

**ŠTÚDIUM POSTUPOV PREDÚPRAVY MATERSKÉHO MLIKA PRE HPLC-MS/MS
STANOVENIE VYBRANÝCH METABOLITOV PLASTIFIKÁTORA DINCH
STUDY OF BREAST MILK PRETREATMENT PROCEDURES FOR HPLC-MS/MS
DETERMINATION OF SELECTED METABOLITES OF THE DINCH PLASTICIZER**

JURDÁKOVÁ Helena, ORAVCOVÁ Alžbeta, GÓROVÁ Renáta*

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava

* *corresponding author: renata.gorova@uniba.sk*

ABSTRAKT

Východiská: Di(isononyl)cyclohexán-1,2-dikarboxylát (DINCH) pre svoj priaznivejší toxikologický profil postupne nahrádza ftaláty používané ako zmäkčovadlá v mnohých spotrebiteľských výrobkoch. Avšak, keďže produkcia a používanie DINCH rapídne narastá, miera expozície sa zodpovedajúcim spôsobom zvyšuje, preto je biomonitoring expozície DINCH dôležitý hlavne v citlivých populačných kohortách, ako sú deti v ranom veku. Dojčením môže matka preniesť potenciálne toxické chemikálie, ktorým bola predtým vystavená. Ako biomarkery expozície DINCH sa používajú najmä dva oxidované metabolity, monoestery hydroxy- (OH-MINCH) a karboxy- (cx-MINCH) cyclohexán-1,2-dikarboxylovej kyseliny.

Cieľ: Cieľom tejto práce bolo študovať rôzne spôsoby predúpravy vzorky materského mlieka pred stanovením týchto dvoch metabolitov metódou HPLC-MS/MS.

Metódy: Postupy predúpravy boli hodnotené z hľadiska celkovej efektivity procesu predúpravy na základe výťažnosti cx-MINCH a OH-MINCH z matrice a matricového efektu v ionizačnom zdroji hmotnostného spektrometra. Skúmaná bola vodná frakcia mlieka získaná po centrifugácii a extrakty do etylacetátu a zmesi etylacetát/hexán.

Výsledky: Efektivita predúpravy získaná pre vodnú frakciu mlieka a etylacetátové extrakty bola veľmi podobná, na úrovni 50 %, po pridaní hexánu do extrakčnej zmesi sa výťažnosť znížila na polovicu.

Záver: Extrakcia do použitých organických rozpúšťadiel nepriinesla žiadne zlepšenie efektivity predúpravného postupu, navyše postup bol prácnejší a časovo náročnejší. Na základe HPLC-MS/MS analýzy vodnej frakcie vzorky mlieka bol odhadnutý limit kvantifikácie pre cx-MINCH 0,03 µg/l a pre OH-MINCH 0,12 µg/l.

Kľúčové slová: DINCH. Materské mlieko. Efektivita predúpravy. HPLC-MS/MS.

ABSTRACT

Background: Di(isononyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) gradually replaces phthalates used as plasticizers in many consumer products due to its more favorable toxicological profile. However, as the DINCH production and usage have been rapidly increased, the rate of exposure is increased accordingly, so biomonitoring of exposure is important mainly in sensitive population cohorts such as children in early life. By breastfeeding, the mother can transfer potentially toxic chemicals to which the mother has previously been exposed. As biomarkers of exposure to DINCH mainly two oxidized metabolites, hydroxy- (OH-MINCH) and carboxy- (cx-MINCH) cyclohexane-1,2-dicarboxylic acid monoesters are used.

Aim: The aim of this work was to study breast milk sample pretreatment prior to HPLC-MS/MS determination of these two metabolites.

Methods: Pretreatment procedures were assessed for overall pretreatment efficiency based on the recovery of cx-MINCH and OH-MINCH from the matrix and on the matrix effects in the ionization source of mass spectrometer. The aqueous milk fraction obtained after centrifugation and extracts into ethyl acetate and ethyl acetate/hexane were analyzed.

Results: Pretreatment efficiency obtained for aqueous milk fraction and ethylacetate extracts were very similar at the level of 50 %, after adding hexane into the extraction solution the recovery decreased by half.

Conclusion: Extraction to examined organic solvents did not bring any improvement of pretreatment method efficiency, the procedure was more laborious and time consuming. On the basis of HPLC-MS/MS analysis of aqueous milk fraction we estimated limits of quantification for cx-MINCH 0.03 µg/l and for OH-MINCH 0.12 µg/l.

Key words: DINCH. Breast milk. Pretreatment efficiency. HPLC-MS/MS.

ÚVOD

Materské mlieko svojim zložením (protiinfekčné a protizápalové látky, rastové faktory a prebiotiká) podporuje prežitie a zdravý vývoj dieťaťa. Chráni telo dieťaťa pred infekciou a zápalom, prispieva k vývoju imunitného systému, vývoju orgánov a zdravej mikrobiote [1]. Napriek všetkým benefitom môže materské mlieko slúžiť ako médium na prenos environmentálnych chemikálií, napr. perzistentných organických polutantov ako sú polychlórované bifenyly, poly- a perfluoroalkylové zlúčeniny a podobne [2]. Niekoľko štúdií preukázalo, že do materského mlieka prenikajú aj chemické zlúčeniny ako ftaláty a ich metabolity [2-7] a konzumácia materského mlieka môže byť zdrojom expozície niektorým ftalátom u kojencov [2]. Expozícia environmentálnym chemikáliám už počas raného detstva môže zvýšiť riziko vzniku detských chorôb [2, 8, 7].

V súčasnosti sú ftalátové zmäkčovadlá nahradzané neftalátovými alternatívami, ktoré v menšej

miere migrujú z polymérov a majú nízku toxicitu. Väčšina plastifikátorov po vstupe do ľudského tela podlieha rýchlej metabolizácii. Toxický potenciál zmäkčovadiel je do značnej miery spôsobený práve ich metabolickou transformáciou na toxickejšie metabolity. Produktom alternatívnych zmäkčovadiel by v ideálnom prípade mali byť metabolity s menej závažnými následkami na ľudské zdravie. Existuje množstvo rôznych alternatívnych zmäkčovadiel vrátane adipátov, benzoátov, citrátov, esterov cyklohexándikarboxylových kyselín, epoxidovaných rastlinných olejov, glycerolacetylovaných esterov, fosfátových esterov, sebakátov, tereftalátov a trimeilitátov. Pre väčšinu alternatívnych zmäkčovadiel sú dostupné informácie o vlastnostiach a toxikologických štúdiách, nie sú však úplné. Niektoré náhrady vstúpili na trh len nedávno a chýbajú údaje najmä o možných toxických účinkoch pri dlhodobej expozícii [10]. Jednou z týchto náhrad je zlúčenina DINCH (diizononylester kyseliny cyklohexán-1,2-dikarboxylovej), ktorá sa využíva ako aditívum v oblasti medicíny, potravinových obalov, na výrobu hračiek a športových pomôcok, ako aj pri výrobe podlahových krytín, nepremokavých odevov, v automobilovom priemysle, pri výrobe stavebných konštrukcií, káblov, a pod. [11, 12]. Plastifikátor DINCH bol na trh bol uvedený v roku 2002. Podobne ako u ftalátov aj v tomto prípade prevláda u človeka expozícia požitím 90 %. Zvyšných 10 % sa do tela môže dostať napr. prostredníctvom prachu (vdýchnutím, dermálnym kontaktom) [13, 14].

Chemická štruktúra DINCH a jeho metabolitov je podobná s ftalátmi (Obr. 1) a DINCH sa po vstupe do organizmu metabolizuje rovnakým spôsobom ako vysokomolekulové ftaláty [15]. Existuje teda predpoklad, že aj DINCH a jeho metabolity takisto prechádzajú do materského mlieka.

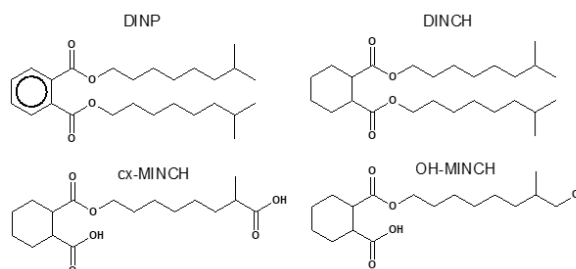
Novšie štúdie preukazujú, že DINCH má významnejšie účinky na organizmus, ako sa pôvodne predpokladalo. Okrem cytotoxicity plastifikátora DINCH pri vyššej miere expozície v obličkových bunkách a oxidačného poškodenia DNA v pečeno- vých bunkách u ľudí [16], tento plastifikátor tiež priamo ovplyvňuje Leydigove bunky produkujúce hormóny v semenníkoch potkanov po dlhšej expozícii, čo spôsobuje zníženie hladiny testosterónu v krvi [17]. Rovnako, pri skúmaní možného účinku DINCH na imunitný systém, výsledky štúdie [18] dokazujú, že plastifikátor DINCH môže ovplyvňovať makrofágy u ľudí vyvolaním bunkového stresu

a tým aj zápalovej reakcie, čo môže viesť k nepriaznivým zdravotným účinkom.

Vzhľadom na uvedené skutočnosti je žiadúce zistiť expozíciu kojencov plastifikátoru DINCH prostredníctvom materského mlieka.

Vzhľadom na komplexné zloženie materského mlieka nie je jeho analýza jednoduchá. Príčinou sú vnútorná zložitosť vzorky (materské mlieko obsahuje štruktúrne rozmanité zlúčeniny, ktorých koncentrácie sa často menia aj o niekoľko rádov) a tiež predanalytické kroky súvisiace s odberom, skladovaním a predúpravou vzorky. Krok prípravy vzorky určuje presnosť, citlivosť a robustnosť chemickej analýzy [19]. Základom predúpravného postupu na HPLC-MS/MS stanovenie ftalátových zmäkčovadiel a ich metabolitov v materskom mlieku je, podobne ako v moči, enzymatická dekonjugácia glukuronidových konjugátov sledovaných analytov a následná extrakcia [2-7].

Pre posúdenie expozície plastifikátoru DINCH sa v súčasnosti využíva stanovenie sekundárnych oxidovaných metabolitov, najmä mono(hydroxyizononyl)ester kyseliny cyklohexán-1,2-dikarboxylovej (OH-MINCH) a mono(karboxyizooktyl)ester kyseliny cyklohexán-1,2-dikarboxylovej (cx-MINCH), v moči (Obr. 1) [20-23].



Obrázok 1 Štruktúra ftalátového plastifikátora DINP (diizononylftalát), jeho náhrady DINCH (diizononylester kyseliny cyklohexán-1,2-dikarboxylovej) a oxidovaných metabolitov cx-MINCH (mono(karboxyizooktyl)ester kyseliny cyklohexán-1,2-dikarboxylovej) a OH-MINCH (mono(hydroxyizononyl) ester kyseliny cyklohexán-1,2-dikarboxylovej).

Cieľom tejto práce bolo otestovať a porovnať rôzne spôsoby predúpravy materského mlieka za účelom dosiahnutia čo najlepšej výťažnosti a efektivity predúpravného postupu pre oxidované metabolity OH-MINCH a cx-MINCH, ako aj štúdium distribúcie týchto metabolitov medzi jednotlivé frakcie materského mlieka – vodnú, bielkovinovú

a tukovú. Skúmaná bola vodná frakcia mlieka získaná po centrifugácii a extrakty do etylacetátu a zmesi etylacetát/hexán.

MATERIÁL A METÓDY

Chemikálie

Štandardy analytov OH-MINCH (mono(hydroxyizonyl)ester kyseliny cyklohexán-1,2-dikarboxylovej) a cx-MINCH (mono(karboxyizooktyl)ester kyseliny cyklohexán-1,2-dikarboxylovej), ako aj izotopovo značené štandardy D8-OH-MINCH a D8-cx-MINCH boli zaobstarané z TRC (Toronto, Canada). Acetonitril (ACN) LC-MS čistoty, použitý na prípravu zásobných roztokov štandardov a ako mobilná fáza, bol zakúpený od Fisher Scientific (Loughborough, UK). Ultračistá deionizovaná voda použitá na riedenie roztokov a ako mobilná fáza bola pripravená pomocou systému Water Pro PS (Labconco, USA) a dočistená pomocou systému Simplicity® Ultrapure (Milipore, Molsheim, Francúzsko). Ďalšie chemikálie použité pri predúprave vzorky boli kyselina octová ľadová p. a. (Mikrochem, Pezinok, Slovakia), β -glukuronidáza z *E. Coli* K12 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a octan amónny (NH_4Ac) (Merck, Darmstadt, Nemecko). Rozpúšťadlá použité na extrakciu boli etylacetát (J.T. Baker, Deventer, Holandsko) a *n*-hexán (Merck, Darmstadt, Nemecko).

Príprava roztokov

Zásobné roztoky štandardov boli pripravené rozpustením v acetonitrile o koncentracii 2,5 g/l cx-MINCH, 1 g/l OH-MINCH, 1 g/l D8-cx-MINCH a 0,5 g/l D8-OH-MINCH. Z týchto roztokov bol následne riedením pripravený zmesný roztok štandardov analytov o koncentracii 1 mg/l jednotlivých zložiek (cx-MINCH, OH-MINCH) a zmesný roztok vnútorných štandardov o koncentracii 1 mg/l jednotlivých zložiek (D8-cx-MINCH, D8-OH-MINCH) vo vode. Tieto roztoky boli použité na obohatenie vzorky materského mlieka a vyhodnotenie výťažnosti, matricových efektov a celkovej efektivity predúpravného postupu. Pripravené roztoky boli skladované pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Pri predúprave vzoriek materského mlieka bol použitý tlmivý roztok 1 mol/l octanu amónneho upravený na $\text{pH} = 6$ a roztok β -glukuronidázy zriedený s tlmivým roztokom v pomere 1:1.

Pri postupoch s extrakciou do organického rozpúšťadla bol extrakt po odparení rozpúšťadla rekonštituovaný pomocou rekonštitučného roztoku so zložením 10 % ACN a 0,05 % kyseliny octovej vo vode.

Príprava vzoriek materského mlieka

Vzorky materského mlieka od dobrovoľných darcýň boli anonymizované a skladované v sklenených fľaštičkách pri teplote $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Štúdiá, ktorej súčasťou je aj tento príspevok, bola schválená Etickou komisiou Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského pod číslom ECH19008.

Materské mlieko bolo pre vyhodnotenie výťažnosti a celkovej účinnosti predúpravného postupu po rozmrazení upravované štyrmi rôznymi predúpravnými postupmi, pričom postup enzymatickej dekonjugácie je rovnaký pre všetky.

1. Po rozmrazení a zvortexovaní sa k 200 μl materského mlieka pridalo 150 μl octanového tlmivého roztoku, 10 μl zmesného roztoku štandardov analytov, 10 μl zmesného roztoku vnútorných štandardov a 5 μl roztoku β -glukuronidázy. Po zvortexovaní sa vzorky nechali 2 hodiny inkubovať vo vodnom kúpeli pri teplote $37\text{ }^\circ\text{C}$. Po ukončení inkubácie sa pridalo 10 μl kyseliny octovej a vzorky sa dali na noc vymraziť ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) za účelom kryoprecipitácie proteínov. Po rozmrazení boli vzorky zvortexované a centrifugované ($20\text{ }^\circ\text{C}$; 15 min; 14000 rpm) [20]. Supernatant (vodná frakcia vzorky) bol odobratý do 96 jamkovej filtračnej platničky (PTFE filter), prefiltrovaný do 96 jamkovej mikrotitračnej platničky (centrifúga, $20\text{ }^\circ\text{C}$; 15 min; 4000 rpm), ktorá bola následne umiestnená do automatického dávkovača vzoriek pre HPLC-MS/MS analýzu.
2. Druhý postup zahŕňa extrakciu organickým rozpúšťadlom po enzymatickej dekonjugácii. Postup je rovnaký po prídavok kyseliny octovej, ako v prvom prípade. Následne sa pridalo 300 μl etylacetátu. Vzorky boli zvortexované a umiestnené na 30 minút na laboratórnu trepačku (1600 rpm), následne do centrifúgy ($-10\text{ }^\circ\text{C}$; 15 min; 14000 rpm). Odobratý supernatant - etylacetátový extrakt bol prefiltrovaný (rovnako ako v prvom postupe) do 96 jamkovej mikrotitračnej platničky a vysušený do sucha prúdom vzduchu ($40\text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm). Následne sa pridalo 250 μl

- rekonštitučného roztoku a po pretrepaní (2 min, 650 rpm) boli extrakty pripravené na analýzu.
3. Tretí postup bol rovnaký ako predchádzajúci, len s tým rozdielom, že sa ako extrakčné činidlo použila zmes rozpúšťadiel etylacetát/*n*-hexán v pomere 1:1.
 4. Posledný postup bol rovnaký ako prvý, avšak spracovávaný objem vzorky materského mlieka bol 300 µl a objem pridávaného tlmivého roztoku bol 100 µl.

Za účelom štúdia distribúcie analytov medzi jednotlivé frakcie materského mlieka – vodnú, tukovú a bielkovinovú (Obr. 2), sa po odobratí vodnej frakcie extrahovali zvlášť tuková frakcia a zvlášť bielkovinová frakcia (pre 1. postup), resp. tuková aj bielkovinová frakcia spolu (pre 1. a 4. postup) tak, že sa k nim pridalo 300 µl etylacetátu a po zvortexovaní a sonikácii (30 min) bol postup extrakcie rovnaký, ako je uvedené v 2. postupe.



Obrázok 2 Vzorka materského mlieka po dekonjugácii a centrifugácii.

Experimentálne podmienky HPLC-MS/MS

Na stanovenie metabolitov DINCH bola použitá technika on-line SPE v spojení s HPLC-MS/MS v systéme s reverznými fázami. Použitý bol kvapalinový chromatograf Finnigan Surveyor (Thermo Fisher Scientific Inc.) v spojení s hmotnostným spektrometrom s trojitým kvadrupólom Finnigan TSQ Quantum GC (Thermo Fisher Scientific Inc.) s vyhrievaným zdrojom elektrosprejovej ionizácie (HESI) v negatívnom móde.

Podmienky pre HPLC-MS/MS analýzu boli rovnaké ako publikované podmienky pre HPLC-MS/MS analýzu metabolitov DINCH v moči [23]. Dávkovaný objem bol 140 µl.

Výpočet parametrov predúpravného postupu

Pre vyhodnotenie a porovnanie rôznych predúpravných postupov boli použité nasledovné parametre [24]:

- maticový efekt $ME(\%) = B/A \times 100$
- výtťažnosť $RE(\%) = C/B \times 100$
- celková efektivita $PE(\%) = C/A \times 100$

kde A – plocha píku štandardu v čistom rozpúšťadle, B – plocha píku štandardu pridaného po úprave vzorky pred meraním, C – plocha píku štandardu pridaného do vzorky pred úpravou vzorky. Z uvedeného vyplýva, že celková efektivita procesu závisí od výtťažnosti a maticového efektu $PE = ME \times RE$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky sú priemerom troch paralelných meraní. Keďže hodnoty pre štandardy analytov a pre ich zodpovedajúce izotopovo značené štandardy boli porovnateľné, v nasledujúcich tabuľkách a grafoch sú uvedené ich priemerné hodnoty.

V tabuľke 1 sú uvedené hodnoty parametrov jednotlivých predúpravných postupov. Z výsledkov je zrejmé, že prvý postup, kde sa analyzovala vodná frakcia a postup s extrakciou etylacetátom (2. postup) poskytli najvyššie a porovnateľné hodnoty výtťažnosti a celkovej efektivity.

Nižšia výtťažnosť pre tretí postup, extrakciu zmesou etylacetát/*n*-hexán, je spôsobená tým, že *n*-hexán je nepolárne organické rozpúšťadlo, ktoré spôsobí rozpustenie väčšieho množstva tukovej frakcie mlieka a po vysušení extraktov bol pozorovaný v mikrotitračnej platničke zvyšok tukovej frakcie. Po zaliatí rekonštitučným roztokom tak v tomto zvyšku tukovej frakcie zostáva väčšia časť analytov v dôsledku vysokého obsahu vody v rekonštitučnom roztoku (90 %) a teda horšej miešateľnosti s tukovou frakciou. Tento efekt bol pozorovaný v menšej miere aj pre etylacetátový extrakt (2. postup).

Vo štvrtom postupe bol objem matrice navýšený s cieľom zvýšiť výtťažnosť metódy. Zvýšením objemu matrice však vyššia výtťažnosť nebola dosiahnutá, práve naopak. Zväčšením objemu matrice na 300 µl a znížením objemu pufru na 100 µl sa pomer tukovej a bielkovinovej frakcie ku vodnej frakcii zvýšil v porovnaní s prvým postupom predúpravy. Analyty sa viac distribuovali do tukovej a bielkovinovej frakcie, čo je zrejmé aj z obrázku 3B. Tento fakt podporujú aj výsledky štúdie týkajúcej sa stanovenia metabolitov ftalátov v materskom mlieku (Calafat a kol., 2004), kde bolo preukázané, že metabolity vyšších ftalátov sú viazané v menej rozpustných mliečnych zložkách, ktoré tvoria po centrifugácii

Tabuľka 1 Vypočítané parametre použitých predúpravných postupov pre cx-MINCH a OH-MINCH. ME – maticový efekt, RE – výťažnosť, PE – celková efektívnosť procesu

Postup predúpravy	ME (%)		RE (%)		PE (%)	
	cx-MINCH	OH-MINCH	cx-MINCH	OH-MINCH	cx-MINCH	OH-MINCH
1	86,8	80,2	51,7	51,6	44,9	41,4
2	95,6	83,6	50,1	46,9	47,9	39,2
3	101,8	77,9	22,6	24,4	23,0	19,0
4	79,2	67,0	26,5	31,2	21,0	20,9

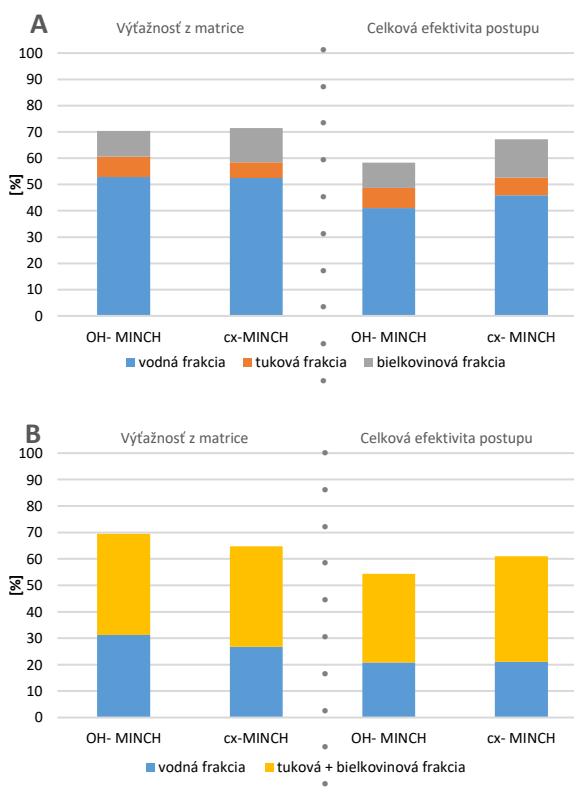
gácii tuhú usadeninu a neprechádzajú dobre do supernatantu [25]. Výraznejší vplyv matrice na účinnosť ionizácie bol pozorovaný pre analyt OH-MINCH v porovnaní s cx-MINCH. Pre cx-MINCH bola účinnosť ionizácie výrazne lepšia pri postupoch s extrakciou doorganického rozpúšťadla, pre OH-MINCH tento efekt nebol pozorovaný.

Pre štúdium distribúcie analytov medzi jednotlivé frakcie materského mlieka po enzymatickej dekonjugácii boli okrem vodnej frakcie v 1. a 4. postupe analyzované aj etylacetátové extrakty bielkovinovej a tukovej frakcie. Keďže analýza extraktu bielkovinovej a tukovej frakcie separátne poskytla porovnateľné výsledky s extrakciou spojenj bielkovinovej a tukovej frakcie pre 1. postup, následne bola v 4. postupe uskutočnená už len extrakcia spojenj tukovej a bielkovinovej frakcie (Obr. 3).

Z obrázku 3 je zrejme, že najvyššia dosiahnutá celková výťažnosť je na úrovni cca 70 %. Straty môžu byť spôsobené zaradením filtračného kroku v procese predúpravy vzorky, ako aj uvedenou nekompatibilitou rekonštitučného roztoku (ktorého zloženie vychádza z počiatočných podmienok HPLC separácie) s rozpustenou časťou tukovej frakcie, do ktorej sa analyty, vzhľadom na svoju nízku polaritu, viac distribuujú.

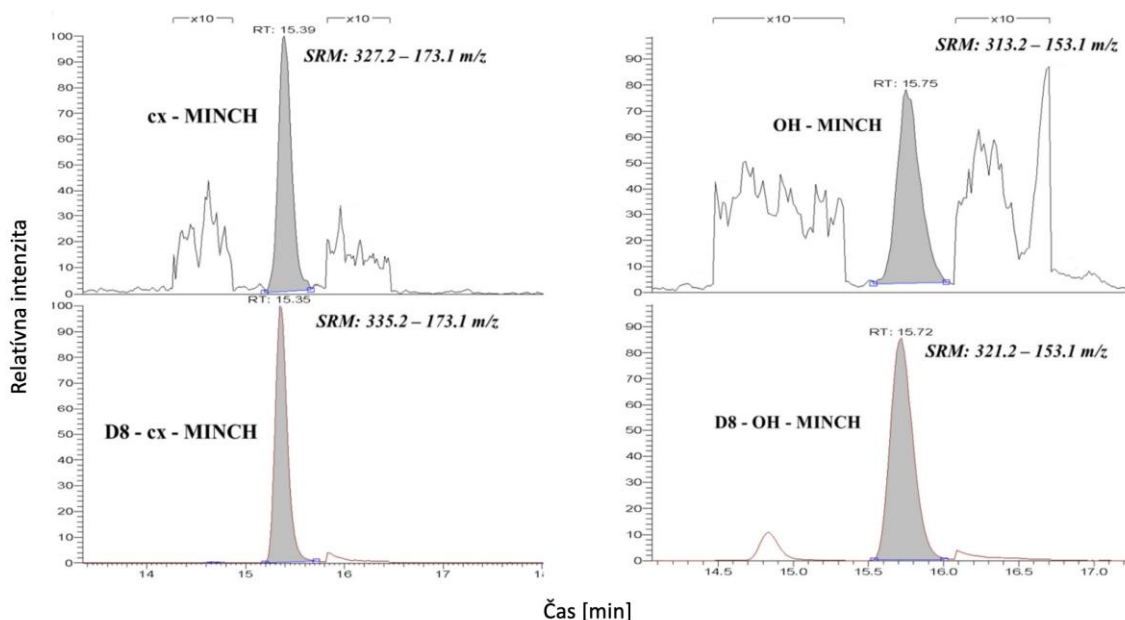
Z výsledkov je zrejme, že distribúcia analytov medzi jednotlivé frakcie materského mlieka a výťažnosť rôznych postupov predúpravy do veľkej miery závisí najmä od obsahu tukov v materskom mlieku. Zloženie materského mlieka sa mení [1]. V prvých cca 5 dňoch po pôrode sa tvorí kolostrum, ktoré v porovnaní so zrelým mliekom obsahuje nižší podiel tuku. Medzi 6. a 15. dňom po pôrode sa začína produkovať prechodné mlieko s vyšším obsahom tuku a zrelé mlieko sa začína produkovať 4 – 6 týždňov po pôrode [26]. Zloženie materského mlieka sa však mení aj v rámci dňa, pričom celkové koncentrácie tukov a živín rozpustných v tukoch, dosahujú najvyššie hodnoty koncentrácií denne v dopoludňajších hodinách, ich koncentrácia je tiež vyššia v zadnom mlieku ako prednom [27].

Najlepší spôsob odberu materského mlieka za účelom stanovenia endogénnych a exogénnych látok by bol preto odber celého objemu mlieka produkovaného počas 24 hodín. Vhodnou alternatívou môže byť tiež jednorazový odber celého objemu



Obrázok 3 Distribúcia oxidovaných metabolitov DINCH, OH-MINCH a cx-MINCH, v jednotlivých frakciách materského mlieka pre dva predúpravné postupy. *Legenda:* A – 1. postup predúpravy (analýza vodnej frakcie a etylacetátových extraktov tukovej a bielkovinovej frakcie separátne); B – 4. postup predúpravy (analýza vodnej frakcie a etylacetátových extraktov spojenj tukovej a bielkovinovej frakcie)

mlieka v konkrétnom časovom úseku. Väčšina publikovaných štúdií však zahŕňa neštandardizovaný odber od darcov, ktorých mlieko sa odoberá počas dňa v rôznych časových úsekoch, v rôznych časoch v rámci dojčenia alebo rôznych štádiách laktácie [1, 28].



Obrázok 4 Chromatografické záznamy vzorky materského mlieka obohateného o cx-MINCH na koncentračnej úrovni 0,06 $\mu\text{g/l}$, OH-MINCH na koncentračnej úrovni 0,12 $\mu\text{g/l}$ so znázorneným 10 násobne zvýšeným šumom a pre zodpovedajúce značené štandardy na koncentračnej úrovni 50 $\mu\text{g/l}$

Z testovaných postupov predúpravy v rámci tejto práce bol zvolený ako najvhodnejší 1. postup, HPLC-MS/MS analýza vodnej frakcie pre spracovaný objem materského mlieka 200 μl , pre ktorý bol odhadnutý detekčný a kvantifikačný limit pre jednotlivé analyty. Tento postup má porovnateľnú výťažnosť a celkovú efektivitu s postupom extrakcie celého objemu etylacetátom (2. postup predúpravy), avšak zahŕňa menej krokov a je menej časovo náročný, lacnejší a nepoužívajú sa organické rozpúšťadlá.

Limity detekcie (pomer signál/šum = 3) boli odhadnuté pre cx-MINCH na úrovni 0,01 $\mu\text{g/l}$, pre OH-MINCH 0,04 $\mu\text{g/l}$. Odhadnuté kvantifikačné limity (pomer signál/šum = 10) boli pre cx-MINCH na úrovni 0,03 $\mu\text{g/l}$, pre OH-MINCH 0,12 $\mu\text{g/l}$ (Obr. 4).

V štyroch rôznych vzorkách materského mlieka, ktoré boli k dispozícii v rámci tejto štúdie boli oba analyty pod medzou detekcie. Existuje viacero štúdií venovaných stanoveniu ftalátových plastifikátorov a ich metabolitov v materskom mlieku, ktoré dokazujú, že ftaláty s dlhým hydrofóbnym reťazcom (DEHP – dietylhexylftalát, DINP) ľahšie prechádzajú do materského mlieka nezmetabolizované, alebo ako primárne monoestery [29-31]. Sekundárne metabolity DEHP a DINP (oxidované)

boli častokrát pod medzou detekcie, prípadne detegované len v malom počte vzoriek [32, 33]. Keďže DINCH a jeho metabolity sa správajú podobne ako vyššie spomenuté ftaláty, vzhľadom na ich lipofilnú povahu a obsah tuku v materskom mlieku je pravdepodobné, že do materského mlieka budú ľahšie prechádzať materská zlúčenina DINCH a jeho primárny metabolit MINCH (mono(izononyl)ester kyseliny cyklohexán -1,2-dikarboxylovej).

ZÁVER

Ľudský biomonitoring je najlepším nástrojom na identifikáciu, kontrolu a prevenciu vystavenia populácie chemickým látkam znečisťujúcim životné prostredie, najmä takým, ktoré by mohli predstavovať potenciálne zdravotné riziko, ktoré nemožno jednoznačne vylúčiť, najmä pri ich dlhodobjšom užívaní a zvyšujúcom sa príjme, ako pri DINCH.

V rámci ľudského biomonitoringu sa využívajú rôzne biologické matrice, okrem iných aj materské mlieko. Materské mlieko môže byť zdrojom expozície zraniteľnej časti populácie v skorom období vývoja mnohým škodlivým environmentálnym polutantom, ako sú aj plastifikátory. Zloženie tejto matrice je veľmi komplexné a premenlivé, preto je výber vhodného predúpravného postupu pre stanovenie cieľových látok kľúčovou časťou analytic-

kého postupu. Na základe tejto štúdie, ako aj poznatkov z podobných štúdií o ftalátoch, sa sekundárne metabolity DINCH nejavia ako najvhodnejšie biomarkery pre posúdenie expozície DINCH prostredníctvom materského mlieka. Vhodnejším biomarkerom by mohol byť primárny metabolit, prípadne nemetabolizovaný DINCH.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-20-0462.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] BALLARD O., MORROW A.L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013; 60 (1): 49-74.
- [2] HENDERSON N. B., SEARS C. G., CALAFAT A. et al. Associations of breast milk consumption with urinary phthalate and phenol exposure biomarkers in infants. *Environ Sci Technol Lett.* 2020; 7 (10): 733-739.
- [3] HINES E. P., CALAFAT A. M., SILVA M. J. et al. Concentrations of phthalate metabolites in milk, urine, saliva, and serum of lactating North Carolina women. *Environ Health Perspect.* 2009; 117 (1): 86-92.
- [4] MAIN K.M., MORTENSEN G.K., KALEVA M.M. et al. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect.* 2006; 114: 270-276.
- [5] HOGBERG J., HANBERG J., BERGLUND M. et al. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ Health Perspect.* 2008; 116: 334-339.
- [6] LATINI G., DE FELICE C., PRESTA G. et al. Lactational exposure to di(2-ethylhexyl)-phthalate. *Ped Res.* 2003; 54 (4): 564.
- [7] MORTENSEN G.K., MAIN K.M., ANDERSON A.M. et al. Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal Bioanal Chem.* 2005; 382: 1084-1092.
- [8] VRIJHEID M., CASAS M., GASCON M. et al. Environmental pollutants and child health – A review of recent concerns. *Int J Hyg Environ Health.* 2016; 219 (4-5): 331-342.
- [9] BRAUN J. M. Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nat Rev Endocrinol.* 2017; 13: 161.
- [10] BUI T., GIOVANOULIS G., COUSINS A.P. et al. Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. *Sci Total Environ.* 2016; 541: 451-467.
- [11] EFSA. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to the 12th list of substances for food contact materials. *EFSA J.* 2006; 4 (10): 395.
- [12] BASF Corporation. Hexamoll® DINCH® The trusted non-phthalate plasticizer. 2019. [15. 11. 2019] https://chemicals.basf.com/global/2017_Brochure_HexamollDINCH_en.pdf.
- [13] GIOVANOULIS G., BUI T., XU F. et al. Multi-pathway human exposure assessment of phthalate esters and DINCH. *Environ Int.* 2018; 112: 115-126.
- [14] KASPER-SONNENBERGA M., KOCH H. M., APEL P. et al. Time trend of exposure to the phthalate plasticizer substitute DINCH in Germany from 1999 to 2017: Biomonitoring data on young adults from the Environmental Specimen Bank (ESB). *Int J Hyg Environ Health* 2019; 222 (8): 1084-1092.
- [15] FREDERIKSEN H., UPNERS E.N., LINDHART LJUBICIC M. et al. Exposure to 15 phthalates and two substitutes (DEHTP and DINCH) assessed in trios of infants and their parents as well as longitudinally in infants exclusively breastfed and after the introduction of a mixed diet. *Environ Int.* 2022; 161: 107107.
- [16] VASCONCELOS A.L., SILVA M.J., LOURO H. In vitro exposure to the nextgeneration plasticizer diisononyl cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH): cytotoxicity and genotoxicity assessment in human cells. *J Toxicol Environ Heal Part A.* 2019; 82: 526–536.
- [17] CAMPIOLI E., LEE S., LAU M. et al. Effect of prenatal DINCH plasticizer exposure on rat offspring testicular function and metabolism. *In Sci Rep.* 2017; 7 (1): 11072.
- [18] SCHAFFERT A., ARNOLD J., KARKOSSA I. et al. The emerging plasticizer alternative DINCH and its metabolite MINCH induce oxidative stress and enhance inflammatory responses in human THP-1 macrophages. *Cells.* 2021; 10 (9): 2367.
- [19] TEN-DOMÉNECH I., RAMOS-GARCIA V.,

- PIÑEIRO-RAMOS J.D. Current practice in untargeted human milk metabolomics. *Metabolites*. 2020; 10(2): 43.
- [20] KOCH H.M., SCHÜTZE A., PÄLMKE C. et al. Metabolism of the plasticizer and phthalate substitute diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH®) in humans after single oral doses. *Arch Toxicol*. 2013; 87 (5): 799-806.
- [21] JURDÁKOVÁ H., GÓROVÁ R. Ľudský biomonitoring náhrady ftalátových plastifikátorov Hexamoll® DINCH. *Zdravotnicke listy*. 2019; 7 (4): 6-11.
- [22] SILVA M.J., FURR J., PREAU J.L. et al. Identification of potential biomarkers of exposure to di(isononyl) cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH), an alternative for phthalate plasticizers. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2012; 22 (2): 204-211.
- [23] JURDÁKOVÁ H., GÓROVÁ R. HPLC-MS/MS metóda pre stanovenie metabolitov DINCH v moči. *Zdravotnicke listy*. 2021; 9 (4): 34-40.
- [24] TRUFELLI H., PALMA P., FAMIGLINI G. et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. In *Mass Spectrom Rev*. 2011; 30 (3): 491-509.
- [25] CALAFAT A., SLAKMAN A.R., SILVA M. J. et al. Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004; 805 (1): 49-56.
- [26] GARWOLIŃSKA D., NAMIEŚNIK J. KOTWASIK A. et al. Chemistry of human breast milk - A comprehensive review of the composition and role of milk metabolites in child development. *J Agric Food Chem*. 2018; 66 (45): 11881-11896.
- [27] LEGHI G.E., MIDDLETON P.F., MUHLHAUSLER B. S. A methodological approach to identify the most reliable human milk collection method for compositional analysis: a systematic review protocol. *Sys Rev*. 2018; 7: 122.
- [28] AZAD M. B., ATKINSON S., GEDDES D. Collection and storage of human milk for macronutrient and macromolecule analysis- an overview. In McGuire, M., O'Connor, L. D. *Human Milk: Sampling and Measurement of Energy-Yielding Nutrients and other Macromolecules*. First Edition. London, UK: Academic Press, 2021. ISBN 978-0-1281-5350-5, 3-33.
- [29] FROMME H., GRUBER L., SECKIN E. et al. Phthalates and their metabolites in breast milk - Results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI). *Environ Int*. 2011; 37 (4): 715-722.
- [30] FREDERIKSEN H., SKAKKEBÆ N.E., ANDEROSON A.M. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res*. 2007; 51 (7): 899 - 911.
- [31] HANBERG A., HÖGBERG J., BERGLUND M. et al. Phthalates and their metabolites in human breast milk, blood and urine as measures for monitoring exposure in human risk groups. Health & Environmental Research Online (HERO), Technical report. *Phthalates SweEPA*. 2005; 1-22.
- [32] SCHLUMPF M., KYPKE K., WITTASSEK M. et al. Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere*. 2010; 81 (10): 1171-1183.
- [33] KIM S., LEE J., PARK F. et al. Concentrations of phthalate metabolites in breast milk in Korea: Estimating exposure to phthalates and potential risks among breast-fed infants. *Sci Total Environ*. 2015; 508: 13-19.