

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vývoj metody pro analýzu vybraných endokrinních disruptorů pomocí
kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Diplomová práce

2025

Bc. Lucie Novotná

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Novotná**
Osobní číslo: **C23255**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Vývoj metody pro analýzu vybraných endokrinních disruptorů pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

- V teoretické části diplomové práce zpracujte úvod do problematiky nejvýznamnějších endokrinních disruptorů, které lze nalézt v biologickém materiálu (krevní vzorky). Popište používané metody přípravy uvedených vzorků pro analýzy kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií. Rovněž stručně charakterizujte obě instrumentální techniky, přičemž se zaměřte na moderní trendy v obou technikách.
- Pro vybrané endokrinní disruptory proměřte retenční chování v systému s obrácenými fázemi s použitím gradientové eluce. Experimentálně ověřte vlivy gradientových profilů, porovnejte různé typy kolon s oktadecyl silikagelovou fází a optimalizujte podmínky hmotnostně spektrometrické detekce. Zaměřte se také na vlivy přípravy vzorků. Navrhněte nejlepší podmínky pro analýzy vybraných látek v biologických vzorcích.
- Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Mgr. Miroslav Kubát**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem *Vývoj metody pro analýzu vybraných endokrinních disruptorů pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9.5.2025

Bc. Lucie Novotná v.r.

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D., za odborné vedení této práce a cenné rady. Poděkování patří dále Ing. Mgr. Miroslavu Kubátovi za jeho ochotu a čas věnovaný pomoci při experimentální části. Doc. MUDr. Lence Sedlákové, Ph.D. děkuji za zprostředkování finanční podpory ze strany Fakultní nemocnice Hradec Králové. Velké poděkování si zaslouží také moje rodina a přátelé za jejich podporu během celého studia.

ANOTACE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií pro analýzu vybraných endokrinních disruptorů a následně ji otestovat na vzorcích lidské plazmy. V teoretické části jsou shrnuty základní poznatky o problematice endokrinních disruptorů a jejich zdravotních rizicích pro člověka. V této části je také popsána příprava vzorku lidské plazmy a základní princip použité instrumentace. V experimentální části je uveden přehled všech použitých chemikálií, instrumentace a dalšího použitého vybavení. Diplomová práce dále obsahuje detailní popis metodiky přípravy vzorků a provedené analýzy. Závěrečná část práce obsahuje shrnutí a zhodnocení získaných výsledků.

KLÍČOVÁ SLOVA

Endokrinní disruptory, bisfenoly, parabeny, ftaláty, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

TITLE

Development of a method for analysis of selected endocrine disruptors using liquid chromatography with mass spectrometry

ANNOTATION

The aim of this thesis was to develop and optimize a liquid chromatography–mass spectrometry method for the analysis of selected endocrine-disrupting compounds and subsequently test it on human plasma samples. The theoretical part summarizes fundamental knowledge about endocrine disruptors and their associated health risks to humans. This section describes also the preparation of human plasma samples and the basic principles of the instrumentation used. The experimental part provides an overview of all chemicals, instruments, and other equipment employed. The thesis also includes a detailed description of the sample preparation methodology and the analytical procedures performed. The final part of the thesis contains a summary and evaluation of the results obtained.

KEYWORDS

Endocrine disruptors, bisphenols, parabens, phthalates, liquid chromatography, mass spectrometry

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	9
SEZNAM TABULEK.....	10
SEZNAM GRAFŮ	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	13
ÚVOD.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 ENDOKRINNÍ DISRUPTORY.....	16
1.1.1 Definice a charakteristika endokrinních disruptorů.....	16
1.1.2 Důležitost správného fungování endokrinního systému.....	16
1.1.3 Rozdělení endokrinních disruptorů dle původu a způsoby expozice	17
1.1.4 Vybrané skupiny endokrinních disruptorů.....	19
1.2 PŘÍPRAVA KREVNÍCH VZORKŮ K ANALÝZE	25
1.2.1 Extrakce na pevné fázi.....	26
1.2.2 Extrakce kapalina-kapalina.....	30
1.3 CHROMATOGRAFIE.....	31
1.3.1 Kapalinová chromatografie.....	31
1.3.2 Aktuální trendy v kapalinové chromatografii.....	34
1.4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	36
1.4.1 Iontový zdroj.....	37
1.4.2 Hmotnostní analyzátory	40
1.5 SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	42
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
2.1 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ A PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ.....	44
2.1.1 Chemikálie	44
2.1.2 Použitá instrumentace	45
2.1.3 Testované kolony	45
2.1.4 SPE vybavení.....	45
2.1.5 Další vybavení	46
2.2 PŘÍPRAVA JEDNOTLIVÝCH ROZTOKŮ STANDARDŮ ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ	46
2.3 PŘÍPRAVA SMĚSNÝCH KALIBRAČNÍCH ROZTOKŮ.....	46

2.4	PŘÍPRAVA MOBILNÍCH FÁZÍ.....	46
2.5	PŘÍPRAVA PLAZMATICKÝCH VZORKŮ.....	47
2.6	OPTIMALIZACE PODMÍNEK SEPARACE ENDOKRINNÍCH DISRUPTORŮ POMOCÍ LC/MS.....	48
2.6.1	Optimalizace LC-MS/MS.....	51
2.6.2	Optimalizace MRM přechodů.....	51
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	53
3.1	OPTIMALIZACE HPLC/MS.....	53
3.1.1	Volba módu ionizace elektrosprejem.....	55
3.1.2	Volba kolony.....	56
3.1.3	Optimalizace gradientu a volba mobilní fáze.....	63
3.1.4	Optimalizace fragmentačních energií v režimu SIM.....	64
3.1.5	Optimalizace napětí na kapiláře.....	67
3.2	OPTIMALIZACE LC-MS/MS.....	69
3.3	OPTIMALIZACE EXTRAKČNÍCH TECHNIK A PŘÍPRAVA VZORKŮ K ANALÝZE.....	71
3.3.1	Extrakce tuhou fází (SPE).....	71
3.3.2	Extrakce kapalina-kapalina (LLE).....	78
3.3.3	Vyhodnocení SPE a LLE postupů z hlediska matricových efektů a extrakční výtěžnosti.....	82
3.4	LIMITY DETEKCE, LIMITY KVANTIFIKACE A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ.....	86
3.4.1	Stanovení limitů detekce a limitů kvantifikace.....	86
3.4.2	Kalibrační křivky.....	87
3.4.3	Vyhodnocení vzorků.....	90
	ZÁVĚR.....	94
	POUŽITÁ LITERATURA.....	96

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Strukturní vzorec bisfenolu A	19
Obrázek 2: Strukturní vzorce dalších zástupců bisfenolů	21
Obrázek 3: Strukturní vzorce vybraných parabenů	22
Obrázek 4: Strukturní vzorce vybraných ftalátů	24
Obrázek 5: Grafické znázornění jednotlivých kroků SPE.....	28
Obrázek 6: Chemická struktura sorbentu typu HLB.....	29
Obrázek 7: Základní princip chromatografického dělení směsi	31
Obrázek 8: Základní instrumentace HPLC pro gradientovou eluci	33
Obrázek 9: Struktura povrchově porézní částice	36
Obrázek 10: Základné schéma hmotnostního spektrometru	37
Obrázek 11: Schématické znázornění jednotlivých fází ionizace molekuly za použití ESI ...	39
Obrázek 12: Hmotnostní spektrometr – jednoduchý kvadrupól	41
Obrázek 13: Schématické znázornění základního principu trojitého kvadrupólu.....	41
Obrázek 14: Extrahovaný chromatogram kontrolního měření blanku získaný pomocí LC-MS/MS potvrzující přítomnost ftalátů	54
Obrázek 15: Schéma chromatografického píku se znázorněním inflexních bodů, vrcholu píku a vyznačených segmentů	60
Obrázek 16: Extrahovaný chromatogram 1 ml vzorku čisté lidské plazmy upraveného technikou SPE (C18 ec), zobrazující detekované analyty	77
Obrázek 17: Extrahovaný chromatogram vzorku 1 ml čisté lidské plazmy upraveného technikou SPE (HLB), zobrazující detekované analyty	78
Obrázek 18: Extrahovaný chromatogram čisté lidské plazmy upravené technikou LLE, zobrazující detekované analyty.....	79
Obrázek 19: Extrahovaný chromatogram vzorku čistého chloroformu zobrazující detekované analyty.....	80
Obrázek 20: Extrahovaný chromatogram blanku čistého chloroformu s přidavkem kyseliny 5-sulfosalicylové zobrazující detekované analyty	81
Obrázek 21: Extrahovaný chromatogram vzorku 100 ml demineralizované vody upraveného technikou SPE (C18 ec), zobrazující detekované analyty	92
Obrázek 22: Extrahovaný chromatogram vzorku 100 ml demineralizované vody upraveného technikou SPE (HLB), zobrazující detekované analyty	93

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hlavní způsoby expozice a jejich zdroje pro vybrané endokrinní disruptory.	18
Tabulka 2: Typické extrakční mechanismy pro SPE.	27
Tabulka 3: Doporučený pracovní postup pro použití HLB sorbentu od výrobce Agilent.	30
Tabulka 4: Klasifikace kapalinové chromatografie podle experimentálního systému.	32
Tabulka 5: Rozdělení hmotnostních analyzátorů dle fyzikálních principů separace.	40
Tabulka 6: Postup přípravy plazmatického vzorku pomocí techniky SPE.	47
Tabulka 7: Optimalizovaný gradient pro finální separaci endokrinních disruptorů.	49
Tabulka 8: Separační podmínky při testování kolon.	49
Tabulka 9: Testované gradienty použité k výběru vhodné kolony pro separaci endokrinních disruptorů.	49
Tabulka 10: Retenční časy, analyzovaných endokrinních disruptorů, naměřené při krátkém gradientu při použití kolony Kinetex Polar a hodnoty jejich log P.	50
Tabulka 11: Parametry hmotnostního spektrometru QqQ použité při identifikaci MRM přechodů.	52
Tabulka 12: Vybrané ionty pro SIM režim při analýze endokrinních disruptorů pomocí hmotnostního spektrometru s jednoduchým kvadrupólem.	55
Tabulka 13: Retenční časy (min) všech testovaných endokrinních disruptorů na různých kolonách za odlišných gradientových podmínek a jejich vztah k hodnotám log P.	57
Tabulka 14: Počet teoretických pater (N) pro jednotlivé analyty na testovaných kolonách v rámci dvou typů gradientů.	62
Tabulka 15: Souhrn optimalizovaných parametrů a nejintenzivnějších MRM přechodů, které byly stanoveny metodou "Compound-by-Compound" pomocí standardů jednotlivých látek o koncentraci 5 µg/ml.	69
Tabulka 16: Porovnání stanovených mezí detekce (LOD) a mezí kvantifikace (LOQ) vybraných EDCs pomocí jednoduchého kvadrupólu a trojitého kvadrupólu.	87
Tabulka 17: Směrnice, úseky, R ² analyzovaných analytů.	90
Tabulka 18: Výsledky kvantifikace detekovaných analytů stanovených ve vzorku demineralizované vody (100 ml) zakoncentrovaném pomocí SPE (sorbenty C18 ec a HLB).	91

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Porovnání šířek píků při krátkém gradientu pro všechny testované kolony	58
Graf 2: Porovnání šířek píků při dlouhém gradientu pro všechny testované kolony	58
Graf 3: Porovnání symetrie píků při krátkém gradientu pro všechny testované kolony	61
Graf 4: Porovnání symetrie píků při dlouhém gradientu pro všechny testované kolony	61
Graf 5: Graficky znázorněný průběh optimalizovaného gradientu v čase (mobilní fáze A – 5 mM octan amonný, mobilní fáze B – ACN).....	63
Graf 6: Výsledný chromatogram separace endokrinních disruptorů z detektoru diodového pole (DAD).....	64
Graf 7: Porovnání optimalizace fragmentační energie pro BPA na základě ploch píků vs. poměru signálu k šumu (S/N)	65
Graf 8: Optimalizace fragmentační energie pro vybrané bisfenoly na základě maximálních odezev ze dvou opakovaných měření	66
Graf 9: Optimalizace fragmentační energie pro vybrané parabeny na základě maximálních odezev ze dvou opakovaných měření	66
Graf 10: Optimalizace fragmentační energie pro vybrané ftaláty na základě maximálních odezev ze dvou opakovaných měření	67
Graf 11: Relativizované hodnoty napětí na kapiláře naměřené při optimalizaci tohoto parametru	68
Graf 12: Relativizované hodnoty napětí na kapiláře naměřené při optimalizaci tohoto parametru	70
Graf 13: Výsledný chromatogram separace endokrinních disruptorů z relativizovaných dat (4HB není zobrazena)	71
Graf 14: Distribuce testovaných parabenů v jednotlivých frakcích při eluci ze sorbentu typu C18 ec (SPE) pomocí ACN	72
Graf 15: Distribuce testovaných parabenů v jednotlivých frakcích při eluci ze sorbentu HLB (SPE) pomocí ACN.....	73
Graf 16: Distribuce testovaných bisfenolů v jednotlivých frakcích při eluci ze sorbentu C18 ec (SPE) pomocí ACN.....	74
Graf 17: Distribuce testovaných bisfenolů v jednotlivých frakcích při eluci ze sorbentu HLB (SPE) pomocí ACN.....	74
Graf 18: Distribuce testovaných ftalátů v jednotlivých frakcích eluovaných ze sorbentu C18 ec (SPE) pomocí ACN.....	75

Graf 19: Distribuce testovaných ftalátů v jednotlivých frakcích eluovaných ze sorbentu HLB (SPE) pomocí ACN.....	75
Graf 20: Srovnání extrakčních výtěžností (RE) pro vybrané EDCs po SPE extrakci pomocí sorbentů HLB a C18 ec ze 100 µl lidské plazmy.....	82
Graf 21: Srovnání vlivu sorbentu (HLB vs. C18 ec) a objemu lidské plazmy (100 µl vs. 1 ml) na velikost matricového efektu.	83
Graf 22: Srovnání extrakčních výtěžností (RE) pro vybrané endokrinní disruptory technikou LLE z 250 µl lidské plazmy.	84
Graf 23: Srovnání matricových efektů (ME) pro vybrané endokrinní disruptory technikou LLE z 250 µl lidské plazmy.	85
Graf 24: Kalibrační křivka vybraných parabenů získaná pomocí LC-MS/MS (QqQ). Zobrazuje závislost plochy signálu na koncentraci.....	88
Graf 25: Kalibrační křivka vybraných bisfenolů získaná pomocí LC-MS/MS (QqQ). Zobrazuje závislost plochy signálu na koncentraci.....	88
Graf 26: Kalibrační křivka analytu BPAF získaná pomocí LC-MS/MS (QqQ). Zobrazuje závislost plochy signálu na koncentraci.....	89
Graf 27: Kalibrační křivka vybraných ftalátů po odečtení ploch blanku získaná pomocí LC-MS/MS (QqQ). Zobrazuje závislost plochy signálu na koncentraci.	89

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN – acetonitril

APCI – ionizace za atmosférického tlaku

BEHF – bis(2-ethylhexyl) ftalát

BP – butylparaben

BPA – bisfenol A

BPAF – bisfenol AF

BPF – bisfenol F

C18 – oktadecyl

C18 ec – oktadecyl endcapped

C8 – oktyl

DAD – detektor diodového pole

DBF – dibutyl ftalát

DDT – dichlordifenyltrichlormethan

DEF – diethyl ftalát

DHF – dihexyl ftalát

EDCs – endokrinní disruptory

EI – elektronová ionizace

EP – ethylparaben

EPA – U.S. Environmental Protection Agency

ESI – ionizace elektrosprejem

GC – plynová chromatografie

HLB – hydrophilic-lipophilic balanced

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LC – kapalinová chromatografie

LC-MS – kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

LC-MS/MS – kapalinová chromatografie ve spojení tandemovou hmotnostní spektrometrií

LLE – extrakce kapalina-kapalina

LOD – limit detekce

LOQ – limit kvantifikace

ME – matricový efekt

MeOH – methanol

MP – methylparaben

MRM – Multiple Reaction Monitoring; režim sledování vybraných fragmentací/fragmentů

MS – hmotnostní spektrometrie

MS/MS – tandemová hmotnostní spektrometrie

m/z – poměr hmotnosti k náboji

NP – normální fáze

PeP – pentymparaben

PET – polyethylentereftalát

PP – propylparaben

QqQ – trojitý kvadrupól

RE – extrakční návratnost

RP – reverzní fáze

SIM – Selected Ion Monitoring, záznam selektivního iontu

S/N – signál k šumu (signal to noise)

SPE – extrakce na pevné fázi

UHPLC – ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

WHO – Světová zdravotnická organizace

Úvod

V průběhu 20. a 21. století bylo dosaženo významného pokroku v oblasti industrializace, ve vývoji nových technologií a zároveň prudce vzrostla světová populace. Tyto skutečnosti vyvolaly masový nárůst produkce průmyslových a biomedicínských chemikálií, které spolu s vedlejšími produkty průmyslové činnosti způsobily markantní změny v ekosystémech a zapříčinily různé zdravotní komplikace u lidí i zvířat [1].

V posledních letech vyvolaly chemické kontaminanty ze skupiny tzv. endokrinních disruptorů (EDCs) velké znepokojení v souvislosti s negativním vlivem na zdravotní stav lidského a zvířecího organismu [1]. Přibývají signály o tom, že tyto látky narušují normální fungování endokrinního systému a bývají spojovány například s příčinou vzniku nádorových onemocnění, kardiovaskulárních chorob, autoimunitních vad, reprodukčních onemocnění a poruch chování [2]. Mezi významné skupiny EDCs patří ftaláty, parabeny a bisfenoly. Člověk s těmito látkami přichází do každodenního kontaktu prostřednictvím produktů osobní hygieny, kosmetiky a plastových materiálů, včetně obalů potravin anebo nápojů a dalších běžně používaných předmětů. Nacházejí se i v životním prostředí, zejména ve vodě, půdě a ovzduší [3].

EDCs představují zdravotní rizika pro jedince a celé populace lidí i zvířat již při velmi nízkých koncentracích (pg-ng/l vody) [4]. Krev a její složky představují relevantní biologickou matici pro sledování expozice EDCs, neboť neustále cirkulují organismem a přicházejí tak do kontaktu se všemi tělesnými tkáněmi [6]. Lipofilní povaha některých EDCs umožňuje jejich snadné pronikání do krevního řečiště [3]. Biologické matrice jsou však velmi komplexní, což výrazně komplikuje jejich analýzu a kvantifikaci [5], a proto je před jejich samotnou analýzou nezbytné provést jejich úpravu [6].

Kvalitativní a kvantitativní stanovení EDCs vyžaduje aplikaci analytické metody vyznačující se vysokou citlivostí a selektivitou. V posledních letech se v této oblasti výrazně prosadila kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Zavedení tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) přispělo k rozvoji techniky LC-MS/MS. Jedním z nejpoužívanějších tandemových hmotnostních analyzátorů je trojitý kvadrupól (QqQ). Technika LC-MS/MS umožňuje citlivější a selektivnější analýzu látek ve stopových koncentracích a představuje velký přínos pro klinické laboratoře. Ačkoli je tato technika poměrně složitá, nabízí výrazné snížení detekčních limitů, vyšší selektivitu a také přesnost ve srovnání s doposud používanými imunotesty. Správná příprava vzorku v kombinaci s LC-MS/MS představuje účinný nástroj pro kvantitativní analýzu [4, 7].

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Endokrinní disruptory

1.1.1 Definice a charakteristika endokrinních disruptorů

Endokrinní disruptory jsou chemické látky, které mohou ovlivnit normální fungování endokrinního systému a mít negativní dopad na lidské a zvířecí zdraví. Jejich přítomnost nejen v životním prostředí, ale i produktech každodenní potřeby výrazně zvyšuje riziko chronických onemocnění a jiných zdravotních komplikací. Termín EDCs byl poprvé použit v 90. letech a v roce 1996 byl americkou agenturou U.S. Environmental Protection Agency (EPA) zaveden pod formálním názvem Endokrinně disruptivní sloučenina [8]. Jako EDCs se označují všechny chemické látky, které narušují normální funkci endokrinního systému lidí a zvířat, a tím mohou ovlivnit hormonální rovnováhu včetně souvisejících fyziologických procesů [9].

Podle EPA jsou EDCs definovány jako látky, které zasahují do syntézy, sekrece, transportu, vazby nebo eliminace přirozených hormonů, které jsou zodpovědné za udržování homeostázy, reprodukce, vývoje a chování [3]. Světová zdravotnická organizace (WHO) specifikovala EDCs jako látku či směs látek, které mění funkci nebo funkce endokrinního systému, a mají tak negativní účinek na zdravotní stav organismu jedince, jeho potomků nebo (sub)populací [10].

EDCs mají rozdílné chemické struktury. Strukturní rozmanitost těchto sloučenin představuje komplikaci pro předpověď jejich endokrinních disruptivních účinků a také při výzkumných činnostech. U některých skupin EDCs lze pozorovat společné znaky jako je přítomnost halogenového substituentu či fenolických skupin [11].

1.1.2 Důležitost správného fungování endokrinního systému

Správné fungování endokrinního systému a sekrece hormonů má zcela zásadní vliv na růst, vývoj a reprodukci populace. Hormony zasahují do důležitých metabolických procesů organismu, kde udržují homeostázu, ovlivňují reprodukční schopnosti, mají vliv na kvalitu spánku a ovlivňují náladu jedince [12, 13]. Optimální činnost endokrinního systému je velmi důležitá pro mnoho životně důležitých funkcí a biologických procesů, které jsou klíčové pro správné fungování organismu [12, 14]. Organismus toleruje

kolísání hladiny hormonů v určitých mezích, ale její výrazné odchylky však mohou vést k závažným zdravotním komplikacím [15].

Narušení hormonální rovnováhy během citlivých fází životního cyklu, zejména v těhotenství, vývoje plodu a laktace může mít závažné nebo dokonce trvalé následky. Z tohoto důvodu je velmi důležité šířit povědomí o všudypřítomnosti EDCs a varovat před jejich negativními dopady na lidské zdraví [16].

1.1.3 Rozdělení endokrinních disruptorů dle původu a způsoby expozice

Endokrinní disruptory lze dle jejich původu rozdělit na přírodní a syntetické chemické látky. Mezi přírodní EDCs patří fytoestrogeny, které jsou přítomné například v některých potravinách jako je mrkev, rýže, brambory atd. [4, 11].

Rozsáhlou skupinou syntetických EDCs jsou bisfenoly, které jsou součástí i některých plastových materiálů. Další významnou skupinu syntetických EDCs představují ftaláty, které jsou používány například jako změkčovadla plastových materiálů a dále jsou přítomny v produktech každodenní péče [11]. Sloučeniny ze skupiny parabenů jsou součástí konzumních produktů, kde plní stabilizační a antimikrobiální funkce [17]. Mezi další látky vykazující endokrinní aktivitu patří sloučeniny obsažené v pesticidech, fungicidech, organických rozpouštědlech a některých farmaceutických přípravcích [11].

Způsoby expozice EDCs se liší v závislosti na jejich typu. V tab. 1 jsou shrnuty hlavní cesty expozice, příklady vybraných EDCs a odpovídající zdroje kontaminace. Výskyt EDCs v běžných konzumních a průmyslových produktech a také v životním prostředí výrazně zvyšuje nárůst nejrůznějších zdravotních komplikací v důsledku nepřetržité expozice.

Tabulka 1: Hlavní způsoby expozice a jejich zdroje pro vybrané endokrinní disruptory [3].

Způsoby expozice	Vybrané příklady EDCs	Zdroj kontaminace
Perorální Konzumace kontaminovaných potravin a nápojů	Bisfenol A (BPA) Perfluorované sloučeniny Ftaláty Dioxiny Dichlordifenyltrichlormethan (DDT) Polychlorované bifenyly (PCB)	Průmyslový odpad Pesticidy ve vodě a v půdě Potravinové a nápojové obaly
Absorpce přes pokožku	Ftaláty Parabeny	Kosmetika a produkty osobní hygieny Léky Opalovací krémy
Inhalace	Různé EDCs	Kontaminovaný vzduch z průmyslové činnosti
Intravenózní	Ftaláty	Zdravotnické vybavení Plastové infuzní sety
Biologický přenos	Různé EDCs, které jsou přítomny v těle matky	Přenos placentou či kojením z matky na dítě

Po vstupu do organismu je BPA metabolizován na glukuronidové a sulfátové konjugáty. Výskyt těchto konjugátů vyžaduje *in vivo* metabolismus a tyto konjugáty představují přímý důkaz o skutečné vnitřní expozici BPA. Uvádí se, že 84–97 % absorbovaného BPA je z organismu vyloučeno během prvních 5-7 hodin. Volná forma BPA v organismu cirkuluje v množstvím menším než 1 % celkového množství a je velmi komplikované ji detekovat [18]. V biomonitorovacích studiích je obvykle měřena celková koncentrace BPA, tedy konjugovaná a nekonjugovaná forma dohromady [19]. Při analýze může dojít k externí kontaminaci vzorku během jeho odběru, přípravy nebo skladování, což může výrazně ovlivnit výsledky [18].

Seznam látek, které spadají do skupiny EDCs, se neustále rozšiřuje. Vzhledem k velkému množství sloučenin patřících do kategorií prokázaných či potenciálních EDCs je tato diplomová práce zaměřena pouze na tři významné skupiny EDCs – bisfenoly, ftaláty a parabeny. Látky z těchto tří skupin se nacházejí v mnoha běžně používaných produktech a představují velká zdravotní rizika pro populaci lidí i zvířat.

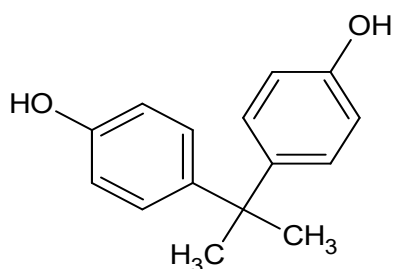
1.1.4 Vybrané skupiny endokrinních disruptorů

Jak již bylo uvedeno výše, tato diplomová práce je primárně zaměřena na jedny z nejčastěji se vyskytujících skupin syntetických EDCs, tedy na bisfenoly, ftaláty a parabeny. Všechny tyto tři skupiny EDCs jsou široce používány v průmyslu a při výrobě běžného spotřebního zboží, což významně zvyšuje riziko expozice [20]. K expozici může tedy docházet v pracovním prostředí, při používání různého spotřebního zboží či prostřednictvím kontaminované stravy a složek životního prostředí [3]. EDCs mohou narušovat endokrinní soustavu již při velmi nízkých koncentracích. V krvi a jejich složkách se vyskytují ve stopových množstvích, což významně ztěžuje jejich detekci [18, 19].

1.1.4.1 Bisfenoly

Bisfenoly jsou významnými kontaminanty vyskytující se v životním prostředí. Jedná se o syntetické látky s charakteristickou chemickou strukturou, která je tvořena dvěma fenolickými jádry spojenými alkylovanou skupinou [20, 22].

Nejnámějším a nejrozšířenějším zástupcem bisfenolů je bisfenol A (BPA) (obr.1). Původně byl BPA syntetizován jako syntetický estrogen. Výroba BPA spočívá v reakci fenolu s acetonem v kyselém prostředí, při které vzniká bílý krystalický BPA. Jeho strukturu tvoří dva fenolové kruhy propojené methylovým můstkem, na kterém jsou navázány dvě funkční methylové skupiny. [23]. Díky své fenolické struktuře může interagovat s estrogenovými receptory a působit jako agonista nebo antagonistu estrogenových drah.



Obrázek 1: Strukturní vzorec bisfenolu A

Zdravotní rizika BPA

BPA má lipofilní povahu, což mu umožňuje snadno procházet hematoencefalickou a placentární bariérou. Přítomnost BPA byla detekována v plodové krvi, pupečnickové

krvi, mateřském mléce a plodové vodě. Dále byl identifikován ve vzorcích moči a krve přibližně 95 % testovaných osob na celém světě [24]. Expozice BPA je spojována s řadou endokrinních poruch, včetně neplodnosti, zhoršené kvality spermií, kardiovaskulárních onemocnění, obezity, rakoviny prsu a prostaty, metabolických dysfunkcí či syndromu polycystických vaječníků a zvýšené míry potratů. Některé studie ukazují, že BPA může být také zodpovědný za předčasný nástup puberty [14, 24, 25]. Obecně mají ženy vyšší průměrnou denní expozici BPA než muži v důsledku používání většího množství produktů osobní hygieny a kosmetických produktů [24].

Produkce BPA, jeho použití a zdroje expozice

Každoroční celosvětová produkce BPA roste. Například v roce 2019 činila více než 8 milionů tun BPA [23]. Od 50. let 20. století se BPA používá jako jedna z hlavních surovin při výrobě polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic [26]. V současné době se zhruba 65 % celosvětové produkce BPA využívá k výrobě polykarbonátových plastů a 30 % k výrobě epoxidových pryskyřic [23].

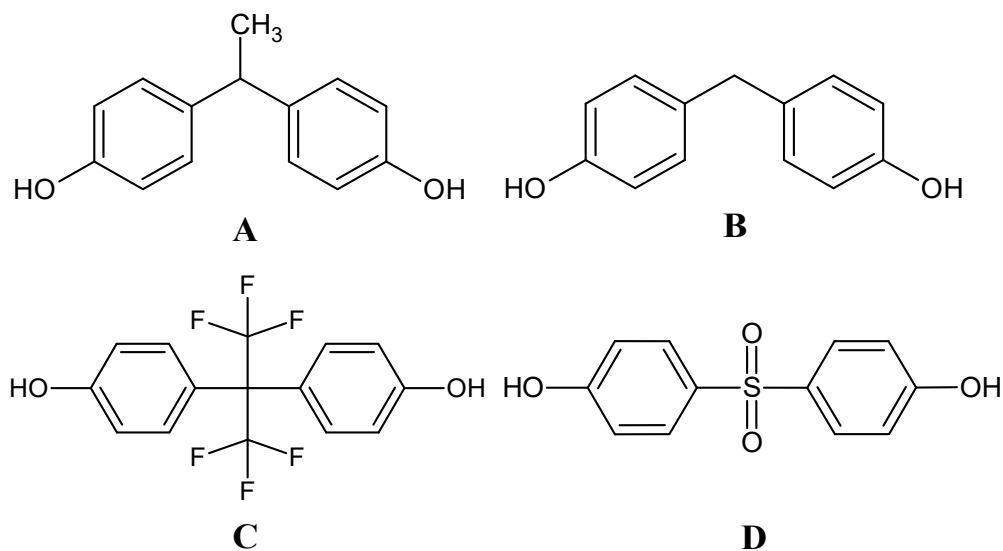
Polykarbonátové plasty jsou ve velkém množství využívány k výrobě spotřebitelských produktů. Příkladem mohou být různé produkty osobní hygieny, plastové lahve na pití, kuchyňské náčiní, hračky pro děti, zdravotnické vybavení. Slouží také jako obalové materiály potravin, ze kterých může BPA migrovat do potravin a nápojů [14, 27]. Dalším zdrojem expozice BPA je například termální papír, který je používán k tisku účtenek nebo jízdenek [28]. Epoxidové pryskyřice obsahující BPA jsou využívány k povrchové úpravě vnitřních částí kovových obalových materiálů, jako jsou konzervy nebo kovové uzávěry lahví [20].

Životní prostředí představuje další zdroj expozice BPA. Při likvidaci spalováním materiálů s obsahem BPA, dochází k jeho uvolňování do atmosféry. Ve složkách životního prostředí se BPA vyskytuje také v důsledku nesprávného nakládání s odpady. Dále může docházet k jeho uvolňování z plastových materiálů a epoxidových pryskyřic do vody. Přítomnost BPA byla prokázána v chemicky upravené pitné vodě, ale i v přírodních vodách [27]. BPA se může ve formě nečistot či degradačních produktů vyskytovat v polyethylentereftalátu (PET) [23].

Z výše uvedených zdrojů BPA vyplývá, že k expozici dochází nejčastěji transdermálně, inhalací, orálně či perorálně. Jednotky monomeru BPA jsou propojeny esterovou vazbou, která se vyznačuje nízkou odolností vůči hydrolyze, zejména při vysoké teplotě

a při kontaktu s kyselými nebo zásaditými látkami. Tato skutečnost má vliv na uvolňování BPA z polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic do potravin, nápojů a životního prostředí. Malá odolnost těchto materiálů vůči hydrolyze naznačuje, že rutinní expozice BPA v důsledku jeho požití je běžná [26, 29].

Během posledních let došlo k omezení používání BPA v důsledku rostoucích obav ze strany spotřebitelů. Tato skutečnost vedla výrobce k reakci v podobě hledání alternativních chemikálií pro výrobní procesy. Výrobci se však často uchýlili k použití jiných analogů bisfenolů. Chemická náhrada by měla být ideálně inertní či méně toxická než původní chemikálie. V praxi se bohužel stává, že některé chemické náhrady nejsou před uvedením na trh odpovídajícím způsobem testovány a jejich toxikologické účinky mohou být stejné nebo dokonce horší než u původní chemikálie [30]. Mezi alternativy BPA patří bisfenol S, bisfenol AF (BPAF), bisfenol F (BPF) (obr. 2), které jsou strukturně velmi podobné BPA [24]. Současná literatura naznačuje, že zmíněné analogy bisfenolů mohou mít také negativní vliv na zdravotní stav včetně endokrinních poruch. Bisfenol S mění různé aspekty imunitní odpovědi zprostředkované monocyty a makrofágy. BPAF snižuje endocytární kapacitu a maturaci dendritických buněk a dále způsobuje oxidační poškození DNA. BPF vyvolává oxidační stres a mění produkci hormonů [31].



Obrázek 2: Strukturální vzorce dalších zástupců bisfenolů

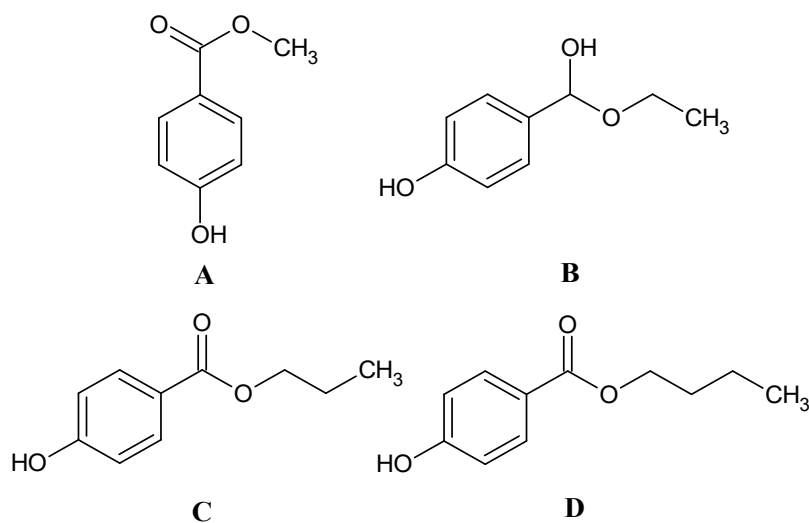
A – bisfenol F, B – bisfenol E, C – bisfenol AF, D – bisfenol S

V minulosti byl v Evropské unii vydán zákaz používání materiálů s obsahem BPA k výrobě kojeneckých lahví. Koncem roku 2024 Evropská komise odsouhlasila zákaz používání BPA v materiálech, které přichází do kontaktu s potravinami a nápoji.

V souvislosti s tímto zákazem byla stanovena lhůta 18 měsíců pro nahrazení těchto materiálů [32]. Pro jiné analogy bisfenolu, které slouží jako náhrady BPA, byly předloženy návrhy vedoucí k omezení jejich používání. Tyto návrhy byly učiněny v důsledku jejich negativních vlivů na lidské zdraví a také pro podezření z jejich endokrinní disruptivity. Tyto návrhy však nebyly doposud schváleny a nebyla přijata ani žádná právní omezení k jejich používání [31].

1.1.4.2 Parabeny

Parabeny jsou skupinou látek, kterou tvoří estery kyseliny p-hydroxybenzoové (4HB). Základní struktura 4HB je substituována alkylovým řetězcem nebo aromatickým kruhem. Mezi nejčastěji se vyskytující parabeny patří methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP), butylparaben (BP) (obr. 3). Vlastnosti jednotlivých derivátů se liší v závislosti na typu substituce. Obecně platí, že s rostoucí délkou řetězce roste odolnost esterů vůči hydrolýze [33].



Obrázek 3: Strukturní vzorce vybraných parabenů

A – methylparaben; B – ethylparaben; C – propylparaben; D – butylparaben

Parabeny jsou strukturně podobné estrogenímu hormonu, což jim umožňuje narušovat jaderné receptory pro androgeny, estrogeny, progesteron, glukokortikoidy i jiné. Z tohoto důvodu se i parabeny řadí mezi EDCs [17]. Expozice parabeny je spojována s výskytem rakoviny prsu a také problémy s neplodností [34].

Parabeny jsou nejčastěji využívány jako konzervační a antimikrobiální látky v potravinářském, kosmetickém i farmaceutickém průmyslu [17]. Ve zpracovaných

potravinách byl prokázán vyšší výskyt parabenů než v nezpracovaných potravinách. Parabeny se přirozeně vyskytují ve velmi nízkých koncentracích i v ovoci a zelenině [35].

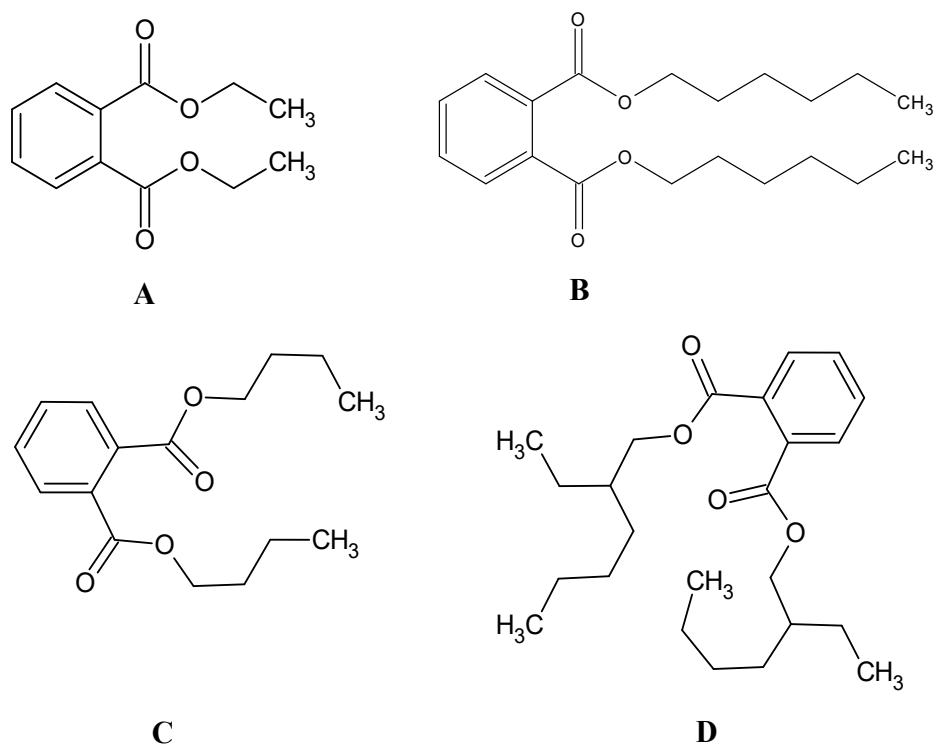
Do kosmetických produktů jsou parabeny s oblibou přidávány díky jejich vlastnostem – jsou bez zápachu, nezpůsobují nežádoucí změnu zbarvení ani zakalení kosmetického produktu a mají téměř neutrální pH [36]. Parabeny bývají součástí produktů určených k aplikaci na kůži, pokožku hlavy, rty, sliznice i nehty.

Parabeny se od 20. let 20. století používají ve farmaceutických produktech jako konzervanty nebo excipienty, přičemž zajišťují ochranu proti mikrobiálnímu růstu a degradaci léčiv. Bylo prokázáno, že použití kombinace několika parabenů je účinnější než použití jednotlivých derivátů. Nacházejí se v různých lékových formách, jako jsou čípky, anestetika, tablety, sirupy, roztoky na přibírání na váze, injekční roztoky a antikoncepce [32, 33].

1.1.4.3 Ftaláty

Dříve byly ftaláty považovány za zcela bezpečné, nicméně v současnosti se jim dostává mimořádné pozornosti především z důvodu potenciálně negativních účinků na endokrinní systém [37]. Data získaná z *in silico*, *in vitro*, *in-vivo* přístupů a klinických studií prokazují negativní dopady na endokrinní systém člověka. Negativní účinky ftalátů se projevují zejména na vývoji lidského plodu, výskytem reprodukčních anomálií, inzulinovou rezistencí a možným přispěním k rozvoji obezity [38].

Ftaláty jsou strukturně diestery kyseliny ftalové [37] (obr. 4). Přípravují se esterifikací kyseliny ftalové s různými alkoholy [39]. Vyznačují se vysokou trvanlivostí, jsou bezbarvé a odolné vůči teplu. Nejběžněji používaným ftalátem je bis(2-ethylhexyl) ftalát (BEHF) a jeho rozkladný produkt monoethylhexyl ftalát. Jedná se o všudypřítomné kontaminanty životního prostředí. BEHF a jeho rozkladné produkty byly detekovány v různých tělních tekutinách, jako jsou sliny, mateřské mléko, moč, sérum, plodová voda atd. BEHF byl identifikován jako EDCs s negativními účinky na reprodukci, vývoj a metabolismus, které mohou přispívat k rozvoji obezity a diabetu 2. typu [40].



Obrázek 4: Strukturální vzorce vybraných ftalátů

A – diethyl ftalát (DEF); B – dihexyl ftalát (DHF); C – dibutyl ftalát (DBF); D – bis(2-ethylhexyl) ftalát (BEHF)

V roce 2021 činila světová produkce zhruba 5,5 milionů tun ftalátů ročně a vzhledem k širokému využití těchto látek je předpokládán další nárůst objemu produkce [40]. Ftaláty jsou běžně používány jako změkčovadla zajišťující zvýšení pružnosti, ohebnosti a elasticity plastů či v kosmetice pro delší výdrž aromatických složek [37, 39]. Lze je nalézt v kosmetických výrobcích a produktech osobní péče, obalech na potraviny, zdravotnických výrobcích jako jsou různé hadičky a krevní sáčky, lepidlech, hračkách [37, 40]. Dále se vyskytují v potravinách, vodě, půdě, prachu, oděvech, mateřském mléce a dalších [38].

Ftalátová změkčovadla nejsou chemicky vázána na polymerní strukturu plastu, a proto mohou i mírné změny okolních podmínek způsobit rychlejší uvolnění ftalátu z plastového výrobku do okolního prostředí. Ftaláty mohou tvořit až 40% hmotnosti konečného polymerního výrobku [40]. Uvolněné látky mohou snadno kontaminovat již výše zmíněné potraviny, nápoje, půdu, vodu, ovzduší, ale i krev [38].

Z uvedených příkladů vyplývá, že mezi hlavní cesty expozice patří orální expozice prostřednictvím kontaminovaných potravin a nápojů. Dalším významným typem expozice je dermální absorpce, například z kosmetických produktů [38]. Ftaláty se rovněž

mohou do organismu uvolňovat z plastových intravenózních setů používaných ve zdravotnictví [3].

Vzhledem k negativním dopadům na zdravotní stav bylo v Evropě v roce 2019 omezeno používání některých ftalátů, včetně BEHF, na maximální koncentraci 0,1 % nebo méně na hmotnost plastifikovaného materiálu v produktech [40].

1.2 Příprava krevních vzorků k analýze

Klíčovým krokem každé analýzy je správný odběr, skladování a příprava vzorku. Biologické tekutiny nejsou vhodné pro přímou analýzu pomocí LC-MS/MS a proto je nutné cílové analyty izolovat z biologické matrice a následně je převést do matrice, která je kompatibilní s LC-MS/MS [7].

Krev a její složky jsou v toxikologických studiích obecně považovány za jednu z nejvhodnějších typů vzorků, protože se nacházejí v přímém kontaktu se všemi tkáněmi v organismu a tím pádem lépe odráží úroveň expozice EDCs. Mezi nevýhody analýzy krevních vzorků patří obtížný odběr, invazivní povaha vzorkování a také vysoké náklady [40, 41].

Správná příprava krevních vzorků pro stanovení EDCs zastává důležitou roli při zajištění spolehlivých výsledků analýzy [41]. Pro získání krevní plazmy je nutné odebranou krev společně s antikoagulantem nejprve centrifugovat. Sérum lze získat pouhým odstředěním krve bez použití antikoagulantu. Sérum má podobné složení jako plazma, ale neobsahuje fibrinogen, který je zodpovědný za srážení krve. Obě tyto krevní složky mohou obsahovat interferující látky v podobě bílkovin, které mohou s cílovými analyty vytvářet komplexy a negativně ovlivnit analýzu. Před samotnou analýzou je nezbytné přítomné proteiny nejprve denaturovat a vysrážet pomocí k tomu určených organických rozpouštědel a následně je odstranit pomocí centrifugy [6, 42].

V některých případech je potřeba daný roztok s analytem zředit, nebo naopak zakoncentrovat v závislosti na detekčních limitech metody. Zejména vzorky s nízkou koncentrací cílového analytu je před analýzou potřeba zakoncentrovat, aby bylo možné dosáhnout dostatečné citlivosti [43]. V dostupné literatuře je v souvislosti s EDCs často zmiňována extrakce kapalina-kapalina (LLE) nebo extrakce na pevné fázi (SPE) či jejich miniaturizované varianty [6, 41].

Biologické vzorky jsou velmi náchylné ke kontaminaci již během odběru, ale také během uchovávání či manipulace se vzorkem. Především při analýze bisfenolů je velmi důležité zamezit kontaktu s materiály, ze kterých se mohou uvolňovat bisfenoly. Mezi časté zdroje této kontaminace patří laboratorní nádoby, rukavice, plastové a mikrocentrifugační zkumavky, SPE patronky, rozpouštědla, ultra čistá voda, ale i kovové jehly stříkaček kvůli epoxidové pryskyřici použité k jejich upevnění ke skleněné stříkačce [44]. Ve studii autorů *Cobellis et al.* byla krev odebírána do zkumavek typu Vacu-test. K odběru krve byly použity skleněné stříkačky a skleněné zkumavky. Zkumavky s krví byly ihned po odběru centrifugovány a poté byl vzorek přenesen do skleněné vialky. Tyto vzorky byly uchovány při -20 °C až do doby analýzy [45].

1.2.1 Extrakce na pevné fázi

SPE je účinná extrakční technika určená pro čištění, separaci nebo zakoncentrování analytů z roztoku matrice [46]. Své uplatnění nachází v oblastech environmentální analýzy, farmaceutické a biochemické analýzy, v organické chemii a analýze potravin [47].

Tato extrakční technika využívá pevnou a kapalnou fázi k izolaci jednoho nebo více analytů z roztoku [43]. Základním principem SPE je rozdělení látek mezi kapalnou fázi (matrice vzorku nebo rozpouštědlo s analyty) a pevnou fázi (sorbent) [46]. Absorbovaný analyt je ze sorbentu uvolněn postupným zvyšováním eluční síly rozpouštědla pomocí krokového gradientu [47].

V současné době je SPE velmi často využívána jako předúprava vzorku před samotným chromatografickým procesem. Zakoncentrování analytu pomocí SPE umožňuje zvýšení chromatografické citlivosti, čímž dochází ke zlepšení limitů detekce. Dále lze SPE využít k odstranění rušivých látek a případných nečistot, které by mohly mít za následek ucpání kolony či zkreslení výsledků analýzy. Velmi častým případem je, že původní matrice s analytem nevyhovuje potřebám analýzy. Pomocí SPE lze převést analyty z původní matrice do nové matrice, která je více kompatibilní s příslušnou analytickou metodou [47].

Před zahájením samotného procesu extrakce je klíčové zvolit správný typ sorbentu. Jeho výběr závisí na povaze analytu a typu interakce mezi cílovým analytem a sorbentem.

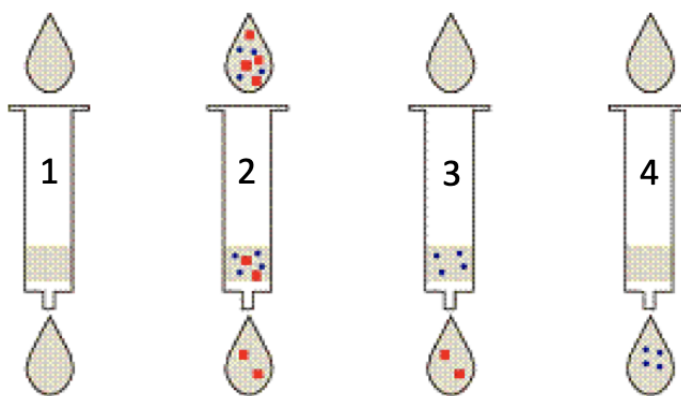
Nejběžnější mechanismy založené na zadržení analytů na pevném sorbentu jsou shrnuty v tab. 2 [46].

Tabulka 2: Typické extrakční mechanismy pro SPE.

Extrakční mechanismus	Použití
Reverzní fáze (RP)	Extrakce hydrofobních nebo polárních analytů z vodné matrice
Normální fáze (NP)	Extrakce polárních analytů z nepolárních organických rozpouštědel
Iontová výměna	Extrakce nabitých analytů z vodných nebo nepolárních organických vzorků

Obecný postup SPE se skládá z několika kroků v následujícím pořadí (obr. 5) [43, 47, 48]:

1. Aktivace a kondicionace sorbentu pomocí vhodného rozpouštědla
 - Tento krok je nezbytný, protože zajistí smáčení sorbentu, solvataci funkčních skupin a zajistí případné vymytí nečistot ze sorbentu. Kondicionace je nezbytným krokem pro zajištění reprodukovatelné interakce s analytem. Pokud sorbent vyschne, dojde k dekonkondicionování sorbentu.
2. Aplikace roztoku vzorku
 - Během tohoto kroku jsou analyty a matrice zachyceny na sorbentu. Dávkovaný objem se může pohybovat od několika mililitrů až po litry. K záchytu analytu dochází v důsledku větší afinity k sorbentu než ke kapalině.
3. Opláchnutí sorbentu k zajištění odstranění zachycené matrice a nečistot
 - Pro tyto účely se využívá rozpouštědla s nízkou eluční silou. Cílový analyt zůstává zachycený na sorbentu. Po opláchnutí sorbentu se doporučuje jeho vysušení k zajištění lepší eluční účinnosti.
4. Eluce zachycených analytů
 - Pomocí malého množství vhodného rozpouštědla dojde k eluci cílových analytů ze sorbentu. Rychlost eluce závisí na rozměrech kolony a množství sorbentu, ale obecně platí, že by neměla být příliš rychlá.



Obrázek 5: Grafické znázornění jednotlivých kroků SPE [49]

Existuje více možných konfigurací SPE. Nejběžnějším zařízením je polypropylenová stříkačka naplněná vrstvou sorbentu. Roztoky protékají sorbentem buď gravitačně, nebo pod tlakem. Tlak může být na roztok vyvíjen stlačením horního pístu či za použití vakuového systému [43].

Ve srovnání s LLE nabízí SPE řadu výhod – nižší spotřeba rozpouštědel, rychlejší proces extrakce, možnost automatizace, vysoká reprodukovatelnost při zpracování jednotlivých vzorků, vyšší selektivita díky širokému spektru adsorbentů a různým retenčním mechanismům a možná optimalizace extrakce [47]. Ačkoli SPE nabízí řadu výhod má i své nevýhody. K minimalizaci těchto nevýhod byly vyvinuty miniaturizované techniky SPE – magnetická extrakce na pevné fázi, mikro extrakce na pevné fázi či extrakce pomocí speciálních pipetových špiček se sorbentem [43, 50].

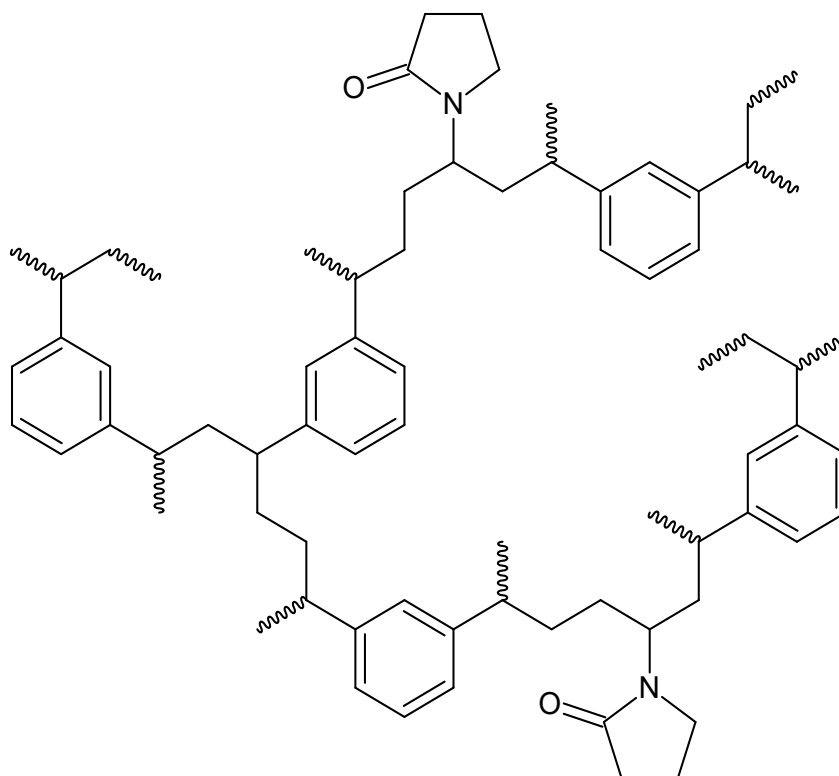
Při analýze BPA je doporučeno zamezit kontaktu analyzovaného vzorku s plastovými materiály, aby bylo minimalizováno riziko kontaminace. Výjimku představuje pouze polypropylen, který je považován za bezpečný materiál. Plastové materiály je doporučeno vyměnit za materiály skleněné, aby se předešlo kontaminaci [51, 52]. V přehledové studii autoři *Caballero-Casero et al.* uvádí, že kontaminaci z SPE patronek (zde uvádí přímo HLB Oasis) lze účinně odstranit jejich předmytím organickým rozpouštědlem [44].

1.2.1.1 Extrakce na pevné fázi v módu reverzních fází

Pro extrakci v RP módu lze využít různé typy sorbentů v závislosti na povaze cílového analytu. V této kapitole budou stručně popsány základní vlastnosti dvou typů sorbentů, které byly použity v experimentální části této práce.

Hydrophilic-Lipophilic Balanced

Hydrophilic-Lipophilic Balanced (HLB) je sorbent na bázi polymeru, který je tvořen kopolymerem hydrofilního N-vinylpyrrolidonu s hydrofobním divinylbenzenem ve specifickém poměru (obr. 6) [53, 54].



Obrázek 6: Chemická struktura sorbentu typu HLB tvořená kopolymerem hydrofilního N-vinylpyrrolidonu s hydrofobním divinylbenzenem

Výhodou tohoto sorbentu je vysoká kapacita pro široké spektrum látek o různé polaritě a rozdílných acidobazických vlastnostech. Nepolární sloučeniny mají vyšší afinitu k divinylbenzenu a polární sloučeniny k N-vinylpyrrolidonu [53]. Tento sorbent je dobře smáčitelný vodou, což znamená, že i když dojde k jeho vyschnutí, proces SPE může dále pokračovat. HLB sorbent je vysoce stabilní v rozsahu pH=0-14 [47].

Sorbent typu HBL je vhodný pro biologické, potravinářské a environmentální matrice [42, 47]. Mezi výrobcem doporučená použití patří extrakce léčiv a jiných farmaceutik z krve, plasmy, séra a moči, dále extrakce středně polárních organických molekul z polarizovaných matric, extrakce tetracyklinu a alkaloidů z krevního séra a extrakce pesticidů z vody [47, 55]. Doporučený pracovní postup při použití sorbetu typu HLB je uveden v tab. 3 [53].

Tabulka 3: Doporučený pracovní postup pro použití HLB sorbentu od výrobce Agilent [53].

Jednotlivé kroky SPE	Roztoky
Kondicionace kolonky	Methanol
Ekvilibrace kolonky	Voda
Dávkování vzorku	Vzorek
Promytí kolonky	Roztok methanolu ve vodě
Eluce analytu	Methanol nebo acetonitril

Sorbent na bázi siliky

Sorbent na bázi oktadecylsiliky (C18) je jedním z nejběžněji používaných sorbentů v módu RP. Tento materiál má hydrofobní charakter, díky němuž interaguje převážně s nepolárními analyty. Sorbent C18 disponuje volnými silanolovými skupinami (-SiOH), které mu umožňují sekundární interakci s polárními analyty. Na rozdíl od HLB sorbentu, je sorbent C18 stabilní pouze při pH v rozmezí 2-8. Sorbenty na bázi oktadecylsiliky jsou dostupné v různých modifikacích dle specifických požadavků prováděné analýzy.

Jednou z možných modifikací je tzv. endcapped sorbent na bázi oktadecylsiliky (C18 ec), který obsahuje méně volných silanolových skupin. Díky menšímu množství volných silanolových skupin je výrazně zvýšena jeho selektivita pro nepolární analyty. Tento typ sorbentu je často používán ke zlepšení čistoty vzorku či odstranění nepolárních sloučenin. Obecně se hodí pro záchyt nepolárních sloučenin, jako jsou například aflatoxiny, antibiotika, léčiva, konzervanty, pesticidy a další [47].

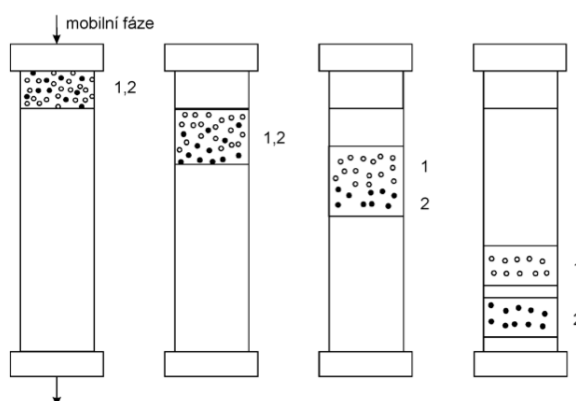
1.2.2 Extrakce kapalina-kapalina

Základním principem LLE je přechod analytu z jedné kapalné fáze do druhé kapalné fáze. Jedna fáze je obvykle tvořená organickým rozpouštědlem a druhá je tvořena vodným roztokem. Základní podmínkou je jejich vzájemná nemísitelnost. Z hlediska provedení se jedná o velmi jednoduchou a účinnou extrakční techniku. Její nevýhodou je relativně velká spotřeba organických rozpouštědel, které jsou finančně nákladné [56].

I v případě využití LLE za účelem extrakce BPA je doporučeno používat výhradně skleněné nebo polypropylenové materiály. Tyto materiály jsou považovány za bezpečné, jelikož vykazují minimální riziko kontaminace BPA ve srovnání s jinými typy plastů běžně používaných v laboratorní praxi [51, 52].

1.3 Chromatografie

V současnosti jsou chromatografické metody považovány za jedny z nejdůležitějších separačních technik. Všechny typy chromatografických metod jsou založeny na základním společném principu dělení látek ve směsi na základě jejich rozdílné afinity ke stacionární a mobilní fázi (obr. 7). Stacionární fáze je vždy nepohyblivá a mobilní fáze je vždy pohyblivá část systému. Během separačního procesu dochází k mnohonásobně opakovanému ustanovování rovnováhy mezi oběma nemísitelnými fázemi [57].



Obrázek 7: Základní princip chromatografického dělení směsi [58]

Chromatografické metody umožňují analyzovat složité směsi, izolovat jednotlivé složky a následně určit jejich kvalitu anebo kvantitu. Obecně jsou vhodné pro analýzu většiny anorganických směsí a téměř všech směsí organických látek [58].

Z historického pohledu sahají počátky chromatografie na přelom 19. a 20. století. První chromatografickou kolonu vyvinul v roce 1901 ruský botanik Michail Cvět. Tato skleněná kolona obsahovala sorbent ve formě uhličitanu vápenatého a byla použita k separaci rostlinných barviv. Objev Michaila Cvěta položil základy pro další významné objevy v oblasti vývoje chromatografických technik a metod [59]. Na jejich rozvoji se v průběhu let podílela řada významných vědců včetně britských vědců a držitelů Nobelovy ceny za chemii Archera J.P. Martina a Richarda L.M. Synge [57, 60].

1.3.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (LC) je separační metoda, která stejně jako ostatní chromatografické techniky využívá rozdílnou distribuci jednotlivých látek mezi dvě nemísitelné fáze. Stacionární fáze je tvořená pevnou látkou nebo kapalinou nanesenou

na tuhém nosiči. Mobilní fáze je vždy kapalná a protéká skrz stacionární fázi umístěnou uvnitř kolony [60, 61]. Kapalná mobilní fáze se vyznačuje minimální kompresivitou. Teplota má při LC má na rozdíl od plynové chromatografie minimální vliv na chromatografickou separaci [58]. Organická rozpouštědla používaná jako mobilní fáze mohou představovat významný zdroj kontaminace bisfenoly. K odstranění nebo minimalizaci této kontaminace lze docílit použitím předkolony na bázi C18 umístěnou mezi čerpadlem a injekčním ventilem. Bisfenoly pocházející z mobilní fáze jsou poté zachyceny na předkoloně a eluují až po bisfenolech pocházejících ze vzorku [44, 62].

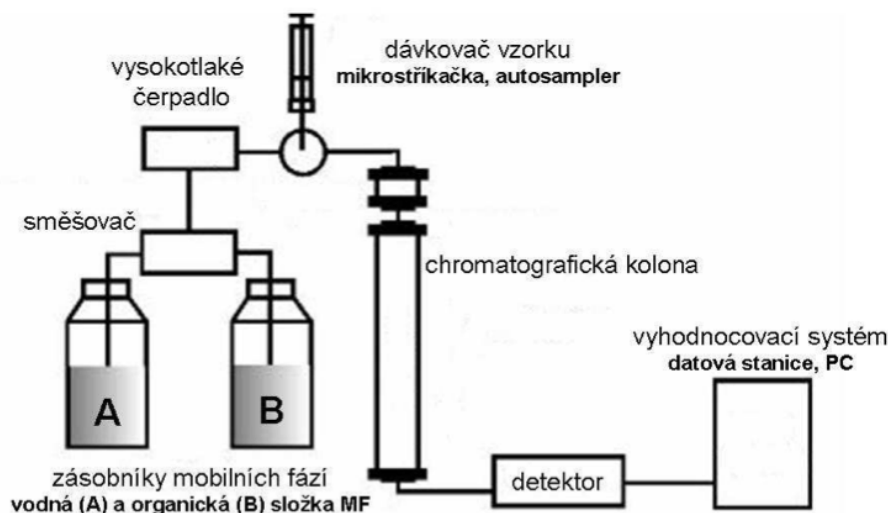
Dle experimentálního uspořádání lze LC rozdělit následovně (tab. 4) [58, 63]:

Tabulka 4: Klasifikace kapalinové chromatografie podle experimentálního systému [58].

Experimentální systém	Typ chromatografie
Otevřený systém	Papírová chromatografie
	Tenkovrstvá chromatografie
Uzavřený systém	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)
	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Kapalinový chromatograf je složen z následujících komponent: zásobník či zásobníky mobilních fází, odplyňovač mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, tlumič pulsů, kolona, detektor a vyhodnocovací systém. V případě gradientové eluce je zde navíc směšovač mobilních fází. Směšovač na základě programového nastavení smísí mobilní fáze v určitém poměru, které poté pokračují do vysokotlakého čerpadla [58].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je považována za nejrozšířenější a nejvyspělejší analytickou techniku. Jde o variabilní analytickou techniku, kterou lze do jisté míry přizpůsobit specifickým potřebám dané analýzy (například volbou mobilní fáze a stacionární fáze) [58]. Obrovskou výhodou HPLC je její vysoká spolehlivost, kterou zajišťuje vysokotlaké čerpadlo pohánějící mobilní fázi. HPLC je vhodná pro separaci látek netěkavého charakteru [58]. Na obr. 8 je zobrazeno schéma HPLC instrumentace.



Obrázek 8: Základní instrumentace HPLC pro gradientovou eluci [61]

Tato všestranná technika nachází uplatnění v mnoha odvětvích jako jsou farmaceutické analýzy a vývoj, klinické diagnostiky, dále při analýze potravin včetně testování jejich bezpečnosti, při monitorování životního prostředí a dalších vědních oborech [57, 63].

1.3.1.1 Kapalinová chromatografie v systému reverzních fází

Při optimalizaci a vývoji nových HPLC metodik je ve většině případů první volbou HPLC se systémem reverzních fází (RP). Mezi tři hlavní faktory ovlivňující separaci v RP-HPLC patří eluční síla mobilní fáze, iontová síla mobilní fáze a její pH [61].

V systému RP je charakter používané mobilní fáze polární a charakter stacionární fáze nepolární (respektive méně polární). Nejčastěji používanou stacionární fází jsou uhlíkaté řetězce ukotvené na povrchu nosiče, například oktadecyl (C18) či oktyl (C8). Mobilní fáze A obvykle představuje vodnou složku ve formě zředěné kyseliny či báze nebo pufru. Mobilní fáze B je organickou složkou, která je mísitelná s vodou – velmi často acetonitril (ACN) či methanol (MeOH). Voda má velmi nízkou eluční sílu, která je s přidavkem organické složky zvyšována. S rostoucí koncentrací soli v mobilní fázi dochází ke zvyšování iontové síly, která ovlivňuje sílu interakce mezi separovanými analyty a stacionární fází. Vyšší iontová síla způsobuje ztenčení solvatačního obalu molekuly, čímž je umožněna její silnější interakce se stacionární fází [61]. Interakce analytu se stacionární fází probíhá prostřednictvím hydrofobních interakcí kdy platí, že nejprve se eluují polární analyty a až poté nepolární [64]. Hodnota pH mobilní fáze má zásadní vliv na retenční časy látek. Zvýšení pH způsobí snížení retenčního času kyselých látek,

a naopak prodloužení retenčního času bazických látek. Snížením pH dojde k opačnému efektu [58].

1.3.2 Aktuální trendy v kapalinové chromatografii

Chromatografie je klíčovým nástrojem moderní analytické chemie, a proto je neustále vyvíjena snaha inovovat tuto metodu s cílem posouvat její hranice možností. V posledních desetiletích došlo k významnému pokroku z hlediska urychlení analýz. První možností zrychlení analýzy je použití monolitických kolon či kolon s povrchově porézními částicemi. Druhou a také dražší možností urychlení analýzy je použití techniky ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) [57, 65].

1.3.2.1 Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V 21. století byla představena modernější verze HPLC – ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC). Tato moderní technika sice pracuje na stejném principu, ale umožňuje rychlejší a účinnější analýzu látek s vysokým rozlišením a zvýšenou citlivostí [63, 66, 67].

Hlavní rozdíl mezi těmito technikami spočívá ve velikosti částic stacionární fáze [67]. Stacionární fáze UHPLC kolon je tvořena porézními částicemi, které jsou menší než 2 μm . Tyto kolony jsou plněny speciálně vyvinutými hybridními materiály, které kombinují vlastnosti klasických silikových a polymerních částic [68]. Příkladem běžně používaných UHPLC kolon může být hybridní siliková kolona X-Terra nebo pokročilejší kolona na bázi bridged ethyl hydrid (BEH), která poskytuje vyšší stabilitu a odolnost vůči vysokým tlakům. Kolony určené pro UHPLC mají menší průměr a jsou kratší než klasické HPLC kolony.

Obecně platí, že účinnost separace je přímo úměrná délce kolony a zároveň nepřímo úměrná velikosti částic. Z toho vyplývá, že kolonu lze zkrátit v poměru ke zmenšení velikosti částic, aniž by došlo ke ztrátě rozlišení [67]. Kolony tvořené takto malými částicemi jsou v průběhu analýzy vystaveny několikanásobně vyššímu zpětnému tlaku oproti běžným kolonám, což má vliv na délku jejich životnosti [65]. Negativní aspekt v podobě vysokého tlaku lze částečně potlačit zvýšením teploty [67]. Přístroje sloužící k UHPLC analýze byly konstrukčně přizpůsobeny k práci za vysokého tlaku, který dosahuje až 100 MPa [65, 68]. Menší částice mají větší povrchovou plochu,

což v kombinaci s vysokým tlakem umožňuje devětkrát rychlejší průběh analýzy [63, 65]. Z hlediska separačních vlastností metody dochází k trojnásobnému zvýšení citlivosti a dvojnásobnému zvýšení rozlišení oproti klasické HPLC [65]. Důsledkem podstatného zkrácení času analýzy bylo snížení spotřeby rozpouštědel a s tím i spojené náklady na jejich bezpečnou likvidaci. Ačkoli tato metoda nabízí spousty benefitů, její nevýhodou je velmi vysoká pořizovací cena UHPLC přístroje [69]. Dalším negativním aspektem UHPLC je potřeba častější údržby přístroje a také již zmíněná kratší životnost kolony [67].

Autoři *Wang et al.* se věnovali vývoji metody založené na UHPLC spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro simultánní stanovení 36 endokrinních disruptorů v lidském séru. Mezi analyzovanými sloučeninami byly bisfenoly, parabeny, ftaláty a další. K separaci použili kolonu C18 s částicemi o velikosti 5 μm . Mobilní fáze byla tvořena z ACN a Milli-Q vody s přídavkem 0,05 % (v/v) kyseliny mravenčí. Ionizace analyzovaných sloučenin probíhala v režimu ESI (pozitivním i negativním) [70].

1.3.2.2 Povrchově porézní částice

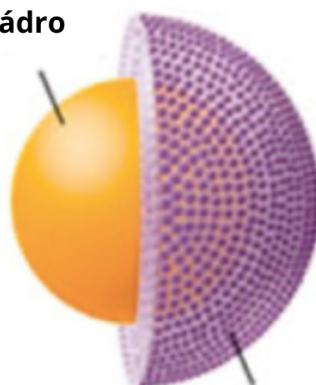
V posledních letech prošla HPLC významným vývojem především díky technologickým inovacím v oblasti vývoje náplní kolon [69]. Mezi další významné technologické pokroky v moderní analytické chemii patří objev core-shell neboli povrchově porézních částic [71].

První komerčně dostupné povrchově porézní částice byly uvedeny už v 70. letech minulého století. Tyto povrchově porézní částice vykazovaly vyšší účinnost oproti plně porézním částicím. Na druhou stranu nabízely pouze malou aktivní plochu částic, typicky v rozmezí 5–15 m^2/g , což způsobovalo nízkou retenci analytů a omezené kapacity vzorku. Až v roce 2007 došlo k vylepšení a modernizaci materiálů povrchově porézních částic, čímž si získaly své místo v moderní analytické chemii. Vylepšení materiálů mělo za následek lepší distribuci velikosti částic a zvětšení aktivní plochy [71].

Povrchově porézní částice obsahují nepropustné jádro a porézní obal (obr. 9), které mohou být zhotoveny z odlišných anebo stejných materiálů. Obvykle jsou jádro i obal vyrobeny ze siliky. Velikost jádra, tloušťka obalu a poréznost obalu mohou být

přizpůsobeny specifickým požadavkům chromatografické analýzy. Existuje několik dostupných morfologií těchto částic [72].

1,7 μm pevné jádro



0,5 μm porézní vrstva

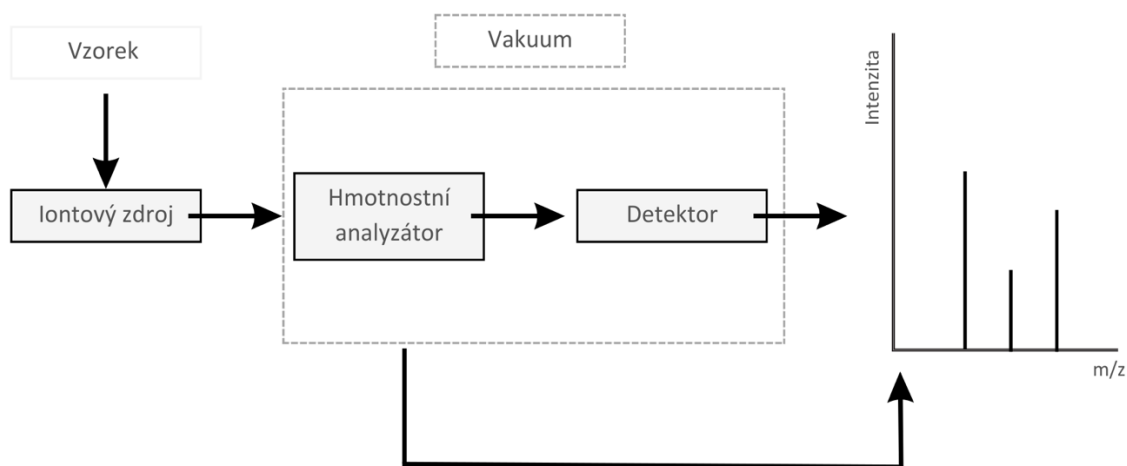
Obrázek 9: Struktura povrchově porézní částice [65]

Kolony s povrchově porézními částicemi pracují za normálních tlaků, a tudíž jsou ve většině případů kompatibilní s běžnými HPLC přístroji. Z dostupné literatury vyplývá, že tyto kolony dosahují srovnatelných výsledků s nákladnými UHPLC analýzami. Jinými slovy povrchově porézní částice zajišťují separační účinnost, rozlišení a rychlost srovnatelnou s UHPLC. Použití povrchově porézní částic v HPLC umožnilo jejich širší využití v oblastech farmaceutických, biologických, toxikologických a environmentálních analýz. Nižší zpětný tlak umožňuje použít vysoce viskózní organicko-vodné směsi pro analýzu složitých matric nebo velkých analytů jako jsou například biomolekuly a makromolekuly včetně proteinů a peptidů [65, 69].

1.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je instrumentální analytická metoda, která je založena na ionizaci molekul za vzniku iontů a jejich následné separaci podle efektivní hmotnosti neboli poměru hmotnosti k náboji (m/z) [58]. Jedná se o velmi citlivou, rychlou a univerzální metodu, která umožňuje identifikaci a kvantifikaci organických nebo anorganických sloučenin v poměrně složitých maticích [73, 74]. V současnosti je MS běžně používána k identifikaci neznámých sloučenin, stanovení izotopového zastoupení prvků v molekule či určení struktury sloučeniny podle její fragmentace [75] a dále je využívána ke studiu fyzikálních, chemických nebo biologických vlastností širokého spektra sloučenin [74].

Základním principem této metody je převedení neutrálních částic molekul na kladně nebo záporně nabitě ionty v plynném stavu. Hlavními třemi částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj zajišťující ionizaci molekul, disperzní prvek sloužící k separaci vzniklých iontů v elektromagnetickém poli a detektor (obr. 10) [75]. Po dopadu iontu na detektor je získáno čárové spektrum, které vyjadřuje relativní zastoupení jednotlivých iontů o hmotnosti m/z [76].



Obrázek 10: Základné schéma hmotnostního spektrometru

Vedle klasické MS existuje také MS/MS, jejímž principem je fragmentace analyzované molekuly a následná analýza vzniklých fragmentů [56]. V klinických laboratořích je nejčastěji používaným tandemovým analyzátelem QqQ [7].

1.4.1 Iontový zdroj

Iontový zdroj slouží k ionizaci neutrálních molekul analytu. Jinými slovy, iontový zdroj zprostředkovává přeměnu neutrální molekuly analytu na nabitě částice neboli ionty.

Ionizační techniky lze klasifikovat v závislosti na množství dodané energie analyzované molekule analytu na měkké a tvrdé. Historicky starší jsou tvrdé ionizační techniky. Tvrdé ionizační techniky dodávají molekulám analytu velké množství energie, které způsobí jejich fragmentaci během procesu ionizace. Určitou nevýhodou tvrdých ionizačních technik je potřeba vzorku v plynném stavu. Z tohoto důvodu jsou možnosti analýzy značně omezeny pouze na těkavé a tepelně stabilní sloučeniny. Příkladem tvrdé ionizační techniky je elektronová ionizace (EI) [7, 73]. V 80. letech minulého století došlo k významnému vývoji v oblasti ionizačních technik, který přinesl objev v podobě měkkých ionizačních technik. Díky tomuto vývoji došlo k rozšíření možných použití

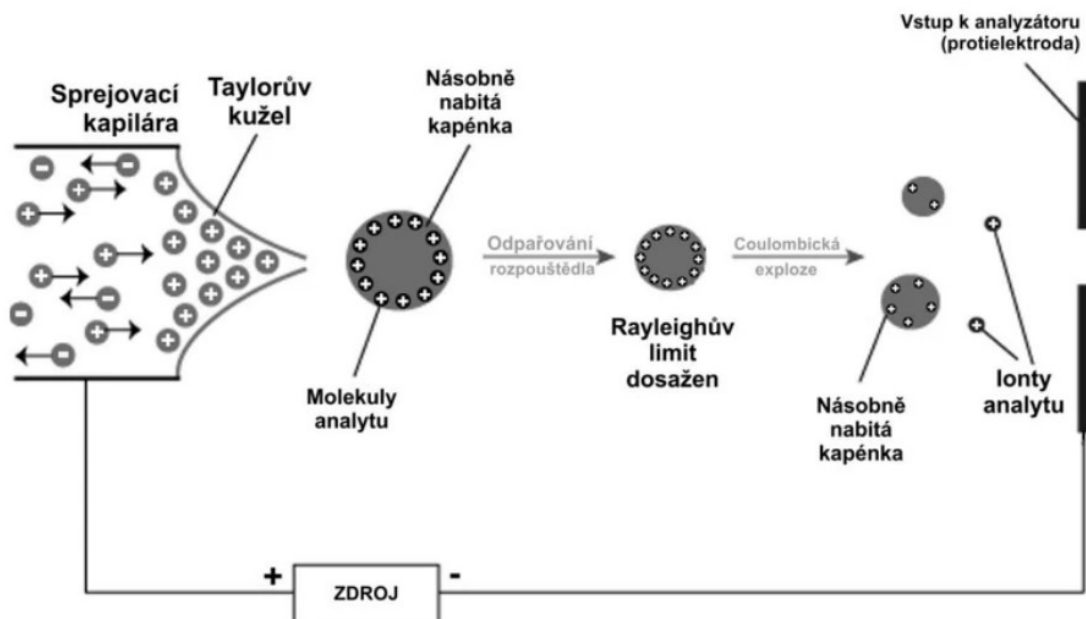
i pro netěkavé a tepelně nestabilní sloučeniny. V tomto případě jsou molekuly analytu vystaveny menšímu množství energie. Při použití měkkých ionizačních technik nedochází k fragmentaci molekul [7, 73]. Mezi nejčastěji používané měkké ionizační techniky patří ionizace elektrosprejem (ESI) či chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Volba ionizační techniky závisí na povaze molekul analyzovaného vzorku [73]. Pro LC-MS aplikace se nejčastěji používají ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku, konkrétně ESI a APCI [77].

V rámci experimentální části této diplomové práce byla použita ionizace typu ESI a z tohoto důvodu bude tomuto typu ionizace věnována následující podkapitola 1.4.1.1.

1.4.1.1 Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem je nepoužívanější ionizační technikou. Jedná se o měkkou ionizační techniku, která dokáže tvořit několikanásobně nabitě ionty, a tudíž lze použít k ionizaci velkých i malých molekul [38, 52]. Tento typ ionizace se hodí pro analýzu středně polárních molekul a je vhodná pro kapalně vzorky [78]. ESI umožňuje práci v negativním i pozitivním módu, přičemž vznikají protonované či deprotonované formy ionizované molekuly [51, 68]. Technika ESI vyžaduje neustálý přívod kapalně fáze, což ji činí vysoce kompatibilní s HPLC [58].

Elektrosprej je tvořen kovovou kapilárou (může být vyhřívána), podél které proudí zamlžující plyn. Na kapiláru je vloženo vysoké napětí v rozmezí 3-5 kV, přičemž na konci kapiláry vzniká tzv. Taylorův kužel. Roztok analytu je po přivedení do nabitě kapiláry za podpory zmlžujícího plynu rozprášen. Vzniklé kapičky, tvořící jemný aerosol, mají na svém povrchu velké množství nábojů. Tyto kapičky jsou následně přivedeny do kontaktu se sušícím plynem, který postupně odstraní přítomný podíl neionizovaného rozpouštědla. Během sušení dochází ke zmenšování objemu kapiček, což má za následek nárůst hustoty elektrického náboje na jejich povrchu. Tyto dva děje mají za následek tzv. „Coulombickou explozi“, která způsobí rozpad jednotlivých kapiček na menší kapičky. Při rozpadu kapiček dochází k rozdělení původního náboje mezi nově vzniklé kapičky. Tímto způsobem nakonec dojde k uvolnění nabitých iontů v plynné formě, které jsou následně vedeny do hmotnostního analyzátoru a poté do detektoru [77, 79]. Celý proces ionizace pomocí ESI je znázorněn na obr. 11.



Obrázek 11: Schématické znázornění jednotlivých fází ionizace molekuly za použití ESI [56]

V průběhu let bylo vyvinuto několik modifikací elektrospreje jako pneumaticky asistovaný elektrosprej, elektrosonický sprej nebo oblíbený nanoelektrosprej. Nanoelektrosprej výrazně snižuje spotřebu vzorku, a tudíž analyzovaný vzorek vystačí pro větší množství analýz. Dostupné modifikace elektrospreje se významně podílejí na rozšíření oblasti využití ESI [79].

1.4.2 Hmotnostní analyzátory

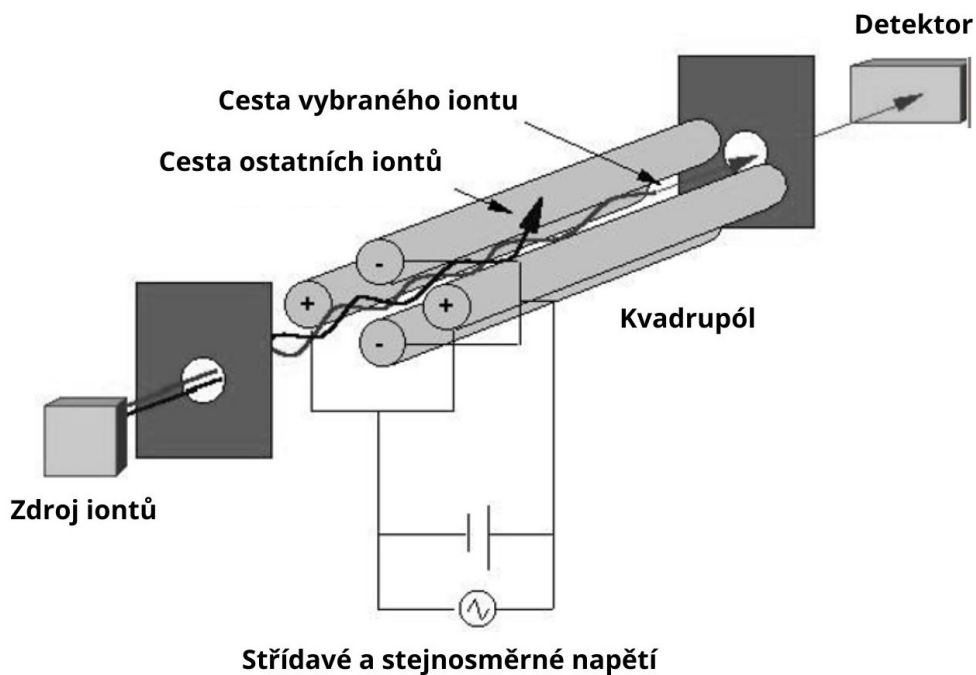
Ionty z iontového zdroje pokračují do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k jejich separaci podle m/z . Hmotnostní analyzátory lze rozdělit do čtyř základních skupin podle rozdílných fyzikálních principů separace iontů (tab. 5) [56]:

Tabulka 5: Rozdělení hmotnostních analyzátorů dle fyzikálních principů separace.

Hmotnostní analyzátor	Princip fungování hmotnostního analyzátoru
Sektorové analyzátory	Odchýlení trajektorie v magnetickém a elektrickém poli
Kvadrupól, sférická a lineární iontová past	Oscilace iontů v elektrickém poli vytvářeném kombinací stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí
Analyzátor doby letu	Měření doby letu
(a) Iontová cyklotronová rezonance (b) Orbitrap	Absorpce energie při cykloidálním pohybu v magnetickém (a) nebo elektrickém poli (b)

1.4.2.1 Jednoduchý kvadrupól

Tento typ hmotnostního analyzátoru je tvořen čtyřmi paralelními tyčemi ve vakuu (obr. 12). Tyče mohou být kruhového nebo hyperbolického průřezu. Dvě protilehlé tyče jsou vždy nabity nábojem stejné polaroty a je na ně aplikováno stejnosměrné (U) a střídavého (V) napětí, přičemž v průběhu skenování jsou obě napětí udržována v konstantním poměru. V důsledku působení elektrostatického přitahování a odpuzování se ionty v prostoru mezi čtyřmi tyčemi pohybují ve tvaru pomyslné šroubovice. Platí zde lineární závislost mezi propuštěnými ionty o daném poměru m/z a elektrickém potenciálu elektrod. Podle nastavení hodnot napětí lze zajistit průchod iontu o konkrétním poměru m/z na detektor, zatímco jiné ionty o jiné hmotnosti m/z budou zadrženy na některé z tyčí. Těžší ionty je obtížnější odklonit z jejich trajektorie než lehčí, což zabraňuje těžším atomům v nárazu na tyče [56, 80].

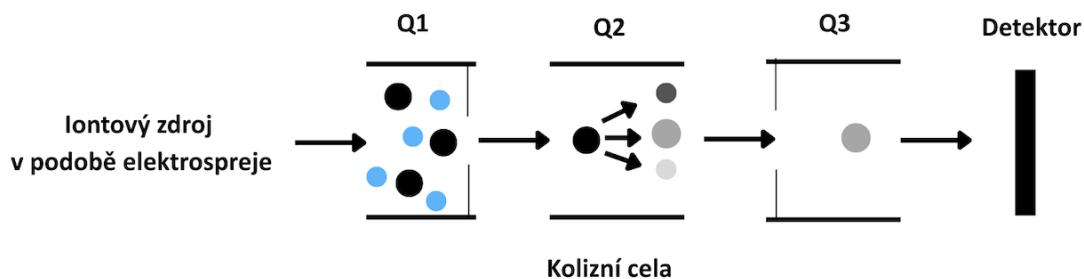


Obrázek 12: Hmotnostní spektrometr – jednoduchý kvadrupól [81]

Tento typ analyzátoru je kompatibilní s LC a plynovou chromatografií (GC). Výhodami jsou relativně nízká pořizovací cena a dobrá reprodukovatelnost [73].

1.4.2.2 Trojitý kvadrupól

Trojité kvadrupól (QqQ) je tandemový hmotnostní spektrometr, který je složený ze tří kvadrupólových analyzátorů umístěných za sebou (obr. 13). První kvadrupól (Q1) slouží k výběru iontů o dané m/z , tzv. prekurzorových iontů. Vybrané prekurzorové ionty pokračují do druhého kvadrupólu (Q2), který představuje kolizní celu naplněnou kolizním plynem. Nejčastějšími kolizními plyny jsou argon nebo dusík. V kolizní cele dochází k fragmentaci prekurzorových iontů na produktové ionty srážkovým procesem zvaný kolizně indukovaná disociace. Pomocí třetího kvadrupólu (Q3) jsou vzniklé produktové ionty analyzovány a poté detekovány [69, 71].



Obrázek 13: Schématické znázornění základního principu trojitého kvadrupólu

QqQ umožňuje měření v různých režimech skenování. Pro dosažení nízkých mezí detekce je nejvhodnější režim Multiple Reaction Monitoring (MRM) neboli režim sledování vybrané fragmentace / vybraných fragmentací [56].

1.5 Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Spojení LC a MS představuje významný pokrok v oblasti analytické chemie. Po technické stránce bylo toto spojení velkou výzvou a bylo umožněno až objevem ESI. V této konfiguraci LC-MS plní MS funkci detektoru a oproti ostatním chromatografickým detektorům nabízí výrazné zvýšení citlivosti a selektivity detekce. Díky vysoké skenovací rychlosti LC-MS umožňuje efektivní analýzu složitých směsí v různých oblastech [78].

Nejrozšířenější konfigurací MS/MS je spojení LC s hmotnostním analyzátozem typu QqQ. Rozvoj MS/MS přinesl vyšší selektivitu detekce, než jakou nabízejí ostatní běžně dostupné analytické metody včetně LC-MS. Zvýšená selektivita je dosažena výběrem specifického prekurzorového iontu v prvním kvadrupólu, jeho fragmentací v kolizní cele a následnou analýzou produktových iontů ve třetím kvadrupólu [7].

V současnosti jsou přístroje LC-MS a LC-MS/MS běžně používanými přístroji v klinické analýze. Jednou z prvních klinických aplikací LC-MS byl novorozenecký screening, který z kapky novorozenecké krve odhaloval vrozené metabolické poruchy [78]. LC-MS nachází uplatnění při analýze širokého spektra látek v enviromentálních, farmaceutických, medicínských, toxikologických, forezních a potravinářských analýzách a dalších oborech [73].

Autoři *Cobellis et al.* vypracovali studii, jejímž cílem bylo simultánní stanovení BPA a bisfenol E (BPE) pro rutinní monitorování jejich hladin v séru u žen trpících endometriózou.

K separaci BPA a bisfenolu B z krevního séra použili kombinaci ACN a fosfátového pufru o pH 6. Pro analýzu byla využita nerezová ocelová monolitická kolona typu Onyx Monolithic C18 (100 × 4,6 mm i.d.; Phenomenex, USA) spolu s fluorescenčním detektorem. Pro potvrzení identifikace a následné kvantifikace byl poté použit hmotnostní detektor, konkrétně trojitý kvadrupól. K ionizaci bisfenolů byl použit ESI v negativním módu. Podmínky pro ionizaci byly následující: ionizační napětí 5000 V, teplota turboplynu 250 °C, nebulizační plyn 55 psi a plyn clony 20 psi [45].

Na základě výše citované odborné literatury lze konstatovat, že LC-MS/MS metody představují vhodný nástroj pro stanovení BPA v biologických matricích. Tato diplomová práce se zaměřuje na návrh a optimalizaci metody pro stanovení vybraných EDCs ze skupin bisfenolů, parabenů a ftalátů v lidské plazmě.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části byl návrh a optimalizace metody pro separaci a stanovení vybraných skupin EDCs pomocí LC-MS nebo LC-MS/MS se systémem RP. Seznam všech použitých standardů EDCs je uveden v kapitole 2.1.1.1.

První část experimentální práce byla provedena za použití LC/MS (kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem Agilent InfinityLab LC/MSD iQ). Pomocí této instrumentace byl optimalizován eluční gradient pro separaci EDCs a zároveň byla vybrána optimální kolona. Hmotnostní detektor s jednoduchým kvadrupólem neposkytoval dostatečně nízké limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) pro stopovou analýzu EDCs.

Druhá část experimentální práce byla tedy realizována s využitím instrumentace typu LC-MS/MS (kapalinový chromatograf 1260 Infinity II s hmotnostním spektrometrem typu QqQ; 6475 LC/TQ). Změna instrumentace vedla k dosažení nižších LOD a LOQ, čímž byla zvýšena citlivost metody. Pomocí této instrumentace byly zároveň otestovány matricové efekty (ME) a také extrakční výtěžnost (RE) plazmatických vzorků, které byly před samotnou analýzou upraveny technikami SPE či LLE.

2.1 Seznam použitých chemikálií a přístrojového vybavení

2.1.1 Chemikálie

2.1.1.1 Standardní látky

- Bisphenol A (Merck, Darmstadt, Německo)
- Bisphenol AF (Merck, Darmstadt, Německo)
- Bisphenol E (Merck, Darmstadt, Německo)
- Bisphenol F (Merck, Darmstadt, Německo)
- Dibutylftalát (Merck, Darmstadt, Německo)
- Diethylftalát (Merck, Darmstadt, Německo)
- Dihexylftalát (Merck, Darmstadt, Německo)
- Bis(2-ethylhexyl) ftalát (Merck, Darmstadt, Německo)
- Methylparaben (Merck, Darmstadt, Německo)
- Ethylparaben (Merck, Darmstadt, Německo)

- Propylparaben (Merck, Darmstadt, Německo)
- Butylparaben (Merck, Darmstadt, Německo)
- 4-hydroxybenzoová kyselina (Merck, Darmstadt, Německo)

2.1.1.2 Mobilní fáze a aditiva

- Octan amonný (Merck, Darmstadt, Německo)
- Mravenčan amonný (Merck, Darmstadt, Německo)
- Acetonitril (Merck, Darmstadt, Německo)
- Hydroxid amonný (Merck, Darmstadt, Německo)
- Kyselina 5-sulfosalicylová (Merck, Darmstadt, Německo)
- Demineralizovaná voda – Milli Q Reference System (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)

2.1.2 Použitá instrumentace

- Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem Agilent InfinityLab LC/MSD iQ (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
- Kapalinový chromatograf 1260 Infinity II s hmotnostním spektrometrem typu QqQ (6475 LC/TQ) (Agilent, Santa Clara, CA, USA)

2.1.3 Testované kolony

- Kinetex Polar C18: délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μm , porozita 100 Å (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Arion Polar C18 UHLPC: délka 100 mm, vnitřní průměr 2,1 mm, velikost částic 2,2 μm (Chromservis, Praha, Česká republika)
- YMC-Triart C18 ExRS: délka 100 mm, vnitřní průměr 2,1 mm, velikost částic 3 μm , porozita 8 nm (YMC, Kyoto, Japonsko)

2.1.4 SPE vybavení

- Patronka se sorbentem Chromabond C18 ec (Macherey-Nagel, Německo)
- Patronka se sorbentem Chromabond HLB (Macherey-Nagel, Německo)
- Patronka se sorbentem Strata C18-E (Phenomenex, USA)
- Vakuový systém pro SPE (Merck, Darmstadt, Německo)

2.1.5 Další vybavení

- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Automatické pipety (Thermo Scientific, Finsko)
- Vortex (Fisher Scientific, USA)
- Stolní centrifuga, model M1012P (Jet Bio-Filtration Co., Čína)
- Skleněné vialky
- Běžné laboratorní nádobí

2.2 Příprava jednotlivých roztoků standardů endokrinních disruptorů

Z 13 vybraných standardů EDCs byly připraveny zásobní, pracovní a standardní roztoky. Všechny roztoky byly připraveny přímo do skleněných vialek o objemu 1,5 ml. Zásobní roztoky byly připraveny navážením jednotlivých standardů EDCs a doplněním odpovídajícím množstvím ACN tak, aby výsledné koncentrace těchto roztoků činily 10 mg/ml. Takto připravené zásobní roztoky byly pečlivě promíchány pomocí vortexu. Ze zásobních roztoků byly naředěny pracovní roztoky jednotlivých EDCs o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Odpipetované objemy zásobních roztoků byly doplněny odpovídajícím množstvím ACN. Vialky s pracovními roztoky byly opět promíchány za použití vortexu. Na závěr byly z připravených pracovních roztoků naředěny standardní roztoky o koncentraci 5 µg/ml, které byly opět pečlivě promíchány. Všechny připravené roztoky standardů EDCs byly po celou dobu experimentální části uchovávány v lednici.

2.3 Příprava směsných kalibračních roztoků

Kalibrační řada byla připravena ve formě směsných standardů o následujících koncentracích: 5000, 1000, 200, 40, 8, 2, 1, 0,5 a 0,1 ppb. K přípravě těchto kalibračních roztoků byl použit ACN.

2.4 Příprava mobilních fází

V této diplomové práci byly testovány dvě mobilní fáze A–5 mM octan amonný a 5 mM mravenčan amonný. Jako mobilní fáze B byl použit ACN o čistotě LC/MS.

Mobilní fáze A v podobě 5 mM octanu amonného byla připravena navážením 0,1925 g této látky a doplněním 500 ml demineralizované vody. Zásobní lahev s mobilní fází byla

důkladně promíchána. ACN o čistotě LC/MS byl pouze přelit do zásobní lahve bez dalších úprav.

2.5 Příprava plazmatických vzorků

Vzorky lidské plazmy byly uchovány v mrazáku při teplotě -20 °C až do doby analýzy. Následně byly v rámci optimalizace postupu přípravy plazmatických vzorků otestovány dva typy sorbentů určené pro SPE a technika LLE.

Použitý postup přípravy plazmatických vzorků k analýze s využitím techniky SPE je shrnut v tab. 6.

Tabulka 6: Postup přípravy plazmatického vzorku pomocí techniky SPE.

Jednotlivé kroky SPE	Použité roztoky
Aktivace	2 ml MeOH
Kondicionace	2 ml 5 % MeOH
Vzorek	100 µl či 1 ml plazmatického vzorku
Promývání	4 ml 5 % MeOH
Eluce	1 ml ACN

Pro výpočet extrakční výtěžnosti (RE) (rovnice 1) byly připraveny plazmatické vzorky následujícím způsobem. Nejprve byl připraven spike vzorku plazmy o koncentraci 50 ppb, poté byl promíchán pomocí vortexu a byl vložen do centrifugy (10 000 otáček/min, 10 min). Současně byl připraven i nespikovaný vzorek čisté plazmy, který byl odstředěn za stejných podmínek. Poté byly oba zcentrifugované vzorky plazmy upraveny pomocí metody SPE (tab. 6). Oba extrakty byly odpařeny proudem N₂ do sucha a znovu rozpuštěny ve 100 µl ACN. Do čisté plazmy, která byla podrobena procesu SPE, byl po extrakci přidán spike o koncentraci 50 ppb.

$$RE [\%] = \frac{\text{plocha píku analytu přidaného před extrakcí}}{\text{plocha píku analytu přidaného po extrakci}} \cdot 100 \quad (1)$$

Pro výpočet ME (rovnice 2) byly vzorky čisté plazmy centrifugovány za stejných podmínek. Stejně jako v předchozím případě byl připraven spike přidaný po extrakci o koncentraci 50 ppb. Po úpravě vzorku metodou SPE byl extrakt odpařen a znovu rozpuštěn ve 100 µl ACN. Srovnávací standardní roztok byl připraven z čistého ACN s přidávkem spiku o koncentraci 50 ppb.

$$ME[\%] = \frac{\text{plocha píku analytu přidaného po extrakci} - \text{plocha píku čisté plazmy}}{\text{plocha píku standardního roztoku}} \cdot 100 \quad (2)$$

Pro přípravu plazmatických vzorků byla otestována i metoda LLE. Z plazmatických vzorků byly nejprve vysráženy proteiny pomocí 10% kyseliny 5-sulfosalicylové v poměru 1:1 (v/v). Plazmatický vzorek zbavený proteinů byl rozdělen do dvou Eppendorfových zkumavek s filtrem, které byly umístěny do centrifugy. Centrifuga byla nastavena na 10 000 otáček/min po dobu 10 minut. Následně byl vytvořen spike o koncentraci 50 ppb, který byl společně se vzorkem čisté plazmy upraven pomocí LLE. K extrakci byl použit chloroform, který byl smíchán se vzorkem v poměru 1:2 (vzorek/chloroform) (v/v). Následně bylo odebráno 950 µl čiré organické vrstvy chloroformu a odpařeno proudem N₂. Do vysušené vialky bylo přidáno 100 µl ACN. Z čisté plazmy byl opět připraven spike přidaný po extrakci o koncentraci 237,5 ppb, která odpovídá teoretickému zakoncentrování po odpaření 950 µl vzorku a rozpuštění v 100 µl ACN. Dále byl připraven srovnávací roztok z čistého ACN o koncentraci 237,5 ppb. K výpočtu RE a ME byly použity rovnice 1 a 2.

2.6 Optimalizace podmínek separace endokrinních disruptorů pomocí LC/MS

Optimalizace separačních podmínek v systému LC/MS byla provedena pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent InfinityLab LC/MSD iQ. Optimalizace byly provedeny pomocí roztoku směsného standardu o koncentraci 5 µg/ml, kdy objem nástřiku činil 5 µl.

Nejprve byl experimentálně optimalizován gradient, při kterém separace testovaných EDCs dosahovala dostatečného rozlišení. K separaci vybraných EDCs byla využita gradientová eluce s programovanou změnou rozpouštědla, jejíž průběh je zaznamenán v tab. 7. Po každé analýze byla kolona automaticky kondicionována po dobu 6 minut na počáteční podmínky gradientu. Vybranou mobilní fází byla směs obsahující 5 mM octan amonný (mobilní fáze A) a čistý ACN (mobilní fáze B). Průtok mobilní fáze byl nastaven na konstantní hodnotu 0,4 ml/min. Termostat kolony byl nastaven na 30 °C.

Tabulka 7: Optimalizovaný gradient pro finální separaci endokrinních disruptorů.

Eluční gradient		
Čas [min]	A [%]	B [%]
0	70	30
8	0	100
14	0	100

Následně byly testovány tři typy kolon. V souladu s výsledky optimalizace byla nakonec použita kolona Kinetex Polar C18 (kolona RP; dále jen „Kinetex Polar“). Separací podmínky použité pro testování kolon jsou shrnuty v tab. 8.

Tabulka 8: Separací podmínky při testování kolon.

Použitý instrument	Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem Agilent InfinityLab LC/MSD iQ
Mobilní fáze A	5 mM octan amonný
Mobilní fáze B	ACN
Průtok mobilní fáze	0,4 ml/min
Teplota uvnitř kolony	30 °C
Objem nástřiku	5 µl

Každá kolona byla otestována pomocí krátkého a dlouhého gradientu, jejichž průběhy jsou zaznamenány v tab. 9. Pro každou kolonu byl změřen dvakrát krátký a dvakrát dlouhý gradient. Dále byl pro každou z kolon změřen mrtvý čas kolony za použití thiomochoviny.

Tabulka 9: Testované gradienty použité k výběru vhodné kolony pro separaci endokrinních disruptorů.

Krátký gradient			Dlouhý gradient		
Čas [min]	A [%]	B [%]	Čas [min]	A [%]	B [%]
0	70	30	0	70	30
8	0	100	20	0	100
14	0	100			

Z výsledných chromatogramů byly odečteny šířky píků při základně. Dále byla zaznamenána symetrie jednotlivých píků a retenční časy látek. Pořadí eluce analyzovaných sloučenin odpovídalo předpokladu, který byl založen na znalosti jejich hodnot log P (tab. 10). Hodnota log P souvisí s lipofilitou sloučeniny a čím je tato hodnota vyšší, tím je daná sloučenina více lipofilní. Lipofilnější sloučeniny jsou zadržovány na koloně delší dobu. Tomuto trendu neodpovídají pouze sloučeniny BPE a diethyl ftalát (DEF), které vykazují odchylky v očekávané retenci vzhledem k jejich hodnotám log P.

Tabulka 10: Retenční časy, analyzovaných endokrinních disruptorů, naměřené při krátkém gradientu při použití kolony Kinetex Polar a hodnoty jejich log P.

Sloučenina	Retenční čas [min]	Log p
4HB	0,967	1,58 [83]
MP	2,776	1,96 [84]
EP	3,816	2,47 [86]
BPF	4,001	2,91 [88]
BPE	4,498	3,90 [90]
PP	4,744	3,04 [91]
BPA	4,905	3,32 [92]
BP	5,518	3,57 [93]
DEF	5,643	2,47 [94]
BPAF	5,914	4,47 [95]
DBF	8,021	4,50 [96]
DHF	9,692	6,82 [97]
BEHF	10,747	7,60 [98]

Dále byly optimalizovány některé parametry hmotnostního spektrometru, v tomto případě jednoduchého kvadrupólu. K ionizaci testovaných analytů byla využita ESI v režimu selektivního záznamu iontu (Selected Ion Monitoring, SIM)

Ionizace analytů probíhala v pozitivním i v negativním módu, jehož volba se odvíjela od chemické povahy testovaných EDCs a intenzity poskytnutých signálů. Některé látky bylo možné detekovat v obou módech, tudíž byl na základě odezvy detektoru zvolen mód s lepší odezvou pro daný analyt. Dále bylo optimalizováno napětí na kapiláře. Posledním optimalizovaným parametrem byly fragmentační energie jednotlivých testovaných analytů.

Kapalinový chromatograf s hmotnostním spektrometrem Agilent InfinityLab LC/MSD iQ byl využit pouze pro kvalitativní analýzu, neboť hodnoty LOD a LOQ nedosahovaly požadovaných limitů pro stopovou analýzu. Z tohoto důvodu byl ve druhé části experimentální práce použit kapalinový chromatograf s tandemovým hmotnostním spektrometrem typu QqQ.

2.6.1 Optimalizace LC-MS/MS

Optimalizace metody LC-MS/MS byla provedena pomocí kapalinového chromatografu ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, konkrétně na přístroji Agilent 6475 Triple Quadrupole LC/MS s iontovým zdrojem typu ESI. K optimalizaci LC-MS/MS byl použit stejný eluční gradient jako při měření na Agilent InfinityLab LC/MSD iQ (tab. 7)

2.6.2 Optimalizace MRM přechodů

K identifikaci MRM přechodů jednotlivých analytů byly použity standardní roztoky EDCs o koncentraci 5 µg/ml. Příprava těchto roztoků je sepsána v kapitole 2.2.

S ohledem na rozdílné strukturní rysy jednotlivých EDCs byly MRM přechody identifikovány v pozitivním i negativním ESI módu. Podmínky MS, za kterých probíhala identifikace MRM přechodů jsou shrnuty v Tabulka 11.

Tabulka 11: Parametry hmotnostního spektrometru QqQ použité při identifikaci MRM přechodů.

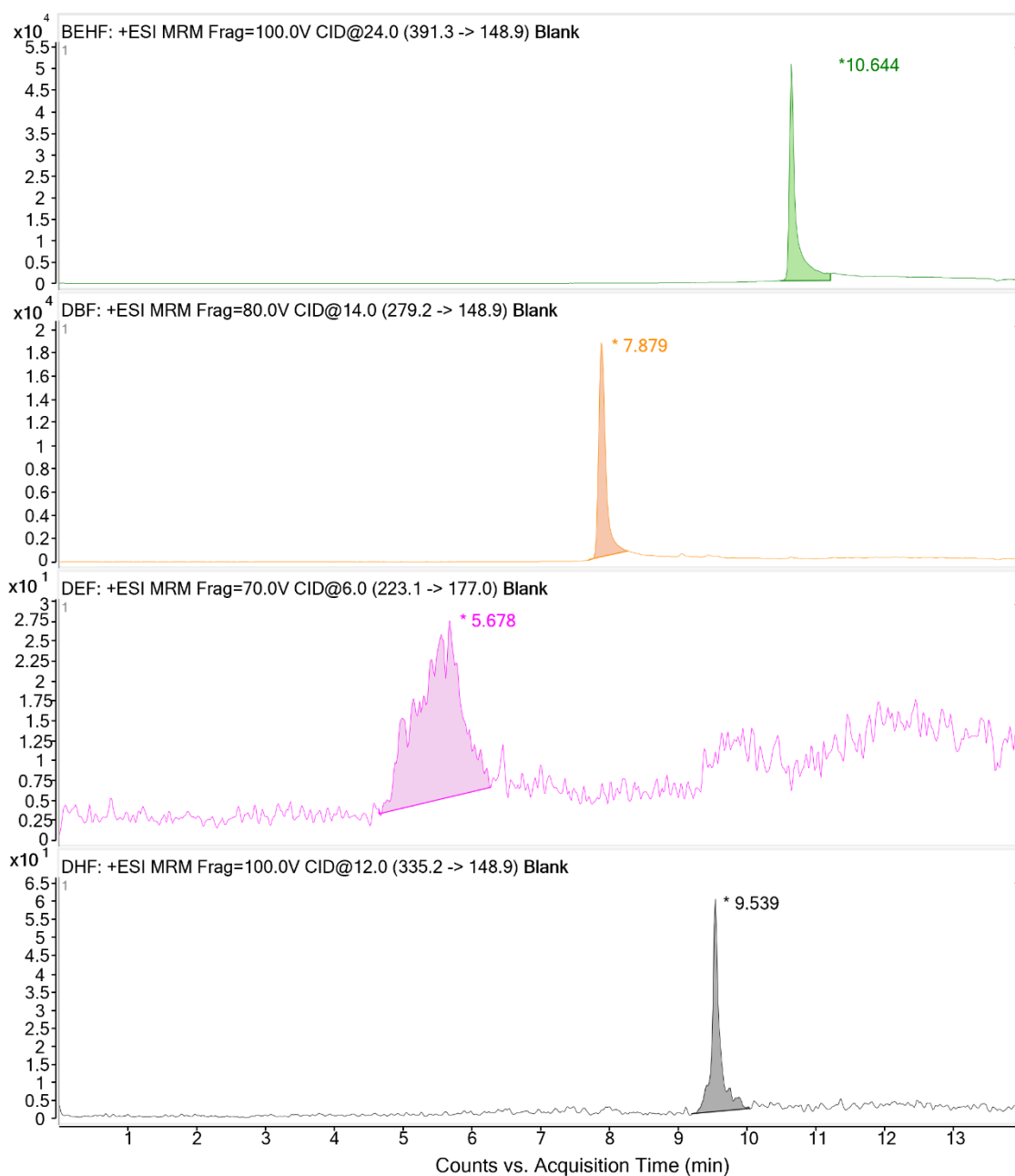
Parametr	Nastavená hodnota
Průtok plynu (L/min) <i>Gas Flow</i>	11
Teplota plynu (°C) <i>Gas Temperature</i>	300
Tlak nebulizátoru (psi) <i>Nebulizer pressure</i>	35
Napětí na kapiláře – kladné (V) <i>Capillary Voltage</i>	4500
Napětí na kapiláře – záporné (V) <i>Capillary Voltage</i>	4500
Napětí na trysce – pozitivní (V) <i>Nozzle Voltage</i>	600
Napětí na trysce – negativní (V) <i>Nozzle Voltage</i>	600

Pro každý EDCs byl zaznamenán nejintenzivnější MRM přechod, který byl následně upraven v metodě a poté použit ke kvantifikaci. Pro nejintenzivnější MRM přechod každého z analytů byly optimalizovány hodnoty kolizní energie (CE) a fragmentační energie.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace HPLC/MS

Pro účely optimalizace podmínek HPLC/MS byl připraven směsný standard všech testovaných EDCs o koncentraci 5 µg/ml v ACN. Již v počátečních fázích měření byla v blanku zjištěna přítomnost všech testovaných ftalátů (BEHF, DBF, DEF, DHF). V případě DEF a dihexyl ftalát (DHF) byly v blanku zaznamenány pouze nízké odezvy. Tyto dva ftaláty byly kvantifikovány pouze v případech, kdy jejich odezvy v analyzovaných vzorcích výrazně převyšovaly hodnoty signálu naměřené v blanku. Tato systematická kontaminace byla s největší pravděpodobností způsobena uvolňováním ftalátů z plastových kapilár přístroje vlivem působení použitého rozpouštědla. Ve vysokých koncentracích byly detekovány zejména BEHF a DBF, a proto byly z následných analýz vyřazeny. Kontaminace byla následně potvrzena i při kontrolním měření blanku pomocí přístroje LC-MS/MS. Výsledný záznam kontrolního měření je v textu uveden jako obr. 14.



Obrázek 14: Extrahovaný chromatogram kontrolního měření blanku získaný pomocí LC-MS/MS potvrzující přítomnost ftalátů (analyty bez signálu nejsou zobrazeny)

Kolona: Kinetex Polar (délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μm , porozita 100 Å); **mobilní fáze:** ACN a 5mM octan amonný; **teplota:** 30 °C; **přítok mobilní fáze:** 0,4 ml/min; **nástřik vzorku** 5 μl ; **gradient:** 0 min – 30 % ACN 8 min – 100 % ACN, MS/ESI-, +, (MRM)

Třetí látkou, která byla z dalších analýz vyloučena, byla 4HB. Tato látka eluovala dříve než thiomocovina, tudíž se v daném systému vůbec nezadržovala (kapitola 3.1.2, tab. 13).

Nulová retence na koloně může být způsobena vysokou polaritou této látky, neboť není esterifikována jako ostatní parabeny.

3.1.1 Volba módu ionizace elektrosprejem

V rámci hledání a volby optimálního módu ionizace byly všechny standardy EDCs analyzovány nejprve v negativním a poté i v pozitivním módu ESI. Z chromatografických analýz vyplývá, že bisfenoly jsou ionizovány v negativním módu, zatímco ftaláty se ionizují pouze v pozitivním módu. V obou módech byly ionizovány parabeny a rovněž BPAF. U látek ionizovatelných v obou módech byly porovnány plochy píků a byl zvolen ten mód, ve kterém byla odezva vyšší.

Rozdíly v ionizačních vlastnostech jednotlivých látek jsou dány jejich molekulovou strukturou a zejména přítomností ionizovatelných funkčních skupin. I malé změny ve struktuře mohou výrazně ovlivnit chování molekuly při ionizaci. Příkladem jsou molekuly ze skupiny bisfenolů – BPA, BPE a BPF, které mají ve své struktuře dvě hydroxylová jádra, a tudíž podléhají deprotonaci. BPAF obsahuje trifluormethylové skupiny, které mohou usnadnit protonaci v pozitivním módu ESI. V důsledku přítomnosti atomů fluoru v molekule BPAF bylo v negativním ionizačním módu dosaženo až 100krát vyšší citlivosti ve srovnání se zbylými bisfenoly. Získané výsledky jsou shrnuty v tab. 12.

Tabulka 12: Vybrané ionty pro SIM režim při analýze endokrinních disruptorů pomocí hmotnostního spektrometru s jednoduchým kvadrupólem.

Sloučenina	Monoisotopická hmota	Vybraný ESI mód	m/z+1 nebo m/z-1
BPA	228,1150	-	227,1150
BPE	214,0994	-	213,0994
BPF	200,0837	-	199,0837
BPAF	336,0478	-	335,0478
DEF	222,0892	+	223,0892
DBF	278,1518	+	279,1518
DHF	334,2144	+	335,2144
BEHF	390,2770	+	391,2770
MP	152,0473	+	153,0473
EP	166,0630	+	167,0630
PP	180,0786	-	179,0786
BP	194,0943	+	195,0943
4HB	138,0317	-	137,0317

Získané výsledky byly na závěr porovnány s výsledky uvedenými v odborných publikacích. V publikaci autorů *Myridakis et al.* byly jimi vybrané parabeny, ftaláty a BPA ionizovány za použití ESI v negativním módu [85], což se shoduje pouze částečně s volbou módu v této diplomové práci. Odlišnost byla zaznamenána u ftalátů a PP, které ve srovnání s uvedenou studií vykazovaly v rámci této práce vyšší intenzitu signálu v pozitivním ESI módu. Ve studii autorů *Barciela-Alonso et al.* byl pro ionizaci vybraných ftalátů (DMP, DEP, DBP), které odpovídají ftalátům použitým i v této diplomové práci, zvolen pozitivní ESI mód [87]. Volba módu ionizace z této studie je v souladu s výběrem ESI módu použitého v této práci. Způsob ionizace molekul se odvíjí také od zvolených experimentálních parametrů – volby mobilní fáze, přítomnosti aditiv atd.

3.1.2 Volba kolony

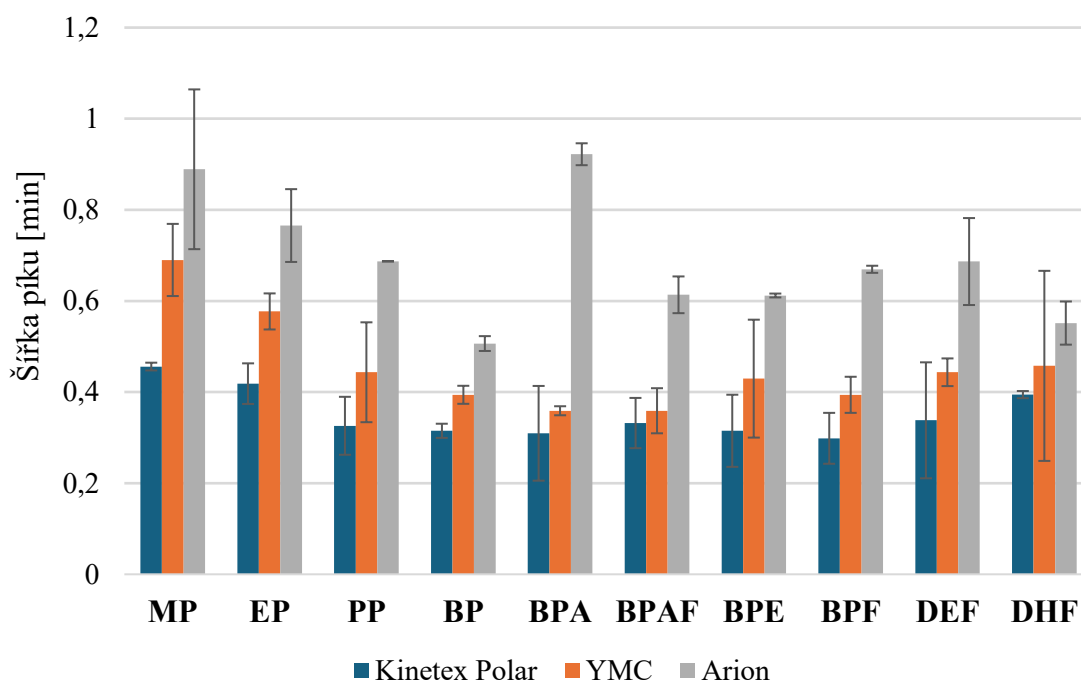
Pro účely optimalizace separace EDCs byly pomocí gradientové eluce otestovány tři druhy kolon pro RP systém. Volba kolony byla provedena na základě vyhodnocení tří parametrů – šířky píků, symetrie píků a počtu teoretických pater (N). Stacionární fáze kolony Kinetex Polar je tvořena povrchově porézními částicemi. Základní informace o tomto typu částic jsou shrnuty v kap. 1.3.2.2. Kolona Kinetex Polar umožňuje použití mobilní fáze, která je tvořena ze 100% vody, aniž by došlo k hydrofobnímu kolapsu stacionární fáze (oktadecylových řetězců). Kolony YMC-Triart C18 ExRS (dále jen „YMC“) a Arion Polar C18 UHPLC (dále jen „Arion“) jsou tvořeny plně porézními částicemi, které se vyznačují vyšší retencí analytů oproti koloně Kinetex Polar. Toto tvrzení dokládají naměřené retenční časy EDCs, které jsou uvedeny v Tabulka 13. Průběh použitých gradientů je specifikován v kapitole 2.6, tab. 9.

Z dat uvedených v tab. 13 je zřejmé, že DHF a BEHF jsou kolonami Arion a YMC zadržovány natolik, že při použitých gradientech nedojde k jejich eluci. Větší retence těchto analytů je v souladu s vyššími hodnotami log P. Zároveň 4HB má nižší anebo velmi blízký retenční čas mrtvému retenčnímu času kolony (Kinetex Polar, Arion, YMC), což znamená, že se prakticky nezadržuje. Z tohoto důvodu byla 4HB z dalších analýz vyřazena.

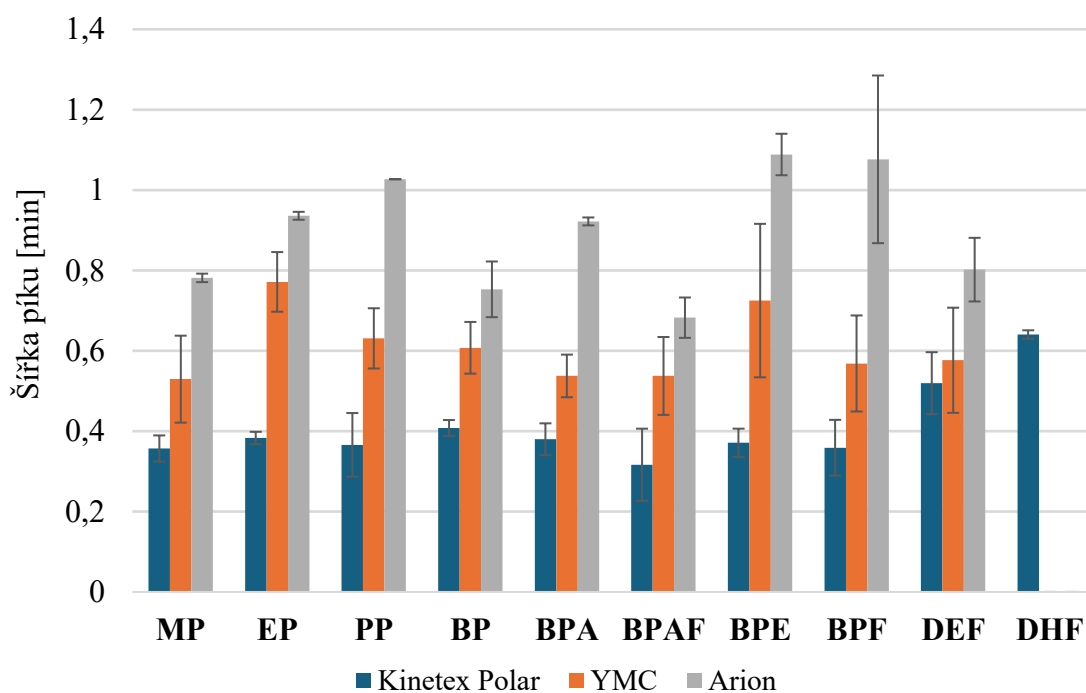
Tabulka 13: Retenční časy (min) všech testovaných endokrinních disruptorů na různých kolonách za odlišných gradientových podmínek (viz. tab. 9) a jejich vztah k hodnotám log P; retenční čas (min) thiomocoviny je uveden ve spodní části tabulky.

KRÁTKÝ GRADIENT				
Sloučenina	log P	Kinetex Polar	YMC	Arion
4HB	1,58 [83]	0,967	0,886	1,487
MP	1,96 [84]	2,776	3,479	6,018
EP	2,47 [86]	3,814	4,912	7,844
BPF	2,91[88]	4,006	4,848	7,928
BPE	3,90 [90]	4,498	5,391	8,539
PP	3,04 [91]	4,744	5,921	9,067
BPA	3,32 [92]	4,905	5,819	9,033
BP	3,57 [93]	5,518	6,733	10,024
DEF	2,47 [94]	5,643	6,975	10,219
BPAF	4,47 [95]	5,914	6,778	10,093
DBF	4,50 [96]	8,021	9,459	12,989
DHF	6,82 [97]	9,692	11,100	15,050
BEHF	7,60 [98]	10,747	12,720	-
DLOUHÝ GRADIENT				
Sloučenina	log P	Kinetex Polar	YMC	Arion
4HB	1,58 [83]	0,938	0,871	1,414
MP	1,96 [84]	1,930	2,290	3,841
EP	2,47 [86]	2,484	3,392	5,491
BPF	2,91[88]	2,476	3,046	5,357
BPE	3,90 [90]	2,986	3,970	6,740
PP	3,04 [91]	3,434	5,336	7,983
BPA	3,32 [92]	3,565	5,033	8,029
BP	3,57 [93]	4,689	7,499	10,416
DEF	2,47 [94]	4,923	8,082	10,746
BPAF	4,47 [95]	5,649	8,040	11,216
DBF	4,50 [96]	10,661	16,098	18,546
DHF	6,82 [97]	15,662	-	-
BEHF	7,60 [98]	19,208	-	-
thiomocovina	<i>-1,08 [99]</i>	<i>1,027</i>	<i>0,865</i>	<i>1,551</i>

Šířka píku byla jedním z hodnocených parametrů při volbě optimální kolony pro separaci vybraných EDCs. Graf 1 znázorňuje průměrné šířky píků získané ze dvou měření při použití krátkého gradientu pro všechny testované kolony (Kinetex Polar, YMC a Arion). Průměrné šířky píků naměřené za použití dlouhého gradientu jsou zobrazeny v grafu 2.



Graf 1: Porovnání šířek píků při krátkém gradientu pro všechny testované kolony



Graf 2: Porovnání šířek píků při dlouhém gradientu pro všechny testované kolony

Jednotlivé sloupce v grafech 1 a 2 představují aritmetické průměry šířek píků při jejich základnách. Šířka píku představuje jeden z klíčových parametrů hodnocení účinnosti separace. Z celkového porovnání testovaných kolon vyplývá, že nejužší píky poskytla

kolona Kinetex Polar. Tento výsledek svědčí o tom, že kolona Kinetex Polar poskytuje vyšší separační účinnost v porovnání s ostatními testovanými typy kolon. Naopak kolona Arion poskytovala nejširší píky, a tudíž je nejméně vhodná k separaci a následné kvantifikaci EDCs. Chybové úsečky zobrazují směrodatné odchylky šířek píků analytů pro daný typ kolony. Hodnota chybových úseček vypovídá o míře variability měření a reprodukovatelnosti separace pro danou kolonu a daný analyt.

Dalším posuzovaným parametrem při finálním výběru kolony byla symetrie píků analyzovaných EDCs. Symetrie píků byly automaticky vypočteny softwarem OpenLab CDS/Data Analysis následovně – pokud byly v datech detekovány dva inflexní body pro daný pík, byla symetrie tohoto píku vyhodnocena dle následujících vztahů (rovnice 3) [89]:

$$\begin{aligned}
 m_1 &= a_1 \left(t_2 + \frac{a_1}{1,5 H_f} \right) \\
 m_2 &= \frac{a_2^2}{0,5H_f + 1,5H} \\
 m_3 &= \frac{a_3^2}{0,5H_r + 1,5H} \\
 m_4 &= a_4 \left(t_3 + \frac{a_4}{1,5H_r} \right)
 \end{aligned} \tag{3}$$

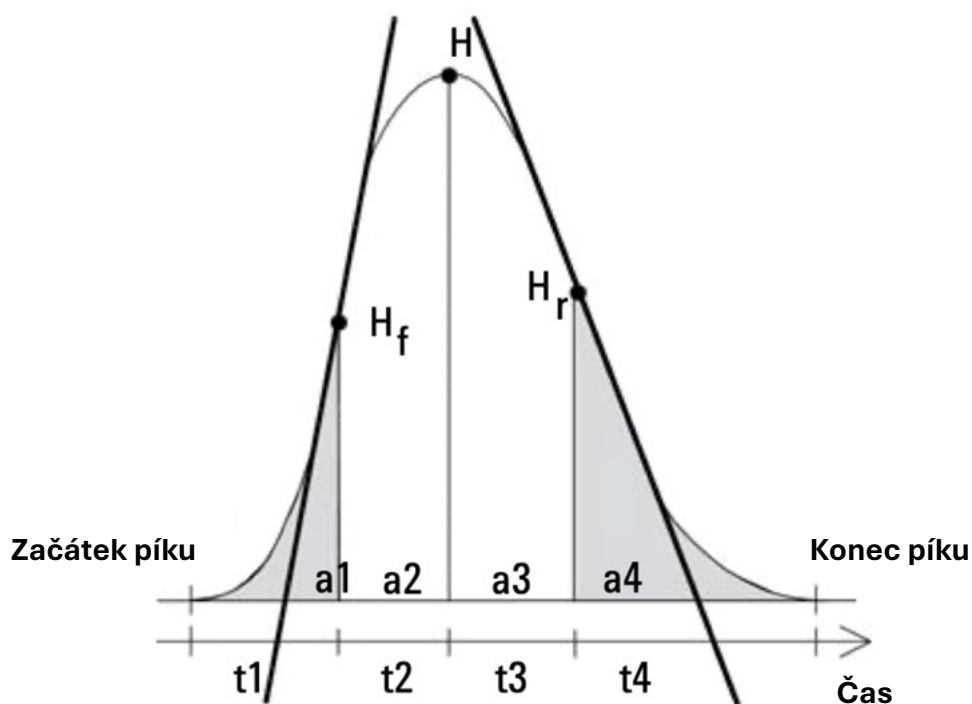
$$\text{Symetrie píku} = \sqrt{\frac{m_1 + m_2}{m_3 + m_4}}$$

a_i – plocha daného segmentu, t_i – časový interval segmentu, H_f – výška předního inflexního bodu, H_r – výška zadního inflexního bodu, H – výška píku

V případech, kdy nebyly nalezeny dva inflexní body byla symetrie píku vypočítána zjednodušeným způsobem na základě ploch jednotlivých segmentů (rovnice 4).

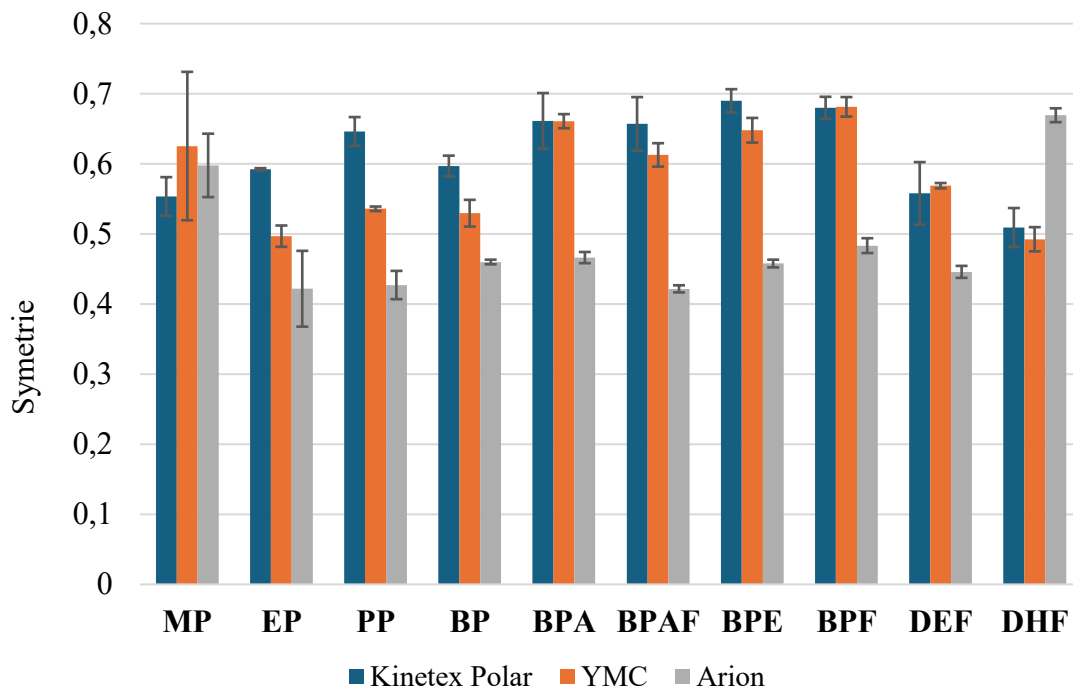
$$\text{Symetrie píku} = \frac{a_1 + a_2}{a_3 + a_4} \tag{4}$$

Parametry využití k výpočtu symetrie píku jsou vyznačeny na obr. 15 [89].

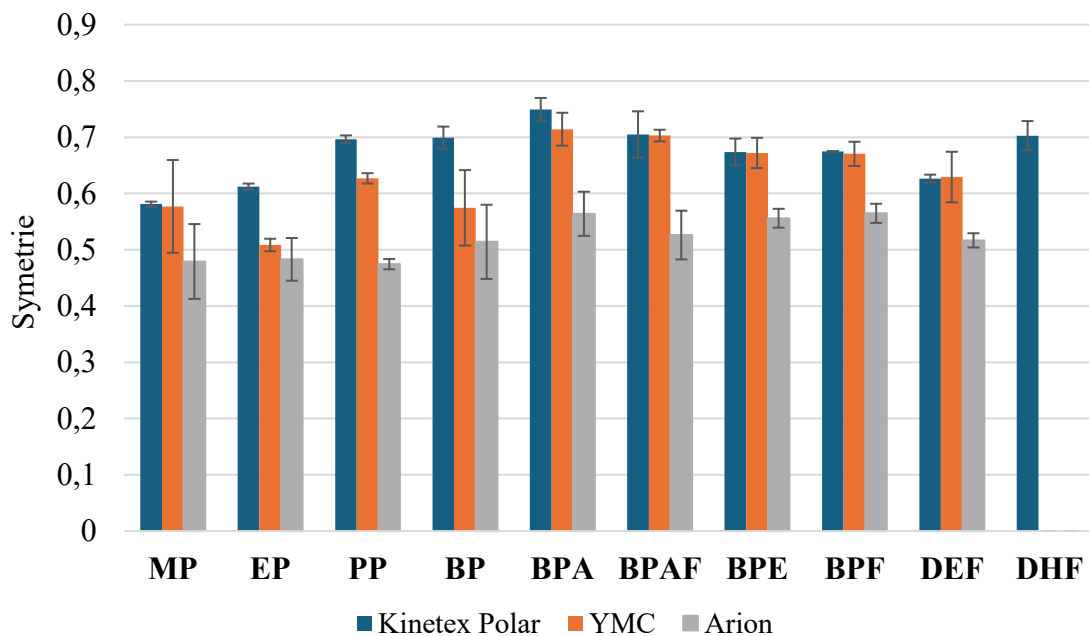


Obrázek 15: Schéma chromatografického píku se znázorněním inflexních bodů, vrcholu píku a vyznačených segmentů, využitých při výpočtu symetrie píku (a_i , t_i , H_f , H_r , H) [89]

Na přiložených grafech 3 a 4 je znázorněno porovnání symetrie píků pro jednotlivé EDCs na třech testovaných kolonách. Z výsledných grafů 3 a 4 vyplývá, že nejvyšší symetrie píků bylo dosaženo za použití kolony Kinetex Polar. Kolona YMC dosahovala podobných výsledků jako kolona Kinetex Polar, ale s ohledem na vyšší retenční schopnosti této kolony pro některé testované analyty, je její použití méně výhodné. Nejnižší hodnoty symetrie jednotlivých píků byly zjištěny při použití kolony Arion.



Graf 3: Porovnání symetrie píků při krátkém gradientu pro všechny testované kolony



Graf 4: Porovnání symetrie píků při dlouhém gradientu pro všechny testované kolony

Posledním hodnoceným parametrem při výběru optimální kolony pro danou separaci byl počet teoretických pater (N) pro jednotlivé analyty na všech třech testovaných kolonách. K výpočtu N byla využita rovnice 5 a výsledné hodnoty jsou shrnuty v tab. 14.

$$N = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \quad (5)$$

t_R – retenční čas látky, w – šířka daného piku při základně

Tabulka 14: Počet teoretických pater (N) pro jednotlivé analyty na testovaných kolonách v rámci dvou typů gradientů.

KRÁTKÝ GRADIENT			
Sloučenina	Kinetex Polar	YMC	Arion
MP	593	414	779
EP	1351	1168	1707
PP	3036	2460	2244
BP	3588	2891	3115
BPA	3587	3127	2787
BPAF	4766	4208	4219
BPE	4927	4689	6277
BPF	5531	3985	3649
DEF	5291	5870	4358
DHF	9663	12950	12047
DLOUHÝ GRADIENT			
Sloučenina	Kinetex Polar	YMC	Arion
MP	473	318	387
EP	674	314	551
BP	804	490	419
PP	1049	533	616
BPA	1513	1168	967
BPE	1432	1423	1213
BPF	2121	2479	3101
BPAF	1486	3398	2915
DEF	5763	3757	4357
DHF	9571	-	-

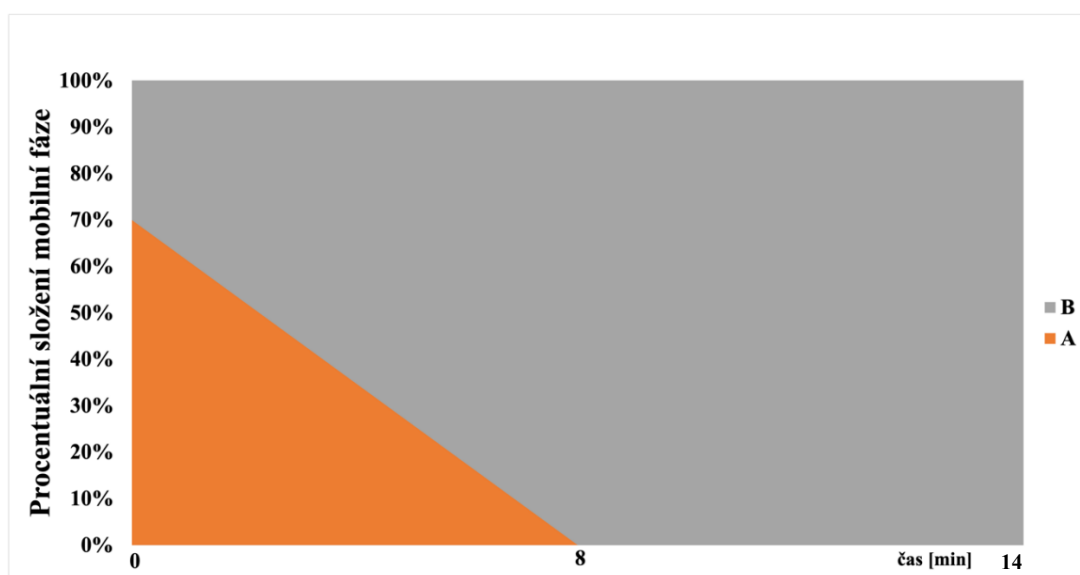
Vyšší hodnota N značí vyšší účinnost separace. Kolony YMC a Arion vykazovaly pro některé analyty srovnatelné anebo dokonce vyšší hodnoty N než kolona Kinetex Polar. Obě kolony jsou charakteristické vyšší retencí a při jejich použití by se významně prodloužila doba analýzy. Kolona Kinetex Polar vykazovala dostatečně vysoké hodnoty N již v rámci krátkého gradientu.

V souladu s výsledky všech hodnocených parametrů tzn. šířky píku, symetrie píku a N, lze konstatovat, že kolona Kinetex Polar je vhodnou kolonou pro separaci testovaných EDCs. S ohledem na požadavek rychlosti analýzy a dostatečné účinnosti vyvíjené metody byla kolona Kinetex Polar vyhodnocena jako neoptimálnější. Tato volba zároveň nejvíce podporuje ekologickou a ekonomickou udržitelnost metody.

3.1.3 Optimalizace gradientu a volba mobilní fáze

V rámci optimalizace gradientu bylo vyzkoušeno několik gradientových profilů, z nichž byly vybrány dva. Tyto gradientové profily byly následně otestovány na třech různých typech kolon, přičemž neoptimálnějších výsledků bylo dosaženo s kolonou Kinetex Polar. Při optimalizaci gradientu byl kladen důraz především na dostatečné rozlišení separovaných analytů. Dalším požadavkem bylo dosažení přiměřené doby trvání analýzy, která má přímý vliv na spotřebu rozpouštědel. Celková doba analýzy byla 14 minut.

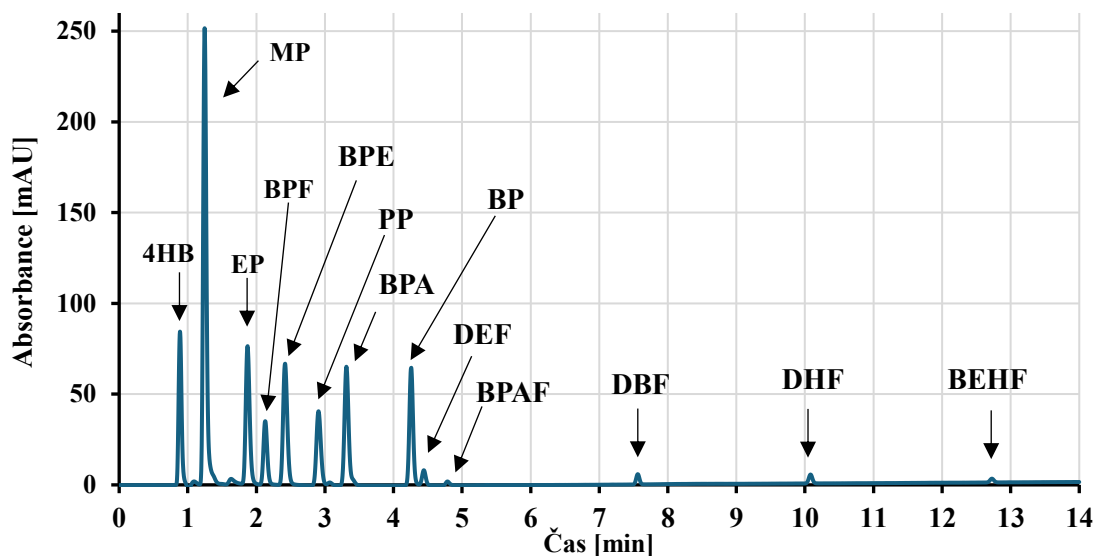
V souladu s výše stanovenými požadavky byl zvolen optimální gradient, jehož průběh je graficky znázorněn v Graf 5 a číselně v kapitole 2.6, v tab. 7. Tento gradient byl použit k optimalizaci dalších parametrů.



Graf 5: Graficky znázorněný průběh optimalizovaného gradientu v čase (mobilní fáze A – 5 mM octan amonný, mobilní fáze B – ACN)

Jako doplněk ke stanovení pomocí MS byl pro ilustraci uveden také chromatogram zaznamenaný pomocí detektoru diodového pole (DAD) (graf 6). Všechny analyzované EDCs obsahují aromatické jádro, tedy systém konjugovaných dvojných vazeb, a tudíž

vykazují absorpci v ultrafialové oblasti (UV). Nicméně detekce pomocí MS vykazuje mnohonásobně vyšší citlivost, zejména u ftalátů.



Graf 6: Výsledný chromatogram separace endokrinních disruptorů z detektoru diodového pole (DAD)

Kolona: Kinetex Polar (délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μm , porozita 100 Å); *mobilní fáze:* ACN a 5mM octan amonný; *teplota:* 30 °C; *průtok mobilní fáze:* 0,4 ml/min; *nástřik vzorku:* 5 μl ; *gradient:* 0 min – 30 % ACN, 8 min – 100 % ACN

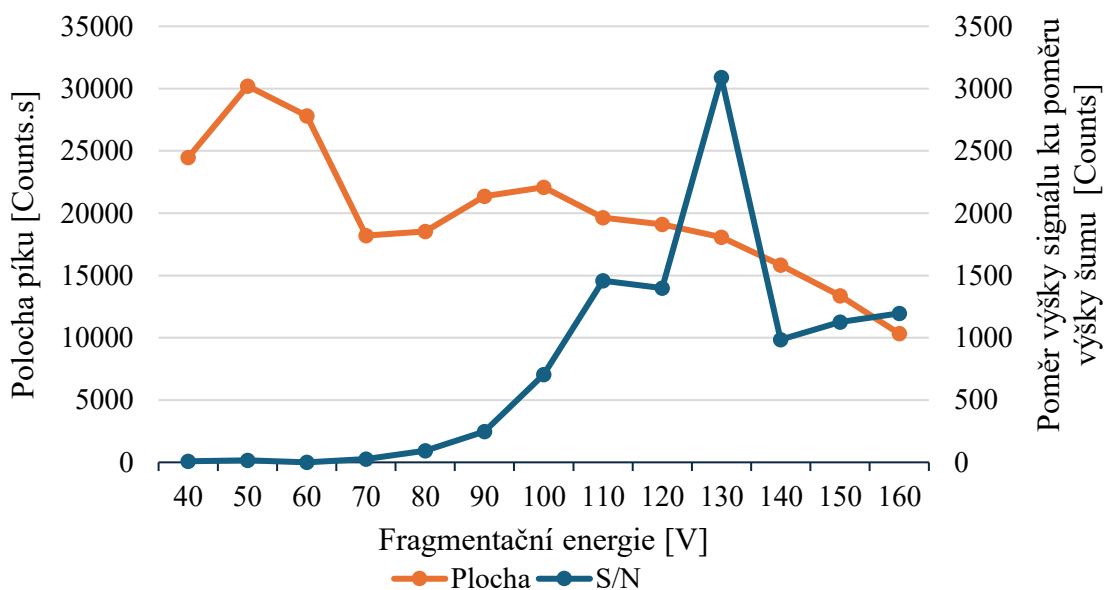
3.1.4 Optimalizace fragmentačních energií v režimu SIM

Hmotnostní spektrometr s jednoduchým kvadrupólem pracoval v režimu SIM. Optimalizace fragmentační energie v SIM režimu je prováděna především za účelem maximalizování intenzity daného molekulárního iontu a zároveň minimalizování šumu.

Optimalizace fragmentační energie vybraných EDCs byla provedena na základě dvou opakovaných měření. Fragmentační energie byly testovány v rozmezí 20-160 V. Jednotlivé píky byly ručně integrovány a následně byla z průměrných ploch píků odpovídajících jednotlivým analytům při různých energiích určena optimální hodnota fragmentační energie. Optimální fragmentační energie byla určena z maxim průměrných ploch píků při nejvyšší dosažené intenzitě signálu.

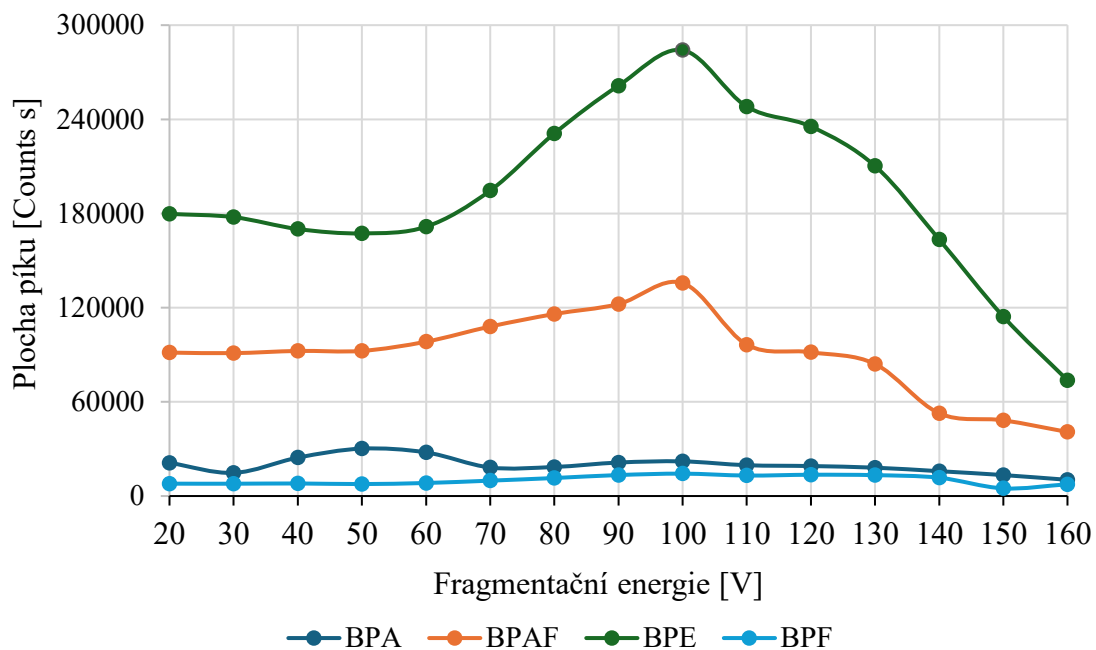
Parabeny bylo možné detekovat jak v pozitivním, tak v negativním módu, a proto byly porovnány plochy píků v obou módech, přičemž byl vybrán mód s větší plochou. Bisfenoly byly analyzovány v negativním ionizačním módu, zatímco ftaláty a parabeny (s výjimkou PP) v pozitivním módu. Z grafu 8 vyplývá, že bisfenoly dosahovaly nejvyšší

odezvy při fragmentačních energiích v rozmezí 50-100 V. U BPA byl při nejvyšší ploše píku, v rámci testovaného rozmezí fragmentačních energií, zaznamenán extrémní signál šumu. Tento stav mohl být způsoben generováním iontů o totožném m/z z pozadí mobilní fáze nebo interakcí analytu s octanem při dané hodnotě fragmentační energie. Tedy fragmentační energie BPA musela být optimalizována na základě poměru signálu k šumu (signal to noise; S/N) (graf 7).

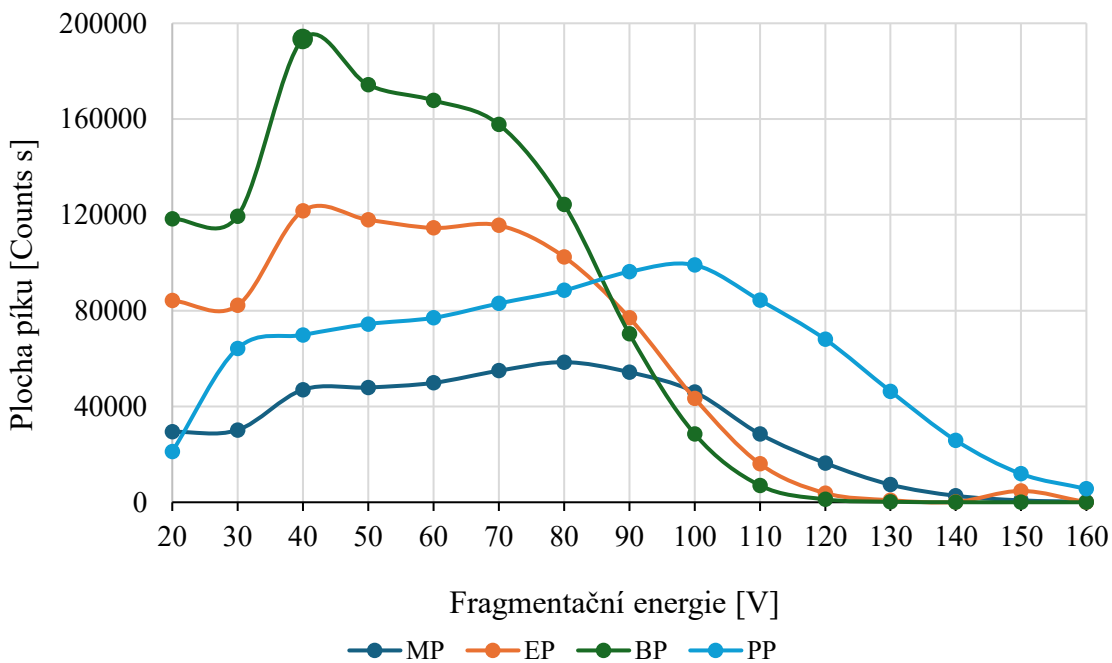


Graf 7: Porovnání optimalizace fragmentační energie pro BPA na základě ploch píků vs. poměru signálu k šumu (S/N)

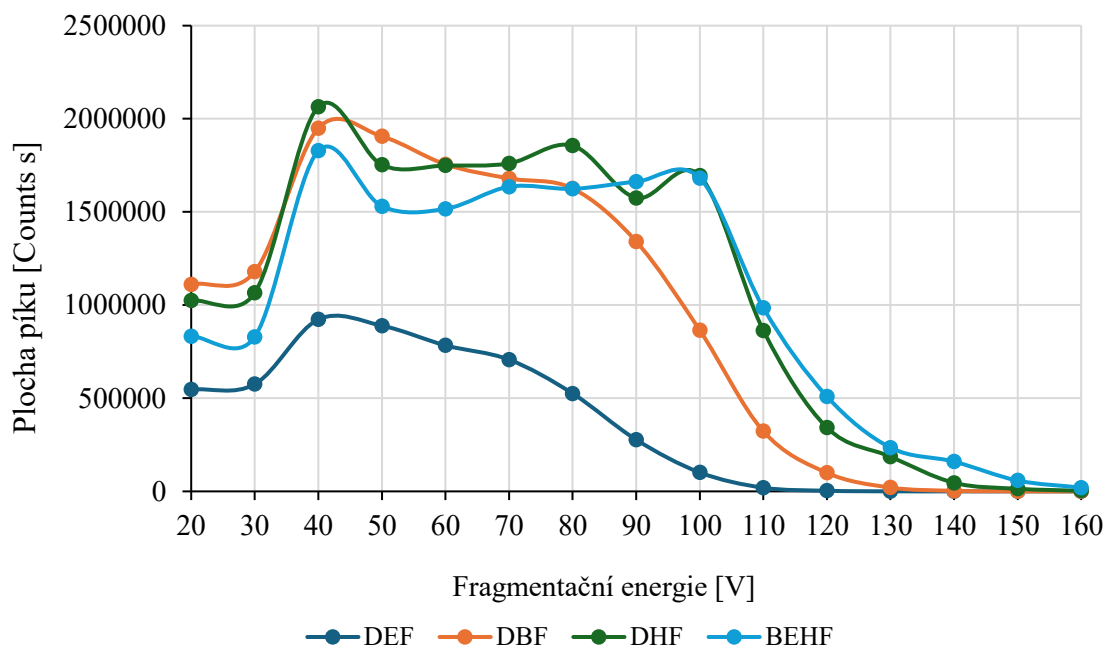
Parabeny vykazovaly nejlepší odezvu při energiích v rozpětí 40-100 V a ftaláty dosahovaly maxima při 40 V (grafy 9-10)



Graf 8: Optimalizace fragmentační energie pro vybrané bisfenoly na základě maximálních odezev ze dvou opakovaných měření



Graf 9: Optimalizace fragmentační energie pro vybrané parabeny na základě maximálních odezev ze dvou opakovaných měření



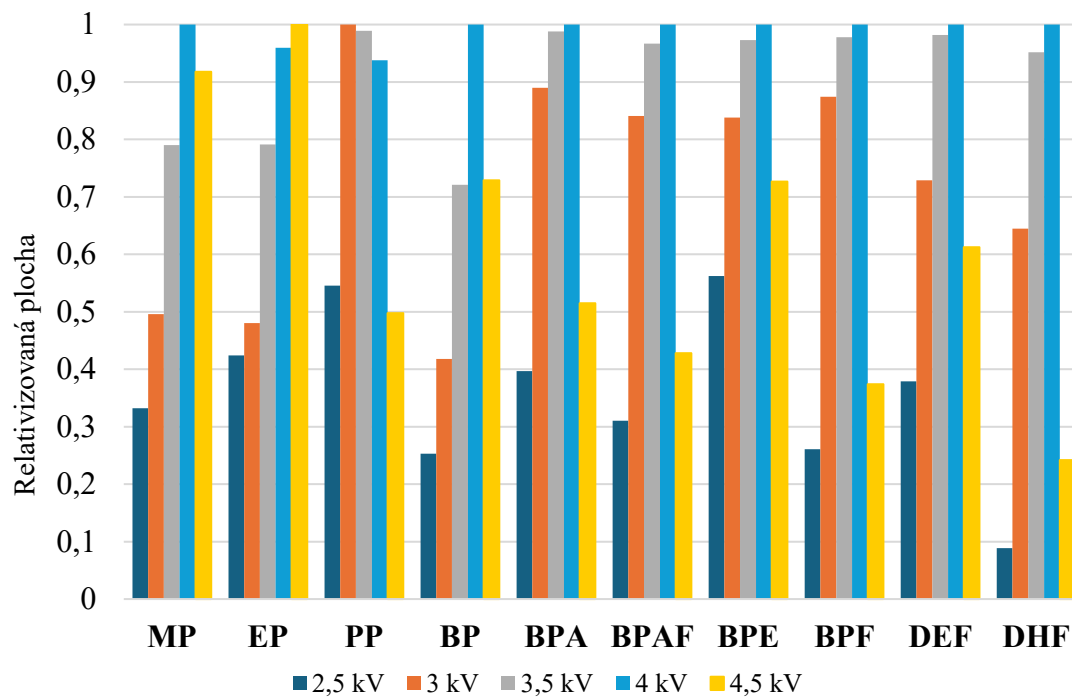
Graf 10: Optimalizace fragmentační energie pro vybrané ftaláty na základě maximálních odezev ze dvou opakovaných měření

Rozdíly v optimálních hodnotách fragmentačních energií lze přisuzovat rozdílům v chemické struktuře a molekulové hmotnosti jednotlivých EDCs. Jednotlivé EDCs mohou mít také rozdílné ionizační vlastnosti. Zjištěné optimální hodnoty fragmentačních energií byly zadány do metody, čímž se zvýšila její citlivost.

3.1.5 Optimalizace napětí na kapiláře

Jedním z dalších klíčových faktorů ovlivňující míru ionizaci je napětí na kapiláře. Napětí na kapiláře bylo testováno v rozmezí 2,5-4,5 kV. Měření probíhalo ve dvou opakováních a získané plochy píků při daném napětí byly zprůměrovány. Pro většinu testovaných EDCs byla optimální hodnota napětí na kapiláře při 4kV. Výjimku představuje EP, u kterého byla zjištěna optimální hodnota napětí až při 4,5 kV, PP při 3 kV a DBF při 3,5 kV.

Pro lepší přehlednost v datech byly hodnoty relativizovány (graf 11). Pro každý analyt byla relativizovaná hodnota získána jako poměr plochy píku k maximální ploše píku daného analytu. Snížení hodnoty napětí na kapiláře pod optimální hodnotu vedlo k omezené produkci aerosolu a následnému poklesu intenzity signálu.



Graf 11: Relativizované hodnoty napětí na kapiláře naměřené při optimalizaci tohoto parametru

3.2 Optimalizace LC-MS/MS

Druhá část experimentální práce probíhala pomocí techniky LC-MS/MS v režimu MRM. Cílem optimalizace bylo identifikovat nejvýraznější MRM přechod pro danou molekulu a optimalizovat parametry kolizní energie (CE) a fragmentační energie. Optimalizované parametry a nalezené nejintenzivnější MRM přechody jsou shrnuty v tab. 15. Na rozdíl od předchozí analýzy prováděné pomocí systému LC/MS, kde některé parabeny vykazovaly lepší odezvu v pozitivním ionizačním módu, při optimalizaci MRM přechodů na systému LC-MS/MS docházelo ke kompletní ionizaci všech sledovaných parabenů (MP, BP, EP i PP) výhradně v módu negativním.

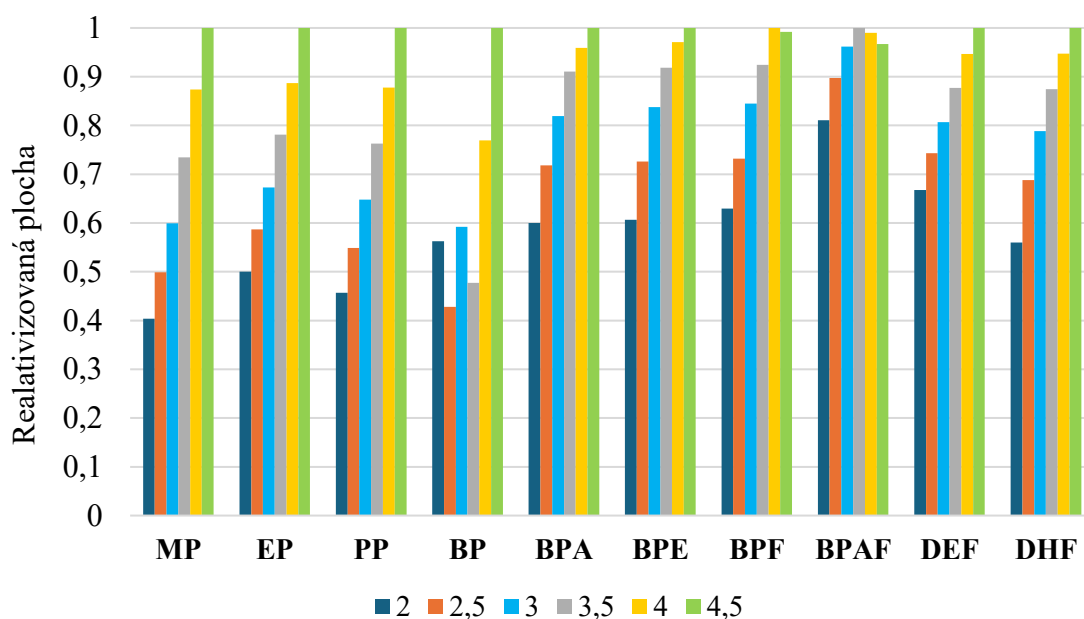
Tabulka 15: Souhrn optimalizovaných parametrů a nejintenzivnějších MRM přechodů, které byly stanoveny metodou "Compound-by-Compound" pomocí standardů jednotlivých látek o koncentraci 5 µg/ml; Frag=fragmentační energie.

Sloučenina	Monoizotopická hmota	Prekurzorový iont (m/z)	Nejintenzivnější produktový iont (m/z)	Frag [V]	CE [V]	ESI mód
BPA	228,1	227,1	212,1	140	20	-
BPAF	336,2	335,2	265,0	150	24	-
BPE	214,1	213,1	198,0	130	16	-
BPF	200,1	199,1	93,0	140	24	-
MP	152,0	151,0	91,9	100	24	-
EP	166,1	165,1	92,0	100	26	-
PP	180,1	179,1	91,9	120	26	-
BP	194,1	193,1	92,0	110	26	-
DEF	222,1	223,1	148,9	70	20	+
DBF	278,2	279,2	148,9	80	14	+
DHF	334,2	335,2	148,9	100	12	+
BEHF	390,3	391,3	148,9	100	24	+
4HB	138,0	137,0	94,9	140	10	+

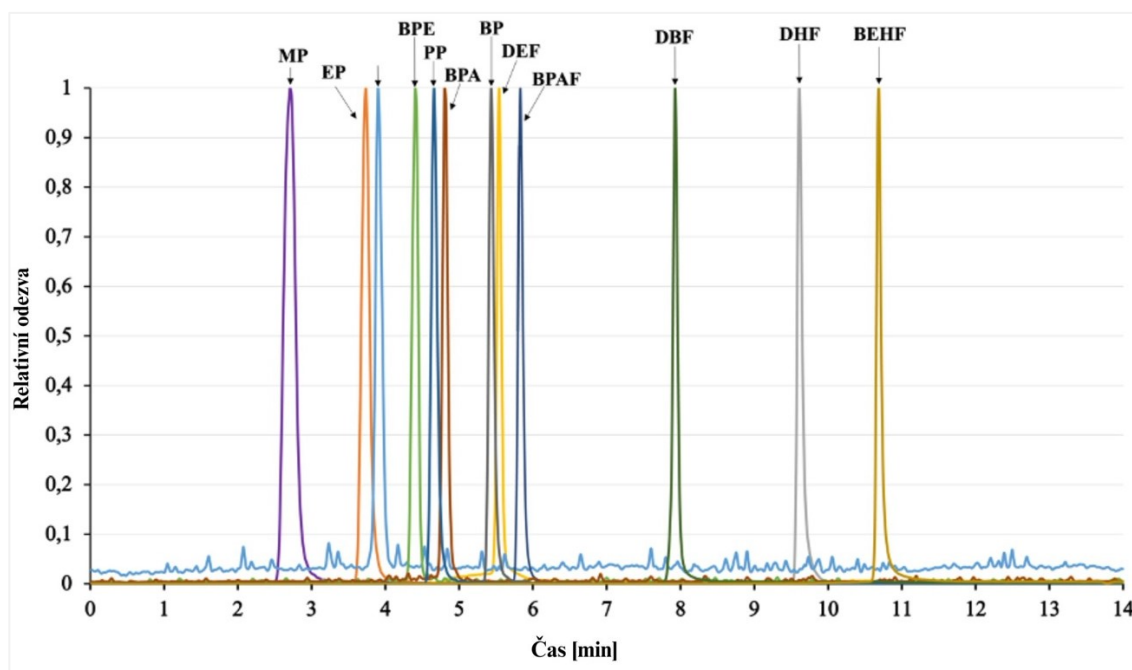
Eluční gradient, volba mobilních fází a kolony byly zachovány z první části experimentální práce. V rámci optimalizace metody pomocí instrumentace LC-MS/MS

byla otestována alternativa mobilní fáze A v podobě 5 mM mravenčanu amonného. Tato změna neposkytla zlepšení odezvy detektoru. Za účelem zvýšení podpory ionizace daných molekul bylo k původní mobilní fázi A, tedy 5 mM octanu amonnému, přidáno aditivum NH₄OH. Tímto přídavkem bylo zvýšeno pH na hodnotu 7,43. Nicméně ani tato úprava se neprojevila jako efektivní a nedošlo ke zlepšení.

Dalším optimalizovaným parametrem bylo napětí na kapiláře, které bylo testováno v rozsahu 2-4,5 kV. Na základě porovnání relativizovaných naměřených hodnot bylo napětí na kapiláře nastaveno na 4,5 kV (graf 12).



Graf 12: Relativizované hodnoty napětí na kapiláře naměřené při optimalizaci tohoto parametru. Výsledný chromatogram separace vybraných EDCs je zobrazen na grafu 13. Chromatogram byl vytvořen z relativizovaných dat, kdy byla intenzita signálu každého analytu podělena jeho vlastní maximální hodnotou.



Graf 13: Výsledný chromatogram separace endokrinních disruptorů z relativizovaných dat (4HB není zobrazena)

Kolona: Kinetex Polar (délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μm , porozita 100 \AA); *mobilní fáze:* ACN a 5 mM octan amonný; *teplota:* 30 $^{\circ}\text{C}$; *průtok mobilní fáze:* 0,4 ml/min; *násřik vzorku:* 5 μl ; *gradient:* 0 min – 30 % ACN, 8 min – 100 % ACN, MS/ESI-, +, (MRM)

3.3 Optimalizace extrakčních technik a příprava vzorků k analýze

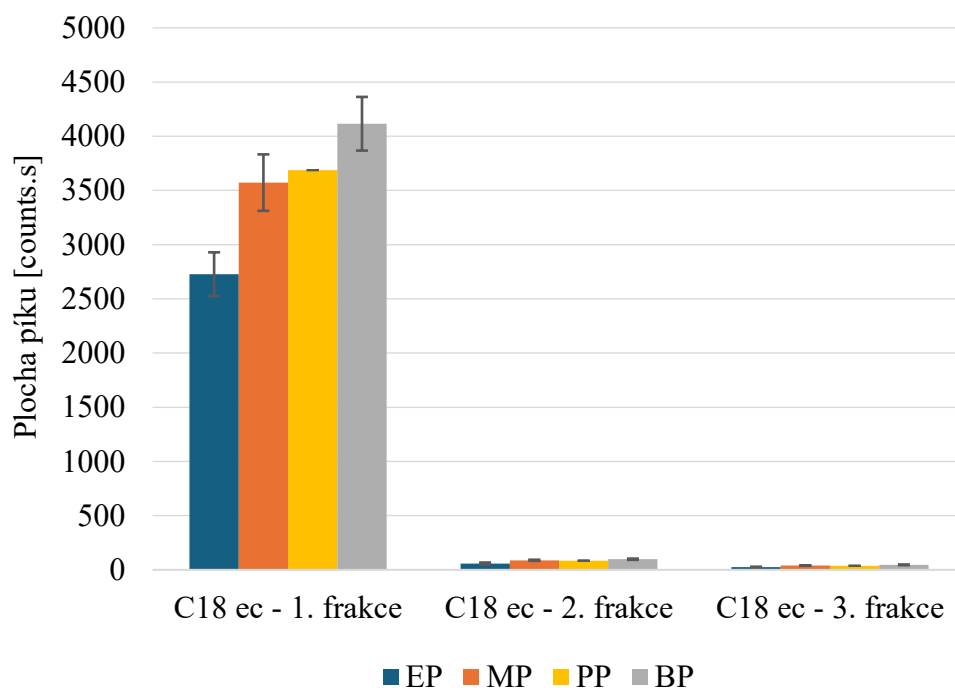
V rámci přípravy plazmatických vzorků byly otestovány dva typy extrakčních technik, konkrétně SPE a LLE. Při optimalizaci extrakční techniky SPE byl místo reálného vzorku použit směsný standard analytů o koncentraci 50 ppb rozpuštěný v acetonitrilu. Při použití techniky LLE byly od začátku zpracovávány reálné vzorky plazmy. Reálné plazmatické vzorky byly poté upraveny pomocí metod SPE a LLE. Každá metoda byla vyhodnocena na základě vypočtených hodnot ME a RE.

3.3.1 Extrakce tuhou fází (SPE)

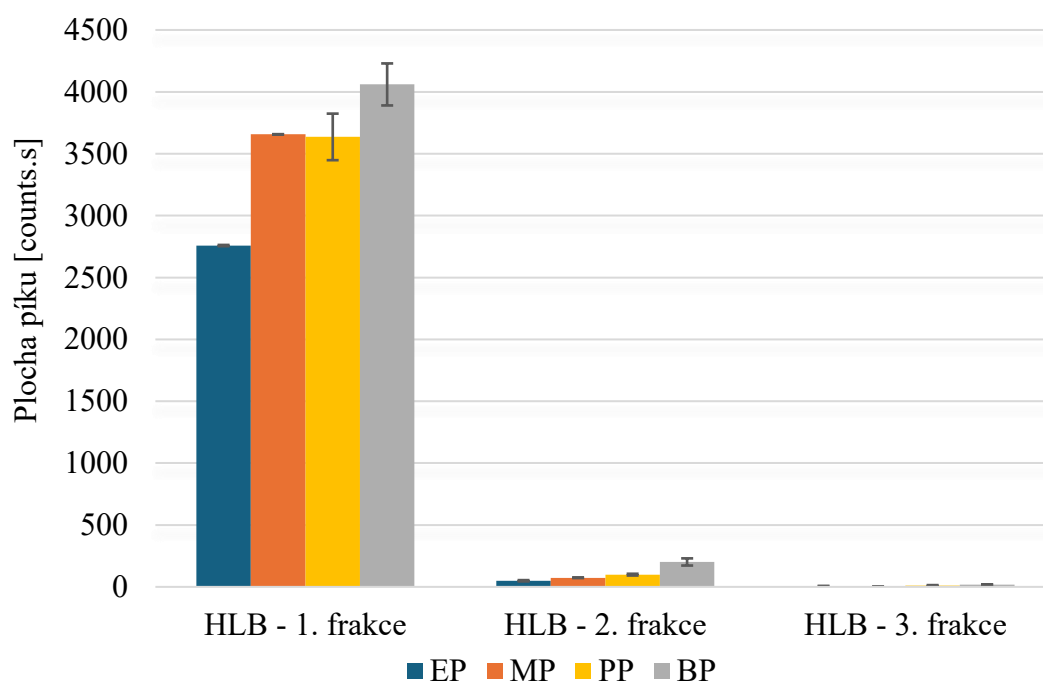
Pro optimalizaci techniky SPE byly srovnávány dva typy sorbentů: Chromabond C18 ec (Macherey-Nagel, Německo) a Chromabond HLB (Macherey-Nagel, Německo).

Jedním z kroků optimalizace bylo stanovení optimálního objemu rozpouštědla potřebného k efektivní eluci analytů z SPE kolonky. Hlavním cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda k efektivní eluci zachycených analytů postačí 1 ml ACN. Směsný roztok o koncentraci 50 ppb byl upraven pomocí SPE dle postupu uvedeného v tab. 6 (str. 47)

v souladu s doporučeními výrobce. Eluce zachycených analytů probíhala ve třech frakcích, přičemž každá frakce byla eluována 1 ml ACN. Každá frakce byla sbírána do čisté skleněné vialky a poté byla analyzována. V grafech 14 a 15 je znázorněna distribuce molekul testovaných parabenů (MP, EP, PP, a BP) ve třech samostatně eluovaných frakcích s použitím C18 ec a HLB sorbentu.

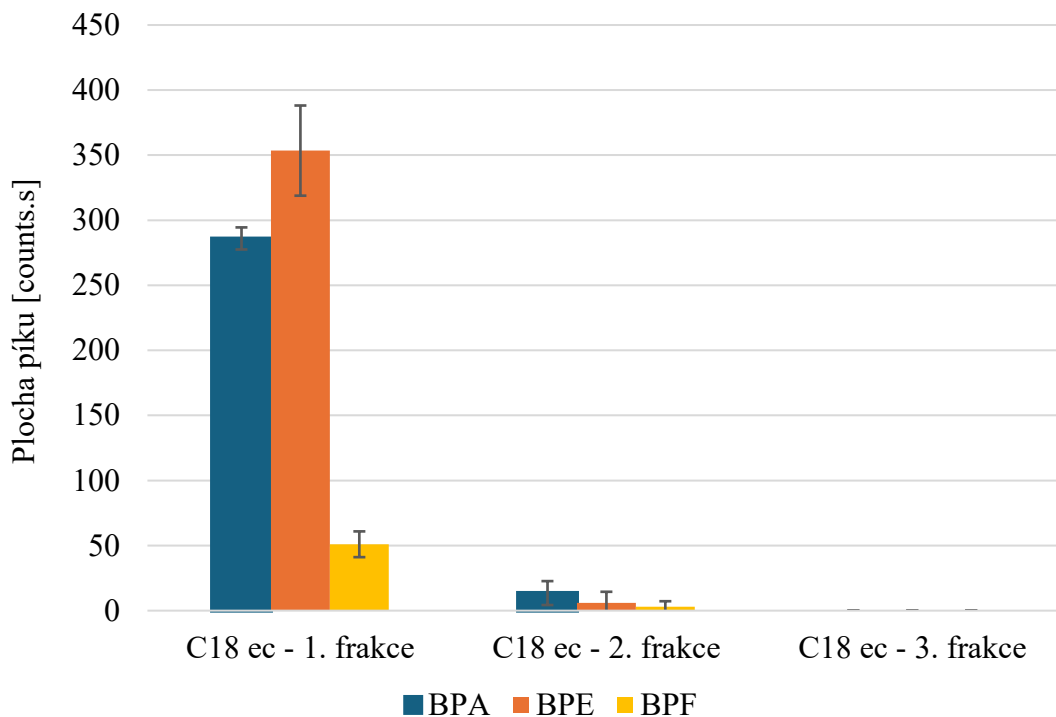


Graf 14: Distribuce testovaných parabenů v jednotlivých frakcích při eluci ze sorbentu typu C18 ec (SPE) pomocí ACN

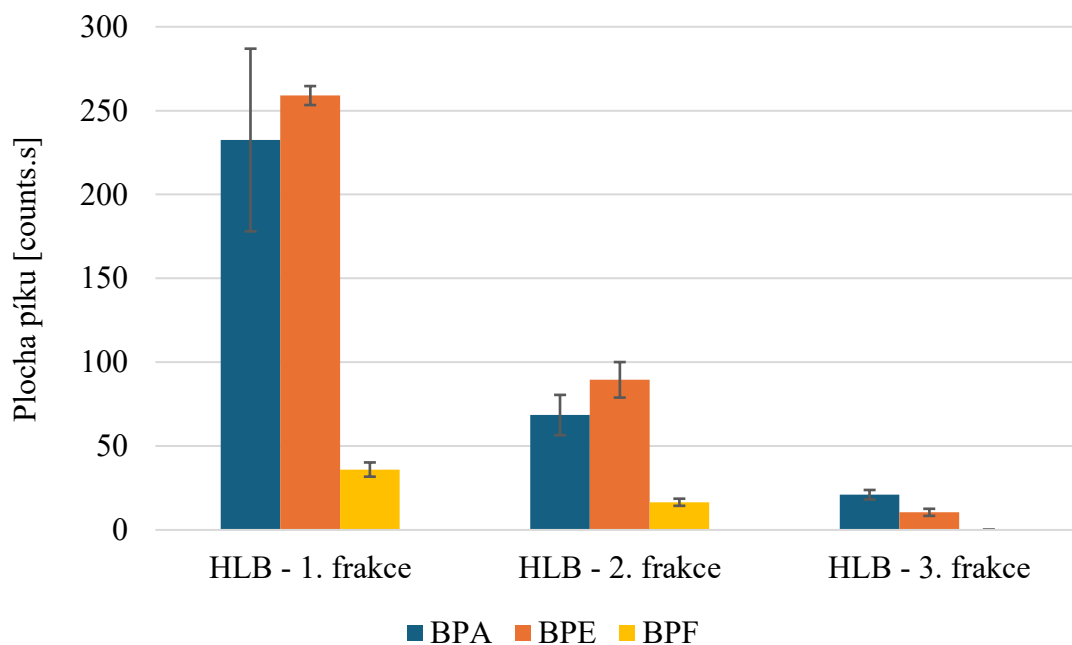


Graf 15: Distribuce testovaných parabenů v jednotlivých frakcích při eluci ze sorbentu HLB (SPE) pomocí ACN

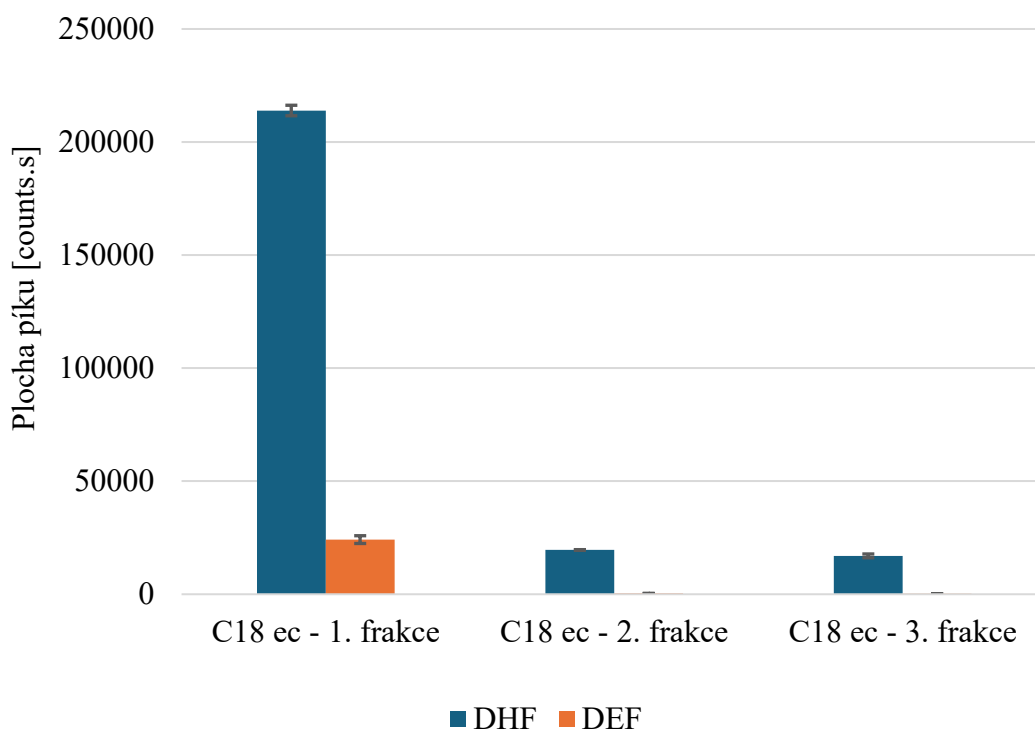
Z grafů 14 a 15 lze usoudit, že největší množství analytů se elovalo již v první frakci. Druhá a třetí frakce obsahovaly už pouze velmi malá až zanedbatelná množství analytů. Tímto způsobem bylo ověřeno, že k efektivní eluci testovaných analytů stačí použít 1 ml ACN. Použití většího množství rozpouštědla by v tomto případě bylo neekologické a způsobilo by nadměrné naředění extraktu bez výrazného zvýšení RE. Tento trend byl zaznamenán i u ostatních testovaných skupin EDCs (graf 16-19).



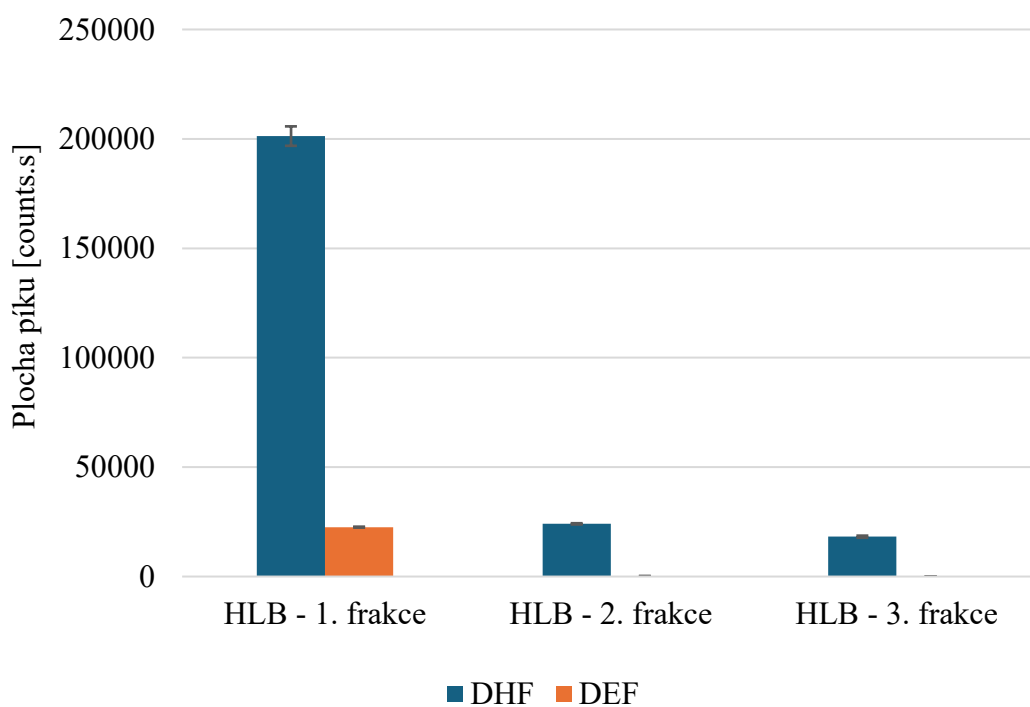
Graf 16: Distribuce testovaných bisfenolů v jednotlivých frakcích při eluci ze sorbentu C18 ec (SPE) pomocí ACN



Graf 17: Distribuce testovaných bisfenolů v jednotlivých frakcích při eluci ze sorbentu HLB (SPE) pomocí ACN



Graf 18: Distribuce testovaných ftalátů v jednotlivých frakcích eluovaných ze sorbentu C18 ec (SPE) pomocí ACN

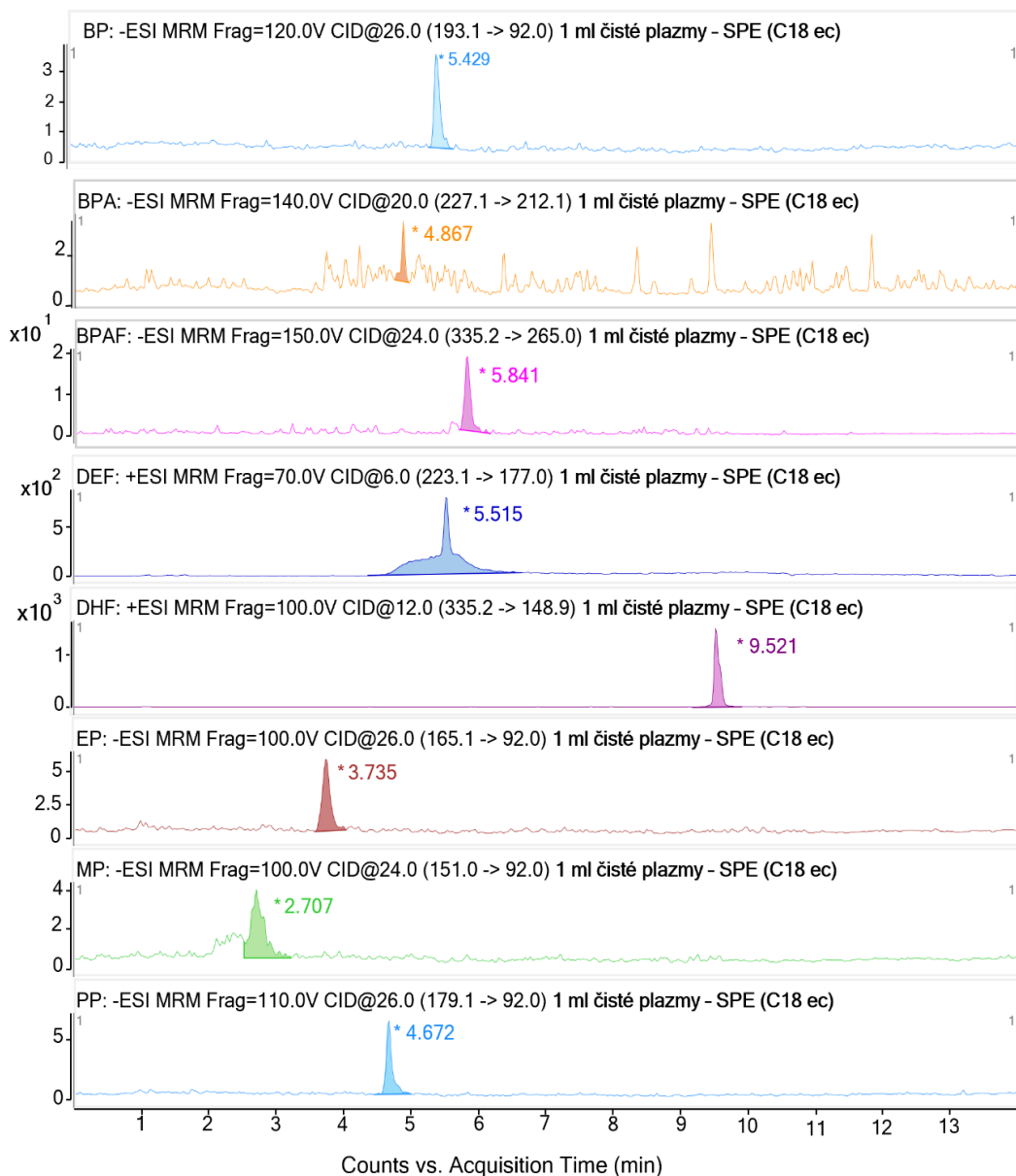


Graf 19: Distribuce testovaných ftalátů v jednotlivých frakcích eluovaných ze sorbentu HLB (SPE) pomocí ACN

V rámci testování obou typů pevných sorbentů byl proveden slepý pokus, přičemž byla namísto vzorku použita demineralizovaná voda. Demineralizovaná voda byla použita k přípravě pomocného roztoku (5 % MeOH), který sloužil k ekvilibraci a promytí kolonky. Při analýze slepého pokusu bylo zjištěna přítomnost parabenů a ftalátů. Výskyt ftalátů ve slepém pokusu byl způsoben uvolňováním těchto látek z plastových hadiček používané instrumentace. Přítomné parabeny pravděpodobně pochází přímo z demineralizované vody a byly v průběhu SPE zakoncentrovány. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k přečištění demineralizované vody metodou SPE se sorbentem Strata C18-E. Současně byly plastové písty SPE vakuové techniky nahrazeny kovovou jehlou. Toto opatření bylo provedeno na základě poznatků z odborné literatury, které upozorňují na možnou kontaminaci zapříčiněnou kontaktem s plastovými prvky, vyjma polypropylenu. Nový slepý pokus však prokázal, že přečištění demineralizované vody nemělo žádný vliv na odstranění kontaminantů.

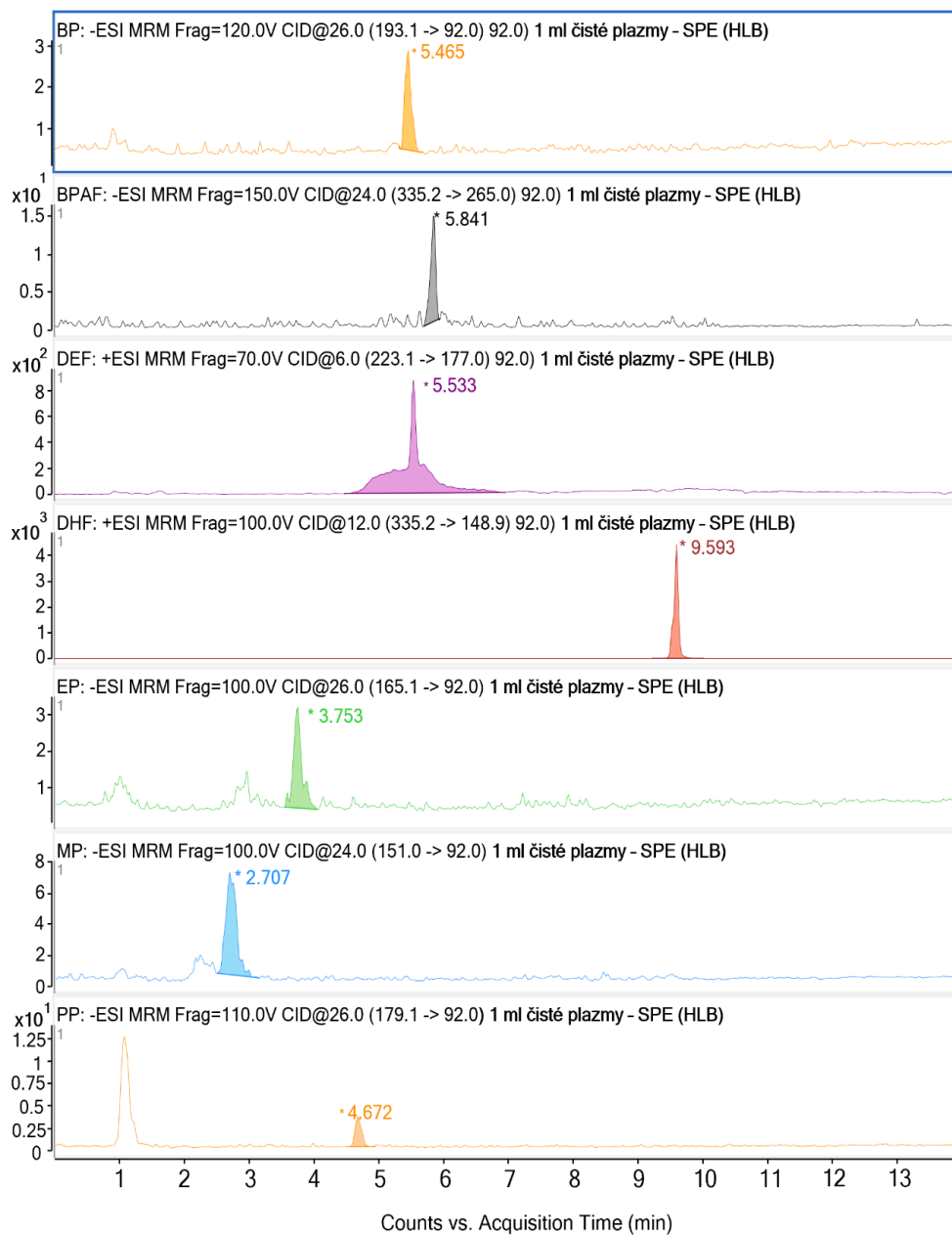
Reálné vzorky plazmy byly podrobeny úpravě prostřednictvím metody SPE. K této úpravě byly použity oba typy sorbentu. Z plazmatických vzorků nebyly odstraněny přítomné proteiny a po jejich nadávkování do kolonky se sorbentem byl znatelně zpomalen průtok přes daný sorbent. Ačkoli se doba celého procesu SPE prodloužila, proces byl dokončen a byly získány extrakty plazmy.

V chromatogramu vzorku čisté plazmy byly detekovány viditelné píky odpovídající analytům MP, EP, PP, BP, BPA, BPAF, DEF a DHF (obr. 16-17). Po srovnání se slepým vzorkem připraveným z demineralizované vody, který byl zpracován stejným SPE postupem, byly detekovány píky stejných analytů s velmi podobnými plochami. Ačkoli některé z detekovaných píků ve vzorku čisté plazmy vykazovaly odezvu nad LOQ, jedná se pravděpodobně pouze o kontaminaci pocházející z použitých chemikálií a laboratorního vybavení. Z tohoto důvodu nebyly tyto analyty kvantifikovány.



Obrázek 16: Extrahovaný chromatogram 1 ml vzorku čisté lidské plazmy upraveného technikou SPE (C18 ec), zobrazující detekované analyty (analyty bez signálu a kontaminanty BEHF a DBF nejsou zobrazeny)

Kolona: Kinetex Polar (délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μm , porozita 100 \AA); **mobilní fáze:** ACN a 5mM octan amonný; **teplota:** 30 $^{\circ}\text{C}$; **průtok mobilní fáze:** 0,4 ml/min; **nástřik vzorku:** 5 μl ; **gradient:** 0 min – 30 % ACN, 8 min – 100 % ACN, MS/ESI-, +, (MRM)



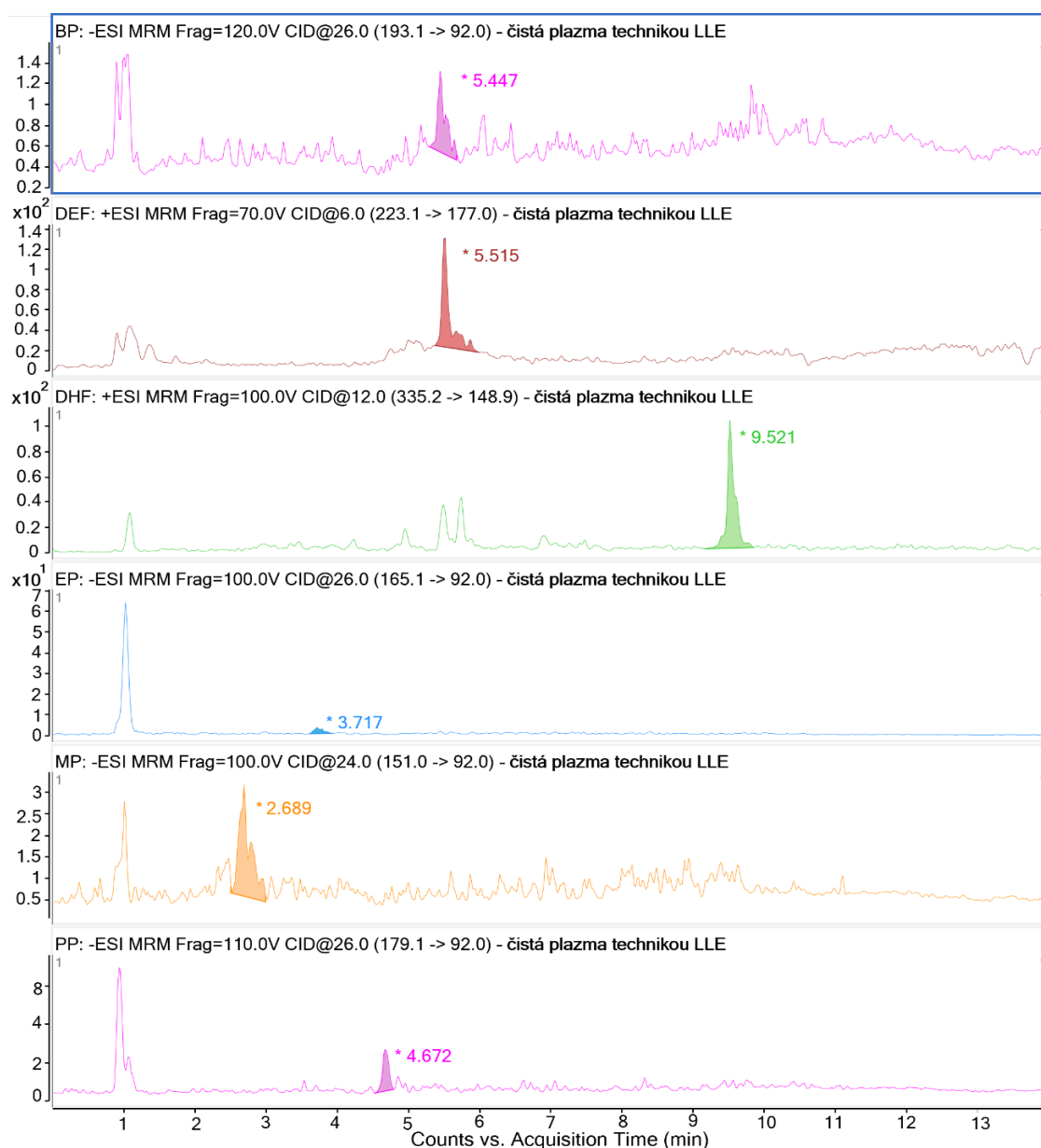
Obrázek 17: Extrahovaný chromatogram vzorku 1 ml čisté lidské plazmy upraveného technikou SPE (HLB), zobrazující detekované analyty (analyty bez signálu a kontaminanty BEHF a DBF nejsou zobrazeny)

Kolona: Kinetex Polar (délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μm , porozita 100 \AA); **mobilní fáze:** ACN a 5mM octan amonný; **teplota:** 30 $^{\circ}\text{C}$; **průtok mobilní fáze:** 0,4 ml/min; **násřik vzorku:** 5 μl ; **gradient:** 0 min – 30 % ACN, 8 min – 100 % ACN, MS/ESI-, +, (MRM)

3.3.2 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

První pokus přípravy plazmatických vzorků pomocí LLE byl realizován bez předchozího vysrážení proteinů obsažených v plazmě. Výsledkem vynechání srážecího kroku bylo, že došlo k nedostatečnému oddělení plazmatické a chloroformové fáze, a proto tyto vzorky nebyly analyzovatelné. Při druhém pokusu byly proteiny obsažené v plazmě

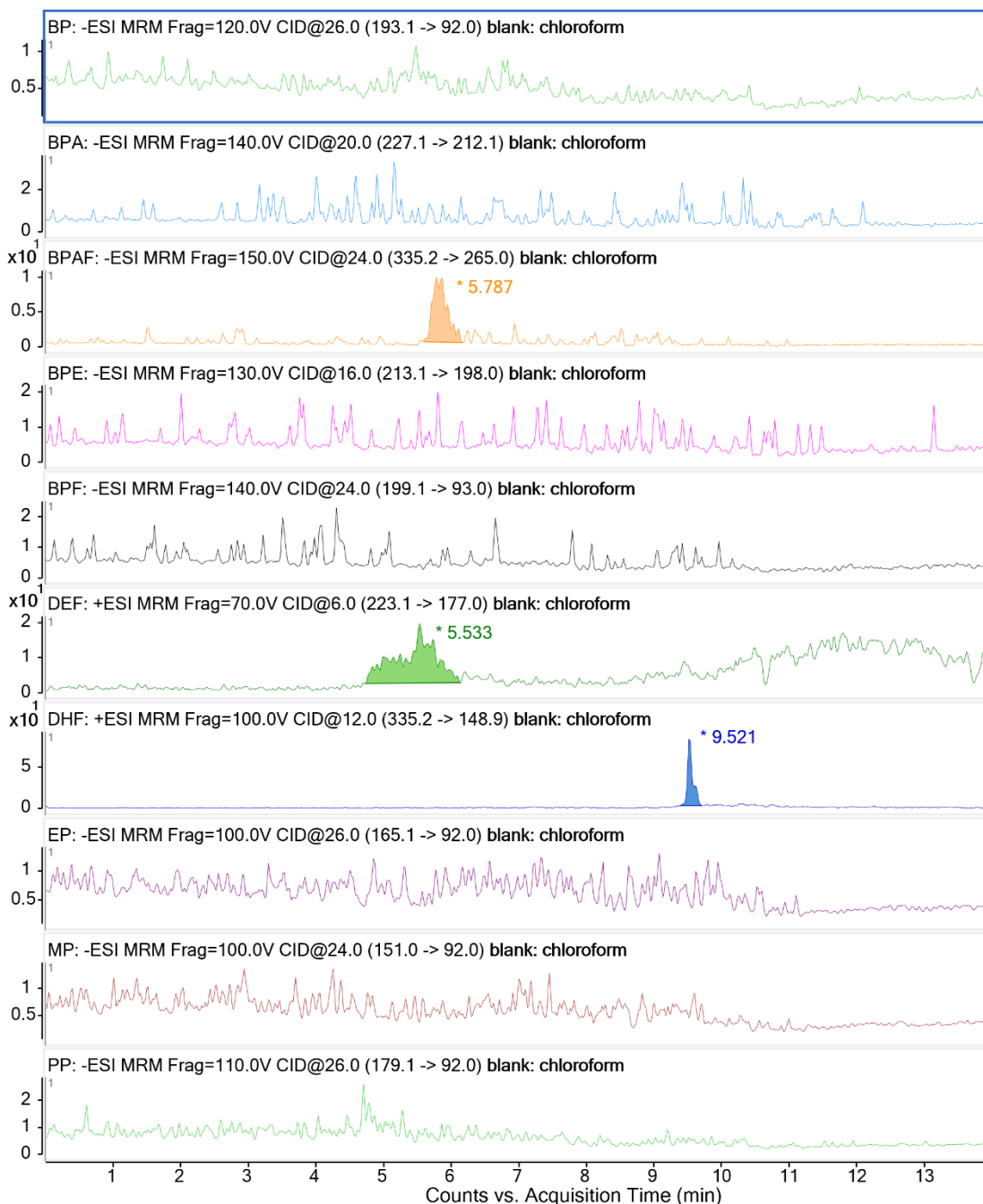
vysráženy použitím 10% kyseliny 5-sulfosalicylové a následně byly odstraněny centrifugací (10 000 otáček/min; 10 min). Až poté byla provedena LLE. Tento krok se ukázal jako klíčový, jelikož po vysrážení proteinů došlo k bezproblémovému oddělení obou fází. Na obr. 18 je zobrazen vyextrahovaný chromatogram z měření čisté plazmy upravené technikou LLE.



Obrázek 18: Extrahovaný chromatogram čisté lidské plazmy upravené technikou LLE, zobrazující detekované analyty (analyty bez signálu a kontaminanty BEHF a DBF nejsou zobrazeny)

Kolona: Kinetex Polar (délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μm , porozita 100 \AA); **mobilní fáze:** ACN a 5 mM octan amonný; **teplota:** 30 $^{\circ}\text{C}$; **průtok mobilní fáze:** 0,4 ml/min; **nástřik vzorku:** 5 μl ; **gradient:** 0 min – 30 % ACN, 8 min – 100 % ACN, MS/ESI -, +, (MRM)

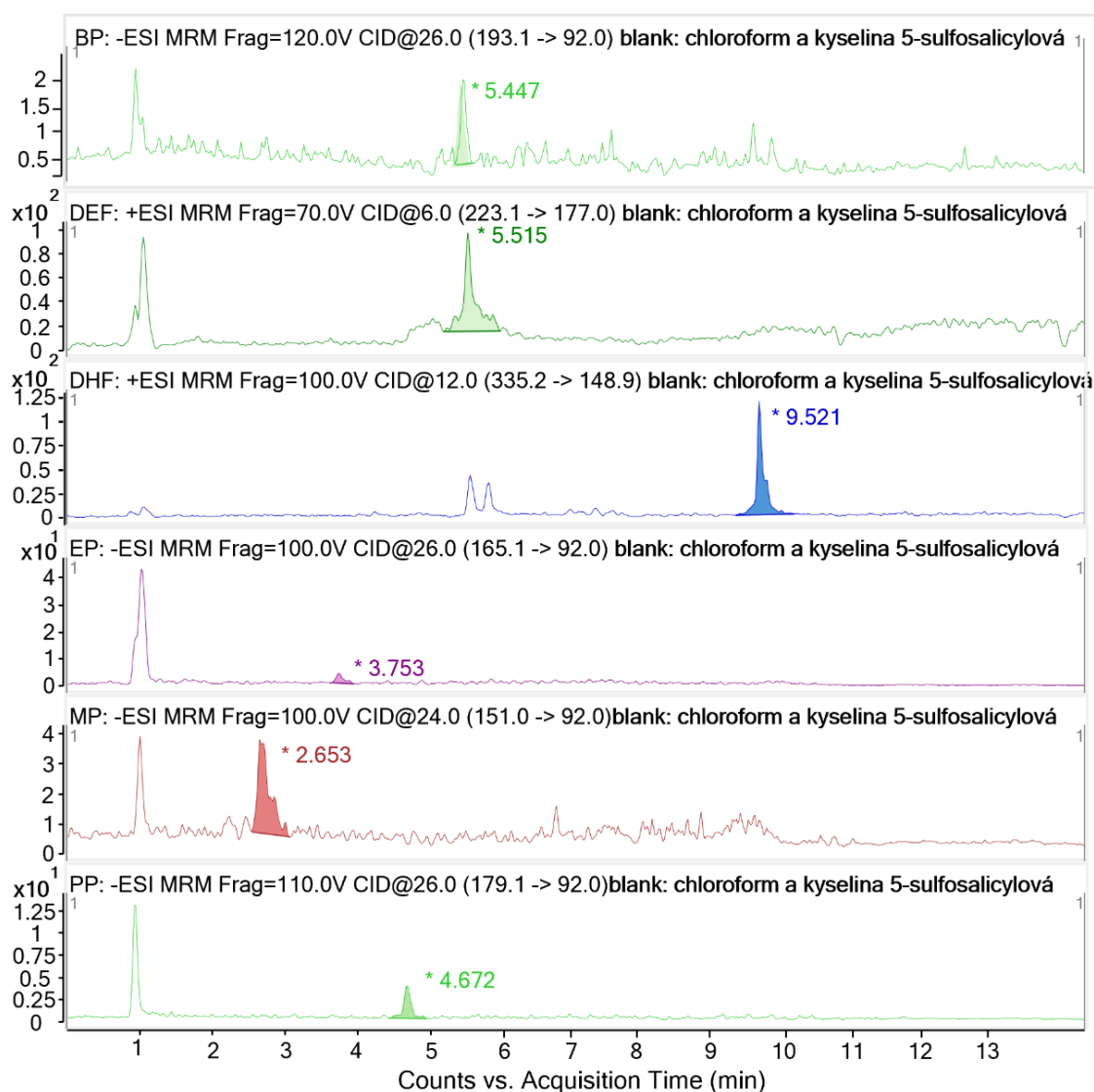
Za účelem vyloučení možné kontaminace byl čistý chloroform analyzován pomocí LC-MS/MS (obr. 19), přičemž je zřejmé, že i v čistém chloroformu bylo možné detekovat zástupce ftalátů a BPAF.



Obrázek 19: Extrahovaný chromatogram vzorku čistého chloroformu zobrazující detekované analyty (analyty 4HB, BEHF a DBF nejsou zobrazeny)

Kolona: Kinetex Polar (délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μm , porozita 100 \AA); **mobilní fáze:** ACN a 5mM octan amonný; **teplota:** 30 $^{\circ}\text{C}$; **průtok mobilní fáze:** 0,4 ml/min; **nástřik vzorku:** 5 μl ; **gradient:** 0 min – 30 % ACN, 8 min – 100 % ACN, MS/ESI -, +, (MRM).

Pro lepší výpovědní hodnotu byl připraven nový blank z čistého chloroformu a 50 μ l 5% kyseliny 5-sulfosalicylové. Je zřejmé, že i takto malé množství vodného roztoku způsobilo, že ve výsledném spektru lze zaznamenat viditelné píky parabenů. Tento jev potvrzuje, že analyty detekované ve vzorku lidské plazmy po úpravě technikou LLE s vysokou pravděpodobností nepocházejí z biologického vzorku, ale jsou přítomny ve vodném roztoku kyseliny jako kontaminanty.



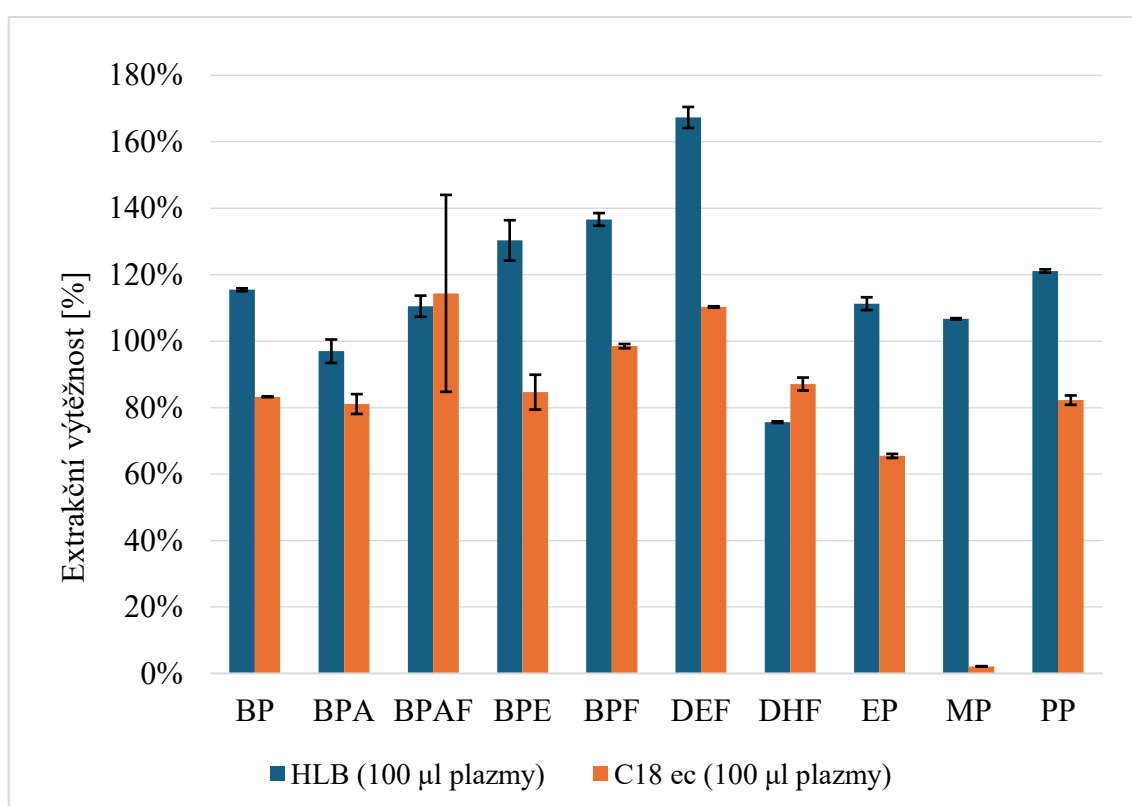
Obrázek 20: Extrahovaný chromatogram blanku čistého chloroformu s přidavkem kyseliny 5-sulfosalicylové zobrazující detekované analyty (analyty bez signálu a kontaminanty BEHF a DBF nejsou zobrazeny)

Kolona: Kinetex Polar (délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μ m, porozita 100 \AA); **mobilní fáze:** acetonitril a 5mM octan amonný; **teplota:** 30 $^{\circ}\text{C}$; **průtok mobilní fáze:** 0,4 ml/min; **nástřik vzorku:** 5 μ l; **gradient:** 0 min – 30 % ACN, 8 min – 100 % ACN, MS/ESI -, +, (MRM).

3.3.3 Vyhodnocení SPE a LLE postupů z hlediska matricových efektů a extrakční výtěžnosti

V rámci přípravy vzorku lidské plazmy byla otestována technika SPE. Použitý postup přípravy vzorku lidské plazmy technikou SPE je v kapitole 2.5 v tab. 6 (str. 47). Rovnice výpočtu hodnot RE (rovnice 1) a ME (rovnice 2) jsou uvedeny v kapitole 2.5.

V příloženém grafu 20 jsou zobrazeny hodnoty RE vybraných EDCs ve vzorcích lidské plazmy za použití sorbetů C18 ec a HLB. Jednotlivé sloupce v grafu představují aritmetický průměr, který byl vypočítán ze dvou opakovaných měření a směrodatné odchylky znázorňují chybu měření.

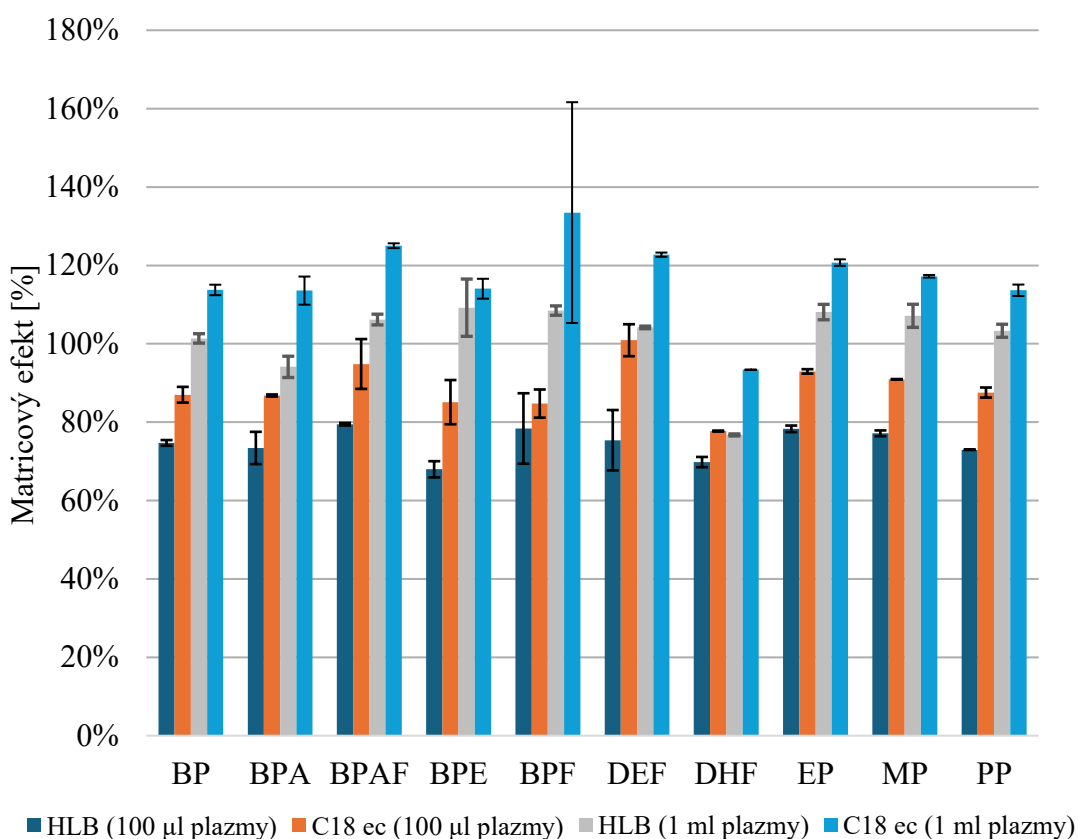


Graf 20: Srovnání extrakčních výtěžností (RE) pro vybrané EDCs po SPE extrakci pomocí sorbetů HLB a C18 ec ze 100 µl lidské plazmy.

Z grafu 20 vyplývá, že v převážné většině případů byly získány vyšší hodnoty RE s použitím sorbentu HLB. Pro oba typy sorbetů byla zaznamenána dobrá variabilita měření pro všechny vybrané EDCs s výjimkou BPAF. BPAF vykazoval lehce vyšší hodnotu RE při použití sorbentu C18 ec, ale zároveň i výrazně vyšší hodnotu směrodatné odchylky. Ve struktuře BPAF se nacházejí fluorované skupiny, které zvyšují její lipofilitu, a tedy snižují polaritu tohoto analytu. V porovnání s ostatními testovanými bisfenoly je BPAF méně polární, a tedy i více lipofilní, a právě tyto vlastnosti by mohly objasnit jeho

vyšší afinitu k sorbentu C18 ec. Vyšší míra afinity k sorbentu C18 ec může zpomalit eluci a tím zvýšit variabilitu výsledků, což by mohlo vysvětlovat vyšší hodnotu směrodatné odchylky. Naopak MP je více polární a na C18 ec se téměř nezadržuje. Mezi hlavní výhody HLB sorbentu patří jeho schopnost efektivně zadržovat i polární analyty díky své hydrofilně-lipofilní struktuře.

V grafu 21 je zaznamenáno srovnání průměrných hodnot ME pro vybrané EDCs po SPE extrakci se sorbenty HLB a C18 ec, které byly vypočítány pro dva objemy vzorku lidské plazmy – 1 ml a 100 μ l. Hodnoty představují aritmetický průměr ze dvou opakovaných měření pro každou kombinaci sorbentu a objemu plazmy. Pokud je hodnota ME blízká 100 % znamená to, že složky matrice ovlivňují signál pouze minimálně. Hodnoty ME > 100 % poukazují na iontové zesílení, kdy matrice signál zvyšuje. V případě ME < 100 % dochází naopak k iontovému potlačení, kdy matrice signál snižuje.



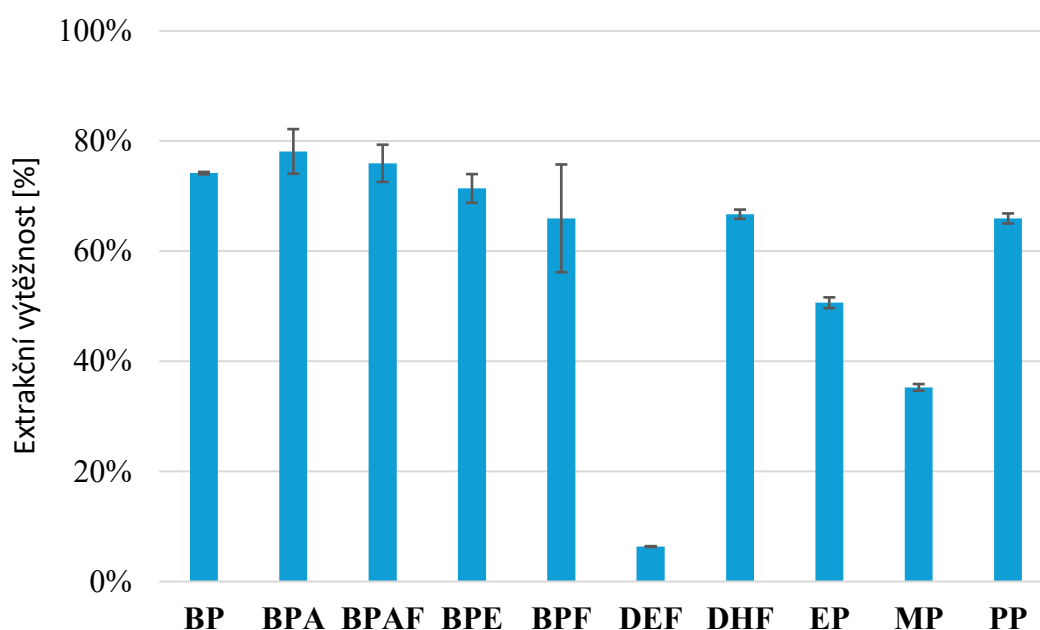
Graf 21: Srovnání vlivu sorbentu (HLB vs. C18 ec) a objemu lidské plazmy (100 μ l vs. 1 ml) na velikost matricového efektu.

Z přiloženého grafu 21 vyplývá, že použití vyššího objemu plazmy obecně vedlo k vyšším hodnotám ME u obou testovaných sorbentů (s výjimkou DHF). Ve všech

případech vykazoval sorbent C18 ec vyšší hodnoty matricového efektu než sorbent HLB při stejném objemu zpracované plazmy. Nejnižších hodnot ME bylo dosaženo při aplikaci 100 µl vzorku lidské plazmy a sorbentu HLB, což poukazuje na výraznější iontové potlačení. Při použití sorbentu C18 ec pro úpravu 1 ml vzorku lidské plazmy byly zaznamenány nejvyšší hodnoty ME pro všechny EDCs. V případě BPAF, BPF, DEF a EP přesáhly hodnoty ME 120 %.

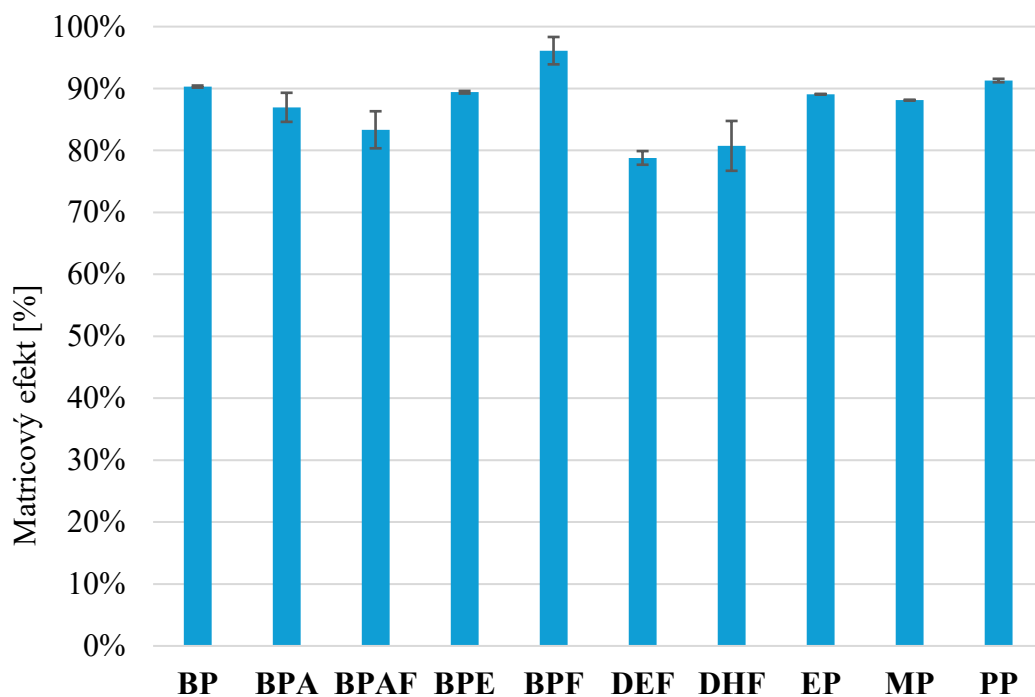
Na základě získaných dat lze předpokládat, že kombinace 1 ml vzorku lidské plazmy a HLB sorbentu se jeví jako optimální. Tato kombinace poskytla hodnoty ME velmi blízké 100 % a lze tedy předpokládat, že matrice významně neovlivňuje signál.

Další vzorek čisté lidské plazmy byl upraven technikou LLE s použitím chloroformu. Z grafu 22 vyplývá, že RE u většiny sloučenin se pohybovaly v rozmezí 60–80 %. Výrazně nejnižší RE byla zaznamenána u DEF. Nízká účinnost extrakce byla rovněž pozorována u MP. Pravděpodobným důvodem je méně efektivní přechod obou látek do chloroformové fáze v důsledku jejich vyšší polarity, což odpovídá i jejich hodnotám log P. Získaná data naznačují, že LLE s chloroformem není pro obě zmíněné látky vhodnou extrakční technikou. Nižší hodnoty RE mohou být částečně způsobeny postupem přípravy vzorku. Z plazmatických vzorků byly vysráženy proteiny, čímž došlo k naředění biologické matrice.



Graf 22: Srovnání extrakčních výtěžností (RE) pro vybrané endokrinní disruptory technikou LLE z 250 µl lidské plazmy.

ME se u většiny sloučenin pohybovaly v rozmezí 80–100 %, což naznačuje minimální ovlivnění signálu vlivem matrice (graf 23). U testovaných ftalátů byly zaznamenány nejnižší hodnoty ME, což může být způsobeno jejich polaritou a interakcemi s biologickou maticí.



Graf 23: Srovnání matricových efektů (ME) pro vybrané endokrinní disruptory technikou LLE z 250 µl lidské plazmy.

3.4 Limity detekce, limity kvantifikace a vyhodnocení výsledků

3.4.1 Stanovení limitů detekce a limitů kvantifikace

V rámci experimentální části této diplomové práce byly stanoveny LOD a LOQ pro metody LC-MS a LC-MS/MS. LOD a LOQ byly vyhodnoceny na základě poměru signál ku šumu (signal noise; S/N). Hodnota LOD byla definována jako koncentrace $S/N \geq 3$ a LOQ odpovídal $S/N \geq 10$.

Měření provedená na přístroji s jednoduchým kvadrupólem ukázala, že dosažené hodnoty LOD a LOQ všech analyzovaných EDCs nebyly dostatečně nízké, vzhledem k tomu, že EDCs se v lidské plazmě vyskytují pouze ve stopových koncentracích. Instrument s trojitým kvadrupólem prokázal vyšší citlivost oproti instrumentaci s jednoduchým kvadrupólem. Změnou instrumentace se podařilo znatelně snížit LOD a LOQ.

Kalibrační řada byla připravena v relativně širokém rozsahu koncentrací. V případě, kdy měl poslední bod kalibrace poskytující signál pro daný analyt poměr S/N větší než 10, byla dopočítána teoretická hodnota LOD podle následující rovnice 6:

$$\text{teoretický LOD} = \frac{LOQ \cdot 3}{10} \quad (6)$$

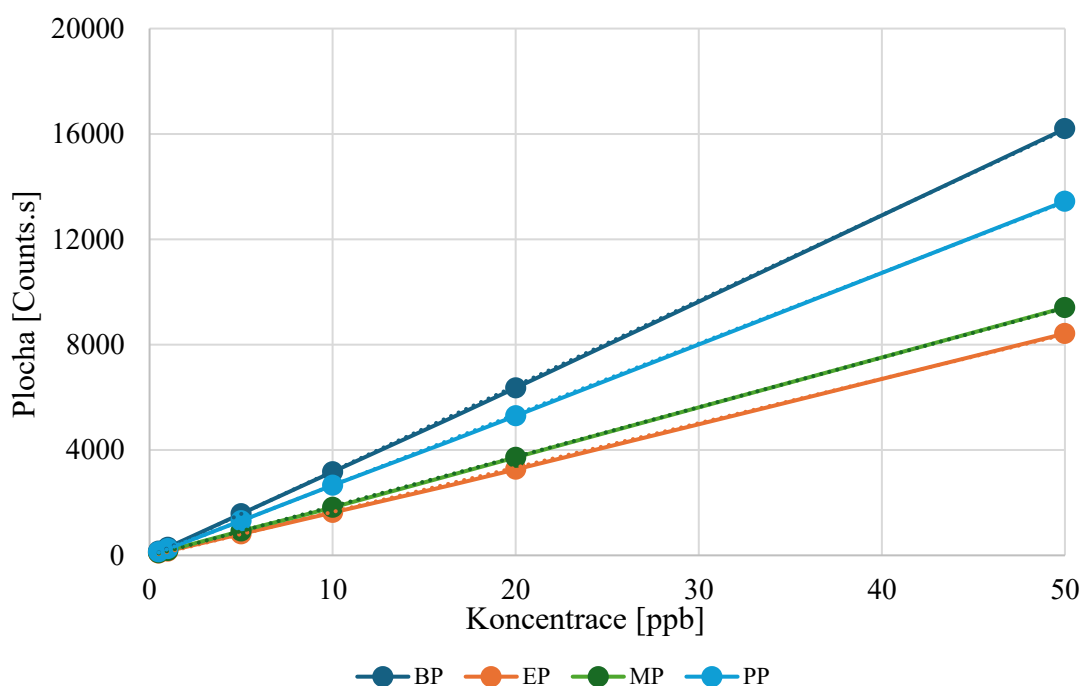
V tabulce 16 jsou shrnuty dosažené hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé analyty. Uvedené hodnoty potvrzují lepší kvantitativní parametry přístroje LC-MS/MS.

Tabulka 16: Porovnání stanovených mezí detekce (LOD) a mezí kvantifikace (LOQ) vybraných EDCs pomocí jednoduchého kvadrupólu a trojitého kvadrupólu.

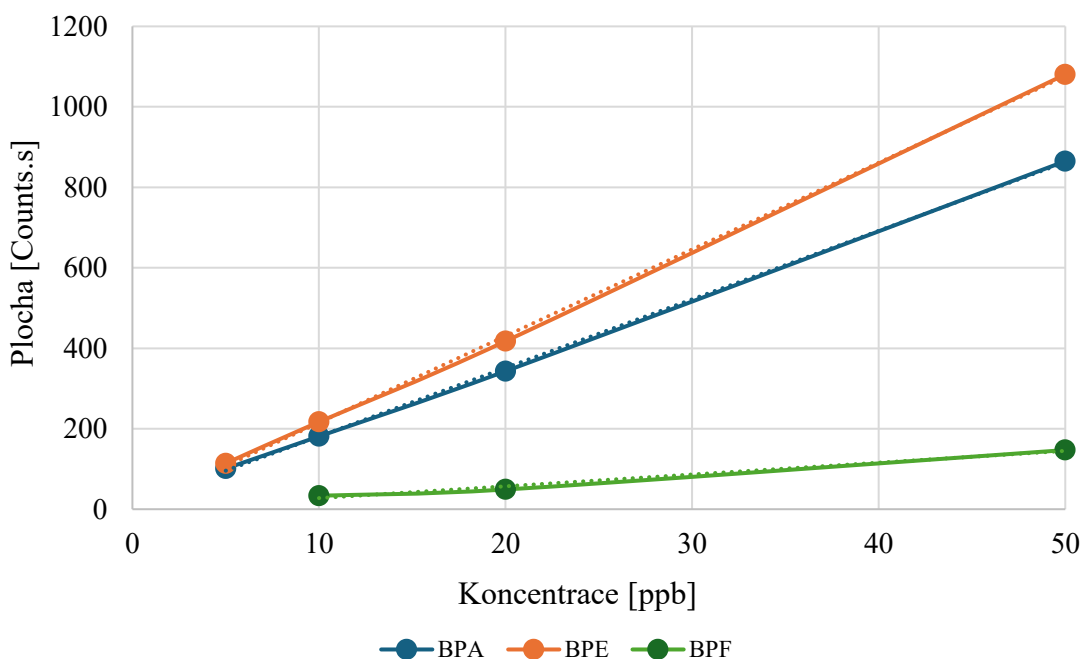
Jednoduchý kvadrupól			Trojitý kvadrupól	
Analyt	LOD [ppb]	LOQ [ppb]	LOD [ppb]	LOQ [ppb]
MP	2	40	0,1	0,5
EP	1	8	0,1	0,5
PP	1	2	0,1	0,5
BP	2	8	0,1	0,5
DEF	2	8	teoretický 0,15	0,5
DHF	40	200	teoretický 0,03	0,1
BPA	8	40	teoretický 1,5	5
BPAF	8	40	0,1	0,5
BPE	8	40	teoretický 1,5	5
BPF	8	40	5	10

3.4.2 Kalibrační křivky

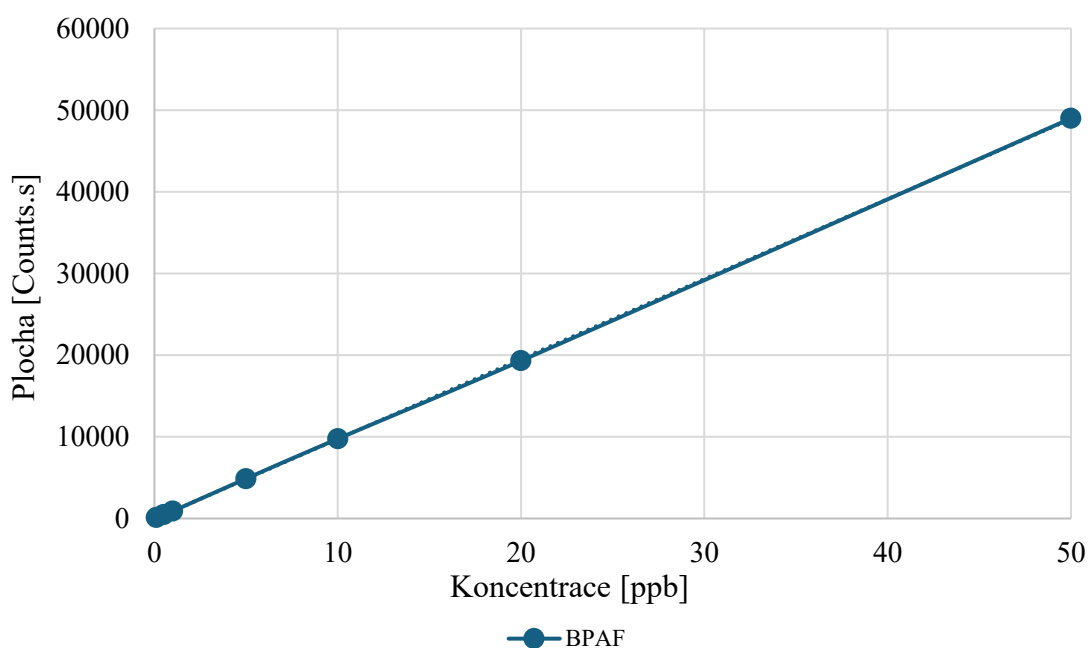
Pro ověření linearitu odezvy detektoru a následnou kvantifikaci reálných vzorků byla připravena kalibrační řada v ACN. Je důležité poznamenat, že kalibrační řada připravená v ACN plně nezohledňuje vliv maticových efektů. Maticové efekty tedy byly při kvantifikaci zanedbány. V ideálním případě by kalibrační řada měla být připravena v roztoku s maticí, která se co nejvíce podobá reálné matici plazmy. U všech analytů byla linearita kalibrační řady potvrzena, což dokazuje koeficient determinace (R^2) >0,99. Pouze v případě BPF byl R^2 roven 0,9865. Grafy 24-27 zobrazují směrnice a úseky jednotlivých analytů použité pro finální kvantifikaci. Tyto grafy byly získány pomocí instrumentace s hmotnostním spektrometrem typu QqQ. Hodnoty LOQ jednotlivých analytů představují nejnižší body kalibrační řady.



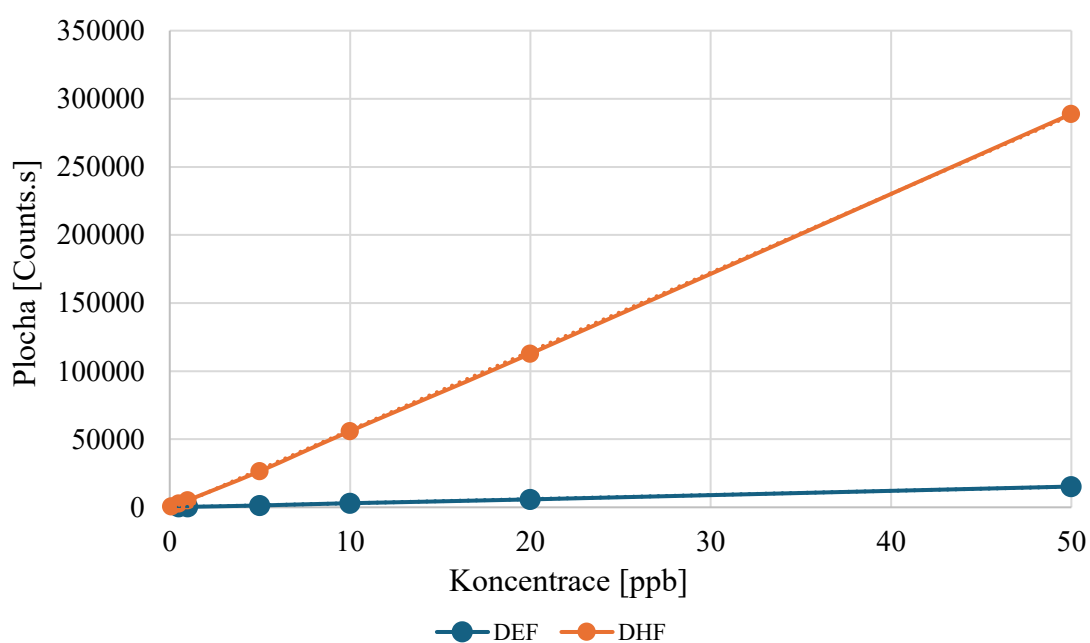
Graf 24: Kalibrační křivka vybraných parabenů získaná pomocí LC-MS/MS (QqQ). Zobrazuje závislost plochy signálu na koncentraci.



Graf 25: Kalibrační křivka vybraných bisfenolů získaná pomocí LC-MS/MS (QqQ). Zobrazuje závislost plochy signálu na koncentraci.



Graf 26: Kalibrační křivka analytu BPAF získaná pomocí LC-MS/MS (QqQ). Zobrazuje závislost plochy signálu na koncentraci.



Graf 27: Kalibrační křivka vybraných ftalátů po odečtení ploch blanku získaná pomocí LC-MS/MS (QqQ). Zobrazuje závislost plochy signálu na koncentraci.

V tab. 17 jsou shrnuty získané směrnice, úseky a hodnoty R^2 analyzovaných sloučenin získané z kalibračních přímk z grafů 24-27.

Tabulka 17: Směrnice, úseky, R^2 analyzovaných analytů.

Analyt	Směrnice	Úsek	R^2
MP	188,330	-23,382	0,9999
EP	168,504	-36,262	0,9998
BP	324,080	-47,256	0,9999
PP	268,969	-28,471	0,9999
BPA	17,036	10,487	0,9997
BPAF	979,652	-62,479	0,9999
BPE	21,537	-0,421	0,9996
BPF	2,937	-1,808	0,9865
DEF	5782,300	-1175,500	0,9999
DHF	303,890	-33,391	0,9993

3.4.3 Vyhodnocení vzorků

Jak již bylo uvedeno v předešlých kapitolách této diplomové práce, plazmatické vzorky nebyly kvantifikovány. Detekované analyty v těchto vzorcích nelze považovat za zcela relevantní, jelikož byly přítomny i v kontrolních blancích, a tudíž se pravděpodobně jedná o kontaminanty vzniklé během přípravy vzorku a nikoli o původní složky biologické matrice.

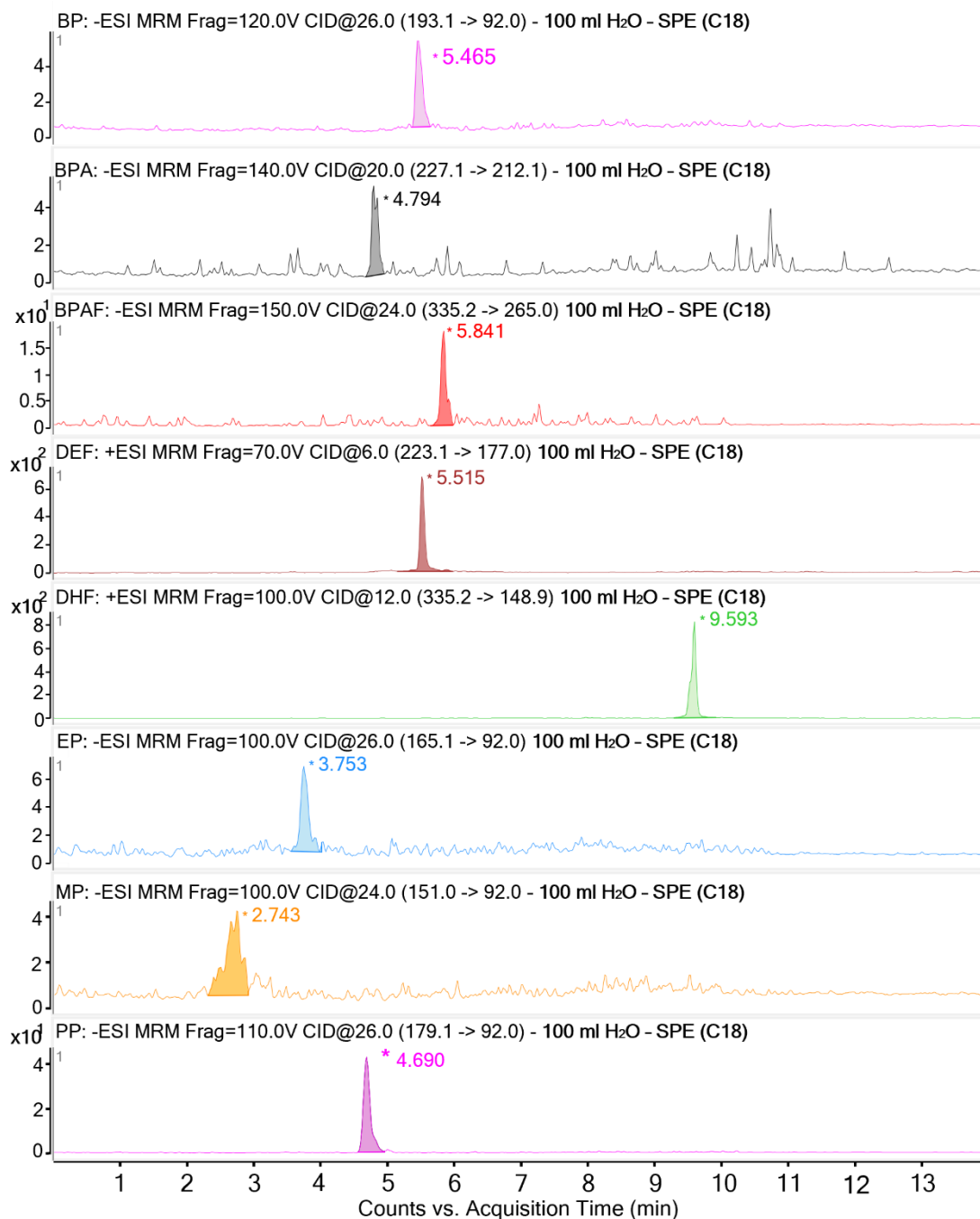
Z tohoto důvodu byl proveden doplňkový experiment s extrémním zakoncentrováním demineralizované vody použité během přípravy plazmatických vzorků. Vzorek demineralizované vody o objemu 100 ml byl 1000krát zakoncentrován pomocí SPE techniky. Ve výsledném extraktu bylo detekováno několik analytů.

Kvantifikace byla možná pouze u PP a BPAF, jejichž signál byl >10 S/N. U analytů DEF a DHF byl před kvantifikací odečten odpovídající signál detekovaný v blanku. Signály ostatních analytů se nacházely pod LOQ. Výsledky, včetně kvantitativních údajů, jsou shrnuty v tab. 18.

Tabulka 18: Výsledky kvantifikace detekovaných analytů stanovených ve vzorku demineralizované vody (100 ml) zakoncentrovaném pomocí SPE (sorbenty C18 ec a HLB).

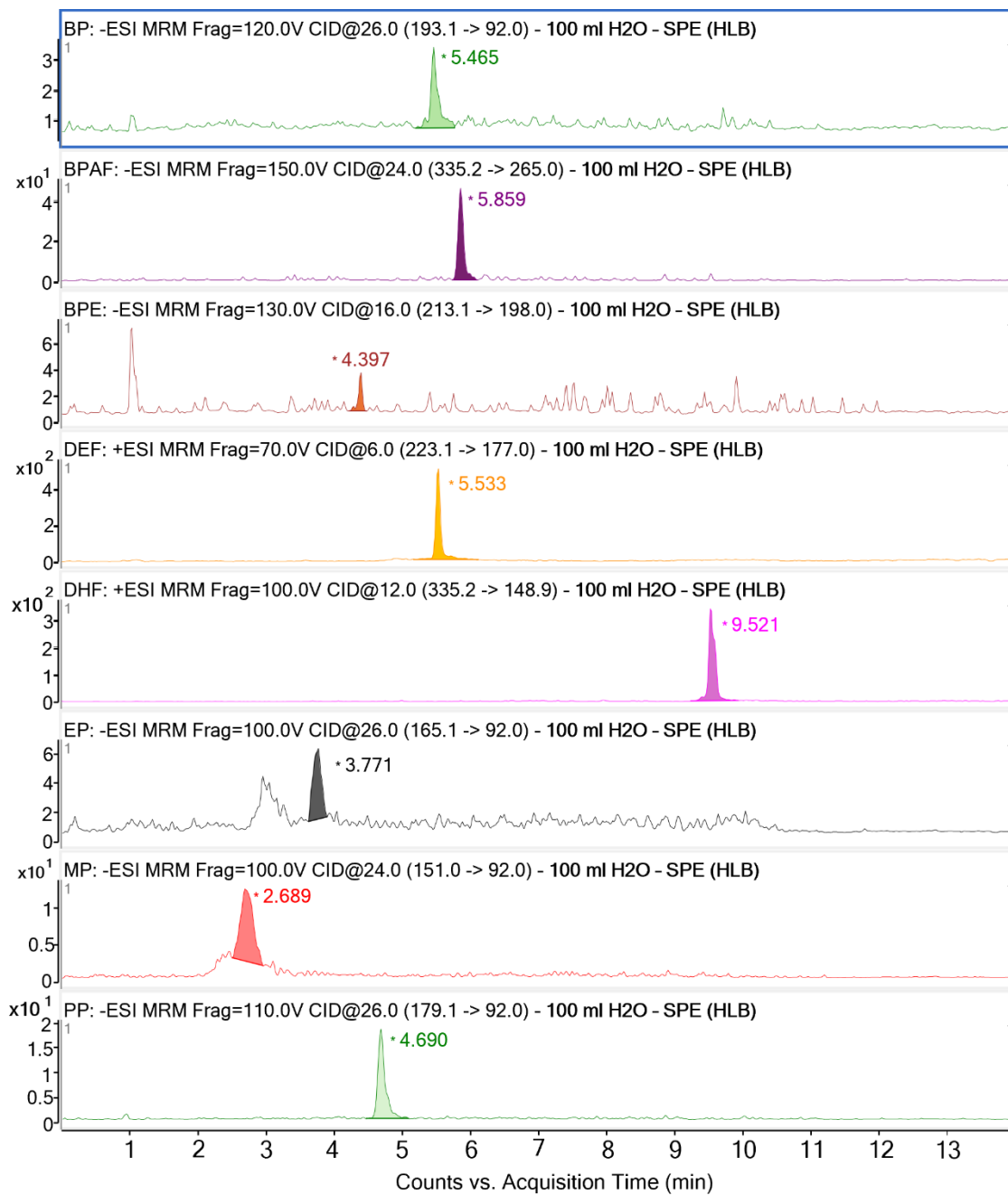
Analyt	Sorbent C18 ec	Sorbent C18 ec	Sorbent HLB	Sorbent HLB
	Koncentrace v extraktu [ng/ml ± SD]	Přepočtená koncentrace ve vzorku [ng/ml ± SD]	Koncentrace v extraktu [ng/ml ± SD]	Přepočtená koncentrace ve vzorku [ng/ml ± SD]
MP	<LOQ	-	<LOQ	-
EP	<LOQ	-	<LOQ	-
PP	1,18 ± 0,008	0,001 ± 8,0·10 ⁻⁶	0,52 ± 0,008	0,0005 ± 8,0·10 ⁻⁶
BP	<LOQ	-	<LOQ	-
BPA	<LOQ	-	-	-
BPE	-	-	<LOQ	-
BPAF	0,18 ± 0,013	0,0002 ± 1,3·10 ⁻⁵	0,34 ± 0,008	0,0003 ± 7,9·10 ⁻⁶
DEF	8,05 ± 0,06	0,008 ± 6,0·10 ⁻⁵	5,57 ± 0,12	0,006 ± 0,0001
DHF	0,88 ± 0,006	0,0008 ± 5,9·10 ⁻⁶	0,51 ± 0,001	0,0005 ± 1,2·10 ⁻⁶

Extrahované chromatogramy detekovaných analytů jsou zobrazeny na obr. 21 a 22, kde je patrný dostatečně silný signál umožňující kvantifikaci.



Obrázek 21: Extrahovaný chromatogram vzorku 100 ml demineralizované vody upraveného technikou SPE (C18 ec), zobrazující detekované analyty (analyty bez signálu a kontaminanty BEHF a DBF nejsou zobrazeny)

Kolona: Kinetex Polar (délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μm, porozita 100 Å); **mobilní fáze:** ACN a 5mM octan amonný; **teplota:** 30 °C; **průtok mobilní fáze:** 0,4 ml/min; **násřik vzorku:** 5 μl; **gradient:** 0 min – 30 % ACN, 8 min – 100 % ACN, MS/ESI -, +, (MRM).



Obrázek 22: Extrahovaný chromatogram vzorku 100 ml demineralizované vody upraveného technikou SPE (HLB), zobrazující detekované analyty (analyty bez signálu a kontaminanty BEHF a DBF nejsou zobrazeny)

Kolona: Kinetex Polar (délka 100 mm, vnitřní průměr 3 mm, velikost částic 2,6 μm , porozita 100 \AA); **mobilní fáze:** ACN a 5mM octan amonný; **teplota:** 30 $^{\circ}\text{C}$; **průtok mobilní fáze:** 0,4 ml/min; **násřik vzorku:** 5 μl ; **gradient:** 0 min – 30 % ACN, 8 min – 100 % ACN, MS/ESI -, + (MRM).

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu LC-MS/MS pro stanovení vybraných EDCs. Separace probíhala v systému RP s gradientovou elucí, přičemž mobilní fázi tvořila kombinace 5 mM octanu amonného a ACN. Výsledkem optimalizace separačních podmínek je optimální eluční gradient, který poskytuje dostatečně účinnou separaci s ohledem na přiměřenou dobu analýzy. Optimalizovaná metoda byla následně otestována v rámci analýzy vzorků lidské plazmy.

V úvodní fázi této práce byla použita instrumentace s jednoduchým kvadrupólem v režimu SIM. Pro zvýšení citlivosti a selektivity byla metoda dále optimalizována na hmotnostním spektrometru typu QqQ v režimu MRM. Pro každý analyt byl nalezen nejintenzivnější fragmentový iont pro následnou kvantifikaci. Změna instrumentace umožnila výrazné snížení LOD a LOQ pro všechny analyty.

Již v úvodní části experimentu byla v blanku zjištěna přítomnost všech testovaných ftalátů. Extrémně vysoké koncentrace byly zaznamenány konkrétně u BEHF a DBF, což bylo důvodem jejich vyloučení z dalších měření. V případě DEF a DHF byly detekované signály v blanku výrazně nižší, a tudíž byly při následné kvantifikaci odečteny. Tato systematická kontaminace s největší pravděpodobností pochází z plastových hadiček přístroje, ze kterých se vlivem rozpouštědla uvolňují tyto sloučeniny. Tato skutečnost poukazuje na důležitost správného výběru materiálů.

Vyvinutá metoda LC-MS/MS byla následně aplikována na vzorky lidské plazmy, které byly před samotnou analýzou upraveny technikami SPE a LLE. Lze předpokládat, že koncentrace vybraných EDCs v lidské plazmě jsou velmi nízké, a proto by bylo vhodné plazmatické vzorky vícenásobně zakoncentrovat. Nicméně z důvodu omezených zásob plazmatických vzorků již nebylo možné vyšší stupeň zakoncentrování realizovat.

V případě obou extrakčních technik byly v analyzovaných vzorcích plazmy detekovány píky parabenů, nicméně při porovnání se slepým pokusem bylo zjištěno, že se s největší pravděpodobností jedná pouze o kontaminaci vzniklou během přípravy vzorku. Slepý pokus byl připraven shodným postupem jako plazmatické vzorky, přičemž místo vzorku byla použita demineralizovaná voda, která byla využita při přípravě plazmatických vzorků. Pro ověření této skutečnosti byl proveden doplňkový experiment s extrémním zakoncentrováním demineralizované vody. Výsledky doplňkového

experimentu potvrdily, že signály pravděpodobně pocházejí z vody, přičemž jejich intenzita výrazně narůstá až při vysokém stupni zakoncentrování (kapitola 3.4.3). Zároveň bylo zjištěno, že určité signály jsou přítomny i po použití pouze 50 µl vodného deproteinačního roztoku (10% kyselina 5-sulfosalicylová), ačkoli při použití čistého chloroformu jako extrakčního rozpouštědla tyto signály detekovány nebyly. Tato skutečnost dále podporuje závěr, že kontaminace pochází z demineralizované vody použité při přípravě plazmatických vzorků.

Jak již bylo uvedeno v kapitole 1.1.3 této diplomové práce, bisfenoly se prakticky ihned po vstupu do lidského těla metabolizují na jejich konjugované formy (především glukuronidové a sulfátové) a během prvních pár hodin jsou z lidského organismu vyloučeny močí. V souladu s poznatky z odborné literatury lze konstatovat, že stanovení volných bisfenolů v biologických matricích je velmi obtížné, neboť se v nich ve volné formě vyskytují v méně než 1 % z celkového přijatého množství. Z tohoto důvodu je v řadě studií doporučováno zařazení kroku enzymatické hydrolýzy (obvykle za použití enzymu β -glukuronidázy), která umožňuje přeměnu konjugovaných forem na volné a tím jejich detekci výrazně usnadňuje [18, 19]. V rámci této práce však nebyla enzymatická hydrolýza provedena, protože tento enzym nebyl k dispozici. Stanovení konjugovaných forem bisfenolů rovněž nebylo realizováno, neboť odpovídající standardy nejsou běžně komerčně dostupné a jejich použití by vyžadovalo novou optimalizaci celé metody.

Tato diplomová práce je počáteční fází výzkumu problematiky stanovení EDCs v lidské plazmě. Aby tato metoda mohla být použita při rutinní analýze, bylo by nutné provést validaci v souladu s příslušnými směrnici. Zároveň by bylo vhodné pokračovat v optimalizaci postupu přípravných extrakčních technik, aby bylo dosaženo co nejpřesnějšího stanovení v biologických matricích. Uvedené experimenty však přesahují rámec této diplomové práce a jedná se tak o nastíněné směry dalšího výzkumu problematiky stanovení EDCs.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] WAN, H. T., P. Y. LEUNG, Y. G. ZHAO, X. WEI, M. H. WONG a Chris K. C. WONG. Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2013, **261**, 763–769. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2013.01.034
- [2] ISMANTO, Aris, Tony HADIBARATA, Risky Ayu KRISTANTI, Lilik MASLUKAH, Novia SAFINATUNNAJAH a Wulan KUSUMASTUTI. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) in environmental matrices: Occurrence, fate, health impact, physio-chemical and bioremediation technology. *Environmental Pollution* [online]. 2022, **302**, 119061. ISSN 0269-7491. Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2022.119061
- [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. ISSN 13826689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2015.06.009
- [4] DÍAZ-CRUZ, M. Silvia, María J. LÓPEZ DE ALDA, Ramón LÓPEZ a Damià BARCELÓ. Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2003, **38**(9), 917–923. ISSN 1096-9888. Dostupné z: doi:10.1002/jms.529
- [5] MILIĆ, Nataša, Maja MILANOVIĆ, Jovana DRLJAČA, Jan SUDJI a Nataša MILOŠEVIĆ. Challenges in the Analytical Preparation of a Biological Matrix in Analyses of Endocrine-Disrupting Bisphenols. *Separations* [online]. 2023, **10**(4), 226. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations10040226
- [6] YUE, Mengjie, Xiaolu ZHOU, Jiatong FAN, Shuo GAO, Xian-En ZHAO, Shuyun ZHU, Qian LIU a Guibin JIANG. Recent advances of mass spectrometry-based analytical methods for endocrine disrupting chemicals in human matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2024, **171**, 117523. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2024.117523
- [7] VAN DER GUGTEN, J. Grace. Tandem mass spectrometry in the clinical laboratory: A tutorial overview. *Clinical Mass Spectrometry* [online]. 2020, **15**, 36–43. ISSN 2376-9998. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinms.2019.09.002
- [8] MONISHA, Ravichandran Swathy, Ragupathy Lakshmi MANI, Baskaran SIVAPRAKASH, Natarajan RAJAMOHAN a Dai-Viet N. VO. Remediation and toxicity of endocrine disruptors: a review. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2023, **21**(2), 1117–1139. ISSN 1610-3661. Dostupné z: doi:10.1007/s10311-022-01455-4
- [9] KAVLOCK, R J, G P DASTON, C DEROSA, P FENNER-CRISP, L E GRAY, S KAATTARI, G LUCIER, M LUSTER, M J MAC, C MACZKA, R MILLER, J MOORE, R ROLLAND, G SCOTT, D M SHEEHAN, T SINKS a H A TILSON. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental*

- Health Perspectives* [online]. 1996, **104**(suppl 4), 715–740. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.96104s4715
- [10] Endokrinní disruptory: často kladené otázky. *European Commission - European Commission* [online]. [vid. 2025-01-19]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/cs/memo_16_2151
- [11] 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. ISSN 0163-769X. Dostupné z: doi:10.1210/er.2009-0002
- [12] HILLER-STURMHÖFEL, Susanne a Andrzej BARTKE. The Endocrine System. *Alcohol Health and Research World*. 1998, **22**(3), 153–164. ISSN 0090-838X.
- [13] KNIGHT, John. Endocrine system 1: overview of the endocrine system and hormones. *Nursing Times* [online]. 26. duben 2021 [vid. 2025-01-19]. Dostupné z: <https://www.nursingtimes.net/primary-care/endocrine-system-1-overview-of-the-endocrine-system-and-hormones-26-04-2021/>
- [14] WUTTKE, Wolfgang, Hubertus JARRY a Dana SEIDLOVA-WUTTKE. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones* [online]. 2010, **9**(1), 9–15. ISSN 2520-8721. Dostupné z: doi:10.1007/BF03401276
- [15] CINDY SEIWERT, PhD a Goodwin UNIVERSITY. Endocrine System [online]. 2024 [vid. 2025-01-23]. Dostupné z: <https://pressbooks.pub/humanbiology/chapter/endocrine-system/>
- [16] US EPA, OCSPP. *Overview of Endocrine Disruption* [online]. 10. srpen 2015 [vid. 2025-01-23]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/overview-endocrine-disruption>
- [17] MITRA, Pubali, Srilagna CHATTERJEE, Nirvika PAUL, Sudakshina GHOSH a Madhusudan DAS. An Overview of Endocrine Disrupting Chemical Paraben and Search for An Alternative – A Review. *Proceedings of the Zoological Society* [online]. 2021, **74**(4), 479–493. ISSN 0974-6919. Dostupné z: doi:10.1007/s12595-021-00418-x
- [18] ANDRA, Syam S., Christine AUSTIN, Juan YANG, Dhavalkumar PATEL a Manish ARORA. Recent advances in simultaneous analysis of bisphenol A and its conjugates in human matrices: Exposure biomarker perspectives. *Science of The Total Environment* [online]. 2016, **572**, 770–781. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.062
- [19] MILIĆ, Nataša, Maja MILANOVIĆ, Jovana DRLJAČA, Jan SUDJI a Nataša MILOŠEVIĆ. Challenges in the Analytical Preparation of a Biological Matrix in Analyses of Endocrine-Disrupting Bisphenols. *Separations* [online]. 2023, **10**(4), 226. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations10040226

- [20] MONNERET, Claude. What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies* [online]. 2017, **340**(9), Endocrine disruptors / Les perturbateurs endocriniens, 403–405. ISSN 1631-0691. Dostupné z: doi:10.1016/j.crv.2017.07.004
- [21] VITKU, J., L. HORACKOVA, L. KOLATOROVA, M. DUSKOVA, T. SKODOVA a M. SIMKOVA. Derivatized versus non-derivatized LC-MS/MS techniques for the analysis of estrogens and estrogen-like endocrine disruptors in human plasma. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2023, **260**, 115083. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2023.115083
- [22] CATENZA, Cyrene J., Amna FAROOQ, Noor S. SHUBEAR a Kingsley K. DONKOR. A targeted review on fate, occurrence, risk and health implications of bisphenol analogues. *Chemosphere* [online]. 2021, **268**, 129273. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129273
- [23] HAHLADAKIS, John N., Eleni IACOVIDOU a Spyridoula GERASSIMIDOU. An overview of the occurrence, fate, and human risks of the bisphenol-A present in plastic materials, components, and products. *Integrated Environmental Assessment and Management* [online]. 2023, **19**(1), 45–62. ISSN 1551-3793. Dostupné z: doi:10.1002/ieam.4611
- [24] HARNETT, Kristen G., Ashley CHIN a Sonya M. SCHUH. BPA and BPA alternatives BPS, BPAF, and TMBPF, induce cytotoxicity and apoptosis in rat and human stem cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2021, **216**, 112210. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112210
- [25] OCAÑA-RIOS, Iran, José DE JESÚS OLMOS-ESPEJEL a Kingsley K. DONKOR. Recent advances in analysis of bisphenols and their derivatives in biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2022, **414**(2), 807–846. ISSN 1618-2642, 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-021-03668-y
- [26] VOGEL, Sarah A. The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A “Safety”. *American Journal of Public Health* [online]. 2009, **99**(Suppl 3), S559–S566. ISSN 0090-0036. Dostupné z: doi:10.2105/AJPH.2008.159228
- [27] XING, Jianing, Siyi ZHANG, Miaolian ZHANG a Jing HOU. A critical review of presence, removal and potential impacts of endocrine disruptors bisphenol A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. 2022, **254**, 109275. ISSN 1532-0456. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpc.2022.109275
- [28] SANTANGELI, Stefania, Francesca MARADONNA, Ike OLIVOTTO, Chiara Carla PICCINETTI, Giorgia GIOACCHINI a Oliana CARNEVALI. Effects of BPA on female reproductive function: The involvement of epigenetic mechanism. *General and Comparative Endocrinology* [online]. 2017, **245**, Proceedings of the Fifth International Workshop on the Biology of Fish Gametes, 122–126. ISSN 0016-6480. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygcen.2016.08.010
- [29] WELSHONS, W.V., S.C. NAGEL a F.S. VOM SAAL. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of

- human exposure. *Endocrinology* [online]. 2006, **147**(6), S56–S69. Dostupné z: doi:10.1210/en.2005-1159
- [30] ROCHESTER, Johanna R. a Ashley L. BOLDEN. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2015, **123**(7), 643–650. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.1408989
- [31] FRANKO, Nina, Anja KODILA a Marija SOLLNER DOLENC. Adverse outcomes of the newly emerging bisphenol A substitutes. *Chemosphere* [online]. 2024, **364**, 143147. ISSN 0045-6535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2024.143147
- [32] *Commission adopts ban of Bisphenol A in food contact materials - European Commission* [online]. 12 2024 [vid. 2025-02-15]. Dostupné z: https://food.ec.europa.eu/food-safety-news-0/commission-adopts-ban-bisphenol-food-contact-materials-2024-12-19_en
- [33] NOWAK, Karolina, Wioletta RATAJCZAK–WRONA, Maria GÓRSKA a Ewa JABŁOŃSKA. Parabens and their effects on the endocrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. 2018, **474**, 238–251. ISSN 0303-7207. Dostupné z: doi:10.1016/j.mce.2018.03.014
- [34] LINCHO, João, Rui C. MARTINS a João GOMES. Paraben Compounds—Part I: An Overview of Their Characteristics, Detection, and Impacts. *Applied Sciences* [online]. 2021, **11**(5), 2307. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app11052307
- [35] PETRIC, Zvonimir, Julia RUŽIĆ a Irena ŽUNTAR. The controversies of parabens – an overview nowadays. *Acta Pharmaceutica* [online]. 2021, **71**(1), 17–32. ISSN 1846-9558. Dostupné z: doi:10.2478/acph-2021-0001
- [36] SONI, M. G., I. G. CARABIN a G. A. BURDOCK. Safety assessment of esters of *p*-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2005, **43**(7), 985–1015. ISSN 0278-6915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2005.01.020
- [37] CHEN, Xueping, Shisan XU, Tianfeng TAN, Sin Ting LEE, Shuk Han CHENG, Fred Wang Fat LEE, Steven Jing Liang XU a Kin Chung HO. Toxicity and Estrogenic Endocrine Disrupting Activity of Phthalates and Their Mixtures. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2014, **11**(3), 3156–3168. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph110303156
- [38] BENJAMIN, Sailas, Eiji MASAI, Naofumi KAMIMURA, Kenji TAKAHASHI, Robin C. ANDERSON a Panichikkal Abdul FAISAL. Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2017, **340**, 360–383. ISSN 0304-3894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2017.06.036
- [39] BASSO, Carla Giovana, Anderson Tadeu DE ARAÚJO-RAMOS a Anderson Joel MARTINO-ANDRADE. Exposure to phthalates and female reproductive health: A literature review. *Reproductive Toxicology* [online]. 2022, **109**, 61–79. ISSN 0890-6238. Dostupné z: doi:10.1016/j.reprotox.2022.02.006

- [40] BIEMANN, Ronald, Matthias BLÜHER a Berend ISERMANN. Exposure to endocrine-disrupting compounds such as phthalates and bisphenol A is associated with an increased risk for obesity. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* [online]. 2021, **35**(5), Endocrine disruptors, 101546. ISSN 1521-690X. Dostupné z: doi:10.1016/j.beem.2021.101546
- [41] WANG, Yun, Guoliang LI, Qingqing ZHU a Chunyang LIAO. A multi-residue method for determination of 36 endocrine disrupting chemicals in human serum with a simple extraction procedure in combination of UPLC-MS/MS analysis. *Talanta* [online]. 2019, **205**, 120144. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2019.120144
- [42] AZZOUZ, Abdelmonaim, Andrés J. RASCÓN a Evaristo BALLESTEROS. Simultaneous determination of parabens, alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A and triclosan in human urine, blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2016, **119**, 16–26. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2015.11.024
- [43] BADAWY, Mohamed E. I., Mahmoud A. M. EL-NOUBY, Paul K. KIMANI, Lee W. LIM a Entsar I. RABEA. A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *Analytical Sciences* [online]. 2022, **38**(12), 1457–1487. ISSN 1348-2246. Dostupné z: doi:10.1007/s44211-022-00190-8
- [44] CABALLERO-CASERO, N., L. LUNAR a S. RUBIO. Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2016, **908**, 22–53. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2015.12.034
- [45] COBELLIS, Luigi, Nicola COLACURCI, Elisabetta TRABUCCO, Carmen CARPENTIERO a Lucia GRUMETTO. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomedical Chromatography* [online]. 2009, **23**(11), 1186–1190. ISSN 0269-3879, 1099-0801. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1241
- [46] ŻWIR-FERENC, A. a M. BIZIUK. Solid phase extraction technique-trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies* [online]. 2006 [vid. 2025-02-04]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Solid-phase-extraction-technique-trends%2C-and-%C5%BBwir-Ferenc-Biziuk/b7dc10b3759723ed7d04f4426028afd45aa628ae>
- [47] MNCHROM. *Chromatography Catalogue* [online]. B.m.: Düren: MACHEREY-NAGEL. Dostupné z: <https://www.mn-net.com/media/pdf/51/5e/04/Catalog-Chromatography-EN.pdf>
- [48] CAMEL, Valérie. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. 2003, **58**(7), 1177–1233. ISSN 0584-8547. Dostupné z: doi:10.1016/S0584-8547(03)00072-7

- [49] VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ, Ústav analýzy potravin a výživy. Extrakce vzorku tuhou fází. In: [online]. Praha. 2018. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20PIGA%20Cz-12%20Extrakce%20vzorku%20tuhou%20fazi%20%28LSC_SPE_MSPD_QuEChERS%29_VH2018.pdf
- [50] PŁOTKA-WASYLKA, Justyna, Natalia SZCZEPAŃSKA, Miguel DE LA GUARDIA a Jacek NAMIEŚNIK. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2015, **73**, 19–38. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.04.026
- [51] VASILJEVIC, Tijana a Tom HARNER. Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, **789**, 148013. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148013
- [52] SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N., E. CONCHA-GRAÑA, I. TURNES-CAROU, S. MUNIATEGUI-LORENZO, P. LÓPEZ-MAHÍA a D. PRADA-RODRÍGUEZ. Blank and sample handling troubleshooting in ultratrace analysis of alkylphenols and bisphenol A by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* [online]. 2012, **101**, 413–419. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2012.09.050
- [53] *Agilent Technologies. Bond Elut® HLB.pdf* [online]. [vid. 2025-02-15]. Dostupné z: https://hpst.cz/sites/default/files/download/2023-07/agilent-hlb-bond-elut-f_altium_komprimovany.pdf
- [54] ALTIUM INTERNATIONAL S.R.O. *SPE kolonky* [online]. [vid. 2025-02-15]. Dostupné z: <https://hpst.cz/priprava-vzorku/spe/spe-kolonky>
- [55] ALTIUM INTERNATIONAL S.R.O. *Moderní polymerní fáze CHROMABOND | Altium International s.r.o.* [online]. Dostupné z: <https://hpst.cz/sites/default/files/download/2023/05/moderni-polymerni-faze-chromabond.pdf>
- [56] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří G. K. ŠEVČÍK. *Organická analýza*. B.m.: Ing. Václav Helán – 2 THETA Český Těšín, nedatováno. ISBN 978-80-88279-17-4.
- [57] CHROM TECH, INC. *History of Chromatography: From Past to Present* [online]. B.m.: Chrom Tech, Inc. 2024. Dostupné z: <https://chromtech.com/blog/history-of-chromatography/>
- [58] KŘÍŽEK, Martin a Jan ŠÍMA. *ANALYTICKÁ CHEMIE* [online]. 1. vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, nedatováno. ISBN 978-80-7394-486-5. Dostupné z: http://kch.zf.jcu.cz/vyuka/download/Analyticka_chemie_komplet.pdf
- [59] JAIN, Aditya. *The Future of Chromatography* [online]. 2023 [vid. 2025-02-21]. Dostupné z: <https://www.delvens.com/blog/the-future-of-chromatography>
- [60] MASARYKOVA UNIVERZITA. *Chromatografie – učební text* [online]. B.m.: Masarykova univerzita, 2018. Dostupné

z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2018/BLIT0222p/um/Chromatografie_ucebni_text.pdf

- [61] MASARYKOVA UNIVERZITA. *Speciální metody v HPLC* [online]. B.m.: Masarykova univerzita. 2013. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/podzim2013/C8102/um/HPLC_spec_metody.pdf
- [62] YE, Xiaoyun, Xiaoliu ZHOU, Ryan HENNINGS, Joshua KRAMER a Antonia M. CALAFAT. Potential External Contamination with Bisphenol A and Other Ubiquitous Organic Environmental Chemicals during Biomonitoring Analysis: An Elusive Laboratory Challenge. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2013, **121**(3), 283–286. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.1206093
- [63] UHPLCS. Jaký je rozdíl mezi HPLC a UHPLC. *Professional HPLC Column Hardware Consumables Supplier* [online]. 30. listopad 2023 [vid. 2025-02-22]. Dostupné z: <https://uhplcs.com/cs/jak%C3%BD-je-rozd%C3%ADl-mezi-hplc-a-uhplc/>
- [64] AUTORSKÝ KOLEKTIV ÚSTAVU 402 VŠCHT PRAHA. *Vysokoúčinná kapalinová chromatografie* [online]. Dostupné z: http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Kap_1.pdf
- [65] OLŠOVSKÁ, Jana a Marie JURKOVÁ. New trends in liquid chromatography and their utilization in analysis of beer and brewery raw materials. Part 1. Theoretical introduction. *Kvasny Prumysl* [online]. 2012, **58**(2), 30–35. ISSN 00235830. Dostupné z: doi:10.18832/kp2012005
- [66] TALEUZZAMAN, Mohamad, S ALI, SJ GILANI, SS IMAM a A HAFEEZ. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry* [online]. nedatováno, **2015**(6), 2. ISSN 2381-8913. Dostupné z: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/64357302/Ultra_Performance_Liquid_Chromatography_%28UPLC%29_-_A-libre.pdf?1599287898=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAustin_Journal_of_Analytical_and_Pharmaceutical.pdf&Expires=1740491868&Signature=C-1~QlrIE0Rwx4aNb~kJwBbRPLw1coANQ-ChKwjdtS3x8OStC5PsQerfjy7hCONO2qDN9xv1KeBYaouMhqOufrfHOaPo30nKAYXeifMKnXZFDEHYa-Nm53HTbBZ1~6VHgcZ2JF4njBQT0NIE4DkIP9M589s7iUSuNAGsAJEJa6Wvr7gD9dP~~OBCcsv0uvsd2YIcT1hRuGEoDkYL48URPQSUQI4g~QuGRX9WI5Eb7tYODr2NXTXz~ZBNG7leQ9~xATmQFRmQTUYM~aTr~A7jfpoyv6kj571mhE5atuKyBeNJKdMyb7NOkNfkxySFYqc--XXfdwW-XiGW6V-6xb4opA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA
- [67] ZOTOU, Anastasia. An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal of Chemistry*. nedatováno, **2012**(10), 554–569.
- [68] MITCHELL, Stuart. Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC). *EAG Laboratories* [online]. 30. březen 2017 [vid. 2025-02-22]. Dostupné z: <https://www.eag.com/app-note/ultra-high-performance-liquid-chromatography-uhplc/>

- [69] PRETI, Raffaella. Core-Shell Columns in High-Performance Liquid Chromatography: Food Analysis Applications. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2016, **2016**(1), 3189724. ISSN 1687-8779. Dostupné z: doi:10.1155/2016/3189724
- [70] WANG, Yun, Guoliang LI, Qingqing ZHU a Chunyang LIAO. A multi-residue method for determination of 36 endocrine disrupting chemicals in human serum with a simple extraction procedure in combination of UPLC-MS/MS analysis. *Talanta* [online]. 2019, **205**, 120144. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2019.120144
- [71] SANCHEZ, Carl a Tivadar FARKAS. The latest trend in LC analysis: UHPLC core-shell particles. *American laboratory*. 2012, **44**, 11–14.
- [72] HAYES, Richard, Adham AHMED, Tony EDGE a Haifei ZHANG. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1357**, Advanced Materials for Separation Science, 36–52. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.05.010
- [73] VADAKEDATH, Sabitha, Kandi VENKATARAMANA a Vikram GODISHALA. The Principle, Types, and Applications of Mass Spectrometry: A Comprehensive Review. *Biomedicine and Biotechnology 7* [online]. nedatováno, **2022**(1), 7, 6–22. Dostupné z: doi:10.12691/bb-7-1-2
- [74] DŽUBÁK, Petr a Barbora PAPOUŠKOVÁ. Hmotnostní spektrometrie. In: Norbert CIBĚČEK a Jan VACEK *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně* [online]. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, nedatováno. ISBN 978-80-244-3951-8. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/wp-content/uploads/2019/07/Cibicek-Vacek-Ol-2014.pdf>
- [75] PATEL, R, M ROY a G DUTTA. Mass spectrometry- A review. *Veterinary World* [online]. 2012, 185. ISSN 0972-8988. Dostupné z: doi:10.5455/vetworld.2012.185-192
- [76] PRAUS, Petr a Jiřina VONTOROVÁ. *Analytická chemie II.* [online]. Ostrava: Vysoká škola Báňská - Technická Univerzita Báňská, nedatováno. ISBN 978-80-248-3734-5. Dostupné z: http://katedry.fmmi.vsb.cz/617/Analyticka_chemie_II.pdf
- [77] KORFMACHER, Walter A. Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discovery Today* [online]. 2005, **10**(20), 1357–1367. ISSN 1359-6446. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6446(05)03620-2
- [78] PITT, James J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*. 2009, **30**(1), 19–34. ISSN 0159-8090.
- [79] BANERJEE, Shibdas a Shyamalava MAZUMDAR. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2012, **2012**(1), 282574. ISSN 1687-8779. Dostupné z: doi:10.1155/2012/282574

- [80] MEDHE, Sharad. Mass Spectrometry: Analysers an Important Tool. *International Journal of Chemical Sciences*. 2018, **16**, 1–8.
- [81] MBANASO, Chimaobi, Yu-Jen FAN, Leonid YANKULIN, Rashi GARG, Petros THOMAS, Greg DENBEAUX, Emil PISCANI a Andrea WUEST. EUV resist outgassing - Scaling to HVM intensity. *Proc. SPIE* [online]. 2009, **7271**. Dostupné z: doi:10.1117/12.816555
- [82] VAN DER GUGTEN, J. Grace. Tandem mass spectrometry in the clinical laboratory: A tutorial overview. *Clinical Mass Spectrometry* [online]. 2020, **15**, 36–43. ISSN 2376-9998. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinms.2019.09.002
- [83] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 4-Hydroxybenzoic acid. *PubChem* [online]. 2025 [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/135>
- [84] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Methylparaben. *PubChem* [online]. [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7456>
- [85] MYRIDAKIS, Antonis, Eirini BALASKA, Christina GKAITATZI, Antonis KOUVARAKIS a Euripides G. STEPHANOU. Determination and separation of bisphenol A, phthalate metabolites and structural isomers of parabens in human urine with conventional high-pressure liquid chromatography combined with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, **407**(9), 2509–2518. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-8497-5
- [86] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Ethylparaben. *PubChem* [online]. 2025 [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8434>
- [87] BARCIELA-ALONSO, María Carmen, Nerea OTERO-LAVANDEIRA a Pilar BERMEJO-BARRERA. Solid phase extraction using molecular imprinted polymers for phthalate determination in water and wine samples by HPLC-ESI-MS. *Microchemical Journal* [online]. 2017, **132**, 233–237. ISSN 0026-265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2017.02.007
- [88] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Bisphenol F. *PubChem* [online]. 2025 [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12111>
- [89] OpenLAB CDS Data Analysis Reference Guide [online]. nedatováno, **2016**. Dostupné z: <http://bit.ly/3EiUOAt>
- [90] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 4,4'-Ethylidenebisphenol. *PubChem* [online]. [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/608116>
- [91] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Propylparaben. *PubChem* [online]. 2025 [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7175>

- [92] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Bisphenol A. *PubChem* [online]. 2025 [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6623>
- [93] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Butylparaben. *PubChem* [online]. [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7184>
- [94] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Diethyl Phthalate. *PubChem* [online]. 2025 [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6781>
- [95] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Bisphenol AF. *PubChem* [online]. [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73864>
- [96] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Dibutyl Phthalate. *PubChem* [online]. 2025 [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3026>
- [97] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Dihexyl phthalate. *PubChem* [online]. [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6786>
- [98] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Bis(2-ethylhexyl) phthalate. *PubChem* [online]. 2025 [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8343>
- [99] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Thiourea. *PubChem* [online]. 2025 [vid. 2025-05-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2723790>