UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Stanovení antibiotik technikou LC/MS: ovlivnění validačních parametrů LC/MS metody přítomností matrice

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Hana Tomiczková

Studijní obor: Analytická chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

2024 Olomouc

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Hana Tomiczková
Název práce:	Stanovení antibiotik technikou LC/MS: ovlivnění validačních parametrů LC/MS metody přítomností matrice
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2024
Anotace:	Diplomová práce se zabývá vlivem matrice na stanovení antibiotik v odpadních vodách metodou LC/MS. Práce obsahuje přiblížení do problematiky stanovení antibiotik, matričních efektů a jejich vlivu na validační parametry metody. Byl studován vliv matrice na meze stanovitelnosti, citlivost a výtěžnost SPE. Dále byla zkoumána souvislost mezi matričními efekty, absorbancí a hodnotou CHSK.
Klíčová slova:	Antibiotika, odpadní voda, matrice, matriční efekty, validační parametry, LC/MS, LOQ, citlivost, výtěžnost, SPE
Počet stran:	50
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Hana Tomiczková
Title:	Determination of antibiotics by LC/MS: influence of the matrix on the validation parameters of the LC/MS method
Type of thesis:	Master's thesis
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.
The year of submission:	2024
Annotation:	This Master's thesis deals with the influence of matrix on the determination of antibiotics in wastewater by the LC/MS method. Thesis contains an approach to the issue of the determination of antibiotics, matrix effects and their influence on the validation parameters of the method. The effect of the matrix on the limits of quantification, sensitivity and SPE recovery was studied. Furthermore, the connection between matrix effects, absorbance and COD values was investigated.
Keywords:	Antibiotics, wastewater, matrix, matrix effects, validation parameters, LC/MS, LOQ, sensitivity, recovery, SPE
Number of pages:	50
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 20. 12. 2024 .....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, doc. RNDr. Petru Fryčákovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Univerzitě Palackého v Olomouci za finanční podporu v rámci projektu *IGA_PrF_2024_026*.

Obsah

1 Úvod 8

2 Teoretická část 9

2.1 Antibiotika 9

2.1.1 Stanovení antibiotik 10

2.1.1.1 Předúprava vzorku 10

2.1.1.2 Separace 11

2.1.1.3 Detekce 12

2.2 Matriční efekty 13

2.2.1 Mechanismus ME 14

2.2.2 Měření ME 16

2.2.3 Potlačení a kompenzace matričních efektů 17

2.2.3.1 Příprava vzorku 17

2.2.3.2 Optimalizace chromatografických parametrů 19

2.2.3.3 Externí kalibrace s matričními standardy 19

2.2.3.4 Metoda vnitřního standardu 19

2.2.3.5 Metoda přídavků standardu 21

2.3 Chemická spotřeba kyslíku 21

3 Experimentální část 23

3.1 Chemikálie a přístroje 23

3.2 Analýza HPLC/MS 25

3.3 Pracovní postup 26

3.3.1 Příprava kalibračních a spikovacích roztoků 26

3.3.2 LOQ experiment 28

3.3.3 SPE experiment 29

3.3.4 Stanovení CHSK 30

4 Výsledky a diskuze 31

4.1 Vliv matrice na LOQ 31
4.2 Vliv matrice na citlivost 33
4.3 Vliv matrice na výtěžnost SPE 36
4.4 UV/VIS 38
4.5 CHSK 40
5 Závěr 42
6 Seznam použitých zkratek 43
7 Seznam použité literatury 45

1 ÚVOD

Antibiotika jsou v současnosti nenahraditelným lékem v boji s bakteriálními onemocněními. Jejich užívání v lidské a veterinární medicíně však způsobuje jejich průnik do životního prostředí, kde mohou vyvolat antibiotickou rezistenci přítomných bakterií. Působením antibiotik, a to i v malém množství, na bakterie dojde k vyselektování rezistentních bakterií, které se poté začnou množit za vzniku rezistentních či dokonce multirezistentních kmenů bakterií. Na tyto bakterie pak nefunguje léčba standardními antibiotiky, což způsobuje vyšší morbiditu nebo dokonce mortalitu.

Je proto důležité sledovat výskyt těchto látek v životním prostředí. Nejpoužívanější metodou pro stanovení antibiotik je kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Je to vysoce citlivá a selektivní metoda, jejímž kamenem úrazu jsou však matriční efekty. Ty negativně ovlivňují přesnost stanovení, meze detekce a stanovitelnosti a další důležité parametry metody. Je proto důležité porozumět matričním efektům i jejich vlivu a umět je efektivně potlačit či odstranit.

Teoretická část této práce nastiňuje problematiku antibiotik, jakožto různorodé skupiny látek, a klíčové kroky jejich stanovení. Důraz je pak věnován matričním efektům, jejich mechanismu a metodám jejich kompenzace a odstranění. Experimentální část je zaměřena na studium vlivu matričních efektů na validační parametry LC/MS metody při stanovení sedmi vybraných zástupců antibiotik v odpadních vodách. Cílem je zjištění vlivu matrice na výtěžnost SPE, meze stanovitelnosti a citlivost metody a porovnání výsledků s dostupnou literaturou o stanovení antibiotik. Dalším záměrem experimentů je zjistit, zda by data ze dvou jednoduchých metod, UV/VIS a CHSK, mohly mít nějakou souvislost s matričními efekty.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Antibiotika

Antibiotika jsou látky přirozeného nebo umělého původu, které poškozují nebo usmrcují bakterie, a přitom pokud možno neškodí lidským buňkám a tkáním. Z tohoto důvodu se hojně využívají na léčbu a prevenci bakteriálních onemocnění. [1] Velké množství antibiotik užívaných pro medicínské a veterinární účely vede k jejich výskytu v životním prostředí. Po užití a následném vyloučení antibiotik z těla se zbytkové antimikrobiální látky běžně dostávají do komunálních čistíren odpadních vod. [2] V čistírnách odpadních vod (ČOV) není většina reziduí antibiotik stoprocentně odstraněna a dostává se skrze přečištěnou odpadní vodu do životního prostředí. [3] Jakmile se dostanou do životního prostředí, rezidua antibiotik ve vodě a v sedimentech mohou být potenciálním rizikem pro potravní řetězec, včetně omezení schopnosti půdy rozkládat se, nebezpečných účinků na vodní organismy a vývoje bakteriálních rezistentních genů. [4]

Přítomnost reziduí medicínsky důležitých antibiotik ve vodách je problémem jak pro vodní ekosystémy, tak pro veřejné zdraví. [5] Dlouhodobé vystavení bakterií těmto látkám totiž může vyvolat antibiotickou rezistenci, a to dokonce i v nízkých dávkách. Rostoucí užívání těchto látek pro prevenci a léčbu nemocí a pro podporu růstu zvířat zapříčinilo rozvoj škodlivějších bakterií. V odpadních vodách z farmaceutických závodů a nemocnic byla zpozorována zvýšená bakteriální rezistence. [2] Například v Polsku, stejně jako v jiných zemích, se rezistence bakterií vůči antibiotikům neustále zvyšuje a tento proces úzce souvisí s nadměrným a často zbytečným používáním antibiotik. [6] V současné době je antibiotická rezistence celosvětovým problémem a podílí se nezanedbatelnou měrou na úmrtnosti, především v případě multirezistentních (tzn. odolných vůči více typům antibiotik) bakteriálních kmenů. [7]

Odpadní vody procházejí v čistírnách odpadních vod (ČOV) několikafázovým čištěním, avšak účinnost odstranění reziduí antibiotik je dána jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi a technologií čištění. [7] Technologie čištění jsou cíleny primárně na eliminaci uhlíkatých sloučenin (uhlovodíky, proteiny, lipidy) a v menší míře i biogenních polutantů, tudíž jsou stěží účinné v likvidaci antibiotik. [6] Úplná eliminace reziduí antibiotik je spíše výjimečná, a i v případě pokročilého čištění zůstává v přečištěné vodě stále část původního množství (jednotky až desítky procent), která vstupuje do povrchových vod. [7] Některé studie [8-9] naznačily, že ČOV mohou sloužit jako potenciální rezervoáry genů antibiotické

rezistence, které mohou být přeneseny na lidské bakterie prostřednictvím vodních a potravinových sítí, a tudíž přispívat k šíření antibiotické rezistence. [10]

Termín antibiotikum dnes zahrnuje široké spektrum látek včetně syntetických a přírodních sloučenin. [2] Antibiotika jsou tudíž různorodou skupinou látek, která může být rozdělena do různých tříd, jako jsou beta-laktamy, chinolony, tetracykliny, makrolidy, sulfonamidy a mnoho dalších. Jsou to často komplexní molekuly, které obsahují různé funkční skupiny, proto mohou v závislosti na pH vystupovat jako neutrální molekuly, kationty, anionty nebo zwitterionty. V důsledku této rozdílnosti se jejich fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti, jako jsou fotoreaktivita, sorpční chování, antibiotická aktivita nebo toxicita, mohou lišit v závislosti na pH. [11]

2.1.1 Stanovení antibiotik

Pro pochopení osudu antibiotik v životním prostředí je potřebný vývoj standardizovaných analytických metod pro detekci jejich mnohých reziduí. [5] Nízké koncentrace a rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti antibiotik spolu s komplexitou vzorků životního prostředí však znesnadňují jejich stanovení. [2,6] Proto jsou potřebné vysoce citlivé a selektivní metody pro jejich monitorování ve vodném prostředí. [2] Nejpoužívanější metodou analýzy antibiotik ve vodných matricích je kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. [6]

Simultánní analýzy antibiotik jsou také většinou prováděny s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií a jako předúprava vzorku se používá extrakce tuhou fází (SPE). [5]

2.1.1.1 Předúprava vzorku

Odpadní a povrchová voda obsahuje pevné částice, lipidy, mikroorganismy atd, na které se mohou sorbovat antibiotika. Vyšší afinitu k sorpci na tyto částice mají lipofilní antibiotika. Z tohoto důvodu by mělo předběžné testování zahrnovat analýzu kapalné i pevné fáze matrice. Prvním krokem předúpravy vzorku bývá obvykle filtrace, nejčastěji se používají filtry ze skleněných vláken. [6]

Co se týče extrakčních technik, SPE je atraktivní alternativou ke konvenční extrakci kapalina-kapalina (LLE) a je obvykle používána pro extrakci a čištění vzorků vody (povrchové, podzemní a odpadní vody). [5-6] SPE je v porovnání s LLE méně náročná na čas i práci a používají se při ní menší objemy rozpouštědel. SPE také nabízí vyšší selektivitu a reprodukovatelnost pro současnou extrakci více látek z vodné matrice. Pro dosažení

nejlepší účinnosti SPE je stěžejní výběr optimálního sorbentu. Výběr je založen na pečlivém zvážení polarit analytů a matrice vzorku. [5] Pro analýzu antibiotik se často používají kolonky se sorbentem HLB. [5-6] Jsou vhodné pro polární i nepolární analyty, protože obsahují lipofilní divinylbenzenové jednotky a hydrofilní N-vinylpyrrolidonové jednotky, které jsou vysoce stabilní v širokém rozmezí pH (1-14). [5] Pro zvýšení účinnosti extrakce se doporučuje úprava pH, typicky na hodnotu kolem 3, a přídavek methanolu. [6]

2.1.1.2 Separace

Simultánní stanovení tak rozdílných analytů, jako jsou antibiotika, vyžaduje chromatografickou separaci. Ačkoli má plynová chromatografie vysokou rozlišovací schopnost, antibiotika jsou polární látky, které jsou často nedostatečně těkavé nebo příliš teplotně nestálé pro přímé stanovení bez předchozí derivatizace. Hlavní volbou pro stanovení antibiotik se proto stala kapalinová chromatografie, jelikož umožňuje stanovení s výrazným zjednodušením manipulace se vzorky. [2]

Pro separaci antibiotik se nejčastěji používá stacionární fáze C18. Pouze zřídka a pro vybrané analyty se používají i oktylové (C8) nebo fenylové stacionární fáze. Na C18 fázi jsou analyty separovány pouze na základě rozdílů polarit, zatímco fáze obsahující fenyl využívají navíc π-π interakce pro separaci hydrofilních aromatických sloučenin od ostatních. Fenylové stacionární fáze byly účinné v analýze hydrofilních sloučenin, jako jsou sulfonamidy a chinolony. [5]

Jelikož jsou chemické interakce mezi analyty, mobilní fází a stacionární fází přímo ovlivňovány teplotou kolony, je důležité udržovat konstantní teplotu kolonového prostoru. Nestabilní teplota kolony může mít za následek posuny retenčních časů a změny v pořadí eluce. Pokud distribuce teploty v koloně není stejnoměrná, vyústí to typicky v nesymetrické píky. Teplota kolony pro detekci antibiotik bývá v rozsahu 15-45 °C, nejčastěji mezi 30 a 40 °C. [5]

Mobilní fáze v kapalinové chromatografii je obvykle směs sestávající z polárních a nepolárních rozpouštědel. Jako polární rozpouštědlo se často používá voda a nepolárním rozpouštědlem bývá acetonitril. Většina studií využívá k separaci velkého počtu analytů v komplexní matrici gradientovou eluci. Obvykle je vzorek nastříknut na kolonu s velkým podílem polárního rozpouštědla (vody) a je adsorbován na částice v koloně. Analyty jsou postupně vymývány z kolony zvyšováním podílu nepolárního rozpouštědla v mobilní fázi. Hydrofobní molekuly se na stacionární fázi vážou silněji a mají delší retenční časy, proto je

k eluci těchto látek nutná vyšší koncentrace organického rozpouštědla. Při prudkém zvyšování podílu organického rozpouštědla může být dosaženo rychlých chromatografických separací, není to ale bez rizika překryvu píků v hmotnostním spektru. Při výběru mobilní fáze a gradientu se musí vzít v úvahu polarity analytů. Těkavá aditiva se obvykle přidávají do mobilní fáze ke zvýšení účinnosti ionizace a citlivosti hmotnostního analyzátoru. Několik studií použilo mobilní fáze s přídavkem kyseliny mravenčí v rozsahu 0,01 – 0,5 % i v kombinaci s mravenčanem amonným nebo acetátem amonným. [5]

I přestože mnoho výzkumů hodnotilo mnoho různých rozpouštědel a aditiv pro optimalizaci chromatografických podmínek pro simultánní stanovení reziduí antibiotik, nejpreferovanější mobilní fází byla směs vody a acetonitrilu s přídavkem kyseliny mravenčí. Tato kombinace vykazovala symetrické píky, vyšší intenzity píků a minimální chvostování. [5]

2.1.1.3 Detekce

Analytické techniky typicky používané pro detekci antibiotik jsou HPLC s UV detektorem, fluorescenčním detektorem nebo hmotnostním spektrometrem a jejich použití závisí na chemických vlastnostech analytů. Sulfonamidy, tetracykliny a fluorochinolony jsou díky přítomnosti chromoforů v jejich molekulách často detekovány UV detektory na vlnových délkách 270-290 nm. Fluorochinolony s fluorescenčními vlastnostmi jsou také detekovatelné fluorescenčními detektory s excitační vlnovou délkou 278 nm a emisní vlnovou délkou 445 nm. Ačkoli jsou UV a fluorescenční detektory jednoduché a cenově dostupné, nejsou dostatečně citlivé pro stanovení stopových množství antibiotik ve vzorcích životního prostředí. Kromě toho tyto detektory nejsou schopny detekovat většinu antibiotik, protože většina antibiotik neobsahuje chromofory. Pro analýzu reziduí antibiotik při nízkých koncentracích se proto používá tandemová hmotnostní spektrometrie. [5]

Tandemová hmotnostní spektrometrie je vhodnou technikou pro stanovení antibiotik díky zlepšené selektivitě a vysoké citlivosti. Navzdory této vysoké citlivosti je však obvykle nutný prekoncentrační krok k dosažení nízkých mezí detekce požadovaných při analýze environmentálních vod. [2]

Pro detekci antimikrobiálních látek se jako hmotnostní analyzátor používá nejčastěji trojitý kvadrupól, díky své vysoké citlivosti, selektivitě a širokému lineárnímu dynamickému rozsahu. [2] Hmotnostní analyzátory jsou obvykle používány v tandemu se skenováním prekurzorových a produktových iontů v módu SRM (monitorování vybraných reakcí).

V SRM módu je v prvním analyzátoru (většinou kvadrupól) vybrán prekurzorový ion se specifickým poměrem m/z, který je dále fragmentován kolizním plynem (helium, dusík, argon), nebo elektrickou energií. Jeden z hlavních fragmentů, tzv. produktový ion, je vybrán druhým analyzátorem a poslán do detektoru ke stanovení a potvrzení. SRM mód je rychlá a přesná metoda ke stanovení známých molekul při analýze rutinních vzorků. [5]

K analýze antibiotik za pomoci hmotnostní spektrometrie se převážně používají dvě ionizační techniky – ESI a APCI. Obě jsou to měkké ionizační techniky a pracují za atmosférického tlaku, což je vhodné pro spojení s kapalinovou chromatografií. ESI je mnohem více preferovanější díky vyšší citlivosti a lepší reprodukovatelnosti a je vhodná pro polární, nepolární i tepelně labilní látky. [5,12] Mnoho antibiotik, která mají vysokou molekulovou hmotnost a jsou netěkavá, mají dobrou odezvu v kladném módu ESI. [12] APCI se k detekci antibiotik používá jen zřídka, i přestože je méně náchylná k matričním efektům. [2,12]

2.2 Matriční efekty

Analýza reálných vzorků je komplikována přítomností ostatních složek vzorku označovaných jako matrice. Ta může obsahovat látky s podobnými chemickými vlastnostmi jako analyt, nebo její složky mohou reagovat se stejnými činidly jako analyt nebo způsobovat odezvu přístroje, kterou nebude snadné odlišit od odezvy analytu. Podobně mohou některé složky matrice analyt překrýt a bránit jeho reakci s činidly nebo snižovat jeho odezvu. Všechny tyto a mnohé jiné účinky ovlivňují stanovení analytu a nazývají se matriční efekty (ME). [13]

Matriční efekt je jedním z hlavních problémů při stanovení antibiotik v reálných vzorcích metodou LC/MS. Objevuje se často při použití ESI, protože tento iontový zdroj je velice citlivý na složky přítomné v matrici. [2] ME sice není vidět na chromatogramu, ale má negativní dopad na přesnost a citlivost metod. [14] Způsobuje buď pokles, nebo zvýšení intenzity signálu analytu. ME mohou tudíž významně ovlivnit reprodukovatelnost, linearitu a přesnost metody a vést k chybnému stanovení. [2,15-16]

ME tedy mohou vést k falešně negativním výsledkům v důsledku potlačení signálu iontů analytu, ale i k falešně pozitivním výsledkům v případě, že signál vnitřního standardu bude potlačen více než signál analytu. Matriční efekty mohou drasticky ovlivnit nejen kvantifikaci, ale i identifikaci. Například naměřená hodnota m/z se může výrazněji

odchylovat od skutečné hodnoty v důsledku matričních efektů při použití MS s vysokým rozlišením. [17]

Rozsah ME je velice variabilní a závisí na povaze vzorku. Vzorky životního prostředí obvykle vykazují široké a komplexní složení i v rámci stejného druhu matrice (půda, voda), což negativně ovlivňuje stanovení, přesnost a preciznost metody. Vzhledem k nepředvídatelnosti ME lze pozorovat odchylky v odezvě i mezi různými šaržemi téhož vzorku. [16]

2.2.1 Mechanismus ME

Tang a Kebarle [18] byli první autoři, kteří v roce 1993 demonstrovali, jak silný vliv může mít přítomnost jiných elektrolytů na signál analytu v ESI-MS. Od té doby bylo navrženo mnoho různých mechanismů potlačení iontů, většina z nich je specifická pro použitou ionizační techniku. [16-17] Ačkoli se matriční efekty objevují v ESI i APCI, ESI je k nim mnohem náchylnější. [16-17,19]

Elektrosprej produkuje jedno- nebo vícenásobně nabité ionty přímo z vodně-organického rozpouštědla tvorbou jemného spreje vysoce nabitých kapiček. Úspěšná tvorba iontů je podmíněna dvěma kroky: přechodem analytu do plynné fáze a nabitím analytu, pokud ještě není v nabitém stavu. [14] Jakákoli událost, která by mohla snížit rychlost tvorby kapiček, a tudíž i tvorbu iontů v plynné fázi, by se mohla podílet na potlačení signálu. Mechanismy vedoucí ke snížení ionizační účinnosti tedy mohou být rozděleny do dvou skupin: procesy probíhající v kapalné fázi a procesy probíhající v plynné fázi. King et al. [19] prokázali, že hlavní příspěvek k potlačení signálu je způsoben procesy v kapalné fázi. [16]

Co se týče procesů probíhajících v kapalné fázi, některé teorie říkají, že složky matrice zabraňují analytu v přístupu k náboji, nebo s analytem soutěží o získání náboje. [16-17] Další teorie tvrdí, že složky matrice narušují schopnost analytu zůstat nabitý i v plynné fázi, nebo že zvyšují elektrický odpor či povrchové napětí kapiček. [17] Ačkoli přesný mechanismus matričních efektů stále není plně pochopen, je široce přijímáno, že složky matrice mohou pozměnit účinnost ionizace analytů a ovlivnit intenzitu jejich signálu v důsledku soutěžení o dostupné náboje a o přístup k povrchu kapek pro emisi do plynné fáze. [16-17,20]

Některé studie [19,21] ukázaly, že přítomnost rušivých sloučenin ve vyšší koncentraci může zvýšit viskozitu a povrchové napětí kapek, což změní účinnost jejich

tvorby a odpařování. Změny v kapalné fázi mohou vést ke změně počtu nabitých iontů v plynné fázi. Kromě toho složky matrice nebo aditiva mobilní fáze, které působí jako ion-párující činidla, obvykle snižují ionizační účinnost a mají za následek nízkou odezvu. [16-17]

Mechanismů zodpovědných za potlačení signálu v plynné fázi je rovněž několik. Analyt může být převeden do plynné fáze jako ion, nebo jako součást nabitého klastru rozpouštědla. V plynné fázi může ion ztratit svůj náboj neutralizačními reakcemi nebo přenosem náboje díky přítomnosti interferujících sloučenin s vysokou bazicitou v plynné fázi. [16,18-19,22]

King et al. [19] skrze sérii experimentů ukázali, že matriční efekty jsou výsledkem soutěže mezi netěkavými složkami matrice a ionty analytu o přístup k povrchu kapiček, ze kterého dochází k přechodu do plynné fáze. Došli ale k závěru, že přesný mechanismus změny přechodu analytu do plynné fáze, způsobený těmito netěkavými složkami, je nejasný. Navrhli seznam pravděpodobných účinků souvisejících s přitažlivou silou držící kapku pohromadě a zabraňující tvorbě menších kapiček, který by měl odpovídat za velkou část potlačení ionizace pozorované u elektrospreje. V závislosti na prostředí, ve kterém ionizace a vypařování iontů probíhá, může tato soutěž snížit nebo zvýšit účinnost tvorby iontů analytu přítomných ve stejné koncentraci. Z toho vyplývá, že účinnost tvorby iontů analytu je velmi závislá na matrici vstupující do iontového zdroje. [14]

Matriční efekty jsou také závislé na sloučenině analytu. Bonfiglio et al. [23] došli k závěru, že chemická povaha sloučeniny má významný vliv na stupeň matričních efektů. V této studii se zabývali čtyřmi sloučeninami o různé polaritě a zjistili, že za stejných MS podmínek byl signál nejpolárnější sloučeniny potlačen nejvíce, zatímco signál nejméně polární sloučeniny byl potlačen nejméně. Tento fakt je důležité zahrnout při výběru vhodného vnitřního standardu pro stanovení. Pokud se stanovuje více analytů s rozdílným stupněm polarity, je možné předpokládat nutnost použití více než jednoho vnitřního standardu. [14] Kloepfer, Quintana a Reemtsma [24] ukázali, že sloučeniny s nízkou molekulovou hmotnostní jsou náchylnější k ME. Další studie [20,25] zase popsaly, jak jsou hydrofilní analyty snadněji potlačeny, pokud jsou v matrici přítomny povrchově aktivní látky. [16] Co se týče antibiotik, porovnáním intenzit jejich naměřených signálů se ukázalo, že antibiotika ve stejné třídě obecně vykazovala podobný stupeň potlačení signálu. [12,26]

Autoři systematické studie ME [27], při které analyzovali 129 pesticidů v ovoci a zelenině, došli k závěru, že matriční efekt je více závislý na matrici než na analytu. Rovněž tvrdí, že různé várky stejného ovoce či zeleniny vykazují rozdílné hodnoty ME a tato úvaha může být rozšířena i na jiné matrice (biomedicínské, matrice životního prostředí…). [16]

Meierjohann et al. [28] zase došli k závěru, že ačkoli dříve vymývané látky vykazovaly nižší matriční efekt, stupeň potlačení závisel více na individuální sloučenině než na retenčním čase.

Jak už bylo řečeno, APCI vykazuje nižší matriční efekty než ESI. U APCI je neutrální molekula analytu převedena do plynné fáze vypařením v proudu horkého plynu a ionizace probíhá ion-molekulovými reakcemi až v plynné fázi. Z toho vyplývá, že většina mechanismů vedoucích k potlačení signálu u ESI, není přítomna u APCI. Hlavní příčinou matričních efektů u APCI je ovlivnění přenosu náboje z jehlové elektrody na analyt koeluujícími složkami matrice. [16-17,29] Přispět k potlačení iontů může také přechod analytu do pevné fáze nebo spoluvysrážení netěkavých složek matrice. [17]

2.2.2 Měření ME

Pro stanovení stupně matričního efektu se běžně používají dvě metody: přídavek standardu po extrakci a infuze standardu za kolonou.

Metoda přídavku standardu po extrakci, kterou navrhl Matuszewski et al. [30], spočívá v porovnání odezvy analytu v čistém roztoku a ve vzorku. Stejné množství analytu je přidáno do vzorku po extrakci a do čistého roztoku mobilní fáze. Rozdíl v odezvě mezi vzorkem a čistým roztokem dělený odezvou čistého roztoku určuje stupeň matričního efektu, ke kterému dochází u daného analytu za daných chromatografických podmínek. [14,17]

$$\mathrm{ME}(\%) = \frac{\mathrm{A} - \mathrm{B}}{\mathrm{A}} \cdot 100$$

A… plocha píku analytu v čistém roztoku

B… plocha píku analytu ve vzorku (původně neobsahujícím analyt) spikovaném analytem po extrakci

Pokud je ME roven 0 %, nedochází k matričním efektům. Pokud je ME kladný, dochází k potlačení intenzity signálu a pokud je ME záporný, dochází ke zvýšení intenzity signálu analytu. [17]

Metoda infuze standardu za kolonou, kterou definoval Bonfiglio et al. [23], poskytuje kvalitativní zhodnocení matričního efektu. Na chromatografickou kolonu je nastříknut upravený vzorek (neobsahující analyt) a za kolonou se do eluátu infuzní pumpou nepřetržitě dávkuje konstantní množství analytu. Odezva analytu by tudíž měla být konstantní a případné poklesy nebo vzestupy na chromatogramu indikují matriční efekty, tedy potlačení nebo zvýšení intenzity signálu analytu koeluujícími látkami. [14,17,31]

Tato infuzní metoda dokáže identifikovat chromatografické oblasti, ve kterých dochází k matričním efektům. Pokud je retenční čas analytu v oblasti poklesu nebo vzestupu signálu na chromatogramu, stanovení analytu bude zatíženo matričními efekty. Tato metoda dovoluje zkoumat vliv matrice na odezvu analytu v průběhu celé chromatografické analýzy. Metoda přídavku standardu po extrakci zase umožňuje kvantitativní posouzení matričního efektu. [14,17,31]

Výsledky experimentů využívajících infuzi standardu za kolonou mohou umožnit vyhodnotit vliv různých extrakčních technik na matriční efekty, určit, kdy se v průběhu analýzy matriční efekty objevují, jejich mechanický aspekt a vliv aditiv v mobilní fázi. [14]

2.2.3 Potlačení a kompenzace matričních efektů

Jak již bylo řečeno, koeluující látky způsobují matriční efekty, tudíž pro vývoj robustní HPLC–ESI–MS/MS metody je nutné odstranit či minimalizovat jejich přítomnost. Důležité je rovněž vzít v úvahu zdroj těchto látek. Interferující složky matrice mohou pocházet z aktuálně nebo předešle nastříknutého vzorku (pozdě eluovaná interference) anebo z jejich nahromadění a přetížení chromatografické kolony. [14] Matriční efekt rovněž závisí na konkrétní kombinaci analyt-vzorek [23], tudíž metoda jeho odstranění by měla brát v potaz proměnlivost matrice měřených vzorků. [2]

Při stanovení antibiotik bylo vyzkoušeno mnoho postupů minimalizace ME, např. zlepšení přípravy vzorku, metoda přídavků standardu, použití izotopově značených vnitřních standardů atd. [2] Tato kapitola se bude zabývat těmi nejpoužívanějšími postupy.

2.2.3.1 Příprava vzorku

Jelikož jsou antibiotika ve vodním prostředí přítomná v nízkých koncentracích, je příprava vzorku před samotnou analýzou rozhodující. Primární účel přípravy vzorku je odstranit z komplexní matrice zdroje interference a extrahovat a zakoncentrovat analyty. [5] Příprava vzorku je však spojená se zvýšenou manipulací se vzorkem, což zvyšuje možnost

výskytu analytických chyb. Pro monitorovací programy tento způsob rovněž není nejvhodnější, protože je požadována především rychlost. [2]

Způsobů přípravy vzorků existuje mnoho, mezi nejběžnější patří dělení, filtrace, centrifugace, sonikace, vysrážení, ředění a další způsoby extrakce. Podle typu vzorku a vlastností analytů může být vhodnou volbou extrakce kapalina-kapalina, vysrážení bílkovin, extrakce tuhou fází (SPE) nebo QuEChERS. S vhodným adsorbentem se může pomocí SPE redukovat nebo eliminovat matrice, což může vést ke snížení matričních efektů. [17]

Pro vodní vzorky určené k separaci pomocí kapalinové chromatografie je preferovanou metodou SPE. Vzorky jsou obvykle nejdříve přefiltrovány pro odstranění částic, dále může být k filtrátu přidána EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) a surogátní standardy a poté následuje případná korekce pH a samotná SPE. EDTA vytváří komplexy s kovovými ionty, které by mohly interferovat s extrakcí specifických tříd antibiotik (typicky tetracykliny a makrolidy [2]) a ze surogátního standardu je možné vypočítat výtěžnost SPE. Typ adsorbentu, pH a rozpouštědlo pro extrakci, eluci a rekonstituci se liší s ohledem na chemické vlastnosti analytů. [5]

pH může mít vliv nejen na účinnost adsorpce či desorpce, ale i na zvýšení či snížení matričního efektu. Například Ye a Weinberg [32] dosáhli u polymerního adsorbentu snížení extrakce matrice při pH = 6. [33]

Zakoncentrování vzorku se musí věnovat zvýšená pozornost, protože může být zvýšena koncentrace nejen analytu, ale také potenciálních interferujících látek. [17]

Opačný přístup, kterým je ředění vzorku, může být velice efektivní metoda snížení matričních efektů. Yang et al. [34] pozorovali, že zředění vzorků odpadní vody do určité míry zvýšilo intenzitu signálů analytů. Stejný jev pozorovali Vanderford et al. [35] při analýze říční vody za čistírnou odpadních vod. Se zvyšující se koncentrací odpadní vody ve vzorku roste také velikost potlačení signálu analytu matricí. Tudíž i když se koncentrace analytu ve vzorku jeví jako nižší, je to proto, že velikost potlačení signálu je vyšší. Ředění vzorku je jednoduchá metoda pro minimalizaci matričních efektů, která s sebou ale přináší zvýšení meze stanovitelnosti, což je důležitý parametr v analýze antibiotik, jež se často vyskytují ve stopových množstvích. [2]

2.2.3.2 Optimalizace chromatografických parametrů

Pokud je koncentrace analytu vysoká, nejjednodušší způsob snížení množství koeluujících složek je mimo ředění vzorku i snížení objemu nástřiku vzorku. Další možností může být změna chromatografických podmínek, například snížení rychlosti průtoku nebo gradientu, použití děliče toku za kolonou, kolony se smíšenou fází, mikro nebo nano LC nebo dvoudimenzionální LC systém. [17]

Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie využívající zařízení k přepínání kolon poskytuje alternativní metodu pro přípravu vzorku s minimálním matričním efektem. [14] První kolona funguje na principu SPE a druhá kolona provádí klasickou HPLC separaci analytů eluovaných z první kolony. Použitím automatizované metody přípravy vzorku a dalších vylepšení chromatografického systému se dá výrazně zvýšit prostupnost vzorku. [17]. Při výběru extrakční techniky se musí brát ohled nejen na poskytnutí nejčistšího vzorku, ale také na chromatografickou separaci. Většina matričních efektů se objevuje na začátku separované frakce, proto zvýšení retence analytu na koloně může matriční efekt snížit. Ke snížení matričních efektů může přispět i posunutí retenčního času analytu do oblastí méně zasažených matričními efekty použitím dat z metody infuze standardu za kolonou. Tyto změny však mohou snížit prostupnost vzorku. [14]

2.2.3.3 Externí kalibrace s matričními standardy

Externí kalibrace s použitím matričních kalibračních standardů reprezentuje podobný matriční efekt, jaký vykazují vzorky. [36] Tato metoda používá ke kalibraci spikované extrakty matrice proto, aby matriční efekt v kalibračních roztocích odpovídal tomu ve vzorcích. Tato metoda je obvykle spolehlivější než jednoduchá externí kalibrace. [37]

Tuto metodu potlačení matričních efektů je bohužel složité aplikovat na analýzu vodných vzorků kvůli jejich různému původu a složení matrice, která se může s časem významně měnit. V takových případech je výběr reprezentativního slepého vzorku, který by měl složení matrice podobné ostatním vzorkům, téměř nemožný. [2-3] Dalším problémem je přítomnost antibiotik v téměř všech odpadních vodách, což komplikuje nalezení vhodného slepého vzorku k validaci metody. [3]

2.2.3.4 Metoda vnitřního standardu

U analýzy reálných vzorků je vhodné použití vnitřního standardu pro zlepšení přesnosti stanovení. Je důležité vybrat takovou sloučeninu, která se nevyskytuje ve vzorku,

aby se předešlo falešně pozitivním výsledkům. Pro vnitřní standard je také žádoucí mít podobnou strukturu jako analyt, aby odrážel vlastnosti analytu během celého analytického postupu. [12]

Z toho vyplývá, že ideálním vnitřním standardem je izotopicky značený analyt. [2] Ve snaze co nejúčinněji reprezentovat analyty se používají standardy značené ^{13}C a deuteriem. Značený standard bude účinný pouze tehdy, kdy se dokonale shoduje s analytem v retenčním čase. Z toho vyplývá, že strukturně identický, izotopicky značený vnitřní standard by měl být v ideálním případě přidán pro každý analyt, který má být stanoven. [12]

Při nedostatečné výtěžnosti nedochází k ovlivnění výsledků, stejně jako při koeluci iontů dochází k rovnoměrné změně u vnitřního standardu i u analytu. Matriční efekty neovlivňují poměr vnitřního standardu a analytu, ale nepříznivě ovlivňují dolní mez stanovitelnosti. [38] Izotopicky značené standardy jsou rovněž drahé a ne vždy komerčně dostupné. Za určitých okolností mohou mít deuterované standardy (hlavně ty s vyšším počtem atomů deuteria) lehce odlišné retenční časy než jejich příslušné analyty, což může způsobit nepřesnost stanovení. Tento jev je vyvolán izotopickým efektem deuteria v důsledku malé změny lipofility. V tomto případě by byly vhodnější ^{13}C-, ^{15}N- nebo ^{17}O-značené analogy, které jsou ovšem ještě dražší. [17]

Při použití vnitřního standardu jiného, než izotopicky značeného je vhodné vybrat ten s podobným retenčním časem, i když ani to nezaručuje bezchybné stanovení. Důvodem je pravděpodobně rozdíl ve struktuře, který má za následek odlišné ovlivnění ionizace složkami matrice. [2]

Některé vyvinuté metody [39-41] používají pro všechny zkoumané analyty pouze jeden nebo dva vnitřní standardy. [2] V mnoha multireziduálních studiích byl jako vnitřní standard pro hmotnostní detekci vybrán simaton díky podobnosti jeho retenčního času s analyty, dobré odezvě v ESI+ módu a žádným viditelným matričním efektům. Ve studiích, kde byla analyzována antibiotika spolu s dalšími léčivy, byl velmi často používán ^{13}C-fenacetin. [12] Tímto přístupem se ale nemusí povést vykompenzovat změnu signálu způsobenou matričním efektem pro širokou škálu látek různých chemických tříd přítomných ve vzorku. Matriční efekt totiž nemusí být stejnoměrný po celou dobu chromatografické analýzy. [2,16]

Použití vnitřního standardu navíc efektivně potlačuje jiné kalibrační obtíže, jako jsou variabilita v objemu nástřiku v důsledku vypařování nebo změn ve viskozitě vzorku, ztráty analytu v průběhu úpravy vzorku nebo drift odezvy přístroje v průběhu měření. [37]

2.2.3.5 Metoda přídavků standardu

Metoda přídavků standardu je kalibrační technika, při které se nejprve naměří odezva analytu v čistém vzorku, poté se do něj přidá známé množství standardu analytu a znovu se změří odezva. Tento krok může být několikrát zopakován a poté se z naměřených signálů vypočítá koncentrace analytu v původním vzorku odpovídající naměřenému signálu. [42] Tato metoda je po vnitřním standardu pravděpodobně nejvhodnější metodou pro kompenzaci matričních efektů v komplexních matricích. [17]

Standard se přidává pro každý vzorek a každý analyt, a proto je tato metoda časově náročná a pracná. Tento přístup s sebou přináší víc analýz každého vzorku místo jedné hromadné analýzy, protože každý vzorek musí být kalibrován a stanoven zvlášť. Pro velké množství rutinních vzorků o široké škále koncentrací je tato metoda nepraktická. Ačkoli tato metoda potlačí matriční efekty, nezabrání negativnímu ovlivnění meze detekce a stanovitelnosti. [2,17] I přes všechna tato omezení metoda přídavků standardu poskytuje spolehlivé výsledky pro vzorky s komplexní matricí při nedostupnosti izotopicky značených vnitřních standardů. [37]

2.3 Chemická spotřeba kyslíku

Chemická spotřeba kyslíku neboli CHSK je definovaná jako množství kyslíkových ekvivalentů organické hmoty vzorku, které podléhá oxidaci silnými oxidačními činidly. [43] CHSK je kritický měřitelný parametr pro testování kvality vody, reprezentuje stupeň organického znečištění vod. [43-44] Jako silná oxidační činidla se nejčastěji používají dichroman ($CHSK_{Cr}$) nebo manganistan ($CHSK_{Mn}$). [44] Tato kapitola se bude zabývat $CHSK_{Cr}$.

$CHSK_{Cr}$ je hmotnostní koncentrace kyslíku ekvivalentní množství dichromanu spotřebovanému rozpuštěnými a nerozpuštěnými látkami ve vzorku vody za podmínek specifikovaných v normě ČSN ISO 6060. [45] Podstatou $CHSK_{Cr}$ je redukce dichromanu přítomnými oxidovatelnými látkami. [45]

Při standardní metodě stanovení $CHSK_{Cr}$ jsou oxidační činidlo (dichroman), katalyzátor (stříbrné ionty) a kyselina sírová přidány k vodnému vzorku a zahřívány 2 hodiny, během nichž dochází k oxidaci organických látek. [43,46] Do směsi se rovněž může přidat síran rtuťnatý, který tvorbou komplexů snižuje interferenci chloridových aniontů. [44,46] Zbylý dichroman se titruje odměrným roztokem síranu diamonno-železnatého – viz rovnice (1). [43] Jako indikátor se používá ferroin [45]

$$Cr_2O_7{}^{2-} + 6Fe^{2+} + 14H^+ \rightarrow 2Cr^{3+} + 6Fe^{3+} + 7H_2O \quad (1)$$

Hydrogenftalan draselný se často používá pro ověření metody jako reprezentant organické hmoty [43,46], průběh reakce je znázorněn v rovnici (2).

$$2KC_8H_5O_4 + 10K_2Cr_2O_7 + 41H_2SO_4 \rightarrow 16CO_2 + 46H_2O + 10Cr_2(SO_4)_3 + 11K_2SO_4 \quad (2)$$

Standardní metody stanovení CHSK jsou přesné, spolehlivé a reprodukovatelné. Mají ale i svá omezení, jako jsou dlouhá doba oxidace a titrace, vysoké teploty při oxidaci a vysoká spotřeba drahého síranu stříbrného, vysoce korozivní kyseliny sírové a toxického dichromanu a síranu rtuťnatého. Dalšími problémy jsou interference anorganických látek, jako jsou chloridy a dusitany, a neúplná oxidace těkavých sloučenin. [43-44]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro studium vlivu matrice na validační parametry bylo zvoleno 7 zástupců antibiotik: chloramfenikol (amfenikoly), erythromycin (makrolidy), tetracyklin (tetracykliny), klindamycin (linkosamidy), ofloxacin (fluorochinolony), linezolid (oxazolidinony) a sulfamethoxazol (sulfonamidy). Jako matrice byla zvolena odpadní voda, jelikož obsahuje množství látek a zřejmě tedy bude vykazovat bohaté matriční efekty.

3.1 Chemikálie a přístroje

Chemikálie a pomůcky:

Deionizovaná voda, Direct-Q® Water Purification system, Millipore

Kyselina mravenčí, 98%, p.a., Honeywell Fluka™

Methanol, for HPLC, gradient grade, HiPerSolv CHROMANORM, VWR Chemicals

Acetonitril, for HPLC, gradient grade, HiPerSolv CHROMANORM, VWR Chemicals

Kyselina chlorovodíková, 37%, ACS Reagent, Honeywell Fluka™

Komplexon III (kyselina ethylendiaminotetraoctová, disodná sůl, dihydrát) p.a., PENTA s.r.o.

Kyselina sírová, 96%, p.a., mikroCHEM®

Síran železnato-amonný hexahydrát (p.a.), Lachema

Dvojchroman draselný (čistý), Lachema

Ftalan draselný kyselý, p.a., Lachema

Síran stříbrný, extra pure, Merck

Síran rtuťnatý, p.a., PENTA CHEMICALS UNLIMITED®

Ferroin

Destilovaná voda

SPE kolonka: Waters Oasis® HLB 6cc, 200 mg

CHROMABOND® SPE vacuum manifold for 12 positions

Protein LoBind Tubes 2,0 ml, Eppendorf tubes®

PP Syringe Filters 0,22 µm, Membrane Solutions

250µl glass inserts, deactivated 100/PK, Agilent

Vialky, silanizované, 2ml

Přístroje:

Ultrazvuková čistička Elmasonic S40H

UV-VIS/NIR Spectrophotometer V-770, JASCO

Hmotnostní spektrometr: Waters Xevo TQD

Kapalinový chromatograf: Thermo Scientific UltiMate 3000

Chromatografická kolona: Kinetex 1,7 µm XB-C18 100 Å, 100 x 2,1 mm, Phenomenex

Standardy:

Chloramfenikol – ChemCruz™

Klindamycin – Clindamycine hydrochloride monohydrate, ChemCruz™

Erythromycin – ChemCruz™

Linezolid – ChemCruz™

Ofloxacin – SIGMA-ALDRICH spol. s.r.o.

Sulfamethoxazol – SIGMA-ALDRICH spol. s.r.o.

Tetracyklin – ChemCruz™

Značené standardy:

Chloramphenicol-d_5 – Toronto Research Chemicals

Clindamycin-d_3 Hydrochloride – Toronto Research Chemicals

Erythromycin-$^{13}C_3$ – Toronto Research Chemicals

Linezolid-d_3 – Toronto Research Chemicals

Ofloxacin-d_3 – SIGMA-ALDRICH spol. s.r.o.

Sulfamethoxazole-(phenyl-$^{13}C_6$) – SIGMA-ALDRICH spol. s.r.o.

Tetracycline-d_6 (80%) – Toronto Research Chemicals

Vzorky odpadních vod (ČOV1, ČTi, FN1, FN2, SVÚ a VN1) byly odebírány z různých ČOV převážně v Olomouci a poté přechovávány při -18 °C až do analýzy.

3.2 Analýza HPLC/MS

K analýze vzorků byl použit kapalinový chromatograf Thermo Scientific UltiMate 3000 spojený s hmotnostním spektrometrem Waters Xevo TQD a ke zpracování dat byl použit program MassLynx V4.1. Separace byla provedena na chromatografické koloně Kinetex 1,7 µm XB-C18 100 Å, 100 x 2,1 mm a probíhala při 35 °C a gradientové eluci (viz Tab. I), objem nástřiku vzorku byl 25 µl. Jako mobilní fáze A (MF A) byla použita deionizovaná voda s 0,5 % kyseliny mravenčí. Mobilní fáze B (MF B) byl acetonitril s 0,1 % kyseliny mravenčí. Rychlost průtoku byla 0,400 ml/min. Tyto parametry byly převzaty ze studie K. Hricové et al. [47] a dále optimalizovány. Rychlost průtoku byla oproti původní studii zvýšena a methanol byl nahrazen acetonitrilem z důvodu nižšího tlakového maxima při gradientové eluci.

CHL byl analyzován v negativním módu ionizace, zbytek analytů v kladném módu ionizace. Přechody a kolizní energie analytů byly taktéž přebrány ze studie K. Hricové [47] a přechody analytů byly dále optimalizovány (viz Tab. II).

Tabulka I: Složení mobilní fáze v průběhu chromatografické separace

t (min)	% MF B
0	5
7	90
8	5
10	5

Tabulka II: Parametry MS metody

Analyt	Přechod	Čas (min)	Kolizní energie (V)
CHL d_5	325,90 → 157,10	4,10 - 4,50	20
CHL	320,90 → 152,20	4,10 - 4,50	18
ERY ^{13}C, d_3	720,50 → 162,40	4,50 - 5,00	35
ERY	716,50 → 558,30	4,50 - 5,00	18
TTC d_6	451,10 → 416,00	0,00 - 3,70	19
TTC	445,10 → 154,00	0,00 - 3,70	30
CLD d_3	428,10 → 129,25	3,70 - 4,10	31
CLD	425,10 → 126,20	3,70 - 4,10	31
OFL d_3	365,10 → 321,10	0,00 - 3,70	14
OFL	362,10 → 318,37	0,00 - 3,70	17
LNZ d_3	341,10 → 297,30	3,70 - 4,10	17
LNZ	338,10 → 296,10	3,70 - 4,10	18
SMX $^{13}C_6$	260,10 → 162,20	3,70 - 4,10	15
SMX	254,10 → 156,30	3,70 - 4,10	18

CHL a CHL d5 byly měřeny v ES-, všechny ostatní analyty v ES+.

Tabulka III: Parametry „MS tune file“ metody

Source Voltages	Capillary (kV)	2,50
	Cone (V)	50
Source Temperatures	Desolvation Temp (°C)	500
Source Gas Flow	Desolvation (L/Hr)	1000
	Cone (L/hr)	0
Analyser	LM Resolution 1	2,8
	HM Resolution 1	14,6
	Ion Energy 1	0,5
	LM Resolution 2	7,5
	HM Resolution 2	15,6
	Ion Energy 2	0,4
	Collision Energy MS (V)	3

3.3 Pracovní postup

3.3.1 Příprava kalibračních a spikovacích roztoků

Z pevných standardů neznačených analytů byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml v methanolu, které byly poté zředěny na koncentraci 10 µg/ml methanolem a podle potřeby dále ředěny. Při ředění erythromycinu na koncentraci 10 µg/ml bylo k 10 µl ERY (c = 1 mg/ml) a 980 µl methanolu přidáno 10 µl HCOOH pro převedení

erythromycinu na anhydro formu, která byla měřena. Zásobní roztoky značených standardů o koncentraci 100 µg/ml přechovávané při -80 °C byly podle potřeby ředěny methanolem.

Spikovací roztok neznačených standardů byl připraven ze zásobních roztoků v methanolu o koncentracích analytů uvedených v Tab. IV.

Tabulka IV: Koncentrace neznačených standardů ve spikovacím roztoku a ve vzorcích

Neznačený standard	Koncentrace ve spikovacím roztoku (ng/ml)	Konečná koncentrace ve vzorcích (ng/ml)
CHL	2500	100
ERY	25	1
TTC	250	10
CLD	2,5	0,1
OFL	250	10
LNZ	25	1
SMX	25	1

Spikovací roztoky značených standardů na koncentračních úrovních A6 a A7 byly připraveny v methanolu ze zásobních roztoků a spikovací roztoky na koncentračních úrovních A1-A5 byly připraveny postupným ředěním. Koncentrace jednotlivých analytů jsou uvedeny v Tab. V.

Tabulka V: Koncentrace značených standardů ve spikovacích roztocích pro kalibrační úrovně AX

Značený standard	c A1 (ng/ml)	c A2 (ng/ml)	c A3 (ng/ml)	c A4 (ng/ml)	c A5 (ng/ml)	c A6 (ng/ml)	c A7 (ng/ml)
CHL d_5	10	30	100	300	1000	3000	10000
ERY ^{13}C, d_3	0,1	0,3	1	3	10	30	100
TTC d_6	3,3	10	33,3	100	333,3	1000	3000
CLD d_3	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3	10
OFL d_3	3,3	10	33,3	100	333,3	1000	3000
LNZ d_3	0,1	0,3	1	3	10	30	100
SMX $^{13}C_6$	0,3	1	3,3	10	33,3	100	300

Kalibrační roztoky byly připraveny smícháním 100 µl spikovacího roztoku značených standardů na příslušné kalibrační úrovni, 10 µl spikovacího roztoku neznačených standardů, 90 µl methanolu a 800 µl deionizované vody. Takto připravené kalibrační roztoky byly proměřeny na HPLC/MS za podmínek specifikovaných v kapitole 3.2.

Tabulka VI: Koncentrace analytů v kalibračních roztocích

Analyt	c KA1 (ng/ml)	c KA2 (ng/ml)	c KA3 (ng/ml)	c KA4 (ng/ml)	c KA5 (ng/ml)	c KA6 (ng/ml)
CHL d_5	1	3	10	30	100	300
ERY ^{13}C, d_3	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3
TTC d_6	0,33	1	3,3	10	33,3	100
CLD d_3	0,001	0,003	0,01	0,03	0,1	0,3
OFL d_3	0,33	1	3,3	10	33,3	100
LNZ d_3	0,01	0,03	0,1	0,3	1	3
SMX $^{13}C_6$	0,033	0,1	0,33	1	3,3	10

3.3.2 LOQ experiment

LOQ experimenty byly provedeny na 6 různých odpadních vodách (ČOV1, ČTi, FN1, FN2, SVÚ a VN1). Cca 5 ml odpadní vody bylo vždy přefiltrováno přes polypropylenový filtr a pro každou odpadní vodu byly udělány 4 opakování, celkem tedy 5 replikátů. K SPE extrakci bylo odebráno vždy 5 ml filtrátu.

SPE extrakce byla provedena na kolonkách Oasis HLB s 200 mg sorbentu, postup byl převzat ze studie K. Hricové et al [47]. Kolonky byly nejdříve kondicionovány 5 ml MeOH a poté ekvilibrovány 5 ml 1% Na_2EDTA o pH = 3. Následoval průtok vzorku, který obsahoval 5 ml filtrátu odpadní vody, 556 µl 10% Na_2EDTA a HCl ke korekci pH na hodnotu 3. Kolonky byly promyty 10 ml 1% Na_2EDTA o pH = 3 a eluovány 2 ml MeOH do eppendorfek.

Všechny eluáty stejné odpadní vody byly spojeny, proměřeny na UV/VIS a poté opět rozděleny do eppendorfek o stejném objemu. Všechny vzorky byly poté odpařeny dosucha pod proudem dusíku při 35 °C.

Extrahované a odpařené vzorky byly následně rozpuštěny na celkový objem 500 µl podle Tab. VII. Pro každou odpadní vodu byl 1 replikát rozpuštěn jako „blank“ a zbylé 4 replikáty jako „vzorek“. Odpadní vody ČTi, FN2, SVÚ a VN1 byly naspikovány na koncentračních hladinách A3 až A6. Odpadní vody ČOV1 a FN1 byly naspikovány na koncentračních hladinách A4 až A7. Takto připravené vzorky byly proměřeny na HPLC/MS za podmínek specifikovaných v kapitole 3.2.

Tabulka VII: Rekonstituce vzorků před HPLC/MS analýzou

blank	vzorek
-	50 µl zásobního roztoku značených standardů
20 µl zřeď. spikovacího roztoku neznačených standardů	
80 µl MeOH	30 µl MeOH
400 µl deionizované vody	

3.3.3 SPE experiment

SPE experimenty byly provedeny na 3 různých odpadních vodách (ČOV1, FN1 a SVÚ), pro FN1 a SVÚ bylo uděláno 5 opakování, celkem tedy 6 replikátů, a pro ČOV1 byly udělány 4 replikáty. Odpadní voda byla přefiltrována (viz kapitola 3.3.2) a k SPE extrakci bylo odebráno vždy 5 ml filtrátu.

SPE extrakce byla provedena na kolonkách Oasis HLB s 200 mg sorbentu. Průběh extrakce je kromě složení vzorku totožný s tím v kapitole 3.3.2. Pro každou odpadní vodu byla provedena extrakce 3 různých typů vzorků (každý vždy v 6 replikátech): matrice s přídavkem analytů před SPE (M+A), matrice bez přídavku analytů (M) a rozpouštědlo (deionizovaná voda) s přídavkem analytů (R+A). Složení těchto vzorků je znázorněno v Tab. VIII.

Po eluci byly vzorky M a R+A spojeny a všechny vzorky byly poté odpařeny dosucha pod proudem dusíku při 35 °C. Odpařené vzorky byly následně rozpuštěny na celkový objem 500 µl takto: 400 µl deionizované H_2O, 80 µl methanolu a 20 µl spikovacího roztoku neznačených standardů (viz Tab. IV). Takto připravené kalibrační roztoky byly proměřeny na HPLC/MS za podmínek specifikovaných v kapitole 3.2.

Tabulka VIII: Složení vzorku při SPE

R+A	M	M+A
5 ml deionizované H_2O	5 ml odpadní vody	5 ml odpadní vody
556 µl 10% Na_2EDTA		
50 µl spikovacího roztoku A7	-	50 µl spikovacího roztoku A7
HCl na pH = 3		

Spikovací roztok A7… viz Tab. V.

3.3.4 Stanovení CHSK

Roztoky byly připraveny podle odstavce Chemikálie v ČSN ISO 6060 [45] s těmito změnami:

- *H_2SO_4, zřeď.* byla připravena v objemu 100 ml
- *Ag_2SO_4, roztok v H_2SO_4* byl nahrazen roztokem H_2SO_4 (3,5 ml H_2O + 96,5 ml konc. H_2SO_4), Ag_2SO_4 se přidával v pevném stavu přímo do varné baňky
- *$K_2Cr_2O_7$, základní roztok standardu* byl připraven v objemu 100 ml

Standardizace byla provedena s použitím 1 ml $K_2Cr_2O_7$ zředěného na 10 ml zřeď. H_2SO_4 a s přídavkem 2-3 kapek ferroinu, který byl titrován odměrným roztokem $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$.

Stanovení bylo provedeno podle ČSN ISO 6060 [45] s jednou změnou, kdy se místo roztoku Ag_2SO_4 v H_2SO_4 přidalo 0,3 g pevného Ag_2SO_4 přímo do varné baňky. Obsah varné baňky (viz Tab. IX) se 110 minut povařil pod zpětným chladičem a po ochlazení na laboratorní teplotu byl zředěn a poté titrován odměrným roztokem do změny zbarvení. Jako indikátor byl použit roztok ferroinu. Slepý pokus byl proveden včetně varu pod zpětným chladičem. Ke kontrole stanovení byl použit referenční roztok hydrogenftalanu draselného.

Tabulka IX: Obsah varné baňky při stanovení

VZOREK	BLANK
10 ml vzorku	10 ml destilované vody
0,3 g Ag_2SO_4	
5 ml roztoku $K_2Cr_2O_7$	
15 ml roztoku H_2SO_4	

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vliv matrice na LOQ

V tomto experimentu (viz kapitola 3.3.2) byly stanovovány meze stanovitelnosti vybraných antibiotik v rozpouštědle a ve vzorcích. Cílem bylo zjistit, jestli má matrice vliv na LOQ. Jako analyty byly použity izotopicky značené standardy vybraných antibiotik, protože ve vzorcích odpadních vod byla vybraná antibiotika přítomna v množství zabraňujícím studovat v nich jejich meze stanovitelnosti. Analyty se tedy myslí značené standardy antibiotik. Neznačené standardy antibiotik byly použity jako vnitřní standardy.

Tabulka X: Naměřené hodnoty LOQ v matrici a v rozpouštědle (v ng/ml)

Matrice	CHL d_5	ERY ^{13}C, d_3	TTC d_6	CLD d_3	OFL d_3	LNZ d_3	SMX $^{13}C_6$
rozpouštědlo	125	0,0840	1,67	0,00623	1,55	0,0413	0,0698
ČTi	140	0,209	11,5	0,0141	43,4	1,03	0,738
FN2	89,0	0,147	11,4	0,0200	44,2	0,809	0,552
SVÚ	64,9	0,399	11,0	0,0386	44,8	0,793	0,111
VN1	168	0,325	12,5	0,0148	-	0,799	1,62
ČOV1	114	0,394	34,6	0,0227	126	4,38	1,37
FN1	51,4	0,810	29,7	0,0368	129	0,324	1,61

Tabulka XI: Podíl LOQ v matrici a v rozpouštědle

Matrice	CHL d_5	ERY ^{13}C, d_3	TTC d_6	CLD d_3	OFL d_3	LNZ d_3	SMX $^{13}C_6$
ČTi	1,1	2,5	6,9	2,3	28,0	24,9	10,6
FN2	0,7	1,8	6,8	3,2	28,5	19,6	7,9
SVÚ	0,5	4,8	6,6	6,2	28,9	19,2	1,6
VN1	1,3	3,9	7,5	2,4	-	19,3	23,2
ČOV1	0,9	4,7	20,7	3,6	81,2	106,1	19,6
FN1	0,4	9,6	17,8	5,9	83,5	7,8	23,1

Zvýrazněné buňky: LOQ ve vzorcích je nižší než v rozpouštědle.

V Tab. X jsou naměřené hodnoty LOQ stanovené ze tří nejnižších stanovitelných kalibračních bodů pro každou matrici. OFL d_3 ve vzorku VN1 byl viditelný pouze na dvou nejvyšších měřených koncentračních úrovních, tudíž nebylo možné vypočítat LOQ.

V Tab. XI je pro každý analyt znázorněno, kolikrát vyšší je LOQ v matrici než v rozpouštědle. Pro všechny analyty s výjimkou CHL d_5 došlo ke zvýšení/zhoršení hodnot

LOQ, tudíž k potlačení nebo překryvu signálu analytů vlivem matrice. Pouze u CHL d_5 došlo v několika vzorcích ke snížení/zlepšení hodnot LOQ (viz zvýrazněné hodnoty v Tab. XI).

Studie autorů Meierjohann et al. [28] došli k závěru, že ačkoli dříve vymývané látky vykazovaly nižší matriční efekt, stupeň potlačení závisel více na individuální sloučenině než na retenčním čase. Tuto teorii potvrzuje OFL d_3, který má nejnižší retenční čas (viz Tab. XII) a ve většině vzorků vykazuje nejvyšší hodnoty potlačení signálu (viz Tab. XI).

Tabulka XII: Retenční časy analytů

Analyt	t_R (min)
CHL d_5	4,24
ERY ^{13}C, d_3	4,78 a 5,00
TTC d_6	2,99 a 3,25
CLD d_3	3,89
OFL d_3	3,18
LNZ d_3	4,00
SMX $^{13}C_6$	3,96

Z Tab. XI je patrné, že u většiny analytů došlo ke zhoršení limitů stanovitelnosti, u LNZ d_3 ve vzorku ČOV1 došlo ke zhoršení dokonce o dva řády. Je tudíž velký rozdíl mezi měřením mezí detekce a stanovitelnosti analytů v čistém rozpouštědle a přímo v matrici. I přes použití asi nejlepší kompenzace matričních efektů, tj. izotopicky značených standardů, došlo k takovému zhoršení mezí stanovitelnosti.

Některé studie [48-49] nespecifikují, v jakých vzorcích byly meze detekce či stanovitelnosti měřeny. V případě, že by se jednalo o parametry naměřené v čistých roztocích standardů, mohly by se některé naměřené koncentrace blízké těmto mezím vyskytovat už pod reálnými mezemi detekce či stanovitelnosti.

Aydin et al. [50] rovněž nespecifikovali, v jakých vzorcích se LOQ měřily. Naměřené meze stanovitelnosti deseti antibiotik se pohybovaly v rozmezí 0,013-2,890 pg/l. Vzhledem k tomu, že v jiných studiích [3,41,51-60] se meze stanovitelnosti stejných analytů obvykle pohybují o dva a více řádů výše, se dá předpokládat, že byly tyto hodnoty naměřeny v čistých roztocích standardů. Konkrétně u erythromycinu, u něhož byla naměřena hodnota LOQ 0,017 pg/l, má v jiných studiích [3,41,51,53-56,58-60] hodnotu minimálně o čtyři řády vyšší.

4.2 Vliv matrice na citlivost

Data v této kapitole vychází ze stejného experimentu (viz kapitola 3.3.2) jako předešlá kapitola. Cílem bylo porovnat citlivost, tj. směrnice kalibračních závislostí, ve vzorcích a v rozpouštědle a zjistit, jaký na ně má matrice vliv. Kalibrační závislosti byly stanoveny proložením tří nejnižších stanovitelných kalibračních bodů přímkou.

Tabulka XIII: Podíl směrnic kalibračních závislostí v matrici a v rozpouštědle

Matrice	CHL d_5	ERY ^{13}C, d_3	TTC d_6	CLD d_3	OFL d_3	LNZ d_3	SMX $^{13}C_6$
ČTi	0,8	1,3	1,0	0,6	5,3	0,8	0,5
FN2	0,9	0,3	1,0	0,09	0,4	0,06	0,07
SVÚ	0,9	2,2	1,0	0,8	9,1	0,8	0,02
VN1	0,9	1,9	1,0	0,6	-	1,1	2,3
ČOV1	1,1	1,6	2,3	0,4	9,6	0,7	0,2
FN1	0,9	1,6	2,1	0,001	9,9	0,01	0,003

Červeně zvýrazněné buňky: zhoršení citlivosti.

Zeleně zvýrazněné buňky: zlepšení citlivosti.

Tabulka XIV: Podíl směrnic kalibračních závislostí v matrici a v rozpouštědle nekorigovaných na vnitřní standard

Matrice	CHL d_5	ERY ^{13}C, d_3	TTC d_6	CLD d_3	OFL d_3	LNZ d_3	SMX $^{13}C_6$
ČTi	0,82	0,79	0,59	0,83	0,64	0,36	0,42
FN2	1,05	0,56	0,43	1,12	0,72	0,30	0,31
SVÚ	1,31	0,44	0,40	0,88	0,56	0,34	0,40
VN1	0,96	0,45	0,25	0,86	-	0,30	0,31
ČOV1	1,18	0,44	0,59	0,68	2,36	0,24	0,32
FN1	1,22	0,28	0,51	0,63	2,43	0,28	0,33

Červeně zvýrazněné buňky: zhoršení citlivosti.

Zeleně zvýrazněné buňky: zlepšení citlivosti.

Tabulky XIII a XIV ukazují, kolikrát vyšší je směrnice analytu v matrici oproti rozpouštědlu. To znamená, že hodnoty vyšší než 1 vyjadřují zlepšení citlivosti v matrici a naopak. Směrnice, z nichž byla vytvořena Tab. XIII, byly vytvořeny jako závislost podílu ploch píků analytu a vnitřního standardu (A_A/A_{IS}) na koncentraci. Směrnice, z nichž byla vytvořena Tab. XIV, byly vytvořeny jako závislost plochy píku analytu (nekorigované na vnitřní standard) na koncentraci.

V Tab. XIII není vidět žádný jasný trend ve změně citlivosti ani z pohledu analytů, ani z pohledu matric. Některé analyty tíhnou ke zhoršení citlivosti v matrici (CLD d_3, SMX

$^{13}C_6$, LNZ d_3), některé ke zlepšení (OFL d_3, ERY ^{13}C, d_3) a u některých se vlivem matrice citlivost příliš nemění (CHL d_5, TTC d_6). Změna citlivosti se ale natolik liší v závislosti na matrici, že se nedá říct, že by u daného analytu došlo vždy ke zhoršení či zlepšení citlivosti. Z pohledu matrice jsou výsledky ještě více nevypovídající. Tyto hodnoty však mohou být ovlivněny absolutními hodnotami ploch píků vnitřních standardů (viz Tab. XV). Jako vnitřní standardy byly totiž použity neznačené standardy antibiotik, které jsou v těchto reálných matricích už přítomné.

Tabulka XIV je vytvořená z hodnot nekorigovaných na vnitřní standard. Tyto výsledky se z pohledu analytů zdají konzistentnější. Jednotlivé analyty mají oproti tabulce XIII podobnou hodnotu zhoršení/zlepšení citlivosti ve všech matricích. Tyto hodnoty u CHL d_5 navíc korespondují s hodnotami zhoršení/zlepšení LOQ (tabulka XI). Tam, kde u CHL d_5 došlo ke zlepšení LOQ, došlo i ke zlepšení citlivosti a naopak.

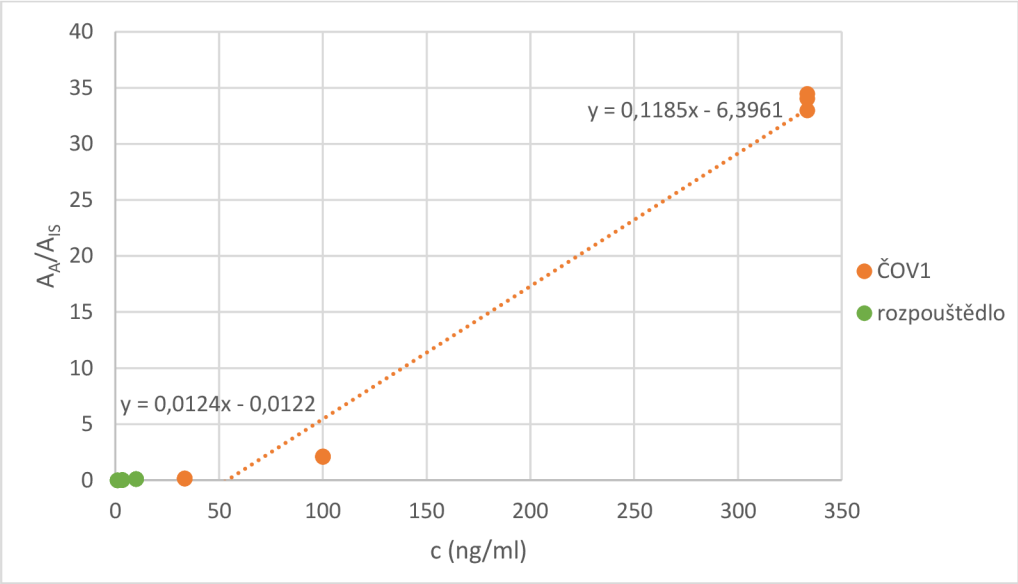
Tabulka XV: Absolutní plochy píků vnitřních standardů v matrici a v rozpouštědle (průměr ± směrodatná odchylka, n = 9)

Matrice	CHL	ERY	TTC	CLD	OFL	LNZ	SMX
Rozpou-štědlo	40 ± 5	437 ± 55	939 ± 40	628 ± 59	7881 ± 404	488 ± 66	537 ± 83
ČTi	57 ± 15	256 ± 27	543 ± 26	1006 ± 319	886 ± 79	194 ± 27	587 ± 104
FN2	46 ± 7	681 ± 14	383 ±33	6515 ± 85	12879 ± 240	2791 ± 87	2839 ± 137
SVÚ	72 ± 14	129 ± 47	366 ± 14	651 ± 35	438 ± 29	240 ± 16	10270 ± 265
VN1	57 ± 12	91 ± 4	231 ± 20	820 ± 29	-	151 ± 9	88 ± 8
ČOV1	49 ± 11	107 ± 11	260 ± 18	880 ± 49	1835 ± 60	174 ± 14	1253 ± 77
FN1	64 ± 12	71 ± 8	235 ± 15	270415 ± 11268	1816 ± 52	26695 ± 741	60218 ± 2038

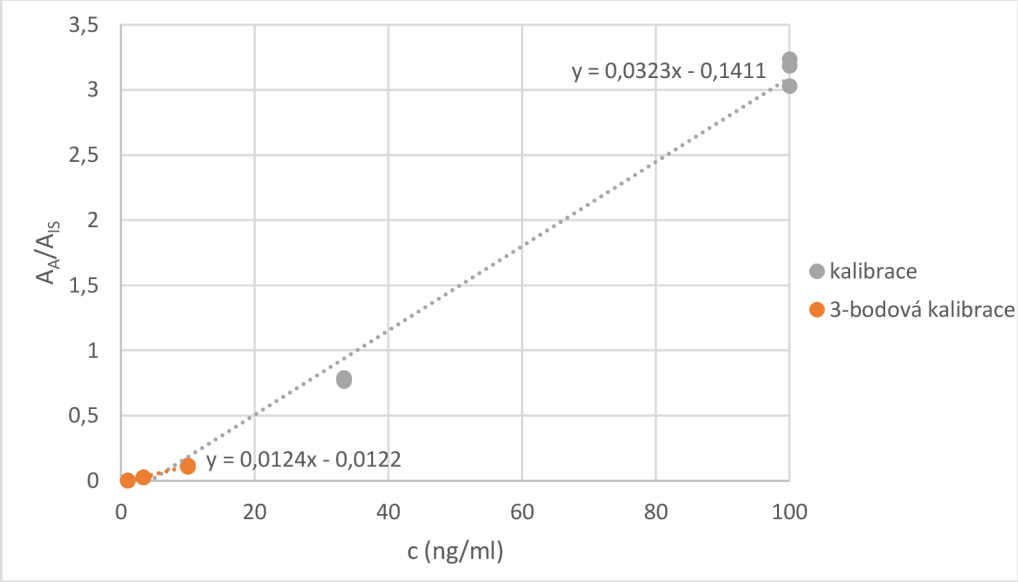
Tabulka XVI: Absolutní plochy píků analytů v nejvyšším kalibračním bodě v matrici a v rozpouštědle (průměr ± směrodatná odchylka, n = 3)

Matrice	CHL d_5	ERY ^{13}C, d_3	TTC d_6	CLD d_3	OFL d_3	LNZ d_3	SMX $^{13}C_6$
Rozpou-štědlo	19 ± 1	94 ± 4	1188 ± 40	198 ± 12	833 ± 26	99 ± 5	212 ± 20
ČTi	18 ± 3	249 ± 22	2227 ± 80	562 ± 41	5015 ± 715	1055 ± 96	898 ± 23
FN2	19 ± 2	177 ± 6	1641 ± 29	740 ± 24	5720 ± 136	853 ± 74	657 ± 19
SVÚ	26 ± 2	140 ± 16	1507 ± 54	1805 ± 9	4399 ± 32	1007 ± 25	824 ± 13
VN1	19 ± 2	146 ± 11	933 ± 36	577 ± 9	-	875 ± 11	1888 ± 29
ČOV1	23 ± 2	404 ± 15	6713 ± 199	1344 ± 4	61331 ± 1225	2420 ± 43	2059 ± 95
FN1	24 ± 2	276 ± 5	5846 ± 170	1316 ± 27	63296 ± 501	813 ± 16	2147 ± 70

U OFL d_3 došlo u dvou matric (ČOV1, FN1) ke zvýšení citlivosti, ale zároveň došlo ke zhoršení LOQ v těch stejných matricích o téměř dva řády. Při pohledu na kalibrační křivky naměřené v rozpouštědle a v ČOV1 (viz Obr. 1) je vidět, že kalibrace v rozpouštědle byla naměřena při mnohem nižších koncentracích než kalibrace v ČOV1 a měla horší citlivost. Na Obr. 2 jsou znázorněny dvě kalibrační přímky v rozpouštědle, jedna je vytvořena proložením bodů v celém rozsahu kalibrace a druhá je vytvořena proložením tří nejnižších bodů. Proložením pouze tří nejnižších bodů se citlivost zhoršila. Z toho by se dalo vyvodit, že citlivost závisí na koncentračním rozsahu kalibrace.



Obrázek 1: Kalibrační závislost OFL d_3 v matrici ČOV1 a v rozpouštědle



Obrázek 2: Kalibrační závislost OFL d_3 v rozpouštědle

4.3 Vliv matrice na výtěžnost SPE

Cílem tohoto experimentu (viz kapitola 3.3.3) bylo zjistit, jestli má matrice nějaký vliv na výtěžnost SPE. SPE byla provedena dvěma způsoby: za prvé byly analyty extrahovány společně s matricí (M) a za druhé byly analyty extrahovány zvlášť v rozpouštědle a spojeny s extrahovanou matricí po extrakci. Spojením byl zachován vliv matrice při samotném stanovení. Stanovení bylo provedeno pro vzorky tří odpadních vod (FN1, ČOV1 a SVÚ). Jako analyty byly opět použity izotopicky značené standardy.

Tabulka XVII: Vliv matrice na výtěžnost SPE

Matrice	CHL d_5	ERY ^{13}C, d_3	TTC d_6	CLD d_3	OFL d_3	LNZ d_3	SMX $^{13}C_6$
FN1	1,07	1,53	1,46	1,04	1,25	0,99	1,02
ČOV1	0,96	1,10	-	0,83	1,73	1,06	1,11
SVÚ	1,55	1,70	-	1,69	-	1,65	1,60

Červeně zvýrazněné buňky: statisticky významné zlepšení/zhoršení výtěžnosti.

$$R_{SPE} = \frac{\frac{A_A}{A_{IS}}(M)}{\frac{A_A}{A_{IS}}(R)} \tag{3}$$

R_{SPE}... změna výtěžnosti SPE

A_A... plocha píku analytu

A_{IS}... plocha píku vnitřního standardu analytu

M... vzorky, kde byly analyty extrahovány společně s matricí

R... vzorky, kde byly analyty extrahovány v rozpouštědle

Hodnoty v Tab. XVII byly spočítány podle vzorce (3). Tab. XVII znázorňuje, kolikrát vyšší byla výtěžnost analytů extrahovaných ve vzorcích s matricí oproti vzorkům bez matrice. Červeně zvýrazněné buňky znamenají statisticky významné zlepšení či zhoršení výtěžnosti. Pro toto porovnání byl proveden F-test shody dvou rozptylů a dvouvýběrový t-test rovnosti středních hodnot dvou souborů. V tabulce některé hodnoty chybí, protože jejich výsledky byly podezřelé, a byly tudíž vyloučeny. Příčinou bylo znehodnocení některých vzorků v průběhu práce a namíchání nového spikovacího roztoku.

Z Tab. XVII je patrné, že téměř ve všech případech došlo ke zlepšení výtěžnosti ve vzorcích s matricí, což je překvapivé. Možné vysvětlení je, že výtěžnost v rozpouštědle zřejmě nebyla stoprocentní a část látky se na sorbentu nevratně zadržovala. K této nevratné sorpci nemuselo v přítomnosti matrice docházet a výtěžnost se zlepšila. Zvláště u matrice SVU došlo u všech analytů ke statisticky významnému zlepšení výtěžnosti.

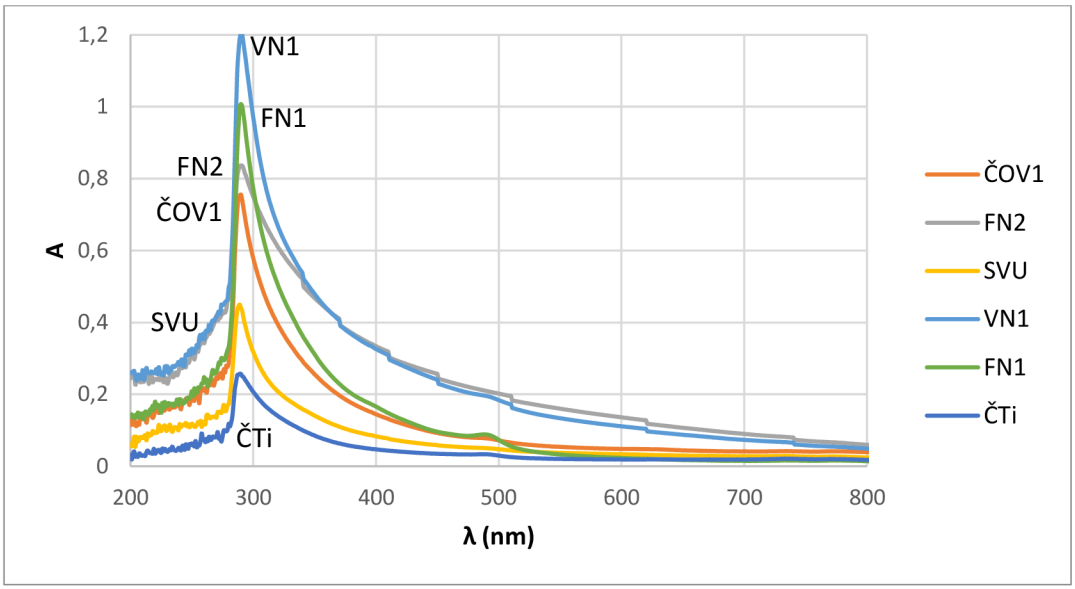
Studie autorů Renew a Huang [61] rovněž předpokládala, že organické látky snižují účinnost extrakce. U ofloxacinu ale dosáhli výtěžnosti v deionizované vodě 101 ± 10 % a v odpadních vodách výtěžností 129 ± 25 % a 114 ± 24 %. Rovněž je zde vidět mírné zlepšení výtěžnosti v matrici. Autoři se domnívají, že přítomnost dalších elektrolytů v matrici usnadňuje sorpci antibiotik na HLB polymer.

Ve studii autorů Ofrydopoulou et al. [62], kde byly stanovovány výtěžnosti v kohoutkové, odpadní a přečištěné odpadní vodě, byla v kohoutkové vodě naměřena vyšší výtěžnost u erythromycinu, ale nižší výtěžnost u sulfamethoxazolu oproti jejich výtěžnostem v odpadních vodách. V článku autorů López-Serna et al. [63] byly v čisté vodě oproti odpaní vodě naměřeny výtěžnosti vyšší pro ERY a CHL, nižší pro OFL a srovnatelné pro TTC a SMX. Výtěžnost tedy závisí nejen na matrici ale i na analytu.

Studie autorů Pugajeva et al. [54] a Kim a Carlson [64] testovali, jak se mění výtěžnost s měnící se koncentrací analytu. V obou dvou studiích došlo u sulfamethoxazolu k poklesu výtěžnosti se zvyšující se koncentrací spiku a u erythromycinu byly výtěžnosti na všech hladinách srovnatelné.

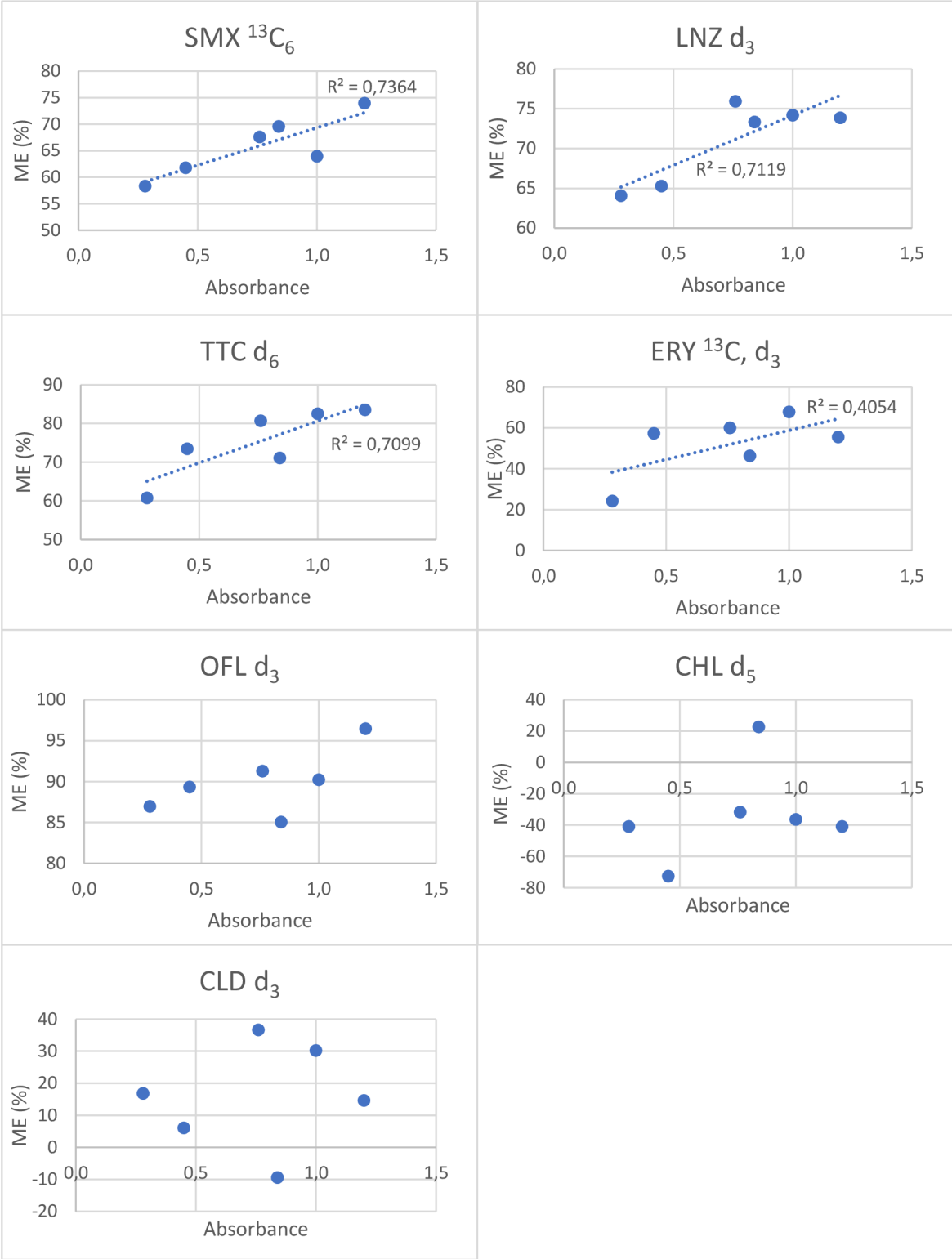
4.4 UV/VIS

Tento experiment měl za cíl zjistit, jestli má hodnota absorbance souvislost s matričními efekty. Byla naměřena UV/VIS spektra (viz Obr. 3) šesti odpadních vod po provedení SPE (viz kapitola 3.3.2). Pro porovnání s ME byly použity hodnoty maxim absorbance při vlnové délce 290 nm (u SVU 289 nm).



Obrázek 3: UV/VIS spektra šesti odpadních vod

Z grafů závislosti ME na absorbanci (viz Obr. 4) je patrné, že u analytů SMX $^{13}C_6$, LNZ d_3 a TTC d_6 s koeficientem determinace vyšším než 0,7 existuje korelace. U ostatních analytů je korelace slabší (ERY ^{13}C, d_3, OFL d_3) nebo vůbec žádná (CHL d_5, CLD d_3). Tato data znovu ukazují, že matriční efekt je závislý na konkrétní kombinaci analyt-matrice. Je také důležité vzít v úvahu, že zřejmě ne všechny látky způsobující matriční efekty budou viditelné v UV/VIS spektru a rozhodně ne při jedné specifické vlnové délce. I přestože se u některých analytů korelace našla, absorbance bohužel není vhodným prediktorem velikosti matričních efektů působící na různorodou skupinu látek v komplexních matricích.



Obrázek 4: Závislost matričního efektu na absorbanci pro jednotlivé analyty

Matrice v pořadí se stoupající hodnotou absorbance: ČTi, SVU, ČOV1, FN2, FN1, VN1.

4.5 CHSK

Tento experiment měl za cíl zjistit, zda by CHSK mohla být vhodným prediktorem matričních efektů. CHSK byla stanovena podle postupu v kapitole 3.3.4 a vypočtena podle vzorce (4). ME byl spočítán podle vzorce (5) z dat naměřených v experimentu popsaném v kapitole 3.3.2 na kalibrační úrovni A5.

$$CHSK = \frac{8000 \cdot c \cdot (V_1 - V_2)}{V_0} \qquad [mg\ O_2/l] \tag{4}$$

c... titr

V_1... spotřeba odměrného roztoku při slepém pokusu

V_2... spotřeba odměrného roztoku při vzorku

V_0... zkoušený objem vzorku před zředěním

8000... molární hmotnost ½ O_2

$$ME = \frac{A_A(RA5) - A_A(MA5)}{A_A(RA5)} \cdot 100 \qquad [\%] \tag{5}$$

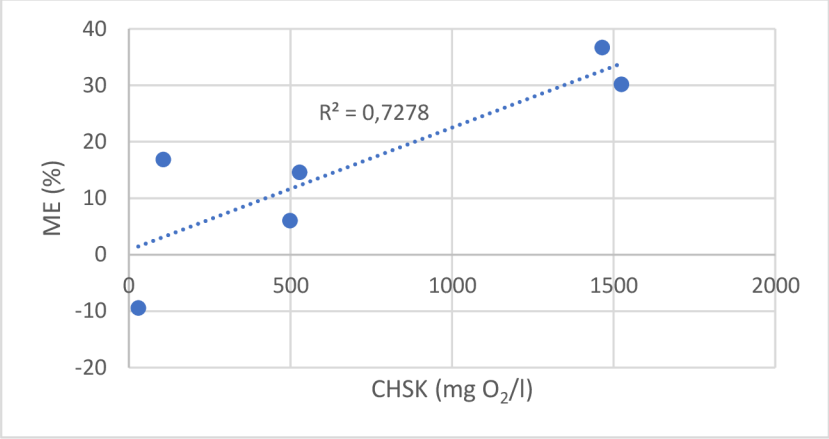
$A_A(RA5)$... plocha píku analytu v rozpouštědle na kalibrační úrovni A5

$A_A(MA5)$... plocha píku analytu v matrici na kalibrační úrovni A5

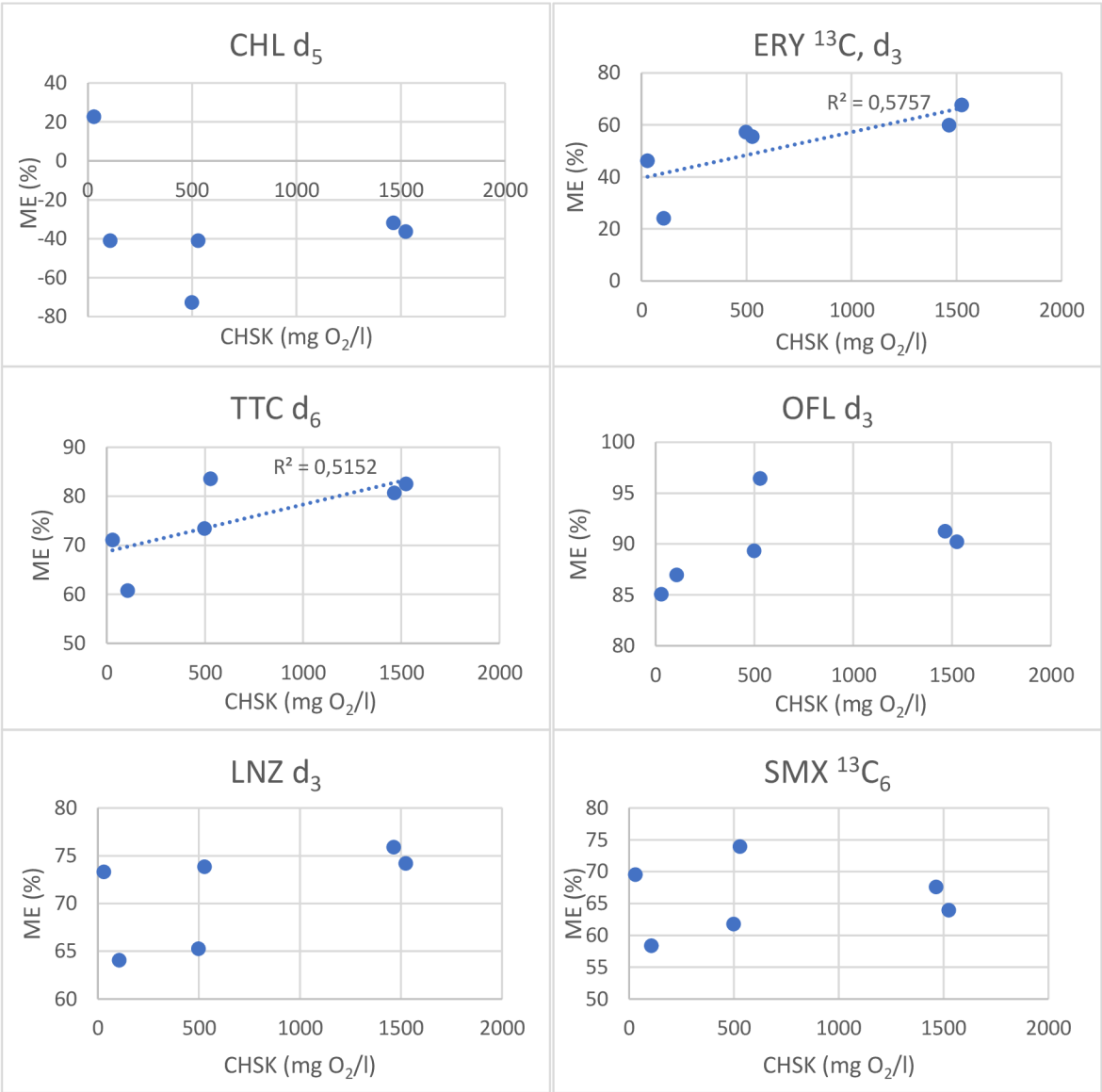
Tabulka XVIII: Naměřené hodnoty CHSK

Matrice	CHSK (mg O_2/l)
ČTi	106
FN2	29
SVÚ	498
VN1	528
ČOV1	1464
FN1	1524

Největší korelace mezi matriční efektem a hodnotou CHSK se našla u CLD d_3 (viz Obr. 5) s koeficientem determinace 0,73. U ostatních analytů byla korelace slabší (ERY ^{13}C, d_3 a TTC d_6) nebo žádná (viz Obr. 6). Důvodem bude zřejmě opět závislost ME na konkrétní kombinaci analyt-matrice a příspěvek pouze oxidovatelných látek k hodnotě CHSK. CHSK se bohužel zdá jako ještě méně vhodný parametr pro predikci matričních efektů než absorbance.



Obrázek 5: Závislost matričního efektu na CHSK u CLD d_3



Obrázek 6: Závislost matričního efektu na CHSK pro jednotlivé analyty

5 ZÁVĚR

Antibiotika jsou z pohledu fyzikálně-chemických vlastností velmi různorodou skupinou látek. Nejpoužívanější metodou analýzy antibiotik ve vodných matricích je kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Konkrétních postupů jejich stanovení touto technikou existuje v literatuře mnoho, ale je složitější vybraný postup dobře optimalizovat pro dosažení co nejkvalitnějších výsledků. Je také důležité určit validační parametry metody v konkrétní matrici, jelikož se mohou zásadně lišit od těch naměřených v rozpouštědle. Matriční efekty mají totiž velký vliv na stanovení antibiotik metodou LC/MS.

Sérií experimentů byly zkoumány vlivy matrice na extrakci a validační parametry LC/MS metody. Ve většině případů matriční efekty zhoršují meze stanovitelnosti analytů a citlivost metody. Mohou také snižovat, ale i zvyšovat velikost výtěžnosti SPE. Pro zlepšení parametrů metody je tedy důležité matriční efekty efektivně odstranit. Použití vnitřních standardů zlepší přesnost stanovení, bohužel však nezachrání zhoršení mezí stanovitelnosti. Stále tedy hraje velkou roli úprava vzorku, která může odstranit matrici a tím i nejefektivněji odstranit matriční efekty.

Dalším předmětem výzkumu bylo hledání souvislosti mezi matričními efekty a absorbancí či hodnotami CHSK. Byla nalezena korelace mezi absorbancí a matričním efektem u sulfamethoxazolu, linezolidu a tetracyklinu. V případě CHSK byla nalezena korelace s matričními efekty u klindamycinu. Ani v jednom případě se ale bohužel nepodařilo najít uspokojivou závislost pro všechny analyty.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A_A	plocha píku analytu
A_{IS}	plocha píku vnitřního standardu
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
CHL	chloramfenikol
CHL d_5	izotopicky značený chloramfenikol
CLD	klindamycin
CLD d_3	izotopicky značený klindamycin
ČOV	čistírny odpadních vod
ČOV1	vzorek odpadní vody
ČTi	vzorek odpadní vody
ERY	erythromycin
ERY ^{13}C, d_3	izotopicky značený erythromycin
ESI	ionizace elektrosprejem
FN1	vzorek odpadní vody
FN2	vzorek odpadní vody
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHSK	chemická spotřeba kyslíku
IS	vnitřní standard
LC/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LNZ	linezolid
LNZ d_3	izotopicky značený linezolid

LOQ	mez stanovitelnosti
ME	matriční efekty
OFL	ofloxacin
OFL d_3	izotopicky značený ofloxacin
SMX	sulfamethoxazol
SMX $^{13}C_6$	izotopicky značený sulfamethoxazol
SPE	extrakce tuhou fází
SRM	monitorování vybraných reakci
SVU	vzorek odpadní vody
TTC	tetracyklin
TTC d_6	izotopicky značený tetracyklin
VN1	vzorek odpadní vody

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] J. Beneš, Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití, Grada Publishing, Praha 2018.

[2] F. Hernández et al., Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS, TrAC, Trends Anal. Chem. Vol. 26, No. 6 (2007) 466-485.

[3] D. Fabregat-Safont et al., Analytical key issues and challenges in the LC-MS/MS determination of antibiotics in wastewater, Anal. Chim. Acta 1239 (2023) 340739.

[4] K. Chen, J. L. Zhou, Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China, Chemosphere 95 (2014) 604-612.

[5] C. Kim et al., A review of analytical procedures for the simultaneous determination of medically important veterinary antibiotics in environmental water: Sample preparation, liquid chromatography, and mass spectrometry, J. Environ. Manage. 217 (2018) 629-645.

[6] U. Szymańska et al., Presence of antibiotics in the aquatic environment in Europe and their analytical monitoring: Recent trends and perspectives, Microchem. J. 147 (2019) 729-740.

[7] P. Fryčák, Vztah výskytu reziduí antibiotik a bakteriální rezistence v odpadních a přírodních vodách, Chem. Listy 114 (2020) 815-822.

[8] P. Gao, M. Munir, I. Xagoraraki, Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistence genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant, Sci. Total Environ. 421-422 (2012) 173-183.

[9] Y. Negreanu et al., Impact of Treated Wastewater Irrigation on Antibiotic Resistance in Agricultural Soils, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 4800-4808.

[10] M. Gros et al., Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1292 (2013) 173-188.

[11] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I, Chemosphere 75 (2009) 417-434.

[12] M. Seifrtová et al., An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters, Anal. Chim. Acta 649 (2009) 158-179.

[13] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Analytická chemie, první vydání, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019.

[14] P. J. Taylor, Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, Clin. Biochem. 38 (2005) 328-334.

[15] A. Cappiello et al., Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Anal. Chem. 80 (2008) 9343-9348.

[16] H. Trufelli et al., An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry, Mass Spectrom. Rev. 30 (2011) 491-509.

[17] W. Zhou, S. Yang, P. G. Wang, Matrix effects and application of matrix effect factor, Bioanalysis 9(23) (2017) 1839-1844.

[18] L. Tang, P. Kebarle, Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass Spectrometry on the Concentration of the Analytes in the Electrosprayed Solution, Anal. Chem. 65 (1993) 3654-3668.

[19] R. King et al., Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11 (2000) 942-950.

[20] N. B. Cech, C. G. Enke, Relating Electrospray Ionization Response to Nonpolar Character of Small Peptides, Anal. Chem. 72 (2000) 2717-2723.

[21] C. R. Mallet, Z. Lu, J. R. Mazzeo, A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts, Rapid Commun. Mass Spectrom. 18 (2004) 49-58.

[22] M. H. Amad et al., Importance of gas-phase proton affinities in determining the electrospray ionization response for analytes and solvents, J. Mass Spectrom. 35 (2000) 784-789.

[23] R. Bonfiglio et al., The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of the Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds, Rapid Commun. Mass Spectrom. 13 (1999) 1175-1185.

[24] Kloepfer, J. B. Quintana, T. Reemtsma, Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples, J. Chromatogr. A 1067 (2005) 153-160.

[25] G. Enke, A Predictive Model for Matrix and Analyte Effects in Electrospray Ionization of Singly-Charged Ionic Analytes, Anal. Chem. 69 (1997) 4885-4893.

[26] Q. T. Dinh et al., Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS, Talanta 85 (2011) 1238-1245.

[27] H. Stahnke, T. Reemtsma, L. Alder, Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC–MS/MS, Anal. Chem. 81 (2009) 2185-2192.

[28] Meierjohann et al., An online SPE LC-MS/MS method for the analysis of antibiotics in environmental water, Environ. Sci. Pollut. Res. 24 (2017) 8692-8699.

[29] O. González et al., Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect, J. Chromatogr. A 1353 (2014) 10-27.

[30] B. K. Matuszewski et al., Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS, Anal. Chem. 75 (2003) 3019-3030.

[31] Van Eeckhaut et al., Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects, J. Chromatogr. B 877 (2009) 2198-2207.

[32] Z. Ye, H. S. Weinberg, Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamide, Macrolide, Quinolone, and Tetracycline Antibiotics in Chlorinated Drinking Water Using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry, Anal. Chem. 79 (2007) 1135-1144.

[33] Speltini et al., Fluoroquinolone antibiotics in environmental waters: Sample preparation and determination, J. Sep. Sci. 33 (2010) 1115-1131.

[34] S. Yang, J. Cha, K. Carlson, Trace analysis and occurrence of anhydroerythromycin and tylosin in influent and effluent wastewater by liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 623-636.

[35] J. Vanderford et al., Analysis of Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, and Personal Care Products in Water Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, Ana. Chem. 75 (2003) 6265-6274.

[36] J. Rossmann et al., Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC–MS/MS, J. Chromatogr. B 969 (2014) 162-170.

[37] F. Raposo, D. Barceló, Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints, TrAC, Trends Anal. Chem. 134 (2021) 116068.

[38] E. Klapková, R. Uřinovská, R. Průša, Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, Klin. Biochem. Metab., 19(40) (2011) 5-8.

[39] B. Li et al., Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Anal. Chim. Acta 645 (2009) 64-72.

[40] X. Chang et al., Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China, Environ. Pollut. 158 (2010) 1444-1450.

[41] W.-h. Xu et al., Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, Environ. Pollut. 145 (2007) 672-679.

[42] S. L. R. Ellison, M. Thompson, Standard additions: myth and reality, Analyst (Cambridge, U. K.) 133 (2008) 992-997.

[43] J. Li et al., Analytical Approaches for Determining Chemical Oxygen Demand in Water Bodies: A Review, Crit. Rev. Anal. Chem. Vol. 48, No. 1 (2018) 47-65.

[44] J. Ma, Determination of chemical oxygen demand in aqueous samples with non-electrochemical methods, Trends Environ. Anal. Chem. 14 (2017) 37-43.

[45] ČSN ISO 6060: Jakost vod – Stanovení chemické spotřeby kyslíku, leden 2009.

[46] R. B. Geerdink et al., Chemical oxygen demand: Historical perspectives and future challenges, Anal. Chim. Acta 961 (2017) 1-11.

[47] K. Hricová, M. Röderová, P. Fryčák, V. Pauk, O. Kurka, K. Mezerová, T. Štosová, J. Bardoň, D. Milde, P. Kučová, M. Kolář, Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci and Antimicrobial Residues in Wastewater and Surface Water, Life 2021, 11, 1403.

[48] M. A. F. Locatelli et al., Determination of Antibiotics in Brazilian Surface Waters Using Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 60 (2011) 385-393.

[49] F. Shen, Y.-J. Xu, Y. Wang et al., Rapid and ultra-trace levels analysis of 33 antibiotics in water by on-line solid-phase extraction with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1677 (2022) 463304.

[50] S. Aydin et al., Determination of antibiotics by SPE-LC-MS/MS in wastewater and risk assessment, Adv. Environ. Res., Vol. 7, No. 3 (2018) 201-212.

[51] S. Castiglioni et al., A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters, J. Chromatogr. A 1092 (2005) 206-215.

[52] E. Carmona et al., Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish – Turia River as case study, J. Pharm. Biomed. Anal. 146 (2017) 117-125.

[53] Z. Wang et al., High through-put determination of 28 veterinary antibiotic residues in swine wastewater by one-step dispersive solid phase extraction sample cleanup coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Chemosphere 230 (2019) 337-346.

[54] I. Pugajeva et al., Determination of pharmaceutical residues in wastewater using high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry, J. Pharm. Biomed. Anal. 133 (2017) 64-74.

[55] N. H. Tran et al., Simultaneous analysis of multiple classes of antimicrobials in environmental water samples using SPE coupled with UHPLC-ESI-MS/MS and isotope dilution, Talanta 159 (2016) 163-173.

[56] L. Jank et al., Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry, Int. J. Environ. Anal. Chem. Vol. 94, No. 10 (2014) 1013-1037.

[57] A. Serra-Compte, M. G. Pikkemaat, A. Elferink et al., Combining an effect-based methodology with chemical analysis for antibiotics determination in wastewater and receiving freshwater and marine environment, Environ. Pollut. 271 (2021) 116313.

[58] B. Lalović et al., Solid-phase extraction of multi-class pharmaceuticals from environmental water samples onto modified multi-walled carbon nanotubes followed by LC-MS/MS, Environ. Sci. Pollut. Res. 24 (2017) 20784-20793.

[59] M. S. Shahriman et al., Poly-(MMA-IL) filter paper: A new class of paper-based analytical device for thin-film microextraction of multi-class antibiotics in environmental water samples using LC-MS/MS analysis, Talanta 254 (2023) 124188.

[60] B. Huidobro-López, I. López-Heras, C. Alonso-Alonso et al., Analytical method to monitor contaminants of emerging concern in water and soil samples from a non-conventional wastewater treatment system, J. Chromatogr. A 1671 (2022) 463006.

[61] J. E. Renew, C.-H. Huang, Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1042 (2004) 113-121.

[62] A. Ofrydopoulou, C. Nannou, E. Evgenidou et al., Sample preparation optimization by central composite design for multi class determination of 172 emerging contaminants in wastewaters and tap water using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1652 (2021) 462369.

[63] R. López-Serna et al., Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)-tandem mass spectrometry (MS/MS), Chemosphere 85 (2011) 1390-1399.

[64] S.-C. Kim, K. Carlson, Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 1301-1315.