

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie

**ANALÝZA FTALÁTŮ POMOCÍ KAPILÁRNÍ  
ELEKTROFORÉZY**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	Bc. Kristýna Hozáková
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.

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

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 11.5.2016

.....

Kristýna Hozáková

Ráda bych poděkovala svému školiteli, panu doc. RNDr. Janu Petrovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a trpělivost. Mé poděkování patří také Mgr. Danielu Baronovi za pomoc s prací v laboratoři.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Bc. Kristýna Hozáková
Název práce	Analýza ftalátů pomocí kapilární elektroforézy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	

Při výrobě plastů se velmi často využívají ftaláty. Tyto látky se snadno uvolňují do okolního prostředí a ovlivňují zdraví člověka. Na základě laboratorních studií byla zjištěna přítomnost ftalátů ve vodě balené v plastových lahvích. Tato diplomová práce popisuje stanovení vybraných ftalátů pomocí micelární elektrokinetické chromatografie. V teoretické části práce jsou charakterizovány ftaláty a metody kapilární elektroforézy. Praktická část je zaměřena na optimalizaci podmínek separace vybraných ftalátů a analýzu vzorků vody skladované v plastových lahvích.

Klíčová slova	Ftaláty, kapilární elektroforéza, micelární elektrokinetická chromatografie
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Český

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname	Bc. Kristýna Hozáková
Title	Analysis of phthalates by capillary electrophoresis
Type of thesis	Master
Department	Department of Analytical Chemistry
Supervisor	Doc. RNDr. Jan Petr, Ph.D.
The year of presentation	2016

## Abstract

Phthalates are widely used compounds especially in the manufacture of plastics. They can release into the environment easily and affect human health. Several studies reported presence of phthalates in the water from plastic bottles. This dissertation is focused on determination of phthalates by micellar electrokinetic chromatography. The theoretical part introduces the topic of this compounds and describes principles of capillary electrophoresis. The experimental part focuses on optimization of separation conditions as well as analysis of samples of water stored in plastic bottles.

Keywords	Phthalates, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1. KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA.....	9
2.1.1. HISTORIE.....	9
2.1.2. PRINCIPY SEPARACE.....	10
2.1.2.1. Elektroosmotický tok.....	10
2.1.2.2. Elektroforetická mobilita.....	12
2.1.3. PARAMETRY SEPARACE.....	13
2.1.4. INSTRUMENTACE.....	14
2.1.4.1. Vstupní a výstupní nádobka.....	15
2.1.4.2. Dávkování vzorku.....	15
2.1.4.3. Zdroj napětí.....	16
2.1.4.4. Kapilára.....	17
2.1.4.5. Detektor.....	17
2.1.5. DRUHY CE.....	19
2.1.5.1. MEKC.....	19
2.2. FTALÁTY.....	21
2.2.1. VYUŽITÍ FTALÁTŮ.....	21
2.2.1.1. PET.....	23
2.2.2. ZPŮSOBY EXPOZICE.....	25
2.2.3. TOXICITA FTALÁTŮ.....	25
2.2.4. METABOLISMUS A ROZKLAD FTALÁTŮ.....	26
2.2.5. REGULACE.....	27
2.2.6. ANALÝZA.....	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
3.1. CHEMIKÁLIE.....	30
3.2. PŘÍSTROJE A MATERIÁL.....	30
3.3. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ ZÁKLADNÍCH ELEKTROLYTŮ.....	31
3.4. PŘÍPRAVA STANDARDNÍCH ROZTOKŮ STUDOVANÝCH LÁTEK.....	31
3.5. PŘÍPRAVA A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ.....	32
3.6. INSTRUMENTACE A EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY.....	33
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	35
4.1. OPTIMALIZACE EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNEK.....	35
4.1.1. Volba vhodného pH elektrolytu.....	35
4.1.2. Výběr vhodného micelotvorného aditiva.....	35
4.1.3. Studium koncentrace SDS.....	36
4.1.4. Studium koncentrace SDC.....	36
4.1.5. Studium duálního systému SDS a SDC.....	37
4.1.6. Studium vlivu přídavku cyklodextrinu.....	37
4.1.7. Studium vlivu přídavku organického rozpouštědla.....	39
4.2. ČÁSTEČNÁ VALIDACE METODY.....	41
4.3. ANALÝZA VÝLUHŮ.....	42

4. ZÁVĚR.....	46
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	47
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	51

# 1. ÚVOD

Diestery kyseliny ftalové jsou hojně užívány jako změkčovadla plastů. Byla zjištěna jejich všudypřítomnost v okolním prostředí a laboratorní studie prokázaly jejich škodlivost pro člověka i zvířata. Tyto skutečnosti vedou ke zvýšenému zájmu o provedení dalších experimentů objasňujících jednak působení ftalátů, ale také jejich uvolňování z materiálů, ve kterých jsou obsaženy.

Cílem této práce je vývoj a optimalizace metody pro stanovení vybraných ftalátů pomocí kapilární elektroforézy a následné využití ke studiu výluhů z plastových lahví. Teoretická část práce shrnuje informace o kapilární elektroforéze týkající se především instrumentace, jednotlivých druhů uspořádání a způsobů jejich využití a dále se zabývá tématem ftalátů včetně jejich výskytu, biologických účinků a možností analýzy.



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA

Pojem kapilární elektroforéza (CE) zahrnuje řadu metod, při kterých dochází k separaci látek v úzké kapiláře vlivem elektrického pole.<sup>1</sup> Takto provedené separace mohou být velmi účinné, rychlé a vhodné pro nabitě i elektroneutrální vzorky. Mají široké využití jak při klinických analýzách, tak v průmyslu.<sup>2</sup>

#### 2.1.1. HISTORIE

Elektroforéza coby separační metoda byla poprvé popsána v roce 1937 švédským biochemikem Arne Tiselium<sup>3</sup>, který ji použil k rozdělení proteinů, za což získal roku 1948 Nobelovu cenu. Principem této metody je migrace nabitých částic v elektrickém poli. Při Tiseliově uspořádání elektroforézy v širokých trubičkách naplněných roztokem však nedocházelo k úplnému rozdělení vzorku.<sup>4</sup> Během průchodu elektrického proudu vodivým roztokem vzniká Jouleovo teplo, které roztok ohřívá a způsobuje konvektivní neboli termální difuzi. Dochází tak k nechtěnému rozšiřování zón separovaných molekul a zmiňovanému neúplnému rozdělení. Pohyblivost iontů ve volném roztoku roste přibližně o 2 %/°C.<sup>5</sup> Vysoká teplota navíc může vést k degradaci některých molekul. Z těchto důvodů je třeba vznikající teplo minimalizovat či rozptýlit.<sup>6</sup> Jedním ze způsobů, jak toho dosáhnout, je použitím antikonvektivních činidel, jako je například celulóza či polyakrylamidový gel. Takováto separace biomolekul je však ve srovnání s jinými analytickými separačními technikami, např. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), zdlouhavá a málo efektivní.<sup>7</sup> Dalším způsobem rozptýlení vytvořeného tepla je použití trubiček nebo kapilár s menším průměrem.<sup>8</sup> Hjerten analyzoval široké spektrum vzorků od anorganických iontů a nukleotidů až po proteiny či viry v pufrem naplněných trubičkách o maximálním průměru několika milimetrů. Proudění tepla bylo navíc ovlivněno rotací trubiček kolem jejich podélné osy.<sup>4</sup>

Na počátku 80. let 20. století potvrdili Jorgenson a Lukacsová možnost vysokoúčinné elektroforetické separace zmenšením vnitřního průměru kapiláry.<sup>9,10</sup> V tomto případě se díky upravenému rozptylu tepla stala kapilára z borosilikátového skla o vnitřním průměru 75  $\mu\text{m}$  poprvé antikonvektivní. To umožnilo použití vysoké elektrické intenzity (100-500 V/cm) a vedlo k rychlé separaci (< 10 minut) s vysokou účinností ( $N > 10^5$ ).<sup>11</sup> V průběhu 80. a na počátku 90. let 20. století byly přístroje pro separaci pomocí CE přivedeny na trh společnostmi Microphoretics, Applied Biosystems, Beckman Coulter, Spectraphysics, Hewlett Packard a Waters.<sup>12,13</sup>

## 2.1.2. PRINCIPY SEPARACE

### 2.1.2.1. Elektroosmotický tok

Při CE se separované látky pohybují na základě různé elektroforetické mobility a migrují směrem k opačně nabitě elektrodě. Zároveň však dochází k pohybu základního elektrolytu kapilárou. Jedná se o elektroosmotický tok, který obvykle směřuje k záporně nabitě elektrodě. Síla elektroosmotického toku bývá větší než elektroforetická mobilita aniontů a elektrolyt tak strhává anionty s sebou směrem k detektoru. Nejrychleji kapilárou migrují kationty, neutrální částice nevykazují elektroforetickou mobilitu, pohybují se pouze vlivem elektroosmotického toku. Anionty jsou stále částečně přitahovány anodou, tato síla zpomaluje jejich pohyb oproti elektrolytu, procházejí proto kapilárou jako poslední. Částice s nejvyšší mobilitou jsou kationty malé velikosti, s vysokou hodnotou náboje, naopak malé anionty s velkým nábojem mají mobilitu nejnižší. Přítomnost elektroosmotického toku umožňuje separaci kationtů, aniontů i neutrálních analytů v rámci jedné analýzy.<sup>6</sup>

Vnitřní stěna kapiláry získává po styku s elektrolytem elektrický náboj. U teflonových kapilár vlivem adsorpce iontů obsažených v elektrolytu, u křemenných kapilár dochází při  $\text{pH} > 3$  k ionizaci silanolových skupin ( $\text{Si-OH}$ ) na negativně nabitě  $\text{SiO}^-$  skupiny. Tato ionizace může být iniciována například promytím kapiláry hydroxidem a následnou aplikací základního elektrolytu. Negativně nabitá stěna kapiláry přitahuje kationty pufru, které podél ní vytvářejí dvě vrstvy. Bližší vrstva je vázána výrazně pevněji než vrstva

vzdálenější a obě společně vytvářejí difuzní dvojvrstvu. Vzdálenější, mobilní vrstva kationtů se vlivem elektrického pole pohybuje směrem k záporné elektrodě. Kationty jsou solvované a při pohybu kapilárou s sebou strhávají molekuly pufru, čímž vzniká elektroosmotický tok.<sup>6</sup>

Elektroosmotický tok je úměrný zeta potenciálu a tím také tloušťce elektrické dvojvrstvy.<sup>14</sup> Zeta potenciál je dán rozdílem potenciálů na styku obou vrstev a můžeme ho vyjádřit vztahem (1):

$$\zeta = 4\pi\delta e/\varepsilon \quad (1)$$

kde  $\delta$  je tloušťka elektrické dvojvrstvy,  $e$  náboj na jednotku plochy povrchu,  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta pufru. Tloušťka dvojvrstvy je nepřímo úměrná koncentraci pufru, například 10 mmol/l koncentrace vede k tvorbě dvojvrstvy široké přibližně 1 nm.

Rychlost elektroosmotického toku je dána vztahem (2):

$$v_{EOF} = \varepsilon\zeta E/4\pi\eta \quad (2)$$

kde  $E$  je intenzita elektrického pole,  $\eta$  je viskozita pufru.

Elektroosmotickou mobilitu pufru vyjadřuje vztah (3):

$$\mu_{EOF} = \varepsilon\zeta/4\pi\eta \quad (3)$$

Ze vzorce (3) je patrné, že elektroosmotická mobilita závisí pouze na vlastnostech pufru.

Elektroosmotický tok lze ovlivnit několika způsoby. Zvýšením aplikovaného napětí, zvýšením hodnoty pH pufru či zvýšením teploty roste také elektroosmotický tok. Vyšší koncentrace nebo iontová síla pufru naopak jeho hodnotu snižuje. Vliv přísady

organického rozpouštědla závisí na tom, jakým způsobem působí na viskozitu, dielektrickou konstantu a zeta potenciál. Modifikace stěny kapiláry může snížit, odstranit nebo také obrátit směr elektroosmotického toku.<sup>6</sup>

### 2.1.2.2. Elektroforetická mobilita

Průtoková rychlost,  $v_{EP}$ , přímo úměrně závisí na elektroforetické mobilitě  $\mu_{EP}$  a intenzitě elektrického pole  $E$  podle vztahu (4):

$$v_{EP} = \mu_{EP} \cdot E \quad (4)$$

Elektroforetická mobilita je pro každý iont konstantní a je dána vztahem (5):

$$\mu_{EP} = q/6\pi\eta r \quad (5)$$

kde  $q$  je náboj iontu,  $r$  je efektivní poloměr iontu, kdy iont uvažujeme jako kulovitý útvar. Elektroforetická mobilita závisí pouze na vlastnostech pufru, ne na vlastnostech elektrického pole. Elektroforetická a elektroosmotická mobilita jsou analogické veličiny se shodnými jednotkami.

Zdánlivá rychlost pohybu vzorku je dána součtem elektroforetické a elektroosmotické mobility:

$$v_{OBS} = v_{EP} + v_{EOF} \quad (6)$$

Zdánlivou mobilitu vzorku charakterizuje následující vztah:<sup>6</sup>

$$\mu_{OBS} = \mu_{EP} + \mu_{EOF} \quad (7)$$

### 2.1.3. PARAMETRY SEPARACE

Mezi parametry elektroforetické separace řadíme migrační čas, účinnost separace, selektivitu a rozlišení.

Migrační čas je doba potřebná k průchodu analytu kapilárou od nadávkování po detekci:

$$t_m = lL/(\mu_{EP} + \mu_{EOF})V \quad (8)$$

kde  $l$  je efektivní délka kapiláry od jejího začátku po detektor,  $L$  je celková délka kapiláry,  $V$  je elektrické napětí.

Účinnost separace je dána počtem teoretických pater,  $N$ , podle vztahu (9):

$$N = (\mu_{EP} + \mu_{EOF})V/2D \quad (9)$$

kde  $D$  je difuzní koeficient analytu.

Selektivita je vyjádřena poměrem elektroforetických mobilit analytů:

$$\alpha = \mu_{EP1}/\mu_{EP2} \quad (10)$$

a její hodnota je vždy  $\geq 1$ .

Rozlišení udává, s jakou úspěšností byly složky vzorku separovány a je proto velmi důležitým separačním parametrem. Můžeme ho vypočítat z elektroforeogramu na základě vztahu (11):

$$R = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2) \quad (11)$$

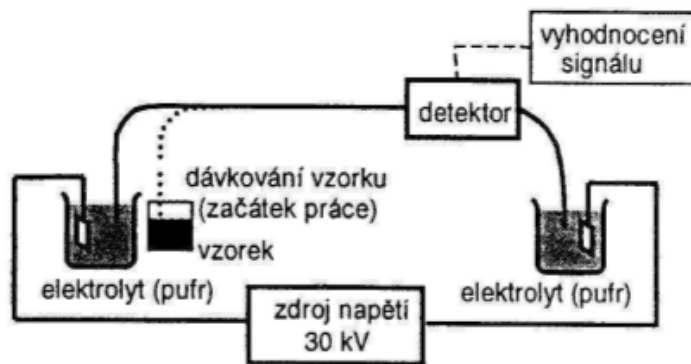
kde  $t$  jsou migrační časy analytů 1 a 2,  $w$  odpovídá šířce jejich píků u základny.

Zvýšením napětí a zkrácením kapiláry zkracujeme dobu analýzy. Zvyšováním aplikovaného napětí se také zvyšuje účinnost separace. Selektivita roste optimalizací pH a složení pufru. Rozlišení lze zlepšit zvýšením napětí, změnou pH a složení pufru, použitím delší kapiláry a optimalizací elektroosmotického toku.

Separace kapilární elektroforézou dosahují vysoké účinnosti. Použití kapilár s malým průměrem snižuje množství vznikajícího tepla a umožňuje jeho lepší rozptyl, což minimalizuje rozšiřování zón separovaných látek a vede k tvorbě úzkých píků. Různé typy kapilární elektroforézy umožňují analýzu širokého spektra vzorků.<sup>6</sup>

#### 2.1.4. INSTRUMENTACE

Hlavní součásti přístroje tvoří nádobka se vzorkem, dvě nádobky se základním elektrolytem, kapilára, detektor, zdroj vysokého napětí, dvě platinové elektrody a počítač snímající signál detektoru v čase. Schéma uspořádání znázorňuje následující obrázek.



Obr. 1 Schéma kapilární elektroforézy. Převzato z <sup>15</sup>.

Vstupní a výstupní nádobka a kapilára jsou na počátku separace naplněny základním elektrolytem, obvykle vodným roztokem pufru. Poté dochází k nástřiku vzorku do vstupní části kapiláry, která je více vzdálena od detektoru. Na kapiláru je vloženo napětí, jakmile jsou oba její konce umístěny v nádobkách s elektrolytem. Rozpuštěné látky se odlišnou rychlostí pohybují kapilárou směrem ke vzdálenější elektrodě, jsou detekovány a příslušná data jsou zpracována počítačem. Grafem závislosti signálu na čase je elektroforeogram, kde jednotlivé píky odpovídají separovaným látkám s různými migračními časy.<sup>6</sup>

#### **2.1.4.1. Vstupní a výstupní nádobka**

Obě nádobky jsou obvykle naplněny stejným pufrem, jehož složení je jedním z nejdůležitějších parametrů CE, i malé změny pH či koncentrace pufru mohou zapříčinit změnu migračního času. Hladina pufru v obou nádobkách by měla být na stejné úrovni. Použitý pufr je odváděn do odpadní nádoby. Při opakovaných analýzách bývá pufr v nádobkách a kapiláře automaticky vyměňován, aby se předcházelo změnám jeho složení.<sup>16</sup>

#### **2.1.4.2. Dávkování vzorku**

Vzorek je u CE dávkován ve chvíli, kdy kapilárou neproudí základní elektrolyt, čímž se tato metoda liší od HPLC nebo plynové chromatografie. K experimentům se používají pouze malé objemy látek, k jedné analýze stačí několik nanolitřů vzorku. Vstupní část kapiláry je přesunuta do nádoby se vzorkem a dochází k aplikaci vzorku, poté se kapilára vrací do vstupní nádoby s pufrem.

Dávkování vzorku je buď hydrodynamické nebo elektrokinetické. Využívá se zvýšeného tlaku, nebo naopak připojení výstupní nádoby k vakuu, další možností je posun nádoby se vzorkem do takové pozice, aby vzorek do kapiláry natekl, nebo vzorek putuje do kapiláry působením elektrického proudu. Hydrodynamické metody - pohyb vzorku působením gravitační síly a nástřik pod tlakem - poskytují reprodukovatelné výsledky, avšak vyžadují složitější instrumentaci než metody elektrokinetické. Ty jsou založeny na dočasném přemístění kapiláry spolu s elektrodou do nádoby se vzorkem. Výhodou je, že

ani doba pohybu elektrody, ani její přesná pozice v nádobce nemusí být reprodukovatelná. Zásadní je hodnota a doba aplikovaného napětí.<sup>6</sup> Problémem mohou být rozdíly v množství aplikovaných vzorků v důsledku rozdílné elektroforetické mobility. Huang et al. zavedli korekci pro dvě látky s různou mobilitou, faktor  $b$ :

$$b = (\mu_1 + \mu_{EOF}) / (\mu_2 + \mu_{EOF}) \quad (12)$$

kde  $\mu_1, \mu_2$  jsou elektroforetické mobility daných látek. Korekce spočívá v podílu příslušné plochy nebo výšky píku faktorem  $b$ .<sup>17</sup>

Odchyłka způsobená rozdílnou mobilitou složek vzorků není problematická, pokud jsou všechny vzorky rozpuštěny ve stejných roztocích o shodných koncentracích. V opačném případě můžeme například ke vzorkům přidat malé množství koncentrovaného nedetekovaného iontu, který zajistí všem vzorkům stejnou konduktivitu. Další možností je použití vnitřních standardů.<sup>18</sup>

V případě opakovaného elektrokinetického dávkování z malého zásobního množství velmi zředěného roztoku vzorku by při každém nástřiku mohlo být odděleno větší množství analytu s vyšší mobilitou, až by došlo k vyčerpání tohoto analytu ze vzorku. S tímto jevem se však setkáváme velmi zřídka.<sup>6</sup>

### **2.1.4.3. Zdroj napětí**

Napětí aplikované na kapiláru dosahuje až 30 kV, elektrický proud až 300  $\mu\text{A}$  a výkon až 6 W. Při separaci obvykle dochází k migraci molekul směrem ke katodě. V opačném případě je potřeba, aby u vstupu do kapiláry byla umístěna záporná elektroda a u výstupu elektroda kladná, jinak by vzorek neprocházel kapilárou, ale do vstupní nádoby. Aplikací vyššího napětí dosahujeme efektivní separace v kratší době a lepšího rozlišení.<sup>6</sup>



#### **2.1.4.4. Kapilára**

Dnes jsou pro separaci používány nejčastěji křemenné kapiláry zvenku zpevněné polyimidem (10-30  $\mu\text{m}$ ), dlouhé 30-100 cm, s vnitřním průměrem 50-75  $\mu\text{m}$  a vnějším průměrem 200-375  $\mu\text{m}$ .<sup>19</sup> Byly použity také kapiláry o vnitřním průměru 25  $\mu\text{m}$ ,<sup>20</sup> 12,7  $\mu\text{m}$ ,<sup>21</sup> 5 a 2  $\mu\text{m}$ .<sup>22</sup> Kapilárou prochází ultrafialové záření i viditelné světlo, detekce analytu je umožněna v místě s přerušenou vrstvou polyimidu. Okénko dlouhé přibližně 1-2 mm může být vytvořeno odříznutím nebo vypálením polyimidu plamenem o nízké teplotě. Skleněnou část je třeba očistit methanolem nebo acetonem a vysušit.<sup>6</sup> V některých případech se setkáváme také s kapilárami borosilikátovými a teflonovými.<sup>23</sup>

#### **2.1.4.5. Detektor**

Detekce v CE může probíhat na základě UV/Vis absorbance, fluorescence, laserem indukované fluorescence, hmotnostní spektrometrie, konduktivity, amperometrie, radiometrie či indexu lomu. Detekční limity se pohybují v rozmezí 1mg/L (ppm)-1 $\mu\text{g/L}$  (ppb). Lze použít také více detektorů následujících za sebou.

Nejčastější uplatnění nacházejí UV/Vis detektory. Světlo o intenzitě  $I_1$  dopadá na kapiláru, část světla je absorbována vzorkem. Kapilárou prochází světlo se sníženou intenzitou  $I_2$ , které je zachyceno fotodetektozem, obvykle fotodiodou. Transmittance je dána vztahem (13):

$$T = I_2/I_1 \quad (13)$$

Princip detekce je založen na Lambert-Beerově zákonu, který popisuje absorbanci vztahem (14):

$$A = \log 1/T \quad (14)$$

Fotodetektor měří intenzitu světla, která je poté převedena na hodnotu absorbance podle

vztahů (13) a (14). Množství absorbovaného záření závisí na typu chromoforu, vlnové délce záření, pH a složení pufru. Chromofor je část molekuly, která pohlcuje světlo. Tab. 1 uvádí běžně používané chromofory a vlnové délky, při kterých vykazují maximální absorbanci. Většina UV/Vis detektorů pracuje s vlnovými délkami v rozmezí 190-800 nm. UV záření přibližně odpovídají vlnové délky 190-350 nm, viditelnému světlu 350-800 nm.

Tab. 1 Absorpční maxima běžně používaných chromoforů.<sup>6</sup>

Chromofor	Absorpční maximum [nm]
Fenyl	202, 255
Naftyl	220, 275
Amin	195
Ethylen	190
Keton	195
Ester	205
Aldehyd	210
Karboxyl	200
Nitroskupina	220

Zdrojem záření v detektoru bývá deuteriová lampy. Bílé polychromatické světlo prochází mřížkou a dochází k difrakci na jednotlivé vlnové délky. Jednou z možností je přítomnost pohyblivé mřížky, která je natočena tak, aby štěrbinou procházelo a na kapiláru dopadalo monochromatické světlo s požadovanou vlnovou délkou. Dalším typem je detektor diodového pole (DAD), u něhož bílé světlo prochází nejprve kapilárou, až poté nepohyblivou mřížkou a následně dopadá na diodové pole obsahující 200-500 diod. Každá dioda zachycuje úzké rozpětí vlnových délek. Datový výstup z celého diodového pole lze získat do 40 milisekund. DAD detektor umožňuje vytvoření několika elektroforeogramů v rámci jednoho nadávkování vzorku. Píky obsahující více složek vykazují rozdílné migrační časy při různých vlnových délkách. Optimální absorbance není vždy absorbance maximální, v některých případech je vhodnější použít vlnovou délku, při které nedochází k absorpci interferující složkou vzorku, která proto nebude detekována. Identifikace píků

probíhá na základě srovnání se spektry a migračními časy standardů.<sup>6</sup>

### **2.1.5. DRUHY CE**

Mezi nejčastěji používané metody CE patří kapilární zónová elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární gelová elektroforéza (CGE), kapilární isoelektrická fokusace (CIEF) a kapilární isotachoforéza (CITP). Rozdílné metody poskytují různé výsledky separace.<sup>6</sup> Například separace antibiotik pomocí CZE a MEKC ukázala rozdílnou selektivitu.<sup>24</sup> CZE je vhodná pro separaci iontů různých velikostí a nábojů, kationty i anionty mohou být separovány v rámci jedné analýzy, nedochází však k separaci neutrálních analytů. K tomu slouží MEKC, kdy je k základnímu pufru přidán detergent. CGE rozděluje ionty na základě jejich velikosti, používá se například k analýze oligonukleotidů a DNA restrikčních fragmentů. Principem CIEF je rozdělení iontů podle isoelektrických bodů. Pro tento účel je v kapiláře vytvořen pH gradient, elektroosmotický tok je zastaven, proto nedochází k pohybu neutrálních částic. Tato metoda je vhodná ke studiu proteinů. CITP je speciálním druhem CE, kdy dochází k uzavření vzorku mezi dva pufrы, šířka zón je úměrná množství iontů ve vzorku. Někdy se CITP používá k prekoncentraci vzorku.<sup>6</sup>

#### **2.1.5.1. MEKC**

Terabe et al.<sup>25</sup> pojmenovali tuto techniku jako elektrokinetická separace, později byla nazvána elektrokinetickou chromatografií<sup>26</sup>, dnes je běžně používán název micelární elektrokinetická kapilární chromatografie.<sup>27</sup> MEKC spojuje separační mechanismus chromatografie s elektroforetickým a elektroosmotickým pohybem látek a roztoků. Přestože byla považována za druh chromatografie, je také typem elektroforézy. Výsledným grafem je v tomto případě elektrokinetický chromatogram. MEKC umožňuje separaci elektricky neutrálních sloučenin, byly separovány dokonce i velmi hydrofobní molekuly.<sup>28</sup>

K roztoku základního pufru je přidán detergent, jehož molekuly mají na jednom konci hydrofilní a na druhém hydrofobní skupinu. Detergent musí být přítomen v

koncentraci vyšší než je jeho kritická micelární koncentrace, která odpovídá agregačnímu číslu, při kterém dochází ke vzniku micely. Micely mají kulovitý tvar, hydrofilní skupiny molekul detergentu jsou uspořádány na povrchu, kde přicházejí do styku s vodným roztokem pufru. Hydrofobní části molekul směřují do centra micely.

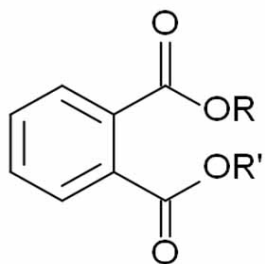
Princip metody spočívá v rozdělení vzorku mezi micely a základní elektrolyt. Hydrofobní molekuly vzorku se stávají součástí micel, zatímco hydrofilní molekuly rozpustné ve vodě jsou součástí elektrolytu. Molekuly částečně rozpustné ve vodě jsou rozděleny mezi micely a pufr, doba strávená v micelách je úměrná jejich hydrofobicitě. U MEKC rozlišujeme dvě fáze, vodnou a micelární, z nichž obě jsou mobilní. Hydrofilní částice jsou unášeny elektroosmotickým tokem a pohybují se kapilárou nejrychleji, zcela hydrofobní částice putují jako součást micel nejpomaleji ze všech elektroneutrálních molekul ve vzorku.<sup>6</sup>

Za účelem ovlivnění selektivity mohou být k roztoku základního elektrolytu a detergentu přidána další aditiva. Například separace karboxylových kyselin byla upravena přidáním tetraalkylamoniových solí k roztoku pufru a dodecylsulfátu sodného (SDS).<sup>24</sup> Aditivum může dokonce sloužit jako sekundární pseudofáze v případě, že je vzorek zachycován micelami a další hydrofobní fází. Velmi hydrofobní analyty, které by jinak prakticky celé přešly do micel a byly eluovány ve stejném čase, byly separovány pomocí MEKC s použitím cyklodextrinů (CD).<sup>28,29</sup> CD jsou oligosacharidy rozpustné ve vodě, nejpoužívanější z nich mají šest ( $\alpha$ -CD), sedm ( $\beta$ -CD) nebo osm ( $\gamma$ -CD) glukopyranosových jednotek spojených do tvaru prstence s hydrofilním vnějším povrchem a hydrofobní dutinou. CD jsou elektricky neutrální, migrují proto rychlostí elektroosmotického toku. Separace je dosažena vlivem rozdílné distribuce částic vzorku mezi micely v závislosti na hydrofobicitě a mezi CD v závislosti na možnosti zapadnout do hydrofobní dutiny a hydrofobicitě. CD-MEKC sloužila k separaci polychlorovaných bifenyly, isomerů tetrachlorodibenzo-p-dioxinu, polycyklických aromatických uhlovodíků<sup>28</sup>, isomerů benzopyrenu<sup>29</sup>, organo-olovnatých sloučenin i sloučenin organoselenia<sup>30</sup>.

## 2.2. FTALÁTY

Lidský organismus je v průběhu života vystavován celé řadě chemických látek. Tento dynamický proces je tak složitý, že jej můžeme jen těžko podrobně sledovat. Rozpoznání složitosti však vedlo k rostoucímu zájmu o zhodnocení rizik spojených s kumulativním charakterem některých látek včetně ftalátů.

Ftaláty jsou diestery 1,2-benzendikarboxylové kyseliny, neboli kyseliny ftalové.<sup>31</sup> Jejich struktura je zobrazena na Obr. 2. Řetězce R a R' se mohou lišit délkou a strukturou. Tyto rozdíly způsobují odlišné chemické a fyzikální vlastnosti jednotlivých ftalátů a ovlivňují jejich biologickou aktivitu.



Obr. 2 Základní struktura ftalátů.

### 2.2.1. VYUŽITÍ FTALÁTŮ

Ftaláty byly poprvé použity ve 20. letech 20. století<sup>32</sup> a od té doby slouží především jako změkčovadla v celé řadě průmyslových materiálů i spotřebního zboží.<sup>33</sup> Přibližně 93 % všech používaných změkčovadel tvoří ftaláty.<sup>34</sup> Vzhledem k tomu, že nejsou ve výsledném produktu vázány kovalentní vazbou, může docházet k jejich uvolňování a kontaminaci výrobků a životního prostředí.<sup>35</sup>

Nejčastěji komerčně využívané ftaláty jsou uvedeny v Tab. 2. Světová produkce těchto sloučenin dosahuje přibližně šesti milionů tun ročně, což vypovídá o jejich

důležitosti a o potřebě sledování jejich působení na lidský organismus.<sup>36</sup>

Tab. 2 Běžně užívané ftaláty.<sup>31,37</sup>

Název ftalátu	Zkratka	Sumární vzorec
Dimethyl ftalát	DMP	$C_{10}H_{10}O_4$
Diethyl ftalát	DEP	$C_{12}H_{14}O_4$
Diallyl ftalát	DAP	$C_{14}H_{14}O_4$
Di-n-propyl ftalát	DPP	$C_{14}H_{18}O_4$
Di-n-butyl ftalát	DBP	$C_{16}H_{22}O_4$
Butylbenzyl ftalát	BBP	$C_{19}H_{20}O_4$
Butyloktyl ftalát	BOP	$C_{20}H_{30}O_4$
Dicyklohexyl ftalát	DCHP	$C_{20}H_{26}O_4$
Di-n-hexyl ftalát	DHP	$C_{20}H_{30}O_4$
Di-n-oktyl ftalát	DOP	$C_{24}H_{38}O_4$
Diisoktyl ftalát	DIOP	$C_{24}H_{38}O_4$
Di-(2-ethylhexyl) ftalát	DEHP	$C_{24}H_{38}O_4$
Diisononyl ftalát	DINP	$C_{26}H_{42}O_4$
Diisodecyl ftalát	DIDP	$C_{28}H_{46}O_4$

Ftaláty zvyšují ohebnost plastů, jsou součástí mnoha výrobků. Množství ftalátů v plastovém materiálu může tvořit až 45 %<sup>38</sup>, podle některých zdrojů až 60 % hmotnosti<sup>31</sup> v závislosti na typu a způsobu využití produktu. Ftaláty s dlouhými řetězci (např. DEHP, DINP, BBP) našly uplatnění v produktech z polyvinylchloridu (PVC), jsou součástí stavebních materiálů, kabelů, oblečení, hraček, obalů potravin. Jídlo je považováno za hlavní zdroj těchto látek, kterému je populace vystavována.<sup>39</sup> Díky rozpustnosti v tucích

jsou nejvyšší koncentrace ftalátů zjišťovány v potravinách s vysokým podílem tuku. Ftaláty s krátkým řetězcem (např. DMP, DEP, DBP) se používají jako rozpouštědla, jako součást lepidel, laků, kosmetiky, parfémů,<sup>40</sup> dále například léků s postupným uvolňováním<sup>41</sup> a dalších produktů, slouží také jako aditiva v textilním průmyslu a při výrobě pesticidů.<sup>42</sup> Za jejich hlavní zdroj pro člověka se považují výrobky osobní péče a také ovduší ve vnitřních prostorech.<sup>39</sup>

Ftaláty jsou všudypřítomné v okolním prostředí. Setkáváme se také s jejich výskytem v povrchových, podzemních a pitných vodách, který souvisí s únikem z gumárenského a chemického průmyslu, skládek odpadu a průmyslových a městských čističek odpadních vod.<sup>43</sup>

### **2.2.1.1. PET**

Prodávané nápoje jsou nejčastěji baleny do lahví z polyethyltereftalátu (PET). PET lahve začaly před čtyřiceti lety postupně nahrazovat skleněné lahve a lahve z PVC.<sup>44</sup> Hlavními monomery PET jsou kyselina tereftalová (případně dimethyltereftalát) a ethylenglykol, vlastnosti polymeru mohou být ovlivněny začleněním dalších monomerů – dikarboxylových kyselin a diolů. První fází syntézy PET je esterifikace, reakce tereftalové kyseliny s ethylenglykolem za vzniku oligomeru a meziprojektu zvaného bis(hydroxyethyl)tereftalát (BHET). Druhá polykondenzační reakce probíhá za přítomnosti katalyzátoru obsahujícího antimon, germanium nebo titan. Ze vzniklého materiálu jsou tvarovány požadované lahve.<sup>45</sup>

Během výroby PET mohou nastat degradační reakce, vysoká teplota a přítomnost kyslíku může vyvolat termomechanické a termooxidační reakce.<sup>46</sup> Přítomnost vody v průběhu tavení může vést k hydrolyze PET.<sup>47</sup> Degradace vlivem teploty vede k uvolňování oligomerů a diethylenglykolu. Ve vzorcích PET vystavených teplotám 200-300°C byly analyzovány chemické látky jako oxid uhelnatý, aldehydy (formaldehyd, acetaldehyd, benzaldehyd), alifatické C1-C4 uhlovodíky, aromatické uhlovodíky (benzen, toluen,

ethylbenzen, styren), estery (vinylbenzen, methylacetát), methanol a acetofenon.<sup>48</sup> Teplotní stabilita PET závisí na druhu použitých monomerů.<sup>49</sup> Jako obalový materiál vyžaduje PET úpravu, která snižuje jeho propustnost pro plyny. Řešením pro PET lahve je například přídavek polyamidu MXD6. Lahve určené pro minerální vody obsahují látky odstraňující acetaldehyd, jedná se například o amid kyseliny anthranilové.<sup>44</sup>

Plastový materiál přicházející do kontaktu s potravinami či nápoji je kontrolován evropskou regulací číslo 10/2011, která zavádí seznam sloučenin povolených používat při výrobě takových plastů, mezi nimiž ftaláty nefigurují. Materiály jsou podrobovány migračním testům, celková migrace všech složek nesmí přesáhnout hodnotu 10 mg na dm<sup>2</sup> povrchu obalu. Některé látky včetně ftalátů navíc mají svůj specifický migrační limit: DBP 0,3 mg/kg; BBP 30 mg/kg; DEHP 1,5 mg/kg.<sup>50</sup> Bach et al.<sup>44</sup> uvádějí, že aditiva jako antioxidanty a změkčovadla včetně ftalátů nejsou při výrobě PET lahví potřebná. Kontaminace nápojů ftaláty může pocházet například z plnicích linek<sup>51</sup>, z těsnění ve víčkách<sup>52</sup>, ze zařízení pro úpravu vody<sup>53</sup> či z použitého recyklovaného materiálu<sup>44</sup>. Dalším zdrojem může být kontaminace vzorků v laboratoři při analýzách.<sup>54</sup> Provedené laboratorní studie nezaznamenaly vyšší než povolené hodnoty zmiňovaných ftalátů.<sup>44</sup>

Balená voda se stala symbolem pitné vody, která si zachovává čistotu jakožto přírodní minerální voda. V mnoha oblastech světa se stala jedinou dostupnou pitnou vodou. Balenou vodu lze rozdělit do několika kategorií podle původu, a to na přírodní minerální, pramenitou a upravenou vodu. Tyto tekutiny jsou pod kontrolou podle nařízení Evropské komise 2009/54/EC a 98/83/EC a podléhají chemickým analýzám a mikrobiologickému testování.<sup>55</sup>

Průmysl produkující balenou vodu deklaruje vysokou kvalitu prodáváného zboží, ta je však negativně ovlivňována několika faktory. Patří mezi ně uvolňování polutantů z nechráněných zemědělských a průmyslových oblastí, dále proces balení, kdy se z plastových nádob na skladování a z plastového potrubí mohou uvolňovat některé složky přímo do vody a také podmínky skladování a materiál plastových lahví.<sup>55</sup> V některých



případech se původ látek analyzovaných v pitné vodě z PET lahví nepodařilo zjistit.<sup>44</sup>

### 2.2.2. ZPŮSOBY EXPOZICE

Rozlišujeme různé způsoby expozice člověka ftalátům, prvotní nastává v průběhu nitroděložního vývoje, další je orální expozice požitím kontaminovaných potravin či nápojů a prostřednictvím hraček a kousátek pro děti. K dermální expozici dochází použitím kosmetiky. Ftaláty také inhalujeme prostřednictvím PVC, laků na nehty, sprejů na vlasy, další možností je parenterální expozice spojená s lékařským vybavením.<sup>40</sup>

### 2.2.3. TOXICITA FTALÁTŮ

Ftaláty mohou nahrazovat nebo blokovat endogenní hormony člověka, tedy působit jako endokrinní disruptory. *In vivo* testování potvrdilo tento efekt u DBP, DEHP, BBP, DEP a DHP.<sup>56</sup> Studie naznačují toxicitu pro reprodukci a vývoj už při vystavení nízkým dávkám ftalátů.<sup>57,58</sup> Lidský plod a novorozenec je vzhledem k probíhající buněčné diferenciaci a nevyvinutým metabolickým systémům obecně náchylnější k hormonálně aktivním látkám než dospělý člověk.<sup>59</sup>

U potkanů samčího pohlaví vyvolalo prenatální vystavení DBP, DEHP a BBP soubor vývojových vad pohlavního ústrojí nazývaný ftalátový syndrom.<sup>60</sup> Expozice ftalátům již od velmi nízkého věku může narušit vývoj dítěte a prostřednictvím trvalých epigenetických změn vést ke zvýšenému riziku kardiometabolických poruch v dospělosti.<sup>61</sup> *In vitro* a *in vivo* studie ukázaly, že ftaláty a jejich metabolity vystupují jako antagonisté hormonů štítné žlázy a mužských pohlavních hormonů, mohou působit na receptory aktivované proliferátory peroxisomů (PPARs) – skupinu jaderných receptorů, které hrají klíčovou roli při tvorbě adipocytů, akumulaci lipidů a při inzulinové rezistenci. Tyto skutečnosti vedly ke spojení ftalátů s rozvojem obezity a diabetu. Objevuje se navíc další možné spojení, a to s kardiovaskulárními onemocněními.<sup>62</sup>

Studie prováděné převážně na potkanech a myších naznačují, že ftaláty s nižší molekulovou hmotností mohou být dráždivé pro oči, nos a krk, větší molekuly mohou způsobovat poškození jater, ledvin a reprodukčních orgánů a vznik onkologických onemocnění.<sup>50</sup> Ftaláty mohou poškozovat testikulární tkáň, inhibovat tvorbu spermatu, zvyšovat riziko onemocnění rakovinou prsu.<sup>63</sup>

#### **2.2.4. METABOLISMUS A ROZKLAD FTALÁTŮ**

Ftaláty jsou v lidském těle rychle metabolizovány hydrolýzou na monoestery, které jsou vylučovány močí ve volné formě nebo konjugované s glukuronidem. Monoestery mohou být dále metabolizovány a vyloučeny jako sekundární oxidované metabolity (alkoholy, ketony a karboxylové kyseliny) konjugované s glukuronidem.<sup>64</sup> Poločas eliminace je kratší než 24 hodin.<sup>65</sup> Metabolity mohou být toxičtější než samotné ftaláty. U savců včetně člověka je DEHP hydrolyzován na mono-(2-ethylhexyl) ftalát (MEHP) a 2-ethylhexanol, který je dále oxidován na 2-ethylhexanovou kyselinu. MEHP je toxičtější než DEHP.<sup>66</sup>

Analýzy spočívají v testování množství monoesterů a jejich metabolitů v moči, avšak výsledky svědčí pouze o vystavení ftalátům v několika posledních hodinách, maximálně dnech.<sup>39</sup> Detekovatelné množství ftalátů bylo nalezeno také v plodové vodě a pupečnickové krvi i dalších tělních tekutinách člověka. Například analýzu mateřského mléka komplikují obsažené hydrolizační enzymy, které by v případě kontaminace vzorku mohly příslušné diestery metabolizovat a vést k falešným výsledkům.<sup>67</sup>

Ftaláty vyskytující se v životním prostředí mohou podléhat hydrolýze, fotodegradaci a biodegradaci.<sup>68</sup> Rychlost hydrolyzačních reakcí je v tomto případě velmi nízká, nehrají proto příliš důležitou roli.<sup>69</sup> Fotodegradace prostřednictvím volných radikálů se uplatňuje v atmosféře a její předpokládaný poločas je přibližně 1 den.<sup>68</sup> Biodegradace probíhá v povrchových vodách, půdě a sedimentu, využívá se jí ale také při čištění odpadních vod.

Ftaláty s vyšší molekulovou hmotností se snadno adsorbují do půdy a sedimentů, protože jsou velmi málo rozpustné ve vodě, což je hlavní faktor ovlivňující biodegradaci. Avšak ve spojení s humusem se jejich rozpustnost zvyšuje a podíl v půdě naopak snižuje.<sup>70</sup> Ftaláty jsou degradovány bakteriemi včetně aktinomycet při aerobních i anaerobních podmínkách, rychlost závisí na délce postranních řetězců.<sup>31</sup> Bylo zjištěno, že DEHP je nejstabilnější a nejstálější polutant z ftalátů<sup>71</sup>, po inkubaci při pokojové teplotě po dobu šesti měsíců bylo v půdě stále přítomno 75-90 % DEHP.<sup>72</sup> Pro snížení koncentrace DEHP v kalech odpadních vod jsou vhodné aerobní podmínky a zvýšená teplota.<sup>73</sup>

### 2.2.5. REGULACE

Toxicita ftalátů byla a stále je předmětem veřejného zájmu a mnoha diskuzí. Někteří považují ftaláty za hrozbu pro lidské zdraví a životní prostředí, jiní argumentují tím, že používání nízkých koncentrací je spojeno s minimálním rizikem.<sup>31</sup>

Některé ftaláty byly označeny za potenciálně rizikové pro lidské zdraví a pro životní prostředí mnoha národními i mezinárodními organizacemi. Následujících šest ftalátů je na seznamu hlavních znečišťujících látek americké Agentury pro ochranu životního prostředí (USEPA): DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DOP. Evropská agentura pro chemické látky (ECHA) zařadila od roku 2008 na kandidátní listinu látek vzbuzujících mimořádné obavy osm ftalátů: diisopentyl ftalát, di-n-pentyl ftalát, DHP, DEHP, bis-(2-methoxyethyl) ftalát, diisobutyl ftalát, BBP, DBP. Ty by měly podléhat autorizaci v rámci směrnice REACH (registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek).<sup>74</sup>

Aktuální nařízení 2015/326/EU potvrdilo dosavadní omezení použití DEHP, DBP a BBP jako součást PVC a dalších plastů ve všech hračkách a výrobcích pro děti, tyto ftaláty nesmí tvořit více než 0,1 % hmotnosti. Množství DINP, DIDP a DNOP v hračkách a výrobcích pro děti, které mohou vkládat do úst, nesmí taktéž překročit 0,1 % hmotnosti. Používání DEHP, DBP a BBP při výrobě kosmetických výrobků bylo zakázáno, když byly

tyto látky nařízením Evropské komise 2004/93/CE označeny jako karcinogenní, mutagenní a toxické pro reprodukci.<sup>34</sup>

Do roku 2010 byl DEHP nejčastěji přidávaným změkčovadlem do výrobků z PVC používaných v lékařství. Evropská směrnice 2007/47/CE však zakázala použití DEHP při výrobě těchto předmětů. Výrobci byli nuceni rychle najít vhodnou alternativu a zároveň zachovat pružnost trubiček pro výživu, dialyzačních katetrů, infuzních setů a dalších. Pro studium bezpečnosti nově používaných chemických látek, včetně míry jejich uvolňování z plastů do různých matric a míry expozice těmto alternativním látkám i jejich metabolitům, je třeba zvolit či vyvinout spolehlivé analytické metody.<sup>75</sup> Alternativami ftalátových změkčovačů mohou být například adipáty, benzoáty, citráty, cyklohexandikarboxylové kyseliny, epoxidované oleje, organofosfáty.<sup>76</sup> DEHP nahradily látky jako diisononyl ftalát, diisononylcyklohexan-1,2-dikarbonylát, trioktyltrimelitát, diethylhexyl tereftalát, diethylhexyl adipát, acetyltri-n-butyl citrát.<sup>75</sup>

Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovil tolerovatelný denní příjem (TDI) pro BBP na 500 µg/kg tělesné hmotnosti/den; pro DBP na 10 µg/kg tělesné hmotnosti/den a pro DEHP na 50 µg/kg tělesné hmotnosti/den.<sup>50</sup> Celkový tolerovatelný denní příjem ftalátů (TTDI) činí 300 µg/kg tělesné hmotnosti/den. Maximální limit pro DEHP v pitné vodě stanovila USEPA na 6 ng/ml.<sup>31</sup>

### **2.2.6. ANALÝZA**

Díky své těkavosti a termostabilitě jsou ftaláty nejčastěji analyzovány pomocí plynové chromatografie (GC) a detekovány hmotnostní spektrometrií (MS).<sup>77</sup> V posledních letech se k separaci ftalátů využívá také HPLC<sup>78</sup> a CE<sup>34,79,80</sup>. Výhody CE spočívají v rychlosti analýz, nižší spotřebě reagentů a vzorků, vyšší efektivitě a jednoduché metodice. MEKC je vhodná k analýze elektricky neutrálních sloučenin, v některých případech byla použita také mikroemulzní elektrokinetická chromatografie (MEEKC), kdy mikroemulze obsahuje surfaktanty, olej a kosurfaktanty.<sup>81</sup>

Citlivost a selektivita přístrojů nedovoluje analyzovat přítomnost velmi nízkých koncentrací ftalátů. Migrace ftalátů z plastů může být velmi pomalá a jejich množství ve vzorku může být proto pouze stopové, avšak ne zanedbatelné. Z tohoto důvodu byly použity různé metody prekoncentrace vzorků: extrakce z kapaliny do kapaliny, extrakce na pevné fázi, mikroextrakce na pevné fázi, mikroextrakce kapalinou, disperzivní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny, „cloud point“ extrakce.<sup>82</sup> Pro zlepšení citlivosti sloužily také on-line prekoncentrační techniky jako zakoncentrování s využitím elektrokinetického dávkování, zakoncentrování vzorku z velkého objemu či „sweeping“.<sup>83,84</sup>

Separální technika „solvent sublation“ je vhodná pro separaci a zakoncentrování stop hydrofobních sloučenin z vodných vzorků o velkém objemu do malého množství organického rozpouštědla. Hydrofobní molekuly ftalátů byly nejprve zachyceny na povrchu bublinek dusíku, který byl zaváděn do vodné fáze a poté přecházely do organické fáze n-hexanu.<sup>85</sup>

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. CHEMIKÁLIE

Pro analýzu byly použity standardy bis(2-ethylhexyl) ftalát (DEHP), dibutyl ftalát (DBP), didecyl ftalát (DDP) a dipropyl ftalát (DPP). Jako vnitřní standard byl použit anastrozol. K promytí kapiláry byl použit roztok Brij.

K přípravě vzorků a elektrolytů byl použit acetonitril (99,8%), deoxycholát sodný (SDC), dodecylsulfát sodný (SDS), ethanol, hydroxid sodný, chlorid sodný, kyselina boritá, kyselina fosforečná (85%), methanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol a destilovaná a deionizovaná voda. Dále byla použita aditiva  $\alpha$ -cyklodextrin,  $\alpha$ -cyklodextrin sulfatovaný,  $\beta$ -cyklodextrin sulfatovaný, dimethyl- $\beta$ -cyklodextrin, karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin sodný,  $\gamma$ -cyklodextrin sulfatovaný, (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -cyklodextrin.

Chemikálie byly zkoupeny u firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

### 3.2. PŘÍSTROJE A MATERIÁL

Experimenty byly provedeny pomocí kapilární elektroforézy s automatickým systémem pro nástřik vzorku a UV-Vis detektorem diodového pole DAD (HP<sup>3D</sup> CE, Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). K řízenému zakoncentrování vzorků sloužil koncentrátor LabEva (Labicom, ČR). Pro extrakci pevným sorbentem byly využity kolonky Spe-ed<sup>TM</sup> SPE Cartridges Octadecyl C18/18% (500 mg/3ml). Lahve z polyethylentereftalátu (PET) o objemu 1,5 l byly získány od lokálního dodavatele.

Při práci byly dále použity následující přístroje: analytické váhy Mettler Toledo AX205, magnetická míchačka Mono Variomag, minitřepačka IKA MS3, pH-metr inoLab 7110.

### 3.3. PŘÍPRAVA ROZTOKŮ ZÁKLADNÍCH ELEKTROLYTŮ

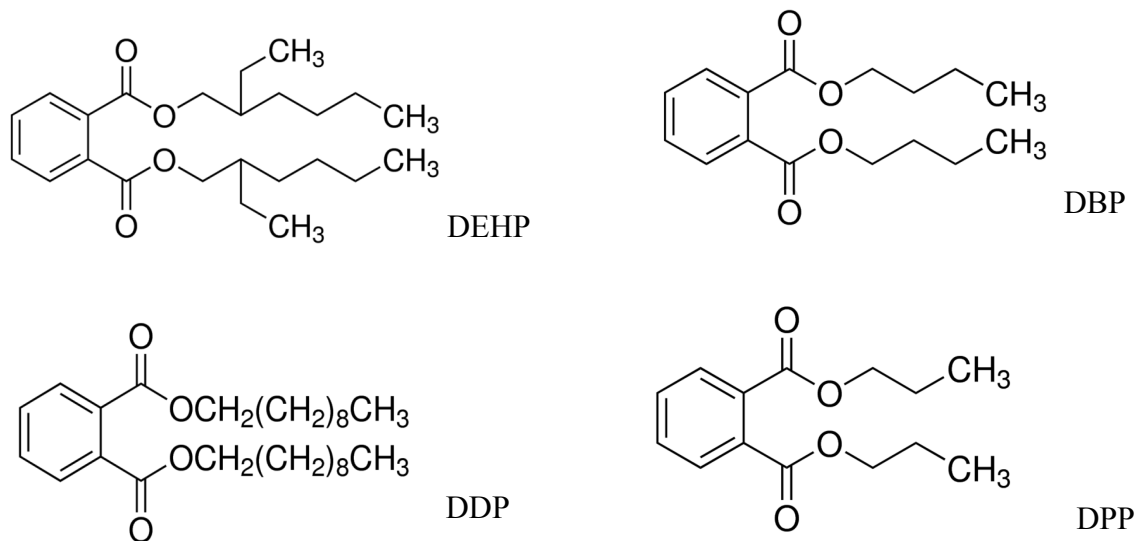
Pro studium chování vybraných ftalátů a stanovení optimálních podmínek separace pomocí kapilární elektroforézy bylo připraveno více druhů základních elektrolytů. 50 mM kyselina boritá a 50 mM kyselina fosforečná byla připravena smícháním odpovídajícího množství kyseliny a deionizované vody. Vzniklý roztok kyseliny borité byl za stálého míchání pomocí pH-metru titrován roztokem hydroxidu sodného do výsledného pH 8,0;8,5; 9,0;9,5 a 10,0. pH roztoku kyseliny fosforečné bylo obdobně upraveno titrováním na hodnotu 7,5. Vzhledem k neutrálnímu charakteru analytu byl k roztokům elektrolytů přidán roztok SDS či SDC o koncentraci 25, 50, 100 a 200 mmol/l. Roztoky vznikly smícháním odpovídajícího množství soli a deionizované vody.

K elektrolytu byl přidávány následující cyklodextriny:  $\alpha$ -cyklodextrin,  $\alpha$ -cyklodextrin sulfatovaný,  $\beta$ -cyklodextrin sulfatovaný, dimethyl- $\beta$ -cyklodextrin, karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin sodný,  $\gamma$ -cyklodextrin sulfatovaný, (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -cyklodextrin. Výsledná koncentrace cyklodextrinu v roztoku elektrolytu činila 2, 5 a 10 mg/ml.

Dále byl k elektrolytu přidán: acetonitril, ethanol, methanol, 1-propanol, 2-propanol a 1-butanol o výsledné koncentraci 1-40 % (v/v).

### 3.4. PŘÍPRAVA STANDARDNÍCH ROZTOKŮ STUDOVANÝCH LÁTEK

Standardní roztoky DEHP, DBP, DDP a DPP o koncentraci 10 mg/ml byly připraveny smícháním zakoupených standardů s methanolem v čistotě pro LC-MS v mikrozkušnicích. Strukturu studovaných ftalátů znázorňuje následující obrázek.



Obr 3 Vzorce studovaných ftalátů.

### 3.5. PŘÍPRAVA A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ

Bylo připraveno sedm vzorků o objemu 2l:

- destilovaná voda - „standard“
- destilovaná voda s přidavkem 100 μl 85% kyseliny fosforečné - „kyselé voda“
- destilovaná voda s přidavkem 100 μl 50% hydroxidu sodného - „zásaditá voda“
- 0,1 mol/l roztok chloridu sodného - „roztok s definovanou iontovou silou“
- 0,1 mol/l roztok chloridu sodného o výsledném pH 3 – upraveno přidavkem kyseliny fosforečné - „okyselený roztok s definovanou iontovou silou“
- 0,1 mol/l roztok chloridu sodného o výsledném pH 9 – upraveno přidavkem hydroxidu sodného - „zásaditý roztok s definovanou iontovou silou“
- 0,05 mol/l vodný roztok SDS - „model lipofilního aditiva ve vodě“

Do připravených PET lahví (Obr. 4) byl odměřen vždy 1 litr vzorku, každým vzorkem byly naplněny dvě lahve, dohromady tedy bylo použito 14 lahví. PET lahve se vzorky byly



uchovány při laboratorní teplotě po dobu šesti týdnů.



Obr. 4 Fotografie PET lahví použitých k experimentu.

Pro prekoncentraci analytů ve výluzích z plastů byla použita metoda extrakce na pevné fázi. Roztok z každé lahve byl aplikován na jednorázovou kolonku se sorbentem C18, průtok byl zajištěn připojením k vakuu. Sorbent s navázaným analytem byl promyt 3 ml destilované vody a následně eluován 3 ml acetonitrilu. Druhý stupeň prekoncentrace byl proveden pomocí koncentrátoru připojeného ke zdroji dusíku, kdy došlo ke snížení objemu vzorků na 1 ml. Takto připravené vzorky byly uskladněny při teplotě 4°C do doby, než byly použity k samotným analýzám.

### **3.6. INSTRUMENTACE A EXPERIMENTÁLNÍ PODMÍNKY**

Experimenty byly prováděny na přístroji pro kapilární elektroforézu HP<sup>3D</sup> CE s UV-VIS detektorem diodového pole DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) (Obr. 5). Detekce probíhala při vlnové délce 200 nm. Signál z detektoru byl zpracován pomocí Agilent 35900E dvoukanalovým A/D převodníkem (Agilent Technologies).

Byla použita křemenná kapilára (Polymicro Technologies, USA) s vnitřním

průměrem 50  $\mu\text{m}$  a vnějším průměrem 365  $\mu\text{m}$ . Celková délka kapiláry  $L = 34 \text{ cm}$ , efektivní délka kapiláry  $l = 25 \text{ cm}$ . Kazeta s kapilárou byla temperována na  $25^\circ\text{C}$ .

Nová kapilára byla promyta 1 mol/l roztokem NaOH po dobu 10 minut, deionizovanou vodou 20 minut a základním elektrolytem 10 minut. Před analýzou byla kapilára promývána 2 minuty 1 mol/l roztokem NaOH, 2 minuty deionizovanou vodou, 2 minuty roztokem Brij (1% v deionizované vodě), 1 minutu roztokem polyvinylalkoholu (1% v deionizované vodě) a 3 minuty základním elektrolytem.

Dávkování vzorků probíhalo po dobu 5s pod tlakem 50 mbar. Aplikované separační napětí činilo 20 kV. Každá analýza byla prováděna třikrát, pokud není uvedeno jinak.



Obr. 5 Fotografie přístroje HP<sup>3D</sup> CE, Agilent Technologies.

## **4. VÝSLEDKY A DISKUSE**

### **4.1. OPTIMALIZACE EXPERIMENTÁLNÍCH PODMÍNEK**

Pro separaci DEHP, DBP, DDP a DPP byly nejprve studovány podmínky separace tak, aby došlo k úplnému oddělení všech čtyř látek. Zároveň byl ke směsi přidán anastrozol jako interní standard. Všechny zmíněné látky jsou elektroneutrální, a proto byla pro jejich separaci vybrána micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). V rámci optimalizace byl studován vliv pH, vliv typu micelotvorného aditiva, koncentrace obou micelotvorných aditiv, vliv přídavku cykloextrinu a organického rozpouštědla.

#### **4.1.1. Volba vhodného pH elektrolytu**

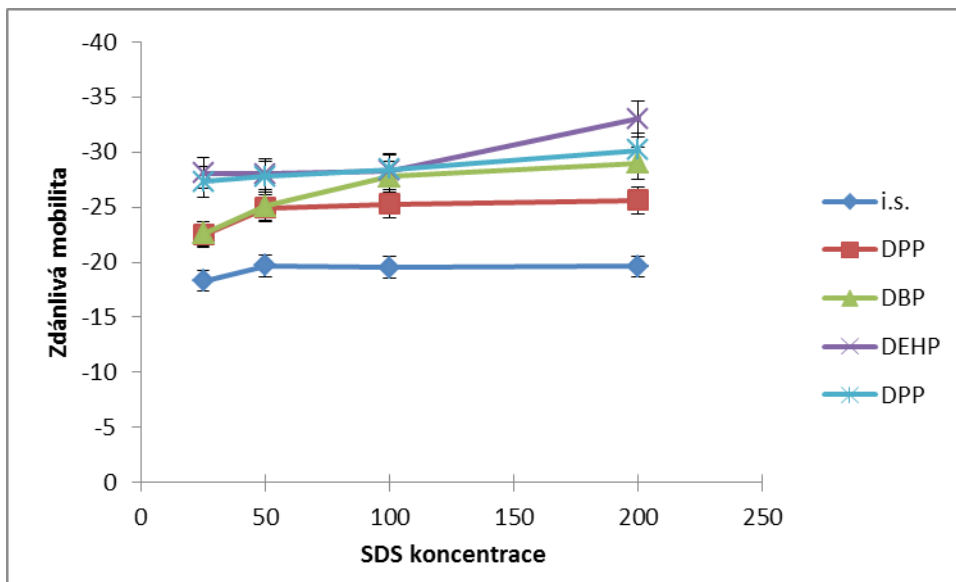
Vliv pH v případě MEKC neutrálních látek by neměl být zásadní, přesto byly testovány následující pufrů: 50 mM fosfát/NaOH pH 7,5 a 50 mM borát/NaOH pH 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 a 10,0. Ve všech případech byl k pufrům přidán 50 mM SDS. Migrace neutrálních látek byla pozorována v borátu o pH > 8,0, přičemž nedošlo k úplné separaci všech analyzovaných látek. Vliv pH na separaci látek nebyl pozorován. Z tohoto důvodu byl pro další studium vybrán 50 mM borát/NaOH o pH 9,5.

#### **4.1.2. Výběr vhodného micelotvorného aditiva**

V dalším kroku byl studován efekt micelotvorného aditiva. Byly vybrány dvě látky: SDS a SDC. SDS vytváří „klasické“ micely kulovitého charakteru, zatímco deoxycholát má planární strukturu a může tak interagovat lépe s ftalátovou skupinou analyzovaných látek. Koncentrace 50 mM SDS a 50 mM SDC byly testovány jako výchozí. V obou případech došlo k migraci analytů, nicméně nedošlo k úplné separaci analyzovaných látek. Z tohoto důvodu byla optimalizována koncentrace jednotlivých aditiv.

#### 4.1.3. Studium koncentrace SDS

Nejprve byla studována koncentrace SDS. Byly připraveny roztoky o koncentracích 25, 50, 100 a 200 mmol/l v 50 mM borátu/NaOH pH 9,5. Na následujícím obrázku je uvedena závislost zdánlivých mobilit jednotlivých analytů na koncentraci SDS.

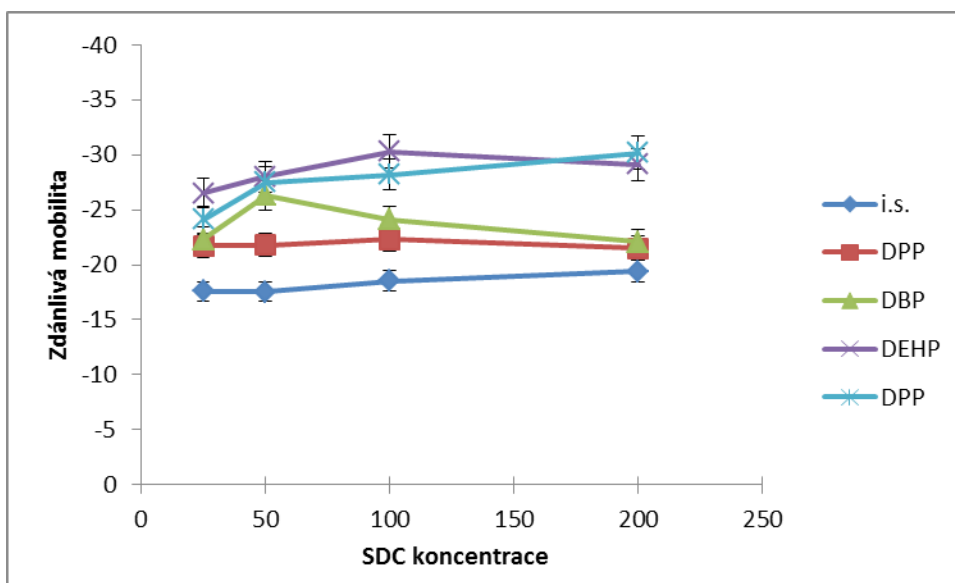


Obr. 6 Vliv koncentrace SDS (v mM) na zdánlivou mobilitu analyzovaných látek (mobilita v  $10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Je vidět, že s rostoucí koncentrací dochází k oddělení některých analytů, nicméně nedochází k úplné separaci. Koncentrace 200 mM SDS je limitní, protože již při 100 mM SDS dochází k obrovskému nárůstu elektrického proudu, který prochází kapilárou. Díky tomu dochází k nekontrolovanému generování Jouleova tepla a tím k destabilizaci analýz.

#### 4.1.4. Studium koncentrace SDC

Dále byla studována koncentrace SDC. Byly připraveny roztoky o koncentracích 25, 50, 100 a 200 mmol/l v 50 mM borátu/NaOH pH 9,5. Na následujícím obrázku je uvedena závislost zdánlivých mobilit jednotlivých analytů na koncentraci SDC.



Obr. 7 Vliv koncentrace SDC (v mM) na zdánlivou mobilitu analyzovaných látek (mobilita v  $10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Je vidět, že se změnou koncentrace dochází k oddělení některých analytů, nicméně nedochází k úplné separaci.

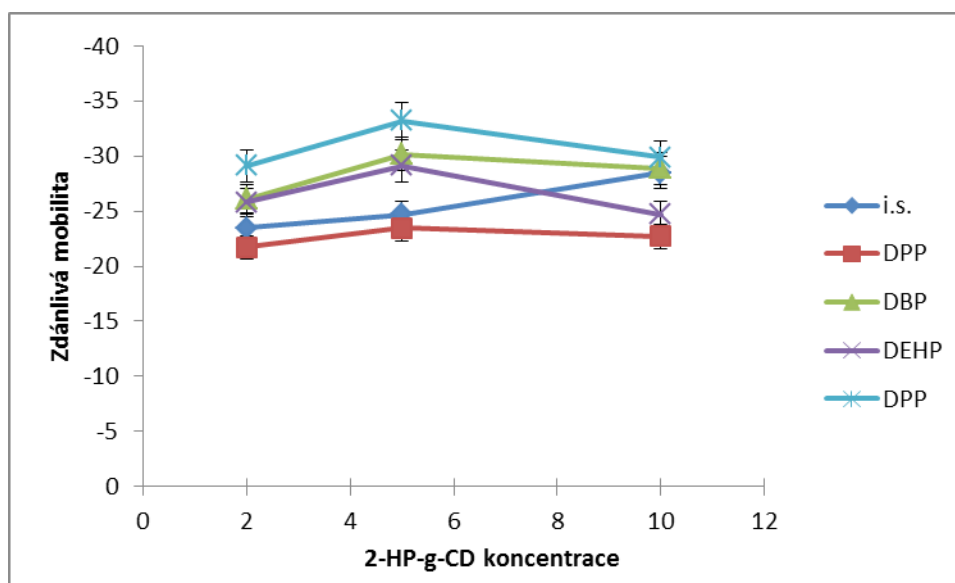
#### 4.1.5. Studium duálního systému SDS a SDC

Jelikož samotný přídavek SDS ani přídavek SDC nevedl k úplné separaci, byla dále studována možnost použití systému s oběma micelotvornými aditivami zároveň. Byly zvoleny poměry SDS a SDC 1:1, 1:2 a 2:1 (koncentrace 25 mM : 25 mM, 25 mM : 50 mM a 50 mM : 25 mM) v 50 mM borátu/NaOH pH 9,5. Ve všech testovaných případech se opět nepodařilo analyty rozseparovat. Navíc analýzy v duálním systému nebyly příliš opakovatelné, proto bylo od použití tohoto systému upuštěno.

#### 4.1.6. Studium vlivu přídavku cyklodextrinu

Další možnost ovlivnění selektivity separace v případě MEKC představuje přídavek vhodného aditiva, které umožní ovlivnění selektivity pomocí další interakce nebo pomocí

změny rozdělovacího koeficientu. V tomto případě byl testován přírůdek cyklodextrinů, které mohou interagovat s ftaláty. Jako modelové cyklodextriny byly zvoleny následující:  $\alpha$ -cyklodextrin,  $\alpha$ -cyklodextrin sulfatovaný,  $\beta$ -cyklodextrin sulfatovaný, dimethyl- $\beta$ -cyklodextrin, karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin sodný,  $\gamma$ -cyklodextrin sulfatovaný, 2-(hydroxypropyl)- $\gamma$ -cyklodextrin. Byly studovány koncentrace cyklodextrinů 2, 5 a 10 mg/ml za použití 50 mM borátu/NaOH pH 9,5 s 50 mM SDS a dále za použití 50 mM borátu/NaOH pH 9,5 s 50 mM SDC. V případě SDC nedošlo k výraznému zlepšení selektivity ani v jednom případě přírůdku CD. V některých případech nebyla vůbec pozorována separace analyzovaných ftalátů. V případě SDS došlo k nejlepšímu ovlivnění selektivity v případě použití  $\gamma$ -cyklodextrinů, zejména 2-(hydroxypropyl)- $\gamma$ -cyklodextrinu (2-HP- $\gamma$ -CD). Vliv koncentrace 2-HP- $\gamma$ -CD na zdánlivou mobilitu analytů je uveden na následujícím obrázku.

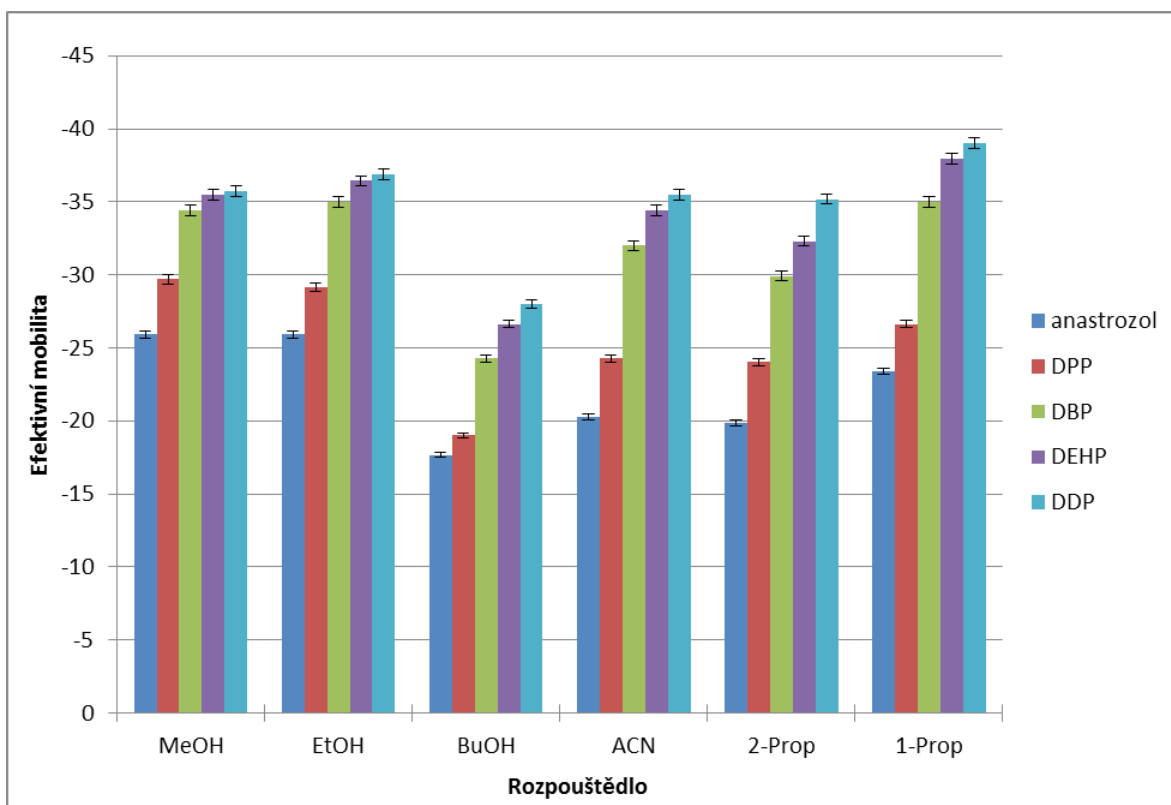


Obr. 8 Vliv koncentrace 2-HP- $\gamma$ -CD (v mg/ml) na zdánlivou mobilitu analyzovaných látek (mobilita v  $10^{-9} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ ).

Z obrázku je opět patrné, že přírůdek 2-HP- $\gamma$ -CD zlepšuje separaci ftalátů, nicméně stále není separace ideální. Proto byl jako další efekt studován vliv přírůdku organického rozpouštědla.

#### 4.1.7. Studium vlivu přidavku organického rozpouštědla

Jak již bylo uvedeno, jako další byl studován vliv přidavku organického rozpouštědla při použití 50 mM borátu/NaOH pH 9,5 s 50 mM SDS. K elektrolytu byl přidáván acetonitril, ethanol, methanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol o koncentracích od 1 % do 40 % (v/v) a byl sledován vliv jejich přítomnosti na výsledek separace. Na následujícím obrázku je srovnání separace studovaných látek a interního standardu v prostředí zmíněných rozpouštědel, každé o koncentraci 10 % (v/v).

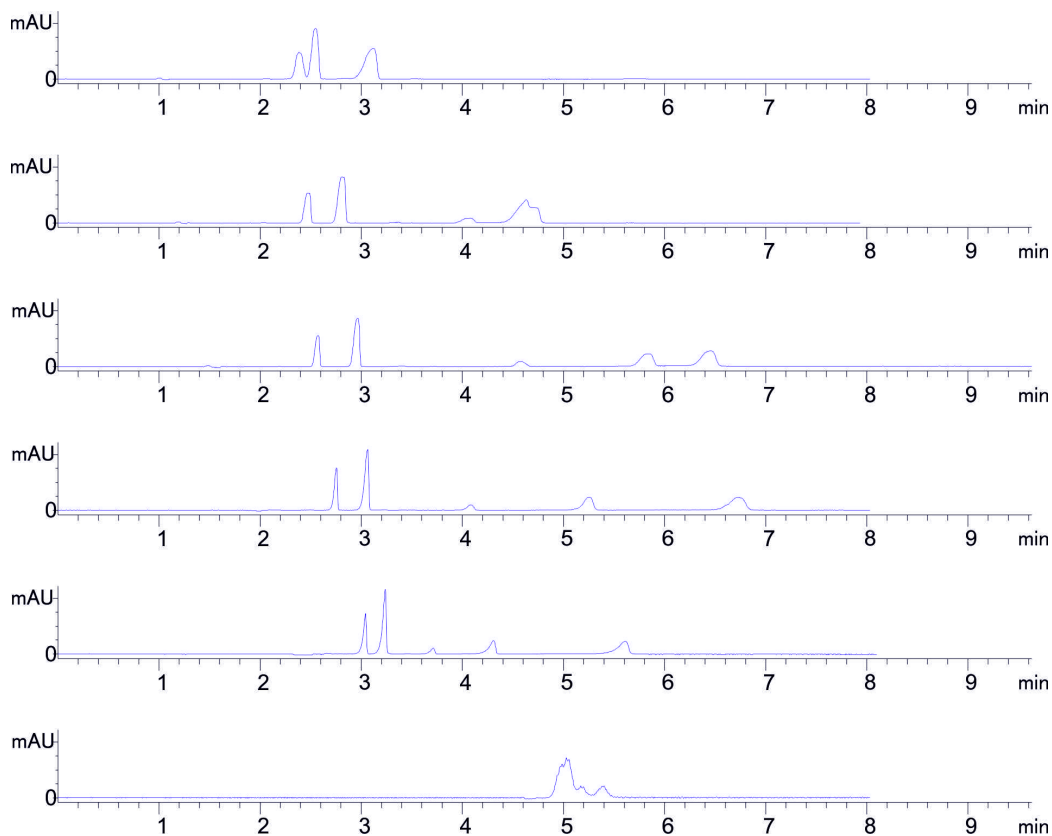


Obr. 9 Vliv přidavku organického rozpouštědla na efektivní mobilitu analytů (mobilita v  $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ).

Z obrázku je patrné, že nejlepší separace bylo dosaženo s použitím 1-propanolu a 2-propanolu. 2-propanol byl testován dále, protože s jeho použitím bylo dosaženo menší

doby analýzy než v případě 1-propanolu a zároveň poskytoval nejvyšší rozlišení.

Dále byl studován vliv koncentrace 2-propanolu (1, 5, 10, 15, 20 a 40 %, v/v) na separaci standardů ftalátů – viz následující obrázek.



Obr. 10 Vliv koncentrace 2-propanolu na separaci analytů.

Koncentrace shora: 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 40 %.

Ze získaných dat je patrné, že koncentrace 10 – 20 % (v/v) poskytují separaci všech zmíněných ftalátů a zároveň i interního standardu. Jako nejlepší byl zvolen 20 % (v/v) 2-propanol.

Ve výsledném pufru (50 mM borát/NaOH pH 9,5, 50 mM SDS, 20 % 2-propanol) byla provedena identifikace pořadí migrace analytů a interního standardu. Analyty migrují v pořadí: anastrozol, DPP, DBP, DEHP a DDP.



## 4.2. ČÁSTEČNÁ VALIDACE METODY

Pro stanovení množství ftalátů je nutné metodu MEKC alespoň částečně validovat. V rámci této práce byly studovány parametry jako je opakovatelnost migračních časů, opakovatelnost ploch píků, výtěžnost, linearita kalibrační závislosti a parametry kalibrační závislosti, meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Všechny výsledky byly vztaženy k internímu standardu. V rámci této validace nebylo prováděno stanovení robustnosti metody, protože se jednalo o vývoj pilotní screeningové metody, která může být ještě upravována na základě požadavků např. z praxe. Data této částečné validace jsou shrnuta v následující tabulce.

Tab. 3 Výsledky částečné validace metody stanovení ftalátů pomocí MEKC.

	DPP	DBP	DEHP	DDP
Opakovatelnost migračních časů (v jednom dni)	0,20 %	0,34 %	0,21 %	0,47 %
Opakovatelnost ploch píků (v jednom dni)	0,52 %	0,40 %	0,67 %	0,59 %
Opakovatelnost migračních časů (ve více dnech)	1,20 %	0,86 %	1,05 %	1,21 %
Opakovatelnost ploch píků (ve více dnech)	2,21 %	1,98 %	2,96 %	2,77 %
Výtěžnost (pro koncentraci 50 mg/l)	95,4 %	96,6 %	98,1 %	96,0 %
Linearita	10 – 250 mg/l			
Koeficient determinace ( $R^2$ )	0,985	0,991	0,981	0,967
LOD (mg/l)	5,0	5,5	6,4	6,2
LOQ (mg/l)	16,7	18,3	21,3	20,8

Z tabulky je zřejmé, že opakovatelnost ploch píků vztažená k internímu standardu se pohybuje do 3 % v rámci několika dnů, do 0,7 % v rámci jednoho dne. To představuje poměrně dobrý výsledek z pohledu relativně složitěho použitého elektrolytu. Mez detekce byla stanovena jako trojnásobek poměru signál – šum. Mez kvantifikace jako desetinásobek poměru signál – šum (zjištěného experimentálně pomocí programu ChemStation Agilent Technologies). Mez kvantifikace je v rozmezí 16,7 – 21,3 mg/l.

Je zřejmé, že mez kvantifikace je příliš vysoká na stanovení ftalátů ve vzorcích vody, resp. výluhů z plastových lahví. Z tohoto důvodu byla zvolena předúprava vzorku z výluhů z plastových lahví – SPE extrakce a následné odふうání pod dusíkem (viz experimentální podmínky). Pro tuto předúpravu byla studována výtěžnost analytů na dvou koncentračních hladinách s výsledky uvedenými v následující tabulce.

Tab. 4 Výsledky studia výtěžnosti v případě předúpravy vzorku.

	DPP	DBP	DEHP	DDP
Výtěžnost (pro koncentraci 50 µg/l)	84,5 %	93,1 %	89,0 %	67,3 %
Výtěžnost (pro koncentraci 10 µg/l)	82,2 %	87,5 %	79,4 %	64,9 %

Z této tabulky je zřejmé, že výtěžnost studovaných látek se v případě předúpravy pomocí SPE a odふうání dusíkem významně liší od výtěžnosti samotné metody MEKC. Nicméně výtěžnost metody s předúpravou vzorku je i tak dostatečná pro screeningovou analýzu ftalátů z výluhů z plastových lahví.

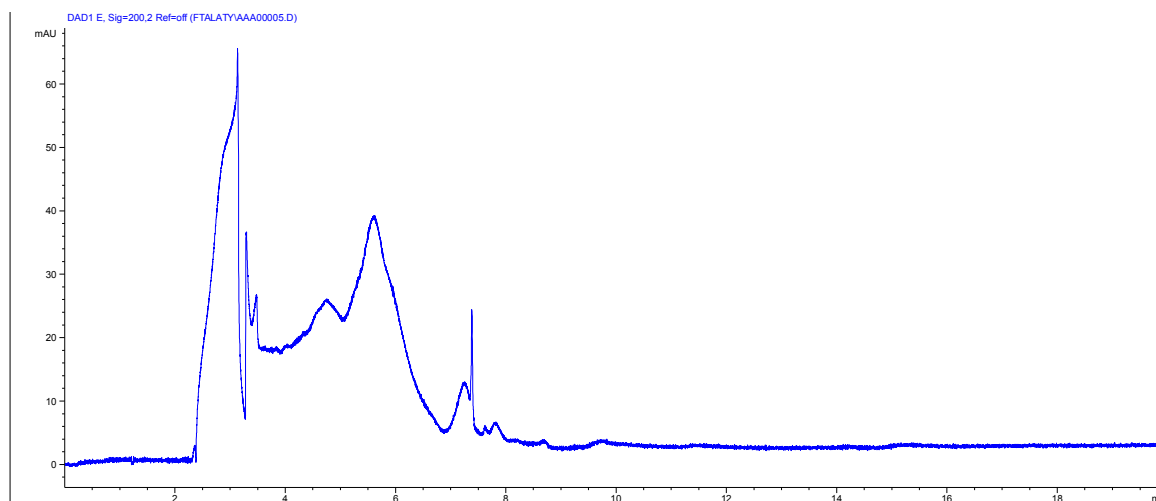
### 4.3. ANALÝZA VÝLUHŮ

Vyvinutá a validovaná metoda byla následně použita k analýze výluhů z plastových lahví. Výluhy byly provedeny postupem uvedeným v experimentální části této práce.

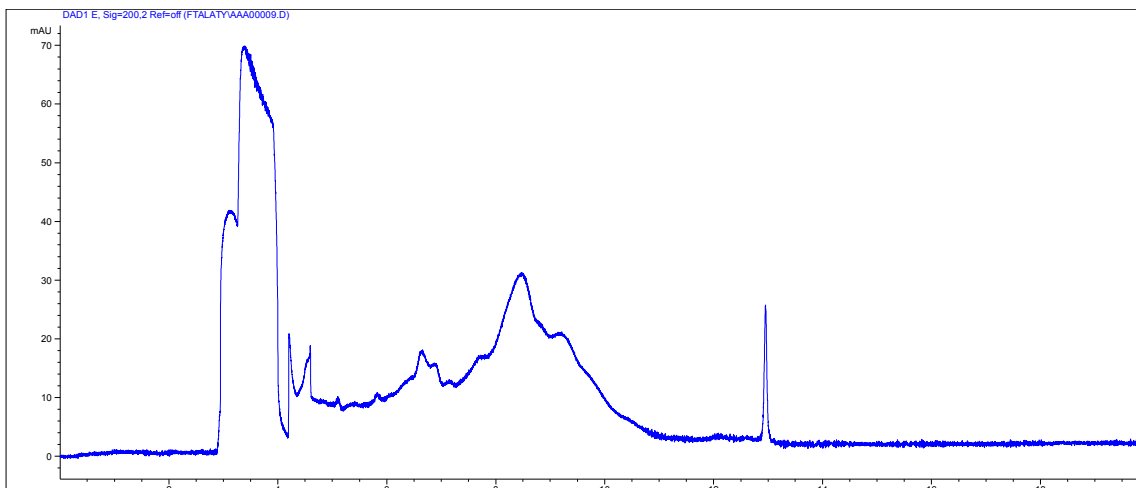
Bylo provedeno sedm typů výluhů modelujících základní stavy, které mohou nastat v případě styku plastové lahve a vody:

- destilovaná voda („standard“)
- destilovaná voda s přidavkem 100  $\mu$ l 85 % kyseliny fosforečné („kyselá voda“)
- destilovaná voda s přidavkem 100  $\mu$ l 50 % hydroxidu sodného („zásaditá voda“)
- 0,1 mol/l roztok chloridu sodného („roztok s definovanou iontovou silou“)
- 0,1 mol/l roztok chloridu sodného o výsledném pH 3 – upraveno přidavkem kyseliny fosforečné („okyselený roztok s definovanou iontovou silou“)
- 0,1 mol/l roztok chloridu sodného o výsledném pH 9 – upraveno přidavkem hydroxidu sodného („zásaditý roztok s definovanou iontovou silou“)
- 0,05 mol/l vodný roztok SDS („model lipofilního aditiva ve vodě“)

Příklady analýz výluhů jsou uvedeny níže.



Obr. 11 Příklad analýzy výluhu z plastové lahve pomocí „roztoku s definovanou iontovou silou“.



Obr. 12 Příklad analýzy výluhu z plastové lahve pomocí „kyselé vody“.

Z analýz výluhů je patrné, že se jedná o složité záznamy, kde není jednoduchá identifikace zmíněných ftalátů. Je zřejmé, že v tomto případě by bylo vhodnější použití jiného typu detektoru, než je UV detektor dostupný pro kapilární elektroforézu, která byla použita v této práci (např. hmotnostní spektrometrie). Pomocí přídavek standardů ftalátů do výluhu byl v některých vzorcích identifikován dibutylftalát (DBP). Pomocí metody standardního přídávku byl DBP i kvantifikován. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 5 Výsledky stanovení DBP ve výluzích z plastových lahví.

Typ výluhu	Koncentrace DBP ( $\mu\text{g/ml}$ )
„standard“	nedetekován
„kyselé voda“	$2,2 \pm 0,4$
„zásaditá voda“	$2,7 \pm 0,6$
„roztok s definovanou iontovou silou“	$3,0 \pm 0,6$
„okyselený roztok s definovanou iontovou silou“	$5,2 \pm 0,9$
„zásaditý roztok s definovanou iontovou silou“	$5,9 \pm 0,8$
„model lipofilního aditiva ve vodě“	nedetekován

Je zřejmé, že vyvinutá metoda MEKC není příliš vhodná pro stanovení ftalátů ve vzorcích výluhů z plastových lahví. Nicméně může sloužit jako levná a zajímavá screeningová alternativa ke konvenčně používaným technikám (např. GC/MS, HPLC/MS).

Při použití nejlepších podmínek trvá jedna separace 7 minut. Pokud uvažujeme 3 minuty promývání (nejmenší možné v tomto případě, aby byla zachována dostatečná opakovatelnost měření), pak za hodinu umožňuje MEKC zanalyzovat 6 vzorků (za 8 hodinovou pracovní dobu vzorků 48). Případně je možné uvažovat nad možností předúpravy vzorků v pracovní době a následném spuštění sekvenčního měření „přes noc“, kdy za 12 hodin (16:00 hod – 6:00 hod) dojde ke změření až 72 vzorků.

Z pohledu modelových vzorků (viz předchozí tabulka) se jeví jako nejagresivnější (ve výluhu byla stanovena největší koncentrace DBP) použití „zásaditých“ vod oproti „okyseleným“ vodám. Poměrně zajímavý je vliv iontové síly, kdy oproti destilované vodě dochází k většímu uvolňování DBP. Naopak model „lipofilního aditiva ve vodě“ nepřinesl žádný výsledek, resp. DBP nebyl v tomto případě detekován.

## 4. ZÁVĚR

Byla vypracována rešerše týkající se tématu kapilární elektroforézy a tématu ftalátů.

V průběhu experimentální práce byla vyvinuta a optimalizována metoda pro stanovení ftalátů pomocí kapilární elektroforézy, resp. micelární elektrokinetické chromatografie. Bylo studováno chování vybraných ftalátů. Nejlepších parametrů separace bylo dosaženo přidavkem 50 mM SDS a 20% (v/v) 2-propanolu k základnímu elektrolytu – 50 mM borát/NaOH pH 9,5. Pořadí migrace analytů a interního standardu bylo určeno následovně: anastrozol (interní standard), DPP, DBP, DEHP, DDP.

Dále byly připraveny vzorky výluhů z plastových lahví. U těchto vzorků byla provedena postupná prekoncentrace. Zakoncentrované výluhy z plastů byly jakožto reálné vzorky analyzovány na základě optimalizované, částečně validované metody. Pro DBP byla nejvyšší koncentrace stanovena ve vodě s bazickým pH. Studované ftaláty však nebyly detekovány ve všech vzorcích. Tato metoda je nízkonákladová, její další výhodou je rychlost analýz, za optimálních podmínek trvala jedna separace pouze 7 minut. Použití jiného detektoru než UV/Vis by mohlo vést ke zlepšení výsledků separace.

## 5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. TAGLIARO F., TURRINA S., SMITH F. P.: *Forensic Sci. Int.* **77**, 211 (1996).
2. ANASTOS N., BARNETT N. W., LEWIS S. W.: *Talanta* **67**, 269 (2005).
3. TISELIUS A.: *Trans. Faraday Soc.* **33**, 524 (1937).
4. HJERTEN S.: *Chromatogr. Rev.* **9**, 122 (1967).
5. HEFTMANN E.: *Chromatography: A Laboratory Handbook of Chromatographic and Electrophoretic Methods*. Van Nostrand Reinhold, New York 1975.
6. BAKER D. R.: *Capillary Electrophoresis*. Wiley, New York 1995.
7. CUNICO R.L., GOODING K.M., WEHR T.: *Basic HPLC and CE of Biomolecules*. Bay Bioanalytical Laboratory Inc., Richmond 1998.
8. ALTRIA K.: *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation and Applications*. Humana Press, Totowa, 1996.
9. JORGENSON J. W., LUKACS K. D.: *Anal. Chem.* **53**, 1298 (1981).
10. JORGENSON J. W., LUKACS K. D.: *Science* **222**, 266 (1983)
11. HORSTKOTTE B., CERDÀ V.: *Chromatogr. Sci.* **47**, 636 (2009).
12. ISSAQ H.J., LIQ J.: *Chrom. Rel. Technol.* **25**, 1153 (2002).
13. WEINBERGER R.: *Am. Lab.* **34**, 32 (2002).
14. TSUDA T., NOMURA K., NAKAGAWA G.: *J. Chromatog.* **248**, 241 (1982).
15. KLOUDA P.: *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava 2003.
16. SCHWARTZ H. E., MELERA M., BROWNLEE R. G.: *J. Chromatog.* **480**, 129 (1989).
17. HUANG X., GORDON M. J., ZARE R. N.: *Anal. Chem.* **60**, 375 (1988).
18. DOSE E. V., GUIOCHON G. A.: *Anal. Chem.* **63**, 1154 (1991).
19. KOHR J., ENGELHARDT H.: *J. Chromatog.* **652**, 309 (1993).
20. ZHU M., RODRIGUEZ R., HANSEN D., WEHR T.: *J. Chromatog.* **516**, 123 (1990).
21. WALLINGFORD R. A., EWING A. G.: *Anal. Chem.* **60**, 1972 (1988).
22. OLEFIROWICZ T. M., EWING A. G.: *Anal. Chem.* **62**, 1872 (1990).
23. LUKACS K. D., JORGENSON: *J. High Res. Chromatog.* **8**, 407 (1985).
24. NISHI H., TSUMAGARI N., TERABE S.: *Anal. Chem.* **61**, 2434 (1989).
25. TERABE S., OTSUKA K., ICHIKAWA K., TSUCHIYA A., ANDO T.: *Anal. Chem.* **56**, 111 (1984).

26. TERABE S., OTSUKA K., ANDO T.: *Anal. Chem.* **57**, 834 (1985).
27. NISHI H., TSUMAGARI N., KAKIMOTO T., TERABE S.: *J. Chromatog.* **465**, 331 (1989).
28. TERABE S., MIYASHITA Y., SHIBATA O., BARNHART E. R., ALEXANDER L. R., PATTERSON D. G., KARGER B. L., HOSOYA K., TANAKA N.: *J. Chromatog.* **516**, 23 (1990).
29. COPPER C. L., SEPANIAK M. J.: *Anal. Chem.* **66**, 147 (1994).
30. NG C. L., LEE H. K., LI S. F.: *J. Chromatog.* **652**, 547 (1993).
31. GÓMEZ-HENS A., AGUILAR-CABALLOS M. P.: *Trends Anal. Chem.* **22**, 847 (2003).
32. ANTIAN J.: *Environ. Health Perspect.* **4**, 3 (1973).
33. WITTASSEK M., KOCH H. M., ANGERER J., BRUNING T.: *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 7 (2011).
34. PÉREZ-FERNÁNDEZ V., GONZÁLEZ M. J., GARCÍA M. Á., MARINA M. L.: *Anal. Chim. Acta* **782**, 67 (2013).
35. HSIEH S. Y., WANG C. C., WU S. M.: *Food Chem.* **141**, 3486 (2013).
36. NIU L. L., XU Y., XU C., YUN L. X., LIU W. P.: *Environ. Pollut.* **195**, 16 (2014).
37. CAO X. L.: *Compr. rev. food sci. food saf.* **9**, 21 (2010).
38. BOUMA K., SCHAKEL D. J.: *Food Addit. Contam.* **19**, 602 (2002).
39. VALVI D., MONFORT N., VENTURA R., CASAS M., CASAS L., SUNYER J., VRIJHEID M.: *Int. J. Hyg. Environ. Health* **218**, 220 (2015).
40. SWAN S. H.: *Environ. Res.* **108**, 177 (2008).
41. HAUSER R., DUTY S., GODFREY-BAILEY L., CALAFAT A. M.: *Environ. Health Perspect.* **112**, 751 (2004).
42. KOCH H. M., ROSSBACH B., DREXLER H., ANGERER J.: *Environ. Res.* **93**, 177 (2003).
43. SERODIO P., NOGUEIRA J. M.: *Water Res.* **40**, 2572 (2006).
44. BACH C., DAUCHY X., CHAGNON M. C., ETIENNE S.: *Water Res.* **46**, 571 (2012).
45. FAKIROV S.: *Handbook of Thermoplastic Polyesters*. Wiley-VCH, Weinheim 2002.
46. ROMAO W., FRANCO M. F., CORILO Y. E., EBERLIN M. N.: *Polym. Degrad. Stab.* **94**, 1849 (2009).
47. ZHANG H., WARD I. M.: *Macromolecules* **28**, 7622 (1995).
48. DZIĘCIOŁ M., TRZESZCZYŃSKI J.: *J. Appl. Polym. Sci.* **77**, 1894 (2000).
49. HOLLAND B. J., HAY J. N.: *Polymer* **43**, 1835 (2002).



50. KERESZTES S., TATÁR E., CZÉGÉNY Z., ZÁRAY G., MIHUCZ V. G.: *Sci. Total Environ.* **458-460**, 451 (2013).
51. HUGUCHI A., YOON B. O., KANEKO T., HARA M., MAEKAWA M., NOHMI T.: *J. Appl. Polym. Sci.* **94**, 1737 (2004).
52. HIRAYAMA K., TANAKA H., KAWANA K., TANI T., NAKAZAWA H.: *Food Addit. Contam.* **18**, 357 (2001).
53. LEIVADARA S. V., NIKOLAOU A. D., LEKKAS T.D.: *Food Chem.* **108**, 277 (2008).
54. FANKHAUSER-NOTI A., GROB K.: *Anal. Chim. Acta* **582**, 353 (2007).
55. GUART A., BONO-BLAY F., BORRELL A., LACORTE S.: *Food Chem.* **156**, 73 (2014).
56. WEZEL A. P., VAN VLAARDINGER P., POSTHUMUS R., CROMMENTUIJN G. H., SIJM D. T. H. M.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **46**, 305 (2000).
57. MEEKER J. D., SATHYANARAYANA S., SWAN S. H.: *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **364**, 2097 (2009).
58. SINGH S., LI S. S.: *Gene* **494**, 85 (2012).
59. BIRNBAUM L. S.: *Environ. Health Perspect.* **102**, 676 (1994).
60. FOSTER P. M. D.: *Int. J. Androl.* **29**, 140 (2005).
61. BAROUKI R., GLUCKMAN P. D., GRANDJEAN P., HANSON M., HEINDEL J. J.: *Environ. Health* **11**, 42 (2012).
62. VALVI D., CASAS M., ROMAGUERA D., MONFORT N., VENTURA R., MARTINEZ D., SUNYER J., VRIJHEID M.: *Environ. Health Perspect.* **123**, 1022 (2015).
63. WANG X., SONG M., GUO M., CHI C., MO F., SHEN X.: *J. Environ. Sci.* **37**, 67 (2015).
64. SILVAM. J., BARR D. B., REIDY J. A., KATO K., MALEK N. A., HODGE C. C.: *Arch. Toxicol.* **77**, 561 (2003).
65. KOCH H. M., BOLT H. M., PREUSS R., ANGERER J.: *Arch. Toxicol.* **79**, 367 (2005).
66. WOODWARD K. N.: *Phthalate Esters: Toxicity and Metabolism*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA 1988.
67. CALAFAT A. M., SLAKMAN A. R., SILVA M. J., HERBERT A. R., NEEDHAM L. L.: *J. Chromatog. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **805**, 49 (2004).
68. STAPLES C. A., PETERSON D. R., PARKERTON T. F., ADAMS W. J.: *Chemosphere* **35**, 667 (1997).
69. SCHWARTZENBACH R. P., GSCHWEND P. M., IMBODEN D. M.: *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York 1992.
70. CARLBERG G. E., MARTINSEN K.: *Sci. Total Environ.* **25**, 245 (1982).

71. SHANKER R., RAMARKISHNA C., SETH P. K.: *Environ. Poll.* **39**, 1 (1985).
72. KIRCHMANN H., ASTROM H., JONSALL G.: *Swedish J. Agric. Res.* **21**, 107 (1991).
73. BANAT F. A., PRECHTL S., BISCHOF F.: *Chemosphere* **39**, 2097 (1999).
74. WANG X., LOU X., ZHANG N., DING G., CHEN Z., XU P., WU L., CAI J., HAN J., QIU X.: *Environ. Toxicol. Chem.* **34**, 2205 (2015).
75. BERNARD L., DÉCAUDIN B., LECOEUR M., RICHARD D., BORDEAUX D., CUEFF R., SAUTOU V.: *Talanta* **129**, 39 (2014).
76. BUI T. T., GIOVANOULIS G., COUSINS A. P., MAGNÉR J., COUSINS I. T., DE WIT C. A.: *Sci. Total Environ.* **541**, 451 (2016).
77. LAFLEUR A. D., SCHUG K. A.: *Anal. Chim. Acta* **696**, 6 (2011).
78. STAPLES C. A.: *The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer, Germany 2003.
79. NORTHROP D. M.: *J. Forensic Sci.* **46**, 549 (2001).
80. MORALES E. B., VAZQUEZ A. L. R.: *J. Chromatogr. A* **1061**, 225 (2004).
81. RYAN R., MCEVOY E., DONEGAN S., POWER J., ALTRIA K.: *Electrophoresis* **32**, 184 (2011).
82. WANG L., JIANG G., CAI Y., HE B., WANG Y., SHEN D.: *J. Environ. Sci.* **19**, 874 (2007).
83. HSIEH S., WANG C., WU S.: *Food Chem.* **141**, 3486 (2013).
84. SUN J., HE H., LIU S.: *J. Sep. Sci.* **37**, 1679 (2014).
85. CHANG L., BI P., LI X., WEI Y.: *Food Chem.* **177**, 127 (2015).

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BBP	butylbenzyl ftalát
BHET	bis(hydroxyethyl)tereftalát
BOP	butyloktyl ftalát
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární isoelektrická fokusace
CITP	kapilární isotachoforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor diodového pole
DAP	diallyl ftalát
DBP	di-n-butyl ftalát
DCHP	dicyklohexyl ftalát
DDP	didecyl ftalát
DEHP	di-(2-ethylhexyl) ftalát
DEP	diethyl ftalát
DHP	di-n-hexyl ftalát
DIDP	diisodecyl ftalát
DINP	diisononyl ftalát
DIOP	diisoktyl ftalát
DMP	dimethyl ftalát
DOP	di-n-oktyl ftalát
DPP	di-n-propyl ftalát
ECHA	Evropská agentura pro chemické látky
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
GC	plynová chromatografie
2-HP- $\gamma$ -CD	2-(hydroxypropyl)- $\gamma$ -cyklodextrin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	mez detekce

LOQ	mez stanovitelnosti
MEEKC	mikroemulzní elektrokinetická chromatografie
MEHP	mono-(2-ethylhexyl) ftalát
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
PET	polyethylentereftalát
PPARs	receptory aktivované proliferátory peroxisomů
PVC	polyvinylchlorid
REACH	Registrace, hodnocení, povolování a omezování chemických látek
SDC	deoxycholát sodný
SDS	dodecylsulfát sodný
TDI	tolerovatelný denní příjem
TTDI	celkový tolerovatelný denní příjem ftalátů
USEPA	Agentura pro ochranu životního prostředí
UV	ultrafialový
Vis	viditelný