

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



Vývoj LC-MS metody pro stanovení vybraných endokrinních disruptorů

Diplomová práce

Eliška Chvalková

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Martin Novák

Hradec Králové 2022

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Všechna literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 10.5.2022

.....

Eliška Chvalková

Poděkování

Ráda bych poděkovala především Mgr. Martinu Novákovi za odborné vedení a cennou pomoc v průběhu vypracování práce a doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za potřebnou pomoc a vstřícnost při zpracování mé diplomové práce.

Dále děkuji Centru biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové za umožnění vypracování experimentální části práce na jejich pracovišti.

Finanční podpora

SVV 260 547

Seznam použitých zkratek.....	8
1 ÚVOD.....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Endokrinní disruptory (ED).....	11
2.1.1 Parabeny.....	13
2.1.2 Ftaláty.....	14
2.1.3 Bisfenol A.....	16
2.1.4 Triclosan.....	17
2.1.5 Polychlorované bifenyly.....	17
2.2 Plodová voda.....	18
2.3 Izolace z biologického materiálu.....	19
2.3.1 Extrakce kapalina-kapalina.....	20
2.4 Derivatizace.....	21
2.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	21
2.5.1 Separační módy.....	22
2.5.2 HPLC systém.....	24
2.6 Hmotnostní spektrometr.....	28
2.6.1 Ionizační techniky.....	28
2.6.2 Analyzátory MS.....	32
2.6.3 Detektory MS.....	35
3 CÍL PRÁCE.....	36
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
4.1 Metodická část.....	37
4.1.1 Chemikálie a přístrojová vybavení.....	37
4.1.2 Příprava roztoků.....	39
4.1.3 Úprava vzorku před analýzou.....	41
4.1.4 Experiment uvolňování disruptorů z laboratorních pomůcek.....	44

5	Výsledky a diskuse	46
5.1.1	Optimalizace úpravy vzorku před analýzou	46
5.1.2	Optimalizace chromatografických podmínek	50
5.1.3	Souhrn optimalizovaných parametrů HPLC-MS metody	63
5.1.4	Experiment uvolňování disruptorů z použitých laboratorních pomůcek	65
6	ZÁVĚR.....	68
	Přílohy.....	76

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Eliška Chvalková

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: Mgr. Martin Novák

Název diplomové práce: Vývoj LC-MS metody pro stanovení vybraných endokrinních disruptorů

Diplomová práce je zaměřena na vývoj a optimalizaci LC–MS metody pro stanovení dvanácti endokrinních disruptorů v plodové vodě u těhotných žen ve třetím trimestru těhotenství. U těchto žen existuje podezření výskytu předčasných porodů v souvislosti se zvýšeným výskytem endokrinních disruptorů v plodové vodě.

Jako extrakční metoda pro izolaci analytů z plodové vody byla vybrána extrakce z kapaliny do kapaliny pomocí 4-methylpentan-2-onu. Pro separaci byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému reverzních fází s kolonou Hypersil C4 GOLD (2,1 × 100 mm, částice 1,9 μm). Pro analýzu byla využita gradientová eluce s mobilní fází A (0,5% (v/v) vodný roztok kyseliny mravenčí) a B (0,5% (v/v) roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu) při průtoku 0,5 ml/min, nástřiku 5 μl a 35 °C v kolonovém termostatu. K identifikaci stanovení odezvy jednotlivých analytů byl využit vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr Orbitrap Q Exactive Plus s chemickou ionizací za atmosférického tlaku v pozitivním módu.

Optimalizovaná metoda byla následně využita pro test uvolňování endokrinních disruptorů z laboratorních pomůcek. Z pipetovacích špiček došlo k uvolnění methylparabenu a bis(2-ethylhexyl)-ftalátu a z eppendorf zkumavek k uvolnění methylparabenu, bis(2-ethylhexyl)-ftalátu a diisonyl ftalátu.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Eliška Chvalková

Supervisor: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Consultant: Mgr. Martin Novák

Title of thesis: Development of LC-MS method for determination of selected endocrine disruptors

The thesis is focused on the development and optimization of LC-MS method for the determination of twelve endocrine disruptors in amniotic fluid of pregnant women in the third trimester of pregnancy. There is a suspicion that premature births are connected with an increased incidence of endocrine disruptors in amniotic fluid.

The analytes were extracted by liquid-liquid extraction with 4-methylpentan-2-one. The analytical method is based on using reverse phase high-performance liquid chromatography with Hypersil C4 GOLD column (2.1 × 100 mm, particles 1.9 μm). For analysis the gradient elution with the mobile phase A (0.5% (v/v) formic acid aqueous solution) and B (0.5% (v/v) formic acid solution in acetonitrile) at a flow rate of 0.5 ml/min, injection 5 μl and column oven temperature 35 °C was used. The high-resolution mass spectrometer Orbitrap Q Exactive Plus with atmospheric pressure chemical ionization in positive mode was used to identify and determine the response of individual analytes.

Then the optimized method was used to test the release of endocrine disruptors from laboratory equipment. The test confirmed that methylparaben and bis(2-ethylhexyl)-phthalate were released from pipette tips and methylparaben, bis(2-ethylhexyl)-phthalate and diisonyl phthalate from eppendorf test tubes.

Seznam použitých zkratek

1-Buta	butan-1-ol
2-Buta	butan-2-ol
2m-THF	2-methyl-tetrahydrofuran
AC	aceton
ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionization)
BPA	bisfenol A
Cif	chloroform
DBP	dibutyl ftalát
Dcm	dichlormethan
DEHP	bis(2-ethylhexyl)-ftalát
DINP	di-isononyl ftalát
Ea	ethylacetát
ED	endokrinní disruptor
EI	elektronová ionizace
ELSD	detektor rozptylu světla odpařováním (evaporative light scattering detector)
EP	ethylparaben
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
EU	Evropská unie
Hex	hexan
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
LC-MS	spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií (Liquid chromatography–mass spectrometry)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (liquid–liquid extraction)
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice (matrix assisted laser desorption and ionization)
Mek	methylethylketon

MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MP	methylparaben
m-Penta	4-methylpentan-2-on
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
n-Hep	n-heptan
PBS	fosfátový pufr
PP	propylparaben
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
Tbme	tert-butyl methyl ether
TCS	triclosan
Thf	tetrahydrofuran
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)
Tol	toluen
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast spektra světla
v/v	objemová koncentrace
w/v	hmotnostně objemová koncentrace

1 ÚVOD

Diplomová práce se zabývá problematikou stanovení vybraných endokrinních disruptorů. V teoretické části se práce věnuje plodové vodě, izolaci vzorku z biologického materiálu, derivatizaci a základním principům vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru.

Endokrinní disruptory jsou exogenní chemické látky, které mění funkce endokrinního systému, a tím negativně působí na člověka i volně žijící zvířata. Studie naznačují, že v lidské populaci dochází za přítomnosti endokrinních disruptorů k narušení funkce mnoha důležitých hormonů, což je důvod, proč jsou právě disruptory spojovány s četnými nepříznivými účinky, jako je klesající počet a kvalita spermií, abnormality v pohlavních orgánech, raná puberta, změny funkcí nervového a imunitního systému, rostoucí případy určitých typů rakoviny a další. V některých případech jsou účinky způsobené endokrinním disruptorem pozorovány až dlouho po expozici. Příkladem může být jejich působení na plod v děloze, které může vést k ovlivnění zdraví nejen dospělého jedince, ale i budoucí generace. [1, 2]

Experimentální část práce se věnuje vývoji a optimalizaci metody pro stanovení dvanácti vybraných endokrinních disruptorů v plodové vodě. Pro stanovení endokrinních disruptorů byla vybrána metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která umožňuje rychlé, citlivé a selektivní stanovení složitých směsí látek.

Práce je součástí projektu Centra biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Cílem projektu je kvantitativně stanovit a porovnat hladiny endokrinních disruptorů v plodové vodě těhotných žen ve třetím trimestru v rámci různých anamnestických skupin rodiček. Projekt by měl odpovědět na otázku, zda endokrinní disruptory mohou vyvolat předčasný porod či nikoliv.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Endokrinní disruptory (ED)

Endokrinní disruptory jsou definovány podle U.S. Environmental Protection Agency (EPA) jako agens zasahující do syntézy, sekrece, transportu, vazby nebo eliminace hormonů přirozeně se vyskytujících v těle, které jsou zodpovědné za udržování homeostázy, reprodukce, vývoje a chování jedince. [3] Zjednodušeně lze říci, že endokrinní disruptory jsou exogenní chemikálie nebo chemické směsi, které narušují normální hormonální funkci.

Endokrinní disruptory jsou vysoce heterogenní skupinou, která může být rozdělena do dvou základních kategorií [4]:

- Přírodní chemikálie vyskytující se přirozeně v potravinách lidí a zvířat (např. fytoestrogeny obsahující genistein a kumestrol)
- Syntetické chemikálie, které lze zařadit do podskupin:
 - Průmyslová rozpouštědla, lubrikanty a jejich vedlejší produkty (např. polychlorované bifenyly (PCB), polybromované bifenyly, dioxiny)
 - Příměsi plastů (např. bisfenol A (BPA))
 - Změkčovadla (např. ftaláty)
 - Pesticidy (např. dichlordifenyltrichlorethan (DDT))
 - Fungicidy (např. vinklozolin)
 - Některé farmaceuticky účinné látky (např. diethylstilbestrol)

Lidé a zvířata přichází do kontaktu s ED nejčastěji konzumací potravy a vody, přes kůži, inhalací, přenosem z matky na plod přes placentu nebo z matky na kojence prostřednictvím laktace. V Tabulce 1 jsou uvedeny příklady zdrojů a cest expozice ED v lidském těle. [5]

Tabulka 1: Příklady expozice endokrinními disruptory u člověka. [5]

Cesta expozice ED	Zdroj ED	Příklady ED
Orální konzumace kontaminované potravin	Průmyslový odpad nebo pesticidy kontaminující půdu nebo podzemní vodu	PCB, dioxin, DDT
	Extrahování chemikálií z nádoby na potraviny nebo nápoje, zbytky pesticidů v potravinách	BPA, ftaláty, DDT
Kontakt s kůží nebo inhalace	Ošetřený nábytek retardéry hoření	bromované bifenyly
	Pesticidy používané v zemědělství, v domácnostech nebo pro kontrolu šíření vektoru onemocnění	DDT, vinklozolin, pyretroidy
Intravenózně	Intravenózní hadička	ftaláty
Aplikace na kůži	Některá kosmetika, antibakteriální přípravky, opalovací krémy, léky	ftaláty, triclosan, parabeny, repelenty
Biologický přenos z placenty	předchozí/aktuální expozice ED matky	nesčetné množství ED je detekováno v placentě
Biologický přenos z mateřského mléka	předchozí/aktuální expozice ED matky	nesčetné množství ED je detekováno v mateřském mléce

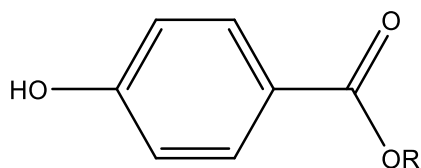
Vyvíjející se plod a děti jsou vysoce náchylné na vlivy životního prostředí a působení ED se může projevit až v pozdějším věku. Výzkum ukazuje, že takové expozice mohou zvýšit dispozici dítěte k několika nepřenosným chorobám v dospělosti. ED se mohou potenciálně zaměřit na různé cíle hormonálního systému v těle, nicméně bylo pozorováno, že účinek těchto chemikálií se primárně týká reprodukčního systému, puberty, embryonálního vývoje a pohlavní diferenciacie plodu. Je tedy pravděpodobné, že primární mechanismus jejich působení je interference s pohlavními steroidními hormony. Dále rostou obavy, že metabolicky podmíněná onemocnění mohou být spojena s ED. Několik *in vitro*, *in vivo* a epidemiologických studií poukazuje na skutečnost, že expozice člověka ED má spojitost s obezitou, diabetem 2. typu a pravděpodobně i s některými hormonálně dependentními nádory. [3, 6, 7, 8]

Jelikož se vědecké poznatky v této oblasti stále prohlubují, vyvíjí se v návaznosti i legislativa, s cílem omezit používání škodlivých chemických látek případně je nahradit bezpečnějšími alternativami. V Evropské unii je hlavním regulačním orgánem týkající se používání endokrinních disruptorů Evropská agentura pro chemické látky. Nařízení o registraci, evaluaci, autorizaci a omezování chemických látek (REACH) tvoří rámcovou legislativu

o chemických látkách v EU. Další významnou agenturou je Evropský úřad pro bezpečnost potravin, který poskytuje nezávislé vědecké poradenství a komunikuje o stávajících a nově vznikajících rizicích spojených s potravinami. [1, 9]

2.1.1 Parabeny

Parabeny jsou odvozeny od kyseliny *para*-hydroxybenzoové a liší se od sebe typem substituentu (Obrázek 1). Substituent může být buď alkylový řetězec, nebo aromatický kruh. Parabeny se často používají v malém množství jako konzervační látky v kosmetice, produktech osobní hygieny, léčivech, potravinách, nápojích. Dále jsou vysoce účinné při prevenci růstu plísní, bakterií a kvasinek. Přispívají rovněž přímo ke kvalitě výrobků tím, že prodlužují jejich trvanlivost. Běžně používané parabeny jsou methylparaben, ethylparaben, propylparaben a butylparaben. [10, 11].



Obrázek 1: Obecný vzorec parabenů.

Ode dne 16. října 2015 přijala Evropská komise nařízení č. 1004/2014, které říká, že na evropský trh mohou být dodávány pouze takové kosmetické přípravky, které jsou v souladu s tímto nařízením. Nařízením Komise (EU) byly zakázány parabeny s dlouhým řetězcem (isopropylparaben, isobutylparaben, fenylparaben, benzylparaben a pentylparaben), zároveň Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitele potvrdil, že methylparaben (MP) a ethylparaben (EP) jsou při nejvyšších povolených koncentracích bezpečné. Příloha pět tohoto nařízení stanovuje nejvyšší koncentraci MP a EP 0,4 hmotnostních procent (jako kyselina) pro jeden ester v přípravku a souhrn jednotlivých koncentrací 0,8 hmotnostních procent (jako kyselina) pro směsi esterů v přípravku. Butylparaben a propylparaben se nesmí používat v přípravcích, které se neoplachují a jsou určeny k ošetření pokožky v oblasti pleny u dětí mladších 3 let. Jednotlivé koncentrace těchto parabenů a jejich solí nepřesahují souhrn jednotlivých koncentrací 0,14 hmotnostních procent. [12]

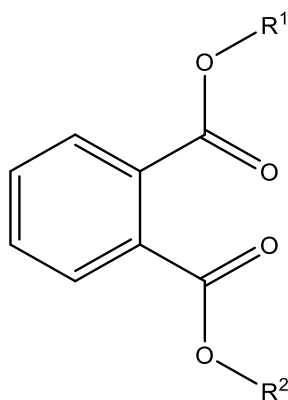
Aktuální nařízení pro použití parabenů v potravinách je Nařízení komise (EU) č.1129/2011. V potravinách se smí používat pouze MP, EP a jejich sodné soli. Maximální povolená množství se pohybují mezi 300–1500 mg/kg. Žádné další parabeny nejsou pro použití v potravinářství schváleny. [13] Evropský úřad pro bezpečnost potravin stanovil celkový přijatelný denní příjem pro MP, EP a soli v celkové výši 0-10 mg/kg tělesné hmotnosti. [14] Zároveň v roce 2015 Evropská agentura pro léčivé přípravky oznámila důkazy o nepříznivých zdravotních účincích souvisejících s příjmem PP při příjmu 1,25 mg/kg tělesné hmotnosti. [15]

V rámci legislativy existuje evropské regulace týkající se obsahu parabenů v kosmetice pro děti do tří let (viz výše), neexistuje však nařízení týkající se jeho užívání těhotnými ženami. Dosavadní studie ukazují potenciální riziko účinku parabenů jakožto endokrinního disruptoru u dětí a plodů. [16]

Během těhotenství je plod vystaven chemikáliím z mateřské krve přes placentu. Placentární transport různých chemických látek mezi mateřskou a fetální krví se liší podle vlastností, náboje molekul a jejich rozpustnosti ve vodě. Předpokládá se, že MP, EP, PP prostupují lidskou placentou pasivní difúzí. [17] Dále epidemiologické studie spojují prenatální expozici parabenů s hmotností placenty a růstem plodu a naznačují, že prenatální expozice může přispět k rozvoji dětské obezity. [18]

2.1.2 Ftaláty

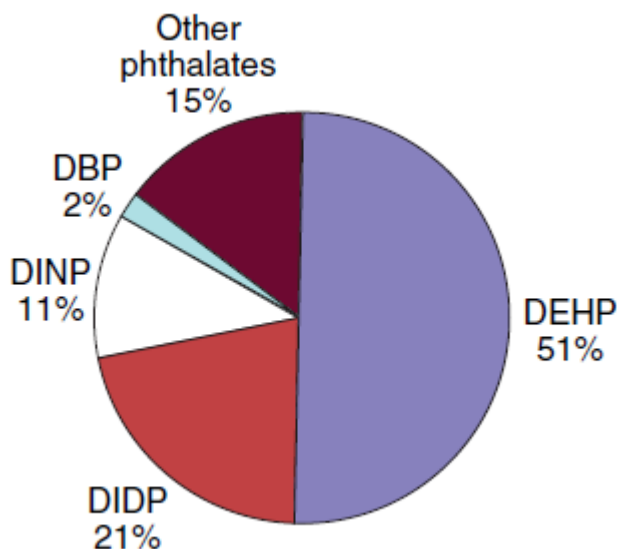
Ftaláty jsou estery kyseliny ftalové (Obrázek 2), používané především jako změkčovadla při výrobě plastů. Některé ftaláty se též používají k rozpouštění jiných materiálů a najdeme je ve stovkách produktů, jako jsou vinylové podlahy, hračky, nebo produkty osobní péče (mýdla, šampony, laky na vlasy). [19, 20]



Obrázek 2: Obecný vzorec ftalátů.

Z desítek ftalátů syntetizovaných v průběhu let jsou v západní Evropě nejvíce používané bis(2-ethylhexyl)-ftalát (DEHP), diisodecyl ftalát (DIDP), diisononyl ftalát (DINP), dibutyl ftalát (DBP) (Obrázek 3). [21]

Existují studie, které potvrzují vliv ftalátů na vývoj plodu. Dle čínské studie publikované v roce 2021 zvyšuje prenatální expozice ftaláty (konkrétně DBP a DEHP) riziko nízké porodní hmotnosti. [22] Taktéž studie z roku 2003, která sledovala množství DEHP v pupečnickové krvi zjistila souvislost mezi zvýšeným množstvím DEHP s rizikem předčasného porodu. [23]



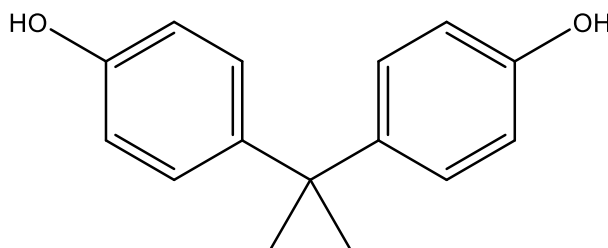
Obrázek 3: Nejpoužívanější ftaláty v Evropské unii v 90. letech 20. století. [21]

Komise (EU) přijala 17. prosince 2018 nařízení č 2018/2005, které omezuje používání bis(2-ethylhexyl)-ftalátu, diisobutyl ftalátu, dibutyl ftalátu a benzylbutyl ftalátu z důvodu prokázané reprodukční toxicity. Tyto látky se

nesmí používat v koncentraci rovné nebo vyšší než 0,1 hmotnostních procent v měkčených plastových materiálech v hračkách a předmětech pro péči o děti. Nařízení se nevztahuje na předměty upravené jinými právními předpisy Unie, jako jsou například materiály a předměty určené pro styk s potravinami, zdravotnické prostředky nebo vnitřní obaly léčivých přípravků. [24]

2.1.3 Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) (Obrázek 4) je hlavní složkou epoxidu a polykarbonátu pryskyřice, které jsou široce používány jako přísady v ochranných nátěrech na nádoby na potraviny a jako lepidla v obalových materiálech. Dále je široce používán ve výrobě zdravotnického vybavení, kontaktních a brýlových čoček nebo hraček. [25]



Obrázek 4: Bisfenol A.

BPA je chemikálie schopná vázat se na lidský estrogenový receptor a aktivovat jej, a taktéž se chová jako antagonistu androgenních receptorů [25]. Kromě toho se ukázalo, že BPA interaguje s jinými endokrinními receptory, např. receptory hormonů štítné žlázy nebo jaderným receptorem PPAR γ . [3]

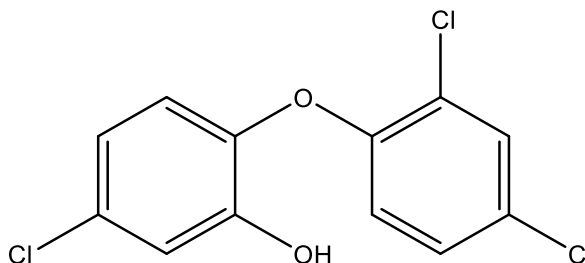
Bylo prokázáno, že BPA hraje roli v patogenezi několika endokrinních poruch včetně ženské a mužské neplodnosti, předčasné puberty, hormonálně závislých nádorů, jako je rakovina prsu a prostaty, a několika metabolických poruch. [3]

V nařízení č. 2018/213 komise (EU) pojednává o použití bisfenolu A v lacích a nátěrových hmotách určených pro styk s potravinami a o změně použití uvedené látky v materiálech z plastů určených pro styk s potravinami. Na základě tohoto nařízení je zakázáno použití této látky při výrobě polykarbonátových kojeneckých lahví. Zároveň byl stanoven specifický migrační limit (nejvyšší povolená hodnota specifické migrace látky ve výrobku do

potravin) pro materiály a předměty z plastu ve výši 0,05 mg BPA na kg potravin. [26]

2.1.4 Triclosan

Triclosan (TCS), systematicky 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxy-difenyl ether (Obrázek 5), je chemická látka s antibakteriálními vlastnostmi. Již více než 30 let se používá ve spotřebních výrobcích, jako jsou detergenty, mýdla, přípravky na čištění pokožky, deodoranty, pleťové vody, krémy, zubní pasty a prostředky na mytí nádobí, jako látka zabraňující růstu choroboplodných zárodků bakterií a plísní. Taktéž lze triclosan přidat do jiných materiálů, jako jsou textilie, aby byly odolné vůči růstu bakterií. [27, 28]



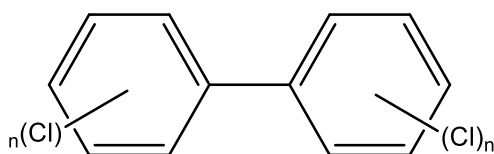
Obrázek 5: Triclosan.

Nařízení komise (EU) č. 358/2014 stanovuje koncentraci triclosanu jako konzervační přísady v kosmetických přípravcích nejvýše 0,3 % s výjimkou ústních vod, kde nejvyšší koncentrace v přípravku připravenému k použití je 0,2 %. [29]

2.1.5 Polychlorované bifenyly

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou aromatické, syntetické chemikálie, které se nevyskytují přirozeně v prostředí. Skládají se z bifenylové struktury se dvěma vázanými benzenovými kruhy, na kterých jsou některé nebo všechny atomy vodíku substituovány atomy chlóru (Obrázek 6). [30]

PCB se začaly vyrábět ve 30. letech 20. století v USA a vyráběly se až do zákazu výroby v roce 1979. Díky své nehořlavosti, chemické stabilitě, vysokému bodu varu a elektrickým izolačním vlastnostem byly PCB používány ve stovkách průmyslových a komerčních aplikací, jako například dielektrické izolátory, aditiva v barvách, plastech, lacích a pryžových výrobcích, hydraulických zařízeních, či teplotních médiích. [30, 31]



Obrázek 6: Obecný vzorec polychlorovaných bifenyľů.

Ačkoliv se v současné době PCB již nevyrábí, stále se vyskytují ve vzduchu, půdě, sedimentech či potravinách. Nejvíce emisí pochází z odpadů s PCB (hlavně ze skladování, nelegálního nakládání a spalování). Dále se PCB uvolňují z transformátorů či kondenzátorů při přehřátí nebo explozi. [32]

O odstraňování polychlorovaných bifenyľů a polychlorovaných terfenyľů pojednává směrnice Rady ze dne 16. září 1996. Rada členským státům uděluje povinnost evidovat zařízení obsahující PCB a stanovuje technické požadavky na nakládání s PCB a dekontaminaci. [33]

In vitro bylo prokázáno, že PCB fungují jako antiandrogeny. Není ovšem zřejmé, jaké konkrétní důsledky z tohoto působení plynou. [25] Nicméně bylo pozorováno intelektuální postižení u dětí vystavených PCB v prenatálním věku. Nejvíce exponované děti měly třikrát vyšší pravděpodobnost, že budou mít nízké průměrné skóre IQ. [34]

2.2 Plodová voda

Plodová voda je komplexní a dynamické prostředí, jehož složení se s postupem těhotenství mění. Skládá se z 99 % z vody, zbylé procento jsou hlavně proteiny, tuky, glukóza, elektrolyty a močové látky. [35] Obsahuje živiny a růstové faktory, které usnadňují růst plodu. Její další funkcí je poskytovat mechanickou ochranu před zraněním zvenčí tlumením náhlých úderů nebo pohybů [36, 37], regulovat teplotu, bojovat s infekcemi, odrazovat od kontrakcí a zachovávat délku a konzistenci děložního hrdla. [38] Dále se u plodu podílí na nácviku dýchání a pohybu kosterního svalstva. [38]

Objem plodové vody přímo koreluje s perinatální mortalitou a mnoha závažnými chorobami. Vysoké množství plodové vody se nazývá polyhydramnion a příčinou často jsou malformace centrálního nervového systému, neuromuskulární poruchy, infekce parvovirem, maternální diabetes mellitus a mnoho dalších onemocnění. [39] Naopak snížené množství plodové

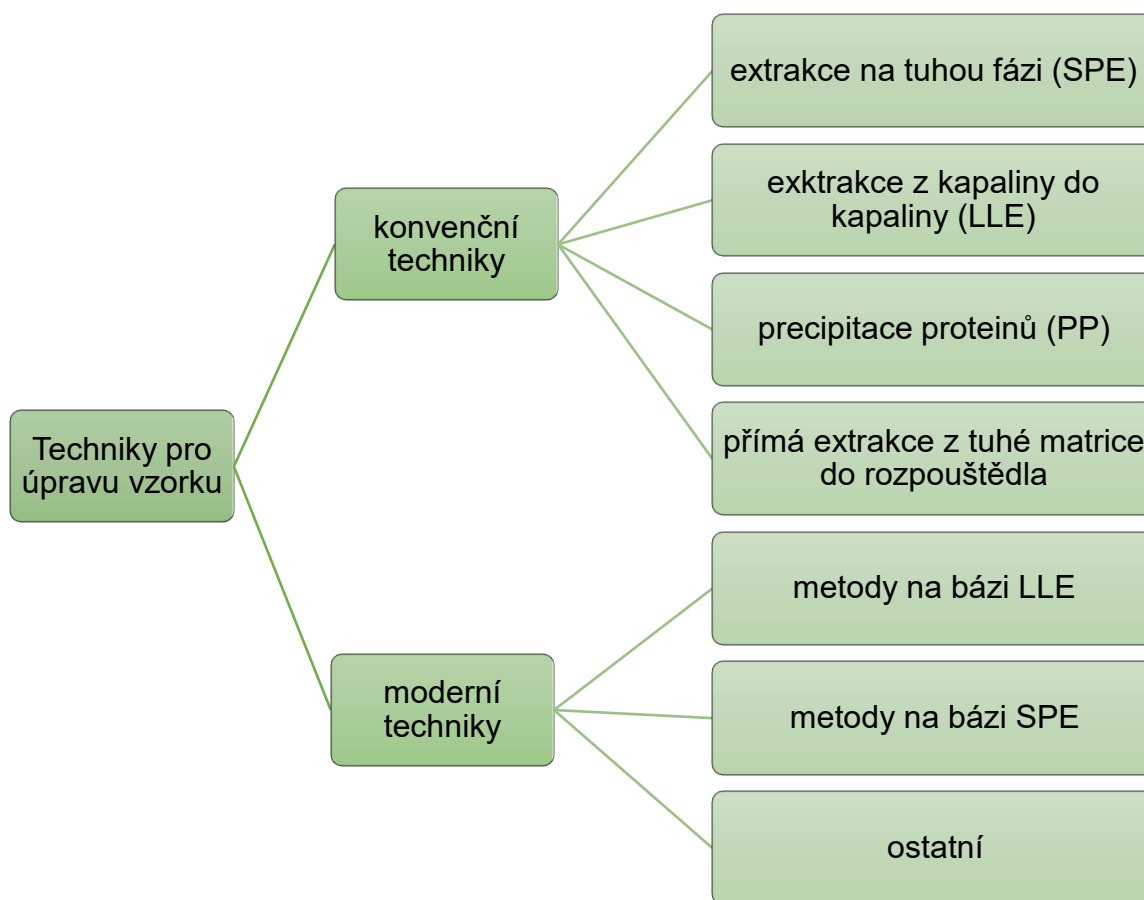
vody se nazývá oligohydramnion a vyskytuje se často při ruptuře vaku blan, vrozených vadách močového traktu, placentární insuficienci nebo u těžkých srdečních onemocnění. [40]

Koncentrace xenobiotik detekovaných v plodové vodě jsou obvykle nižší než v mateřské krvi a obtížně detekovatelné pomocí konvenčních metod. Pokročilá analytická chemie však v současné době již poskytuje citlivé metody pro kvalitativní a kvantitativní detekci těchto sloučenin, a to i ve stopových hladinách (pg-ng/ml). Jednou z nejvhodnějších využitelných technik je hmotnostní spektrometrie. Použití plodové vody pro hodnocení expozice endokrinních disruptorů je stále do značné míry neprozkoumané. [41]

2.3 Izolace z biologického materiálu

Úprava vzorku před analýzou je nezbytnou součástí chromatografických a spektroskopických analýz. Cílem je získat vzorek bez interferujících látek se stanovovanou látkou, který je kompatibilní s danou analytickou metodou.

Základní techniky úpravy vzorku jsou precipitace proteinů, extrakce z kapaliny do kapaliny a extrakce na tuhou fázi. Další metody úpravy vzorku většinou vychází z těchto základních metod (Obrázek 7).



Obrázek 7: Základní rozdělení technik úpravy vzorku. [42]

2.3.1 Extrakce kapalina-kapalina

Principem extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) je separace analytu mezi dvě nemísitelné kapaliny. Jedna fáze LLE je obvykle vodná a druhá fáze je organické rozpouštědlo (např. hexan, diethylether, chloroform). Použití organického rozpouštědla nesmí být mísitelné s vodou, musí mít podobnou polaritu jako analyt a musí s ním interagovat. Zároveň rozpouštědlo nesmí s analyzovanou látkou reagovat, musí být těkavé a mít odpovídající čistotu. Zlepšení výtěžnosti je možné změnou organického rozpouštědla (resp. směsí org. rozpouštědel), zvýšením objemu organické fáze, opakováním extrakce nebo derivatizací. Mezi fázemi může přecházet pouze neionizovaný analyt, proto je potřeba pro látky s acidobazickými vlastnostmi upravit pH, případně přidat iontově-párové činidlo. Výhodou LLE je jednoduchost a nenáročnost na provedení a laboratorní vybavení. Extrakce má poměrně dobrou výtěžnost a je dobře reprodukovatelná. Je vhodná jak pro extrakci malých, tak velkých molekul

a zároveň tato metoda umožňuje zakoncentrování vzorku díky možnosti odpaření organického rozpouštědla a následné rekonstituce. Naproti tomu je LLE relativně pracná při velkém množství vzorků, špatně automatizovatelná a polární látky mají nízkou výtěžnost. [43, 44, 45]

Postup LLE:

1. třepání biologického vzorku s organickým rozpouštědlem (analyt se extrahuje do příslušné vrstvy)
2. centrifugace (oddělení nemísitelných fází)
3. odebrání alikvotní části
4. odpaření rozpouštědla (proudem dusíku, zahříváním, využitím vakua)
5. rekonstituce vzorku

2.4 Derivatizace

Derivatizace zahrnuje chemickou reakci mezi analytem a derivatizačním činidlem za účelem změny chemických a fyzikálních vlastností analytu. Hlavním důvodem pro přístup k derivatizaci je zlepšení detekovatelnosti, změna molekulární struktury nebo polariry pro lepší chromatografii či stabilizace analytu.

Derivatizační techniky můžeme rozdělit podle toho, kde daná chemická reakce probíhá do tří kategorií (předkolonová, postkolonová derivatizace a derivatizace na koloně). [46]

V ideálním případě by derivatizační reakce měla být rychlá, kvantitativní a produkovat minimální vedlejší produkty. Přebytek činidla by neměl interferovat s analýzou anebo by měl být snadno odstranitelný z reakční matrice. [43]

2.5 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je analytická metoda používaná k separaci, identifikaci nebo kvantifikaci jednotlivých komponent ve směsi.

Separace je založena na přítomnosti dvou různých fází. Jedna fáze zajišťuje transport analytu a je označována jako mobilní fáze a druhá fáze je nehybná a obvykle se označuje jako fáze stacionární. Analyty jsou unášeny mobilní fází a princip separace je založen na rozdílných interakcích mezi těmito

fázemi. Při HPLC separaci hrají svou roli dva odlišné aspekty. Kinetický aspekt migrace chromatografické zóny zodpovídá za rozšíření zóny píku a termodynamický aspekt je zodpovědný za retenci analytu na koloně (tedy polohu píku na chromatogramu). Oba aspekty jsou důležité. Úspěšného oddělení jednotlivých analytů lze dosáhnout buď optimalizací účinnosti, změnou retence nebo změnou selektivity HPLC systému. [47, 48]

2.5.1 Separační módy

Chromatografie na normálních fázích: Mobilní fáze je zde tvořena nepolárními rozpouštědly (hexan, heptan, atd.) s malým přídavkem polárního modifikátoru (tj. ethanol, propan-2-ol). Jako stacionární fáze se obvykle používají porézní oxidy, jako je oxid křemičitý nebo oxid hlinitý. Povrch těchto stacionárních fází je pokryt hydroxylovými skupinami, které činí tyto povrchy vysoce polární. Stacionární fáze pro normální fázi chromatografie mohou být chemicky modifikované (např. modifikovaný trimethoxy glycidoxypropyl silan). HPLC s normální fází je metoda volby pro vysoce hydrofobní sloučeniny, které jsou nerozpustné v polárních nebo vodných rozpouštědlech. [48]

Chromatografie na reverzních fázích: Při chromatografii na reverzních fázích se využívá hlavně disperzních sil (hydrofobní, van der Waalsovy interakce). Polarity mobilních a stacionárních fáze jsou obráceny. Povrch stacionární fáze je u reverzní chromatografie hydrofobní a mobilní fáze je polární a z toho vyplývá, že za stejných podmínek bude hydrofobnější látka zadržována na koloně déle. Stacionární fáze použité v tomto způsobu chromatografie jsou porézní tuhé materiály s hydrofobním povrchem. [47] Většinu používaných stacionárních fází tvoří chemicky upravený porézní silikagel, zejména kvůli jeho výhodným vlastnostem (porozita, snadná derivatizace, mechanická stabilita, nestlačitelnost). Na HPLC s reverzní fází se provádí 90 % všech analýz vzorků s nízkou molekulovou hmotností. [48]

Iontově-výměnná chromatografie: Iontově výměnná chromatografie, jak už naznačuje její název, je založena na různých afinitách iontů analytu k opačně nabitým centrům stacionární fáze. V závislosti na náboji výměnných center rozlišujeme buď anex (má pozitivní náboj) nebo katex (nese negativní náboj).

Retence analytu a selektivita v iontově-výměnné chromatografii jsou silně závislé na pH a iontové síle mobilní fáze. [47]

Chromatografie hydrofilních interakcí: Hydrofilní interakční chromatografie využívá polární stacionární fáze ve spojení s mobilní fází obsahující polární rozpouštědlo (často acetonitril) v kombinaci s určitým množstvím vody (alespoň 2,5 % v/v, obvykle 5-40 % v/v). Stacionární fáze je většinou silikagel modifikovaný animoskupinou, amidem, diolem, cyklodextrinem, sacharidem nebo jinou polární funkční skupinou. Chromatografie hydrofilních interakcí nabízí alternativu k chromatografii na normálních fázích pro separaci polárních sloučenin. Retence je komplexní a zahrnuje navázání vody na povrch stacionární fáze a rozdělení analytu mezi tuto fázi a fázi mobilní. [46, 47]

Chirální chromatografie: Chirální separace se využívá u molekul, které mají shodný sumární a konstituční vzorec, ale liší se svým prostorovým uspořádáním. Enantiomery mají stejně fyzikálně-chemické vlastnosti. Zde se využívá dvou přístupů separace. Nepřímý přístup využívá chirální derivatizace, kde se enantiomery mění na diastereomery, které pak mohou být separovány pomocí chromatografie na normální či reverzní fázi. Druhý přístup spočívá ve vytvoření chirálního prostředí pomocí chirální stacionární fáze nebo chirálních aditiv mobilní fáze. [46]

Size-exclusion chromatografie: Jedná se o dynamickou separaci molekul podle jejich velikosti. Oddělení molekul je založeno na vyloučení molekul z porézního prostoru obalového materiálu v důsledku jejich velikosti. Hlavním určujícím faktorem retence je hydrodynamický poloměr molekuly analytu. Obecně platí, že čím větší je hydrodynamický poloměr, tím větší je molekulová hmotnost molekuly a tím kratší je retence (za předpokladu stejné stacionární fáze). Toto je jediný ze zmíněných separačních módů, kdy je třeba se vyhnout jakékoli interakci analytu se stacionární fází (pokud molekula interaguje se stacionární fází, může dojít ke zvýšení její retence, což může ovlivnit a narušit separaci molekul pouze na základě hydrodynamického poloměru). [47]

2.5.2 HPLC systém

Typický HPLC systém se skládá z následujících hlavních komponent:

Zásobník mobilní fáze: Umožňuje uchovávání dostatečného množství rozpouštědel pro kontinuální provoz systému. Pro izokratické analýzy je možno využít pouze jednoho zásobníku. Pro analýzy gradientové je nutno využít dva a více zásobníků pro jednotlivé mobilní fáze. [49, 50]

Vysokotlaká čerpadla: Vysokotlaká čerpadla zajišťují kontinuální a nepřetržitý tok mobilní fáze systémem za vysokého tlaku s minimem pulzací. Většina moderních čerpadel umožňuje řízené míchání různých rozpouštědel z různých zásobníků. [47]

Odplyňovač: Odplyňovač slouží v systému k odplynění mobilních fází (plyny v mobilní fázi způsobují kolísání základní linie a zvyšují šum signálu detektoru). [47]

Dávkovač: Dávkovač umožňuje zavedení směsi analytů do proudu mobilní fáze před tím, než vstoupí MF s nastříknutým analytem na kolonu. Moderní dávkovače (autosamplery) umožňují automatické nástřiky různých objemů vzorků, které jsou odebírány z vialok uložených v termostatovaném zásobníku.

Chromatografická kolona: Kolona je místo, kde dochází k separaci jednotlivých složek vzorku. Celý kolonový prostor je termostatován, protože teplota zásadně ovlivňuje retenci a selektivitu.

Detektor: Zde probíhá vlastní detekce analyzovaných látek. Žádný současný detektor není univerzální, nicméně současně dostupné detektory umožňují velmi široký rozsah aplikací. Pokud jsou součástí vzorku analyty se značně se lišícími fyzikálními vlastnostmi, může být nutné použít dva nebo více detektorů v sérii, aby bylo zajištěno, že každá sledovaná složka bude adekvátně detekována. [47].

Systém sběru dat a řízení: Počítačový systém s příslušným chromatografickým softwarem ovládá všechny moduly HPLC přístroje (složení eluentu, teplota, sekvence vzorků, vstřikování atd.). Získává data z detektoru a monitoruje výkon systému (nepřetržité sledování složení mobilní fáze, teplota, protitlak).

2.5.2.1 Stacionární fáze

V kapalinové chromatografii je uvnitř kolony sorbent, který nabízí vysoký poměr plochy povrchu k objemu, aby se zvýšila možnost interakce analytů se stacionární fází. Proto klíč k zvýšení účinnosti v kapalinové chromatografii je pochopení přenosu hmoty v porézních materiálech, odpovídající design a výroba náplňových a monolitických kolon. [48]

Náplňové kolony: Tyto kolony jsou naplněny malými porézními sférickými částicemi (1,3-5 μm).

Monolitické kolony: Monolitické kolony jsou tvořeny na rozdíl od náplňových kolon jediným kusem pórovitého materiálu, který zcela vyplňuje objem separační kolony. Sorbent je vysoce porézní skládá se ze dvou druhů pórů. Velké póry (makropóry) zabírají asi 80 % objemu kolony [49] a zajišťují rychlý konvektivní tok mobilní fáze. Středně velké póry (mesopóry) poté zajišťují dostatečně velký povrch pro vysokou separační kapacitu. [51, 52]

2.5.2.1.1 Základní materiály pro výrobu sorbentu

Silikagel: Hydratovaný oxid křemičitý je nejčastěji používaný základní materiál, který má vysokou mechanickou stabilitu, vynikající fyzikálně-chemické vlastnosti povrchu a je kompatibilní s širokou škálou organických rozpouštědel. [48] Na povrchu silikagelu jsou silanolové skupiny Si-OH, které je možno modifikovat. Nevýhodou je jeho rozpustnost při pH 8 a vyšším.

Oxid zirkoničitý, hlinitý a titaničitý: Porézním materiálem jsou i další oxidy kovů. V současné době je hlavně používán oxid zirkoničitý, v menší míře poté oxid hlinitý a titaničitý. Oxid zirkoničitý je stabilní v celém rozsahu pH, ale jeho nevýhodou je relativně nízká reaktivita (obtížněji se navazují různé funkční skupiny na povrch), což výrazně omezuje výběr dostupných stacionárních fází. [51]

Polymery: Jedná se o zesíťované kopolymery nejčastěji styren-divinylbenzenu a methylmethakrylátu. Tyto materiály vykazují vysokou stabilitu pH a chemickou odolnost. Nejčastěji se polymerní stacionární fáze využívá v analýze proteinů a peptidů, jelikož u těchto analytů nehraje významnou roli mikroporozita náplně. [46, 49]

Grafitovaný uhlík: Jedná se o materiál tvořený plně porézními částicemi uhlíku. [47] Jeho výhodou je stabilita v celém rozmezí pH a do teploty 200 °C. Jeho tlaková stabilita je však pouze do 40 MPa. [52]

2.5.2.2 Detektory

Spektrofotometrické detektory (UV/VIS): Spektrometrický detektor je nejpoužívanější detektor v moderní kapalinové chromatografii. Tato zařízení mají pro mnohé rozpuštěné látky vysokou citlivost. Vzorky však musí absorbovat v UV/VIS oblasti (190-600 nm), aby mohly být detekovány. Absorbance dané látky přímo úměrná její koncentraci, molárnímu absorpčnímu koeficientu a šířce vrstvy vzorku, přes kterou záření prochází (Rovnice 1): [47, 53]

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$$

Rovnice 1: Lambert-Beerův zákon.

kde A je absorbance, I_0 je intenzita dopadajícího světla, I je intenzita procházejícího světla, ϵ je molární absorpční koeficient, b je tloušťka květy v cm a c je molární koncentrace roztoku. [53]

Fluorescenční detektory: Fluorimetr je velmi citlivý a selektivní detektor pro fluorescenční soluty. Měří se záření, které analyzovaná látka vyzáří po absorbování primárního (excitačního) záření. Mnoho nefluoreskujících látek může být převedeno na fluoreskující za využití derivatizace. Tento přístup je atraktivní pro selektivní detekci určitých sloučenin, pro které jsou jinak citlivé detekční metody nedostupné. [47]

Elektrochemické detektory: Mnoho sloučenin s oxidoredukčními vlastnostmi může být detekováno pomocí selektivního elektrochemického měření. Průchod látky průtokovou celou detektoru, ve které jsou umístěny elektrody s vloženým napětím nezbytným k průběhu elektrochemické reakce, způsobuje změny elektrické veličiny (elektroodový potenciál, proud, kapacita). Použitelnost elektrochemických detektorů je omezena tím, že mobilní fáze musí být elektricky vodivá a sledovaná látka musí být elektroaktivní, čehož lze snadno dosáhnout před nebo postkolonovou derivatizací). [47]

Radiometrické detektory: Radiometrické detektory jsou specifická zařízení pro monitorování radioaktivně značených rozpuštěných látek při jejich eluci. Detekce je založena na emisi světla v průtokové cele v důsledku radioaktivního rozpadu rozpuštěné látky s následnou emisí α -, β -, popř. γ – záření. [47]

Refraktometrické detektory: Detektor indexu lomu, nazývaný také jako diferenciální detektor indexu lomu detekuje rozpuštěné látky pozorováním indexu lomu eluentu vzhledem k referenční cele obsahující vzduch, mobilní fázi nebo průhledný materiál se specifickým indexem lomu. Refraktometrické detektory jsou velmi citlivé na změny teploty, proto detektor i kolona musí být dokonale termostatované. Detektory nelze použít při gradientové eluci, jelikož odezva detektoru je velmi citlivá na změnu složení mobilní fáze. [54, 55]

Detektory rozptylu světla: Nejoblíbenějším detektorem tohoto typu je detektor rozptylu světla využívající odpaření mobilní fáze (tzv. evaporative light scattering detector, ELSD). ELSD pracuje na principu odpaření mobilní fáze s následným měřením rozptylu světla na částicích netěkavých analytů. Odezva detektoru souvisí s absolutním množstvím přítomného analytu. Na rozdíl od refraktometrického detektoru je odezva nezávislá na rozpouštědle, tudíž detektor může být použit u gradientové eluce a není tak velmi citlivý na teplotu nebo kolísání průtoku. [53]

Aerosolový detektor nabitých částic: Eluent z HPLC kolony je nejprve rozprašen dusíkem (nebo vzduchem) za vzniku kapiček, které se poté suší, aby se odstranila mobilní fáze. Primární proud částic analytu se potká se sekundárním proudem dusíku (nebo vzduchu), který je pozitivně nabitý koronárním výbojem. Náboj je přenesen na částice analytu a ty dále proudí do kolektoru, kde se generuje proud, který je zaznamenáván elektrometrem. Tento detektor je vysoce citlivý, poskytuje konzistentní odezvu a má široký dynamický rozsah. [53, 55]

Hmotnostní detektor: Hmotnostní detektor detekuje ionty po jejich separaci na základě poměru hmotnosti k náboji a určuje relativní intenzity jednotlivých iontů. Princip této detekční techniky je dále diskutován v kapitole 2.6.3.

2.6 Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analyticko-instrumentální metoda, často používaná ve spojení se separačními technikami. Tato technika může sloužit k identifikaci neznámých látek (objasnění chemické struktury) či ke kvantifikaci známých sloučenin.

Prvním krokem v hmotnostně spektrometrické analýze sloučenin je převedení analytu do iontového stavu. Vznikající ionty jsou separovány v hmotnostním analyzátoru podle jejich poměru hmotnosti k náboji a jsou detekovány úměrně jejich množství. Záznam z analýzy hmotnostním spektrometrem se nazývá hmotnostní spektrum. Toto spektrum je zobrazeno jako závislost četnosti iontů (osa Y) na poměru hmotnosti k náboji (osa X). [56]

2.6.1 Ionizační techniky

V iontovém zdroji dochází k převodu analytů na ionty. Pro ovlivnění produkce iontů bylo vyvinuto mnoho různých technik, z nichž nejběžnější jsou uvedeny v následujících kapitolách. Nabité částice jsou poté urychlovány elektrostatickým polem dále do hmotnostního spektrometru, kde jsou následně separovány a detekovány za vysokého vakua, aby se minimalizovaly kolize mezi ionty. Ionizace probíhá za atmosférického tlaku nebo ve vysokém vakuu. [57]

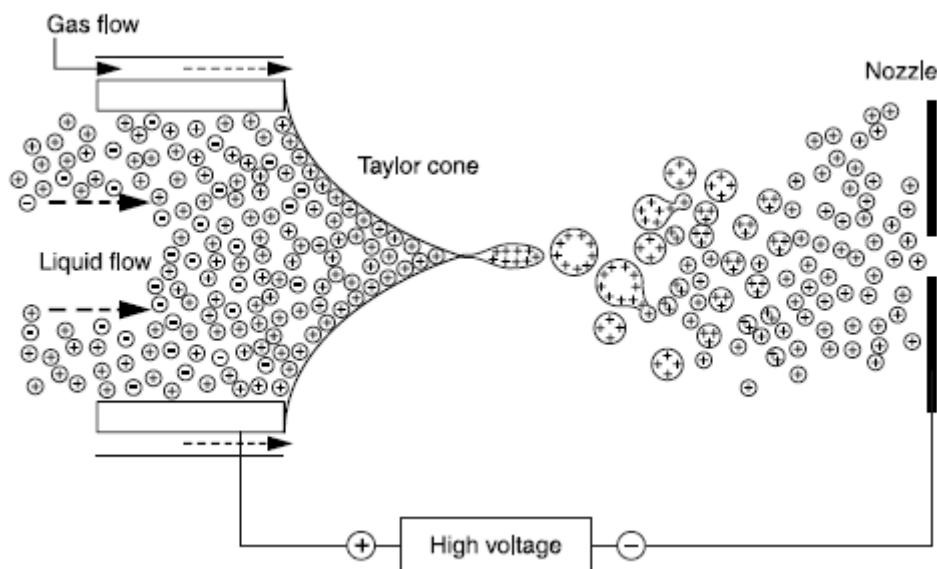
2.6.1.1 Elektronová ionizace (EI)

Molekuly analytu jsou zavedeny přímo do zdroje. Proud elektronů (zdrojem je rozžhavené vlákno z wolframu nebo rhenia) interaguje s analytem ze vzniku radikalkationtu a vzniklé ionty jsou urychlovány směrem k analyzátoru. Při ionizaci vznikají molekulární ionty a zároveň ve stejný čas dochází k jejich poměrně intenzivní fragmentaci. Na základě fragmentačních pravidel lze látku identifikovat. [58]

2.6.1.2 Ionizace elektrosprejem (ESI)

Nástup ESI ionizace, která probíhá za atmosférického tlaku a kde tvorba iontů probíhá mimo vakuový systém hmotnostního analyzátoru, poskytl metodu ionizace labilních a netěkavých látek. [59] V ESI se vzorek rozpustí v polárním, těkavém rozpouštědle a takto je transportován přes kapiláru s vysokým

elektrickým potenciálem. Vysoký elektrický potenciál mezi kapilárou a vstupem do MS vytvoří Taylorův kužel, který je na špičce obohacen o kladné nebo záporné ionty (Obrázek 8). Rozprášené nabité kapičky jsou vytrženy z Taylorova kužele elektrickým polem. Kapky se odpařováním zmenšují za pomoci teplého proudu plynného dusíku. Vytvořené ionty procházejí do střední vakuové oblasti a odtud přes malý otvor do vysokého vakua hmotnostního analyzátoru. [58]



Obrázek 8: Schéma ionizace elektrosprejem. [58]

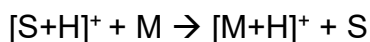
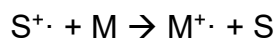
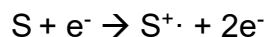
2.6.1.3 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)

APCI je ionizační technikou, která se spolu s ESI a APPI řadí mezi techniky pracující za atmosférického tlaku. Spolu s ESI se jedná o nejčastěji používanou techniku pro spojení HPLC/MS. [60] Výhoda APCI ionizace je její využití i pro analýzu méně polární sloučenin. Problematické může být ionizace tepelně nestabilních sloučenin. Stejně jako u ESI je APCI měkká ionizační technika, kde dochází relativně málo k fragmentaci. [61]

Chemická ionizace za atmosférického tlaku je dvoustupňový proces (Obrázek 9), kde nejprve jsou ionizovány molekuly mobilní fáze, které jsou v nadbytku a poté dochází k přenosu náboje na analyt. [62]

Roztok vzorku může protékat kapilárou 0,2- 2 ml/min. Kapalina je pneumaticky nastříknuta do vyhřívaného evaporizéru, kde je pomocí nebulizačního plynu (nejčastěji dusík) rozprášena do koronárního výboje. [62]

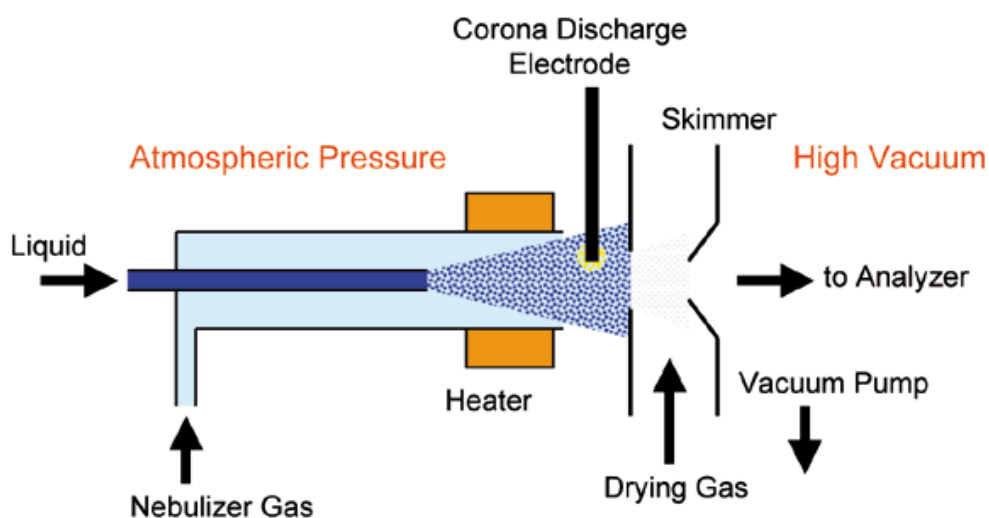
Koronární výbojová jehla poskytuje napětí 2,5-3 kV [63] a ionizace probíhá podle reakce níže (Rovnice 2), kde S je rozpouštědlo a M je analyt [64]:



Rovnice 2: Ionizace analytu pomocí APCI.

Ionizace může probíhat v pozitivním nebo negativním módu. Přenosem protonu poté mohou vznikat protonované $[M+H]^+$ nebo deprotonované $[M-H]^-$ molekuly, [62] popřípadě jiné adukty jako $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+Cl]^-$, $[M+CH_3COO]^-$. Jak u ESI, tak u APCI dochází převážně ke vzniku iontů se sudým počtem elektronů. [65]

Mezi hlavní faktory ovlivňující účinnost APCI řadíme: vlastnosti analyzované látky, složení roztoku (rozpuštědla, aditiva), průtok mobilní fáze, proud na jehlové elektrodě, teplotu odpařovacího prostoru, teplotu a průtok pomocných plynů a napětí na vstupu do vakua. [65]

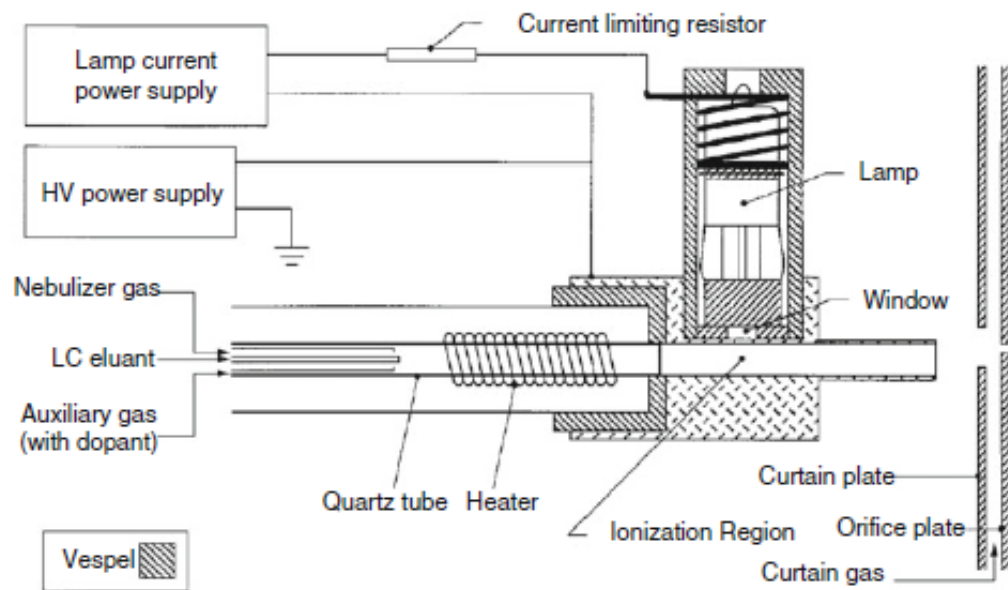


Obrázek 9: Schéma ionizace APCI. [66]

2.6.1.4 Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)

APPI je užitečná zejména pro nepolární sloučeniny, které je prakticky nemožné ionizovat v ESI nebo APCI. [54] Princip je analogický APCI, akorát

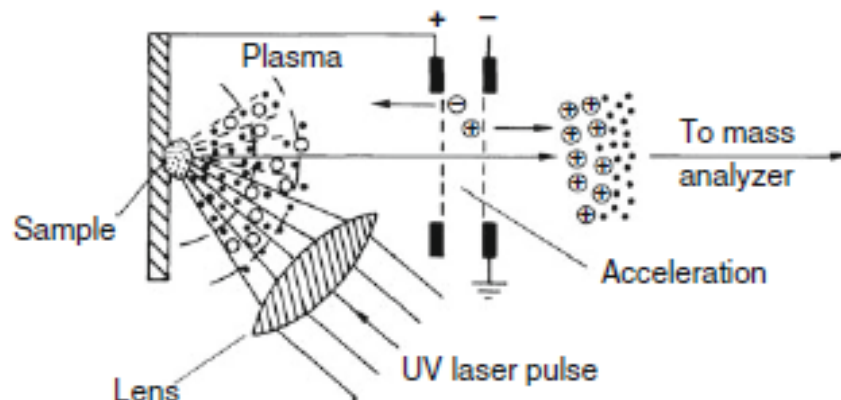
analyt absorbuje fotony, které jsou zde dodávány místo koronárního výboje UV zářením (Obrázek 10). [62]



Obrázek 10: Schéma ionizace APPI. [62]

2.6.1.5 Ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)

V nejrozšířenější formě MALDI-MS se vzorek skládá z molekul analytu zředěných molekulami matrice s nízkou molekulovou hmotností, která vysoce absorbuje laserové světlo. Spotřebovaná energie při ozáření laserem pak způsobí vypařování a případnou ionizaci vzorku (Obrázek 11). Tento typ ionizace se velmi často používá ve spojení s TOF analyzátozem. [58, 62]



Obrázek 11: Schéma ionizace MALDI. [62]

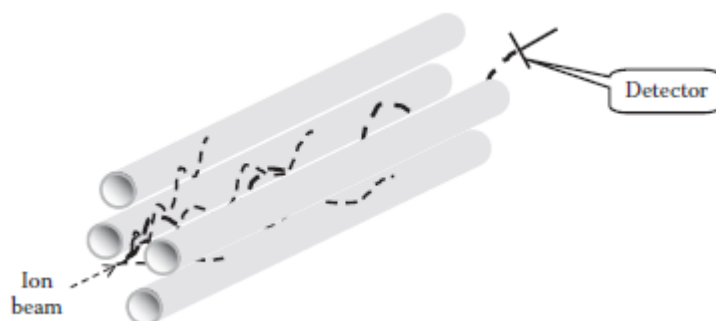
2.6.2 Analyzátoři MS

Jakmile jsou ionty převedeny do plynné fáze, je třeba je rozdělit podle jejich poměru hmotnosti k náboji (m/z). Bylo vyvinuto několik typů hmotnostních analyzátorů. Všechny hmotnostní analyzátoři používají statická nebo dynamická elektrická a magnetická pole, která mohou být samostatná nebo kombinovaná. Většina základních rozdílů mezi různými typy hmotnostních analyzátorů spočívá ve výběru pole, kterým je dosažena separace. [56]

2.6.2.1 Kvadrupól (Q)

Analyzátor využívá kombinace stejnosměrného napětí a vysokofrekvenčního potenciálu. Kvadrupól se většinou skládá ze čtyř rovnoběžných tyčí, kde na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnoměrné napětí a na zbylé dvě záporné stejnoměrné napětí (Obrázek 12).

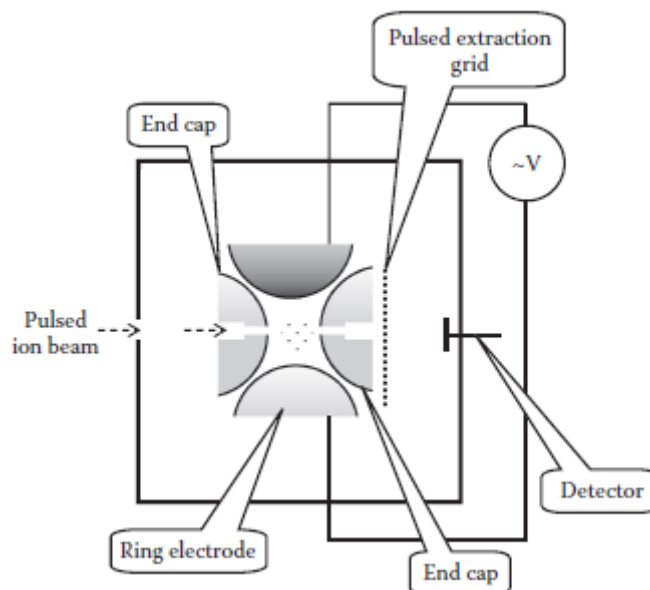
Ionty vycházející ze zdroje vstupují do analyzátoru mezi tyčemi a pohybují se rovnoběžně s tyčemi. Při daných hodnotách stejnosměrného napětí a vysokofrekvenčního potenciálu prochází přes kvadrupól pouze ionty o určitém úzkém rozsahu m/z . [62]



Obrázek 12: Schéma kvadrupólu. [63]

2.6.2.2 Sférická iontová past (IT)

V iontové pasti jsou ionty s daným poměrem m/z zachyceny v sadě tří hyperbolických elektrod. Na dvě koncové elektrody je vloženo stejnoměrné elektrické pole a na prstencovou elektrodu oscilující elektrické pole (Obrázek 13). Ionty jsou pulzně vstřikovány, zachyceny na krátkou dobu a poté extrahovány po jednotlivých m/z poměrech pomocí pulzní extrakční mřížky. [63]



Obrázek 13: Schéma iontové pasti. [63]

2.6.2.3 Analyzátor doby letu (TOF)

V případě analyzátoru TOF jsou ionty různých m/z rozděleny v čase během jejich letu po dráze o známé délce. Za předpokladu, že všechny ionty začnou svou cestu ve stejnou dobu a je jim udělena stejná energie, dorazí lehčí ionty k detektoru dříve než ty těžší.

Mezi základní výhody TOF analyzátoru patří:

- v zásadě neomezený rozsah m/z
- vysoké rozlišení m/z hodnot iontů
- vysoká rychlost získávání hmotnostního spektra [62]

2.6.2.4 Orbitrap

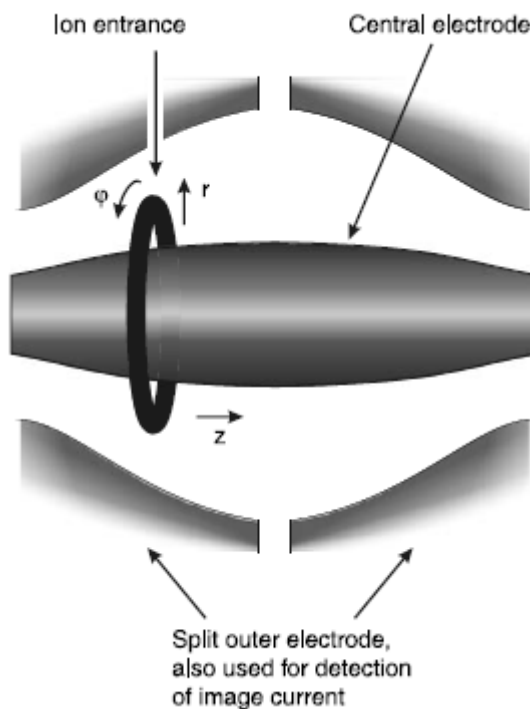
Orbitrap je hmotnostní analyzátor založený na iontové pasti vyvinutý z Kingdonovy pasti, který se skládá ze dvou vnějších a jedné centrální elektrody. [67] Ionty se pohybují po stabilních trajektoriích jak kolem centrální elektrody, tak v harmonických oscilacích ve směru z (Obrázek 14). [58] Různé ionty oscilují na různých frekvencích, což má za následek jejich oddělení. Oscilace jsou detekovány a pomocí Fourierovy transformace jsou získávána hmotnostní spektra. [58, 68] Frekvence axiální oscilace je závislá na konstantě instrumentace (k) a poměru m/z podle Rovnice 3 [69]:

$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

Rovnice 3: Frekvence axiální oscilace.

Vstřikování iontů do orbitrapu a vytváření stabilních trajektorií je komplikovaný proces s přísnými požadavky na prostor, čas a kinetickou energii. Tyto požadavky jsou vyřešeny zavedením speciální pasti (C-trap), která umožňuje pulzní dávkování úzkého svazku iontů. [70, 71]

Výhodou tohoto analyzátoru je jeho vysoká rozlišovací schopnost 100.000- 280.000, vysoká správnost určení hmoty 1–3 ppm a hmotnostní rozsah do 6000 m/z. [69]



Obrázek 14: Schéma orbitrapu. [58]

2.6.2.5 Iontová cyklotronová past s FT (FT-ICR)

U analyzátoru iontové cyklotronové rezonance (ICR) jsou ionty zachyceny silným magnetickým polem. Magnetické pole způsobí, že se ionty budou pohybovat kruhovým pohybem s frekvencí závislou na jejich m/z. Ionty, které mají být detekované jsou excitované, aby se pohybovaly blíže k detekčním deskám. Poté se indukuje malý proud pokaždé, když kolem desek proletí iont. Protože ionty s různými m/z mají různé frekvence iontové

cyklotronové frekvence, každá generovaná aktuální frekvence bude odpovídat určité hodnotě m/z . [58]

2.6.3 Detektory MS

Úkolem detektoru je přeměnit energii přicházejících částic na signál, který je registrován elektrickými zařízeními a přenášen do počítače hmotnostního spektrometru. [58]

2.6.3.1 Elektronový násobič

Podstatou elektronového násobiče je sériové zapojení kovových desek (dynod), které až milionkrát zesilují elektronový proud iontů. Ion vstoupí do elektronového násobiče, kde je zastaven první konverzní dynodou. Tato dynoda emituje elektrony, které jsou následně zesíleny systémem dynod a opakovanými kolizemi. [72]

2.6.3.2 Fotonásobič

Ve fotonásobiči ionty nejprve narazí na dynodu, což vede k emisi elektronů. Vytvořené elektrony pak narazí na fosforovou obrazovku, která uvolňuje fotony. Fotony pak přecházejí do multiplikátoru, kde podobně jako u elektronového násobiče dochází k zesílení signálu kaskádovým způsobem. Hlavní výhodou použití fotonů je, že multiplikační část detektoru může být udržována utěsněná ve vakuu, což zabraňuje kontaminaci a výrazně prodlužuje životnost detektoru. [72]

2.6.3.3 Faradayova klec

Faradayův detektor je stále velmi používaný detektor. Hlavními důvody jeho trvalé popularity je přesnost, spolehlivost a robustnost. Nejjednodušší formou Faradayova detektoru je kovová (vodivá) miska, která shromažďuje nabitě částice a je elektricky připojena k přístroji, který měří produkovaný proud. [54] Skládá se z duté vodivé elektrody spojené se zemí přes vysoký odpor. Ionty narážející na kolektor způsobí tok elektronů ze země přes rezistor a výsledný pokles potenciálu na rezistoru se zesílí. [72]

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat LC-MS metodu pro stanovení dvanácti endokrinních disruptorů.

Mezi dílčí cíle práce patří:

- výběr a optimalizace vhodné extrakční metody
- optimalizace podmínek MS detekce (vhodná ionizační technika)
- optimalizace chromatografických podmínek – výběr vhodné stacionární a mobilní fáze, optimalizace teploty na koloně a gradientové eluce
- experimentální ověření možného uvolnění testovaných disruptorů z laboratorních plastových pomůcek

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Metodická část

4.1.1 Chemikálie a přístrojová vybavení

Všechna rozpouštědla, standardní látky a ostatní použité chemikálie byly zakoupeny u firmy Merck. Použitá rozpouštědla a aditiva pro chromatografické účely dosahovala stupně čistoty LC – MS. Voda pro chromatografické analýzy byla připravena pomocí přístroje Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF od firmy ThermoFisher Scientific (stupeň kvality ASTM typ I).

Jako matrice byla pro přípravu vzorků použita plodová voda odebraná ve druhém trimestru těhotenství od žen podstupujících transambdominální amniocentézu z genetických důvodů. Použití zbývajících množství plodové vody k výzkumným účelům bylo schváleno Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové 201902 S16P ze dne 7.2.2019.

4.1.1.1 Vybrané stanovované endokrinní disruptory

Níže uvedené endokrinní disruptory byly vybrány na základě konzultace s lékaři gynekologického a porodnického oddělení FNHK v potenciální souvislosti s jejich vlivem na předčasný porod.

Parabeny: methylparaben, ethylparaben, propylparaben

Bisfenol A

Triclosan

Ftaláty: bis(2-ethylhexyl)-ftalát, diisononyl ftalát

Bifenyly: Aroclor 1232 (2-chlorbifenyl), Aroclor 1221 (3-chlorbifenyl), Aroclor 1016 (3,3',5-trichlorbifenyl), Aroclor 1242 (2,3,2',4'- tetrachlorbifenyl), Aroclor 1248 (3,5,3',5'-tetrachlorbifenyl), Aroclor 1254 (2,2',3,3',4-pentachlorbifenyl), Aroclor 1260 (2,2',3,3',4,4'-hexachlorbifenyl)

4.1.1.2 Extrakční činidla

Pro optimalizaci vhodného extrakčního činidla byly využity následující rozpouštědla: ethylacetát, dichlormethan, methylethylketon, chloroform, tert-butyl methyl ether, hexan, tetrahydrofuran, 2-methyl-tetrahydrofuran, n-heptan, 1-butanol, 2-butanol, toluen, 4-methyl-2-pentanon, 1-pentanol, aceton, acetonitril

4.1.1.3 Další použité chemikálie

Pro přípravu mobilních fází byla použita kyselina mravenčí, kyselina octová, mravenčan amonný a octan amonný. Dále byl v práci použit fosfátový pufr o pH 7,4 (1 tableta rozpuštěná ve 200 ml deionizované vody) a také dansylchlorid pro derivatizaci vzorků.

4.1.1.4 Přístrojové vybavení

Třepačka (Witeg VM-10, typ vortex)

Lab Dancer Vortex Mixer (IKA TM)

Ultrazvuková lázeň (Elma S 40)

Centrifuga (Universal 320 R, Hettich Zentrifugen)

Centrifugační koncentrátor (CentriVap – Labconco)

Analytické váhy Sartorius CPA225D-0CE

Pipety Eppendorf® Reference (0,5 – 10 µl, 10 –100 µl, 100 – 1000 µl)

Thermomixer (Eppendorf ThermoMixer C, ThermoFisher Scientific)

Termostat blokový (Bio TDB 100, Biosan)

Kapalinový chromatograf: Dionex UltiMate 3000 RS (ThermoFisher Scientific)

Binární vysokotlaké čerpadlo HPG-3400RS spojené s vakuovým odplyňovačem

Kolonový termostat TCC-3000

Detektor diodového pole DAD 3000

Programy Chromeleon 6.80 a Microsoft Excel 2016

Hmotnostní spektrofotometr: Q Exactive Plus (ThermoFisher Scientific)

Program Xcalibur 3.0.63 pro vyhodnocování hmotnostních spekter

pH metr (Hanna edge, HI 2020)

laboratorní sklo, vialky s víčky, eppendorf zkumavky

4.1.1.5 Testované kolony

Tabulka 2: Přehled testovaných stacionárních fází.

Název kolony	Stacionární fáze	Výrobce	Délka/průměr	Velikost částic	Póry (Å)	pH	Max. tlak (bar)
Excel	C18-PFP	ACE	100 mm × 2,1 mm	1,7 µm	100	2-8	1000
Excel	C18-AR	ACE	100 mm × 2,1 mm	1,7 µm	100	2-8	1000
Hypersil GOLD	C4	ThermoFisher Scientific	100 mm × 2,1 mm	1,9 µm	175	2-8	1250
Hypersil GOLD	C8	ThermoFisher Scientific	100 mm × 2,1 mm	1,9 µm	175	2-9	1250
Kinetex	C18	Phenomenex	50 mm × 2,1 mm	1,7 µm	100	1,5-8,5	1000
Kinetex	EVO C18	Phenomenex	50 mm × 2,1 mm	1,7 µm	100	1-12	1000

4.1.1.6 MS detekční podmínky

Tabulka 3: Nastavení detekčních parametrů.

Typ ionizace	APCI
Teplota na kapiláře	260 °C
Napětí na kapiláře	2500–3500 V
Napětí na RF čočce	50 V
Průtok pomocného plynu	12,5 arb. unit
Průtok protisměrného plynu	2,5 arb. unit
Průtok sušícího plynu	50 arb. unit

4.1.2 Příprava roztoků

4.1.2.1 Zásobní roztoky

Při vývoji a optimalizaci metody pro stanovení endokrinních disruptorů byly připraveny následující zásobní roztoky:

- 3 mM roztok parabenů (MP, EP, PP) v methanolu
- 100 µM roztok ftalátů (DEHP, DINP), bisfenolu A a triclosanu v methanolu
- 200 µg/ml polychlorovaných bifenyků (Aroclor 1232, 1016, 1248, 1254, 1260, 1221, 1242) v methanolu

4.1.2.2 Pracovní roztoky

Všechny pracovní roztoky byly získány naředěním zásobních roztoků methanolem, přičemž každá skupina disruptorů byla připravena na třech koncentračních hladinách.

- Směs parabenů: koncentrace 30 μM , 300 nM, 3 nM
- Směs ftalátů, BPA, TCS: koncentrace 25 μM , 250 nM, 2,5 nM
- Směs PCB: koncentrace 20 $\mu\text{g/ml}$, 200 ng/ml, 2 ng/ml

Všechny připravené zásobní i pracovní roztoky byly uchovávány v lednici při 4 °C.

4.1.2.3 Příprava vodných roztoků mobilních fází

Všechny vodné mobilní fáze byly připraveny z ultračisté vody. Po připravení byly mobilní fáze odplyněny na ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.

V experimentální části byly použity tyto mobilní fáze:

Mobilní fáze A (MF A)

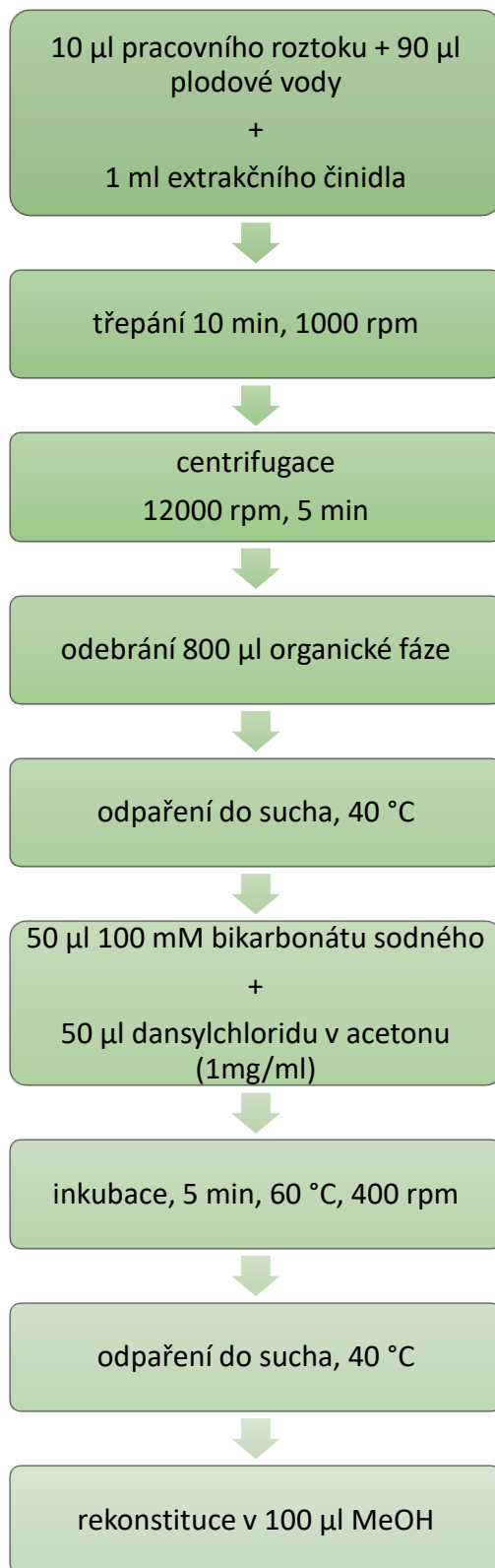
- $\text{H}_2\text{O} + 0,02\% \text{HCOOH (v/v)}$
- $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{HCOOH (v/v)}$
- $\text{H}_2\text{O} + 0,5\% \text{HCOOH (v/v)}$
- $\text{H}_2\text{O} + 0,1\% \text{CH}_3\text{COOH (v/v)}$
- $\text{H}_2\text{O} + 10 \text{ mM HCOONH}_4$
- $\text{H}_2\text{O} + 10 \text{ mM CH}_3\text{COONH}_4$

Mobilní fáze B (MF B)

- $\text{ACN} + 0,1\% \text{HCOOH (v/v)}$
- $\text{ACN} + 0,5\% \text{HCOOH (v/v)}$

4.1.3 Úprava vzorku před analýzou

Postup úpravy vzorku před analýzou je znázorněn na Obrázek 15.



Obrázek 15: Postup přípravy vzorku před analýzou.

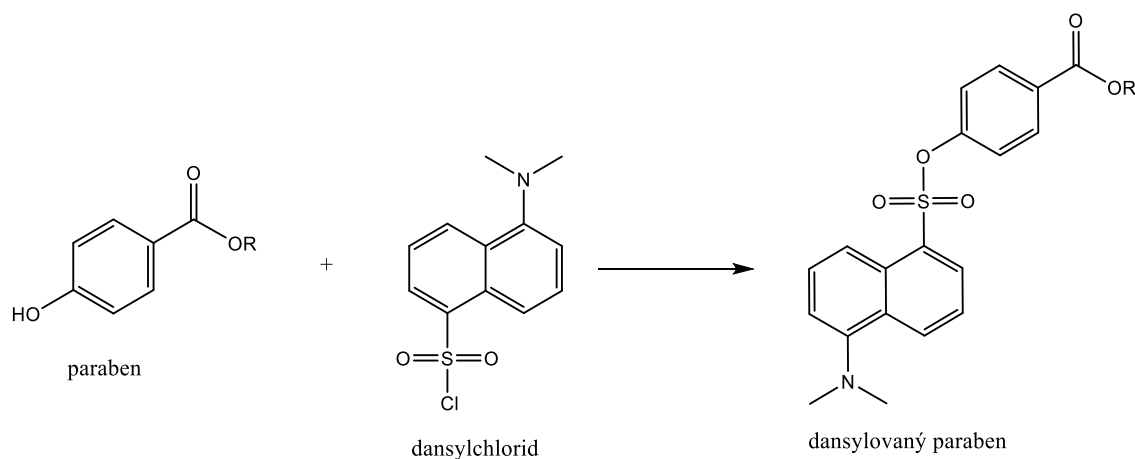
4.1.3.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE)

K 10 μ l pracovního roztoku standardů endokrinních disruptorů bylo přidáno 90 μ l plodové vody. Po krátkém promíchání byl přidán 1 ml extrakčního činidla. Směs byla 10 minut třepána, při 1000 otáček za minutu (rpm) a centrifugována po dobu 5 minut při 12000 rpm. Následně bylo odebráno 800 μ l organické fáze, která byla odpařena ve vakuové odparce při 40 °C dosucha. Tento postup byl proveden pro všechny koncentrace stanovovaných disruptorů pro všechna organická rozpouštědla uvedená v kapitole 4.1.1.2.

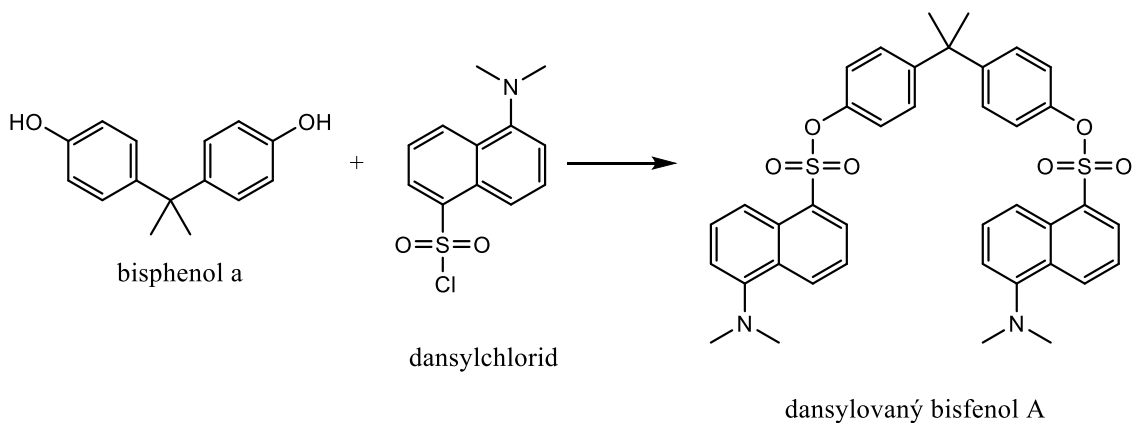
4.1.3.2 Derivatizace

K dosucha odpařeným vzorkům bylo přidáno 50 μ l 100 mM bikarbonátu sodného o pH 10,5 a 50 μ l dansylchloridu v acetonu (1 mg/ml). Směs byla krátce vortexována a poté inkubována 5 minut při 60 °C a 400 rpm [73]. Následně byly vzorky opět za stejných podmínek odpařeny ve vakuové odparce do sucha a skladovány v -80 °C.

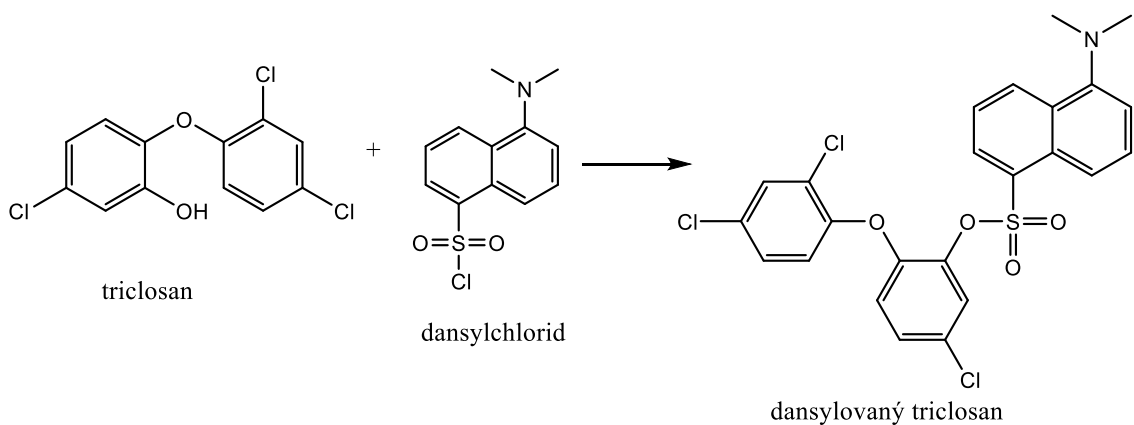
K derivatizaci bylo přistoupeno u parabenů, BPA a TCS (viz následující Rovnice 4-6).



Rovnice 4: Dansylace parabenů.



Rovnice 5: Dansylace bisfenolu A.



Rovnice 6: Dansylace triclosanu.

4.1.3.3 Rekonstituce

K odpařeným derivatizovaným vzorkům bylo přidáno 100 μ l MeOH [73]. Vzorek byl po rozpuštění krátce protřepán a vložen na 5 minut do ultrazvukové lázně. Po sonikaci byl vzorek opět protřepán, následně centrifugován (aby se kapalina dostala na dno zkumavky a vzorek šel odebrat bez větších ztrát) 3 minuty při 7000 rpm, a poté přenesen do insertu ve vialce k následné HPLC-MS analýze.

4.1.4 Experiment uvolňování disruptorů z laboratorních pomůcek

4.1.4.1 Eppendorf zkumavky

Experiment uvolňování disruptorů z 1,5 ml eppendorf zkumavek byl prováděn v kyselém, neutrálním a bazickém prostředí. Použité roztoky a jejich pH jsou uvedeny v Tabulce 4. Do každé zkumavky bylo přidáno 200 μ l příslušného roztoku o daném pH a vzorky byly inkubovány za extrémních podmínek při 80 °C 60 minut v termomixéru. Z mikrozkušavky bylo po inkubaci odebráno 90 μ l vzorku, byl přidán 1 ml 4-methyl-pentan-2-onu (m-Penta) a byla provedena extrakce dle metodiky uvedené v kapitole 4.1.3. Jako kontrolní blankové vzorky byly použity roztoky s výše uvedenými pH hodnotami, které podstoupily stejnou inkubaci ve skleněných zkumavkách.

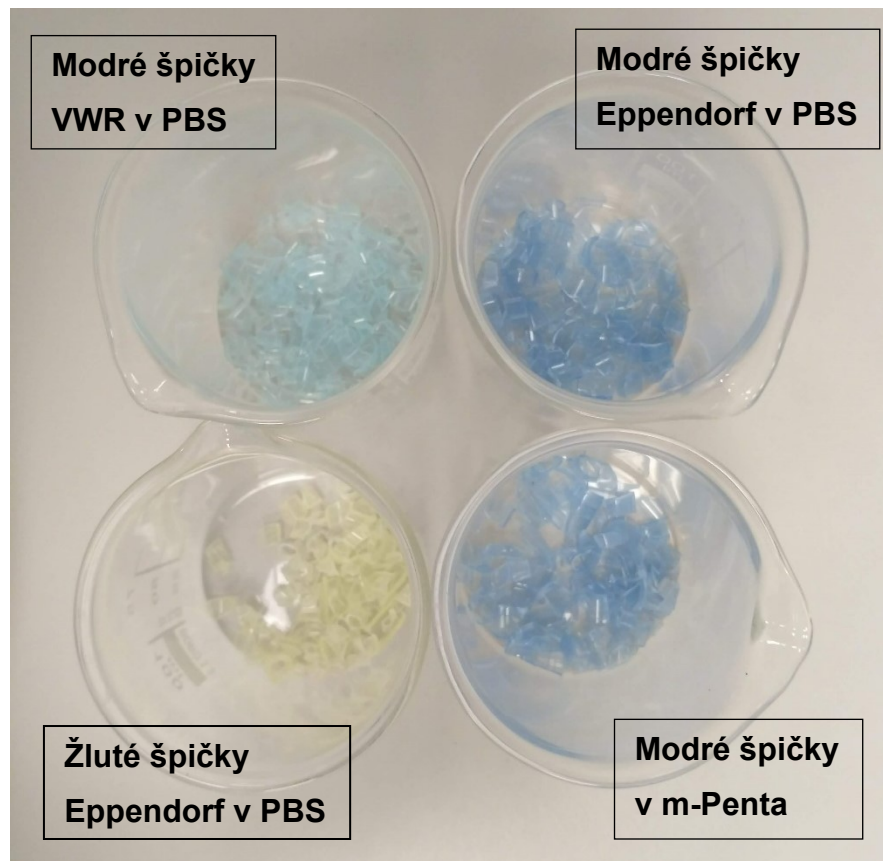
Tabulka 4: *Roztoky použité při experimentu uvolňování disruptorů ze zkumavek.*

Prostředí	pH	roztok
Kyselé	4	mravenčan amonný
Neutrální	7,4	fosfátový pufr
Bazické	10,5	bikarbonát sodný

4.1.4.2 Špičky

V experimentu byly použity modré (1000 μ l) a žluté (200 μ l) špičky od firmy Eppendorf, a poté modré špičky od firmy VWR International. Špičky byly rozstříhány do kádinek na malé kousky a byly ponechány 30 minut ve fosfátovém pufru (pH 7,4) při 60 °C (Obrázek 16). Na 1 g špiček bylo vždy použito 50 ml rozpouštědla. K 200 μ l inkubovaného roztoku byl přidán 1 ml m-Penta a opět byla provedena extrakce podle bodu 4.1.3. Jako kontrolní blankový vzorek byl použit roztok fosfátového pufru, který podstoupil stejnou inkubaci ve skleněné nádobě bez špiček.

Experiment s modrými špičkami probíhal rovněž v prostředí m-Penta, kde byla testována možnost uvolnění disruptorů do optimalizovaného činidla pro extrakci. Po inkubaci (30 min. v m-Penta při 60 °) bylo odebráno 200 μ l vzorku a odpařeno do sucha. Rekonstituce byla provedena podle bodu 4.1.3.3. Jako kontrolní blankový vzorek byl použit m-Penta, který podstoupil stejnou inkubaci ve skleněné nádobě.



Obrázek 16: Nastříhané špičky pro experiment uvolňování disruptorů.

5 Výsledky a diskuse

Pro zvýšení MS odezvy bylo nutné některé disruptory derivatizovat. Ze stanovovaných endokrinních disruptorů podléhají dansylaci parabeny, bisfenol A a triclosan (viz kapitola 4.1.3.2, Rovnice 4, Rovnice 5, Rovnice 6)

5.1.1 Optimalizace úpravy vzorku před analýzou

Prvním krokem k optimalizaci metody pro stanovení endokrinních disruptorů byla volba vhodné úpravy vzorku před analýzou. Jako metoda úpravy byla zvolena extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction, LLE) a pro její optimalizaci byla testována sada šestnácti extrakčních činidel uvedená v kapitole 4.1.1.2. Cílem optimalizace bylo nalézt extrakční činidlo s nejvyšší souhrnnou extrakční účinností pro stanovované disruptory.

Extrakční účinnost jednotlivých činidel byla stanovena na koloně EVO C18 (2,1 × 50 mm/1,7 μm), za využití gradientové eluce (viz Tabulka 5) s mobilními fázemi A (0,1% (v/v) HCOOH) a B (0,1% (v/v) HCOOH v ACN), průtokem 0,5 ml/min a nástřikem vzorku 5 μl. MS detekce probíhala za použití ionizace elektrosprejem (ESI).

Tabulka 5: Profil gradientu.

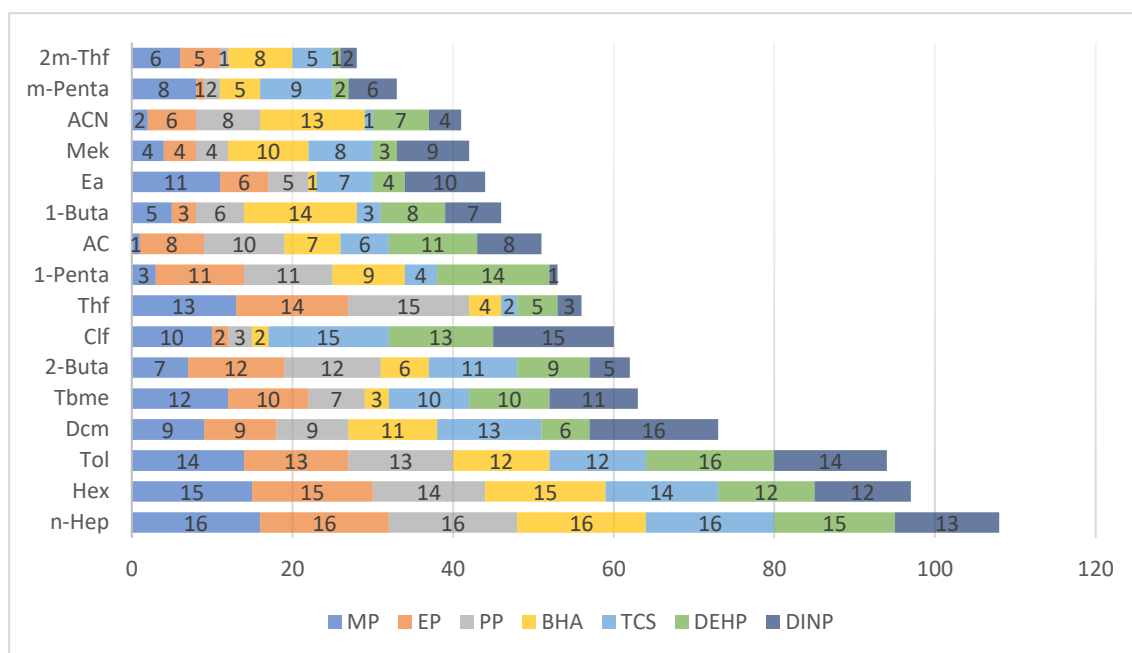
Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0,3	95	5
3,3	0	100
4,0	0	100
4,0	95	5
7,5	95	5

Vyhodnocení probíhalo na základě porovnání intenzity a zároveň i plochy píků jednotlivých analytů při využití různých extrakčních činidel, jelikož píky některých analytů byly asymetrické. Protože standardy PCB jsou směsí izobaricky polohově se lišících izomerů, byla u nich porovnávána pouze plocha pod píky. Reprezentativní výsledky vyhodnocení jsou uvedeny v Tabulkách 6-8. Extrakční činidla byla následně očíslována od jedné do šestnácti dle výtěžnosti extrakce (jednička byla přiřazena pro extrakční činidlo poskytující nejvyšší intenzitu odezvy detektoru, popř. plochu pod píkem, šestnáctka nejnižší) (graf 1-3). Čísla k extrakčním činidlům byla přiřazena samostatně pro každý

stanovovaný disruptor, následně pro jednotlivá extrakční činidla sečtena a činidla s nejnižším součtem hodnot byla vybrána jako vhodná pro LLE.

Tabulka 6: *Intenzita odezvy detektoru u parabenů, ftalátů, BPA a TCS na nejvyšší koncentrační úrovni za využití různých extrakčních činidel.*

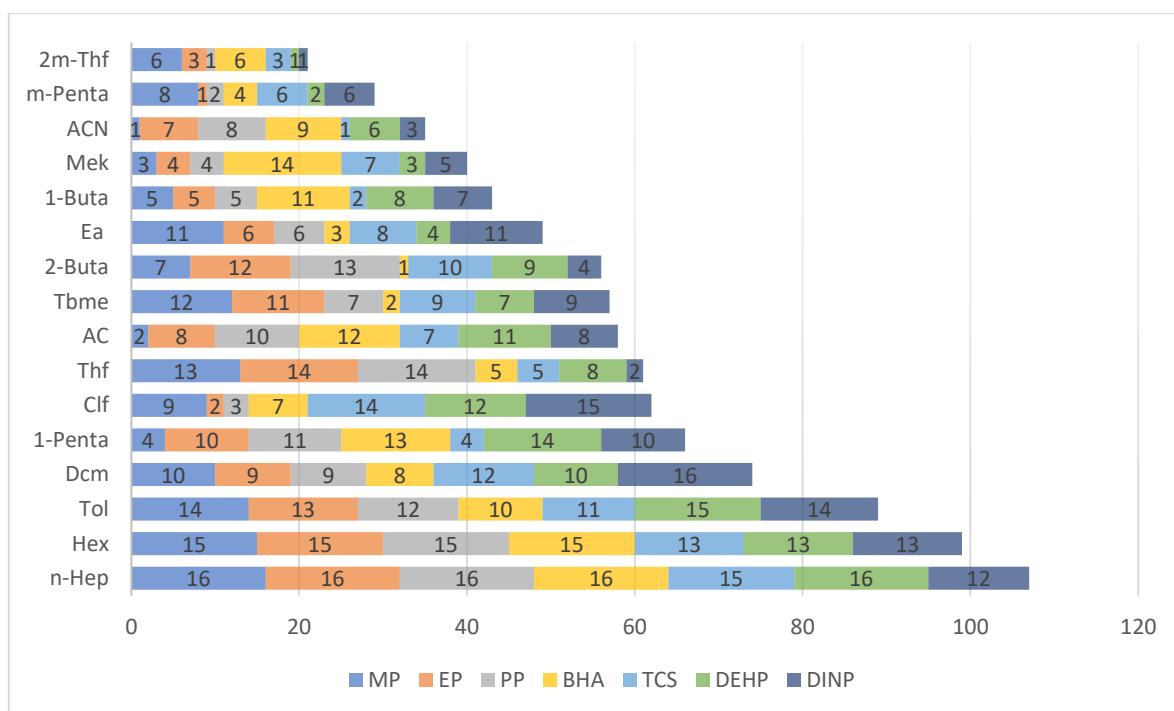
Extrakční rozpouštědlo	MP 3,5 µM	EP 3,5 µM	PP 3,5 µM	BPA 2,5 µM	TCS 2,5 µM	BEHP 2,5 µM	DINP 2,5 µM
Ea	8,30E+07	2,67E+07	5,26E+07	2,94E+08	2,71E+07	9,45E+06	3,18E+05
Dcm	1,29E+08	2,16E+07	2,74E+07	1,97E+08	1,38E+07	6,68E+06	8,80E+04
Mek	1,91E+08	3,94E+07	5,39E+07	1,98E+08	2,67E+07	9,53E+06	3,25E+05
Clf	1,25E+08	5,08E+07	5,68E+07	2,69E+08	1,10E+07	5,25E+06	9,00E+04
Tbme	4,25E+07	1,76E+07	4,20E+07	2,68E+08	2,17E+07	6,40E+06	3,06E+05
Hex	6,59E+06	1,26E+06	9,49E+06	2,79E+07	1,16E+07	5,58E+06	1,11E+05
Thf	4,11E+07	4,56E+06	4,38E+06	2,55E+08	3,76E+07	7,97E+06	4,99E+05
2m-Thf	1,84E+08	3,91E+07	1,61E+08	2,09E+08	3,05E+07	1,54E+07	7,93E+05
n-Hep	2,52E+06	2,89E+05	1,82E+06	2,73E+07	7,61E+06	3,10E+06	1,06E+05
1-Buta	1,87E+08	4,06E+07	4,67E+07	1,72E+08	3,41E+07	6,64E+06	3,75E+05
2-Buta	1,77E+08	1,43E+07	1,80E+07	2,51E+08	2,16E+07	6,61E+06	4,18E+05
Tol	3,48E+07	7,69E+06	1,71E+07	1,92E+08	1,72E+07	2,91E+06	1,02E+05
m-Penta	1,43E+08	5,62E+07	6,50E+07	2,46E+08	2,61E+07	1,50E+07	3,84E+05
1-Penta	2,03E+08	1,61E+07	2,41E+07	2,04E+08	3,15E+07	4,59E+06	8,47E+05
AC	3,96E+08	2,38E+07	2,65E+07	2,11E+08	2,94E+07	6,04E+06	3,32E+05
ACN	3,05E+08	2,67E+07	3,91E+07	1,77E+08	5,21E+07	6,74E+06	4,37E+05



Graf 1: Výběr extrakčního činidla pro parabeny, ftaláty, BPA a TCS na základě intenzity odezvy signálu.

Tabulka 7: Plocha pod píkem u parabenů, ftalátů, BPA a TCS na nejvyšší koncentrační úrovni za využití různých extrakčních činidel.

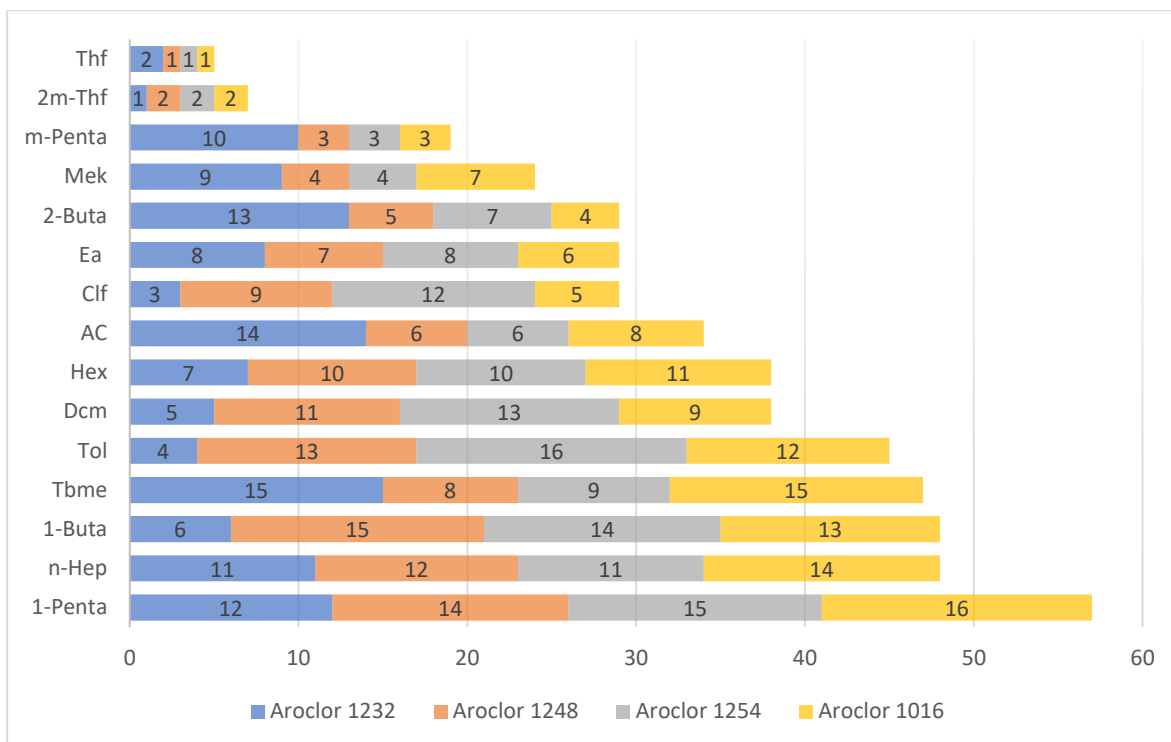
Extrakční rozpouštědlo	MP 3,5 µM	EP 3,5 µM	PP 3,5 µM	BPA 2,5 µM	TCS 2,5 µM	BEHP 2,5 µM	DINP 2,5 µM
Ea	137165571	48534316	81052594	428628732	41677771	15124933	1211370
Dcm	200075630	34802561	48681746	360548238	24325567	12257501	382819
Mek	391682902	74161267	88113007	330021750	46440753	17458435	1574111
Clf	223687353	81407730	96297924	377093207	23164184	9998971	398782
Tbme	79267142	30563605	69563788	443758910	40991229	12970061	1357595
Hex	12693147	2407280	14226748	46566838	23735466	9875925	446329
Thf	75075938	7215818	16259725	404848738	53375021	14749283	1927317
2m-Thf	334257991	77915743	320304856	396858414	60468925	25477800	2254536
n-Hep	4803794	393023	3871266	46378880	14828004	5942340	513150
1-Buta	354797866	72204008	85124780	341091240	64269592	12439091	1427668
2-Buta	292571048	23213307	30044043	447170770	37475281	12384818	1658451
Tol	63022834	13453558	33796312	343284909	31513451	6646971	417527
m-Penta	269936362	101009731	125047383	406987483	48412071	20545937	1489218
1-Penta	363170539	30875530	44209203	331314364	56494523	9477880	1316069
AC	559399580	37941161	48405817	339938320	47339017	12087752	1401429
ACN	563448312	48124187	63338712	347171761	75320554	13672982	1699088



Graf 2: Výběr extrakčního činidla pro parabeny, ftaláty BPA a TCS na základě velikosti plochy pod píky.

Tabulka 8: Plocha pod píkem u polychlorovaných bifenylnů na nejvyšší koncentrační úrovni za využití různých extrakčních činidel.

Extrakční rozpouštědlo	Aroclor 1232 2 µg/ml	Aroclor 1248 2 µg/ml	Aroclor 1254 2 µg/ml	Aroclor 1016 2 µg/ml
Ea	186864	1034728	537607	894768
Dcm	337073	746111	239253	767805
Mek	183642	1214860	654237	854488
Clf	447893	832547	274705	1013044
Tbme	27285	871914	355375	534388
Hex	215243	773496	332100	714112
Thf	1854735	2902401	909701	4534259
2m-Thf	3343307	2368524	866876	4457218
n-Hep	167349	696382	304145	570211
1-Buta	320125	475138	202213	627121
2-Buta	101977	1164638	584872	1087838
Tol	384179	616257	178084	687977
m-Penta	171705	1913009	738389	1777669
1-Penta	128011	503963	187279	497606
AC	92712	1074708	587605	838246
ACN	X	X	589685	764946



Graf 3: Výběr extrakčního činidla pro polychlorované bifenyly na základě velikosti plochy pod píky.

Na nejvyšší měřené koncentrační úrovni byla vybrána jako vhodná extrakční činidla 2m-Thf, m-Penta a Thf (viz Graf 1-3), která prokázala nejnižší souhrnné bodové skóre. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo i na dalších testovaných koncentračních úrovních. Thf prokázal velmi dobrou extrakční účinnost pro extrakci polychlorovaných bifenyly, nicméně nedostatečnou účinnost pro extrakci ostatních testovaných disruptorů. Dalším vhodným extrakčním činidlem pro PCB podle bodového skóre byl 2m-Thf a poté m-Penta. Kritériem pro volbu mezi 2m-Thf a m-Penta byl zvolen pokles odezvy pod limit detekce u triclosanu. Tento pokles byl zaznamenán na nejnižší koncentrační úrovni (v řádu stovek pmol) v případě použití 2m-Thf. Rovněž byly testovány různé směsi uvedených rozpouštědel, nicméně ke zvýšení účinnosti extrakce nedošlo. Pro naše potřeby jsme využili univerzální extrakční činidlo jako kompromis a to m-Penta.

5.1.2 Optimalizace chromatografických podmínek

Před optimalizací chromatografických podmínek bylo nutné nastudovat a porovnat základní informace o analyzovaných látkách, včetně jejich struktur,

schopnosti ionizace, lipofility, acidobazických vlastností apod. Metody separace jednotlivých ED nalezené v literatuře jsou shrnuty v Tabulce 9. Jelikož jsou pro různé analyty používané různé metody a cílem práce bylo analyzovat všech 14 ED najednou, bylo nutné vyvinout zcela novou metodu.

Tabulka 9: Přehled metod používaných k separaci jednotlivých ED.

	Chromatografická technika	Kolona	MF A	MF B	Eluce	Detekce	Ionizace
Parabeny [74]	HPLC	ZOBRADEx Eclipse XDB-C18 Rapid resolution, (4.6 mm x 150 mm, 3.5 µm)	H ₂ O	MeOH	gradientová	UV 254 nm	-
Ftaláty [75]	HPLC-MS/MS	Synergi Polar-RP 2.5 µm	0,1 % vodný roztok HCOOH	0,1 % roztok HCOOH v ACN:MeOH, 50:50	gradientová	MS	APCI
Ftaláty [76]	HPLC-MS/MS	Hypersil Gold Column (1.9 µm, 2.1 × 50 mm, Thermo, Palo Alto, CA)	MeOH	5 mmol octan amonný + 0,1 % (v/v) HCOOH	gradientová	MS	ESI
PCB [77]	HPLC-MS/MS	Waters XSELECT HSS T3 (100mm×2.1mm, 2.5µm)	H ₂ O	MeOH	gradientová	MS	APPI
Parabeny + ftaláty [78]	HPLC	Zorbax C8 (150 x 4.6 mm, 3 µm)	H ₂ O	MeOH	gradientová	DAD 230 nm	-

Na základě vyhledaných informací byly testovány pro separaci jednotlivých analytů různé druhy stacionárních a mobilních fází. Dále byl optimalizován průběh gradientové eluce a nastavena optimální teplota na koloně.

Hlavním cílem bylo optimalizovat chromatografické podmínky abychom získali úzké, symetrické, oddělené píky s dostatečnou intenzitou. Zároveň bylo žádoucí nastavit podmínky tak, aby byla doba analýzy co nejkratší.

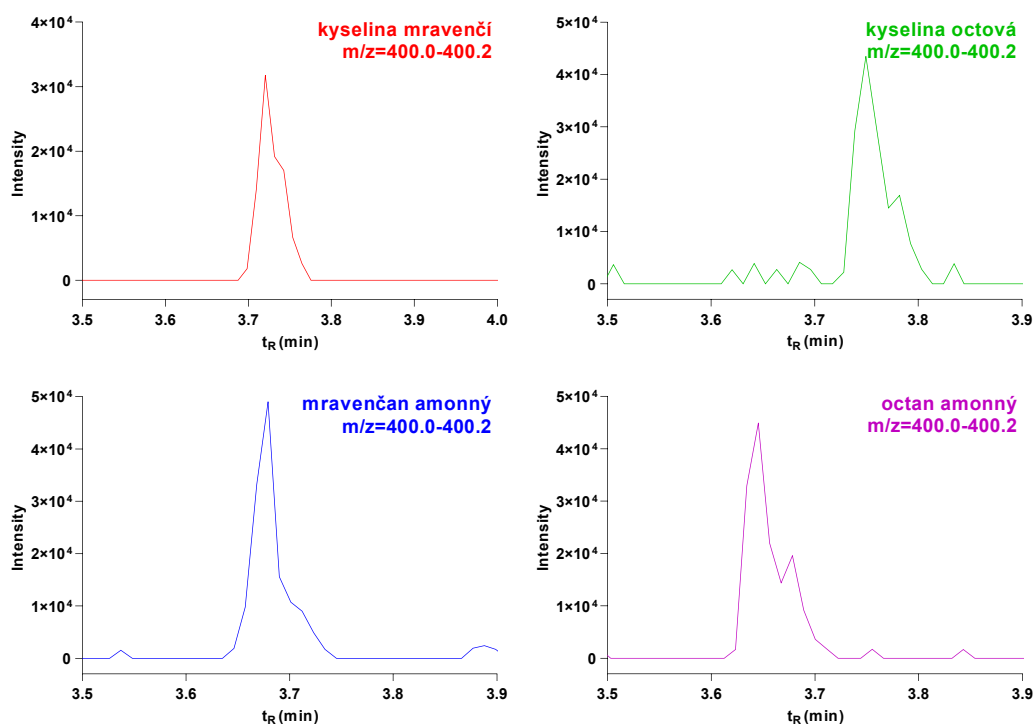
5.1.2.1 Optimalizace složení mobilní fáze

Prvotním cílem bylo optimalizovat složení mobilní fáze s ohledem na intenzitu, symetrii a tvar píků a jejich retenční čas. Základní screening testovaných MF byl prováděn na koloně Phenomenex Kinetex EVO C18 2,1 × 50 mm/1,7 µm. Průběh gradientové eluce pro screeningovou metodu je uveden v kapitole 5.1.1 v Tabulce 5.

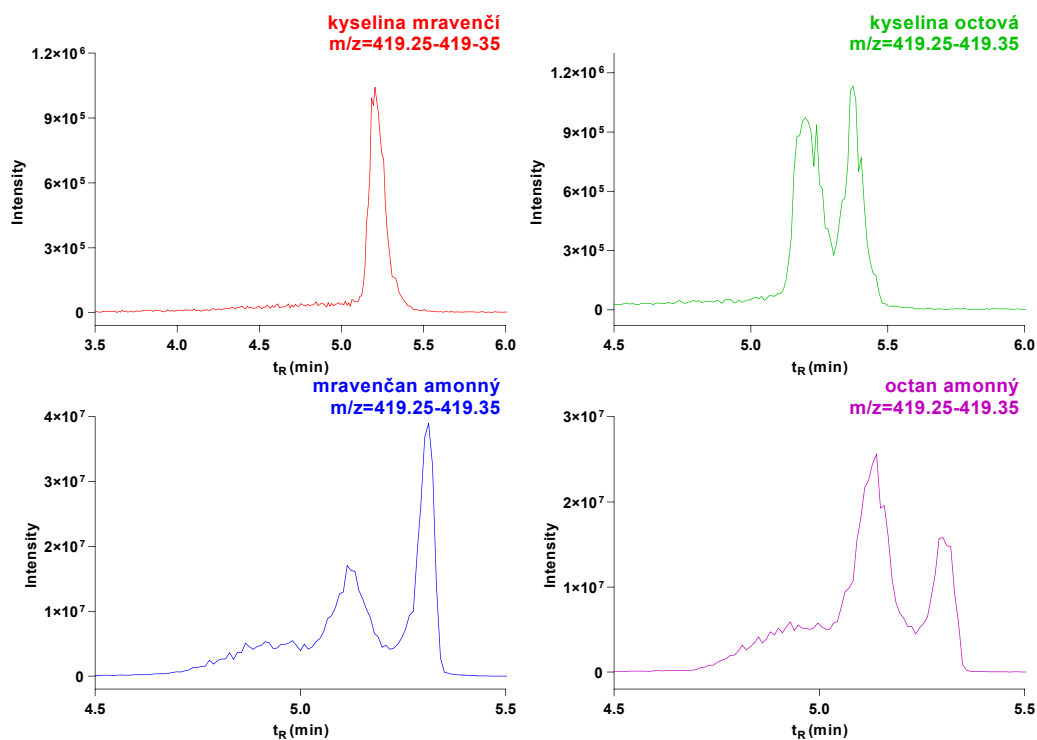
Byly testovány čtyři základní mobilní fáze A: 0,1% HCOOH (v/v), 0,1% CH₃COOH (v/v), 10 mM HCOONH₄ a 10 mM CH₃COONH₄. Jako mobilní fáze B byl použit ACN s přidavkem 0,1% HCOOH (v/v).

Záznamy jednotlivých extrahovaných chromatogramů z testování mobilních fází jsou demonstrovány na příkladu EP (Obrázek 17) a DINP (Obrázek 18).

Jelikož pro všechny testované mobilní fáze byla odezva MS detektoru pro jednotlivé analyty naměřena na podobných hladinách, rozhodujícím faktorem pro volbu MF tedy byl hlavně tvar píku (viz Obrázek 17). Vizuální štěpení píku je dáno nevhodnými podmínkami analýzy, které byly dále optimalizovány a ve finální metodě ke štěpení nedocházelo. Nejvíce symetrické píky byly získány za použití kyseliny mravenčí, tudíž byla vybrána jako optimální mobilní fáze.

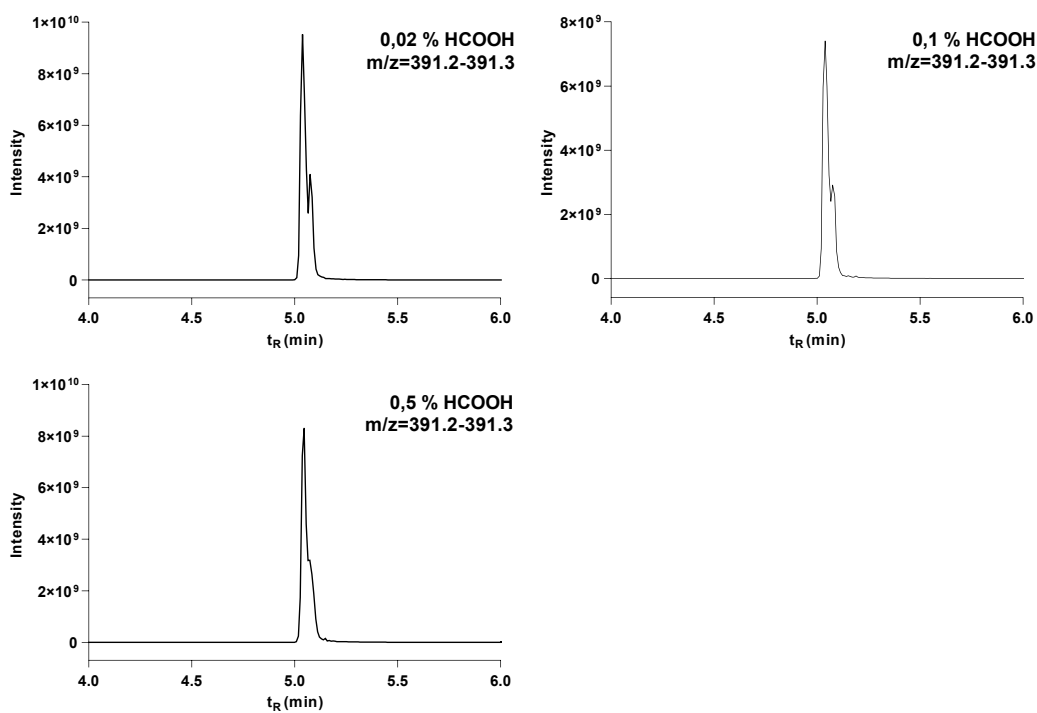


Obrázek 17: Extrahované iontové chromatogramy dansylovaného ethylparabenu v různých mobilních fázích.

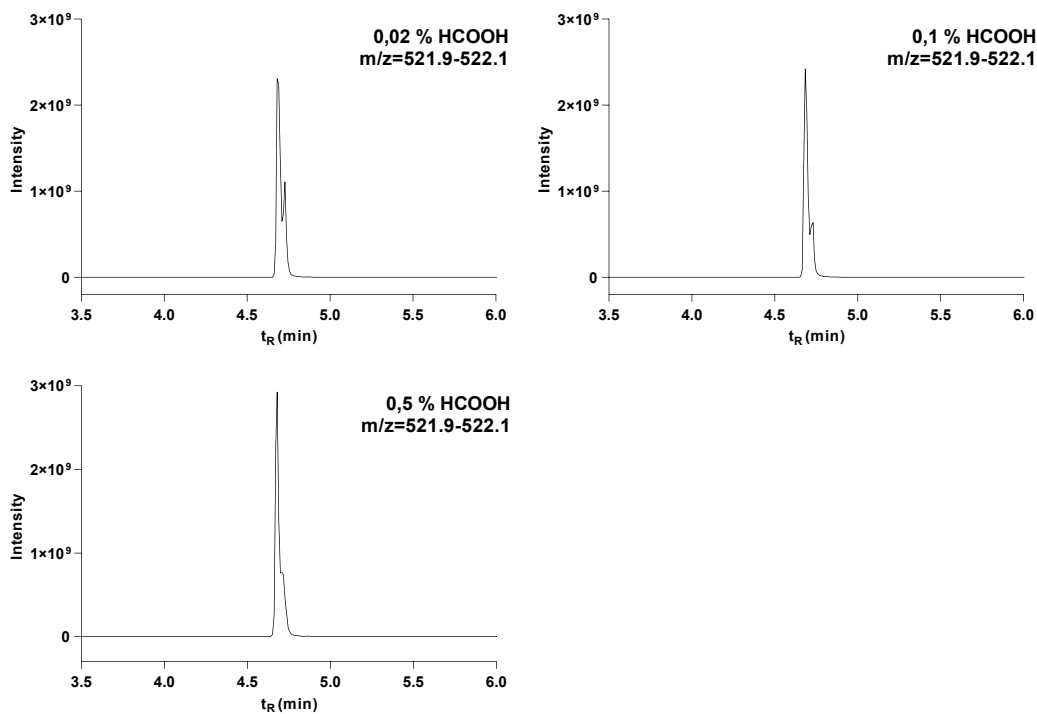


Obrázek 18: Extrahované iontové chromatogramy di-isononyl ftalátu v různých mobilních fázích.

Následně byl vliv přídavku kyseliny mravenčí do mobilní fáze testován ve třech koncentracích (0,02%; 0,1%; 0,5%). Záznamy extrahovaných chromatogramů pro jednotlivé koncentrace kyseliny mravenčí jsou demonstrovány na příkladu DEHP (Obrázek 19) a TCS (Obrázek 20).

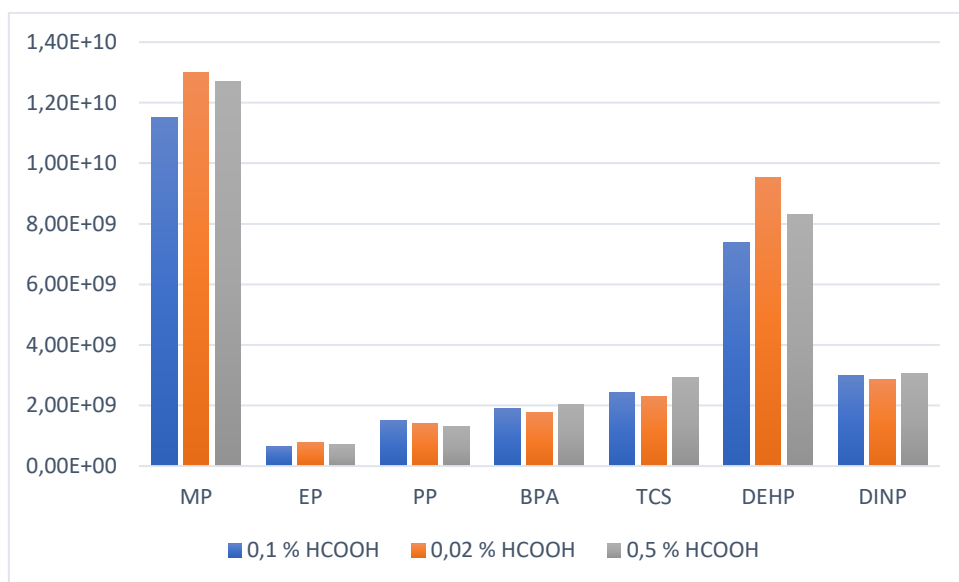


Obrázek 19: Extrahované iontové chromatogramy bis-2-ethylhexylftalátu při testování vlivu koncentrace kyseliny mravenčí v MF.

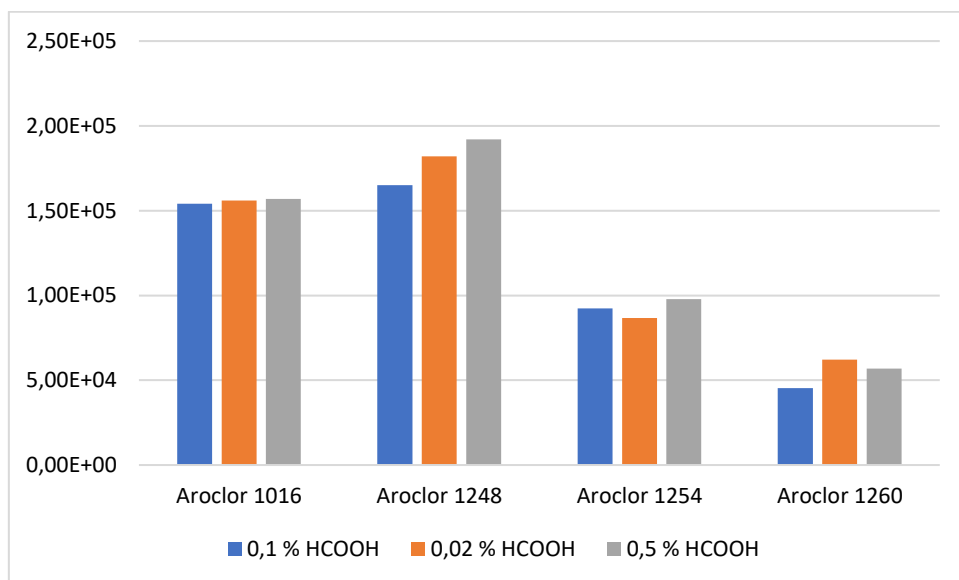


Obrázek 20: Extrahované iontové chromatogramy dansylovaného triclosanu při testování vlivu koncentrace kyseliny mravenčí v MF.

Odezva MS detektoru byla pro jednotlivé disruptory na všech testovaných koncentračních úrovních podobná (Graf 4 a Graf 5), při výběru tedy opět rozhodoval převážně tvar píku a symetrie píků. Při použití 0,02% a 0,1% kyseliny mravenčí docházelo ke štěpení analytu z důvodu nevhodných podmínek separace. Nejvíce symetrické píky byly získány za použití 0,5% kyselina mravenčí, která byla následně zvolena jako optimální mobilní fáze.



Graf 4: Porovnání intenzity odezvy disruptorů při testování vlivu koncentrace kyseliny mravenčí v MF.

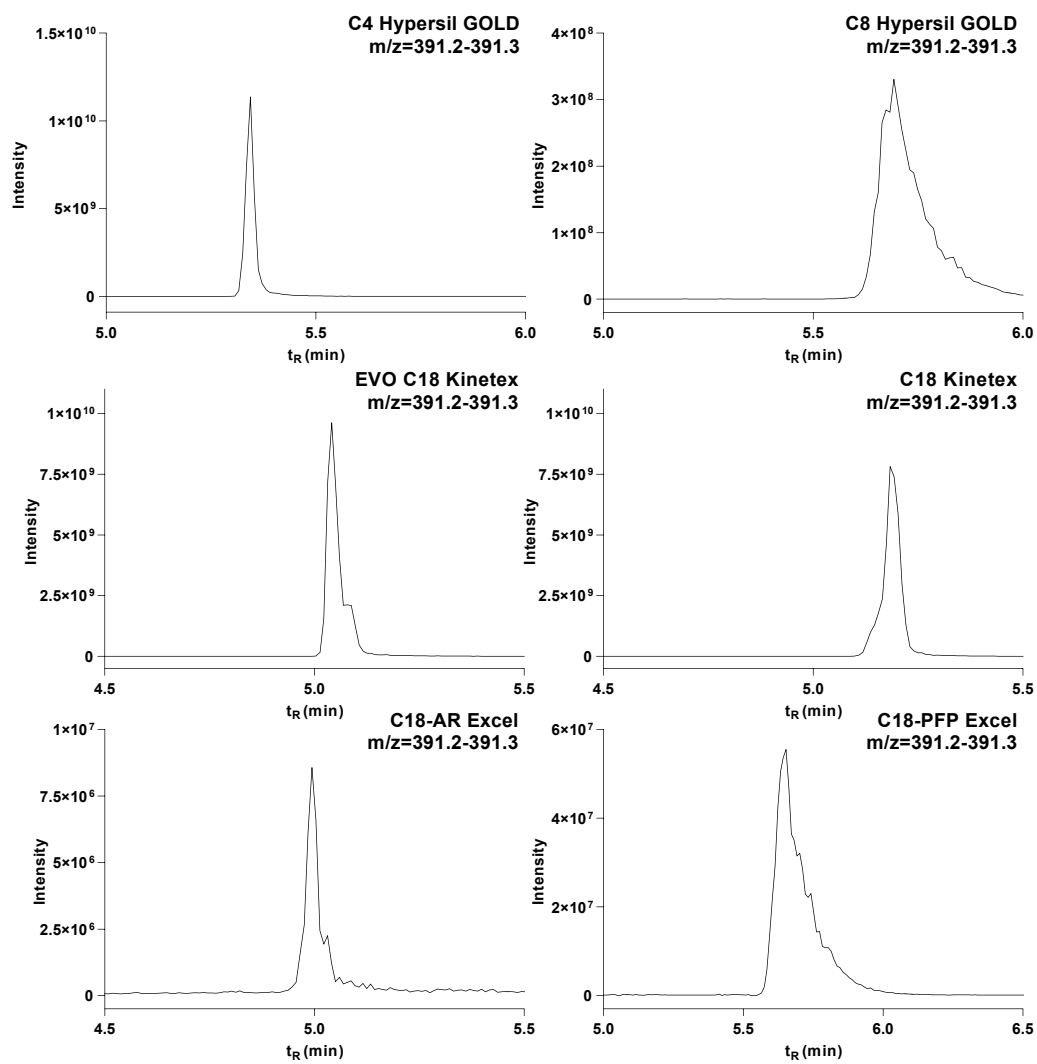


Graf 5: Porovnání intenzity odezvy disruptorů při testování vlivu koncentrace kyseliny mravenčí v MF.

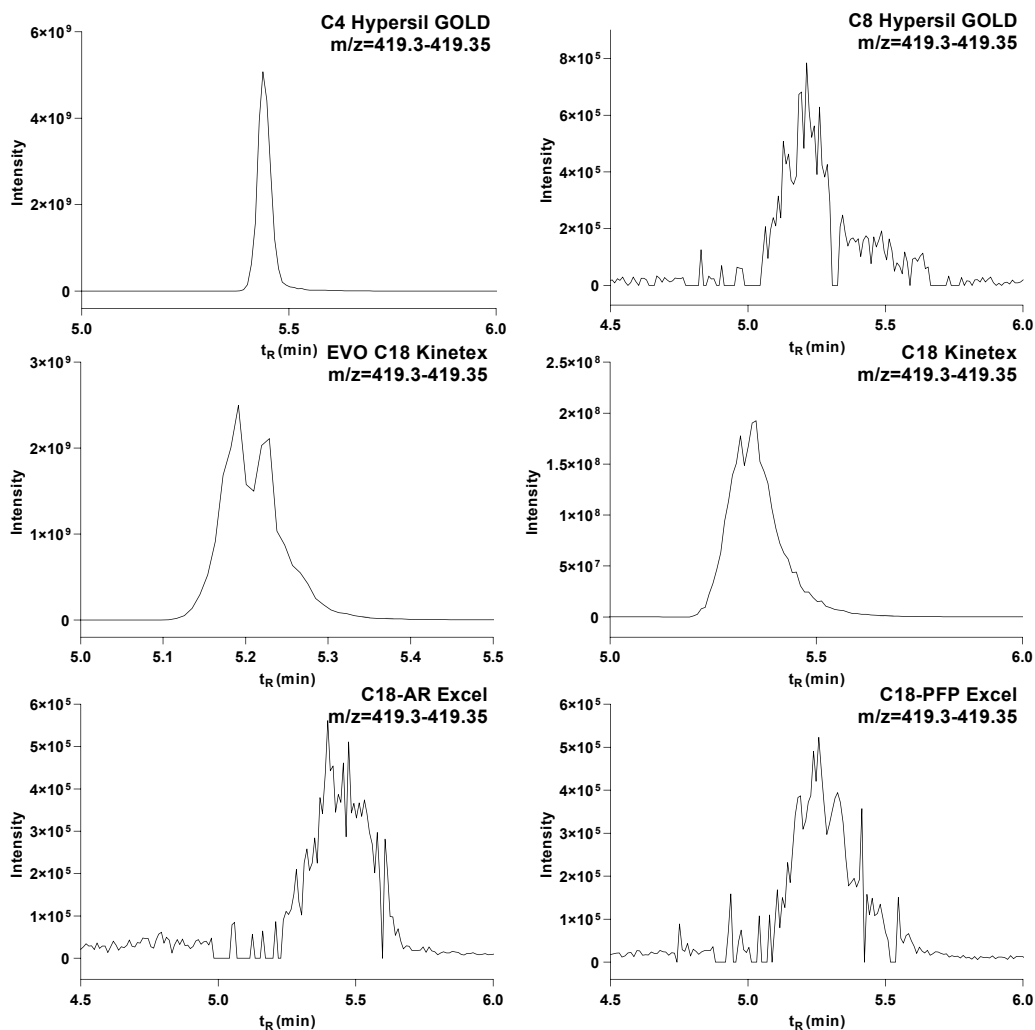
5.1.2.2 Výběr chromatografické kolony

Pro stanovení endokrinních disruptorů byl jako chromatografický mód zvolen systém s reverzními fázemi, kde stacionární fáze má nepolární charakter a fáze mobilní charakter polární. Cílem testování jednotlivých kolon bylo najít takovou kolonu, na níž dojde k separaci analytů na základní linii a vyhovujícímu tvaru eluovaných píků v přijatelném čase analýzy. Testované kolony, včetně jejich základní charakteristiky, jsou uvedeny v Tabulka 2 (kapitola 4.1.1.5)

Pro testování účinnosti kolon byla využita již optimalizovaná mobilní fáze 0,5% HCOOH (v/v) a gradientová eluce uvedená v Tabulce 5 v kapitole 5.1.1. Kolony se stacionární fází EVO C18 a C18 byly vybrány jako základní screeningové kolony. Z důvodu předpokladu vysoké lipofility a s tím spojené předpokládané vysoké retence stanovovaných analytů byly do testování kolon zařazeny také stacionární fáze C4 a C8. Aromatické jádro na koloně C18-AR je vhodné pro separaci látek obsahujících aromatický kruh, který může zapříčinit změnu selektivity stacionární fáze. V neposlední řadě byla testována kolona s navázaným pentafluorfenylem (PFP), která je vhodná k separaci halogenovaných aromatických sloučenin, hlavně díky π - π interakcím. Účinnost separace testovaných kolon je demonstrována na příkladech DEHP a DINP (Obrázek 21 a Obrázek 22).



Obrázek 21: Retence DEHP při testování různých SF.



Obrázek 22: Retence DINP při testování různých SF.

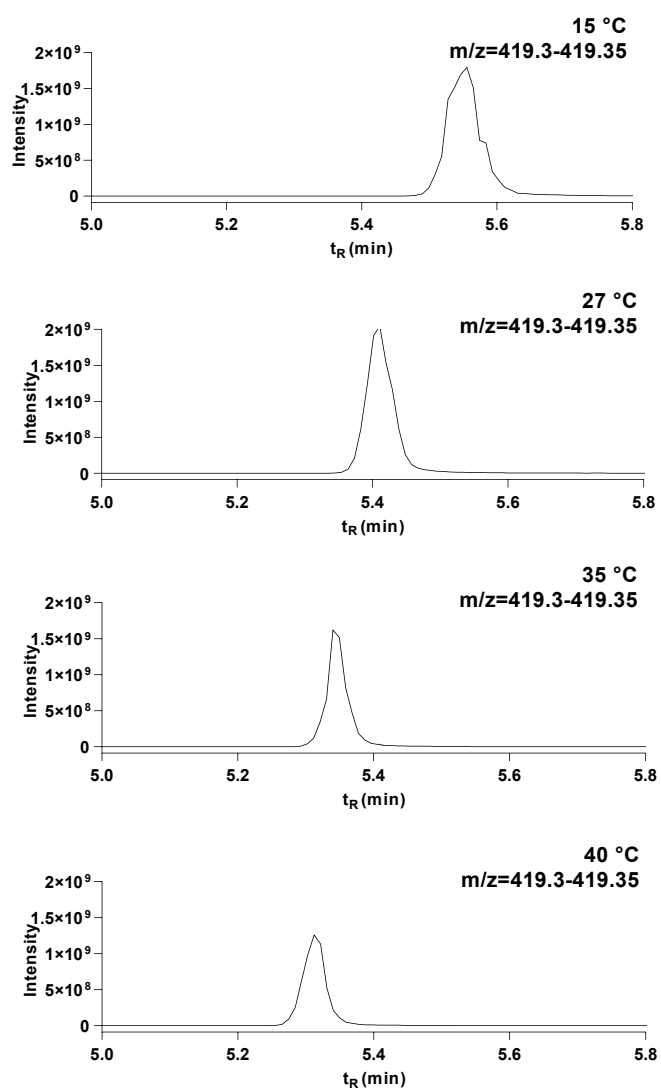
Výběr kolony byl prováděn především vylučovací metodou na základě retenčních časů analytů a tvaru jejich píků. Nejčastější komplikací byla eluce rozmytých píků, kdy se objevoval buď frontující nebo chvostující pík (Obrázek 21 a Obrázek 22). Jako vhodnější stacionární fáze byla vybrána kolona Hypersil GOLD C4.

5.1.2.3 Optimalizace teploty a gradientové eluce

Po volbě stacionární fáze byla dalším krokem optimalizace teploty kolonového termostatu. Z principů HPLC separace vyplývá, že zvýšením teploty na koloně klesá viskozita MF, zvyšuje se účinnost separace a obvykle klesá

retence analytů. K optimalizaci metody byly testovány teploty 15, 27, 35 a 40 °C.

Z přiloženého Obrázku 23 je zřejmé, že s narůstající teplotou se analyty eluují dříve a zároveň dochází k eluci užších píků. Jelikož při teplotě 40 °C docházelo ke koeluci některých analytů s velmi nízkými retenčními časy, a vzhledem k možné přítomnosti matricových efektů v těchto retenčních časech, byla jako vhodná teplota zvolena teplota 35 °C.



Obrázek 23: Extrahované iontové chromatogramy DINP při testování teploty kolonového termostatu.

Dále bylo nutné optimalizovat průběh gradientové eluce. Změny gradientů byly testovány za použití MF A 0,5% (v/v) HCOOH, MF B 0,5% (v/v) HCOOH

v ACN s průtokem 0,5 ml/min. Testované gradienty jsou uvedeny v Tabulce 9-11.

Tabulka 10: Profil gradientu 2.

Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0,3	70	30
3,3	0	100
4,0	0	100
4,0	70	30
7,5	70	30

Tabulka 11: Profil gradientu 3.

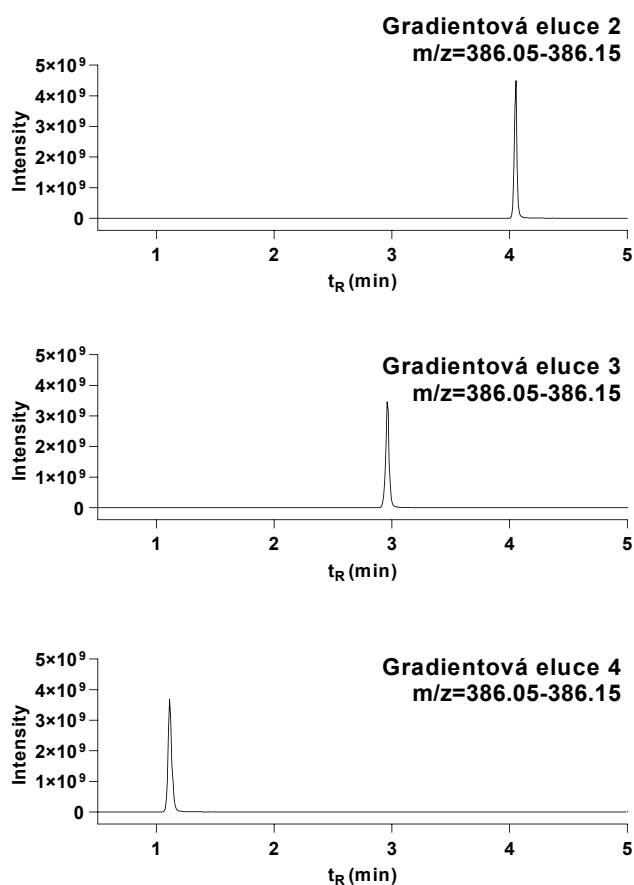
Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0,3	50	50
3,3	0	100
4,0	0	100
4,0	50	50
7,5	50	50

Tabulka 12: Profil gradientu 4.

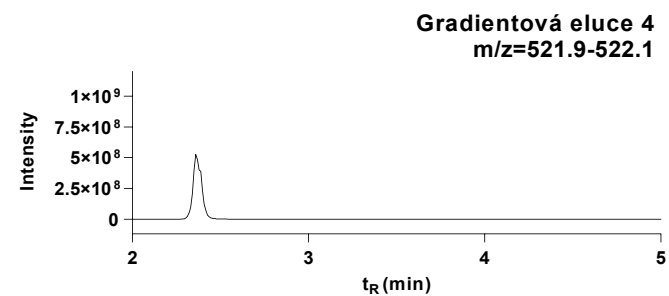
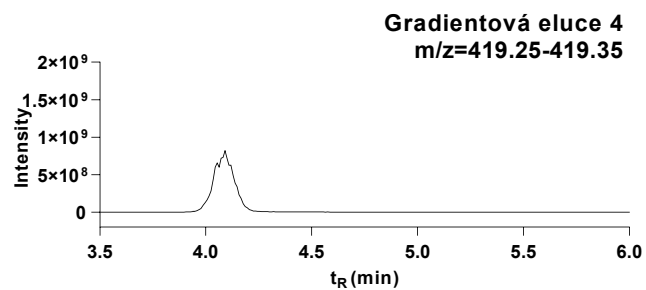
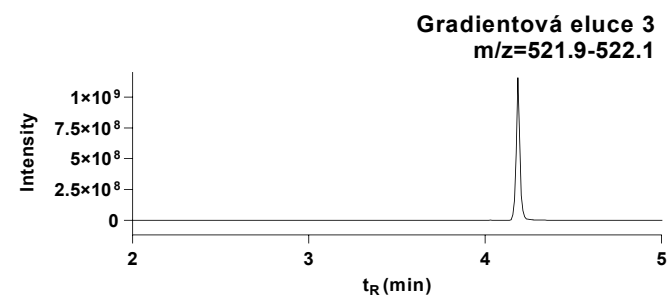
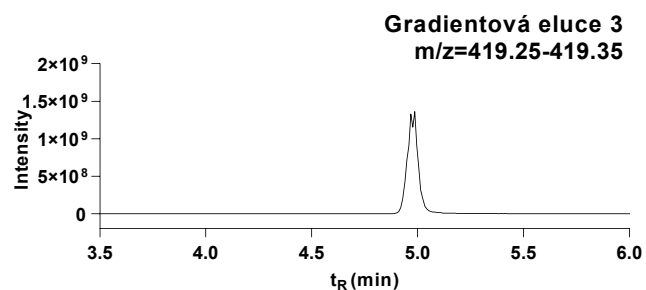
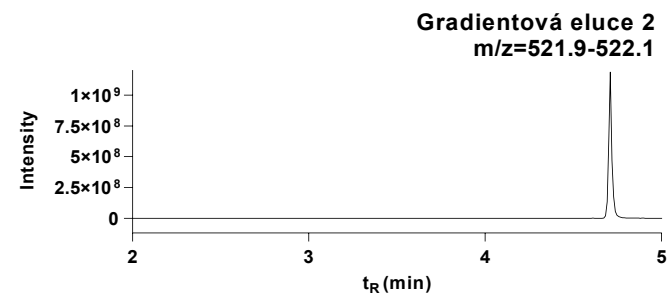
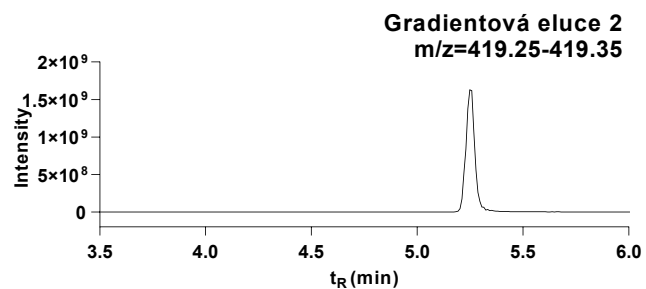
Čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0,3	30	70
3,3	0	100
4,0	0	100
4,0	30	70
7,5	30	70

Hlavním cílem úpravy gradientové eluce bylo optimalizovat retenční časy, vylepšit separaci jednotlivých analytů a dosáhnout vhodné symetrie eluovaných píků. Při gradientové eluci 2 (Tabulka 10), která začínala na 70 % MF A a 30 % MF B se první analyt (MP) eluoval v čase 4,05 min. a poslední (DINP) se eluoval v čase 5,25 min. Když gradient začínal v poměru 50 % MF A a 50 % MF B (gradientová eluce 3, Tabulka 11), eluoval se MP v čase 2,96 min. a DINP v čase 4,99 min. U tohoto gradientu bylo pozorováno výrazné vylepšení separace a symetrie píků a rovněž nedocházelo ke koeluci žádných ze

stanovovaných analytů. V případě gradientové eluce 4 (Tabulka 12) počátečními podmínkami 30 % MF A a 70 % MF B, byl pozorován výrazný pokles účinnosti separace a docházelo také k rozšiřování zón jednotlivých analytů (Obrázek 25, Obrázek 26) v porovnání s ostatními testovanými gradienty. Pozorována byla rovněž koeluce jednotlivých analytů, a zároveň retenční časy některých analytů byli již velmi nízké (Obrázek 24), což by mohlo potenciálně vyústit v koeluci s polárními balastními látkami. Jako optimální gradient byl tedy zvolen gradient začínající na 50 % MF A a 50 % MF B.



Obrázek 24: Extrahované iontové chromatogramy dansylovaného MP při různých gradientových elucích



Obrázek 25: Extrahované iontové chromatogramy DINP při různých gradientových elucích.

Obrázek 26: Extrahované iontové chromatogramy danylovaného TCS při různých gradientových elucích.

5.1.2.4 Volba iontového zdroje

Při vývoji této metody byly testovány ionizační techniky ESI a APCI. V obou případech ionizace probíhala v pozitivním módu.

Jako vhodnější zdroj pro detekci dansylovaných parabenů se ukázala ionizace pomocí ESI, jelikož byla zaznamenána dvojnásobná hodnota jejich odezvy. Pro skupinu dansylovaného BPA, dansylovaného TCS, DEHP a DINP byla odezva obou zdrojů víceméně shodná. Hlavní výhodou iontového zdroje APCI, byla možnost detekce Aroclorů, které nebylo možné zaznamenat při použití ionizace elektrosprejem. Nicméně pokud by nebylo nutné analyzovat bifenyly, jako vhodný ionizační zdroj se ukázal elektrosprej. Jako ionizační technika byla tedy z důvodu své univerzálnosti použita pro námi stanovované disruptory vybrána ionizace pomocí APCI.

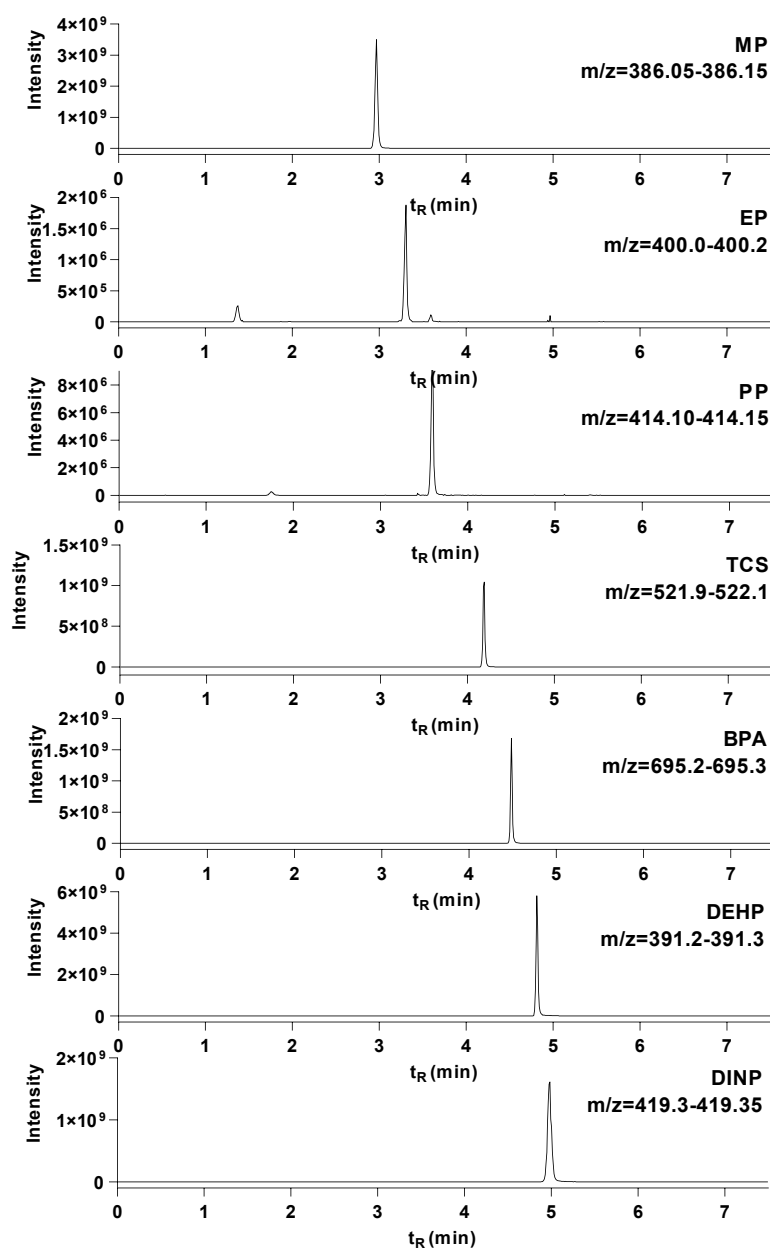
5.1.3 Souhrn optimalizovaných parametrů HPLC-MS metody

V Tabulce 13 jsou uvedeny finálně optimalizované parametry metody.

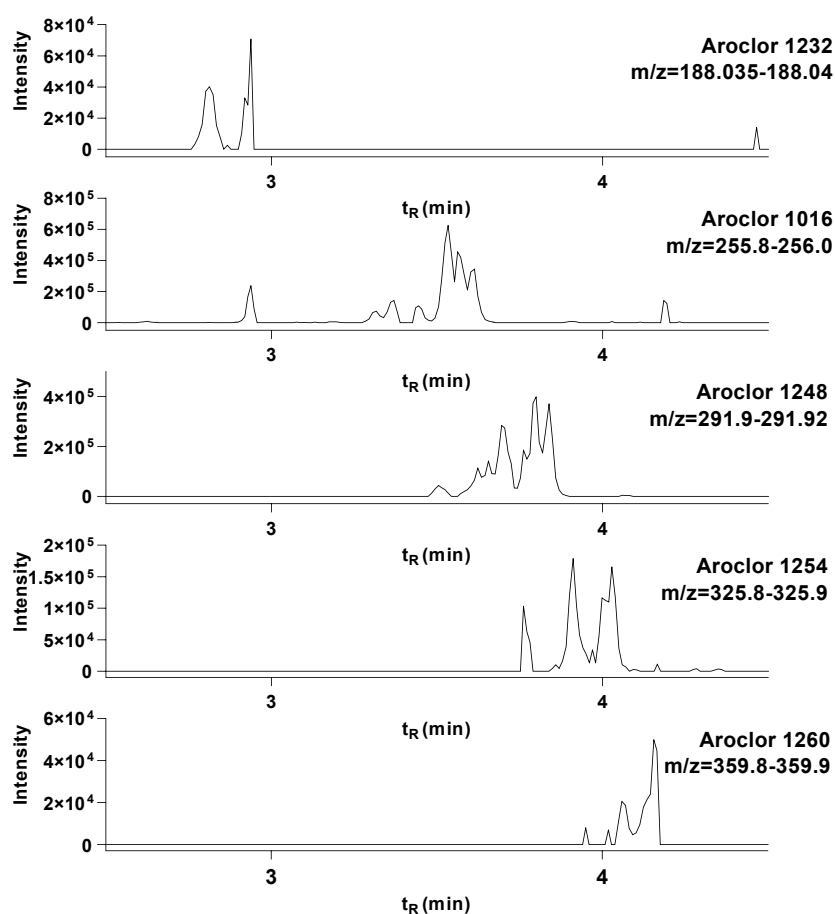
Tabulka 13: Základní optimalizované parametry pro separaci a detekci skupiny endokrinních disruptorů.

Stacionární fáze	Hypersil GOLD C4 (2,1 × 100 mm/1,9 μm)
Mobilní fáze	MF A 0,5 % (v/v) HCOOH MF B ACN + 0,5 % (v/v) HCOOH
Typ eluce	gradientová
Průtok	0,5 (ml/min)
Nastřikovaný objem	5 μl
Teplota	35 °C
Ionizační technika	APCI

Na Obrázku 27 a Obrázku 28 jsou zaznamenány extrahované iontové chromatogramy všech stanovovaných látek naměřené při optimalizovaných podmínkách. V případě standardů aroclorů, výrobce deklaruje jejich koncentraci a uvádí pouze počet chlórů na bifenyly, nikoliv jejich polohu. Z extrahovaných iontových chromatogramů jednotlivých aroclorů je patrné, že se jedná o směs polohových izomerů PCB (Obrázek 28). Námi optimalizované podmínky byly bez jakýchkoliv modifikací aplikovány pro analýzu reálných vzorků (reálná měření ale nebyla součástí diplomové práce). Taktéž cílem diplomové práce nebyla validace metody.



Obrázek 27: Extrahované iontové chromatogramy dansylovaných parabenů, ftalátů, dansylovaného BPA a dansylovaného TCS.



Obrázek 28: Extrahované iontové chromatogramy PCB.

5.1.4 Experiment uvolňování disruptorů z použitých laboratorních pomůcek

Cílem experimentu bylo stanovit, zda se z použitých mikroskopů a špiček od pipet v průběhu přípravy vzorků neuvolňují námi stanovované disruptory a tím pádem nezkreslují naměřené výsledky.

Příprava inkubovaných vzorků a kontrolních blankových roztoků je uvedena v kapitole 4.1.4. Výsledky jsou vyjádřeny jako nárůst množství disruptorů v extraktu ze špiček a eppendorf zkumavek oproti blankovým vzorkům v procentech (Tabulka 14, Tabulka 15).

Tabulka 14: Uvolňování parabenů, ftalátů, BPA a TCS z Eppendorf zkumavek.

Inkubace	MP [Area]	Nárůst [%]	EP [Area]	Nárůst [%]	PP [Area]	Nárůst [%]	BPA [Area]	Nárůst [%]	DEHP [Area]	Nárůst [%]	DINP [Area]	Nárůst [%]
blank (pH=4)	1,00E+05								5,57E+07		1,55E+07	
inkubace zkumavek (pH=4)	3,28E+05	227	n.d.		n.d.		n.d.		5,77E+07	3	2,08E+07	35
blank (pH=7,4)	9,70E+04								5,08E+07		1,91E+07	
inkubace zkumavek (pH=7,4)	1,47E+05	52	n.d.		n.d.		n.d.		5,62E+07	11	1,99E+07	4
blank (pH=10,5)	1,37E+05								6,81E+07		2,05E+07	
inkubace zkumavek (pH=10,5)	1,67E+05	22	n.d.		n.d.		n.d.		1,24E+08	82	1,91E+07	-7

n.d.= not detected (odezva detektoru 4,00E+04 a nižší)

zvýrazněné nárůsty vyšší než 15 % oproti blankovému vzorku

Tabulka 15: Uvolňování parabenů, ftalátů, BPA a TCS z pipetovacích špiček.

Inkubace	MP [Area]	Nárůst [%]	EP [Area]	Nárůst [%]	PP [Area]	Nárůst [%]	BPA [Area]	Nárůst [%]	DEHP [Area]	Nárůst [%]	DINP [Area]	Nárůst [%]
blank (pH=7,4)	9,70E+04				6,64E+05		5,17E+04		5,08E+07		1,91E+07	
modré špičky (pH=7,4)	1,67E+05	72	n.d.		2,66E+05	-60	5,51E+04	7	4,58E+07	-10	1,93E+07	1
blank (pH=7,4)	9,70E+04				6,64E+05				5,08E+07		1,91E+07	
žluté špičky (pH 7,4)	1,52E+05	57	n.d.		6,72E+05	1	n.d.		1,09E+08	115	1,94E+07	2
blank (pH=7,4)	9,70E+04				6,64E+05				5,08E+07		1,91E+07	
VWR špičky modré (pH=7,4)	1,33E+05	37	n.d.		3,08E+05	-54	n.d.		3,82E+07	-25	1,88E+07	-1
blank (m-Penta)	4,24E+04				2,37E+05				3,55E+07		1,67E+07	
modré špičky v m-Penta	1,00E+05	137	n.d.		2,62E+05	10	n.d.		1,83E+08	414	1,82E+07	9

n.d.= not detected (odezva detektoru 4,00E+04 a nižší)

zvýrazněné nárůsty vyšší než 15 % oproti blankovému vzorku

Ve všech inkubovaných vzorcích, jak u špiček, tak u eppendorf zkumavek bylo detekováno zvýšené množství MP v porovnání s blankovým vzorkem (Tabulka 14, Tabulka 15). Nejvíce MP se uvolnilo z eppendorf zkumavek v kyselém prostředí (konkrétně nárůst o 227 % oproti blanku) (viz Tabulka 14). V alkalickém prostředí k tak vysokému uvolňování MP nedošlo pravděpodobně z důvodu, že parabeny jsou obecně stabilní v pH 4,5-7,5 a v alkalickém prostředí hydrolyzují na *p*-hydroxybenzoovou kyselinu a příslušný alkohol. [79] Dále bylo z Eppendorf zkumavek prokázáno uvolňování DEHP v zásaditém prostředí a menší množství DINP v prostředí kyselém. V případě experimentu se špičkami se kromě MP poměrně výrazně uvolňoval i DEHP, u kterého v prostředí *m*-Penta došlo k nárůstu detekovaného množství o 414 % v porovnání s blankem.

V proměřovaných vzorcích jsme nezaznamenali žádné množství TCS a Aroclorů. Tyto látky se do našich vzorků neuvolňovaly nebo pravděpodobněji se v použitých laboratorních pomůckách vůbec nevyskytovaly.

Uvolňování disruptorů ze špiček a eppendorf zkumavek bylo mimo rámec diplomové práce pozorováno v nižší míře i v rámci experimentů s reálnými vzorky, které procházely výše uvedenou optimalizovanou úpravou vzorku a analýzou. Ukázalo se tedy, že uvolňování některých disruptorů není způsobeno pouze extrémními podmínkami, které jsme záměrně zvolili pro náš experiment, a že je tedy nutné ho v dalším postupu při analýze reálných vzorků zohlednit.

Z výsledků provedeného experimentu je patrné, že pro přesnou kvantifikaci stanovovaných disruptorů a další výzkum v této oblasti bude z důvodu možnosti uvolňování těchto látek z laboratorních pomůcek pravděpodobně nutné v průběhu přípravy vzorku používat výhradně skleněné laboratorní pomůcky včetně skleněných pipetovacích špiček. Skleněné špičky jsou dostupné například od firmy Merck (Nichipet Eco pipette). Špičky lze po použití recyklovat za využití důkladného promytí a odstranění všech reziduí.

6 ZÁVĚR

Endokrinní disruptory svými účinky na lidské tělo mění funkce endokrinního systému, což může způsobovat mnoho negativních účinků u lidí i zvířat. Byla vznesena hypotéza o vlivu ED v plodové vodě u těhotných žen na předčasný porod. Z tohoto důvodu bylo třeba vyvinout analytickou metodu pro stanovení dvanácti ED. Spektrum sledovaných látek bylo navrženo skupinou lékařů gynekologického a porodnického oddělení FNHK, kteří se dlouhodobě zabývají vlivem exogenních látek v plodové vodě na průběh těhotenství.

V rámci práce byla vyvinuta a optimalizována analytická metoda pro stanovení dvanácti vybraných disruptorů. Jako univerzální extrakční činidlo s nejvyšší extrakční účinností byl vybrán 5-methyl-2-pentanon. Separace disruptorů byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s gradientovou elucí. Jako mobilní fáze A byla použita 0,5 % (v/v) kyselina mravenčí a jako mobilní fáze B 0,5 % roztok (v/v) kyseliny mravenčí v acetonitrilu. Separace probíhala na analytické koloně Hypersil GOLD C4 (ThermoFisher Scientific), s gradientovou elucí začínající v poměru 50:50 (MF A:MF B) a teplotou na koloně 35 °C. Jako vhodná ionizační technika byla zvolena chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Na optimalizované metodě již probíhá proměření reálných vzorků, čím brzy může být vznesená hypotéza potvrzena či vyvrácena.

Jelikož v rámci úpravy vzorku před analýzou dochází ke kontaktu analytů s plastovými mikrozkušavkami a špičkami, byl proveden test uvolňování stanovovaných ED z laboratorních pomůcek, který uvolňování některých ED z plastových materiálů potvrdil. Pro zamezení tohoto uvolňování navrhuje při dalším stanovení a kvantifikaci disruptorů používat výhradně skleněné laboratorní pomůcky.

Seznam použité literatury

- [1] *Endocrine disruptors* [online]. [cit. 2022-01-27]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/en/hot-topics/endocrine-disruptors>
- [2] *What are endocrine disruptors?* [online]. [cit. 2022-01-27]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endodis_en.htm
- [3] KABIR, Eva Rahman, Monica Sharfin RAHMAN a Imon RAHMAN. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2015, **40**(1), 241-258 [cit. 2021-11-17]. ISSN 13826689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2015.06.00
- [4] DIAMANTI-KANDARAKIS, Evanthia, Jean-Pierre BOURGUIGNON, Linda C. GIUDICE, Russ HAUSER, Gail S. PRINS, Ana M. SOTO, R. Thomas ZOELLER a Andrea C. GORE. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* [online]. 2009, **30**(4), 293-342 [cit. 2021-11-17]. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2009-0002
- [5] GORE, Andrea C., et al. Introduction to endocrine disrupting chemicals (EDCs). *A guide for public interest organizations and policy-makers*, 2014, 21-22.
- [6] NEWBOLD, Retha R., Elizabeth PADILLA-BANKS, Ryan J. SNYDER a Wendy N. JEFFERSON. Perinatal exposure to environmental estrogens and the development of obesity. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2007, **51**(7), 912-917 [cit. 2022-03-08]. ISSN 16134125. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.200600259
- [7] SONG, Yan, Elizabeth L. CHOU, Aileen BAECKER, Nai-Chieh Y. YOU, Yiqing SONG, Qi SUN a Simin LIU. Endocrine-disrupting chemicals, risk of type 2 diabetes, and diabetes-related metabolic traits: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Diabetes* [online]. 2016, **8**(4), 516-532 [cit. 2022-03-08]. ISSN 17530393. Dostupné z: doi:10.1111/1753-0407.12325
- [8] MUSCOGIURI, Giovanna, Luigi BARREA, Daniela LAUDISIO, Silvia SAVASTANO a Annamaria COLAO. Obesogenic endocrine disruptors and obesity: myths and truths. *Archives of Toxicology* [online]. 2017, **91**(11), 3469-3475 [cit. 2022-03-16]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-017-2071-1
- [9] *Porozumět nařízení REACH* [online]. [cit. 2022-01-27]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/regulations/reach/understanding-reach>
- [10] Parabens Factsheet. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. Atlanta, 2017 [cit. 2021-11-17]. Dostupné z: https://www.cdc.gov/biomonitoring/Parabens_FactSheet.html
- [11] Parabens. *ChemicalSafetyFacts* [online]. c2021 [cit. 2021-11-17]. Dostupné z: <https://www.chemicalsafetyfacts.org/parabens/>
- [12] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1004/2014 ze dne 18. září 2014, kterým se mění příloha V nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. In: EUR-Lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [cit. 5. 12. 2021]. Dostupné také z: <http://eurlex.europa.eu/>

- [13] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie. In: EUR-Lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [cit. 5. 12. 2021]. Dostupné také z: <http://eurlex.europa.eu/>
- [14] EFSA advises on the safety of paraben usage in food. *Europien Food Safety Authority* [online]. 2004 [cit. 2022-01-23]. Dostupné z: <https://www.efsa.europa.eu/en/news/efsa-advises-safety-paraben-usage-food>
- [15] *European Public MRL assessment report (EPMAR)* [online]. [cit. 2022-01-23]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/propyl-4-hydroxybenzoate-its-sodium-salt-all-food-producing-species-european-public-mrl-assessment_en.pdf
- [16] BOBERG, Julie, Camilla TAXVIG, Sofie CHRISTIANSEN a Ulla HASS. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reproductive Toxicology* [online]. 2010, **30**(2), 301-312 [cit. 2021-12-01]. ISSN 08906238. Dostupné z: doi:10.1016/j.reprotox.2010.03.011
- [17] SYME, Michael R, James W PAXTON a Jeffrey A KEELAN. Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta. *Clinical Pharmacokinetics* [online]. 2004, **43**(8), 487-514 [cit. 2021-12-01]. ISSN 0312-5963. Dostupné z: doi:10.2165/00003088-200443080-00001
- [18] SONG, Shiming, Yuan HE, Tao ZHANG, Hongkai ZHU, Xiongfei HUANG, Xueyuan BAI, Bo ZHANG a Kurunthachalam KANNAN. Profiles of parabens and their metabolites in paired maternal-fetal serum, urine and amniotic fluid and their implications for placental transfer. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2020, **191** [cit. 2021-12-01]. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110235
- [19] Phthalates Factsheet. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. Atlanta, 2021 [cit. 2021-12-02]. Dostupné z: https://www.cdc.gov/biomonitoring/Phthalates_FactSheet.html
- [20] Phthalates. *U.S. Food and Drug Administration* [online]. Silver Spring, 2013 [cit. 2021-12-02]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-ingredients/phthalates>
- [21] PEIJNENBURG, W.J.G.M. Phthalates. *Encyclopedia of Ecology* [online]. Elsevier, 2008, 2008, s. 2733-2738 [cit. 2021-12-02]. ISBN 9780080454054. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008045405-4.00419-5
- [22] ZHANG, Yunhui, Ling LIN, Yang CAO, Bingheng CHEN, Lixing ZHENG a Ren-Shan GE. Phthalate Levels and Low Birth Weight: A Nested Case-Control Study of Chinese Newborns. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2009, **155**(4), 500-504 [cit. 2021-12-02]. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpeds.2009.04.007
- [23] LATINI, Giuseppe, Claudio DE FELICE, Giuseppe PRESTA, Antonio DEL VECCHIO, Irma PARIS, Fabrizio RUGGIERI a Pietro MAZZEO. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2003, **111**(14), 1783-1785 [cit. 2022-01-25]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.6202
- [24] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2018/2005 ze dne 17. prosince 2018, kterým se mění příloha XVII nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a

- omezování chemických látek, pokud jde o bis(2-ethylhexyl)-ftalát (DEHP), dibutyl-ftalát (DBP), benzyl-butyl-ftalát (BBP) a diisobutyl-ftalát (DIBP). In: EUR-Lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [cit. 5. 12. 2021]. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu>
- [25] KIM, H.S. a B.M. LEE. Endocrine Disrupting Chemicals and Human Cancer. *Encyclopedia of Environmental Health* [online]. Elsevier, 2011, 2011, s. 296-305 [cit. 2021-12-02]. ISBN 9780444522726. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52272-6.00027-1
- [26] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2018/213 ze dne 12. února 2018 o použití bisfenolu A v lacích a nátěrových hmotách určených pro styk s potravinami a o změně nařízení (EU) č. 10/2011, pokud jde o použití uvedené látky v materiálech z plastů určených pro styk s potravinami. In: EUR-Lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [cit. 5. 12. 2021]. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/>
- [27] Triclosan Factsheet. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]. Atlanta, 2017 [cit. 2021-12-03]. Dostupné z: https://www.cdc.gov/biomonitoring/Triclosan_FactSheet.html
- [28] 5 Things to Know About Triclosan. *U.S. Food and Drug Administration* [online]. Silver Spring, 2019 [cit. 2021-12-03]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/consumers/consumer-updates/5-things-know-about-triclosan>
- [29] NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 358/2014 ze dne 9. dubna 2014, kterým se mění přílohy II a V nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. In: EUR-Lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [cit. 5. 12. 2021]. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu>
- [30] *Polychlorinated biphenyls (PCBs)* [online]. 2000 [cit. 2021-12-03]. Dostupné z: https://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0016/123064/AQG2ndEd_5_10PCBs.PDF
- [31] Learn about Polychlorinated Biphenyls (PCBs). *U.S. Environmental Protection Agency* [online]. Washington, D.C., USA [cit. 2021-12-03]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/pcbs/learn-about-polychlorinated-biphenyls-pcbs>
- [32] *Polychlorované bifenyly (PCB)* [online]. [cit. 2021-12-03]. Dostupné z: https://www.irz.cz/sites/irz.env.cz/files/repository/látky/polychlorovane_bifenyly.pdf
- [33] *Směrnice Rady ze dne 16. září 1996 o odstraňování polychlorovaných bifenyliů a polychlorovaných terfenylů (PCB/PCT)*. In: EUR-Lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [cit. 5. 12. 2021]. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/>
- [34] JACOBSON, Joseph L. a Sandra W. JACOBSON. Intellectual Impairment in Children Exposed to Polychlorinated Biphenyls in Utero. *New England Journal of Medicine* [online]. 1996, **335**(11), 783-789 [cit. 2021-12-03]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM199609123351104
- [35] BONSNES, ROY W. COMPOSITION OF AMNIOTIC FLUID. *Clinical Obstetrics and Gynecology* [online]. 1966, **9**(2), 440-448 [cit. 2021-12-26]. ISSN 0009-9201. Dostupné z: doi:10.1097/00003081-196606000-00012
- [36] UNDERWOOD, Mark A, William M GILBERT a Michael P SHERMAN. Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. *Journal of Perinatology* [online]. 2005, **25**(5), 341-348 [cit. 2021-12-26]. ISSN 0743-8346. Dostupné z: doi:10.1038/sj.jp.7211290

- [37] *Amniotic fluid* [online]. [cit. 2022-01-23]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/ency/article/002220.htm>
- [38] HARMAN, Christopher R. Amniotic Fluid Abnormalities. *Seminars in Perinatology* [online]. 2008, **32**(4), 288-294 [cit. 2021-12-26]. ISSN 01460005. Dostupné z: doi:10.1053/j.semperi.2008.04.012
- [39] LIU, Li-Ling, Li-Hong PANG a Bi-Ye DENG. Prenatal Diagnosis and Pregnancy Outcome Analysis of Polyhydramnios. *Fetal and Pediatric Pathology* [online]. 2015, **35**(1), 21-28 [cit. 2021-12-26]. ISSN 1551-3815. Dostupné z: doi:10.3109/15513815.2015.1122127
- [40] GOMELLA, Tricia Lacy, M. Douglas CUNNINGHAM, Fabien G. EYAL a Karin E. ZENK, ed. *Neonatology: management, procedures, on-call problems, diseases, and drugs*. 5th ed. New York, N.Y.: Lange Medical Books/McGraw-Hill, Medical Publ. Division, c2004. Lange clinical manual. ISBN 0-07-138918-0. ISSN 0697-6295.
- [41] DUSZA, Hanna M., Katherine E. MANZ, Kurt D. PENNELL, Rakesh KANDA a Juliette LEGLER. Identification of known and novel nonpolar endocrine disruptors in human amniotic fluid. *Environment International* [online]. 2022, **158** [cit. 2021-12-26]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2021.106904
- [42] Nováková, Lucie. *Moderní trendy v přípravě vzorku pro analýzu separačními technikami* [přednáška]. Hradec Králové: FAF UK v Hradci Králové, 25.10.2019
- [43] RONALD, E. *SAMPLE PREPARATION FUNDAMENTALS FOR CHROMATOGRAPHY* [online]. 2013, 364 [cit. 2021-12-26]. Dostupné z: https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf
- [44] Nováková, Lucie. *Moderní trendy v přípravě vzorku pro analýzu separačními metodami* [přednáška]. Hradec Králové: FAF UK v Hradci Králové, 1.10.2019.
- [45] Kučera, Radim. *Úprava vzorku před analýzou LLE, deproteinace* [přednáška]. Hradec Králové: FAF UK v Hradci Králové, 20.12.2020.
- [46] HPLC.cz [online]. [cit. 26.12.2021]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>
- [47] SNYDER, Lloyd R., Joseph J. KIRKLAND a John W. DOLAN. *Introduction to Modern Liquid Chromatography* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2009 [cit. 2021-12-26]. ISBN 9780470508183. Dostupné z: doi:10.1002/9780470508183
- [48] FANALI, Salvatore. *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*. Waltham: Elsevier, c2013. ISBN 978-0-12-415807-8.
- [49] KAZAKEVICH, Yuri a Rosario LOBRUTTO, ed. *HPLC for Pharmaceutical Scientists* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2007 [cit. 2021-12-26]. ISBN 9780470087954. Dostupné z: doi:10.1002/0470087951
- [50] KOVAŘÍKOVÁ, Petra; STARIAT, Ján. HPLC- popis základního hardwaru [pdf]. Dostupné z https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%2020_HPLC%20instrumentace.pdf

- [51] KOVAŘÍKOVÁ, Petra; STARIAT, Ján. HPLC- stacionární fáze a separační módy [pdf]. Dostupné z https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/399298/mod_resource/content/1/Lekce%204_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf
- [52] NOVÁKOVÁ, Lucie. Moderní trendy v HPLC [pdf]. Dostupné z https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/276836/mod_resource/content/1/Modern%C3%AD%20trendy%20v%20HPLC%20prezentace%20p%C5%99edn%C3%A1%C5%A1ka.pdf
- [53] SWARTZ, Michael. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2010, **33**(9-12), 1130-1150 [cit. 2021-12-26]. ISSN 1082-6076. Dostupné z: doi:10.1080/10826076.2010.484356
- [54] Chromedia analytical sciences [online]. [cit. 27.12.2021]. Dostupné z: <https://chromedia.org/>
- [55] KOVAŘÍKOVÁ, Petra; STARIAT, Ján. HPLC- detektory [pdf]. Dostupné z https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/219169/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%203_Detektory.pdf
- [56] DE HOFFMANN, Edmond a Vincent STROOBANT. *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester: John Wiley, c2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [57] WATSON, J. Throck a O. David SPARKMAN. *Introduction to Mass Spectrometry* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 2007 [cit. 2021-12-27]. ISBN 9780470516898. Dostupné z: doi:10.1002/9780470516898
- [58] EKMAN, Rolf. *Mass spectrometry : instrumentation, interpretation, and applications*. New Jersey: Wiley, 2009. ISBN 978-0-471-71395-1.
- [59] SPARKMAN, O. David. Mass spectrometry basics Christopher G. Herbert and Robert A. W. Johnstone. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2003, **14**(8), 925-927 [cit. 2021-12-27]. ISSN 1044-0305. Dostupné z: doi:10.1016/S1044-0305(03)00402-1
- [60] HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní spektrometrie [pdf]. Dostupné z https://holcapek.upce.cz/teaching/Holcapek_EMSV_MS.pdf
- [61] ROCKWOOD, Alan L., Mark M. KUSHNIR a Nigel J. CLARKE. *Mass Spectrometry. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry* [online]. Elsevier, 2018, 2018, s. 33-65 [cit. 2022-03-23]. ISBN 9780128160633. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5
- [62] GROSS, Jürgen H. *Mass Spectrometry* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017 [cit. 2021-12-27]. ISBN 978-3-319-54397-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-54398-7
- [63] SHRADER, Stephen. *Introductory Mass Spectrometry* [online]. CRC Press, 2013 [cit. 2021-12-27]. ISBN 9780429073441. Dostupné z: doi:10.1201/b15584
- [64] Atmospheric Pressure Chemical Ionization. *The National High Magnetic Field Laboratory* [online]. [cit. 2022-03-23]. Dostupné z: <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/apci>
- [65] Nováková, Lucie. *Měkké ionizační techniky*. [přednáška]. Hradec Králové: FAF UK v Hradci Králové, 2020.

- [66] Chemická ionizace za atmosférického tlaku. *Wikipedie* [online]. [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Chemická_ionizace_za_atmosférického_tlaku
- [67] Orbitrap mass spectrometers offer the highest levels of accuracy and precision. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2022-03-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms.html>
- [68] KUČERA, Radim. *Hmotnostní spektrometrie, úvod* [přednáška]. Hradec Králové: FAF UK v Hradci Králové, 31.10.2020.
- [69] Nováková, Lucie. *Hmotnostní analyzátory*. [přednáška]. Hradec Králové: FAF UK v Hradci Králové, 2020.
- [70] Orbitrap. In: *Mass Spec Pro* [online]. [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: <http://www.massspecpro.com/mass-analyzers/orbitrap>
- [71] *Mass Analyzer Orbitrap* [online]. 2021 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: https://phys.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/UCD%3A_Biophysics_241_-_Membrane_Biology/06%3A_Experimental_Characterization_-_Mass_Spectrometry_and_Atomic_Force_Microscopy/6.04%3A_Mass_Analyzer_Orbitrap
- [72] Types of Ion Detector for Mass Spectrometry. *Technology Networks* [online]. c2021 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/types-of-ion-detector-for-mass-spectrometry-347890>
- [73] VITKU, Jana, Tereza CHLUPACOVA, Lucie SOSVOROVA, Richard HAMPL, Martin HILL, Jiri HERACEK, Marie BICIKOVA a Luboslav STARKA. Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid. *Talanta* [online]. 2015, **140**, 62-67 [cit. 2021-12-11]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2015.03.013
- [74] BARBAS, C. a J. RUPÉREZ. *Separation of Paraben Preservatives by Reversed-Phase HPLC* [online]. 2005, 4 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-3635EN.pdf>
- [75] SADJADI, Seyed, Matthew TRASS, Jeff LAYNE a Sky COUNTRYMAN. *Determination of Phthalates, Including DEHP, by LC/MS/MS and GC/MS to Aid in Food Safety Analysis* [online]. 2011, 12 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: http://phx.phenomenex.com/lib/po88780811_L_3.pdf
- [76] LI, Z., L. XU, C. PENG, et al. Simultaneous Determination of Nine Types of Phthalate Residues in Commercial Milk Products Using HPLC-ESI-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2011, **49**(4), 337-343 [cit. 2022-03-16]. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chrscl/49.4.337
- [77] MOUKAS, Athanasios I., Nikolaos S. THOMAIDIS a Antonios C. CALOKERINOS. Determination of polychlorinated biphenyls by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2014, **49**(11), 1096-1107 [cit. 2022-03-16]. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.3427

- [78] SHEN, Hao-Yu, Hai-Liang JIANG, Hong-Lei MAO, Gang PAN, Lu ZHOU a Yun-Feng CAO. Simultaneous determination of seven phthalates and four parabens in cosmetic products using HPLC-DAD and GC-MS methods. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, **30**(1), 48-54 [cit. 2022-03-16]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200600215
- [79] BŁĘDZKA, Dorota, Jolanta GROMADZIŃSKA a Wojciech WĄSOWICZ. Parabens. From environmental studies to human health. *Environment International* [online]. 2014, **67**, 27-42 [cit. 2021-12-11]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2014.02.007

Přílohy

Seznam obrázků

Obrázek 1: Obecný vzorec parabenů.	13
Obrázek 2: Obecný vzorec ftalátů.	15
Obrázek 3: Nejpoužívanější ftaláty v Evropské unii v 90. letech 20. století.	15
Obrázek 4: Bisfenol A.	16
Obrázek 5: Triclosan.	17
Obrázek 6: Obecný vzorec polychlorovaných bifenyli.	18
Obrázek 7: Základní rozdělení technik úpravy vzorku.	20
Obrázek 8: Schéma ionizace elektrosprejem.	29
Obrázek 9: Schéma ionizace APCI.	30
Obrázek 10: Schéma ionizace APPI.	31
Obrázek 11: Schéma ionizace MALDI.	31
Obrázek 12: Schéma kvadrupólu.	32
Obrázek 13: Schéma iontové pasti.	33
Obrázek 14: Schéma orbitrapu.	34
Obrázek 15: Postup přípravy vzorku před analýzou.	41
Obrázek 16: Nastříhané špičky pro experiment uvolňování disruptorů.	45
Obrázek 17: Extrahované iontové chromatogramy dansylovaného ethylparabenu v různých mobilních fázích.	52
Obrázek 18: Extrahované iontové chromatogramy di-isononyl ftalátu v různých mobilních fázích.	53
Obrázek 19: Extrahované iontové chromatogramy bis-2-ethylhexylftalátu při testování vlivu koncentrace kyseliny mravenčí v MF.	54
Obrázek 20: Extrahované iontové chromatogramy dansylovaného triclosanu při testování vlivu koncentrace kyseliny mravenčí v MF.	54
Obrázek 21: Retence DEHP při testování různých SF.	57
Obrázek 22: Retence DINP při testování různých SF.	58
Obrázek 23: Extrahované iontové chromatogramy DINP při testování teploty kolonového termostatu.	59
Obrázek 24: Extrahované iontové chromatogramy dansylovaného MP při různých gradientových elucích.	61
Obrázek 25: Extrahované iontové chromatogramy DINP při různých gradientových elucích.	62
Obrázek 26: Extrahované iontové chromatogramy dansylovaného TCS při různých gradientových elucích.	62
Obrázek 27: Extrahované iontové chromatogramy dansylovaných parabenů, ftalátů, dansylovaného BPA a dansylovaného TCS.	64
Obrázek 28: Extrahované iontové chromatogramy PCB.	65

Seznam grafů

Graf 1: Výběr extrakčního činidla pro parabeny, ftaláty, BPA a TCS na základě intenzity odezvy signálu.	48
Graf 2: Výběr extrakčního činidla pro parabeny, ftaláty BPA a TCS na základě velikosti plochy pod píky.	49
Graf 3: Výběr extrakčního činidla pro polychlorované bifenyly na základě velikosti plochy pod píky.	50
Graf 4: Porovnání intenzity odezvy disruptorů při testování vlivu koncentrace kyseliny mravenčí v MF.	55
Graf 5: Porovnání intenzity odezvy disruptorů při testování vlivu koncentrace kyseliny mravenčí v MF.	55

Seznam tabulek

Tabulka 1: Příklady expozice endokrinními disruptory u člověka.	12
Tabulka 2: Přehled testovaných stacionárních fází.	39
Tabulka 3: Nastavení detekčních parametrů.	39
Tabulka 4: Roztoky použité při experimentu uvolňování disruptorů ze zkumavek.	44

Tabulka 5: Profil gradientu.	46
Tabulka 6: Intenzita odezvy detektoru u parabenů, ftalátů, BPA a TCS na nejvyšší koncentrační úrovni za využití různých extrakčních činidel.	47
Tabulka 7: Plocha pod píkem u parabenů, ftalátů, BPA a TCS na nejvyšší koncentrační úrovni za využití různých extrakčních činidel.	48
Tabulka 8: Plocha pod píkem u polychlorovaných bifenylyů na nejvyšší koncentrační úrovni za využití různých extrakčních činidel.	49
Tabulka 9: Přehled metod používaných k separaci jednotlivých ED.	51
Tabulka 10: Profil gradientu 2.	60
Tabulka 11: Profil gradientu 3.	60
Tabulka 12: Profil gradientu 4.	60
Tabulka 13: Základní optimalizované parametry pro separaci a detekci skupiny endokrinních disruptorů.	63
Tabulka 14: Uvolňování parabenů, ftalátů, BPA a TCS z Eppendorf zkumavek.	66
Tabulka 15: Uvolňování parabenů, ftalátů, BPA a TCS z pipetovacích špiček.	66

Seznam rovnic

Rovnice 1: Lambert-Beerův zákon.	26
Rovnice 2: Ionizace analytu pomocí APCI.	30
Rovnice 3: Frekvence axiální oscilace.	34
Rovnice 4: Dansylace parabenů.	42
Rovnice 5: Dansylace bisfenolu A.	43
Rovnice 6: Dansylace triclosanu.	43