

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD**

**Aplikace pasivního vzorkování a necílené LC/HRMS
analýzy pro hodnocení zdrojů znečištění a identifikaci
nových prioritních polutantů**

**R. Grabic, P. Nováková, A. Sadchenko, H. Švecová, R. Kodešová,
V. Kodeš**

č. 219

Vodňany

ISBN 978-80-7514-243-6

Publikace byla zpracována za finanční podpory následujících projektů:
Výsledky byly získány za finanční podpory Ministerstva zemědělství České republiky –
projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum QK23020018.

Obsah

1. Cíl metodiky	4
2. Vlastní popis metodiky	5
2.1. Současný stav poznání v oblasti necílené analýzy	5
2.1.1. Odběr a příprava vzorků	6
2.1.2. Instrumentální analýza a sběr dat	8
2.1.3. Zpracování dat	9
2.2. Popis vzorkovaných míst, použité metody vzorkování a instrumentální analýzy.	13
2.2.1. Výběr vzorkovaných lokalit a jejich popis	13
2.2.2. Použité metody vzorkování	15
2.2.3. Použité metody instrumentální analýzy	16
2.3. Popis parametrů zpracování dat pomocí softwaru Compound Discoverer 3.3.	18
2.4. Komentovaný postup vyhodnocení dat	23
2.4.1. Práce se soubory před spuštěním vyhodnocení	23
2.4.2. Základní zpracování a vyhodnocení MS ¹ dat	26
2.4.3. Základní zpracování a vyhodnocení MS ² dat	31
2.4.4. Ukázky pokročilého vyhodnocení dat po automatickém zpracování	38
2.4.5. Komunikace a sdílení výsledků necílených analýz uživatelům dat	41
2.4.6. Příklady výsledků dosažených aplikací necílených analýz v rámci projektu a možnosti využití již získaných DIA dat	42
3. Srovnání „novosti postupů“	43
4. Popis uplatnění certifikované metodiky	43
5. Ekonomické aspekty	44
6. Seznam použité související literatury	44
7. Seznam publikací, které předcházely metodice	48

1. Cíl metodiky

Rostoucí lidská populace a kvalita života přímo i nepřímo zapříčiňují zvyšování znečištění životního prostředí. Neustálý přísun cizorodých látek z rozličných zdrojů rozšiřuje počet a množství chemických látek, o jejichž výskytu a osudu v životním prostředí, stejně jako o jejich vlivu na ekosystém a lidské zdraví, máme jen kusé informace. Známé chemické látky jsou sdružovány do specializovaných databází. Například největší z nich, provozovaná American Chemical Society (ACS), eviduje kolem 219 milionů unikátních sloučenin s přiřazeným identifikátorem (CAS – z angl. *Chemical Abstracts Service*). Registr Evropské unie (REACH – z angl. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) obsahuje informace o spotřebě a částečně také o možném riziku pro zdraví a prostředí přibližně 360 000 látek. S přihlédnutím ke skutečnosti, že toxicita látek může být ovlivněna přítomností dalších sloučenin nebo se může měnit jejich transformací v prostředí, má za následek, že posouzení rizik expozice složitým směsím chemických sloučenin vyžaduje rozsáhlý a komplexní přístup (Bernhardt a kol., 2017).

Mikropolutanty (cizorodé znečišťující látky pocházející z lidských aktivit) se v životním prostředí vyskytují ve stopových koncentracích ($<ng.L^{-1}$ nebo $<ng.kg^{-1}$) a přesto mohou mít negativní účinky na živé organismy. Pro výzkum i následnou regulaci představují náročnou výzvu díky rozmanitosti látek, obvykle nízké koncentraci a složitosti environmentálních matric jako jsou povrchové a podzemní vody, sedimenty či půdy, ve kterých se vyskytují (Sousa a kol., 2018). Přenos chemikálií mezi složkami životního prostředí i v rámci potravního řetězce umožňuje vzájemná propojenost vodního a půdního prostředí. Mobilitu mikropolutantů ovlivňují jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a také vlastnosti okolního prostředí. Jakmile jsou jednou uvolněny do prostředí, v rámci matric se mohou transportovat, akumulovat nebo degradovat/transformovat. Znalosti o vlastnostech zájmových látek nebo expozičním scénáři (např. vodní organismy biokoncentrací z vody) pomáhají zaměřit vzorkovací i analytické metody na relevantní matrice (Escher a kol., 2020).

Posledních několik let je snaha vědců upřena na neprozkoumané chemikálie vyskytující se v prostředí ve stopovém množství. Neustálý vývoj analytických metod úspěšně zajišťuje provázání identifikace neznámých látek přítomných v životním prostředí se stanovením rizika. Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS, z angl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) je dnes již běžnou metodou pro kvalitativní a kvantitativní analýzu známých mikropolutantů v řadě environmentálních matric (Brack a kol., 2017; Hollender a kol., 2017). Díky zvýšení citlivosti, rozlišovací schopnosti a správnosti určení m/z hmotnostních spektrometrů byla umožněna identifikace neznámých látek i ve složitých matricích. Použití vysoko rozlišujících hmotnostních spektrometrů k analýzám v plném skenu (HRMS full scan; z angl. *High Resolution Mass Spectrometry*) bez předchozích informací o přítomných sloučeninách je optimálním způsobem, jak detekovat široké spektrum látek a získat jejich přesné prvkové složení. Rozšíření analýz o tandemovou hmotnostní spektrometrii ve vysokém rozlišení pak pomáhá odhadnout jejich molekulovou strukturu a identifikovat je (Hollender a kol., 2017; Zedda a Zwiener, 2012). Společně s přístrojovou technikou se zlepšují i softwarové prostředky pro zpracování získaných dat. Lepší detekce píků snižuje počet falešně pozitivních záchytů a dostupné databáze spekter urychlují identifikaci sloučenin. V případě zkoumání transformačních produktů se přistupuje například k softwarovým návrhům transformace v několika následných stupních. .

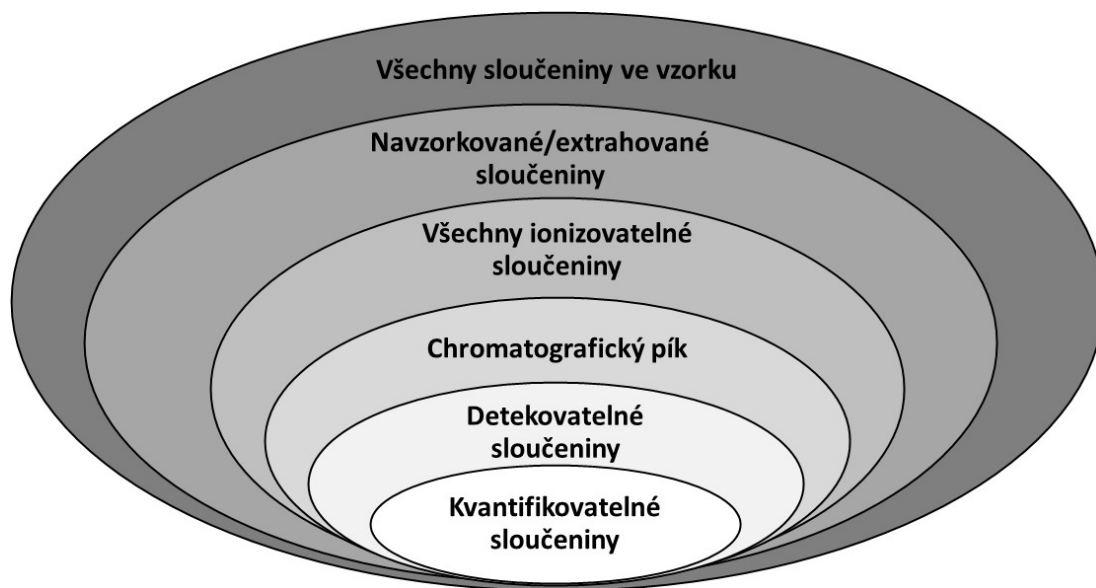
Princip necílené (NT, z angl. *non-target*) chemické analýzy je zachycení co nejširšího chemického prostoru obsaženého ve vzorku. Běžná praxe cílených metod LC-MS je schopna obsáhnout přibližně stovky analytů s popsanou charakteristikou a dochází k diskriminaci látek neznámých nebo nových (Bletsou a kol., 2015; Escher a kol., 2020). Necílenou analýzu můžeme podpořit vložением informací o látkách, které ve vzorku předpokládáme. V takovém případě hovoříme o suspektním screeningu (analýza podezřelých/očekávaných látek, též suspektní analýza; SA, z angl. *suspect screening*), kdy se data HRMS analýzy v plném skenu porovnávají se známými hodnotami m/z, prvkovým složením nebo transformačními procesy uvedenými v seznamech zájmových sloučenin (Gosetti a kol., 2016; Krauss a kol., 2010). Takto lze rozšířit seznam podezřelých sloučenin až na tisícovky bez nutnosti referenčních standardů. Potvrzování identity probíhá na základě porovnávání s knihovny hmotnostních spekter či pokročilé manuální interpretace. Data ze suspektních analýz jsou získávána s větší citlivostí a intenzitou díky vynechávání pravděpodobně nezájmových signálů (Hulleman a kol., 2023), ale necílená analýza je náročná nejenom vzhledem k nákladné analytické instrumentaci, ale také z pohledu zpracování dat.

Cílem této metodiky je přiblížit na reálných příkladech postupy necílené analýzy vody pomocí kapalinové chromatografie s vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrií (LC-HRMS). Metodika navazuje na již dříve vydané metodiky o pasivním vzorkování (Grabic a kol., 2015; 2018) a obecném přístupu k hodnocení využití odpadních vod a čistírenských kalů pro zemědělství (Kodeš a kol., 2023), které rozšiřuje je o obecné platné postupy a principy necílené analýzy pro identifikaci neznámých zájmových sloučenin.

2. Vlastní popis metodiky

2.1. Současný stav poznání v oblasti necílené analýzy

Obecný postup pro NT analýzy zahrnuje obecně zavedené kroky modifikované podle typu vzorku, dostupné analytické techniky a softwarů. Při zkoumání kontaminantů se nelze vyhnout krokům, které vedou k nižšímu počtu identifikovaných sloučenin, než kolik jich je ve vzorku přítomno, viz Obrázek 1. Z obrázku je patrné, že zásadní vliv budou mít vzorkování a extrakce, ale také použité separační metody. Vztah mezi analýzou účinku pomocí bioanalytických metod a instrumentální analýzou byl obsáhle diskutován v naší předcházející metodice (Kodeš a kol., 2023). Jednoduše jej lze popsat tak, že sloučeniny detekovatelné pomocí instrumentálních metod jsou podmnožinou sloučenin, které se podílejí na účinku na organismy. V následujících kapitolách jsou shrnuty metody, postupy a doporučení pro dosažení co nejvyššího počtu identifikovaných sloučenin.



Obrázek 1. Schéma snižování počtu sloučenin ve vzorku v průběhu celého analytického postupu.

2.1.1. Odběr a příprava vzorků

Necílený screening je způsob, jak podrobně vymezi obsah chemických znečišťujících látek ve vzorku. Fyzikálně-chemické vlastnosti mikropolutantů ovlivňují jejich zastoupení v různých složkách životního prostředí, ale i schopnost jejich transportu nebo sorpce. Vzorkovací plán tedy musí být přizpůsoben zamýšlenému cíli experimentu (Escher a kol., 2020). Vodní a půdní prostředí jsou úzce provázaná a mikropolutanty přecházejí přes jednotlivé složky nebo se v nich kumulují. Výběr matrice, časový plán nebo opakování odběrů významně ovlivňuje složení i množství sloučenin ve finálních vzorcích. Například sedimenty nebo půdy mohou sloužit jako pohled do historie pro sloučeniny, které jsou dostatečně stabilní (Chiaia-Hernandez a kol., 2014), a naopak mohou pomoci při sledování degradace/transformace méně stabilních polutantů. Opačnou vzorkovací strategií jsou bodové vzorky vody jako ukazatele aktuálního stavu vodních toků/těles v okamžiku vzorkování. Jsou sice nejméně náročné jak finančně, tak z pohledu náročnosti odběru, ale mají mnohem menší vypovídající hodnotu.

Výhodnější alternativou jsou kompozitní vzorky odebírané v různých časových řadách, kdy získáváme informace z většího časového horizontu (Menger a kol., 2020). Jak již bylo uvedeno v našich předchozích metodikách (Grabac a kol., 2015; 2018), z mnoha důvodů je vhodnější použít pro vzorkování vodních útvarů pasivní vzorkovače. Obvykle se jedná o sorbent vložený mezi dvě polopropustné membrány (POCIS – *Polar Organic Compound Integrative Sampler*, SPMD – *SemiPermeable Membrane Device*, ChemCatcher) nebo o materiál sorbující mikropolutanty přímo z vody (SpeedDisk, listy silikonového polymeru). Svým způsobem unikátní srovnání výsledků dosažených třemi různými pasivními vzorkovači pro polární mikropolutanty bylo provedeno v práci Fialové a kol. (2024). Pasivní vzorkovače zajišťují sběr informací o znečištění v rámci týdnů až měsíců podle užitého typu a zároveň umožňují i zachycení sloučenin na velmi nízkých koncentračních hladinách, které by jinak nebyly detekovatelné (Escher a kol., 2020). V Tabulce 1, která byla převzata z předchozí metodiky

Kodeše a kol. (2023), jsou porovnány podmínky vzorkování a extrakce pro běžně používané LC-MS metody analýzy vod.

Tabulka 1. Přehled koncentračních faktorů pro různé metody vzorkování, úpravy a analýzy vzorků vody (Kodeš a kol., 2023).

Metoda	Typická doba vzorkování		Filtrace	Objem vzorku	Objem pro extrakci	Finální objem vzorku	Koncentrační faktor
	Vyčištěná odpadní voda	Povrchová podzemní voda					
SPE extrakce	24 hodin/bodové	24 hodin/bodové	ano	1 l	0.1-1 l	1 ml	100-1000
In-line SPE	24 hodin/bodové	24 hodin/bodové	ano	0.1 l	1-5 ml	ekv. 5 µl	200-1000
Off-line SPE plné vody	24 hodin/bodové	24 hodin/bodové	ne	1-3 l	1-3 l	0.1-1 ml	1000-33000
POCIS	14 dní	28 dní	ne	1.4-3 l *	vzorkovač	1 ml	1400-3000
SPMD	30 dní	30 dní	ne	80-200 l**	vzorkovač	1 ml	80000-200000
silikon	30 dní	30 dní	ne	50-150 l***	vzorkovač	1 ml	50000-150000

*Povrchová plocha vzorkovače: standardní POCIS 41 cm²; ** standardní SPMD 460cm²; *** jeden plát silikonu 100 cm²

Příprava vzorku k analýze závisí na jeho povaze a měla by být minimální bez rizika ztrát nebo degradace sloučenin. U vzorků vody je vhodná minimální manipulace a v necílené analýze často používáme přímý nástřik do chromatografického systému, případně předchozí zředění nebo šetrnou filtraci k odstranění větších částic. Extrakce na pevnou fázi (SPE, z angl. *Solid Phase Extraction*) již vnáší do úpravy vzorku krok, který snižuje celkový počet detekovatelných sloučenin (Obrázek 1). Na druhou stranu však zvyšuje šanci zachytit mikropolutanty přítomné na nízkých koncentračních hladinách a lze použít kombinované systémy s více mechanismy zachytu pro rozšíření spektra analytů.

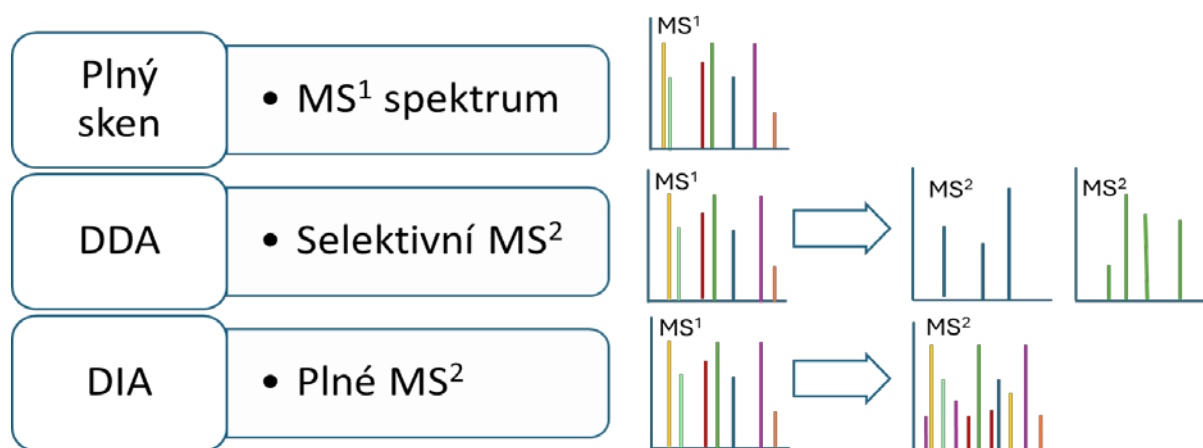
Sedimenty, půdy, pasivní vzorkovače nebo biologické vzorky musejí být extrahované, aby byly analyty převedeny do vhodného rozpouštědla. Během extrakce by se měly šetrně odstranit interference z matrice, a naopak zachovat a zkoncentrovat co nejvíce sloučenin a předejít jejich degradaci (Milman a Zhurkovich, 2017; Petrie a kol., 2015). Úprava, extrakce a čištění vzorků vždy ovlivní selektivitu, citlivost a opakovatelnost analýz. Rychlý rozmach NT metod a absence standardních validačních postupů pro široký rozsah detekovaných látek komplikují posuzování kvality publikovaných výsledků (Hajeb a kol., 2022). U NT analýzy jsou zásadní slepé vzorky (rozpouštědlové, procesní a polní), které odfiltrují signály přítomné v pozadí daném vzorkováním, extrakcí a vlastní analýzou. Kontrola matricových efektů a úspěšnost extrakcí se zajišťují především přidáním vnitřních standardů (izotopicky značené referenční standardy) a vypočtením jejich výtěžnosti pomocí cílených kvantifikačních metod (Schulze a kol., 2020).

2.1.2. Instrumentální analýza a sběr dat

Necílený screening začíná detekcí ionizovaných molekul přítomných ve vzorku po jejich předchozí separaci na chromatografické koloně. Chromatografická separace je vybírána vzhledem k použité vzorkovací a extrakční metodě. V této metodice se zabýváme polárními polutanty, a tak je metodou první volby kapalinová chromatografie na reverzní fázi, tedy silikagelu modifikovaném většinou C18 řetězcem. Doplňkově je možné aplikovat komplementární metody jako HILIC chromatografie (z angl. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) pro zachycení velmi polárních až iontových sloučenin analogicky metabolomickým metodám (Giebułtowicz a kol., 2024).

Nejčastější ionizační technikou spojenou s NT-HRMS je elektrosprej (ESI; z angl. *Electrospray Ionization*) jako měkká ionizační technika zaručující žádnou nebo minimální fragmentaci iontů v iontovém zdroji (Menger a kol., 2020). Výsledné chromatogramy v módu plného skenu obsahují informace o všech detekovaných iontech, jako jsou retenční čas (RT, z angl. *Retention Time*) a poměr hmotnosti k náboji – m/z v definovaném rozmezí hmot a mohou být rozšířeny přidáním dalšího stupně MS (MS^2 - M^n), tedy fragmentací prekurzorových iontů a záznamem produktových iontů. MS^2 spektra jsou klíčová pro zvýšení jistoty identifikace sloučenin. Pro získání dat s odpovídající mírou strukturních informací tedy potřebujeme hybridní hmotnostní spektrometry. V tom případě je před vysoko rozlišujícím MS, kterým je většinou TOF (*Time of Flight mass analyzer*) nebo orbitální past (OIT - *Orbital Ion Trap mass analyzer*), předřazen kvadrupólový hmotnostní spektrometr s nízkým rozlišením.

Způsobem výběru prekurzorových iontů pro fragmentaci rozlišujeme dva typy experimentů, které jsou přehledně zobrazeny v Obrázku 2. Datově závislá akvizice (DDA; z angl. *Data-Dependent Acquisition*) selektuje automaticky signály z MS^1 plného skenu iontů na základě jejich intenzity a přítomnosti v seznamu suspektních iontů. K měření MS^2 produktových spekter dochází pouze při překročení nastaveného spodního limitu intenzity signálu s využitím úzkých izolačních oken (1-3 m/z). Výhodou DDA je vysoká kvalita a čistota fragmentačních spekter. Datově nezávislá akvizice (DIA; z angl. *Data-Independent Acquisition*), kde jsou pro MS^2 vybrány všechny signály ze stanoveného rozsahu m/z (několik izolačních oken většinou o rozsahu 100–150 m/z a nedochází tak k limitaci intenzitou signálu. Zároveň větší počet produktových fragmentů ztěžuje interpretaci MS/MS spekter. DDA je obecně více zastoupena napříč publikovanými experimenty zaměřenými na HRMS full scan, ačkoli DIA poskytuje větší přehled o neznámých analytech. Datové akvizice v MS^1 plném skenu v kombinaci s DIA lze spolehlivě použít k uskladnění dat pro pozdější retrospektivní vyhledávání a identifikaci. Na rozdíl od uchovávání fyzických vzorků nedochází k degradacím nebo jiným znehodnocováním (Schulze a kol., 2020).



Obrázek 2. Schématické znázornění rozdílů mezi akvizicemi dat typu DDA a DIA v tandemové hmotnostní spektrometrii.

Obě výše popsané metody mají své slabiny, které se dodavatelé přístrojů snaží kompenzovat zavedením pokročilých metod, jako jsou např. SWATH anebo AcquireX, které kombinují prvky jak DIA, tak i DDA. Například AcquireX firmy Thermo Fisher Scientific vychází z DIA za použití tzv. top N metody, kdy je pro MS^2 experiment vybráno N nejintenzivnějších m/z z každého MS^1 skenu. V AcquireX jsou pak tyto m/z přidány do tzv. exclusion listu – seznamu m/z , které nejsou vybrány pro MS^2 experimenty v opakovaném nástřiku vzorku. Tento postup je opakován podle nastavení až 10krát a získat tak kvalitní MS^2 spektra i pro prekurzorové ionty o nízké intenzitě.

2.1.3. Zpracování dat

Výsledné datové soubory obsahují obsáhlé chromatogramy s vysokým počtem detekovaných signálů z celého vzorku. Typický soubor naměřený v plném skenu (rozlišení 70 000 FWHM; z angl. *Full Width at Half Maximum*) kombinovaný s DIA (rozlišení 15 000 FWHM) má velikost mezi 150 a 300 MB. S ohledem na náročnost jejich zpracování je nutné využít programové zpracování výsledků. Průměrně se v jednom vzorku nachází 10^3 – 10^5 signálů (Verkh a kol., 2018). Podle typu softwaru se mohou soubory zpracovávat přímo nebo po konvertování na vhodný formát. Výběr softwaru pro zpracování dat závisí na tom, co bychom chtěli z dat získat, ale i na jejich cenové dostupnosti. Některé softwary jsou dostupné bez omezení nebo částečně zdarma (MS-DIAL, mzMine, GNPS, enviMass atd.), ale často vyžadují pokročilou znalost programování. Zároveň firmy dodávající hmotnostní spektrometry zajišťují software kompatibilní většinou jen s daty daného dodavatele (Compound Discoverer – Thermo Fisher; Mass Lynx – Waters; ChemVista – Agilent atd.). Cena za licenci takového programu pak může dosahovat stovek tisíc korun.

V odborné literatuře byly publikovány různé přístupy k analýze komplexních necílených dat, které často kombinují více softwarů. Nicméně základní kroky vedoucí k identifikaci neznámých sloučenin ve vzorku by měly být dodrženy při každém experimentu.

Zpracování začíná automatickým detekováním píků v chromatogramu, odstraněním šumu a signálů z pozadí na základě slepých vzorků, odfiltrováním falešně pozitivních signálů nebo signálů nedostatečně intenzivních a přiřazením retenčních časů a m/z ke každému z nich. Nastavení minimální intenzity signálu může výrazně ovlivnit výběr píků pro

další vyhodnocování. Signály detekované s příliš nízkým prahem intenzity vnášejí falešně pozitivní chyby, které pocházejí z pozadí. Příliš vysoký práh intenzity zase může způsobit chybu tzv. falešně negativní detekce, kdy z výsledků mizí potenciálně zájmové sloučeniny. Správně vybrané slepé vzorky slouží k odstranění interferencí z laboratorních podmínek a matrice. Signály ze slepých vzorků nacházející se ve vzorcích pod nastaveným limitem (běžný poměr vzorek/slepý vzorek je >5-10) jsou odstraněny (Zedda a Zwiener, 2012). Dále jsou signály sloučeny napříč vzorky a seřazeny už jako sloučeniny. Každá sloučenina má udanou exaktní molekulovou hmotnost (nebo m/z), izotopový vzor a z nich navržené prvkové složení. Následně může být navržena molekulární struktura(y), jejíž správnost můžeme odhadnout podle rozdílu skutečné (monoizotopické) a navržené m/z (Hug a kol., 2014), přítomnosti heteroatomu/ů jako jsou halogeny nebo síra.

Fáze detekce a integrace píku je zcela zásadní, protože ovlivňuje všechny následné kroky vyhodnocení výsledků necílené analýzy. Schulze a kol. (2023) použili pět různých softwarů a algoritmů pro analýzu stejného souboru dat a došli k velmi překvapivému výsledku, že překryv zachycených signálů (m/z s RT) byl pouze 7,2 % pro více než tři algoritmy. Podobné porovnání pěti softwarů provedené Hohrenkem a kol. (2020) našlo pouze 10% shodu, s tím, že odfiltrování pozadí ze slepých pokusů a shoda mezi opakováním nástřiků výrazně ovlivňovaly tuto úspěšnost. Z těchto publikovaných výsledků vyplývá nutnost vlastní validace parametrů nastavení daného softwaru. Dalším závěrem výše zmíněných autorů bylo to, že zvolená metoda analýzy dat je vždy kompromisem mezi počtem detekovaných signálů a jejich kvalitou. Autoři metodiky mohou jen přidat poznámku, že pro identifikaci je zatím vždy nutná manuální kontrola a ověření a méně signálů často znamená více spolehlivě identifikovaných sloučenin.

Poté co analýzou datových souborů získáme seznam potencionálně přítomných sloučenin, můžeme pokračovat ve zvyšování jistoty jejich identifikace nebo dále postupovat necíleným přístupem a porovnávat vzorky mezi sebou bez nutnosti identifikace sloučenin. U této techniky pracujeme s celým souborem signálů jako jedním komplexním znakem popisujícím celkový stav vzorku. Jako hodnoty k porovnání můžeme použít počty sloučenin, nebo i jejich intenzitu. Pomocí popisné statistiky pro zhodnocení vícerozměrných dat (analýza hlavních komponent – PCA, z angl. *Principal Component Analysis*), úrovně změny vzhledem k referenčnímu vzorku nebo místu, regresní statistikou a je možné sledovat rozdíly/vztahy mezi vzorky například při úpravě pitné nebo čištění odpadní vody (Hollender a kol., 2017; Müller a kol., 2011; Nováková a kol., 2023).

Základním cílem necílené analýzy je identifikace neznámých látek, v našem případě sloučenin, které se nacházejí jak v zvláhové, tak i podzemní vodě. Tyto sloučeniny pak mohou být dále hodnoceny z pohledu jejich mobility a ohrožení podzemních vod. Výsledkem projektu NAZV QK23020018 byla identifikace např. 6:2 fluorotelomerního oktán sulfonátu nebo difenylguanidinu a jejich hodnocení z pohledu ohrožení podzemních vod (Kodeš a kol., 2025a).

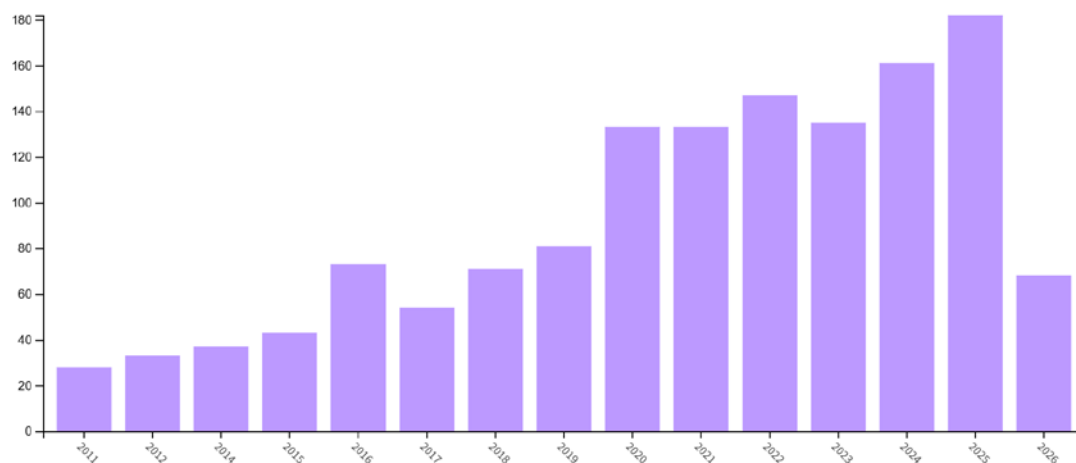
Jedna z možností postupu vyhodnocení dat je porovnávání naměřených (hodnot m/z s teoretickými m/z vypočtenými na základě prvkového složení známých nebo predikovaných sloučenin. Vyhledávání vhodných kandidátů vyžaduje databáze sloučenin (např. Chempider [ChemSpider: Search and Share Chemistry - Homepage](#), Pubmed [PubMed](#), NORMAN [NORMAN Database System](#)) nebo záznamy hmotnostních spekter (MS, MS², MSⁿ) shromážděné do knihoven hmotnostních spekter (MassBank [MassBank](#), METLIN [metlin-nl.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage](#), mzCloud) [mzCloud - Advanced Mass Spectral Database](#) k porovnávání. Každé spektrum je specifické pro použitý

spektrometr, ionizační techniku a podmínky fragmentace, jaké jsou dány například parametry kolizní energie (Kind a Fiehn, 2010). K potvrzení identity látek se nejčastěji používá dostupných referenčních standardů nebo porovnání s fragmentovými MS² spektry. Nedostatek ověřených MS² spekter vede k používání *in silico* nástrojů pro odhad fragmentací (Chao a kol., 2020). Vývoj softwarů pro predikci rozpadu prekurzorových iontů (rodičovských struktur) je na vzestupu s cílem umožnit identifikaci neznámých látek až na úroveň 2D struktury (Hupatz a kol., 2025).

Nejmodernější přístupy k vyhodnocování NT dat zahrnují použití umělé inteligence a umělé neuronové sítě a jsou často spojeny i s odhadem toxicity identifikované sloučeniny (Peets a kol., 2024; Meekel a kol., 2025). Algoritmy vyhledávající signály v datech je rovnou charakterizují podle kvality a odstraňují ty, co nesplňují definované požadavky. Vyřazují tak falešně pozitivní signály a zlepšují reprodukovatelnost identifikace (Lennon a kol., 2024).

Slabinou necílené analýzy je kvantifikace, protože dochází k záznamu intenzity signálu, který bez odpovídajících referenčních standardů nemůže být převeden na koncentraci dané látky. Ionizace při ESI je vysoce variabilní a mezi plochou píku a množstvím látky ve vzorku nemusí mít souvztažnost. Při zaměření identifikace pouze na vysoce intenzivní sloučeniny mohou být eliminovány látky sice s menšími plochami píků, ale biologicky aktivní a účinné. Pomocí může prioritizace píků podle izotopových vzorců – např. pro sloučeniny obsahující ve svém vzorci chlor nebo brom. Tyto sloučeniny jsou často spojovány se znečištěním lidskou produkcí a mohou být potenciálně toxické (Nováková a kol., 2023).

S vývojem a dostupností HRMS instrumentace vzrostl exponenciálně rozvoj NT analýz a identifikace neznámých sloučenin ve vzorcích životního prostředí. Například publikační databáze *Web of Science* (WOS) v roce 2011 uvádí jen 28 vědeckých článků zmiňujících využití takového typu analýzy. Za rok 2025 jich bylo již 182, přičemž největší zlom nastal mezi lety 2019 a 2020 (z 81 na 133 záznamů) jak je patrné z grafu v Obrázku 3.



Obrázek 3. Počty článků publikovaných v jednotlivých letech v databázi *Web of Science* (WOS) s klíčovými slovy „non-target screening“ a „liquid chromatography“. Údaje za rok 2026 zahrnují pouze první tři měsíce roku.

S rozvojem necílené analýzy vyvstává otázka posouzení kvality publikovaných výsledků a jejich správnosti. Hlavní problémy při hodnocení spolehlivosti výsledků NT jsou: častá absence standardizovaných postupů kontroly kvality, velké rozdíly mezi použitými

softwaru, přístupy a algoritmy, nedostatek vnitřních standardů a nedostatečný rozsah dostupných knihoven spekter. I odlišné závěry výstupů identifikace se obtížně komunikují ve stručné a přehledné formě. V současné době je jistota nebo úroveň identifikace standardizována pro metabolomické studie, ale také pro environmentální analýzy, kde je používána pětiúrovňová stupnice navržená Emmou Schymanski a pak odvozená a více podrobná škála speciálně pro PFAS (z angl. *Per- and Polyfluoroalkyl Substances*) (Charbonnet a kol., 2022; Escher a kol., 2020; Schymanski a kol., 2014). V zmiňované publikaci Schymanski a kol. (2014) bylo definováno pět stupňů spolehlivosti identifikace, které se od té doby obecně používají pro popis identifikovaných sloučenin. Úrovně jsou odstupňovány na základě získaných informací, viz. Tabulka 2. Od nejnižšího 5. stupně, kde je známá pouze exaktní hodnota m/z a retenční čas, až po 1. stupeň označující sloučeniny potvrzené oproti referenčnímu standardu. Dodržování uzančných úrovní jistoty identifikace při sdílení výsledků posiluje jejich spolehlivost a validitu.

Tabulka 2. Úrovně jistoty identifikace neznámé sloučeniny podle Schymanski a kol. (2014).

Úroveň jistoty identifikace		Popis
1	Potvrzená struktura	Struktura potvrzena porovnáním s referenčním standardem na základě shody retenčního času, MS a MS/MS spektra (případně potvrzení pomocí dalších analytických metod, např. NMR; z angl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>).
2a	Pravděpodobná struktura (knihovna/literatura)	Pravděpodobná struktura určená porovnáním experimentálního MS a MS/MS spektra s databází nebo knihovnou spekter.
2b	Pravděpodobná struktura (fragmenty)	Pravděpodobná struktura navržená na základě experimentálních dat – diagnostických fragmentů a interpretace MS a MS/MS spektra, bez přímého porovnání s knihovnou nebo standardem.
3	Předběžný návrh struktury	Navrženo několik možných struktur (např. izomery), které nelze jednoznačně rozlišit na základě dostupných dat.
4	Sumární vzorec	Jednoznačně určené prvkové složení molekuly na základě správné m/z a izotopového vzoru.
5	Exaktní m/z	Detekovaný signál charakterizovaný na základě přesné a správné hodnoty m/z bez dalších strukturálních informací.

Necílená analýza poskytuje unikátní náhled do chemického profilu vzorku, který je nutný k pochopení celkového zastoupení mikropolutantů a identifikaci neznámých látek

(Menger a kol., 2020). Vzhledem k množství detekovaných sloučenin je nutné přistoupit k prioritizaci, ať už při výběru vzorkované matrice a vzorkovacích míst nebo při procesování dat. Nejnovější přístupy úpravy vzorku pak spojují bioanalytické postupy (efektivně směřovaná analýza – EDA; z angl. *Effect-Directed Analysis*), jako je např. afinitní čištění vzorku s NT analýzou, kdy dochází k snížení komplexity vzorku a specifické detekci látek s daným biologickým efektem (Peng et al., 2016; Mikušová et al., 2024).

Komunikace výsledků z necílené nebo suspektní analýzy musí vždy zahrnovat popis použitých technik, metody odběru vzorku, jeho přípravu, detaily analytických metod a v neposlední řadě také detaily práce s daty (nastavení parametrů detekce píku atd.). Výhodou dat analyzovaných DIA je možnost zpětného vyhodnocení a také opakované analýzy pokročilejšími metodami a za použití současných knihoven spekter. Vzhledem k požadavkům na otevřenou vědu a také často zadavatelům studií se ukládání a sdílení dat, včetně metadat o experimentech, stává standardem. Většinou jde o veřejně přístupné databáze typu ZENODO (<https://zenodo.org/>), kde lze vytvořit DOI pro tato data a spravovat přístup k nim např. heslem. Přehled o tzv. FAIR (*Findable, Accessible, Interoperable and Reusable*) principech správy dat lze dohledat třeba na Národní platformě Open Science [FAIR principy - Národní platforma Open Science](#).

2.2. Popis vzorkovaných míst, použité metody vzorkování a instrumentální analýzy.

Projekt NAZV č. QK23020018, v jehož průběhu byla získána data pro tuto metodiku, byl zaměřen na prohloubení dosavadních znalostí o systému voda/půda/podzemní voda v zavlažovaných oblastech s použitím pasivního vzorkování. Cílem byla identifikace nových zájmových sloučenin vhodných pro zařazení do následného monitoringu znečištění povrchových a podzemních vod. Pro necílený screening je požadován komplexní přístup ke vzorkování, aby nedocházelo ke zbytečné diskriminaci detekovatelných látek specifických pro různé matrice. Soubor kroků vedoucích k identifikaci nových mikropolutantů potenciálně nebezpečných pro životní prostředí by měl vyústit v následný relevantní monitoring těchto látek na rozšířeném počtu lokalit.

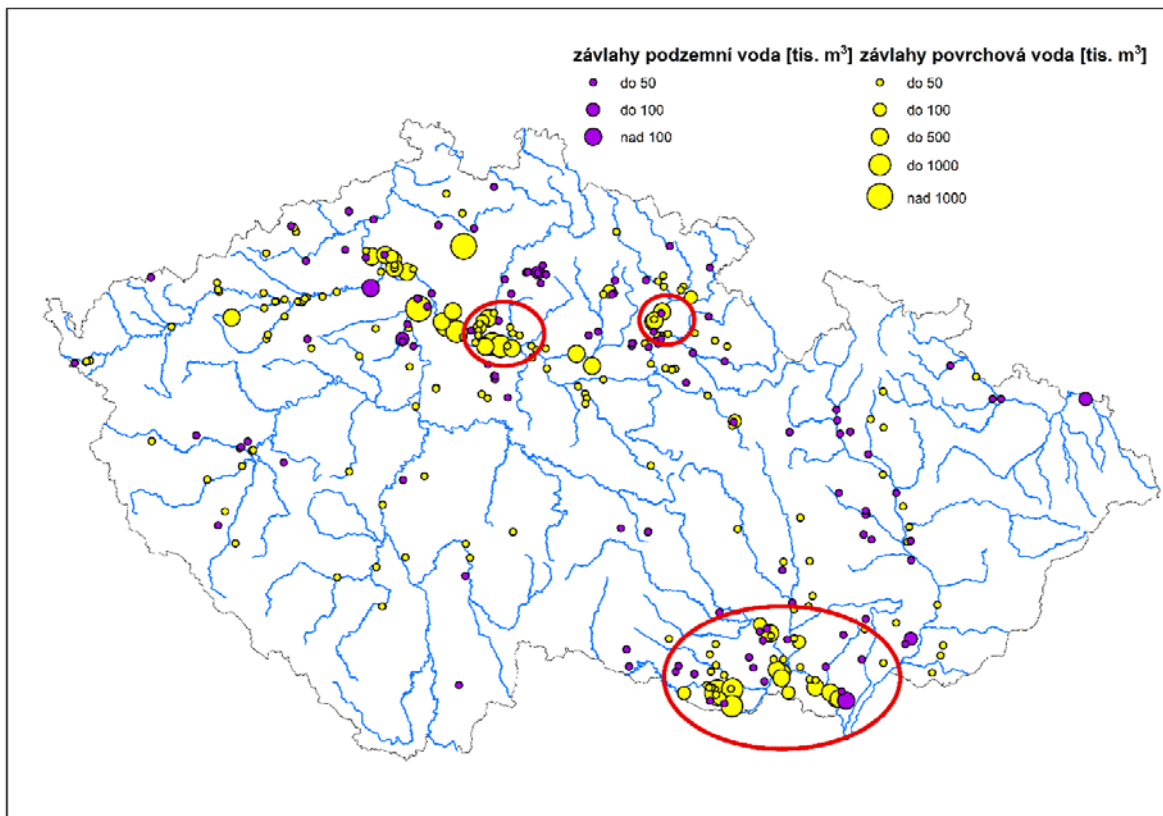
2.2.1. Výběr vzorkovaných lokalit a jejich popis

Celý projekt byl zaměřen na identifikaci sloučenin, které jsou relevantní z pohledu případné kontaminace povrchových a podzemních vod používaných jako zdroje pitné a závlahové vody. Lokality pro odběr vzorků byly vybrány na základě informací o využití vod pro závlahy v Integrovaném systému plnění ohlašovacích povinností tzv. ISPOP (zákon č. 25/2008 Sb., 2008) a výstupů Studie ověření stavu závlahových systémů a jejich inventarizace (Novák a kol., 2016), kdy byly vytipovány oblasti se závlahovými systémy ve středním Podolí, a horním i středním úseku Labe včetně Jizery. Zkombinováním datových a mapových údajů byly vybrány tři širší lokality, kde proběhla rekognoskace v terénu (Obrázek 4).

Ve druhém kroku proběhla analýza existence objektů (vrtů) monitorovací sítě podzemních vod Českého hydrometeorologického ústavu (ČHMÚ) v těchto oblastech. U vrtů, které leží v zavlažovaných oblastech, byl posouzen sledovaný kolektor podzemních vod a následně byly vybrány vrty sledující mělké kolektory. Tyto kolektory leží bezprostředně v podloží zavlažovaných půd a voda perkolující nesaturovanou zónou dotuje podzemní vodu v

kolektoru. Ostatní objekty sledující hlubší kolektory včetně kolektorů v jejichž nadloží z výběru objektů pro monitoring vyřazeny. Na vytipovaných lokalitách byla následně provedena terénní rekognoskace, kdy byla přímo na místě posouzena shoda mezi údaji získanými z informačních systémů a skutečným stavem v terénu. Na základě terénní rekognoskace byl proveden finální výběr vrtů pro monitoring, kdy byly vyřazeny objekty, v jejichž okolí nebyly nalezeny žádné závlahové systémy. Pro monitoring povrchových vod byly vybrány lokality reprezentující vodní tok využívaný pro odběry závlahových vod, popřípadě infrastrukturu určenou pro závlahu v jednotlivých oblastech. Pro monitoring povrchových vod jako zdrojů pro závlahy bylo vybráno osm profilů (Lysá nad Labem/Labe; Obříství/Labe; Předměřice/Jizera; Hradec Králové/Labe; Dyjákovice/Dyje; Dyje/Dyje; Krhovice/zavlažovací kanál Krhovice-Hevlín a Slup/Dyjsko-mlýnský náhon). Pro monitoring podzemních vod bylo vybráno 12 vrtů ČHMÚ, z toho šest ve středním Polabí/Pojizeří, jeden v horním Polabí a pět v Podyjí. Po deinstalaci byly vzorkovače okamžitě zamrazeny na -18 °C a při této teplotě uchovány až do vlastní extrakce a analýzy v laboratoři. V zamraženém stavu byly uchovávány až do provedení analýz i odebrané bodové vzorky podzemních vod. V nejbližším okolí vrtů byl na jaře a v období aktivního zavlažování proveden odběr vzorků půdy s cílem zachytit vliv závlah na chování sledovaných látek v půdním prostředí.

Na základě cílených analýz z dlouhodobého monitoringu ČHMÚ jsme předpokládali možný příspěvek znečištění podzemních vod vodami závlahovými. Tato hypotéza byla testována diferenčními analýzami závlahových vod s příslušnými podzemními vodami v dané oblasti.



Obrázek 4. Mapa vzorkovaných lokalit na podkladu mapy zavlažovaných oblastí (Novák a kol., 2016)

2.2.2. Použité metody vzorkování

Metody vzorkování odpovídaly požadovanému záměru identifikace širokého spektra sloučenin. Souběžné využití několika vzorkovaných matic zaručuje komplexní poznání o přítomnosti a chování mikropolutantů a zvyšuje pravděpodobnost jejich záchytu. Pro necílenou analýzu jsou vhodné pasivní vzorkovače POCIS (Fialová a kol., 2024), které mají oproti bodovým vzorkům vody několik zásadních předností: integrální sběr dat v čase a zkoncentrování sloučenin na stopové úrovni kontaminace, což vede k větší vypovídací schopnosti o stavu znečištění. Pasivní vzorkovače byly umístěny ve vybraných podzemních (vrtech) a povrchových vodách na cca tři týdny. Vzorky podzemních vod byly odebrány v dynamickém stavu tzn. před odběrem vzorku byly z vrtu odčerpány minimálně 3 objemy vody při současném sledování fyzikálně-chemických parametrů čerpané vody a odběr vzorku byl prováděn po ustálení těchto parametrů. V těchto objektech byly po odběru vzorků podzemních vod instalovány a exponovány do perforované části výstroje vrtu i pasivní vzorkovače POCIS v konfiguraci pro monitoring ve vrtech (typ POCIS HLB, výrobce Affinisep, Francie) po dobu 21–42 dní. I přes zmiňované výhody pasivních vzorkovačů může být pro některé typy sloučenin problémem proudění vody v okolí vzorkovače, membrána vzorkovače či nízká afinita k sorbentu, a proto bylo provedeno také kvalitativní srovnání počtu sloučenin identifikovaných z extraktů POCIS se vzorky vody (podzemní i povrchové) analyzovanými přímým nástřikem – tedy bez diskriminace vzorkováním či extrakcí.

Zpracování vzorků probíhalo s ohledem na zachování širokého spektra mikropolutantů. Sorbenty z POCIS vzorkovačů byly extrahovány směsí rozpouštědel (metanol, dichlormetan, toluen) jak je podrobně uvedeno v předchozích pracích (Grabic, 2018; Vrana a kol., 2021) a

zkonzentrovány na objem 2 ml. Vzorky vody byly upraveny pouze filtrací (velikost filtru 0,2 μm , regenerovaná celulóza).

2.2.3. Použité metody instrumentální analýzy

Extrakty pasivních vzorkovačů byly analyzovány pomocí LC-HRMS na hybridním hmotnostním spektrometru s kvadrupólem a orbitální pastí Q-Exactive HF (Thermo Scientific, USA). Pro chromatografickou separaci analytů byla vybrána kolona Hypersil Gold aQ (Thermo Scientific) o rozměrech 50 mm x 2,1 mm vnitřního průměru a 5 μm velikosti částic s předkolonou stejné fáze o rozměrech 20 mm x 2,1 mm a 5 μm částicemi. Kolona byla vybrána pro kompatibilitu s 100% vodní fází a dostatečnou retenci vysoce polárních analytů. Pro chromatografickou separaci sloučenin a následnou hmotnostně-spektrometrickou detekci jsme použili gradient methanolu ve vodě, kdy byly obě fáze pufrované 10 mmol octanem amonným. Pro separaci byl použit kapalinový chromatograf Vanquish™ (Thermo Scientific) s vysokotlakou tvorbou gradientu, jehož parametry jsou popsány v Tabulce 3.

Tabulka 3. Program gradientové eluce použitý pro chromatografickou separaci.

Čas [min]	10 mmol roztok octanu amonného ve vodě [%]	10 mmol roztok octanu amonného v metanolu [%]	Průtok [$\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$]
0	100	0	350
1	100	0	350
4	75	25	400
7,5	40	60	400
10	0	100	400
12	0	100	400
12,05	100	0	400
15	100	0	350

Pro analýzu extraktů pasivních vzorkovačů a půd byl použit nástřik 10 μl extraktu, který byl předtím naředěn 1:1 ultra čistou vodou, a pro vodné vzorky byl použit přímý nástřik 100 μl vzorku pomocí CTC PAL RST automatického dávkovače (PAL Systems, Zwingen, Švýcarsko).

Jako ionizační zdroj byl použit vyhřívaný elektrosprej (HESI, z angl. Heated Electrospray Ionisation). Ionizace elektrosprejem je obecně považována za nejrozšířenější měkkou techniku získávání iontů bez nežádoucí fragmentace (Leendert a kol., 2015). Analýza probíhala odděleně, ve dvou separátních nástřicích vzorku, v pozitivním a negativním módu ionizace. Takto nedochází ke snižování počtu bodů na chromatografický pík přepínáním ionizačního napětí (pozitivní ESI+/negativní ESI-). Konkrétní hodnoty pro HESI jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4. Parametry nastavení elektrospreje použité v experimentu.

Podmínky MS analyzátoru	Q Exactive-HF
Iontový zdroj	H-ESI
Ionizační napětí v ESI+ (V)	3500
Ionizační napětí v ESI- (V)	2800
Zmlžující (sheath) plyn (N ₂ 5.0), relativní jednotky	40
Přídavný (auxiliary) plyn (N ₂ 5.0), relativní jednotky	10
Teplota odpařování (°C)	275
Teplota přechodové kapiláry (°C)	325

Data pro necílený screening byla získána kombinací MS¹ plného skenu v rozsahu 100–800 m/z při rozlišení 60000 FWHM na 200 m/z s MS² datově nezávislou analýzou (DIA) při použití širokých izolačních oken (např. 100 m/z). Vzhledem k tomu, že není možné určit optimální kolizní energii získání použitelných MS² dat, použili jsme tzv. krokovou kolizní energii, kdy jsou frakce izolovaných iontů fragmentovány při třech různých energiích (15, 35 a 70), ale analyzovány v orbitální pasti najednou. Takové MS² spektrum bude s vysokou pravděpodobností obsahovat produktové ionty. Nevýhodou je absence MS² spekter získaných stejným postupem v knihovnách spekter, jako jsou mzCloud a MassBank, které obsahují převážně MS² spektra získaná při jedné kolizní energii. Tato skutečnost bude více diskutována dále u vyhodnocení dat (kapitola 2.4.2.). Parametry hmotnostně spektrometrické detekce jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5. Parametry nastavení MS analýzy, názvy některých parametrů byly pro přehlednost ponechány v anglickém jazyce.

	MS ¹	DIA MS ²	DIA MS ²
Rozlišení orbitální pasti (FWHM)	70 000	15 000	15 000
AGC target	3 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶
Maximum IT (ms)	70 ms	50 ms	50 ms
Rozsah skenu (m/z)	100-800	automaticky	automaticky
Typ MS spektra	profilové	profilové	profilové
m/z pro izolaci v MS ²		150, 250, 350, 450	650
Izolační okno (m/z)		110	300
Normalizovaná kolizní energie (NCE)		15, 35, 70	15, 35, 70

Další drobnou nevýhodou DIA se širokým izolačním oknem je absence přímého spojení prekursoru a fragmentu (produktového iontu), jako například u datově závislé analýzy, ale výhodou je sběr všech MS² dat. Takto získaná data se označují za digitálně zmrazené vzorky a pokud obsahují i izotopicky značené vnitřní standardy a např. sadu kalibračních standardů, je možné využívat je i retrospektivně pro kvantifikaci sloučenin.

2.3. Popis parametrů zpracování dat pomocí softwaru Compound Discoverer 3.3.

Compound Discoverer (CD; Thermo Scientific) je program vyvinutý přímo pro data získaná na spektrometrech předmětného výrobce, který ale umožňuje zpracovávat i data z jiných přístrojů po změně jejich formátu. Dále uvedené postupy analýzy necílených dat však mají obecnou platnost.

Datové soubory všech vzorků se nahrávají do softwaru přímo bez předchozího formátování. Důležité je definovat hypotézy, se kterými budeme pracovat, a označit typy vzorků, matrice či vzorkované lokality do názvu či popisu vzorků. Většina programů pro analýzu dat umožňuje nejenom základní operace detekce píku, izotopové obálky, aduktů, prvkového složení atd., ale také statistické logické operace se získanými daty.

Postup je možné libovolně přizpůsobit požadavkům na výsledky zpracování. Základní operační kroky zpracování dat se individuálně upravují nastavením parametrů (hodnoty postupu nastavené pro komentovaný experiment jsou uvedeny v Tabulce 6).

Tabulka 6. Parametry základního nastavení postupu vyhodnocení dat od výběru píku (peak picking) až po diferenční analýzu. U názvů jednotlivých kroků byly ponechány i originální anglické názvy, u parametrů jsou pro zachování přesnosti uvedeny pouze originální názvy.

Procesní krok	Parametr	Hodnota
Vstupní soubory		

Výběr spekter (Select Spectra)

Nejnižší RT	1
Nejvyšší RT	12
Total Intensity	0
Threshold	
Minimum Peak Count	1
Min. Precursor Mass	100 Da
Max. Precursor Mass	800 Da
Mass Analyzer	FTMS
MS Order	MS2; MS1
Activation Type	HCD
Acquisition Type	Not specified
Min. Collision Energy	0
Max. Collision Energy	1000
Scan Type	Any
Polarity Mode	+ nebo -
MS1 Mass Range	Not specified
FAIMS CV	Not specified
S/N Threshold (FT only)	1,5
Unrecognized Charge Replacements	1
Unrecognized Mass Analyzer	ITMS
Unrecognized MS Order	MS2
Unrecognized Activation Type	CID
Unrecognized Polarity	+
MS Resolution@200	60000
MSn Resolution@200	30000
Precursor Selection	Use MS(n-1) precursor
Use Isotope Pattern in Reevaluation	True
Provide Profile Spectra	Automatic
Spectra to Store	All
Store Chromatograms	False
Alignment Model	Adaptive curve
Alignment Fallback	Linear model
Maximum Shift	0,3 min
Shift Reference File	True
Mass Tolerance	5 ppm
Remove Outlier	False
Mass Tolerance	5 ppm
Min. Peak Intensity	250000
Min. # Scans per Peak	6

**Srovnání retenčních časů
(Align Retention Times)****Detekce sloučenin (Detect
Compounds)**

Seskupování sloučenin (Group Compounds)

Use Most Intense Isotope Only	True
Precursor Mass Tolerance	0 ppm
Max. Gaps to Correct	0
Min. Adjacent Non-Zeros	1
Trace Mass Update Strategy	Weighted mean
Chromatographic S/N Threshold	1,5
Remove Baseline	False
Gap Ratio Threshold	0,5
Max. Peak Width	0,6 min
Min. Relative Valley Depth	0,1
Group Isotopes for	Br; Cl
RT Tolerance	0
Use Peak Quality for Grouping	True
Filter Bad Peaks Only	False
Zig-Zag Index Threshold	0,4
Jaggedness Threshold	0,4
Modality Threshold	0,9
Remove False Positive Isotopes	True
Ions	[M+H] ⁺¹ (pozitivní mód) [M-H] ⁻¹ (negativní mód)
Base Ions	[M+H] ⁺¹ (pozitivní mód) [M-H] ⁻¹ (negativní mód)
Remove Singlets	True
Detect Persistent Background Ions	False
Mass Tolerance	5 ppm
RT Tolerance	0,4 min
Minimum Valley	10 %
Align Peaks	False
Preferred Ions	[M+H] ⁺¹ (pozitivní mód) [M-H] ⁻¹ (negativní mód)
Area Integration	Most Common Ion
Area Contribution	3
CV Contribution	0,5
FWHM to Base Contribution	2

***Označení sloučenin pozadí
(Mark Background)***

***Anotace sloučeniny (Assign
Compound Annotations)***

***Hodnocení izotopové obálky
(Pattern Scoring)***

***Vyhledávání v online knihovně
spekter mzCloud (Search
mzCloud)***

Jaggedness Contribution	4
Modality Contribution	3
Zig-Zag Index Contribution	3
Peak Rating Threshold	5
Number of Files	1
Max Sample/Blank	5
Max Blank/Sample	0
Hide Background	True
Mass Tolerance	5 ppm
Data Sources	Predicted Compositions; MassList; mzCloud; ChemSpider
Use mzLogic	True
Use Spectral Distance	True
SFit Threshold	50
SFit Range	50
Clear Names	False
Isotope Patterns	Cl, Cl2, Cl3, Cl4, Cl5, Cl6, Cl7, Cl8, Br, Br2, Br3, Br4, Br5, ClBr, ClBr2, Cl2Br
Mass Tolerance	5 ppm
Intensity Tolerance	30 %
SN Threshold	3
Min Spectral Fit	60 %
Preferred Ions	[M+H] ⁺¹ (pozitivní mód) [M-H] ⁻¹ (negativní mód)
Compound Classes	All
Precursor Mass Tolerance	5 ppm
FT Fragment Mass Tolerance	5 ppm
IT Fragment Mass Tolerance	0,4 Da
Library	Autoprocessed; Reference
Post Processing	Recalibrated
Max Results	10
Annotate Matching Fragments	True
Search MSn Tree	False
Identity Search	HighChem HighRes
Match Activation Type	False

**Návrh prvkového složení
(Predict Compositions)**

Activation Energy	Any
Activation Energy Tolerance	20
Apply Intensity Threshold	True
Similarity Search	Forward
Match Factor Threshold	40
Use DIA Scans	True
Max Isolation Width	500 Da
DIA Activation Energy Tolerance	100
DIA Match Factor Threshold	20
Mass Tolerance	5 ppm
Min Elements	C H
Max Elements	C90 H190 Br8 Cl8 F50 N10 O18 P3 S5
Min RDBE	0
Max RDBE	40
Min H/C	0
Max H/C	3,5
Max Candidates	20
Max Internal Candidates	200
Intensity Tolerance	40 %
Intensity Threshold	0,1 %
SN Threshold	3
Min Spectral Fit	40 %
Min Pattern Coverage	50 %
Dynamic Recalibration	True
Use Fragment Matching	False
Databases	DrugBank; EINECS; EPA DSSTox; EPA Toxcast; MassBank
Search Mode	Formula or Mass
Mass Tolerance	5 ppm
Max Results per Compound	100
Max Predicted Compositions Searched	5
Result Order	CSID ASC

**Vyhledávání v online
databázích sloučenin
ChemSpider (Search
ChemSpider)**

Apply Spectral Distance	Check All Predicted Compositions	False	
	Mass Tolerance	5 ppm	
	Intensity Tolerance	30 %	
	Intensity Threshold	0,1 %	
	SN Threshold	3	
Vyhledávání v knihovnách přesných hmot (Search Mass Lists)	Dynamic Recalibration	True	
	Mass Lists	Více databází (EFS HRAM, MassBankEU, PFAS, PubChemLite atd.)	
	Use Retention Time	False	
	RT Tolerance	2 min	
	Mass Tolerance	5 ppm	
1Sloučení signálů (Merge Features)	Mass Tolerance	5 ppm	
	RT Tolerance	0,4 min	
	Parameters	None	
Popisná statistika (Descriptive Statistics)	Log10 Transform	True	
	Group Area Calculation	Median	
Diferenční analýza (Differential Analysis)	Replicate Area Calculation	Median	
	Update Peak Rating	True	
	Area Contribution	10	
	CV Contribution	3	
	FWHM to Base Contribution	5	
	Jaggedness Contribution	5	
	Modality Contribution	5	
	Zig-Zag Index Contribution	5	

2.4. Komentovaný postup vyhodnocení dat

2.4.1. Práce se soubory před spuštěním vyhodnocení

Pro názornost vysvětlení postupu analýzy a použitých metod jsme použili data z pasivních vzorkovačů exponovaných v roce 2024. Přehled míst a matic je uveden v Tabulce 7. Každý datový soubor pro jednotlivý vzorek byl před analýzou přejmenován tak, aby bylo jasné definováno místo a čas odběru: Jizera_Predmerice_1, kde Jizera_Predmerice znamená místo odběru a 1 znamená první odběr – jaro. Dále byly pojmenovány slepé pokusy, extrakční Blank_1, polní slepé pokusy např. blank_NAZV_1 (extrakt z POCIS pro povrchové vody).

Zároveň jsme definovali kategorické proměnné (povodí, voda), kterými se blíže specifikují analyzované vzorky. Část tabulky, která takto vznikne, je pro ilustraci ukázána v Obrázku 5.

Tabulka 7. Přehled počtu pasivních vzorkovačů v jednotlivých povodích, sezónách a maticích.

Povodí	Jaro	Podzim	Léto
	povrchová voda	povrchová voda	podzemní voda
Labe	4	4	5
Jizera	1	1	1
Dyje	4	3	5

File	Sample Identifier	Sample Type	Povodí	Voda
F1	0.5_2.5	Sample	Std	std
F2	5_2.5	Sample	Std	std
F3	50_2.5	Sample	Std	std
F4	Blank_NAZV_1	Blank	n/a	SW
F5	Blank_NAZV_2	Blank	n/a	SW
F6	Blank_NAZV_GW	Blank	n/a	GW
F7	Dvorce	Sample	Labe_L	GW
F8	Dyjakovice	Sample	Dyje	GW
F9	Dyje_Dyjakovice_1	Sample	Dyje	SW
F10	Dyje_Dyjakovice_2	Sample	Dyje	SW

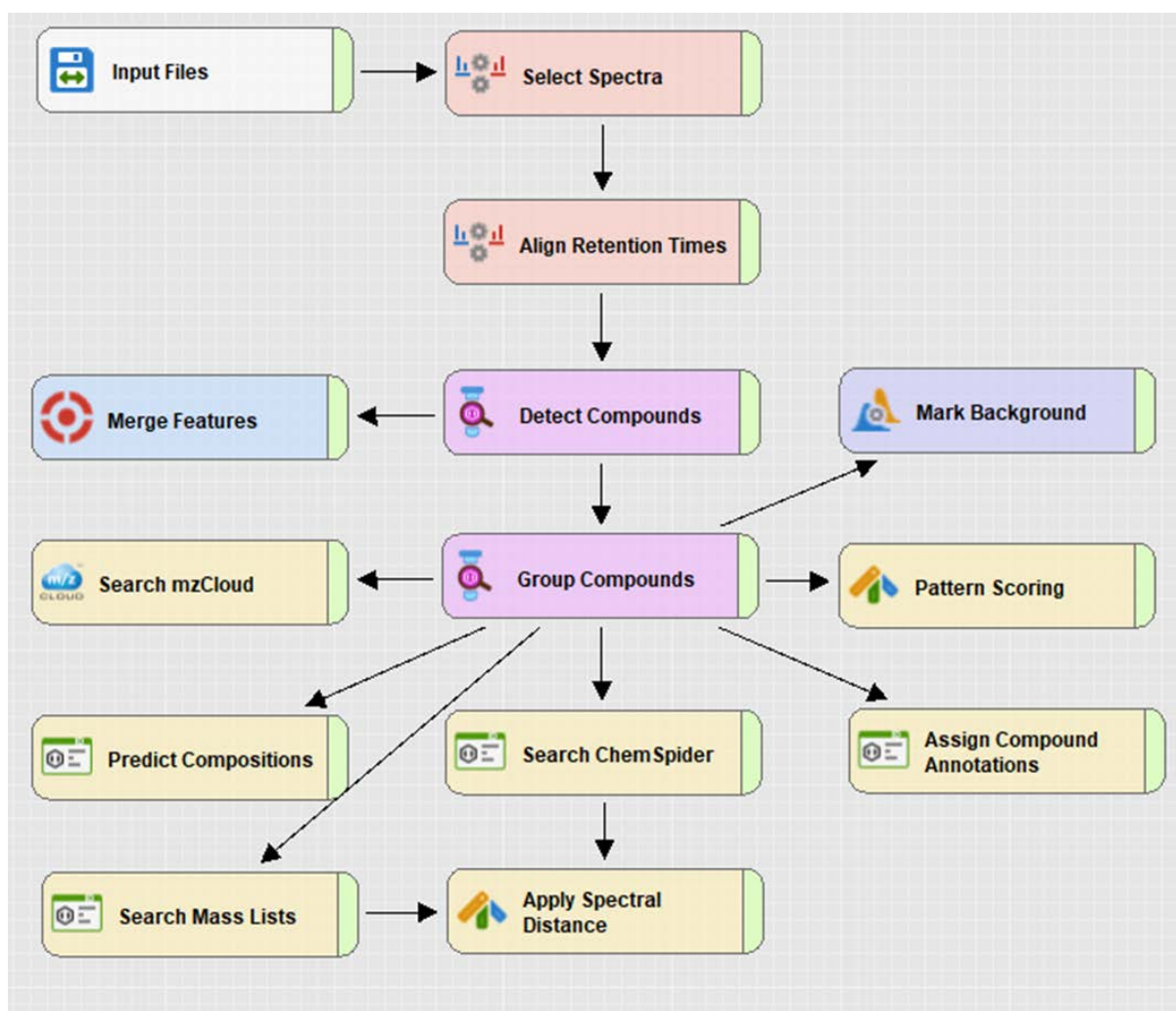
Obrázek 5. Ukázka tabulky ze softwaru Compound Discoverer 3.3. s popisem vzorků pro další zpracování. SW – surface water/povrchová voda; GW – groundwater/podzemní voda.

Na Obrázku 5. jsou vidět jednotlivé parametry a kategorické proměnné. Blank_NAZV_1 je slepý pokus, který je pro potřeby zpracování dat definován jako slepý pokus pro program – parametrem **Sample Type**, nemá definováno povodí, ale je označen v proměnné **Voda** (matrice) jako povrchová voda – SW. Standard, ve kterém bylo 50 ng.ml⁻¹ analytů + 2,5 ng.ml⁻¹ vnitřních standardů (50_2.5) je definován jako vzorek pro software, ale oběma proměnnými je definován jako standard. Pasivní vzorkovač Dvorce je vzorek z povodí dolního Labe a jde o vzorek podzemní vody. Takto nastavené parametry jsou používány algoritmem programu pro diferenční analýzu nebo mohou být použity pro filtrování zobrazení uživatelem – můžeme označit/zobrazit pouze podzemní vody nebo pouze vzorky z povodí Dyje.

Je důležité promyslet pojmenování, kategorické proměnné nebo i případně číselné proměnné (lze zadat např. průměrný průtok ve vzorkovaném období nebo počet obyvatel v povodí, plochu obdělávané půdy v povodí apod. a použít je pro přepočty – normalizaci signálů) před spuštěním vlastní analýzy. V CD je možné měnit názvy či kategorie v již procesovaných datech pouze předdefinováním parametrů a následným novým zpracováním dat, což je většinou časově náročné.

2.4.2. Základní zpracování a vyhodnocení MS¹ dat

Při zpracování program provádí výběr spekter podle zadaných parametrů (viz Tabulka 6. výše), pak zvoleným algoritmem automaticky zkoriguje retenční časy napříč vzorky, podle typických píků v pozadí, a detekuje píky sloučenin. Zde je důležité zdůraznit, že pokud použijeme korekci retenčních časů, tak korigovaný čas, který je přiřazen sloučenině v CD neodpovídá přesné hodnotě v původním souboru z měření. Detekce píků (Detect Compounds) je základním kamenem všech dalších kroků v identifikaci neznámých sloučenin a také může být základním kamenem úrazu. Jak jsme již zmínili v úvodu, počet detekovaných signálů závisí na parametrech, které do programu zadáme, ale také na algoritmu výrobce softwaru, což je pro běžného uživatele černá skříňka. **Jediným možným řešením je vlastní validace parametrů, ze které můžeme odvodit nastavení pro naše účely.** Ve výsledku jde o kompromis, kdy volíme mezi vysokým počtem signálů s velmi rozdílnou kvalitou a nízkým počtem kvalitních signálů, kdy je vysoké riziko, že pomineme důležité komponenty směsi, které mají nižší intenzitu nebo horší tvar chromatografického píku, ale může se jednat o sloučeniny biologicky či ekotoxikologicky relevantní. Postup algoritmu v jednotlivých krocích je znázorněn na Obrázku 6. Každý krok je přizpůsobitelný konkrétním požadavkům pomocí měnitelných hodnot u jednotlivých parametrů, jak bylo popsáno v Tabulce 6.

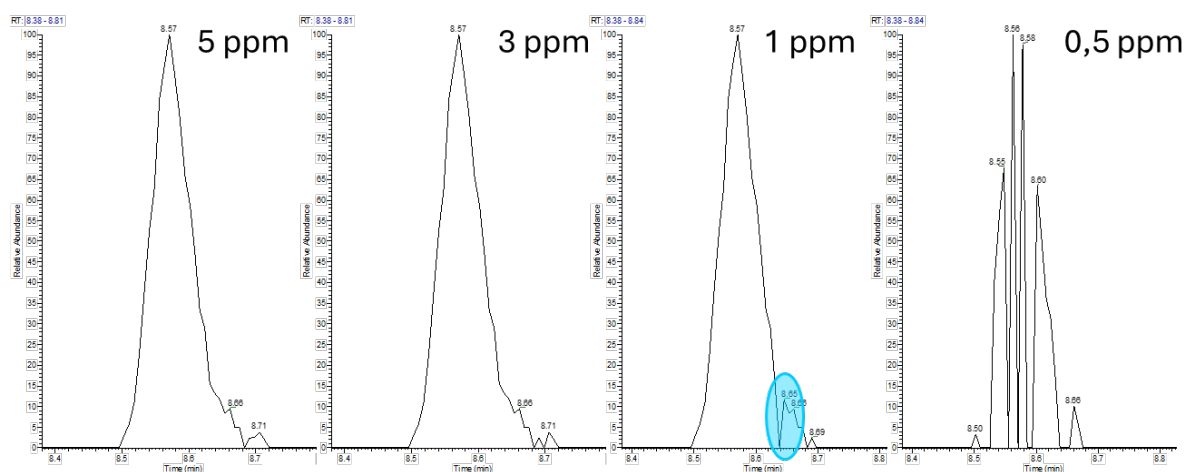


Obrázek 6. Schematické znázornění postupu zpracování dat v softwaru Compound Discoverer 3.3.

Po spuštění vyhodnocení proběhne výběr spekter a jejich korekce na posun retenčního času. Pak je spuštěna **detekce sloučenin (Detect Compounds)**, kdy je každé detekované MS¹ spektrum v jednotlivých vzorcích posuzováno podle nastavených parametrů: jsou vyloučeny singlety – tedy m/z bez příslušného (většinou C₁₃) izotopového vzoru, jsou detekovány izotopové obálky halogenovaných molekul a vyloučeny jiné než monoizotopické signály, dále jsou vyloučeny signály, které mají v MS¹ méně než 6 bodů na chromatografický pík a odfiltrovány jsou také příliš široké chromatografické píky (> 0,6 min).

V kroku **Merge Features**, jsou sloučeny signály se stejnou m/z a retenčním časem napříč soubory. Standardně používáme chybu určení m/z < 5 ppm a odchylku času 0,4 min.

V pracovním kroku **Group Compounds** jsou detekované signály v jednotlivých vzorcích, které vykazují shodu podle nastavených parametrů, sjednoceny jako jedna sloučenina. Hlavní roli zde opět hraje odchylka m/z (tolerance 5 ppm) a odchylka retenčního času (RT tolerance 0,4 min) mezi detekovanými signály. Okno tolerance chyby v správnosti určení m/z vychází z rozlišení hmotnostního spektrometru a také ze stability kalibrace daného přístroje. Závislost tzv. extrakčního okna pro správnou m/z na rozlišení byla publikována například v odborném článku Xia a kol. (2011). Pro názornost dokládáme simulované snižování extrakčního okna = tolerance pro pesticid azoxystrobin ve vzorku POCIS z toku Dyje (lokality Dyjákovice) v Obrázku 7.



Obrázek 7. Vliv nastavené tolerance odchylky správné m/z na vykreslení píku azoxystrobinu v chromatogramu. Modrá elipsa ukazuje na výpadek skenu při příliš nízké odchylce m/z.

Z obrázku je patrné, že tolerance 5 ppm je dostatečná i pro malou změnu hmotnostní kalibrace, která je pro orbitální pasti <1 ppm/24 hod. Při příliš nízké toleranci ke změně m/z může docházet k tomu, že některé skeny budou chybět a chromatografický pík pak nebude detekován (výpadek jednoho skenu při 1 ppm a mnoha při 0,5 ppm toleranci odchylky m/z). Tento problém může nastat častěji při porovnání vzorků měřených s výrazným časovým odstupem (např. porovnání monitorovaných dat mezi lety), proto je pro necílené analýzy doporučována **hmotnostní kalibrace vždy před zahájením analýz**. Pro jiné typy vysoko rozlišujících hmotnostních spektrometrů (např. TOF) jsou jak rozlišení, tak i stabilita závislé na výrobci a typu přístroje. Nastavení parametru tolerance je tedy do značné míry definováno zkušeností a empirií operátora. Tyto údaje se ale dají jednoduše získat z dat vnitřních standardů přítomných ve vzorcích. **Doložení stability kalibrace a rozlišení je v současné době**

vyžadovaným parametrem pro publikování dat z necíleného screeningu a jedná se o jeden ze základních prvků QA/QC (z angl. Quality Assurance and Quality Control).

Stabilita retenčních časů je podmíněna chromatografickou separací, maticí vzorků a také stárnutím kolony nebo její výměnou za novou. Je to obzvláště důležitý parametr, pokud porovnáváme navzájem data naměřená v jiném čase, což může být typická situace u monitoringu, nebo z jiných matic, kde povaha vzorku může zásadně ovlivňovat retenci některých nebo i všech analytů. Stejně jako u stability hodnot m/z lze stabilitu RT sledovat pomocí vnitřních standardů.

Dalším parametrem, kterým můžeme ovlivnit počet detekovaných sloučenin, je kvalita chromatografického píku vyjádřená jako vážený součet několika dílčích parametrů: plochy píku, rozptylu plochy píku replikátů (tento parametr je validní hlavně v metabolomických studiích), zašumění křivky píku, symetrie atd. Výsledkem je jedno číslo, které můžeme použít jako limitní parametr pro identifikaci chromatografického píku (**Peak Rating Threshold**). Zde opět velmi **důrazně doporučujeme vlastní validaci** vlivu nastavení jednotlivých parametrů pro detekci neznámých sloučenin. Nastavení, ve kterém jsme použili limitní hodnotu kvality píku 5 není diskriminační ani pro poněkud širší a méně symetrické píky. Tento parametr je možné použít pro další zúžení kandidátů použitím logických funkcí např. $\text{Peak Rating} > 8$ zúžíme výběr pouze na velmi dobře vykreslené Gausovské chromatografické píky.

Dalším procesním krokem je porovnání signálů ve vzorcích se slepými vzorky (**Mark Background**). V tomto kroku jsou označeny jako relevantní pouze ty signály, které mají poměr vzorek/slepý pokus > 5 . Za podmínek demonstrovaného nastavení to znamená, že signál bude brán do úvahy, pokud je v minimálně jednom ze vzorků pětkrát vyšší než ve slepém pokusu. Signály označené jako pozadí nejsou brány do úvahy při vyhodnocování, ale je možné je zobrazit a pracovat s nimi. V Tabulce 8. jsou pro názornost uvedeny počty signálů pozadí a pak počet sloučenin, které splňují kritérium vzorek/slepý pokus > 5 v obou ionizačních módech v analyzovaném souboru vzorků pasivních vzorkovačů z roku 2024.

Tabulka 8. Počty signálů (sloučenin), detekovaných základním nastavením, rozdělené pro pozitivní (ESI+) a negativní (ESI-) mód v demonstračním souboru dat pasivních vzorkovačů z roku 2024.

	Počet signálů celkem	Vzorek/pozadí > 5	Pozadí
ESI+	44 668	37 139	7 549
ESI-	11 021	9 225	1 796

Pro všechny signály, včetně pozadí, jsou z jejich přesných molekulových hmot vypočítána nejpravděpodobnější prvková složení (**Predict Composition**). Pro tento procesní krok definujeme, které a kolik prvků může být do složení zahrnuto, maximální odchylku změřené m/z od monoizotopového píku daného složení, poměr H/C, počet nenasycených vazeb (aromatický kruh, dvojná a trojná vazby), shodu MS^1 spektra s teoretickým spektrem podle prvkového složení. Také definujeme počet vnitřních kandidátů (200) a počet kandidátních složení s nejlepšími výsledky pro zobrazení a uložení (20). Nastavení je opět na operátorovi a může být více či méně diskriminační. Naše doporučení je nepoužívat křemík do prvkového složení (kvůli množství izotopů), pouze v případě, že je podezření na konkrétní sloučeniny s obsahem křemíku.

Výsledkem může být pouze několik složení, která vyhovují zadaným kritériím – např. pro antidepressivum mirtazapin v ESI+ jsou to pouze dvě možnosti a ta správná je řazena jako

první, tedy nejlépe odpovídající (Tabulka 9.). Pro dosažení úrovně 4 podle stupnice Schymanské je nutné mít jednoznačně určené prvkové složení. Pro mirtazapin máme lepší shodu spekter i výrazně menší odchylku monoizotopické hmotnosti od změřené m/z a splňuje tedy předpoklad pro zařazení na úroveň 4 jistoty identifikace.

Tabulka 9. Příklady určení prvkového složení pro dvě identifikované sloučeniny mirtazapin a PFHxS.

^a RDBE – stupeň nenasycenosti molekuly, z angl. *Rings and Double Bond Equivalents*

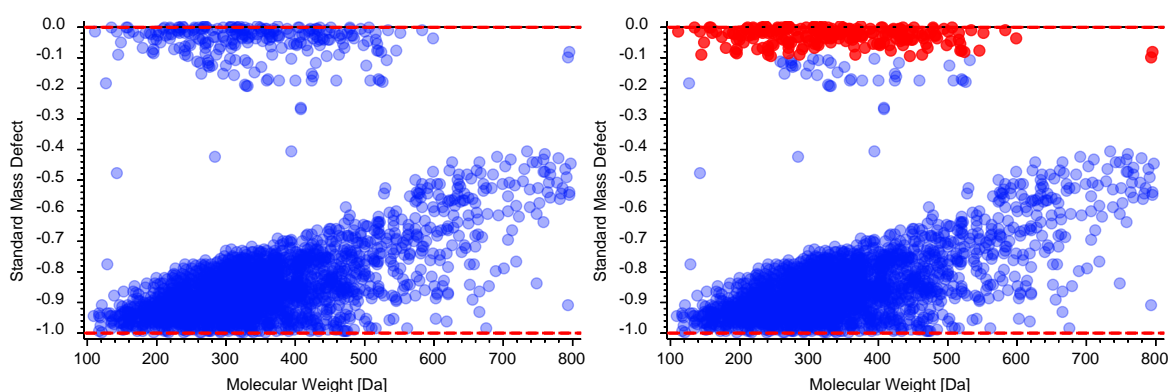
Vzorec	Monoizotopická hmotnost	Odchylka m/z [ppm]	RDBE ^a	H/C	Pořadí	Počet shodných izotopů	Shoda spekter [%]
<u>Mirtazapin (ESI+)</u>							
C17 H19 N3	265,1579	-0,14	10	1,1	1	4	81,2
C14 H20 F N3 O	265,1590	-4,45	6	1,4	2	3	80,1
<u>PFHxS (ESI-)</u>							
C5 H2 F9 N4 O3 P S	399,9442	-0,01	3	0,4	1	3	84,9
C6 H F13 O3 S	399,9439	0,67	0	0,2	2	3	81,3
C6 H13 I N2 O8 S	399,9437	1,05	1	2,2	3	3	78,7
C7 H16 F I N2 O2 P2 S	399,9436	1,26	1	2,3	4	3	78,2
C3 H8 F3 N2 O13 P S	399,9437	1,17	0	2,7	5	3	77,3
C7 H3 F2 N6 O8 P S	399,9439	0,68	9	0,4	6	3	75,4
C8 H6 F3 N6 O2 P3 S	399,9438	0,9	9	0,8	7	3	75,0
C8 H20 I O2 P3 S	399,9442	-0,01	0	2,5	8	3	74,4
C8 H7 F N4 O8 P2 S	399,9444	-0,59	8	0,9	9	3	72,5
C5 H6 F2 N4 O11 S2	399,9443	-0,27	4	1,2	10	3	71,1
C6 H9 F3 N4 O5 P2 S2	399,9442	-0,05	4	1,5	11	3	70,7
C9 H6 F5 O8 P S	399,9441	0,08	5	0,7	12	3	69,8
C10 H9 F6 O2 P3 S	399,9440	0,3	5	0,9	13	3	69,3
C5 H5 F4 N6 O5 P S2	399,9437	1,22	5	1	14	3	69,3
C7 H8 F7 O5 P S2	399,9439	0,62	1	1,1	15	3	69,2
C8 H10 F I N6 S2	399,9437	1,1	6	1,3	16	3	66,6
C9 H14 I N4 P S2	399,9442	-0,18	5	1,6	17	3	64,9
C12 H11 F2 I O3 S	399,9442	-0,04	6	0,9	18	3	64,5
C9 H9 N2 O10 P S2	399,9436	1,31	7	1	19	3	63,2
C10 H13 F4 I S2	399,9440	0,5	2	1,3	20	3	63,1

Perfluorované sloučeniny (PFAS) jsou v posledních letech předmětem zvýšeného zájmu ve všech složkách prostředí vodu nevyjímaje. Pro perfluorohexansulfonovou kyselinu (PFHxS), která je představitelem již legislativně regulovaných PFAS, už máme více kandidátů splňujících podmínky, než je 20 nastavených jako limit pro zobrazení a zobrazí se pouze 20 podle pořadí. V tomto případě je správná sloučenina až druhá v pořadí, protože první složení má poněkud lepší shodu MS¹ spektra a také nižší odchylku monoizotopické hmotnosti od m/z ve vzorku. Algoritmus výpočtu pořadí, včetně vah jednotlivých příspěvků, není nikde uveden a je tedy nutné brát v potaz, že první neznamená vždy ten správný. Bohužel CD neumí vypočítat počet atomů uhlíku, který je důležitým parametrem při rozhodování o správnosti navrženého složení, a tento výpočet je v případě potřeby nutné provádět ručně. Můžeme si také pomoci

dvěma dalšími parametry, které nám poskytuje MS¹ spektrum – izotopovou obálkou specifických A+2 prvků, které mají izotop o dvě hmotnostní jednotky těžší než nejvíce zastoupený izotop (S, Cl, Br atd.) a hmotnostním úbytkem vazby. Program umí vyhledat a podle shody spekter porovnat zadané počty halogenů (Cl, Br) a jejich kombinací. Počty A+2 prvků v molekule společně s parametry jejich identifikace (počty izotopových píků, shoda spekter, pokrytí obálky atd.) se nastavují v procesním kroku **Patern scoring**.

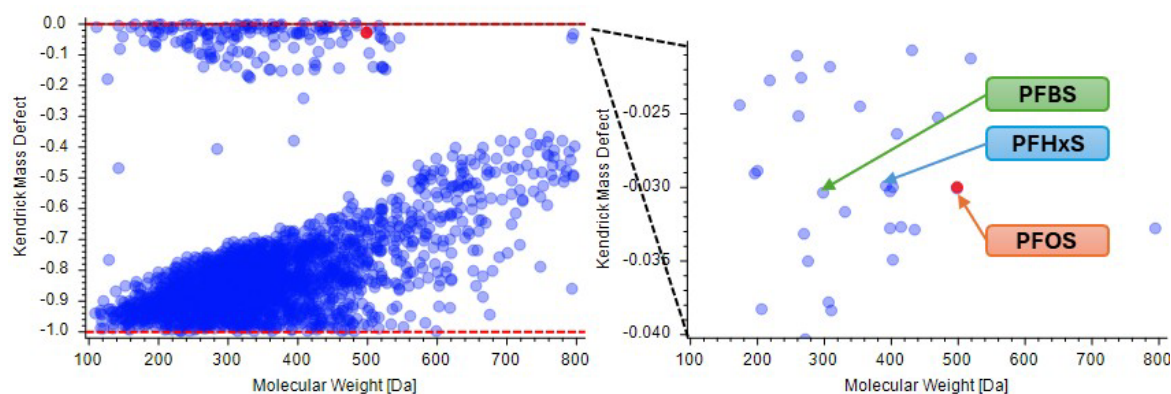
Standardní hmotnostní úbytek (m/z odečtená od nominální hmotnosti molekuly) je pro perfluorované a perhalogenované molekuly velmi odlišný od ostatních sloučenin – pohybuje se obvykle v rozmezí 0 až -0,1 pro zaokrouhlení nominální hmotnosti nahoru. Tento parametr je možné použít pro selektivní vyfiltrování např. PFAS sloučenin, jak je ukázáno v Obrázku 8.

Obrázek až sem



Obrázek 8. Graf standardního hmotnostního úbytku (Standard Mass Defect) sloučenin (zaokrouhlení nominální hmotnosti nahoru – Ceiling) na ose y proti molekulové hmotnosti sloučenin (Molecular Weight), červeně jsou vyznačeny potencionální PFAS nebo perhalogenované sloučeniny.

Hmotnostní úbytek lze s výhodou používat při identifikaci neznámých sloučenin z MS¹ spekter v homologických řadách, kdy se sloučeniny liší například o CH₂ nebo CF₂. Jako příklad si můžeme opět uvést PFAS. Pokud identifikujeme pouze jeden homolog z dané řady, tak pomocí Kendrickova hmotnostního úbytku můžeme identifikovat další homology. Kendrickův hmotnostní úbytek je definován jako rozdíl Kendrickovy hmotnosti a nominální Kendrickovy hmotnosti, kde **Kendrickova hmotnost = a × (b/c)**, kde **a** je přesná hmotnost daného prvkového složení, **b** je nominální hmotnost Kendrickova vzorce (např. CH₂ nebo CF₂) a **c** je přesná hmotnost Kendrickova vzorce. Homology pak mají stejnou hodnotu Kendrickova hmotnostního úbytku, jak je ukázáno v Obrázku 9.



Obrázek 9. Graf Kendrickova hmotnostního úbytku (Kendrick Mass Defect) pro homology CF_2 (zaokrouhlení nominální hmotnosti nahoru – Ceiling) na ose y proti molekulové hmotnosti sloučenin (Molecular Weight). Červeně je vyznačen PFOS, v pravé části obrázku je výsek, který ukazuje dva další homology PFOS – PFHxS a PFBS.

Poslední dvě operace s MS^1 spektry jsou prohledávání seznamů sloučenin s přesnými a správnými hmotnostmi (nebo prvkovým složením) a online prohledávání databází, které také obsahují tyto informace.

Prohledávání předefinovaných seznamů (**Mass List Search**) se řídí pouze odchylkou v určení m/z a shodou spektra v MS^1 . Existuje relativně velké množství seznamů dodávaných jak výrobci, tak i dostupných v literatuře ve formě tabulek v Excelu (Getzinger a kol., 2021). Není také problém si sestavit vlastní seznam. Jediné, co potřebujeme je prvkové složení dané sloučeniny. Compound Discoverer umožňuje i vyhledávání analytů pro tvorbu vlastních seznamů pomocí ChemSpideru a CAS nebo názvů. Při tvorbě vlastních knihoven je třeba dávat pozor na iontové sloučeniny – podle CAS jde např. o draselnou sůl PFOS, ale sloučenina, která se nachází ve vodě, je volná kyselina a je jí potřeba do knihovny takto zadat. Podobný problém může nastat u kvartérních amoniových solí, které jsou permanentní kationty s různými anionty. Tento typ vyhledávání je velmi rychlý a pomůže nám především při suspektních analýzách, kdy se zaměřujeme například pouze na určitou skupinu sloučenin jako jsou pesticidy, biocidy nebo PFAS. Počet sloučenin v databázích dodávaných např. ke Compound Discovereru se pohybuje v tisících až nízkých desítkách tisíců sloučenin. Seznamy cílových sloučenin zahrnují jak polutanty, tak i přírodní látky a lidský metabolom nebo exposom.

Online prohledávání nabízí ještě širší spektrum možností a je, na rozdíl od seznamů, soustavně aktualizováno. Problém nastává s reálným časem prohledávání. Ten závisí na počtu a rozsahu zvolených databází, protože každá zvolená databáze prodlužuje čas vyhledávání o desítky minut až hodiny (v našem případě jsme zvolili databáze DrugBank, EINECS, EPA DSSTox, EPA Toxcast a MassBank). Jejich rozsah je ovšem mnohem širší než u offline seznamů, hlavně v oblasti průmyslových látek.

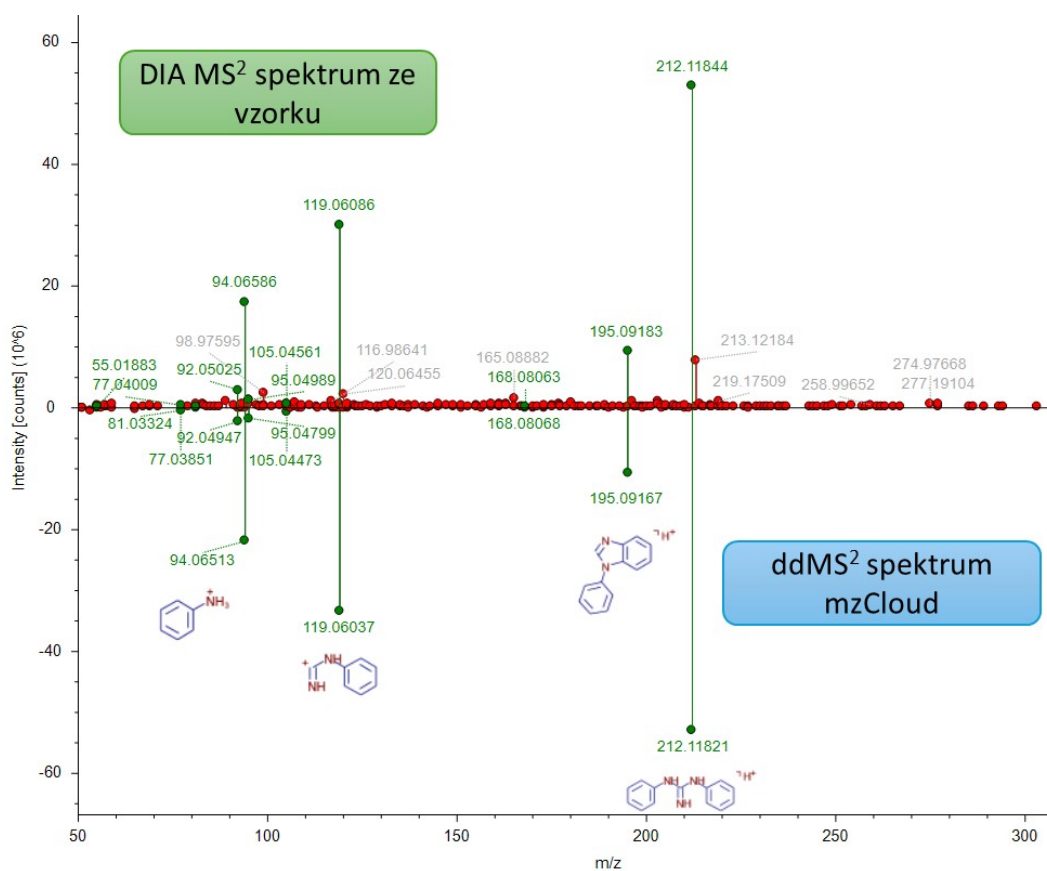
2.4.3. Základní zpracování a vyhodnocení MS^2 dat

MS^2 spektra jsou v Compound Discovereru automaticky vyhodnocována v procesním kroku **mzCloud search**, kdy jsou porovnávána s online knihovnou spekter mzCloud ([mzCloud - Advanced Mass Spectral Database](#)) podle parametrů vyhledávání uvedených v Tabulce 6. Pochopení, toho, co srovnáváme s tím, co je knihovných MS^2 spekter, je zásadní pro vyhodnocování identity či podobnosti spekter.

Jak jsme již zmiňovali v instrumentální části metodiky, pro neznámé sloučeniny nemůžeme odhadnout optimální kolizní energie, a proto používáme krokovou kolizní energii, jejímž výsledkem je MS^2 spektrum produktů ze tří odlišných MS^2 experimentů. To platí jak pro DIA, tak i pro DDA MS^2 . Naproti tomu naprostá většina MS^2 spekter v knihovnách je získaná při jedné kolizní energii. Z toho vyplývá jeden významný závěr – faktor shody spekter je třeba brát spíše orientačně, což může být matoucí pro uživatele se zkušeností z GC-MS, kde je ionizační energie většinou 70 eV, jak pro analýzy, tak i pro záznamy v knihovnách spekter. Doporučujeme pohlížet na číselné hodnoty shody spekter (match) jako na orientační a vždy

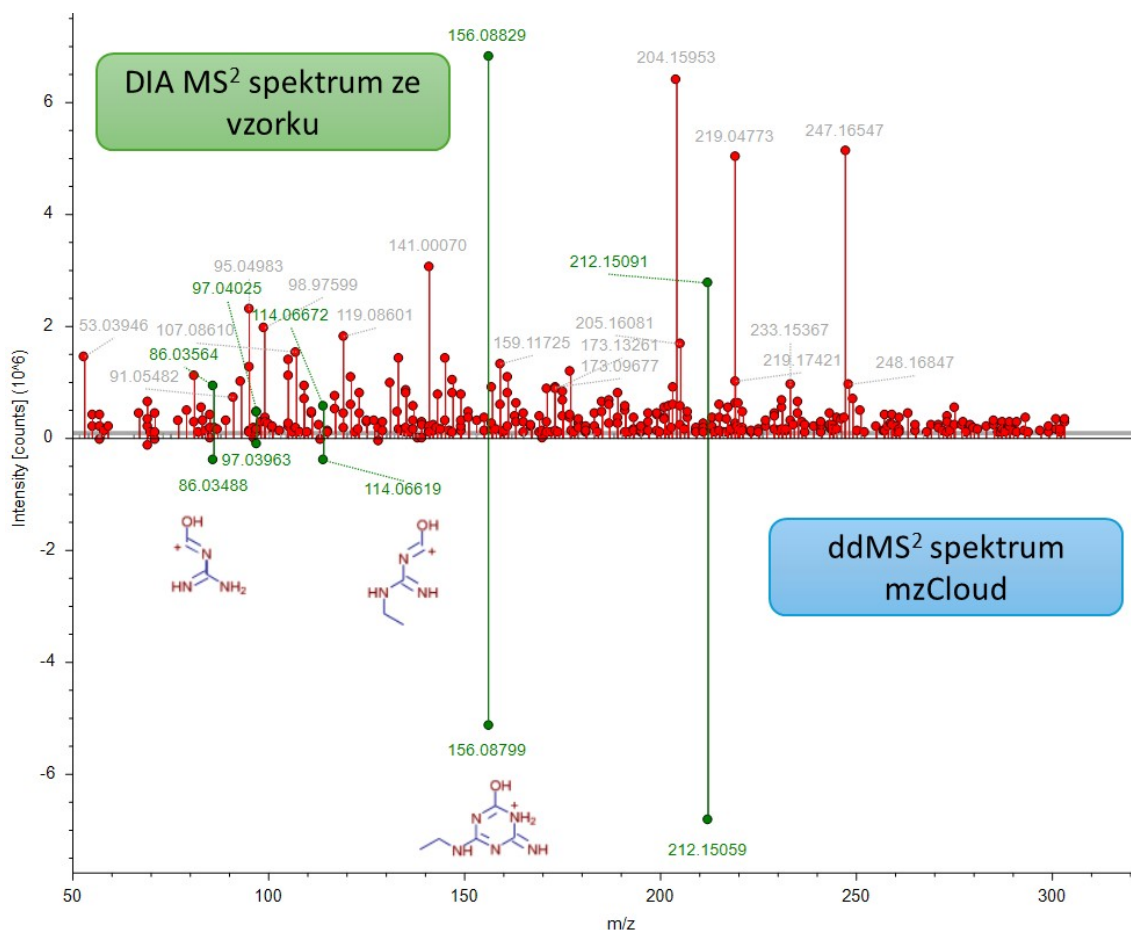
posuzovat spíše přítomnost nebo absenci produktových iontů. I z tohoto důvodu **používáme minimální hodnotu shody spekter pro DIA analýzy 20**. Pro DDA MS² nebo cílené analýzy s využitím PRM (z en, *Parallel Reaction Monitoring*) můžeme tuto hodnotu zvýšit na 40 nebo 50, protože izolační okno u DDA experimentů je obvykle 1 m/z a kvalita i čistota MS² spekter je výrazně vyšší.

Pro názornost uvedeme několik případů, kdy automatická identifikace funguje správně a kdy je třeba výsledky korigovat. V Obrázku 10. je srovnáno spektrum N, N'- difenylguanidinu ve vzorku se spektrem z knihovně mzCloud. Hodnota shody spekter byla 94,7 %, tedy velmi vysoké.



Obrázek 10. Porovnání MS² spekter N,N'-difenylguanidinu ve vzorku a v knihovně mzCloud.

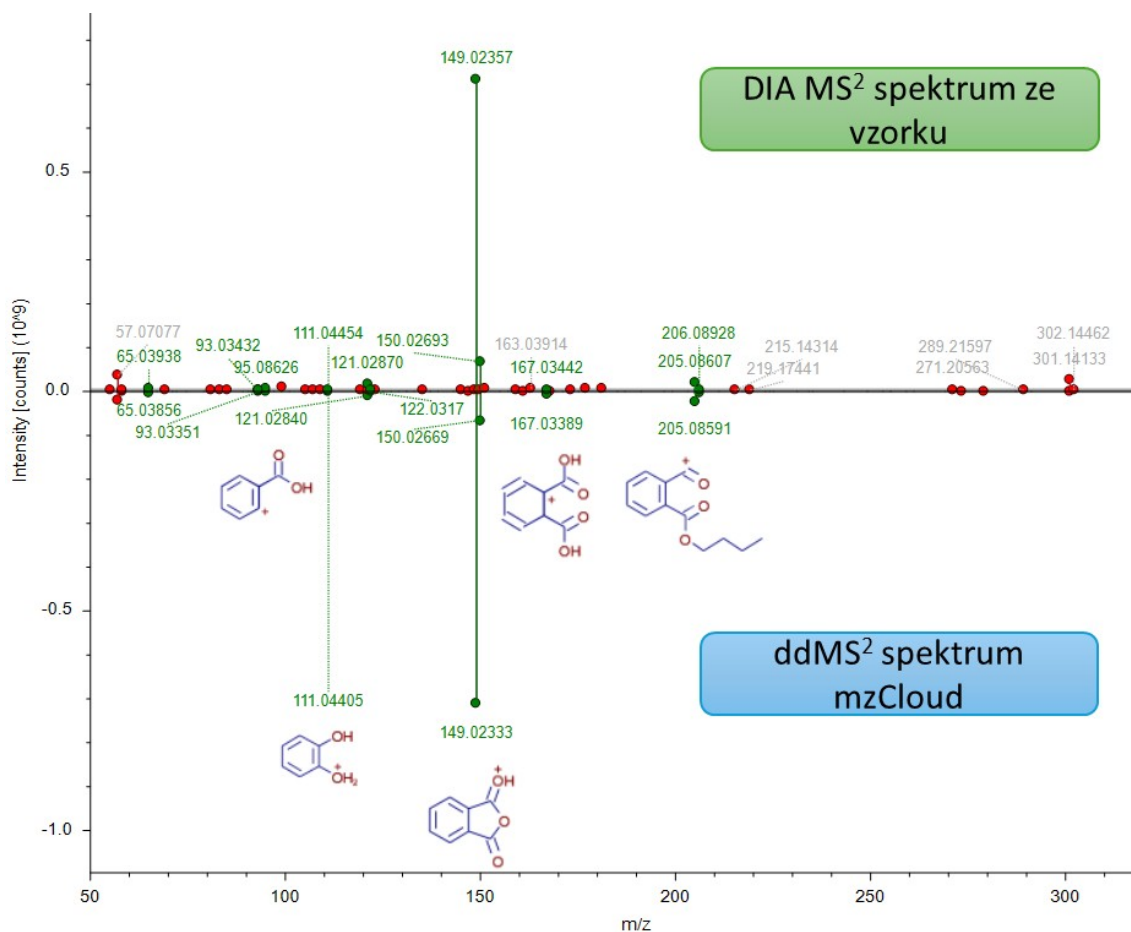
Čtyři nejintenzivnější fragmentové ionty v referenčním spektru jsou přítomny na velmi podobných intenzitách i ve vzorku, kde měla tato sloučenina nejvyšší intenzitu signálu. Tato dobrá shoda jde na vrub tomu, že v mzCloud obsahuje MS² spektrum získané podobným způsobem – tedy krokovou kolizní energií, i když s trochu jinými parametry (10/30/50 místo našich 15/35/55). Analyt byl ve vzorcích později potvrzen cílenou analýzou po zakoupení standardu.



Obrázek 11. Porovnání MS² spekter 4-hydroxy terbutylazinu ve vzorku a v knihovně mzCloud.

Poněkud horší je situace u 4-hydroxy terbutylazinu (viz Obrázek 11.), kde jsou v MS² spektru vzorku přítomny další intenzivní fragmentové ionty. To je bohužel u DIA experimentů se širokým izolačním oknem 100 m/z častým jevem. Shoda spekter je relativně nízká – 38,4 %. Zde musíme vycházet z toho, že výrazné fragmentové ionty ve spektru z knihovny nechybí ve spektru naměřeném v nejintenzivnějším vzorku. I tato sloučenina byla potvrzena cílenou analýzou se standardem.

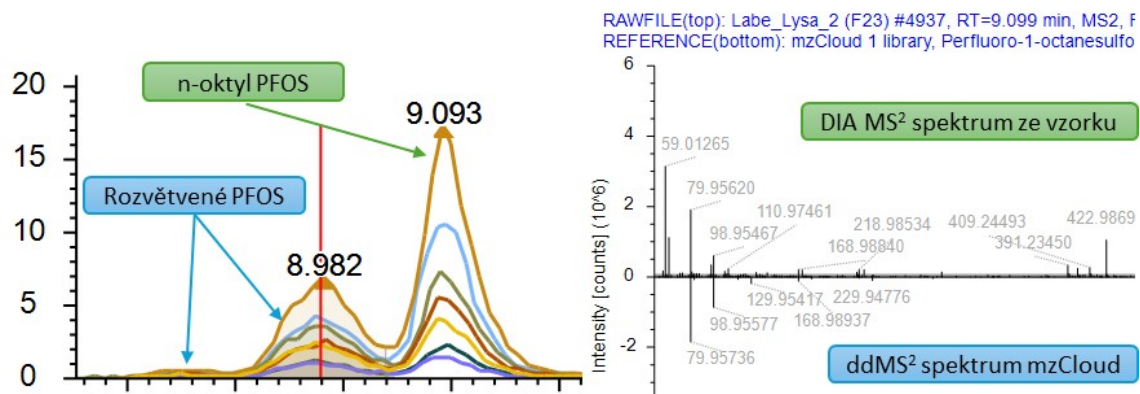
Nejproblematictější jsou pak sloučeniny, které vykazují falešně pozitivní shody a mají velmi chudá MS² spektra z pohledu fragmentových iontů. Typickým příkladem jsou izomery a izobary ftalátů, jak je ukázáno v Obrázku 12.



Obrázek 12. Porovnání MS² spekter neidentifikovatelného ftalátu ve vzorku se spektrem dibutyl ftalátu v knihovně mzCloud.

Spektra vykazují velmi vysoké shody, ale to jen díky přítomnosti jednoho intenzivního fragmentu s m/z 149,0235. Bohužel identická spektra poskytuje celá řada příbuzných sloučenin např. di-isobutyl ftalát, oktyl ftalát, a mono (2-ethylhexyl) ftalát. V takovém případě nemůžeme o daném analytu tvrdit, že je identifikován na úrovni 2 stupnice Schymanski, ale pouze na úrovni 3.

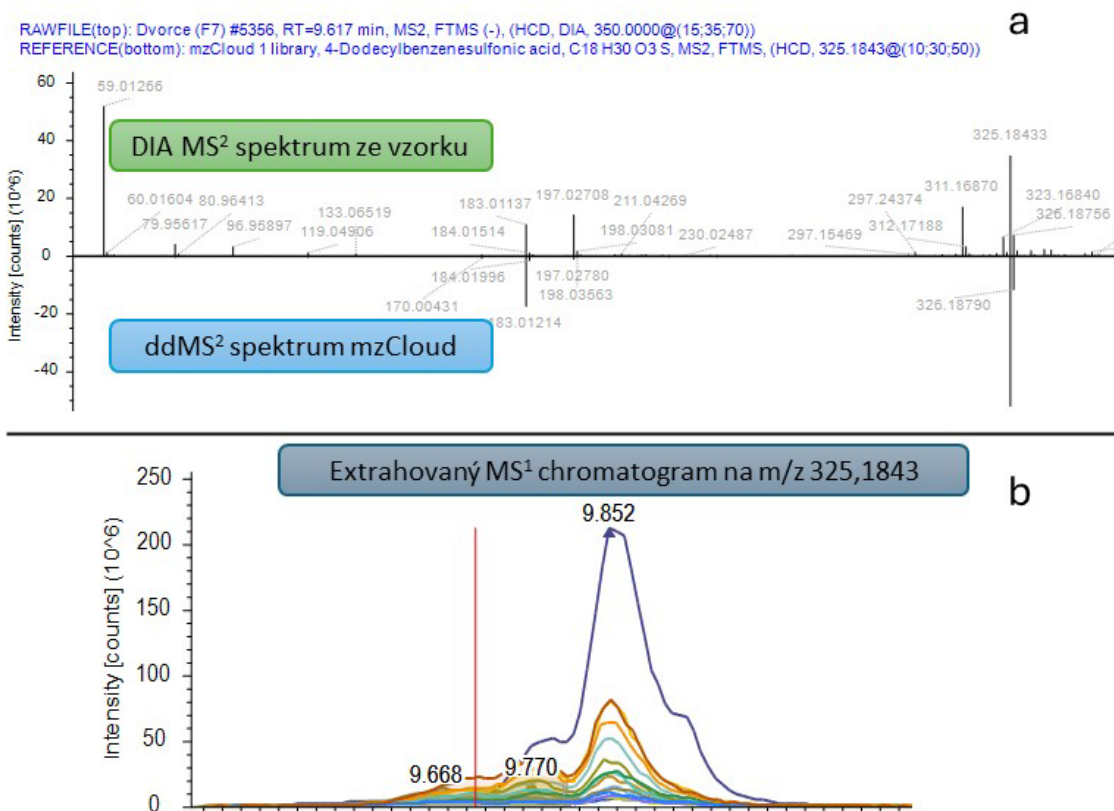
Dalším případem problémové identifikace mohou být již výše zmiňované PFAS a také např. detergenty z rodiny lineárních alkyl benzen sulfonátů (LAS). Jejich technické směsi obsahují různě rozvětvené izomery, které nemusí, stejně jako PFOS uvedené v Obrázku 13, vykazovat rozdíly v MS¹ ani MS² spektru, ale objevují se jako vícenásobné identifikace stejné sloučeniny v rozdílných retenčních časech.



Obrázek 13. Chromatogram PFOS ve vzorcích pasivních vzorkovačů (vlevo). Osa x zobrazuje retenční čas (min). Vpravo porovnání MS^2 spektra z experimentu a knihovny.

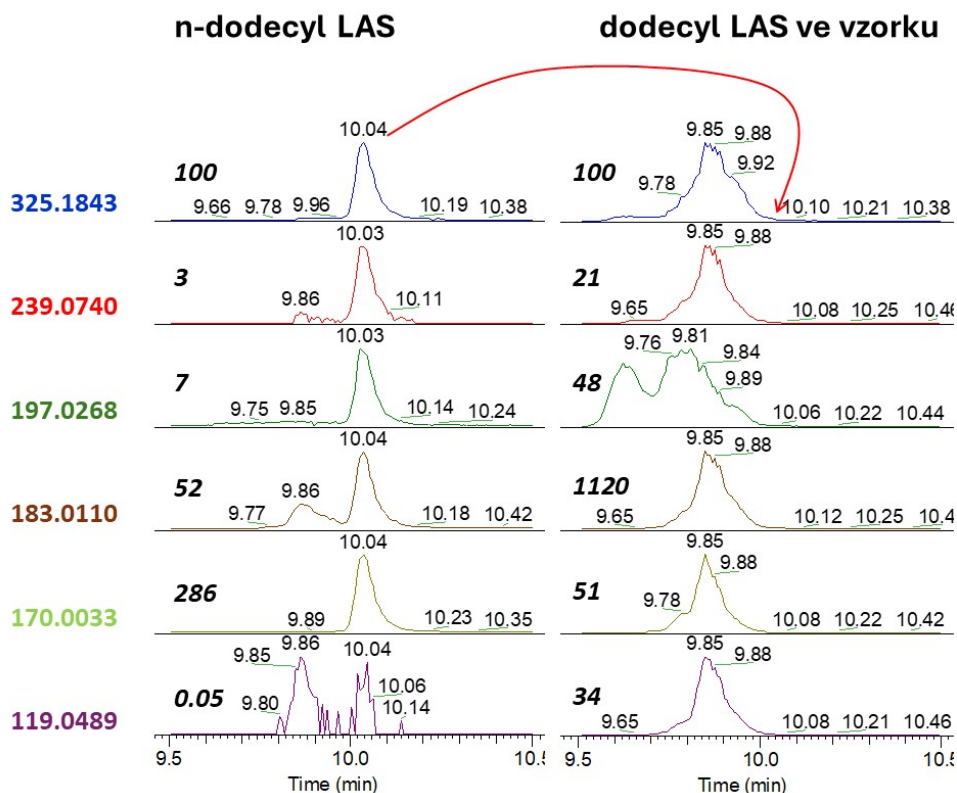
Zde lze naštěstí izomery odlišit chromatograficky – v použitém systému separace s reverzními fázemi mají rozvětvené řetězce nižší retenci a jsou vždy eluovány před n-homology, což také bylo potvrzeno analýzou standardů.

V komplexních vzorcích znečištěné vody se často můžeme setkat s technickými směsmi sloučenin, které často obsahují nejen homology, ale také strukturální izomery jednotlivých homologů. Takovým případem jsou i již výše zmiňované LAS. Pomocí MS^2 spekter jsme identifikovali ve vzorcích n-dodecyl-benzensulfonovou kyselinu (LAS C12). Z Obrázku 14a. je ovšem patrný rozdíl mezi MS^2 spektrem odečteném ze vzorku a spektrem z knihovny. Z chromatogramu na extrahovaném prekurzorovém iontu v MS^1 je také patrné, že jde o směs několika izomerů (Obrázek 14b).



Obrázek 14. Porovnání chromatogramů na jednotlivých produktových iontech pro *n*-dodecyl LAS s LAS detekovanými ve vzorcích pasivních vzorkovačů. Osa y udává relativní intenzitu vzhledem k prekurzorovému iontu 325,1843. Osa x udává *m/z* (a) a retenční čas (b).

Pokud znázorníme extrahované produktové ionty, a to jak ve standardu *n*-dodecyl LAS i dodecyl LAS ve vzorku (Obrázek 15), tak je patrné, že jde opravdu o nedokonale rozdělenou směs izomerů, které navíc vůbec neobsahují *n*-dodecyl LAS. Zatímco u lineárního izomeru je nejintenzivnějším iont s *m/z* 170,0033, ve vzorku je to *m/z* 183,0110. Tento příklad jenom dokládá, jak obtížná je interpretace necílených analýz, i když je k dispozici spektrum v online knihovně. Zde je nutné zdůraznit, že spektrum je odečteno v jednom bodě – nejčastěji vrcholu píku a nemusí být čisté, zvláště pak u DIA s izolačním oknem 100 *m/z*. Compound Discoverer bohužel nenabízí detekci čistoty spektra pomocí srovnání vrcholů a tvarů píků v chromatogramech na produktových iontech a je tak nutná další ruční operace, speciálně pro prekurzorové ionty na nižších intenzitách. Tuto velmi užitečnou funkci nabízejí jiné programy (příklad) a v tom případě je velmi vhodné ji používat.



Obrázek 15. Porovnání chromatogramů na jednotlivých fragmentových iontech pro *n*-dodecyl LAS s LAS detekovanými ve vzorcích pasivních vzorkovačů. Čísla u jednotlivých chromatogramů udávají relativní intenzitu vzhledem k prekurzorovému iontu 325,1843.

Compound Discoverer neumožňuje online procházení spekter v databázi MassBank ([MassBank](#)) a tak je nutné manuální zadávání spekter nebo jejich porovnání. MassBank obsahuje prověřená (curated) spektra stejně jako mzCloud ([mzCloud - Advanced Mass Spectral Database](#)), ale na rozdíl od této databáze obsahuje spektra získaná na rozdílných přístrojích, různými ionizačními technikami i za různých podmínek. Je tedy nutné vyfiltrovat pouze ta spektra, která jsou pro naše účely použitelná. Jinak zásady pro vyhodnocení shody i problémy zůstávají stejné jako pro mzCloud, pouze je vyhodnocení podstatně pomalejší. Vyhledávat lze podle monoizotopických hmotností prekurzoru s měnitelnou tolerancí – my používáme 0,05 Da.

V případě, že nemáme shodu v ani jedné z těchto dvou rozsáhlých online knihoven, je možné postupovat několika způsoby:

- I. Hledat MS² spektra v původní literatuře, pokud máme k dispozici identifikaci na úrovni 4 stupnice Schymanské.
- II. Použít stále se rozšiřující paletu *in silico* nástrojů, které umožňují více či méně přesně simulovat či interpretovat produktová spektra podle navržené struktury. My používáme komerčně dostupný program MassFrontier 7.0 (Thermo Fisher), který používá fragmentace na základě možných reakcí a publikovaných fragmentačních mechanismů. V současné době je v něm predikce fragmentových iontů omezená pouze na ESI+. Z volně dostupných programů je možné zmínit např. MetFrag

- ([MetFrag - home](#)) nebo částečně nekomerční program mzmine ([mzmine – mzio](#)), který je ovšem více zaměřen na metabolomiku.
- III. Manuální interpretace MS² spekter – nutná znalost ionizačních a fragmentačních mechanismů pro jednotlivé skupiny organických molekul.

Každý z těchto postupů je extrémně náročný z pohledu času, vysoké kvalifikace a zkušenosti operátora. Lze je doporučit pouze v případě, že jde o vysoce prioritní sloučeniny významné pro daný účel, nikoliv jako rutinní postup.

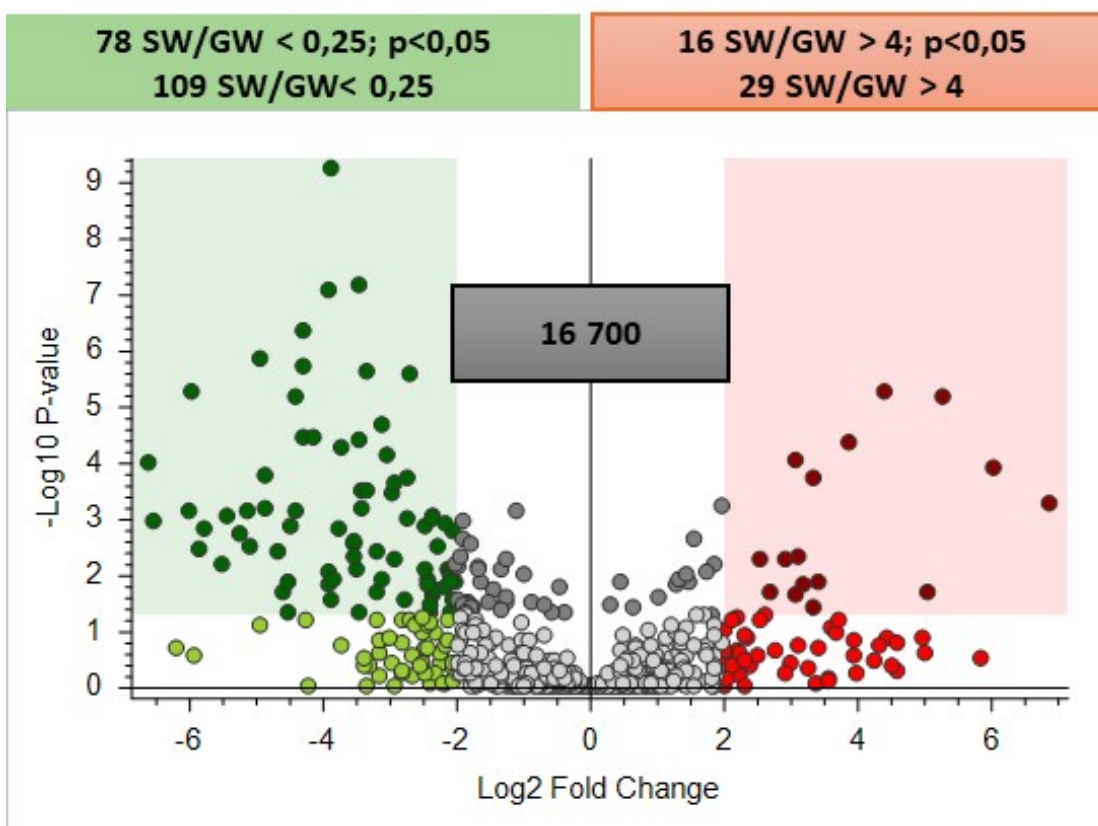
Celou kapitolu můžeme shrnout do následujících doporučení

- I. Provést **prioritizaci sloučenin**, pro které bychom chtěli zvýšit úroveň jistoty identifikace až na úroveň 2 nebo potenciálně 1, protože nejsme schopni vyhodnotit vše, co je v daném souboru dat (2.4.2).
- II. **Používat co nejvíce automatizované postupy vyhodnocení, které je ovšem nezbytně nutné manuálně zkontrolovat (2.4.3).**
- III. V případě, že nejsou dostupná MS² spektra v automatickém režimu vyhledávání, provést **manuální vyhledávání** v online knihovně spekter MassBank či v jiné, ale **vždy prověřené knihovně spekter**.
- IV. V případě sloučenin, které nemají žádné dostupné MS² spektrum v knihovnách, ale máme o jejich identifikaci zájem, je nutné zvolit některou z časově náročných metod.

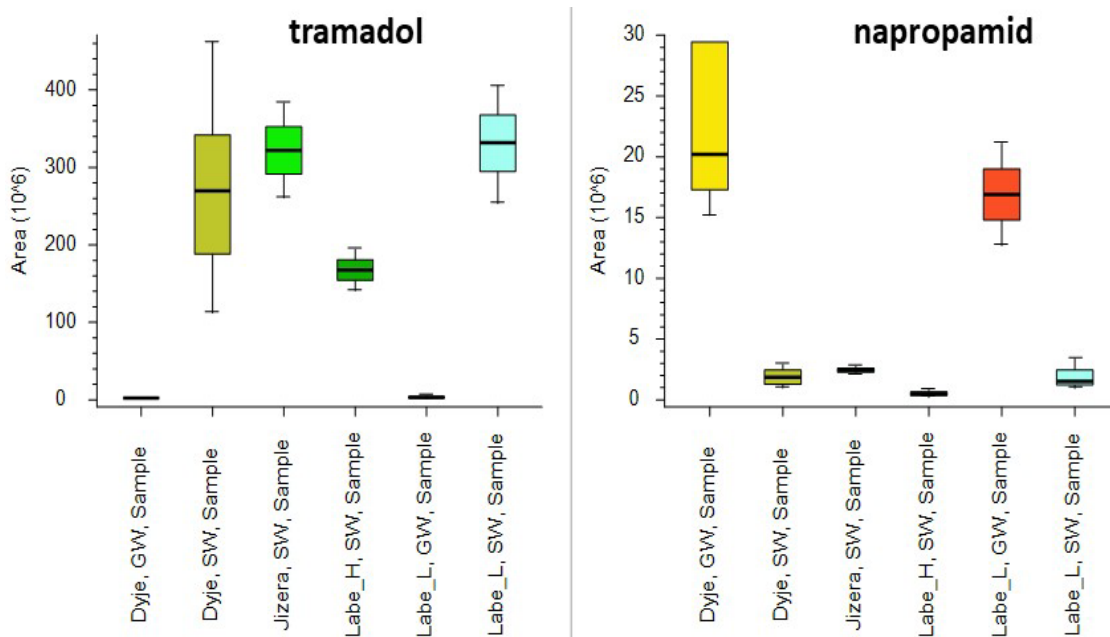
2.4.4. Ukázky pokročilého vyhodnocení dat po automatickém zpracování

Pro redukci počtu signálů (potenciálních sloučenin) na ty, které jsou důležité pro finální identifikaci, byly vyvinuty postupy založené na různých principech (Hollender a kol., 2017). Jak již bylo zmíněno výše, prioritizace je nezbytná pro redukci počtu sloučenin, které se budou identifikovat interpretací MS² spekter. Pro náš projekt se jeví jako nejvíce přínosný postup založený na diferenční analýze mezi vzorky s definovanou hypotézou (Kiefer a kol., 2021). V Obrázku 16. je uveden příklad diferenční analýzy mezi povrchovou a podzemní vodou ve vzorcích z povodí Dyje v pozitivním ionizačním módu. Použili jsme nastavení parametru pro významnost rozdílu (\log_2 fold change) na hodnotu 2, což znamená, že poměr je vyšší než 4 nebo nižší než 0,25. Jako další pomocný parametr můžeme použít statistickou významnost p , která by nastavena na 0,05. Tento parametr však má opodstatnění pouze v případě, že porovnáváme replikáty experimentů, kdy se předpokládá normální rozdělení výsledků kolem střední hodnoty, což není příklad reálných vzorků z různých profilů, časů a typů vod. Z popisu obrázku je patrné, v povrchové vodě bylo 29 sloučenin s průkazně vyšší intenzitou (4x větší průměrná plocha píku) v porovnání s podzemní vodou, z toho 16 na statisticky významné úrovni (zelená plocha na Obrázku 16.). Naopak 4x větší plochu píku v podzemní, než v povrchové vodě mělo 109 sloučenin, z toho 78 na hladině významnosti $p < 0,05$ (červená plocha na Obrázku 16.). 16 700 sloučenin pak v rámci nastavených parametrů nevykazoval

žádné rozdíly (šedá plocha na Obrázku 16.). Jako příklady rozdílné intenzity v maticích můžeme uvést léčivo tramadol a pesticid napropamid (Obrázek 17.), kde je tento rozdíl i rozptyl ploch píku naprosto jasný.

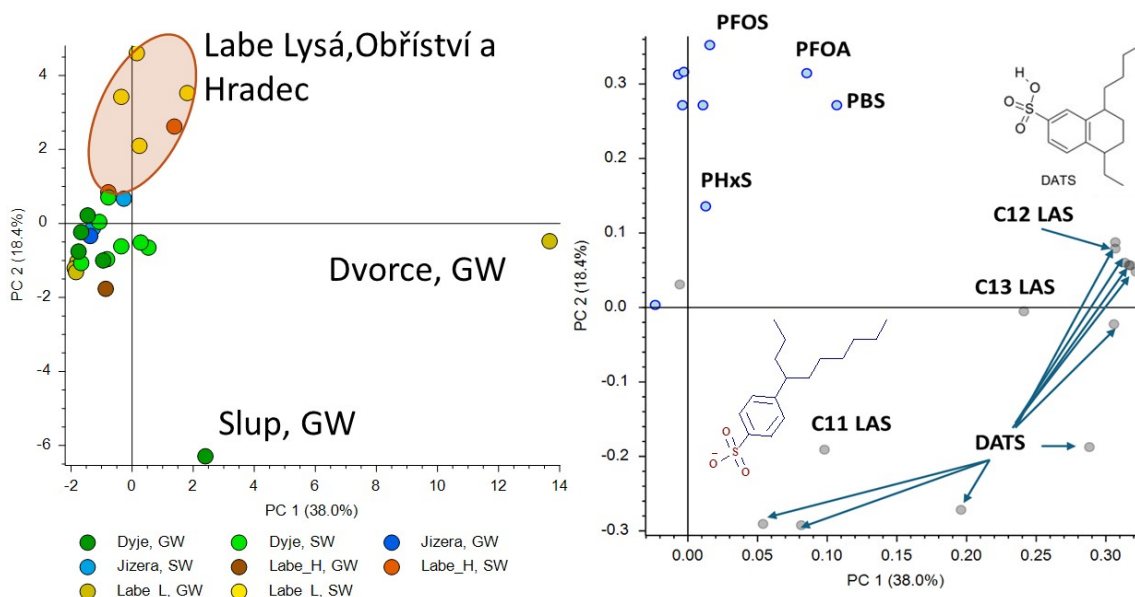


Obrázek 16. Výsledky diferenční analýzy mezi povrchovou (SW) a podzemní vodou (GW) v povodí Dyje jsou zobrazeny jako vulkánový graf. Na ose x je poměr mezi průměrnou plochou píku ve skupině povrchových vod a podzemních vod (\log_2 fold change); osa y vyjadřuje statistickou významnost rozdílů mezi těmito skupinami. Červeně popřípadě zeleně vyznačené oblasti splňují požadavky rozdílu v intenzitě na požadované hladině statistické významnosti ($p < 0,05$).



Obrázek 17. Zobrazení rozdílů mezi tramadolem a napropamidem ve skupinách vzorků rozdělených podle povodí (Dyje, Jizera, Labe) a typu vody (GW-podzemní a SW-povrchová) pomocí krabicových grafů, kde osa y zobrazuje průměrné plochy píků.

Další možností, jak zúžit výběr kandidátů pro identifikaci, je vybrat zájmovou skupinu podle vloženého seznamu přesných a správných m/z. To lze provést pomocí logických funkcí Např. v Compound Discovereru je to zadání filtru : shoda se seznamem přesných monoizotopických hmotností má status minimálně jedné shody v tomto seznamu. Při použití našeho vlastního seznamu PFAS a detergentů jsme v ESI- datech redukovali počet sloučenin na 32. Po odstranění píků s nízkou intenzitou ve vzorcích to bylo 30 sloučenin, ze kterých bylo možné identifikovat 25 na úrovni jistoty 1–3. Na úrovni 3 byla řada homologů LAS (viz výše) a jejich analogů dialkyltetralin sulfonátů (DATS) identifikována pomocí Kendrickova hmotnostního úbytku, jak je popsáno výše. Tento úzký výběr polutantů pak můžeme použít v kombinaci s analýzou základních komponent pro popis znečištění lokalit vybranými analyty. Příklad takovéto analýzy je uveden v Obrázku 18.



Obrázek 18. Výsledky analýzy hlavních komponent (PCA) pro analyzované vzorky podzemních (GW) a povrchových (SW) vod, kdy proměnné byly sloučeniny identifikované na úrovni jistoty 1–3 ze seznamu PFAS a anionaktivních detergentů. Červenou elipsou vyznačené vzorky z povrchových vod jsou charakteristické přítomností PFAS. V odlehlých vzorcích (podzemní vody) Slup a Dvorce převažují anionaktivní tenzidy. Vlevo jsou roviny PC1 a PC2 případů (vzorkovací místa) a vpravo pak PC1 a PC2 rovina proměnných – PFAS, LAS a DATS.

Z obrázku je patrné seskupení pasivních vzorkovačů z povodí Labe (povrchová voda), které je charakterizováno přítomností PFAS a také dvou vzorků podzemní vody, kde je patrná přítomnost anionaktivních tenzidů, přičemž Slup je asociována s nižšími homology a Dvorce s vyššími homology těchto sloučenin. Tento příklad ukazuje užitečnost vlastních seznamů zájmových sloučenin pro identifikování míst se zvýšenou nebo výrazně odlišnou kontaminací.

2.4.5. Komunikace a sdílení výsledků necílených analýz uživatelům dat

Analytický chemik, který pracuje s necílenými analýzami, musí výsledky analýz předávat dále koncovým uživatelům dat, což velmi často nebývají analytici ani chemici, a výsledky tedy musí být prezentovány srozumitelnou formou. Jak jsme již popsali, data získaná v ESI+ a ESI- jsou analyzována odděleně a je možná duplicita nálezů (typicky pro léčiva jako jsou např. diklofenak nebo telmisartan). Tyto duplicity je nutné sloučit a odstranit. Doporučujeme prezentování výsledků formou tabulek, kdy jsou uvedeny název a identifikátor (např. CAS) detekované sloučeniny, monoizotopická hmotnost, ionizační mód, vždy s úrovní jistoty identifikace podle Schymanski a kol. (2014) nebo Charbonett a kol. (2022). Předcházíme tím zásadním nedorozuměním ohledně následné prezentace a použití výsledků necílených analýz.

Publikace výsledků necílených analýz v literatuře vyžaduje přísnou kontrolu kvality. Důraz je kladen na vysoký standard od přístrojové analýzy až po vyhodnocení dat a také na otevřené sdílení dat (včetně primárních). K tomuto účelu byla založena a je provozována platforma BP4NTA – Best Practices for Non-Targeted Analysis ([NTA Study Reporting Tool \(SRT\) – BP4NTA](#)), na které lze stáhnout velmi užitečnou pomůcku nejen pro publikování, ale také pro

udržování vysokého standardu necílených analýz – *Study Reporting Tool* (STR). STR je šablona v Excelu, která umožňuje každému zhodnotit kvalitu a transparentnost jeho experimentů (Peter a kol., 2021). Není nezbytně nutné dodržovat všechny požadavky, z nichž některé jsou aplikovatelné hlavně na metabolomické studie, jedná se ale o užitečné vodítko pro dokumentování QA/QC v rámci našich prováděných analýz.

2.4.6. Příklady výsledků dosažených aplikací necílených analýz v rámci projektu a možnosti využití již získaných DIA dat

Postup necílené analýzy demonstrováný v této metodice vedl k prioritizaci šesti nových sloučenin:

- Průmyslově používaných látek jako jsou 1,3-diphenylguanidin (urychlovač vulkanizace – pneumatiky, pryže a stavební materiály), triethylcitrát (změkčovač, rozpouštědlo a emulgátor)
- Meziproduktů ve výrobě barviv – kyselina naftalen-2-sulfonová a kyselina benzo(d)thiazol-2-sulfonová
- Metabolitů léčiv - 4-acetamidoantipyrin
- 6:2 fluorotelomersulfonová kyseliny, která se používá v hasících pěnách a při pokovování)

Tyto látky jsou relevantními kontaminanty v zavlažovaných půdách, jak bylo potvrzeno i cílenými analýzami (Kodeš a kol. 2025a) a byly následně vybrány pro studie jejich chování v půdách pro vyhodnocení jejich sorpčního chování v tomto prostředí a potenciálního ohrožení podzemních vod (Kodešová a kol., 2026, Kodeš a kol., 2025b). Jedním z kroků výběru vhodných kandidátů pro další studie je i dostupnost analytického standardu či sloučeniny s čistotou >98 %. To bohužel diskriminuje velké množství sloučenin, zvláště z rodiny metabolitů a průmyslových sloučenin dodávaných jako směsi.

V dalších studiích jsme kromě široké škály pesticidů a průmyslových polutantů identifikovali i jejich metabolity, které jsme ovšem nebyli schopni zařadit do cílených analýz z totožných důvodů (Sadchenko a kol. 2026). Východiskem z této situace je aplikace výpočetní chemie, kdy je možné na základě struktury vypočítat ionizační účinnost dané sloučeniny a porovnat ji se strukturně podobnou sloučeninou v kalibračním standardu (Liigand a kol., 2020; Malm a kol., 2024; Wang, a kol., 2025). Pro účely laboratoří podniků Povodí, ale i pro účely vědeckých pracovišť, které se výpočetní chemií nezabývají, není dostupný přístup kvantifikace takových dat. Členové zahraničního týmu, kteří přišli s tímto přístupem, založili spin-off společnost, kde je možné tyto kvantifikace objednat jako službu. [Quantem Analytics - Contaminant Quantification for suspect and non-target screening](#) nabízí kvantifikaci necílených dat formou online kalkulátoru, který je interaktivní a uživatelsky přívětivý. Jako u všech činností spojených s necílenými analýzami jde o velmi nové přístupy, které vyžadují pečlivou validaci, která není cílem této metodiky. Podle našich prvních výsledků, je ale shoda mezi cílenými analýzami LC-MS/MS a kvantifikací z LC-HRMS/DIA dat provedená na tréninkovém setu 40 pesticidů a léčiv v extraktu z pasivních vzorkovačů v ESI+ až překvapivě dobrá, s odchylkou do 30 %. V současnosti probíhá rozsáhlejší ověření spolehlivosti tohoto způsobu kvantifikace ve vzorcích půd a pasivních vzorkovačů, která bude předmětem budoucí publikace.

3. Srovnání „novosti postupů“

Monitoring chemického stavu ve vodách EU je v současnosti založen na analýzách tzv. prioritních sloučenin. Rámcová směrnice o vodách pracuje s maximálně několika desítkami sloučenin, které byly identifikovány jako prioritní nebezpečné nebo potenciálně nebezpečné látky. Prioritizace je složitý a zdoluhavý proces, který nereflektuje dynamický vývoj použití chemických látek v průmyslu, domácnostech a zemědělství. V současné době (březen 2026) je v databázi komerčních sloučenin EU (EINECS – European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances) evidováno 106 212 chemických individuů nebo směsí. K těmto komerčním produktům je třeba připočítat i sloučeniny, které nejsou v databázi evidovány, např. metabolity a transformační produkty, vedlejší a odpadní produkty výroby atd. (Kiefer et al., 2020). V rámci regulací podle platné legislativy či v rámci monitoringu jsou v ČR sledovány maximálně stovky polárních kontaminantů vody. Nepoměr mezi legislativně danými a potenciálně kontaminujícími sloučeninami je tedy zřejmý.

Aplikace metod necíleného screeningu na bázi vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrie je v současné době stále více využívaným nástrojem pro identifikaci sloučenin přítomných v komplexních směsích, jako jsou kontaminované povrchové nebo podzemní vody (Hollender a kol., 2017; Menger a kol., 2021). Pro zúžení počtu signálů (potenciálních sloučenin) na ty, které jsou důležité pro finální identifikaci, byly vyvinuty postupy založené na různých principech jako je diferenční analýza mezi vzorky s definovanou kontaminací a vzorky s velmi nízkou úrovní zatížení (Kiefer a kol., 2021) nebo efektově směřované analýzy pro identifikaci potenciálně toxických sloučenin (Peets a kol., 2024) nebo endokrinních disruptorů (Mikušová et al., 2024, 2025). Všechny publikované informace jsou zatím dostupné pouze ve formě vědeckých článků v anglickém jazyce.

Tato metodika je první svého druhu zaměřená na popis postupu, vlivu podmínek měření a vyhodnocení a také problémů při necílené analýze vzorků vod. Navazuje na naše předchozí vědecké publikace a prezentuje je formou návodného postupu na demonstračním souboru dat.

4. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika se zabývá kombinací pasivního vzorkování a necílené analýzy jako nástroje pro identifikaci nových kontaminantů ve vodním prostředí. Popisuje postupy identifikace potenciálně znečišťujících sloučenin, což je základním předpokladem k vyhodnocení jejich ekotoxikologického rizika a také k řízení těchto rizik. Primárně by měla sloužit ke zlepšení ochrany podzemních vod či zdrojů pitné vody a také může být použita v širším kontextu pro sledování čistírenských procesů. V zahraničí (např. Německo, Nizozemí) se používá pro online sledování a hodnocení kvality surové vody pro úpravu pitné vody.

Tato metodika je zejména určena pro podniky Povodí v rámci činností správy povodí, dále pro výzkumné organizace, které se ochranou vody zabývají – např. Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka v.v.i., a vysoké školy. V širším okruhu uživatelů také mohou být provozovatelé úpraven pitné vody či čistíren odpadní vody, kteří se ale budou spíše zajímat o aplikovatelnost necílených analýz pro kontrolu technologických procesů.

5. Ekonomické aspekty

V případě této metodiky je velmi obtížné odhadnout ekonomické aspekty zavedení, provozování a případných benefitů necílených analýz. Pořízení přístrojového vybavení, které je pro tyto účely vhodné, se pohybuje v řádu 12–30 milionů Kč podle parametrů dané instrumentace. Pro účely analýzy vzorků vody je možné použít přístroje ze spodní poloviny tohoto rozsahu, tedy do 20 milionů Kč. Náklady na provoz a údržbu přístrojů se pohybují řádově ve vysokých stovkách tisíc až jeden milion Kč za rok. Nejvyšší provozní položkou jsou platy kvalifikované pracovní síly, které se budou lišit podle zaměstnavatele. Vzhledem k počtu analýz, které je jeden přístroj schopen provést za rok, je nezbytný počet operátorů 2–3, aby byl plně využit potenciál přístroje. Zde je třeba uvést, že i v naší laboratoři je značná část přístrojového času vysokorozlišujících MS věnována cíleným analýzám, např. léčiv a PFAS v biologické matrici, takže skutečné zatížení necílenými analýzami je nižší.

Ekonomické přínosy pasivního vzorkování jsme diskutovali již v našich výše zmíněných metodikách (Grabic 2015 a 2018). Necílené analýzy zvyšují informační výtěžnost pasivního vzorkování speciálně v rozsahu sledovaných sloučenin. Při použití datově nezávislých metod, což je hlavní náplní této metodiky, je výrazným benefitem také budování databáze datově zmražených vzorků, které mohou být použity mnoha různými způsoby, včetně retrospektivních kvalitativních i kvantitativních analýz. Dostupnost datově zmražených vzorků pak může v budoucnu razantně snížit náklady pro ověřování relevance např. nově prioritizovaných polutantů, kdy není potřebné opětovně provádět náročné vzorkovací kampaně.

Hlavním přínosem metodiky je ovšem pomoc při zavádění necílených analýz jako nástroje, který výrazně rozšiřuje možnosti ochrany kvality podzemní a pitné vody.

6. Seznam použité související literatury

- Bernhardt, E. S., Rosi, E. J., & Gessner, M. O. (2017). Synthetic chemicals as agents of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15, 84–90.
- Bletsou, A. A., Jeon, J., Hollender, J., Archontaki, E., & Thomaidis, N. S. (2015, March). Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 66, pp. 32–44. Elsevier.
- Brack, W., Dulio, V., Ågerstrand, M., Allan, I., Altenburger, R., Brinkmann, M., ... Vrana, B. (2017, January). Towards the review of the European Union Water Framework management of chemical contamination in European surface water resources. *Science of the Total Environment*, Vol. 576, pp. 720–737. Elsevier B.V.
- Chao, A., Al-Ghoul, H., McEachran, A. D., Balabin, I., Transue, T., Cathey, T., ... Sobus, J. R. (2020). In silico MS/MS spectra for identifying unknowns: a critical examination using CFM-ID algorithms and ENTACT mixture samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 1303–1315.
- Charbonnet, J. A., McDonough, C. A., Xiao, F., Schwichtenberg, T., Cao, D., Kaserzon, S., ... Higgins, C. P. (2022). Communicating Confidence of Per- and Polyfluoroalkyl Substance Identification via High-Resolution Mass Spectrometry. *Environmental Science and*

- Technology Letters*, 9, 473–481.
- Chiaia-Hernandez, A. C., Schymanski, E. L., Kumar, P., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Suspect and nontarget screening approaches to identify organic contaminant records in lake sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 7323–7335.
- Escher, B. I., Stapleton, H. M., & Schymanski, E. L. (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*, Vol. 367, pp. 388–392.
- Fialová, P., Šverclová, K., Grabicová, K., Grabic, R., Švecová, H., Nováková, P., & Vrana, B. (2024). Performance comparison of three passive samplers for monitoring of polar organic contaminants in treated municipal wastewater. *Science of the Total Environment*, 908. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168153>
- Getzinger, G. J., Carolina, N., States, U., Higgins, C. P., States, U., & Ferguson, P. L. (2021). *HHS Public Access*. 93, 2820–2827.
- Giebułtowicz, J., Grabicová, K., Brooks, B. W., & Grabic, R. (2024). Influence of time-dependent sampling on the plasma metabolome and exposome of fish collected from an effluent-dependent pond. *Science of the Total Environment*, 906. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167446>
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Gennaro, M. C., & Marengo, E. (2016, March). Contaminants in water: non-target UHPLC/MS analysis. *Environmental Chemistry Letters*, Vol. 14, pp. 51–65. Springer International Publishing.
- Grabic, R., Grabicová, K., Fedorova, G., Golovko, O., & Randák, T. ([2015]). Metodika sledování kontaminace povrchových vod organickými cizorodými látkami pomocí pasivních vzorkovačů. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. Edice metodik. ISBN 978-80-7514-031-9.
- Grabic, R., Vrana, B., Fedorova, G., Švecová, H., Urík, J., Červený, D., Golovko, O., Grabicová, K., Šandová, M., Turek, J., & Randák, T. (2018). Využití pasivních vzorkovačů POCIS pro monitoring farmak a pesticidů v povrchových vodách. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. Edice metodik. ISBN 978-80-7514-067-8.
- Hajeb, P., Zhu, L., Bossi, R., & Vorkamp, K. (2022). Sample preparation techniques for suspect and non-target screening of emerging contaminants. *Chemosphere*, 287, 132306.
- Hohrenk, L. L., Itzel, F., Baetz, N., Tuerk, J., Vosough, M., & Schmidt, T. C. (2020). Comparison of Software Tools for Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry Data Processing in Nontarget Screening of Environmental Samples. *Analytical Chemistry*, 92, 1898–1907.
- Hollender, J., Schymanski, E. L., Singer, H. P., & Ferguson, P. L. (2017). Nontarget Screening with High Resolution Mass Spectrometry in the Environment: Ready to Go? *Environmental Science and Technology*, 51, 11505–11512.
- Hug, C., Ulrich, N., Schulze, T., Brack, W., & Krauss, M. (2014). Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environmental Pollution*, 184, 25–32.
- Hulleman, T., Turkina, V., O'Brien, J. W., Chojnacka, A., Thomas, K. V., & Samanipour, S. (2023, September). Critical Assessment of the Chemical Space Covered by LC-HRMS Non-Targeted Analysis. *Environmental Science and Technology*, Vol. 57, pp. 14101–14112. American Chemical Society.
- Hupatz, H., Rahu, I., Wang, W. C., Peets, P., Palm, E. H., & Krueve, A. (2025). Critical review on in silico methods for structural annotation of chemicals detected with LC/HRMS non-targeted screening. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 417, 473–493.
- Kiefer, K., Bader, T., Minas, N., Salhi, E., Janssen, E. M. L., von Gunten, U., & Hollender, J.

- (2020). Chlorothalonil transformation products in drinking water resources: Widespread and challenging to abate. *Water Research*, *183*, 116066.
- Kiefer, K., Du, L., Singer, H., & Hollender, J. (2021). Identification of LC-HRMS nontarget signals in groundwater after source related prioritization. *Water Research*, *196*, 116994.
- Kind, T., & Fiehn, O. (2010). Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical Reviews*, *2*, 23–60.
- Kodeš, V., Grabic, R., Kodešová, R. (2023): Metodika pro stanovení podmínek bezpečného využití vody a kalu z čistíren odpadních vod v zemědělství. Certifikovaná metodika. Český hydrometeorologický ústav, ISBN 978-80-7653-064-5 (online.pdf), pp 36.
- Kodeš, V., Kodešová, R., Sadchenko, A., Fér, M., Ackermanová, M., Nikodem, A., Roztočilová, H., Švecová, H., Klement, A., Válek, P., Mikl, L., Grabic, R., (2025a). Mapy výskytu látek v půdním a vodním prostředí pro emergentní organické mikropolutanty: 1,3-diphenylguanidin, triethylcitrát, kyselina naftalen-2-sulfonová, kyselina benzo(d)thiazol-2-sulfonová, 4-acetamidoantipyrin, 6:2 fluorotelomersulfonová kyselina. Český hydrometeorologický ústav, ISBN 978-80-7653-086-7 (online.pdf)..... <https://www.chmi.cz/documents/42501/55105/ISBN+978-80-76530867.pdf/54634f89-4231-2a18-9d90-11513ea29471?t=1767768924424>
- Kodeš, V., Kodešová, R., Sadchenko, A., Fér, M., Kočárek, M., Nikodem, A., Švecová, H., Klement, A., Zelinka, J., Grabic, R. Ackermanová, M., (2025b). Mapy mobility látek v půdním prostředí a specifické zranitelnosti podzemních vod pro emergentní organické mikropolutanty: 1,3-diphenylguanidin, triethylcitrát, kyselina naftalen-2-sulfonová, kyselina benzo(d)thiazol-2-sulfonová, 4-acetamidoantipyrin, 6:2 fluorotelomersulfonová kyselina. Český hydrometeorologický ústav, ISBN 978-80-7653-085-0 (online.pdf)..... <https://www.chmi.cz/documents/42501/55105/ISBN+978-80-7653-085-0.pdf/a73f048c-b828-0f4e-7ac0-c10e7033435d?t=1767768923675>
- Kodešová R., Sadchenko A., Kočárek M., Fér M., Švecová H., Klement A., Nikodem A., Zelinka J., Kučírek M., Pavlů L., Kodeš V., Grabic R. (2026): Potential of micropollutants originated from irrigation water to contaminate soil and groundwater. *Soil and Water Research*. <https://doi.org/10.17221/35/2026-SWR>
- Krauss, M., Singer, H., & Hollender, J. (2010). LC-high resolution MS in environmental analysis: From target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *397*, 943–951.
- Leendert, V., Van Langenhove, H., & Demeestere, K. (2015). Trends in liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry for multi-residue analysis of organic micropollutants in aquatic environments. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *67*, 192–208.
- Lennon, S., Chaker, J., Price, E. J., Hollender, J., Huber, C., Schulze, T., ... David, A. (2024). Harmonized quality assurance/quality control provisions to assess completeness and robustness of MS1 data preprocessing for LC-HRMS-based suspect screening and non-targeted analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *174*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117674>
- Liigand, J., Wang, T., Kellogg, J., Smedsgaard, J., Cech, N., & Krueve, A. (2020). Quantification for non-targeted LC/MS screening without standard substances. *Scientific Reports*, *10*, 1–10.
- Malm, L., Liigand, J., Aalizadeh, R., Alygizakis, N., Ng, K., Frøkjær, E. E., ... Krueve, A. (2024). Quantification Approaches in Non-Target LC/ESI/HRMS Analysis: An Interlaboratory Comparison. *Analytical Chemistry*, *96*, 16215–16226.

- Meekel, N., Krueve, A., Lamoree, M. H., & Been, F. M. (2025). Machine Learning-based Classification for the Prioritization of Potentially Hazardous Chemicals with Structural Alerts in Nontarget Screening. *Environmental Science and Technology*, *59*, 5056–5065.
- Menger, F., Ahrens, L., Wiberg, K., & Gago-Ferrero, P. (2021). Suspect screening based on market data of polar halogenated micropollutants in river water affected by wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, *401*, 123377.
- Menger, F., Gago-Ferrero, P., Wiberg, K., & Ahrens, L. (2020). Wide-scope screening of polar contaminants of concern in water: A critical review of liquid chromatography-high resolution mass spectrometry-based strategies. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, *28*, e00102.
- Mikušová, P., Toušová, Z., Sehnal, L., Kuta, J., Grabicová, K., Fedorova, G., ... Hilscherová, K. (2024). Identification of new endocrine disruptive transthyretin ligands in polluted waters using pull-down assay coupled to non-target mass spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, *471*, 134240.
- Mikušová, P., Toušová, Z., Smutná, M., Grabicová, K., Grabic, R., Singer, A. C., ... Hilscherová, K. (2025). Effect-based and (non-)target chemical analyses reveal concerning levels of emerging contaminants in urban streams in Sub-Saharan Africa. *Journal of Hazardous Materials*, *497*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.139654>
- Milman, B. L., & Zhurkovich, I. K. (2017). The chemical space for non-target analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *97*, 179–187.
- Müller, A., Schulz, W., Ruck, W. K. L., & Weber, W. H. (2011). A new approach to data evaluation in the non-target screening of organic trace substances in water analysis. *Chemosphere*, *85*, 1211–1219.
- Novák, P., Kulhavý, Z., Pelíšek, I., Podhrázká, J., Novotný, I., Skokanová, E., Batysta, M., Marval, Š., Podhrázký, A., Berka, M., Khel, T., Papaj, V., Holub, J., Karásek, P. (2016): Studie ověření stavu závlahových systémů a jejich inventarizace. VÚMOP v.v.i., 52 s.
- Nováková, P., Kodešová, R., Fedorova, G., Bořík, A., Sadchenko, A., & Grabic, R. (2024). Identifying organic micropollutants' transformation products from the soil dissipation experiment by non-targeted high-resolution mass spectrometry approach: Can we gain more than transformation product identity? *Environmental Pollution*, *351*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124038>
- Nováková, P., Švecová, H., Bořík, A., & Grabic, R. (2023). Novel nontarget LC-HRMS-based approaches for evaluation of drinking water treatment. *Environmental Monitoring and Assessment*, *195*. <https://doi.org/10.1007/s10661-023-11348-w>
- Peets, P., Rian, M. B., Martin, J. W., & Krueve, A. (2024). Evaluation of Nontargeted Mass Spectral Data Acquisition Strategies for Water Analysis and Toxicity-Based Feature Prioritization by MS2Tox. *Environmental Science and Technology*, *58*, 17406–17418.
- Peng, H., Sun, J., Alharbi, H. A., Jones, P. D., Giesy, J. P., & Wiseman, S. (2016). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ is a Sensitive Target for Oil Sands Process-Affected Water: Effects on Adipogenesis and Identification of Ligands. *Environmental Science and Technology*, *50*, 7816–7824.
- Peter, K. T., Phillips, A. L., Knolhoff, A. M., Gardinali, P. R., Manzano, C. A., Miller, K. E., ... Sobus, J. R. (2021). Nontargeted Analysis Study Reporting Tool: A Framework to Improve Research Transparency and Reproducibility. *Analytical Chemistry*, *93*, 13870–13879.
- Petrie, B., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, *72*, 3–27.

- Schulze, B., Heffernan, A. L., Samanipour, S., Gomez Ramos, M. J., Veal, C., Thomas, K. V., & Kaserzon, S. L. (2023). Is Nontarget Analysis Ready for Regulatory Application? Influence of Peak-Picking Algorithms on Data Analysis. *Analytical Chemistry*, *95*, 18361–18369.
- Schulze, B., Jeon, Y., Kaserzon, S., Heffernan, A. L., Dewapriya, P., O'Brien, J., ... Samanipour, S. (2020). An assessment of quality assurance/quality control efforts in high resolution mass spectrometry non-target workflows for analysis of environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *133*, 116063.
- Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H. P., & Hollender, J. (2014). Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. *Environmental Science and Technology*, *48*, 2097–2098.
- Sousa, J. C. G. G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. T. (2018). A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of Hazardous Materials*, *344*, 146–162.
- Verkh, Y., Rozman, M., & Petrovic, M. (2018). A non-targeted high-resolution mass spectrometry data analysis of dissolved organic matter in wastewater treatment. *Chemosphere*, *200*, 397–404.
- Vrana, B., Urík, J., Fedorova, G., Švecová, H., Grabicová, K., Golovko, O., ... Grabic, R. (2021). In situ calibration of polar organic chemical integrative sampler (POCIS) for monitoring of pharmaceuticals in surface waters. *Environmental Pollution*, *269*, 116121.
- Wang, W. C., Amini, N., Huber, C., Kull, M., & Krueve, A. (2025). Active Learning Improves Ionization Efficiency Predictions and Quantification in Nontargeted LC/HRMS. *Analytical Chemistry*, *97*, 13131–13139.
- Xia, Y. Q., Lau, J., Olah, T., & Jemal, M. (2011). Targeted quantitative bioanalysis in plasma using liquid chromatography/high-resolution accurate mass spectrometry: an evaluation of global selectivity as a function of mass resolving power and extraction window, with comparison of centroid and profile masses. *Rapid Communications in Mass Spectrometry : RCM*, *25*, 2863–2878.
- Zákon č. 25/2008 Sb. Zákon o integrovaném registru znečišťování životního prostředí a integrovaném systému plnění ohlašovacích povinností v oblasti životního prostředí a o změně některých zákonů (autorský zákon).
- Zedda, M., & Zwiener, C. (2012). Is nontarget screening of emerging contaminants by LC-HRMS successful? A plea for compound libraries and computer tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *403*, 2493–2502.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

Grabic R., Sadchenko A., Nováková P., Kodeš V., Kodešová R., 2025. Ovlivňují závlahy kvalitu podzemních vod v zavlažovaných oblastech? Identifikace nových relevantních polutantů pomocí HPLC/HRMS. Voda 2025, Litomyšl, 15. - 17.09.2025, Sborník přednášek a posterových sdělení, s. 338-342.

Grabicová, K., Švecová, H., Kodeš, V., Grabic, R., 2024 Pasivní vzorkování a aplikace necílené LC-HRMS analýzy pro identifikaci nových emergentních látek v povrchových vodách. Vodní hospodářství, ročník 74, číslo 7-8/2024, str. 2-5. ISSN: 1211-0760.

Kodeš, V., Kodešová, R., Sadchenko, A., Fér, M., Ackermanová, M., Nikodem, A., Roztočilová, H., Švecová, H., Klement, A., Válek, P., Mikl, L., Grabic, R., (2025a). Mapy výskytu látek v půdním a vodním prostředí pro emergentní organické mikropolutanty: 1,3-diphenylguanidin, triethylcitrát, kyselina naftalen-2-sulfonová, kyselina benzo(d)thiazol-2-sulfonová, 4-acetamidoantipyrin, 6:2 fluorotelomersulfonová kyselina Specializovaná mapa s odborným obsahem, ČHMÚ, s. 44. ISBN 978-80-7653-086-7.

Kodeš, V., Kodešová, R., Sadchenko, A., Fér, M., Kočárek M., Nikodem, A., Švecová, H., Klement, A., Zelinka, J., Grabic, R., Ackermanová, M., (2025b). Mapy mobility látek v půdním prostředí a specifické zranitelnosti podzemních vod pro emergentní organické mikropolutanty: 1,3-diphenylguanidin, triethylcitrát, kyselina naftalen-2-sulfonová, kyselina benzo(d)thiazol-2-sulfonová, 4-acetamidoantipyrin, 6:2 fluorotelomersulfonová kyselina. Specializovaná mapa s odborným obsahem, ČHMÚ, s. 30. ISBN 978-80-7653-085-0.

Kodešová, R., Sadchenko, A., Kočárek, M., Fér, M., Švecová, H., Klement, A., Nikodem, A., Zelinka, J., Kučírek, M., Pavlů, L., Kodeš, V., & Grabic, R. (2026). Potential of micropollutants originated from irrigation water to contaminate soil and groundwater. *Soil and Water Research*, v redakci.

Nováková, P., Kodešová, R., Fedorova, G., Bořík, A., Sadchenko, A., & Grabic, R. (2024). Identifying organic micropollutants' transformation products from the soil dissipation experiment by non-targeted high-resolution mass spectrometry approach: Can we gain more than transformation product identity? *Environmental Pollution*, 351. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124038>

Sadchenko, A., Nováková, P., Klement, A., Fér, M., Nikodem, A., Kodeš, V., Kodešová, R., & Grabic, R. (2026). Discovering complex pesticide pollution in river water irrigated soils/groundwater systems: From targeted analyses to non-targeted screening and back. *Soil and Water Research*, submitted.

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu na rozvoj výzkumné organizace č. **QK23020018** s názvem „Co nevíme o organickém znečištění zdrojů pitné a závlahové vody: Identifikace emergentních sloučenin pomocí necíleného screeningu“.

Externí odborný oponent

doc. Ing. Branislav Vrana, Ph.D.

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Centrum RECETOX, Kamenice 753/5, 625 00 Brno

Interní odborný oponent

doc. RNDr. Andrea Vojs Staňová, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Zátíší 728/II, 389 01 Vodňany, www.frov.jcu.cz

Oponent za státní správu

Ing. Ondřej Tomášek

Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Osvědčení o uplatnění certifikované metodice č. ze dne

Ministerstvo zemědělství, Odbor státní správy lesů, myslivosti a rybářství, Těšnov 65/17, 110 00 Praha 1

Adresa autorského kolektivu

doc. Mgr. Roman Grabic, Ph.D.

Ing. Petra Nováková, Ph.D.

MSc. Alina Sadchenko, Ph.D.

Ing. Helena Švecová, Ph.D.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz, Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 01 Vodňany

prof. Ing. Radka Kodešová, CSc.

Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Ústav pedologie a ochrany půdy, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6, Česká republika

Mgr. Vít Kodeš, Ph.D.

Český hydrometeorologický ústav, Oddělení jakosti vod, Na Šabatce 17, 143 06 Praha 4, Česká republika

V edici Metodik (technologická řada) vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, www.frov.jcu.cz; přidělený editor: doc. Ing. Antonín Kouba, Ph.D.; redakce: Zuzana Dvořáková; náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2026; publikace je dostupná online; grafický design a technická realizace: Jesenické nakladatelství Jena Šumperk