.

Druhý experiment ukázal, že biouhel má signifikantní vliv na příjem léčiv žížalami. Biouhel váže léčiva na svůj povrch a tím snižuje dostupnou frakci léčiv pro příjem žížalami, a proto je příjem léčiv žížalami menší než v porovnání s příjmem léčiv v půdě bez biouhlu se stejnou koncentrací léčiv. Z pohledu časové závislosti se příjem léčiv žížalami postupem času snižuje. V prvním dnu byla koncentrace léčiv v žížalách největší a s narůstajícím časem klesala. Jedno z vysvětlení, proč tomu tak je, může být metabolizace léčiv žížalami, kde žížaly mohou metabolizovat léčiva na jiné aktivní látky, které nejsme schopni detekovat, jelikož nevíme, na jaké látky jsou léčiva přímo metabolizována.

Příjem léčiv žížalami je poměrně málo prozkoumaná oblast. V budoucnu se lze zaměřit na mnoho aspektů, které mohou ovlivňovat příjem léčiv žížalami, jako je obsah organické hmoty, typ a druh půdy, velikost částic v půdě, přítomnost jiných kontaminantů nebo například způsob krmení. Lze se také zaměřit na konkrétní jednotlivou strukturu léčiv a na zjištění možných metabolitů léčiv, které mohou vznikat během života žížal v půdě s léčivy. Dále by se dalo zaměřit také na to, jakým způsobem žížaly léčiva přijímají, zda se léčiva sorbují na pokožku žížal nebo prostupují přes jejich pokožku či jsou přijímána podobným způsobem jako živiny z potravy.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BERGÉ, Alexandre a Emmanuelle VULLIET, 2015. Development of a method for the analysis of hormones and pharmaceuticals in earthworms by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407(26), 7995-8008. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8972-z
- [2] DÍAZ-CRUZ, M.Silvia, María J. LÓPEZ DE ALDA a Damià BARCELÓ, 2003. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 22(6), 340-351. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-9936(03)00603-4
- [3] Pharmaceutical consumption, 2023. OECDiLibrary [online]. OECD Health Statistics, 2021 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://www.oecd-ilibrary.org/sites/5689c05c-en/index.html?itemId=/content/component/5689c05c-en>
- [4] HAMILTON, Andrew J., Frank STAGNITTI, Xianzhe XIONG, Simone L. KREIDL, Kurt K. BENKE a Peta MAHER, 2007. Wastewater Irrigation: The State of Play. *Vadose Zone Journal*. 6(4), 823-840. ISSN 15391663. Dostupné z: doi:10.2136/vzj2007.0026
- [5] PAYNE, David J., Michael N. GWYNN, David J. HOLMES a David L. POMPLIANO, 2007. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 6(1), 29-40. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd2201
- [6] O'NEILL, Jim. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS: THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. In: Wellcome Collection [online]. 183 Euston Road London NW1 2BE, MAY 2016 [cit. 2023-04-09]. Dostupné z: <https://wellcomecollection.org/works/thvwsuba/items>
- [7] MURRAY, Christopher J L, Kevin Shunji IKUTA, Fablina SHARARA, et al., 2022. *The Lancet*. 399(10325). ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
- [8] COATES, Anthony RM, Gerry HALLS a Yanmin HU, 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same?. *British Journal of Pharmacology* [online]. 163(1), 184-194 [cit. 2023-05-08]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x
- [9] SINGER, Heinz P., Annika E. WÖSSNER, Christa S. MCARDELL a Kathrin FENNER, 2016. Rapid Screening for Exposure to “Non-Target” Pharmaceuticals from Wastewater Effluents by Combining HRMS-Based Suspect Screening and Exposure Modeling. 50(13), 6698-6707. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.5b03332
- [10] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK, 2015. *Farmakochemie* [online]. 3., upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [cit. 2023-01-11]. ISBN 978-80-7080-875-7. Dostupné z: [https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid\\_isbn-978-80-7080-875-7](https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-875-7)
- [11] CYCÓN, Mariusz, Agnieszka MROZIK a Zofia PIOTROWSKA-SEGET, 2019. Antibiotics in the Soil Environment—Degradation and Their Impact on Microbial Activity and Diversity. *Frontiers in Microbiology*. 10. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.00338
- [12] PARENTE, Cláudio ET., Evelyn OLIVEIRA DA SILVA, Sidney Fernandes SALES JÚNIOR, Rachel Ann HAUSER-DAVIS, Olaf MALM, Fábio Veríssimo CORREIA a Enrico Mendes SAGGIORO, 2021. Fluoroquinolone-contaminated poultry litter strongly affects earthworms as verified through lethal and sub-lethal evaluations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 207. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111305

- [13] Antimicrobial resistance: Why is antimicrobial resistance a global concern?, 2021. World Health Organization: Newsroom [online]. WHO, 17 November 2021 [cit. 2023-02-21]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- [14] Státní zdravotní ústav, A EUROPEAN HEALTH INITIATIVE a european centre for disease prevention and control. Antibiotická rezistence – stále větší hrozba pro lidské zdraví [online]. 1 [cit. 2023-02-21]. Dostupné z: [http://www.khskv.cz/Aktualne/EAAD/Antibioticka\\_rezistence\\_hrozba\\_pro\\_lidske\\_zdravi.pdf](http://www.khskv.cz/Aktualne/EAAD/Antibioticka_rezistence_hrozba_pro_lidske_zdravi.pdf)
- [15] MONTEMURRO, Nicola, Joel JOEDICKE a Sandra PÉREZ, 2021. Development and application of a QuEChERS method with liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry for the determination of 50 wastewater-borne pollutants in earthworms exposed through treated wastewater. Chemosphere. 263. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128222
- [16] CARTER, Laura J., Catherine D. GARMAN, James RYAN, Adam DOWLE, Ed BERGSTRÖM, Jane THOMAS-OATES a Alistair B. A. BOXALL, 2014. Fate and Uptake of Pharmaceuticals in Soil–Earthworm Systems. 48(10), 5955-5963. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es500567w
- [17] QuEChERS Sample Preparation Kits Reproducible results, excellent recoveries: QuEChERS sample preparation—now easier, more convenient, and affordable, 2023. ThermoFisher SCIENTIFIC [online]. Czech Republic: Thermo Fisher Scientific [cit. 2023-03-18]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/chromatography/chromatography-sample-preparation/sample-preparation-consumables/quechers-kits.html>
- [18] Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing, 2023. MERCK [online]. Germany: Sigmaaldrich, 2023 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/supelco/52738u?gclid=Cj0KCQiA6fafBhC1ARIsAIjL8lplm4AKctE9myaSkESHkVN4AcTh-XVV3d8CWocSH2e0Vb\\_iUfX9XcaApijEALw\\_wcB&glsrsrc=aw.ds](https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/supelco/52738u?gclid=Cj0KCQiA6fafBhC1ARIsAIjL8lplm4AKctE9myaSkESHkVN4AcTh-XVV3d8CWocSH2e0Vb_iUfX9XcaApijEALw_wcB&glsrsrc=aw.ds)
- [19] QuEChERS Products: Fast, Simple Sample Prep for Multi-Residue Pesticide Analysis, 2009. In: Restek: innovative chromatography solutions [online]. Restek Corporation, 2009 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://d1lqgfmy9cwjff.cloudfront.net/csi/pdf/e/rk53.pdf>
- [20] Supelco: Sorbenty Discovery, 2023. HPST a member of Altium Group [online]. Šlechtitelů 19, 783 71 Olomouc, Česká republika: studio Matosoft, 2023 [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/priprava-vzorku-prislusenstvi/spe-solid-phase-extraction/spe-kolonky/supelco>
- [21] Discovery® DSC-18 SPE Tube, 2023. Merck [online]. Merck [cit. 2023-02-28]. Dostupné z: [https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/substance/discoverydsc18spetube1234598765?gclid=Cj0KCQiA6fafBhC1ARIsAIjL8kw-ysHqmOK4doVq\\_pnY4EOqQU3HdVOixJX19Ng2v5lx5smcGUIyMaAk\\_BEALw\\_wcB&glsrsrc=aw.ds](https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/substance/discoverydsc18spetube1234598765?gclid=Cj0KCQiA6fafBhC1ARIsAIjL8kw-ysHqmOK4doVq_pnY4EOqQU3HdVOixJX19Ng2v5lx5smcGUIyMaAk_BEALw_wcB&glsrsrc=aw.ds)
- [22] Soil quality: Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials (ISO 17402:2008), 2011. 1. the United Kingdom: BSI Standards Publication. ISBN 978 0 580 73156 3.

- [23] Carbon-based sorbents and their nanocomposites for the enrichment of heavy metal ions: a review: Abstract, 2023. Springer Link[online]. Switzerland: Springer Nature Switzerland AG. Part of Springer Nature, 26 July 2019 [cit. 2023-03-02]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-019-3668-2#Abs1>
- [24] GALLEGO, Sara, David NOS, Nicola MONTEMURRO, Juan C. SANCHEZ-HERNANDEZ, Sandra PÉREZ, Montserrat SOLÉ a Fabrice MARTIN-LAURENT, 2021. Ecotoxicological impact of the antihypertensive valsartan on earthworms, extracellular enzymes and soil bacterial communities. *Environmental Pollution*. 275. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2021.116647
- [25] CLOUTIER, Pierre-Luc, Frédéric FORTIN, Paule Emilie GROLEAU, Pauline BROUSSEAU, Michel FOURNIER, Mélanie DESROSIERS a Fabrice MARTIN-LAURENT, 2017. QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDEs and PCDD/Fs in biological samples. *Talanta*. 165, 332-338. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2016.12.080
- [26] MORRISON, Shane A., Kristal K. SIEVE, Robert E. RATAJCZAK, Robert B. BRINGOLF, Jason B. BELDEN, Mélanie DESROSIERS a Fabrice MARTIN-LAURENT, 2016. Simultaneous extraction and cleanup of high-lipid organs from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation. *Talanta*. 146, 16-22. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2015.08.021
- [27] GUIRONNET, Alexandre, Laure WIEST a Emmanuelle VULLIET, 2022. Improvement of the QuEChERS extraction step by matrix-dispersion effect and application on beta-lactams analysis in wastewater sludge by LC-MS/MS. *Talanta*. 237. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2021.122923
- [28] BANERJEE, Shibdas, Shyamalava MAZUMDAR a Emmanuelle VULLIET, 2012. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2012, 1-40. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1155/2012/282574
- [29] SILVA, Vera, Hans G.J. MOL, Paul ZOMER, Marc TIENSTRA, Coen J. RITSEMA a Violette GEISSEN, 2019. Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Science of The Total Environment*. 653, 1532-1545. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.441
- [30] SHIN, Jae min, Su-Jeong CHOI, Young hey PARK, et al., 2022. Comparison of QuEChERS and Liquid–Liquid extraction methods for the simultaneous analysis of pesticide residues using LC-MS/MS. *Food Control*. 141. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2022.109202
- [31] ISLAS, Gabriela, Israel S. IBARRA, Prisciliano HERNANDEZ, Jose M. MIRANDA a Alberto CEPEDA, 2017. Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2017, 1-16. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1155/2017/8215271
- [32] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA, 2021. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [33] ANCUCEANU, Robert, 2003. Maximum Residue Limits of Veterinary Medicinal Products and Their Regulation in European Community Law. *European Law Journal*. 9(2), 215-240. ISSN 1351-5993. Dostupné z: doi:10.1111/1468-0386.00176

- [34] ANCUCEANU, Robert, 2003. Maximum Residue Limits of Veterinary Medicinal Products and Their Regulation in European Community Law. *European Law Journal*. 9(2), 215-240. ISSN 1351-5993. Dostupné z: doi:10.3000/17252555.L\_2009.152
- [35] SMRŽ, Miloslav, 2010. Organická chemie ve farmacii: Úvod do chemie léčiv. In: Informační systém Masarykovy univerzity [online]. Brno, 2010 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/sci/jaro2010/C8790/12325185/FarmPres01.pdf>
- [36] MATTAVELLI, R. Balocco, 2023. Health products policy and standards: INN & Medicines classification. World Health Organization [online]. 20 Avenue Appia 1211, Geneva 27 Switzerland, 2023 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://www.who.int/teams/health-product-and-policy-standards/inn>
- [37] ATC/DDD Index: Updates unclued in the ATC/DDD Index, 2023. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics [online]. Postboks 222 Skøyen 0213 Oslo Norwa, 2023-01-23 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: [https://www.whocc.no/atc\\_ddd\\_index/?code=M01AE01](https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=M01AE01)
- [38] Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) Classification, 2023. World Health Organization [online]. Copyright World Health Organization, 2023 [cit. 2023-03-26]. Dostupné z: <https://www.who.int/tools/atc-ddd-toolkit/atc-classification>
- [39] RAPOSO, Francisco a Damià BARCELÓ, 2021. Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 134 [cit. 2023-05-07]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2020.116068
- [40] BOSCHER, Aurore, Cédric GUIGNARD, Terence PELLET, Lucien HOFFMANN a Torsten BOHN, 2010. Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 1217(41), 6394-6404 [cit. 2023-05-10]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2010.08.024
- [41] DE BAERE, S. a Patrick DE BACKER, 2007. Quantitative determination of amoxicillin in animal feed using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* [online]. 586(1-2), 319-325 [cit. 2023-05-10]. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2006.10.036
- [42] Úřední věstník Evropské unie: Nařízení Komise (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu [online], 2010. In: . České. Lucembursko: Úřad pro publikace Evropské unie, 20. ledna 2010, s. 74 [cit. 2023-05-07]. ISSN 1725-5074. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2010:015:FULL>
- [43] POKLUDOVÁ, Lucie, Lenka MAXOVÁ, Jana WOJTYLOVÁ a Jiří BUREŠ, 2020. SPOTŘEBA ANTIMIKROBIK VE VETERINÁRNÍ MEDICÍNĚ: DETAILNÍ KOMENTOVANÉ SROVNÁNÍ TRENDŮ VE SPOTŘEBÁCH ANTIMIKROBIK V ČESKÉ REPUBLICE [online]. Česká republika [cit. 2023-04-17]. Dostupné z: [https://www.uskvbl.cz/attachments/1529\\_Spotřeba%20antimikrobik%20ve%20veterinárn%C3%AD%20medic%C3%ADně%20v%20ČR%20v%20obdob%C3%AD%202010-2018\\_final.pdf](https://www.uskvbl.cz/attachments/1529_Spotřeba%20antimikrobik%20ve%20veterinárn%C3%AD%20medic%C3%ADně%20v%20ČR%20v%20obdob%C3%AD%202010-2018_final.pdf)
- [44] Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2021: Trends from 2010 to 2021 Twelfth ESVAC report [online], 2022. Twelfth. Domenico Scarlatti 6 1083 HS Amsterdam The Netherlands: European Medicines Agency [cit. 2023-04-08]. ISBN 978-92-9155-069-2. Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2021-trends-2010-2021-twelfth-esvac\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2021-trends-2010-2021-twelfth-esvac_en.pdf)

- [45] ANASTASSIADES, Michelangelo, Steven J LEHOTAY, Darinka ŠTAJNBAHER a Frank J SCHENCK, 2003. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 86(2), 412-431. ISSN 1060-3271. Dostupné z: doi:10.1093/jaoac/86.2.412
- [46] LEHOTAY, Steven J., Alan R. LIGHTFIELD, Jennifer A. HARMAN-FETCHO a Dan J. DONOGHUE, 2001. Analysis of Pesticide Residues in Eggs by Direct Sample Introduction/Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(10), 4589-4596. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf0104836
- [47] ARGAUER, Robert J., Steven J. LEHOTAY a Richard T. BROWN, 1997. Determining Lipophilic Pyrethroids and Chlorinated Hydrocarbons in Fortified Ground Beef Using Ion-Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(10), 3936-3939. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf9701953
- [48] DA SILVA, Josiel José, Bianca Ferreira DA SILVA, Nelson Ramos STRADIOTTO, Mira PETROVIC, Pablo GAGO-FERRERO a Meritxell GROS, 2020. Pressurized Liquid Extraction (PLE) and QuEChERS evaluation for the analysis of antibiotics in agricultural soils. In: *MethodsX* [online]. [cit. 2023-05-16]. ISSN 22150161. Dostupné z: doi:10.1016/j.mex.2020.101171
- [49] PAYÁ, Paula, Michelangelo ANASTASSIADES, Dorothea MACK, Irina SIGALOVA, Bünyamin TASDELEN, José OLIVA a Alberto BARBA, 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389(6), 1697-1714. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-007-1610-7
- [50] HEPPELLE, Julia, Daniela DÖRK, Anja BARTH, Bünyamin TAŞDELEN a Michelangelo ANASTASSIADES, 2015. Studies to Improve the Extraction Yields of Incurred Pesticide Residues from Crops Using the QuEChERS Method. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 98(2), 450-463. ISSN 1060-3271. Dostupné z: doi:10.5740/jaoacint.13-068
- [51] ANASTASSIADES, Michelangelo, Ellen SCHERBAUM, Bünyamin TADELEN a Darinka TAJNBAHER, 2007. Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. *Pesticide Chemistry*. Weinheim, Germany, 439-458. ISBN 9783527611249. Dostupné z: doi:10.1002/9783527611249.ch46
- [52] AOAC Official Method 2007.01: Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate, 03.2007n. 1.. AOAC INTERNATIONAL.
- [53] HUANG, Qin, Hua ZHOU, Xianglun WU, Chenli SONG, Jiangang ZHENG, Meikang LEI, Pengqian MU a Pinggu WU, 2023. Simultaneous determination of the residues of anesthetics and sedatives in fish using LC-QLIT-MS/MS combined with DSPE. *Food Chemistry*. 403. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2022.134407
- [54] MORENO-GONZÁLEZ, David, José F. HUERTAS-PÉREZ, Laura GÁMIZ-GRACIA a Ana M. GARCÍA-CAMPAÑA, 2015. High-Throughput Methodology for the Determination of 33 Carbamates in Herbal Products by UHPLC–MS/MS. *Food Analytical Methods*. 8(8), 2059-2068. ISSN 1936-9751. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-014-9998-0
- [55] VILLAGRASA, M., M. GUILLAMÓN, E. ELJARRAT a D. BARCELÓ, 2007. Matrix effect in liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry analysis of benzoxazinoid derivatives in plant material. *Journal of Chromatography A*. 1157(1-2), 108-114. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.04.040



- [56] MURRAY, Kermit K., M. GUILLAMÓN, E. ELJARRAT a D. BARCELÓ, 2013. Definitions of Terms Relating to Mass Spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Chemistry International*. 35(5), 108-114. ISSN 1365-2192. Dostupné z: doi:10.1515/ci-2013-0516
- [57] CORTESE, Manuela, Maria Rosa GIGLIOBIANCO, Federico MAGNONI, Roberta CENSI a Piera DI MARTINO, 2020. Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. *Molecules*. 25(13). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25133047
- [58] ARIAS, Jean Lucas de Oliveira, Caroline ROMBALDI, Sergiane Souza CALDAS a Ednei Gilberto PRIMEL, 2014. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1360, 66-75. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.07.082
- [59] NGUYEN, Thanh Dong, Eun Mi HAN, Mi Suk SEO, Sa Ra KIM, Mi Young YUN, Dae Myung LEE a Gae-Ho LEE, 2008. A multi-residue method for the determination of 203 pesticides in rice paddies using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 619(1), 67-74. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2008.03.031
- [60] BS EN 15662:2018, 2018. Foods of plant origin. Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE. Modular QuEChERS-method. UK: British Standards Institution.
- [61] CUNHA, B.A., 2006. The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clinical Microbiology and Infection*. 12, 12-24. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01393.x
- [62] KLEIN, JEROME O., 1997. History of macrolide use in pediatrics. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 16(4), 427-431. ISSN 0891-3668. Dostupné z: doi:10.1097/00006454-199704000-00025
- [63] PARNHAM, Michael J., Vesna Erakovic HABER, Evangelos J. GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Gianpaolo PERLETTI, Geert M. VERLEDEN a Robin VOS, 2014. Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. 143(2), 225-245. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.03.003
- [64] YEO, Yee Hui, Sz-Iuan SHIU, Hsiu J HO, Biyao ZOU, Jaw-Town LIN, Ming-Shiang WU, Jyh-Ming LIOU a Chun-Ying WU, 2017. First-line *Helicobacter pylori* eradication therapies in countries with high and low clarithromycin resistance: a systematic review and network meta-analysis. *Gut*. 67(1), 20-27. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2016-311868
- [65] AMSDEN, G. Erythromycin, clarithromycin, and azithromycin: are the differences real?. *Clinical Therapeutics*. 18(1), 56-72. ISSN 01492918. Dostupné z: doi:10.1016/S0149-2918(96)80179-2
- [66] VÁZQUEZ-LASLOP, Nora a Alexander S. MANKIN, 2018. How Macrolide Antibiotics Work. *Trends in Biochemical Sciences*. 43(9), 668-684. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2018.06.011
- [67] PATYRA, Ewelina a Krzysztof KWIATEK, 2021. Comparison of HPLC–DAD and LC–MS Techniques for the Determination of Tetracyclines in Medicated Feeds Using One

- Extraction Protocol. *Chromatographia* [online]. 84(8), 741-749 [cit. 2023-05-10]. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-021-04058-3
- [68] MORITA, Ikuo, 2002. Distinct functions of COX-1 and COX-2. 68-69, 165-175. ISSN 10988823. Dostupné z: doi:10.1016/S0090-6980(02)00029-1
- [69] EPSTEIN, L. a Y. GOLAN, 2012. Fidaxomicin, a new treatment for *Clostridium difficile* infections. *Drugs of Today*. 48(2). ISSN 1699-3993. Dostupné z: doi:10.1358/dot.2012.48.2.1746740
- [70] GHLICHLOO, Ida a Valerie GERRIETS, 2023. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs). National Library of Medicine: National Center of Biotechnology Information [online]. StatPearls Publishing, May 19, 2022 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547742/>
- [71] DO VALE, Gabriel T., Carla S. CERON, Natália A. GONZAGA, Janaina A. SIMPLICIO a Júlio C. PADOVAN, 2019. Three Generations of  $\beta$ -blockers: History, Class Differences and Clinical Applicability. *Current Hypertension Reviews*. 15(1), 22-31. ISSN 15734021. Dostupné z: doi:10.2174/1573402114666180918102735
- [72] STEENEN, Serge A, Arjen J VAN WIJK, Geert JMG VAN DER HEIJDEN, Roos VAN WESTRHENEN, Jan DE LANGE a Ad DE JONGH, 2016. Propranolol for the treatment of anxiety disorders: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Psychopharmacology*. 30(2), 128-139. ISSN 0269-8811. Dostupné z: doi:10.1177/0269881115612236
- [73] GORRE, Frauke a Hans VANDEKERCKHOVE, 2017. Beta-blockers: focus on mechanism of action Which beta-blocker, when and why?. *Acta Cardiologica*. 65(5), 565-570. ISSN 0001-5385. Dostupné z: doi:10.1080/AC.65.5.2056244
- [74] MACHACKOVA, Jarmila, Santosh K. SANGANALMATH, Vijayan ELIMBAN a Naranjan S. DHALLA, 2011. B-adrenergic blockade attenuates cardiac dysfunction and myofibrillar remodelling in congestive heart failure. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 15(3), 545-554. ISSN 15821838. Dostupné z: doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01015.x
- [75] OGBRU, Annette (Gbemudu), 2023. BETA BLOCKERS: WHAT ARE SOME EXAMPLES OF BETA BLOCKERS?. *RxList* [online]. RxList, 4/8/2021 [cit. 2023-04-06]. Dostupné z: [https://www.rxlist.com/beta\\_blockers/drug-class.htm](https://www.rxlist.com/beta_blockers/drug-class.htm)
- [76] MOGLE, Bryan T, Jeffrey M STEELE, Stephen J THOMAS, KarenBeth H BOHAN a Wesley D KUFEL, 2018. Clinical review of delafloxacin: a novel anionic fluoroquinolone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 73(6), 1439-1451. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkx543
- [77] SEYDEL, Joachim K., 1968. Sulfonamides, Structure-Activity Relationship, and Mode of Action. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 57(9), 1455-1478. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.2600570902
- [78] OVUNG, Aben a Jhimli BHATTACHARYYA, 2021. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*. 13(2), 259-272. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-021-00795-9
- [79] SUPURAN, Claudiu, 2017. Special Issue: Sulfonamides. *Molecules*. 22(10). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22101642
- [80] RAMA, Adem, Lorena LUCATELLO, Cristiana BENETTI, Guglielmo GALINA a Drita BAJRAKTARI, 2017. Assessment of antibacterial drug residues in milk for

- consumption in Kosovo. *Journal of Food and Drug Analysis*. **25**(3), 525-532. ISSN 10219498. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfda.2016.07.007
- [81] AWAISHEH, Saddam S., Mohammad S. KHALIFEH, Razan J. RAHAHLEH, Ja'far M. AL-KHAZA'LEH a Rania M. ALGROOM, 2019. Sulfamethazine contamination level and exposure assessment in domestic and imported poultry meats in Jordan. *Veterinary World*. **12**(12), 1992-1997. ISSN 22310916. Dostupné z: doi:10.14202/vetworld.2019.1992-1997
- [82] DAI, Tianhong, Ying-Ying HUANG, Sulbha K. SHARMA, Javad T. HASHMI, Divya B. KURUP a Michael R. HAMBLIN, 2010. Topical Antimicrobials for Burn Wound Infections. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. **5**(2), 124-151. ISSN 1574891X. Dostupné z: doi:10.2174/157489110791233522
- [83] ESHGHI, Hossein, Mohammad RAHIMIZADEH, Mahmood ZOKAEI, Shaghayegh ESHGHI, Shohreh ESHGHI, Zinab FAGHIHI, Elaheh TABASI a Mehdi KIHANYAN, 2011. Synthesis and antimicrobial activity of some new macrocyclic bis-sulfonamide and disulfides. *European Journal of Chemistry*. **2**(1), 47-50. ISSN 2153-2257. Dostupné z: doi:10.5155/eurjchem.2.1.47-50.260
- [84] CHOPRA, Ian a Marilyn ROBERTS, 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **65**(2), 232-260. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
- [85] NELSON, Mark L., Britt H. PARK, Janey S. ANDREWS, Vlasios A. GEORGIAN, Richard C. THOMAS a Stuart B. LEVY, 1993. Inhibition of the tetracycline efflux antiport protein by 13-thio-substituted 5-hydroxy-6-deoxytetracyclines. *Journal of Medicinal Chemistry*. **36**(3), 370-377. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm00055a008
- [86] Azithromycin. National Library of Medicine: PubChem[online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/447043>
- [87] Clarithromycin. National Library of Medicine: PubChem[online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/84029>
- [88] Erythromycin. National Library of Medicine: PubChem[online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12560>
- [89] Rulide. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6915744>
- [90] 2-[(4R,5S,6S,7R,9R,10R,11E,13E,16R)-6-[5-(4,5-dihydroxy-4,6-dimethyloxan-2-yl)oxy-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-10-[5-(dimethylamino)-6-methyloxan-2-yl]oxy-4-hydroxy-5-methoxy-9,16-dimethyl-2-oxo-1-oxacyclohexadeca-11,13-dien-7-yl]acetaldehyde. National Library of Medicine: PubChem[online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6419898>
- [91] Ibuprofen. National Library of Medicine: PubChem[online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3672>

- [92] Ketoprofen. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3825>
- [93] Mefenamic Acid. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4044>
- [94] Meloxicam. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54677470>
- [95] Naproxen. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/156391>
- [96] Celecoxib. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2662>
- [97] Piroxicam. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54676228>
- [98] Acebutolol. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1978/compound/54677470>
- [99] Atenolol. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2249>
- [100] Bisoprolol. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2405/compound/2249>
- [101] Metoprolol. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4171>
- [102] Corgard. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/39147>
- [103] Pindolol. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4828>
- [104] Propranolol. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4946>
- [105] Ciprofloxacin. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2764>
- [106] Enrofloxacin. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71188>

- [107] Moxifloxacin. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/152946>
- [108] Norfloxacin. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4539>
- [109] Ofloxacin. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4583>
- [110] Pefloxacin. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/51081>
- [111] Sulfacetamide. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5320>
- [112] Sulfamethoxypyridazine. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5330>
- [113] Sulfadiazine. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5215>
- [114] Sulfadimethoxine. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5323>
- [115] Sulfamerazine. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5325>
- [116] Sulfamethazine. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5327>
- [117] Sulfamethoxazole. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5329>
- [118] Sulfapyridine. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5336>
- [119] Sulfathiazole. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5340>
- [120] Sulfadiazine. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5215>
- [121] Trimethoprim. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5578>

- [122] Doxycycline. National Library of Medicine: PubChem[online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54671203>
- [123] Chlortetracycline. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675777>
- [124] Minocycline. National Library of Medicine: PubChem[online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675783>
- [125] Oxytetracycline. National Library of Medicine: PubChem [online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675779>
- [126] Tetracycline. National Library of Medicine: PubChem[online]. 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD, 20894 USA, 2023-04-01 [cit. 2023-04-08]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54675776>
- [127] SCHENCK, F. J. a J. E. HOBBS, 2004. Evaluation of the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) Approach to Pesticide Residue Analysis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 73(1), 7995-8008. ISSN 0007-4861. Dostupné z: doi:10.1007/s00128-004-0388-y
- [128] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK, 2014. Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014. Český Těšín: 2 THETA. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [129] CHUANG, Ya-Hui, Yingjie ZHANG, Wei ZHANG, Stephen A. BOYD a Hui LI, 2015. Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables. *Journal of Chromatography A* [online]. 1404, 1-9 [cit. 2023-05-07]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2015.05.022
- [130] SARMAH, Ajit K., Michael T. MEYER a Alistair B.A. BOXALL, 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. 65(5), 725-759. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.026
- [131] BROWN, S. A., 1996. Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 19(1), 1-14. ISSN 0140-7783. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2885.1996.tb00001.x
- [132] Pragolab: QuEChERS [online]. 2023 [cit. 2023-02-07]. Dostupné z: <https://www.pragolab.cz/chromatografie-a-ms/spotrebni-material/priprava-vzorku/quechers-hypersep-dispersive-spe>
- [133] EDWARDS, Clive A., C. A. HENDRIX a P. J. BOHLEN, 1996. Biology and Ecology of Earthworm[online]. Třetí. Velká Británie: St Edmundsbury Press [cit. 2023-02-14]. ISBN 9780387749426. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=ad4rDwD\\_GhsC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cz/books?id=ad4rDwD_GhsC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false)
- [134] EDWARDS, Clive A., 2004. Earthworm Ecology [online]. Druhé. United States of America: CRC Press [cit. 2023-02-14]. ISBN 0-8493-1819-X. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=7mHvxY->

1BKsC&pg=PA105&dq=isbn:084931819X&hl=cs&source=gbs\_selected\_pages&cad=3#v=onepage&q&f=true

- [135] BRUINS, Andries P, 1998. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*. 794(1-2), 345-357. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(97)01110-2
- [136] Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC, Ng KF, Suen MW, Tai HL. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev*. 2003;24(1):3-12. PMID: 18568044; PMCID: PMC1853331
- [137] MCMAHON, PHD, Greg, 2023. Types of Ion Detector for Mass Spectrometry. *TechnologyNetwork: Analysis a Separations* [online]. May 4, 2021 [cit. 2023-04-09]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/types-of-ion-detector-for-mass-spectrometry-347890#D1>
- [138] MELLON, F.A., 2003. MASS SPECTROMETRY | Principles and Instrumentation. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 2003, 3739-3749. ISBN 9780122270550. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-227055-X/00746-X
- [139] SCHIEWEK, Ralf, Matthias LORENZ, Ronald GIESE, Klaus BROCKMANN, Thorsten BENTER, Siegmund GÄB a Oliver J. SCHMITZ, 2008. Development of a multipurpose ion source for LC-MS and GC-API MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 392(1-2), 87-96. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-008-2255-x
- [140] LOOS, Glenn, Ann VAN SCHEPDAEL a Deirdre CABOOTER, 2016. Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 374(2079). ISSN 1364-503X. Dostupné z: doi:10.1098/rsta.2015.0366
- [141] FRENCH, Laura. Buyer's Guide: HPLC Pumps, Columns and Detectors: Pumps. *Labcompare: The Buyer's Guid for Laboratory Equipment* [online]. CompareNetworks, June 25, 2021 [cit. 2023-04-10]. Dostupné z: <https://www.labcompare.com/10-Featured-Articles/577167-Buyer-s-Guide-HPLC-Pumps-Columns-and-Detectors>
- [142] PALAMAREVA, M.D., 2005. LIQUID CHROMATOGRAPHY | Principles. *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier, 2005, 112-118. ISBN 9780123693976. Dostupné z: doi:10.1016/B0-12-369397-7/00314-9
- [143] DOLAN, John W. Mobile-Phase Degassing: What, Why, and How. *LCGC: Solutions for Separation Scientists* [online]. July 1, 2014 [cit. 2023-04-10]. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/mobile-phase-degassing-what-why-and-how>
- [144] AL OMARI, Mahmoud M.H., Deema S. JAAFARI, Khaldoun A. AL-SOU'OD a Adnan A. BADWAN, 2014. Moxifloxacin Hydrochloride. Elsevier, 2014, 299-431. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. ISBN 9780128001738. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800173-8.00007-6
- [145] MACHTEJEVAS, SR., Dr. Egidijus, 2023. HPLC Tips & Tricks: Optimizing Injection Volume. Merck [online]. Darmstadt, Germany and/or its affiliates: Merck, 2022 [cit. 2023-04-10]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/optimizing-injection-volume>
- [146] PEDERSEN, Adam F., Rune DIETZ, Christian SONNE, Lan LIU, Aqquallu ROSING-ASVID a Melissa A. MCKINNEY, 2023. Development and validation of a modified QuEChERS method for extracting polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides

- from marine mammal blubber. *Chemosphere*. 312. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2022.137245
- [147] SHERWOOD, Carly A., Ashley EASTHAM, Lik Wee LEE, Jenni RISLER, Hamid MIRZAEI, Jayson A. FALKNER a Daniel B. MARTIN, 2009. Rapid Optimization of MRM-MS Instrument Parameters by Subtle Alteration of Precursor and Product m / z Targets. *Journal of Proteome Research*. 8(7), 3746-3751. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr801122b
- [148] Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect, 2023. European Commission [online]. Brussels: Directorate-General for Communication, 22 December 2005 [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP\\_05\\_1687](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687)
- [149] Making Europe's sewage treatment plants more efficient and circular can help meet zero-pollution targets. European Environment Agency [online]. European Environment Information and Observation Network, 05 Jul 2022 [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://www.eea.europa.eu/highlights/making-europes-sewage-treatment-plants>
- [150] PAYÁ, Paula, Michelangelo ANASTASSIADES, Dorothea MACK, Irina SIGALOVA, Bünyamin TASDELEN, José OLIVA a Alberto BARBA, 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 389(6), 1697-1714 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-007-1610-7
- [151] KAH, Melanie, Sabine BEULKE a Colin D. BROWN, 2007. Factors Influencing Degradation of Pesticides in Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 55(11), 4487-4492 [cit. 2023-05-14]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf0635356
- [152] SOLANKI, Avni a Treavor H. BOYER, 2019. Physical-chemical interactions between pharmaceuticals and biochar in synthetic and real urine. *Chemosphere* [online]. 218, 818-826 [cit. 2023-05-16]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.11.179
- [153] WATSON, M. R., 1958. The chemical composition of earthworm cuticle. *Biochemical Journal* [online]. 68(3), 416-420 [cit. 2023-05-16]. ISSN 0306-3283. Dostupné z: doi:10.1042/bj0680416
- [154] Zajištění jakosti ve forenzní analýze, rozhodovací analýza, legislativní aspekty. In: VŠCHT [online]. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~poustkaj/AMFA%20JH1%20QA.pdf>
- [155] Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, 2011. *Chronicles of Young Scientists* [online]. 2(1), 21-25 [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: doi:10.4103/2229-5186.79345
- [156] ZHI, Dan, Danxing YANG, Yongxin ZHENG, Yuan YANG, Yangzhuo HE, Lin LUO a Yaoyu ZHOU, 2019. Current progress in the adsorption, transport and biodegradation of antibiotics in soil. *Journal of Environmental Management* [online]. 251 [cit. 2023-05-17]. ISSN 03014797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2019.109598
- [157] THIELE-BRUHN, Sören, 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* [online]. 166(2), 145-167 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1436-8730. Dostupné z: doi:10.1002/jpln.200390023



- [158] GUEDES-ALONSO, Rayco, Cristina AFONSO-OLIVARES, Sarah MONTESDEOCA-ESPONDA, Zoraida SOSA-FERRERA a José Juan SANTANA-RODRÍGUEZ, 2013. An assessment of the concentrations of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plants on the island of Gran Canaria (Spain). SpringerPlus [online]. 2(1) [cit. 2023-05-15]. ISSN 2193-1801. Dostupné z: doi:10.1186/2193-1801-2-24
- [159] FRAM, Miranda S. a Kenneth BELITZ, 2011. Occurrence and concentrations of pharmaceutical compounds in groundwater used for public drinking-water supply in California. Science of The Total Environment [online]. 409(18), 3409-3417 [cit. 2023-05-15]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2011.05.053
- [160] GHOSH, Sulekha, Probir Kumar OJHA, Edoardo CARNESECCHI, Anna LOMBARDO, Kunal ROY a Emilio BENFENATI, 2020. Exploring QSAR modeling of toxicity of chemicals on earthworm. Ecotoxicology and Environmental Safety [online]. 190 [cit. 2023-05-16]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2019.110067
- [161] BUSS, Wolfram, Isabel HILBER, Margaret C. GRAHAM a Ondřej MAŠEK, 2022. Composition of PAHs in Biochar and Implications for Biochar Production [online]. 10(20), 6755-6765 [cit. 2023-05-16]. ISSN 2168-0485. Dostupné z: doi:10.1021/acssuschemeng.2c00952
- [162] SCHMIDT, Hans-Peter, Claudia KAMMANN, Nikolas HAGEMANN, Jens LEIFELD, Thomas D. BUCHELI, Miguel Angel SÁNCHEZ MONEDERO a Maria Luz CAYUELA, 2021. Biochar in agriculture – A systematic review of 26 global meta-analyses. GCB Bioenergy [online]. 13(11), 1708-1730 [cit. 2023-05-16]. ISSN 1757-1693. Dostupné z: doi:10.1111/gcbb.12889
- [163] PAN, Min a L.M. CHU, 2016. Adsorption and degradation of five selected antibiotics in agricultural soil. Science of The Total Environment [online]. 545-546, 48-56 [cit. 2023-05-22]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2015.12.040
- [164] GWOREK, Barbara, Marta KIJENSKA, Justyna WRZOSEK a Magdalena GRANIEWSKA, 2021. Pharmaceuticals in the Soil and Plant Environment: a Review [online]. 232(4) [cit. 2023-05-14]. ISSN 0049-6979. Dostupné z: doi:10.1007/s11270-020-04954-8
- [165] HOLATKO, Jiri, Martin BRTNICKY, Adnan MUSTAFA, et al., 2023. Effect of Digestate Modified with Amendments on Soil Health and Plant Biomass under Varying Experimental Durations. Materials [online]. 16(3) [cit. 2023-05-14]. ISSN 1996-1944. Dostupné z: doi:10.3390/ma16031027

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

|          |                                                                                                                                                          |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WHO      | Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)                                                                                              |
| QuEChERS | Rychlé, jednoduché, levné, efektivní, robustní a bezpečné (anglicky <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> )                              |
| INN      | Mezinárodní nechráněný název (anglicky <i>International Nonproprietary Name</i> )                                                                        |
| ATB      | Antibiotika                                                                                                                                              |
| DDD      | Definovaná denní dávka                                                                                                                                   |
| dSPME    | disperzní mikroextrakce na tuhou fázi (anglicky <i>Dispersive solid phase microextraction</i> )                                                          |
| dSPE     | Disperzní extrakce na tuhou fázi (anglicky <i>Dispersive solid phase extraction</i> )                                                                    |
| SPE      | Extrakce na tuhou fázi (anglicky <i>Solid phase extraction</i> )                                                                                         |
| PSA      | Primární sekundární amin                                                                                                                                 |
| GCB      | Grafitizovaný uhlík (anglicky <i>Graphitized carbon black</i> )                                                                                          |
| EDTA     | Kyselina ethylendiamintetraoctová                                                                                                                        |
| PCB      | Polychlorované bifenyly                                                                                                                                  |
| PBT      | Perzistentní, bioakumulativní a toxické látky                                                                                                            |
| PBDE     | Polybromované difenyletery                                                                                                                               |
| LC-MS/MS | Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií                                                                                          |
| GC-MS/MS | Plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií                                                                                             |
| GC-HRMS  | Plynová chromatografie s tandemovou vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií (anglicky <i>Gas chromatography – high resolution mass spectrometry</i> ) |
| CAD      | Nábojový aerosolový detektor (anglicky <i>Charge aerosol detector</i> )                                                                                  |
| ELSD     | Detektor s odpařovacím rozptylem světla (anglicky <i>Evaporative light scattering detector</i> )                                                         |
| APCI     | Chemická ionizace za atmosférického tlaku (anglicky <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> )                                                    |
| APPI     | Fotoionizace za atmosférického tlaku (anglicky <i>Atmospheric pressure photoionization</i> )                                                             |
| APLI     | Ionizace laserem za atmosférického tlaku (anglicky <i>Atmospheric pressure laser ionization</i> )                                                        |
| EM       | Elektronásobič (anglicky <i>Electron multiplier</i> )                                                                                                    |
| FC       | Faradayovy nálevky (anglicky <i>Faraday cup</i> )                                                                                                        |
| QQQ, QqQ | Trojité kvadrupól                                                                                                                                        |
| IT       | Iontová past (anglicky <i>Ion trap</i> )                                                                                                                 |
| LoQ      | Limit kvantifikace (anglicky <i>Limit of quantification</i> )                                                                                            |
| LoD      | Limit detekce (anglicky <i>Limit of detection</i> )                                                                                                      |

|       |                                                                                                              |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HPLC  | Vysokoučinná kapalinová chromatografie                                                                       |
| UHPLC | Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (anglicky <i>Ultra high performance liquid chromatography</i> ) |
| N.D.  | Není stanoveno (anglicky <i>Not determined</i> )                                                             |
| MWHC  | Maximální vodní sorpční kapacita (anglicky <i>Maximum water-holding capacity</i> )                           |

## 8 SEZNAM PŘÍLOH

Tabulka 16: Parametry použité půdy I

| Parametry půdy |                  |                     |                     |          |
|----------------|------------------|---------------------|---------------------|----------|
| Vodný výluh    |                  |                     |                     |          |
| pH             | Vodivost [mS/cm] | Organická hmota [%] | Organický uhlík [%] | MHWC [%] |
| 6,47           | 0,287            | 5,12                | 2,98                | 44,0     |

Tabulka 17: Parametry použité půdy II

| Parametry půdy    |                        |            |           |            |            |                          |                                      |                                       |
|-------------------|------------------------|------------|-----------|------------|------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Vodný výluh       |                        |            |           |            |            |                          |                                      |                                       |
| Celkový dusík [%] | Celkový fosfor [mg/kg] | Na [mg/kg] | K [mg/kg] | Ca [mg/kg] | Mg [mg/kg] | NH <sup>4+</sup> [mg/kg] | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg/kg] | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg/kg] |
| 12,80             | 46,69                  | 44,96      | 135,83    | 388,24     | 57,13      | 6,77                     | 188,95                               | 194,21                                |
| Kyselinový výluh  |                        |            |           |            |            |                          |                                      |                                       |
| Celkový dusík [%] | Celkový fosfor [mg/kg] | Na [mg/kg] | K [mg/kg] | Ca [mg/kg] | Mg [mg/kg] | NH <sup>4+</sup> [mg/kg] | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> [mg/kg] | PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg/kg] |
| -                 | 2822,40                | 87,08      | 1594,18   | 388,24     | 1594,18    | 89,57                    | -                                    | 1972,79                               |

Tabulka 18: Vlastnosti biouhlu [165]

| Parametry biouhlu        |       |
|--------------------------|-------|
| Obsah sušiny [%]         | 65-75 |
| BET [m <sup>2</sup> /g]  | 289   |
| Ash <sub>550°C</sub> [%] | 11,7  |
| Celkový dusík [g/kg]     | 13,2  |
| Celkový uhlík [g/kg]     | 866   |
| Organický uhlík [g/kg]   | 74    |
| P [g/kg]                 | 6,2   |
| K [g/kg]                 | 24,4  |
| Ca [g/kg]                | 8,1   |
| Mg [g/kg]                | 6,7   |

Tabulka 19: Výťažnost různých rozpouštědel (směsi rozpouštědel) při optimalizaci extrakce

| Skupina léčiv                     | Název analytu          | Směs [%]      | MeOH [%]      | ACN [%]        | EA [%]       |
|-----------------------------------|------------------------|---------------|---------------|----------------|--------------|
| Beta-blokátory                    | Acetobutolol           | 79 ± 12       | 94 ± 5        | 92 ± 4         | 126 ± 36     |
|                                   | Nadolol                | 82 ± 2        | 73,4 ± 0,8    | 69,9 ± 0,2     | 12 ± 10      |
| Chinolony a fluorochinolony       | Ciprofloxacin          | 45 ± 2        | 61,0 ± 0,5    | 20,0 ± 1,6     | 13,36 ± 0,11 |
|                                   | Enrofloxacin           | 63,12 ± 0,11  | 69,8 ± 0,5    | 59,0 ± 0,6     | 34 ± 5       |
|                                   | Moxifloxacin           | 56 ± 3        | 68,5 ± 0,2    | 37 ± 5         | 27 ± 4       |
|                                   | Norfloxacin            | 38,2 ± 0,3    | 59,4 ± 0,3    | 16,4 ± 1,9     | 9,8 ± 0,8    |
|                                   | Ofloxacin              | 51,8 ± 1,5    | 64,16 ± 1,13  | 36,6 ± 0,2     | 0,8 ± 0,9    |
|                                   | Pefloxacin             | 56 ± 4        | 69 ± 5        | 40,880 ± 0,113 | 25,36 ± 0,11 |
| Makrolidová antibiotika           | Azithromycin           | 90,1 ± 0,7    | 212 ± 194     | 88,0 ± 1,6     | 28 ± 8       |
|                                   | Clarithromycin         | 83 ± 4        | 91 ± 5        | 90 ± 8         | 159 ± 48     |
|                                   | Erythromycin           | N.D.          | 104,56 ± 1,02 | 77,7 ± 1,2     | 159 ± 35     |
|                                   | Roxithromycin          | 99 ± 4        | 88 ± 5        | 105 ± 8        | 160 ± 48     |
| Nesteroidní protizánětlivá léčiva | Ibuprofen              | N.D.          | 70 ± 7        | 105 ± 5        | 7 ± 10       |
|                                   | Kyselina salicylová    | 128 ± 4       | 102,2 ± 1,9   | 114 ± 5        | 26 ± 16      |
|                                   | Ketoprofen             | 95 ± 3        | 86,5 ± 1,2    | 84,1 ± 1,2     | 28 ± 6       |
|                                   | Meloxicam              | 93 ± 4        | 85 ± 4        | 93 ± 3         | 15 ± 2       |
|                                   | Naproxen               | 94 ± 7        | 81,1 ± 1,4    | 87 ± 4         | 22 ± 3       |
| Sulfonamidy                       | Sulfacetamid           | 81,7 ± 0,3    | 75 ± 2        | 72 ± 3         | 53 ± 35      |
|                                   | Sulfamethoxyipyridazin | 87,7 ± 2,3    | 81 ± 0        | 96 ± 17        | 140 ± 35     |
|                                   | Sulfadiazin            | 89,4 ± 1,7    | 78,0 ± 0,8    | 86 ± 8         | 112 ± 45     |
|                                   | Sulfadimethoxin        | 93,2 ± 0,6    | 84 ± 2        | 90,64 ± 1,02   | 112 ± 20     |
|                                   | Sulfamerazin           | 93 ± 4        | 82,9 ± 0,2    | 82 ± 25        | 147 ± 39     |
|                                   | Sulfamethazin          | 99,60 ± 1,02  | 86 ± 4        | 76 ± 0         | 5 ± 7        |
|                                   | Sulfamethoxazol        | 92,9 ± 0,3    | 79,4 ± 0,7    | 82 ± 13        | 123 ± 10     |
|                                   | Sulfapyridin           | 93,8 ± 4,3    | 65,9 ± 1,6    | 92 ± 5         | 160 ± 46     |
|                                   | Sulfathiazol           | 75,6 ± 5,5    | 79 ± 3        | 85 ± 3         | 65 ± 2       |
|                                   | Trimethoprim           | 55,5 ± 4,5    | 86 ± 2        | 95 ± 3         | 144 ± 31     |
| Tetracykliny                      | Doxycykline            | N.D.          | N.D.          | N.D.           | N.D.         |
|                                   | Chlortetracyklin       | N.D.          | N.D.          | N.D.           | N.D.         |
|                                   | Oxytetracyklin         | 7,600 ± 0,113 | 41,8 ± 0,7    | N.D.           | 25,2 ± 1,5   |
|                                   | Tetracyklin            | 48,9 ± 0,3    | N.D.          | N.D.           | N.D.         |

Tabulka 20: Výtěžnost různého složení vodné fáze při optimalizaci extrakce

| Skupina léčiv                     | Název analytu         | MQ voda [%] | pH 2,6 [%]    | pH 4 [%]   | pH 6 [%]      | pH 7 [%]   | pH 8 [%]     |
|-----------------------------------|-----------------------|-------------|---------------|------------|---------------|------------|--------------|
| Beta-blokátory                    | Acetobutolol          | 86,2 ± 1,8  | 124,21 ± 1,12 | 91 ± 4     | 88,90 ± 1,16  | 86,2 ± 1,8 | 90,3 ± 1,8   |
|                                   | Nadolol               | 86 ± 5      | 117,6 ± 1,8   | 84 ± 9     | 85,813 ± 1,07 | 86 ± 5     | 85 ± 3       |
| Chinolony a fluorochinolony       | Ciprofloxacin         | 70 ± 3      | 91 ± 3        | 63,2 ± 3   | N.D.          | 61 ± 15    | N.D.         |
|                                   | Enrofloxacin          | 77 ± 2      | 103 ± 4       | 70 ± 7     | 90 ± 41       | 71,3 ± 1,4 | 71 ± 8       |
|                                   | Moxifloxacin          | 64 ± 6      | 108 ± 8       | 53 ± 47    | 77 ± 4        | 64 ± 6     | 80 ± 6       |
|                                   | Norfloxacin           | 67 ± 2      | 105,1 ± 0,7   | 67 ± 6     | 70,720 ± 0,3  | 67 ± 2     | 70,3 ± 0,4   |
|                                   | Ofloxacin             | 115 ± 4     | 145,6 ± 1,7   | 111 ± 10   | 112 ± 5       | 115 ± 4    | 77,2 ± 1,3   |
|                                   | Pefloxacin            | 71,8 ± 1,3  | 98,9 ± 0,6    | 74 ± 4     | 76,267 ± 0,9  | 71,8 ± 1,3 | 77,7 ± 0,6   |
|                                   | Azithromycin          | 94 ± 11     | 139 ± 4       | 141 ± 30   | 62 ± 26       | 94 ± 11    | 85 ± 9       |
| Makrolidová antibiotika           | Clarithromycin        | 85 ± 4      | 101 ± 1       | 73 ± 7     | 79,307 ± 1,6  | 70 ± 3     | 72,6 ± 1,4   |
|                                   | Erythromycin          | 55,3 ± 0,6  | 100 ± 3       | 80 ± 2     | 80 ± 3        | 77 ± 2     | 80,0 ± 1,8   |
|                                   | Roxithromycin         | 79,6 ± 1,9  | 114 ± 6       | 84 ± 13    | 78 ± 5        | 79,6 ± 1,9 | 81 ± 3       |
|                                   | Ibuprofen             | N.D.        | N.D.          | 83,8 ± 1,8 | 68 ± 59       | 0 ± 0      | 34 ± 7       |
| Nesteroidní protizánětlivá léčiva | Kyselina salicylová   | 92 ± 4      | 126 ± 2       | 80 ± 14    | 87 ± 5        | 92 ± 4     | 86 ± 3       |
|                                   | Ketoprofen            | 82,1 ± 1,9  | 106,7 ± 1,8   | 89 ± 9     | 80,8 ± 1,8    | 82,1 ± 1,9 | 85 ± 2       |
|                                   | Meloxicam             | 82,9 ± 1,1  | 119 ± 2       | 88 ± 9     | 81,7 ± 0,5    | 82,9 ± 1,1 | 85 ± 1       |
|                                   | Naproxen              | 81 ± 6      | 100 ± 4       | 84 ± 7     | 77 ± 4        | 81 ± 6     | 84 ± 8       |
|                                   | Sulfacetamid          | 72,5 ± 0,8  | 98 ± 3        | 66 ± 13    | 70,7 ± 1,1    | 72,5 ± 0,8 | 77,01 ± 1,04 |
| Sulfonamidy                       | Sulfamethoxypyridazin | 81 ± 3      | 92,7 ± 1,3    | 86 ± 11    | 79,573 ± 1,09 | 81 ± 3     | 80,5 ± 1,4   |
|                                   | Sulfadiazin           | 79 ± 4      | 91,9 ± 0,9    | 76 ± 8     | 75,3 ± 1,4    | 79 ± 4     | 78,1 ± 1,9   |
|                                   | Sulfadimethoxin       | 81,8 ± 0,9  | 101,1 ± 0,9   | 81 ± 9     | 85 ± 3        | 81,8 ± 0,9 | 85,5 ± 0,9   |
|                                   | Sulfamerazin          | 83 ± 4      | 102 ± 5       | 79 ± 10    | 82 ± 3        | 83 ± 4     | 84,3 ± 1,8   |
|                                   | Sulfamethazin         | 79 ± 3      | 94 ± 3        | 79 ± 10    | 79 ± 4        | 79 ± 3     | 82,0 ± 1,9   |
|                                   | Sulfamethoxazol       | 82 ± 3      | 93 ± 3        | 88 ± 8     | 79 ± 3        | 82 ± 3     | 78 ± 1       |
|                                   | Sulfapyridin          | 80 ± 5      | 95 ± 2        | 87 ± 9     | 78 ± 2        | 80 ± 5     | 80,11 ± 1,07 |
|                                   | Sulfathiazol          | 79 ± 4      | 88,3 ± 1,5    | 74 ± 12    | 77,707 ± 1,7  | 79 ± 4     | 80,0 ± 1,9   |
|                                   | Trimethoprim          | 87 ± 4      | 115,89 ± 1,07 | 97 ± 3     | 88 ± 5        | 87 ± 4     | 94,6 ± 0,7   |
|                                   | Tetracykliny          | Doxycykline | 71,3 ± 1,4    | 74,3 ± 1,5 | 66 ± 6        | 72,3 ± 1   | 62,5 ± 0,7   |
| Chlortetracyklin                  |                       | 61 ± 15     | N.D.          | N.D.       | N.D.          | N.D.       | N.D.         |
| Oxytetracyklin                    |                       | 69 ± 4      | 98 ± 3        | 72 ± 6     | 74 ± 2        | 69 ± 4     | 70,9 ± 1,4   |
| Tetracyklin                       |                       | 117 ± 14    | 112 ± 3       | 73 ± 5     | 67 ± 6        | 117 ± 14   | 50 ± 28      |

Tabulka 21: Výťažnosť různých navážek EDTA při optimalizaci extrakce

| Skupina léčiv                     | Název analytu         | 0 mg EDTA [%] | 10 mg EDTA [%] | 20 mg EDTA [%] | 30 mg EDTA [%] |
|-----------------------------------|-----------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| Beta-blokátory                    | Acetobutolol          | 140 ± 5       | 88 ± 6         | 83,7 ± 0,3     | 86,4 ± 1,7     |
|                                   | Nadolol               | 135 ± 4       | 100 ± 24       | 81,8 ± 1,8     | 79,4 ± 0,4     |
| Chinolony a fluorochinolony       | Ciprofloxacin         | 114 ± 7       | 70 ± 8         | 74 ± 7         | 66,1 ± 1,2     |
|                                   | Enrofloxacin          | 120 ± 31      | 80 ± 10        | 76,5 ± 1,9     | 79,5 ± 0,3     |
|                                   | Moxifloxacin          | 130 ± 9       | 71,1 ± 1,4     | 77 ± 5         | 79 ± 3         |
|                                   | Norfloxacin           | 125,4 ± 1,3   | 73 ± 5         | 70,7 ± 1,3     | 71 ± 6         |
|                                   | Ofloxacin             | 169 ± 36      | 110 ± 20       | 95 ± 7         | 108 ± 3        |
|                                   | Pefloxacin            | 117 ± 2       | 78 ± 2         | 72,69 ± 1,07   | 73 ± 3         |
| Makrolidová antibiotika           | Azithromycin          | 138 ± 4       | 83 ± 3         | 84 ± 3         | 82,2 ± 1,9     |
|                                   | Clarithromycin        | 137 ± 3       | 84 ± 1         | 85 ± 3         | 83,9 ± 0,7     |
|                                   | Erythromycin          | 25 ± 3        | 43 ± 11        | 41,49 ± 1,18   | 49 ± 6         |
|                                   | Roxithromycin         | 136 ± 5       | 90 ± 3         | 87,84 ± 1,28   | 85,3 ± 0,6     |
| Nesteroidní protizánětlivá léčiva | Ibuprofen             | 49 ± 20       | 36 ± 6         | 44 ± 10        | 51 ± 45        |
|                                   | Kyselina salicylová   | 153 ± 24      | 112 ± 11       | 100,8 ± 1,3    | 98,3 ± 1,6     |
|                                   | Ketoprofen            | 137 ± 3       | 87 ± 4         | 89 ± 3         | 82 ± 3         |
|                                   | Meloxicam             | 144,91 ± 1,07 | 78 ± 2         | 81 ± 3         | 78,5 ± 0,8     |
|                                   | Naproxen              | 138 ± 16      | 70 ± 6         | 81 ± 11        | 73 ± 5         |
| Sulfonamidy                       | Sulfacetamid          | 125,2 ± 0,7   | 72 ± 2         | 71 ± 4         | 72 ± 8         |
|                                   | Sulfamethoxypyridazin | 136 ± 9       | 80 ± 7         | 80,9 ± 0,8     | 83 ± 5         |
|                                   | Sulfadiazin           | 111,7 ± 0,6   | 73,9 ± 0,7     | 75,15 ± 1,07   | 77,8 ± 1,3     |
|                                   | Sulfadimethoxin       | 131 ± 26      | 88 ± 8         | 85,2 ± 1,7     | 80,48 ± 0,96   |
|                                   | Sulfamerazin          | 134,9 ± 0,8   | 86 ± 6         | 82,6 ± 0,6     | 81,6 ± 0,16    |
|                                   | Sulfamethazin         | 113 ± 38      | 82 ± 6         | 79,2 ± 0,4     | 79,3 ± 0,8     |
|                                   | Sulfamethoxazol       | 115 ± 23      | 77 ± 5         | 77 ± 1         | 79,2 ± 0,16    |
|                                   | Sulfapyridin          | 130 ± 22      | 81,0 ± 1,4     | 79,0 ± 1,5     | 77,3 ± 0,9     |
|                                   | Sulfathiazol          | 127,2 ± 0,6   | 83 ± 9         | 78,6 ± 0,4     | 79 ± 3         |
| Tetracykliny                      | Trimethoprim          | 138 ± 6       | 90 ± 11        | 87 ± 5         | 84 ± 4         |
|                                   | Doxycykline           | 121 ± 2       | 100,3 ± 0,8    | 80 ± 16        | 75 ± 3         |
|                                   | Chlortetracyklin      | 88 ± 17       | 74 ± 11        | 70 ± 3         | 72,1 ± 0,6     |
|                                   | Oxytetracyklin        | 117 ± 2       | 73 ± 5         | 78 ± 13        | 75,2 ± 1,8     |
|                                   | Tetracyklin           | 107 ± 11      | 80 ± 5         | 75 ± 4         | 75 ± 4         |

Tabulka 22: Výťažnost různých způsobů přečištění při optimalizaci extrakce

| Skupina léčiv                     | Název analytu          | 0 mg C18 [%]  | 12,5 mg C18 [%] | 20 mg C18 [%]  | 30 mg C18 [%] | 40 mg C18 [%] | Agilent kit [%] | Thermofisher kit [%] | Zmrazeno [%] |
|-----------------------------------|------------------------|---------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|-----------------|----------------------|--------------|
| Beta-blokátory                    | Acetobutolol           | 118,7 ± 1,8   | 104,1 ± 1,5     | 86,0 ± 1,9     | 97,3 ± 1,3    | 90 ± 4        | 88,64 ± 1,6     | 108 ± 7              | 87 ± 4       |
|                                   | Nadolol                | 98 ± 2        | 99,4 ± 1,6      | 80,5 ± 1,4     | 73,9 ± 0,7    | 85,4 ± 2,0    | 86,8 ± 0,6      | 117 ± 7              | 79,0 ± 0,5   |
| Chinolony a fluorochinolony       | Ciprofloxacin          | 95,0 ± 1,6    | 98 ± 2          | 81,5 ± 1,3     | 67,3 ± 0,8    | 87 ± 2        | 81,1 ± 2,0      | 104,6 ± 0,4          | 61,12 ± 0,64 |
|                                   | Enrofloxacin           | 102,1 ± 0,9   | 96,9 ± 1,8      | 87,1 ± 1,8     | 73,1 ± 1,3    | 87 ± 2        | 57 ± 49         | 100 ± 8              | 117,3 ± 0,6  |
|                                   | Moxifloxacin           | 68 ± 4        | 90 ± 2          | 89 ± 5         | 126 ± 4       | 91,2 ± 1,8    | 85,0 ± 0,7      | 128 ± 8              | 208 ± 10     |
|                                   | Norfloxacin            | 110,1 ± 1,5   | 99,3 ± 0,4      | 89,8 ± 0,3     | 84,3 ± 0,6    | 87 ± 3        | 79,1 ± 1,3      | 116 ± 2              | 81 ± 2       |
|                                   | Ofloxacin              | 97 ± 3        | 99,1 ± 1,7      | 78,5 ± 1,5     | 63,0 ± 0,3    | 73 ± 4        | 79,3 ± 0,8      | 111 ± 4              | 60,9 ± 1,8   |
|                                   | Pefloxacin             | 136,7 ± 1,4   | 99,2 ± 0,6      | 82,187 ± 1,007 | 69,5 ± 1,2    | 90,9 ± 0,1    | 83,2 ± 0,4      | 109 ± 6              | 71,8 ± 1,6   |
| Makrolidová antibiotika           | Azithromycin           | N.D.          | 106 ± 2         | 79,1 ± 0,8     | 96,7 ± 1,3    | 105 ± 1       | 89,4 ± 1,3      | 109 ± 5              | 182 ± 6      |
|                                   | Clarithromycin         | 96 ± 2        | 102 ± 5         | 74 ± 4         | 72,5 ± 1,2    | 87 ± 4        | 84 ± 3          | 111 ± 3              | 60,2 ± 0,8   |
|                                   | Erythromycin           | 0 ± 0         | 78 ± 4          | N.D.           | 51 ± 3        | N.D.          | N.D.            | N.D.                 | 73,81 ± 0,18 |
|                                   | Roxithromycin          | 118,4 ± 0,3   | 97,5 ± 0,5      | 80 ± 4         | 70,8 ± 0,3    | 88,0 ± 1,2    | 84 ± 3          | 124 ± 6              | 59,0 ± 0,3   |
| Nesteroidní protizánětlivá léčiva | Ibuprofen              | 104 ± 30      | 100 ± 4         | 95 ± 5         | 76 ± 6        | 85 ± 8        | 6 ± 10          | 84 ± 12              | 57 ± 7       |
|                                   | Kyselina salicylová    | 99 ± 5        | 95 ± 4          | 90 ± 4         | 85,41 ± 1,04  | 90,1 ± 0,8    | 75,1 ± 1,8      | 118 ± 3              | 69,8 ± 1,8   |
|                                   | Ketoprofen             | 87 ± 3        | 99,1 ± 1,3      | 81 ± 3         | 69 ± 2        | 87 ± 3        | 81,8 ± 1,3      | 117 ± 8              | 84,7 ± 1,8   |
|                                   | Meloxicam              | 90 ± 2        | 107 ± 3         | 80,9 ± 1,7     | 72,2 ± 0,9    | 91 ± 0        | 83,4 ± 1,8      | 115,4 ± 1,9          | 61,4 ± 1,5   |
|                                   | Naproxen               | 100 ± 15      | 110 ± 5         | 72 ± 9         | 80 ± 2        | 96 ± 3        | 85 ± 4          | 110 ± 3 ± 5          | 69 ± 3       |
| Sulfonamidy                       | Sulfacetamid           | 72,5 ± 0,8    | 98 ± 3          | 66 ± 13        | 70,7 ± 1,1    | 72,5 ± 0,8    | 77,01 ± 1,04    | 118 ± 5              | 70 ± 2       |
|                                   | Sulfamethoxy pyridazin | 81 ± 3        | 92,7 ± 1,3      | 86 ± 11        | 79,6 ± 1,1    | 81 ± 3        | 80,5 ± 1,4      | 108 ± 5              | 80,1 ± 1,4   |
|                                   | Sulfadiazin            | 79 ± 4        | 91,9 ± 0,9      | 76 ± 8         | 75,3 ± 1,4    | 79 ± 4        | 78,1 ± 1,9      | 106 ± 5              | 75 ± 3       |
|                                   | Sulfadimethoxin        | 81,8 ± 0,9    | 101,1 ± 0,9     | 81 ± 9         | 85 ± 3        | 81,8 ± 0,9    | 85,5 ± 0,9      | 99 ± 4               | 63 ± 3       |
|                                   | Sulfamerazin           | 83 ± 4        | 102 ± 5         | 79 ± 10        | 82 ± 3        | 83 ± 4        | 84,3 ± 1,8      | 99 ± 6               | 66 ± 3       |
|                                   | Sulfamethazin          | 79 ± 3        | 94 ± 3          | 79 ± 10        | 79 ± 4        | 79 ± 3        | 82,0 ± 1,9      | 107 ± 8              | 80 ± 3       |
|                                   | Sulfamethoxazol        | 82 ± 3        | 93 ± 3          | 88 ± 8         | 79 ± 3        | 82 ± 3        | 78 ± 1          | 112 ± 5              | 72,0 ± 1,5   |
|                                   | Sulfapyridin           | 80 ± 5        | 95 ± 2          | 87 ± 9         | 78 ± 2        | 80 ± 5        | 80 ± 1          | 113 ± 7              | 66,7 ± 1,4   |
|                                   | Sulfathiazol           | 79 ± 4        | 88,3 ± 1,5      | 74 ± 12        | 77,707 ± 1,7  | 79 ± 4        | 80,0 ± 1,9      | 111 ± 3              | 68 ± 1       |
| Trimethoprim                      | 87 ± 4                 | 115,89 ± 1,07 | 97 ± 3          | 88 ± 5         | 87 ± 4        | 94,6 ± 0,7    | 113 ± 8         | 74,1 ± 1,9           |              |
| Tetracykliny                      | Doxycykline            | 71,3 ± 1,4    | 74,3 ± 1,5      | 66 ± 6         | 72,3 ± 1      | 62,5 ± 0,7    | 65,0 ± 1,5      | 91 ± 2               | 53,8 ± 1,1   |
|                                   | Chlortetracyklin       | 61 ± 15       | N.D.            | N.D.           | N.D.          | N.D.          | N.D.            | 133 ± 14             | 120 ± 3      |
|                                   | Oxytetracyklin         | 69 ± 4        | 98 ± 3          | 72 ± 6         | 74,400 ± 2    | 69 ± 4        | 70,9 ± 1,4      | 137 ± 9              | 75 ± 2       |
|                                   | Tetracyklin            | 117 ± 14      | 112 ± 3         | 73 ± 5         | 67 ± 6        | 117 ± 14      | 50 ± 28         | 105 ± 7              | N.D.         |



Tabulka 23: Koncentrace léčiv v žížalách v půdě s různou koncentrací léčiv

| Skupina léčiv                        | Název analytu          | 100<br>ng léčiv/g půdy<br>[ng léčiv/g žížaly] | 500<br>ng léčiv/g půdy<br>[ng léčiv/g žížaly] | 750<br>ng léčiv/g půdy<br>[ng léčiv/g žížaly] | 1000<br>ng léčiv/g půdy<br>[ng léčiv/g žížaly] | 2000<br>ng léčiv/g půdy<br>[ng léčiv/g žížaly] | 5000<br>ng léčiv/g půdy<br>[ng léčiv/g žížaly] | 10 000<br>ng léčiv/g půdy<br>[ng léčiv/g žížaly] | 20 000<br>ng léčiv/g půdy<br>[ng léčiv/g žížaly] |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Beta-blokátory                       | Acetobutolol           | 66 ± 22                                       | 89 ± 77                                       | 122 ± 104                                     | 104 ± 51                                       | 242 ± 152                                      | 793 ± 294                                      | 1280 ± 195                                       | 1451 ± 1064                                      |
|                                      | Nadolol                | N.D.                                          | 84 ± 135                                      | 604 ± 809                                     | 388 ± 723                                      | 106 ± 175                                      | 155 ± 109                                      | 97 ± 65                                          | 1027 ± 948                                       |
| Chinolony a<br>fluorochinolony       | Ciprofloxacin          | 44 ± 22                                       | 144 ± 190                                     | 78 ± 70                                       | 70 ± 44                                        | 83 ± 60                                        | 171 ± 135                                      | 137 ± 48                                         | 250 ± 129                                        |
|                                      | Enrofloxacin           | N.D.                                          | 117 ± 207                                     | 17 ± 19                                       | 98 ± 125 84                                    | 109 ± 100                                      | 217 ± 147                                      | 304 ± 75                                         | 2795 ± 3085                                      |
|                                      | Moxifloxacin           | N.D.                                          | 48 ± 0                                        | N.D.                                          | 93 ± 71                                        | 143 ± 137                                      | 788 ± 147                                      | 4851 ± 7013                                      | 6056 ± 9444                                      |
|                                      | Norfloxacin            | N.D.                                          | 565 ± 22                                      | 1415 ± 37                                     | 144 ± 71                                       | 11522 ± 10684                                  | 10314 ± 12267                                  | 71 ± 95                                          | 427 ± 281                                        |
|                                      | Ofloxacin              | N.D.                                          | 400 ± 144                                     | 44 ± 38                                       | 570 ± 386                                      | 120 ± 83                                       | 2384 ± 2575                                    | 163 ± 56                                         | 972 ± 1598                                       |
|                                      | Pefloxacin             | N.D.                                          | 110 ± 0                                       | 6348 ± 729                                    | 14920 ± 15524                                  | N.D.                                           | N.D.                                           | 182 ± 60                                         | 446 ± 322                                        |
| Makrolidová<br>antibiotika           | Azithromycin           | 199 ± 64                                      | 193 ± 167                                     | 422 ± 668                                     | 339 ± 381                                      | 339 ± 151                                      | 314 ± 376                                      | 4176 10956                                       | 115 ± 127                                        |
|                                      | Clarithromycin         | 56 ± 12                                       | 52 ± 44                                       | 91 ± 77                                       | 88 ± 107                                       | 131 ± 122                                      | 383 ± 309                                      | 619 ± 552                                        | 1824 ± 1628                                      |
|                                      | Erythromycin           | N.D.                                          | 3191 ± 3056                                   | 1515 ± 1901                                   | 2051 ± 3242                                    | 959 ± 1687                                     | 2871 ± 3322                                    | 4690 ± 4944                                      | 7020 ± 7436                                      |
|                                      | Roxithromycin          | N.D.                                          | 89 ± 62                                       | 112 ± 77                                      | 80 ± 35                                        | 309 ± 368                                      | 592 ± 232                                      | 2000 ± 3842                                      | 931 ± 336                                        |
| Nesteroidní<br>protizánětlivá léčiva | Ibuprofen              | N.D.                                          | N.D.                                          | N.D.                                          | N.D.                                           | 30 ± 0                                         | 317 ± 189                                      | 4175 ± 7729                                      | 4579 ± 6466                                      |
|                                      | Kyselina salicylová    | N.D.                                          | 86 ± 60                                       | 44 ± 32                                       | 85 ± 51                                        | 94 ± 54                                        | 130 ± 127                                      | 646 ± 148                                        | 1567 ± 1814                                      |
|                                      | Ketoprofen             | N.D.                                          | 240 ± 206                                     | 480 ± 706                                     | 107 ± 73                                       | 88 ± 82                                        | 909 ± 904                                      | 507 ± 229                                        | 2000 ± 1422                                      |
|                                      | Meloxicam              | N.D.                                          | 17 ± 14                                       | 16 ± 11                                       | 55 ± 44                                        | 47 ± 30                                        | 256 ± 142                                      | 655 ± 310                                        | 9737 ± 13020                                     |
|                                      | Naproxen               | N.D.                                          | 124 ± 132                                     | 621 ± 988                                     | 63 ± 45                                        | 377 ± 308                                      | 2042 ± 1263                                    | 4668 ± 4700                                      | 10163 ± 14481                                    |
| Sulfonamidy                          | Sulfacetamid           | 47 ± 6                                        | 647 ± 576                                     | 139 ± 64                                      | 148 ± 119                                      | 105 ± 72                                       | 351 ± 487                                      | 637 ± 614                                        | 1100 ± 794                                       |
|                                      | Sulfamethoxypyridazine | N.D.                                          | 209 ± 277                                     | 41 ± 27                                       | 200 ± 236                                      | 174 ± 94                                       | 1108 ± 906                                     | 1570 ± 517                                       | 1116 ± ±1381                                     |
|                                      | Sulfadiazin            | N.D.                                          | N.D.                                          | 40 ± 38                                       | 2264 ± 1735                                    | 3096 ± 4123                                    | 3493 ± 3444                                    | 692 ± 830                                        | 1188 ± 881                                       |
|                                      | Sulfadimethoxine       | 149 ± 76                                      | 422 ± 464                                     | 1142 ± 1278                                   | 286 ± 88                                       | 200 ± 102                                      | 866 ± 710                                      | 1875 ± 807                                       | 871 ± 636                                        |
|                                      | Sulfamerazin           | N.D.                                          | 6512 ± 20411                                  | 26 ± 22                                       | 5258 ± 14521                                   | 96 ± 54                                        | 2252 ± 6736                                    | 4734 ± 12768                                     | 834 ± 573                                        |
|                                      | Sulfamethazin          | 7 ± 16                                        | 82 ± 64                                       | 28 ± 26                                       | 39 ± 22                                        | 83 ± 38                                        | 244 ± 108                                      | 427 ± 264                                        | 666 ± 343                                        |
|                                      | Sulfamethoxazol        | 10 ± 25                                       | 31 ± 20                                       | 15 ± 15                                       | 35 ± 25                                        | 88 ± 63                                        | 213 ± 135                                      | 1338 ± 1085                                      | 10378 ± 15384                                    |
|                                      | Sulfapyridin           | 127 ± 65                                      | 804 ± 0                                       | 287 ± 469                                     | 1208 ± 1759                                    | 2144 ± 3392                                    | 1724 ± 2229                                    | 822 ± 690                                        | 839 ± 868                                        |
|                                      | Sulfathiazol           | N.D.                                          | N.D.                                          | N.D.                                          | 115 ± 8                                        | 57 ± 0                                         | 313 ± 193                                      | 341 ± 320                                        | 659 ± 309                                        |
| Tetracyklíny                         | Trimethoprim           | N.D.                                          | 5281 ± 8485                                   | 107 ± 114                                     | 4092 ± 8200                                    | 2126 ± 5699                                    | 498 ± 242                                      | 317 ± 177                                        | 868 ± 325                                        |
|                                      | Doxycykline            | N.D.                                          | 7532 ± 25394                                  | 179 ± 98                                      | 9260 ± 22487                                   | 303 ± 154                                      | 3680 ± 9792                                    | 7706 ± 20318                                     | 4186 ± 7616                                      |
|                                      | Chlortetracyklin       | N.D.                                          | 1036 ± 1207                                   | 625 ± 750                                     | 956 ± 1188                                     | 1214 ± 2388                                    | 6732 ± 14610                                   | 481 ± 359                                        | 562 ± 382                                        |
|                                      | Oxytetracyklin         | N.D.                                          | 192 ± 182                                     | 108 ± 89                                      | 150 ± 90                                       | 677 ± 1059                                     | 1180 ± 1758                                    | 299 ± 357                                        | 520 ± 532                                        |
|                                      | Tetracyklin            | N.D.                                          | 10432 ± 14775                                 | 8194 ± 13832                                  | 240 ± 64                                       | 269 ± 142                                      | 11263 ± 28459                                  | 127 ± 35                                         | 516 ± 498                                        |

Tabulka 24: Koncentrace léčiv v žížalách v půdě s 10 000 ng léčiv/g půdy bez biohlu v čase

| Skupina léčiv                     | Analyt                  | 1. den [ng léčiv/g žížaly] | 3. den [ng léčiv/g žížaly] | 7. den [ng léčiv/g žížaly] | 14. den [ng léčiv/g žížaly] | 21. den [ng léčiv/g žížaly] |
|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Beta-blokátory                    | Acetobutolol            | 2427 ± 640                 | 1603 ± 1132                | 1653 ± 728                 | 1000 ± 474                  | N.D.                        |
|                                   | Nadolol                 | 9125 ± 3782                | 4218 ± 3344                | 2082 ± 1173                | 440 ± 439                   | 39 ± 7                      |
| Chinolony a fluorochinolony       | Ciprofloxacin           | 488 ± 340                  | 306 ± 205                  | 151 ± 98                   | 191 ± 96                    | 149 ± 52                    |
|                                   | Enrofloxacin            | 7330 ± 6161                | 15527 ± 0                  | 698 ± 469                  | 221 ± 131                   | 304 ± 75                    |
|                                   | Moxifloxacin            | 1854 ± 869                 | 999 ± 872                  | 1100 ± 589                 | 447 ± 293                   | 911 ± 449                   |
|                                   | Norfloxacin             | 559 ± 284                  | 380 ± 250                  | 928 ± 1523                 | 168 ± 110                   | 48 ± 79                     |
|                                   | Ofloxacin               | 552 ± 231                  | 403 ± 322                  | 433 ± 268                  | 174 ± 114                   | 163 ± 56                    |
|                                   | Pefloxacin              | 739 ± 237                  | 375 ± 278                  | 317 ± 149                  | 200 ± 110                   | 182 ± 60                    |
| Makrolidová antibiotika           | Azithromycin            | 2277 ± 1910                | 872 ± 748                  | 214 ± 148                  | 190 ± 171                   | 6499 ± 13859                |
|                                   | Clarithromycin          | 564 ± 257                  | 443 ± 386                  | 389 ± 235                  | 916 ± 631                   | 632 ± 659                   |
|                                   | Erythromycin            | 681 ± 306                  | 600 ± 383                  | 449 ± 269                  | 5563 ± 5466                 | 2304 ± 1993                 |
|                                   | Roxithromycin           | 1948 ± 474                 | 1017 ± 757                 | 1005 ± 469                 | 1194 ± 1230                 | 2240 ± 4565                 |
| Nesteroidní protizánětlivá léčiva | Ibuprofen               | 8284 ± 5816                | 5279 ± 35513               | 10018 ± 11819              | 2106 ± 2008                 | 6390 ± 9389                 |
|                                   | Ketoprofen              | 2064 ± 1493                | 343 ± 490                  | 1999 ± 1500                | 819 ± 485                   | 511 ± 228                   |
|                                   | Kyselina salicylová     | 95 ± 34                    | 52 ± 30                    | N.D.                       | N.D.                        | N.D.                        |
|                                   | Meloxicam               | 7326 ± 2660                | 1809 ± 1414                | 3449 ± 1659                | 1580 ± 886                  | 787 ± 241                   |
|                                   | Naproxen                | 13211 ± 7128               | 20204 ± 18864              | 13802 ± 10074              | 16220 ± 13468               | 6352 ± 4436                 |
| Sulfonamidy                       | Sulfacetamid            | 93 ± 46                    | 83 ± 71                    | N.D.                       | N.D.                        | 49 ± 0                      |
|                                   | Sulfamethoxyipyridazine | 5481 ± 30111               | 1631 ± 1197                | 3620 ± 1760                | 1694 ± 702                  | 1570 ± 517                  |
|                                   | Sulfadiazin             | 703 ± 702                  | 342 ± 659                  | 334 ± 149                  | 469 ± 0                     | 442 ± 827                   |
|                                   | Sulfadimethoxine        | 2770 ± 1834                | 618 ± 554                  | 1945 ± 1060                | 1149 ± 704                  | 2054 ± 644                  |
|                                   | Sulfamerazin            | 2779 ± 1665                | 682 ± 630                  | 1553 ± 1050                | 494 ± 234                   | 479 ± 265                   |
|                                   | Sulfamethazin           | 1966 ± 1142                | 489 ± 442                  | 1135 ± 637                 | 549 ± 258                   | 535 ± 226                   |
|                                   | Sulfamethoxazol         | 3806 ± 2621                | 1419 ± 1283                | 4105 ± 1878                | 1659 ± 1114                 | 1775 ± 938                  |
|                                   | Sulfapyridin            | 3028 ± 2073                | 1311 ± 1306                | 294 ± 160                  | 578 ± 357                   | 868 ± 723                   |
|                                   | Sulfathiazol            | 1918 ± 1193                | 648 ± 513                  | 482 ± 281                  | 59 ± 41                     | 164 ± 52                    |
| Tetracykliny                      | Trimethoprim            | 779 ± 392                  | 684 ± 498                  | 317 ± 201                  | 221 ± 225                   | 317 ± 177                   |
|                                   | Doxycykline             | 1744 ± 493                 | 1171 ± 832                 | 1020 ± 448                 | 724 ± 0                     | 127 ± 229                   |
|                                   | Chlortetracyklin        | 7823 ± 4818                | 12330 ± 10676              | 3519 ± 1373                | 48 ± 36                     | 208 ± 42                    |
|                                   | Oxytetracyklin          | 470 ± 349                  | 327 ± 223                  | 229 ± 146                  | 223 ± 116                   | 138 ± 45                    |
|                                   | Tetracyklin             | 465 ± 214                  | 413 ± 515                  | 680 ± 9                    | 152 ± 67                    | N.D.                        |

Tabulka 25: Koncentrace léčiv v žířalách v půdě s 10 000 ng léčiv/g půdy s biouhlem v čase

| Skupina léčiv                     | Analyt                 | 1. den [ng léčiv/g žířaly] | 3. den [ng léčiv/g žířaly] | 7. den [ng léčiv/g žířaly] | 14. den [ng léčiv/g žířaly] | 21. den [ng léčiv/g žířaly] |
|-----------------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Beta-blokátory                    | Acetobutolol           | 2033 ± 10561               | 1638 ± 885                 | 1037 ± 563                 | 1309 ± 400                  | 103 ± 0                     |
|                                   | Nadolol                | 6476 ± 2899                | 3985 ± 2224                | 1234 ± 684                 | 976 ± 906                   | 428 ± 125                   |
| Chinolony a fluorochinolony       | ciprofloxacin          | 281 ± 40                   | 338 ± 204                  | 171 ± 102                  | 296 ± 191                   | 162 ± 70                    |
|                                   | enrofloxacin           | 154 ± 217                  | N.D.                       | 5233 ± 0                   | 334 ± 148                   | 417 ± 134                   |
|                                   | Moxifloxacin           | 1188 ± 764                 | 883 ± 483                  | 889 ± 425                  | 942 ± 481                   | 821 ± 446                   |
|                                   | Norfloxacin            | 398 ± 291                  | 401 ± 203                  | 275 ± 92                   | 295 ± 219                   | 4154 ± 3172                 |
|                                   | Ofloxacin              | 334 ± 332                  | 349 ± 304                  | 322 ± 190                  | 329 ± 208                   | 944 ± 67                    |
|                                   | Pefloxacin             | 563 ± 316                  | 358 ± 227                  | 273 ± 145                  | 300 ± 187                   | 129 ± 71                    |
| Makrolidová antibiotika           | Azithromycin           | 8886 ± 0                   | 629 ± 133                  | 78 ± 43                    | 533 ± 543                   | 380 ± 176                   |
|                                   | Clarithromycin         | 295 ± 298                  | 379 ± 347                  | 307 ± 195                  | 1293 ± 809                  | 462 ± 466                   |
|                                   | Erythromycin           | 677 ± 340                  | 569 ± 251                  | 290 ± 141                  | 6365 ± 5993                 | 2382 ± 6017                 |
|                                   | Roxithromycin          | 917 ± 708                  | 1147 ± 814                 | 1264 ± 369                 | 1712 ± 1292                 | 784 ± 1359                  |
| Nesteroidní protizánětlivá léčiva | Ibuprofen              | 5542 ± 5921                | 4468 ± 2555                | 1305 ± 619                 | 1542 ± 1018                 | 5825 ± 18288                |
|                                   | Ketoprofen             | 576 ± 394                  | 602 ± 586                  | 401 ± 284                  | 630 ± 278                   | 3186 ± 443                  |
|                                   | Kyselina salicylová    | 113 ± 39                   | N.D.                       | 405 ± 0                    | N.D.                        | 1441 ± 0                    |
|                                   | Meloxicam              | 3912 ± 18445               | 3900 ± 2927                | 2330 ± 1302                | 1324 ± 582                  | 777 ± 674                   |
|                                   | Naproxen               | 6308 ± 4099                | 20328 ± 10004              | 5164 ± 5334                | 5906 ± 5395                 | 2718 ± 6157                 |
| Sulfonamidy                       | Sulfacetamid           | 48 ± 26                    | 59 ± 44                    | N.D.                       | N.D.                        | 27 ± 0                      |
|                                   | Sulfamethoxypyridazine | 2302 ± 1138                | 1679 ± 741                 | 1361 ± 601                 | 1486 ± 1279                 | 1774 ± 672                  |
|                                   | Sulfadiazin            | 490 ± 755                  | 99 ± 107                   | 169 ± 31                   | 167 ± 76                    | 409 ± 709                   |
|                                   | Sulfadimethoxine       | 1112 ± 703                 | 784 ± 387                  | 889 ± 251                  | 996 ± 919                   | 995 ± 916                   |
|                                   | Sulfamerazin           | 765 ± 605                  | 592 ± 324                  | 560 ± 363                  | 373 ± 437                   | 1005 ± 296                  |
|                                   | Sulfamethazin          | 832 ± 488                  | 483 ± 202                  | 487 ± 235                  | 428 ± 374                   | 540 ± 271                   |
|                                   | Sulfamethoxazol        | 1111 ± 918                 | 1313 ± 964                 | 1793 ± 1218                | 2584 ± 2656                 | 1303 ± 1354                 |
|                                   | Sulfapyridin           | 1087 ± 942                 | 1206 ± 1395                | 115 ± 63                   | N.D.                        | 1169 ± 540                  |
|                                   | Sulfathiazol           | 622 ± 422                  | 490 ± 395                  | 250 ± 167                  | 37 ± 17                     | 492 ± 57                    |
| Trimethoprim                      | 757 ± 536              | 769 ± 647                  | 381 ± 235                  | 550 ± 372                  | 304 ± 181                   |                             |
| Tetracykliny                      | Doxycykline            | 904 ± 548                  | 1470 ± 1058                | 1009 ± 616                 | 2147 ± 1144                 | 738 ± 1650                  |
|                                   | Chlortetracyklin       | 5413 ± 2549                | 14785 ± 8440               | 3921 ± 1679                | 173 ± 157                   | 2728 ± 109                  |
|                                   | Oxytetracyklin         | 274 ± 343                  | 328 ± 205                  | 280 ± 156                  | 388 ± 234                   | 123 ± 94                    |
|                                   | Tetracyklin            | 418 ± 439                  | 494 ± 311                  | 1475 ± 1430                | 409 ± 197                   | 149 ± 0                     |