



Středoškolská technika 2023

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Stanovení reziduí antibiotik v různých typech půd

Nikol Král'ová

Střední průmyslová škola chemická
Vranovská 65, Brno

Anotace

Tato práce se zabývá antimikrobiálními léčivy, konkrétně pak fluorochinolovými antibiotiky, která mimo jiné patří mezi kriticky důležitá antibiotika, dále se zabývá jejich výskytem v životním prostředí, nežádoucími účinky na organismus, kontaminací životního prostředí a rozvojem antibiotické rezistence. Výskyt antibiotických látek v životním prostředí a převážně v půdě je zapříčiněn aplikací kontaminovaného živočišného odpadu jako hnoje, odpadní vody pro zavlažování popřípadě aplikace upravených kalů z čistíren odpadních vod (ČOV). Všechny tyto látky aplikované na půdu mohou být zdrojem reziduí antibiotik v životním prostředí, pokud tomu tak je, může dojít ke kontaminaci půdy antimikrobiálními látkami a obecně léčivy, přítomnost léčiva může následně vést ke vzniku antimikrobiální rezistence, což je velkým a dlouhodobým problémem.

Experimentální část byla zaměřena na extrakci fluorochinolových antibiotik z půd o různých fyzikálních a chemických vlastnostech a posoudit, zda-li mají tyto vlastnosti vliv na extrahovatelnost léčiv z půdy. Léčiva byla z půdy extrahována již prostřednictvím optimalizované multireziduální metody, konkrétně pomocí ultrazvuku s následným zakoncentrováním a přečištěním vzorku prostřednictvím SPE s následnou analytickou koncovkou LC-ESI-MS/MS.

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 8: Ochrana a tvorba životního prostředí



STANOVENÍ REZIDUÍ ANTIBIOTIK V RŮZNÝCH TYPECH PŮD

Nikol Král'ová

Jihomoravský kraj

Brno 2023

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 8: Ochrana a tvorba životního prostředí

STANOVENÍ REZIDUÍ ANTIBIOTIK V RŮZNÝCH TYPECH PŮD DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESIDUES IN DIFFERENT SOIL TYPES

Autorka: Nikol Král'ová

Škola: Střední průmyslová škola chemická Brno, Vranovská 65

Kraj: Jihomoravský kraj

Konzultanti: Ing. Jan Fučík, Mgr. Erik Kalla

Brno 2023

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci psala sama pod vedení Ing. Jana Fučíka a Mgr. Erika Kally, použila jsem pouze podklady a materiály uvedené v seznamu literatury a další nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění. Také prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze SOČ práce jsou shodné.

.....

V Brně dne 30.1.

Nikol Král'ová

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat především Ing. Janu Fučíkovi za umožnění vykonání praktické části, vedení práce, odbornou pomoc a další rady při zpracování a za trpělivost a čas strávený nad mojí prací. Dále velké díky patří Mgr. Eriku Kallovi za veškerou podporu a obdobně za rady při zpracovávání experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí na Vysokém učení technickém v Brně, které mi poskytlo finanční podporu, vybavení, zázemí laboratoří, a veškeré prostředky pro moji práci a v poslední řadě ÚKZÚZ za poskytnutí vzorků půd.

ANOTACE

Tato práce se zabývá antimikrobiálními léčivy, konkrétně pak fluorochinolovými antibiotiky, která mimo jiné patří mezi kriticky důležitá antibiotika, dále se zabývá jejich výskytem v životním prostředí, nežádoucími účinky na organismus, kontaminací životního prostředí a rozvojem antibiotické rezistence. Výskyt antibiotických látek v životním prostředí a převážně v půdě je zapříčiněn aplikací kontaminovaného živočišného odpadu jako hnoje, odpadní vody pro zavlažování popřípadě aplikace upravených kalů z čistíren odpadních vod (ČOV). Všechny tyto látky aplikované na půdu mohou být zdrojem reziduí antibiotik v životním prostředí, pokud tomu tak je, může dojít ke kontaminaci půdy antimikrobiálními látkami a obecně léčivy, přítomnost léčiva může následně vést ke vzniku antimikrobiální rezistence, což je velkým a dlouhodobým problémem.

Experimentální část byla zaměřena na extrakci fluorochinolových antibiotik z půd o různých fyzikálních a chemických vlastnostech a posoudit, zda-li mají tyto vlastnosti vliv na extrahovatelnost léčiv z půdy. Léčiva byla z půdy extrahována již prostřednictvím optimalizované multireziduální metody, konkrétně pomocí ultrazvuku s následným zakoncentrováním a přečištěním vzorku prostřednictvím SPE s následnou analytickou koncovkou LC-ESI-MS/MS.

KLÍČOVÁ SLOVA

Antibiotika, fluorochinolony, půda, kontaminace, antimikrobiální rezistence, extrakce, extrakce na tuhou fázi, kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

ANNOTATION

This thesis deals with antimicrobial drugs, specifically fluoroquinol antibiotics, which are among other critically important antibiotics, and also deals with their occurrence in the environment, adverse effects on organisms, environmental contamination and the development of antibiotic resistance. The occurrence of antibiotic substances in the environment and mainly in the soil is caused by the application of contaminated animal waste such as manure, irrigation wastewater or treated sewage sludge. All of these substances applied to the soil can be a source of antibiotic residues in the environment, if this is the case, the soil can become contaminated with antimicrobials and pharmaceuticals in general, the presence of the drug can then lead to the development of antibiotic resistance, which is a major and long-term problem.

The experimental part was focused on the extraction of fluoroquinol antibiotics from soils with different physical and chemical properties and to assess whether these properties have an effect on the extractability of drugs from soil. Drugs were already extracted from soil by means of an optimized multiresidue method, namely ultrasound followed by concentration and purification of the sample by SPE followed by LC-ESI-MS/MS analytical endpoint.

KEYWORDS

Antibiotics, fluoroquinolones, soil, contamination, antimicrobial resistance, extraction, solid-phase extraction, liquid chromatography-mass spectrometry

OBSAH

| | |
|---|----|
| Teoretická část..... | 2 |
| 1. Antibiotické látky | 11 |
| 1.1. Účinek | 11 |
| 1.2. Použití | 11 |
| 1.3. Rozdělení antibiotik..... | 11 |
| 1.3.1. Podle spektra účinnosti..... | 12 |
| 1.3.2. Podle typu účinku..... | 12 |
| 1.3.3. Podle mechanismu účinku..... | 12 |
| 1.3.4. Kriticky důležitá antibiotika | 13 |
| 1.3.5. Podle chemické struktury | 14 |
| 2. Fluorochinolony/Chinolony | 14 |
| 2.1. Jednotlivé generace fluorochinolonů..... | 14 |
| 2.2. Účinek | 16 |
| 2.2.1. Nežádoucí účinky..... | 16 |
| 2.2.2. Interakce | 17 |
| 2.3. Zástupci..... | 17 |
| 2.3.1. Ciprofloxacin | 17 |
| 2.3.2. Enrofloxacin | 18 |
| 2.3.3. Norfloxacin..... | 19 |
| 2.3.4. Ofloxacin | 19 |
| 2.3.5. Perfloxacin..... | 20 |
| 2.3.6. Moxifloxacin..... | 20 |
| 3. Antibiotická rezistence | 21 |
| 3.1. Příčiny vzniku..... | 21 |
| 3.2. Důsledky | 22 |
| 4. Kontaminace životního prostředí | 22 |
| 4.1. Původ reziduí..... | 22 |
| 4.2. Aplikace odpadní vody a hnoje na zemědělskou půdu..... | 24 |
| 5. Půda | 25 |

| | |
|--|----|
| 5.1. Vznik půdy | 25 |
| 5.2. Složení půd | 25 |
| 5.2.1. Kapalná fáze | 25 |
| 5.2.2. Plynná fáze | 26 |
| 5.3. Vlastnosti půd | 26 |
| 5.3.1. Fyzikální vlastnosti půd..... | 26 |
| 5.3.2. Chemické vlastnosti půd..... | 26 |
| 5.3.3. Vlastnosti půd, které mají vliv na extrahovatelnost léčiv | 26 |
| 5.4. Rozdělení půd | 27 |
| 6. Extrakce | 27 |
| 6.1. Extrakce pevného vzorku kapalinou..... | 27 |
| 6.2. Extrakce na tuhou fázi..... | 28 |
| 6.2.1. Extrakční metoda SPE (solid phase extraction)..... | 28 |
| 6.2.2. Popis kolony | 29 |
| 6.2.3. Jednotlivé kroky extrakce a provedení SPE | 30 |
| 7. Kapalinová chromatografie..... | 31 |
| 7.1. Ultraúčinná kapalinová chromatografie..... | 32 |
| 8. Hmotnostní spektrometrie..... | 33 |
| 8.1. Vakuový systém..... | 33 |
| 8.2. Vstup vzorku | 33 |
| 8.3. Iontový zdroj | 33 |
| 8.3.1. Elektrosprej - elektronová ionizace..... | 34 |
| 8.4. Hmotnostní analyzátor | 34 |
| 8.5. Detektor iontů..... | 34 |
| Experimentální část..... | 26 |
| 1. Použité přístroje..... | 35 |
| 2. Pomůcky | 35 |
| 3. Chemikálie | 35 |
| 3.1. Fyzikálně-chemické parametry použitých půd pro experimentální část..... | 36 |
| 4. Příprava roztoků | 38 |
| 4.1. Roztok amoniaku – 2,5% | 38 |
| 4.2. Roztok dusičnanu hořečnatého - 0,5 g/ml..... | 38 |
| 4.3. McIvaine pufr – pH 8..... | 39 |

| | |
|--|----|
| 4.4. Roztok pufru o pH 3 | 39 |
| 4.4. Roztok kyseliny mravenčí v methanolu – 0,1% | 40 |
| 4.5. Roztok kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitrilu (95:5) – 0,1% | 41 |
| 4.6. Příprava standardu fluorochinolonů o koncentraci 0,1 µg/ml..... | 41 |
| 4.7. Příprava roztoků pro kalibraci | 42 |
| 5. Stanovení fluorochinolonů v půdě..... | 42 |
| 5.1. Slovní popis stanovení fluorochinolonů v půdě | 42 |
| 5.2 Popis stanovení fluorochinolonů v půdě prezentovaný pomocí obrázků | 45 |
| 5.3. Parametry LC-MS/MS metody..... | 47 |
| 6. Výsledky a diskuze | 49 |
| 7. Závěr | 54 |
| 8. Seznam použitých zdrojů..... | 55 |
| 9. Seznam použitých zkratk | 61 |
| 10. Seznam obrázků..... | 62 |

ÚVOD

Obecně je známo, že se v poslední době setkáváme s problémem nadužívání antibiotických látek. Tento problém přetrvává již desetiletí a to nejen u lidí ale i u zvířat. Zvířatům se preventivně podávají antibiotika za účelem rozšířit jejich přírůstky (což je v EU od roku 2006 zakázáno), jako prevenci před onemocněním popřípadě kvůli stimulaci růstu.

Toto nadbytečné a do jisté míry zbytečné podávání antibiotik s sebou nese spoustu rizik. A to z toho důvodu, že antibiotické látky nejsou nikdy v živém organismu na 100 % biotransformovány, část antibiotického léčiva tedy vždy projde trávicím traktem a je vyloučena spolu se střevním obsahem. A jelikož jsou výkaly hospodářských zvířat používány jako hnojivo, dochází tímto způsobem ke kontaminaci půd a vod.

Stejně tak jako u zvířat nedochází ani u lidí k úplné biotransformaci léčiva. Rezidua antibiotik jsou tedy vyloučena, což vede ke kontaminaci vod. Takto kontaminované vody nejsou schopny čistírny odpadních vod vyčistit. Kal z čističek odpadních vod je často používán jako hnojivo, pokud je tedy kal kontaminován léčivem, dojde i ke kontaminaci půdy.

Na této kontaminované půdě jsou pěstovány zemědělské plodiny, které následně obsahují malé koncentrace antibiotických léčiv. Vlivem jejich konzumace člověkem či zvířetem dochází k dlouhodobému přijímání malých dávek antibiotik. Je možné, že může docházet k alteraci střevní mikroflóry a dalšímu rozvoji antimikrobiální rezistence. To je jedním z důvodů rozvoji antibiotické rezistence kromě již zmíněného nadužívání a zbytečného podávání antibiotik domácím zvířatům.

Rostoucí koncentrace léčiv v životním prostředí jsou velkým problémem. Jejich malá koncentrace dokáže stimulovat změnu bakteriálního genomu DNA. Tím se bakterie přizpůsobí danému antibiotickému léčivu a je schopna se v jeho přítomnosti množit a růst. Tomuto jevu se říká antimikrobiální (antibiotická) rezistence. Rezistentní bakterie mohou být velkým zdravím ohrožujícím problémem do budoucna.

Moje práce se zabývá stanovením fluorochinolovými antibiotiky v různých typech půd a v závislosti na výtěžnosti i porovnáním, jak jednotlivé vlastnosti půdy ovlivňují výtěžnost extrakce. Multireziduální analytické metody pro stanovení reziduí antimikrobiálních látek v půdě jsou důležité pro odhalení tzv. hotspot kontaminace, ale také pro posouzení rizika pro životní prostředí, ale i lidské zdraví, vzhledem k pěstovaným potravinám na zemědělské půdě.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Antibiotické látky

Antibiotikum je látka, která se používá u lidí nebo zvířat jako léčivo bakteriální infekce. Jedná se o produkt některých mikroorganismů, ti produkují tyto látky za účelem zahubení jiných bakterií, aby a měly samy více prostoru pro rozmnožování a vlastní kolonie. Antibiotické látky obecně napadají bakterie, narušují jejich strukturu a zabraňují jejich dalšímu množení [1].

Je známo mnoho látek s antibiotickými účinky, nicméně pouze malá skupina z nich je používána jako léčivo ať už ve veterinární nebo v humánní medicíně. Spousta látek s antibiotickými účinky má kromě léčebných účinků i vedlejší, častokrát i toxické účinky [1].

První antibiotika byla přírodního původu a později se začala vyrábět synteticky. Za jejich objevitele prvního přírodního antibiotika je považován Skot Alexandr Fleming a to díky objevení penicilinu roku 1928 [2].

1.1. Účinek

Antibiotika se užívají především proti bakteriálním infekcím, nicméně mnohá z nich jsou účinná i proti prvokům a houbám, nejsou ale absolutně účinná proti virům. Fungují tak, že danou bakterii buď zabíjejí (baktericidní), nebo inhibují její růst (bakteriostatická).

V organismu se chovají tak, že zasahují a poškozují struktury bakterie nikoli pacientovy buněčné struktury. Této schopnosti poškodit především cizorodou bakterii se říká selektivita účinku [3].

1.2. Použití

Kromě toho, že se antibiotika používají jako léčiva v medicíně při bakteriální infekci, někdy se podávají i preventivně, kvůli stimulaci imunitního systému (tzv. antibiotická profylaxe), což není úplně vhodné vzhledem k rozvoji antibiotické rezistence [4].

Nadále se antibiotika začala využívat i v hospodářství. Podáváním jejich malých dávek zvířatům dochází ke zvyšování jejich přírůstků a také ke stimulaci jejich růstu. Kvůli vzniku antibiotické rezistence je výše popsané podávání antibiotik hospodářským zvířatům od roku 2006 v EU zakázané [5].

1.3. Rozdělení antibiotik

Jedná se o velmi rozmanitou skupinu látek, proto můžeme tyto látky klasifikovat na základě různých vlastností:

1.3.1. Podle spektra účinnosti

Antibiotické spektrum je výčet mikrobiálních druhů, které jsou citlivé na působení určitého antibiotika. Lze jej vyjádřit pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC), což je nejnižší koncentrace dané substance, která dokáže zastavit růst příslušného mikroorganismu, nebo prostřednictvím minimální baktericidní koncentrace (MBC), charakterizované jako nejnižší koncentrace dané substance, která způsobí usmrcení příslušného mikroorganismu. Antibiotika se z tohoto pohledu dělí na úzkospektrá a širokospektrá [6].

Úzkospektrá antibiotika léčí cíleněji, tedy útočí pouze na velmi malou a konkrétní skupinu mikroorganismů, a právě z tohoto důvodu jsou mnohem šetrnější k organismu. Antibiotika širokého spektra se naopak zaměřují na širší skupinu mikroorganismů, tedy i na ty mikroorganismy, které jsou pro organismus přirozené. Mohou tedy inhibovat růst pro člověka symbiotických bakterií. Svým účinkem mohou poškodit nejen patogenní buňky, ale i některé ze somatických buněk nacházejících se přirozeně v těle pacienta. To znamená, že mohou mít nežádoucí účinky v podobě zdravotních komplikací [7].

1.3.2. Podle typu účinku

Další možností dělení je podle působení antibiotika na bakterie. Z tohoto hlediska existují dva různé typy antibiotik, baktericidní a bakteriostatická. Baktericidní antibiotikum bakterii zahubí poškozením její buněčné struktury, čímž dojde k rozpadu bakterie. Bakteriostatická zastavují množení bakterie, působí na tvorbu DNA v bakterii – a její buňka ztrácí schopnost se dále dělit [8].

Baktericidní antibiotika působí podstatně rychleji, používají se při závažnějších infekcích. Mezi těmito skupinami není i přes podání vyšší koncentrace léčiva prakticky žádný rozdíl, protože mnoho bakteriostatických antibiotik může působit i baktericidně. Pro rozlišení těchto skupin je podstatný rozdíl mezi koncentrací působící baktericidně a bakteriostaticky [9].

1.3.3. Podle mechanismu účinku

Podle mechanismu účinku se antibiotika diferencují do 4 skupin:

- inhibující syntézu buněčné stěny
- inhibující syntézu bílkovin
- inhibující syntézu nukleových kyselin
- porušují funkci cytoplazmatické membrány [10]

1.3.4. Kriticky důležitá antibiotika

Některá antibiotika jsou Světovou zdravotnickou organizací (WHO) zařazena na seznam kriticky důležitých léčiv. Jelikož jsou používána pouze proti bakteriálním infekcím, na něž už obyčejná antibiotika neúčinkují, a to kvůli vzniklé antibiotické rezistenci [11].

Tato antibiotika jsou následně dělena do skupin podle důležitosti pro lidské zdraví na - kriticky důležitá, vysoce důležitá a důležitá. Kriticky důležitá antibiotika (CIA) jsou nejdůležitějšími antibiotiky pro lidské zdraví, dále se dělí na CIA s nejvyšší prioritou (kategorie 1) a CIA s vysokou prioritou (kategorie 2). Každá z těchto antibiotických látek musí splňovat níže popsaná dvě kritéria, aby mohla být považována za CIA [11, 12].

Kriticky důležité antibiotikum je charakterizované jako léčivo, které je jako jediné (popřípadě jako jedno z mála), účinné proti konkrétní bakteriální infekci. Podmínkou pro zařazení léčiva do CIA je, aby infekce, proti které je antibiotikum účinné, byla způsobena jinou činností než humánní. Alternativou je schopnost bakterie, proti které má antibiotikum působit, získat rezistenci na ostatní antibiotické látky přirozenou cestou, respektive bez humánní činnosti (např. nadužíváním antibiotik) [11, 12].

Je velmi důležité, aby tato antibiotika poslední instance byla i nadále účinná a aby nedošlo ke vzniku rezistence na tato konkrétní léčiva. Na použití těchto léčiv tedy musí být kladena opatření a nesmějí být používána k prevenci jakéhokoli onemocnění nebo k léčbě zvířat. CIA se obvykle používají jako poslední možnost v případech, kdy by žádné jiné antibiotikum nebylo účinné [11, 12].

Skupiny vysoce důležitých a důležitých antibiotik jsou takové skupiny, jejichž předepsání a následná konzumace jsou řízeny pokyny pro bezpečné užívání. Musejí být používána s opatrností, s tím rozdílem, že antibiotikum zařazené mezi vysoce důležitá antibiotika splňuje alespoň jedno z výše uvedených kritérií. Mezi důležitá antibiotika patří pak ostatní léky s antibiotickými účinky [11, 12].

Některé příklady CIA:

- Cefalosporiny 3./ 4. generace.
- Fluorochinolony
- Colistin.

1.3.5. Podle chemické struktury

Další možností dělení antibiotik je na základě složení molekul. Níže jsou uvedena pouze nejzákladnější z nich spolu s chinolony, kterými se bude práce později zabývat.

Typickým příkladem mohou být třeba beta-laktamy, což jsou nejčastěji předepisovaná antibiotika. Dále to mohou být aminoglykosidy, které působí především na gramnegativní bakterie, tetracykliny, které narušují proteosyntézu, chinolony [13, 14].

2. Fluorochinolony/Chinolony

Chinolony jsou látky s antibiotickými účinky čistě syntetického původu, řadí se do skupiny chemoterapeutik. Jsou odvozeny od bicyklické struktury – chinolonu. Jejím postupnou modifikací různými substituenty bylo docíleno specifických vlastností jednotlivých sloučenin, které jsou v současné době používány pro léčebné účely [15, 16].

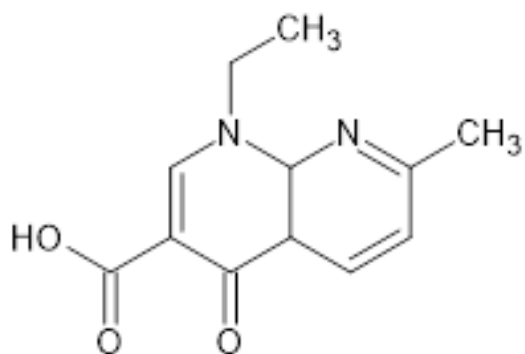
Starší látky tohoto původu (chinolony 1. generace) postrádají v molekule atom fluoru, a byly určeny k léčbě infekcí močových cest. V současné době se však nepoužívají. Novější látky tzv. fluorochinolony (2. až 4. generace) obsahují ve své struktuře atom fluoru. Díky tomu mají širší spektrum účinku a lepší systémovou distribuci. Jejich základní chemickou kostrou je molekula chinolonu [15].

Fluorochinolony patří k nejčastěji a nejhojněji používaným antibiotickým přípravkům z důvodu širokého spektra účinku. Působí aktivně na gramnegativní i grampozitivní bakterie a částečně i na anaerobní bakterie. Mezi další výhody fluorochinolonů můžeme zařadit jejich rychlé vstřebávání z gastrointestinálního (trávicího) traktu po perorálním podání. Z těchto důvodů jsou fluorochinolony hojně používány v humánní i ve veterinární medicíně. Naopak ale výhody, které přináší jejich použití, jsou vyváženy nežádoucími účinky a především rychlým vznikem bakteriální rezistence [15-18].

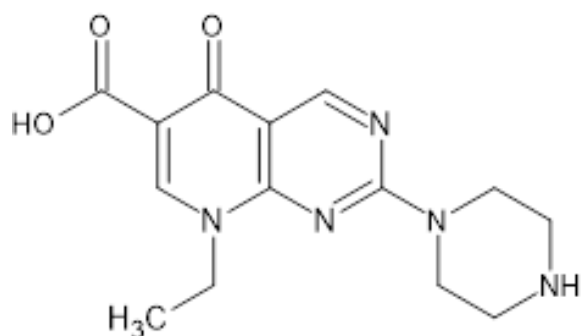
2.1. Jednotlivé generace fluorochinolonů

Chinolony jsou převážně baktericidní látky, které můžeme podle spektra účinku, farmakologických vlastností, antibakteriální aktivity, průniku do tkání a šířky antibakteriálního spektra rozdělit do 3 generací (v české literatuře do 4).

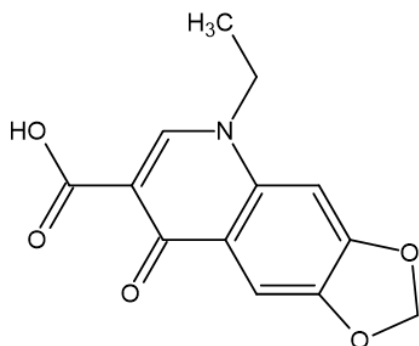
Jako první generace jsou označovány nefluorované chinolony. Tyto látky jsou účinné zejména proti gramnegativním bakteriím, používaly se k léčbě infekcí dutých močových cest, ale v terapii se již nepoužívají. K chinolonům první generace patří kyselina nalidixová, kyselina oxolinová, kyselina pipemidová, cinoxacin a další látky [15].



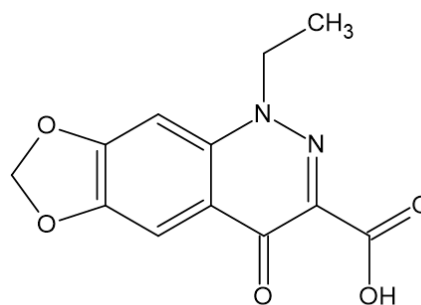
Obrázek 1: Struktura kyseliny nalidixové



Obrázek 2: Struktura kyseliny pipemidové



Obrázek 3: Struktura kyseliny oxolinové



Obrázek 4: Struktura cinoxacinu

Postupem času se ale zjistilo, že substitucí fluorem na pozici 6 chinolonového jádra se až desetkrát zvyšuje antibakteriální efekt těchto přípravků a dosahují tak výrazně baktericidnějšího účinku. Těmto látkám vzniklých substitucí fluoru na chinolonové jádro se říká fluorochinolony (druhé až čtvrté generace). Jednotlivé generace fluorochinolonů se liší především spektrem účinku proti různým patogenům, různou četností vedlejších nežádoucích reakcí a rychlostí nárůstu bakteriální rezistence [15].

Druhá generace, do níž jsou řazeny např. ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, prulifloxacin a pefloxacin, je charakteristická svým systémovým účinkem a širším antimikrobním spektrem. Třetí generace má také velký systémový účinek a široké antibakteriální spektrum, a mezi typické zástupce patří gatifloxacin, grepafloxacin, sparfloxacin a jiné v ČR nedostupné přípravky. Zástupcem ze čtvrté generace fluorochinolonů je od roku 2001 v ČR registrován moxifloxacin, který se do klinického použití dostává oproti jiným státům EU či USA výrazně později [15].

Jedním z mnoha cílů při vývoji nových fluorochinolonů bylo rozšíření jejich spektra účinku na grampozitivní bakterie. To se povedlo např. u moxifloxacinu, který je schopný inhibovat růst bakterie *Streptococcus pneumoniae*, toto antibiotikum. Toto antibiotikum je tedy účinné proti pneumonii, tuberkulóze a k jiným respiračním onemocněním. Díky tomu nese celá čtvrtá generace fluorochinolonů označení „respirační fluorochinolony“. Kromě moxifloxacinu do této skupiny patří i například gemifloxacin (bronchitida), trovafloxacin a sitafloxacin. Tyto přípravky ale nejsou v ČR k dispozici, protože jejich užívání přináší velké množství rizik [15, 17].

2.2. Účinek

Fluorochinolony inhibují syntézu DNA bakteriální buňky, a to tím způsobem, že blokují funkci gyráz, což jsou enzymy (bakteriální topoizomerázy), které zodpovídají za splétání a rozplétání řetězců DNA při buněčném dělení. Kvůli inhibici bakteriální gyrázy dochází ke vzniku zlomů v bakteriální DNA, a poté bakterie umírá [19,20].

Fluorochinolony se ukázaly jako účinné u mnoha infekcí, včetně nekomplikovaných nebo komplikovaných infekcí močových cest, infekcí dýchacích cest, kapavky, bakteriální gastroenteritidy a infekcí měkkých tkání způsobených gramnegativními organismy. Obecně lze říci, že úspěch byl pozoruhodný při léčbě gramnegativních infekcí, ale méně u grampozitivních infekcí [15, 17].

2.2.1. Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky fluorochinolonů, jež jsou např. hypersenzitivní reakce, závratě, bolesti hlavy, gastrointestinální poruchy a drobné hematologické abnormality, jsou obvykle mírné a přechodné a nepředstavují tedy vážnější problém. Naopak bylo zjištěno, že fluorochinolony poškozují juvenilní nosné klouby u zvířat, a z toho důvodu se u dětí musejí používat pouze s opatrností. Některé z dalších velmi závažných nežádoucích účinků fluorochinolonů vedou k invaliditě, mohou poškozovat současně více orgánových systémů, nejčastěji svaly, šlachy, již zmíněné klouby, periferní nervy a centrální nervový systém. Tato poškození jsou potenciálně trvalá. Mezi další nežádoucí účinky patří např. fototoxicita a vznik srdeční arytmie [15, 17].

Níže uvedené nežádoucí účinky vedly evropskou agenturu EMA k celoevropskému přehodnocení aplikace flurochinolonů v medicíně, které vedlo k těmto opatřením, kterými je momentálně řízeno předepisování a užívání fluorochinolonů:

1) úplné zatavení používání veškerých chinolonů 1. generace ať už v humánní nebo veterinární medicíně

2) omezení používání fluorochinolonů ostatních generací k léčbě málo závažných infekcí, nebakteriálních infekcí, k prevenci průjmu cestovatelů, k léčbě opakovaných infekcí dolních močových cest, mírných nebo méně závažných infekcí s výjimkou situací, kdy nemůže být použita obvyklá léčba nebo nemůže být použit jiný léčebný přípravek.

3) úplné přerušování podávání fluorochinolonů pacientům, kteří mají větší předpoklady ke zvýšenému riziku vzniku nežádoucích účinků (osoby s výše zmíněnými nežádoucími účinky, starší osoby, pacienti s onemocněním ledvin, s transplantovanými orgány, nebo uživatelé kortikosteroidů) [15-18].

2.2.2. Interakce

Fluorochinolony mohou tvořit komplexy s dvojmocnými (Mg^{2+}) a trojmocnými ionty (Al^{3+}), které jsou obsaženy v antacidech a sukralfátech. Mohou ale interagovat i s jinými kovovými kationty (např. Ca^{2+} , Fe^{2+} nebo Fe^{3+}). Je třeba se vyvarovat současného užívání těchto látek, ať už v potravě nebo v podobě jiných léčiv, a to i s odstupem několika hodin, jelikož tato interakce způsobuje snížení absorpce fluorochinolonů [21-23].

Fluorochinolony dokáží svým působením zvyšovat účinek řady léčiv, zejména teofylinu, kofeinu, digoxinu, glibenklamidu, rifampicinu, cyklosporinu. Tato zvýšení účinnosti jsou pozorovatelná u všech fluorochinolonů s výjimkou ofloxacinu u kterého není prokázána interakce, která by zapříčiňovala zvýšené účinky theofylinu, warfarinu a kofeinu. U pacientů léčených perorálními diabetiky se mohou projevovat poruchy glukózové tolerance [17].

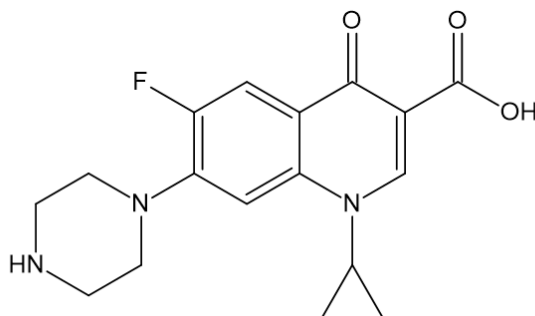
2.3. Zástupci

2.3.1. Ciprofloxacin

Ciprofloxacin je jedním z nejpoužívanějších, nejznámějších a zároveň nejprozkoumanějších fluorochinolonových širokospektrých antibiotických léčiv. Patří mezi fluorochinolony druhé generace, je určen k podání v podobě tablet, kapek určených k perorálnímu podání, ušních kapek, očních kapek a oční masti. Podává se také injekčně, tento způsob podání je ale možný pouze v nemocnici. Vzhledem k dobré rozpustnosti ciprofloxacinu v tucích a slabé vaznosti na bílkoviny se toto antibiotikum rychle vstřebává do organismu, což je provázeno rychlým účinkem [13, 24].

Ciproflaxin se používá k prevenci nebo k léčbě bakteriálních infekcí, např. pneumonie, kapavka nebo břišní tyfus. Může být také použit k léčbě bronchitidy, sinusových infekcí nebo infekcí močových cest. Jeho užívání je možné pouze na základě lékařského předpisu. Užívání ciprofloxacinu je spojeno s mnoha nežádoucími účinky. Mezi ty nejznámější a nejhojnější

vyskytované patří problémy se šlachami a svalstvem, poškození nervů, vážné změny nálad nebo chování, nebo nízká hladina cukru v krvi. Kromě nežádoucích účinků je toto léčivo spojeno se vznikem antibiotické rezistence, a to je důvodem, proč je nutné ho předepisovat pouze u infekcí, které nelze léčit bezpečnějším antibiotikem [24].

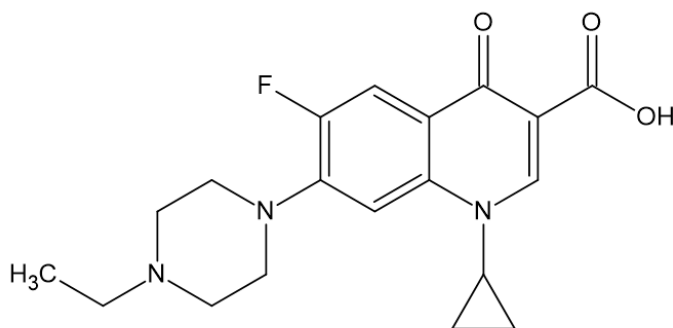


Obrázek 5: Struktura ciprofloxacinu

2.3.2. Enrofloxacin

Je syntetizovaný fluorochinolon druhé generace, jedná se o antibiotikum, které je určeno k veterinárnímu použití, většinou k léčbě domácích zvířat. Enrofloxacin má velmi široké spektrum účinku, které je převážně baktericidní, působí na grampozitivní a gramnegativní bakterie, naopak není účinný proti anaerobním bakteriím [13, 25].

Často je používán při infekcích měkkých tkání, respiračních obtížích domácích zvířat, dále při infekci kůže a močových cest. Toto antibiotikum se pro výše zmíněné infekce užívá pouze, pokud jsou dané bakterie, způsobující infekci, rezistentní proti jinému antibiotiku [26, 27].

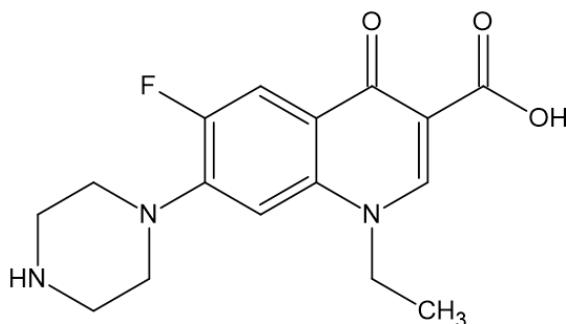


Obrázek: 6 Struktura Enrofloxacinu

2.3.3. Norfloxacin

Norfloxacin je fluorochinolobové antibiotikum, které je určeno k použití k bakteriálním infekcím u lidí. A to konkrétně k léčbě prostaty a močových cest (močový měchýř a ledviny). Výjimečně se norfloxacin užívá k léčbě kapavky.

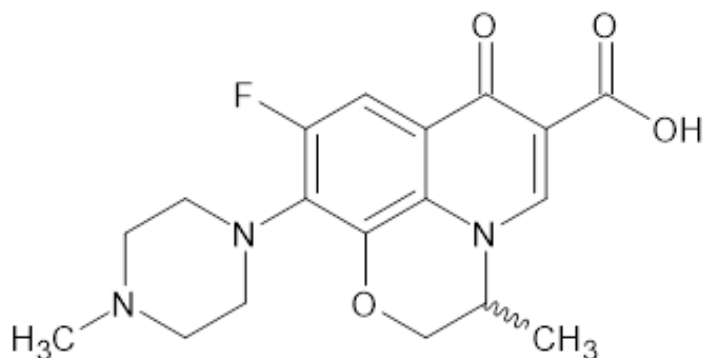
Užívání tohoto antibiotika je spojeno s mnoha riziky, mezi něž mohou patřit například otoky, ztuhnutí a omezení hybnosti kloubů, natržení a ochabnutí šlach. Tyto rizika jsou pravděpodobnější s rostoucím věkem [28].



Obrázek: 7 Struktura norfloxacinu

2.3.4. Ofloxacin

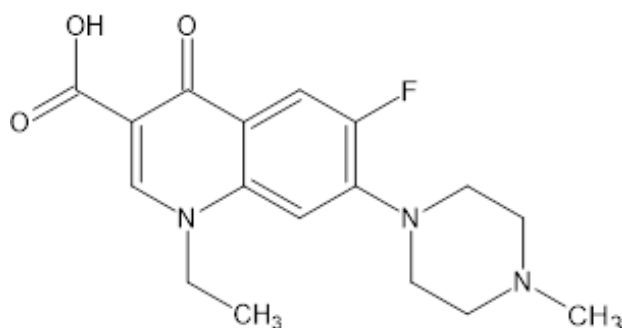
Ofloxacin je fluorochinolonové antibiotikum, které zamezuje množení bakterie a používá se při léčbě zánětů ucha nebo očních infekcí (zánět rohovky, ječné zrno a zánětu spojivek). Nadále může zapříčít nízkou hladinu cukru v krvi a kromě toho může dojít vlivem jeho užívání v některých případech k poškození nervů a šlach. Vzhledem k tomu, že může způsobovat invaliditu, je předepisován pouze proti závažným infekcím, která nejdou řešit jinou cestou [29].



Obrázek 8: Strukturní vzorec Ofloxacinu

2.3.5. Perfloxacin

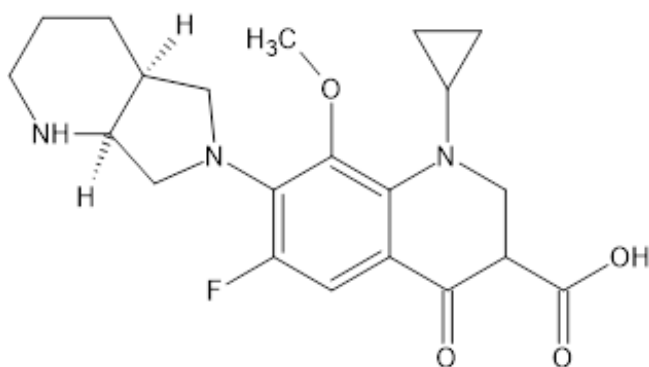
Je opět fluorochinolonové antibiotikum účinné proti gram pozitivním a gram negativním bakteriím. Působí proti stafylokokovým infekcím, infekcím dýchacích cest, infekcím kostí a kloubů. Neměli by jej používat děti do 12 let [30].



Obrázek 9: Struktura perfloxacinu

2.3.6. Moxifloxacin

Moxifloxacin se užívá k léčbě bakteriálních zánětlivých onemocnění dýchacího ústrojí konkrétněji proti zánětu průdušek, plic a dutin. Obecně se předepisují výjimečně a to pouze tehdy, kdy už není jiného východiska, jelikož mohou způsobovat zdravotní problémy. Například bolesti hlavy a kloubů, chudokrevnost a může zapříčinit poruchy srdečního rytmu [31].



Obrázek 10: Struktura moxifloxacinu

3. Antibiotická rezistence

Antibiotickou rezistenci můžeme definovat jako odolnost organismů vůči antibiotiku. Bakterie, která je odolná vůči antibiotickému léčivu je schopná v jeho přítomnosti nadále žít a množit se [32].

Antibiotická rezistence se dělí na přirozenou a získanou. Přirozená (primární) rezistence se vztahuje na bakteriální druhy, které jsou mimo spektrum působení antibiotika. Je způsobena vlastnostmi dané bakterie např. geneticky podmíněnou necitlivostí bakterie na dané antibiotikum. Z toho vyplývá, že bakterie s přirozenou rezistencí je odolná vůči působení antibiotika i bez předchozího kontaktu s antibiotickým léčivem [32, 33].

Získaná (sekundární) rezistence je způsobena mutací genomu, respektive adaptací DNA bakterie a vytvoření protilátek vůči konkrétnímu antibiotiku. Daná bakterie se stane rezistentní během léčby, nebo následkem opakovaného užívání antibiotika. Získaná rezistence vzniká tedy buď evolucí bakteriálního genomu, nebo přenosem genu rezistentní bakterie na jinou bakterii buněčným dělením. Jinou různě mechanismy (transdukce, konjugace, transpozice a transformace), kdy se přenos uskutečňuje pomocí mobilních částic v buňce (plazmidy) [32, 33].

Rezistentní bakterie však existovaly i před érou hojného užívání antibiotik a to kvůli přírodnímu původu některých antibiotických látek, které jsou produkovány různými druhy mikroorganismů. Tato rezistence ale není tolik rapidní a nebezpečná vůči lidskému zdraví [34].

3.1. Příčiny vzniku

Vznik a šíření antibiotické rezistence může mít mnoho příčin. Jedna z hlavních příčin je chybné užívání antibiotik, což je v současnosti velkým problémem. Obzvláště pak problematické je použití nevhodného antibiotika (např. proti rezistentnímu původci), nebo předepsání antibiotik při léčbě virových onemocnění, jako je rýma nebo chřipka. Lékař by proto měl pacientovi s nejasnou diagnózou před předepsáním jakéhokoli antibiotického léčiva udělat test na C-Reaktivní protein (CRP) test, aby si byl jistý virovým onemocněním. Další příčinou antibiotické rezistence je nedodržení nebo nedobráni celé předepsané dávky antibiotik. Pacient v takových případech přestane užívat předepsané antibiotikum, a kvůli tomu nejsou veškeré mikroorganismy (bakterie) zcela zničeny. Kromě selhání léčby vede toto chování k rozvoji antibiotické rezistence u neúplně zahubených populací bakterií.

Dalším velkým problémem a příčinou vzniku antibiotické rezistence může být podávání antibiotik hospodářským zvířatům kvůli prevenci před onemocněními nebo jako stimulatory růstu a hojnějších přírůstků, aplikace antibiotik z těchto důvodů je ale v ČR a v celé EU od roku 2006 zakázána. Toto zbytečné podávání antibiotik hospodářským zvířatům vedlo totiž k velkému rozvoji antibiotické rezistence [35, 36].

3.2. Důsledky

Antibiotická rezistence ohrožuje léčebné postupy, které hrají velkou roli při léčbě pacientů antibiotiky. Kvůli rychlému vzniku rezistence jsou bakterie, které způsobují dříve snadno vyléčitelné a banální infekce, odolnější a odolnější vůči konkrétnímu antibiotiku, a ohrožují jeho účinnost. Může se stát, že za pár let budou snadno vyléčitelné infekce hrozbou, a budou ve velké míře ohrožovat naše zdraví. Dalším problémem nadužívání antibiotik je kontaminace životního prostředí. Antibiotika totiž mohou kontaminovat vody nebo půdu. (viz kapitola 4.1) [13, 37].

Studie prováděné roku 2019 odhadují na základě dat ze systematických přehledů literatury, nemocničních systémů a dalších zdrojů, že došlo k asi 4,95 milionům úmrtí spojených s antibiotickou rezistencí, včetně 1,27 milionů úmrtí jednoznačně připsané antibiotické rezistenci [37].

4. Kontaminace životního prostředí

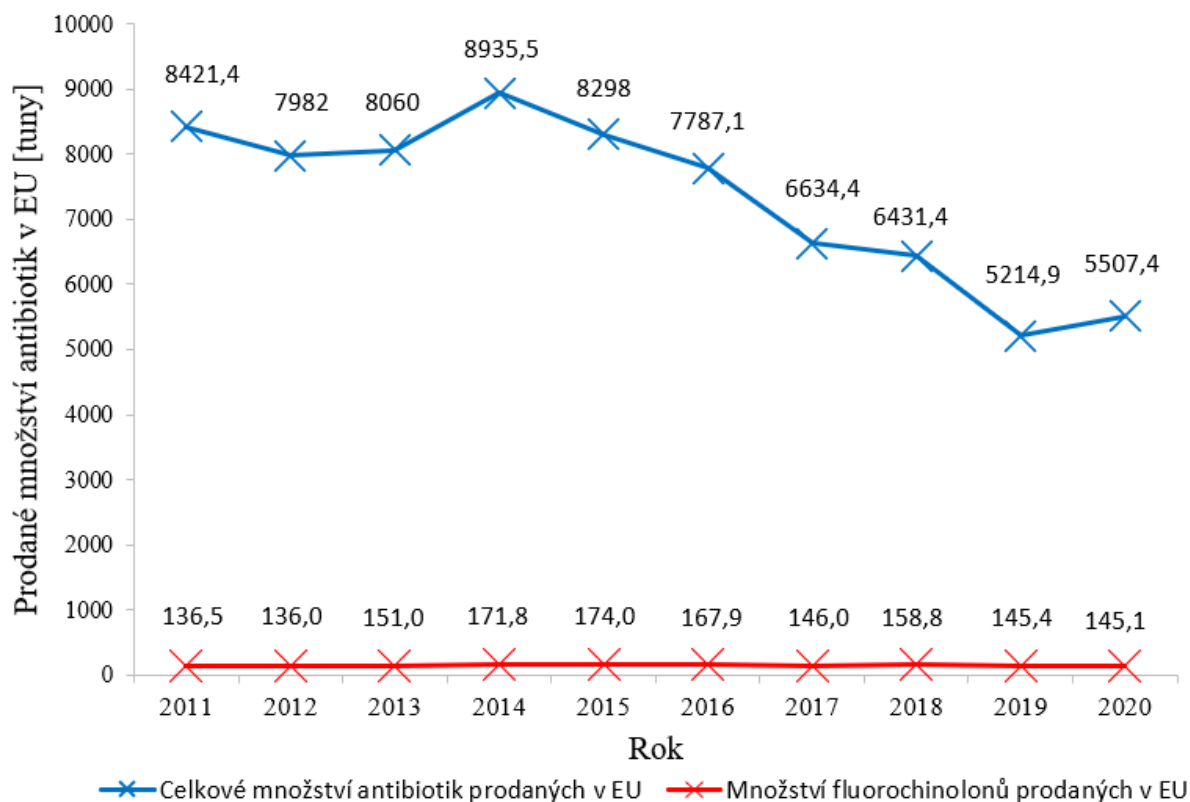
Kromě vzniku antibiotické rezistence může nadužívání antibiotik kontaminovat životní prostředí.

4.1. Původ reziduí

Antibiotika se do půd, vod a všeobecně do životního prostředí dostávají různými způsoby. Již při výrobě antibiotik je produkován odpad a způsob jeho likvidace musí být v souladu se zákonnými předpisy o ochraně životního prostředí. Do životního prostředí může ale vstupovat i velká část předepsaných/užívaných antibiotik, která nejsou při úplném dobrání odevzdána do lékáren k odborné likvidaci, nýbrž končí na skládkách, a tím dochází ke kontaminaci půd. Velká část respondentů schraňuje po neúplném dobrání antibiotik léčiva doma a tím nevědomky napomáhají ke zvýšení emisí antibiotik [38].

Dalším problémem je podávání antibiotik hospodářským zvířatům, kvůli zrychlení růstu, popřípadě jako prevence před onemocněním (což je v ČR zakázané od roku 2006). Tato bezdůvodná aplikace antibiotik vede k rozvoji antibiotické rezistence.

Odhaduje se, že až 70 % spotřebovaných antibiotických léčiv je v USA podáváno zvířatům, a to právě z výše uvedených důvodů. V Evropě se procentuální využití antibiotických léčiv pro veterinární účely z celkově konzumovaných antibiotik obecně odhaduje na 2,3 % - 95 % v závislosti na typu antibiotika. Fluorochinolony jsou pro veterinární účely využívány z 2,5 % z celkově předepsaných antibiotických léčiv (údaje z roku 2018). Graf níže, popisuje veterinárně využitá antibiotika v Evropě v letech 2011 – 2020 celkově a zároveň udává spotřeby fluorochinolonových antibiotik taktéž pro veterinární účely [38-40].



Graf 1: Spotřeby antibiotik pro veterinární účely v průběhu posledních let

Antibiotikum po požití zvířetem projde trávicím traktem zvířete, nemusí dojít k úplné biotransformaci, vlivem čehož dojde k vyloučení spolu se střevním obsahem. Jelikož jsou exkrementy zvířat používány jako hnojiva, může docházet jejich následnou aplikací na půdu ke kontaminaci půd, což je spojeno s kontaminací potravin na ní pěstovaných. Při konzumaci těchto potravin člověkem dochází spolu s potravou k příjmu malých koncentrací antibiotických látek, což podporuje opět vznik antibiotické rezistence.

Neúplná biotransformace a následné vyloučení antibiotika exkrementy je jedním z hlavních zdrojů reziduí. Průměrně může být vyloučeno až 90 % požitého antibiotika v závislosti na třídě léčiva. Dochází tedy k úniku z těla spolu se střevním obsahem.

Antibiotika, která po užití přecházejí do krevního oběhu, nemusejí podlehnout úplné biotransformaci, a tato část antibiotického léčiva se poté v původní podobě vylučuje ledvinami. Dalším souvisejícím problémem může být například to, že ačkoli léčivo podlehne biotransformaci, tak i přes to se v exkrementech a v moči nachází v podobě metabolitů, které mohou být bioaktivní a tím znečišťují odpadní vodu.

Antibiotika se i přes několika fázové čištění odpadní vody v čistírnách odpadních vod dostávají do vodních toků a následně půd, kam se vstřebávají z povrchových vod. Rezidua antibiotik, která pocházejí z lidských sídel, však nejsou snadno z odpadních vod odstranitelná, a to je další z příčin kontaminace půd antibiotiky a všeobecně léčivy [38, 41].

4.2. Aplikace odpadní vody a hnoje na zemědělskou půdu

Česká republika se potýká s velkým množstvím nedostatku tradičních organických hnojiv, jako jsou hnůj a kejda. Jednou z alternativ, jak nahradit tato hnojiva je použití kalů z ČOV. Tyto kaly jsou pro půdy zdrojem organické hmoty, mikro prvků a živin. Hnojení tímto způsobem může ale přinášet spoustu nevýhod. Vzhledem k tomu, z jakého prostředí kaly z ČOV pocházejí, je nutno velmi pozorně sledovat jejich obsah a složení, aby nedocházelo ke kontaminaci půd např. těžkými kovy či léčivými. V ČR se kaly používají k přímé aplikaci na zemědělskou půdu, před jeho použitím musí dojít k hygienizaci. Mezi další podmínky pro použití kalů patří obsah rizikových prvků, pro který je stanoven limit, který nesmí být překročen [42].

V důsledku použití kalů z ČOV jako hnojiva pro zemědělskou půdu, může dojít ke kontaminaci půd antibiotiky a jinými léčivými, a to z toho důvodu, že kal pocházející z odpadní vody odebraný z ČOV je původem z lidských sídel. Odpadní vody z lidských sídel bývají kontaminovány léčivými a antibiotiky, kterých se ČOV úplně nezvládnou zbavit a po aplikaci kalu jako hnojiva na zemědělskou půdu dochází ke kontaminaci půd antibiotiky. Tato rezidua antibiotik mohou mít negativní vliv na životní prostředí a také na člověka, který požije potraviny, které byly vypěstované na kontaminované půdě. V tom případě přijímá dlouhodobě po malých dávkách malé koncentrace těchto léčiv. Tyto faktory všeobecně způsobují rozvoj bakteriální rezistence, která je aktuálně velkým problémem. Zbytky antibiotik mohou ovlivňovat i vývoj samotné hnojené rostliny, protože mohou být rostlinou absorbovány, což narušuje její fyziologické procesy [43].

Aplikace hnoje a recyklace vody pro další využití jako hnojiva je podporováno EU v rámci Cirkulární ekonomiky Evropské unie. Předpokládá se, že bude nutné užívat čím dál více kalů z čistíren odpadních vod, které bude nutné recyklovat pro následné použití jako hnojiva, jelikož je nutné udržet zemědělskou produkci z důvodu růstu populace. To ovšem zapříčiní hojnější kontaminaci půd léčivými nebo těžkými kovy. Řešení tohoto problému by mohlo být dočištění odpadních vod pomocí procesů oxidačních, a to například UV lampami, ozonem nebo peroxidem vodíku. Tyto procesy je možné kombinovat za účelem intenzivního čištění. U hnojí je zapotřebí před aplikací na půdu nechat obsažená léčiva zdegradovat. Rozložení nebo pokles koncentrace léčiva v hnojivu můžeme dosáhnout například fermentací, a to tak, že zamezíme přístupu kyslíku a necháme hnůj nějakou dobu kvasit. Pokud dojde ke kontaminaci půdy kontaminovaným kalem nebo hnojem je možné zpětně antibiotika z půd do nějaké určité fáze odstranit, například aplikací látky, která je schopná antibiotika z půdy adsorbovat na svůj povrch. Takovouto látkou by mohl být například biouhel, který disponuje sorpčními vlastnostmi a jedná v podstatě zuhelněná biomasa [44, 45].

5. Půda

Vytváří nejsvrchnější vrstvu zemské kůry, a tedy i pedosféry. Půda je tenká vrstva nacházející se na povrchu Země, skládá se ze zvětralých hornin, organických materiálů, vzduchu a vody. Půda je životním prostředím půdních organismů, jedním z hlavních zdrojů obživy pro člověka (produkce potravin), z něhož vyrůstají rostliny a žijí v něm živočichové. Těmto rostlinám půda poskytuje vodu a živiny, také přispívá k regulaci vody a atmosférických plynů a hraje důležitou roli v regulaci klimatu [46, 47].

5.1. Vznik půdy

Proces, při kterém dochází ke vzniku půdy, se nazývá pedogeneze. Půda vzniká postupně zvětráváním hornin, činností mikroorganismů (půdotvorných činitelů), vznikem substrátu, a nakonec vznikem samotné půdy, jejíž 1 cm se tvoří asi 1000 let, proto je považována za neobnovitelný zdroj. Mezi faktory, které ovlivňují kvalitu a rychlost vzniku půdy patří například klima, topografie, podkladový materiál, a především půdotvorní činitelé, jejichž různé kombinace a intenzita výskytu na konkrétním území vedou ke vzniku různých druhů půd [48].

5.2. Složení půd

Pro nás již známou a často viditelnou pevnou složku půdy tvoří organické látky, mezi něž patří humus (huminy, huminové kyseliny a fulvunové kyseliny) různé organismy a mikroorganismy a také nehuminové látky jako například nukleonové kyseliny, sacharidy atd. Spolu s organickými látkami tvoří půdu i anorganické látky (voda, soli, plyny, kovy, minerály, horniny atd), respektive mineralogická část, k níž se řadí například různé horniny. Půda se kromě pevné složky skládá i z kapalné a plynné, půdní voda společně s půdním vzduchem vyplňují veškeré volné prostory mezi pevnými částicemi [46, 48].

5.2.1. Kapalná fáze

Půdní voda napomáhá růstu rostlin a je jedním z hlavních faktorů pro jejich výživu, jelikož se v ní rozpouštějí minerály. Tyto látky rozpuštěné ve vodě ve formě iontů jsou následně přístupnější pro rostlinstvo. Zdrojem půdní vody jsou převážně srážky, popřípadě podzemní voda, která vlivem kapilárních sil může vzlínat do kořenové zóny, nebo povrchová voda, která se do půdy dostane vsakováním [46, 48].

5.2.2. Plynná fáze

Půdní vzduch se v mnoha faktorech velmi liší od atmosférického, jeho složení ovlivňují mikroorganismy a kořeny rostlin. Obsah půdního vzduchu je závislý na mikroorganismech a půdní vodě, mezi nejintenzivněji zastoupené plyny v půdě patří kyslík (49 %), dusík (0,2 – 0,4 %) a oxid uhličitý (v průměru 16 % - v rašelinách to může být až 50 % zatímco v polopouštích pouze 0,8 %) [48, 49].

5.3. Vlastnosti půd

Základní vlastnosti půd kategorizujeme do fyzikálních, chemických a biologických.

5.3.1. Fyzikální vlastnosti půd

Jsou závislé převážně na vztahu mezi půdní pevnou a kapalnou fází. Dělíme je na základní fyzikální, hydrofyzikální, fyzikálně-chemické a tepelné vlastnosti. Mezi fyzikální vlastnosti půd patří například soudržnost (charakterizuje sílu, jíž se přitahují vzájemně sousední částice půdy), struktura, zrnitost, měrná a objemová hmotnost, pórovitost a přilnavost (síla mezi částicemi půdy a libovolným předmětem). K hydrofyzikálním patří propustnost, vlhkost, hygroskopicitu a provzdušenost, nadále k vlastnostem fyzikálně-chemickým patří ku příkladu plasticita, konzistence, lepivost a soudržnost, a nakonec tepelné vlastnosti ke kterým patří tepelná kapacita, tepelná vodivost a teplota půdy [48-50].

5.3.2. Chemické vlastnosti půd

Chemické složení a vlastnosti půdy jsou převážně ovlivněny chemickými reakcemi a procesy probíhajícími v půdě. Mezi základní chemické vlastnosti patří pH půdy a půdní sorpční komplex (je schopnost částic půdy poutat prvky, které jsou nezbytné pro výživu rostlinstva a pro půdotvorný proces), vodivost, složení (obsah dusíku, fosforu a uhlíku) [50, 51].

5.3.3. Vlastnosti půd, které mají vliv na extrahovatelnost léčiv

Mezi vlastnosti, které nejvíce ovlivňují extrahovatelnost léčiva z půdy, může patřit obsah písku, prachu a jílu, přičemž na základě podílu těchto látek v hlíně se určuje půdní typ. Dalším velkým činitelem, který značně ovlivňuje extrahovatelnost, může být obsah kationtů, a to například Ca_2^+ , K^+ dále obsah huminových fulvokyselin, vodivost a pH [53].

Při extrakci antibiotických látek a obecně léčiv z půdy nejsme schopni dosáhnout 100 % extrahovatelnosti léčiv, a to z důvodu vázanosti léčiv v půdě. Léčiva jsou v půdě vázána různými interakcemi Van der Waalsovými silami, vodíkovými můstky, mohou být mechanicky zachycena v půdě nebo vázána kovalentními vazbami [54, 55].

5.4. Rozdělení půd

Půdu dělíme podle obsahu pevných látek, zrnitosti a mechanického složení na půdní druhy a podle pH a obsahu živin na půdní typy. Půdní typy kategorizujeme na černozemě, hnědozemě, rendziny, podzolové půdy a nivní půdy. Mezi půdní druhy řadíme jílovité, hlinité a písčité půdy [46].

6. Extrakce

Extrakce, nebo li vyluhování je laboratorní metoda, při níž dochází k přechodu látky z kapalně, popřípadě pevné fáze do jiné kapalně fáze. Využívá se při ní rozdílné rozpustnosti látek ve směsi rozpouštědel a je možné ji využít i termolabilní látky, protože se teplota extrakce může přizpůsobit teplotě, kterou teplotně nestálá látka snese. Můžeme tedy extrahovat při laboratorní teplotě, popřípadě za chladu [56, 57].

6.1. Extrakce pevného vzorku kapalinou

Extrakce pevného vzorku obecně znamená převedení pevného vzorku na kapalinu, tento vzorek bude možné rozpouštědlem vyextrahovat. Pevný vzorek se tedy obecně nadrtí tak, aby měly částice co nejmenší povrch z důvodu co nejúčinnější extrakce. Jako rozpouštědlo volíme látku, která má stejnou polaritu jako látka, již chceme ze vzorku izolovat. Pro extrakci fluorochinolonů se nejčastěji používá metanol, acetonitril a McIlvainův pufr (různé pH) a $MgNO_3$ nebo EDTA [58, 59].

Jedním z mnoha důležitých kroků extrakce je zabezpečení kontaktu vzorku s rozpouštědlem. K tomu je možné využít třepačku nebo jinou alternativu protřepání vzorku, pomocí níž se roztok zhomogenizuje. Následně je vhodné použít ultrazvuk (pro sonikaci vzorku), který je nutné regulovat dle navážky vzorku, která v našem případě činí 1 g, proto bude stačit 10 minut.

Závěrečnou fází izolace léčiv z pevného vzorku je centrifuga, nebo také odstředivka, díky níž je ze suspenze pomocí odstředivé síly oddělena pevná fáze od rozpouštědla. Pomocí ní zbavíme roztok rozpouštědla nežádoucích zbytků půdy (vzorku). Kdyby zůstala pevná fáze vzorku v rozpouštědle, mohla by se ucpat SPE kolona při extrakci a také díky oddělení rozpouštědla od pevné fáze je možné extrahovat ze vzorku několikrát po sobě a tedy dojít k vyšší výtěžnosti extrakce [60, 61].

6.2. Extrakce na tuhou fázi

Jelikož máme vzorek, v němž je koncentrace léčiva nižší než limit stanovení příslušnou metodou, kterou jsme použili ke stanovení, je třeba provést prekoncentraci analytu. Nižší koncentrace analyzovaného materiálu je ve vzorku proto, že se antibiotika v půdách vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Přizpůsobit vzorek tomuto stanovení nám právě pomůže extrakce na tuhou fázi. Ta je založená na principu nanášení předem extrahovaného vzorku, který musí být vhodně upravený. Úprava spočívá ve zředění demineralizovanou vodou z důvodu velkého obsahu organických rozpouštědel, pomocí nichž jsme extrahovali antibiotika z půdy. Další možnosti úpravy vzorku pomocí extrakce na tuhou fázi může být přizpůsobení pH nebo přefiltrování. Obecně tedy u extrakce na tuhou fázi dojde k přečištění a zakoncentrování vzorku. Postupně dochází k nanášení vzorku na kolonu a jeho postupným průchodem kolonou, která je naplněna sorbentem, který je schopen na základě polaritativy a dalších vlastností zachytit sledovaný analyt (v našem případě fluorochinolonové antibiotikum). Z těchto důvodů je potřeba vybrat kolonu s vhodným sorbentem, může to být například aktivní uhlí, silikagel, styren-divinyl benzenový kopolymer, apod. [62].

6.2.1. Extrakční metoda SPE (solid phase extraction)

Tato laboratorní technika spočívá v interakcích mezi třemi složkami, mezi něž patří tuhá fáze (sorbent), analyt a rozpouštědlo. SPE může fungovat na dvou různých principech, a to na zadržení analytu, přičemž roztok rozpouštědla prochází kolonou do plastové nádoby. Druhý typ funguje na přesně opačném principu, tedy na zadržení matrice a propuštění analytu. Obecně dochází k izolaci za sníženého tlaku (který zapříčiňuje průtok vzorku kolonou) z komplikovaných matric, kdy izolace probíhá v jednom kroku spolu s přečištěním a zakoncentrováním, čemuž předchází distribuce analytu mezi pevný sorbent a kapalnou matici [60-62].



Obrázek 11: Aparatura pro provedení SPE

6.2.2. Popis kolony

Kolona, kterou jsme použili pro naše stanovení, je tvořena z polypropylenu. V její spodní části se nachází porézní fritka z polyethylenu, v níž je sorbent (Oasis HLB - polymerní sorbent), přičemž jeho hmotnost se odvíjí od množství vzorku, který nanášíme na danou kolonu. V naší praktické části jsem použila kolonu s 200 mg sorbentu. Sorbent se nachází mezi dvěma fritami a jeho velikost pórů musí odpovídat velikosti částic nanášeného vzorku, což může být v řádu 45-100 μm . Rozměry kolony jsou dostupné nejčastěji okolo 10 mm průměru, a celkovém objemu 1-6 ml. Extrakce 500 ml roztoku může takovouto kolonou zabrat 2-3 hodiny v závislosti na nastavení rychlosti průtoku roztoku kolonou, znečištění, rozpouštědle, atd. [61].



Obrázek 12: Kolona pro provedení SPE

6.2.3. Jednotlivé kroky extrakce a provedení SPE

Extrakce je složena z několika základních kroků, mezi něž patří kondicionace sorbentu, nanášení vzorku, promytí, sušení a eluce, popřípadě na závěr zakoncentrování vzorku N_2 tedy vysušení vzorku od rozpouštědel.

Kondicionace je příprava kolony a přizpůsobení podmínkám, za kterých je extrakce provedena. Je realizována za pomoci rozpouštědla nebo vody, vždy s podobnými vlastnostmi, jako má vzorek. Kondicionace je prováděna objemem rozpouštědla v závislosti na velikosti kolony z důvodu zbavení kolony nečistot. Rychlost průtoku rozpouštědla je doporučována kolem 1ml/min [60, 61, 63].

Následuje nanášení známého objemu vzorku, který musí být na kolonu nanášen rychlostí kolem 5 ml/min. Analyt vzorku musí být schopný se pod takovou rychlostí zachytit na koloně, zbytek rozpouštědla prokape a je zachycen v nádobě. Veškeré operace probíhají za sníženého tlaku. Tato operace může trvat 2-3 hodiny v závislosti na objemu vzorku. Na závěr nanášení veškerého vzorku je nutné nádobu se zbytky nanášeného vzorku propláchnout vodou abychom dosáhli kvantitativního převedení vzorku do kolony a úplné extrakce a zároveň aparaturu promyli [60, 61].

Důležitou fází extrakce je promytí, které se provádí rozpouštědlem za účelem odstranění nežádoucích interferujících látek, abychom je při eluci nedostali do našeho vzorku, protože mohou ovlivnit stanovení, popřípadě v dalším kroku znečistit kapalinový chromatogram. Je důležité zvolit takové rozpouštědlo pro promytí, aby nedošlo k eluci analytu, tedy izolovaného antibiotika, ze sorbentu, ale aby mělo rozpouštědlo dostatečnou eluční sílu k eluci matrice vzorku – interferující látky, kterou obsahoval vzorek procházející kolonou. Objem rozpouštědla by měl být takový, aby došlo k promytí kolony od interferujících látek, neměl by však být schopen vymýt léčiva. Rychlost průtoku by měla odpovídat 1 ml/min [60, 61].

Předposlední část extrakční metody SPE je sušení, které probíhá pod vakuem. Mělo by sorbent zbavit nadbytečné vlhkosti (vody), která by mohla být poté nežádoucí pro odpařování eluátu pod plynným dusíkem. Voda obsažená v sorbentu SPE kolony a později tedy i ve vzorku, se odpařují hůře než organická rozpouštědla (methanol), kterými je vzorek eluován. Voda obsažená v sorbentu a následně ve vzorku může tedy zhoršit reprodukovatelnost eluce [60].

Poslední částí extrakce, jak už bylo naznačeno výše, je eluce. Je prováděna malým objemem rozpouštědla, které by mělo mít vyšší eluční sílu a také by mělo být svou polaritou podobné rozpouštědlu, které bylo použito pro rozpuštění daného vzorku. Provádí se ve dvou krocích (dvěma alikvoty objemu rozpouštědla), což ji činí účinnější [60, 61].

7. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je jedna z nejpoužívanějších analytických separačních metod. Slouží k separaci rozpuštěných iontů nebo molekul (včetně námi analyzovaných fluorochinolonových antibiotik). Pomocí této metody separujeme složky směsi od sebe na základě jejich afinity ke stacionární (nepohyblivé) nebo k mobilní (pohyblivé) fázi, které jsou mezi sebou vzájemně nemísitelné.

Pohyb vzorku, jak už bylo zmíněno výše, je závislý na afinitě látky ke stacionární nebo k mobilní fázi. Mobilní fáze, která je pod vysokým tlakem, je pohyblivá a putuje po stacionární fázi, kterou je naplněna chromatografická kolona. Spolu se vzorkem, jehož složky se na základě afinity ke každé z fází pohybují každá jinou rychlostí, projdou chromatografickou kolonou, čímž se následně liší retenčním časem (odlišná rychlost částic vzorku procházejících kolonou).

Během separace se tedy analyt dělí na jednotlivé složky směsi. Z čehož vyplývá, že složky s vyšší afinitou ke stacionární fázi budou mít větší retenční čas, a budou tedy putovat pomaleji než složky s nižší afinitou k mobilní fázi. Ty budou mít naopak menší retenční čas a budou dříve eluovány z chromatografické kolony.

Jako stacionární fáze je používán například polární silikagel a jako mobilní fází je nutné použít nepolární rozpouštědlo, což může být např. hexan. Uspořádání může být odlišné, což je častější, kdy je stacionární fáze nepolární (např. modifikovaný silikagel s navázaným nepolárním oktadecylem, a mobilní fáze je polární tedy voda v kombinaci s méně polárním methanolem nebo acetonitrilem [60, 64].

7.1. Ultraúčinná kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii je využívána technika UPLC respektive ultraúčinná kapalinová chromatografie. Přístroj založen na této technice obsahuje 2-4 zásobníky mobilní fáze s odplyňovačem mobilní fáze, který zbavuje mobilní fází rozpuštěného vzduchu (pomocí vakua). Mobilní fáze nesmí obsahovat rozpuštěný vzduch kvůli možným interferencím. Do zásobníků mobilní fáze je nutné volit mobilní fází takovou, aby v ní byl vzorek rozpustný a zároveň s ní nijak nereagoval. Pokud se jedná o reverzní systém tedy o nepolární stacionární fází je jako mobilní fáze nejčastěji používána voda s přidávkem kyseliny mravenčí v kombinaci s méně polárním metanolem nebo acetonitrilem. Dále obsahuje kapalinový chromatogram čerpadla/pumpy, která dle potřeby zásobují kapalinový chromatogram mobilní fází, dokáží regulovat objem mobilní fáze, poměr mobilních fází a zároveň zajišťují její konstantní průtok. Kapalinový chromatogram dále disponuje automatickým dávkovačem (autosamplerem), který slouží k nastříknutí přesně definovaného objemu vzorku z vialky do proudu mobilní fáze. Vzorek putuje až na chromatografickou kolonu, kde dochází na základě afinity k rozdělení jednotlivých složek vzorku, které následně putují na detektor, v našem případě do hmotnostního spektrometru. Celá kolona se nachází v temostatu, který slouží jako regulátor teploty. Teplota by měla být zvolena o několik °C vyšší než laboratorní, čímž je zajištěna vyšší reprodukovatelnost výsledků. Teplota také ovlivňuje separaci na koloně [60, 61].



Obrázek 13: Kapalinový chromatogram s hmotnostním spektrometrem

8. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která analyzuje ionty na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji. Tyto ionty interagují s magnetickým a elektrickým polem. Naším výsledkem je hmotnostní spektrum – graf, který charakterizuje závislost četnosti iontů na jejich poměru hmotnosti ku náboji.

Obecně platí, že se každý spektrometr skládá z vakuového systému, vstupu vzorku, iontového zdroje a detektoru iontů [61].

8.1. Vakuový systém

Ionty (v plynné fázi) jsou vzhledem ke svému náboji velmi reaktivní, proto je nutné, aby hmotnostním spektrometrem putovaly za vysokého vakua. Jinak by docházelo ke srážce těchto iontů s molekulami plynu a nebylo by možné, aby byly tyto ionty dopraveny až na detektor (spektrometr). Vysokého vakua je dosaženo pomocí rotačních čerpadel spolu s turbomolekulárními vývěvami. Vakuum se nachází v celém spektrometru s výjimkou iontového zdroje (v případě ionizace za atmosférického tlaku, která je typická pro spojení s kapalinovou chromatografií) [61].

8.2. Vstup vzorku

Kapalinová chromatografie je s hmotnostní spektrometrií spojená kapilárou, která je vedena z kapalinového chromatogramu – konkrétněji z kolony, do iontového zdroje. Vzorek je ionizován za atmosférického tlaku oproti tomu k separaci iontů v hmotnostním analyzátoru dochází za vakua, kde se stanoví hmotnost molekul [60].

8.3 Iontový zdroj

V iontovém zdroji se za atmosférického tlaku ionizuje vzorek, k čemuž je zapotřebí dodat určité množství energie. Ionizovat vzorek je možné různými způsoby na základě skupenství vzorku. Mezi nejpoužívanější patří elektronová a chemická ionizace, která je příkladem ionizační techniky v plynné fázi, dalším příkladem je ionizační technika pro kapalné vzorky, mezi níž patří například elektrosprej. Pro pevné vzorky se využívá desorpce a ionizace laserem za účasti matrice [60, 61].

8.3.1 Elektrosprej - elektronová ionizace

Vzhledem k tomu, že vzorek fluorochinolonů opouští chromatografickou kolonu jako kapalina, je vhodné jako ionizační techniku použít elektrosprej. Ten je nejvhodnější konkrétně pro kapalné, netěkavé, polární látky a iontové látky.

Vzorek vtéká do kapiláry, která je kovová (tedy i vodivá) a je na ni vkládáno stejnosměrné napětí (obvykle 1 000 až 5 000 V). V častěji využívaném pozitivním módu elektrospreje dochází k pohybu záporně nabitých iontů směrem od menisku a kladně nabitých iontů k menisku, který má sférický tvar. Následně dochází ke vzniku tzv. Taylorova kužele, kdy dojde ke sprejování látek společně s mobilní fází ve formě kapének do vyhřívaného prostoru za atmosférického tlaku. Zvýšená teplota způsobuje postupné odpařování rozpouštědla a dochází ke zmenšování velikosti kapének, kde se zvyšují odpudivé síly, jelikož kapénky obsahují primárně pouze kladně nabité ionty. Dochází tedy k postupnému odpařování rozpouštědla, do té doby, než se kapky stanou nestabilními a nedosáhnou tzv. Rayleighova limitu, který charakterizuje stav, kdy se kapky vlivem elektrostatického odpuzování souhlasných nábojů rozpadají, a dojde k explozi kapek. Tento děj se nazývá Coulombická exploze, dojde při něm ke vzniku menších a tedy i stabilnějších kapének. Štěpení je neustálé opakováno, při čemž vždy dojde k odpaření nějaké části rozpouštědla, a to dokud nevzniknou samostatné ionty v plynné fázi, které následně putují přes iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru [60].

8.4. Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor se nachází za iontovým zdrojem, respektive pracuje již se vzorkem ve formě iontů. Pracuje za vakua a slouží k separaci iontů na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji - m/z .

Mezi nejrozšířenější hmotnostní analyzátory patří kvadrupól. Kvadrupolový analyzátor je tvořen čtyřmi tyčemi z molybdenu, do nichž je vkládáno střídavé napětí. Polarita na tyčích se mění rychle. Každý ion chce vždy putovat k tyči s opačným nábojem a vlivem rychlé změny náboje na tyčích začnou ionty oscilovat. Výsledkem je trajektorie ve tvaru šroubovice. Může se stát, že se některé ionty zachytí na tyčích (= nestabilní trajektorie) a některé putují na detektor (= stabilní trajektorie). Vše závisí na jejich vlastnostech – hmotnosti a náboji. Postupně (skenováním) jsou propuštěny všechny ionty. Kvadrupol je nastavitelný, proto můžeme korigovat, jaké ionty (o jakém poměru hmotnosti a náboji) bude propouštět [60, 62, 64].

8.5. Detektor iontů

Ionty po separaci doputují na detektor iontů, který po jejich dopadu generuje elektrický signál, který je úměrný množství dopadajících iontů. Z toho vyplývá, že čím je signál menší, tím méně se nachází sledovaného analytu ve vzorku. Mezi detektory se řadí například fotografická deska, Faradayův detektor a elektronový násobič [60, 64].

Experimentální část

Předmětem experimentální části SOČ je posoudit zda fyzikálně-chemické vlastnosti půd ovlivňují extrakční výtěžnost fluorochinolonů. Proto byly provedeny extrakce fluorochinolonů z několika různých typů půd, které mají charakterizované fyzikálně-chemické vlastnosti.

1. Použité přístroje

- Analytické váhy HR-12-EC, A & D Instruments Ltd
- Ultrazvuková lázeň, KRAINTEK 5
- Vortex MIX-28+, MIUlab
- Centrifuga: Nüve NF 800 a ROTINA 420 R, Hettich ZENTRIFUGEN
- SPE extraktor, SUPELCO, Visiprep spe-12-g Bake
- Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity - kolona LC: Luna Omega 1,6 µm Polar C18 100x2,1 mm Phenomenex
- Milli-Q® Academic, Millipore QGARD, Francie
- Hmotnostní spektrometr BRUKER EVOQ LC-TQ
- Generátor dusíku a vzduchu, Peak Scientific – Genius 304

2. Pomůcky

- Běžné lanoratorní sklo a další obdobné pomůcky
- Automatické pipety: BIOHIT Proline (1-5 ml), BIOHIT m1000 (100-1 000 µl) BIOHIT m200 (20-200 µl)
- pH metr inoLab® 730, WTW Cond
- ExtractionCartridge(SPE kolony) - Oasis® HLB (6 ml, 200 mg)

3. Chemikálie

- Enrofloxacin, Pharmaceutical Secondary Standard, CRM; Sigma Aldrich (Německo)
- Ciprofloxacin, Pharmaceutical Secondary Standard, CRM; Sigma Aldrich (Německo)
- Norfloxacin čistoty min. 98 % (TLC), Analytical standard; Sigma Aldrich (Německo)
- Ofloxacin čistoty min. 99 % (HPLC); Sigma Aldrich (Německo)
- Pefloxacin mesylate dihydrate; Sigma Aldrich (Německo)
- Moxifloxacin Hydrochloride, Pharmaceutical Secondary Standard, CRM; Sigma Aldrich (Německo)
- Enrofloxacin - d5 hydrochloride čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Ciprofloxacin - d8 hydrochloride hydrate čistoty min. 99 %, Sigma Aldrich (Německo)
- Dodekahydráthydrogenfosforečnanu sodného, Lach:ner
- Hexahydrát dusičnanu hořečnatého, VWR chemicals ≥ 98%

- Amoniak (25%), VWR chemicals
- Kyselina citronová o čistotě $\geq 99\%$, Lach:ner
Kyselina mravenčí, SUPELCO
- EDTA/Chelaton III, Lach:ner
- Dusík – 4.7 SIAD Czech spol. s. r. o.
- Acetonitril – 100% LC-MS Chromasolv® o čistotě $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich
- Dihydrogenfosforečnan draselný, Lach:ner

3.1. Fyzikálně-chemické parametry použitých půd pro experimentální část

V rámci experimentální části SOČ byly použity půdy z různých částí České republiky (viz Tabulka 1), které se výrazně lišily svými fyzikálně-chemickými parametry. Tyto půdy, včetně stanovených půdních parametrů byly poskytnuty Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (Brno).

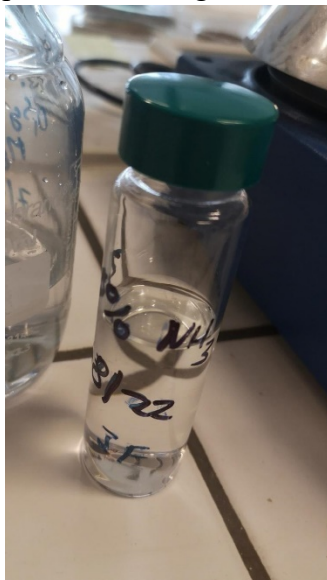
Tabulka 1: Charakteristika a složení půdních vzorků

| číslo půdy | Kraj odběru | Půdní druh | Písek [%] | Prach [%] | Jíl [%] | Aktivní půdní reakce pH [-] | Výměnná půdní reakce [-] | EC [$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$] | Organická hmota [%] | Organický uhlík [%] | Celkový dusík [%] | Celkový dusík [%] | Celkový fosfor [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] | Ca [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] | K [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] | Mg [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] | Na [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] |
|---------------|-----------------|------------|--------------|--------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------|--|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|---|--|---|--|--|
| 1 | Plzeňský | Luvisol | 21,2 | 53,9 | 24,9 | 6,30 | 5,65 | - | 3,61 | 2,10 | 0,148 | 0,148 | 558,6 | 119 | 2,7 | 14,3 | 0,35 |
| 2 | Moravskoslezský | Luvisol | 8,3 | 73,7 | 18,0 | 5,83 | 5,25 | 94 | 2,37 | 1,38 | 3,28 | 3,28 | 572,0 | 66,1 | 3,28 | 15,7 | 0,29 |
| 3 | Pardubický | Glejosol | 35,1 | 42,6 | 22,4 | 6,48 | 5,78 | 109 | 3,39 | 1,97 | 3,54 | 3,54 | 534,0 | 112 | 3,54 | 35,5 | 1,01 |
| 4 | Zlínský | Fluvisol | 10,9 | 58,7 | 30,3 | 7,20 | 6,40 | 177 | 5,37 | 3,12 | 6,26 | 6,26 | 2087,5 | 271 | 6,26 | 23,7 | 0,62 |
| 5 | Zlínský | Kambisol | 18,5 | 53,1 | 28,4 | 7,20 | 6,50 | 202 | 3,39 | 1,97 | 3,85 | 3,85 | 453,5 | 207 | 3,85 | 21 | 0,83 |
| 6 | Liberecký | Kambisol | 48,3 | 42,6 | 9,2 | 6,30 | 5,50 | 357 | 7,09 | 4,12 | 1,57 | 1,57 | 853,5 | 99,7 | 1,57 | 30,7 | 0,58 |
| 7 | Karlovarský | Stagnosol | 19,0 | 55,5 | 25,5 | 6,15 | 5,48 | 208 | 5,99 | 3,48 | 5,62 | 5,62 | 1402,5 | 138 | 5,62 | 24,3 | 1,74 |
| 8 | Jihomoravský | Černosol | 41,8 | 40,2 | 18,0 | 7,60 | 6,98 | 188 | 4,18 | 2,43 | 3,66 | 3,66 | 1817,5 | 192 | 3,66 | 7,69 | 0,83 |
| 9 | Ústecký | Fluvisol | 27,1 | 50,5 | 22,4 | 6,98 | 6,45 | 978 | 5,56 | 3,23 | 24,2 | 24,2 | 2887,5 | 198 | 24,2 | 40 | 3,04 |
| 10 | Zlínský | Fluvisol | 15,0 | 55,4 | 29,6 | 7,75 | 7,13 | 210 | 2,89 | 1,68 | 7,41 | 7,41 | 999,0 | 188 | 7,41 | 20,6 | 0,57 |
| 11 | Plzeňský | Luvisol | 15,2 | 64,7 | 20,0 | 6,30 | 5,65 | 101 | 4,83 | 2,81 | 2,81 | 2,81 | 670,0 | 93,6 | 2,81 | 10,5 | 0,58 |

4. Příprava roztoků

4.1 Roztok amoniaku – 2,5%

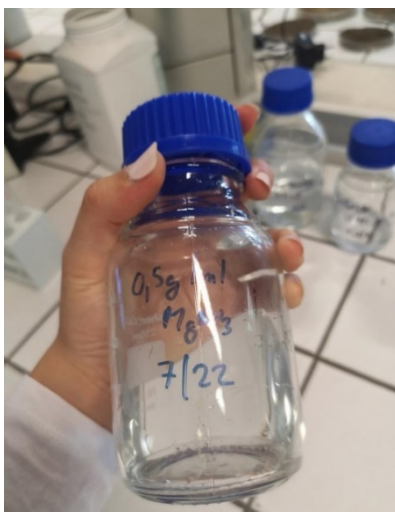
Bylo odpipetováno 10 ml 25% amoniaku, takto odměřený roztok byl zředěn Mili-Q vodou v odměrné baňce na 100 ml. Vše bylo provedeno v digestoři.



Obrázek 14: Roztok amoniaku – 2,5%

4.2. Roztok dusičnanu hořečnatého - 0,5 g/ml

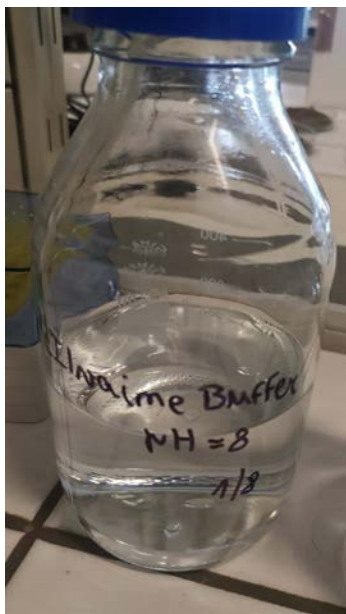
Na předvážkách bylo naváženo 50 g dusičnanu hořečnatého, tato navážka byla rozpuštěna v Mili-Q vodě a kvantitativně převedena do odměrné baňky o objemu 100 ml, která byla následně doplněna po rysku.



Obrázek 15: Roztok dusičnanu hořečnatého – 0,5 g/ml

4.3. McIlvaine pufr – pH 8

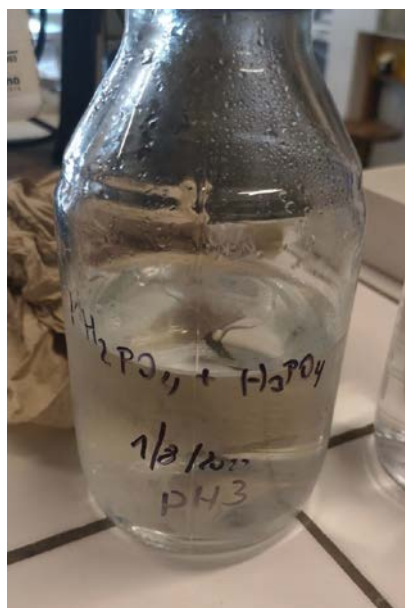
Bylo navaženo 0,5 g kyseliny citronové a 17,5 g dekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného, následně kvantitativně převedeno do odměrné baňky a zředěno na 250 ml. Kontrola pH roztoku byla provedena na pH metru a následně upravena přidávkem kyseliny citronové.



Obrázek 16: McIlvainův pufr – pH 8

4.4. Roztok pufru o pH 3

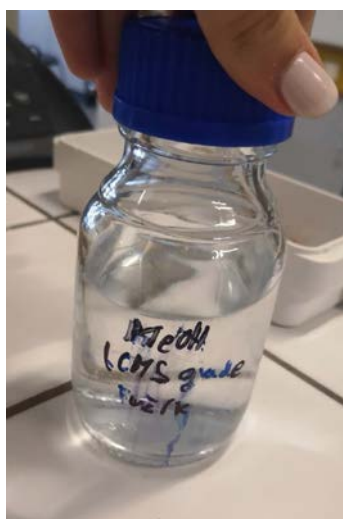
Bylo naváženo 6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného, který byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 250 ml pomocí Milli-Q vody. Následně bylo napipetováno 0,338 ml koncentrované kyseliny fosforečné a odměrná baňka byla doplněna po rysku vodou. Následně bylo zkontrolováno pH a to bylo vhodně upraveno na pH 3 přidávkem kyseliny fosforečné.



Obrázek 17: Roztok pufru - pH 3

4.4. Roztok kyseliny mravenčí v methanolu – 0,1%

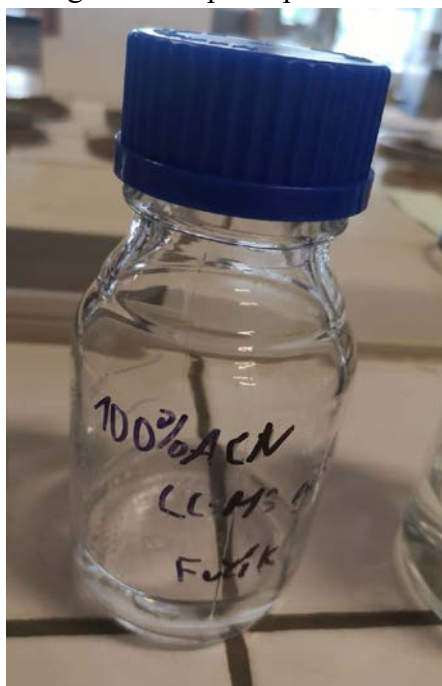
Z roztoku kyseliny mravenčí bylo odpipetováno 100 μl tohoto roztoku, a v odměrné baňce byl tento objem zředěn methanolem na 100 ml.



Obrázek 18: Roztok methanolu pro přípravu roztoku kyseliny mravenčí

4.5. Roztok kyseliny mravenčí ve vodě a acetonitrilu (95:5) – 0,1%

Bylo napipetováno 5 ml acetonitrilu, který byl přidán do odměrné baňky o objemu 100 ml. Následně z roztoku kyseliny mravenčí bylo odpipetováno 100 μ l a tento objem byl taktéž přidán do odměrné baňky. Odměrná baňka byla následně doplněna po rysku Mili-Q vodu a, takto připravený roztok byl zhomogenizován protřepáním.



Obrázek 19: Roztok acetonitrilu pro přípravu 0,1% roztoku kyseliny mravenčí

4.6. Příprava standardu fluorochinolonů o koncentraci 0,1 μ g/ml

Bylo naváženo 10 mg jednotlivých fluorochinolových léčiv, kvantitativně byla jejich navážka převedena do jednotlivých 10 ml odměrných baňky a baňka doplněna po rysku 0,1 % roztokem kyseliny mravenčí v acetonitrilu (50:50). Vzniklé roztoky měly koncentraci 1 mg/ml.

Z takto připravených roztoků byl připraven směsný standard o koncentraci 10 μ g/ml a to zředěním v 10 ml OB Mili-Q vodou. Z tohoto roztoku byl následně odpipetován 1 ml do 10 ml OB a baňka byla doplněna po rysku metanolem, došlo tedy ke vzniku roztoku o koncentraci 0,1 μ g/ml.

4.7. Příprava roztoků pro kalibraci

Z roztoku, připraveného v předchozím kroku, o koncentraci 10 µg/ml, byly následně připraveny zásobní roztoky (2 µg/ml, 5 ng/ml, 125 ng/ml, 500 ng/ml) z nichž byly připraveny roztoky kalibrační a to přidáním 5 µl vnitřního standardu o téže koncentraci (10 µg/ml). Koncentrace připravených kalibračních roztoků, se nacházejí níže v tabulce číslo 2.

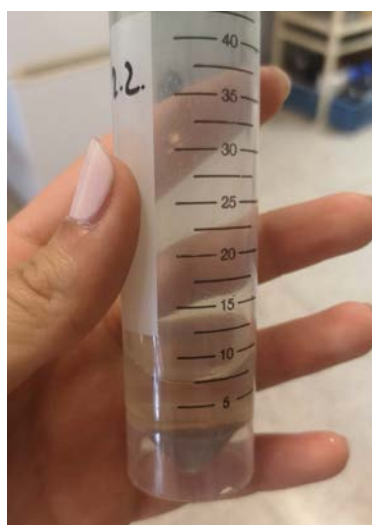
Tabulka 2: Koncentrace připravených kalibračních roztoků

| Kalibrační roztoky | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|-----|---|---|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| Koncentrace [ng/ml] | | | | | | | | | | | | |
| 0,1 | 0,5 | 1 | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 100 | 200 | 500 | 500 |

5. Stanovení fluorochinolonů v půdě

5.1. Slovní popis stanovení fluorochinolonů v půdě

Nejprve byly jednotlivé vzorky půd rozdrceny pomocí třecí misky s tloučkem, aby byly homogenizovány a tím byla zvýšena reprodukovatelnost léčiv. Takto připravené vzorky půdy byly postupně jeden po druhém naváženy do plastové centrifugační zkumavky o objemu 50 ml a vhodně označeny (vzorků půd bylo celkem 11 po navážkách 1 g a každý experiment byl proveden 2x). Následně byly vzorky půdy naspikovány roztokem léčiv 500 µl (koncentrace 1µg/ml), aby každá půda obsahovala 500 ng každého léčiva (tedy známou koncentraci). Následně se zkumavky nechaly přes noc v digestoři, aby došlo k odpaření methanolu a navázání léčiv na půdu tak, jako jsou léčiva vázána na půdu v případě kontaminace životního prostředí.



Obrázek 20: Vzorek půdy s extrakčními činidly připraven k extrakci

Následujícího dne byly do jednotlivých zkumavek napipetovány extrakční roztoky – metanol a fosfátový pufr (pH 3) po objemu 5 ml. Připravené zkumavky s roztoky byly jedna po druhé promíchány na vortexu a vloženy na dobu 10 minut na ultrazvuk při 12°C. Promíchané a již sonikované vzorky byly vloženy do centrifugy na 4800 otáček za minutu na dobu 8 minut, extrakty byly následně slity do vialky se stejným číslem jako na centrifugační zkumavce. Do těchto prázdných zkumavek byly opět přidány stejné extrakční roztoky o stejném objemu, tyto roztoky byly opět promíchány na vortexu, vloženy na ultrazvuk a pevná složka z nich byla odstředěna na centrifuze. Všechny operace probíhaly za stejných podmínek jako v první části extrakce. Extrakty byly opět slity do stejných vialek s příslušnými čísly. Po slití extraktů bylo do jednotlivých zkumavek naváženo 0,6 g dihydrátu kyseliny ethylendiamidtetraoctové (EDTA) a napipetováno 7,5 ml acetonitrilu, 7,5 ml McIlvaina pufru (pH 8), 4,8 ml roztoku hexahydrátu dusičnanu hořečnatého o koncentraci 0,5 g/ml a nakonec 0,2 ml 2,5% roztoku amoniaku. Takto připravené roztoky vzorků s extrakčními činidly byly vloženy na vortex, aby se promíchaly a následně byly umístěny na ultrazvuk na 10 minut ale již při teplotě 35°C. Homogenizované a sonikované vzorky byly vloženy na centrifugu a to na dobu 8 minut na 4800 otáček za minutu. Pomocí centrifugy došlo k odstředění extraktu od pevné složky vzorku, tyto odstředěné extrakty byly slity do vialek z tmavého skla opatřených číslicemi stejnými jako na jednotlivých zkumavkách. Do zkumavek byly naposledy přidány poloviční objemy extrakčních činidel z předchozího kroku (tedy 3,75 ml acetonitrilu, 3,75 ml McIlvaina pufru (pH 8), 2,4 ml roztoku hexahydrátu dusičnanu hořečnatého o koncentraci 0,5 g/ml a nakonec 0,1 ml 2,5% roztoku amoniaku) a to bez přídavku EDTA. S připravenými roztoky bylo zacházeno jako v předchozím kroku, byly promíchány na vortexu, vloženy při 35°C na 10 minut na ultrazvuk a vloženy na 8 minut na 4800 otáček za minutu na ultrazvuku. Extrahovaná rozpouštědla byla opět slita do vialek s hnědým sklem s příslušnými čísly. Po extrakci byly jednotlivé vialky s roztoky vystaveny plynnému dusíku v kovovém bloku termostatu zahřátém na 40°C, aby došlo k odpaření převážně organického rozpouštědla za účelem zakoncentrování roztoku. Hmotnost každého roztoku ve vialce klesla o 6 g. Veškeré extrakty se shodnými čísly byly kvantitativně převedeny do kádinky o objemu 600 ml a postupně zředěny na 480 ml Mili-Q vodou. Poté bylo se vzorky provedeno SPE přes kolony OASIS HLB (200 mg; 6 ml; průměr částic 25-35 µm; WATERS USA) obsahující univerzální sorbent. Tento sorbent je makroporezím kopolymerem sestávající ze dvou monomerů (z lipofilního divinylbenzenu a hydrofilního N-vinylpyrrolidonu), pomocí něhož je možné stanovovat sloučeniny ve všech rozmezích pH, díky čemuž dochází k lepšímu zachycení polárních analytů. Vše probíhalo za použití vakuového systému. Nejprve byly kolony propláchnuty 6 ml metanolu a následně 6 ml Mili-Q vody průtokem rychlostí 1 ml/min. Při zbytkovém zůstatku vody na sorbentu, dosahujícím po meniskus horní frity SPE kolony, byly připojeny ke kolonám hadičky, jimiž začal z kádinek proudit předem připravený roztok vzorku a to postupným prokapáváním rychlostí 5 ml/min. Tato extrakce trvala 2-3 hodiny a po prokapání celého roztoku vzorku byly kádinky propláchnuty zhruba 15 ml Mili-Q vody z důvodu kvantitativního převedení vzorku do cartridge. Rychlost průtoku odpovídala 1 ml/min.

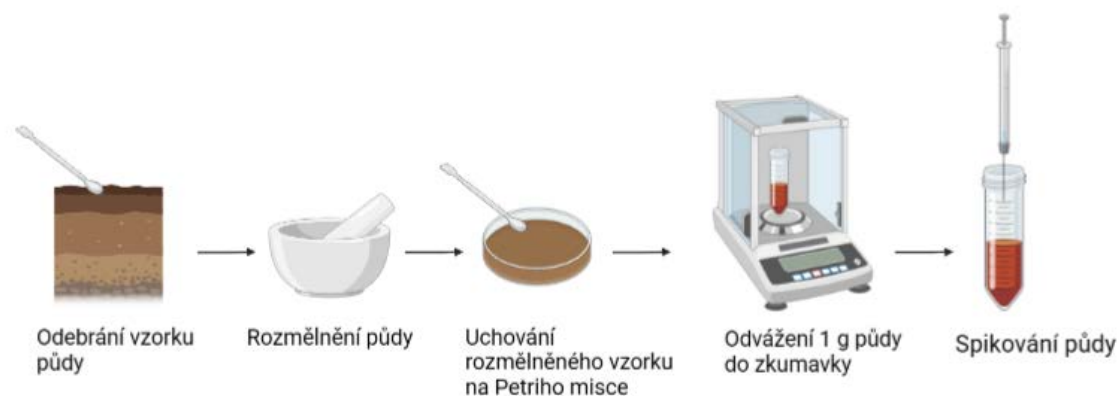
Jakmile došlo k prokapání veškerého zbytku Mili-Q vody z kádinek, hadičky byly odpojeny, a jednotlivé kolony byly po dobu 2 minut sušeny vzduchem. Následně byla aparatura připravena pro eluci a to vložением 20 ml vialek pod jednotlivé kolony a přidáním 9 ml 0,1% kyseliny mravenčí v methanolu jako elučního činidla do jednotlivých SPE kolonek.

Eluovaný vzorek byl následně vložen pod proud dusíku do kovového termostatického bloku vyhřátého na 40°C, aby se z něj vypařila eluční činidla a to téměř do sucha. K eluovaným a vysušeným vzorkům bylo přidáno 5 µl směsi vnitřních standardů (ENR-d5 a CIP-d8, koncentrace směsi 10 µg/ml) a 995 µl 0,1% FA v H₂O:ACN (95:5). Následně byly zhomogenizovány za pomoci ultrazvuku a poté byly přefiltrovány přes stříkačku s nylonovým filtrem o průměru 13 mm a velikosti pórů 0,22 µm do 2ml skleněných vialek označených číslicí příslušného vzorku. Takto připravené roztoky vzorků byly vloženy do LC/MS přístroje, a bylo zapnuto měření a následně vyhodnoceny výsledky.

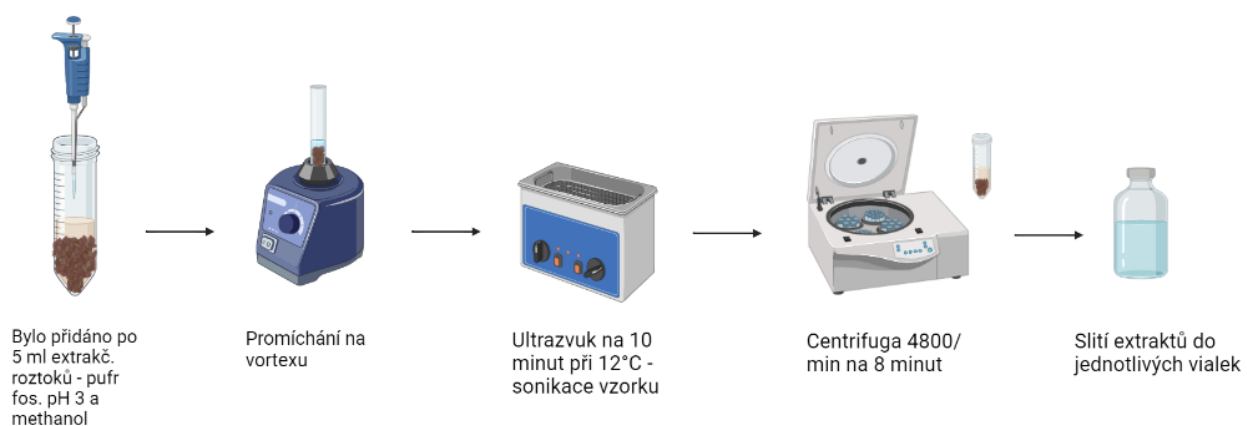


Obrázek 21: Připravené vzorky pro LC/MS analýzu

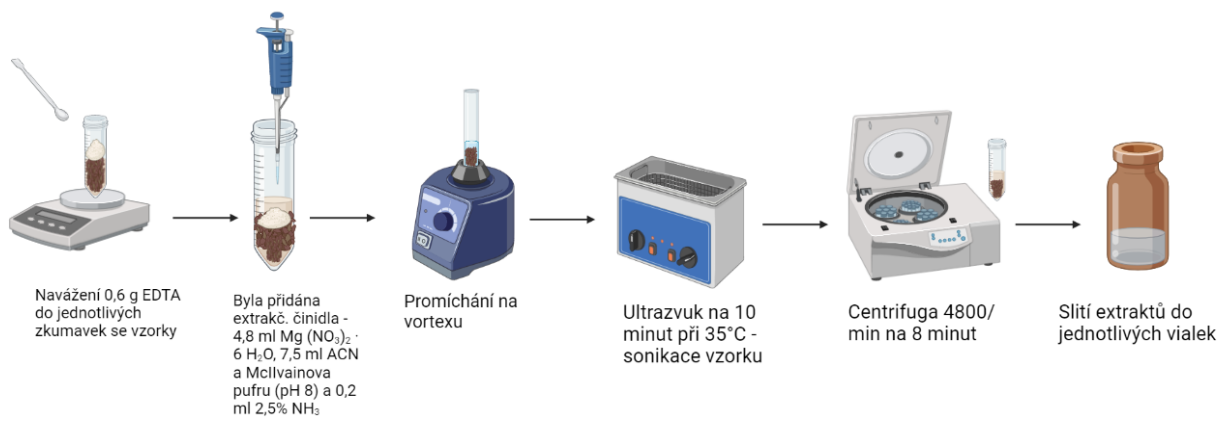
5.2 Popis stanovení fluorochinolonů v půdě prezentovaný pomocí obrázků



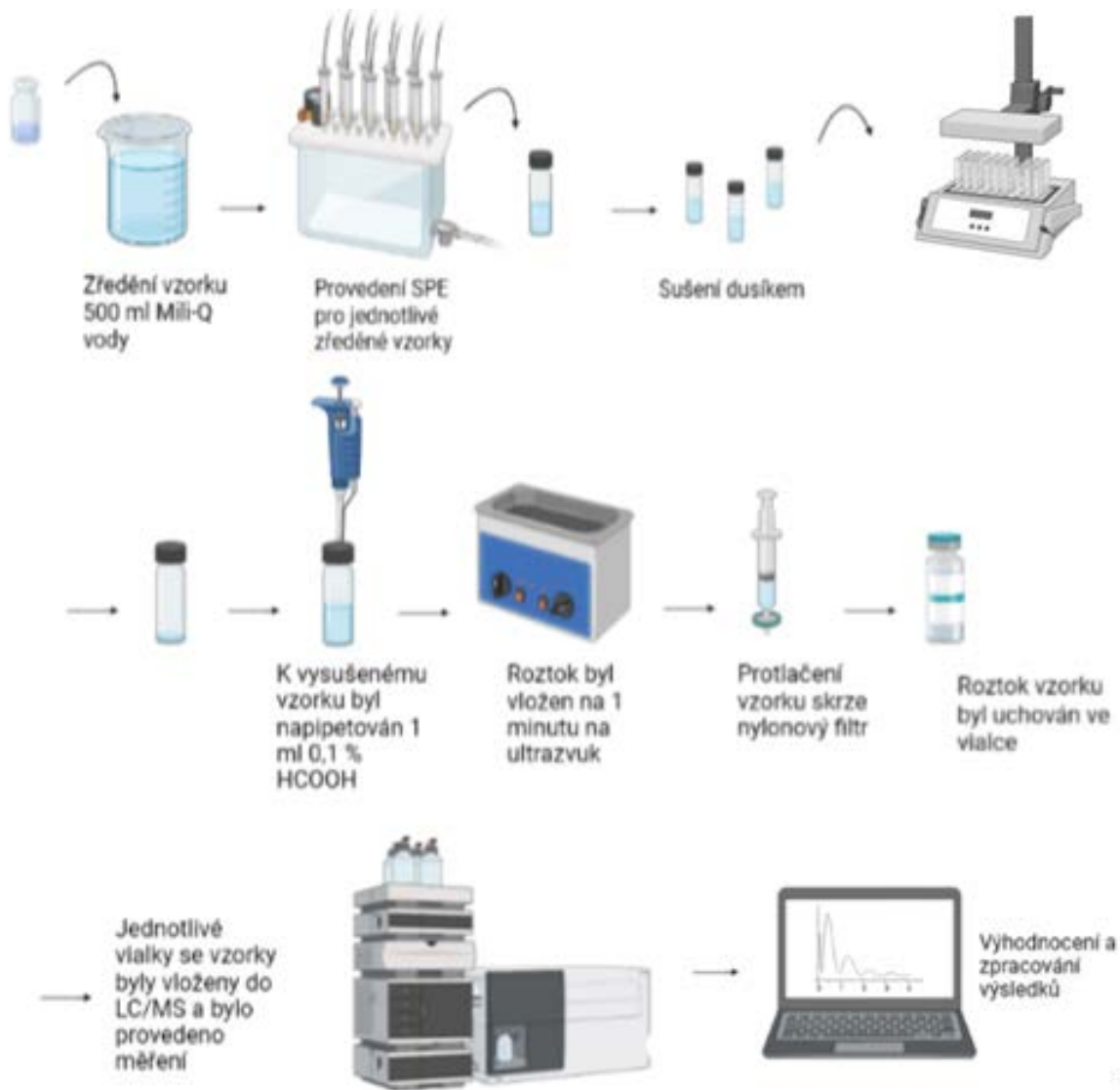
Obrázek 22: Příprava vzorku půdy pro extrakci



Obrázek 23: První krok extrakce ze vzorku, proveden 2x po sobě



Obrázek 24: Druhý krok extrakce ze vzorku, proveden 2x po sobě, podruhé ale s polovičními objemy činidel a bez přídatku EDTA



Obrázek: 25: Provedení SPE a LC/MS analýzy

5.3. Parametry LC-MS/MS metody

V tabulkách níže jsou popsána daná nastavení, která byla při UPLC a na LC-MS přístroji nastavena a použita k vyhodnocení výsledků.

Tabulka 3: Optimalizovaná metoda UPLC metoda pro stanovení léčiv

| UPLC parametry | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| nástřik vzorku | 7 μ l |
| průtok MF | 0,5 ml·min ⁻¹ |
| teplota kolony | 35 °C |
| mobilní fáze | A: 0,1 % HCOOH v MQ |
| | B: acetonitril |
| gradient mobilní fáze | t [min] B [%] |
| | 0,0 10 |
| | 0,5 10 |
| | 13,0 65 |
| | 13,1 95 |
| | 13,5 10 |
| 15,9 10 | |
| Stop time | 16,0 minut |
| posttime na ekvilibraci kolony | 2,0 minuty |
| flush port | OFF |

Tabulka 4: Optimalizovaná metoda ESI pro stanovení léčiv

| ESI parametry | |
|--------------------------|---------------------|
| iontový zdroj | elektrosprej (HESI) |
| napětí elektrospreje | 4 500 V |
| ionizační mód (polarita) | pozitivní (ESI+) |
| Průtok pomocného plynu | 25 |
| Teplota pomocného plynu | 500 °C |
| Průtok sušícího plynu | 15 |
| Teplota sušícího plynu | 350 °C |
| Zmlžovač | 45 |
| Aktivního odtah | ON |
| Režim scanu | MRM |
| Tlak kolizního plynu | 1,5 mTorr |

Tabulka 5: Optimalizovaná metoda TQ pro stanovení léčiv

| MS parametry – acquisition method | | | | | | | |
|--|---------------------------|------------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------------|
| Stanovovaný 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] |
| Ciprofloxacin | 3.25 | 332.4 | 314.2 | 10 | 332.4 | 288.2 | 10 |
| Ciprofloxacin-d8 | 3.25 | 340.4 | 322.1 | 15 | 340.4 | 296.1 | 15 |
| Enrofloxacin | 3.66 | 360.4 | 316.2 | 10 | 360.4 | 342.2 | 20 |
| Enrofloxacin-d5 | 3.66 | 365.4 | 321.0 | 10 | 365.4 | 346.8 | 20 |
| Moxifloxacin | 4.70 | 402.0 | 358.2 | 20 | 402.0 | 384.2 | 20 |
| Norfloxacin | 3.10 | 320.1 | 276.1 | 10 | 320.1 | 231.1 | 40 |
| Ofloxacin | 3.16 | 362.2 | 318.1 | 10 | 362.2 | 261.1 | 20 |
| Pefloxacin | 3.20 | 334.0 | 317.0 | 10 | 334.0 | 289.0 | 10 |

6. Výsledky a diskuze

Pro extrakci fluorochinolonů (FQs) z půdy byla použita metoda popsána podrobně v kapitole 6.2.1, následně byly vzorky změřeny prostřednictvím LC-MS/MS metody (viz kapitoly 7.1. a 8.), aby byly zjištěny výtěžnosti extrakcí z jednotlivých typů půd (viz tabulka 1 s přehledem půd a jejich fyzikálně chemickými vlastnostmi). Jelikož byl každý experiment proveden 2x, hodnoty extrakčních výtěžností byly zprůměrovány a byly vypočteny směrodatné odchylky (viz tabulka 9 v příloze). Mimo jiné byly tyto hodnoty vyneseny do grafu 2.

Tabulka 6: Výsledky koncentrací jednotlivých fluorochinolonů ve vzorcích

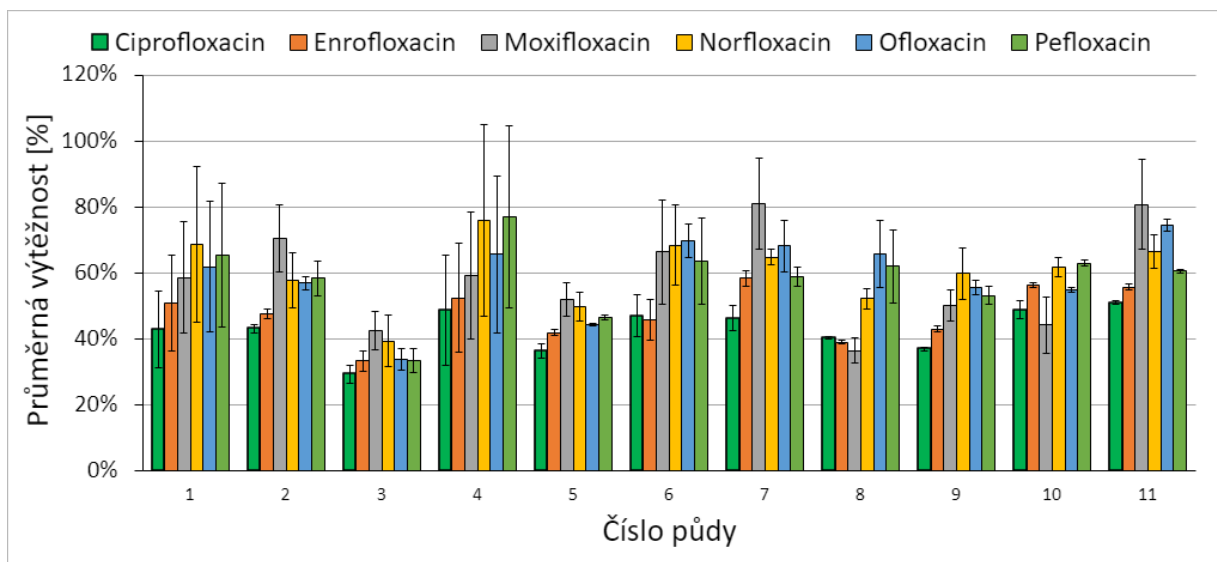
| 1. opakování | | | | | | |
|--------------|---------------|--------------|--------------|-------------|-----------|------------|
| VZOREK | Ciprofloxacin | Enrofloxacin | Moxifloxacin | Norfloxacin | Ofloxacin | Pefloxacin |
| SOC 1.1 | 51,18% | 61,26% | 70,52% | 85,28% | 75,90% | 80,76% |
| SOC 2.1 | 44,06% | 48,60% | 77,78% | 63,66% | 58,42% | 62,08% |
| SOC 3.1 | 31,24% | 35,58% | 46,72% | 44,88% | 36,24% | 36,04% |
| SOC 4.1 | 60,62% | 64,02% | 72,88% | 96,60% | 82,36% | 96,50% |
| SOC 5.1 | 34,62% | 41,26% | 55,60% | 52,72% | 44,58% | 46,88% |
| SOC 6.1 | 51,42% | 50,18% | 77,54% | 76,96% | 73,26% | 72,86% |
| SOC 7.1 | 43,50% | 56,56% | 90,90% | 66,44% | 62,70% | 56,72% |
| SOC 8.1 | 40,54% | 39,44% | 33,76% | 54,24% | 72,98% | 69,84% |
| SOC 9.1 | 37,32% | 42,32% | 53,38% | 65,42% | 53,98% | 55,24% |
| SOC 10.1 | 46,86% | 55,86% | 38,16% | 63,70% | 54,34% | 63,56% |
| SOC 11.1 | 50,60% | 56,32% | 90,48% | 70,10% | 75,84% | 60,18% |

Tabulka 7: Výsledky koncentrací jednotlivých fluorochinolonů ve vzorcích

| 2. opakování | | | | | | |
|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| VZOREK | Ciprofloxacin | Enrofloxacin | Moxifloxacin | Norfloxacin | Ofloxacin | Pefloxacin |
| SOC 1.2 | 34,70% | 40,61% | 46,62% | 51,94% | 47,90% | 49,84% |
| SOC 2.2 | 42,20% | 46,67% | 63,39% | 51,78% | 55,60% | 54,56% |
| SOC 3.2 | 27,38% | 31,20% | 38,51% | 33,74% | 31,50% | 30,89% |
| SOC 4.2 | 36,95% | 40,75% | 45,53% | 55,51% | 48,89% | 57,38% |
| SOC 5.2 | 37,70% | 42,48% | 48,39% | 46,76% | 44,05% | 46,07% |
| SOC 6.2 | 42,50% | 41,41% | 55,28% | 59,98% | 66,13% | 54,21% |
| SOC 7.2 | 49,02% | 60,07% | 71,36% | 63,16% | 73,55% | 61,01% |
| SOC 8.2 | 40,13% | 38,66% | 39,11% | 50,08% | 58,47% | 54,12% |
| SOC 9.2 | 36,55% | 43,75% | 46,82% | 54,23% | 56,97% | 51,16% |
| SOC 10.2 | 50,72% | 56,74% | 50,14% | 59,56% | 55,50% | 62,22% |
| SOC 11.2 | 51,32% | 55,04% | 71,06% | 62,76% | 73,15% | 60,80% |

Tabulka 8: Zprůměrované výsledky koncentrací jednotlivých fluorochinolonů ve vzorcích z prvního a druhého opakování, včetně směrodatných odchylek

| Číslo pŮdy | Ciprofloxacin [%] | Enrofloxacin [%] | Moxifloxacin [%] | Norfloxacin [%] | Ofloxacin [%] | Pefloxacin [%] |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| 1 | 42,9 ± 11,7 | 50,9 ± 14,6 | 58,6 ± 16,9 | 68,6 ± 23,6 | 61,9 ± 19,8 | 65,3 ± 21,9 |
| 2 | 43,1 ± 1,3 | 47,6 ± 1,4 | 70,6 ± 10,2 | 57,7 ± 8,4 | 57,0 ± 2,0 | 58,3 ± 5,3 |
| 3 | 29,3 ± 2,7 | 33,4 ± 3,1 | 42,6 ± 5,8 | 39,3 ± 7,9 | 33,9 ± 3,4 | 33,5 ± 3,6 |
| 4 | 48,8 ± 16,7 | 52,4 ± 16,5 | 59,2 ± 19,3 | 76,1 ± 29,1 | 65,6 ± 23,7 | 76,9 ± 27,7 |
| 5 | 36,2 ± 2,2 | 41,9 ± 0,9 | 52,0 ± 5,1 | 49,7 ± 4,2 | 44,3 ± 0,4 | 46,5 ± 0,6 |
| 6 | 47,0 ± 6,3 | 45,8 ± 6,2 | 66,4 ± 15,7 | 68,5 ± 12,0 | 69,7 ± 5,0 | 63,5 ± 13,2 |
| 7 | 46,3 ± 4,0 | 58,3 ± 2,5 | 81,1 ± 13,8 | 64,8 ± 2,3 | 68,1 ± 7,7 | 58,9 ± 3,0 |
| 8 | 40,3 ± 0,3 | 39,1 ± 0,6 | 36,4 ± 3,8 | 52,2 ± 2,9 | 65,7 ± 10,3 | 62,0 ± 11,1 |
| 9 | 36,9 ± 0,5 | 43,0 ± 1,0 | 50,1 ± 4,6 | 59,8 ± 7,9 | 55,5 ± 2,1 | 53,2 ± 2,9 |
| 10 | 48,8 ± 2,7 | 56,3 ± 0,6 | 44,2 ± 8,5 | 61,6 ± 2,9 | 54,9 ± 0,8 | 62,9 ± 1,0 |
| 11 | 51,0 ± 0,5 | 55,7 ± 0,9 | 80,8 ± 13,7 | 66,4 ± 5,2 | 74,5 ± 1,9 | 60,5 ± 0,4 |



Graf 2: Koncentrace jednotlivých fluorochinolonů

Ke kvantifikaci fluorochinolonů v půdě byla použita externí kalibrační metoda s izotopicky značenými vnitřními standardy (IS). Koeficient determinace kalibračních závislosti (R^2) pro jednotlivá léčiva byl vždy $>0,995$. Kalibrační rozsah byl 0,1 až 500 ng/ml pro všechny FQs. Pro každé léčivo (viz tabulka 10) byly vypočteny limit detekce (LoD) a limit kvantifikace (LoQ) a to podle normy DIN 32645. Dalším základním validačním parametrem každé analytické metody je výtěžnost extrakce. Ta je vynesena do grafu 2 nebo je možné nalézt konkrétní číselné výsledky v tabulce v příloze 9. Mezi další validované parametry v případě LC-MS metody pro reziduální metody v životním prostředí patří: selektivita/specifičnost, confirmace identity, robustnost metody, volba kvantifikační metody, linearita, lineární rozsah (kalibrační rozsah, pracovní rozsah), citlivost měřicího přístroje, preciznost, pravdivost, přesnost měření, výtěžnost, matriční efekt (suprese nebo enhance ionizace), účinnost procesu, stabilita analytu, ale také nejistota měření. Nicméně tyto parametry nebyly v rámci SOČ vyhodnoceny, jelikož se nejednalo o primární cíl této práce. Validace analytických metod je dle správné analytické praxe prováděna v rámci dlouhého časového úseku.

Tabulka 9: Přehled limitů detekce a kvantifikace pro stanovení fluorochinolonů v půdě

| Název léčiva | LoD [ng/g] | LoQ [ng/g] |
|---------------|------------|------------|
| Ciprofloxacin | 0,6 | 0,9 |
| Enrofloxacin | 0,13 | 0,2 |
| Moxifloxacin | 11,77 | 17,65 |
| Nofloxacin | 1,68 | 2,51 |
| Ofloxacin | 1,22 | 1,83 |
| Pefloxacin | 0,34 | 0,51 |

Jak je možné vidět z grafu 2, tak původní domněnka (tedy cíl této SOČ práce), že různé typy půd (respektive jejich vlastnosti) mají výrazný vliv na výtěžnost extrakce, se potvrdila. Za účelem zjištění, který z parametrů má statisticky významný vliv na výtěžnost extrakce byla vytvořena jednoduchá tabulka s korelacemi mezi jednotlivými parametry (viz tabulka 11). Korelace posuzuje vzájemný vztah mezi dvěma náhodnými veličinami (v našem případě parametry). Pokud se jedna z těchto veličin mění, tak se mění i druhá a naopak, v případě že mezi těmito náhodnými veličinami existuje korelace, tak na sobě závisí. Sílu korelace vyjadřuje tzv. korelační koeficient, který nabývá hodnot v intervalu $<-1,1>$. V našem případě, jsou pro nás v tabulce 11 důležité hodnoty vyšší než 0,7 (vysoká pozitivní korelace) nebo nižší než $-0,7$ (vysoká negativní korelace). Tyto hodnoty jsou ve zmíněné tabulce zvýrazněny zelenou barvou. Dále jsou ve stejné tabulce zvýrazněny hodnoty v intervalu $<0,5;0,7>$, které představují střední pozitivní korelaci, a opačně také hodnoty v intervalu $<-0,5; -0,7>$, které představují střední negativní korelaci.

Jak je patrné z tabulky s korelačními koeficienty, vyskytuje se celá řada korelací i mezi vlastnostmi samotné půdy: V případě množství Ca^{2+} iontů existuje korelace s hodnotou pH, ať již aktivní půdní reakcí nebo výměnou půdní reakcí (rozdílný způsob měření pH). Dále existuje korelace mezi množstvím K^+ , Mg^{2+} a Na^+ iontů a vodivostí půdy. Vodivost půdy má také korelaci s celkovým obsahem dusíku a fosforu. Zde můžeme předpokládat, že se opět jedná o ionty přítomné v půdě, tedy konkrétně NO_3^- a PO_4^{3-} . Dále zde existuje korelace mezi obsahem K^+ iontů a celkovým obsahem dusíku a fosforu, korelace mezi obsahem Na^+ iontů a celkovým obsahem dusíku a fosforu. V obou případech můžeme předpokládat, že je korelace způsobena přítomností aniontů obou prvků (NO_3^- a PO_4^{3-}).

Tabulka 11: Korelace jednotlivých půdních parametrů a výtěžnosti jednotlivých fluorochinolonů

| | Písek [%] | Prach [%] | Jíl [%] | aktivní půdní reakce pH [-] | výměnná půdní reakce pH [-] | EC [uS/cm] | Organická hmota [%] | Organický uhlík [%] | Celkový dusík [%] | Celkový fosfor [mg/kg] | Ca [mg/kg] | K [mg/kg] | Mg [mg/kg] | Na [mg/kg] | Ciprofloxacin [%] | Enrofloxacin [%] | Moxifloxacin [%] | Norfloxacin [%] | Ofloxacin [%] | Pefloxacin [%] | |
|-----------------------------|-----------|-----------|---------|--------------------------------|--------------------------------|------------|------------------------|------------------------|----------------------|---------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------------------|-------------------|--|
| Písek [%] | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prach [%] | -0,89 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Jíl [%] | -0,66 | 0,24 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| aktivní půdní reakce pH [-] | 0,09 | -0,39 | 0,45 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| výměnná půdní reakce pH [-] | 0,06 | -0,35 | 0,45 | 0,99 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| EC [uS/cm] | 0,24 | -0,26 | -0,09 | 0,15 | 0,21 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| Organická hmota [%] | 0,44 | -0,34 | -0,36 | -0,14 | -0,19 | 0,42 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| Organický uhlík [%] | 0,44 | -0,34 | -0,36 | -0,14 | -0,19 | 0,42 | 1,00 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| Celkový dusík [%] | -0,04 | -0,06 | 0,18 | 0,29 | 0,36 | 0,92 | 0,22 | 0,22 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Celkový fosfor [mg/kg] | 0,10 | -0,20 | 0,13 | 0,41 | 0,44 | 0,73 | 0,46 | 0,46 | 0,80 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| Ca [mg/kg] | -0,13 | -0,23 | 0,63 | 0,81 | 0,78 | 0,27 | 0,11 | 0,11 | 0,41 | 0,63 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| K [mg/kg] | -0,05 | -0,06 | 0,20 | 0,27 | 0,34 | 0,92 | 0,20 | 0,20 | 0,99 | 0,79 | 0,40 | 1,00 | | | | | | | | | |
| Mg [mg/kg] | 0,28 | -0,35 | -0,02 | -0,06 | -0,07 | 0,63 | 0,38 | 0,38 | 0,59 | 0,34 | 0,13 | 0,58 | 1,00 | | | | | | | | |
| Na [mg/kg] | 0,15 | -0,25 | 0,08 | 0,10 | 0,15 | 0,85 | 0,40 | 0,40 | 0,88 | 0,72 | 0,27 | 0,88 | 0,64 | 1,00 | | | | | | | |
| Ciprofloxacin [%] | -0,35 | 0,46 | -0,01 | -0,05 | -0,08 | -0,22 | 0,32 | 0,32 | -0,21 | 0,02 | -0,01 | -0,22 | -0,44 | -0,35 | 1,00 | | | | | | |
| Enrofloxacin [%] | -0,60 | 0,59 | 0,31 | -0,14 | -0,14 | -0,16 | 0,18 | 0,18 | -0,09 | -0,01 | -0,01 | -0,07 | -0,33 | -0,15 | 0,87 | 1,00 | | | | | |
| Moxifloxacin [%] | -0,38 | 0,61 | -0,19 | -0,74 | -0,75 | -0,19 | 0,37 | 0,37 | -0,22 | -0,22 | -0,48 | -0,23 | -0,15 | -0,09 | 0,58 | 0,65 | 1,00 | | | | |
| Norfloxacin [%] | -0,30 | 0,36 | 0,05 | -0,12 | -0,16 | 0,11 | 0,51 | 0,51 | -0,01 | 0,26 | 0,15 | 0,02 | -0,17 | -0,13 | 0,85 | 0,77 | 0,55 | 1,00 | | | |
| Ofloxacin [%] | -0,02 | 0,22 | -0,31 | -0,17 | -0,18 | -0,01 | 0,57 | 0,57 | -0,13 | 0,23 | -0,08 | -0,13 | -0,45 | -0,12 | 0,84 | 0,65 | 0,59 | 0,80 | 1,00 | | |
| Pefloxacin [%] | -0,25 | 0,29 | 0,06 | 0,14 | 0,10 | -0,04 | 0,32 | 0,32 | -0,10 | 0,31 | 0,29 | -0,08 | -0,42 | -0,29 | 0,84 | 0,66 | 0,29 | 0,90 | 0,80 | 1,00 | |

Primárním cílem SOČ bylo posoudit vliv vlastností půdy na výtěžnosti extrakce fluorochinolonových antibiotik. V tomto případě byly nalezeny následující korelace:

- 1) střední negativní korelace mezi Enrofloxacinem a % obsahem písku v půdě;
- 2) střední pozitivní korelace mezi Enrofloxacinem a % obsahem prachu v půdě;
- 3) střední pozitivní korelace mezi Moxifloxacinem a % obsahem písku v půdě;
- 4) vysoká negativní korelace mezi Moxifloxacinem a půdním pH;
- 5) střední pozitivní korelace mezi Norfloxacinem a organickou hmotou (resp. organickým uhlíkem);
- 6) střední pozitivní korelace mezi Ofloxacinem a organickou hmotou (resp. organickým uhlíkem) a dále se zde vyskytují středně až vysoké pozitivní korelace mezi jednotlivými fluorochinolony, což je způsobeno podobnou chemickou strukturou jednotlivých léčiv a tedy podobnými fyzikálně chemickými vlastnostmi.

7. Závěr

Tato práce se zabývala problematikou, která je spojena s nadužíváním antibiotik a následnou kumulací těchto léčiv v životním prostředí. Jak již bylo zmíněno, ke kontaminaci životního prostředí dochází již při samotné výrobě antibiotik. Stejně tak tomu je i u konečného spotřebitele, ať už u zvířete nebo u člověka nedochází k úplné biotransformaci léčiva, což znamená následné vyloučení z těla a kontaminaci vody a půd. Následkem může být vznik antibiotické rezistence, která je velkým problémem z hlediska zdraví.

Praktická část se zabývá stanovením konkrétně fluorochinolonových antibiotik v různých typech půd. Metoda stanovení byla již slovně i obrázky popsána výše v teoretické části v kapitole 5. Měření bylo prováděno analytickou metodou SPE a LC-MS, tyto metody jsou opět podrobně vysvětleny v kapitolách 6.2.1, 7.1 a 8. Po porovnání výtěžností jednotlivých fluorochinolonů z půd, můžeme potvrdit, že jednotlivé fyzikální a chemické vlastnosti a složení půd mají vliv na výtěžnost fluorochinolonů z půdy. Výsledky výtěžnosti jednotlivých fluorochinolonových látek jsou prezentované v tabulce č. 8 a grafu č. 2.

Primární cíl SOČ, tedy posoudit vliv vlastnosti půd na výtěžnosti byl úspěšně splněn, na základě statistické analýzy dat (korelační tabulky) bylo zjištěno, že na výtěžnost fluorochinolonů z půdy mají vliv následující půdní vlastnosti: % obsah písku v půdě; % obsah prachu v půdě; půdní pH a množství organické hmoty (respektive organického uhlíku).

Nicméně i přesto, že bylo potvrzeno, že tyto konkrétní půdní parametry mají vliv na výtěžnost (v souladu s dostupnou literaturou), tak nelze jednoznačně říci, která z těchto vlastností půd nejvíce ovlivňuje výtěžnost samotné extrakce (kvůli velkému množství značně lišících se parametrů půdy). Pozitivní výsledek této SOČ tedy udává směr pro následující výzkum vlivu půdních vlastností na výtěžnosti různých léčiv z půdní matrice.

8. Seznam použitých zdrojů

- [1] Antibiotika. Medixa.org [online]. Česká republika: MUDr. Pavel Kouda, 2014 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.medixa.org/lecba/antibiotika>
- [2] Antibiotika – na co si dát pozor?. Gate2biotech [online]. Jihočeský kraj: RNDr. Lenka Grycová, Ph.D, 2013 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/antibiotika-na-co-si-dat-pozor/>
- [3] NEŽÁDOUCÍ A TOXICKÉ ÚČINKY ANTIBIOTIK. České Budějovice, 2016. Není uveden druh práce. JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUĎEJOVICÍCH ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA. Vedoucí práce Tereza Ševčíková. Dostupné v pdf. na http://www.toxicology.cz/_soubory/pdf/antibiot.pdf
- [4] Pavla Hosnedlová. Brusel omezuje používání antibiotik. Bakterie jsou vůči nim čím dál odolnější. EURACTIV.cz [online]. 2019, 21.1.2019, 23.1.2019 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://euractiv.cz/section/zivotni-prostredi/news/brusel-omezuje-pouzivani-antibiotik-bakterie-jsou-vuci-nim-cim-dal-odolnejsi/>
- [5] EU omezí podávání antibiotik hospodářským zvířatům. Spotřebitele.dtest.cz [online]. Portál spotřebitele.dtest.cz, 2018, 27.11.2018 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://spotřebitele.dtest.cz/clanek-7032/eu-omezi-podavani-antibiotik-hospodarskym-zviratum>
- [6] Hodnocení minimální inhibiční (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) jako nástroje výzkumu a vývoje. Qlaboratories [online]. Ohio, 2022 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www qlaboratories.com/minimum-inhibitory-mic-and-minimum-bactericidal-concentration-mbc-evaluations-as-rd-tools/>
- [7] Antibiotika - léky, nezastupitelné v léčbě infekcí. Ordinace.cz [online]. Česká republika: redakce Ordinace.cz [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.ordinace.cz/clanek/antibiotika-leky-nezastupitelne-v-lecbe-infekci/>
- [8] Tvorba učebního materiálu v rámci mezipředmětových vazeb pro téma antibiotika. [online]. Brno, 2012 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/220879/pdf_m/Diplomova_prace_Lucka. Diplomová práce. MUNI. Vedoucí práce Bc. Lucie Dobrovolná.
- [9] BRABCOVÁ, Kristýna. Využití metody QuEChERS pro analýzu fluorochinolonových antibiotik v půdě. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/139328>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí . Vedoucí práce Ludmila Mravcová.
- [10] FUČÍK, Jan. Odstranění sulfonamidových antibiotik s využitím pokročilých oxidačních procesů [online]. Brno, 2019 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/173480>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Tereza Tulková.
- [11] Kriticky důležitá antibiotika (CIA). Teagasc.ie [online]. Carlow: Teagasc, 2017 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.teagasc.ie/animals/amr/critically-important-antibiotics-cias/>

- [12] Kriticky důležité používání antimikrobiálních látek (CIA). Futurelearn.com [online]. FutureLearn [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.futurelearn.com/info/courses/antimicrobial-stewardship-in-veterinary-practice/0/steps/65403>
- [13] KAPRINAY BRÉDA, Boglárka. Stanovení reziduí antibiotik v půdě [online]. Brno, 2021 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/201385>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ludmila Mravcová.
- [14] Antibiotika: Nemoci hospodářských zvířat. Agropress.cz [online]. Česká republika: Agropress, 2017 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.agropress.cz/antibiotika/>
- [15] Konsensus používání antibiotik: Fluorochinolony 2019 [online]. Česká republika, 2019 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.cls.cz/media/document/6e25ae726f9ccef045b2db6b5b777687.pdf>. Subkomise pro antibiotickou politiku (SKAP). Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně.
- [16] Chinolony. Lekarske.slovniky.cz [online]. Česká republika: Lékařské slovníky [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://lekarske.slovniky.cz/pojem/chinolony>
- [17] Možnosti fluorochinolonů v současné klinické praxi. Klinická farmakologie [online]. FN Olomouc: Vojtěch Hanulík, 2010, 184 - 186 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2010/04/05.pdf>
- [18] Fluorochinolonová antibiotika – omezení používání potvrzeno. Cus.cz [online]. Česká republika: Míša Matoušková - Česká urologická společnost, 2019 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.cus.cz/archiv/fluorochinolonova-antibiotika-omezeni-pouzivani-potvrzeno/>
- [19] JAK FUNGUJÍ FLUOROCHINOLONY?. Rxlist.com [online]. Dr. Sruthi M., MBBS, 2021 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: https://www.rxlist.com/how_do_fluoroquinolones_work/drug-class.htm
- [20] Topoizomeráza: Definice a funkce. Study.com [online]. USA: study.com [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://study.com/academy/lesson/topoisomerase-definition-function.html>
- [21] Lékové interakce s fluorochinolony. Pubmed.gov [online]. USA: National library of medicine, 1993 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8474934/>
- [22] Lékové interakce s ciprofloxacinem a jinými fluorochinolony. Pubmed.gov [online]. USA: National library of medicine, 1993 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2686430/>
- [23] Chinolony: praktický přehled klinických použití, úvahy o dávkování a lékových interakcích. Pubmed.gov [online]. USA: National library of medicine, 1993 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8537808/>
- [24] O ciprofloxacinu. NHS.uk [online]. Česká republika: NHS.uk, 2022 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.nhs.uk/medicines/ciprofloxacin/>

- [25] Enrofloxacin. Pubchem.ncbi [online]. Pubchem, 2022 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enrofloxacin#section=Associated-Disorders-and-Diseases>
- [26] Enrofloxacin. Sciencedirect.com [online]. Sciencedirect, 2016 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/enrofloxacin>
- [27] Enrofloxacin. Go.drugbank.com [online]. drugbank, 2016 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB11404>
- [28] Norfloxacin. Go.drugbank.com [online]. Česká republika: Drugs.com, 2016 [cit. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/mtm/norfloxacin.html>
- [29] Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK. Stefajir.cz [online]. Praha: MUDr. Jiří Štefánek, 2011 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/ofloxacin>
- [30] Pefloxacin. Přehled jeho antibakteriální aktivity, farmakokinetických vlastností a terapeutického použití. Pubmed.ncbi. [online]. USA: National library of medicine [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2663414/>
- [31] Moxifloxacin. Stefajir.cz [online]. Praha: MUDr. Jiří Štefánek, 2011 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/moxifloxacin>
- [32] Antibiotická rezistence. Tvp.vscht.cz [online]. Praha: Ústav technologie vody a prostředí VŠCHT Praha, 2021 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://tvp.vscht.cz/veda-a-vyzkum/projekty/ARGTech/antibioticka-rezistence>
- [33] Antibiotická rezistence. Bmedic.cz [online]. Klára Menšíková, 2020 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://bmedic.cz/antibioticka-rezistence/>
- [34] Vztah výskytu reziduí antibiotik a bakteriální rezistence v odpadních a přírodních vodách. Chemicke-listy.cz [online]. Praha: Chemické listy - P. Fryčák, 2023 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <http://w-ww.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3751>
- [35] Antibiotická rezistence. Cdc.gov [online]. USA: Ministerstvo zdravotnictví a sociálních služeb USA, 2022 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html>
- [36] Antimikrobiální rezistence. Cdc.gov [online]. USA: Ministerstvo zdravotnictví a sociálních služeb USA, 2022 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
- [37] Globální zátěž bakteriální antimikrobiální rezistence v roce 2019: systematická analýza. Thelancet.com [online]. USA: thelancet.com, 2019 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(21\)02724-0/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(21)02724-0/fulltext)
- [38] Od přirozeného fenoménu výskytu genů rezistence k antibiotikům v životním prostředí ke vzniku multirezistentních kmenů. Chemicke-listy.cz [online]. Praha: Chemické listy, 2018 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <http://w-ww.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3239>
- [39] Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018 [online]. EU, 2020 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents->

- 31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf. Vedoucí práce © European Medicines Agency, 2020.
- [40] Nebezpečí zvířecích antibiotik. Theatlantic.com [online]. Kalifornie: Bill Niman, 2009 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.theatlantic.com/health/archive/2009/07/the-dangers-of-animal-antibiotics/21286/>
- [41] Antibiotika v životním prostředí: příčiny a důsledky. Ncbi.nlm [online]. USA: National library of medicine, 2020 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7418837/>
- [42] Aplikace kalů z čistíren odpadních vod na zemědělské půdě a související legislativa. BIOM.CZ [online]. Praha: Veronika Jarolímová [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: https://biom.cz/cz-09E5%20EK&uid=%5B%5Buid%5D%5D&e=%5B%5Be_no%5D%5D&odkud=ENEKO/odborne-clanky/aplikace-kalu-z-cistiren-odpadnich-vod-na-zemedelske-pude-a-souvisejici-legislativa
- [43] Antibiotics in the environment: causes and consequences. Ncbi.nlm [online]. USA: National library of medicine, 2020 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7418837/>
- [44] BOURDAT-DESCHAMPS, Marjolaine, Sokha LEANG, Nathalie BERNET a Jean-Jacques DAUDIN. Journal of Chromatography A [online]. 2014, 1349 [cit. 2023-01-26]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.05.006
- [45] BEN MORDECHAY, Evyatar, Jorge TARCHITZKY, Yona CHEN, Moshe SHENKER a Benny CHEFETZ. Composted biosolids and treated wastewater as sources of pharmaceuticals and personal care products for plant uptake: A case study with carbamazepine. Environmental Pollution [online]. 2018, 232, 164-172 [cit. 2023-01-26]. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2017.09.029
- [46] PŮDA A VODA. Geology.cz [online]. ZŠ. J. A. K. Blatná [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: http://www.geology.cz/svet-geologie/ucitele/miniprojekty/Puda_a_voda_Blatna.pdf
- [47] Často kladené otázky: Půda pomůcka OPVK. Aa.ecn.cz [online]. [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: https://aa.ecn.cz/img_upload/5c056690afe4c19cfc7c7c1869565537/puda-casto-kladene-otazky.pdf
- [48] Vliv kontinuální a rotační pastvy na vybrané fyzikální a chemické vlastnosti půd [online]. České Budějovice, 2009 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: https://theses.cz/id/h0qrgq/downloadPraceContent_adipIdno_7688. Diplomová práce. JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH Zemědělská fakulta.
- [49] Sorpční schopnosti půdy. Web2.mendelu.cz [online]. Brno: Prof. Ing. Rostislav Richter, DrSc., 2004 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_221_multitext/vyziva_rostlin/html/agrochemie_pudy/sorpce.htm
- [50] Půdní znaky a vlastnosti půd. Is.muni.cz [online]. Brno: MUNI [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2004/G8141/um/102910/Pudni_znaky_vlast_pud.pdf
- [51] Sorpční komplex. Enviwiki.cz [online]. Kopecká Ivana, 2020 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: https://www.enviwiki.cz/wiki/Sorp%C4%8Dn%C3%AD_komplex

- [52] ZHANG, Ya-Lei, Shuang-Shuang LIN, Chao-Meng DAI, Lu SHI a Xue-Fei ZHOU. Sorption–desorption and transport of trimethoprim and sulfonamide antibiotics in agricultural soil: effect of soil type, dissolved organic matter, and pH. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2014, 21(9), 5827-5835 [cit. 2023-01-26]. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-014-2493-8
- [53] STRAWN, Daniel G. Sorption Mechanisms of Chemicals in Soils. *Soil Systems* [online]. 2021, 5(1) [cit. 2023-01-26]. ISSN 2571-8789. Dostupné z: doi:10.3390/soilsystems5010013
- [54] Kah, M., & Brown, C. D. (2006). Adsorption of Ionisable Pesticides in Soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 149–217. doi:10.1007/978-0-387-32964-2_5
- [55] Laboratorní technika: Extrakce. Ped.muni.cz [online]. Brno: Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity, 2007 -2008 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/extrakce.html>
- [56] Směsi. [Http://e-chembook.eu/](http://e-chembook.eu/) [online]. Česká republika: RNDr. Jan Břížďala [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <http://e-chembook.eu/smesi>
- [57] Extrakce. Web.vscht.cz [online]. Praha: vscht, 2018 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-11%20Extrakce%20vzorku%20kapalinou%20\(LLE_LSE_PLE_MASE_SFE\)_VH2018.pdf](https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-11%20Extrakce%20vzorku%20kapalinou%20(LLE_LSE_PLE_MASE_SFE)_VH2018.pdf)
- [58] ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V PŮDĚ A PŘÍPADNĚ DALŠÍCH ČÁSTECH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ [online]. Brno, 2021 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/Benes/Zprava_AMR_2021_FINAL.pdf. Zpráva z funkčního úkolu MZe za rok 2021. VUT.
- [59] ANALÝZA FLUOROCHINOLONOVÝCH ANTIBIOTIK V PŮDĚ [online]. Brno, 2022 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=239154. Diplomová práce. VUT.
- [60] FUČÍK, Jan. Studijní materiál: Zpracování vzorku léčiv pro metodu SPE. Vysoké učení technické, Fakulta chemická v Brně, 2022.
- [61] UNIVERZITA KARLOVA Farmaceutická fakulta v Hradci Králové [online]. Hradec Králové, 2017 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: https://dodo.is.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/85360/DPTX_2016_2_11160_0_374609_0_169230.pdf?sequence=1. Diplomová práce. UNIVERZITA KARLOVA Farmaceutická fakulta.
- [62] Kondicionování. Cojeco.cz [online]. Česká republika: -red-, 2000 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.cojeco.cz/kondicionovani>
- [63] STANOVENÍ LÉČIV V PŮDNÍM EKOSYSTÉMU [online]. Brno, 2022 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: https://www.vut.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=238806. Diplomová práce. VUT.
- [64] Hmotnostní spektrometrie v organické analýze. Adoc.pub [online]. Miroslav Lísa, 2023 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://adoc.pub/hmotnostni-spektrometrie-v-organicke->

9. Seznam použitých zkratk

| | |
|------|--|
| ATB | antibiotika |
| EU | Evropská unie |
| MIC | minimální inhibiční koncentrace |
| MBC | minimální baktericidní koncentrace |
| WHO | Světová zdravotnická organizace |
| CIA | kriticky důležitá antibiotika |
| ČR | Česká republika |
| USA | Spojené státy americké |
| EMA | European medical agency |
| CRP | C-Reaktivní protein |
| ČOV | čistírna odpadních vod |
| EDTA | dihydrát kyseliny ethylendiamintetraoctové |
| SPE | solid phase extraction |
| UPLC | Ultra účinná kapalinová chromatografie |

10. Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1: Struktura kyseliny nalidixové..... | 15 |
| Obrázek 2: Struktura kyseliny pipemidové..... | 15 |
| Obrázek 3: Struktura kyseliny oxolinové..... | 15 |
| Obrázek 4: Struktura cinoxacinu..... | 15 |
| Obrázek 5: Struktura ciprofloxacinu | 18 |
| Obrázek 6: Struktura Enrofloxacinu..... | 18 |
| Obrázek 7: Struktura norfloxacinu | 19 |
| Obrázek 8: Strukturální vzorec Ofloxacinu..... | 19 |
| Obrázek 9: Struktura perfloxacinu | 20 |
| Obrázek 10: Struktura oxifloxacinu | 20 |
| Obrázek 11: Aparatura pro provedení SPE..... | 29 |
| Obrázek 12: Kolona pro provedení SPE..... | 30 |
| Obrázek 13: Kapalinový chromatogram s hmotnostním spektrometrem..... | 32 |
| Obrázek 14: Roztok amoniaku – 2,5% | 38 |
| Obrázek 15: Roztok dusičnanu hořečnatého – 0,5 g/ml..... | 38 |
| Obrázek 16: McIvainův pufr – pH 8 | 39 |
| Obrázek 17: Roztok pufru - pH 3..... | 40 |
| Obrázek 18: Roztok methanolu pro přípravu roztoku kyseliny mravenčí..... | 40 |
| Obrázek 19: Roztok acetonitrilu pro přípravu 0,1% roztoku kyseliny mravenčí | 41 |
| Obrázek 20: Vzorek půdy s extrakčními činidly připraven k extrakci..... | 42 |
| Obrázek 21: Připravené vzorky pro LC/MS analýzu | 44 |
| Obrázek 22: Příprava vzorku půdy pro extrakci | 45 |
| Obrázek 23: První krok extrakce ze vzorku, proveden 2x po sobě..... | 45 |
| Obrázek 24: Druhý krok extrakce ze vzorku, proveden 2x po sobě, podruhé ale s polovičními objemy činidel a bez přídavku EDTA | 46 |
| Obrázek 25: Provedení SPE a LC/MS analýzy..... | 46 |