



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STANOVENÍ LÉČIV V PŮDNÍM EKOSYSTÉMU

DETERMINATION OF ANTIBIOTICS IN THE SOIL ECOSYSTEM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tomáš Brož

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1672/2021
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Tomáš Brož**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.**

Akademický rok: 2021/22

Název diplomové práce:

Stanovení léčiv v půdním ekosystému

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši z oblasti výskytu a analýzy léčiv v půdním ekosystému (voda, půda, rostliny).
2. Vybrat a optimalizovat vhodnou metodu pro extrakci léčiv z půdy.
3. Provést modelové laboratorní experimenty.
4. Vyhodnotit a zpracovat získané výsledky.

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

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

Bc. Tomáš Brož
student

Ing. Ludmila Mravcová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Práce se zabývá aktuální problematikou narůstajících koncentrací léčiv, a tím i rostoucího počtu rezistentních bakterií v půdě. Jednou z příčin je hnojení zemědělských polí zvířecími fekáliemi, ve kterých se antibiotika vyskytují v nezměněné a stále aktivní formě nebo nedostatečná účinnost konvenčních metod používaných v čistírnách odpadních vod. Ve snaze zlepšit monitoring tohoto problému, byla vyvinuta a optimalizována metoda stanovení těchto antibakteriálních látek v půdní matrici, za využití extrakce tuhou fází, a také UPLC/MS metoda na jejich vyhodnocení. Ze skupiny sulfonamidových antibiotik byl vybrán sulfacetamid, sulfadiazol, sulfamerazin, sulfamethazin, sulfamethoxazol, sulfapyridin, sulfasalazin, sulfathiazol a trimethoprim. Nejnižším limitem detekce metody byla koncentrace 0,3 µg/g v případě sulfathiazolu a nejvyšším 8,1 µg/g pro sulfasalazin. Nejvyšších průměrných výtěžností bylo dosaženo u sulfamethoxazolu a to konkrétně 63 ± 8 %.

ABSTRACT

This work deals with a current issue of increasing drug concentrations and thus the growing number of resistant bacteria in the soil. One of the problem helping this issue is the fertilization of agricultural fields with animal faeces, in which antibiotics occur in an unchanged and still active form, as well as the insufficient effectiveness of conventional methods used in wastewater treatment plants. In an effort to improve the monitoring of this problem, a method for the determination of these antibacterial agents in the soil matrix, using solid phase extraction, and also a UPLC/MS method for their evaluation have been developed and optimized. From the group of sulfonamide antibiotics, sulfacetamide, sulfadiazole, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfapyridine, sulfasalazine, sulfathiazole and trimethoprim were selected. The lowest limit of detection for the method is 0.3 µg/g for sulfathiazole and the highest of 8.1 µg/g for sulfasalazine. The highest average yields were achieved with sulfamethoxazole, namely 63 ± 8 %.

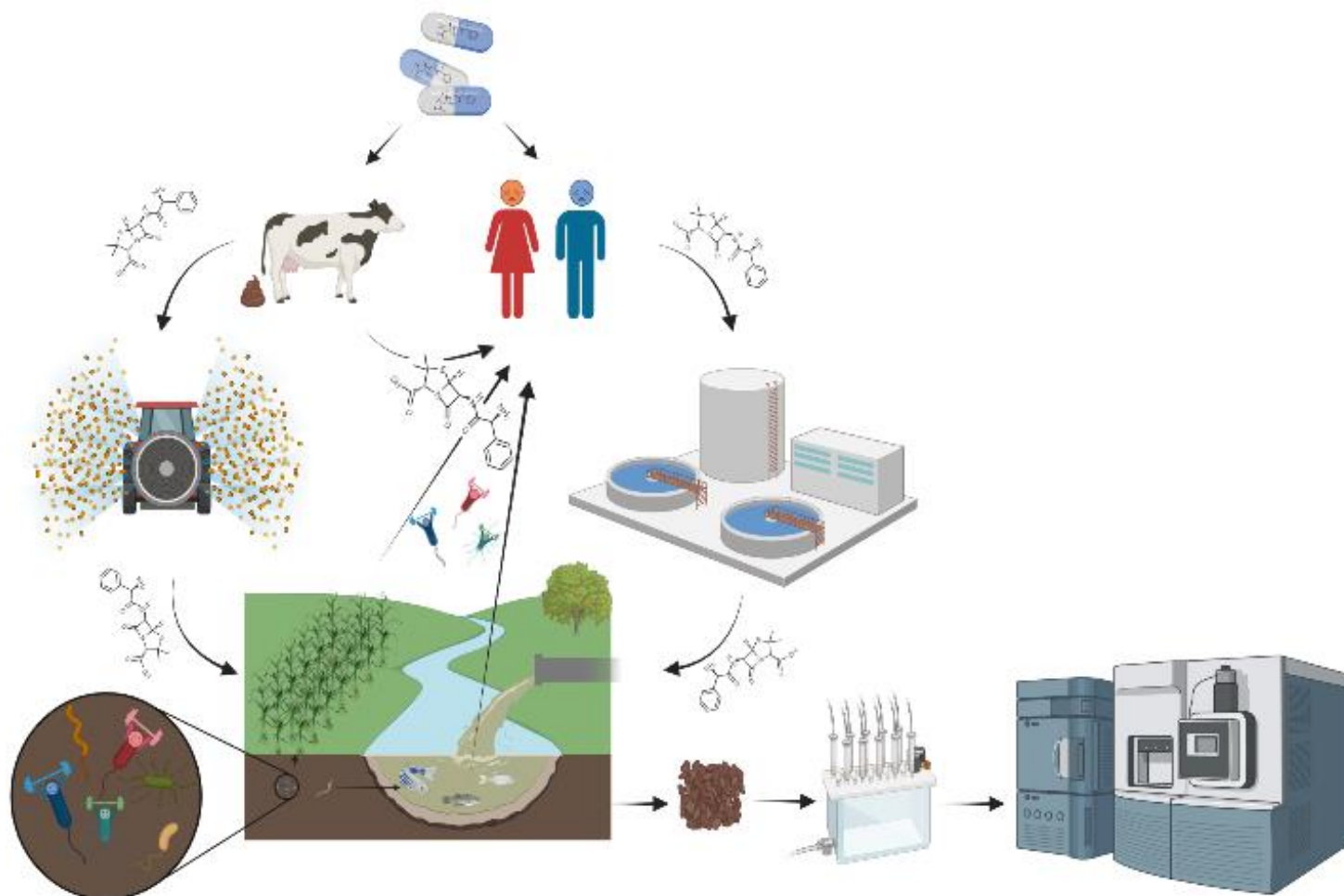
KLÍČOVÁ SLOVA

Sulfonamidy, extrakce tuhou fází, půda, antibiotika, léčiva, rezistence, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

KEYWORDS

Sulfonamides, solid phase extraction, soil, antibiotics, drugs, resistance, high performance liquid chromatography, mass spectrometry

GRAFICKÝ ABSTRAKT/GRAPHICAL ABSTRACT



BROŽ, Tomáš. *Stanovení léčiv v půdním ekosystému* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/139327>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ludmila Mravcová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych rád poděkoval vedoucí této práce Ing. Ludmile Mravcové, Ph.D. za vstřícný přístup a odborné rady. Dále bych chtěl poděkovat Ústřednímu kontrolnímu a zkušebnímu ústavu zemědělskému za poskytnutí vzorků půdy. Největší díky však patří mému konzultantovi Ing. Janu Fučíkovi za trpělivost, ochotu pomoci v jakoukoliv denní hodinu a přínosné konzultace.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Antibiotika	10
2.1.1	Historie	10
2.1.2	Proč mikroorganismy tvoří antibiotika?	10
2.1.3	Rozdělení antibiotik	11
2.1.4	Mechanismus účinku	12
2.1.5	Rozdíl mezi antibiotiky a běžnými léčivy	14
2.1.6	Antibiotika v životním prostředí.....	15
2.1.7	Vstup antibiotik do potravinového řetězce prostřednictvím plodin	16
2.2	Sulfonamidy a Trimethoprim.....	17
2.2.1	Sulfamethoxazol (SMX).....	18
2.2.2	Sulfapyridin (SPD)	18
2.2.3	Sulfasalazin (SSZ)	19
2.2.4	Sulfacetamid (SAA).....	19
2.2.5	Sulfadiazin (SDA)	19
2.2.6	Sulfathiazol (STA).....	19
2.2.7	Sulfamerazin (SMR)	20
2.2.8	Trimethoprim (TMP).....	20
2.2.9	Mechanismus působení.....	20
2.2.10	Syntéza.....	20
2.2.11	Degradační produkty sulfonamidů	21
2.2.12	Rezistence na sulfonamidy	22
2.2.13	Vedlejší účinky sulfonamidů	24
2.2.14	Analýza sulfonamidů	25
2.3	Půda.....	27
2.4	Extrakce tuhou fází (SPE).....	27
2.4.1	Postup	28
2.5	Quechers	29
2.6	Sorpční extrakce na magnetické míchadlo.....	31
2.7	Kapalinová chromatografie.....	31
2.7.1	UPLC (Ultraúčinná kapalinová chromatografie).....	31

2.7.2	Spojení LC-MS a LC-MS/MS	32
3	Analytická část	34
4	Experimentální část	37
4.1	Použité přístroje a pomůcky	37
4.2	Použitý software pro zpracování a interpretaci dat	37
4.3	Použité chemikálie a standard	38
4.3.1	Chemikálie	38
4.3.2	Plyny	38
4.4	Vzorky půd	38
4.5	Příprava roztoků	39
4.5.1	Příprava zásobních roztoků standardu	39
4.5.2	Příprava kalibračních roztoků	39
4.6	Příprava extrakčních medií	39
4.6.1	Citráto-fosfátový (McIlvaine) pufr o různém pH	39
4.7	Extrakce a analýza	40
4.7.1	Podmínky a metody extrakce	40
4.7.2	Výběr extrakčních médií	40
4.7.3	Příprava vzorků pro extrakci	42
4.7.4	Extrakce tuhou fází (SPE)	42
4.8	Sušení vzorků pod proudem dusíku	43
4.9	Předúprava vzorků před analýzou	44
4.10	Kvantitativní analýza	44
4.10.1	Optimalizace LCMS metody	45
5	Výsledky a diskuze	48
5.1	Kalibrační závislost	48
5.1.1	Určení mezí stanovení metody – LoD a LoQ	48
5.2	Výsledky optimalizace jednotlivých kroků metody	49
5.2.1	Výběr účinnější SPE kolonky	49
5.2.2	Optimalizace typu extrakčního média	50
5.2.3	Optimalizace vlivu doby naložení půdy s léčivý v EM	53
5.2.4	Optimalizace vlivu teploty	54
5.2.5	Optimalizace vlivu přídavku EDTA	55
5.2.6	Optimalizace vlivu navážky půdy	56

5.2.7	Optimalizace vlivu objemu rozpouštědla během rekonstituce vzorku	57
5.2.8	Vliv koncentrace aplikovaných léčiv	57
5.3	Aplikace konečné metody na různé typy půd	58
6	Závěr	60
7	Seznam použitých Zdrojů	61
8	Seznam použitých zkratk	67
9	Přílohy	69

1 ÚVOD

Antibiotika jsou široce užívána po celém světě k léčbě a prevenci infekčních onemocnění u lidí a zvířat. V některých zemích je rovněž stále dovoleno jejich použití k podpoře růstu či zvýšení příjmu potravin u zvířat, které produkují hospodářské produkty jako jsou vejce či mléko (v Evropské unii zakázáno od roku 2006). Mezi nejpoužívanějšími veterinárními antibiotiky jsou tetracykliny a sulfonamidy, které se řadí do skupin chemoterapeutik, jelikož jsou syntetizovány čistě chemicky. Protože se tyto sloučeniny ve střevech zvířat špatně vstřebávají, je značná část (až 90 %) z nich vylučována z těla ven. Do životního prostředí se poté dostávají především aplikací hnoje a kejdy jako hnojiva na zemědělských polích. Jakmile se antibiotika dostanou do půdy, tak podléhají řadě fyzikálním, chemickým a biologickým procesům, které závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiv, počasí a také vlastnostech půdy [1].

Z půdy se mohou následně antibiotika dostávat do podzemních vod anebo být splavovány deštěm do povrchových vod, kde mají negativní vliv na bakterie, které se podílejí na koloběhu živin i rozkladných procesů. Přítomnost antibiotik v nízkých koncentracích po dlouhou dobu způsobuje vznik rezistentních bakterií, což představuje potenciální hrozbu pro všechny organismy. A jelikož v dnešní době nedochází k masivnímu vývoji nových generací antibiotických léků, je zapotřebí zvýšené obezřetnosti při předepisování těch stávajících, aby byla zajištěna dlouhodobá dostupnost účinné léčby bakteriálních infekcí. Pokud se antibiotika stanou neúčinnými, pak současná a nově se objevující infekční onemocnění mohou vést k horšímu průběhu nemoci, nadměrnému využívání zdravotní péče a předčasnému úmrtí [2].

Údaje z 30 zemí Evropské unie/Evropského hospodářského prostoru odhalily vysokou úroveň stejně se chovajícího vzrůstajícího trendu antimikrobiální rezistence (AMR), přičemž nejvyšší procenta AMR hlásily země na jihu a východě Evropy. Zpráva z European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet) z roku 2019 ukázala, že více než polovina izolovaných bakterií *Escherichia Coli* a více než třetina izolovaných bakterií *Klebsiella pneumoniae* byla rezistentní na alespoň jednu antimikrobiální skupinu [3].

Čím více budeme antibiotika používat, tím dříve se na ně bakterie dokážou adaptovat, čímž můžeme ztratit výhody, které z antibiotické léčby máme. Proto je důležité najít nejlepší metodu jejich extrakce a stanovení, abychom mohli koncentrace, případně perzistence léčiv v půdě lépe monitorovat a včas reagovat.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Antibiotika

Přírodní antibiotika jsou látky produkované metabolismem bakterií nebo plísní, které jsou namířeny proti jiným mikroorganismům, nejčastěji bakteriím. Jejich produkcí do svého okolí, si mikroorganismus zajišťuje přístup k výživovým zdrojům. Jedná se tedy o konkurenční boj, který může zvýhodnit například pomalu rostoucí plíseň, která může díky antibiotikům zpomalit rozmnožování (bakteriostatická) nebo přímo zabít (baktericidní) rychleji rostoucí bakterii, a tím si zajistí živiny, což jí umožňuje v daném prostředí přežít [4].

2.1.1 Historie

První použití mikrobů produkujících antibiotika k prevenci nemocí se datuje na několik tisíciletí zpět. Eberův papyrus z roku 1550 př. n. l. je nejstarším dochovaným lékařským dokumentem, ve kterém se například popisuje využití obkladů z plesnivého chleba k léčbě otevřených ran nebo účinky „léčivé půdy“. Nicméně vývoj protiinfekčních léků a základní koncept chemoterapie vděčí výzkumu Paula Ehrlicha, který společně se svými kolegy zhruba před 112 lety vyvinul syntetické léčivo Salvarsan k léčbě *Treponema pallidum*, původci syfilis [5].

Salvarsan byl nahrazen sulfonamidovým prolékem Prontosilem, jež objevil Gerhard Domagk, bakteriolog z Bayeru, který lék použil k záchraně paže své dcery před amputací. Domagk a jeho kolegové se při výrobě sulfonamidů inspirovali barvivý, které Paul Ehrlich používal k selektivnímu barvení bakteriálních buněk. Sulfonamidy byly první skutečně účinné širokospektrální antimikrobiální látky používány v klinické praxi. Poté byly z velké části nahrazeny objevem penicilinu, který na kontaminované Petriho misce pozoroval v roce 1928 Alexander Fleming. Penicilin byl později purifikován Normanem Heatley, Howardem Florey a Ernestem Chain z Oxfordu, kteří se zasloužili o vývoj penicilinu jakožto léku. Dorothy Hodgkinová objasnila beta-laktamovou strukturu penicilinu v roce 1945, čímž vyvrátila tvrzení Roberta Robinsona, který věřil, že se jedná o thiazolidin-oxazolonovou strukturu. To byl důležitý průlom, protože umožnil vývoj polosyntetických derivátů, které obcházejí penicilínovou rezistenci. Ze všech antibiotik objevených v letech 1945 až 1978 pocházelo 55 % z rodu *Streptomyces* [6, 7].

2.1.2 Proč mikroorganismy tvoří antibiotika?

Existuje více teorií, nabízející vysvětlení, proč půdní mikroby vytvářejí obecně tolik bioaktivních přírodních produktů. Nejpravděpodobnější je, že fungují jako chemické zbraně k zabíjení konkurentů v půdě pro svou ochranu (defenzivní funkce) nebo zajištění potravy (útočná funkce). Dalším důvodem může být jejich využití jako významné signální molekuly pro příbuzné mikroorganismy nebo interakce s eukaryotními organismy, jako je hmyz nebo rostliny. Přispívají tomu důkazy o tom, že se druhy *Streptomyces* a další vláknité aktinomycety vyvinuly zhruba před 440 miliony let, což je přibližně stejná doba, kdy rostliny poprvé kolonizovaly Zemi. Vlákňitý růst těchto bakterií poskytoval výhodu při napadání kořenů rostlin a předpokládá se, že mnoho z jejích přírodních produktů se mohlo vyvinout nebo být přizpůsobeno k zprostředkování těchto interakcí [8].

Jedním z nejpřekvapivějších objevů, které vyplývají ze sekvenování mikrobiálního genomu bylo, že v přirozeném prostředí produkují bakterie a houby daleko více produktů, než jsou schopny vytvořit v laboratoři. Má se za to, že alespoň tři čtvrtiny jejich schopností tvořit bioaktivní látky nejsou možné *in vitro*, což vyvolalo úsilí o vývoj inovativní metody a nástrojů k aktivaci jejich „tajemných“ biosyntetických genových klastrů v naději na objevení nových chemických látek s užitečnými biologickými vlastnostmi. Mnoho bezobratlých živočichů, včetně hmyzu a mořských hub, tvoří vzájemně prospěšné symbiózy s bakteriemi produkujícími antibiotika a zdá se pravděpodobné, že většina, ne-li všechny suchozemské rostliny, dělají totéž [9].

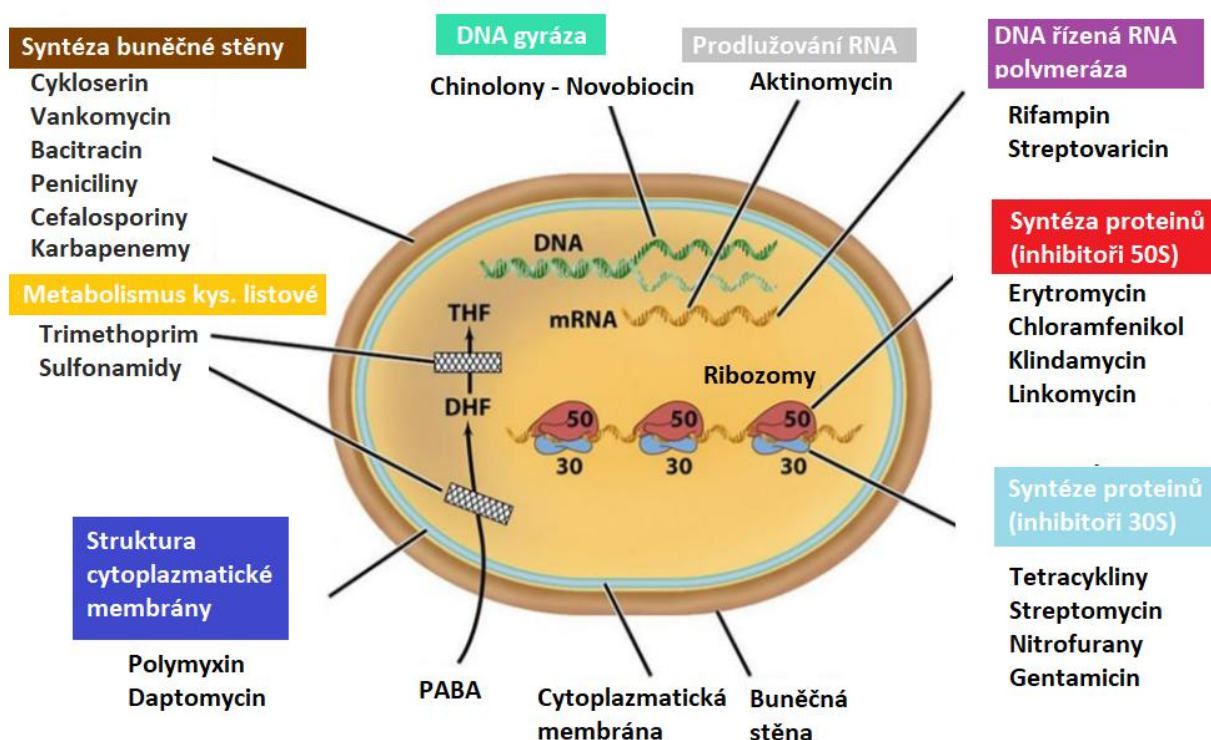
2.1.3 Rozdělení antibiotik

Podle síly účinku je můžeme rozdělit na bakteriostatické, baktericidní případně fungistatická a fungicidní, která jsou namířeny proti plísním. Toto rozdělení však může být zavádějící, protože některá bakteriostatická antibiotika mohou ve velkých koncentracích působit až baktericidně (chloramfenikol v případě meningokokové infekce) a naopak některá baktericidní antibiotika neusmrcují určité bakterie ani ve vysokých koncentracích (penicilin G u enterokoků) [10, 11].

V současné době jsme schopni rozlišovat nejen přírodní antibiotika (penicilin, tetracyklin), ale díky objasnění struktury řady z nich, máme také polysyntetická (ampicilin, oxacilin), která jsou substituována z těch přírodních molekul, anebo čistě syntetická (chloramfenikol), která jsou syntetizována *de novo*. V závislosti na rozsahu působení se může jednat o látky s úzkým nebo širokým spektrem. U antibiotik rozlišujeme 4 základní mechanismy účinku, podle kterých je můžeme rozdělit na: inhibující syntézu buněčné stěny, inhibující proteosyntézu, narušující cytoplazmatickou membránu a pro nás nejdůležitější, které inhibují syntézu nukleových kyselin, protože mezi ně se řadí i sulfonamidy. Dále je například můžeme rozdělit podle rozpustnosti na hydrofilní a lipofilní nebo podle cílové skupiny na protistafyloková, antituberkulotika a další. V neposlední řadě je můžeme rozdělit na základě jejich chemické struktury, čímž získáme skupiny antibiotik vykazující podobné vlastnosti, jako je účinnost, toxicita a vedlejší účinky [10, 11].

2.1.4 Mechanismus účinku

Na obrázku 1 lze vidět přehledně všechna místa bakteriální buňky, na které antibiotika působí. Popis mechanismu je následně popsán v kapitole 2.1.4.1.



Obrázek 1: Cíle působení antibiotik (upraveno z [11])

2.1.4.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Bakteriální buňky jsou obklopeny buněčnou stěnou z peptidoglykanu, který je složen z dlouhých cukerných polymerů. Jedná se o dva za sebou se řadící aminosacharidy, a to N-acetylglukosamin a kyselinu acetylmuramovou, které jsou spojeny přes beta-1,4-glykosidické vazby. Na COOH– skupině kyseliny acetylmuramové jsou navázané 4 aminokyseliny. Tyto „řetízky“ jsou navzájem spojené a vytvářejí síť. D-alanyl-alaninová část peptidového řetězce je zesíťovaná glycinovými zbytky v přítomnosti proteinů vázající penicilin (PVP), což jsou důležité enzymy odpovědné za transpeptidaci a transglykosylaci peptidoglykanových jednotek vystupujících z cytoplazmy [12].

Typickými zástupci této skupiny jsou glykopeptidy a β -laktamy. Má se za to, že β -laktamový kruh napodobuje D-alanyl-alaninovou část peptidového řetězce, na kterou se proteiny normálně váží. Ty potom místo toho vytváří vazbu právě s β -laktamovým kruhem a stávají se nedostupným pro syntézu nového peptidoglykanu, což vede k lýzi bakterií. Tento mechanismus se uplatňuje převážně u grampozitivních mikrobů, protože buněčná stěna gramnegativních bakterií je doplněna o fosfolipidovou vrstvu, která může bránit průniku hydrofilních antibiotik k vazebnému proteinu [12].

2.1.4.2 Inhibice proteosyntézy

Živé organismy včetně bakterií jsou definovány množstvím a typem proteinů, ze kterých se skládají a které neustále produkují. Tyto proteiny jsou odpovědné mimo jiné za strukturní složení, metabolické a fyziologické procesy a reakci na nepříznivé podmínky. Typ a množství proteinů produkované bakterií v daném okamžiku však závisí na informacích obsažených v další velmi důležité biomolekule – kyselině deoxyribonukleové (DNA). DNA určuje typ proteinu, který má bakteriální buňka produkovat prostřednictvím určitých informací, které jsou obsaženy v souboru genetických kódů, zvaných kodony. Tyto informace se potom přepisují na ribonukleovou kyselinu (RNA), konkrétně messenger RNA (mRNA). Tato biomolekula putuje do ribozomů – továrna na syntézu bílkovin v živé buňce. Transferová RNA (tRNA) pak dešifruje kodony obsažené v mRNA a usnadňuje translaci sekvence kodonů na sekvenci aminokyselin, které jsou stavebními kameny proteinů [13].

Translace mRNA do proteinů probíhá v ribozomech ve třech po sobě jdoucích fázích (iniciace, elongace a terminace). Ribozomy se skládají z proteinů a ribozomální RNA (rRNA) a dělí se na dvě podjednotky, malou a velkou. Tyto dvě podjednotky se obvykle popisují na základě jejich sedimentačních koeficientů a jsou měřeny ve Svedbergových jednotkách označovaných jako 30S a 50S. Bakterie mají na své rRNA geny 5S, 16S a 23S. Gen 16S sídlí jako jediný gen RNA v malé podjednotce, zatímco další dva geny rRNA (23S a 5S) se vyskytují na velké podjednotce bakteriálního ribozomu. Mezi prokaryotickou a eukaryotickou rRNA je obrovský rozdíl, což umožnilo vědcům vyvinout antibiotika, která se zaměřují pouze na rRNA širokého spektra patogenních bakterií. Vzhledem k důležitosti proteinů v metabolických procesech a životě všech živých organismů by cokoli, co by narušilo proces jejich syntézy, buňku zneschopnilo, inhibovalo její růst nebo ji dokonce zabilo. Léky, které inhibují syntézu proteinů, patří mezi nejširší skupinu antibiotik a lze je rozdělit do dvou podtříd: inhibitory 50S a inhibitory 30S [14].

Antibiotika jako erythromycin, klindamycin, linkomycin, chloramfenikol, linezolid a další se projeví jako inhibitory ribozomu 50S. Obecně řečeno, antibiotika inhibující 50S ribozom blokuji buď iniciační fázi proteinové translace, nebo elongační fázi proteinové syntézy, kdy je přichozí aminokyselina spojována s rostoucím peptidovým řetězcem. Příklady antibiotik, které blokuji zahájení translace proteinů, jsou ze skupiny oxazolidinonů, zatímco makrolidy, jako je linkosamid a streptogramin, blokuji syntézu proteinů inhibicí prodlužovací fáze translace mRNA. 30S ribozomové inhibitory fungují primárně tak, že blokuji přístup aminoacyl-tRNA k ribozomu. Příklady antibiotik, které fungují tímto způsobem, zahrnují tetracyklin, streptomycin, spektinomycin atd. [15].

2.1.4.3 Inhibice syntézy nukleových kyselin

Metabolické dráhy, které vedou k syntéze nukleových kyselin, jsou velmi důležité a jejich narušení je nepříznivé jak pro přežití, tak pro rozmnožování bakteriálních buněk. Antibiotika zasahují do syntézy nukleových kyselin blokováním replikace nebo zastavením transkripce. Replikace DNA začíná odmotáním struktury dvojité šroubovice, což je proces usnadněný helikázovými enzymy. Chinolonová skupina antibiotik například interferuje s těmito enzymy,

čímž narušuje jejich funkci. Antibiotika, jejichž mechanismem účinku je inhibice syntézy nukleových kyselin, se také zaměřují na bakteriální topoisomerasu II a topoisomerasu IV. Narušení aktivit těchto enzymů nepříznivě ovlivňuje RNA polymerázu, která zase brání syntéze RNA. Chinolony, které tímto způsobem inhibují syntézu bakteriální nukleové kyseliny, neinteragují se savií RNA polymerázou, což je činí specificky antagonistickými vůči grampozitivním bakteriím a některým gramnegativním bakteriím [16].

2.1.4.4 Narušení klíčových metabolických drah

Některá antibiotika, jako jsou sulfonamidy a trimethoprim, napodobují substrát potřebný pro buněčný metabolismus bakterií, což způsobí, že se bakteriální enzymy připojí k antibiotiku spíše než k normálnímu substrátu. Zejména sulfonamidy působí jako tetrahydrofolát, který je nezbytný pro syntézu kyseliny listové v bakteriálních buňkách. Kyselina listová je životně důležitá v metabolismu nukleové kyseliny a aminokyselin [17].

2.1.5 Rozdíl mezi antibiotiky a běžnými léčivy

Tabulka 1: Rozdíly mezi běžnými léky a antibiotiky [18]

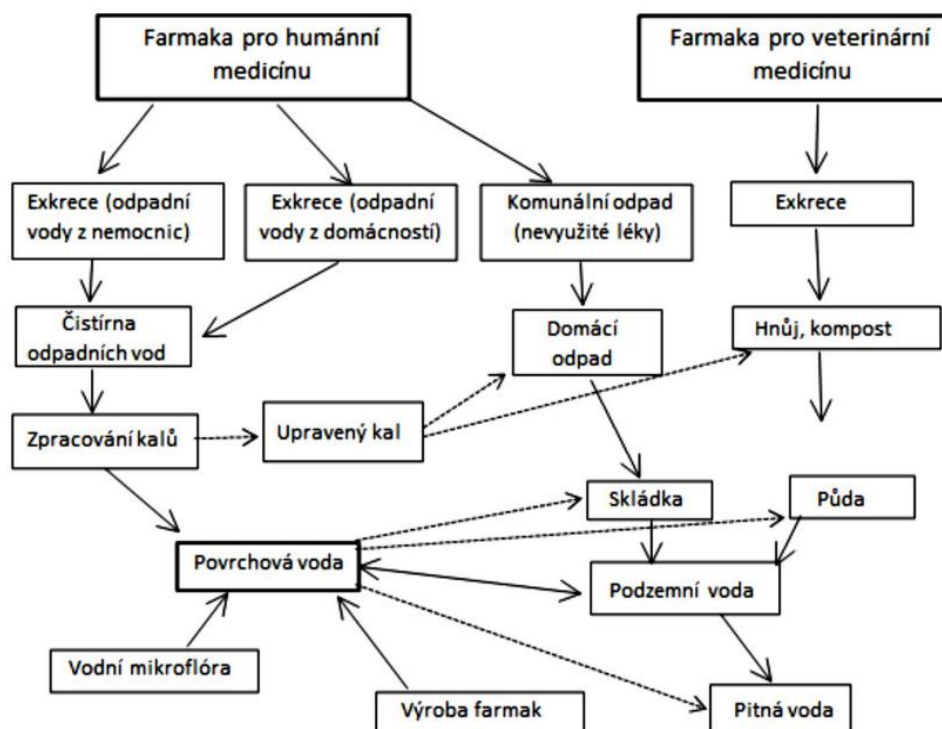
Většina léků	Antibiotika (ATB)
Působí na buňky lidského těla	Působí na bakterie přítomné v tkáních
Ovlivňují funkci cílových buněk, ale neničí je	Zabíjejí cílové buňky (patogenní bakterie)
Cílové buňky jsou v lidském organismu lokalizovány vždy na stejné místě	Cílové buňky se mohou nacházet v různých orgánech či tkáních
Lidská populace je geneticky velmi homogenní, účinek je dobře předpověditelný	Bakteriální populace je velmi různorodá, účinek empiricky podaného ATB často nelze predikovat.
Mají na pacienty stejný účinek, ať jsou léčeni kdekoli	Účinek závisí na místním stavu rezistence, ten může být jiný v Praze než v Brně, v nemocnici jiný než v komunitě a na JIP jiný než na standardním oddělení
Účinek se v čase nemění	Účinek se může během léčby změnit v důsledku adaptace bakterií
Působí jen na léčené osoby	Mohou ovlivnit mikroflóru okolních osob

2.1.6 Antibiotika v životním prostředí

Některé antibiotika jako jsou například penicilíny mohou být metabolismem organismů rozkládána na oxid uhličitý a vodu. Mnohem častějším případem (kolem 70 %) však je, že se léčiva vylučují z těla ven v nezměněné podobě jako stále aktivní sloučeniny. Ty se poté kanalizačním systémem dostávají do čistíren odpadních vod, kde pokud nejsou úspěšně eliminovány, končí v povrchových a podzemních vodách. Navíc jsou tyto odpadní vody často recyklovány a aplikovány v zemědělství, což je podporováno Evropskou unií v rámci cirkulární ekonomiky. To z čistíren dělá hlavní zdroj vstupu antibiotik do životního prostředí. Tento problém se vyskytuje hlavně u stálých a polárních antibiotik, které se neváží na pevné částice filtru. Poté už totiž nejsou zachytávány v žádném stupni čištění. Přehlíženým problémem může být rovněž to, že v konečné matici poté vzniká mix všech možných antibiotik, čímž může docházet k aditivním efektu a tím ke větší výsledné toxicitě [19].

Antibiotika jsou také hojně využívána k léčbě a prevenci nemocí u zvířat, které je rovněž vylučují ve formě moči a fekálií. Těmi se poté hnojí zemědělská půda, ze které se pomocí dešťů vymývají léčiva až do podzemních a povrchových vod. Dalším problémem může být vstřebávání antibiotik rostlinami jako jsou mrkev, listy salátu, brambory, cibule a kukuřice. Podle studií tyto plodiny nejčastěji absorbovaly chlortetracyklin a sulfamethazin. Jejich koncentrace nebyly v rostlinných tkáních příliš velké, ale postupně se zvyšovaly s rostoucím množstvím antibiotik v hnoji. Nejvyšší koncentrace absorbovaných léčiv z půdy bylo neměřeno u kukuřice a brambor. Dostupné studie však nenabízejí mnoho důkazů o významnějším riziku působení antibiotik v rostlinách. I tak to ale nemůžeme přehlížet, protože tyto plodiny jsou následně požívány zvířaty či lidmi, čímž se vytváří začarovaný kruh [20].

Dalším významným zdrojem, ze kterého mohou antibiotika prostupovat do životního prostředí, je akvakultura. Tento pojem označuje cíleně plánované obhospodařování vodních ploch, s cílem dosáhnout dlouhodobě stálých výnosů ryb, humrů, krabů, krevet a jiných vodních organismů. Antibiotika oprávněná k používání v akvakultuře jsou florfenicol, sarafloxacin, erythromycin, oxytetracyklin nebo právě sulfonamidy. Problém na těchto farmách je ten, že jsou antibiotika dávkována přímo do vody a nejsou organismy spotřebována na 100 %. Pronikají tedy přímo do vodního prostředí [19].



Obrázek 2: Schéma průniku léčiv do životního prostředí [18]

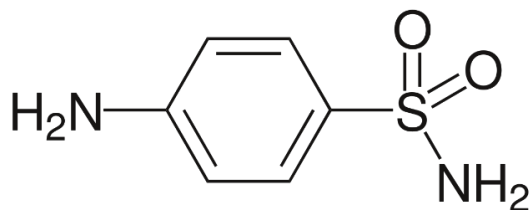
2.1.7 Vstup antibiotik do potravinového řetězce prostřednictvím plodin

Kromě toho, že se antibiotika dostávají do půdy a vod, tak se prostřednictvím plodin mohou dostávat až do lidského těla, kde mohou interagovat se střevní mikroflórou a způsobit změny ve složení mikrobioty. Tato nerovnováha může poté způsobovat až pseudomembranózní kolitidu, kolorektální rakovinu a různá střevní onemocnění. Dalším problémem je, že střevní bakterie si vybudovávají rezistenci, což představuje potenciální riziko. Přítomnost antibiotik v rostlinách byla studována méně, než ve vodě a půdě, ale například Conde-Cid a kolektiv detekovali antibiotika ve 12 z 27 analyzovaných vzorků. Maximální detekovaná koncentrace byla $0,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro tetracykliny (TC) a $0,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro sulfamethoxazol. Conde-cid a kol. také uvedli, že sulfonamidy byly detekovány v rostlinách častěji, což mohlo být způsobeno nižší molekulovou hmotností SA ve srovnání s TC, což usnadňuje příjem rostlinou. Došli také k zajímavé informaci, že v plodinách se vyskytovalo více léčiv než v samotné půdě, což naznačuje probíhající proces bioakumulace v rostlinných tkáních [21].

Rezidua antibiotik vykazují rovněž toxicitu pro rostliny (fytotoxicitu), protože postihují klíčení, růst a vývoj rostlin. Liu a kol. zkoumali účinky šesti antibiotik (chlortetracyklin, tetracyklin, tylosin, sulfamethoxazol, sulfamethazin a trimethoprim) na klíčení semen ovesa, rýže a okurek, přičemž zjistili, že nejcitlivější na všech 6 léčiv byl oves a že tetracykliny a sulfonamidy byly s ohledem na klíčení semen toxičtější než tylosin a trimethoprim [22]. Dále přišli na to, že oxytetracyklin, sulfamethazin a ciproflaxacin měli toxický účinek na aktivitu kořenů a obsah chlorofylu v listech [23]. Opris a kol. pozoroval, že doxycyklin, tetracyklin, ciprofloxacin a amoxicilin negativně ovlivnily rychlost fotosyntézy a obsah chlorofylu v pšenici [24].

2.2 Sulfonamidy a Trimethoprim

Sulfonamidy byly první léky, které vykazovaly selektivní účinek a u kterých bylo možné systémové použití proti bakteriálním infekcím. První úspěšné experimenty, které prokazovaly úspěšnou ochranu před bakteriálním onemocněním způsobující zánět pobřišnice, pomocí chemicky syntetizovaného léku z řad sulfonamidů, byly provedeny v roce 1932 Gerhardem Domagkem. Konkrétně se jednalo o lék Prontosil rubrum, hydrolyzovaný *in vivo* na aktivovaný antimetabolit sulfanilamid. Od této doby se začaly využívat v klinické praxi [25].



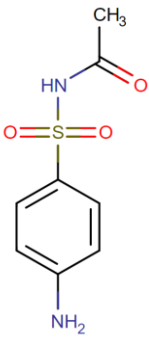
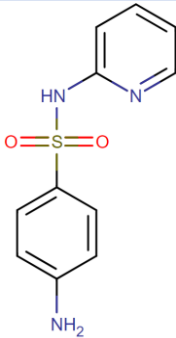
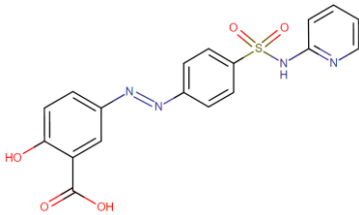
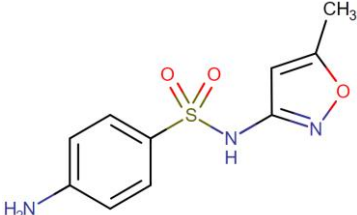
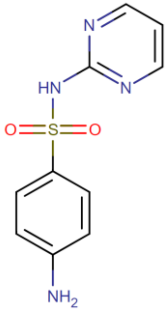
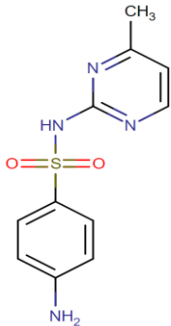
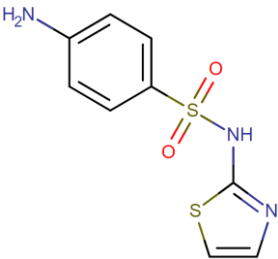
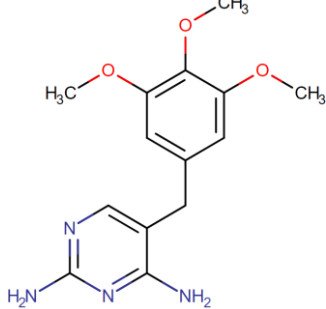
Obrázek 3: Strukturní vzorec sulfanilamidu [26]

Sulfonamidy jsou širokospektrální bakteriostatická antibiotika, což znamená, že bakterie nutně nezabíjí, ale zastavují jejich množení. Jedná se o strukturní analogy kyseliny para-aminobenzoové (PABA), se kterou soutěží o vazbu na dihydropteroátsyntetázu, čímž inhibují konverzi PABA a dihydropteroátdifosfátu na kyselinu dihydrofolovou nebo dihydrofolát. Toto zastavení produkce dihydrofolátového meziproductu narušuje normální bakteriální syntézu kyseliny listové (folátu). Folát je nezbytný metabolit pro bakteriální růst a replikaci. Používá se při syntéze RNA, DNA, především při biosyntéze thymidylátů a purinů, při syntéze nukleových kyselin a aminokyselin, včetně serinu, glycinu a methioninu. Blokáda produkce kyseliny listové tedy inhibuje na folátu závislé metabolické procesy růstu bakterií. Lidé si kyselinu listovou syntetizovat neumí, proto ji přijímají v potravě, ale bakterie ji syntetizovat musí. Sulfonamidové antimikrobiální látky lze kombinovat s trimethoprimem, který působí na jiný enzym v cestě syntézy kyseliny listové, a tím se stávají baktericidní, tudíž bakterie zabíjejí. Obecně se podávají v orální formě a všechny se rychle vstřebávají. Metabolizují se v játrech acylací a glukuronidací. Samotný lék i jeho metabolity se vylučují ledvinami. Nejčastěji se využívají na léčbu infekcí močových a horních dýchacích cest [27].

Výroba, distribuce a spotřeba se však v současné době velmi omezila. Vedly k tomu tři hlavní důvody. Jedním z nich je, že od jejich zavedení ve 30. letech 20. století bylo objeveno mnoho dalších, účinnějších antibakteriálních látek. Druhým důvodem byla poměrně rychle získaná rezistence na tyto antibiotika mezi bakteriemi a třetím důvodem byly zcela běžné vedlejší účinky u léčených pacientů. Mezi nejčastější patřily krevní dyskrázie, včetně aplastické anémie, které byly pozorovány s frekvencí 5,3 na milion definovaných denních dávek sulfonamidů se 17% úmrtností v postižené skupině [28].

V tabulce 2 lze přehledně vidět strukturní vzorce všech vybraných sulfonamidů a trimethoprimu.

Tabulka 2: Strukturní vzorce vybraných sulfonamidů [26]

Sulfacetamid	Sulfapyridin	Sulfasalazin	Sulfamethoxazol
			
Sulfadiazin	Sulfamerazin	Sulfathiazol	Trimethoprim
			

2.2.1 Sulfamethoxazol (SMX)

Jedná se o často využívané antibiotikum v humánní i veterinární medicíně k předcházení a léčbě bakteriálních onemocnění postihující vylučovací, dýchací a trávicí soustavu. Vzhledem k tomu, že zpomaluje růst bakterií, je sulfamethoxazol považován za bakteriostatické antibiotikum. Podává se v kombinaci s trimethoprimem, což je antifolátové antibiotikum, které společně se sulfamethoxazolem působí synergicky tak, že blokují dva po sobě jdoucí kroky v biosyntéze nukleových kyselin a proteinů, což pomáhá zpomalit rozvoj bakteriální rezistence. Je účinný proti gram pozitivním i gram negativním bakteriím [26].

2.2.2 Sulfapyridin (SPD)

Sulfapyridin je sulfanilamidový antibakteriální lék, který se běžně označoval jako M&B 693. Toto antibiotikum se již nepředepisuje k léčbě infekcí u lidí, může se však použít k léčbě IgA nefropatie a má využití ve veterinární medicíně. Jeho rozpustnost ve vodě je velmi závislá na pH, a proto existuje riziko krystalizace v močovém měchýři nebo močové trubici, která by mohla vést k bolesti nebo zablokování. Stejně jako u ostatních sulfonamidů existuje značné riziko agranulocytózy, což je, spíše než vývoj rezistence bakterií, hlavní důvod jeho ústupu v používání [26].

M&B 693 byl úspěšně použit k léčbě bakteriálního zápalu plic Winstona Churchilla během druhé světové války. Stejný zdroj uvádí, že v roce 1944 M&B 693 zachránil před zápalom plic také Nera, královského cirkusového lva. Může být užíván buď ve formě tablet nebo prášku, který se aplikuje přímo do ran. Během druhé světové války byl používán tak široce, že společnost May & Baker měla potíže držet krok s poptávkou. Později byl z velké části nahrazen penicilinem a jinými sulfonamidy [29].

2.2.3 Sulfasalazin (SSZ)

Lék, který se používá při léčbě zánětlivých onemocnění střev. Z chemického hlediska se jedná o azosloučeninu sulfapyridinu (SPD) spolu s kyselinou 5-aminosalicylovou (5-ASA), známou též pod názvem mesalazin, který je vlastní účinnou protizánětlivou látkou. Způsob účinku sulfasalazinu nebo jeho metabolitů 5-ASA a SPD je stále předmětem zkoumání, ale může souviset s protizánětlivými a/nebo imunomodulačními vlastnostmi, které byly pozorovány u zvířat a *in vitro* modelech. Klinické studie využívající rektální podávání sulfasalazinu, SPD a 5-ASA ukázaly, že hlavní terapeutický účinek může spočívat ve skupině 5-ASA [26].

2.2.4 Sulfacetamid (SAA)

Sulfacetamid je sulfonamidové antibiotikum s bakteriostatickými účinky a širokospektrální aktivitou proti většině grampozitivních a mnoha gramnegativních organismů. Hodně kmenů jednotlivých druhů si však vytvořilo rezistenci. Využívá se k léčbě zánětu očních víček, rohovky, spojivek, acne vulgaris a bakteriální vaginitidy. Výzkumy prokázaly, že za přítomnosti UV-A světla se stává mírně dráždivý, a proto by se měl skladovat ve tmě [30]. Sulfacetamid jako lék je dostupný jako roztok, oční kapky, pleťová voda a prášek [26].

2.2.5 Sulfadiazin (SDA)

Používá se společně s pyrimethaminem, inhibitorem dihydrofolát reduktázy. Je to první volba při léčbě toxoplazmózy, která je způsobena prvokovým parazitem. Dále se využívá při léčbě zánětu středního ucha, profylaxi revmatické horečky a chlamydií. Používá se také jako doplňková léčba malárie rezistentní na chlorochin a několika forem bakteriální meningitidy. Při užívání je doporučeno vyhýbat se slunečnímu záření. Užívá se orálně [26].

2.2.6 Sulfathiazol (STA)

Sulfathiazol nebo také Norsulfazolum je organosírová sloučenina používaná jako krátkodobě působící léčivo. Dokud nebyly objeveny méně toxické alternativy, jednalo se o běžné perorální a topické antimikrobiální činidlo. Příležitostně se stále používá v kombinaci se sulfabenzamidem a sulfacetamidem v podobě krému Triple Sulfa. Ve veterinární medicíně se používá při léčbě skotu [26].

2.2.7 Sulfamerazin (SMR)

Sulfamerazin je antibakteriální látka používaná při léčbě různých bakteriálních infekcí, jako je bronchitida, zánět prostaty a infekce močových cest. Vedlejšími příznaky mohou být nevolnost, zvracení, průjem a reakce přecitlivělosti. U pacientů s deficitem glukózo-6-fosfátdehydrogenázy se mohou také objevit hematologické účinky, jako je anémie, agranulocytóza, trombocytopenie a hemolytická anémie. Sulfamethoxazol může také vytěsnit bilirubin z vazebných míst pro albumin a způsobit žloutenku nebo kernikterus (poškození mozkových jader) u novorozenců [26].

2.2.8 Trimethoprim (TMP)

Trimethoprim je antibiotikum používané zejména při léčbě infekcí močového měchýře. Mezi další použití patří infekce středního ucha a cestovatelský průjem. Se sulfamethoxazolem nebo dapsonem může být použit na léčbu zápalu plic způsobenou u lidí s HIV/AIDS. Užívá se ústy. Mezi časté nežádoucí účinky patří nevolnost, změny chuti a vyrážka. Vzácně může vést k problémům s krví, jako je nedostatek krevních destiček nebo bílých krvinek a citlivosti na slunce. Existují důkazy o možném poškození během březosti u některých zvířat, u lidí však ne. Funguje tak, že u blokuje bakteriální metabolismus kyseliny listové prostřednictvím dihydrofolát reduktázy, což vede k jejich smrti. Přibližně 10–20 % požitá dávka trimethoprimu je metabolizována, primárně v játrech, zatímco až 80 % zbytku je vylučována v nezměněné podobě močí [26].

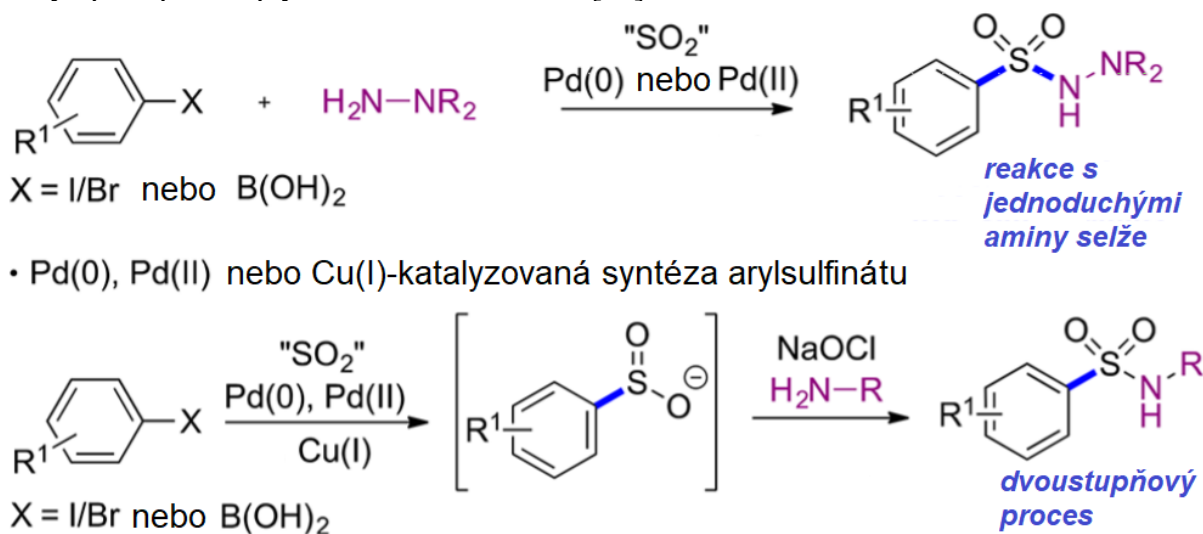
2.2.9 Mechanismus působení

Sulfonamidy jsou účinné proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Kompetitivně inhibují syntézu kyseliny listové, která je růstovým faktorem bakterií. Antibiotika tedy působí pouze na mikroorganismy, které syntetizují vlastní kyselinu listovou. Jejich účinek je bakteriostatický až baktericidní [16].

2.2.10 Syntéza

I přes pokroky dosažené v aplikaci sulfonamidů zůstává jejich nejběžnější metoda syntézy od původní použité pro přípravu Prontosilu ve 30. letech nezměněna. Klíčovou reakcí je sloučení aminu s odpovídajícím aktivovaným sulfonylovým derivátem, nejčastěji sulfonylchloridem. Ten se připravuje elektrofilní chlorsulfonylací mateřského arenu nebo oxidativní chlorací organosírových arylových sloučenin. Elektrofilní aromatické substituční procesy často vyžadují silně kyselé podmínky, omezující kompatibilitu funkčních skupin, a jsou účinné pouze pro specifické substituce, vycházející z charakteristik výchozího arenu. Podobně je tomu v případě oxidační chlorace, a navíc je často vyžadována přítomnost páchnoucích thiolových substrátů. Těmto problémům by se dalo vyhnout, pokud by existoval přímý způsob přípravy sulfonamidů ze snadno dostupných výchozích materiálů, které by nevyžadovaly předinstalovanou funkční skupinu síry [31].

Koncepčně atraktivní způsob syntézy sulfonamidů, který se vyhýbá použití výchozích materiálů obsahujících síru, zahrnuje implantaci molekuly oxidu siřičitého mezi vhodné fragmenty uhlíku a dusíku. Aby byly tyto dva fragmenty synteticky užitečné, mělo by se jednat o ideálně jednoduché organické suroviny se širokou komerční dostupností. V posledních dvanácti letech se stalo použití oxidu siřičitého při katalýze často užívanou technologií pro zavedení funkčních skupin odvozených od sulfonylu. Zpráva z roku 2010 poukázala na možný způsob přípravy pomocí Pd-katalyzované syntézy N-aminosulfonamidů kombinací z aryljodidů, oxidu síry a hydrazinu. Jednalo se o první ukázkou možnosti začlenění oxidu siřičitého pomocí křížové vazby. Taký bylo poukázáno na to, že použití náhražky oxidu siřičitého, v tomto případě aduktu oxidu siřičitého s aminem DABCO, nabídl významné výhody oproti použití plynného oxidu siřičitého [31].



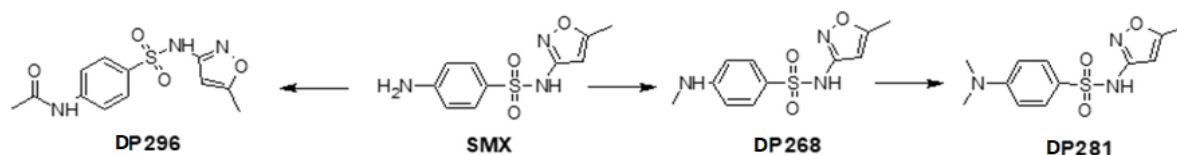
Obrázek 4: Katalytická syntéza sulfonamidů za použití SO₂ [31].

2.2.11 Degradční produkty sulfonamidů

Hlavním abiotickým faktorem ovlivňujícím rychlost degradace SA v prostředí je UV-A záření. Bylo prokázáno, že přítomnost mikrobů ve vodě jezera vedla k 94,5% degradaci SMX po 55 dnech ve srovnání se sterilními podmínkami, kde to bylo 51,6 %. Ozáření vzorku ve vodním prostředí pomocí slunečního záření, způsobuje degradaci 88 %–98 % SMX a SDA [32]. V prostředí se biotické a abiotické faktory vzájemně ovlivňují synergicky, takže rychlost degradace SA ve skutečných podmínkách životního prostředí bude vyšší než v modelových podmínkách. Degradční produkty (DP) antibiotik, jež zatím nejsou všechny známy, tvoří odlišnou, expanzivní skupinu sloučenin, které jsou potenciálně nebezpečné kvůli své neznámé struktuře a fyzikálně-chemickým vlastnostem. DP mohou vykazovat vyšší biologickou aktivitu než jejich příslušné mateřské sloučeniny, což se může promítnout do vyšší toxicity v exponovaných organismech [33].

Sledování procesu degradace SA v určitých podmínkách životního prostředí je obtížné, protože mateřské sloučeniny existují ve velmi nízkých koncentracích a působí na ně různé faktory prostředí. Většina dosavadních zpráv popisuje simulace degradace SA pouze za modelových podmínek [33].

Jedním z hlavních degradačních produktů SMX je 4-N-acetyl-sulfamethoxazole s poměrem m/z 296, proto ve zkratce DP296. Vzniká při druhé fázi metabolismu SMX a vyskytuje se především v exkrementech organismů podstupující antibiotickou léčbu, tím pádem je vylučován do životního prostředí. V závislosti na podmínkách, jako je množství kyslíku nebo přítomnost aerobních organismů, může z DP296 pomocí reverzní reakce zpátky vzniknout SMX, a poté podstoupit degradaci pomocí jiné degradační dráhy. Dalším z degradačních produktů SMX je 4-N-dimethyl-sulfamethoxazol, který vzniká dvojitou metylací amino skupiny v benzenovém jádře SMX. Jeho poměr m/z je 281, proto ve zkratce DP281. DP281 i jeho jednou metylovaný derivát s poměrem m/z 268 mají delší retenční časy než jejich mateřská sloučenina, protože hydrofobní metylová skupina snižuje polaritu molekuly, která zvyšuje lipofilicitu výsledných degradačních produktů [34].



Obrázek 5: Degradační cesta SMX v životním prostředí [33]

2.2.12 Rezistence na sulfonamidy

Účinnost antibiotik značně komplikuje rezistence (AMR) neboli odolnost bakterií, kterou po určité době od zavedení antibiotik do léčby infekčních nemocí získaly nebo je součástí jejich fyziologického aparátu. Kvůli odlišnému uspořádání buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií mají grampozitivní bakterie méně možností, jak antibiotikům čelit. Podle poslední studie z roku 2019 bylo zjištěno, že v souvislosti s antimikrobiální rezistencí došlo v téže roce přibližně k 4,95 milionů úmrtí, včetně 1,27 milionů, které byly AMR přímo způsobeny. Výsledky také ukazovaly, že nejvyšší úmrtnost napříč věkovými kategoriemi byla v subsaharské Africe, čítající 27,3 úmrtí na 100 000 obyvatel a nejnižší v Austrálii s 6,5 úmrtími na 100 000 obyvatel. Nejčastější příčinou smrti byla infekce horních dýchacích cest, která zabila více než 1,5 milionů lidí. Šest hlavních patogenů (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* a *Pseudomonas aeruginosa*) zapříčinilo 929 000 úmrtí na AMR a 3,57 milionů spojených s AMR [34, 35].

Mechanismů, které zajišťují získanou rezistenci, bylo popsáno sedm:

1. Enzymatická inaktivace antibiotik

Uskutečňuje se pomocí rozštěpení molekuly antibiotika nebo připojením postranních skupin. Tento typ rezistence se u bakterií vyskytuje velmi často, protože jde o účinný a ekonomický způsob, jak účinku léčiva odolat.

2. Zabránění ataku cílového místa

Uskutečňuje se to pomocí různých zátaras, které jsou si bakterie schopné vytvořit. Jednou z nich může být například pouzdro nebo vrstva hlenu, jehož náboj může odpuzovat molekuly aminoglykosidů. Velmi účinnou bariéru tvoří gramnegativní bakterie pomocí zevní membrány, která je schopná omezit počet příslušných pórů, přes které antibiotika prochází nebo póry přestanou úplně tvořit. Tím se účinek antibiotik omezí pouze na grampozitivní bakterie.

3. Aktivní transport antibiotika z bakteriální buňky

Tento typ rezistence neposkytuje kompletní ochranu před účinkem antibiotik, spíše snižuje jejich razanci. Využívá se totiž přečerpávání nežádoucích látek, které již stačily proniknout do buňky pomocí transmembránových pump. To znamená, že část proniknuté molekuly léčiva se ve většině případů stihne navázat na své cílové místo a buňku tím poškodit. Výhodou však je, že tyto efluxní systémy jsou základním fyziologickým vybavením bakterií a dokážou vyčerpat i několik druhů antibiotik zároveň.

4. Znemožnění aktivace

Bakterie jsou schopné omezit tvorbu enzymů, které antibiotikum aktivují, a tím zamezit jejich účinek. Lze to využít pouze proti antibiotikům, která se podávají v neaktivní (prodrug) formě. Příkladem můžou být nitroimidazoly.

5. Modifikace cílového místa

Pomocí mutace genu, který kóduje cílový enzym, napadnutím metabolické dráhy nebo dodatečnou úpravou molekuly, mohou bakterie změnit struktury, na které se antibiotika váží a tím negativně ovlivnit jejich afinitu k pozměněnému cíli.

6. Náhrada zablokované metabolické dráhy

Bakterie mohou v případě zablokování některých důležitých metabolických drah využít alternativní cestu, která sice není tak výhodná, ale postačuje k přežití.

7. Vytvoření nadbytku cílových míst

Další možností, jak se bakterie mohou ubránit proti účinkům antibiotik je zvýšení produkce cílového enzymu, který je napadán. Byl objeven rovněž způsob ochrany, kdy mykobakterie vytváří tzv. molekulární mimikry v podobě zvláštních peptidů, které napodobují strukturu DNA, na které se napadající flourochinolony naváží a nepoškodí tolik samotnou bakterii.

Rezistence je podmíněna geneticky a stejně jako každá jiná genetická informace se dědí z generace na generaci. Pokud je tato odolnost pro bakterii výhodná, začnou se rezistentní buňky oproti původním prosazovat čím dál více. Tento způsob se nazývá klonální šíření, jehož podstatou je přenos genetické informace vertikálním způsobem, tj. z mateřských do dceřiných buněk. Naopak horizontální přenos využívá šíření genetické informace mezi různými druhy či rody bakterií. Uplatňuje se mechanismus konjugace, transdukce a transformace. Za horizontální přenos jsou zodpovědné především plasmidy a transpozony [37].

Plasmidy jsou malé, kruhové úseky DNA ve tvaru dvoušroubovice. Vyskytují se volně v cytoplazmě bakteriálních buněk, které buď mohou jejich genetickou informaci využít nebo se jich mohou zbavit.

Transpozony jsou geny schopné přenášet genetickou informaci tím, že se vyštěpí z kompaktní DNA a přeskočí na jiné místo DNA. Nejčastěji dochází k přeskočení z plasmidu na chromozom ať už v rámci jedné nebo více bakteriálních buněk.

Snaha co nejvíce zamezit zneužívání antibiotik a zabránit tak prohlubující se bakteriální rezistenci, vedla k zavedení Usnesení Evropského Parlamentu o Evropském akčním plánu „Jedno zdraví“ proti antimikrobiální rezistenci (2017/2254(INI)) nabývající platnosti dne 13. 9. 2018, které mimo jiné vyzývá Komisi, aby v souvislosti s dohodami o volném obchodu zakázala dovoz potravinářských živočišných výrobků v případě, že jejich chov nebyl v souladu s normami EU a vyzývá Komisi, aby stejnou měrou investovala do vývoje neantibiotických alternativ v oblasti zdraví zvířat, včetně růstových stimulátorů [38].

2.2.13 Vedlejší účinky sulfonamidů

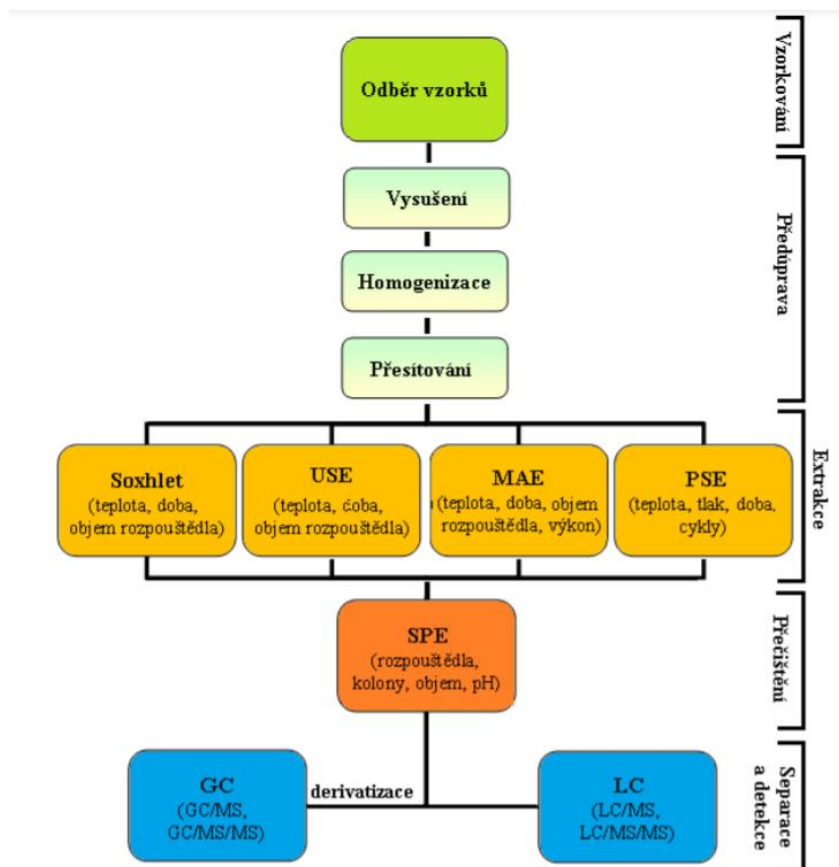
Nežádoucí účinky tohoto typu antibiotik nejsou většinou natolik závažné, aby vedly k přerušení léčby. Obecně mezi nejčastější projevy patří gastrointestinální potíže, poruchy krvetvorby, poškození ledvin a alergické reakce. Alergické reakce postihuje 1,5–3 % uživatelů a jsou desetkrát častější u lidí s onemocněním AIDS. Léčba závisí na typu a síle reakce. Střední nebo slabé reakce mohou být léčeny přerušením podávání antibiotik a nasazením antihistaminik. Při silných reakcích může dojít až k hospitalizaci v nemocnici a nasazení steroidní léčby v podobě kožních krémů či tablet. Alergická reakce se může projevovat například syndromem přecitlivělosti na sulfonamidy, jehož příznaky se projevují nejčastěji po sedmi až čtrnácti dnech horečkou, vyrážkou a mohou být postihnuty vnitřní orgány. V případě prudké reakce se projevuje mezi osmi až třiceti minutami od prvního podání léku červený kulatý otok na kůži často ohraničený puchýřem [26]. V tabulce 3 lze přehledně vidět mimo jiné vedlejší účinky a toxicitu jednotlivých sulfonamidů.

Tabulka 3: Využití a toxicita [26]

Název	Léčba	Mechanismus působení	Vedlejší účinky	Toxicita
Sulfamethoxazol	Infekce močového ústrojí, bronchitida	Inhibice syntézy kyseliny listové	Podrážděný žaludek, zvracení, průjem	LD ₅₀ u myši je 2300 mg/kg
Sulfapyridin	Duhringova dermatitida	Inhibice syntézy kyseliny listové	Horečka, bolest hlavy, svědění, kožní vyrážka	LD ₅₀ u myši je 15800 mg/kg
Sulfasalazin	Crohnova choroba, ulcerózní kolitida a revmatoidní artritida	Zatím neznámé	Horečka, nevolnost, nízký počet spermií u mužů	-
Sulfacetamid	Zánětlivé stavy oka, akné	Inhibice syntézy kyseliny listové	Zarudnutí a otok kůže, závratě, únava	LD ₅₀ u myši je 16500 mg/kg
Sulfadiazin	Toxoplazmóza, zánět středního ucha	Inhibice syntézy kyseliny listové	Zvonění v uších, deprese, insomnie, závrať	LD ₅₀ u myši je 1500 mg/kg
Sulfamerazin	Bronchitida, zánět prostaty a močových cest	Inhibice syntézy kyseliny listové	Anémie, agranulocytóza, žloutenka	-
Trimethoprim	Infekce močového ústrojí, bronchitida	Inhibice syntézy kyseliny listové	Podrážděný žaludek, zvracení, průjem	LD ₅₀ u myši je 2764 mg/kg

2.2.14 Analýza sulfonamidů

Ke stanovení sulfonamidů z enviromentální matrice, ať už se jedná o odpadních a čisté vody, půdu či hnůj, dosud nebyla vyvinuta univerzální metoda. Existuje ale mnoho studií, které se sice liší v jednotlivých krocích, principiálně jsou ale velmi podobné. Ze zkoumané lokality se odebere reprezentativní vzorek, který je následně převezen do laboratoře. Pokud se jedná o pevnou matrici, je třeba vzorek nejprve vysušit a homogenizovat. Co se týče detekce těchto analytů, vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií v tandemovém režimu (HPLC-MS/MS) je jednou z nejrozšířenějších technik, vyžaduje však použití drahého a složitého přístrojového vybavení, které není vždy dostupné pro rutinní sledování. Další přístupy používané také ke stanovení sulfonamidů jsou HPLC s UV detekcí, kapilární elektroforéza (CE) a kapilární elektrochromatografie (CEC) [39]. K předúpravě vzorků se nejčastěji využívá extrakce kapalina-kapalina, extrakce pevnou fází (SPE), QuEChERS a materiálů s molekulárním potiskem [39, 36].



Obrázek 6: Postup analýzy sulfonamidů

Pro úspěšné stanovení je nutno převést vzorek do formy vhodné pro analýzu. Voda, potraviny, biologické tekutiny a farmaceutika obsahují různé sloučeniny, které mohou interferovat se samotnou analýzou. Vzhledem k nízké koncentraci sulfonamidů je nezbytné vyizolování a v závislosti na metodě stanovení (limity detekce) zakoncentrování vzorku. V ideálním případě by měl být maximálně eliminován vliv matričního efektu. V případě vzorků vody je třeba dbát na to, aby byly co nejméně zakalené. Je třeba je přefiltrovat nebo zcentrifugovat a uschovat v neprůhledných skleněných lahvičkách za snížené teploty. Lahvičky se předem vymývají acetonem nebo methanolem a bývají zahřáty na 280 °C z důvodu odstranění nežádoucích nečistot. Jestliže se předpokládá zvýšená koncentrace rušivých kationtů, přidává se ke vzorku vody sodná sůl EDTA (chelaton 3) k vytvoření komplexu vápenatých a hořečnatých iontů (100 mg na 100 ml vzorku), a tím ke snížení tendence antibiotik vázat se na matici [40].

Pevné vzorky se obvykle odebírají z vrchní vrstvy půdy (0–20 cm). Buď se stírají přímo z povrchu nebo se provedou menší vrty. Dále se půda vysuší na přibližně 5% vlhkost a velikost částic vzorku se upraví roztíráním, mletím nebo prosíváním sítím s velikostí pórů 2 mm. Při mletí vzorku je nutné se vyhnout přehřátí. Někdy je vhodné provést také lyofilizaci. Po prekoncentraci cílových analytů následuje jejich separace. Většina odborných článků uvádí jako použitou techniku pro separaci sulfonamidů metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), nejčastěji v kombinaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS) nebo s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) [40].

2.3 Půda

Při stanovování vzorků z půd je zapotřebí složitější příprava a úprava před samotným vyhodnocováním, protože se jedná o velmi komplexní matici. I přes všechna snažení je však většinou dosahováno nižších výtěžností, neboť s extrahovanými analyty získáváme i velké množství koextrahovaných látek. Ovlivňující faktory, které se podílí na výtěžnosti měření, jsou i samotné vlastnosti půdy, jako je obsah organické hmoty, její pH, iontově výměnná kapacita a další. Půda obsahuje i velké množství rizikových látek, mezi které se řadí například ropa a její deriváty, polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenylly, aromatické uhlovodíky, chlorované uhlovodíky a heterocyklické uhlovodíky [41]. Dále se v půdě nachází také huminové látky, což jsou přírodní organické látky, které vznikají převážně rozkladem rostlinných zbytků a jen obtížně podléhají další degradaci.

Úspěch postupů je závislý i na vlastnostech analyzovaných sloučenin v ekosystému (pK_a , Kow, Koc). Problém může být ať už samotná extrakce analytů z půdy nebo vliv matrice a extrakčních činidel při LC/MS/MS analýze, kdy může dojít k zvýšení nebo potlačení signálu analytu (matriční efekty). Matriční efekty jsou problém hlavně při využití elektrospreje (ESI) v hmotnostně spektrometrické detekci, protože ESI je vysoce citlivý na jakékoliv další látky přítomné v eluátu z kolony. Při stopové analýze může být potlačení ionizace natolik silné, že ve výsledku způsobí falešně negativní výsledky. Za zdroje způsobující potlačení iontů mohou být považovány jak endogenní sloučeniny, jako jsou organické nebo anorganické molekuly přítomné ve vzorku, tak exogenní sloučeniny, které nejsou přítomny v původním vzorku. Exogenní sloučeniny mohou být do vzorku zavedeny v průběhu jeho přípravy [41, 42] .

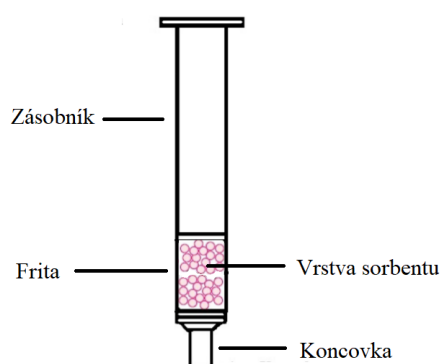
Pro zlepšení přesnosti kvantifikace analytů z environmentální matrice je proto vhodné použít interní standardy (IS). IS jsou většinou látky, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako ty stanovované, akorát jsou upravené tak, aby byly rozlišitelné ve spektru při vyhodnocování. To se nejčastěji provádí izotopickým značením (2D , ^{13}C , ^{15}N), protože přítomnost těžších izotopů způsobí posun m/z , čímž dochází k odlišení signálu IS od neznačené látky. V případě sulfonamidů bylo v literatuře nejčastěji zmiňováno použití $^{13}C_6$ -sulfamethazinu jako IS. Dále se používají deuterované standardy jako například D_4 -sulfadiazin, D_4 -sulfathiazol, D_4 -sulfametoxazol a D_4 -sulfadimethoxin, jejichž použití způsobí posun m/z ve spektru o +4 m/z od příslušné neznačené látky. Je zde důležitá podmínka 1 Deuteria na 100 g/mol nativního standardu, aby byl IS mimo jeho izotopický klastr, protože jinak čím by byla vyšší koncentrace nativního standardu, zvyšovala by se i koncentrace IS. Tím, že kalibrace je jejich poměr, docházelo by ke špatným výsledkům [44].

2.4 Extrakce tuhou fází (SPE)

Je jednou z mnoha dostupných technik, díky které jsme schopni upravit a následně analyzovat složité matrice vzorků. Narozdíl od více krokové extrakce kapalina-kapalina (LLE), které se velmi podobá, nabízí SPE mnoho výhod. Hlavní benefity jsou, že není zapotřebí takového množství organických rozpouštědel, získá vyšší výtěžnosti analytu, protože nedochází k separaci mezi dvě fázemi, které by navzájem mohli ovlivňovat svůj objem, a také jsme schopni zachytávat více rušivých elementů, díky větším částicím, které obsahuje tuhá fáze [45].

V závislosti na předúpravě vzorku pro následnou analýzu na LC skýtá tato metoda ještě výhody v zesílení stopy analytu, odstranění solí, oddělení látek biologické matrice a eliminaci látek nebezpečných pro kolonu. Při pokračování pomocí LC je vhodné jako rozpouštědlo využít takovou látku nebo směs látek, které jsou mobilní fází při chromatografii. V tomto případě mohou být přímo nastříknuty větší objemy frakce analytu, čímž se dosáhne větší detekční citlivosti [45].

Pro úspěšné provedení této extrakce je zapotřebí kolonka, jejíž stěna je vyrobena z velmi čistého polypropylenu, aby se předešlo kontaminace vzorku. Skládá se ze zásobníku ve formě válečku, do kterého je umístěna fritta, vyrobená z polytetrafluorethylenu, polypropylenu nebo nerezové oceli a slouží k udržování ložiska se sorbentem v kolonce. Sorbenty jsou nejčastěji na základě oxidu křemičitého, uhlíku nebo polymeru [45].



Obrázek 7: SPE kolonka [46].

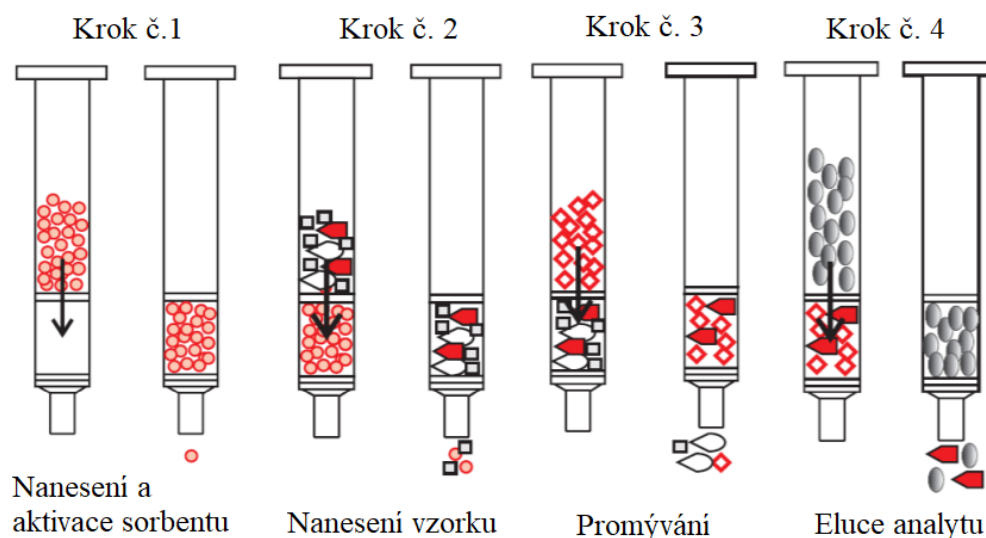
V publikovaných člancích, které se zabývaly stanovením sulfonamidových antibiotik jako jedinou skupinou cílových analytů v akvatických matricích, jsou při SPE extrakci používány především kolonky Oasis HLB. Základem jejich sorbentů je univerzální, vodou smáčitelný kopolymer pro reverzní fáze s vyváženými hydrofilními a lipofilními vlastnostmi, který nabízí vysokou kapacitu pro polární látky. SPE kolonky Oasis HLB byly často využívány také při izolaci sulfonamidů v rámci multireziduálních analýz farmakologických polutantů v akvatických matricích [47].

2.4.1 Postup

Před nanesením vzorku je nejprve zapotřebí aktivovat sorbent, což se u polárně vázaných fází nejčastěji provádí methanolem nebo acetonitrilem. U silikátových gelů ovšem způsobuje jejich deaktivaci, tudíž se zde užívá středně polárních rozpouštědel jako např. metylén-chloridu. Tento krok je důležitý zejména kvůli solvataci a vyčištění kolony od vzdušných nečistot. Pokud jsou následně aplikovány vodné vzorky, promývá se kolona taky vodou. Ve druhém kroku jsou nanášeny samotné analyty, které musejí být rozpuštěny ve slabém rozpouštědle, aby bylo zajištěno silné zadržení tuhou fází. V závislosti na vlastnostech analytu volíme příslušnou fázi na SPE. Pokud provádíme SPE s tzv. normální fází, rozpouštíme vzorky v uhlovodíkových nebo jiných nepolárních rozpouštědlech. Naopak pokud je analyt rozpuštěn ve vodě nebo pufru s obsahem organické složky (methanol nebo acetonitril) naředěné na 2,5–5 %, pak se provádí SPE s reverzní fází (RP-SPE) [46].

Aby se při eluci neuvolňovaly ze sorbentu do rozpouštědla společně s analytem také rušivé látky, je cílem třetího kroku jejich odstranění. Zároveň je ale však třeba zajistit, aby nedocházelo k uvolňování analytu. To zajistíme správným výběrem typu a objemu rozpouštědla a doby promývání [46].

Cílem závěrečného kroku je eluce sledovaných analytů vhodným rozpouštědlem. Většinou se používá methanol nebo okyselený methanol. Nejdříve je však zapotřebí vysušit SPE kolonku od zbytkové vody, což se provádí proudem vzduchu cca 1 minutu. Tato metoda se často spojuje s dalšími metodami jako je homogenizace vzorků, ředění, filtrace, úprava pH a další [46].



Obrázek 8: Schématicky znázorněný postup SPE (upraveno z [48])

2.5 Quechers

Metoda QuEChERS překonává problémy spojené s časově náročnými, nákladnými a pracnými multireziduálními metodami. Název vychází z anglických slov Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, které v překladu znamenají, že se jedná o rychlou, snadnou, levnou, efektivní, robustní a bezpečnou metodu disperzní extrakce tuhou fází. Původně byla vytvořena pro stanovování pesticidů v ovoci a zelenině, ale díky svým skvělým vlastnostem a velké všestrannosti si metoda QuEChERS získala oblibu a rozšířila svůj rozsah použití na extrakci různých analytů jako jsou polyfenoly, aminy, antidepresiva a látky znečišťující životní prostředí z několika matric včetně potravin, biologických tekutin, půd, vod a dalších [49].

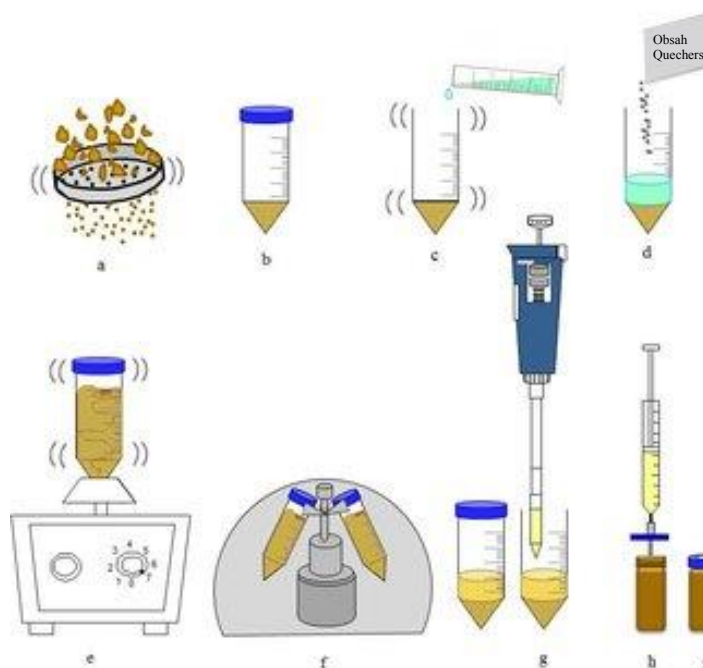
Tento účinný a snadný postup přípravy vzorků se skládá nejprve z extrakčního kroku, založeného na vysolovacím efektu, kde je podporována rovnováha mezi vodnou a organickou vrstvou. Následuje disperzní extrakce tuhou fází (d-SPE), která zahrnuje další čistící kroky, pomocí kombinace několika porézních sorbentů a solí k odstranění látek interferujících s matricí [49].

Mezi hlavní výhody patří možnost zanalyzovat i 8 vzorků najednou během méně než 30 minut, menší nároky na manipulaci, méně kroků v postupu a potřeba pouze malého množství sorbentu, což přináší finanční úspory. Tato metoda je vhodná použít před analýzou širokého spektra látek včetně nepolárních a polárních sloučenin. Dochází k minimálním ztrátám analytu, a na rozdíl od ostatních technik zde není nutnost přidavku chlorovaných rozpouštědel [50]. Pro výběr sorbentu je důležitý typ matrice vzorku [49].

Tabulka 4: Příklady matrice a sorbentů [49]

Typ matrice	Příklad matrice	Sorbent
Běžná matrice	Jablka, okurky, melouny	síran hořečnatý, PSA
Tukové matrice	Mléko, cereálie, ryby	síran hořečnatý, PSA, C18
Pigmentové matrice	Salát, mrkev, víno	síran hořečnatý, PSA, C18, GCB
Vysoce pigmentované matrice	Špenát, červená paprika	síran hořečnatý, PSA, C18, GCB

Postup je velmi jednoduchý. V prvním kroku procedury je zapotřebí extrahovat zhomogenizovaný vzorek a následně frakcionovat pomocí organického rozpouštědla a roztoků solí. Druhým krokem je extrakce a přečištění organické vrstvy pomocí disperzivní SPE techniky. Ke směsi adsorbentů je poté přidán 1 ml organického rozpouštědla z kroku 1, obsah je důkladně promíchán a zcentrifugován. Tím je připraven čistý extrakt pro analýzu různými GC a HPLC technikami [47, 48].



Obrázek 9: Schematicky znázorněný postup metody [49]

2.6 Sorpční extrakce na magnetické míchadlo

Kvůli značně nízké koncentraci SA v půdě se začíná využívat nové mikroextrakční techniky zvané sorpční extrakce na magnetické míchadlo (SBSE). Její výhodou je, že přečišťování, obohacování i extrakce může být prováděn v jednom kroku. Taky se předpokládá, že za použití menšího množství organických rozpouštědel a adsorbentů může dosáhnout vyšších adsorpčních kapacit, což ukazuje na šetrnost k životnímu prostředí. Tradiční adsorbenty jako je aktivní uhlí, polydimethylsiloxan, styren-divinylbenzen a další použité při této metodě, sice vylepšují nedostatky klasické SPE, ale nejsou dostačující při detekci SA v komplexní matici. Proto se v poslední době začínají využívat molekulárně potištěné polymery (MIP), což jsou polymery, které jsou zpracovány pomocí techniky molekulárního imprintingu, která zanechává dutiny v polymerní matici s afinitou pro vybranou molekulu. Z tohoto materiálu se poté vyrábí membrány nejčastěji za pomoci elektrospinningu [51].

2.7 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je jedna z nejpoužívanějších analytických separačních metod, protože je schopná separovat i velmi malé částice jako jsou rozpuštěné ionty, organické látky ale i makromolekuly. Tato separační metoda je založena na rovnovážné distribuci analytů mezi vzájemně nemísitelnými fázemi. Stacionární fáze (SF) je nepohyblivá, nejčastěji je zakotvená na pevném nosiči uvnitř chromatografické kolony, mobilní fáze (MF) je pohyblivá a je pod vysokým tlakem protlačována okolo stacionární fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní (kapalnou) a stacionární (pevnou) fázi podle své afinity ke každé z nich. Složky, které se stacionární fází interagují silněji, se kolonou pohybují nižší rychlostí (mají vyšší retenci) než složky, které vykazují slabší interakci. Látka, která má delší retenční čas a dosahuje tak větší retence, je eluována z kolony později. V případě, že jednotlivé složky nemají dostatečně rozdílné afinity, tak nedojde k jejich separaci. Výstupem této metody je chromatogram – grafické znázornění závislosti intenzity signálu na čase, v němž se hodnotí retenční čas, který v daném systému při definovaných podmínkách slouží k identifikaci analytu, a plocha/výška píku (eluční křivka), která je funkcí koncentrace stanovované látky [52].

2.7.1 UPLC (Ultraúčinná kapalinová chromatografie)

Jedná se o novou, mimořádně účinnou separační techniku v oblasti kapalinové chromatografie, která nabízí práci s širokým rozsahem průtoků a významně zkracuje dobu analýzy. Celý separační proces probíhá za velmi vysokých tlaků (15000 psi, 1000 bar, 100 MPa). Oproti klasické HPLC nabízí navíc snížení nákladů, zvýšení citlivosti, snížení meze detekce a více kvalitativních informací. Děje se tomu díky využití kratších kolon (cca 10 cm) s vnitřním průměrem 1–2,1 mm a menších částic, které kolonu vyplňují (<2 μm). V současné literatuře se k analýze sulfonamidů nejčastěji využívá kolona C18, ojediněle také C12 nebo C8 [42, 53, 54]. Jako mobilní fáze je nejčastěji využívána směs methanolu nebo acetonitrilu s vodou. Ve většině případu je eluce analytu prováděna gradientem mobilní fáze, což je typické pro separaci látek izolovaných z environmentálních matic [44]. Ke stanovení sulfonamidů se UPLC nejčastěji spojuje s hmotnostně spektrometrickou detekcí (MS), případně tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) [42].

2.7.2 Spojení LC-MS a LC-MS/MS

Pro LC-MS a LC-MS/MS analýzu sulfonamidů je nejčastěji využívanou ionizační technikou elektrosprej (ESI). Jedná se o měkkou ionizační techniku využívající atmosférického tlaku, která produkuje protonované $[M+H]^+$, popřípadě deprotonované $[M-H]^-$ ionty. Oba tyto ionty mohou tvořit i sulfonamidy. Při jejich detekci pomocí MS i MS/MS je však výhradně upřednostňováno využití pozitivního módu (ESI+), protože protonované molekulové ionty sulfonamidových antibiotik $[M+H]^+$ se obecně považují za nejlepší prekurzorové ionty pro MS/MS detekci. Sulfonamidy poskytují při MS/MS specifické fragmentové ionty 92 m/z $[M-RNH_2-SO_2]^+$, 108 m/z $[M-RNH_2-SO]^+$ a 156 m/z $[M-RNH_2]^+$ [44].

Nejpoužívanějším analyzátozem při LC-MS/MS analýze sulfonamidů, byl podle literatury [55–57] trojitý kvadrupól, nastavený v režimu monitoringu vybraných reakcí SRM (Selected Reaction Monitoring). Principem SRM módu je nejprve selekce vybraného prekurzorového iontu v prvním kvadrupólu (Q1), který je následně fragmentován v druhém kvadrupólu (q2) sloužícím jako kolizní cela. Poté se vybere jeden fragment (produktový iont), který je dále analyzován ve třetím kvadrupólu (Q3). Sledovaná antibiotika jsou kvantifikována právě na základě nejintenzivnějšího produktového iontu. Pro potvrzení předpokladu strukturní identifikace původní molekuly lze použít i druhý nejintenzivnější fragmentový iont, což je kvalitativní SRM přechod. Tento režim nám nabízí vysokou přesnost a citlivost analýzy, ale nevýhodou je, že nemůžeme detekovat další neznámé látky [44].

V environmentální analýze léčiv je nutné znát fyzikálně-chemické vlastnosti daného analytu. Například čím vyšší je rozdělovací koeficient oktanol/voda ($\log P$), a nižší rozpustnost látky ve vodě, tím lipofilněji se látka v organismu chová. Díky tomu snadno prostupuje lipidovými membránami a dochází k bioakumulaci. Hodnota $\log P$ v rozmezí 1–3 značí průměrnou lipofilitu, zatímco $\log P < 1$ znamená hydrofilní vlastnosti léčiva a vyšší polaritu. Pro $\log P > 0$ je doporučováno systém reverzních fází (RP). V prostředí půd budou vykazovat antibiotika s průměrnou lipofilitou vyšší afinitu k adsorpci na organické pevné částice než antibiotika hydrofilní.

Na extrakci sulfonamidů má vliv také pH eluentu, což se dá vysvětlit pomocí jejich disociačních konstant (pK_a). Sulfonamidy obsahují dvě funkční skupiny, které mohou být protonovány. Jedna má kyselé vlastnosti ($-NH-$) a druhá se chová jako zásada ($-NH_2$). Každá z těchto skupin má jinou hodnotu pK_a . Sulfonamidy v kyselém prostředí ($pH < 2$) existují pouze ve formě svých kationtů. Zvýšení hodnoty pK_a na rozmezí 2–5 má za následek, že se sulfonamidy začínají vyskytovat i jako neutrální sloučeniny. Tím pádem můžeme upravit pH vzorků na rozmezí 3–4, čímž dostaneme podobný výsledek a neutrální sloučeniny jsou dobře zadržovány na sorbentu SPE. Úprava vzorku na hodnotu pH vyšší než 6 způsobí, že sloučeniny přechází do aniontového stavu, takže extrakce pevnou fází při pH 7 vykazuje nízkou účinnost [33]. Přehled fyzikálně-chemických vlastností zkoumaných antibiotik popisuje tabulka 5.

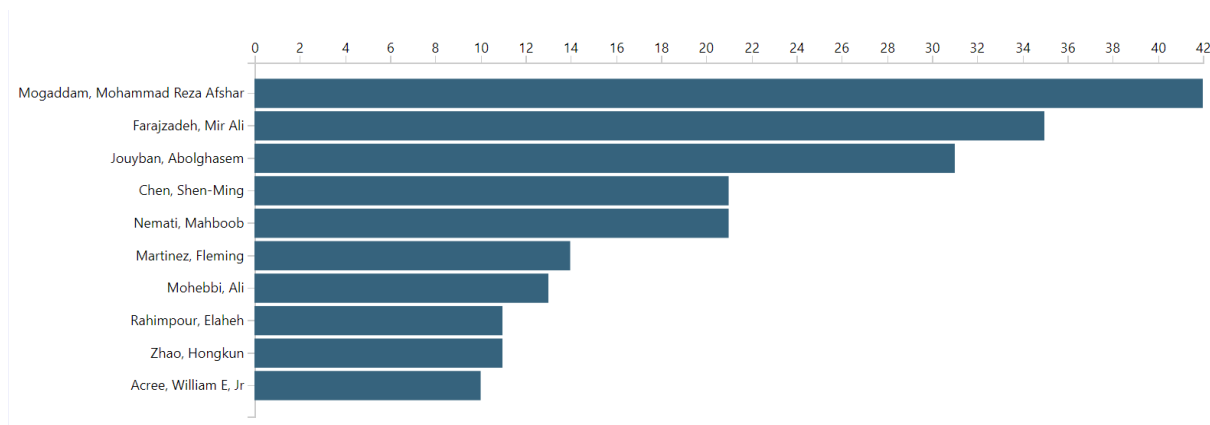
Tabulka 5: Parametry sulfonamidů důležité pro LC/MS [27]

Sulfonamid	pK_a (-) kyselý	pK_a (-) zásaditý	log P (-)	Mw (-)
Sulfacetamid	2,14	4,30	-0,96	214,243
Sulfadiazin	2,01	6,99	-0,1	250,278
Sulfamerazin	2,01	6,99	0,1	264,205
Sulfamethazin	2,07	6,99	0,9	273,33
Sulfamethoxazol	1,97	6,16	0,9	253,279
Sulfapyridin	2,14	6,24	0,4	249,29
Sulfasalazin	0,55	3,23	2,5	398,394
Sulfathiazol	2,04	6,93	0,1	255,32
Trimethoprim	7,16	17,33	0,9	290,32

3 ANALYTICKÁ ČÁST

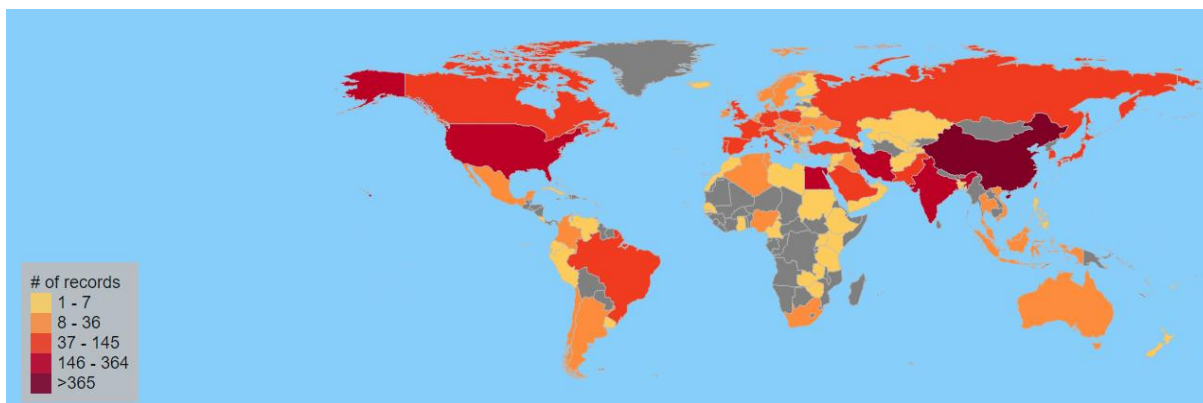
Tato část se zaměřuje na průzkum současné literatury se stejným nebo velmi blízkým tématem. Cílem bylo zjistit, jaké jsou v současné době nejčastěji využívány metody ke stanovení sulfonamidů v půdě a jakých bylo dosahováno výsledků. Dalším záměrem téhle části bylo prozkoumat, kdo je nejvíce přínosným autorem pro danou problematiku, které klíčová slova se nejčastěji vyskytovala, a které země světa vydaly největší počet článků řešících daný problém. K tomu byla využita desktopová aplikace VantagePoint, která nabízí analytikům širokou sadu výkonných nástrojů k analýze, zpřesňování a podávání zpráv o vědeckých, technických, tržních a patentových informacích.

Nejprve bylo zapotřebí zadat do vyhledávače na internetové stránce webofscience.com algoritmus ((drug* OR antibiotic* OR sulfonamide*) AND determination AND (soil* OR ecosystem* OR manure*)) a vybrat rozmezí let od 2019 do 2021. Celkově bylo nalezeno 2 669 článků, které byly staženy a exportovány do aplikace VantagePoint. Získané výsledky po patřičných analýzách lze vidět na obrázku 10. Všechny analýzy byly provedeny k datu 5. 1. 2022.



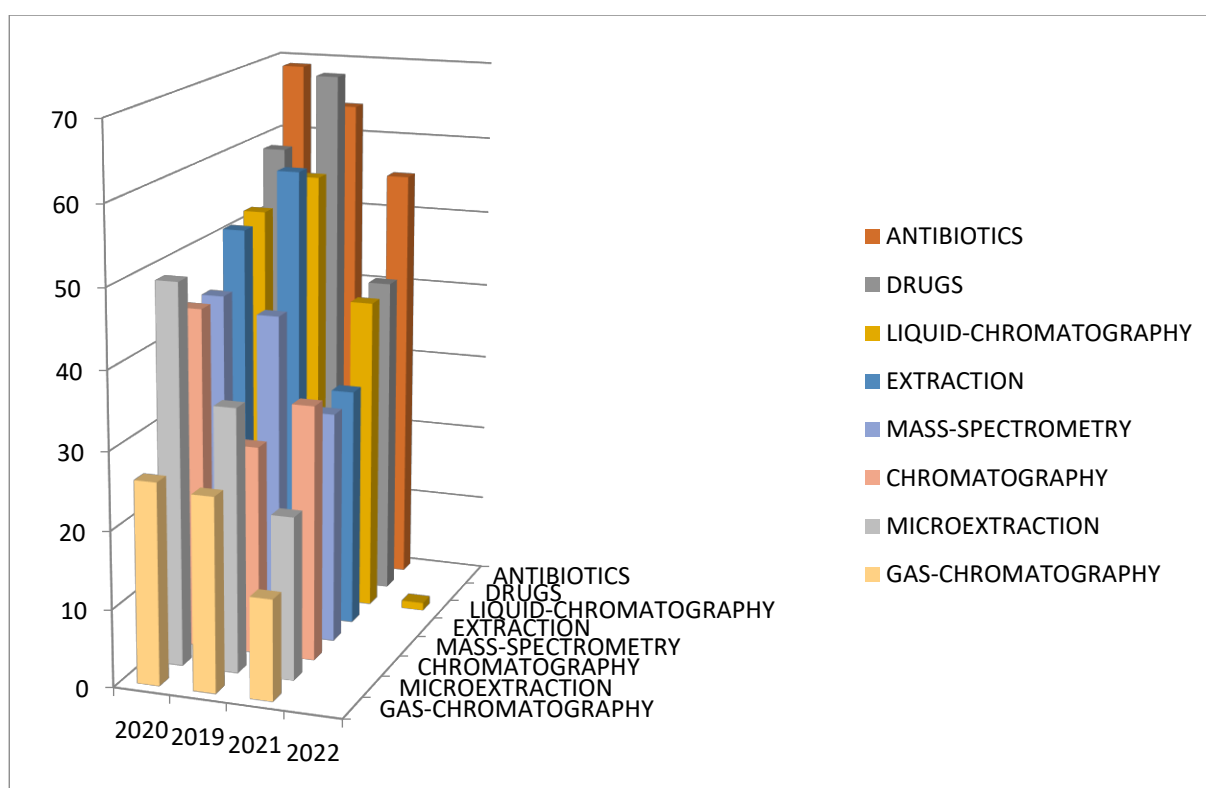
Obrázek 10: 10 nejvýznamnějších autorů

Z tohoto obrázku lze zjistit, že nejvíce aktivním autorem odpovídajícím zadanému algoritmu byl iránský vědec Mohammad Reta Afshar Mogaddam, který si prvenství zasloužil díky 42 vydaných publikací od roku 2019 do roku 2021. Na druhém a třetím místě skončili rovněž vědci z Íránu Mir Ali Farajzadeh a Abolghasem Jouyban, kteří vydali 35 a 31 článků. I když by se proto mohlo zdát, že Írán bude zemí s největším vlivem pro naše téma, není tomu tak. Jak lze vidět na obrázku 11, nejtmavší barvu, a tím i nejvíce publikací, měla jednoznačně Čína, s konkrétním počtem 729. Írán však skončil na druhém místě, ovšem s poměrně velkým odstupem, konkrétně s 271 publikacemi a na třetím místě s 207 články skončila Indie. Pro zajímavost v České republice se vydalo 36 vědeckých článků na dané téma.



Obrázek 11: Přehled zemí s největším počtem vydaných článků na dané téma

Nejčastěji používanými klíčovými slovy byly podle obrázku 12 antibiotika, léky, kapalná chromatografie a extrakce.



Obrázek 12: Nejčastější klíčová slova

V tabulce 6 lze vidět souhrnný přehled metod nejčastěji se využívajících ke stanovení sulfonamidů v půdě podle dostupné literatury, včetně mezí detekcí, stanovitelnosti a výtěžnosti.

Tabulka 6: Souhrnný přehled metod využívající se ke stanovení sulfonamidů z půdy

Sulfonamidy	Vzorek	Metoda	Předúprava vzorků	LOD	LOQ	Výtěžnost	Zdroj
SMZ, SMR, SAA, SDX, SB, STZ, SQX, SDZ, SMDX, SMZ SMT, SMA, SMTP, SPY, SSA, SNT, AcSMZ, AcSMA, AcSPY, AcSDZ, AcSMR	Půda	LCI-QqLIT-MS/MS v MRM módu, Atlantis C18 LC-kolona (2.1 mm x 150 mm, 3 µm)	PLE následující SPE (Oasis HLB)	0.01–4.19 ng/g	0,05–13,98 ng/g	-	[58]
SDZ, SMZ, SM, SME, SDMX, SMA	Skleníková půda	UPLC-MS/MS v MRM módu, Acquity UPLC BEH C18 kolona (2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm)	Freeze-dried vzorky extrahované ACN a kyselým pufrům, následně SPE (SAX a HLB)	0.23–5 ng/g	-	-	[59]
SDZ, SMA, SMZ, SMM, SCP	Hnůj a půda	UPLC-MS/MS v MRM módu, Acquity UPLC BEH C18 kolona (2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm)	Freeze-dried vzorky extrahované McIlvainovým pufrům a MeOH-ACN-acetonem, následně SPE (SAX a HLB)	0.1–0.8 ng/g	-	65.6–90.0 %	[60]
SMZ, SMA	Prasečí kejda a čistírenský kal	UPLC-MS/MS v MRM módu, Waters UPLC BEH C18 kolona (2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm)	QuEChERS extrakce následující online SPE (Oasis HLB)	31–150 ng/L	9–11 ng/L	78–111 %	[61]
STZ, SMA, SMZ	Půda	LC-MS/MS v MRM módu, XTerra MS C18 kolona (2.1 mm x 50 mm, 2.5 µm)	Extrakce McIlvainovým pufrům + hydroxid amonný, následně SPE (Oasis HLB)	0.6–2.3 ng/g	-	-	[62]
SDX	Půda	LC-MS/QExactive, Hypersil GOLD C18 kolona (2.1 x 100 mm, 3 µm)	Extrakce McIlvainovým pufrům, následně SPE (Strata-X)	1.8 ng/g	6.1 ng/g	-	[63]
STZ, SMA, SME, SDMX, SMZ	Prasečí hnůj	LC-MS/MS v MRM módu, Symmetry C18 kolona (2.1 mm x 150 mm, 5 µm)	Freeze-dried vzorky extrahované v McIlvaine-EDTA pufru, následně SPE (HLB)	3–6 ng/g	10–20 ng/g	84–110 % při spíku 0,05 mg/kg	[64]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Předmětem experimentální části práce byl vývoj a optimalizace metody pro stanovení sulfonamidů v půdě. Nejdříve byla optimalizována metoda LC-MS pro kvalitativní a kvantitativní analýzu. Následně byly provedeny samotné extrakční experimenty, kdy bylo prozkoumáno několik parametrů, které byly vhodně vyhodnoceny. K posouzení účinnosti stanovení množství antibiotik v modelových vzorcích půd byla zvolena analytická metoda LC-ESI-MS.

4.1 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy HR-120-EC, a & D Instruments Ltd.

Přístroj pro přípravu Milli-Q vody Millipore QGARD, Academic

Ultrazvuková vodní lázeň Kraintek 5

Běžné laboratorní sklo a další vybavení

pH metr InoLab WTW series, Nameko, ČR

SPE kolonky Oasis HLB 200 mg, Waters, USA

Koncentrátor Evatorm, Labicom s.r.o, ČR

Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity

- Kolona: Luna® Omega Polar C18 Phenomenex, (100 x 2.1 mm; 1.6 µm)

Hmotnostní spektrometr BRUKER EVOQ LC-TQ

Generátor dusíku a vzduchu, Peak Scientific – Genius 3045

4.2 Použitý software pro zpracování a interpretaci dat

6300 Series TrapControl Version 6.2

6300 Series DataAnalysis Version 6.2

6300 Series QuantAnalysis Version 6.2

Bruker Compass HyStar version 5.1.8.1, Bruker Daltonik GmbH 2019

Bruker Daltonics MS Workstation version 8.2.1, Bruker Daltonik GmbH 2017

TASQ version 2.2.14 1533, Bruker Daltonik GmbH 2018

Microsoft Office Excel 365 ProPlus

Microsoft Office Word 365 ProPlus6300

4.3 Použité chemikálie a standard

4.3.1 Chemikálie

Milli-Q voda

Methanol – Chromasolv®, for HPLC o čistotě $\geq 99,9$ %, Sigma Aldrich

Kyselina mravenčí o čistotě ≥ 98 %, Sigma Aldrich

Acetonitril – LC-MS Chromasolv® o čistotě $\geq 99,9$ %, Sigma Aldrich

Dihydrogenfosforečnan draselný o čistotě 99,0 %, Aldrich Chemical Co. Ltd

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát o čistotě ≥ 98 %, Lach-ner s.r.o, ČR

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Lach-ner s.r.o, ČR

Kyselina citrónová monohydrát o čistotě $\geq 99,0$ %, Lach:ner

4.3.2 Plyny

Dusík – 4.7 Siad Czech spol. s. r. o.

Argon – 5.0 SIAD Czech spol. s.r.o.

4.4 Vzorky půd

Pro nalezení nejlepších extrakčních podmínek byly využity vzorky půd typu Fluvisol (dříve nivní půda), vytvářející se na recentních fluviálních sedimentech a vyskytující se v říčních nivách, které jsou nebo byly (před úpravou vodního toku) pravidelně zaplavovány povodňovou vodou. Její agrochemické vlastnosti lze vidět v tabulce 7 a obsah rizikových prvků je dostupný v tabulce 8.

Tabulka 7: Agrochemické vlastnosti

pH	P	K	Mg	Ca	N _{tot}	C _{tot}
(-)	(mg/kg)				(%)	
7,1	161	315	336	6106	0,19	1,83

Tabulka 8: Obsah rizikových prvků

As	Be	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	V	Zn	Hg
(mg/kg)										
13,6	1,25	0,43	16,1	67,4	30,2	45,5	31	52,7	113	0,14

Vzorky půdy byly poskytnuty Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským.

4.5 Příprava roztoků

4.5.1 Příprava zásobních roztoků standardu

Na analytických vahách bylo naváženo s přesností na 4 desetinná místa 10 mg jednotlivých standardů. Následně bylo navážené množství analytu vždy kvantitativně převedeno do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněno směsí methanolu a milli-Q vody (50:50) po rysku. Obsah odměrné baňky byl vždy důkladně promíchán a byly získány roztoky o koncentraci 1 mg/ml (celkově 9 zásobních roztoků).

Z každého připraveného roztoku standardu o koncentraci 1 mg/ml bylo odpipetováno Hamiltonovou stříkačkou 100 μ l do odměrné baňky o objemu 10 ml. Obsah byl doplněn po rysku 50 % methanolem, aby výsledný objem byl 10 ml a výsledná koncentrace každého standardu 10 μ g/ml (směsný standard). Tento roztok zároveň dále sloužil i pro přípravu kalibrační závislosti.

Následně z připraveného roztoku o koncentraci 10 μ g/ml bylo odpipetováno 1 ml do 10ml odměrné baňky, které bylo rovněž doplněno po rysku 100% methanolem. Výsledná koncentrace každého standardu byla 1 μ g/ml. Tento roztok se poté využíval na aplikaci léčiv do půdy.

4.5.2 Příprava kalibračních roztoků

Z připraveného zásobního roztoku standardů o koncentraci 10 μ g/ml byly následným ředěním připraveny směsné kalibrační roztoky o koncentracích 500; 400; 300; 200; 100; 50; 40; 30; 20; 10; 5; 1; 0,5 a 0,1 ng/ml.

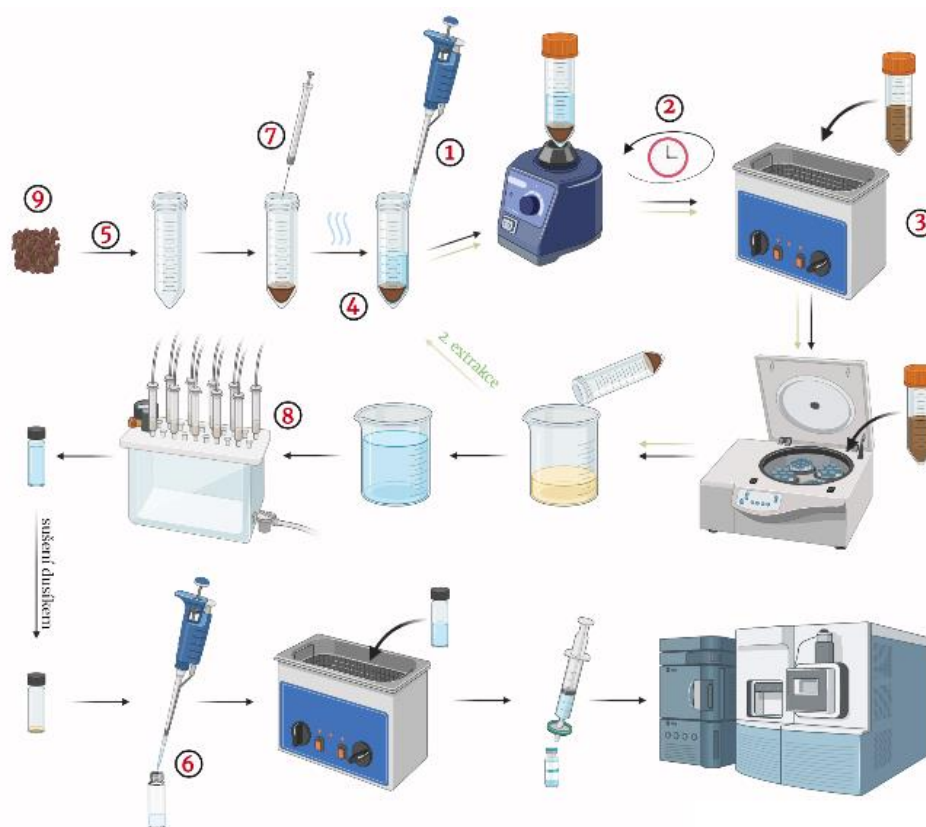
4.6 Příprava extrakčních medií

Antibiotika z půd byla uvolňována do několika extrakčních medií (o různé extrakční síle a vlastnostech). V rámci extrakčních pokusů byly použity následující extrakční média: H₂O, 100% MeOH, 100% acetonitril, vodný roztok dihydrogenfosforečnanu draselného a citráto-fosfátový (Mellavaine) pufr o různém pH.

4.6.1 Citráto-fosfátový (Mellavaine) pufr o různém pH

Pro přípravu citráto-fosfátového pufru o pH 2,5 bylo na analytických vahách naváženo s přesností na 4 desetinná místa 1,564 0 g Na₂HPO₄·12H₂O a 3,744 0 g C₆H₈O₇·H₂O (kyseliny citrónové). V případě pH 4,0 se jednalo o 5,525 0 g Na₂HPO₄·12H₂O a 2,582 9 g C₆H₈O₇·H₂O, a pro pH 7,5 bylo naváženo s přesností na 4 desetinná místa 13,925 9 g Na₂HPO₄·12H₂O a 0,120 0 g C₆H₈O₇·H₂O. Navážené látky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 200 ml a ta byla následně doplněna Milli-Q vodou až po rysku. Nakonec byla ověřena hodnota pH a případně upravena přidáním Na₂HPO₄·12H₂O nebo kyseliny citrónové na hodnotu pH = 2,5±0,1, 4,0±0,1 a 7,5±0,1.

4.7 Extrakce a analýza



Obrázek 13: Schématické znázornění postupu

4.7.1 Podmínky a metody extrakce

Stanovení antibiotik z modelových půd se skládá ze tří částí, kdy je nejprve zapotřebí takzvaný spike (obohacený vzorek), kterým se léčiva do zeminy aplikují, následuje zpětná extrakce těchto látek a na závěr samotná analýza prostřednictvím vhodné analytické metody. Cílem extrakce je získat co možná nejvyšší množství původně nastříknutých látek zpět, a tím najít metodu, která by se dala využít při stanovování množství antibiotik v půdách reálných. K tomu je nutné zvolit vhodné extrakční médium (EM) (1) a další podmínky jako je doba naložení v pufru (2), teplota (3), vliv přídavku EDTA (4), vliv navážky půdy (5), vliv objemu, ve kterém se znovu rozpouští vysušený analyt po SPE (6), vliv rozdílné koncentrace spike (7), vliv použitých SPE kolonek (8) vliv odlišných vlastností půdy (9) a další.

4.7.2 Výběr extrakčních médií

Výběr extrakčních médií, které byly v rámci experimentu vyzkoušeny, byl inspirován na základě odborné literatury. Přehledně jsou znázorněny v tabulce 9. Vzhledem k vlastnostem sulfonamidů (jejich pK_a) je možné využít různé hodnoty pH extrakčních směsí. Mezi používané hodnoty pH patří 2,6; 4 a 7,5. Pro jeho úpravu se využívají McIlvaineův pufr (kyselina citrónová + hydrogenufosforečnan sodný), kyselina mravenčí, amoniak atd. Často byla využívána organická rozpouštědla, především methanol a acetonitril.

Tabulka 9: Výběr extrakčního média

Navážka půdy	Sulfonamidy	Spike	Extrakční médium	Typ extrakce	Vyhodnocení	Výtěžnost	Zdroj
1 g	9 sulfonamidů	0,5 ml (1 mg/l)	MeOH	MASE	LC-MS/MS	76,4–98,1 %	[65]
2 g	6 sulfonamidů	200 uL (0.5 ng/g)	1:1 voda:ACN	LSE	UPLC/MS/MS	77–112 %	[66]
2 g	4 sulfonamidy	1 ml (1 mg/ml)	4 ml ACN	MASE spojeno s online SPE (alumina)	LC–MS/MS	84,6–93.1 %	[67]
5 g	22 sulfonamidů	-	90:10 MeOH:voda	PLE následována SPE (nylon)	LC–MS/MS	60–130 %	[58]
2 g	11 sulfonamidů	50 ug/kg	1:1 ACN a K ₃ PO ₄	SPE	LC-MS/MS	59–99 %	[68]
1 g	17 sulfonamidů	50 µg/kg	1:1 ACN:MeOH, 0.2% HCOOH, Na ₂ EDTA a McIlvaine pufr	SPE	UPLC/MS	61–103 %	[69]
1 g	4 sulfonamidy + trimethoprim	50 ng/g suché váhy	1:1 MeOH:McIlvaine pufr (pH 7)	PLE	UHPLC- QqLIT	50,6–90,3 %	[70]

4.7.3 Příprava vzorků pro extrakci

Nejdříve byly fixem označeny prázdné centrifugační zkumavky typu Falcon s víčkem o objemu 50 ml, do kterých bylo naváženo na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa 1 g půdy. Do těchto zkumavek bylo následně nastříknuto pomocí Hamiltonovy jehly 500 μ l mixu léčiv v MeOH o koncentraci 1 μ g/ml (spike). Byla snaha o rovnoměrnou aplikaci. Takto připravené vzorky se nechaly přes noc v digestoři, aby se mohly vytvořit vazby mezi částicemi půdy a stanovovanými antibiotiky, a tím bylo zajištěno, že budou antibiotika stanovována skutečně z vybrané matrice, a ne z tohoto rozpouštědla. Rovněž bylo zapotřebí odpaření methanolu.

Po vysušení methanolu z půdy se pomocí automatické pipety přidalo většinou 10 ml příslušného EM. Obsah zkumavky byl poté zvortexován po dobu 1 minuty při maximálním výkonu. Následně se zkumavky přenesly do ultrazvukové lázně, kde byly ponechány po dobu 10 minut. Objem vody v lázni byl 3,5 litru a kromě části, kdy byl optimalizovaný vliv teploty na rozpouštění vzorků, byly experimenty prováděny bez zahřívání. Byla zapnutá funkce Degas (odstranění vzduchových bublinek), která významně urychluje a zefektivňuje odplynění, snižuje povrchové napětí kapaliny a tím dochází k dokonalému přilnutí k povrchu částic půdy, čímž by mělo docházet k zvýšení účinnosti přechodu antibiotik do EM. Po deseti minutách byly zkumavky z lázně vytaženy a osušeny. Poté se přešlo k centrifuze, kde se vzorky odstřeďovaly po dobu 8 minut, při 4800 otáčkách za minutu a 24 °C. Zkumavky byly předem zváženy, aby se zajistilo potřebné vyvážení. Kapalně části byly přelity do označených 600ml kádinek se snahou, aby nedošlo k zanesení odstředěným pevným podílem. Pokračovalo se druhou extrakcí, již postup byl obdobný jako u té první. Po dokončení druhého kola byly kádinky doplněny milli-Q vodou na 500 ml, čímž se obsah organického rozpouštědla nařadil tak, aby nepřekračoval 2,5 %.

4.7.4 Extrakce tuhou fází (SPE)

Součástí zařízení umožňující provedení této extrakce je skleněná nádoba, víko, ve které jsou umístěny SPE kolonky a membránová vývěva, zajišťující vakuum. Všechny závitky ve víku byly uzavřeny a čekalo se, než bude podtlak dostatečný. Následně bylo zapotřebí nejprve aktivovat sorbent, což se provedlo napipetováním 6 ml methanolu do kolonky, který se pomalým otevřením závitku nechal protéct rychlostí průtoku 1 ml/min, do fáze, kdy se meniskus kapaliny dotkl sorbentu, aby nedošlo k jeho vysušení. Pod víkem byla zpočátku umístěna plastová nádoba, která nepotřebnou kapalinu zachytávala. Poté bylo napipetováno 6 ml milli-Q vody, která se rovněž nechala kolonkou protéct po meniskus. Dále bylo napipetováno 5 ml stanovovaného vzorku a na kolonku byla umístěna zátka s hadičkou, která byla připevněna ke kádince, ve které se nacházel příslušný analyt. Závitky se otevřely a tím byla spuštěna extrakce tuhou fází. Byl nastaven průtok 5 ml/min. Po přečerpání celého objemu byla kádinka vypláchnuta 9 ml milli-Q vody, aby se zajistily co možná nejmenší ztráty. Na závěr byl obsah kolonky propláchnut ještě 6 ml vody, která se nechala protéct úplně a následně byly uzavěry naplno otevřeny po dobu 1 minuty, čímž se docílilo záměrného vysušení sorbentu od zbytku vody, která by při následném zakoncentrovávání vzorku proces zpomalovala. Vývěva byla vypnutá, sběrná nádobka vyjmuta a obsah vylit do výlevky.

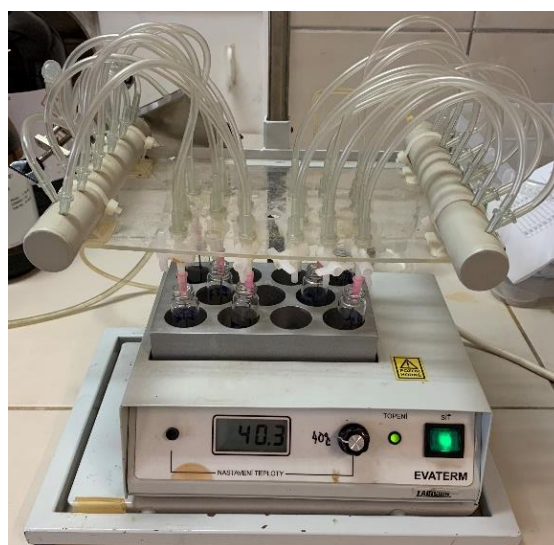
Při eluční části byly pod ústí závitů umístěny označené 20ml vialky. Znovu se zajistilo vakuum a do kolonek bylo napipetováno 9 ml 0,1% kyseliny mravenčí ve 100% methanolu, které se rovněž nechalo protéct kolonkou rychlostí průtoku 1 ml/min. Na závěr byly závity naplno otevřeny po dobu 1 minuty, aby se uvolnilo i zbytkové množství rozpouštědla.



Obrázek 14: SPE aparatura

4.8 Sušení vzorků pod proudem dusíku

Vialky byly umístěny do koncentrátoru, který byl vyhříván na 40 °C. K vrchní části konstrukce byly připevněny jehly, které po jejím snížení zapadaly přesně do hrdla vialek. Příslušné kohoutky byly otevřeny a pomalu se nechal přivádět plynný dusík, čímž docházelo k rovnoměrnému odpařování methanolu, a tím k zakoncentrovávání našeho analytu. Po vysušení vzorku téměř úplně do sucha byl přívod dusíku zastaven.



Obrázek 15: Koncentrátor

4.9 Předúprava vzorků před analýzou

Obsah vialek byl znovu rozpuštěn, tentokrát pomocí přidavku 995 μl 0,1% kyseliny mravenčí v milli-Q vodě a acetonitrilu v poměru 95:5. Rovněž bylo přidáno 5 μl vnitřních standardů sulfamethoxazol-d4 a trimethoprim-d4 o koncentraci 10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$, a takto připravené vzorky byly umístěny v molitanu do ultrazvukové lázně po dobu 1,5 minuty. Funkce Degas byla vypnutá.

Mezitím byly připraveny plastové injekční stříkačky o objemu 2 ml, na které byl nasazen nylonový filtr (0,22 μm , Chromservis). Nejdříve byly extrakční roztoky nabrány Pasteurovou pipetou a byly řádně omyty stěny vialky, poté byl roztok napipetován do injekční stříkačky a byl přefiltrován do označených vialek o objemu 1,8 ml.

4.10 Kvantitativní analýza

Jako vhodná analytická metoda pro kvantitativní analýzu extrahovaných antibakteriálních látek z půd byla zvolena metoda UPLC-ESI-TQ. Použitý kapalinový chromatograf a hmotnostní spektrometr je zobrazen na obrázku 16. Pro kvantitativní analýzu byla použita nově vytvořená metoda (viz kapitola 4.10.1) jejíž parametry na kapalinovém chromatografu a hmotnostním spektrometru byly nastaveny podle tabulky 10 a tabulky 11.

Analyty byly separovány na chromatografické koloně Luna® Omega Polar C18 o rozměrech 100 x 2,1 mm, s velikostí částic 1,6 μm . Před kolonou byla do systému zapojena i předkolona.



Obrázek 16: Kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity s hmotnostním spektrometrem Bruker EVOQ LC-TQ

4.10.1 Optimalizace LCMS metody

Vývoji LCMS metody předcházelo studium literatury, kde bylo předmětem zájmu hlavně fyzikálně-chemické parametry stanovovaných látek (M_w , pK_a , $\log P$.) a jaké mobilní fáze a kolony se nejčastěji používají (většina aplikací v systému reverzních fází, kdy se jako kolona používá C18 a mobilní fáze acetonitril a 0,1% HCOOH v Milli-Q vodě [42, 44, 53, 54].

Prvním krokem bylo nalezení MRM přechodů, tedy vhodných přechodů a prekurzorů. Produkty fragmentace jsou dost často stejné, což je způsobeno tím, že se jedná o léčiva ze stejné skupiny, takže se fragmentují obdobně, ale mají jiný prekurzor, čímž je zajištěná kvalitativní informace. Dále byla pozornost zaměřena na optimalizaci LC gradientu, kdy se začínalo v 95 % milli-Q vody a postupně se přecházelo do ACN (viz. tabulka 10). Během optimalizace LC gradientu se na MS nastavil mód SIM a sledovala se vždy jedna m/z daného analytu po celou dobu gradientu – sledovaly se konkrétně $[M+H]^+$ molekulární ionty, které vznikají primárně z důvodu přidavku HCOOH do mobilní fáze.

Až po optimalizaci LC gradientu se přešlo na optimalizaci MS parametrů, jelikož složení MF v daném retenčním čase ovlivňuje ionizaci analytu. V tomto kroku se postupně měnily všechny parametry, které lze vidět v tabulce 11. Provedla se analýza při napětí 4 500 V, 3 500 V, 2 500 V a 1 500 V. Výsledné píky se porovnávaly a bylo vybráno nejvhodnější napětí. Poté se postupně měnily průtoky a teploty plynu v rozsahu, který dovoluje přístroj. Po optimalizování těchto parametrů v módu SIM, se přešlo na mód skenu produktu. Zde se nastavil konkrétní prekurzor a skenovaly se ty jeho produkty ve vhodném rozsahu m/z při různých kolizních energiích (0–70 eV). Na základě měření se vytipovaly nejlepší produkty a porovnávala se jejich intenzita. Byly vybrány vždy 2 přechody. Jejich poměr nese kvalitativní informaci a je důležité ho sledovat u měření reálných vzorků a porovnávat s kalibrací, protože to může odhalit koeluci.

Tabulka 10: Optimalizovaná metoda UPLC-ESI-TQ – parametry UPLC

Nástřik vzorku (μ l)	Průtok MF (ml/min)	Teplota kolony ($^{\circ}$ C)	Mobilní fáze		Gradient mobilní fáze							POST time (min)	Flush port
7	0,5	35	A:	B:	t (min)	0,0	0,5	13,0	13,1	15,5	15,9	2	OFF
			0,1% HCOOH v MQ	ACN	B (%)	10	10	65	95	10	10		

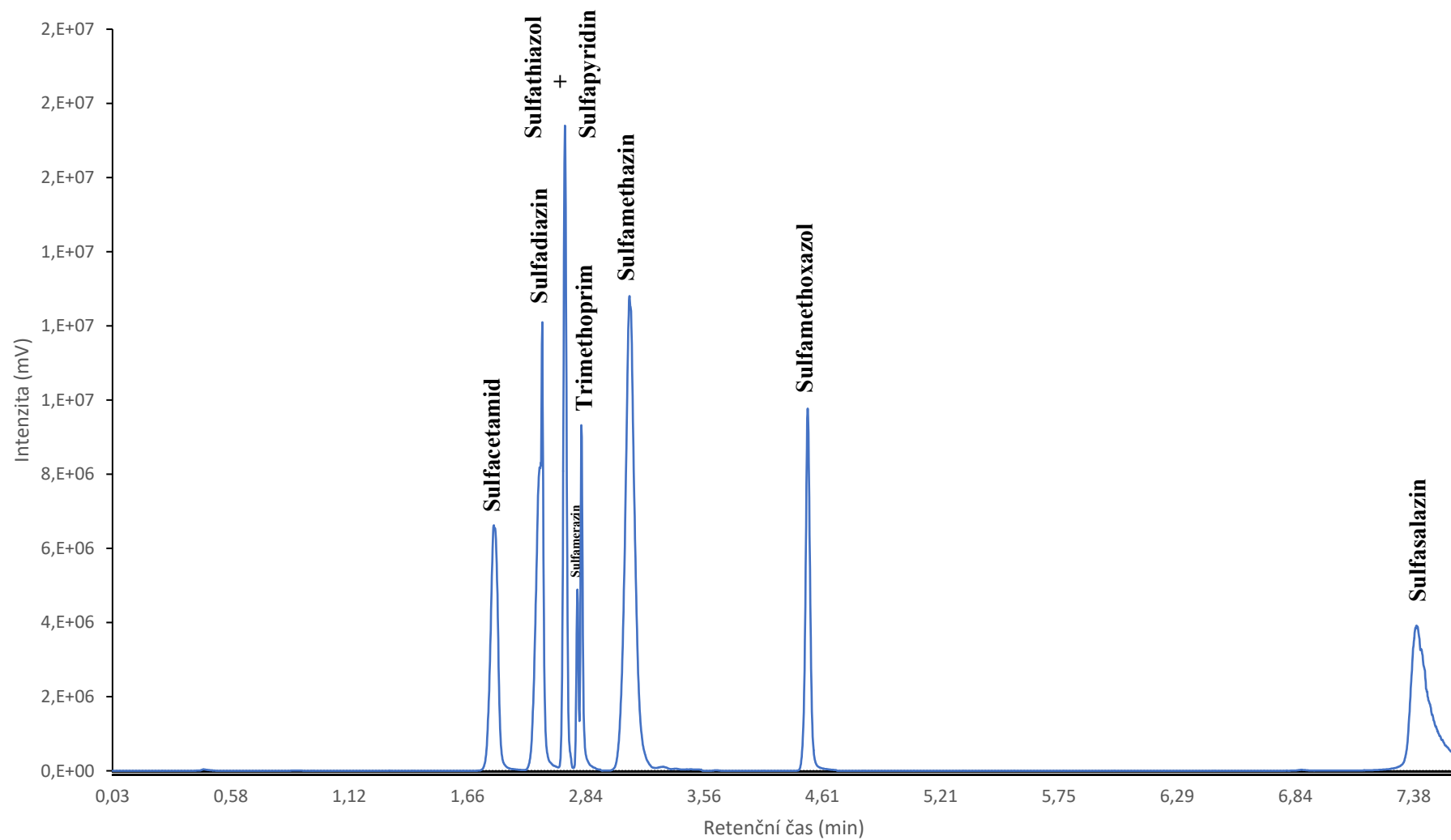
Tabulka 11: Optimalizovaná metoda UPLC-ESI-TQ – parametry ESI

Parametry ESI	
Iontový zdroj	Elektrosprej (HESI)
Napětí elektrospreje	4 500 V
Ionizační mód (polarita)	Pozitivní (ESI+)
Průtok pomocného plynu	25 a.u.
Teplota pomocného plynu	500 °C
Průtok sušícího plynu	15 a.u.
Teplota sušícího plynu	350 °C
Zmlžovací plyn	45 a.u.
Aktivní odtah	ON
Režim scanu	MRM
Tlak kolizního plynu	1,5 mTorr

Kvantifikace analytů byla provedena metodou vnějšího standardu a korigována na výtěžnost deuterovaných standardů sulfamethoxazolu-d4 a trimethoprimu-d3. Kvalitativní informaci, potvrzující přítomnost daných analytů ve vzorích půdy, jsou Rt, specifické prekursorzy a produkty (MRM přechody) a poměry těchto přechodů.

Tabulka 12: Optimalizovaná metoda UPLC-ESI-TQ – parametry MRM přechodů

Látka	Rt (min)	Kvantitativní přechod			Kvalitativní přechod		
		Prekurzor m/z	Produkt m/z	Kolizní energie (eV)	Prekurzor m/z	Produkt m/z	Kolizní energie (eV)
Sulfacetamid	1,77	215,2	155,9	10,0	215,2	91,9	20,0
Sulfadiazin	2,10	251,3	155,6	10,0	251,3	92,0	25,0
Sulfathiazol	2,44	256,0	155,8	10,0	256,0	92,2	20,0
Sulfapyridin	2,45	250,3	156,0	10,0	250,3	92,1	25,0
Sulfamerazin	2,70	265,3	108,0	20,0	265,3	92,1	20,0
Trimethoprim	2,76	291,2	260,9	25,0	291,2	123,0	20,0
Sulfamethazin	3,21	279,3	185,9	10,0	279,3	92,1	25,0
Sulfamethoxazol	4,43	254,3	155,6	10,0	254,3	92,1	25,0
Sulfasalazin	7,28	399,3	222,8	25,0	399,3	380,8	15,0



Obrázek 17: Chromatogram zkoumaných sulfonamidů pro kalibrační roztok o koncentraci 500 ng

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Kalibrační závislost

Před každým měřením vzorků byla nejdříve proměřena kalibrační řada pro kvantifikované látky, podle které se naměřená data vyhodnocovala. Kalibrační závislosti ze dne 29. 4. 2022 jsou zobrazeny v tabulce 13 a to včetně typu využívaných funkcí pro kalibrační závislosti, váhové funkce a koeficientu determinace.

Tabulka 13: Kalibrační závislosti ze dne 29. 4. 2022 včetně typu funkce kalibrační závislosti, váhové funkce a koeficientu determinace

Analyt	Funkce kalibrační závislosti	Váhová funkce	Kalibrační závislost	R ² (-)
Sulfacetamid	kvadratická	1	$0,00104x^2 + 3,572x + 37,91$	0,99602
Sulfadiazin	kvadratická	1	$2,585 \cdot 10^{-4}x^2 + 6,456x + 48,10$	0,99513
Sulfamerazin	kvadratická	1	$-0,00262x^2 + 3,457x + 24,13$	0,99567
Sulfamethazin	kvadratická	1	$-0,01068x^2 + 16,06x + 64,43$	0,99759
Sulfamethoxazol	kvadratická	1	$0,00157x^2 + 5,157x + 15,73$	0,99965
Sulfapyridin	kvadratická	1	$-0,00617x^2 + 12,32x + 37,09$	0,99867
Sulfasalazin	kvadratická	1	$-0,00509x^2 + 5,872x + 13,33$	0,99816
Sulfathiazol	kvadratická	1	$-1,456 \cdot 10^{-4}x^2 + 6,007x + 22,46$	0,99798
Trimethoprim	kvadratická	1	$-4,146 \cdot 10^{-4}x^2 + 1,525x + 1,557$	0,99840

5.1.1 Určení mezí stanovení metody – LoD a LoQ

Z kalibračních závislosti, respektive z jejich oblastí pro kvantifikace byla následně vypočítána mez detekce (LoD), která udává nejmenší koncentraci analytu, vyvolávající odezvu měřicího systému a rozpoznatelnou od ostatních vlivů a mez stanovitelnosti (LoQ) udávající koncentraci analytu, kterou lze s definovanou přesností kvantitativně stanovit a pro kterou byla metoda validována.

Obě tyto meze byly vypočítány podle německé směrnice DIN 32645 [71], která dává do poměru standardní odchylku měření na úrovni blanku (S_{blank}) a sklon kalibrační křivky (b). Vztah pro výpočet lze vidět níže.

$$LOD = 6 \cdot \frac{S_{blank}}{b} \quad (\text{Rovnice 1})$$

$$LOQ = 9 \cdot \frac{S_{blank}}{b} \quad (\text{Rovnice 2})$$

Výsledné meze detekce a stanovitelnosti metody pro všechny stanovované sulfonamidy jsou zobrazeny v tabulce 14.

Tabulka 14: Limity detekce a limity kvantifikace pro jednotlivé SA na UPLC-ESI-TQ

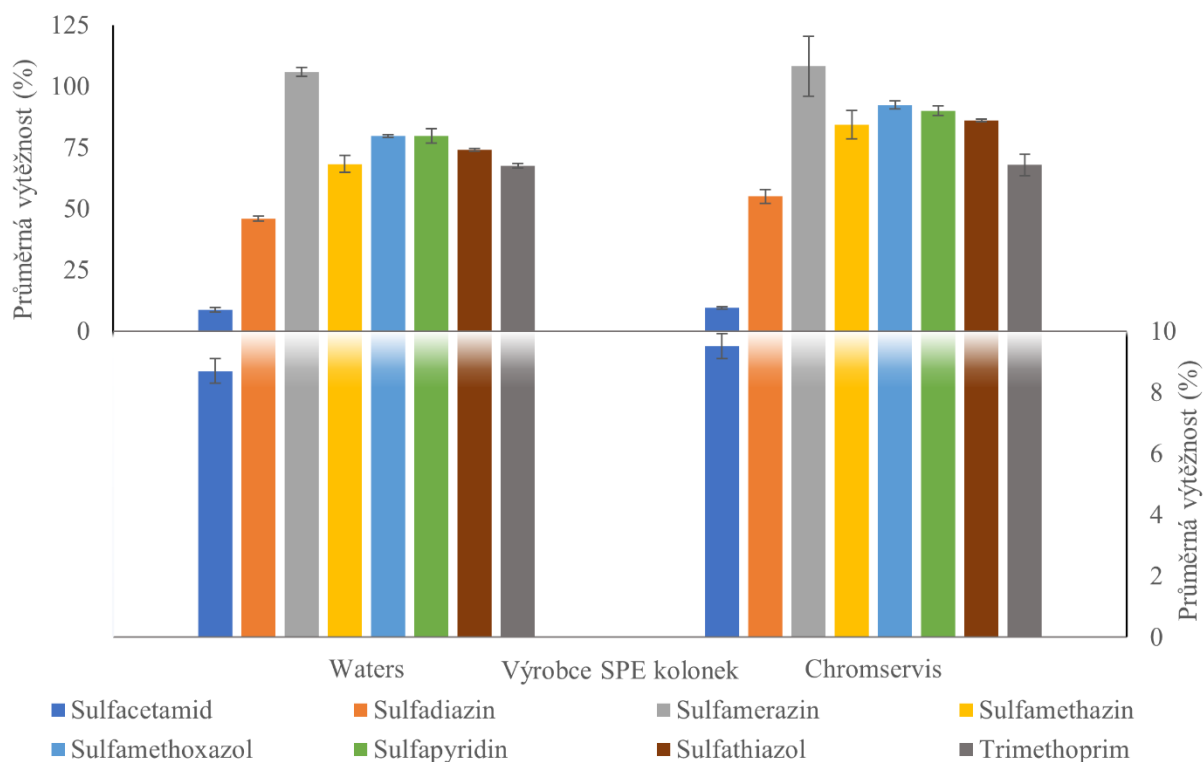
	LoD (µg/g)	LoQ (µg/g)
Sulfacetamid	0,73	1,1
Sulfadiazin	0,5	07
Sulfamerazin	0,40	0,60
Sulfamethazin	0,4	0,53
Sulfamethoxazol	0,5	0,7
Sulfapyridin	0,4	0,6
Sulfasalazin	8,14	12,21
Sulfathiazol	0,3	0,44
Trimethoprim	1,14	1,70

5.2 Výsledky optimalizace jednotlivých kroků metody

Postupně byly optimalizovány jednotlivé kroky měření podle obrázku 13 a v další fázi už byly využívány jen ty nejlepší z předchozích. Pro ověření pravdivosti jednotlivých údajů byly provedeny vždy 2 opakování. Naměřená data byla přenesena do programu TASQ version 2.2.14 1533, Bruker Daltonik GmbH 2018. Následně byla exportována do programu Microsoft Office Excel 365. Výťažnosti jednotlivých měření se vypočítaly jako podíl množství analytu, které bylo naměřeno na detektoru ku množství analytu, které bylo na začátku aplikováno do půdy. Ze dvou opakování byl pomocí funkce PRŮMĚR spočítán průměr a pomocí funkce SMODCH.P byla vypočítána směrodatná odchylka měření. V programu Microsoft Office Excel 365 byly výsledky rovněž graficky zpracovány.

5.2.1 Výběr účinnější SPE kolonky

Nejprve bylo zapotřebí optimalizovat SPE metodu, a to výběrem účinnější SPE kolonky, schopné zachytávat více molekul zkoumaného analytu. Jednou z možností byly kolonky Oasis HLB 6cc (200 mg) od firmy Waters a druhou možností byly kolonky SPEextra clinical HLB 30 µm 200 mg od firmy Chromservis s.r.o. Pokus probíhal zcela bez vlivu matričního efektu, kdy bylo rovnou do 600ml kádinek napipetováno 0,5 ml spiku a doplněno milli-Q vodou na 500 ml celkového objemu. Cílem bylo zjistit, které z vybraných kolonek nabízejí lepší výtěžnosti SA.



Obrázek 18: Průměrné výtěžnosti SA pro různý typ SPE kolonek

Jak lze vidět na obrázku 18, výtěžnost byla mírně vyšší ve prospěch kolonek od firmy Chromservis. Důvod není zcela jasný, protože kvůli uchování firemního tajemství není známo přesné složení jednotlivých sorbentů. Protože však rozdíly nebyly tak markantní a počet kusů kolonek od firmy Waters byl větší, pokračovalo se v optimalizaci dalších kroků právě s kolonkami od této firmy. Toto rozhodnutí bylo učiněno rovněž z ekonomického hlediska, protože tyto kolonky jsou levnější, na což se taky musí brát ohled. Kolonky od firmy Chromservis byly použity až na závěr, při provádění pokusu se všemi optimalizovanými kroky. Nejlepších výsledků bylo dosahováno v případě sulfamerazinu, který se za použití SPE kolonky od firmy Waters podařilo stanovit se $106 \pm 2\%$ úspěšností. Výtěžnosti sulfasalazinu se i v tomto případě pohybovaly pod limitem detekce, a proto nebyly do grafu zahrnuty. Číselné hodnoty jsou dostupné v tabulce 18 v seznamu příloh.

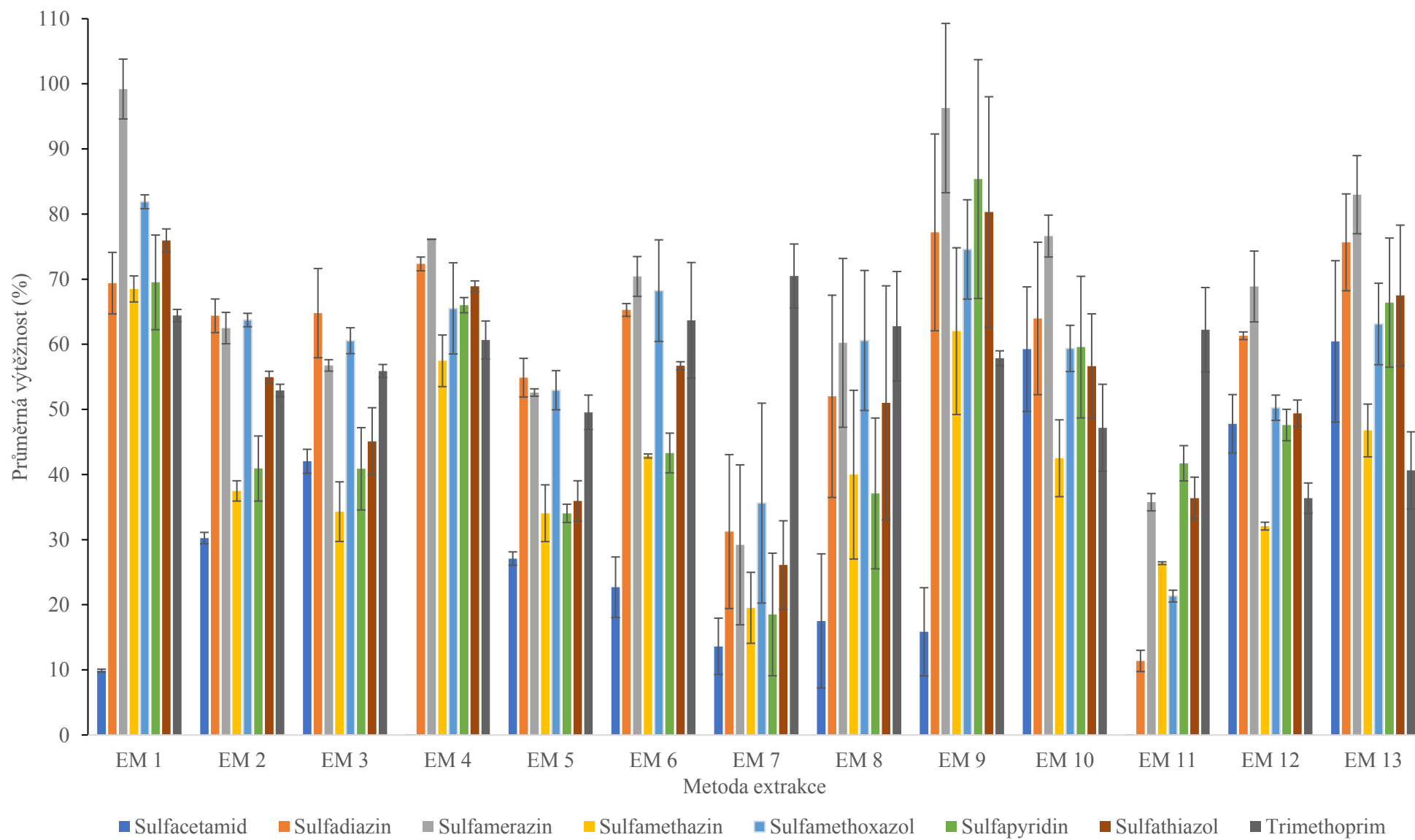
5.2.2 Optimalizace typu extrakčního média

Následně bylo na základě odborné literatury (tabulka 9) zvoleno 13 různých EM, které byly přidávány do zkumavky po vysušení naspikované půdy. Jednotlivé pufry jsou uvedeny v tabulce 15. V případě EM 6 a 7 se při druhé extrakci přidávalo pouze poloviční množství rozpouštědla a EDTA se už nepřidávala vůbec. Tento výběr rovněž umožňuje porovnání účinnosti extrakce v acetonitrilu a methanolu.

Tabulka 15: Přehled zvolených extrakčních médií

EM 1	5 ml milli-Q + 5 ml ACN
EM 2	5 ml ACN + 5 ml ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$) pH3,09
EM 3	5 ml 1:1 ACN:MeOH + 5 ml citrát-fosfátový pufr pH2,6, 0,6 g EDTA
EM 4	5 ml MeOH + 5 ml citrát-fosfátový pufr pH7,8
EM 5	5 ml ACN + 5 ml citrát-fosfátový pufr pH2,6
EM 6	5 ml ACN + 5 ml citrát-fosfátový pufr pH4
EM 7	0,6 g EDTA + 20 ml (7,5 ml citrát-fosfátový pufr pH2,6; 7,5 ml ACN; 5 ml $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), při 2. extrakci už jen 10 ml mixu a bez EDTA
EM 8	0,6 g EDTA + 20 ml (7,5 ml citrát-fosfátový pufr pH7,8; 7,5 ml ACN; 5 ml $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), při 2. extrakci už jen 10 ml mixu a bez EDTA
EM 9	5 ml milli-Q + 5 ml MeOH
EM 10	5 ml MeOH + 5 ml ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$) pH3,09
EM 11	5 ml ACN + 5 ml citrát-fosfátový pufr pH7,8
EM 12	5 ml MeOH + 5 ml citrát-fosfátový pufr pH2,6
EM 13	5 ml MeOH + 5 ml citrát-fosfátový pufr pH4

Z výsledků znázorněných na obrázku 19 lze pozorovat, že souhrnně nejlepších výsledků bylo dosahováno při použití EM 1, Kdy se podařilo získat zpět z matrice 99 ± 5 % sulfamerazinu, ale současně bylo dosaženo i nejmenší výtěžnosti sulfacetamidu (nepočítaje ty, které vyšly pod limitem detekce) a to pouze $9,88 \pm 0,24$ %. EM 9 nabízelo rovněž zajímavé výsledky, ale po prozkoumání směrodatných odchylek bylo prokázáno, že výtěžnosti jednotlivých měření se velmi lišily, a proto bylo jako jistější volba se stálejšími výtěžnostmi zvoleno EM 1. Výtěžnosti sulfasalazinu se při použití jakéhokoliv EM pohybovaly pod limitem detekce (LOD), a proto nebyly do grafu zahrnuty. Číselné výsledky lze nalézt v seznamu příloh v tabulce 17.

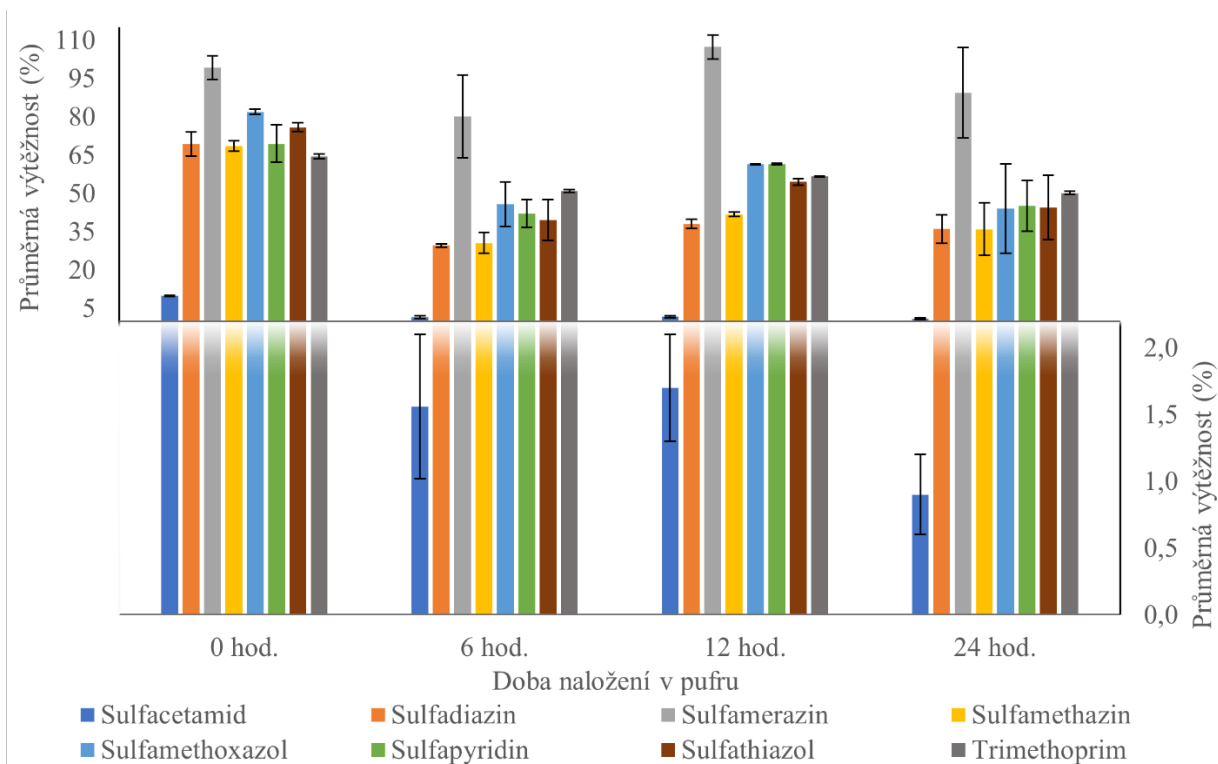


Obrázek 19: Průměrná výtěžnost SA v závislosti na použitém EM

V odborné literatuře [66] testovali totožné extrakční médium na extrakci sulfadiazinu, sulfathiazolu, sulfamethazinu a sulfamethoxazolu z půdy, kdy dosahovali podobných (lepších) výtěžností, kolem 90 %. Ve stejném článku rovněž ověřovali účinnosti extrakce v roztoku 1:1 MeOH:voda a ve směsi 1:1 MeOH:ACN, kdy dosahovali stejně jako v mém případě nejlepších výtěžků při použití roztoku 1:1 ACN:voda. Když však porovnáme účinnosti zpětného zisku sulfonamidů ve směsi ACN (EM 2, EM 5, EM 6 a EM 11) a MeOH (EM 10, EM 12, EM 13 a EM 4) s jiným rozpouštědlem než vodou, získáváme překvapivě lepší výtěžnost v případě MeOH. Všechny byly však nižší než v případě EM 1. Ideální situací by bylo, kdyby jedno EM fungovalo nejlépe pro všechny SA, ale to není moc reálné, protože vybrané látky jsou na příklad jinak polární, takže jím vyhovuje jiné pH. Proto bylo vybráno takové, které nabízelo souhrnně nejlepší výsledky pro všechny stanovované SA. Obecně by se však podle našeho měření dalo říct, že hromadně nejideálnější hodnotou pH pro stanovování námi vybraných SA je kolem 6,5, které mělo EM 1 a EM 9, dle stanovování podle Lakmusových papírků, což je v rozporu s odborným článkem [33], kde tvrdí, že nejlepších výtěžností se dosahuje při hodnotě pH kolem 4, a že při $\text{pH} > 6$ už jsou SA velmi špatně zachytávány při SPE.

5.2.3 Optimalizace vlivu doby naložení půdy s léčivem v EM

Při optimalizaci dalšího parametru se zkoumal vliv doby naložení půdy s antibiotiky v extrakčním médiu. V prvním případě se v experimentu pokračovalo okamžitě po přidání EM a v dalších případech se zkoušely vzorky v EM ponechat po dobu 6, 12 a 24 hodin. Motivací bylo zjistit, zda se ustálí rovnováha a výtěžnost se s delší dobou naložení zvýší. Tento parametr totiž nebyl ověřován v žádné dostupné literatuře, která byla prostudována. Překvapivě se však došlo k výsledkům, že výtěžnosti jednotlivých SA se chovaly proti předpokladům a s rostoucím časem se snižovaly. Toto mohlo být způsobeno například důkladnějším navázáním molekul sulfonamidů na molekuly matrice, či jejich iontů, což by způsobilo nedokonalé převedení stanovovaných látek do roztoku. Problémem možná mohlo být i potenciální adsorpce SA na stěnu plastových zkumavek, ve kterých byly uschovány. Z grafických (obrázek 20) a číselných (tabulka 19) výsledků, bylo vyhodnoceno, že nejlepší výsledků se dosahovalo při okamžitém pokračování pokusů bez delšího naložení půdy v EM. Dále se však dosahovalo poměrně totožných výsledků, což může znamenat, že sulfonamidy jsou s rostoucím časem stabilní a nedegradují.



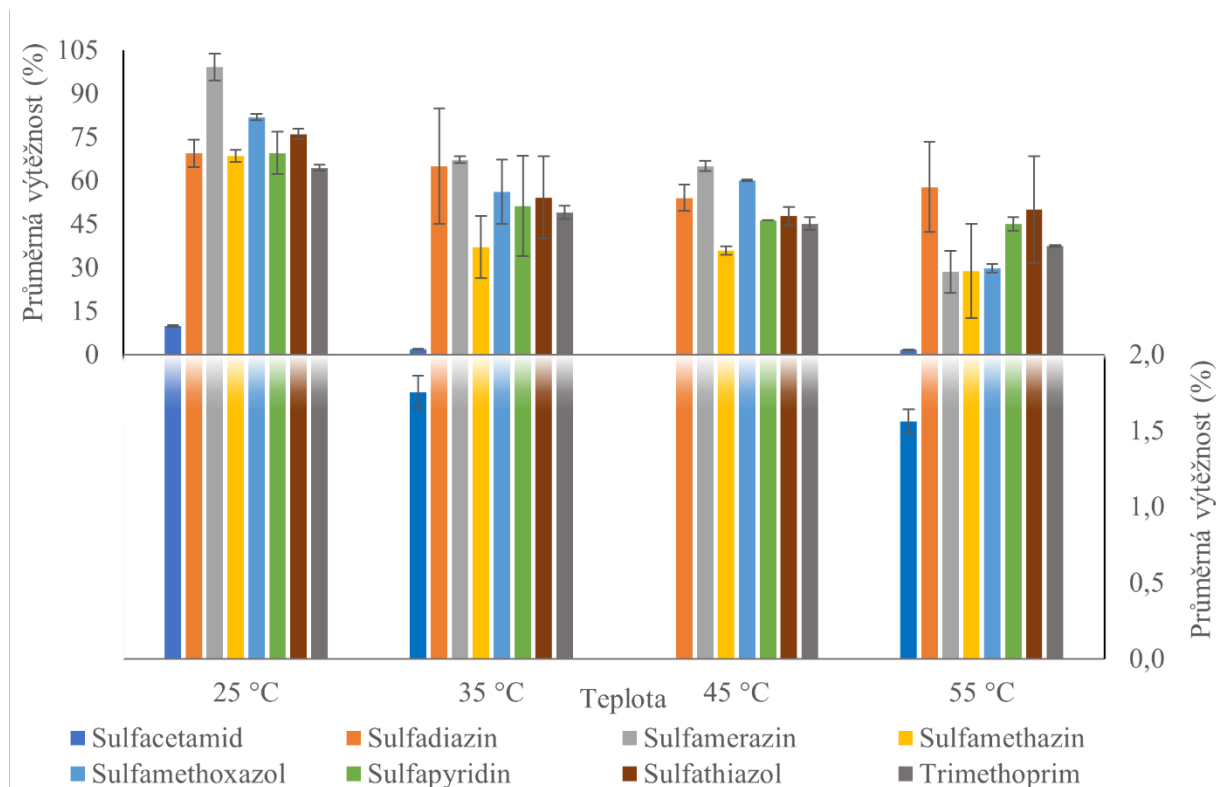
Obrázek 20: Průměrné výtěžnosti SA v závislosti na době naložení v EM

Nejlépeších výsledků bylo dosaženo opět v případě sulfamerazinu, když byla naložená půda s léčivý v EM po dobu 12 hodin (107 ± 5 %). Naopak nejhůře dopadl znovu sulfacetamid, tentokrát v případě analýzy vzorku po 24 hodinách ($0,9 \pm 0,3$ %).

5.2.4 Optimalizace vlivu teploty

Další parametrem, který byl ověřován byla teplota, při které se extrakce prováděla. V tomto případě se zkoušela extrakce bez ohřevu tj. 25 ± 2 °C, při 35 ± 2 °C, 45 ± 2 °C a 55 ± 2 °C. Teploty bylo docíleno pomocí termostatu ultrazvukové lázně, ve které byl vzorek ponořen, při každé z extrakcí, po dobu deseti minut.

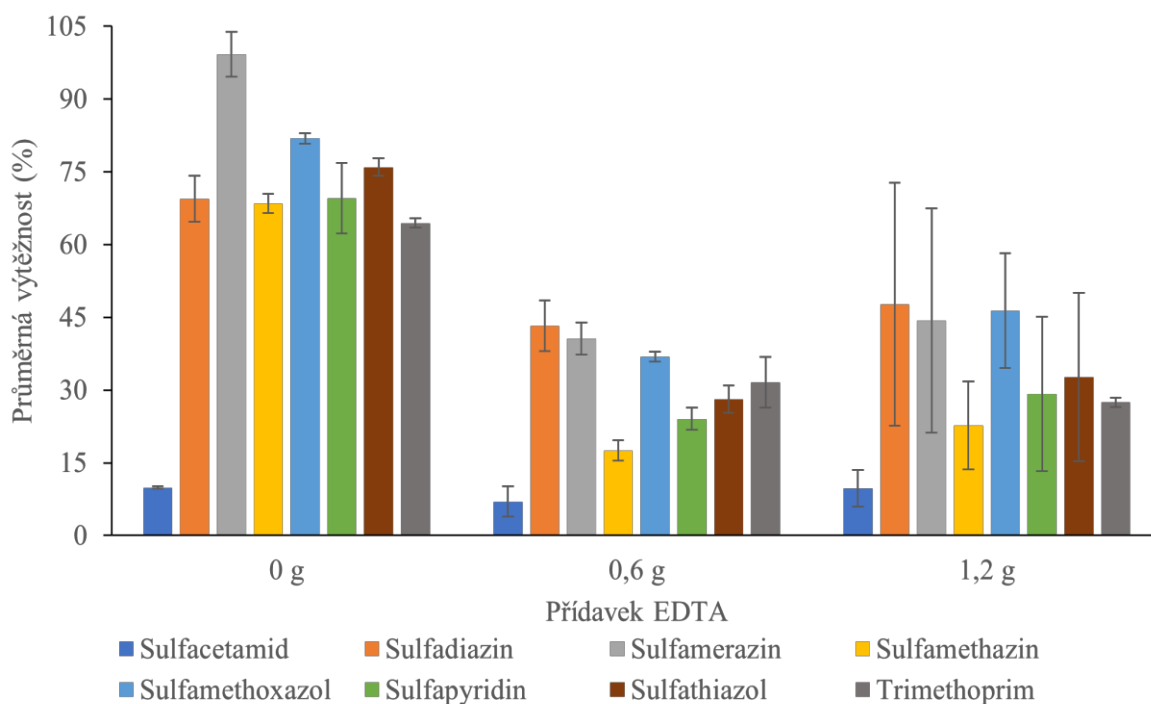
Stejně jako v případě [72] byly hodnoty průměrné výtěžnosti získané u všech antibiotik sníženy s rostoucí teplotou, jak lze vidět na obrázku 21, což mohlo být způsobeno například důsledkem tepelné degradace analytu nebo většího vlivu matrice na výsledky. Proto byla v dalších krocích zvolena teplota extrakce 25 °C tzn. vzorky nebyly dodatečně zahřívány a experiment probíhal za laboratorní teploty. V případě stanovení sulfasalzinu za každé teploty a sulfacetamidu při teplotě 45 °C vycházely výsledky pod limitem stanovení. Číselné výsledky lze najít v tabulce 20 v přílohách.



Obrázek 21: Průměrné výtěžnosti SA v závislosti na vlivu teploty

5.2.5 Optimalizace vlivu přídavku EDTA

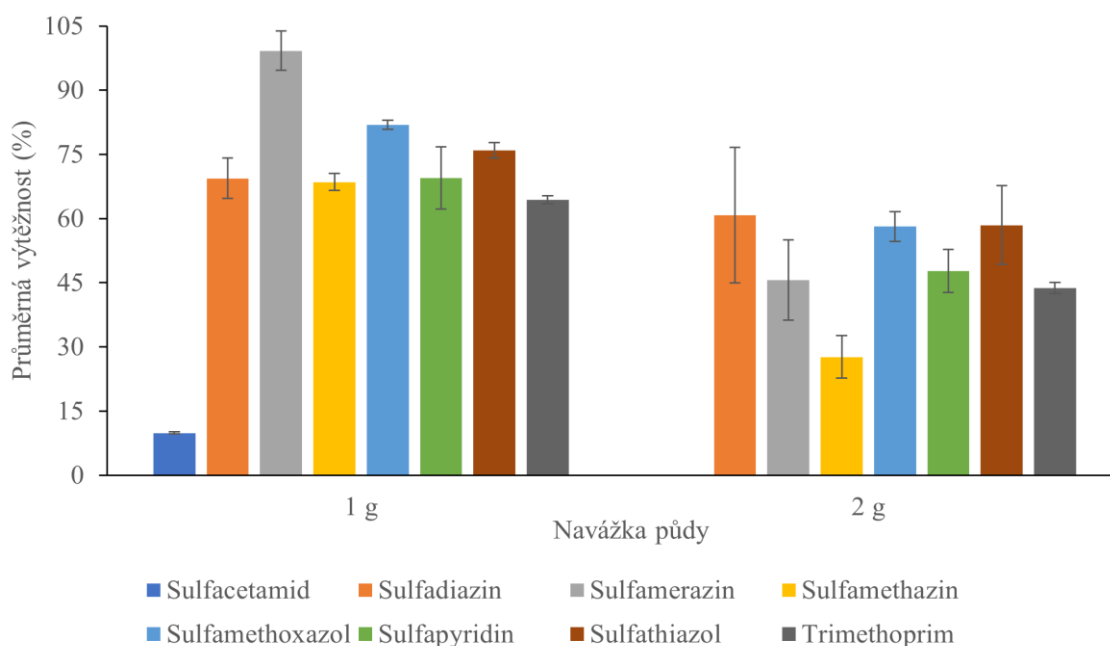
Při úpravě vzorku pro multireziduální analýzu je před aplikací na SPE, kromě úpravy pH vzorku, také často ke vzorku přidáváno chelateční činidlo EDTA, které slouží ke snížení tendence antibiotik vázat se na kationty v matrici, ke zlepšení tvaru píku a k prevenci interferencí během extrakce antibiotik. Přidání silného chelatačního činidla EDTA do vzorku před extrakcí se většinou využívá k vyvázání kovů nebo vícemocných kationtů (Ca^{2+} a Mg^{2+}), které jsou dostatečně rozpustné ve vodě, do komplexních sloučenin. Typ půdy, která byla na tento krok využita je hodně vápenatá, a proto připadalo přidání EDTA v úvahu. Dle odborné literatury [44] však sulfonamidy komplexy s divaletními a polyvalentními kationty kovů netvoří. Znamená to, že pokud se stanovují pouze SA, není tato úprava nutná. Tímto krokem jsme chtěli toto tvrzení potvrdit a dle obrázku 22 se shoduje s mými výsledky, kdy přídavek EDTA výtěžnosti nejenomže nezlepšil, ale dokonce zhoršil. Číselné výsledky jsou k dispozici v přílohách v tabulce 21.



Obrázek 22: Průměrné výtěžky SA v závislosti na přídavku EDTA

5.2.6 Optimalizace vlivu navážky půdy

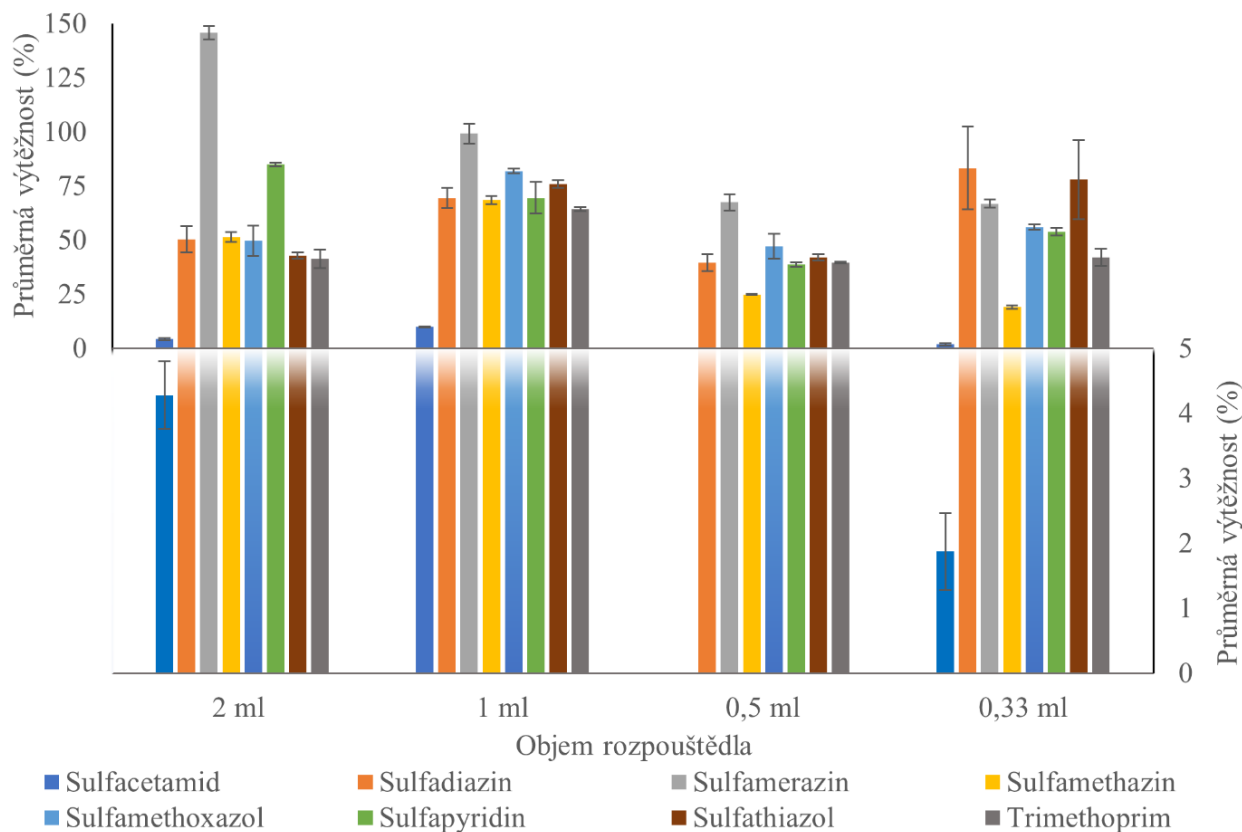
Ve většině článků se optimalizuje metoda na stanovování sulfonamidů za využití 1 g půdy [65, 69, 70], ale jsou i takové [66–68], kde probíhá měření výtěžnosti sulfonamidů ze 2 g půdy. Proto byla pozornost zaměřena i na tento faktor. Cílem bylo snížit limity detekce a kvantifikace. I po snížení limitu detekce však nebylo možné sulfasalazin stanovit, a proto se v grafu nenachází. Lepších výtěžností bylo však dosahováno při použití 1 g půdy, jak lze vidět na obrázku 23.



Obrázek 23: Průměrné výtěžky SA v závislosti na velikosti navážky půdy

5.2.7 Optimalizace vlivu objemu rozpouštědla během rekonstituce vzorku

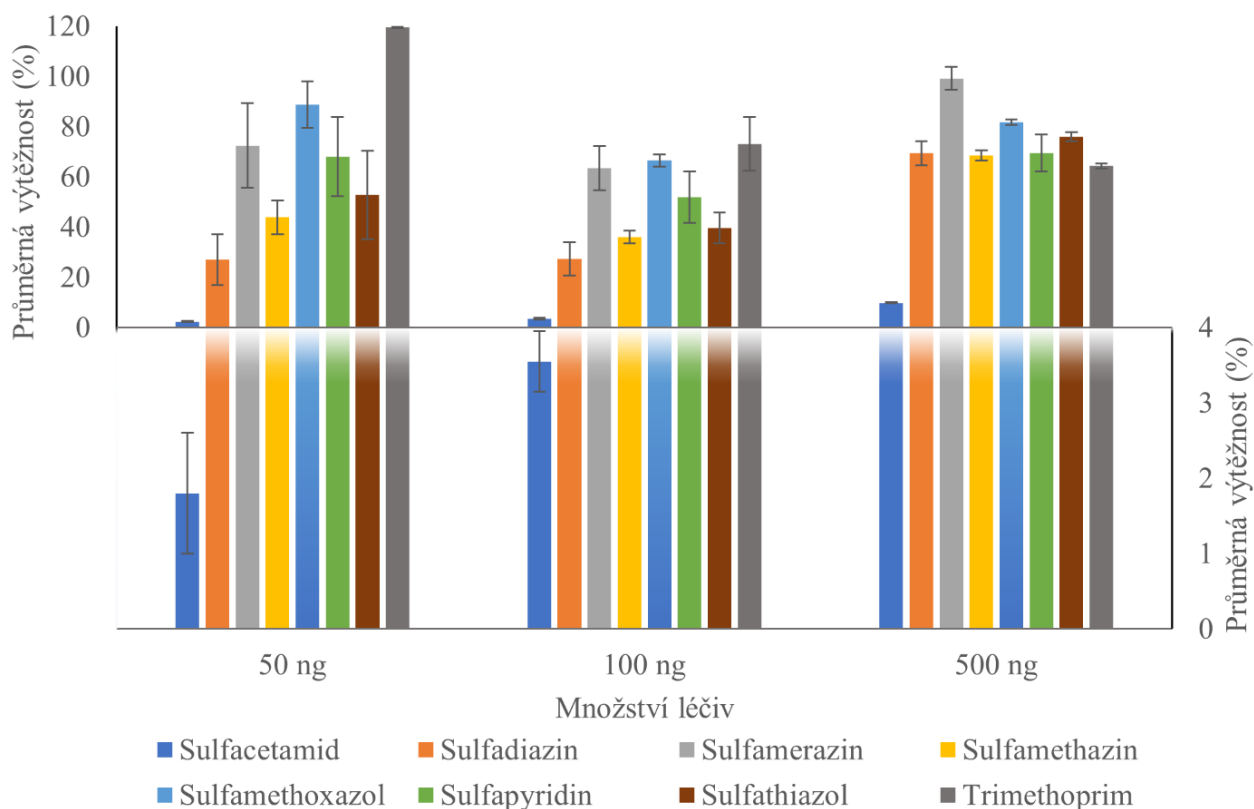
Tento krok následoval po vysušení vzorků dusíkem získaných po SPE. Vysušené vzorky bylo třeba opět rozpustit, aby byla možná jejich analýza na UPLC/MS. Na to se využíval roztok vody s ACN (95:5) s přidavkem 0,1% HCOOH, který sloužil rovněž jako MF v kapalinovém chromatografu. Cílem bylo zjistit, zda bude účinnost dané metody ovlivněna různými koncentračními úrovněmi SA, kvůli čemuž byly vzorky rozpouštěny ve 2 ml, 1 ml, 0,5 ml a 0,33 ml mobilní fáze. Očekávalo se, že rekonstituce v nižším objemu bude díky vyšší koncentraci SA ve vzorku přinášet lepší výsledky, ale dle obrázku 24 se tomu tak nestalo. Číselné výsledky jsou rovněž k dispozici v přílohách v tabulce 23.



Obrázek 24: Průměrné výtěžnosti SA v závislosti na objemu rozpouštědla při rekonstituci

5.2.8 Vliv koncentrace aplikovaných léčiv

Motivací bylo ověřit, zda tato metoda funguje na různých koncentračních úrovních, což je vyžadováno i ve validačních postupech. V reálných podmínkách se léčiva v půdě nacházejí v daleko nižších koncentracích, než bylo do půd přidáváno v této práci, ale s cílem lepšího a snazšího nalezení problému, při optimalizacích bylo zvoleno právě množství přidávaných léčiv na 500 ng, nicméně bylo ověřeno, že i při podmínkách podobnějších skutečným, naše metoda funguje a lze jí sulfonamidy z půdy stanovit. Výsledky tohoto měření jsou zobrazeny na obrázku 25. Přesné hodnoty jsou v tabulce 24.



Obrázek 25: Průměrné výtěžnosti SA v závislosti koncentraci nastříknutých léčiv

5.3 Aplikace konečné metody na různé typy půd

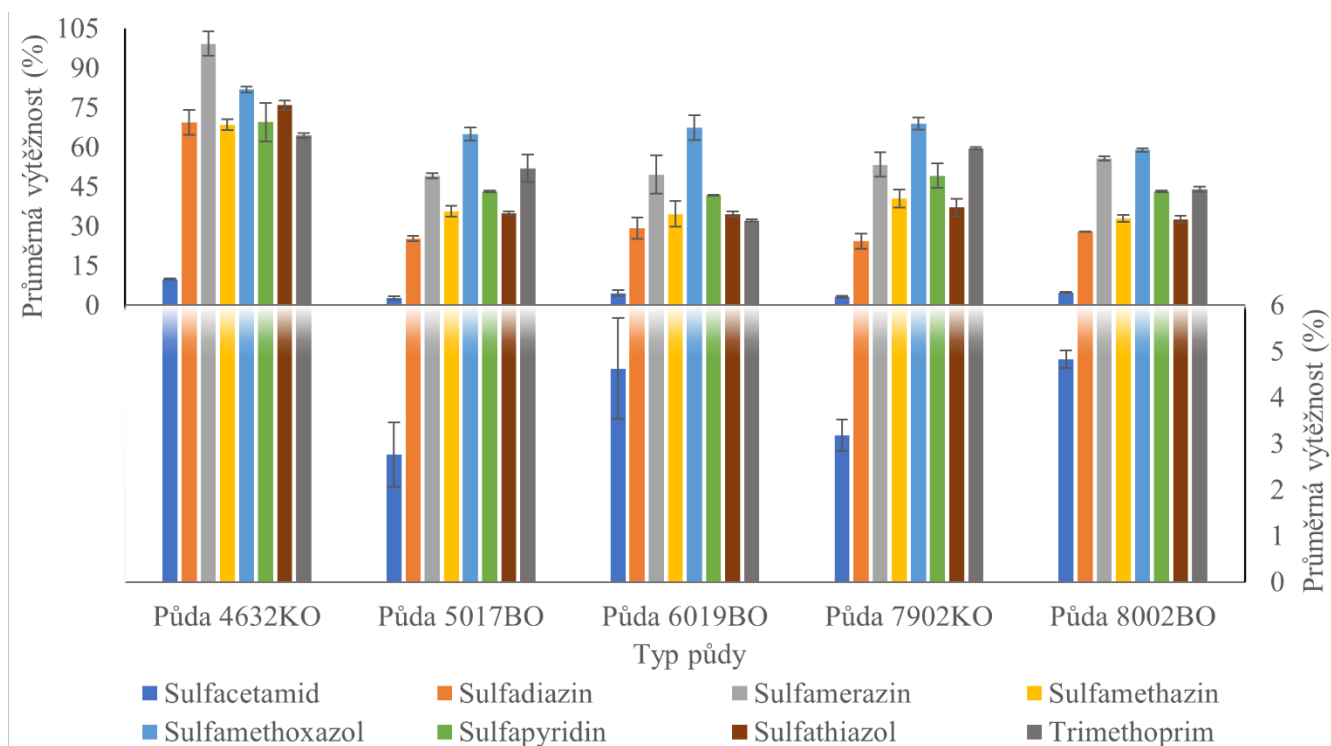
Na závěr byla optimalizovaná metoda, skládající se z navážky 1 g půdy, 500 ng spiku léčiv, acetonitrilu a vody (1:1) jako extrakčního média, okamžité extrakci při teplotě 25 °C, SPE kolonek od firmy Chromservis a objemem MF na rekonstituci vzorku 1 ml, vyzkoušena na další 4 půdy rozdílného půdního druhu s různými agrochemickými vlastnostmi, které lze vidět v tabulce 16. Půda číslo 4632KO je půda, na kterou byla metoda připravená a nebyla již součástí finálního experimentu. V tabulce 16 a obrázku 26 je znázorněná jen pro porovnání jejich agrochemických vlastností a výtěžností.

Tabulka 16: Agrochemické vlastnosti vybraných půd

Číslo půdy	Půdní druh	pH (-)	Organická hmota (%)	Ca ²⁺ (mg/kg)	Mg ²⁺ (mg/kg)
4632KO	Fluvisol	7,1	5,1	6106	336
5017BO	Kambisol	6,3	7,1	99,7	30,7
6019BO	Glejsol	6,5	3,4	112	35,5
7902KO	Černosol	7,6	4,2	192	7,69
8002BO	Luvisol	5,8	2,4	66,1	15,7

Graficky jsou výsledky tohoto měření znázorněny na obrázku 26. Při aplikaci konečné metody na odlišné půdy nebylo dosaženo takových výtěžností, jako v případě půdy 4632KO, kde jediným odlišným parametrem oproti tomuto pokusu bylo použití SPE kolonek od firmy Waters. Právě tento rozdíl však mohl ve výsledku průměrné výtěžnosti značně ovlivnit. Výběr

SPE kolonek od firmy Chromservis na konečný experiment byl totiž učiněn čistě na základě experimentu v kapitole 5.2.1, kde však byly posuzovány úspěšnosti zachytu stanovovaných léčiv na sorbentu SPE kolonek bez jakéhokoliv vlivu půdní matrice. Je však možné, že na kolonky od firmy Chromservis má matrice jistý vliv. Například mohlo dojít k ovlivnění pH vzorku, což by mohlo mít za následek horší zachyt molekul sledovaných analytů na sorbentu SPE kolonek. Vylepšení by proto mohlo nabízet úprava pH zředěného vzorku před samotnou SPE extrakcí, případně vyzkoušet i SPE kolonky od firmy Waters, které jsou dělány na zachyt polárnějších vzorků.



Obrázek 26: Průměrné výtěžnosti SA v závislosti na typu použité půdy

Průměrné výtěžnosti SA však v dalších půdách vycházely velmi podobně, a protože podle tabulky 16 obsahují vybrané půdy poměrně významně odlišný obsah iontů, a hlavně daleko nižší než v případě půdy 4632KO, se kterou bylo dosahováno nejvyšších výtěžností, mohlo by to potvrzovat závěry z odborné literatury [44], že sulfonamidy netvoří komplexy s divaletními a polyvalentními kationty kovů, což by znesnadňovalo jejich extrakci z této matrice.

6 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byla zpracována aktuální problematika týkající se výběru a optimalizace vhodné metody na stanovení antimikrobiálních látek z řad sulfonamidů v půdě. Bylo vybráno 9 antibiotik a to sulfapyridin, sulfadiazin, sulfathiazol, sulfamerazin, sulfamethazin, sulfamethoxazol, sulfasalazin, sulfacetamid a trimethoprim. Hlavní motivací, proč analyzovat rezidua těchto antibiotik v půdách, je vzrůstající rezistence bakterií vůči těmto látkám. Jelikož je půda velmi komplexní matricí, která obsahuje spoustu anorganických i organických sloučenin, které by analýzu mohly ovlivňovat, bylo prozkoumáno několik parametrů, s cílem dosažení nejsprávněji kvantifikovatelných výsledků. Pro izolaci a zakoncentrování analytů z původní matrice byla zvolena metoda extrakce tuhou fází. V průběhu práce bylo dále postupně vybráno vhodné extrakční médium, typ SPE kolonek, teplota, doba naložení v extrakčním médiu, navážka půdy, koncentrace aplikovaných léčiv a vliv objemu rozpouštědla na rekonstituci vzorku. Jakožto vhodná analytická metoda pro kvalitativní i kvantitativní analýzu byla zvolena analytická metoda ultraúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií UPLC/MS, kterou bylo nutné nejdříve optimalizovat. Použitou ionizační technikou byl elektrosprej, analyzátozem trojitý kvadrupól. Kvantifikace analytů byla provedena metodou vnějšího standardu a korigována na výtěžnost použitých deuterovaných standardů.

Z výsledků vyplývá, že se podařilo najít vhodnou metodu, kterou lze použít na multireziduální stanovení sulfonamidů z různých typů půd, jejíž součástí bylo i úspěšná optimalizace LC/MS metody pro vyhodnocování. Nejlépe metoda funguje na stanovení sulfamethoxazolu, kdy se při použití 5 různých půd dosahovalo průměrně $63 \pm 8\%$ výtěžnosti. Tato metoda však není nejvhodnější pro sulfacetamid, který se podařilo získat zpět z půdy s úspěchem pouze $5,0 \pm 2,2 \%$ a sulfasalazin, který vycházel pokaždé pod limitem detekce, a proto nebylo možné stanovit jeho přesné množství. V těchto dvou případech mohl hrát roli jejich méně polární charakter, a proto nevhodná SF při SPE extrakci i LC/MS vyhodnocování. Z důvodu lipofilnějšího charakteru sulfasalazinu mohlo rovněž docházet ke větší afinitě k adsorpci na pevné organické složky půdy, a tím k horšímu extrahování. Protože nalezení univerzální metody na stanovení látek s takto rozdílnými vlastnostmi není snadné, dalo by se považovat její vhodnost pro zbývajících 7 látek za úspěch. Metoda byla rovněž ověřena na velmi nízké koncentrace léčiv v půdě, které se blíží reálnému výskytu.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] M. Conde-Cid, A. Núñez-Delgado, M. J. Fernández-Sanjurjo, E. Álvarez-Rodríguez, D. Fernández-Calviño, and M. Arias-Estévez, ‘Tetracycline and Sulfonamide Antibiotics in Soils: Presence, Fate and Environmental Risks’, *Processes*, vol. 8, no. 11, Art. no. 11, Nov. 2020, doi: 10.3390/pr8111479.
- [2] K. Kümmerer, ‘Antibiotics in the aquatic environment--a review--part I’, *Chemosphere*, vol. 75, no. 4, pp. 417–434, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.086.
- [3] ‘The State of the World’s Antibiotics Report in 2021’, *Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP)*, Feb. 03, 2021. <https://cddep.org/blog/posts/the-state-of-the-worlds-antibiotics-report-in-2021/> (accessed Apr. 21, 2022).
- [4] M. I. Hutchings, A. W. Truman, and B. Wilkinson, ‘Antibiotics: past, present and future’, *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 51, pp. 72–80, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- [5] K. Williams, ‘The introduction of “chemotherapy” using arsphenamine – the first magic bullet’, *J. R. Soc. Med.*, vol. 102, no. 8, pp. 343–348, Aug. 2009, doi: 10.1258/jrsm.2009.09k036.
- [6] A. Fleming, ‘On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*’, *Br. J. Exp. Pathol.*, vol. 10, no. 3, pp. 226–236, Jun. 1929.
- [7] E. P. Abraham *et al.*, ‘FURTHER OBSERVATIONS ON PENICILLIN’, *The Lancet*, vol. 238, no. 6155, pp. 177–189, Aug. 1941, doi: 10.1016/S0140-6736(00)72122-2.
- [8] R. F. Seipke, M. Kaltenpoth, and M. I. Hutchings, ‘*Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme?’, *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 36, no. 4, pp. 862–876, Jul. 2012, doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00313.x.
- [9] K. Blin *et al.*, ‘antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline’, *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. W1, pp. W81–W87, Jul. 2019, doi: 10.1093/nar/gkz310.
- [10] S. P. Chakraborty, P. Pramanik, and S. Roy, ‘A REVIEW ON EMERGENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANT *Staphylococcus aureus* AND ROLE OF CHITOSAN NANOPARTICLE IN DRUG DELIVERY’, *Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 1, p. 20, 2012.
- [11] E. Etebu and I. Ariekpar, ‘Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives’, p. 12.
- [12] J. M. Munita and C. A. Arias, ‘Mechanisms of Antibiotic Resistance’, *Microbiol. Spectr.*, vol. 4, no. 2, p. 4.2.15, Mar. 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- [13] E. Etebu, ‘Potential panacea to the complexities of Polymerase Chain Reaction (PCR)’, *Adv. Life Sci. Technol.*, vol. 13, pp. 53–59, Jan. 2013.

- [14] W. Hong, J. Zeng, and J. Xie, 'Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs', *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 4, no. 4, pp. 258–265, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.apsb.2014.06.012.
- [15] L. Katz and G. W. Ashley, 'Translation and protein synthesis: macrolides', *Chem. Rev.*, vol. 105, no. 2, pp. 499–528, Feb. 2005, doi: 10.1021/cr030107f.
- [16] C. R. Chen, M. Malik, M. Snyder, and K. Drlica, 'DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage', *J. Mol. Biol.*, vol. 258, no. 4, pp. 627–637, May 1996, doi: 10.1006/jmbi.1996.0274.
- [17] K. P. Talaro and B. Chess, *Foundations in microbiology*, 8. New York: McGraw-Hill Education.
- [18] 'Farmakochemie (strana 005/450)'. http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-978-80-7080-639-5/pages-pdf/005.html (accessed May 03, 2022).
- [19] S. E. Jørgensen and B. Halling-Sørensen, 'Drugs in the environment', *Chemosphere*, vol. 40, no. 7, pp. 691–699, Apr. 2000, doi: 10.1016/S0045-6535(99)00438-5.
- [20] H. Dolliver, K. Kumar, and S. Gupta, 'Sulfamethazine Uptake by Plants from Manure-Amended Soil', *J. Environ. Qual.*, vol. 36, no. 4, pp. 1224–1230, Jul. 2007, doi: 10.2134/jeq2006.0266.
- [21] M. Conde-Cid *et al.*, 'Occurrence of tetracyclines and sulfonamides in manures, agricultural soils and crops from different areas in Galicia (NW Spain)', *J. Clean. Prod.*, vol. 197, pp. 491–500, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.06.217.
- [22] F. Liu, G.-G. Ying, R. Tao, J.-L. Zhao, J.-F. Yang, and L.-F. Zhao, 'Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities', *Environ. Pollut. Barking Essex 1987*, vol. 157, no. 5, pp. 1636–1642, May 2009, doi: 10.1016/j.envpol.2008.12.021.
- [23] L. Lin *et al.*, 'Potential effect and accumulation of veterinary antibiotics in *Phragmites australis* under hydroponic conditions.', *Ecol. Eng.*, vol. 53, pp. 138–143, 2013.
- [24] O. Opreș, F. Copaciu, M. Loredana Soran, D. Ristoiu, U. Niinemets, and L. Copolovici, 'Influence of nine antibiotics on key secondary metabolites and physiological characteristics in *Triticum aestivum*: leaf volatiles as a promising new tool to assess toxicity', *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 87, pp. 70–79, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.09.019.
- [25] O. Sköld, 'Sulfonamide resistance: mechanisms and trends', *Drug Resist. Updat.*, vol. 3, no. 3, pp. 155–160, Jun. 2000, doi: 10.1054/drup.2000.0146.
- [26] 'DrugBank | Powering health insights with structured drug data'. <https://www.drugbank.com/> (accessed Mar. 11, 2022).
- [27] Connor, Erin E. 1998. 'Sulfonamide Antibiotics'. *Primary Care Update for OB/GYNS* 5 (1): 32–35. [https://doi.org/10.1016/S1068-607X\(97\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S1068-607X(97)00121-2).
- [28] M. Keisu, B.-E. Wiholm, and J. Palmblad, 'Trimethoprim-sulphamethoxazole-associated blood dyscrasias. Ten years' experience of the Swedish spontaneous reporting system', *J.*

Intern. Med., vol. 228, no. 4, pp. 353–360, Oct. 1990, doi: 10.1111/j.1365-2796.1990.tb00245.x.

- [29] J. E. Lesch, *The First Miracle Drugs: How the Sulfa Drugs Transformed Medicine*. 198 Madison Avenue, New York, New York 10016: Oxford University Press, 2007. [Online]. Available: <https://www.thevespiary.org/rhodium/Rhodium/Vespiary/talk/files/5876-the-first-miracle-drugs-how-the-sulfa-drugs-transformed-medicine0a94.pdf>
- [30] R. K. Sahu, B. Singh, S. A. Saraf, G. Kaithwas, and K. Kishor, ‘Photochemical toxicity of drugs intended for ocular use’, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.*, vol. 65, no. 2, pp. 157–167, Jun. 2014, doi: 10.2478/10004-1254-65-2014-2461.
- [31] Y. Chen, P. R. D. Murray, A. T. Davies, and M. C. Willis, ‘Direct Copper-Catalyzed Three-Component Synthesis of Sulfonamides’, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 140, no. 28, pp. 8781–8787, Jul. 2018, doi: 10.1021/jacs.8b04532.
- [32] Y. Zhang *et al.*, ‘Degradation of sulfonamides antibiotics in lake water and sediment’, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 20, no. 4, pp. 2372–2380, Apr. 2013, doi: 10.1007/s11356-012-1121-8.
- [33] K. Kokoszka, J. Wilk, E. Felis, and S. Bajkacz, ‘Application of UHPLC-MS/MS method to study occurrence and fate of sulfonamide antibiotics and their transformation products in surface water in highly urbanized areas’, *Chemosphere*, vol. 283, p. 131189, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131189.
- [34] D. Lee, J.-C. Lee, J.-Y. Nam, and H.-W. Kim, ‘Degradation of sulfonamide antibiotics and their intermediates toxicity in an aeration-assisted non-thermal plasma while treating strong wastewater’, *Chemosphere*, vol. 209, pp. 901–907, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.06.125.
- [35] J. O’NEILL, ‘TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS’. Wellcome Trust, May 2016.
- [36] C. J. Murray *et al.*, ‘Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis’, *The Lancet*, vol. 399, no. 10325, pp. 629–655, Feb. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [37] Andersson, Dan I. 2006. ‘The Biological Cost of Mutational Antibiotic Resistance: Any Practical Conclusions?’ *Current Opinion in Microbiology* 9 (5): 461–65. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.07.002>.
- [38] ‘Usnesení Evropského parlamentu ze dne 13. září 2018 o Evropském akčním plánu Jedno zdravíproti antimikrobiální rezistenci (AMR) (2017/2254(INI))’, p. 20, 2018.
- [39] M. Vergara-Barberán, Ó. Mompó-Roselló, J. M. Herrero-Martínez, and E. F. Simó-Alfonso, ‘Poly(ethylene glycol) diacrylate based monolithic capillary columns for the analysis of polar small solutes by capillary electrochromatography’, *J. Sep. Sci.*, vol. 41, no. 12, pp. 2632–2639, Jun. 2018, doi: 10.1002/jssc.201800184.
- [40] A. Moga, M. Vergara-Barberán, M. J. Lerma-García, J. M. Herrero-Martínez, and E. F. Simó-Alfonso, ‘Poly(ethylene glycol) diacrylate-based solid-phase extraction for

- determination of sulfonamides in meat samples', *Microchem. J.*, vol. 157, p. 104931, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.104931.
- [41] I. C. S. www.cosmotron.sk s r o- and S. poľnohospodárska knižnica pri S. v Nitre, *Hygiena pôdy*. 2002. Accessed: Apr. 26, 2022. [Online]. Available: https://arl4.library.sk/arl-spu/sk/detail-spu_us_cat-0140011-Hygiena-pody/
- [42] R. Hoff, T. Pizzolato, and S. Díaz-Cruz, 'Trends in sulfonamides and their by-products analysis in environmental samples using mass spectrometry techniques', *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 9, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.teac.2016.02.002.
- [43] J.-P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, and B. Le Bizec, 'The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis', *Anal. Chim. Acta*, vol. 529, no. 1–2, pp. 129–136, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.aca.2004.08.055.
- [44] M. Seifrtová, L. Nováková, C. Lino, A. Pena, and P. Solich, 'An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters', *Anal. Chim. Acta*, vol. 649, no. 2, pp. 158–179, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.aca.2009.07.031.
- [45] J. Pawliszyn and S. Pedersen-Bjergaard, 'Analytical Microextraction: Current Status and Future Trends', *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 44, no. 6, pp. 291–307, Jul. 2006, doi: 10.1093/chromsci/44.6.291.
- [46] N. J. K. Simpson, *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. CRC Press, 2000.
- [47] S. A. Errayess, A. A. Lahcen, L. Idrissi, C. Marcoaldi, S. Chiavarini, and A. Amine, 'A sensitive method for the determination of Sulfonamides in seawater samples by Solid Phase Extraction and UV–Visible spectrophotometry', *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 181, pp. 276–285, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.saa.2017.03.061.
- [48] 'The solid phase extraction process for rapid extraction of PAHs in... | Download Scientific Diagram'. https://www.researchgate.net/figure/The-solid-phase-extraction-process-for-rapid-extraction-of-PAHs-in-water-samples_fig1_257793492 (accessed May 03, 2022).
- [49] R. Perestrelo *et al.*, 'QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends', *Anal. Chim. Acta*, vol. 1070, pp. 1–28, Sep. 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.02.036.
- [50] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, and F. J. Schenck, 'Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce', *J. AOAC Int.*, vol. 86, no. 2, pp. 412–431, Mar. 2003, doi: 10.1093/jaoac/86.2.412.
- [51] Cui, Yahan, Liyan Jiang, Huiyu Li, Di Meng, Yanhua Chen, Lan Ding, and Yang Xu. 2021. 'Molecularly Imprinted Electrospun Nanofibre Membrane Assisted Stir Bar Sorptive Extraction for Trace Analysis of Sulfonamides from Animal Feeds'. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 96 (April): 382–89. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.01.045>.

- [52] M. Ghanjaoui, 'High performance liquid chromatography quality control', *Int. J. Adv. Chem.*, pp. 160–169, Jan. 2020.
- [53] G. Kahsay, H. Song, A. Van Schepdael, D. Cabooter, and E. Adams, 'Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics', *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 87, pp. 142–154, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2013.04.015.
- [54] M.-M. Zheng, M.-Y. Zhang, G.-Y. Peng, and Y.-Q. Feng, 'Monitoring of sulfonamide antibacterial residues in milk and egg by polymer monolith microextraction coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry', *Anal. Chim. Acta*, vol. 625, no. 2, pp. 160–172, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.aca.2008.07.033.
- [55] N. M. Vieno, T. Tuhkanen, and L. Kronberg, 'Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection', *J. Chromatogr. A*, vol. 1134, no. 1–2, pp. 101–111, Nov. 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.08.077.
- [56] C. Hao, L. Lissemore, B. Nguyen, S. Kleywegt, P. Yang, and K. Solomon, 'Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry', *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 384, no. 2, pp. 505–513, Dec. 2005, doi: 10.1007/s00216-005-0199-y.
- [57] D. Perret, A. Gentili, S. Marchese, A. Greco, and R. Curini, 'Sulphonamide Residues in Italian Surface and Drinking Waters: A Small Scale Reconnaissance', *Chromatographia*, vol. 63, no. 5–6, pp. 225–232, Mar. 2006, doi: 10.1365/s10337-006-0737-6.
- [58] M. J. García-Galán, S. Díaz-Cruz, and D. Barceló, 'Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography–electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry', *J. Chromatogr. A*, vol. 1275, pp. 32–40, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2012.12.004.
- [59] C. Li *et al.*, 'Occurrence of antibiotics in soils and manures from greenhouse vegetable production bases of Beijing, China and an associated risk assessment', *Sci. Total Environ.*, vol. 521–522, pp. 101–107, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.070.
- [60] J. Hou *et al.*, 'Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China', *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 22, no. 6, pp. 4545–4554, Mar. 2015, doi: 10.1007/s11356-014-3632-y.
- [61] M. Bourdat-Deschamps, S. Leang, N. Bernet, J.-J. Daudin, and S. Nélieu, 'Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction', *J. Chromatogr. A*, vol. 1349, pp. 11–23, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.05.006.
- [62] Y. M. Awad *et al.*, 'Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility', *Environ. Earth Sci.*, vol. 71, no. 3, pp. 1433–1440, Feb. 2014, doi: 10.1007/s12665-013-2548-z.

- [63] M. Sollicec, A. Roy-Lachapelle, M.-O. Gasser, C. Coté, M. Génèreux, and S. Sauvé, 'Fractionation and analysis of veterinary antibiotics and their related degradation products in agricultural soils and drainage waters following swine manure amendment', *Sci. Total Environ.*, vol. 543, pp. 524–535, Feb. 2016, doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.11.061.
- [64] X. Pan, Z. Qiang, W. Ben, and M. Chen, 'Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China', *Chemosphere*, vol. 84, no. 5, pp. 695–700, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.03.022.
- [65] V. K. Balakrishnan, K. N. Exall, and J. M. Toito, 'The development of a microwave-assisted extraction method for the determination of sulfonamide antibiotics in sediments and soils', *Can. J. Chem.*, vol. 92, no. 5, pp. 369–377, May 2014, doi: 10.1139/cjc-2013-0457.
- [66] N. F. Tetzner, M. G. Maniero, C. Rodrigues-Silva, and S. Rath, 'On-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a powerful technique for the determination of sulfonamide residues in soils', *J. Chromatogr. A*, vol. 1452, pp. 89–97, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.034.
- [67] L. Chen *et al.*, 'On-line coupling of dynamic microwave-assisted extraction to solid-phase extraction for the determination of sulfonamide antibiotics in soil', *Anal. Chim. Acta*, vol. 648, no. 2, pp. 200–206, Aug. 2009, doi: 10.1016/j.aca.2009.07.010.
- [68] W. Hu, L. Ma, C. Guo, J. Sha, X. Zhu, and Y. Wang, 'Simultaneous extraction and determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides antibiotics in soils using optimised solid phase extraction chromatography-tandem mass spectrometry', *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 92, no. 6, pp. 698–713, May 2012, doi: 10.1080/03067319.2010.520122.
- [69] L. Hang *et al.*, 'Determine Multiple Classes of Veterinary Antibiotics in Soil: Comparing Dispersive and Solid-Phase Extraction for Sample Cleanup', *Chromatographia*, vol. 84, no. 9, pp. 833–844, Sep. 2021, doi: 10.1007/s10337-021-04064-5.
- [70] J. J. da Silva, B. F. da Silva, N. R. Stradiotto, M. Petrovic, P. Gago-Ferrero, and M. Gros, 'Pressurized Liquid Extraction (PLE) and QuEChERS evaluation for the analysis of antibiotics in agricultural soils', *MethodsX*, vol. 7, p. 101171, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.mex.2020.101171.
- [71] G. Schmitt and R. Aderjan, 'Grenzwerte forensisch-toxikologischer und chemischer Analysenverfahren: Kalibriergeradenmethode – Leerwertmethode', *Rechtsmedizin*, vol. 18, no. 1, pp. 65–77, Feb. 2008, doi: 10.1007/s00194-007-0479-2.
- [72] P. Łukaszewicz, J. Kumirska, A. Białk-Bielińska, J. Dołzonek, and P. Stepnowski, 'Assessment of soils contamination with veterinary antibiotic residues in Northern Poland using developed MAE-SPE-LC/MS/MS methods', *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 24, no. 26, pp. 21233–21247, Sep. 2017, doi: 10.1007/s11356-017-9757-z.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATB	Antibiotika
SA	Sulfonamidy
SMX	Sulfamethoxazol
SPD	Sulfapyridin
SSZ	Sulfasalazin
SAA	Sulfacetamid
SDA	Sulfadiazin
STA	Sulfathiazol
SMR	Sulfamerazin
SMT	Sulfamethazin
TMP	Trimethoprim
AMR	Antimikrobiální rezistence
SPE	Extrakce tuhou fází
USE	Extrakce ultrazvukem
MAE	Extrakce v mikrovlnném poli
PSE	Extrakce podporovaná tlakem
LSE	Extrakce kapalina-pevná látka
MASE	Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
SBSE	Sorpční extrakce na míchadlo
MeOH	Methanol
ACN	Acetonitril
EM	Extrakční médium
LoD, LoQ	Mez detekce a stanovitelnosti

HPLC, UPLC	Vysoko/Ultra účinná kapalinová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
ESI	Elektrosprej
GC	Plynová chromatografie
SF, MF	Stacionární a mobilní fáze
SRM	Režim skenu vybraných reakcí
SIM	Režim skenu vybraných iontů
IS	Vnitřní standard
CE	Kapilární elektroforéza
CEC	Kapilární elektrochromatografie
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
MIP	Molekulárně potištěné polymery
PABA	Kyselina 4-aminobenzoová
TC	Tetracykliny
PVP	Proteiny vázající penicilín
LD ₅₀	Letální dávka usmrcující 50 % testovaných
DABCO	1,4-Diazabicyklo[2.2.2]oktan
DP	Degradační produkty
EU	Evropská unie

9 PŘÍLOHY

Tabulka 17: Číselné výsledky průměrné procentuální výtěžnosti SA při optimalizaci vhodného EM

EM	Sulfacetamid	Sulfadiazin	Sulfamerazin	Sulfamethazin	Sulfamethoxazol	Sulfapyridin	Sulfasalazin	Sulfathiazol	Trimethoprim
EM 1	9,88 ±0,24	69 ±5	99 ±5	69 ±2	81,9 ±1,1	69 ±7	LOD	76 ±2	64,4 ±0,9
EM 2	30,2 ±0,9	64 ±3	62,5 ±2,4	38 ±2	63,73 ±1,0	41 ±5	LOD	55,0 ±0,9	52,9 ±0,9
EM 3	42 ±2	65 ±7	56,8 ±0,9	34 ±5	61 ±2	41 ±6	LOD	45 ±5	55,9 ±1,0
EM 4	LOD	72,3 ±1,1	76,13 ±0,03	58 ±4	66 ±7	66,0 ±1,1	LOD	68,9 ±0,8	61 ±3
EM 5	27,1 ±1,0	55 ±3	52,6 ±0,6	34 ±4	53 ±3	34,0 ±1,4	LOD	36 ±3	50 ±3
EM 6	23 ±5	65 ±1	70 ±3	42,9 ±0,3	68 ±8	43 ±3	LOD	56,7 ±0,6	64 ±9
EM 7	14 ±4	31 ±12	29 ±12	20 ±6	36 ±15	19 ±9	LOD	26 ±7	71 ±5
EM 8	18 ±10	52 ±20	60 ±13	40 ±13	61 ±10	37 ±12	LOD	51 ±20	63 ±8
EM 9	16 ±7	77 ±20	96 ±13	62 ±13	75 ±8	85 ±20	LOD	80 ±20	57,9 ±1,2
EM 10	59 ±10	64 ±12	77 ±3	43 ±6	59 ±4	60 ±11	LOD	57 ±8	47 ±7
EM 11	LOD	11 ±2	35,8 ±1,3	26,4 ±0,2	21,3 ±0,9	42 ±3	LOD	36 ±3	62 ±7
EM 12	48 ±5	61,3 ±0,6	69 ±5	32,1 ±0,6	50 ±2	47,6 ±2,4	LOD	49,40 ±2,0	36,4 ±2,3
EM 13	61 ±12	76 ±7	83 ±6	47 ±4	63 ±6	66 ±10	LOD	68 ±11	41 ±6

Tabulka 18: Číselné výsledky průměrné procentuální výtěžnosti SA pro rozdílné SPE kolonky

Výrobce	Sulfacetamid	Sulfadiazin	Sulfamerazin	Sulfamethazin	Sulfamethoxazol	Sulfapyridin	Sulfasalazin	Sulfathiazol	Trimethoprim
Waters	8,7 ±0,9	46 ±1	106 ±2	68 ±4	79,7 ±0,5	80 ±3	LOD	74,1 ±0,6	68 ±1
Chromservis	9,5 ±0,4	55 ±3	108 ±12	84 ±6	92 ±2	90,1 ±2,0	LOD	86,1 ±0,6	68 ±4

Tabulka 19: Číselné výsledky průměrné procentuální výtěžnosti SA při optimalizaci doby naložení vzorku v EM

t (hod.)	Sulfacetamid	Sulfadiazin	Sulfamerazin	Sulfamethazin	Sulfamethoxazol	Sulfapyridin	Sulfasalazin	Sulfathiazol	Trimethoprim
0	9,88 ±0,24	69 ±5	99 ±5	69 ±2	81,9 ±1,1	70 ±7	LOD	76 ±2	64,4 ±0,9
6	1,6 ±0,5	29,7 ±0,7	80 ±20	31 ±4	46 ±9	42 ±6	LOD	40 ±8	51,0 ±0,5
12	1,7 ±0,4	38 ±2	107 ±5	41,8 ±0,9	61,4 ±0,2	61,5 ±0,3	LOD	54,5 ±1,2	56,7 ±0,3
24	0,9 ±0,3	36 ±5	89 ±20	36 ±10	44 ±20	45 ±10	LOD	45 ±13	50,2 ±0,7

Tabulka 20: Číselné výsledky průměrné procentuální výtěžnosti SA při optimalizaci teploty extrakce

T (°C)	Sulfacetamid	Sulfadiazin	Sulfamerazin	Sulfamethazin	Sulfamethoxazol	Sulfapyridin	Sulfasalazin	Sulfathiazol	Trimethoprim
25	9,88 ±0,24	69 ±5	99 ±5	69 ±2	81,9 ±1,1	70 ±7	LOD	76 ±2	64,4 ±0,9
35	1,75 ±0,11	65 ±20	67,2 ±1,2	37 ±11	56 ±11	51 ±20	LOD	54 ±14	48,9 ±2,3
45	LOD	54 ±5	65 ±2	35,8 ±1,4	60,03 ±0,23	46,3 ±0,0	LOD	48 ±3	45,1 ±2,1
55	1,56 ±0,08	58 ±20	29 ±7	29 ±20	30 ±2	45,0 ±2,3	LOD	50 ±20	37,4 ±0,3

Tabulka 21: Číselné výsledky průměrné procentuální výtěžnosti SA při optimalizaci přídavku EDTA

m (g)	Sulfacetamid	Sulfadiazin	Sulfamerazin	Sulfamethazin	Sulfamethoxazol	Sulfapyridin	Sulfasalazin	Sulfathiazol	Trimethoprim
0	9,88 ±0,24	69 ±5	99 ±5	69 ±2	81,9 ±1,1	70 ±7	LOD	76 ±2	64,4 ±0,9
0,6	7 ±3	43 ±5	41 ±3	17,5 ±2,1	36,9 ±1,0	24,1 ±2,3	LOD	28 ±3	32 ±5
1,2	10 ±4	48 ±24	44 ±23	23 ±9	46 ±12	29 ±20	LOD	33 ±20	27,4 ±0,9

Tabulka 22: Číselné výsledky průměrné procentuální výtěžnosti SA při optimalizaci navážky půdy

m (g)	Sulfacetamid	Sulfadiazin	Sulfamerazin	Sulfamethazin	Sulfamethoxazol	Sulfapyridin	Sulfasalazin	Sulfathiazol	Trimethoprim
1	9,88 ±0,24	69 ±5	99 ±5	69 ±2	81,9 ±1,1	70 ±7	LOD	76 ±2	64,4 ±0,9
2	LOD	61 ±20	46 ±9	28 ±5	58 ±4	48 ±5	LOD	59 ±9	43,7 ±1,3

Tabulka 23: Číselné výsledky průměrné procentuální výtěžnosti SA při optimalizaci objemu rozpouštědla po vysušení vzorku

V (ml)	Sulfacetamid	Sulfadiazin	Sulfamerazin	Sulfamethazin	Sulfamethoxazol	Sulfapyridin	Sulfasalazin	Sulfathiazol	Trimethoprim
2	4,3 ±0,5	50 ±6	146 ±3	51,3 ±2,3	50 ±7	85,0 ±0,8	LOD	43 ±2	41 ±4
1	9,88 ±0,24	69 ±5	99 ±5	69 ±2	81,9 ±1,1	70 ±7	LOD	76 ±2	64,4 ±0,9
0,5	LOD	40 ±4	67 ±4	24,9 ±0,3	47 ±6	38,7 ±1,1	LOD	42,0 ±1,4	39,7 ±0,4
0,33	1,9 ±0,6	83 ±20	67 ±2	19,0 ±0,7	56,0 ±1,1	54 ±2	LOD	78 ±20	42 ±4

Tabulka 24: Číselné výsledky průměrné procentuální výtěžnosti SA při optimalizaci koncentrace spiku

V (μl)	Sulfacetamid	Sulfadiazin	Sulfamerazin	Sulfamethazin	Sulfamethoxazol	Sulfapyridin	Sulfasalazin	Sulfathiazol	Trimethoprim
50	2,4 ±0,2	27 ±10	73 ±20	44 ±7	89 ±9	68 ±20	LOD	53 ±20	119,6 ±0,4
100	3,6 ±0,4	27 ±7	63 ±9	36 ±3	66,6 ±2,4	52 ±10	LOD	40 ±6	73 ±11
500	9,88 ±0,24	69 ±5	99 ±5	69 ±2	81,9 ±1,1	70 ±7	LOD	76 ±2	64,4 ±0,9

Tabulka 25: Číselné výsledky průměrné procentuální výtěžnosti SA při použití různých typů půd

Půda	Sulfacetamid	Sulfadiazin	Sulfamerazin	Sulfamethazin	Sulfamethoxazol	Sulfapyridin	Sulfasalazin	Sulfathiazol	Trimethoprim
4632KO	9,88 ±0,24	69 ±5	99 ±5	69 ±2	81,9 ±1,1	70 ±7	LOD	76 ±2	64,4 ±0,9
5017BO	2,8 ±0,8	25,3 ±1,1	49,1 ±1,1	35,6 ±2,4	65 ±3	43,2 ±0,4	LOD	35,0 ±0,7	52 ±6
6019BO	5,1 ±1,2	29 ±5	50 ±8	35 ±5	67 ±5	41,7 ±0,2	LOD	34,5 ±1,1	32,2 ±0,5
7902KO	3,2 ±0,4	24 ±3	53 ±5	41 ±4	69 ±3	49 ±5	LOD	37,1 ±3,6	59,5 ±0,5
8002BO	5,90 ±0,21	27,87 ±0,13	55,7 ±0,8	32,9 ±1,4	58,9 ±0,7	43,1 ±0,4	LOD	33 ±2	44,1 ±1,2