



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek  
Poslijediplomski sveučilišni studij Analitička kemija

Klaudija Ivanković

## **Pregled analitičkih tehnika u analizi farmaceutika u bioti**

*Analysis of emerging and related pollutants in aquatic biota*  
(R. Álvarez-Ruiz i Y. Picó, *Trends Environ. Anal. Chem.* **25** (2020) e00082)

Kemijski seminar I

Zagreb, travanj 2021.

# SADRŽAJ

<b>I. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>II. PRIKUPLJANJE I PRIPREMA UZORAKA .....</b>	<b>2</b>
<b>III. EKSTRAKCIJA ANALITA.....</b>	<b>4</b>
<i>i. Ekstrakcija tekuće-tekuće .....</i>	<i>4</i>
<i>ii. Ekstrakcija na čvrstoj fazi .....</i>	<i>6</i>
<i>iii. QuEChERS .....</i>	<i>7</i>
<i>iv. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom .....</i>	<i>7</i>
<i>v. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalnim zračenjem .....</i>	<i>8</i>
<i>vi. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom.....</i>	<i>9</i>
<b>IV. PROČIŠĆAVANJE I UKONCENTRIRAVANJE.....</b>	<b>11</b>
<i>i. Pročišćavanje ekstrakcijom na čvrstoj fazi .....</i>	<i>11</i>
<i>ii. Pročišćavanje kromatografijom .....</i>	<i>12</i>
<b>V. INSTRUMENTNA ANALIZA.....</b>	<b>14</b>
<i>i. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa .....</i>	<i>14</i>
<i>ii. Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa .....</i>	<i>16</i>
<b>VI. LITERATURA .....</b>	<b>17</b>

## I. UVOD

Farmaceutici su organski spojevi koji se koriste u dijagnostici, liječenju i prevenciji bolesti te u svrhu obnavljanja, modificiranja i korekcije rada pojedinih organa kod ljudi i životinja. Eliminacijom iz organizma, ispuštanjem iz farmaceutskih postrojenja ili nesavjesnim odlaganjem starih lijekova, farmaceutici dolaze u okoliš gdje čine bitnu grupu zagađivala zbog sve učestalije uporabe u ljudskoj i životinjskoj medicini, potencijalno negativnog djelovanja na žive organizme i ljudsko zdravlje te pseudo stabilnosti<sup>1</sup>. Stoga, analiza okolišnih razina farmaceutika i ispitivanje njihovog djelovanja na živi svijet postali su imperativ.

Analiza farmaceutika u okolišu može se provoditi prikupljanjem i analizom uzoraka vode, sedimenta ili biote. Dosadašnja istraživanja bila su fokusirana na analizu farmaceutika u otpadnoj<sup>2-4</sup>, morskoj<sup>5-7</sup> ili riječnoj<sup>3,8-10</sup> vodi te sedimentu<sup>5,11,12</sup>. Takva istraživanja govore o izloženosti, no ne daju konkretan uvid u bioakumulaciju i utjecaju farmaceutika na žive organizme. U novije vrijeme raste broj istraživanja i objavljenih radova koji se bave problematikom analize farmaceutika u bioti, a gdje se pod biotom smatraju biljni i životinjski uzorci iz okoliša. Analizom biote može se pratiti utjecaji izloženosti i bioakumulacije farmaceutika u organizmu, primjerice, na njegovo brazdanje, izlijeganje i organogenezu<sup>13,14</sup>, plodnost<sup>15</sup>, vizualno-motoričke odgovore<sup>16,17</sup> i instinkt za preživljavanje<sup>17-19</sup>.

Analiza farmaceutika u bioti može se ugrubo podijeliti u nekoliko koraka<sup>1</sup>: prikupljanje i priprema uzoraka, ekstrakcija, pročišćavanje i ukoncentriravanje, instrumentna analiza, obrada podataka te njihova interpretacija i primjena. Svaki od navedenih koraka, s naglaskom na analitičke postupke ekstrakcije, pročišćavanja i ukoncentriravanja te instrumentne analize, bit će detaljnije obrađeni u nastavku.

## II. PRIKUPLJANJE I PRIPREMA UZORAKA

Način prikupljanja uzorka ovisi o cilju istraživanja. Za praćenje bioakumulacije, toksičnosti i općeg utjecaja na živi organizam zbog izloženosti farmaceuticima, najbolji način prikupljanja uzoraka biote jest putem kontroliranog, laboratorijskog uzgoja<sup>20-23</sup>. Najčešće se kao model koriste ribe koje su uzgojene u kontroliranim uvjetima te ih se u određenom vremenskom periodu izlaže određenim količinama farmaceutika. Ukoliko se želi pratiti stvarna izloženost živih organizama farmaceuticima u realnom okruženju na nekom području, potrebno je prikupiti uzorke direktno iz okoliša<sup>10,24-26</sup>. Treća opcija jest pribavljanje uzoraka od distributera, kao što su lokalne farme, trgovine, tržnice, ribarnice i sl., što omogućuje uvid u ljudsku izloženost farmaceuticima putem prehrane<sup>24,27,28</sup>. Najčešće analizirani uzorci biote u dosad objavljenim radovima su ribe, školjke, beskralježnjaci i alge<sup>1</sup>.

Priprema uzorka je prvi analitički korak gdje se uzorak priprema za ekstrakciju, a čiji je cilj omogućiti maksimalnu ekstrakciju farmaceutika iz uzorka. Priprema uzoraka razlikovat će se ovisno o vrsti prikupljene biote, a možemo ju podijeliti na uzorke bioloških tekućina (žuč, krv, plazma) i čvrste uzorke (mišićno tkivo i organi). S obzirom na veličinu uzoraka, uzorci se analiziraju zasebno ili se udružuju<sup>29,30</sup>. Najčešći postupci pripreme uzorka su vaganje ili mjerenje uzorka, mehaničko čišćenje, homogenizacija, usitnjavanje, zamrzavanje i liofilizacija<sup>31</sup>.

Homogenizacija je čest pristup pripremi krutih uzoraka jer doprinosi reprezentativnosti što je naročito bitno kod udruživanja uzoraka<sup>29,30,32</sup>. Homogenizacija se može provesti jakim miješanjem, ali i uređajima namijenjenim prvenstveno za usitnjavanje kao što su mikseri i mlinovi. Homogenizacija povezana s usitnjavanjem bitna je kod analize cijelog tijela organizma<sup>33-35</sup> gdje analiti neće biti podjednako zastupljeni u različitim tkivima<sup>30,36</sup>, ali i olakšava manipulaciju uzorcima jer kompaktnu masu pretvara u tekuću smjesu ili prah, ovisno o udjelu vode u uzorku.

Liofilizacija je postupak sušenja smrznutog uzorka čime se čuvaju toplinski osjetljive strukture. Ovim postupkom uzorci biote se dehidriraju što olakšava manipulaciju i skladištenje, ali i omogućuje određivanje suhe tvari. Organizmi poput mekušaca i organi poput mozga i bubrega, sadržavaju veliki udio vode čije prisustvo može utjecati na određivanje koncentracije farmaceutika, zbog čega je liofilizacija čest postupak u pripremi uzoraka biote.

Centrifugiranje je tehnika odjeljivanja suspendiranih čestica koja se koristi na tekućim uzorcima, najčešće na uzorcima krvi. Krv je kompleksna matrica koja, između ostalog, sadrži proteine zaslužne za zgrušavanje krvi zbog čega nije pogodna za dulje čuvanje i manipulaciju te se mali broj radova bavi njenom analizom<sup>1</sup>. S druge strane, centrifugiranjem svježe krvi, dobiva se plazma koja se često prikuplja i analizira zbog jednostavnosti pripreme i ekstrakcije uzorka<sup>37-39</sup>. Plazma i nakon centrifugiranja može sadržavati proteine u manjoj količini pa se njihova denaturacija provodi dodatkom organskog otapala, alkohola ili kiseline čime se uzorak pročišćava prije ekstrakcije.

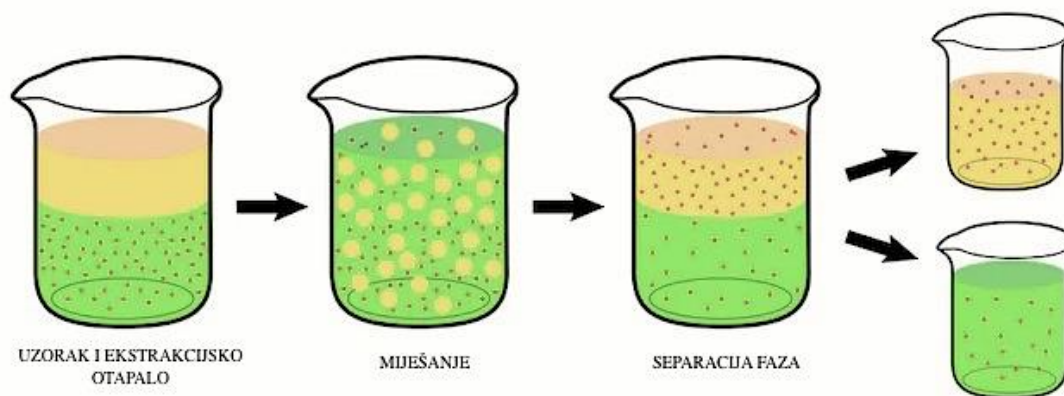
Za analizu farmaceutika u uzorcima žuči i jetre<sup>40-43</sup> te kod analize cijelog tijela<sup>44</sup>, često se dodaju hidrolizirajući enzimi glukuronida,  $\beta$ -glukuronidaze. Glukuronidi su produkti glukuronizacije, procesa vezanja ksenobiotika u organizmu. Nastali kompleks ksenobiotika i proteina dobro je topljiv u vodi što omogućuje njihovu jednostavnu eliminaciju iz tijela putem urina. Kako bi se odredila ukupna količina farmaceutika u uzorku, slobodnih i vezanih u glukuronid, dodaju se enzimi koji hidroliziraju kompleks, oslobađajući farmaceutike u njihovom roditeljskom obliku.

### III. EKSTRAKCIJA ANALITA

Ekstrakcija je separacijski postupak kojim se želi odvojiti analite od matrice uz što veće analitičke povrate. Izbor ekstrakcijskih tehnika i njihovih varijacija je širok stoga će izbor tehnike ovisiti o matrici i analitima, a veliku ulogu u postizanju optimalnih analitičkih povrata imat će i korišteno otapalo<sup>33,45,46</sup>. S obzirom na to da su analiti često strukturno različiti, s različitim funkcionalnim grupama i fizikalnim karakteristikama, kod analize širokog spektra analita bitna je optimizacija postupka ekstrakcije zbog dobivanja što viših analitičkih povrata, a nerijetko se pribjegava korištenju više ekstrakcijskih tehnika.

#### *i. Ekstrakcija tekuće-tekuće*

Kako uzorci bioloških tekućina i većine organa sadrže velike udjele vode, a samim time i analite u tekućoj fazi, najjednostavnija i najbrža korištena tehnika ekstrakcije je tekuće-tekuće ili LLE (engl. *liquid-liquid extraction*). LLE se temelji na različitoj topljivosti analita u organskoj i anorganskoj fazi te koeficijentu razdjeljenja koji opisuje koncentracijsku ravnotežu analita između dva otapala (Slika 1.). Za LLE farmaceutika iz krutih uzoraka biote neophodna je homogenizacija i usitnjavanje. U uzorke se dodaje određeni volumen organskog otapala ili smjese otapala u nekoliko ciklusa, a najčešće korištena otapala su aceton, acetonitril i metanol, sa ili bez dodatka kiseline. Silovitim miješanjem, centrifugiranjem i odjeljivanjem, dobiva se farmaceuticima obogaćeno organsko otapalo koje se ukoncentrira uparivanjem u struji dušika.

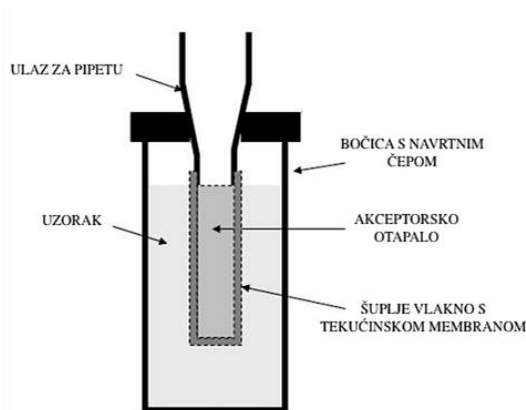


Slika 1. Shematski prikaz ekstrakcije tekuće-tekuće

LLE je jednostavna i brza tehnika ekstrakcije koja se najviše koristi za tekuće uzorke biote. Pregledom literature vidljivo je kako se LLE koristi većinom kod ekstrakcija malog broja farmaceutika sličnih fizikalno-kemijskih svojstava, najvjerojatnije zbog velikog utjecaja otapala na proces ekstrakcije analita i iskorištenje postupka<sup>46</sup>. Pomoću LLE, dosada su analizirani farmaceutici u plazmi<sup>46-48</sup>, jetri<sup>46,47,49</sup>, bubrežima<sup>46</sup>, mišićima<sup>45-47,49-52</sup> i mozgu<sup>46,47</sup> riba, beskralježnjacima<sup>50,52</sup> i mekom tkivu školjki<sup>53</sup>.

Na osnovi jednostavne LLE kreirane su razne modificirane LLE kao što je LLE sa SUPRAS (engl. *supramolecular solvent*). SUPRAS LLE je ekstrakcija tekuće-tekuće koja koristi supramolekularno otapalo. Takvo otapalo tvori nanostrukture koje omogućuju ekstrakciju na temelju različitih vrsta interakcija (npr. vodikove veze i disperzivne interakcije) i veličine molekule (veličina šupljine supramolekule otapala se može podešavati). Zbog velikog broja veznih mjesta na malom prostoru, SUPRAS LLE povećava iskorištenje ekstrakcije analita iz biote u odnosu na klasični LLE i daje visoke analitičke povrate<sup>54</sup>.

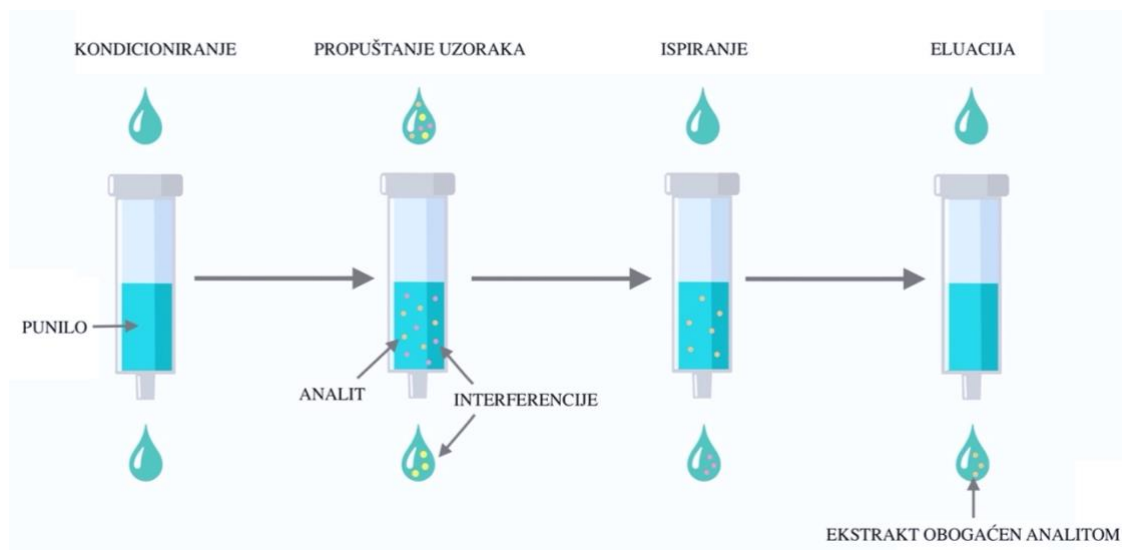
Druga modifikacija LLE je mikro ekstrakcija tekuće-tekuće (LPME, engl. *liquid phase microextraction*). LPME (Slika 2.) funkcionira na principu difuzije analita iz uzorka u željeno otapalo. Najčešća izvedba je preko šupljeg vlakna (HF-LPME, engl. *hollow fiber liquid phase microextraction*) koje ima formiranu tekućinsku membranu, unutar kojeg se nalazi akceptorsko otapalo. Vlakno se uranja u uzorak te dolazi do prelaska analita iz uzorka u akceptorsko otapalo preko tekućinske membrane. Akceptorsko otapalo je ujedno i završno otapalo koje se nakon ekstrakcije može injektirati u kromatografski sustav. Ovom metodom Kanimozhi i suradnici su pripremili uzorke za analizu bioakumulacije estrogena u jetri zebrića<sup>55</sup>.



Slika 2. Shematski prikaz mikro ekstrakcije tekuće-tekuće

## ii. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi, poznatija kao SPE (engl. *solid-phase extraction*) temelji se na adsorpciji analita na čvrstoj fazi tj. punilu kolonice za SPE te njihovoj desorpciji odgovarajućim otapalom (Slika 3.). Ekstrakcija se provodi sporim propuštanjem uzorka kroz sloj punila koji zadržava analit, nakon čega se punilo suši pod vakuumom ili u struji dušika, a naposljetku se analiti eluiraju s punila pogodnim otapalom, najčešće metanolom. Ovaj tip ekstrakcije pogodan je za tekuće, neviskozne uzorke poput plazme<sup>38,42,56</sup>. SPE-om mogu se ekstrahirati i analiti iz uzoraka mišića, jetre i mozga ribe koji su prethodno usitnjeni i homogenizirani te otopljeni u pogodnom otapalu<sup>57</sup>, kao i homogenizirani uzorci cijelog tijela beskralježnjaka<sup>58</sup>. Ipak, češća uporaba SPE u analizi farmaceutika u bioti jest kod pročišćavanja uzoraka prije instrumentne analize.



Slika 3. Shematski prikaz ekstrakcije na čvrstoj fazi

U literaturi je moguće pronaći analize uzoraka biote nekim novijim, modificiranim SPE tehnikama kao što je mikro ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase microextraction*, SPME)<sup>41,59</sup>. SPME, slično kao i kod HF-LPME, provodi se pomoću vlakana koja se uranjaju u tekući uzorak (npr. žuči), a analiti se iz uzorka ekstrahiraju procesom adsorpcije, bez upotrebe otapala, što odgovara načelima zelene kemije. Zanimljiva je i činjenica da ova metoda omogućuje *in vivo* uzorkovanje<sup>59</sup>.



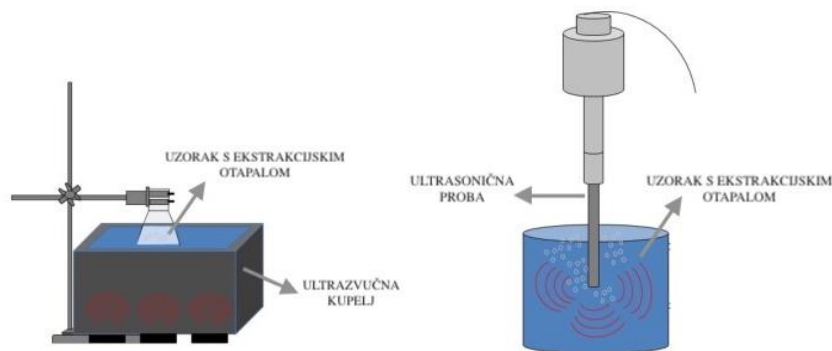
### *iii. QuEChERS*

QuEChERS je skraćenica od „*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*“, a naziv je kreiranog protokola ekstrakcije za analizu pesticida<sup>60</sup>. Protokol se sastoji od dva dijela, ekstrakcije pomoću ekstrakcijskih soli i pročišćavanjem disperzivnom ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Ekstrakcija se provodi u nekoliko koraka. Prvi korak je LLE gdje se u homogenizirane uzorke dodaje otapalo te se uzorak silovito miješa. Drugi korak je dodatak ekstrakcijskih soli u uzorak nakon čega se uzorak ponovo silovito miješa i centrifugira, a nastali supernatant se odvaja za daljnje pročišćavanje.

Tri su najpoznatije verzije QuEChERS protokola, a razlikuju se u korištenim solima za ekstrakciju koje mogu biti: a) bezvodni magnezijev sulfat i natrijev klorid, prema originalnoj verziji protokola<sup>60</sup>, b) acetatni pufer prema Europskom odboru za standardizaciju (EN 15662)<sup>61</sup>, ili c) citratni pufer prema AOAC metodi (AOAC Official 2007.1 Method)<sup>62</sup>. Iako je protokol nastao s ciljem analize pesticida, u novijim istraživanjima postoje primjene QuEChERS protokola s ciljem analize farmaceutika u biljakama<sup>27,63</sup>, ribama<sup>33,64,65</sup>, beskralježnjacima<sup>65</sup> i školjkama<sup>66</sup>.

### *iv. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom*

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (USE, engl. *ultrasound-assisted extraction*) inačica je LLE gdje se ekstrakcija pospešuje primjenom ultrazvučnih valova (frekvencije >20 kHz). Usitnjeni, homogenizirani uzorak miješa se s ekstrakcijskim otapalom te se sonificira. Energija ultrazvučnih valova uzrokuje akustičnu kavitaciju koja dovodi do lokalnog porasta temperature, tlaka i formiranje kavitacijskih balona u uzorku. Pucanje kavitacijskog balona uzrokuje mehaničku štetu na uzorku što dovodi do oštećenja i pucanja stjenke stanica i oslobađanja staničnog sadržaja. USE poboljšava izmjenu tvari, olakšava prolaz ekstrakcijskog otapala u uzorak te omogućuje bolje iskorištenje postupka ekstrakcije. Dvije su moguće izvedbe ekstrakcije, pomoću ultrazvučne kupelji i ultrazvučne probe (Slika 4.).



Slika 4. Shematski prikaz najčešće korištenih metoda ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

Prema pregledu literature, pomoću USE dosada su ekstrahirani farmaceutici iz embrija i ikre ribe<sup>29</sup>, plazmi, jetri i mozgu ptica<sup>43</sup>, riblje plazme<sup>38,67</sup>, različitih tkiva<sup>36,43,68,69</sup> i cijele ribe<sup>70,71</sup>, mekog tkiva školjki<sup>72</sup>, beskralježnjaka i perifitona<sup>73</sup> te biljki<sup>73,74</sup>.

Za razliku od klasične USE, FUSLE (engl. *focused ultrasound liquid extraction*) fokusira valove što omogućuje ciljano stvaranje kavitacijskih balona, odnosno ablaciju tkiva. FUSLE metodom Mijangos sa suradnicima je ekstrahirao farmaceutike iz uzoraka ribljeg mišića, jetre, mozga i škrge te mekog tkiva školjki<sup>75</sup>. Prednosti FUSLE metode, u odnosu na klasični USE, jest kraće vrijeme ekstrakcije (30-60 sek), manji volumen otapala (do 10 cm<sup>3</sup>) i manja količina uzorka (0,1-1 g).

Iskorištenje postupka ekstrakcije uvelike će ovisiti o ekstrakcijskom otapalu<sup>73,75,76</sup>, kao i kod LLE s obzirom na to da primijenjena energija pomaže isključivo u prijenosu tvari, ne i u distribuciji farmaceutika između matrice i otapala. Osim otapala, parametri koji imaju utjecaj na iskorištenje USE su pH vrijednost otapala, volumen uzorka, trajanje sonifikacije i temperatura kupelji za vrijeme sonifikacije<sup>73</sup>.

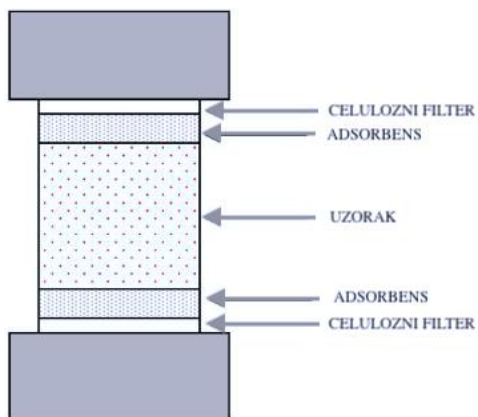
#### v. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalnim zračenjem

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalnim zračenjem ili MAE (engl. *microwave-assisted extraction*) zasniva se na činjenici da otapalo i voda u uzorku apsorbiraju mikrovalove (300 MHz – 300 GHz) što uzrokuje pojačane dipolne rotacije polarnih molekula i kidanje vodikovih veza. Posljedica apsorpcije energije je slična kao kod USE; nastaje pritisak na staničnu stjenku koja puca što omogućuje prodiranje otapala u stanicu.

Ova metoda ekstrakcije nije uobičajena u literaturi za analizu farmaceutika u bioti<sup>1</sup>. Međutim, postoje radovi koji su koristili modificirane MAE tehnike kao što su enzimatska ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima<sup>77</sup> (MAEE, engl. *enzymatic microwave-assisted extraction*) i micelarna ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima<sup>78,79</sup> (MAME, engl. *microwave-assisted micellar extraction*). Kod MAEE koriste se enzimi koji mogu pomoći pri ekstrakciji, primjerice dodaje se enzim za razgradnju stjenke u uzorak, dok MAME koristi tenzide pri čemu se analit ekstrahira micelama.

#### vi. Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom

Ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom ili PLE (engl. *pressurized liquid extraction*) temelji se na izlaganju uzorka s dodatkom otapala povišenom tlaku što dolazi do povišenja temperature i zagrijavanja uzorka. Povećanje temperature smanjuje viskoznost otapala što omogućuje bolje močenje uzorka i otapanje analita, te olakšava desorpciju analita iz uzorka i njegovu difuziju u otapalo. U ekstrakcijsku ćeliju stavlja se celulozni filter i uzorak, a ostatak se nadopunjuje adsorbensom kao što su hidromatriks<sup>32,80–83</sup> i aluminijev oksid<sup>28,32,84,85</sup>, kao što je prikazano na slici 5. Dodatak spomenutog materijala služi popunjavanju praznog prostora, poboljšanju prodiranja otapala, smanjenju udjela vode u ekstraktu te zadržavanju matrice, naročito lipida.



Slika 5. Najčešći način punjenja PLE ekstrakcijske ćelije

Bitno je napomenuti da postoji nekoliko različitih vrsta PLE koje se razlikuju u vrsti korištenog otapala, odnosno fluida (voda, organsko otapalo, superkritični fluid itd.). Kada je u pitanju ekstrakcija farmaceutika iz uzoraka biote, koriste se gotovo isključivo organska otapala. Terminologija nije u potpunosti definirana pa se PLE često naziva i ubrzanom tekućinskom

ekstrakcijom ili ASE (engl. *accelerated solvent extraction*), što je tzv. trademark tvrtke Dionex, pionira među proizvođačima instrumenata za ekstrakciju potpomognutu visokim tlakom.

PLE je brza i visoko automatizirana tehnika ekstrakcije koja koristi manje otapala od klasičnih metoda ekstrakcije te je najkorištenija tehnika ekstrakcije farmaceutika iz čvrstih i polučvrstih uzoraka biote. Mnoga istraživanja pokazala su dobre rezultate ekstrakcije farmaceutika iz različitih matrica biote, kao što su biljke<sup>23,25,74</sup>, mišići kornjača i ptica<sup>25</sup>, različita tkiva<sup>20,28,86-89</sup> i cijele ribe<sup>33,36,81,90-92</sup>, beskralježnjaci<sup>25,86,87,93</sup>, planktoni<sup>86,87</sup> i školjke<sup>32,85,87</sup>. U usporedbi s USE, drugom najkorištenijom metodom ekstrakcije za čvrste i polučvrste uzorke, PLE metoda pokazuje veće analitičke povrate, bolju ponovljivost te omogućuje nižu granicu detekcije<sup>74</sup>. Slične rezultate pokazalo je istraživanje Huerte i suradnika gdje je PLE uspoređen s USE i QuEChERS<sup>33</sup>. PLE pokazuje bolje analitičke povrate za većinu farmaceutika nego druge dvije metode, dok se neki farmaceutici nisu niti ekstrahirali drugim tehnikama. Kao i kod prijašnjih tehnika, i kod PLE je izrazito važan odabir otapala<sup>88</sup>. Mana PLE tehnike jest koelucija komponenti iz matrice kao što su lipidi, proteini, pigmenti i slične molekule velikih masa koje mogu interferirati kod instrumentne analize.

## IV. PROČIŠĆAVANJE I UKONCENTRIRAVANJE

Kako je biota kompleksna organska matrica, a u procesima ekstrakcije koriste se organska otapala, dobiveni ekstrakti nisu obogaćeni isključivo farmaceuticima već i mnogim drugim spojevima. Takva matrica interferira i otežava proces instrumentne analize, zbog čega se pribjegava postupcima pročišćavanja<sup>94</sup>. Uz klasične tehnike dodatnog pročišćavanja kao što su taloženje, filtracija, centrifugiranje ili LLE, najčešće tehnike pročišćavanja nakon ekstrakcije su SPE i kromatografija.

### *i. Pročišćavanje ekstrakcijom na čvrstoj fazi*

Postupak SPE je već opisan te je spomenuto kako se on kod analize uzoraka biote najčešće koristi za pročišćavanje. Ekstrakt u organskom otapalu prvo se mora upariti i razrijediti u većem volumenu vode kako bi se smanjio udio organskog otapala. Dobivena vodena otopina se propušta kroz kolonice za SPE te se provodi već opisani postupak. Za pročišćavanje koristi se i disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi ili dSPE (engl. *dispersive solid-phase extraction*) kod koje je punilo funkcionalizirano dugim ugljikovodičnim lancima što omogućuje ekstrakciju slabo polarnih i nepolarnih molekula što je dobra opcija za ekstrakciju lipida. Izvedba dSPE može biti preko kolonice kao i kod SPE, ili dodatkom krutine u uzorak, silovitim miješanjem, centrifugiranjem i odvajanjem supernatanta.

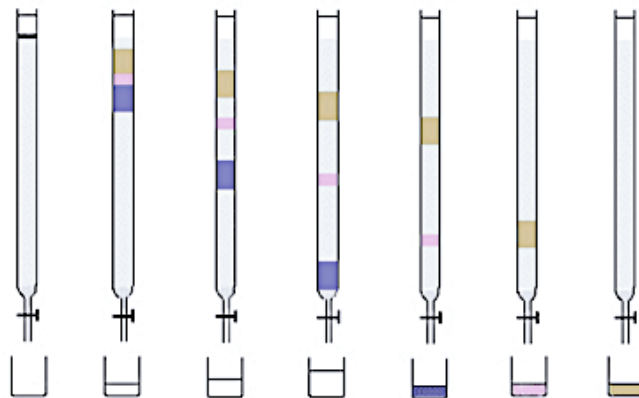
Za pročišćavanje i ukoncentriravanje uzoraka SPE postupkom, najčešće se koriste kolonice Oasis HLB čije punilo je polimerni sorbens reverzne faze s uravnoteženim hidrofilnim i lipofilnim interakcijama što ga čini dobrim sorbentom za široki spektar spojeva te često daje dobre analitičke povrate. Osim kolonice Oasis HLB<sup>25,86,95,96</sup>, koriste se i kolonice Oasis MCX<sup>24,81,97</sup> čije je punilo kationski izmjenjivač, Strata-X<sup>73,74,85</sup> čije punilo tvori interakcije s analitom na temelju  $\pi$ - $\pi$ , dipol-dipol i hidrofobnih interakcija, Florisil<sup>30,75,82</sup> punila odnosno magnezijev silika gel i PSA<sup>33,63,98</sup> ili kombinacija SAX/PSA<sup>39,99</sup> sorbensa gdje SAX ima punilo s jakim anionskim izmjenjivačem, a PSA sadrži primarne i sekundarne aminske skupine.

Dosadašnja istraživanja pokazala su različite uspješnosti pročišćavanja uzoraka biote. Vidljivo je kako su spomenuti sorbensi različitih kemijsko-fizikalnih karakteristika zbog čega nisu univerzalni. Odabir sorbensa ovisit će uvelike o vrsti analita te njihovim kemijsko-fizikalnih

karakteristika. Primjerice, Oasis HLB zbog svoje karakteristike je dobar izbor kod ekstrakcija većeg broja različitih analita, no problem su koelucije drugih neželjenih spojeva matrice. Eksperimenti su pokazali da Oasis HLB ne daje dobre rezultate pročišćavanja uzoraka jetre koji ima velik udio lipida<sup>75,81,95</sup>. Kod takvih uzoraka, koriste se druga punila, kao primjerice Oasis MCX<sup>81</sup> ili PES (poliethersulfon) sorbensa<sup>75</sup> koji daju zadovoljavajuće rezultate. Može se koristiti i kombinacija sorbensa gdje se prvo koristi sorbens za uklanjanje lipida, primjerice SAX/PSA<sup>99</sup>, nakon čega se koristi punilo za ukoncentriravanje, npr. HLB. Steinbach i Schwack su pokazali kako se pomoću PSA kolonica najbolje uklanjaju lipidi u odnosu na ukupno sedam različitih testiranih kolonica, a da klasični dSPE može imati usporedive rezultate, no s velikom količinom korištenog sorbensa<sup>98</sup>. SPE je relativno brza i jeftina tehnika u odnosu na druge metode pročišćavanja te ne zahtjeva dodatne postupke obrade uzorka<sup>32,81</sup>, no zbog svih navedenih problema s koelucijom, SPE često nije prvi izbor za pročišćavanje uzoraka biote od lipida. Kako bi se dobili čišći uzorci, koriste se tehnike kromatografije, dok se SPE koristi kao zadnji korak pročišćavanja od anorganskih komponenti i proteina te ukoncentriravanje prije instrumentne analize<sup>43</sup>.

## *ii. Pročišćavanje kromatografijom*

Kromatografske tehnike korištene za pročišćavanje uzoraka biote su kromatografija isključenjem kod koje se tvari odvajaju na temelju veličina i kolonska kromatografija kod koje se tvari odvajaju na temelju različitog afiniteta prema stacionarnoj fazi. Najkorištenija kromatografija isključenjem za pročišćavanje je gel propusna kromatografija<sup>33,43,100,101</sup> (GPC) čija stacionarna faza je polimerni gel. Kod kolonske kromatografije za stacionarnu fazu najčešće se koristi silika gel<sup>188,101-103</sup> (SGC). Obje metode koriste se isključivo za pročišćavanje uzoraka od lipida, nakon kojih je potreban proces ukoncentriravanja (uparavanje). Najčešće se ukoncentrirani ekstrakt razrjeđuje u većim volumenom vode kako bi se smanjio udio organske faze te se provodi SPE kako bi se analiti ukoncentrirali na punilu, preostali lipidi istaložili, a uzorak dodatno pročistio od makromolekula prisutnih u matrici<sup>100</sup>.



Slika 6. Shematski prikaz separacije analita kolonskom kromatografijom

Huerta i suradnici su pokazali da GPC pročišćavanje daje bolje rezultate nego pročišćavanje SPE Florisil kolonicama ili kombinacijom SPE-HLB i GPC<sup>33</sup>, štoviše neki farmaceutici nisu ni bili prisutni u završnim ekstraktima drugih dviju metoda. Bitno je spomenuti kako je isti eksperiment proveden uz PLE ekstrakciju, gdje je u ekstrakcijsku ćeliju dodan aluminijev oksid koji zadržava lipide. Tanoue i suradnici su usporedili pročišćavanje GPC i SGC metodom te ispitivali različita otapala<sup>43</sup>. U prosjeku SGC metoda pročišćavanja davala je bolje analitičke povrate i bolje pročišćavanje uzoraka od lipida, osim za uzorke jetre i mozga. Kod tih uzoraka, korišten je dodatni korak pročišćavanja GPC metodom čime je dobiven čišći ekstrakt. Također, pokazano je kako analitički povrati i pročišćavanje uvelike ovise o otapalu. Kromatografske tehnike pokazuju dobro pročišćavanje uzoraka biote od matrice, no njihova mana je dugo vrijeme pročišćavanja uzoraka, velika količina potrebnog organskog otapala te potreba za dodatnim procesom ukoncentriravanja.

## V. INSTRUMENTNA ANALIZA

Završni ekstrakti uzoraka biote pripremljeni na prethodno opisani način sadrže vrlo niske koncentracije analita unutar kompleksne matrice uzorka te se za njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu uglavnom upotrebljavaju visokoselektivni i visokoosjetljivi spregnuti sustavi kromatografije i spektrometrije masa. Kromatografska separacija na ovim hibridnim analitičkim sustavima može se provoditi primjenom tekućinske ili plinske kromatografije dok se masenospektrometrijska detekcija provodi uglavnom primjenom različitih tipova tandemnih spektrometara masa. Podaci dobiveni instrumentnom analizom obrađuju se računalnim programima integriranim s instrumentom.

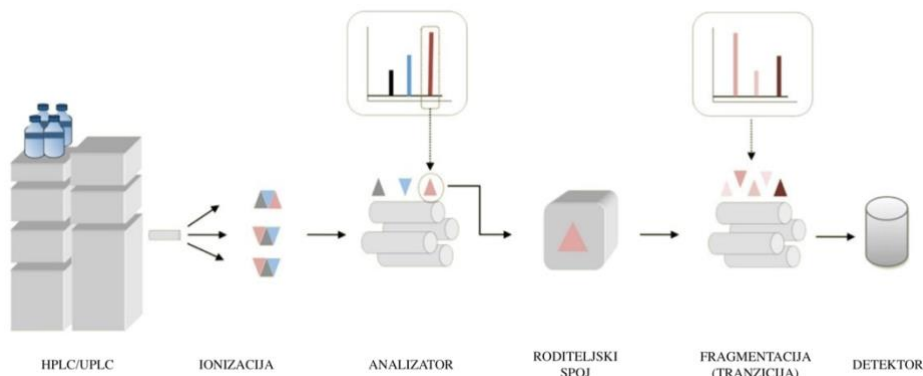
### *i. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa*

Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS) predvodnik je u instrumentnoj analizi okolišnih uzoraka općenito, pa tako i uzoraka biote. Jednostavnost, kratko vrijeme analize, laka prilagodba metode i mogućnost analize velikog broja spojeva samo su neke od prednosti analize LC-MS sustavom. Od LC sustava koriste se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti<sup>47,49,96,50,51,53,68,69,72,73,75</sup> (HPLC, engl. *high performance liquid chromatography*) ili tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti<sup>32,33,36,48,67,74,85</sup> (UPLC, engl. *ultra high performance liquid chromatography*). Glavna razlika između ovih kromatografskih sustava jest trajanje analize. Punila UPLC kolona manjeg su promjera od punila HPLC kolona, što poboljšava kromatografsku rezoluciju i znatno skraćuje vrijeme analize. Za analizu farmaceutika koristi se kromatografija obrnutih faza gdje je stacionarna faza, odnosno punilo na kolonama inačica C18 modificiranih lanaca, a mobilnu fazu čini kombinacija ultračiste vode i organskog otapala, s ili bez dodatka kiseline, soli ili pufera.

Nakon separacije provedene u tekućinskom kromatografu, separirani analiti otopljeni su u velikom volumenu otapala što nije kompatibilno sa spektrometrijom masa koja se radi u uvjetima visokog vakuuma. Kako bi se analiti prije uvođenja u spektrometar masa preveli u plinsku fazu i ionizirali, najčešće se koristi elektroraspršenje<sup>20,25,27,58,63,64,72,73,75</sup> (ESI, engl. *electrospray ionization*). ESI je uvjerljivo najkorištenija metoda meke ionizacije kod LC-MS vezanog sustava, a namijenjena je ionizaciji polarnih nehlapljivih organskih i biomolekula koje su ionizirane u otopini, molarnih



masa do 200 000 Da. Osim ESI, korištene su i metode kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (APCI)<sup>81,91</sup>, zagrijani elektrosprej (HESI)<sup>66,74,85</sup> i turbo ion sprej (TIS)<sup>38,54,67</sup>. Kada su analiti prevedeni u  $[M+H]^+$  oblik, ulaze u MS sustav gdje dolaze na analizator koji ih dodatno separira i fragmentira. Pregledom literature vidljivo je kako se za analizu mogu koristiti razni analizatori, no opće prihvaćeni standard u kvantitativnoj analizi je trostruki kvadrupol<sup>20,23,89,90,93,97,25,27,44,58,63,73,86,87</sup> (QqQ). Snimanja se mogu provoditi u dvije opcije, puno snimanje gdje se snimaju svi ioni bez separacije u analizatoru i, češće, tandemsku spektrometriju u tzv. MRM (engl. *multi reaction monitoring*) načinu rada, uz praćenje odabranih tranzicija analita koje su specifične i selektivne za analiziranu komponentu čime se utjecaj matrice dodatno smanjuje. MRM metodom u analizatoru se provodi separacija prema roditeljskom spoju i njegovoj zadanoj tranziciji (fragmentaciji) što povećava točnost i preciznost kvantitativnog određivanja bez obzira na kompleksnost uzorka. Osim QqQ, koriste se i drugi analizatori poput ionske stupice spregnute s kvadrupolom<sup>32,33,38,41,59,67,104</sup> (QTrap), analizatora s vremenom preleta spregnutim s kvadrupolom<sup>48</sup> (QToF) i Orbitrap<sup>66,74</sup>, međutim njihovo korištenje je češće kod kvalitativnih identifikacijskih analiza<sup>74,105</sup>, dok se kvantitativne analize uglavnom provode QqQ sustavima.



Slika 7. Shematski prikaz LC-MS/MS sustava

Nedostatak primjene LC-MS tehnika za kvantitativnu analizu je promjena intenziteta signala (supresija ili pojačanje) u ekstraktima uzoraka koji sadrže kompleksnu matricu, zbog čega kod njihove primjene često nije prikladno kvantifikaciju provoditi na temelju eksternih kalibracijskih krivulja<sup>108</sup>. Stoga se za tu svrhu primjenjuje metoda dodatka unutarnjeg standarda pri čemu je idealni unutarnji standard izotopno obilježen analit čije bi ponašanje tijekom pripreve uzoraka, ekstrakcije i instrumentne analize trebalo biti istovjetno analitu<sup>109</sup>. Ukoliko je takav spoj

nedostupan, kriterij za odabir internog standarda jest struktura i sličnost fizikalno-kemijskih svojstava te najvažnije, sličnost ponašanja s analitom što se provjerava postupkom validacije. Interni standardi se u uzorak dodaju na samom početku kako bi se na taj način kompenzirali svi potencijalni gubitci do kojih dolazi tijekom pripreme uzorka. Postoje i druge opcije kalibracije, no ni jedna nije pokazala dovoljno dobru kompenzaciju i na gubitke i na utjecaj matrice kao metoda dodatka unutarnjeg standarda<sup>49</sup>.

## *ii. Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa*

Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS) nije uobičajena tehnika analize farmaceutika u bioti, budući da je ova tehnika prikladnija za analizu hlapljivih i termički stabilnih analita, što nisu karakteristike većine farmaceutika. Prednost koju ima GC-MS nad LC-MS tehnikama su manji volumeni injektiranog uzorka i smanjeni utjecaj matrice što olakšava analizu<sup>106</sup>. Plinska kromatografija zasniva se na istom principu kao i tekućinska, komponente se odjeljuju s obzirom na afinitet prema zadržavanju na stacionarnoj fazi. Mobilna faza je inertni plin nosač, najčešće helij, u koji se injektira uzorak, dok je stacionarna faza punilo kolone čije čestice su često presvučene mikroskopskim slojem viskozne tekućine. Za ionizaciju se koristi jaka tehnika ionizacije, ionizacija brzim elektronima (EI, engl. *electron impact*) koja daje stabilne odzive. Analizatori u GC-MS sustavima su najčešće kvadrupoli, a detekcija analita funkcionira na istom principu kao i kod LC-MS sustava.

Prije nego se uzorak farmaceutika injektira u sustav, potrebno je analite derivatizirati. Derivatizacija je postupak modifikacije funkcionalnih skupina čiji je cilj učiniti komponente hlapljivijima što je nužan postupak u analizi farmaceutika GC-MS tehnikom. Postoje mnogobrojni derivatizacijski agensi, no najčešće korišteni su BSTFA (N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid)<sup>29</sup>, MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamid)<sup>102,103,107</sup> i MTBSTFA (N-*tert*-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamid)<sup>29,42</sup>. U istraživanju Moline-Fernandez i suradnika, MTBSTFA pokazao se kao bolji derivatizacijski agens nego BSTFA jer su uzorci derivatizirani pomoću MTBSTFA pokazali bolju osjetljivost i rezoluciju što je omogućilo bolje određivanje niskih koncentracija farmaceutika<sup>29</sup>. Pomoću GC-MS tehnike uspješno su analizirani farmaceutici iz skupine nesteroidnih protuupalnih lijekova<sup>29,30,42,56</sup>, lipidnih regulatora<sup>29,42</sup>, antidepresiva<sup>57,88,103</sup>, steroida<sup>42,82,107</sup>, antimikotika<sup>42,88,102,103</sup>, antikonvulzanata<sup>42,88,103</sup> i fibrata<sup>42,56</sup>.

## VI. LITERATURA

1. R. Álvarez-Ruiz i Y. Picó, *Trends Environ. Anal. Chem.* **25** (2020) e00082.
2. K. Yu, B. Li i T. Zhang, *Anal. Chim. Acta* **738** (2012) 59–68.
3. O. A. H. Jones, N. Voulvoulis i J. N. Lester, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **35** (2005) 401–427.
4. J. Radjenovic, M. Petrovic i D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (2007) 1365–1377.
5. R. Moreno-González, S. Rodriguez-Mozaz, M. Gros, D. Barceló i V. M. León, *Environ. Res.* **138** (2015) 326–344.
6. C. D. S. Pereira, L. A. Maranhão, F. S. Cortez, F. H. Pusceddu, A. R. Santos, D. A. Ribeiro, A. Cesar i L. L. Guimarães, *Sci. Total Environ.* **548–549** (2016) 148–154.
7. A. Lolić, P. Paíga, L. H. M. L. M. Santos, S. Ramos, M. Correia i C. Delerue-Matos, *Sci. Total Environ.* **508** (2015) 240–250.
8. I. Muñoz, J. C. López-Doval, M. Ricart, M. Villagrasa, R. Brix, A. Geiszinger, A. Ginebreda, H. Guasch, M. J. López De Alda, A. M. Romani, S. Sabater i D. Barceló, *Environ. Toxicol. Chem.* **28** (2009) 2706–2714.
9. K. Komori, Y. Suzuki, M. Minamiyama i A. Harada, *Environ. Monit. Assess.* **185** (2013) 4529–4536.
10. F. O. Agunbiade i B. Moodley, *Environ. Monit. Assess.* **186** (2014) 7273–7291.
11. Y. Yang, G. S. Toor i C. F. Williams, *J Soils Sediments* **15** (2015) 993–1004.
12. S. Matongo, G. Birungi i B. Moodley, *Env. Sci Pollut Res* **22** (2015) 10298–10308.
13. K. Nowakowska, J. Giebułtowicz, M. Kamaszewski, A. Adamski, H. Szudrowicz, T. Ostaszewska, U. Solarska-Dzięciołowska, G. Nałęcz-Jawecki, P. Wroczyński i A. Drobniowska, *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* **229** (2020) 108670.
14. S. Zhou, Q. Chen, C. Di Paolo, Y. Shao, H. Hollert i T. B. Seiler, *Sci. Total Environ.* **664** (2019) 89–98.
15. J. P. Nash, D. E. Kime, L. T. M. Van der Ven, P. W. Wester, F. Brion, G. Maack, P. Stahlschmidt-Allner i C. R. Tyler, *Environ. Health Perspect.* **112** (2004) 1725–1733.
16. I. J. Huang, H. I. Sirotkin i A. E. McElroy, *Neurotoxicol. Teratol.* **72** (2019) 39–48.
17. Y. Sun, J. Liu i G. Lu, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **195** (2020)
18. M. Saaristo, A. Lagesson, M. G. Bertram, J. Fick, J. Klaminder, C. P. Johnstone, B. B. M. Wong i T. Brodin, *Sci. Total Environ.* **655** (2019) 1311–1320.
19. L. E. Vossen, D. Červený, O. Sen Sarma, P. O. Thörnqvist, F. Jutfelt, J. Fick, T. Brodin i S. Winberg, *Sci. Total Environ.* **703** (2020) 134701.
20. J. Ding, G. Lu i Y. Li, *Chemosphere* **148** (2016) 21–31.
21. A. T. Da Silveira, L. A. Maranhão, N. H. Torres, L. F. R. Ferreira, M. M. de Salles Pupo, R. N. Bharagava, B. S. Souza, M. J. Costa i V. L. Tornisiello, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **318** (2018) 1001–1008.
22. T. B. Gomes, S. Fernandes Sales Junior, T. D. Saint’Pierre, F. V. Correia, R. A. Hauser-Davis i E. M. Saggiaro, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **171** (2019) 781–789.
23. A. M. Franklin, C. F. Williams, D. M. Andrews, E. E. Woodward i J. E. Watson, *J. Environ. Qual.* **45** (2016) 546–554.
24. H. Y. Kim, I. S. Lee i J. E. Oh, *Sci. Total Environ.* **579** (2017) 940–949.
25. W. Li, Y. Shi, L. Gao, J. Liu i Y. Cai, *Chemosphere* **89** (2012) 1307–1315.
26. W. Li, Y. Shi, L. Gao, J. Liu i Y. Cai, *Environ. Pollut.* **162** (2012) 56–62.
27. F. Hu, K. Bian, Y. Liu, Y. Su, T. Zhou, X. Song i L. He, *J. Chromatogr. A* **1368** (2014)

- 52–63.
28. H. Berrada, F. Borrull, G. Font i R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* **1208** (2008) 83–89.
  29. N. Molina-Fernandez, C. Perez-Conde, S. Rainieri i J. Sanz-Landaluze, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24** (2017) 10907–10918.
  30. G. C. Nallani, P. M. Paulos, L. A. Constantine, B. J. Venables i D. B. Huggett, *Chemosphere* **84** (2011) 1371–1377.
  31. T. H. Miller, N. R. Bury, S. F. Owen, J. I. MacRae i L. P. Barron, *Environ. Pollut.* **239** (2018) 129–146.
  32. D. Alvarez-Muñoz, B. Huerta, M. Fernandez-Tejedor, S. Rodríguez-Mozaz i D. Barceló, *Talanta* **136** (2015) 174–182.
  33. B. Huerta, A. Jakimska, M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz i D. Barceló, *J. Chromatogr. A* **1288** (2013) 63–72.
  34. K. Grabicová, R. Grabic, G. Fedorova, J. Kolářová, J. Turek, B. W. Brooks i T. Randák, *Environ. Pollut.* **261** (2020) 114150.
  35. H. Xie, H. Hao, N. Xu, X. Liang, D. Gao, Y. Xu, Y. Gao, H. Tao i M. Wong, *Sci. Total Environ.* **659** (2019) 230–239.
  36. M. E. Valdés, B. Huerta, D. A. Wunderlin, M. A. Bistoni, D. Barceló i S. Rodríguez-Mozaz, *Sci. Total Environ.* **557–558** (2016) 58–67.
  37. M. Lahti, J. M. Brozinski, A. Jylhä, L. Kronberg i A. Oikari, *Environ. Toxicol. Chem.* **30** (2011) 1403–1411.
  38. F. Chen, Z. Gong i B. C. Kelly, *J. Chromatogr. A* **1383** (2015) 104–111.
  39. J. L. Zhao, Y. S. Liu, W. R. Liu, Y. X. Jiang, H. C. Su, Q. Q. Zhang, X. W. Chen, Y. Y. Yang, J. Chen, S. S. Liu, C. G. Pan, G. Y. Huang i G. G. Ying, *Environ. Pollut.* **198** (2015) 15–24.
  40. R. Gibson, C. R. Tyler i E. M. Hill, *J. Chromatogr. A* **1066** (2005) 33–40.
  41. O. P. Togunde, K. D. Oakes, M. R. Servos i J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.* **46** (2012) 5302–5309.
  42. Y. Yu i L. Wu, *Front. Environ. Sci. Eng.* **9** (2015) 475–481.
  43. R. Tanoue, K. Nomiyama, H. Nakamura, T. Hayashi, J. W. Kim, T. Isobe, R. Shinohara i S. Tanabe, *J. Chromatogr. A* **1355** (2014) 193–205.
  44. G. Daniele, M. Fieu, S. Joachim, A. Bado-Nilles, P. Baudoin, C. Turies, J. Porcher i S. Andres, *Anal. Bioanal. Chem.* (2016)
  45. A. J. Ramirez, M. A. Mottaleb, B. W. Brooks i C. K. Chambliss, *Anal. Chem.* **79** (2007) 3155–3163.
  46. K. Grabicova, A. Vojs Staňová, O. Koba Ucuñ, A. Borik, T. Randak i R. Grabic, *Anal. Chim. Acta* **1022** (2018) 53–60.
  47. S. N. Garcia, M. Foster, L. A. Constantine i D. B. Huggett, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **84** (2012) 207–211.
  48. O. Malev, M. Lovrić, D. Stipaničev, S. Repec, D. Martinović-Weigelt, D. Zanella, T. Ivanković, V. Sindičić Đuretec, J. Barišić, M. Li i G. Klobučar, *Environ. Pollut.* **266** (2020)
  49. B. Du, P. Perez-Hurtado, B. W. Brooks i C. K. Chambliss, *J. Chromatogr. A* **1253** (2012) 177–183.
  50. A. Lagesson, J. Fahlman, T. Brodin, J. Fick, M. Jonsson, P. Byström i J. Klaminder, *Sci. Total Environ.* **568** (2016) 208–215.
  51. E. S. McCallum, A. Sundelin, J. Fick, A. Alanärä, J. Klaminder, G. Hellström i T. Brodin,

- Aquat. Toxicol.* **207** (2019) 170–178.
52. T. Brodin, S. Piovano, J. Fick, J. Klaminder, M. Heynen i M. Jonsson, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **369** (2014) 20130580.
  53. S. Bayen, E. S. Estrada, G. Juhel i B. C. Kelly, *Anal. Bioanal. Chem.* **407** (2015)
  54. C. Caballo, M. D. Sicilia i S. Rubio, *Anal. Bioanal. Chem.* **407** (2015) 4721–4731.
  55. S. Kanimozhi, C. Basheer, S. Neveliappan, K. Ang, F. Xue i H. K. Lee, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **909** (2012) 37–41.
  56. J. N. Brown, N. Paxéus, L. Förlin i D. G. J. Larsson, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **24** (2007) 267–274.
  57. B. W. Brooks, C. K. Chambliss, J. K. Stanley, A. Ramirez, K. E. Banks, R. D. Johnson i R. J. Lewis, *Environ. Toxicol. Chem.* **24** (2005) 464–469.
  58. T. H. Miller, N. R. Bury, S. F. Owen i L. P. Barron, *Chemosphere* **183** (2017) 389–400.
  59. O. P. Togunde, K. D. Oakes, M. R. Servos i J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* **1261** (2012) 99–106.
  60. M. Anastasiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher i F. J. Schenck, *J. AOAC Int.* **86** (2003) 412–431.
  61. Foods of plant origin — Determination of pesticide residues using GC-MS and / or LC-MS / MS following acetonitrile extraction / partitioning and cleanup by dispersive SPE — QuEChERS-method, *European Committee for Standardization*, 2008, 1–81.
  62. S. J. Lehotay, *J. AOAC Int.* **90** (2007) 485–520.
  63. D. Papaioannou, P. H. Koukoulakis, D. Lambropoulou, M. Papageorgiou i I. K. Kalavrouziotis, *Sci. Total Environ.* **662** (2019) 537–546.
  64. G. Daniele, M. Fieu, S. Joachim, A. Bado-Nilles, P. Baudoin, C. Turies, J. M. Porcher, S. Andres i E. Vulliet, *Anal. Bioanal. Chem.* **408** (2016) 4435–4444.
  65. T. F. T. Omar, A. Z. Aris, F. M. Yusoff i S. Mustafa, *Environ. Pollut.* **248** (2019) 763–773.
  66. M. J. Martínez Bueno, C. Boillot, D. Munaron, H. Fenet, C. Casellas i E. Gómez, *Anal. Bioanal. Chem.* **406** (2014) 601–610.
  67. F. Chen, Z. Gong i B. C. Kelly, *Environ. Sci. Technol.* **51** (2017) 11085–11095.
  68. R. Zhang, K. Yu, A. Li, Y. Wang, C. Pan i X. Huang, *Sci. Total Environ.* **704** (2020) 135288.
  69. P. Arnnok, R. R. Singh, R. Burakham, A. Pérez-Fuentetaja i D. S. Aga, *Environ. Sci. Technol.* **51** (2017) 10652–10662.
  70. M. E. Valdés, M. V. Amé, M. de los A. Bistoni i D. A. Wunderlin, *Sci. Total Environ.* **472** (2014) 389–396.
  71. Y. Chen, J. L. Zhou, L. Cheng, Y. Y. Zheng i J. Xu, *Chemosphere* **180** (2017) 467–475.
  72. S. R. de Solla, A. M. Gilroy, J. S. Klinck, L. E. King, R. McInnis, J. Struger, S. M. Backus i P. L. Gillis, *Chemosphere* **146** (2016) 486–496.
  73. J. L. Wilkinson, P. S. Hooda, J. Swinden, J. Barker i S. Barton, *Environ. Pollut.* **234** (2018) 864–875.
  74. C. L. Chitescu, E. Oosterink, J. De Jong i A. A. M. Stolker, *Talanta* **88** (2012) 653–662.
  75. L. Mijangos, H. Ziarrusta, I. Zabaleta, A. Usobiaga, M. Olivares, O. Zuloaga, N. Etxebarria i A. Prieto, *Anal. Bioanal. Chem.* **411** (2019) 493–506.
  76. B. Huerta, A. Jakimska, M. Llorca, A. Ruhí, G. Margoutidis, V. Acuña, S. Sabater, S. Rodríguez-Mozaz i D. Barcelò, *Talanta* **132** (2015) 373–381.
  77. R. Fernandez-Torres, B. A. B. Lopez, M. O. Consentino, M. C. Mochon i M. R. Payan, *J.*

- Pharm. Biomed. Anal.* **54** (2011) 1146–1156.
78. R. Cueva-Mestanza, M. E. Torres-Padrón, Z. Sosa-Ferrera i J. J. Santana-Rodríguez, *Biomed. Chromatogr.* **22** (2008) 1115–1122.
  79. V. Contardo-jara, C. Lorenz, S. Pflugmacher, G. Nützmann, W. Kloas i C. Wiegand, *Aquat. Toxicol.* **105** (2011) 428–437.
  80. R. Moreno-gonzález, S. Rodriguez-mozaz, M. Gros, D. Barceló i V. M. León, *Environ. Res.* **138** (2015) 326–344.
  81. S. Chu i C. D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A* **1163** (2007) 112–118.
  82. A. M. Al-Ansari, A. Saleem, L. E. Kimpe, V. L. Trudeau i J. M. Blais, *J. Chromatogr. B* **879** (2011) 3649–3652.
  83. B. Dussault, V. K. Balakrishnan, U. Borgmann, K. R. Solomon i P. K. Sibley, **72** (2009) 1635–1641.
  84. H. Wang, X. Zhou, Y. Zhang, H. Chen, G. Li, Y. Xu, Q. Zhao, W. Song, H. Jin i L. Ding, *J. Agric. Food Chem.* **60** (2012) 10343–10351.
  85. K. Wille, J. A. L. Kiebooms, M. Claessens, K. Rappé, J. Vanden Bussche, H. Noppe, N. Van Praet, E. De Wulf, P. Van Caeter, C. R. Janssen, H. F. De Brabander i L. Vanhaecke, *Anal. Bioanal. Chem.* **400** (2011) 1459–1472.
  86. H. Yang, G. Lu, Z. Yan, J. Liu, H. Dong, X. Bao, X. Zhang i Y. Sun, *J. Hazard. Mater.* **391** (2020) 122245.
  87. Z. Xie, G. Lu, J. Liu, Z. Yan, B. Ma, Z. Zhang i W. Chen, *Chemosphere* **138** (2015) 140–147.
  88. B. Subedi, M. A. Mottaleb, C. K. Chambliss i S. Usenko, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 6278–6284.
  89. B. Subedi, B. Du, C. K. Chambliss, J. Koschorreck, H. Rüdél, M. Quack, B. W. Brooks i S. Usenko, *Environ. Sci. Technol.* **46** (2012) 9047–9054.
  90. J. Wang i P. R. Gardinali, *Environ. Toxicol. Chem.* **32** (2013) 1752–1758.
  91. A. M. Al-Ansari, A. Saleem, L. E. Kimpe, J. P. Sherry, M. E. McMaster, V. L. Trudeau i J. M. Blais, *Environ. Pollut.* **158** (2010) 2566–2571.
  92. Y. Pico, V. Belenguier, C. Corcellas, M. S. Diaz-Cruz, E. Eljarrat, M. Farré, P. Gago-Ferrero, B. Huerta, A. Navarro-Ortega, M. Petrovic, S. Rodríguez-Mozaz, L. Sabater, G. Santín i D. Barcelo, *Sci. Total Environ.* **659** (2019) 1186–1198.
  93. C. A. Kinney, E. T. Furlong, D. W. Kolpin, M. R. Burkhardt, S. D. Zaugg, S. L. Werner, J. P. Bossio i M. J. Benotti, *Environ. Sci. Technol.* **43** (2009) 545–547.
  94. N. J. K. Simpson i P. M. Wynne, THE SAMPLE MATRIX AND ITS INFLUENCE ON METHOD DEVELOPMENT, *SOLID-PHASE EXTRACTION Principles, Techniques, and Applications*, Marcel Dekker, New York, 2000, str. 39–96.
  95. I. Zabaleta, E. Bizkarguenaga, A. Iparragirre, P. Navarro, A. Prieto, L. Á. Fernández i O. Zuloaga, *J. Chromatogr. A* **1331** (2014) 27–37.
  96. S. P. Haddad, A. Luek, W. C. Scott, G. N. Saari, S. R. Burket, L. A. Kristofco, J. Corrales, J. B. Rasmussen, C. K. Chambliss, M. Luers, C. Rogers i B. W. Brooks, *J. Hazard. Mater.* **359** (2018) 231–240.
  97. J. Wang i P. R. Gardinali, *Anal. Bioanal. Chem.* **404** (2012) 2711–2720.
  98. P. Steinbach i W. Schwack, *J. Chromatogr. A* **1323** (2014) 28–38.
  99. R. Zhang, J. Pei, R. Zhang, S. Wang, W. Zeng, D. Huang, Y. Wang, Y. Zhang, Y. Wang i K. Yu, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **154** (2018) 27–35.
  100. J. Liu, R. Wang, B. Huang, C. Lin, Y. Wang i X. Pan, *Environ. Pollut.* **159** (2011) 2815–

- 2822.
101. R. Tanoue, K. Nomiya, H. Nakamura, J. W. Kim, T. Isobe, R. Shinohara, T. Kunisue i S. Tanabe, *Environ. Sci. Technol.* **49** (2015) 11649–11658.
  102. M. A. Mottaleb, S. Usenko, J. G. O'Donnell, A. J. Ramirez, B. W. Brooks i C. K. Chambliss, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 815–823.
  103. A. J. Ramirez, R. A. Brain, S. Usenko, M. A. Mottaleb, J. G. O'Donnell, L. L. Stahl, J. B. Wathen, B. D. Snyder, J. L. Pitt, P. Perez-Hurtado, L. L. Dobbins, B. W. Brooks i C. K. Chambliss, *Environ. Toxicol. Chem.* **28** (2009) 2587–2597.
  104. V. Contardo-Jara, C. Lorenz, S. Pflugmacher, G. Nützmann, W. Kloas i C. Wiegand, *Aquat. Toxicol.* **105** (2011) 428–437.
  105. C. L. Chitescu, A. I. Nicolau i A. A. M. Stolker, *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **30** (2013) 1138–1146.
  106. C. Hao, X. Zhao i P. Yang, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **26** (2007) 569–580.
  107. M. H. Dévier, P. Labadie, A. Togola i H. Budzinski, *Anal. Chim. Acta* **657** (2010) 28–35.
  108. M. Petrović, M. D. Hernando, M. S. Díaz-Cruz i D. Barceló, *J. Chromatogr. A* **1067** (2005) 1–14.
  109. S. Wang, M. Cyronak i E. Yang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43** (2007) 701–707.