

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické
analýzy



**LC-MS monitorování vybraných antimikrobních
látek ve vodách**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Dominik Krupka

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant: Ing. Martin Ferenčík

Hradec Králové, 2023

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne:

Podpis:

Poděkování

Rád bych poděkoval panu Ing. Martinu Ferenčíkovi za jeho odborné vedení, za cenné rady, pomoc a spoustu trpělivosti při řešení problémů s vypracováním této diplomové práce. Také bych chtěl poděkovat svému vedoucímu práce panu doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za připomínky, vstřícnost a potřebnou pomoc se zpracováním diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Dominik Krupka

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Ing. Martin Ferenčík

Název diplomové práce: LC-MS monitorování vybraných antimikrobních látek ve vodách

Sledování reziduí humánních a veterinárních antibiotik v povrchových vodách získává, vzhledem ke vzrůstající rezistenci bakterií, stále na větší důležitosti. Tato práce se zabývá adaptováním HPLC-MS/MS metody pro získání pilotních dat o výskytu antibiotik v povrchových vodách. Metoda je zaměřena na analýzu 30 antibiotik ze skupin β -laktamů, makrolidů, linkosamidů, amfenikolů, fluorochinolonů, tetracyklinů a sulfonamidů.

Analýza byla vykonána na přístroji UHPLC Agilent 1200 Infinity series s MS Agilent model 6495 triple Quad. Separace antibiotik byla provedena na reverzní fázi s využitím gradientové eluce a pro jejich detekci byla využita tandemová hmotnostní spektrometrie. Pro ionizaci analytů byl použit elektrosprej v kladné i záporné polaritě.

Metoda byla použita pro pilotní analýzu vzorků povrchových vod České republiky. Byly analyzovány vzorky z 15 toků. Nejčastěji nalézanými antibiotiky byly sulfomethoxazol a klarithromycin.

Klíčová slova: HPLC, MS, Antibiotika, Povrchové vody

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Dominik Krupka

Supervisor: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Consultant: Ing. Martin Ferenčík

Title of diploma thesis: LC-MS monitoring of selected antimicrobial compounds in waters

The monitoring of residues of human and veterinary antibiotics in surface water is gaining more and more importance due to the increasing resistance of bacteria. This work deals with the modification of an HPLC-MS/MS method to obtain pilot data on the occurrence of antibiotics in surface water. The method is focused on the analysis of 30 antibiotics from the groups of β -lactams, macrolides, lincosamides, aminoglycosides, fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides.

The method was performed on a UHPLC instrument Agilent 1200 Infinity series with MS Agilent model 6495 triple Quad. Separation of antibiotics was performed on reverse phase using gradient elution and tandem mass spectrometry. An electrospray in both positive and negative polarity was used to ionize the analytes.

The method was used for the pilot analysis of surface water samples in the Czech Republic. Samples from 15 rivers and streams were analysed. The most frequently found antibiotics were sulfamethoxazole and clarithromycin.

Key words: HPLC, MS, Antibiotics, Surface water

Obsah

Seznam použitých zkratek	8
1 Úvod	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Chromatografie	10
2.1.1 Vysokotlaká kapalinová chromatografie.....	10
2.1.2 Chromatografické módy.....	12
2.2 Hmotnostní spektrometrie.....	13
2.2.1 Iontový zdroj	14
2.2.2 Analyzátor	15
2.2.3 Detektor	18
2.3 Antibiotika.....	19
2.3.1 β -laktamy.....	20
2.3.2 Makrolidy	21
2.3.3 Linkosamidy.....	21
2.3.4 Amfenikoly.....	22
2.3.5 Fluorochinolony	23
2.3.6 Tetracykliny.....	24
2.3.7 Sulfonamidy	25
2.3.8 Rezistence.....	26
2.4 Antibiotika v povrchových vodách.....	26
2.4.1 Cesta antibiotika do vody.....	26
2.4.2 Pohyb antibiotik v povrchových vodách.....	27
2.4.3 Vliv antibiotika na prostředí.....	28

2.4.4	Limity pro antibiotika v povrchových vodách.....	28
3	Cíl práce	31
4	Experimentální část.....	32
4.1	Použitý materiál a chemikálie.....	32
4.1.1	Přístroje a pomůcky:	32
4.1.2	Chemikálie	32
4.1.3	Standardy	33
4.2	Odběr a zpracování vzorku.....	34
4.3	Popis lokalit	34
4.4	Navažování, rozpouštění, ředění	36
4.5	Ladění kolizních energií	36
4.6	Chromatografie	37
4.7	Kalibrace.....	38
4.8	Měření reálných vzorků.....	39
4.9	Experimentální podmínky	39
5	Výsledky a diskuse	41
5.1	Ladění	41
5.2	Chromatografie a kalibrace	43
5.3	Reálné vzorky	48
6	Závěr	52
7	Seznam použité literatury, obrázků a tabulek	53
7.1	Seznam použité literatury	53
7.2	Seznam obrázků.....	55
7.3	Seznam tabulek.....	56

Seznam použitých zkratk

ACN	acetonitril
ATB	antibiotika
ESI	ionizace elektrosprejem
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	hmotnost/náboj
Q	kvadrupól
SRM	selected reaction monitoring
S/N	poměr píku k šumu

1 Úvod

Práce se zabývá adaptací analytické metody pro analýzu širokého spektra antibiotik v povrchových vodách. Po předchozí rešerši byla pro tento účel zvolena kombinace HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Antibiotika jsou léky sloužící k léčbě bakteriálních onemocnění. Jejich užívání je ale spjato i se vznikem a posilováním rezistence. Možnost vzniku rezistence se zvyšuje, pokud jsou antibiotika užívána nesprávně. Bakterie mají možnost vyvinout si geny pro rezistenci, pokud jsou vystavovány nižším než terapeutickým koncentracím. Taková situace může nastat v povrchových vodách, kam se antibiotika dostávají prostřednictvím odpadních vod protékajících přes čističky, které je nedokáží dostatečně odstraňovat. Bakterie jsou zároveň schopny si mezi sebou několika způsoby tyto geny předávat a získávat tak rezistenci od jiných druhů.

Teoretická část stručně popisuje principy kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Dále se věnuje antibiotikům, jejich mechanismům účinku, chemickým vlastnostem a vzniku rezistence. Také se zaměřuje na chování antibiotik ve vodním prostředí. Experimentální část se následně věnuje vlastní analytické metodě.

Laboratorní práce byla prováděna v laboratoři Povodí Labe, státní podnik pod odborným dohledem pana Ing Martina Ferencíka.

2 Teoretická část

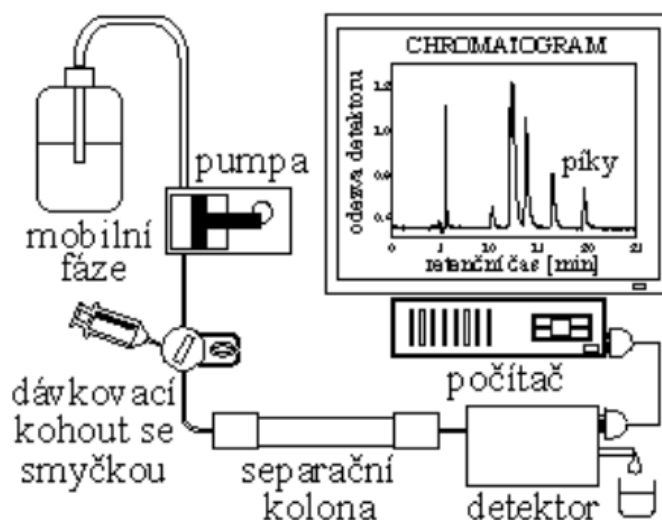
2.1 Chromatografie

Chromatografie je separační analytická metoda. Složky analytu jsou děleny mezi dvě nemísitelné fáze, stacionární a mobilní. Mobilní fáze proniká stacionární fází a unáší s sebou složky vzorku. Ty v důsledku mnohých sorpčních a desorpčních interakcí jsou při pohybu po stacionární fázi, unášeny mobilní fází různou rychlostí, na základě jejich distribučních konstant a dochází k jejich kvalitativnímu dělení. [1]

Základní chromatografické metody lze dělit podle vlastností mobilní fáze na plynovou chromatografii, kde je mobilní fází inertní plyn. Dále superkritickou fluidní chromatografii, ve které je jako mobilní fáze použit plyn nad svou kritickou teplotou a tlakem. A nakonec kapalinovou chromatografii, u které se používá jako mobilní fáze kapalina. [1]

2.1.1 Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je moderní použití kapalinové chromatografie. Schéma HPLC je zobrazeno na Obrázku 1. Mobilní fáze je neustále čerpána ze zásobníku vysokotlakým čerpadlem přes kolonu se stacionární fází, za kterou je umístěn detektor, který kontinuálně snímá vybranou vlastnost eluátu. Výsledný signál detektoru, který je vyneseny proti času, se nazývá chromatogram. [2]



Obrázek 1: Schéma HPLC [5]

2.1.1.1 Zásobníky mobilní fáze a degaser

Zásobníky slouží jako zásobárna roztoků, ze kterých je složena mobilní fáze. Ze zásobníku se roztok čerpá hadičkou opatřenou fritou, která brání vstupu nečistot. [3]

Eluce z kolony může být u této separační metody prováděna dvěma způsoby. Isokratická eluce, se provádí buď jedním rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel, jejichž poměr se v průběhu separace nemění. Druhý způsob je nazýván gradientová eluce. U ní se mobilní fáze skládá z více složek s rozdílnou polaritou, jejichž poměr se v průběhu separace mění. Pro isokratickou eluci nám stačí zásobník jeden, do kterého si rovnou namícháme mobilní fázi, případně může mobilní fáze vznikat smísením roztoků z více zásobníků. Pro gradientovou eluci potřebujeme zásobníků vždy více. [3]

Degaser slouží k odstranění rozpuštěného plynu. K odplynování se používá nejčastěji probublávání heliem nebo vakuový degaser. Bublinky plynu mohou způsobit vznik rušivých píků na výstupu z detektoru. Také mohou vést ke kolísání základní linie nebo zavzdušnění čerpadel. [2]

2.1.1.2 Čerpadla a dávkování vzorku

Nejčastěji používaným čerpadlem je pístové čerpadlo. Jeho úkolem je pod tlakem (až 40 MPa) čerpat mobilní fázi směrem ke koloně. Zároveň poskytovat průtoky od 0,1 do 10 ml/min. Čerpadla jsou vyrobena z odolného materiálu, který odolá korozi a celé řadě chemikálií. Mělo by způsobovat co nejmenší pulzy v toku. [3]

Vialky se vzorky uzavřeny pryžovým perforovaným septem se umísťují do kazety autosampleru. Autosampler si pomocí jehly nabere vzorek z vialky a nadávkuje ho do přístroje. Případně lze u některých přístrojů dávkovat vzorek i manuálně. Nejčastějším způsobem dávkování vzorku je pomocí dávkovací smyčky. Je nedílnou součástí instrumentace a umožňuje velmi přesné dávkování v řádu mikrolitrů. Dávkovací smyčka je napojena na vícecestný ventil, který svým otáčením určuje směr toku mobilní fáze. [3,4]

2.1.1.3 Kolona

Srdcem celého chromatografického systému je kolona, na které dochází k vlastní separaci vzorku. Její plášť je nejčastěji vyroben z nerezové oceli. Dosahuje obvykle rozměrů od 30 mm do 250 mm a je naplněna částicemi o průměru 1,3 až 5 μm , jejichž povrch tvoří stacionární fázi. [2]

Nejčastějším materiálem pro naplnění kolon je silikagel, jehož hydroxylové skupiny mohou být různými způsoby modifikovány, čímž se upravuje selektivita stacionární fáze. Jednou z obvyklých modifikací je například navázání dlouhého uhlovodíkového řetězce (C8, C18, fenyl, alkylfenyl, ...) na silikagel. Tím nám vznikne nepolární stacionární fáze, jejíž polarita a retenční vlastnosti se liší podle navázaného řetězce na stacionární fázi. Nepolární stacionární fáze bude více zadržovat nepolární látky ve vzorku. Nejen vlastní chemické složení stacionární fáze ovlivňuje separaci, ale také velikost částic silikagelu a jejich charakter. Nejběžnější jsou plně porézní částice silikagelu. Další možností jsou povrchově porézní částice. Tyto částice mají pevné neporézní jádro a porézní slupku o tloušťce 0,25-0,5 μm . Alternativou kolon naplněných částicemi jsou monolitické kolony, u kterých je celý prostor kolony vyplněný monolitem. Monolit lze v tomto případě považovat za jednu velkou porézní částici, kterou protéká mobilní fáze. [2,5]

2.1.1.4 Detektor

Detektor slouží k detekci analyzovaných látek. Měl by umožňovat průtok kapaliny, kvůli čemuž by měl mít relativně malý vnitřní objem. Existuje celá řada detektorů založených na různém principu. Patří mezi ně např.: UV/VIS absorpční detektor, fluorescenční detektor, elektrochemický detektor, vodivostní detektor, hmotnostní detektor atd. Každý z nich se díky svým vlastnostem hodí na analýzu jiných látek. [3]

2.1.2 Chromatografické módy

2.1.2.1 Chromatografie na normálních fázích

U tohoto chromatografického módu je typické, že stacionární fáze je polární a mobilní fáze je nepolární. Mobilní fáze je bezvodá. Skládá se z jednoho nebo více rozpouštědel s různou eluční silou (pentan, hexan, benzen, chloroform, methanol, ...). Stacionární fázi většinou tvoří oxid křemičitý nebo oxid hlinitý. K separaci dochází na povrchu stacionární fáze, na kterou jsou molekuly vzorku adsorbovány. Molekuly analytu si vzájemně kompetují o vazebná místa na stacionární fázi s molekulami rozpouštědla. Čím více je mobilní fáze polární, tím méně je analyt zadržován. [1]

2.1.2.2 Chromatografie na reverzních fázích

Tento typ patří k nejpoužívanějším typům kapalinové chromatografie. Je tomu tak díky jeho jednoduchosti, robustnosti a všestrannosti. Stacionární fáze je nepolární, čehož se dosahuje navázáním uhlovodíkového řetězce na silikagel, jak je zmíněno v kapitole 2.1.1.3. Zvýšením hydrofobnosti kolony se zvyšuje její schopnost interagovat s látkou, která má ve své struktuře hydrofobní část. Tu představuje např. uhlovodíkový řetězec nebo aromatická skupina. V důsledku toho dochází k retenci těchto látek na koloně zprostředkované silami typu nejčastěji hydrofobních interakcí. Mobilní fáze je polární a obvykle je směsí vody nebo pufru a organického rozpouštědla (acetonitril, methanol, propan-2-ol atd.). Použité organické rozpouštědlo by mělo být mísitelné s vodou a stabilní za daných experimentálních podmínek. Téměř univerzální použití tohoto typu vychází z toho, že skoro každá organická sloučenina má ve struktuře hydrofobní část, která může interagovat se stacionární fází. Obecně se dá říci, že snížením polaritý mobilní fáze se snižuje retence analytu. Tento jev je opačný oproti chromatografii na normálních fázích. Na eluci látky má také velký vliv teplota. Zvýšení teploty zapříčiňuje oslabení interakce separované látky s mobilní i stacionární fází a tím snižuje retenci této látky. [1,2]

2.1.2.3 Ionově-výměnná chromatografie

Tento typ chromatografie je založen na interakci iontů rozpuštěných v mobilní fázi k opačně nabytým místům stacionární fáze. Z tohoto důvodu jsou na koloně ionizovatelné nebo ionizované skupiny např. $-\text{SO}_3^-$ pro retenci protonizovaných bází nebo $-\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ pro retenci ionizovaných kyselin. Retence je ovlivněna soutěží iontů analytu a protiontů mobilní fáze o iontové skupiny na stacionární fází. [2]

2.2 Hmotnostní spektrometrie

Tato analytická metoda pracuje na principu převedení analyzované látky na ionty, které jsou následně rozděleny podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Následně jsou zaznamenány relativní intenzity takto rozdělených iontů v detektoru. Je to destruktivní analytická metoda. Výhodou této metody je vysoká citlivost, možnost kvantitativní i kvalitativní analýzy (dají se určit konkrétní strukturní informace analyzovaných látek) a potřeba malého množství vzorku. Bohužel je to velmi finančně nákladná metoda vyžadující stabilní prostředí s minimálním kolísáním teplot a vakua v instrumentaci.

Hmotnostní spektrometrie se dá využít jako samostatná analytická metoda, ale často se využívá ve spojení s kapalinovou nebo plynovou chromatografií. [6,7]

2.2.1 Iontový zdroj

Pomocí iontového zdroje se převádí neutrálně nabyté molekuly analytu na ionty, které jsou následně pomocí iontové optiky fokusovány do analyzátoru. Ionizační techniky se dělí na tvrdé a měkké. U tvrdých ionizačních technik je díky přebytečné energii původní molekula ionizována a fragmentována. Měkké ionizační techniky jsou šetrnější, proto dochází převážně ke vzniku protonovaných iontů u pozitivu, případně deprotonovaných iontů u negativu. Dochází pouze minimálnímu vzniku fragmentových iontů. [6]

Dále se dají ionizační techniky dělit podle toho, zda dochází k ionizaci za atmosférického tlaku nebo za vakua. Mezi techniky ionizace za atmosférického tlaku patří ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku a fotoionizace za atmosférického tlak. Naopak za vakua pracují např. elektronová ionizace a MALDI. [6]

2.2.1.1 Elektronová ionizace

Je to jedna z nejstarších ionizačních technik. Jedná se o tvrdou ionizační techniku pracující za vakua. Metoda je vhodná pro ionizaci těkavých a termostabilních látek, protože je třeba ionizovat vzorek v plynném stavu. K tomu dochází v ionizační komůrce, která bývá obvykle temperována na 150 – 200°C. Ionizace probíhá vystavením analytu proudu elektronů, vznikajícímu v rheniovém vláknu nebo ve wolframové žhavené katodě. Tyto elektrony jsou schopny vyrazit valenční elektron ostřelovaných molekul za vzniku kation radikálu, případně může také dojít k excitaci nebo vícenásobné ionizaci analytu. V některých případech může elektronová ionizace vést k elektronovému záchytu za vzniku anion radikálu. Díky tomu, že je ionizace reprodukovatelná mezi přístroji, byly vypracovány rozsáhlé knihovny spekter. [6,8]

2.2.1.2 Ionizace elektrosprejem

Je to jedna z nejpoužívanějších ionizačních technik, která je vhodná pro ionizaci středně polárních až iontových látek. Patří k velmi šetrným ionizačním technikám a může u ní docházet k tvorbě vícenásobně nabitých iontů, což je typické pro analýzu biomakromolekul. [6,9]

Rozpuštěný analyt je přiváděn kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Na konci kapiláry vznikají kapičky za pomoci 15mlžujícího plynu. Kapičky nesou náboj podle zvoleného pracovního módu. Postupným odpařováním se náboj stále zahušťuje, až dojde ke coulombické explozi, která vede k rozpadu kapiček za uvolnění iontů. Ionty jsou následně směřovány malým otvorem do analyzátoru. [6,9]

2.2.1.3 Chemická ionizace za atmosférického tlaku

Opět se jedná o měkkou ionizační techniku. Jsou u ní pozorovány častější fragmentové ionty než u ESI. Je vhodná pro nepolární až středně polární látky. Eluát je přiváděn na konec kapiláry, kde je zmlžen do vyhřívané zóny. V této zóně se nachází jehla, na kterou je vloženo vysoké napětí, čímž vzniká koronární výboj, kterým jsou ionizovány molekuly mobilní fáze. Následně jsou ion-molekulárními reakcemi ionizovány molekuly analytu. [6]

2.2.1.4 Fotoionizace za atmosférického tlaku

Je to měkká ionizační technika, která je vhodná pro ionizaci nepolárních až středně polárních látek. Uspořádání iontového zdroje je stejné jako u APCI. Jediný rozdíl je, že místo jehly je vložený zdroj UV záření. U tohoto typu ionizace je ionizován přímo analyt, nikoli mobilní fáze. Případně může být primárně ionizovaný dopant (toulen, benzen, ...), který následně ion-molekulárními reakcemi ionizuje analyt. [6]

2.2.1.5 MALDI

MALDI nebo-li ionizace laserem za účasti matrice je měkká ionizační technika probíhající za vakua. Vzorek je nanesen na terčík spolu s matricí a je následně ionizován pomocí krátkého laserového impulsu a veden dále do analyzátoru. [6]

2.2.2 Analyzátor

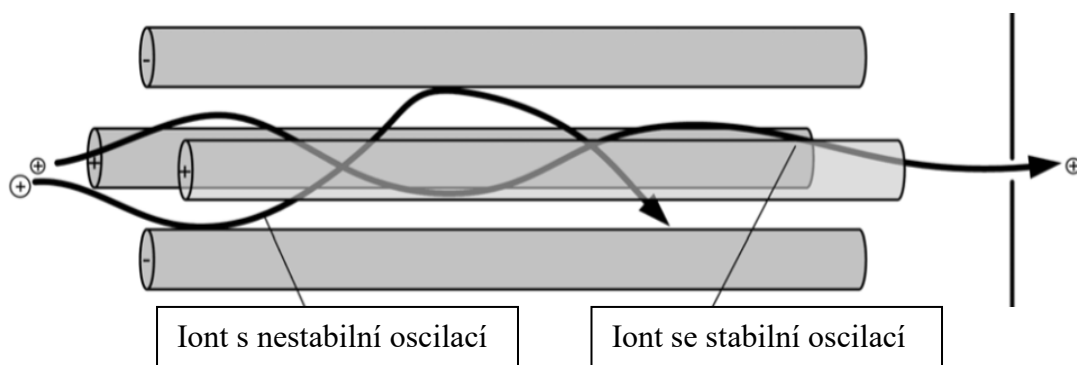
Tato část spektrometru slouží k rozdělení iontů podle poměru hmotnost/náboj, na základě jejich chování v elektromagnetickém poli. Dělení iontů probíhá ve vysokém vakuu. Dělí se podle několika parametrů. Podle způsobu dělení iontů se analyzátory dělí na iontové pasti (zachycují ionty v elektromagnetickém poli), skenující (mění skenovanou veličinu a postupně propouští ionty o určitém poměru m/z k detektoru) a průletové analyzátory (měří čas, po který ionty překonají určitou vzdálenost). [6,10]

2.2.2.1 2D iontová past

Tento typ analyzátoru se skládá z dvou koncových elektrod a jedné prstencové elektrody. Na elektrody je vloženo napětí. Vhodným poměrem napětí mezi elektrodami jsou ionty drženy uvnitř pasti. Změnou napětí jsou ionty následně vypuzovány do detektoru podle jejich m/z . Iontová past je vhodná pro kvalitativní analýzu, díky tomu, že umožňuje fragmentaci zachycených iontů a následnou analýzu jejich produktových iontů. [6,10]

2.2.2.2 Kvadrupólový analyzátor

Tento analyzátor se mechanicky skládá ze 4 tyčí dlouhých 20–30 cm, na které je vloženo stejnosměrné napětí. Na 2 protilehlé tyče kladné a na zbylé 2 protilehlé tyče záporné. Na všechny tyče je zároveň superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí. [6]



Obrázek 2: Schéma průchodu iontů kvadrupólem [11]-upraveno

Ionty vzniklé v iontovém zdroji jsou urychleny do středu mezi tyče, které tvoří kvadrupólové elektrické pole podél podélné osy směrem k detektoru. V elektrické poli, které tyče vytvářejí začínou ionty oscilovat. Určitý poměr hodnoty stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí je stabilní pouze pro určitou hodnotu m/z , a proto iont s touto hodnotou projde k detektoru. Oscilace ostatních iontů jsou nestabilní, v důsledku toho dojde k jejich kolizi s tyčí kvadrupólu, na kterých ztratí svůj náboj. Pomocí plynulé změny hodnoty stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí jsou propouštěny postupně k detektoru všechny ionty analyzovaného vzorku (Obrázek 2). [6,10]

2.2.2.3 Trojitý kvadrupólový analyzátor

Jsou to 3 kvadrupóly postavené za sebe, z nichž 1. a 3. pracují jako klasický kvadrupól, zatímco 2. slouží jako kolizní cela. V této kolizní cele se nachází kolizní plyn

a dochází v ní k fragmentaci iontů vybraných 1. kvadrupólem. Tyto fragmenty jsou následně fokusovány do 3. kvadrupólu. [6,11]

Díky tomuto složení může trojitý kvadrupól pracovat v několika režimech, při kterých se různě kombinují vlastnosti jeho 3 komponent:

1. Sken produktových iontů: U tohoto režimu Q1 propouští pouze iont s vybranou hodnotou m/z . Iont je následně fragmentován v kolizní cele. Q3 následně skenuje produktové ionty ve vybraném rozsahu m/z . Všechny vzniklé fragmenty v tomto rozmezí projdou a jsou zaznamenány detektorem. Díky tomuto nám tento režim poskytne kompletní informaci o fragmentaci definovaného iontu.
2. Sken prekurzorových iontů: Jak už název napovídá, funkce kvadrupólů jsou u tohoto režimu opačné než u skenu produktových iontů. To znamená, že Q1 propouští postupně všechny ionty daného rozmezí m/z , zatím co Q3 propouští k detektoru po celou dobu pouze iont s jednou danou hodnotou m/z .
3. Sken neutrální ztráty: Tento mód je typický tím, že Q1 i Q3 propouštějí ionty s konstantní diferencí m/z , jež představuje neutrální fragment, který vzniká v kolizní cele.
4. Sledování rozpadu iontu (SRM): Tento režim je velice selektivní a zároveň citlivý. Q1 vybírá iont prekurzoru, který je následně v kolizní cele fragmentován pomocí optimální kolizní energie pro získání co nejintenzivnějšího produktu. Tento produkt je následně vybrán pomocí Q3. [12]

2.2.2.4 Analyzátor doby letu

Je složen z dlouhé letové trubice, na začátku které jsou ionty urychleny napěťovým pulzem. Ionty letí různou rychlostí v závislosti na jejich hmotnosti. Díky tomu se kvalitativně rozdělí a dorazí na detektor v jinou dobu. Čím je iont lehčí, tím se pohybuje rychleji. [6]

Výhodou tohoto analyzátoru je, že se jím dá velice přesně určit m/z . Aby mohl být analyzátor takto přesný, musí ionty urazit v trubici určitou vzdálenost. To se pojí s prostorovou náročností tohoto analyzátoru. Tento hendikep jsou schopny částečně

kompensovat iontová zrcadla, díky kterým může být velikost přístroje zkrácena při zachování stejné rozlišovací schopnosti. [6,10]

2.2.2.5 *Orbitální past*

Je to nová metoda komerčně využívaná od roku 2005. Hlavní součásti orbitální pasti jsou vnější a středová vřetenová elektroda. Na elektrody je vložen konstantní elektrický potenciál. Ionty se pohybují podél a okolo vřetenové elektrody. Zvyšujícím napětím se svazek iontů stlačuje, dále se stabilizujícím napětím se stabilizují trajektorie iontů, které následně vytvoří kolem elektrody rotující prstence. Signál následně získaný z detektoru má charakter oscilací a na hmotnostní spektrum se převede Fourierovou transformací. [6,10]

2.2.2.6 *Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací*

Tento typ analyzátoru obsahuje velmi silné supravodivé magnety generující magnetické pole, uprostřed kterého se nachází cela. Po tom, co se ionty dostanou do cely, vlivem silného magnetického pole se rozdělí podle m/z a začnou se pohybovat po cykloidální trajektorii. Vložením pulzu na excitační elektrody jsou ionty excitovány do vyšších orbit. Následně probíhá detekce pomocí měření indukovaného proudu na detekčních elektrodách. Změřený signál je následně převeden Fourierovou transformací na hmotnostní spektrum. [6,13]

2.2.3 Detektor

Poté, co jsou ionty v analyzátoru rozděleny, putují do detektoru. Ionty dopadající na detektor vytvářejí signál, který detektor následně zesílí a převede na elektrický signál. Pouze orbitální past a iontová cyklotronová rezonance nepoužívají detektor, proto že jsou ionty detekovány přímo v analyzátoru. [6,10]

2.2.3.1 *Faradayova klec*

U tohoto elektrického detektoru dopadají ionty na kolektor, kde jsou neutralizovány, což vyvolá proud elektronů. Tyto elektrony prochází rezistorem, na kterém způsobí změnu napětí. Napěťový signál rezistoru je následně zesílen zesilovačem. Měření a zesílený signál je přímo úměrný počtu nábojů dopadajících na kolektor. Odezva Faradayovi klece je nezávislá na energii, hmotnosti a chemické povaze iontu. [10]

2.2.3.2 Fotonásobič

Tento detektor je typický tím, že ionty dopadající na konverzní destičku a z ní uvolní elektrony. Elektrony jsou následně fokusovány na fosforovou destičku, čímž se uvolní fotony. Proud fotonů je poté zesílen ve fotonásobiči. [6]

2.2.3.3 Elektronový násobič

Paprsek iontů rozdělených v analyzátoru dopadá na konverzní elektrodu, která emituje elektrony. Množství emitovaných elektronů je přímo úměrné množství dopadajících iontů. Emitované elektrony jsou následně urychleny a fokusovány na druhou elektrodu která po dopadu těchto elektronů emituje více elektronů než na ní dopadne. Tento proces se 10–20 krát opakuje, čím dojde k podstatnému zesílení signálu. [10]

2.3 Antibiotika

Antibiotika jsou léčivé látky, které slouží k potlačování infekcí. Dříve byly definovány jako látky produkované organismy bránící růstu jiných mikrobu. V dnešní době jsou však mezi antibiotika řazeny i látky vytvořené člověkem nazývaná antibakteriální chemoterapeutika. [14]

Antibiotika mají několik rozdílů oproti ostatním běžným léčivým látkám:

- antibiotika by měla co nejméně působit na lidské buňky a co nejvíce působit na buňky bakteriální
- antibiotika inhibují nebo přímo zabíjejí cílové buňky
- účinek je závislý na stavu rezistence, která může být v různých oblastech světa odlišná
- účinnost antibiotické léčby se může v průběhu terapie měnit kvůli možné adaptaci mikroorganismu

V důsledku těchto specifík je schopna léková politika citelně ovlivnit účinnost těchto léčiv. Kvůli tomu je třeba k těmto látkám přistupovat specificky. [15]

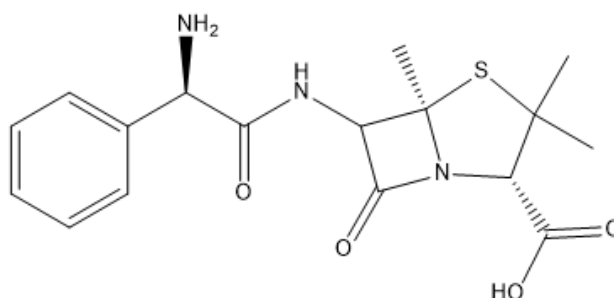
Antibiotika se dělí podle celé řady kritérií. Často používané dělení je podle místa účinku na bakteriální buňce:

- Inhibitory syntézy buněčné stěny (β -laktamy, glykopeptidy)
- Inhibitory syntézy kyseliny listové (sulfonamidy, trimethoprim)

- Inhibitory funkce nukleových kyselin (fluorochinolony, rifamyciny)
- Inhibitory syntézy bílkovin (makrolidy, linkosamidy, streptograminy, amfenikoly, tetracykliny, aminoglykosidy)
- Antibiotika poškozující buněčnou membránu (peptidová antibiotika, aminoglykosidy)
- Oxidačně působící antibiotika (nitroimidazoly, nitrofurany) [15]

2.3.1 β -laktamy

V současné době se jedná o nejvýznamnější a nejpoužívanější skupinu antibiotik. Jedná se o baktericidní antibiotika působící na buněčnou stěnu bakterií. Antibiotikum působí jako falešný substrát bakteriální peptidázy. Konkrétně se naváže na koncovou část D-alanin-D-alanin-peptidázy, čímž tento enzym nemůže propojovat peptidoglykanové řetězce v bakteriální stěně. Důsledkem toho dochází k rozpadu buněčné stěny a smrti bakterie. [15]



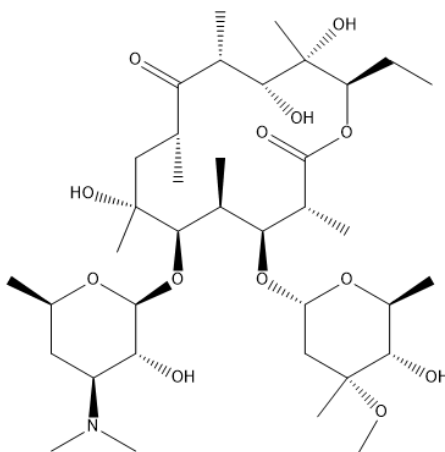
Obrázek 3: Struktura ampicilinu

β -laktamy mají ve své chemické struktuře betalaktamový kruh, na který je vázaný nejčastěji kondenzovaný heterocyklus. Podle struktury β -laktamového kruhu se dělí na peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a inhibitory β -laktamáz. Nejčastěji používané s největším počtem zástupců jsou peniciliny a cefalosporiny. Penicilinová antibiotika vycházejí ze struktury kyseliny 6-aminopenicilanové, zatímco cefalosporiny z kyseliny 7-aminocefalosporanové. Mezi peniciliny patří amoxicillin, ampicilin (Obrázek 3: Struktura ampicilinu), penicilin G, penicilin V, piperacilin a oxacillin. Mezi cefalosporiny patří cefazolin a cefotaxim. Jedná se o hydrofilní látky. Vylučují se z těla převážně ledvinami v nemetabolizované podobě. [14,15]

2.3.2 Makrolidy

Makrolidová antibiotika působí navázáním na velkou ribozomální podjednotku 50 S, čímž brání proteosyntéze. Jedná se o bakteriostatická antibiotika. Výborně pronikají biologickými bariérami a dokonce dochází k jejich hromadění v leukocytech. Díky tomu se výborně hodí na likvidaci patogenů, které jsou schopny přežít v makrofázích. [15]

Tato antibiotika jsou tvořena 14–16členným laktonovým kruhem, na který jsou navázány cukry. Makrolidy jsou lipofilní látky, které mají omezenou stabilitu v kyselém prostředí. Močí jsou vylučovány pouze omezeně. Jsou převážně vylučovány žlučí. Částečně také dochází k jejich metabolizaci na cytochromech v játrech. Mezi makrolidy patří erythromycin (Obrázek 4), klarithromycin, roxithromycin a azithromycin [14,15]

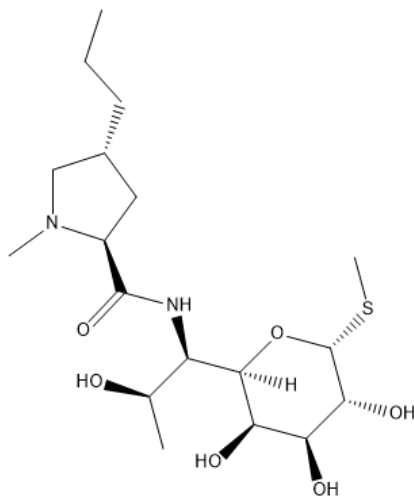


Obrázek 4: Struktura erythromycinu

2.3.3 Linkosamidy

Jedná se o malou skupinu antibiotik, které se váží na velkou podjednotku 50 S bakteriálního ribozomu, čímž brání proteosyntéze. Působí převážně bakteriostaticky, ale u některých citlivějších bakterií mohou působit i baktericidně. Jsou schopny

poškozovat bakterie už při koncentracích nižších než minimální inhibiční koncentrace. [15]



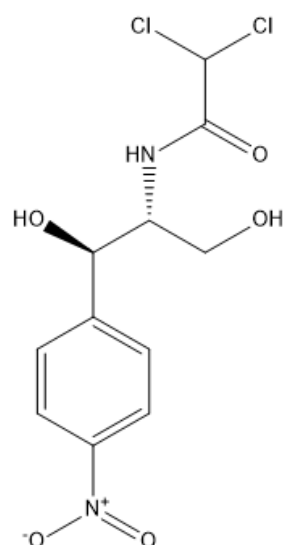
Obrázek 5: Struktura linkomycinu

Základem chemické struktury linkosamidů je aminocukr, ke kterému je peptidickou vazbou navázán prolin. Jedná se o hydrofilní látku, která je převážně vylučována ledvinami. Částečně je ale také vylučována žlučí. Mezi linkosamidy patří linkomycin (Obrázek 5). [15,16]

2.3.4 Amfenikoly

Tato malá skupina antibiotik inhibuje proteosyntézu pomocí navázání na velkou podjednotku 50 S bakteriálního ribozomu. Působí převážně bakteriostaticky, ale u některých citlivějších bakterií se může projevit i baktericidní účinek. [15]

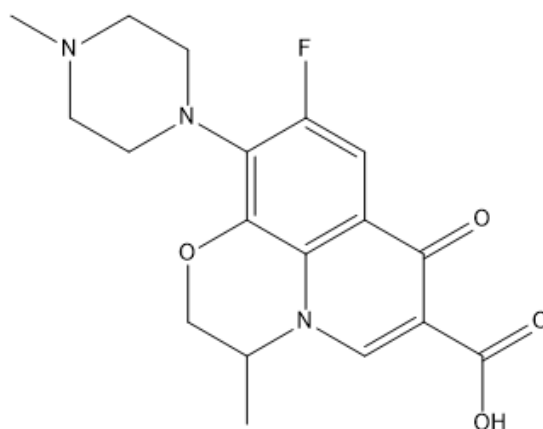
Jedná se o malou molekulu jejíž základ tvoří benzenové jádro s nitroskupinou. Amfenikoly mají lipofilní charakter. Převážná část antibiotika je v játrech glukuronidována a následně vyloučena močí. Mezi amfenikoly patří chloramfenikol (Obrázek 6). [15]



Obrázek 6: Struktura chloramfenikolu

2.3.5 Fluorochinolony

Fluorochinolony působí mechanismem inhibice topoizomeráz. Konkrétně se jedná u gram-positivních bakterií o topoizomerázu IV a u gram-negativních o topoizomerázu II. Topoizomeráza II skládá molekulu DNA do superšroubovice DNA. Topoizomeráza IV zase odděluje dceřiné vlákno od mateřského vlákna DNA při replikaci DNA. Jedná se o bakteriocidní antibiotika, která nemají velký rozdíl mezi minimální inhibiční koncentrací a minimální cidní koncentrací. [15]



Obrázek 7: Struktura ofloxacinu

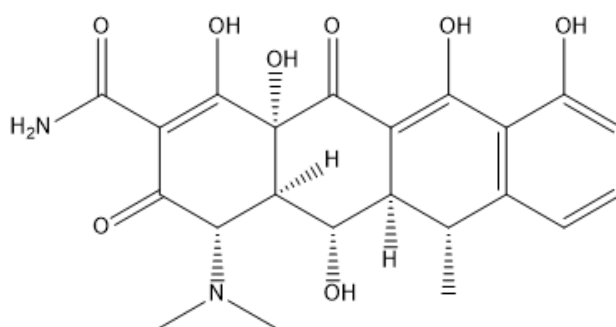
Většina fluorochinolonů je odvozena od 4-chinolon-3-karboxylové kyseliny. Ve vlastnostech těchto antibiotik jsou velké rozdíly. Jsou vylučovány v různém poměru (dle

konkrétního fluorochinolonu) játry i ledvinami. Některé jsou velmi ochotně metabolizovány s tím, že část metabolitů si stále zachovává antibakteriální aktivitu. Vytvářejí komplexy s vícemocnými ionty, které mohou bránit vstřebávání ze střev. Mezi fluorochinolony patří ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin a ofloxacin (Obrázek 7). [15]

2.3.6 Tetracykliny

Tato antibiotika se reverzibilně váží na malou podjednotku 30 S bakteriálního ribozomu, čímž brání proteosyntéze. Tetracykliny působí bakteriostaticky. U prokaryotických buněk přispívá k účinku aktivní transport tetracyklinů do buňky. Tento mechanismus u eukaryotických buněk chybí, což kromě jiné struktury ribozomů také přispívá k jejich odolnosti vůči těmto antibiotikům. [15]

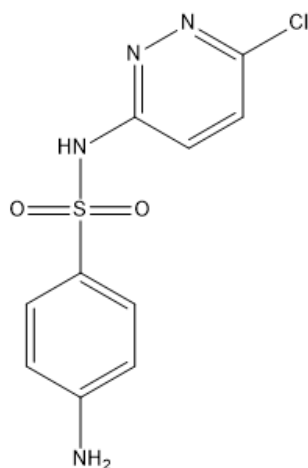
Základem molekuly tetracyklinů jsou čtyři lineárně fúzované aromatické cykly. Jedná se o lipofilní látky, které snadno pronikají tělními bariérami. V těle částečně podléhají metabolizaci. Jsou vylučovány jak ledvinami, tak i žlučí. Ochotně vytvářejí komplexy s vícemocnými ionty (Mg^{2+} , Ca^{2+} , ...), díky tomu dochází při jejich delším užívání k hromadění v kostech a zubech. Mezi tetracykliny patří doxycyklin (Obrázek 8), chlortetracyklin, oxytetracyklin a tetracyklin. [15]



Obrázek 8: Struktura doxycyklinu

2.3.7 Sulfonamidy

Sulfonamidy inhibují syntézu kyseliny listové. Vlastním esenciální látkou vznikající z kyseliny listové je kyselina tetrahydrolistová, která je nezbytná pro eukaryotické i prokaryotické organismy. Prokaryotické organismy si vyrábějí kyselinu listovou, zatím co savci ji získávají z prostředí a nemají genovou výbavu na její syntézu. V důsledku toho působí sulfonamidová antibiotika selektivně na bakterie. Na bakterie působí bakteriostaticky. Konkrétně sulfonamidy fungují jako kompetitivní inhibitory na enzymu dihydropteroát-syntetáza, která vytváří kyselinu dihydropteroovou, ze které vzniká kyselina dihydrolistová. [15]



Obrázek 9: Struktura sulfachlorpyridazinu

Vzorovou molekulou pro všechny sulfonamidy je sulfanilamid, na kterém dochází k obměnám na sulfonamidové skupině nebo aminoskupině. Existují druhy sulfonamidů, které jsou hydrofilního charakteru, tak i hydrofobního charakteru. Mohou v těle podléhat metabolickým reakcím v játrech. Převážně podléhají glukuronidaci a acetylaci. Jsou vylučovány močí. Některé sulfonamidy (např. ftalylsulfathiazol) se díky svým chemickým vlastnostem téměř nevstřebávají a využívají se kvůli tomu k léčbě střevních infekcí nebo topicky. Mezi hledanými sulfonamidy touto prací patří: sulfadimethoxin, sulfadoxin, sulfachlorpyridazin (Obrázek 9), sulfaklozin, sulfamerazin, sulfamethazin, sulfamonomethoxin, sulfapyridin a sulfathiazol. [14,15]

2.3.8 Rezistence

Rezistence se dělí na přirozenou a získanou. Přirozená rezistence je vlastnost bakterií vyplývající z jejich metabolismu. Znamená, že celá populace daného druhu bakterie je vždy rezistentní vůči danému antibiotiku. Například *Enterococcus faecium* je rezistentní vůči β -laktámovým antibiotikům díky rozdílné D-alanin-D-alanin-peptidáze, na kterou se obvykle tato antibiotika vážou. [15]

Získaná rezistence se vyvinula u bakterií až poté, co byla zavedena antibiotika do praxe. Mechanismů, kterými vzniká rezistence je několik: enzymatická inaktivace antibiotika (peniciliny, cefalosporiny), zábrana přístupu antibiotika k cílovému místu (aminoglykosidy, glykopeptidy), aktivní transport antibiotika ven z buňky (fluorochinolony, makrolidy), zábrana aktivace antibiotika (nitroimidazoly), modifikace cílového místa (β -laktámová antibiotika) a náhrada zablokované metabolické dráhy (sulfonamidy). [15]

2.4 Antibiotika v povrchových vodách

2.4.1 Cesta antibiotika do vody

Xenobiotika jsou z lidského těla vylučována převážně ledvinami nebo žlučí. Při vylučování antibiotika z těla je antibiotikum vylučováno v metabolizované podobě nebo jako nemetabolizovaná látka. Poměr těchto způsobů vylučování je pro každou látku specifický. Například chloramfenikol podléhá z více jak 80 % metabolizaci (nejčastěji glukuronidaci), zhruba 10 % se vyloučí v nezměněné podobě močí a zbytek je vyloučen žlučí do střeva. [15,17]

Po vyloučení z těla mohou být některé metabolity antibiotik přeměněny zpět na účinnou formu antibiotika (například v předchozím odstavci zmiňovaný glukuronid chloramfenikolu). Zároveň se ukazuje, že například sulfonamidy, jsou v hnoji stabilní a udržují si významnou proti-mikrobní aktivitu i v době hnojení. Tímto způsobem se veterinární antibiotika dostávají do životního prostředí odkud mohou být dále distribuovány do vodního prostředí. [17]

Pozemní transport antibiotik se v experimentálních podmínkách malého rozsahu podařilo prokázat. Probíhalo to tak, že na 2 plochy o rozloze $5 \times 2 \text{ m}^2$ s průměrným

sklonem 6° byla aplikována kejda. Kejda byla z dobytka ošetřovaného tylosinem. Dále do ní byl přidán oxytetracyklin a sulfachlorpyridazin. Na okraji ploch byly do hloubky 5 cm nainstalovány žlaby pro odběr vzorku. Po 24 hodinách od aplikace kejdy byl simulován déšť, poté byly plochy ponechány přírodním podmínkám. Po simulovaném dešti a následně po každé srážkové události byly ze žlabů odebrány a analyzovány vzorky. Ve vzorcích byl nalezen oxytetracyklin a sulfachlorpyridazin. Tímto způsobem se mohou dostávat veterinární antibiotika do povrchových vod, ve kterých se je podařilo prokázat a jejich koncentrace se zvyšovala v období hnojení nebo po extrémních srážkách. Antibiotika se mohou pohybovat buď odtokem, pokud jsou rozpuštěna, nebo může transport probíhat půdní erozí u antibiotik navázaných na půdní částice. [18,19]

Další cestou, kterou se dostávají tyto látky do povrchových vod jsou odpadní vody. Odstranění antibiotik z komunálních vod v čistírnách odpadních vod probíhá v rozmezí mezi 60-90 %. Polárnější antibiotika jsou eliminována z odpadních vod většinou hůře než nepolární. Nepolární látky jsou adsorbovány na aktivovaný kal prostřednictvím hydrofobních interakcí. [17]

Účinnost odstranění jednotlivých druhů antibiotik byla zkoušena v Thajsku. Ukázalo se, že účinnost čištění odpadních vod je velmi závislá na konstrukci čistírny a způsobu čištění odpadní vody. Obecně byla nejnižší efektivita čištění u sulfomethoxazolu a klarithromycinu, zatím co nejvyšší byla u cefazolinu a celexinu. Další potenciální možností jsou průsaky kontaminovaných vod ze skládek odpadu. [20,21]

2.4.2 Pohyb antibiotik v povrchových vodách

Osud antibiotika v povrchové vodě závisí na jeho fyzikálně-chemických vlastnostech, které ovlivňují jeho koncentrace ve vodě případně vodních organismech nebo navázané na pevné částice sedimentu (tetracykliny, fluorochinolony). Mezi nejdůležitější atributy patří rozpustnost ve vodě, adsorpce na pevné látky, fotostabilita, náchylnost k biodegradaci případně k biotransformaci. Antibiotika vázaná na pevné částice, jakými je například sediment na dně toků, jsou stabilnější než rozpuštěná a mohou vytvářet rezidua. [17,22]

Koncentrace antibiotika v povrchových vodách ovlivňuje také roční období. Velkou roli v procesu distribuce antimikrobních látek ve vodním prostředí a v jeho

biogeochemickém zpracování hraje fytoplankton. Větší nárůst fytoplanktonu v období květu zvyšuje degradaci antibiotik, která snadno podléhají biodegradaci (např. tetracykliny). Zároveň větší množství biomasy fytoplanktonu zvyšuje koncentrace antibiotik v sedimentech, v důsledku zrychlené sedimentace znečišťujících látek z vodního sloupce. [23]

2.4.3 Vliv antibiotika na prostředí

Nízké koncentrace antibiotik, kterým jsou bakterie vystavovány u nich podporují vznik rezistence. V Polsku se ukázalo, že infrastruktura čistíren odpadních vod je vzhledem k antibiotikům nedostatečná. Nejvyšší koncentrace antibiotik byly naměřeny u výpustě z čistírny, následně byla 3 km po proudu nalezena bakteriální komunita s vysokou rezistencí na antibiotika. [22]

Antibiotika ovlivňují strukturu mikrobiálního společenství, a tak i jejich fungování. Sediment může působit jako důležitý sekundární zdroj některých antibiotik. V Číně v Perlové řece byly nalezeny vyšší koncentrace fluorochinolonů v bezobratlých a bentických rybách, což bylo pravděpodobně způsobeno jejich častým kontaktem se sedimentem, kde se tato antibiotika kumulují. [23]

K působení nízkých dávek antibiotik jsou citlivé řasy a sinice. Antibiotika u nich ovlivňují mnoho metabolických procesů. Erythromycin zvyšuje oxidační stres buněk řas. To se projevuje u druhu *Raphidocelis subcapitata* stimulací růstu při koncentraci 20 µg/l, ale inhibicí růstu při koncentraci 60 µg/l. U druhu *Chlorella vulgaris* působí i koncentrace erythromycinu 60 µg/l hormeticky. Hrozí změna druhového zastoupení řas, které jsou hlavním zdrojem potravy pro spoustu organismů. Nebyl prokázán žádný vliv environmentálních dávek antibiotik na běžnou rybí populaci. Citlivost ale byla zjištěna u rybích embryí, u kterých byly pozorovány otoky a deformity. [21,24]

2.4.4 Limity pro antibiotika v povrchových vodách

Limity pro antibiotika jsou uvedeny v prováděcím rozhodnutí komise (EU) 2022/1307. Z látek, kterými se zabývá tato práce je jeho příloze uvedený limit pouze pro ofloxacin. Tímto rozhodnutím jsou zrušeny rozhodnutí z předchozích let. V nich byly limity pro některá další antibiotika, které byly analyzovány naší metodou. Limity z rozhodnutí komise (EU) jsou uvedeny v Tabulce 1. [25]

Tabulka 1: Limity antibiotik ve vodách dle rozhodnutí komise EU [25–27]

Antibiotikum	Indikativní analytická metoda	Limit (ng/l)
Ofloxacin	SPE-LC-MS-MS	26
Ciprofloxacin*	SPE-LC-MS-MS	89
Amoxicilin*	SPE-LC-MS-MS	78
Makrolidy (Erythromycin, Klarithromycin, azithromycin)*	SPE-LC-MS-MS	19

* antibiotika ze starších rozhodnutí před 2022/1307

2.4.4.1 Koncentrace antibiotik v povrchových vodách

Existuje celá řada prací, které se snaží vyvinout metodu na analýzu antibiotik, zjistit jejich koncentrace v povrchových vodách a pochopit jejich šíření v životním prostředí a vliv na něj. V rámci toho se analyzují nejen vzorky vody, ale také vzorky sedimentu ze dna, fytoplankton z hladiny, ale také vodní organismy např. plži. Podařilo se mi nalézt 2 práce, které se zabývají hledáním antibiotik v povrchových vodách v České republice [28,29]. Autorům těchto prací se podařilo vyvinout metody, díky kterým našli několik sulfonamidů v sedimentech. Ve vodách se jim nepodařilo najít žádná antibiotika. V Tabulce 2 uvádím rozmezí koncentrace antibiotik nalezené v řekách v různých krajínách. Jedná se pouze o antibiotika, kterými se zabývá tato práce a pouze o koncentrace nalezené ve vodě.

Tabulka 2: Koncentrace antibiotik v řekách ve světě (ng/l) [22,23,30–32]

Antibiotikum	Španělsko - 2014-2015 - Rivera de Huelva	Španělsko - 2014-2015 - Guadamar	Polsko - 2018-2020 - Białka	USA Nebraska - 2018 - potok	Čína - 2018 - Perlová řeka	Čína - 2018-2019 - Huangshui
penicilin G						0,11-12,1
erythromycin	0-85	0-0,3		0-0,35	17,2-210,8	0,30-16,6
klarithromycin	0-70,8	0-0,88				0,06-7,75
roxithromycin					24,5-339,0	0,12-48,7
linkomycin				0-11,5		0,07-8,62
ciprofloxacin			0-3,0		4,4-280,8	
norfloxacin					3,1-253,5	
ofloxacin					9,0-198,8	
doxycyklin			0-124,0			
oxytetracyklin			0-47,0		96,0-385,3	
tetracyklin					35,5-110,7	
sulfadimethoxin				0-0,23		
sulfamerazin				0-4,6		

Antibiotikum	Španělsko - 2014-2015 - Rivera de Huelva	Španělsko - 2014-2015 - Guadamar	Polsko - 2018-2020 - Białka	USA Nebraska - 2018 - potok	Čína - 2018 - Perlová řeka	Čína - 2018-2019 - Huangshui
sulfamethazin					43,0-293,3	
sulfapyridin					16,0-164,2	

3 Cíl práce

Cílem této práce bylo vhodně adaptovat LC-MS použitou pro analýzu antibiotik za účelem získání pilotních dat o výskytu humánních a veterinárních antibiotik v povrchových vodách vybraných míst České republiky a vyhodnotit získané výsledky touto metodou.

4 Experimentální část

4.1 Použitý materiál a chemikálie

4.1.1 Přístroje a pomůcky:

UHPLC: Agilent 1200 Infinity series

Kolonový termostat Agilent G1316C 1290TCC, USA

Autosampler Agilent G7167B 1290 Multisampler, USA

Binární pumpy Agilent G4220A 1290 Bin Pump, USA

MS: Agilent model G1958-65138, 6495 triple Quad LC/MS, USA

Programy: Masshunter Workstation software LC-MS acquisition for 6400 series triple quadrupole version B.07.00, Optimizer, EffiChem EffiValidation 4.0

Předfiltr: ASSY frit 0,2um, 2,1mm, Waters Critical Clean, USA

Předkolona: ACQUITY UPLC HSS T3 1,8 µm VanGuard 2,1 × 5 mm, Waters, USA

Kolona: ACQUITY UPLC HSS T3 1,8 µm 2,1 × 100 mm Column, Waters, USA

Filtry: 17 mm RC 0,2 um, 100/pk, Syringe Filter, Mexiko, Thermo fisher

Analytické váhy AND LTD GR-202-EC

Ultrazvuková lázeň: DK 514 BP, Bandelin Electronic, Německo

Přístroj na ultračistou vodu: Watter clear Evoqua TWF UV, TM, TOC monitoring

Vialky s normálními i perforovanými septy

Hamiltonovy mikro stříkačky různých objemů

Kopisty

Laboratorní sklo

4.1.2 Chemikálie

Methanol LC-MS LiChrosolv, Merck

Kyselina mravenčí LC-MS Suprapur, Merck

Acetonitril LC-MS Honeywell, Merck

4.1.3 Standardy

Antibiotika byla vybrána na základě předchozí rešerše prací, které se zabývaly analýzou antibiotik v povrchových vodách po celém světě a zároveň podle spotřeb humánních a veterinárních antibiotik v České republice. Seznam standardů antibiotik je uveden v Tabulce 3 a Tabulce 4.

Tabulka 3: Seznam neznačených standardů

Antibiotikum	Výrobce	Šarže	Produktové číslo
Amoxicillin trihydrát	DR. Ehrenstorfer GmbH	G1193514	DRE-C10242500
Ampicilin trihydrát	DR. Ehrenstorfer GmbH	G1059464	DRE-C10243080
Cefazolin sodný	DR. Ehrenstorfer GmbH	G1238077	DRE-C11064100
Cefotaxim sodný	DR. Ehrenstorfer GmbH	G1150484	DRE-C11064400
Penicilin G	DR. Ehrenstorfer GmbH	20531	DRE-C15935000
Penicilin V	DR. Ehrenstorfer GmbH	20123	DRE-C15935010
Piperacilin	DR. Ehrenstorfer GmbH	G1246730	DRE-C16218900
Oxacillin	DR. Ehrenstorfer GmbH	20622	DRE-C15755100
Erythromycin (směs A, B, C)	DR. Ehrenstorfer GmbH	1195627	DRE-C13203490
Klarithromycin	DR. Ehrenstorfer GmbH	1015119	DRE-C11668540
Roxithromycin	DR. Ehrenstorfer GmbH	1059449	DRE-C16860000
Linkomycin hydrochlorid monohydrát	DR. Ehrenstorfer GmbH	1010414	DRE-C14635000
Chloramfenikol	European Pharmacopoeia Reference Standards	0064W6	C1200000
Ciprofloxacin	DR. Ehrenstorfer GmbH	00526	DRE-C1166850
Enrofloxacin	DR. Ehrenstorfer GmbH	G116914	DRE-C1370000
Norfloxacin	DR. Ehrenstorfer GmbH	10214	DRE-C15648000
Ofloxacin	DR. Ehrenstorfer GmbH	G1227539	DRE-C15717000
Doxycyklin	DR. Ehrenstorfer GmbH	1116543	DRE-C13084280
Chlortetracyklin	DR. Ehrenstorfer GmbH	00528	DRE-C11509100
Oxytetracyklin	DR. Ehrenstorfer GmbH	G1125763	DRE-C15820000
Tetracyklin	DR. Ehrenstorfer GmbH	10616	DRE-C17396150
Sulfadimethoxin	Sigma-Aldrich	BCCC4132	46794
Sulfadoxin	Sigma-Aldrich	BCCC5858	31736
Sulfachlorpyridazin	DR. Ehrenstorfer GmbH	G1112689	DRE-C6992100
Sulfaklozin sodný monohydrát	DR. Ehrenstorfer GmbH	G1101080	DRE-C16990300

Antibiotikum	Výrobce	Šarže	Produktové číslo
Sulfamerazin	Sigma-Aldrich	BCCC4027	46826
Sulfamethazin	DR. Ehrenstorfer GmbH	G1125859	DRE-C16996500
Sulfamonomethoxin sodný	DR. Ehrenstorfer GmbH	G996524	DRE-C16998180
Sulfapyridin	Sigma-Aldrich	BCCF2670	31738
Sulfathiazol	DR. Ehrenstorfer GmbH	G980077	DRE-C17000200

Tabulka 4: Seznam izotopově značených standardů

Antibiotikum	Výrobce	Šarže	Produktové číslo
Azithromycin-D3	Toronto Research Chemicals	9-EAW-147-2	9-EAW-147-2
Ciprofloxacin-D8 hydrochlorid	Toronto Research Chemicals	13-SBK-140-5	13-SBK-140-5
Erythromycin-D6	Toronto Research Chemicals	7-VHP-20-2	7-VHP-20-2
Sulfamethazin-13C6	Toronto Research Chemicals	12-MP-142-2	12-MP-142-2

4.2 Odběr a zpracování vzorku

Vzorky vody byly odebrány maximálně 1 měsíc před analýzou. Vzorek byl odebrán z hloubky cca 10 cm pod vodní hladinou a následně přelit do vzorkovnice. U mělkých vodních zdrojů byl vzorek odebrán tak, aby nedocházelo ke kontaminaci materiálem plovoucím na hladině ani materiálem ze dna toku. Následně byl vzorek přefiltrován filtry s membránou z regenerované celulózy o velikosti pórů 0,2 µm a až do analýzy uchován v lednici při teplotě 6 ± 2 °C ve skleněných vialkách.

4.3 Popis lokalit

Celkem byly měřeny vzorky z 20 míst na vodních tocích povodí Labe a 1 místo mimo povodí Labe v České republice. Konkrétní místa odběru vzorů v této práci nejsou uvedeny, protože se jedná, v dnešní době, o citlivé téma a informace by mohly být nesprávně interpretovány. Částečná charakteristika vodního toku, ze kterého byl vzorek odebrán je uvedena v Tabulce 5.

Tabulka 5: Popis odběrových míst

Název vzorku	Popis vodního toku	Datum odběru
9976	odběrové místo cca 120 km od začátku řeky, řeka protéká převážně zemědělskou oblastí se spoustou vesnic a jen pár městy	03.10.2022
9977	cca 50 km dlouhá řeka, po celé své délce protékající zemědělskou krajinou a malými vesnicemi, jež se za odběrovým místem vlévá ve městě do větší řeky	03.10.2022
10037	odběrové místo je cca 30 km od začátku řeky, která zemědělskou oblastí a 1 velkým městem a několika menšími městy s vesnicemi	04.10.2022
10044	odběrové místo je 20 km od začátku řeky, část řeky protéká lesem, část zemědělskou krajinou a také jedním městem a pár vesnicemi	04.10.2022
10056	odběrové místo cca 140 km od začátku řeky, řeka v 1. 1/3 protéká lesy a následně hospodářskou krajinou, cestou proteče přes několik velkých měst a celou řadou menších měst s vesnicemi	05.10.2022
10058	toto odběrové místo se nachází o několik desítek km po proudu od odběrového místa 10056, řeka od předchozího odběrového místa protéká zemědělskou krajinou a několika městy s vesnicemi	05.10.2022
10062	toto odběrové místo se nachází o několik desítek km po proudu než odběrové místo 10058, řeka dále protekla pár městy a zemědělskou oblastí se spoustou vesnic	05.10.2022
10064	toto odběrové místo se nachází o několik desítek km po proudu než odběrové místo 10062, řeka protéká z větší části zemědělskou krajinou a z 1/3 CHKO, cestou míjí několik měst a celou řadu vesnic	05.10.2022
10065	toto odběrové místo se nachází ve městě cca 15 km po proudu než odběrové místo 10064, řeka protéká CHKO z větší části zalesněnou oblastí, kde se nachází pár vesnic	05.10.2022
10067	toto odběrové místo se nachází cca 10 km po proudu než odběrové místo 10065, řeka protéká lesy CHKO, kde se na jejím břehu nacházejí jen 2 vesnice	05.10.2022
10129	odběrové místo se nachází cca 10 km od začátku potoka, který pramení ve vesnici, kousek od začátku se vlévá do malého rybníka, ze kterého teče zemědělskou oblastí skrz několik vesnic	05.10.2022
10563	odběrové místo se nachází cca 15 km od začátku řeky, na jedné straně řeky je převážně les a na druhé zemědělská oblast, řeka protéká několika městy a několika vesnicemi	17.10.2022
10567	odběrové místo se nachází cca 40 km od začátku řeky, řeka protéká 2 městy a celou řadou vesnic v zemědělské oblasti	17.10.2022
10577	odběrové místo se nachází cca 60 km od začátku řeky, která ze začátku teče kousek podél lesa a zbytek cesty pokračuje zemědělskou oblastí skrz spoustu vesnic a několik malých měst	17.10.2022
10580	odběrové místo se nachází cca 40 km od začátku řeky, která protéká zemědělskou oblastí, kde míjí několik měst a spoustu vesnic	17.10.2022
10579	toto odběrové místo se nachází cca 20 km po proudu než odběrové místo 10580, řeka protéká zemědělskou krajinou s vesnicemi a městy	17.10.2022
10581	odběrové místo se nachází cca 35 km od začátku řeky, řeka protéká zemědělskou oblastí se spoustou vesnic a pár městy	17.10.2022
10663	odběrové místo se nachází cca 15 km od začátku potoka, potok ze začátku teče podél lesa a na druhém břehu je zemědělská oblast, 1/3 před odběrovým místem teče už jen zemědělskou oblastí, cestou mine několik vesnic	18.10.2022
10693	odběrové místo se nachází cca 10 km od začátku potoka, potok začíná ve městě a teče úzkým lesem obklopeným zemědělskou oblastí skrz pár vesnic	17.10.2022

Název vzorku	Popis vodního toku	Datum odběru
10933	odběrové místo se nachází cca 8 km od začátku potoka, který se nachází v podhorské oblasti, podél jednoho svého břehu má les a po druhé straně pole, teče skrz pár vesnic, potok je veden jako přírodní památka	24.10.2022
10966	odběrové místo se nachází cca 10 km od vodní nádrže, ze které řeka vytéká, cestou teče na okraji CHKO převážně skrz zemědělskou krajinu přes několik vesnic	24.10.2022

4.4 Navažování, rozpouštění, ředění

Část standardů byla ve formě soli. Jejich navážky byly přepočítány na příslušnou kyselinu nebo bázi. Neznačené standardy byly naváženy přímo do vialky a následně rozpouštěny v methanolu v ultrazvukové lázni. Tím byly připraveny koncentrované zásobní roztoky daných standardů. Následně z nich byly připraveny pracovní roztoky. Konkrétně se jednalo o naředění každého izotopově neznačeného standardu na koncentraci 0,3 µg/ml a přípravu směšného roztoku izotopově neznačených standardů o koncentraci 10 µg/ml ze všech těchto standardů.

Zásobní i pracovní roztoky izotopově značených standardů byly připraveny rozpouštěním standardu v acetonitrilu. Acetonitril byl vybrán, protože neobsahuje žádné hydroxylové nebo aminoskupiny, které by mohly měnit vodíkový atom za deuterium. Pracovní roztoky izotopově značených standardů byly připraveny naředěním následně: Ciprofloxacin-D8 hydrochlorid na koncentraci 4 µg/ml, roztoky ostatních izotopově značených standardů na koncentraci 0,2 µg/ml a směšný roztok izotopově značených standardů na koncentraci 20 µg/ml ze všech těchto standardů.

Roztoky neznačených i izotopově značených standardů antibiotik byly skladovány v mrazáku při teplotě -20 °C.

4.5 Ladění kolizních energií

Pro ladění kolizních energií byly u neznačených standardů použity pracovní methanolické roztoky standardů o koncentraci 0,3 µg/ml. U izotopově značených standardů antibiotik jejich pracovní acetonitrilové roztoky o koncentraci 0,2 µg/ml. Jediný ciprofloxacin-D8 hydrochlorid se v této koncentraci nepodařilo naladit, proto byl

připraven nový roztok pro ladění o koncentraci 4 µg/ml. Ladění probíhalo v módu skenování produktových iontů. Rozmezí hledaných kolizních energií bylo nastaveno na 0-50 V. Byly hledány 3 produktové ionty s největší odezvou. Minimální měřená hodnota m/z produktového iontu byla nastavena na 33. Rozdíl oproti standardní analýze byl také v tom, že byla místo chromatografické kolony použita pouze spojka. Jako MF byla použita směs 10 % MF A (čistý methanol) + 90 % MF B (90 % methanol + 9,95 % voda + 0,05 % kyseliny mravenčí). Průtok MF byl nastaven na 0,250 ml/min a dávkování vzorku na 20 µl. Nejdříve byla antibiotika laděna v módu ESI +. Ta, která měla příliš nízké odezvy produktových iontů v tomto módu byla následně laděna v ESI -.

4.6 Chromatografie

Výchozí chromatografické podmínky byly inspirovány prací [33] a byly upraveny dle zkušeností laboratoře. Původní práce využívala pro analýzu dvě chromatografické metody, kdy každá z nich byla určena pro definovanou skupinu antibiotik. Nejzřetelnější změnou byla mobilní fáze, která byla pro každou chromatografickou metodu odlišná:

1. MF A: 5mM kyselina šťavelová v 50 % ACN, 50 % MeOH,
MF B: 5mM kyselinu šťavelovou v H₂O
2. MF A: 0,3 % HCOOH, 0,1 % NH₄HCO₂ v H₂O
MF B: 50 % ACN, 50 % MeOH

Naše pilotní metoda separovala všechna antibiotika najednou a vlastní separace trvala kratší dobu. Byla zvolena gradientová eluce složená z těchto 2 mobilních fází:

MF A: MeOH

MF B: 96,95 % H₂O + 3 % MeOH + 0,05 % HCOOH

Gradient byl lineární a jeho průběh v čase je uveden v Tabulce 6. Protože nebyla metoda optimalizovaná, byl také použit větší nástřik vzorku, aby bylo možné zachytit co nejširší spektrum antibiotik. Pro chromatografii byla použita kolona s předkolonkou a mechanickým předfiltrem.

V čase 4,8 min byla mobilní fáze proudící z kolony do odpadu, přesměrována do hmotnostního spektrometru.

Pro identifikaci retenčních časů byly připraveny 2 roztoky:

- 1. 10 µl směsného roztoku neznačených standardů, 25 µl směsného roztoku izotopově značených vnitřních standardů a doplněním na 10 ml mobilní fázi B
- 2. 25 µl směsného roztoku izotopově značených vnitřních standardů a doplněním na 10 ml mobilní fázi B

Tabulka 6: Gradientová eluce v průběhu analýzy

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)	Průtok (ml/min)
0	0	100	0,25
0,5	0	100	0,25
12,0	100	0	0,25
13,2	100	0	0,25
17,0	100	0	0,45
17,1	0	100	0,45
17,95	0	100	0,45
17,99	0	100	0,25
20,0	0	100	0,25

4.7 Kalibrace

Kalibrační roztoky byly připraveny ze dvou roztoků „IS Farmaka“ a „10000 A“. Pro přípravu těchto roztoků byly použity pracovní roztoky uvedené v kapitole 4.4. Roztok IS Farmaka byl připraven smícháním 1000 µl HCOOH, 10 µl směsného roztoku izotopově značených standardů a doplněním do 10 ml methanolem. Dále byl připraven roztok 10000 A smícháním 250 µl roztoku IS Farmaka, 10 µl směsného roztoku neznačených standardů a doplněním ultračistou vodou do 10 ml. Tyto 2 roztoky byly následně použity na vytvoření koncentrační řady kalibračních roztoků.

Pro sestavení kalibrační přímky bylo připraveno 10 směsných kalibračních roztoků a jeden slepý vzorek, z nichž byl každý měřen třikrát. Roztok o koncentraci 100 ng/l byl připraven dvakrát pro zjištění odchylky při přípravě jednotlivých roztoků. Koncentrace neznačených standardů kalibračních roztoků byly: 0 ng/l (slepý vzorek), 2 ng/l, 5 ng/l, 10 ng/l, 20 ng/l, 50 ng/l, 100 ng/l A, 100 ng/l B, 250 ng/l, 500 ng/l, 1000 ng/l. Koncentrace značených standardů byly v každém roztoku 500 ng/l. Kalibrační

rozmezí bylo zvoleno podle očekávaných koncentrací antibiotik ve vodě dle zkušeností laboratoře.

Příprava roztoků probíhala v odměrných baňkách o objemu 10 ml. Pro odebrání a přidávání přesného množství složek byly využívány Hamiltonovy stříkačky. Nejdříve byla do odměrných baněk nalita voda po risku a dále byly odebírány a přidávány roztoky dle Tabulky 7. Po přidání roztoku IS Farmaka byla každá baňka důkladně protřepána.

Tabulka 7: Příprava kalibračních roztoků

Výsledná koncentrace kalibračního roztoku	Ultračistá voda	Odebráno	Přidáno IS Farmaka	Odebráno	Přidáno 10000 A
0 ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	0 µl	0 µl
2 ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	2 µl	2 µl
5 ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	5 µl	5 µl
10 ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	10 µl	10 µl
20 ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	20 µl	20 µl
50 ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	50 µl	50 µl
100 A ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	100 µl	100 µl
100 B ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	100 µl	100 µl
250 ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
500 ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	500 µl	500 µl
1000 ng/l	10,0 ml	250 µl	250 µl	1000 µl	1000 µl

4.8 Měření reálných vzorků

Z každého vzorku vody byl odměřen 1 ml do vialky. Z vialky bylo odebráno a vylito do odpadu 25 µl. Do vialky bylo následně přidáno 25 µl roztoku IS Farmaka. Dále byl připraven do 1 vialky slepý roztok stejným způsobem, jen byl místo 1 ml vzorku použit 1 ml ultračisté vody. Každý reálný vzorek byl měřen pouze jednou. Analýza probíhala v módu SRM. K výpočtu koncentrace byla jako hlavní použita metoda kalibrační přímky.

4.9 Experimentální podmínky

Dávkování vzorku: 100 µl

Průtok mobilní fáze: 0,25 ml/min

Kolonový termostat: 40 °C

Typ ionizace:	ESI ±
Teplota kvadrupólu:	100 °C
Gas flow:	120 °C, 15 l/min
Sheat gasflow:	290 °C, 11 l/min
Nebulizer:	25 psi
Napětí na kapiláře:	positiv: 3000 V negativ: 2500 V
Napětí na trysce:	positiv: 300 V negativ: 1000 V
Hight-pressure RF:	positiv: 90 V negativ: 90 V
Low-pressure RF:	positiv: 60 V negativ: 60 V

5 Výsledky a diskuse

Separace vzorku probíhala pomocí HPLC s gradientovou elucí. Detekce antibiotik byla prováděna pomocí hmotnostního spektrometru s elektrosprejovou ionizací a trojitým kvadrupólem. Veškerá antibiotika byla ionizována v pozitivním módu až na piperacilin, který lépe vycházel módu negativním.

5.1 Ladění

Ladění byla jedna z prvních nezbytných činností, kterou byla získána esenciální data o iontových přechodech jednotlivých antibiotik. Získané informace byly dále využity během kalibrace a vlastního měření reálných vzorků. Byly hledány 3 nejintenzivnější produktové ionty, ze kterých byl ten s nejvyšší odezvou v detektoru využit jako kvantitativní iont. Zbylé 2 ionty byly použity jako kvalitativní. Rozsah kolizních energií byl využit v rozmezí od 0 do 50 V. Přechody jednotlivých antibiotik jsou uvedeny v Tabulce 8 pro neznačené standardy a v Tabulce 9 pro značené standardy.

Tabulka 8: SRM přechody iontů neznačených standardů

Antibiotikum	Prekurzorový iont	Kvantitativní iont	1. potvrzovací iont	2. potvrzovací iont	Positiv/negativ	Kolizní energie v pořadí iontů kvalitativní; potvrzovací 1.; 2.
amoxicillin	366,1	349,1	134	114	positiv	8;36;24
ampicillin	350,1	105,9	160	113,9	positiv	24;16;28
cefazolin	455	323,1	156	124	positiv	8;16;32
cefotaxim	456,1	324,1	396		positiv	12;8
penicilin G	335,1	91	70,2		positiv	44;32
penicilin V	351,1	114	201,4		positiv	28;20
piperacilin	516,2	330,1	232,8		negativ	8;16
oxacillin	402,1	243	160	144	positiv	8;8;16
erythromycin	734,5	158	576,2	83,1	positiv	36;20;50
klarithromycin	748,5	157,9	590,3	83,1	positiv	28;20;50
roxithromycin	837,5	158	679,3	116	positiv	36;24;48
linkomycin	407,2	126,1	359,1	42,3	positiv	40;20;50
chloramfenikol	321	257	151,9	120,8	negativ	12;24;32
ciprofloxacin	332,1	314	288,1	231	positiv	24;16;36
enrofloxacin	360,2	342,2	316,1	286	positiv	24;20;36

Antibiotikum	Prekurzorový iont	Kvantitativní iont	1. potvrzovací iont	2. potvrzovací iont	Pozitiv/negativ	Kolizní energie v pořadí iontů kvalitativní; potvrzovací 1.; 2.
norfloxacin	320,1	302	282,1	231	positiv	24;36;40
ofloxacin	362,2	318,3	344	261,1	positiv	24;24;36
doxycyklin	445,2	428,1			positiv	16
chlortetracyklin	479,1	444,1	462,1	154	positiv	24;16;32
oxytetracyklin	461,2	426	443,1	200,9	positiv	20;12;48
tetracyklin	445,2	410,1	154,2	98,1	positiv	20;23;44
sulfadimethoxin	311,1	155,8	108	92,1	positiv	16;28;32
sulfadoxin	311,1	155,8	108,2	92	positiv	16;32;40
sulfachlorpyridazin	285	155,9	107,9	92,1	positiv	16;28;32
sulfaklozin	285	155,9	108	92	positiv	16;28;36
sulfamerazin	265,1	92	156	107,9	positiv	36;15;32
sulfamethazin	279,1	186	124,1	92,1	positiv	20;24;32
sulfamonomethoxin	281,1	91,9	125,8	108,1	positiv	36;20;32
sulfapyridin	250,1	91,9	108	65,3	positiv	28;24;48
sulfathiazol	256	92	108	65,3	positiv	28;28;48

Tabulka 9: SRM přechody iontů izotopicky značených standardů

Antibiotikum	Prekurzorový iont	Kvantitativní iont	1. potvrzovací iont	2. potvrzovací iont	Pozitiv/negativ	Kolizní energie v pořadí iontů kvalitativní; potvrzovací 1.; 2.
Azithromycin-D3	752,5	594,6	157,9	115,8	positiv	32;40;44
Ciprofloxacin-D8 hydrochlorid	340	322,1	296,1	235,1	positiv	24;20;44
Erythromycin-D6	740,5	164,3	582,2	83,2	positiv	40;16;44
Sulfamethazin-13C6	285,1	97,9	124	114	positiv	40;24;36

U všech antibiotik byly nalezeny SRM přechody, ale ne u všech se podařilo najít všechny produktové ionty v dostatečné intenzitě. Například u doxycyklinu byl nalezen pouze jeden produktový iont s dostatečnou intenzitou. Do budoucna pro doplnění chybějících iontů je nutno otestovat širší rozsah kolizní energie.

5.2 Chromatografie a kalibrace

Pro separaci byla vybrána gradientová eluce. Mobilní fáze vznikala smícháním dvou částí: mobilní fáze A methanol; mobilní fáze B methanol-voda-HCOOH (3:96,95:0,05, v/v/v). Popis gradientu je uveden v Tabulce 6. Chromatografie trvala 20 minut. V Tabulce 10 a Tabulce 11 jsou uvedeny retenční časy antibiotik. Na Obrázku 11 uvádím ukázkový chromatogram, na kterém jsou vidět píky všech analyzovaných antibiotik spolu s jejich retenčními časy.

Kvůli stanovení závislosti odezvy detektoru na koncentraci antibiotika byla vytvořena kalibrační přímka. Pro vytvoření kalibrační přímky bylo naředěno 10 roztoků se zvyšující se koncentrací neznámených standardů antibiotik. Koncentrace izotopově značených standardů byly ve všech kalibračních roztocích stejné. Každý roztok byl měřen třikrát. Z výsledků těchto měření byla sestrojena kalibrační přímka a vygenerována rovnice kalibrační přímky, která byla následně použita pro výpočet reálných vzorků.

Tabulka 10: Kalibrační křivka neznámených standardů

Antibiotikum	Retenční čas (min)	Rovnice kalibrační přímky	R ²	Rozmezí bodů kalibrační přímky ng/l	Plocha pod křivkou u kalibračního roztoku 250 ng/l
amoxicillin	5,09	$y=266,2331x+61,4633$	0,9994	2–1000	68736
ampicillin	7,51	$y=420,9594x+19,3760$	0,9955	2–1000	103926
cefazolin	7,46	$y=10,3815x+0,9480$	0,9878	2–1000	3244
cefotaxim	7,25	$y=98,0967x+12,4122$	0,9966	2–1000	25018
penicilin G	8	$y=157,5189x-15,2761$	0,9837	2–500	39416
penicilin V	7,51	$y=27,6977x+40,5540$	0,9668	2–1000	7264
piperacilin	10,04	$y=63,6986x+12,5126$	0,9962	2–1000	16041
oxacillin	10,97	$y=77,9760x+10,1193$	0,9977	2–1000	18447
erythromycin	10,7	$y=12,8060x+4,4127$	0,9921	2–250+1000	3291
klarithromycin	11,39	$y=896,7251x+230,5079$	0,9959	2–1000	231178
roxithromycin	11,49	$y=218,8321x+16,3959$	0,9978	2–250+1000	55718
linkomycin	6,59	$y=2274,3593x+208,3894$	0,9973	2–500	594867
chloramfenikol	8,95	$y=13,2159x+77,7841$	0,9560	2–1000	3963
ciprofloxacin	7,35	$y=1184,1793x+892,6555$	0,9955	2–1000	597788
enrofloxacin	7,42	$y=499,4412x+556,2601$	0,9888	2–1000	111257

Antibiotikum	Retenční čas (min)	Rovnice kalibrační přímky	R ²	Rozmezí bodů kalibrační přímky ng/l	Plocha pod křivkou u kalibračního roztoku 250 ng/l
norfloxacin	7,21	y=1597,6333x+1018,1809	0,9955	2–1000	402536
ofloxacin	7,05	y=598,6674x+1186,9332	0,9953	2–1000	152128
doxycyklin	9,38	y=706,3951x+739,8194	0,9923	2–1000	152487
chlortetracyklin	8,57	y=218,1317x+64,8703	0,9939	2–1000	60467
oxytetracyklin	7,39	y=460,2786x+44,6876	0,9943	2–1000	128822
tetracyklin	9,98	y=537,2003x+113,5543	0,9967	2–1000	128539
sulfadimethoxin	8,9	y=2082,6477x+456,3023	0,9956	2–1000	364588
sulfadoxin	7,9	y=2152,4238x+353,7135	0,9966	2–1000	561172
sulfachlorpyridazin	7,51	y=615,6836x+26,3756	0,9871	2–500	175624
sulfaklozin	8,68	y=1374,5755x+305,8255	0,9954	2–1000	391257
sulfamerazin	6,4	y=1304,5420x+367,5660	0,9974	5–250	331903
sulfamethazin	7,1	y=745,9370x+147,7248	0,9950	2–1000	195733
sulfamonomethoxin	7,72	y=503,4883x+127,2318	0,9919	2–1000	140980
sulfapyridin	6,1	y=1001,7483x+153,3013	0,9956	2–500	268945
sulfathiazol	5,85	y=702,1058x+99,9424	0,9977	2–1000	178574

Izotopově značené standardy měly nadměrně vysokou relativní směrodatnou odchylku (Tabulka 11). Dle práce [33] by měla relativní směrodatná odchylka dosahovat hodnoty nejvýše 30 %. Kvůli tomu nebyla použita metoda kvantifikace pomocí vnitřního standardu ke stanovení koncentrace reálných vzorků. Důvod zvýšené relativní směrodatné odchylky se nepodařilo objasnit.

Tabulka 11: Kalibrační přímka značených standardů

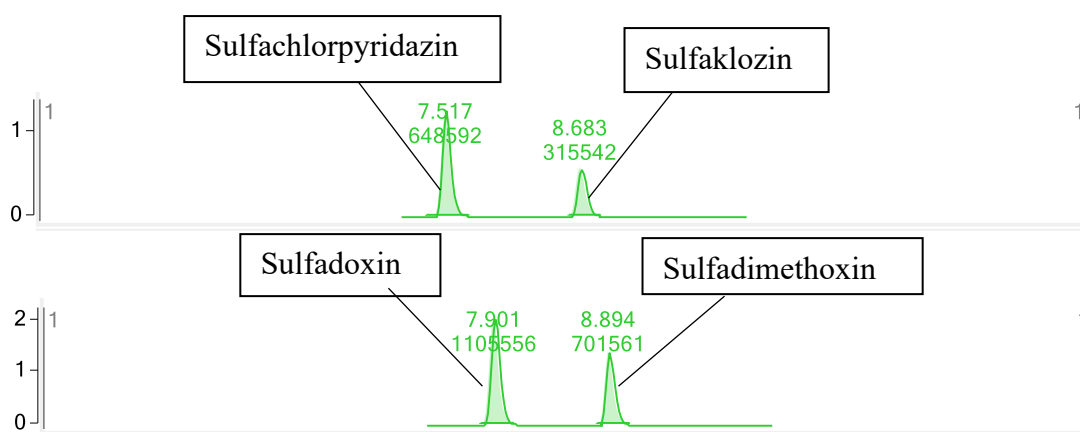
Antibiotikum	Retenční čas (min)	Rovnice kalibrační přímky	Relativní směrodatná odchylka (%)
azithromycin-D3	8,86	y=-12,9378x+68664,1711	33,26
ciprofloxacin-D8 hydrochlorid	7,33	y=46,5786x+221643,0387	36,78
erythromycin-D6	10,74	y=-1,3067x+6548,6736	48,98
sulfamethazin-13C6	7,1	y=15,5236x+185694,6562	31,24

Píky sulfachlorpyridazinu, sulfaklozinu, sulfadimethoxinu a sulfadoxinu měly produktové ionty prakticky stejné. Z jejich první analýzy se nedalo odlišit, který pík,

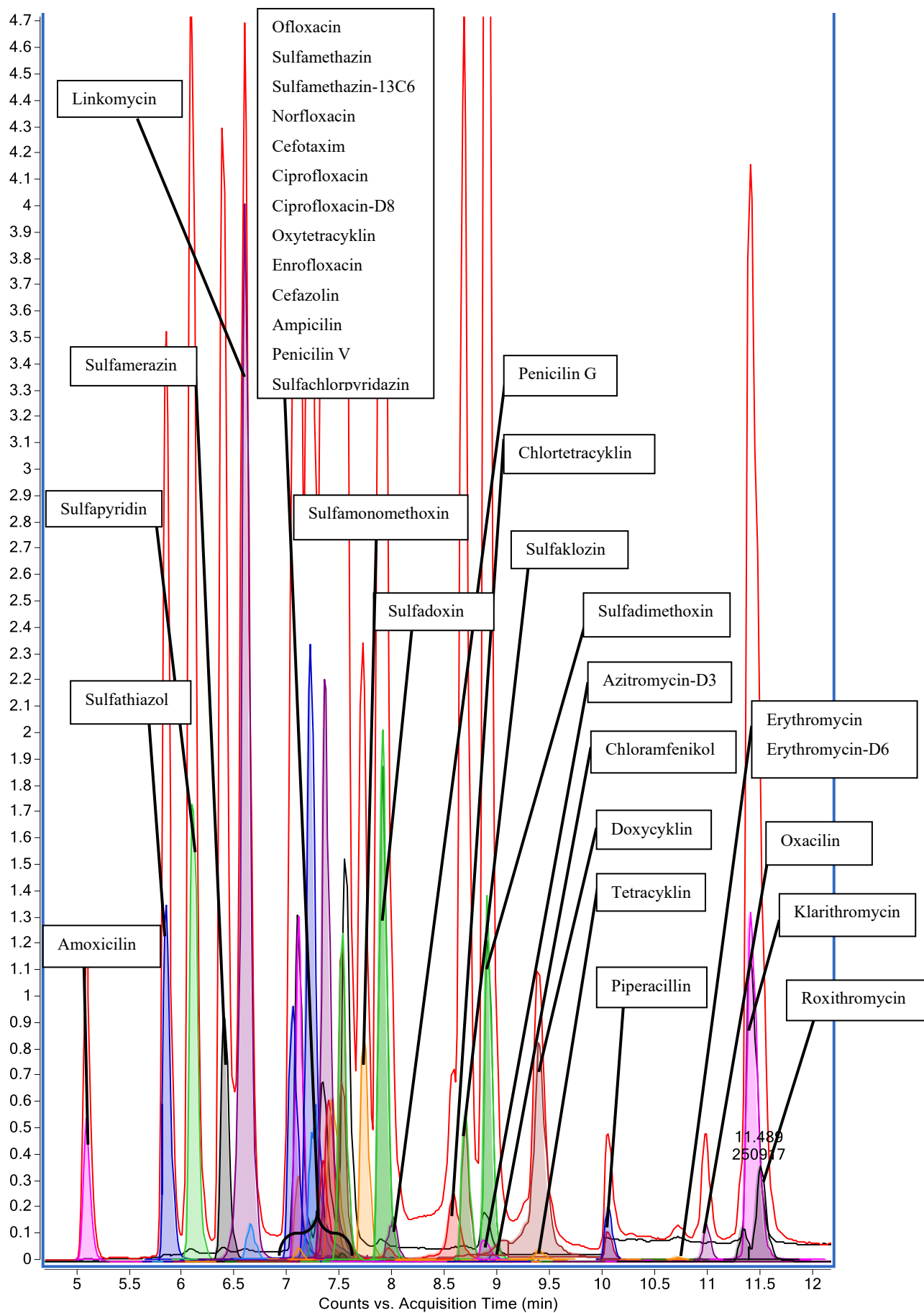
kterému z dvojice náleží. Kvůli určení konkrétního retenčního času byly připraveny jako čisté standardy o koncentraci 1 µg/ml a změřeny každý zvlášť. Chromatogram a jejich přechody iontů jsou uvedeny na Obrázku 10 a v Tabulce 12.

Tabulka 12: SRM přechody antibiotik se shodným m/z

Antibiotikum	Prekurzorový iont	Kvantifikační iont	1. Potvrzovací iont	2. Potvrzovací iont	Retenční čas (min)
sulfadimethoxin	311,1	155,8	108	92,1	8,9
sulfadoxin	311,1	155,8	108,2	92	7,9
sulfachlorpyridazin	285	155,9	107,9	92,1	7,51
sulfaklozin	285	155,9	108	92	8,68



Obrázek 10: Chromatogram antibiotik se stejnými produktovými ionty



Obrázek 11: Chromatogram kalibračního roztoku 1000 ng/l s popsanými antibiotiky

Tabulka 13: Limity pro antibiotika

Antibiotikum	LOD (ng/l)	LOQ (ng/l)
amoxicillin	0,2470	5
ampicillin	0,1714*	5
cefazolin	1,0000	100
cefotaxim	0,3550	20
penicilin G	2,6316	20
penicilin V	0,9375	20
piperacilin	0,1467*	10
oxacillin	0,0444*	2
erythromycin	0,5455	20
klarithromycin	0,0342*	10
roxithromycin	0,2048	5
linkomycin	0,0385*	5
chloramfenikol	0,5282	50
ciprofloxacin	0,1134*	5
enrofloxacin	0,4138	5
norfloxacin	0,2760	5
ofloxacin	0,2273	5
doxycyklin	0,3061	20
chlortetracyklin	0,5556	20
oxytetracyklin	0,1395*	20
tetracyklin	0,0853*	20
sulfadimethoxin	0,1181*	5
sulfadoxin	0,0722*	5
sulfachlorpyridazin	0,2335	10
sulfaklozin	0,2479	5
sulfamerazin	0,1070*	5
sulfamethazin	0,1422*	5
sulfamonomethoxin	0,2055	5
sulfapyridin	0,0355*	5
sulfathiazol	0,0592*	5

* pro přesnější LOD a LOQ je třeba použít roztok o nižší koncentracích než 2 ng/l

LOD a LOQ jednotlivých antibiotik jsou uvedeny v Tabulce 13. LOD byla vypočtena jako poměr píku k šumu (S/N) větší než 3. U většiny antibiotik byla vypočítána z roztoku o koncentraci 2 ng/l. Jediný penicilin G nedosahoval při této koncentraci potřebného poměru, proto byl vypočítán z roztoku o koncentraci 5 ng/l. Dle zvyklostí v laboratoři by se pro výpočet LOD neměl použít chromatogram, kde

pro daný pík je poměr signálu k šumu vyšší než 30. Hodnoty vyšší než 30 znamenají, že jsou píky oproti šumu hodně vysoké a výpočet LOD nemusí být přesný. Pokud je hodnota S/N 30 při koncentraci 2 ng/l, odpovídá $LOD = 0,2 \text{ ng/l}$. To znamená, že hodnoty LOD nižší než 0,2 ng/l je třeba dále ověřit. U antibiotik, které mají tuto hodnotu nižší by bylo vhodné pro přesné určení LOD naředit tyto roztoky na nižší koncentraci než 2 ng/ml a změřit odezvu detektoru u nich.

Je potřeba vzít v úvahu šum základní linie, který je u ultračisté vody, ze které byly tyto roztoky připravené, minimální. Pro zpřesnění by bylo tedy lepší použít vhodnější matici více podobnou povrchové vodě. U ní by se také mohli projevit potenciální matriční efekty, které zatím nebyly hodnoceny.

Mez kvantifikace byla stanovena jako spodní bod kalibrační přímky, pro který je hladina nejistoty nižší než 30 %. Hladinu nejistoty počítal program EffiChem EffiValidation 4.0. Byla spočítána vzorcem: $(\text{naměřená hodnota/teoretická hodnota, dle kalibrační přímky}) \times 100$. LOD a LOQ této metody by se daly dále zlepšit zakoncentrováním vzorku na pomoci SPE kolonek.

5.3 Reálné vzorky

Vzhledem k tomu, že relativní směrodatné odchylky izotopově značených standardů přesahovaly hodnotu 30 %, nebyly použity izotopově značené standardy ke kvantifikaci. Antibiotika byla kvantifikována pomocí kalibračních přímk neznačených standardů. Koncentrace antibiotik nalezené v povrchových vodách jsou uvedené v Tabulce 14.

V každém odběrovém místě byla nalezena antibiotika a však ne všude byla jejich koncentrace nad mezí kvantifikace. Nejčastěji nalézané antibiotikum s nejvyššími koncentracemi byl sulfapyridin. Na většině lokalit dosahoval koncentrací, jaké byly detekovány v Perlové řece v Číně v roce 2018 [23]. Použití tohoto antibiotika jsem však v humánní ani veterinární medicíně ČR nikde nenašel. Jeho vysoké koncentrace v povrchových vodách lze vysvětlit tím, že se používá navázaný na kyselinu 5-aminosalicylovou v podobě sulfasalazinu. Jeho rozkladem vzniká sulfapyridin. [34]

Dalším často detekovaným antibiotikem byl klarithromycin. Toto makrolidové antibiotikum bylo uvedeno v roce 2018 v prováděcím rozhodnutí komise EU 840 [26]. V tomto rozhodnutí byl uveden limit pro makrolidová antibiotika 19 ng/l. Tento limit byl na 6 lokalitách překročen. Stejný limit zároveň platí pro erythromycin. Ten překročil tento limit pouze na jednom místě. Koncentrace klarithromycinu byla v porovnání s řekami ve světě vysoká a na 2 lokalitách přesahovala i koncentrace nalezené v řece Rivera de Huelva ve Španělsku v letech 2014-2015 [30]. Koncentrace erythromycinu byla na místě, kde limit překročila, podobná jako nalezené koncentrace v Rivera de Huelva nebo v Perlové řece v Číně. [32]

Většina toků, ze kterých byly vzorky odebrány měla podobný charakter. Nejvíce nálezů antibiotik nad mezí kvantifikace bylo nalezeno na lokalitě 10037. To je zřejmě způsobeno tím, že je řeka celkem krátká a za svou cestu proteče hned několika většími aglomeracemi.

Další zvýšené nálezy antibiotik byly nalezeny na místech 10129 a 10693. Tyto 2 potoky mají podobný charakter. Jsou malé, tak že dochází k malému naředění polutantů a zároveň protékají několika obcemi.

Zajímavý trend měla koncentrace sulfapyridinu na velké řece, na které byly odebírány vzorky podél velké části toku na místech 10056, 10058, 10062, 10064, 10065 a 10067. Koncentrace sulfapyridinu postupně po proudu klesala i přes to, že řeka velkou část své cesty protéká zemědělskou krajinou s celou řadou měst a vesnic. Tento pokles by mohl být způsobený samočisticí schopností povrchových vod, které zahrnuje i vazbu na sediment, v němž mohou tyto látky tvořit rezidua. Ke snížení koncentrace zřejmě přispělo i naředěním postranními přítoky.

Opačný trend má menší řeka, ze které byly vzorky odebrány z 2 odběrových míst 10580 a 10579. Zde došlo po proudu k zvýšení koncentrace sulfapyridinu a zároveň se zvýšila koncentrace klarithromycinu a linkomycinu nad mez kvantifikace. Klarithromycin je humánní antibiotikum, které se ve veterinární medicíně používá pouze raritně. Zatím co linkomycin se v dnešní době používá jako veterinární léčivo a pro humánní použití mu byla v roce 2010 ukončena registrace. Tento nárůst by mohl být způsoben tím, že se jedná o menší řeku s drobnými přítoky potoků a říček ze zemědělské oblasti se spoustou vesnic. [15,35]

lokality/antibiotika	9976	9977	10037	10044	10056	10058	10062	10064	10065	10067	10129	10563	10567	10577	10579	10580	10581	10663	10693	10933	10966	
amoxicilin	0	*	9,91	9,53	*	*	*	0	*	*	*	*	*	*	*	0	*	0	0	0	0	
ampicillin	0	0	0	0	0	0	*	0	0	0	*	0	0	0	*	*	0	*	0	0	0	
cefazolin	0	*	*	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
cefotaxim	0	*	*	0	*	*	*	*	*	0	*	*	*	0	0	*	*	0	0	*	*	
penicilin G	0	0	0	0	0	0	*	0	*	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
penicilin V	*	0	*	0	*	*	*	*	*	*	*	0	0	0	0	0	*	*	65,6	49,63	20,09	
piperacilin	0	*	*	0	*	0	*	*	0	*	0	0	0	*	*	*	*	*	0	*	0	
oxacillin	*	*	2,5	*	*	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
erythromycin	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	33,45	*	*	
klarithromycin	0	*	116,6	98,61	30,91	*	*	*	*	*	21,25	*	*	*	*	24,28	*	*	52,32	*	*	
roxithromycin	0	*	*	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	*	*	0	0	0	0	0	
linkomycin	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	6,58	*	*	*	*	*	
chloramfenikol	0	0	0	0	0	0	*	*	0	*	0	0	*	0	0	0	0	0	0	*	*	
ciprofloxacín	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	5,32	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
enrofloxacin	0	*	5,24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
norfloxacín	0	*	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ofloxacin	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	*	0	
doxycyclin	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	22,6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
chlortetracyklin	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
oxytetracyklin	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
tetracyklin	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
sulfadimethoxin	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
sulfadoxin	0	*	*	*	*	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	0	*	*	*	*
sulfachlorpyridazin	0	*	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sulfaklozin	0	0	*	0	0	0	*	*	0	*	*	*	0	0	0	0	0	0	*	*	*	0
sulfamerazin	0	0	0	0	0	0	0	0	*	0	*	0	0	*	*	0	0	*	*	*	*	*
sulfamethazin	0	*	5,27	0	*	*	*	*	*	*	6,54	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
sulfamonomethoxin	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	0	*	*	*	*
sulfapyridin	0	*	41,79	7,46	22,13	12,74	12,4	9,93	10,8	9,08	129,29	15,87	36,01	12,39	9,51	33,65	38,52	*	30,27	*	*	
sulfathiazol	0	*	*	0	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0	*	0	*	

Tabulka 14: Koncentrace ATB na lokalitách (ng/l), * LOD<x<LOQ

Analýzou ATB v povrchových vodách se zabývaly v České republice 2 práce [28,29]. Tyto práce se zaměřovali čistě na analýzu sulfonamidů, které se jim nepodařilo detekovat ve vodách, ale pouze v sedimentech. Tyto práce měly zároveň nižší LOD i LOQ než tato naše pilotní metoda. Odebírali ale vzorky z několika moravských toků, ve kterých je zřejmě kontaminace sulfonamidů nižší než v těch tocích, kterým i se zabývá naše práce.

Naše pilotní metoda je schopna měřit koncentrace antibiotik v povrchových vodách. Bohužel vzhledem k tomu, že reálné vzorky byly z důvodu nedostatku času měřeny jen jednou, je třeba výsledek z Tabulky 14 ještě ověřit. Pro získání spolehlivých výsledků by bylo vhodné změřit každý vzorek dle laboratoře alespoň 6krát, vzhledem k tomu, že metoda není ještě validována. Pokud by byla metoda zvalidována, měření vzorků by dle zvyklostí laboratoře probíhalo jednou standardně dle uvedené metody a jednou s přidavkem neznačených standardů (metoda standardního přidavku).

Pro získání celkovějšího přehledu o antibiotikách ve vodě by bylo lepší z každého odběrového místa odebírat vzorky v průběhu celého roku. Aby se předešlo tomu, že budou výsledky skreslené chvilkovým nárůstem koncentrace antibiotika například z důvodů přetížení čistírny odpadních vod, hnojení, přívalového deště atd. Zároveň by bylo vhodné do budoucna rozšířit metodu o analýzu sedimentů a případně i fytoplanktonu. Pro získání komplexnějšího přehledu koncentrací i u antibiotik, které mají tendenci se v těchto soustavách spíše kumulovat, než zůstat rozpuštěny ve vodě.

Výhodou této metody je široké spektrum antibiotik, které je schopna detekovat. Limity detekce a kvantifikace také dosahují velmi nízkých hladin i v porovnání se zahraničními pracemi zabývajícími se touto problematikou. Zároveň má tato metoda potenciál pro další snížení těchto limitů, pokud se použije vhodná forma zakoncentrování vzorku. Do budoucna bude dobré metodu validovat.

6 Závěr

Byla adaptována metoda pro screeningové šetření výskytu humánních a veterinárních antibiotik na vybraných místech České republiky v povrchových vodách. Separace antibiotik probíhala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s gradientovou elucí. Jako mobilní fáze A byl použit methanol, jako mobilní fáze B směs 96,95 % ultračisté vody, 3 % methanolu a 0,05 % kyseliny mravenčí. Antibiotika byla detekována pomocí hmotnostního spektrometru typu trojitého kvadrupólu. Ionizace analytů byla provedena pomocí elektrospreje s využitím pozitivního i negativního záznamu. Nejdříve byly nalezeny vhodné kolizní energie pro získání co nejintenzivnějších signálů produktových iontů jednotlivých antibiotik. Dále byla identifikována jednotlivá ATB na základě příslušných SRM přechodů a charakterizována příslušným retenčním časem. Pro jednotlivá ATB byly sestrojeny kalibrační přímky. Pak následovala aplikace metody na reálné vzorky.

Touto metodou bylo analyzováno 21 vzorků vody odebraných z 15 toků České republiky. Antibiotika byla detekována ve všech tocích. Celkem bylo detekováno 30 různých antibiotik. Nejčastěji nalezenými antibiotiky a s nejvyššími koncentracemi byly sulfapyridin a klarithromycin. Tato práce poskytla cenná data na jejichž základě bude probíhat další bádání na Povodí Labe. Je v plánu rozšířit metodu o další antibiotika a případně snížit limity detekce a kvantifikace a provést validaci.

7 Seznam použité literatury, obrázků a tabulek

7.1 Seznam použité literatury

1. Poole, C.F.; Poole, S.K. *Chromatography Today*; 1. ed., 5. impr.; Elsevier: Amsterdam, 1997; ISBN 978-0-444-88492-3.
2. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Dolan, J.W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*; 3rd. ed.; Wiley: Hoboken, NJ, 2010; ISBN 978-0-470-16754-0.
3. Skoog, D.; West, D.; Holler, J.; Stanley, C. *Analytická Chemie*; VŠCHT PRAHA: Praha, 2019; ISBN 978-80-7592-043-0.
4. Douša, M. Autosampler HPLC Available online: <http://www.hplc.cz/Teorie/autosamplers.html> (accessed on 25 March 2023).
5. Coufal, P. HPLC Available online: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> (accessed on 8 February 2023).
6. Holčápek, M. Experimentální metody strukturálního výzkumu Hmotnostní spektrometrie. 2015.
7. *Advanced Instrumental Methods of Chemical Analysis*; Churáček, J., Ed.; Academia Praha; E. Horwood: Nové Město, Czech Republic; [New York], 1993; ISBN 978-80-200-0424-6.
8. Lemr, K.; Borovcová, L. ELEKTRONOVÁ IONIZACE. *Chemické Listy* **2020**, *114*, 101–105.
9. Lemr, K.; Borovcová, L. IONIZACE ELEKTROSPREJEM. *Chemické Listy* **2020**, *114*, 169–178.
10. Watson, T.; David, S. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*; 4th ed.; Wiley, 2008; ISBN 978-0-470-51634-8.
11. Wittmann, C. Fluxome Analysis Using GC-MS. *Microb Cell Fact* **2007**, doi:10.1186/1475-2859-6-6.
12. Friedecký, D.; Lemr, K. Úvod Do Hmotnostní Spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **2012**, *20*, 152–157.
13. Škríba, A. Iontová cyklotronová rezonance s furierovou transformací. *Chem. Listy* **2020**, *114*, 119–125.
14. Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie*; 3rd ed.; Vysoká Škola Chemicko-Technologická v Praze: Praha, 2015; Vol. 2015; ISBN 978-80-7080-875-7.
15. Beneš, J. *Antibiotika*; 1st ed.; Grada: Praha, 2018; Vol. 2018; ISBN 978-80-271-0636-3.
16. SÚKL SPC o Neloren, injekční roztok 2009.
17. Hirsch, R.; Ternes, T.; Haberer, K.; Kratz, K.-L. Occurrence of Antibiotics in the Aquatic Environment. *Science of The Total Environment* **1999**, *225*, 109–118, doi:10.1016/S0048-9697(98)00337-4.
18. Kay, P.; Blackwell, P.; Boxall, A. Transport of Veterinary Antibiotics in Overland Flow Following the Application of Slurry to Arable Land. *Chemosphere* **2005**, 951–959.

19. Bailey, C.; Spielmeier, A.; Frings, R.M.; Hamscher, G.; Schüttrumpf, H. From Agricultural Fields to Surface Water Systems: The Overland Transport of Veterinary Antibiotics. *J Soils Sediments* **2015**, *15*, 1630–1634, doi:10.1007/s11368-015-1140-4.
20. Sinthuchai, D.; Kitpati Boontanon, S.; Boontanon, N. Evaluation of Removal Efficiency of Human Antibiotics in Wastewater Treatment Plants in Bangkok, Thailand. *Water Science & Technology* **2016**, *73*, 182–191.
21. Koutková, Z. Látky kontaminující vodní prostředí a možnosti jejich odstranění – studijní materiály pro zkvalitnění výuky předmětu Toxikologie. 2020.
22. Lenart-Boroń, A.; Prajsnar, J.; Guzik, M.; Boroń, P.; Chmiel, M. How Much of Antibiotics Can Enter Surface Water with Treated Wastewater and How It Affects the Resistance of Waterborne Bacteria: A Case Study of the Białka River Sewage Treatment Plant. *Environmental Research* **2020**, *191*, doi:10.1016/j.envres.2020.110037.
23. Tang, J.; Fang, J.; Tam, N.F.; Yang, Y.; Dai, Y.; Zhang, J.; Shi, Y. Impact of Phytoplankton Blooms on Concentrations of Antibiotics in Sediment and Snails in a Subtropical River, China. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55*, 1811–1821, doi:10.1021/acs.est.0c08248.
24. Zhihua, M.; Fangshe, Y.; Jingya, R. Growth Inhibition and Oxidative Stress in Two Green Algal Species Exposed to Erythromycin. *Journal of the American Water Resources Association* **2021**, 628–637.
25. EU 2022/1307 *Prováděcí rozhodnutí komise (EU) 2022/1307*; 2022; Vol. 257;.
26. EU 2018/840 *Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2018/840*; 2018; Vol. 141;.
27. EU 2020/1161 *Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2020/1161*; 2020; Vol. 257;.
28. Jarova, K.; Vavrova, M.; Koleckarova, A. Residues of Selected Antibiotics in the South Moravian Rivers, Czech Republic. *Neuroendocrinology Letters* **2015**, 100–105.
29. Járová, K.; Vávrová, M.; Jírová, A. Assessment of Contamination Level of Aquatic Ecosystem in the Svatka and the Svitava Rivers (Czech Republic) by Selected Pharmaceuticals. *Fresenius Environmental Bulletin* **2014**, *23*, 3265–3271.
30. Malvar, J.L.; Abril, C.; Martín, J.; Santos, J.L.; Aparicio, I.; Escot, C.; Basanta, A.; Alonso, E. Development of an Analytical Method for the Simultaneous Determination of the 17 EU Watch List Compounds in Surface Waters: A Spanish Case Study. *Environ. Chem.* **2018**, *15*, 493, doi:10.1071/EN18101.
31. Naderi Beni, N.; Snow, D.D.; Berry, E.D.; Mittelstet, A.R.; Messer, T.L.; Bartelt-Hunt, S. Measuring the Occurrence of Antibiotics in Surface Water Adjacent to Cattle Grazing Areas Using Passive Samplers. *Science of The Total Environment* **2020**, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138296.
32. Kuang, Y.; Guo, X.; Hu, J.; Li, S.; Zhang, R.; Gao, Q.; Yang, X.; Chen, Q.; Sun, W. Occurrence and Risks of Antibiotics in an Urban River in Northeastern Tibetan Plateau. *Sci Rep* **2020**, doi:10.1038/s41598-020-77152-5.
33. Englert, B. Metod 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS 2007.
34. SÚKL SPC Sulfasalazin K 2011.
35. Pokludová, L. Žádost o Spotřeby Sulfonamidů ČR Vet Data 2020 2022.

7.2 Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma HPLC [5]	10
Obrázek 2: Schéma průchodu iontů kvadrupólem [11]-upraveno.....	16
Obrázek 3: Struktura ampicilinu.....	20
Obrázek 4: Struktura erythromycinu	21
Obrázek 5: Struktura linkomycinu.....	22
Obrázek 6: Struktura chloramfenikolu	23
Obrázek 7: Struktura ofloxacinu.....	23
Obrázek 8: Struktura doxycyklinu.....	24
Obrázek 9: Struktura sulfachlorpyridazinu.....	25
Obrázek 10: Chromatogram antibiotik se stejnými produktovými ionty	45
Obrázek 11: Chromatogram kalibračního roztoku 1000 ng/l s popsány antibiotiky	46

7.3 Seznam tabulek

Tabulka 1: Limity antibiotik ve vodách dle rozhodnutí komise EU [25–27]	29
Tabulka 2: Koncentrace antibiotik v řekách ve světě (ng/l) [22,23,30–32]...	29
Tabulka 3: Seznam neznačených standardů.....	33
Tabulka 4: Seznam izotopově značených standardů.....	34
Tabulka 5: Popis odběrových míst.....	35
Tabulka 6: Gradientová eluce v průběhu analýzy.....	38
Tabulka 7: Příprava kalibračních roztoků.....	39
Tabulka 8: SRM přechody iontů neznačených standardů.....	41
Tabulka 9: SRM přechody iontů izotopicky značených standardů.....	42
Tabulka 10: Kalibrační křivka neznačených standardů.....	43
Tabulka 11: Kalibrační přímka značených standardů.....	44
Tabulka 12: SRM přechody antibiotik se shodným m/z.....	45
Tabulka 13: Limity pro antibiotika.....	47
Tabulka 14: Koncentrace ATB na lokalitách (ng/l), * LOD<x<LOQ.....	50