

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**OPTIMALIZACE EXTRAKCE FENBENDAZOLU
Z ENVIRONMENTÁLNÍCH VZORKŮ**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martina Navrátilová

HRADEC KRÁLOVÉ 2023

Denisa Brodská

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení, věnovaný čas a umožnění práce v laboratořích Katedry biochemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Velice děkuji také Mgr. Martině Navrátilové za spoluúčast při výzkumné činnosti, předané zkušenosti a také za veškerou pomoc při zpracování výsledků k této bakalářské práci.

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

V Hradci Králové 2023

Denisa Brodská

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Denisa Brodská

Školitel: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martina Navrátilová

Název bakalářské práce: Optimalizace extrakce fenbendazolu z enviromentálních vzorků

Anthelmintika jsou léky používané k léčbě a profylaxi infekčních onemocnění způsobených parazitickými červy. V České republice se používají především ve veterinární medicíně. Při biotransformaci účinné látky vznikají metabolity, které se vylučují spolu s parentní látkou stolicí a močí. Fenbendazol a další podobné látky se touto cestou mohou vstřebávat do půdy a následně působit na necílové organismy v prostředí. Široké využití má fenbendazol při chovu hospodářských zvířat a jelikož zvířecí exkrementy jsou často dále využívány i k hnojení, riziko obsahu léčivých látek je třeba cíleně zkoumat.

Za tímto účelem bylo zapotřebí vyvinout a optimalizovat extrakční metodu a taktéž provést odpovídající validaci analytické metody, jež budou následně použitelné pro reálné vzorky v životním prostředí. Předmětem samotného výzkumu byla léčivá látka fenbendazol společně s metabolickými produkty, fenbendazol sulfoxidem a fenbendazol sulfonem.

Půda byla extrahována pomocí metody QuEChERS, jenž pracuje na principu extrakce na pevné fázi. Metoda byla rozšířena o d-SPE krok. Pro detekci byla použita chromatografická metoda kombinovaná s analyzátozem s hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS). Tato kombinace je široce využívána při stanovení stopových množství látek ve vzorcích životního prostředí.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Denisa Brodská

Supervisor: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Consultant: Mgr. Martina Navrátilová

Title of bachelor thesis: The optimization of fenbendazole extraction from environmental samples

Anthelmintics are drugs used for the treatment and prophylaxis of infectious diseases caused by parasitic worms. In the Czech Republic, they are mainly used in veterinary medicine. During the biotransformation of the active substance, metabolites are formed, which are excreted together with the parent substance in faeces and urine. Fenbendazole and other similar substances can be absorbed into the soil in this way and subsequently act on non-target organisms in the environment. Fenbendazole is widely used in livestock farming, and since animal excrements are often further used for fertilization, the risk of the content of medicinal substances should be strictly monitored.

For this purpose, it was necessary to develop and optimize the extraction method and also to carry out the corresponding validation of the analytical method, which will subsequently be applicable to real samples in the environment. The assumption of absorption of fenbendazole and its metabolic products, fenbendazole sulfoxide and fenbendazole sulfone, into the soil was the subject of the research itself.

The soil was extracted using the QuEChERS method, which works on the principle of solid-phase extraction. The QuEChERS method included d-SPE step. For detection, a chromatographic method was used combined with a mass spectrometer analyser (UHPLC-MS/MS). This combination is widely used in the determination of trace amounts of substances in environmental samples.

OBSAH

ÚVOD	8
Teoretická část	9
1 Léčiva v životním prostředí.....	9
1.1 Anthelmintika a jejich současná problematika.....	9
1.2 Benzimidazolová anthelmintika.....	12
1.2.1 Fenbendazol	12
2 Analýza v environmentálních vzorcích.....	14
2.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	16
2.1.2 Extrakce na pevnou fázi	16
2.1.2.1 QuEChERS	16
2.2 Kvalitativní a kvantitativní hodnocení zvolených analytů.....	18
2.2.1 UHPLC-MS/MS.....	19
2.2.2 Hmotnostní analyzátor.....	20
2.2.3 Způsob ionizace.....	21
2.2.4 Matricové efekty	22
2.2.4.1 Odstranění matricových efektů	23
2.2.4.2 Hodnocení matricových efektů	24
2.2.4.2.1 Metoda porovnání směrníc kalibračních křivek.....	24
2.2.4.2.2 Metoda postextrakčního přídatku analytu	25
Cíle experimentální části.....	27
Experimentální část.....	28
3 Extrakce vzorků.....	28
3.1 Chemikálie a přístrojové vybavení.....	28
3.1.1 Chemikálie.....	28
3.1.2 Pomůcky.....	28
3.1.3 Přístrojové vybavení.....	28
3.2 Příprava zásobních, pracovních roztoků a extrakčních směsí.....	29
3.2.1 Zásobní roztoky a pracovní roztoky	29

3.2.1.1	Příprava kalibrátorů.....	30
3.2.2	Příprava kontrolní roztoků (QC, Quality Control).....	30
3.2.3	Extrakční a d-SPE směsi.....	30
3.3	Odběr vzorků a jejich předpříprava.....	31
3.4	Vývoj extrakční metody.....	31
3.4.1	Optimalizace extrakčních podmínek.....	31
3.4.2	QuEChERS extrakce pomocí AOAC a EN metody.....	31
3.5	Příprava vzorků před měřením.....	32
3.6	Validace.....	32
3.6.1	Kalibrace.....	33
3.6.2	QC vzorky.....	34
3.6.3	Extrakční výtěžnost.....	34
3.6.4	Matricové efekty.....	34
3.7	UHPLC-MS/MS analýza.....	34
4	Výsledky.....	36
4.1	Optimalizace extrakčních podmínek.....	36
4.1.1.1	QC vzorky.....	36
4.1.1.2	Matricové efekty.....	37
4.1.2	Validace.....	39
4.1.2.1	Kalibrace.....	40
4.1.2.2	Extrakční výtěžnost u AOAC metody.....	40
4.1.2.3	Specifická a retenční čas.....	41
5	Diskuze.....	43
	ZÁVĚR.....	45
	Použité zkratky.....	46
	Seznam tabulek.....	48
	Seznam obrázků.....	49
	Použitá literatura.....	50

ÚVOD

Produkty farmaceutického průmyslu jsou přítomny v každodenním životě téměř na každém rohu a anthelmintika nejsou výjimkou. I přes svůj nezpochybnitelný význam mají tyto látky i svou negativní stranu. Léčivé látky, případně jejich metabolity, se nechtěně dostávají do životního prostředí a této problematice je zapotřebí věnovat pozornost. Léčiva v životním prostředí představují stále větší problém z důvodu stále hojnějšího využívání. S tím souvisí nutnost vyvíjet stále nové metody, které by byly schopné stanovit jednotlivé látky, v ideálním případě několik látek současně včetně produktů jejich metabolismu. Stále totiž chybí úplné znalosti o osudu léčiv a jejich metabolitů v environmentálním prostředí.

Fenbendazol patří mezi hojně využívaná anthelmintika využívaná v chovu hospodářských zvířat, a tedy vhodným místem pro zkoumání potenciálního přestupu této léčivé látky do životního prostředí je právě půda z farem věnujícím se tomuto chovu.

Ačkoli věda a výzkum stále nabývají rozmachu, k dispozici jsou pouze omezené údaje týkající se osudu veterinárních léčiv v životním prostředí obecně a pouze několik článků se zabývá konkrétně osudem anthelmintických léčiv v životním prostředí. Půdaje nepopíratelně velmi složitý systém, a tedy i samotný průkaz jednotlivých látek vyžaduje spolehlivé úpravy. Cílem této experimentální bakalářské práce je vyvinout, respektive optimalizovat metodu úpravy vzorku, extrakce QuEChERS, a následně dle potřeby optimalizovat UHPLC-MS/MS metodu pro závěrečnou analýzu, která bude použitelná pro reálné vzorky půdy ze dvou pilotních farem v Orlických horách.

TEORETICKÁ ČÁST

1 LÉČIVA V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Léčiva představují významnou skupinu nově se objevujících znečišťujících látek životního prostředí (Wojslawski et al. 2019). Přestup léčivých látek, včetně metabolitů, do životního prostředí je kontinuální a masivní, proto je lze považovat za kvaziperzistentní znečišťující látky (Syslová et al. 2019). Tyto látky mohou pocházet jak od léčby lidí, tak i zvířat. Bohužel na rozdíl od léčiv používaných u lidí, jejichž exkrementy procházejí čistíčkami, léčiva používaná na farmách jsou většinou na pastvinách ponechána svému osudu.

Použití léčiv v chovu zvířat způsobuje, že se léčiva následně dostávají do půdního prostředí v exkrementech na pastvinách, případně dále ve zpracovaných hnojivech. V závislosti na jejich chemických vlastnostech mohou být léčiva absorbována do půdy nebo vymyta dešťovými srážkami s následným vstupem do podzemních vod. V rámci sorpce se chemické látky mohou spojovat s pevnými fázemi, jako je půda (Wojslawski et al. 2019). Vzhledem k širokému využívání se očekává, že anthelmintika budou mít zcela jisté dopady na suchozemské a vodní prostředí (Boxall et al. 2004). Pro pochopení problematiky je nutné znát aktuální přehled současného stavu znalostí o globálním významu a převládajících koncentracích léčiv v životním prostředí. Tomu se věnuje ve svém článku Aus Der Beek (2016), kde jednoznačně dochází k závěru, že ačkoli si moderní medicínu již nedovedeme představit bez léčiv, pro životní prostředí jsou dnes již globálním problémem, který je třeba řešit.

1.1 Anthelmintika a jejich současná problematika

Anthelmintické léky mají svou nezastupitelnou funkci v léčbě infekcí způsobených parazitickými červy, helminty. Mezi parazitické červy řadíme ploché červy, motolice a tasemnice, a oblé červy, tj. hlístice. Helminthózy hospodářských zvířat způsobují značnou morbiditu i mortalitu, které se mohou v chovech projevit značnými ekonomickými ztrátami (Bártíková et al. 2016, Horvat et al. 2012).

Anthelmintická léčiva jsou dělena do podskupin podle způsobu působení, a především podle jejich molekulární struktury. Dělí se na benzimidazoly, difenylsulfidy, imidazothiazoly, hexahydropyraziny, makrocyclické laktony, salicylanilidy,

tetrahydropyrimidiny a další (Horvat et al. 2012). Léčiva, která v organismu rychle metabolizují, nebo se rychle vylučují, nejsou vhodná pro profylaxi (Čatár et al. 1991). Účinná antiparazitická léčba závisí na schopnosti léčivé látky dosáhnout vysokých, účinných a trvalých koncentrací v parazitech (Capece et al. 2009). Některá anthelmintika působí bezprostředně, jiná až svými metabolity, které se vytvoří v organismu hostitele. Účinnost do jisté míry závisí i na způsobu podání (Čatár et al. 1991). Léčivo může být podáno parenterální cestou (lokálně, injekčně), či enterální cestou. Enterální cesta podávání léčiv je obecně využívanější. Při výběru je však nutné zohlednit počet ošetřovaných zvířat, množství podávaných léčiv a taktéž způsob podání, respektive zda bude léčivo podáváno individuálně či hromadně. Lékových forem pro enterální podávání léčiv je celá řada a zahrnuje např. tablety, kapky, enterální pasty, suspenze, či premix ve formě granulátu nebo prášku. U perorálního způsobu podání látka podléhá kyselému prostředí žaludku, a tedy je zapotřebí, aby tomu bylo léčivo uzpůsobené (Ducháček a Lamka 2014).

Anthelmintika se podávají velkému množství zvířat v zemědělství a akvakultuře a tvoří tak velkou část farmaceutického průmyslu (Bártíková et al. 2016, Horvat et al. 2012). Vylučování léčiv nebo jejich metabolitů močí a výkaly hospodářských zvířat dávají možnost přestupu těchto látek do životního prostředí (Kummerer 2010, Bártíková et al. 2016, Horvat et al. 2012). Podávání anthelmintik v rámci intenzivních chovů hospodářských zvířat je pravděpodobně hlavním vstupem těchto léčiv do životního prostředí, stejně je tomu i v případě chovu ryb. Tyto dvě odvětví postupně kontaminují jak půdu, tak vodu (Bártíková et al. 2016, Horvat et al. 2012). V případě, že látky nejsou vázány na půdní složky, mohou se dostat do spodní vody. V případě silných dešťů se mohou taktéž dostat do povrchových vod (Kummerer 2010).

Anthelmintika jsou zároveň tématem v oblasti rezistence. Anthelmintická rezistence je definována jako geneticky přenášená ztráta citlivosti na léčivou látku (Köhler 2001). Hlavní příčinou vzniku rezistence je plošné používání, poddávkování a opakované používání léčiv ze stejné skupiny anthelmintik. To vše vede k rezistenci, která vážně ohrožuje účinnou kontrolu infekcí helminty (Sangster et al. 1999). Tento fakt však neřeší druhý hlavní problém, sice přenos léčiva do půdy a vody a následné ovlivňování jiných organismů nejen z řad rostlin, ale i živočichů konzumujících zasažené rostliny i vodu.

Anthelmintické léky, stejně jako jiná léčiva, začínají být čím dál více spojovány i s určitou mírou toxicity pro necílové organismy (Wagil et al. 2015). A to přímo prostřednictvím exkrementů obsahujících parentní látku a metabolity ponechaných na pastvinách nebo vystavením kontaminovanému prostředí vlivem hnojení (Jjemba 2006, Podlipná et al. 2013, Navrátilová et al. 2020). Do životního prostředí se tímto způsobem může dostat přímo nezměněná parentní forma sloučeniny, stejně tak ale i její metabolity, které mohou mít zachovanou antiparazitickou aktivitu.

Při vstupu do půdního prostředí mohou být dále léčiva vystavena biotransformačním procesům díky společenstvu půdních mikroorganismů, které mohou léčiva dále transformovat na méně bioaktivní sloučeniny, popřípadě kompletně mineralizovat. Mikroorganismy tak mají klíčovou roli při snižování expozice životního prostředí chemickými kontaminanty. Obecně platí, že samotný průběh biotransformace kontaminantu závisí na skupině několika faktorů (Fenner et al. 2021). Kromě schopností příslušného společenstva mikroorganismů mají svůj vliv i koncentrace jednotlivých látek a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti (Wojslawski 2019, Horvat et al. 2012, Capece et al. 2009, Fenner et al. 2021) spolu s environmentálním hlediskem a klimatickými podmínkami stanoviště (Horvat et al. 2012, Fenner et al. 2021). Výsledné množství anthelmintik vstupujících do ekosystému bude záviset i na systémech způsobu chovu a hustotě osazení zvířat, která jsou daným lékem léčena. V kombinaci s časovým hlediskem a frekvencí aplikace budou všechny tyto faktory ovlivňovat perzistenci anthelmintik. Ovlivnění budou tedy i volně žijící parazité (Horvat et al. 2012).

V současnosti se léčiva obecně stala jedním z nejvíce znepokojujících kontaminantů z důvodu jejich neustále rostoucí koncentrace v životním prostředí, včetně vody, půdy, rostlin a živočichů (Syslová et al. 2019, Horvat et al. 2012). Povědomí o přítomnosti léčiv v životním prostředí spolu s určitými důkazy o účincích ukazuje důležitost zavedení preventivních opatření ke snížení uvolňování léčiv do životního prostředí a taktéž důležitost propagace udržitelné farmacie. Léčiva, stejně jako další mikropolutanty, kterými jsou například produkty osobní péče, dezinfekční prostředky či pesticidy, byla díky stále se zvyšující citlivosti analytických přístrojů a používaných metod nalezena v nízkých koncentracích v prostředí (Kummerer 2010). Stejně jako je věnována pozornost léčivým látkám a metabolitům

ve vodním prostředí ve článku Kummerera (2010), obdobná situace se očekává u analýzy půdy těmito léčivým látkám vystavené.

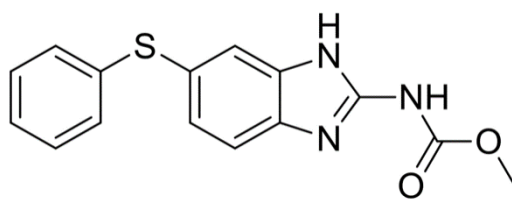
1.2 Benzimidazolová anthelmintika

Benzimidazolová anthelmintika jsou největší a nejhojněji užívanou chemickou skupinou léčiv používanou k léčbě endoparazitárních onemocnění domácích zvířat (Horvat et al. 2012). Zavedení benzimidazolových anthelmintik bylo velkým pokrokem v léčbě gastrointestinálních parazitů pro celou veterinární praxi (Capece et al. 2009).

Přítomnost benzimidazolového jádra slouží jako podstata antiparazitika, zároveň figuruje i jako centrální složka antimikrobiálních látek, antivirotik, protirakovinných a protizánětlivých látek, antioxidantů, antihypertenziv, antikoagulancií, imunomodulátorů, hormonálních modulátorů, stimulantů CNS i tlumidel, modulátorů hladiny lipidů, antidiabetik atd. Zároveň si drží stále svou roli i při vývoji léčiv nových (Bansal a Silakari 2012). U hemininthů benzimidazoly působí selektivní vazbou s vysokou afinitou k β podjednotce mikrotubulového proteinu (Köhler 2001). V posledních letech se užívání těchto léků zvýšilo, což má za následek již zmíněnou přítomnost v životním prostředí a s ní spojené možné negativní účinky na biotu (Wagil et al. 2015).

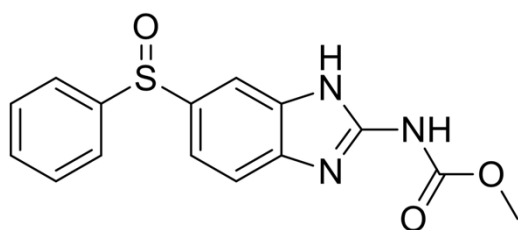
1.2.1 Fenbendazol

Fenbendazol (FBZ), celým názvem methyl N-(6-fenylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl)karbamát, je zástupce třídy benzimidazolových anthelmintik. Jedná se o bílý, krystalický prášek slabě rozpustný ve vodě. Při podávání širokospektrálního fenbendazolu zvířatům se parentní látka společně s jejími metabolity vylučují hlavně stolicí a močí (Gokbulut et al. 2006, Baeder 1974). Fenbendazol touto cestou může, stejně jako jiné látky farmaceutického průmyslu, významně ovlivňovat mnoho fyziologických a metabolických procesů nejen v rostlinách (Syslová et al. 2019, Horvat et al. 2012). Z toho důvodu by měla být omezena kontaminace ekosystémů hnojem obsahujícím toto anthelmintikum.

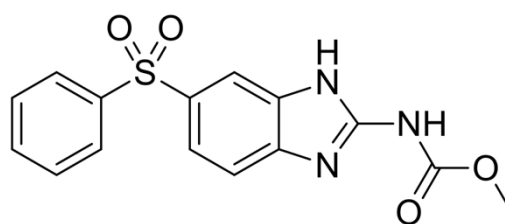


Obr. 1 Fenbendazol

Hlavními metabolity jsou aktivní fenbendazol sulfoxid (FBZ-SO) a jeho neaktivní derivát fenbendazol sulfon (FBZ-SO₂) (Horvat et al. 2012, Capece et al. 2009).



Obr. 2 Fenbendazol sulfoxid



Obr. 3 Fenbendazol sulfon

2 ANALÝZA V ENVIRONMENTÁLNÍCH VZORCÍCH

Koncentrace anthelmintik v životním prostředí se pohybuje v rozmezí ng/l– μ g/l u vzorků vody nebo ng/g u pevných vzorků, v závislosti na matricích vzorku (Kataoka 2003). Množství pesticidů a obecně látek cizích, které se adsorbují do půdy, závisí na konkrétních vlastnostech konkrétní látky. Jedná se o vlhkost, pH, ale i o množství organické hmoty, kterou půda obsahuje, např. pesticidy jsou podle výzkumů silně adsorbovány na půdách s vysokým obsahem jílu nebo organické hmoty, ale ne tolik na písčitých půdách (Pszczolińska et al. 2016). Analýza léčivých látek je komplikovanou činností, protože matrice kromě farmakologicky aktivní sloučeniny obsahuje i další sloučeniny s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Nejčastěji jde o bílkoviny, soli, kyseliny, zásady, nebo i organické sloučeniny s vlastnostmi podobnými zkoumaným analytům (Szultka et al. 2014, Kataoka 2003, Hammad et al. 2022).

Analyty ve vzorcích je proto třeba před instrumentální analýzou extrahovat z příslušné matrice a koncentrovat (Kataoka 2003, Pinto et al. 2010), ideálně se současným odstraněním interferujících látek (Pinto et al. 2010). Příprava vzorku je tedy prvním a zároveň klíčovým krokem, který má významný vliv na kvalitu, úspěšnost i rychlost analýzy komplexních vzorků (Hammad et al. 2022, Szultka et al. 2014, Kataoka 2003, Pszczolińska et al. 2016). Extrakce a analýza jednotlivých sloučenin přítomných v komplexních matricích, které se vyskytují zejména v nízkých koncentracích, představuje významnou analytickou výzvu (Kataoka 2003). Volba způsobu přípravy vzorku do značné míry závisí na typu a složitosti matrice. Voda je obecně méně komplikovanou matricí v porovnání se vzorky sedimentů nebo půdy. Volba přípravy vzorku souvisí také se zvolenou metodou detekce (Pinto et al. 2010). Při kvalitativním i kvantitativním stanovení cílových látek je tedy rozhodující výběr správného postupu přípravy vzorku, jelikož i navzdory pokroku ve vývoji analytických přístrojů nelze pracovat přímo s komplexní matricí. Dobře připravené vzorky tak pomáhají zlepšit citlivost a selektivitu tím, že kromě ochrany analytických přístrojů zlepšují případnou chromatografickou separaci a následnou detekci (Hammad et al. 2022, Szultka et al. 2014, Kataoka 2003, Gilbert- López et al. 2009). V ideálním případě by techniky přípravy vzorků měly být snadno použitelné, rychlé, levné a zároveň kompatibilní s více analytickými přístroji.

Obecně je analytický proces rozdělen do pěti kroků, kterými jsou vzorkování, příprava vzorku, separace, detekce a analýza dat (Kataoka 2003).

Poměrně běžnou formou úpravy vzorku před použitím chromatografických technik je extrakce. Tento krok úpravy vzorku je nezbytný z různých důvodů, včetně již zmíněného odstranění potenciálních interferujících sloučenin, zakonzcentrování a stabilizace všech cílových analytů, uvedení vzorku do kompatibilních podmínek pro analýzu (Hammad et al. 2022, Szultka et al. 2014). Příprava vzorku může trvat až 80 % celkové doby analýzy (Szultka et al. 2014, Kataoka 2003).

Extrakce je separační proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze. Extrakce je založena na rozdílech fyzikálních a chemických vlastností. Patří mezi ně rozpustnost, polarita nebo těkavost (Pszczolińska et al. 2016).

Pro extrakci je velice důležité zvolit vhodné rozpouštědlo (extrakční činidlo), aby během procesu extrakce přecházely extrahované látky do fáze rozpouštědla. Jelikož nároky na postup přípravy vzorku spočívají ve vysoké opakovatelnosti a výtěžnosti cílových analytů, doporučenou vlastností extrakčního činidla je jeho dobrá selektivita, tedy možnost oddělení pouze potřebné složky směsi (Míka a Neužil 1999, Szultka et al. 2014). Výhodou extrakce jako takové bezpochyby zůstává i nízká cena a dobrá dostupnost (Míka a Neužil 1999). Pro úspěšné stanovení látek i jejich metabolitů v reálném vzorku je klíčová vhodná extrakční technika. Měla by být taková, aby se výtěžnost blížila 100 % a zároveň, aby bylo ze vzorku odstraněno co nejvíce interferujících látek (Gilbert-López et al. 2009).

Mezi nejrozšířenější úpravy vzorku patří: přímá extrakce do rozpouštědla, srážení proteinů (ang. Protein precipitation, PP), extrakce kapalina-kapalina (ang. Liquid- Liquid extraction, LLE) a extrakce na pevnou fázi (ang. Solid- Phase extraction, SPE) (Szultka et al. 2014, Nováková et al. 2021b). Volba metody je dána kromě fyzikálních a chemických vlastností analytů i typem matrice, tedy zda se jedná o biologické vzorky, vodu, nebo půdu. Svůj vliv má i již zmiňovaná metoda analýzy (Szultka et al. 2014). Extrakční techniky LLE a SPE, včetně jejich rozdílů, budou dále přiblíženy.

Poměrně hojně se používají i automatizované systémy přípravy vzorků ve spojení s jednou z těchto technik nebo jejich kombinací (Kataoka 2003).

2.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny-kapaliny (LLE) patří mezi široce používané techniky přípravy vzorků. Tato tradiční extrakce však čelí i několika omezením, zejména v oblasti vhodného výběru rozpouštědla, které je nemísitelné se vzorkem. Obtíže mohou nastat také při extrakci polárních a iontových sloučenin z vody, a to kvůli hydrofobní povaze organických rozpouštědel používaných jako extrakční činidla. Další omezení spočívá v potřebě poměrně velkých objemů již zmíněného organického rozpouštědla, kterým bývá nejčastěji chloroform, ethylacetát, nebo ether, což vede k výslednému zředění extraktu (Kataoka 2003, Hammad et al. 2022).

2.1.2 Extrakce na pevnou fázi

Extrakce kapalina-pevná fáze (SPE) je založena na rozdělení sloučenin mezi kapalnou (vzorkovou) fází a pevnou (extrakční) fází. Mezi těmito dvěma fázemi ovlivňují retenci a eluci jednotlivé mezimolekulární síly. SPE nabízí oproti LLE výhody v podobě účinnější koncentrace, menšího množství použitých organických rozpouštědel, zároveň nedochází k problémům s možným pěněním či tvorbou emulzí. SPE většinou vyžaduje i kratší dobu přípravy vzorku a poskytuje snazší provoz i možnost zapojení do automatizovaného procesu. V současnosti je dostupná široká škála sorbentů SPE pro přizpůsobení se jednotlivým interakcím (Kataoka 2003).

2.1.2.1 *QuEChERS*

Tato metoda, jenž nese název QuEChERS, byla vyvinuta za účelem zjednodušení poměrně komplikovaného a časově náročného postupu při úpravách vzorků. Název QuEChERS odráží hlavní výhody této metody, tedy provedení rychlé, snadné, levné, efektivní, robustní a bezpečné („Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe“). Metoda QuEChERS byla zavedena Anastassiadesem et al. (2003) jako nový přístup k extrakci široké škály pesticidů z různých potravinových matric s vysokým obsahem vody. Tato metoda, původně vyvinutá právě pro stanovení pesticidů v ovoci a zelenině, je principiálně založená na extrakci acetonitrilem (ACN) a pufrovacími solemi, po níž následuje krok disperzní SPE (d-SPE) (Anastassiades et al. 2003, Pinto et al. 2010). Metoda jednak vynechává nebo nahrazuje některé ze složitých analytických kroků používaných v tradičních metodách, jednak poskytuje vysoce kvalitní výsledky, vyžaduje nízkou spotřebu rozpouštědel

a je spojena i s relativně nízkými náklady na analýzu vzorku (Pszczolińska et al. 2016). Cílem této poměrně mladé metody je umožnit rychlou analýzu i při vyšším počtu vzorků, a to s použitím menšího množství organického rozpouštědla, kterým je nejčastěji ACN (Anastassiades et al. 2003).

Postupně byla metoda upravována a ukázala se jako účinná i pro analýzu chemických sloučenin v půdě (Pinto et al. 2010, Pszczolińska et al. 2016) a to včetně typů půd s různými fyzikálními a chemickými vlastnostmi (Pszczolińska et al. 2016). Vzorky půdy se, na rozdíl od ovoce a zeleniny, liší v mnoha aspektech. Nemají například tak vysoký obsah sloučenin lipidové povahy, nebo obsah vody (Pinto et al. 2010). V QuEChERS jde převážně o extrakce polárních a zásaditých těkavých, případně polotěkavých sloučenin (Pinto et al. 2010, González-Curbelo et al. 2015). Své uplatnění metoda našla i v analýze polycyklických aromatických uhlovodíků, mykotoxinů a pesticidů (González-urbelo et al. 2015). Sloučeniny, jako jsou léčiva na principu β -laktamových antibiotik nebo veterinární léčiva, byly již také stanovovány pomocí QuEChERS. Na základě těchto poznatků a zkušeností je velký zájem o vývoj nových aplikací a modifikací této metody (Pinto et al. 2010).

K prvotním kroku se využívá ACN, a to díky svým výhodám, kterými jsou snadné oddělování od vody v přítomnosti bezvodého $MgSO_4$, který odstraňuje zbytkovou vodu zbývající v organické fázi a zároveň je prakticky nerozpustný v ACN. Po počáteční jednofázové extrakci s ACN se ke vzorku přidají soli za účelem oddělení jednotlivých fází (Pszczolińska et al. 2016). Soli $MgSO_4$ a $NaCl$ tvoří základ pro původní metodu, která zajišťuje vysokou výtěžnost spíše polárních látek (González-Curbelo et al. 2015).

Postupně začala být původní metoda QuEChERS upravována, jelikož cílem je opět metodu optimalizovat, aby se zlepšila stabilita analytu a kvalita extraktu (Pszczolińska et al. 2016, Pinto et al. 2010, González-Curbelo et al. 2015). Byly zavedeny mimo jiné modifikace použitím různých pufovacích roztoků pro zajištění účinné extrakce sloučenin závislých na pH bez hrozby degradace některých látek (Pinto et al. 2010, Pszczolińska et al. 2016) nebo přidáním vody do vzorků s jejím nízkým obsahem (Pinto et al. 2010). Dvě upravené verze původní metody byly přijaty autoritami jako jsou AOAC INTERNATIONAL (Association of Official Analytical Chemists), dále jen AOAC, a Evropského výboru pro normalizaci (European Committee for Standardization), dále jen EN. Modifikované QuEChERS zlepšily

výtěžnost, snížily hrozbu degradace a snížily i ovlivnění případnými matricovými efekty (Pszczolińska et al. 2016).

Po extrakci ACN a příslušnými solemi následuje již zmíněná extrakce kapalina-pevná fáze, nazývaná disperzní SPE, zkráceně d-SPE. D-SPE je v metodě QuEChERS jednoduchý přístup k čištění pro odstranění dalších zbývajících interferencí matrice (Anastassiades et al. 2003, Díez et al. 2006, Lehotay et al. 2010). D-SPE je založeno na původní metodice SPE s rozdílem, že sorbent se přidává přímo do extraktu (Pszczolińska et al. 2016, Díez et al. 2006, Lehotay et al. 2010). Pro d-SPE jsou tři nejpoužívanější pevné sorbenty, primární-sekundární amin (PSA), oktyldecylsilan (C18) a grafitizovaný uhlík (GCB) (Pszczolińska et al. 2016, Pinto et al. 2010). Nejčastěji využívaný je PSA v kombinaci s bezvodým MgSO₄, který má stejně jako u kroku extrakce pomocnou funkci (Anastassiades et al. 2003, Díez et al. 2006, Lehotay et al. 2010). PSA účinně odstraňuje mastné kyseliny, cukry a některé další matricové koextrakce, které tvoří vodíkové vazby (Díez et al. 2006, Lehotay et al. 2010).

Adsorpční kapacita půd, a tedy následná účinnost extrakce, by mohla být dle předpokladů silně ovlivněna typem půdy, respektive obsahem písku, jílu a organické hmoty (Pinto et al. 2010, Pszczolińska et al. 2016). Proto se Pinto et al. (2010) této domněnce ve svém výzkumu intenzivně věnoval, aby získané výsledky mohly být vztaženy na většinu půd. Jako závěr svého výzkumu uvádí, že pokud jde o dva různě složité vzorky půdy, extrakční účinnost je i přes tuto skutečnost velmi podobná a výtěžnost zjištěná u obou typů půd nevykazovala žádné významné rozdíly. Toto zjištěné chování posiluje myšlenku, že vazba sloučenin na půdu, respektive obsah organické hmoty, není určujícím parametrem v procesu extrakce (Pinto et al. 2010).

2.2 Kvalitativní a kvantitativní hodnocení zvolených analytů

Problémy při získávání spolehlivých kvantitativních a kvalitativních údajů závisí na přístrojovém vybavení i na přípravě vzorků (Loos et al. 2016). Pro složitější vzorky, jako jsou enviromentální nebo biologické matrice, které obsahují vysoké množství potenciálně interferujících komponent, je metodou první volby spojení separační techniky a specifického detektoru (Nováková et al. 2021a). Hojně využívaným spojením

je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) (Nováková et al. 2021a, Loos et al. 2016). Toto spojení se obecně používá dále v kombinaci s ionizací elektrosprejem a s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (Mano a Goto 2003, Loos et al. 2016). Pouze hmotnostní analyzátor může provést potvrzení identity zkoumané sloučeniny na základě její molekulové hmotnosti a strukturně specifických fragmentů. Hmotnostní analyzátor zároveň poskytuje vysoce citlivé kvantitativní stanovení (Nováková et al. 2021a, Mano a Goto 2003) a to za pomoci interních standardů (IS), které jsou pro toto stanovení ideální volbou (Nováková et al. 2021a). Izotopicky značené standardy slouží ke korekci chyb přístrojového i lidského charakteru.

2.2.1 UHPLC-MS/MS

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem má dnes široké uplatnění (Klapková et al. 2011), klíčové je i v analýze složitějších vzorků, jako jsou biologické nebo enviromentální matrice (Trufelli et al. 2010, Mano a Goto 2003).

Na základě HPLC byla vyvinuta inovativní technika ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) založená na použití náplní stacionární fáze s menšími částicemi (menšími než 2 μm) a technologickým systémem umožňujícím zvládat vyšší zpětný tlak generovaný při použití takovýchto stacionárních fází. Díky zmenšení částic lze dosáhnout vyššího rozlišení a citlivosti, kratší doby analýzy a vyššího poměru signálu k šumu (Gosetti et al. 2010, Fekete et al. 2014, Borovcová et al. 2019). UHPLC v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií je vynikajícím analytickým nástrojem pro vícereziduální stanovení léčiv, toxinů a pesticidů v environmentálních vzorcích (Gosetti et al. 2010). Vhodnými mobilními fázemi jsou pro toto spojení těkavá rozpouštědla, zejména ACN a methanol (MeOH), ke kterým lze případně přidat i těkavá aditiva, kterými mohou být např. kyselina mravenčí, kyselina octová či pufr octanu a mravenčanu amonného (Nováková et al. 2021a).

Ionty vytvořené v iontovém zdroji jsou urychlovány přidáním energie a následně jsou transportovány do hmotnostního analyzátoru (Mano a Goto 2003). Hmotnostní spektrometrie (MS) jako taková umožňuje určit molekulovou hmotnost

molekul a jejich částí po převedení na ionty ionizací. Následně dochází k rozlišení jednotlivých iontů na základě poměru hmotnosti a náboje (Nováková et al. 2021a, Klapková et al. 2011, Holčapek 2001). Kvantitativní farmaceutická analýza je dnes často prováděna právě pomocí MS (Loos et al. 2016). Existují obecně dva přístupy k dosažení vyšší citlivosti v analýze MS. Prvním z nich je zvýšit množství iontů zlepšením ionizace, druhým je zdokonalit rozlišení signálu od šumu. Zejména tento druhý uvedený způsob je významný pro vývoj metod kvantitativního stanovení v komplexních vzorcích (Mano a Goto 2003).

Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum reprezentující záznam relativních intenzit jednotlivých iontů, které informuje o molekulové hmotnosti i o struktuře látek (Nováková et al. 2021a, Klapková et al. 2011). Hmotnostní spektra se však mohou za určitých okolností výrazně lišit, konkrétně podle použité ionizačního zdroje, typem analýzy i typu hmotnostního spektrometru (Nováková et al. 2021a). Pro porovnávání hmotnostních spekter existuje několik knihoven spekter a databází, které se rozlišují podle typu použité ionizační techniky. Mezi nejpoužívanější knihovny se řadí knihovny Národního institutu standardů a technologie (National Institute of Standards and Technology, NIST), která v minulosti sloužila pouze pro GC-MS spektra. V posledních letech do svého portfolia zařadila i LC-MS spektra. V rámci současné verze NIST 20 obsahuje knihovna 350 643 látek pro GC-MS a 30 999 látek pro LC-MS (<https://www.nist.gov/>).

2.2.2 Hmotnostní analyzátor

Na základě parametrů a praktických požadavků pro hmotnostní spektrometr je často zvoleno spojení více analyzátorů v sérii. Takové uspořádání je označováno jako tandemová hmotnostní spektrometrie a vyžaduje specifické analyzátory stejného typu. Pokud se jedná o spojení analyzátorů odlišných, jedná se potom o výsledný analyzátor hybridní (Nováková et al. 2021a).

Velice uznávaným tandemovým uspořádáním pro techniku separace kapalin, jako je HPLC, se stal trojitý kvadrupól. V kvadrupólovém uspořádání se ionty produkované v iontovém zdroji pohybují mezi čtyřmi vodivými tyčemi s elektrickým polem, kde se vyskytuje jak stejnosměrný, tak střídavý proud

(Holčapek 2001, Mano a Goto 2003, Griffiths et al. 2001). Instrument má relativně malou velikost a nízkou cenu, proto je hojně využíván (Mano a Goto 2003).

Při použití trojitého kvadrupólu pro identifikaci látek, pro které nemáme dostupné standardy, je proveden nejprve tzv. MS sken, kdy dochází ke sběru dat v celém rozsahu očekávaných m/z . V dalších krocích následuje sken produktových iontů, sken prekurzorových iontů a sken neutrálních ztrát. Dalšími možnými typy záznamů jsou selektivní záznam jedné (SRM) či více reakcí (MRM) (Nováková et al. 2021a). V prvním kvadrupólu je vybrán prekurzorový iont, který je fokusován do druhého kvadrupólu, který slouží jako kolizní cela, kde dochází ke kolizní aktivaci pomocí kolizního plynu a následné fragmentaci. Vlastní analýza probíhá ve třetím z kvadrupólů (Mano a Goto 2003, Griffiths et al. 2001). MRM bylo také využíváno v experimentální části této bakalářské práce.

2.2.3 Způsob ionizace

Aby mohla být cílová molekula analyzována pomocí hmotnostního spektrometru, musí být předem ionizována. Podle použité techniky ionizace se následně liší i samotná analýza například v ohledu na matricové efekty. Téma matricových efektů však bude rozebráno v samostatné kapitole.

Pro ionizaci analytů lze využít širokou nabídku ionizačních technik. Jelikož žádná z nich není univerzální, zvolení konkrétní ionizační techniky je odvozeno jak od fyzikálně-chemických vlastností látky, tak i od cílů měření (Mano a Goto 2003, Nováková et al. 2021a). Mezi nejpoužívanější ionizační techniky ve spojení s HPLC patří měkká ionizační technika nazývaná ionizace za atmosférického tlaku (API). U měkkých ionizačních technik obecně nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci ve zdroji, jako je tomu u tvrdých ionizačních technik, mezi které patří elektronová ionizace (EI). API zahrnuje chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI) a také ionizaci elektrosprejem (ESI), která zároveň patří mezi nejšetrnější (Nováková et al. 2021a).

ESI využívá tzv. elektrosprej a umožňuje před MS analýzou přenos iontů z roztoku do plynné fáze, a to s použitím elektrického napětí. Na kovovou kapiláru s proudící kapalinou (vzorkem) je vloženo vysoké napětí (3-5 kV) za tvorby aerosolu na výstupu z hrotu elektrospreje (Scalf et al. 2000, Mano a Goto 2003, Holčapek 2001,

Griffiths et al. 2001). Obvyklý průtok vodného roztoku, jakožto mobilní fáze, se pohybuje od 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ do 1 ml/min (Nováková et al. 2021a). Podle volby polarit vkladáného napětí se tvoří záporné nebo kladné ionty. Polaritu volíme podle typu látky.

Postupně díky Coulombické explozi se náboj z vysoce nabitých kapek přenes na molekuly analytu v plynné fázi (Mano a Goto 2003). K vypařování iontů dochází i vlivem odpudivé síly stejně nabitých částic, která stoupá se zmenšováním rozměrů kapiček a tím i kumulaci náboje (Holčapek 2001), odpařování podporuje i přivedený proud ohřátého plynu, nejčastěji dusíku (Scalf et al. 2000, Mano a Goto 2003).

Současné regulační požadavky však spojují tuto metodu s potřebou posouzení a eliminace matricového efektu, ke kterému je vzhledem ke své konstrukci metoda citlivá (Trufelli et al. 2011, Panuwet et al. 2015).

2.2.4 Matricové efekty

Matricové efekty (ME) lze definovat jako změnu účinnosti ionizace stanovovaného analytu způsobenou přítomností dalších látek z matrice, které doputují do iontového zdroje současně jako látka analyzovaná a mohou tak ovlivnit intenzitu signálu v „soutěži“ o dostupné náboje (Trufelli et al. 2011, Matuszewski et al. 2003, Panuwet et al. 2015, Gosetti et al. 2010). To vede u zkoumaného analytu ke snížené tvorbě požadovaných iontů (potlačení ionizace) nebo naopak ke tvorbě zvýšené (zesílení ionizace), tím je ovlivněna citlivost analýzy (Klapková et al. 2011, Panuwet et al. 2015, Matuszewski et al. 2003, Trufelli et al. 2011, Holčapek 2001).

Výsledným projevem v praxi je rozdíl odezvy hmotnostního analyzátoru pro analyt ve standardním roztoku ve srovnání s odezvou pro stejný analyt při stejné koncentraci ve zkoumané matrici, což následně vede k nesprávným výsledkům (Klapková et al. 2011, Panuwet et al. 2015, Holčapek 2001). Tento fenomén byl popsán ve všech typech běžně analyzovaných matric, jako jsou plazma, sérum, moč tkáně či vzorky vody a půdy (Trufelli et al. 2011).

Úroveň změny signálu velmi závisí na koncentraci, na hydrofobicitě analytu a také na afinitě ke stacionární fázi (retenčním faktoru, K_D) (Gosetti et al. 2010). Funkci supresorů mohou zastat látky endogenního i exogenního původu. Skupinu tzv. endogenních supresorů tvoří látky přímo přítomné v matrici, kterými mohou být soli, vysoce polární sloučeniny, povrchově aktivní látky a různé

organické molekuly, jako jsou sacharidy, aminy, močovina, lipidy, peptidy a obecně sloučeniny nebo metabolity s chemickou strukturou podobnou cílovému analytu (Panuwet et al. 2015, Gosetti et al. 2010). Tzv. exogenní supresory, jakožto druhý zdroj ME, představují interferující sloučeniny, které nebyly původně přítomny v matrici vzorku a pocházejí z procesu přípravy a detekce (Trufelli et al. 2011, Panuwet et al. 2015). Obecně jde o zbytky plastů či polymerů, ftaláty (Panuwet et al. 2015), dále organické kyseliny, pufrů, kalibrační produkty (Trufelli et al. 2011) nebo materiály uvolňované při extrakčním procesu (Trufelli et al. 2011, Gosetti et al. 2010) či činidla přidaná do mobilní fáze pro zlepšení tvaru píků na chromatogramu (ion-párová činidla) (Gosetti et al. 2010, Panuwet et al. 2015). Vzhledem k tomu, že ME mohou mít negativní dopad na jednotlivé validační parametry metody, musí být ME testovány (Trufelli et al. 2011, Panuwet et al. 2015, Gosetti et al. 2010). Látky obsažené v matrici mohou mít svůj vliv i na výkon přístroje, proto je nutná častá preventivní údržba (Panuwet et al. 2015).

2.2.4.1 Odstranění matricových efektů

Konečným cílem optimalizace je metoda co nejméně zatížena matricovými efekty, a to jak z hlediska chromatografické separace, tak ionizačního procesu. Na základě poznatků z odborné literatury lze shrnout některé možnosti, jak toho docílit. Možnosti zahrnují modifikace chromatografických a MS podmínek.

I přes to, že v některých případech nemohou být ME zcela odstraněny, mohou být alespoň minimalizovány nebo kompenzovány pomocí kombinace různých opatření (Panuwet et al. 2015). Běžně používaným laboratorním postupem je snaha zlepšit přečištění vzorků, aby došlo k odstranění potenciálně interferujících složek směsi (Gosetti et al. 2010, Trufelli et al. 2011). Účel přečištění spočívá v odstranění sloučenin, které mají odlišné hydrofobní vlastnosti či odlišnou polaritu. Metody pro přečištění však nejsou v některých případech schopny zachytit veškeré složky matrice koeluující s analytem, poněvadž některé sloučeniny způsobující ME mají velmi podobné vlastnosti.

Cesta zlepšením účinnosti separace HPLC je dalším z přístupů. Především se jedná o zaměření se na analyty eluované na začátku analýzy, tedy látky vysoce polární a nezadržované, nebo na konci elučního gradientu, kde nalézáme naopak sloučeniny silně zadržované. Vzhledem k tomu, že jsou tyto oblasti obecně více ovlivněny interferencemi,

může být retence analytů upravena tak, aby došlo k eluci mezi těmito dvěma oblastmi (Gosetti et al. 2010, Trufelli et al. 2011). Lze taktéž použít různé stacionární fáze s vlastnostmi vhodnými pro sledované analyty (Gosetti et al. 2010).

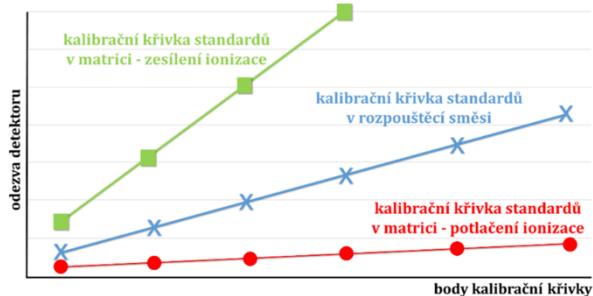
Nelze-li ME vyloučit výše popsanými metodami, musí být použita vhodná kalibrační technika ke kompenzaci změn signálu (Trufelli et al. 2011). Během kvantifikace je využívána metoda sestavení kalibrační křivky ve vzorcích matrice pro kompenzaci již zmiňovaných ME (Gosetti et al. 2010, Trufelli et al. 2011). Při této metodě je důležité zvolit koncentraci analytu co nejbližší koncentraci očekávané ve skutečném vzorku, a to i při použití izotopicky značeného vnitřního standardu (IS) (Gosetti et al. 2010). Použití IS může minimalizovat dopad matrice na kvantifikaci (Panuwet et al. 2015, Gosetti et al. 2010), jelikož podle IS kompenzujeme při vyhodnocování změnu signálu (Gosetti et al. 2010, Trufelli et al. 2011). Při použití IS se očekává, že případné koelující složky matrice ovlivní analyt ve srovnatelné míře jako zvolený IS (Gosetti et al. 2010).

2.2.4.2 Hodnocení matricových efektů

V praxi se přítomnost ME hodnotí třemi různými metodami, díky kterým je možno získat kvalitativní nebo kvantitativní informace. Jedná se o metodu postextrakčního přídatku, metodu porovnání směrnic kalibračních křivek a metodu postkolonové infuze (Svoboda 2017). Zde jsou představeny první dvě, a to z důvodu jejich využití v experimentální části práce.

2.2.4.2.1 Metoda porovnání směrnic kalibračních křivek

Při této metodě se porovnávají směrnice kalibračních křivek, jejichž kalibranty byly přidány do roztoku bez matrice, tedy v mobilní fázi, anebo v slepých vzorcích matrice získané používanou extrakční metodou (Klapkova et al. 2011). Slepý vzorek, neboli také blank, je takový vzorek, který obsahuje veškeré látky a přidaná činidla kromě látek stanovovaných.



Obr. 4 Metoda porovnání směrnic kalibračních křivek (převzato od Svoboda 2017)

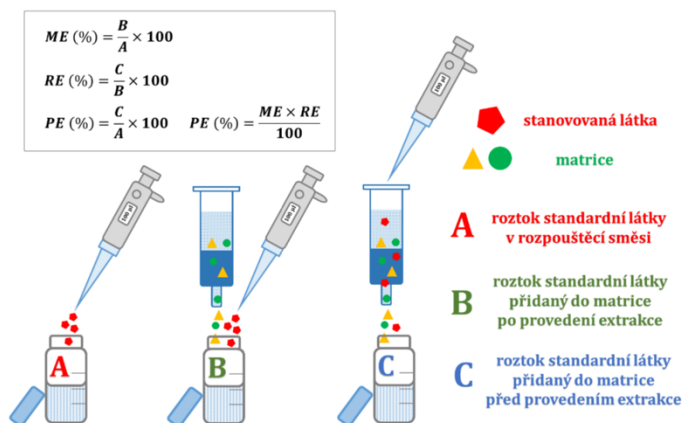
Pokud jsou měřené intenzity odlišné u jednotlivých technik příprav vzorků, indikuje to přítomnost interferujících látek. V případě zesílení ionizace je směrnicí kalibrační křivky vyšší než směrnicí kalibrační křivky připravené v rozpouštědle. V případě potlačení ionizace je tomu přesně naopak (Trufelli et al. 2011).

V případě, že hodnota výsledného ME je vyšší než 100 %, došlo k zesílení ionizace analytu. Hodnota ME rovna 100 % udává nepřítomnost ME. Pokud je výsledná hodnota ME nižší než 100 %, indikuje to potlačení ionizace (Trufelli et al. 2011, Matuszewski et al. 2003).

2.2.4.2.2 Metoda postextrakčního přidavku analytu

Pro hodnocení matricových efektů slouží porovnání signálů, resp. ploch píků chromatogramu, a to u vzorku analytu v rozpouštěcí směsi (A) a signálu analytu přidaného až po extrakci vybranou metodou (B) (Obr. 5) (Svoboda 2017, Trufelli et al. 2011).

Extrakční výtěžnost (RE, recovery) porovnává odezvu MS detektoru pro standard přidaný do matrice před extrakčním krokem (C) a odezvu pro standard přidaný po extrakci (B). Dalším sledovaným parametrem může být celková účinnost (PE, process efficiency), která hodnotí metodu jako celek, jelikož do hodnocení zahrnuje matricové efekty i extrakční výtěžnost (Trufelli et al. 2011, Matuszewski et al. 2003).



Obr. 5 Metoda postextrakčního přidavku (převzato od Svoboda 2017)

Tento aspekt hodnocení ME je důležitý pro vývoj selektivních metod HPLC- MS/MS a podrobné srovnání výtěžnosti procesu. Z tohoto důvodu jsou vzorce, znázorněné na Obr. 5, využity v experimentální části práce.

Eliminace ME je rozhodující pro generování spolehlivých bioanalytických i farmakokinetických dat. Přítomnost ME pro daný analyt však nemusí nutně znamenat, že bioanalytická metoda není použitelná. Za předpokladu, že vliv matrice je stejný pro stanovovanou látku i vnitřní standard ve všech studovaných šaržích, konečný výsledek by neměl být ovlivněn (Matuszewski et al. 2003).

CÍLE EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Cílem této práce bylo optimalizovat extrakci fenbendazolu ze vzorků půdy, tedy nalézt vhodnou metodu pro přípravu i analýzu zmíněné léčivé látky.

Dosažení cíle zahrnovalo:

- Předpřípravu vzorků půdy zahrnující proces sušení, mletí, navážení
- Vývoj a optimalizace extrakční techniky QuEChERS
- Přípravu extrakčních a d-SPE směsí
- Stanovení, zda je tato extrakční technika vhodná pro FBZ
- Vývoj a optimalizaci metody HPLC-MS
- Vyhodnocení a zpracování výsledků

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3 EXTRAKCE VZORKŮ

3.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

Pro všechny dílčí extrakce byl veškerý materiál zajištěn katedrou biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

3.1.1 Chemikálie

Mezi použité chemikálie patřily Fenbendazol (FBZ) VETRANAL® (Sigma-Aldrich, 99,8 %), Fenbendazol sulfon (FBZ-SO₂) VETRANAL®, Fenbendazol sulfoxid (FBZ- SO) VETRANAL®, Mebendazol VETRANAL®, Fenbendazol-D₃ VETRANAL®. Dále acetonitril (≥ 99.9 %, HiPerSolv CHROMANORM® for LC-MS), ddH₂O (ultračistá voda – připravená z deionizované vody systémem Milli-Q), síran hořečnatý bezvodý p.a. (Lach-Ner, s.r.o.) octan sodný bezvodý p.a. (Lach-Ner, s.r.o.), chlorid sodný p.a., citronan sodný dihydrát p.a., primární sekundární amin PSA (Agilent Technologies).

3.1.2 Pomůcky

Centrifugační zkumavky 15 ml a 30 ml (Eppendorf), mikrozkušavky 5 ml (Eppendorf), porcelánová třecí miska s tlučkem, laboratorní lžička, automatická pipeta, stojánky na zkumavky a vialky, vialky 1,5 ml (Agilent Technologies), jednorázové pipetovací špičky, injekční stříkačky 1 ml (MEDILAB ČR, s. r. o.), stříkačkové filtry PTFE (Labstorel European Laboratory Footprint), inserty 0.3 ml (ThermoScientific), analytická kolona ZORBAX RRHD Eclipse C18, 95A (2.1 x 150 mm, 1,8 μm) (Agilent Technologies), ochranné rukavice a další běžné laboratorní pomůcky.

3.1.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy – Sartorius CP225D

Centrifuga – Eppendorf 5810 R 40

Hmotnostní spektrometr – Shimadzu 8030 Triple Quadrupole

Kapalinový chromatograf – UHPLC Shimadzu Nexera

Laboratorní váhy – Kern 440-43N

System pro čištění vody – Milli Q Millipore, Bedford, MA, USA

Trepačka – Heidolph Multi Reax

Ultrazvuková lázeň – K10, Kraintek, SR

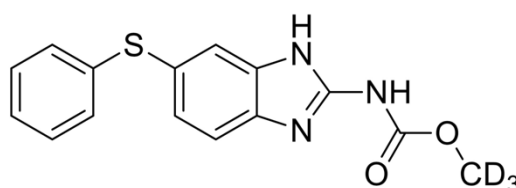
Vortex - V-1 PLUS, BIOSAN

Vakuový koncentrátor – Concentrator 5301, Eppendorf

3.2 Příprava zásobních, pracovních roztoků a extrakčních směsí

3.2.1 Zásobní roztoky a pracovní roztoky

Předmětem pozornosti byla trojice látek, fenbendazol (FBZ), fenbendazol sulfoxid (FBZ-SO₂) a fenbendazol sulfon (FBZ-SO). Zásobní roztoky standardů byly připraveny rozpuštěním látek FBZ, FBZ-SO, FBZ-SO₂, FBZ-D₃ v dimethylsulfoxidu (DMSO) na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Následným ředěním zásobních roztoků byly připraveny roztoky pracovní o nižších koncentracích. Zásobní roztoky byly ředěny 10-krát a 100-krát pomocí ACN. Z roztoků FBZ, FBZ-SO a FBZ-SO₂ byl z praktického důvodu vytvořen zásobní roztok o výsledné koncentraci 0,3333 mg/ml každé z látek, dále nazývaný jako pracovní roztok A. Následným ředěním v ACN byl vytvořen pracovní roztok B (0,03 mg/ml) a taktéž pracovní roztok C (0,003 mg/ml). Roztok IS FBZ-D₃, jenž byl připraven tímto způsobem, byl v praxi využíván pouze o koncentraci c=0,01 mg/ml. Pro zkoumání FBZ je nejvhodnějším látkou právě izotopicky značený FBZ-D₃ (Obr. 6). Izotopicky značené IS sdílejí s analytem shodné fyzikálně- chemické vlastnosti a liší se pouze v molekulové hmotnosti, jsou tedy nejvhodnější volbou v oblasti IS. Všechny roztoky jsou skladovány při 4 °C v lednici.



Obr. 6 Fenbendazol- D₃

3.2.1.1 Příprava kalibrátorů

Pro potřeby validačního procesu byl použit směsný pracovní roztok A (0,3333 mg/ml), který byl dále ředěn 50 % ACN. Takto byly vytvořeny 4 kalibrační roztoky K1-K4. Výsledné koncentrace jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1 Příprava kalibrátorů

Kalibrátor	Pracovní roztok A (μl)	Rozpouštědlo (μl)	Výsledná koncentrace (μg/ml)
K1	48	1952	8
K2	750 K1	250	6
K3	500 K1	500	4
K4	250 K1	750	2

3.2.2 Příprava kontrolní roztoků (QC, Quality Control)

Pro vývoj a validaci analytické metody byly připraveny QC roztoky ve třech koncentracích (LLOQ, QCA a QCB). Dle směrnice SANTE/11312/2021 (Pesticide guidelines 2021) není přímo specifikováno definované rozmezí. Jako QC roztok o nejnižší koncentraci (LLOQ) byl použit pracovní roztok C. Pro QCB roztok byl použit pracovní roztok B. Jako QCA roztok byl použit pracovní roztok A. Popis přípravy je uveden v kapitole 3.2.1.

3.2.3 Extrakční a d-SPE směsi

Ve výzkumné práci optimalizace extrakce fenbendazolu z enviromentálních vzorků bylo cíleno na extrakční metodu QuEChERS, respektive na její dva podtypy. Pro každý z podtypů existuje extrakční směs, charakteristická pro dané použití. Jednalo se o extrakční směs pro metodu AOAC 2007.01 (dále jen AOAC) a metodu EN 15662:2008 (dále jen EN).

Pro přípravu jedné směsi pro EN extrakci jsou potřeba 4 g bezvodého síranu hořečnatého, 1 g chloridu sodného, 1 g dihydrátu citronanu sodného a 0,5 g citronanu sodného seskvihydrátu. Pro přípravu jedné směsi pro AOAC extrakci jsou potřeba 6 g bezvodého síranu hořečnatého a 1,5 g bezvodého octanu sodného. Obě extrakční směsi byly přímo připravovány.

Jako d-SPE směs byla zvolena směs 150 mg PSA + 900 mg MgSO₄, případně 7,5 mg GCB. Srovnání jednotlivých technik bude rozebráno v samostatné kapitole.

3.3 Odběr vzorků a jejich předpříprava

Odběr vzorků ze správných oblastí je klíčovým aspektem pro celkové vyhodnocení. Vzorky z daného místa jsou odebrány ze dvou hloubek ve dvou časových intervalech. Prvním z nich je odběr půdy ještě před samotným zahájením léčby fenbendazolem, tedy v období, kdy by se v půdě tato léčivá látka neměla vyskytovat, v našem případě dne 10. 10. 2021. Tento odběr plní funkci kontrolních vzorků. Druhou skupinu tvoří vzorky odebrané z téhož místa po podání léčivého přípravku obsahujícím FBZ, v našem případě dne 26. 10. 2021, tudíž se v tomto případě jedná o reálné vzorky, které nejsou předmětem této bakalářské práce. Zvířatům bylo podáváno léčivo Panacur 25 mg/ml ve finální dávce 20 mg/kg.

Všechny odebrané vzorky byly po transportu dále zpracovávány. Nejprve byly sušeny při teplotě 30 °C za cílem odstranění přebytečného obsahu vody. Odstranění vody pomáhá zabránit případné oxidaci sledovaných sloučenin. Poté byly vzorky rozmělněny v třecí misce s tloučkem, následně přesety přes síto. Takto upravená půda byla nejprve odvážena do zipových PP sáčků, které byly uskladněny při -24 °C. Pro vývoj vhodné extrakční metody byla využita půda, která neobsahuje námi zkoumaný FBZ.

3.4 Vývoj extrakční metody

3.4.1 Optimalizace extrakčních podmínek

Během výběru vhodné extrakční metody se testovaly AOAC a EN metody extrakce QuEChERS v kombinaci s d-SPE pomocí grafitizovaného uhlíku (GCB) a primárního sekundárního aminu (PSA).

3.4.2 QuEChERS extrakce pomocí AOAC a EN metody

Originální metody QuEChERS pracují se vzorky obsahujícími vodu. Jelikož vzorky půdy pro tuto výzkumnou činnost byly zbaveny vody, aby bylo umožněno zamražení, před samotnou extrakcí bylo zapotřebí vzorky rehydratovat.

Do 50ml centrifugační zkumavky byly naváženy 4 g půdy. Půda byla hydratována přidáním 12 ml ddH₂O, po kterém následovalo třepání na třepačce po dobu 20 min. Výsledný obsah vody se pohyboval kolem 75 %. Do připravené půdy bylo napipetováno 3 µl pracovního roztoku standardu A, B, nebo C, s následným přidáním 10 µl IS FBZ-D₃ o koncentraci 0,01 mg/ml. Opět bylo potřeba vzorky umístit na třepačku po dobu 30 minut. Tento krok byl zopakován po přidání 10 ml ACN, tentokrát však zkráceno na 5 minut. Po těchto krocích následovalo přidání extrakční směsi pro AOAC, případně EN. Vzorky se opět umístily na třepačku po dobu 30 min a následně byly vzorky centrifugovány 15 min při 3220 rcf. Po oddělení fází bylo odebráno 6 ml z vrchní fáze do 5 ml centrifugační zkumavky a vloženo do vakuové odparky k odpaření do sucha (bez d-SPE kroku) anebo lze odebrat 8 ml do 15 ml zkumavky obsahující d-SPE směs s následným zopakováním kroku třepání i s využitím centrifugy a následovaným odpařením ve vakuové odparce. Vzorky byly odpařovány v 5 ml centrifugačních zkumavkách postupně z důvodu limitace instrumentace vakuové odparky. U obou metod (bez)d-SPE bylo celkem odpařeno 6 ml acetonitrilové fáze při 30 °C. Tento krok je nezbytný pro uskladnění.

3.5 Příprava vzorků před měřením

Vzorky je vždy zapotřebí připravit bezprostředně před samotným měřením. Do 5 ml centrifugační zkumavky obsahující odpařený vzorek bylo v prvním kroku přidáno 100 µl ACN následované třepáním (5 min) a ultrazvukovou lázní (5 min). Poté bylo přidáno 100 µl ddH₂O a následný postup byl zopakován. Takto rozpuštěné vzorky byly filtrovány pomocí stříkačkového filtru z PTFE materiálu do vialky se skleněným inzertem. Následně byly takto připravené vzorky analyzovány.

3.6 Validace

Cílem validace metody je poskytnout důkaz, že metoda je vhodná pro zamýšlený účel. Ověřování výkonnosti metody během rutinní analýzy by mělo probíhat pravidelně, jelikož nám potvrzuje mimo jiné správnost prováděné analýzy. Validace je zároveň požadavkem akreditačních orgánů.

Pokud se analýza zaměřuje na více analytů, metoda musí být validována pro každý z nich. Pro kontrolu výtěžnosti a přesnosti je vyžadováno minimálně 5 opakování. Průměrné hodnoty výtěžnosti z počáteční validace by měly být v rozmezí 70-120 %.

V případě potlačení/zesílení signálu o více než 20 % je třeba řešit vlivy matrice v kalibraci (Pesticide guidelines 2021).

Validační proces proběhl dle: ANALYTICAL QUALITY CONTROL AND METHOD VALIDATION PROCEDURES FOR PESTICIDE RESIDUES ANALYSIS IN FOOD AND FEED SANTE 11312/2021 (Pesticide guidelines 2021).

Mezi hodnocené parametry v rámci prováděného výzkumu patřily linearita (kalibrace), limit detekce, limit kvantifikace, selektivita, extrakční výtěžnost, matricové efekty, posun retenčního času, preciznost a přesnost.

3.6.1 Kalibrace

Kalibrační vzorky byly konstruovány bez a v přítomnosti příslušné matrice. V případě konstrukce kalibrátorů v matrix půdy byly využity slepé vzorky připraveny dle EN nebo AOAC metody, do kterých byl postextrakčně přidán příslušný kalibrátor. Kalibrační roztoky KR1- KR9 (Tab. 2) byly připraveny postupným ředěním kalibrátoru K1-K4 viz. Tab. 1. Kalibrační vzorky byly připraveny přidavkem 200 μ l kalibračního roztoku (KR1- KR9) a 1,2 μ l IS do příslušné centrifugační zkumavky s danou odpařenou matricí. S takto připravenými vzorky se pracovalo podle kapitoly 3.5.

Tab. 2 Kalibrace

Kalibrační roztok	Kalibrátor (μ l)	Rozpouštědlo (μ l)	Výsledná koncentrace (μ g/ml)
KR1	250 K1	750	2
KR2	100 K1	900	0,8
KR3	100 K2	900	0,6
KR4	100 K3	900	0,4
KR5	100 K4	900	0,2
KR6	10 K1	990	0,08
KR7	10 K2	990	0,06
KR8	10 K3	990	0,04
KR9	10 K4	990	0,02

3.6.2 QC vzorky

QC vzorky (QCA, QCB, LLOQ,) byly připraveny v pěti replikátech. Vzorky byly připraveny přidavkem 3 μ l příslušného QC vzorku a 10 μ l IS k dané blankové matici. Následně byla provedena extrakce EN nebo AOAC dle kapitoly 3.4.1. S takto připravenými vzorky se následně pracovalo podle kapitoly 3.5.

3.6.3 Extrakční výtěžnost

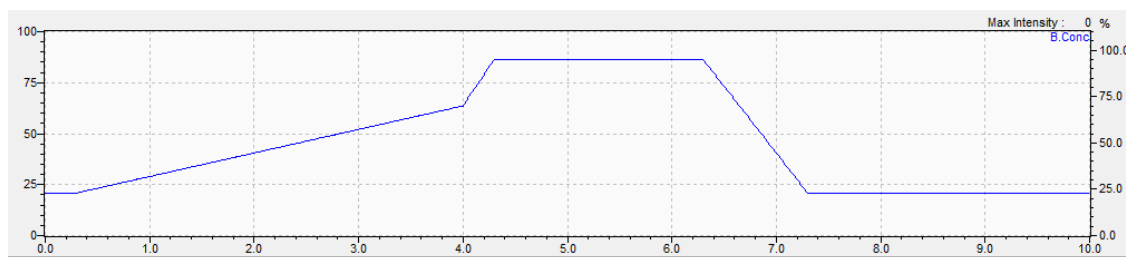
Pro porovnání extrakční výtěžnosti byly využívány QC vzorky (LLOQ, QCA, QCB) po pěti replikátech. Po příslušném typu extrakce bylo do blankového acetonitrilového extraktu (6 ml) přidáno 3 μ l příslušného QC vzorku. S takto připravenými vzorky se pracovalo dle kapitoly 3.5.

3.6.4 Matricové efekty

Vzhledem k výraznému vlivu matrice při elektrosprejové ionizaci na velikosti odezvy detekce, byl tento vliv cíleně zkoumán. Pro testování vlivu ME byla použita metoda porovnání směrnic kalibračních křivek konstruovaných v příslušné matici a v rozpouštědle 50 % ACN. Využity byly vzorky připravené podle Tab. 2. Doplněno bylo metodou postextrakčního přidavku. Popis obou metod je uveden v kapitolách 2.2.4.2.1 a 2.2.4.2.2.

3.7 UHPLC-MS/MS analýza

Pro stanovení jednotlivých analytů UHPLC metodou byla zvolena separace pomocí analytické kolony ZORBAX RRHD Eclipse C18, 95A (2.1 x 150 mm) s velikostí částic 1,8 μ m (Agilent Technologies). Rychlost průtoku mobilní fáze (MF) byla 0,4 ml/min. Objem nástřiku byl 1 μ l pro všechny analýzy. Teplota kolonového prostoru byla nastavena na 40 °C. MF byla tvořena roztokem A (H₂O + 0,1 % k. mravenčí) a roztokem B (ACN + 0,1 % k. mravenčí). Průběh gradientové eluce v čase znázorňuje Obr. 7.



Obr. 7 Průběh gradientové eluce

Pro analýzu MS/MS byl použit trojitý kvadrupól s ionizačním zdrojem ESI provozovaným v pozitivním režimu s posunem kapiláry +2, pracujícím v režimu MRM. Napětí na sprejovací kapiláře bylo 4,5 kV a teplota tepelného bloku byla nastavena na 400 °C. Jako nebulizační plyn byl použit dusík a to s průtokem 2,5 l/min. Dusík byl zvolen taktéž jako sušící plyn s průtokem 12 l/min. Kolizním plynem pro MS/MS experimenty byl zvolen argon. Tímto způsobem byly získány informace o jednotlivých sloučeninách uvedených v Tab. 3.

Tab. 3 Molekulová hmotnost a vybrané produktové ionty analyzovaných sloučenin

Sloučenina	t _R [min]	Prekurzorový iont [M+H] ⁺	Produktový iont [M+H] ⁺ , m/z (kolizní energie)
FBZ	3,818	300,1	267,9 (-21); 159,0 (-39)
FBZ-SO	2,444	316,0	265,9 (-27); 207,1 (-30); 191,0 (-24)
FBZ-SO ₂	3,146	332,0	300,0 (-23); 159,1 (-43)
FBZ-D ₃	3,805	303,4	268,1 (-21); 169,15 (-36)

4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace extrakčních podmínek

Použití dvou metod pro stanovení v ME nám následně umožňuje určit, která z extrakčních technik QuEChERS je pro FBZ vhodnější.

Zvolenou extrakční metodou QuEChERS je metoda AOAC 2007.01. Příslušné grafy, tabulky a validační parametry chromatografické metody jsou uvedeny níže. Principem optimalizace bylo přidání kroku d-SPE, které odstraní balastní látky, a tudíž umožní docílit co nejpřesnějších nezkreslených výsledků. Během procesu optimalizace byly provedeny testy s přečištěním pomocí GCB (7,5 mg), avšak tato metoda se neosvědčila. Vhodnějším byl PSA ve spojení s MgSO₄. PSA má schopnost odstraňovat mastné kyseliny, cukry a některé další matricové koextrakce a i samotná manipulace byla v tomto případě snazší, než tomu bylo v případě grafitizovaného uhlíku. Zvolenou a dále používanou směsí byla směs 150 mg PSA + 900 mg MgSO₄.

4.1.1.1 QC vzorky

Analýzou QC vzorků na třech hladinách (QCA, QCB LLOQ,) byla hodnocena preciznost a přesnost. Povolená odchylka pro QC vzorky dle směrnice SANTE/11312/2021 je $\leq 20\%$ (Pesticide guidelines 2021). Naměřené hodnoty splňují validační kritéria dle validační směrnice a nepřekročily 15 % Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4 Preciznost a přesnost měření v rámci QC vzorků

Standard	QC	Naměřená koncentrace [μg/ml]	Preciznost [CV %]	Přesnost [%]
FBZ	QCA	1.8054	4.3	0.3
	QCB	0.1530	1.7	-14.8
	LLOQ	0.0153	10.4	-15.0
FBZ-SO	QCA	1.9080	0.7	6.0
	QCB	0.1763	0.8	-2.0
	LLOQ	0.0185	9.9	3.0
FBZ-SO ₂	QCA	1.9440	4.1	8.0
	QCB	0.1710	1.1	-5.0
	LLOQ	0.0192	7.5	7.0

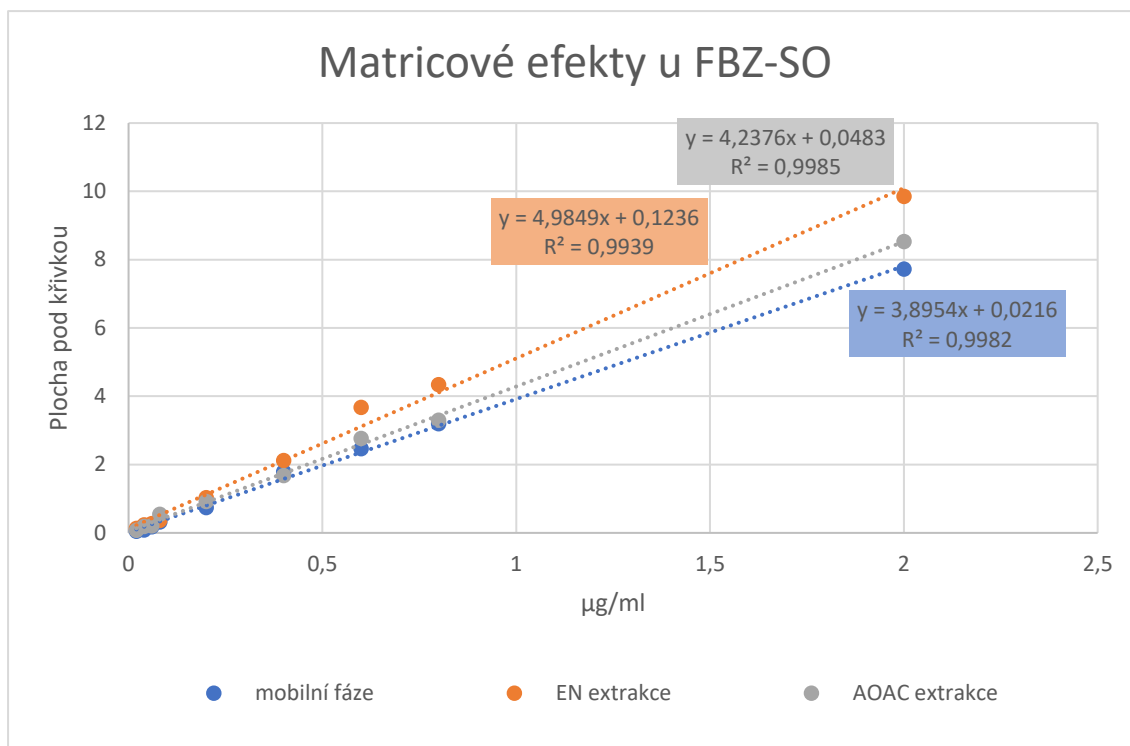
4.1.1.2 Matricové efekty

ME charakterizují změnu účinnosti ionizace způsobenou přítomností látky vycházející z kolony současně se stanovovaným analytem. Metoda porovnání směrníc křivek a metoda postextrakčního přidavku umožňují stanovit ME. Jako prvním krokem pro výběr vhodné extrakční techniky jsme zvolili právě porovnání ME pomocí porovnání směrníc kalibračních křivek, abychom hned na začátku odhalili, zda u jedné metody nedochází k potlačení signálu na detektoru a nebudeme tedy následně schopni docílit nízkých LOD a LOQ hodnot. Metoda porovnání směrníc kalibračních křivek je znázorněna na Obr. 8-10 a taktéž v Tab. 5.

Tab. 5 Výsledky ME metodou porovnání směrníc kalibračních křivek

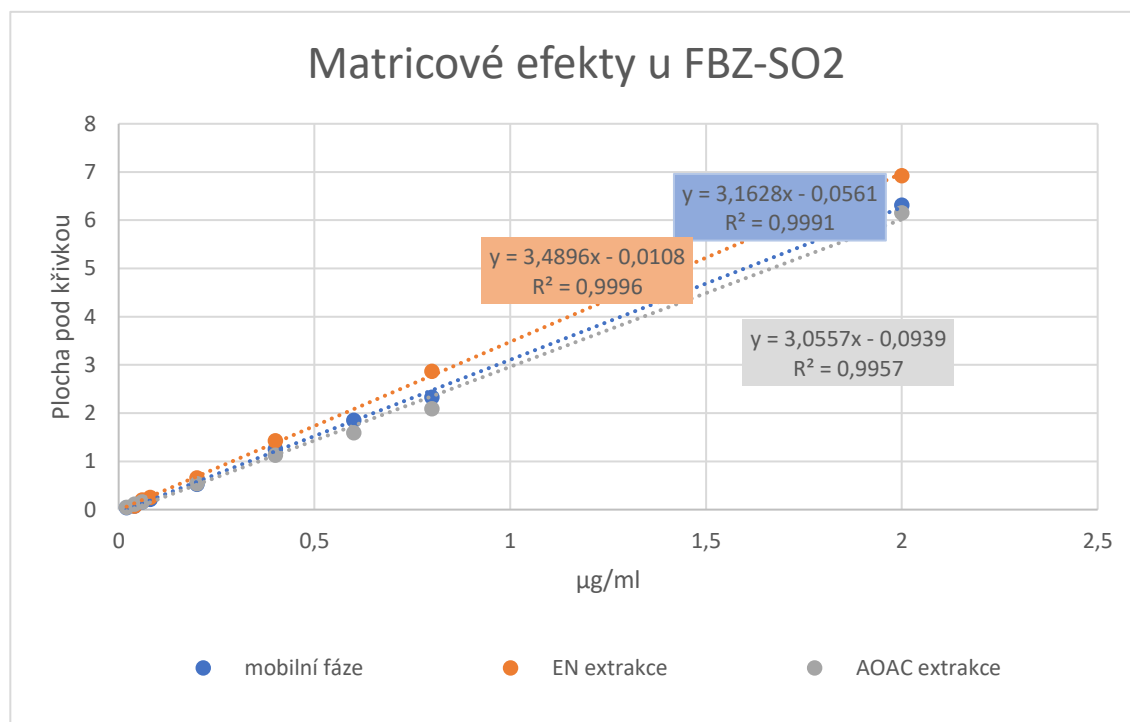
Sloučenina	EN 15662:2008 [%]	AOAC 2007.01 [%]
FBZ	64	65
FBZ-SO	128	109
FBZ-SO ₂	110	97

Pro látku FBZ-SO (Obr. 8) platí, že vzorky upraveny EN i AOAC metodou byly zatíženy ME. U vzorků bylo pozorováno zesílení ionizace vlivem ME. V případě EN metody o 28 %, u AOAC metody o 9 %.



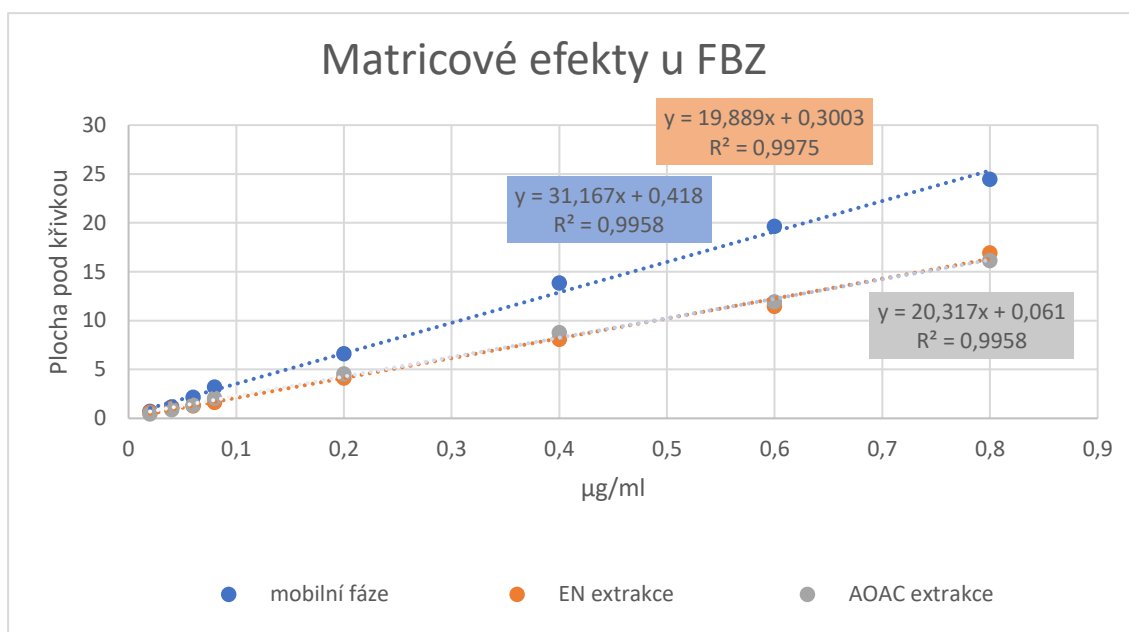
Obr. 8 Hodnocení ME u FBZ-SO

U látky FBZ-SO₂ (Obr. 9) po použití extrakční metody EN došlo taktéž k zesílení ionizace vlivem ME, a to o 10 %. Naopak po použití metody AOAC došlo u zkoumaného analytu k potlačení ionizace o 3 %.



Obr. 9 Hodnocení ME u FBZ-SO₂

U látky FBZ (Obr. 10) došlo po použití obou metod k výrazně snížené tvorbě požadovaných iontů (potlačení ionizace). U EN metody o 36 % a u metody AOAC o 35 %.



Obr. 10 Hodnocení ME u FBZ

Z graficky (Obr. 8-10) i tabulkově (Tab. 5) znázorněných výsledků ME vyplývá, že obě metody QuEChERS jsou pro extrakci FBZ použitelné. Znatelně lepších výsledků dosáhla AOAC extrakce. Pro rozsáhlejší analýzu však využíváme i metodu postextrakčního přidavku. Hodnoty získané touto metodou hodnocení ME byly použity pro závěrečné stanovení extrakční výtěžnosti, a proto jsou společně uvedeny v Tab. 7.

4.1.2 Validace

Po kroku optimalizace extrakčních podmínek byla metoda optimalizovaná podle SANTE 2021 z hlediska validace (Pesticide guidelines 2021). Jak již bylo zmíněno v experimentální části, hodnocenými parametry jsou linearita (kalibrace), limit detekce, limit kvantifikace, selektivita, extrakční výtěžnost, matricové efekty, posun retenčního času, preciznost a přesnost.

V Tab. 6 jsou znázorněny jednotlivé parametry kalibračního rozsahu metody pro dané analyty.

4.1.2.1 Kalibrace

Hodnocení kalibračních závislostí probíhalo měřeními dvou sérií, kdy každý vzorek byl měřen v duplikátu. Dle validačních kritérií je nutno využít pro kalibrační závislost minimálně 5 kalibračních bodů. V hodnocení trojice látek, jež byly předmětem výzkumu, byla kalibrace 9bodová. Využívány byly příslušné kalibrační roztoky K1-K9. Jako regresivní model byla použita jednoduchá lineární regrese. Zpětně vypočtená koncentrace dle rovnice přímky nepřekročila 20 % u žádného z kalibračních bodů.

Tab. 6 Parametry kalibračního rozsahu pro FBZ, FBZ-SO, FBZ-SO₂

Sloučenina	FBZ	FBZ-SO	FBZ-SO ₂
Lineární rozsah	0,8-0,02	2-0,02	2-0,02
Směrnice	20,3170	4,2376	3,0057
Průsečík kalibrační křivky na ose y	0,0610	0,0483	0,0939
Korelační koeficient (r ²)	0,9958	0,9985	0,9957
LOD µg/ml	0.0098	0.01247	0.00179
LOQ µg/ml	0,02	0,02	0,02

4.1.2.2 Extrakční výtěžnost u AOAC metody

Extrakční výtěžnost (Tab. 7) byla studována na třech koncentračních hladinách a to pomocí hodnot získaných metodou postextrakčního přídatku. Každá z koncentračních hladin byla zároveň podrobena analýze celkem dvakrát. Vyhodnocení extrakční výtěžnosti je vyjádřeno v procentech a jedná se o poměr množství sledované látky ve vzorku, který byl obohacen před extrakcí, a vzorku blankové vyextrahované matrice která byla obohacena až po extrakci. Postup a výpočet je popsán v kapitole 2.2.4.2.2., využity byly rovnice kalibračních přímek sestavených pro FBZ-SO na Obr. 8, pro FBZ-SO₂ na Obr. 9 a pro FBZ na Obr. 10.

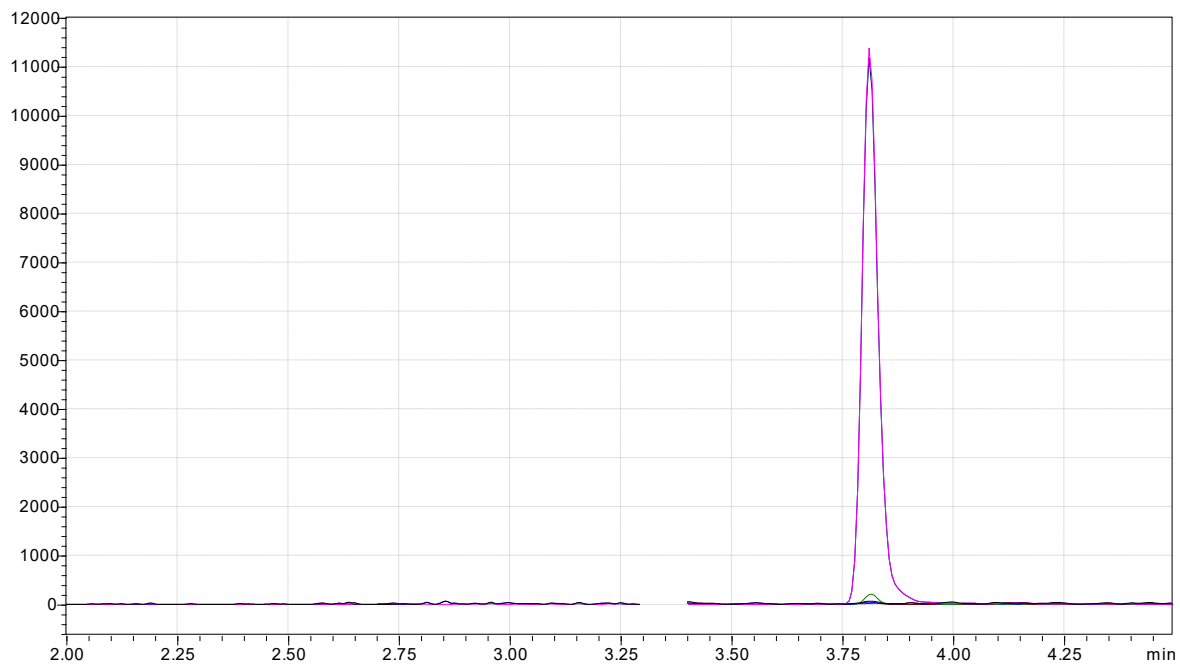
Tab. 7 Extrakční výtěžnost a ME vyhodnoceny dle metody postexkračního přidavku

Standard	QC	Extrakční výtěžnost ± SD [%]	ME [%]
FBZ	QCA	100 ± 4	73
	QCB	85 ± 2	68
	LLQC	85 ± 10	65
FBZ-SO ₂	QCA	108 ± 4	92
	QCB	96 ± 1	102
	LLQC	107 ± 7	103
FBZ-SO	QCA	106 ± 1	110
	QCB	98 ± 1	123
	LLQC	103 ± 10	91

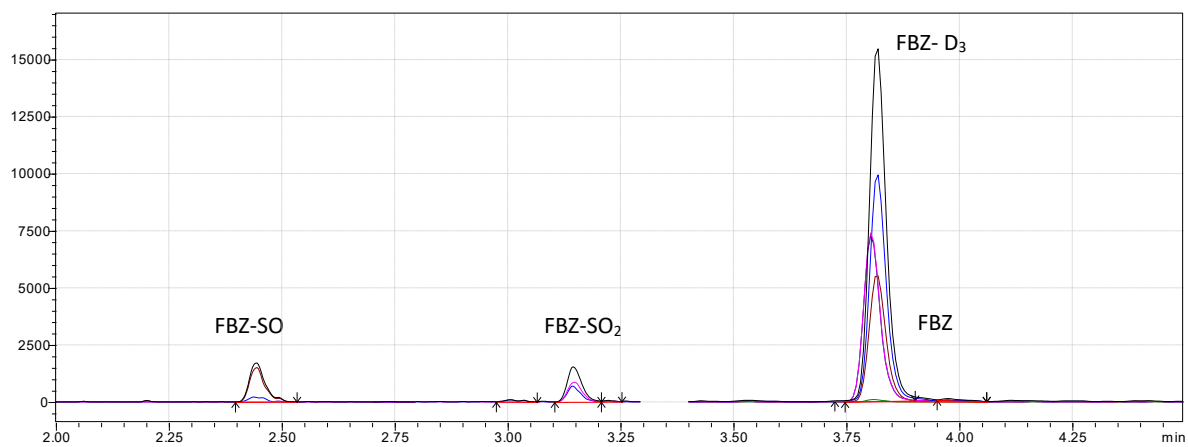
Na všech koncentračních hladinách došlo k ovlivnění procesu ionizace, což indikuje přítomnost interferujících látek v matrici. Získané výsledky však ukazují, že ačkoli signály získané z analýzy UHPLC-MS/MS jsou ovlivněny matricovými efekty, metoda je dostatečně optimalizována pro poskytnutí kvalitních výsledků. Dle výše zmíněných validačních kritérií by měly průměrné hodnoty výtěžnosti z počáteční validace být v rozmezí 70-120 %. Látky FBZ-SO a FBZ-SO₂ poskytují velice dobré výsledné hodnoty extrakční výtěžnosti blízké 100 %, taktéž extrakční výtěžnost FBZ neklesla pod 85 %. Kritéria validace jsou splněna i z hlediska hodnot směrodatné odchylky, které nesmějí překračovat 20 %. Hodnota směrodatné odchylky žádné ze zkoumaných koncentračních hladin nepřekročila 10 %.

4.1.2.3 Specifita a retenční čas

Námi nastavený hmotnostní analyzátor pracuje v MRM módu. Na přiloženém chromatogramu (Obr. 11) je znázorněn slepý vzorek půdy jen s IS, který znázorňuje specifitu. Na následujícím chromatogramu (Obr. 12) je znázorněna blanková matrice obohacena standardními roztoky zkoumaných látek FBZ, FBZ-SO, FBZ-SO₂ společně s IS, kterým byl FBZ-D₃. Chromatogram přísluší koncentraci LLOQ. V průběhu celé analýzy opakovatelnost retenčního času u všech analytů splňoval validační kritérium ± 0,1 min dle SANTE 2021.



Obr. 11 Chromatogram FBZ-D₃



Obr. 12 Chromatogram QC vzorku o koncentraci LLOQ

5 DISKUZE

Léčivé látky mohou být pro životní prostředí významným zdrojem znečištění. Kromě hrozby vzniku rezistence, mohou benzimidazolová anthelmintika, včetně fenbendazolu, postupně přecházet do půdy i podzemních vod (Stuchlíková et al. 2017). Cílem této práce bylo vyvinout a validovat UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení léčivé látky FBZ v půdě a to včetně dvou metabolitů, FBZ-SO a FBZ-SO₂.

Tyto tři látky jsou mimo jiné předmětem článku Gokbulut et al. (2006), který se věnuje podávání anthelmintik oslům a sleduje jejich koncentraci v plasmě a v trusu po léčení. Podobný osud anthelmintik se očekává i u hospodářských zvířat. Kromě důležitosti fyzikálně-chemických vlastností je však zapotřebí zaměřit se na konkrétní druh zvířete, jak uvádí Capece et al. (2006) na základě rozsáhlého výzkumu, mnohdy se totiž mezi různými druhy liší zastoupení parentní látky i metabolitů.

V současné době existuje již několik studií věnujících se přestupu anthelmintik do životního prostředí a následného ovlivnění dalších (necílových) živých organismů. Účinkem na necílové živočichy se zabývá i Wagil et al. (2014), který ve svém článku uvádí toxické účinky flubendazolu a FBZ u korýšů (*Daphnia magna*). Poměrně výraznou část těchto příspěvků tvoří studie Katedry biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Tyto studie jsou ve formě odborných článků i závěrečných prací. V souvislosti s výzkumem týkajícím se FBZ v půdě, jemuž se věnuji já, byl prováděn výzkum taktéž s léčivou látkou albendazol, ve kterém byla přítomnost této léčivé látky v prostředí potvrzena (Vrábl'ová 2021, Navrátilová et al. 2021). Skupina také provádí studie zaměřující se na fytotoxicitu anthelmintických léčiv. V této oblasti se například Stuchlíková et al. (2020) zaměřuje na rostlinu *Medicago sativa* po expozici léčivé látky albendazol. Vlivy albendazolu společně s flubendazolem na rostlinu *Phragmites australis* posuzuje Podlipná et al. (2013). Navrátilová et al. (2020) se věnuje účinku ivermektinu na rostlinu *Plantago lanceolata*. Ze studií vyplývá, že rostliny jsou schopny přijímat a dále biotransformovat léčivé látky, kterým jsou vystavené.

Hledání optimálních podmínek pro environmentální analýzu je náročné. Jakákoli analýza je náchylná k chybám vznikajícím v každé fázi postupu od odběru vzorků, přes přípravu vzorku (extrakce a čištění), přístrojovou analýzu, i kvantifikaci. Každý z analytických kroků může být ovlivněn řadou faktorů, včetně složení vzorku

(např. pH, obsah vody, lipidů, cukrů) (Anastassiades et al. 2003). Většina studií je prováděna *in vitro* s vyššími koncentracemi anthelmintik, než jaké jsou nalezeny v životním prostředí, je tedy následně třeba *in vitro* poznatky též testovat v reálných podmínkách.

Předmětem optimalizace ve fázi vývoje bylo zvolit vhodný poměr zkoumané matrice společně s extrakční a přečišťovací směsí a na základě předchozích testů zvolit i vhodný interní standard. Izotopicky značené standardy se často používají ke korekci případného potlačení iontů. Stejně je tak tomu i v případě látky FBZ-D₃, který jsme použili jako interní standard v našich vzorcích.

Na základě porovnání ME u jednotlivých koncentračních hladin látek v rozpouštědle i v matrici půdy, analyzovaných UHPLC-MS/MS systémem, které je uvedeno výše, byla pro extrakci FBZ z environmentálních vzorků zvolena metoda AOAC 2007.01. Optimalizace extrakční metody QuEChERS spočívala v přidání disperzního čištění. Jako nejvhodnější se projevil primární a sekundární amin (PSA) ve směsi s MgSO₄. Optimalizovaná chromatografická separace využívala ionizaci elektrosprejem a hmotnostní analyzátor typu trojitého kvadrupólu. Stanovení bylo zkomplikováno složitostí matrice půdy. Matrici nebylo možné zcela odstranit ani přidáním přečišťovacího kroku ve formě d-SPE u zvolené extrakční metody, a docházelo tedy ke značným interferencím. Více ovlivněna byla metoda EN QuEChERS v porovnání s AOAC metodou. Přítomnost interferencí jednoznačně ukazuje, že zatížení způsobené ME a s tím spojené potenciální problémy s výtěžností a případnou sorpcí je tématem, kterému je potřeba se i nadále věnovat. Snaha o zavádění metod s efektivnější eliminací ME ve všech výzkumných oblastech by mohla do budoucna významně posunout analytické metody kupředu.

Z výsledků této bakalářské práce vyplývá, že FBZ, FBZ-SO a FBZ-SO₂ lze od sebe takto optimalizovanou metodou odlišit, a tedy stanovit kvalitativní i kvantitativní hledisko, i v přítomnosti ME. Tato práce doplňuje studie prováděné na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a zároveň poskytuje prostor pro další navázání, a to nejen z hlediska aplikace metody na reálné vzorky.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo optimalizovat stanovení léčivé látky fenbendazol a jejích dvou metabolitů v půdních vzorcích, tedy optimalizovat UHPLC-MS/MS metodu spolu s extrakční technikou QuEChERS.

- Extrakční technikou AOAC 2007.01 a EN 15662:2008 byly provedeny extrakce vzorků půdy.
- Zkoumán byl i vhodný sorbent pro doplňovací přečišťovací krok pomocí d-SPE.
- Pro normalizaci kvantitativního hlediska byl využit IS FBZ-D₃.
- Proběhlo hodnocení ME metodou porovnání kalibračních křivek a metodou postextrakčního přídávku, následovalo stanovení extrakční výtěžnosti.
- Na základě hodnocení ME bylo provedeno porovnání obou metod QuEChERS.

Zvolenou kombinací pro reálné vzorky se stala metoda AOAC 2007.01, doplněna přečištěním 150 mg PSA + 900 mg MgSO₄. Pro tuto kombinaci byl uskutečněn validační proces pro UHPLC-MS/MS analýzu.

POUŽITÉ ZKRATKY

ACN	acetonitril
AOAC	metoda QuEChERS- metoda AOAC INTERNATIONAL (ang. Association of Official Analytical Chemists) se spec. extrakční směsí
API	ionizace za atmosférického tlaku
C18	oktadecylsilan
ddH ₂ O	redestilovaná H ₂ O
D-SPE	disperzní SPE
EN	metoda QuEChERS- metoda Evropského výboru pro normalizaci (ang. European Committee for Standardization) se spec. extrakční směsí
ESI	ionizace elektrosprejem
FBZ	fenbendazol
FBZ-D ₃	fenbendazol-D ₃
FBZ-SO	fenbendazol sulfoxid
FBZ-SO ₂	fenbendazol sulfon
GCB	grafitizovaný uhlík
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
IS	interní standard
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce kapalina-kapalina (ang. Liquid-Liquid extraction)
ME	matricové efekty
MeOH	methanol

MRM	selektivní záznam více reakcí v hmotnostní spektrometrii
MS	hmotnostní spektrometrie
NIST	Národní institut standardů a technologie
PSA	primární-sekundární amin
QC	kontrolní vzorek (ang. Quality Control)
SPE	extrakce kapalina-pevná fáze (ang. Solid-Phase.extraction)
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC-MS/MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Příprava kalibrátorů	30
Tab. 2 Kalibrace.....	33
Tab. 3 Molekulová hmotnost a vybrané produktové ionty analyzovaných sloučenin....	35
Tab. 4 Preciznost a přesnost měření v rámci QC vzorků.....	36
Tab. 5 Výsledky ME metodou porovnání směrníc kalibračních křivek	37
Tab. 6 Parametry kalibračního rozsahu pro FBZ, FBZ-SO, FBZ-SO ₂	40
Tab. 7 Extrakční výtěžnost a ME vyhodnoceny dle metody postexkračního přídávku .	41

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Fenbendazol.....	13
Obr. 2 Fenbendazol sulfoxid.....	13
Obr. 3 Fenbendazol sulfon.....	13
Obr. 4 Metoda porovnání směrníc kalibračních křivek (převzato od Svoboda 2017)....	25
Obr. 5 Metoda postextrakčního přídávku (převzato od Svoboda 2017).....	26
Obr. 6 Fenbendazol- D ₃	29
Obr. 7 Průběh gradientové eluce.....	35
Obr. 8 Hodnocení ME u FBZ-SO	38
Obr. 9 Hodnocení ME u FBZ-SO ₂	38
Obr. 10 Hodnocení ME u FBZ	39
Obr. 11 Chromatogram FBZ-D ₃	42
Obr. 12 Chromatogram QC vzorku o koncentraci LLOQ	42

POUŽITÁ LITERATURA

Tištěné zdroje

BOXALL, A. B. A., L. A. FOGG, P. A. BLACKWELL, P. BLACKWELL, P. KAY, E. J. PEMBERTON, A. CROXFORD. *Veterinary Medicines in the Environment. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York, NY: Springer New York, 2004, 2004, vol.180, 1-91. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. ISBN 978-0-387-40402-8.

ČATÁR, G., V. KRČMÉRY, K. SOBOTA. *Antiparazitiká*. Martin-Slovenská rep.: Osveta, 1991. *Aktuálne farmakoterapeutiká*. ISBN 80-217-0282-6.

HOLČAPEK, M., ed. *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*. Pardubice: Ediční středisko Univerzity Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-390-8.

LAMKA, J. a L. DUCHÁČEK. *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Vyd. 4. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2790-8.

MÍKA, V. a L. NEUŽIL. *Chemické inženýrství II. 2.*, přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1999. ISBN 80-708-0359-2.

NOVÁKOVÁ, L., M. DOUŠA, P. ČESLA. 2021a. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.

NOVÁKOVÁ, L., M. DOUŠA, P. ČESLA. 2021b. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. 2.* přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8560-6.

RICHARDSON, J.F., J. H. HARKER, J.R. BACKHURST. *Chemical engineering*. 5th ed. Great Britain: MPG Books, 2002. ISBN 0 7506 4445 1.

SVOBODA, P. *Matricové efekty v LC-MS analýze: vznik, hodnocení a jejich odstranění*. Disertační práce. Katedra analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové, 2017.

VRÁBELOVÁ, D. *Monitorovanie rozšírenia albendazolu z trusu ovce domácej v poľnohospodárskej pôde s pomocou LC-MS*. Diplomová práca. Katedra biochemických vied Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovy, Hradec Králové 2021.

Elektronické zdroje

ANASTASSIADES M, LEHOTAY S. J., STAJNBAHER D., SCHENCK F. J. *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. Journal of AOAC International. 2003, 86(2):412-31.

AUS DER BEEK, T., F. A. WEBER, A. BERGMANN, S. HICKMANN, I. EBERT, A. HEIN a A. KÜSTER. *Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives*. Environmental Toxicology and Chemistry. 2016, 35(4), 823-835. ISSN 07307268. Dostupné z: doi:10.1002/etc.3339

BAEDER, C., H. BÄHR, O. CHRIST, et al. *Fenbendazole: A new, highly effective anthelmintic*. Experientia. 1974, 30(7), 753-754. ISSN 0014-4754. Dostupné z: doi:10.1007/BF01924165

BANSAL, Y. a O. SILAKARI. *The therapeutic journey of benzimidazoles: A review*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2012, 20(21), 6208-6236. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2012.09.013

BÁRTÍKOVÁ, H., R. PODLIPNÁ, L. SKÁLOVÁ. *Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants*. Chemosphere. 2016, 144, 2290-2301. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2015.10.137

BOROVCOVÁ, L., V. HAVLÍČEK, K. LEMR. *Rychlé chromatografické separace*. Chemické Listy. 2019, (113), 407-414. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3405>

CAPECE, B. P. S., G. L. VIRKEL, C. E. LANUSSE. *Enantiomeric behaviour of albendazole and fenbendazole sulfoxides in domestic animals: Pharmacological implications*. The Veterinary Journal. 2009, 181(3), 241-250. ISSN 10900233. Dostupné z: doi:10.1016/j.tvjl.2008.11.010

- DÍEZ, C., W.A. TRAAG, P. ZOMMER, P. MARINERO, J. ATIENZA. *Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples.* Journal of Chromatography A. 2006, 1131(1-2), 11-23. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.07.046
- FEKETE, S., J. SCHAPPLER, J. L. VEUTHEY, D. GUILLARME. *Current and future trends in UHPLC.* TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2014, 63, 2-13. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2014.08.007
- FENNER, K., M. ELSNER, T. LUEDERS, M. S. MCLACHLAN, L. P. WACKETT, M. ZIMMERMANN, J. E. DREWES. *Methodological Advances to Study Contaminant Biotransformation: New Prospects for Understanding and Reducing Environmental Persistence?.* ACS ES&T Water. 2021, 1(7), 1541-1554. ISSN 2690-0637. Dostupné z: doi:10.1021/acsestwater.1c00025
- GILBERT-LÓPEZ, B., J. F. GARCÍA-REYES, A. MOLINA-DÍAZ. *Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review.* Talanta. 2009, 79(2), 109-128. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2009.04.022
- GOKBULUT, C., F. AKAR, Q. A. MCKELLAR. *Plasma disposition and faecal excretion of oxfendazole, fenbendazole and albendazole following oral administration to donkeys.* The Veterinary Journal. 2006, 172(1), 166-172. ISSN 10900233. Dostupné z: doi:10.1016/j.tvjl.2005.02.022
- GONZÁLEZ-CURBELO, M. A., B. SOCAS-RODRÍGUEZ, A. V. HERRERA-HERRERA, J. GONZÁLEZ-SÁLAMO, J. HERNÁNDEZ-BORGES, M. A. RODRÍGUEZ-DELGADO. *Evolution and applications of the QuEChERS method.* TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2015, 71, 169-185. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.04.012
- GOSETTI, F., E. MAZZUCCO, D. ZAMPIERI, M. C. GENNARO. *Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A. 2010, 1217(25), 3929-3937. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.11.060
- GRIFFITHS, W. J., A. P. JONSSON, S. LIU, D. K. RAI, Y. WANG. *Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry.* Biochemical Journal. 2001, 355(3), 545-561. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj3550545

- HAMMAD, S. F., I. A. ABDALLAH, A. BEDAIR, F. R. MANSOUR. *Homogeneous liquid-liquid extraction as an alternative sample preparation technique for biomedical analysis*. Journal of Separation Science. 2022, 45(1), 185-209. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.202100452
- HORVAT, A. J. M., S. BABIĆ, D. M. PAVLOVIĆ, D. AŠPERGER, S. PELKO, M. KAŠTELAN-MACAN, M. PETROVIĆ, A. D. MANCE. *Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2012, 31(31), 61-84. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2011.06.023
- JJEMBA, P. K. *Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2006, 63(1), 113-130. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2004.11.011
- KATAOKA, H. *New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2003, 22(4), 232-244. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-9936(03)00402-3
- KLAPKOVÁ, E., R. UŘINOVSÁ, R. PRŮŠA. *Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií*. Klinická biochemie a metabolismus. 2011, 19 (40)(1), 5-8. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/Klapkova.pdf>
- KÖHLER, P. *The biochemical basis of anthelmintic action and resistance*. International Journal for Parasitology. 2001, 31(4), 336-345. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/S0020-7519(01)00131-X
- KÜMMERER, K. *Pharmaceuticals in the Environment*. Annual Review of Environment and Resources. 2010, 35(1), 57-75. ISSN 1543-5938. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-environ-052809-161223
- LEHOTAY, S. J., R. E. MAJORS, M. ANASTASSIADES. *The QuEChERS Revolution*. LCGC Asia Pacific. 2010, vol.13(4), 30-36.
- LOOS, G. A. V. SCHEPDAEL, D. CABOOTER. *Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis*. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. 2016, 374(2079), 52-60. ISSN 1364-503X. Dostupné z: doi:10.1098/rsta.2015.0366

MANO, N. a J. GOTO. *Biomedical and Biological Mass Spectrometry*. Analytical Sciences. 2003, 19(1), 3-14. ISSN 0910-6340. Dostupné z: doi:10.2116/analsci.19.3

MATUSZEWSKI, B. K., M. L. CONSTANZER, C. M. CHAVEZ-ENG. *Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS*. Analytical Chemistry. 2003, 75(13), 3019-3030. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac020361s

NAVRÁTILOVÁ, M., L. RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, P. MATOUŠKOVÁ, M. AMBROŽ, J. LAMKA, I. VOKŘÁL, B. SZOTÁKOVÁ, L. SKÁLOVÁ. *Proof of the environmental circulation of veterinary drug albendazole in real farm conditions*. Environmental Pollution. 2021, 286. ISSN 02697491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2021.117590

NAVRÁTILOVÁ, M., L. RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, L. SKÁLOVÁ, B. SZOTÁKOVÁ, L. LANGHANOVÁ, R. PODLIPNÁ. *Pharmaceuticals in environment: the effect of ivermectin on ribwort plantain (Plantago lanceolata L.)*. Environmental Science and Pollution Research. 2020, 27(25), 202–210. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-020-09442-4

NIST National Institute of Standards and Technology [online]. [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: <https://www.nist.gov>

PANUWET, P., R. E. HUNTER, P. E. D'SOUZA, et al. *Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring*. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 2015, 46(2), 93-105. ISSN 1040-8347. Dostupné z: doi:10.1080/10408347.2014.980775

PESTICIDE GUIDELINES 2021. *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed* [online]. [cit. 2023-04-05] Sante, 2021 (11312). Dostupné z: https://food.ec.europa.eu/system/files/2022-02/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf

PINTO, C. G., M. E. F. LAESPADA, S. H. MARTÍN, A. M. C. FERREIRA, J. L. P. PAVÓN, B. M. CORDERO. *Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples*. Talanta. 2010, 81(1-2), 385-391. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2009.12.013

- PODLIPNÁ, R., L. SKÁLOVÁ, H. SEIDLOVÁ, et al. *Biotransformation of benzimidazole anthelmintics in reed (Phragmites australis) as a potential tool for their detoxification in environment*. *Bioresource Technology*. 2013, 144, 216-224. ISSN 09608524. Dostupné z: 10.1016/j.biortech.2013.06.105
- SCALF, M., M. S. WESTPHALL, L. M. SMITH. *Charge Reduction Electrospray Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*. 2000, 72(1), 52-60. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac990878c
- STUHLÍKOVÁ, L., M. NAVRÁTILOVÁ, L. LANGHANSOVÁ, K. MOŤKOVÁ, R. PODLIPNÁ, B. SZOTÁKOVÁ, L. SKÁLOVÁ. *The Identification of Metabolites and Effects of Albendazole in Alfalfa (Medicago sativa)*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, 21(16). ISSN 1422-0067. Dostupné z: 10.3390/ijms21165943
- SYSLOVÁ, E., P. LANDA, L. STUHLÍKOVÁ, et al. *Metabolism of the anthelmintic drug fenbendazole in Arabidopsis thaliana and its effect on transcriptome and proteome*. *Chemosphere*. 2019, 218, 662-669. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.11.135
- SZULTKA, M., P. POMASTOWSKI, V. RAILEAN-PLUGARU, B. BUSZEWSKI. *Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis*. *Journal of Separation Science*. 2014, 37(21), 3094-3105. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201400621
- TRUFELLI, H., P. PALMA, G. FAMIGLINI, A. CAPPIELLO. *An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry*. *Mass Spectrometry Reviews*. 2011, 30(3), 491-509. ISSN 02777037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.20298
- WAGIL, M., A. BIAŁK-BIELIŃSKA, A. PUCKOWSKI, et al. *Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, 22(4), 2566-2573. ISSN 0944-1344. Dostupné z: doi:10.1007/s11356-014-3497-0
- WOJSŁAWSKI, J., A. BIAŁK-BIELIŃSKA, P. STEPNOWSKI, J. DOŁŻONEK. *Leaching behavior of pharmaceuticals and their metabolites in the soil environment*. *Chemosphere*. 2019, 231, 269-275. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.05.031