



# Analýza metabolitů ftalátů – vývoj metody, zajištění správnosti výsledků

## Státní zdravotní ústav

Oddělení pro chemickou bezpečnost výrobků

Ing. Karel Vrbík, Ing. Ivana Bartoňová

Praha, 23.11.2011



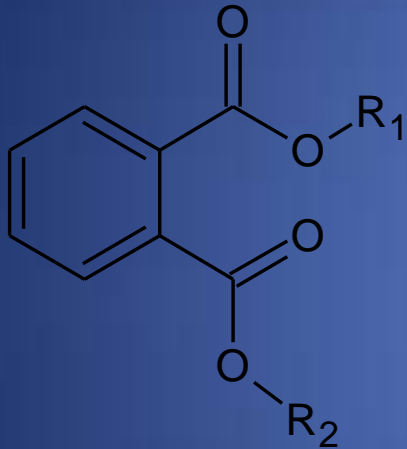
# Úvod

## Obsah

1. Úvod
2. Experimentální část
  - a) návrh SOP
  - b) vývoj a validace metody
  - d) analýzy reálných vzorků
3. Účast v MPZ (ICI a EQUAS)
4. Závěr

## Úvod

Metabolity ftalátů vznikají působením živé hmoty na dialkylestery kyseliny ftalové.



R – alkyl, cykloalkyl, aryl, atd.  
R1 = (≠)R2

### Průmyslová výroba

Anhydrid kyseliny ftalové + alkohol (směs alkoholů)

### Nejčastěji používané

DEHP (DNOP), DINP + DIDP (nejsou chemická individua)

### Celosvětová výroba

8 mil. tun/rok



## Úvod

### Použití

**Změkčovadla PVC a jiných polymerů (cca 90 %):** obaly (i pro potraviny), podlahové krytiny, hadice, kabely, hračky, pláštěnky, zdravotnické pomůcky (infuzní vaky - DEHP)

**Stavební materiály:** složky těsnicích a adhezivních materiálů a nátěrů a materiálů pro povrchovou úpravu

**Technika:** složky inkoustů, rozpouštědla

**Kosmetické prostředky:** rozpouštědla, fixační a denaturační činidla v parfémtech, vodách po holení (DEP), lacích na nehty apod.



## Úvod

### Legislativní omezení

**REACH (= hračky a předměty pro péči o děti):** max. 0,1 hm. % DBP, BzBP, DEHP, DNOP, DINP, DIDP

**Materiály a výrobky ve styku s potravinami:** ftaláty povoleny pouze jako

- změkčovadlo v materiálech a předmětech pro opakované použití přicházejících do styku s beztukovými potravinami (přísné SML)
- technický pomocný materiál v polyolefinech v koncentracích do 0,05 % v konečném výrobku (DBP, DEHP, BzBP, dialkylftaláty s alkyly C<sub>8</sub>-C<sub>11</sub>)

**Kosmetické výrobky:** DBP, DEHP, bis(2-methoxyethyl)-ftalát, DPePy, BzBP, dialkylftaláty (alkyly C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub>, nerozvětvené i rozvětvené) – prakticky zakázány



## Úvod

### Expoziční cesty (vstup do organismu)

**Perorálně:** potraviny (oleje, mléko, sýry, červená masa, ryby) i pitná voda  
(zdroj ftalátů: kontaminované suroviny pro výrobu potravin, nevhodné obaly  
např. PVC folie pro tukové potraviny)  
kousátka

**Perkutánně:** oděvy (pláštěnky), kosmetické výrobky

**Intravenózně:** infuzní vaky (PVC s DEHP)

**Inhalačně:** při vyšších teplotách ovzduší, prach

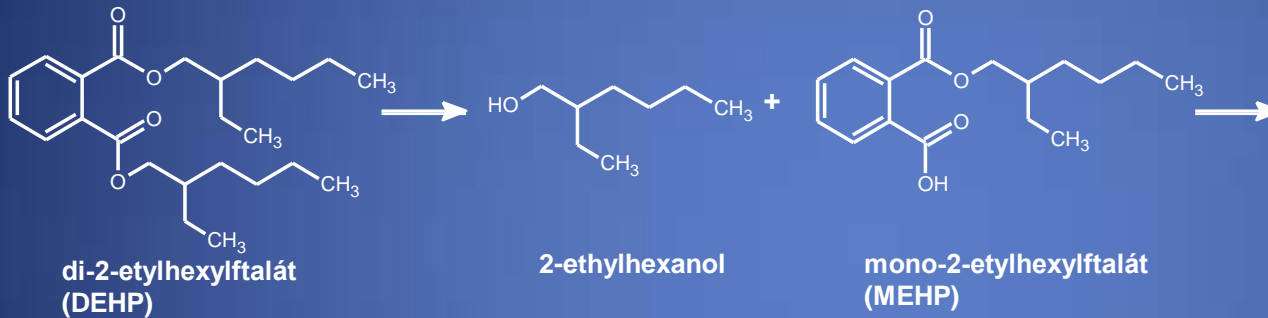
### Účinky na lidský organismus

- toxické pro reprodukci
- játra, ledviny

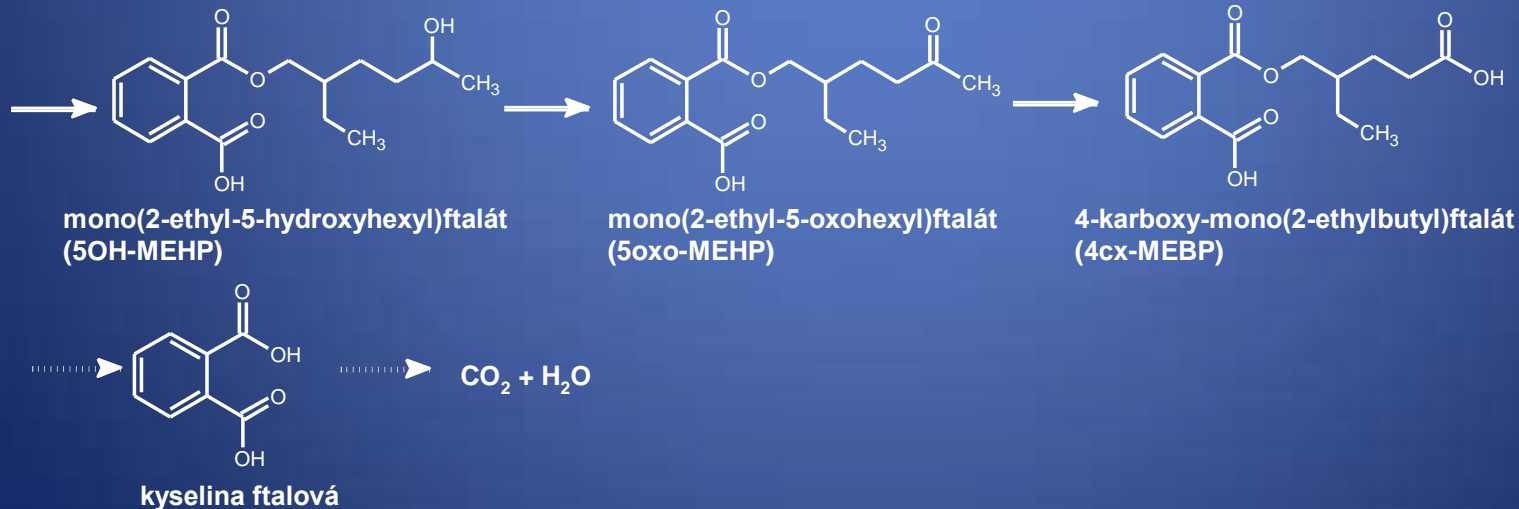
# Úvod

Metabolity ftalátů vznikají působením živé hmoty na dialkylestery kyseliny ftalové.

## 1. Hydrolýza => primární metabolit

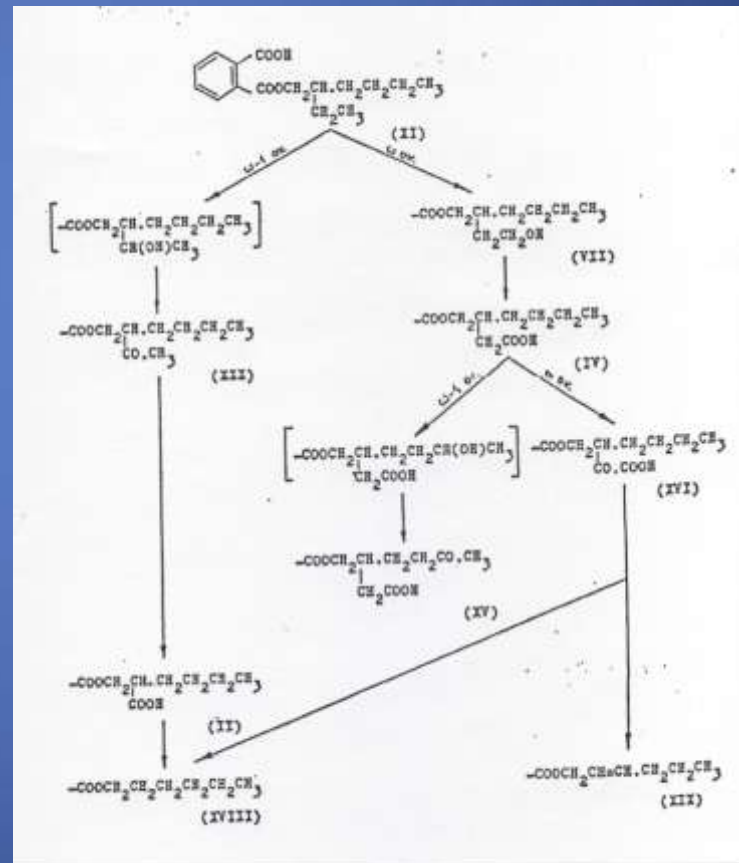
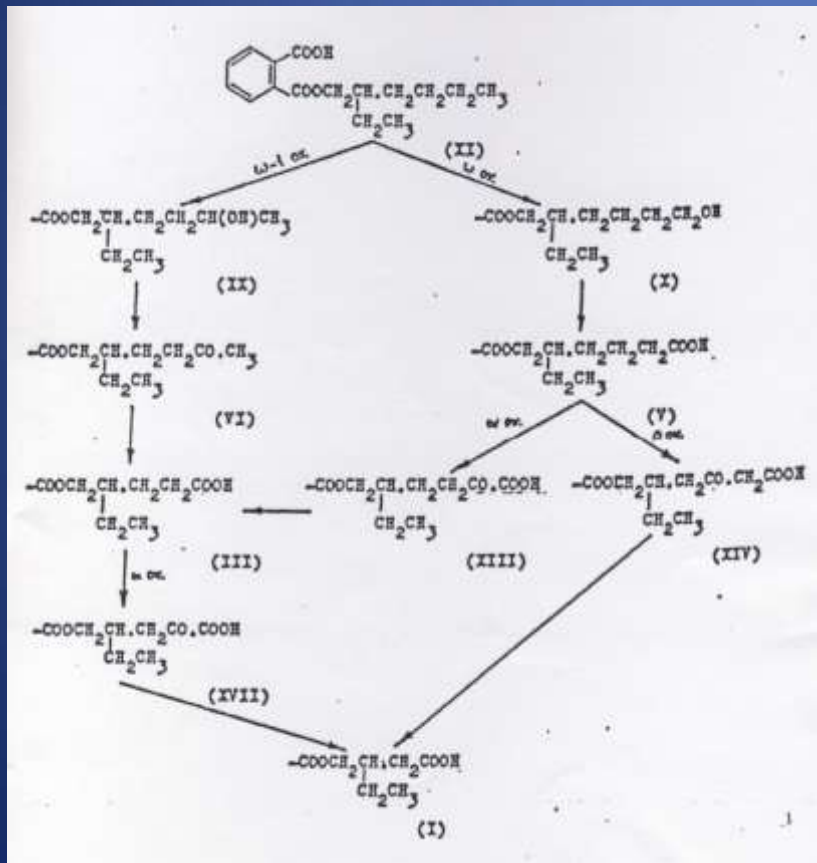


## 2. Oxidace => sekundární metabolity



# Úvod

Mechanismy oxidace => další zkracování alkylového řetězce





# Úvod

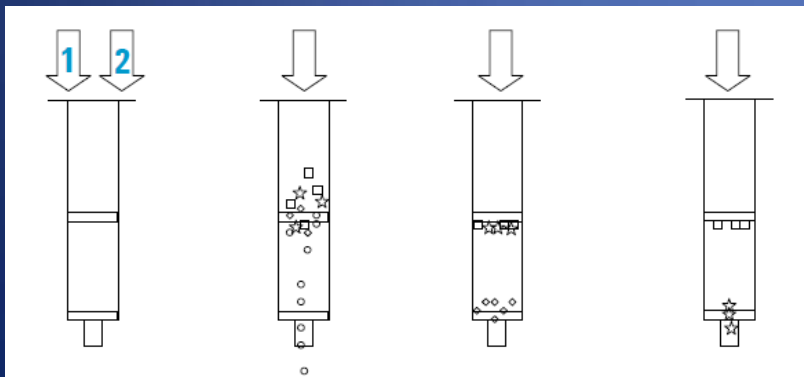
## Společná úvodní část všech metod

- stabilizace pH vzorku moči na hodnotu 6,5 octanovým pufrem
- přidavek vnitřních standardů (isotopicky značené analogy metabolitů ftalátů – D nebo  $^{13}\text{C}$ )
- enzym glukuronidáza (rozštěpení glukuronidových komplexů metabolitů) při 37 °C

## Všechny varianty pokračování založeny na SPE

### 1. Klasická SPE

- aktivace (+ ekvilibrace pufrem)
- nanesení inkubovaného vzorku moči
- vypláchnutí matrice co nejméně polárním rozpouštědlem (nesmí nevymývat analyty)
- eluce všech analytů co nejslabším rozpouštědlem (nesmí se vymývat matrice)
- koncentrování eluentu odpařením





## Úvod

### Výhody:

- koncentrování analytů (snížení LOQ)
- redukce matrice vzorku (snížení kontaminace instrumentace a odezvy pozadí)

### Nevýhody:

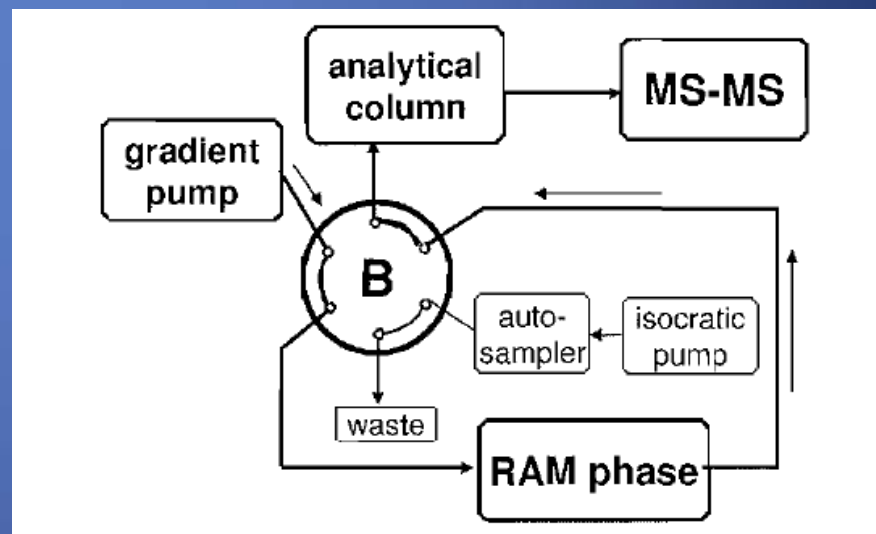
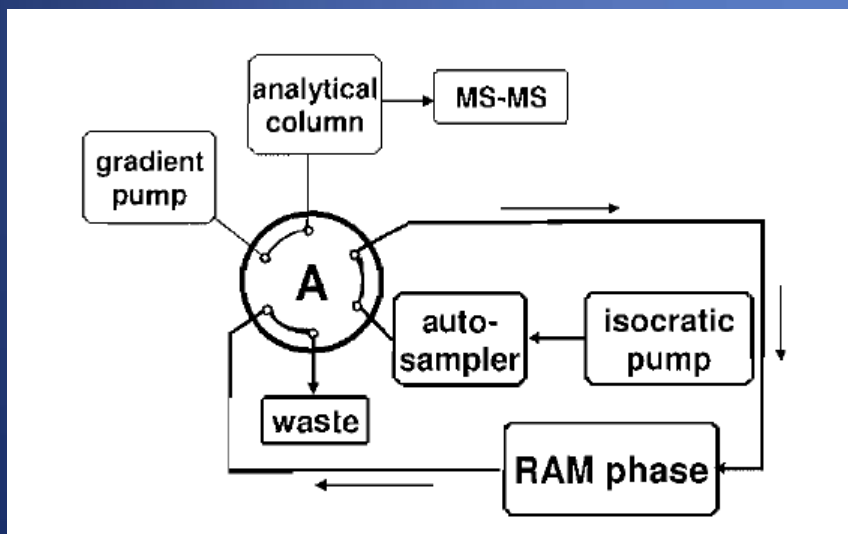
- zdlouhavý vývoj SPE metody (univerzální parametry pro všechny analyty)
- často problematická reprodukovatelnost a výtěžnost
- zvýšené materiálové náklady a hlavně pracnost

# Úvod

## 2 On line metody

### a) dle Angerera

- LC-MS/MS s kvarterním systémem pump
- inkubovaný vzorek moči přes dávkovací smyčku na velice krátkou chromatografickou kolonu (RAM phase)
- zachycené analyty opačně proudící mobilní fází na klasickou analytickou kolonu





## Úvod

### Výhody

- koncentrování 8krát (snížení LOQ)
- redukce matrice vzorku (snížení kontaminace instrumentace a odezvy pozadí)
- opakované použití RAM kolonky (pokles materiálových nákladů)
- snížení vlivu lidského faktoru (stabilní reprodukovatelnost a výtěžnost)

### Nevýhody

- nutný kvartérní systém pump u LC a šesticestný ventil (+ 400 tis. Kč)
- časově náročné vyladění systému pro všechny analyty
- specializované zařízení je plně využitelné pouze při extrémním množství vzorků



## Úvod

### 2.B dle Calafata

- pouze manuální pipetáž vzorku moči
- přídavky všech roztoků a inkubace ve speciálním zařízení
- přidavek 4-methyl umbelliferon glucuronidu (kontrola úplnosti dekonjugace)
- plato s inkubovanými vzorky do autosampleru LC-MS/MS zařízení

### Výhody

- stejné jako u předchozí on line metody
- kontrola dokonalosti dekonjugace 4-methyl umbelliferon glucuronidem
- prakticky automatické zpracování vzorku – redukce manuální práce a s tím spojená minimalizace vlivu lidského faktoru
- pohodlnější realizace validačních postupů, automatické zpracování dat do databází

### Nevýhody

- stejné jako u předchozí on line metody
- ještě vyšší investiční náklady

## Experimentální část – návrh SOP

### Návrh SOP

Ke vzorku filtrované moči se přidá:

- octanový pufr (stabilizuje pH na hodnotu 6,5)
- vnitřní standardy (isotopicky značené analogy metabolitů ftalátů – D nebo  $^{13}\text{C}$ ) (korigují vliv kvality matrice na odezvy detektoru a kolísání objemu nastříkovaného vzorku)
- 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (ověření kompletnosti enzymatického štěpení)
- glukuronidáza (rozštěpení glukuronidových komplexů při teplotě 37 °C (90 min)
  
- naředění inkubovaných vzorků mobilní fáze (1:1 či větší)
- nastřík pomocí autosampleru přes dávkovací smyčku na analytickou kolonu
- tandemové uspořádání UHPLC-ESI-MS/MS
- kvantifikace metodou interních standardů na izotopicky značené analogy
- kalibrace z analýz vodných kalibračních roztoků zpracovaných stejně jako vzorky moči

## Experimentální část – návrh SOP

Přehled analytů (metabolitů ftalátů) a odpovídajících izotopicky značených analogů

Analyt	Zkratka	Analog	Zkratka
Monometylftalát	<b>MMP</b>	Monometylftalát -3,4,5,6-d <sub>4</sub>	<b>LMMP</b>
Monoetylftalát	<b>MEP</b>	Monoetylftalát -3,4,5,6-D <sub>4</sub>	<b>LMEP</b>
Monocyklohexylftalát	<b>MCHP</b>	Monocyklohexylftalát, ring-1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> , dikarboxyl- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	<b>LMCHP</b>
Monobenzylftalát	<b>MBzP</b>	Monobenzylftalát-3,4,5,6-D <sub>4</sub>	<b>LMBzP</b>
Monobutylftalát	<b>MnBP</b>	Monobutylftalát-3,4,5,6-D <sub>4</sub>	<b>LMnBP</b>
Mono(2-ethylhexyl)ftalát	<b>MEHP</b>	Mono(2-ethylhexylftalát)-3,4,5,6-D <sub>4</sub>	<b>LMEHP</b>
Mono(2-etyl-5-hydroxyhexyl)ftalát	<b>5OH-MEHP</b>	Mono(2-etyl-5-hydroxyhexyl)ftalát -3,4,5,6-D <sub>4</sub>	<b>L5OH-MEHP</b>
Mono(2-etyl-5-oxohexyl)ftalát	<b>5OXO-MEHP</b>	Mono(2-etyl-5-oxohexylftalát) <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	<b>L5OXO-MEHP</b>
Monoisobutylftalát	<b>MiBP</b>	Monoisobutylftalát-3,4,5,6-D <sub>4</sub>	<b>LMiBP</b>

Koncentrace kalibračních roztoků: 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 ; 10; 20; 50; 100; 200; 500 a 1000 µg/l  
 Koncentrace IS: 20 µg/l

## Experimentální část – návrh SOP

### Přístrojové vybavení

- kapalinový chromatograf UHPLC Infinity 1290, vybavený binární pumpou, termostatovaným autosamplerem a termostatem kolon, výrobce: Agilent
- hmotnostní spektrometr QqQ, model 6490A s iontovým zdrojem Jet Stream, software: Masshunter Workstation, výrobce: Agilent

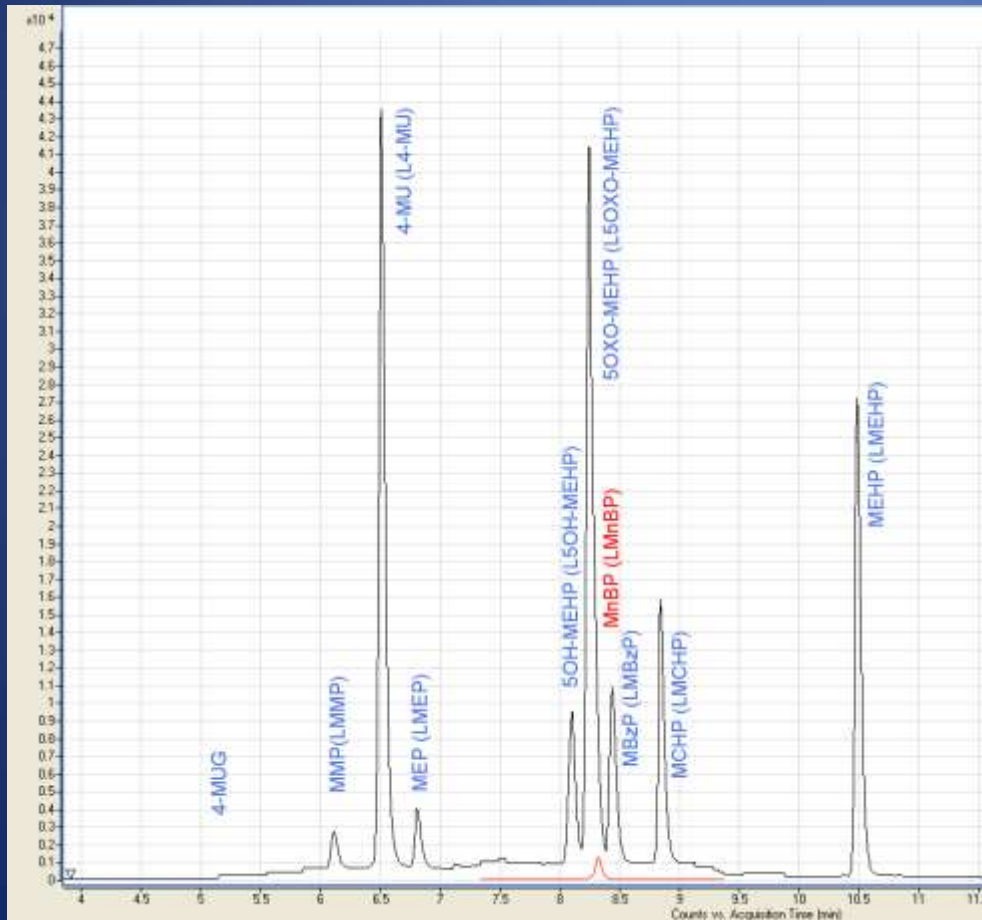




# Experimentální část – návrh SOP

## TIC Chromatogram metabolitů ftalátů

Koncentrace metabolitů i isotopicky značených analogů je 20 µg/l.



# Experimentální část – vývoj a validace metody

## Vývoj metody

### 1. Optimalizace SPE metody

Přehled testovaných SPE kolonek			
Označení	Typ	Výrobce	Poznámka
Strata X, 30 mg/3 ml	polymerní	Phenomenex	
Supelclean ENVI Chrom P (0,25 g/3 ml)	octadecyl	Supelco	
Lichrolut EN (200 m/3 ml)	polymerní	Merck	

Bylo vždy postupováno v souladu s instrukcemi konkrétního výrobce SPE kolonek.

Základní postup standardní

- aktivace sorbentu metanolem
- promytí demineralizovanou vodou
- ekvibrace octanovým puřem
- nanesení inkubovaného vzorku nebo kalibračního roztoku
- vymytí matrice octanovým puřem
- eluce analytů pomocí ACN, etylacetátem nebo postupně oběma
- koncentrování eluentu odpařením při teplotě 50 °C v proudu dusíku



## Experimentální část – vývoj a validace metody

### Výsledky

- žádná z testovaných SPE kolonek nevyhověla ve všech parametrech pro všechny analyty
- naopak bylo zjištěno že:
  - a) koncentrování vzorků není vzhledem k citlivosti LC-MS/MS systému nutné
  - b) vliv matrice lze eliminovat ředěním vzorku a jejím odkloněním do odpadu

## Experimentální část – vývoj a validace metody

### 2. Vysoká koncentrace některých analytů ve slepých vzorcích

MnBP a MEHP ve slepých vzorcích na úrovni jednotek resp. desítek  $\mu\text{g/l}$  (snižování citlivosti metody a nemožnost stanovovat jejich nízké koncentrace)

Kontrolovaný parametr	Výsledek	Poznámka
a) Testování čistoty všech použitých chemikálií (včetně organických složek mobilní fáze – ACN, MeOH)	negativní	
b) Testování čistoty demineralizované vody z různých zařízení případně její dočištění na koloně plněné octadecylovou fází	negativní	úroveň koncentrace slepých pokusů je přímo závislá na proteklém objemu mobilní fáze počátečního složení
c) Analýza s nulovým objemem nástřiku	negativní	dtto

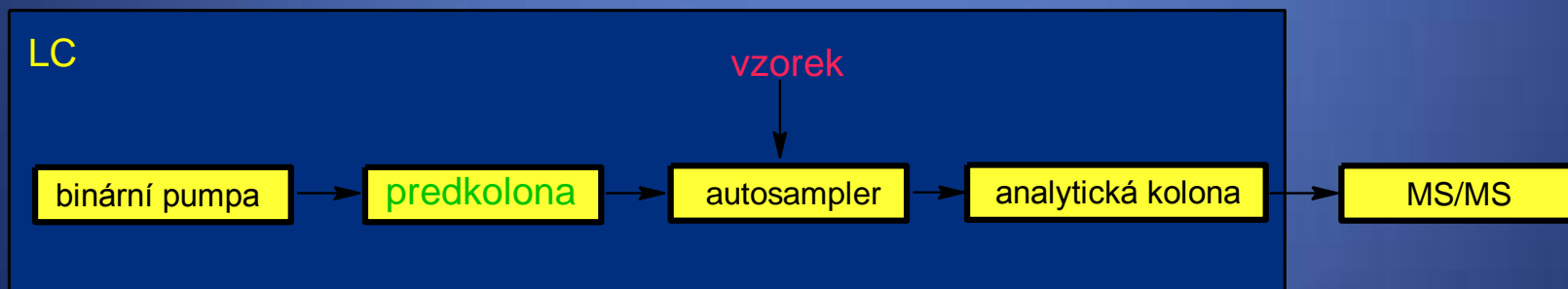
=> nežádoucí analyty přináší do systému vodná složka mobilní fáze

## Experimentální část – vývoj a validace metody

### Řešení

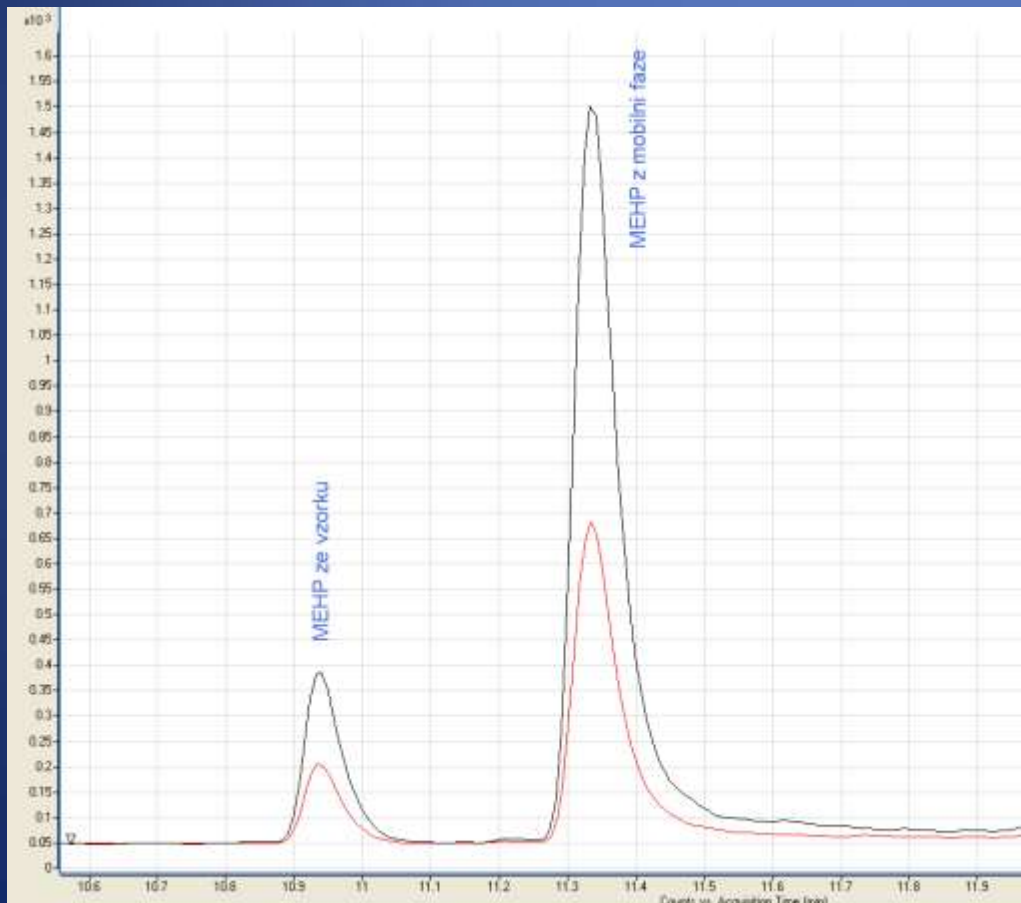
- vložení předkolony (standardní chromatografické kolony) mezi binární pumpu a autosampler
- průběžné zachycování analytů přinášených mobilní fází
- nástřík vzorku s „chtěnými“ analyty
- při odpovídajícím složení mobilní fáze pohyb „nechtěných“ analytů předkolonou a v zápětí i „chtěných“ v analytické koloně
- vzniklý rozdíl v retenčních časech cca 0,4 min u MEHP

### Blokové schéma



## Experimentální část – vývoj a validace metody

Chromatogram MRM přechodu kvantifikačního a kvalifikačního iontu MEHP  
konc. MEHP ve vzorku 2,3 µg/l



## Experimentální část – vývoj a validace metody

### 3. Koeluce MnBP a MiBP

- MnBP a MiBP blízké retenční časy (rozdíl cca 0,05 min)
- hmotnostní spektra totožná
- při koeluci nelze kvantifikovat

Pokus	Výsledek	Poznámka
a) Výměna standardní analytické kolony s oktadecylovou zakotvenou fází za jiný typ např. Luna, Phenyl-Hexyl, 3 $\mu$ m, 150 mm, 4,6 mm, Phenomenex (doporučena v literatuře)	negativní	Navíc zhoršení profilů píku ost. analytů a pokles odezev
b) Výměna standardní analytické kolony za monolytickou (bez částic) Chromolith High Resolution RP-18e, 100 mm, 4,6 mm	negativní	
c) Změna kvalitativního složení mobilní fáze (náhrada ACN za MeOH)	negativní	
d) Změna rychlosti gradientu (složení mobilní fáze na čase)	negativní	
e) Zvýšení teploty v termostatu kolon	negativní	

## Experimentální část – vývoj a validace metody

### 4. Náhrada ACN metanolem

ACN: vysoká eluční síla, nízká viskozita (nízké zpětné tlaky), ale 4krát dražší oproti MeOH

Pokus	Výsledek	Poznámka
<p>a) Výměna standardní analytické kolony s oktadecylovou zakotvenou fází za monolytickou Chromolith High Resolution RP-18e, 100 mm, 2 mm, Merck (dle prospektů kladou výrazně nižší odpor průtoku mobilní fáze a při výrazně nižším průtoku zachovávají stejné retenční časy)</p>	<p>pozitivní</p>	<p>Použití ACN:            - pokles tlaků z 300 na cca 30 barů sníží výrazně opotřebení nejexponovanějších součástí LC            - výrazně sníží i spotřebu mob. fází (průtok z 0,5 ml/min na 0,3 ml/min)</p> <p>MeOH nemá vyhovující dělicí vlastnosti.</p>



## Experimentální část – vývoj a validace metody

Cíl validace: Provéřit, zda navržená metoda má dostatečnou výkonnost

Dle požadavků pořadatele MPZ zatím pouze 3 parametry

### 1. Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)

- z 10 měření individuálně připraveného slepého pokusu (reálný vzorek s velice nízkou přirozenou koncentrací analytu nebo s přidavkem příslušného analytu v koncentraci takové, aby signál odpovídal max. trojnásobku šumu)
- $LOD = 3 \cdot SD$ ,  $LOQ = 10 \cdot SD$  ( $SD =$  výběrová směrodatná odchylka rozptylu)

Parametr	MMP [µg/l]	MEP [µg/l]	5-OH-MEHP [µg/l]	5-oxo-MEHP [µg/l]	MnBP [µg/l]	MBzP [µg/l]	MCHP [µg/l]	MEHP [µg/l]
LOD	0,09	0,2	0,2	0,08	0,5	0,4	0,07	0,7
LOQ	0,27	0,6	0,6	0,24	1,5	1,2	0,2	2,0

## Experimentální část – vývoj a validace metody

### 2. Opakovatelnost (r)

- z 10 měření ve třech dnech na vzorku moči se střední úrovní obsahu analytů, který byl obohacen ve třech úrovních a to 2, 20, 150  $\mu\text{g/l}$
- vyjádřeno jako relativní směrodatná odchylka v %

Opakovatelnost	MMP [ $\mu\text{g/l}$ ]	MEP [ $\mu\text{g/l}$ ]	5-OH-MEHP [ $\mu\text{g/l}$ ]	5-oxo-MEHP [ $\mu\text{g/l}$ ]	MnBP [ $\mu\text{g/l}$ ]	MBzP [ $\mu\text{g/l}$ ]	MCHP [ $\mu\text{g/l}$ ]	MEHP [ $\mu\text{g/l}$ ]
RSD <sub>2</sub> [%]	12	9	5	5	9	7	7	4
RSD <sub>20</sub> [%]	6	4	3	3	4	5	4	2
RSD <sub>150</sub> [%]	5	3	4	7	4	6	6	2

Praktický význam má **limit opakovatelnosti** (vyjádřený v rel. %)

Limit opakovatelnosti	MMP [ $\mu\text{g/l}$ ]	MEP [ $\mu\text{g/l}$ ]	5-OH-MEHP [ $\mu\text{g/l}$ ]	5-oxo-MEHP [ $\mu\text{g/l}$ ]	MnBP [ $\mu\text{g/l}$ ]	MBzP [ $\mu\text{g/l}$ ]	MCHP [ $\mu\text{g/l}$ ]	MEHP [ $\mu\text{g/l}$ ]
LOR <sub>2</sub> [%]	36	27	16	16	27	23	23	14
LOR <sub>20</sub> [%]	11	14	8	10	13	16	11	6
LOR <sub>150</sub> [%]	17	9	12	21	13	17	17	6

## Experimentální část – vývoj a validace metody

### 3. Správnost

nejméně ověřitelná:

- na CRM nebo referenčním postupem
- účastí v MPZ
- stanovením výtěžnosti z 10 měření ve třech dnech na vzorku moči se střední úrovní obsahu analytů, který byl obohacen ve třech úrovních a to 2, 20, 150 µg/l
- vyjádřeno v %
- výsledky analýz se korigují na výtěžnost

Výtěžnost	MMP [µg/l]	MEP [µg/l]	5-OH-MEHP [µg/l]	5-oxo-MEHP [µg/l]	MnBP [µg/l]	MBzP [µg/l]	MCHP [µg/l]	MEHP [µg/l]
R <sub>02</sub> [%]	110	82	105	94	110	97	87	73
R <sub>20</sub> [%]	99	93	105	97	87	103	91	90
R <sub>150</sub> [%]	102	95	106	100	90	103	94	96



## Experimentální část – analýzy reálných vzorků

### Analýza reálných vzorků

- vzorky močí kolegů, jejich rodinných příslušníků i známých
- naměřené koncentrace v jednotkách maximálně v desítkách  $\mu\text{g/l}$  (ppb)
- u vyšších koncentrací (kromě MEP) zřejmě nevhodné stravovací návyky

### Příklad

- rozdílný obsah MEP u jednoho dobrovolníka mezi ranní a odpolední močí (195 → 1259  $\mu\text{g MEP/l}$ )
- vyloučení potravinového zdroje
- vysoký obsah DEP (2 %) v kosmetickém výrobku (kolínské vodě)
- ze zahraniční studie: dobrovolníci „nakrmeni“ deuterovaným DEHP => **max. koncentrace metabolitu MEHP je v moči již po 2 hod a poločas vylučování je pouhých 5 hod.**

### DEMOCOPHES

- analyzováno cca 20 vzorků moče
- standardní úroveň koncentrací, ale i více než 1000  $\mu\text{g/l}$

## Účast v MPZ (ICI a EQUAS)

### Pořadatel

Institute for Prevention and Occupational Medicine (IPA), Bürkle-de-la-Camp Platz 1,  
44789 Bochum, Germany

MPZ	Termín	Účast SZÚ	Poznámka
ICI01	2-3/2011	ne	nebyla vyvinuta metoda
ICI02	5-6/2011	ano	
ICI03	?	ne	kolo zrušeno pořadatelem a nahrazeno EQUAS01 a EQUAS02
EQUAS01	9-10/2011	ano	
EQUAS02	12/2011-2/2012	ano	

Legenda:

ICI - Interlaboratory Comparison Investigations

EQUAS - External Quality Assessment Schemes

## Účast v MPZ (ICI a EQUAS)

### ICI 02

- odeslány výsledky stanovení 8 analytů ve dvou vzorcích včetně požadovaných validačních parametrů
- zpráva o účasti v elektronické podobě obsahovala pouze zaslané koncentrace a jejich aritmetické průměry a směrodatné odchylky z dat všech zúčastněných
- nebyly zveřejněny žádné vztažné hodnoty

### EQUAS01

- odeslány výsledky stanovení 8 analytů ve dvou vzorcích včetně požadovaných validačních parametrů
- zpráva o účasti v elektronické podobě obsahovala oproti ICI02 navíc průměrné hodnoty a směrodatné odchylky získané z měření ve 4 nebo 5 referenčních laboratořích

Násobky SD	MMP		MEP		5-OH-MEHP		5-oxo-MEHP		MnBP		MBzP		MCHP		MEHP	
	Q [µg/l]	R [µg/l]	Q [µg/l]	R [µg/l]	Q [µg/l]	R [µg/l]	Q [µg/l]	R [µg/l]	Q [µg/l]	R [µg/l]	Q [µg/l]	R [µg/l]	Q [µg/l]	R [µg/l]	Q [µg/l]	R [µg/l]
SZÚ	0,31	-0,56	-1,16	-0,97	-0,77	-1,24	-0,92	-1,20	0,53	0,31	-0,60	-0,66	-0,63	-0,62	-0,84	-0,83

Legenda:

Násobky SD – počet směrodatných odchylek výsledku laboratoře SZÚ od průměrné hodnoty všech účastníků



## Závěr

- na základě rešerše navržen a ověřen vlastní SOP bez SPE
- 8 analytů v rozsahu koncentrací cca 1-1000 µg/l
- vyřešeny problémy s vysokými koncentracemi slepých pokusů (MnBP, MEHP)
- píky MnBP a MiBP se nepodařilo oddělit
- monolytické kolony dovolují pracovat při srovnatelných výkonnostních parametrech s výrazně nižšími tlaky i průtoky
- zjištěné validační parametry mají vyhovující hodnoty
- výsledky MPZ ukazují, že námi měřené výsledky jsou převážně nižší oproti průměrným
- EQUAS02?



**Děkuji za pozornost.**

**Ing. K. Vrbík  
vrbik@szu.cz  
267082554**