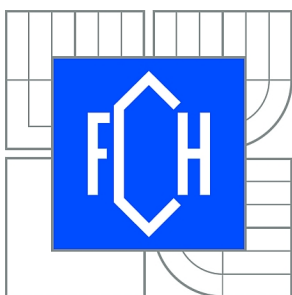




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH TECHNIK VE SPOJENÍ S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ PRO STANOVENÍ ENVIRONMENTÁLNĚ VÝZNAMNÝCH LÁTEK

APPLICATION OF SEPARATION TECHNIQUES CONNECTED WITH MASS SPECTROMETRY
FOR THE ANALYSIS OF ENVIRONMENTALLY IMPORTANT COMPOUNDS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. DANIELA MÁCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JOSEF ČÁSLAVSKÝ, CSc.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce: **FCH-DIZ0063/2011** Akademický rok: **2011/2012**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Ing. Daniela Mácová**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (P2805)
Studijní obor: Chemie životního prostředí (2805V003)
Vedoucí práce **doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.**
Konzultanti:

Název dizertační práce:

Využití separačních technik ve spojení s hmotnostní spektrometrií pro stanovení environmentálně významných látek

Zadání dizertační práce:

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na možnosti využití hmotnostní spektrometrie při identifikaci degradačních produktů polyurethanových pěn a při stanovení indikátorů oxidativního stresu v živých organismech
2. Realizace modelových experimentů pro identifikaci degradačních produktů polyurethanových pěn standardního složení a s přidavkem biodegradabilního modifikátoru při využití akcelerovaného stárnutí
3. Realizace modelových experimentů pro ověření využitelnosti F2-isoprostanů jako indikátorů oxidativního stresu v organismech
4. Zhodnocení získaných výsledků

Termín odevzdání dizertační práce: 5.7.2012

Dizertační práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu dizertační práce. Toto zadání je přílohou dizertační práce.

Ing. Daniela Mácová
Student(ka)

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Prvním tématem předkládané dizertační práce byla identifikace degradačních produktů flexibilních polyurethanových pěn s přidaným biodegradovatelným plnidlem vzniklých hydrolyzou a fotodegradací. U hydrolyzátů polyurethanových pěn určených pro ekotoxikologické testy byly za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS) separovány hydrolyzní degradační produkty. Jejich struktura byla objasňována pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS^n). Fotodegradační produkty polyurethanových pěn byly získány expozicí materiálů záření vlnové délky 254 nm. Semivolatilní degradační produkty byly z materiálu izolovány extrakcí n-hexanem, volatilní sloučeniny mikroextrakcí tuhou fází (SPME). Pro jejich identifikaci byla použita plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) a orthogonální kompletní tandemová plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GCxGC/TOF MS). V závěru této části je diskutován vliv přidaného bioplnidla na charakter degradačních produktů a vliv stanovených degradačních produktů na životní prostředí.

Předmětem druhého tématu bylo stanovení izoprostanů – markerů oxidativního stresu v tkáních mořského bezobratlovce sasanky koňské (*Actinia equina*). Z kyseliny arachidonové byly syntetizovány F_2 -izoprostany, které byly použity pro vývoj a optimalizaci metody stanovení těchto látek pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS/MS). Byla optimalizována izolace izoprostanů z tkání *Actinia equina* pomocí extrakce tuhou fází (SPE). Výsledná metodika byla použita pro kvantifikaci izoprostanů v tkáních *Actinia equina*, které byly vystaveny mírným i vysokým teplotním změnám. Změna teploty měla za cíl iniciovat v organismech oxidativní stres. Byly rovněž sledovány časové změny hladin neznámých sloučenin, které byly z tkání extrahovány spolu s F_2 -izoprostany. Identita těchto sloučenin je v dizertační práci rovněž diskutována. Závěrem práce je zhodnocena možnost využití stanovení izoprostanů v korálnatcích k monitoringu oxidativního stresu těchto organismů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Flexibilní polyurethanové pěny s biodegradovatelným plnidlem, fotodegradace, hydrolyza, izoprostany, oxidativní stres, *Actinia equina*, GC/MS, GCxGC/MS, HPLC/MS/MS, MS^n

ABSTRACT

The identification of the hydrolysis and photodegradation products of flexible polyurethane foams (PUFs) with addition of biooriginated and biodegradable additive was the first topic of this dissertation work. Separation of polyurethane foam hydrolysis degradation products, intended for ecotoxicological tests, was managed by high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC/MS). The degradation product structure was elucidated by tandem mass spectrometry (MSⁿ). PUF photodegradation products were obtained by exposure of materials by irradiation at 254 nm. Semi-volatile degradation products were isolated from the exposed polyurethane by n-hexane extraction; volatile compounds were collected by solid phase microextraction (SPME). Gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS) and complete orthogonal tandem gas chromatography with mass spectrometry (GCxGC/TOF MS) was used for separation and identification of photodegradation products. The influence of the bio-filler on the character of degradation products and the possible effect of PUF degradation products on the environment was discussed at the end of this section.

The determination of isoprostanes – markers of oxidative stress in tissues of beadlet anemone (*Actinia equina*) was the subject of the second topic. F₂-isoprostanes were synthesized from the arachidonic acid. With thereby prepared isoprostanes the method of determination by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) was developed and optimized. The isoprostane isolation process from the *Actinia equina* tissues was optimized with solid phase extraction (SPE). The resulting methodology was used to quantify isoprostanes in tissues of anemones, which were exposed to both moderate and high temperature changes. The temperature changes were used to initiate the oxidative stress in organisms. In addition, concentration levels of unknown compounds were also monitored. These unknown compounds were extracted from tissues together with F₂-isoprostanes and their identity is discussed in this dissertation work too. The possibility of using isoprostane levels in the *Anthozoa* tissues for the oxidative stress monitoring is discussed in the conclusion of this work.

KEYWORDS

Flexible polyurethane foam with biodegradative filler, photodegradation, hydrolysis, isoprostanes, oxidative stress, *Actinia equina*, GC/MS, GCxGC/MS, HPLC/MS/MS, MSⁿ

MÁCOVÁ, D.: *Využití separačních technik ve spojení s hmotnostní spektrometrií pro stanovení environmentálně významných látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 175 s. Vedoucí dizertační práce doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za odborné vedení dizertační práce, za cenné rady a pomoc při jejím zpracování a předně také za cenný čas, ochotu a vstřícnost, s níž vždy vystupoval.

Dále bych chtěla poděkovat Dr. Stuartu Gibbovi za umožnění pobytu v Environmental Reserach Institute, Dr. Angele Squier a Dr. Kennedu Boydovi za cenné rady a pomoc se zpracováním druhé části dizertační práce. Neméně bych pak chtěla poděkovat manželům Greyovým a všem zaměstnancům Environmental Reserach Institute za příjemnou atmosféru, vstřícnost a jejich pomoc, kdykoliv bylo třeba.

Rovněž bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za podporu a akademické zázemí doktorského studia a Ing. Haně Alexové za ochotu a pomoc při sjednávání pracovní stáže.

Moje poděkování patří také toho času studentkám Tereze Tobiášové a Martině Bolechové za pomoc s experimentální částí prvního tématu dizertační práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat nynějšímu vedoucímu Oboru aplikované geochemie a zkušební laboratoře RNDr. Juraji Franců, CSc. za poskytnutí části pracovní doby pro dokončení dizertační práce.

Pracovní stáž v Environmental Reserach Institute byla finančně podporována stipendijním programem SOCRATES ERASMUS.

OBSAH

1	Úvod	9
2	Teoretická část	11
2.1	Hmotnostní spektrometrie	11
2.1.1	Ionizace	11
2.1.2	Hmotnostní analyzátory	14
2.1.3	Detektory v MS	18
2.1.4	Vakuový systém	19
2.2	Separční techniky	19
2.3	Spojení MS se separačními technikami	22
2.4	Techniky přípravy vzorků	23
2.4.1	Extrakce tuhou fází	23
2.4.2	Mikroextrakce tuhou fází	24
Téma A.....		27
3	Teoretická část	28
3.1	Polyurethany.....	28
3.1.1	Historie vývoje polyurethanů	28
3.1.2	Syntéza polyurethanů	28
3.1.3	Flexibilní polyurethanové pěny.....	30
3.1.4	Polyurethany modifikované bio-surovinami	31
3.1.5	Degradace polyurethanů.....	32
4	Experimentální část	41
4.1	Použité chemikálie	41
4.2	Instrumentace použitá k analýzám	41
4.3	Další používaná zařízení	41
4.4	Testované vzorky	42
4.5	Postupy a podmínky měření	43
4.5.1	Příprava vzorků pro analýzy	43
4.6	Finální podmínky stanovení hydrolyzních degradačních produktů PUF	44
4.6.1	Stanovení degradačních produktů pomocí HPLC/MS	44
4.6.2	Fragmentace degradačních produktů pomocí MS ⁿ	45
4.7	Finální podmínky stanovení fotodegradačních produktů PUF	46
4.7.1	Stanovení degradačních produktů pomocí GC/MS.....	46
4.7.2	Stanovení degradačních produktů pomocí GCxGC/TOF MS.....	46
5	Výsledky a diskuze.....	48
5.1	Hydrolyzní degradační produkty flexibilních PU pěn	48
5.1.1	Interpretace dat pozitivních modů HPLC/MS a MS ⁿ	48
5.1.2	Interpretace dat negativních modů HPLC/MS a MS ⁿ	64
5.2	Fotodegradační produkty flexibilních PU pěn	68
5.2.1	Fotodegradační produkty flexibilních PU pěn – extrakce rozpouštědlem	68
5.2.2	Fotodegradační produkty flexibilních PU pěn – mikroextrakce tuhou fází	75
6	Shrnutí a závěr	82

Téma B.....	89
7 Teoretická část	90
7.1 Oxidativní stres	90
7.1.1 Reaktivní formy kyslíku.....	90
7.1.2 Reaktivní formy dusíku.....	91
7.1.3 Produkce ROS v živých systémech.....	92
7.1.4 Produkce RNS v biologických systémech	94
7.1.5 Antioxidační obrana	95
7.1.6 Oxidativní poškození.....	95
7.1.7 Markery oxidativního stresu.....	97
7.2 Izoprostany	98
7.2.1 Názvosloví izoprostanů	98
7.2.2 Mechanismus syntézy izoprostanů.....	99
7.2.3 Stanovení izoprostanů	104
7.3 Oxidativní stres a blednutí korálů	107
7.3.1 Sasanka koňská (<i>Actinia equina</i>)	107
8 Experimentální část	110
8.1 Použité chemikálie a standardy	110
8.2 Instrumentace použitá k analýzám	110
8.3 Další používaná zařízení	110
8.4 Postupy a podmínky měření	111
8.4.1 Syntéza směsi izoprostanů	111
8.4.2 Transport a chov sasanek <i>Actinia equina</i> pro experimenty.....	111
8.4.3 Popis výsledných experimentů	112
8.4.4 Příprava vzorků pro analýzy HPLC/MS/MS	115
8.5 Nastavení hmotnostních spektrometrů pro analýzy	116
8.6 Finální podmínky stanovení izoprostanů HPLC/MS/MS	117
9 Výsledky a diskuze.....	118
9.1 Syntéza izoprostanů <i>in-vitro</i>	118
9.2 Optimalizace podmínek stanovení	119
9.2.1 Optimalizace přípravy vzorků.....	119
9.2.2 Optimalizace stanovení izoprostanů pomocí HPLC/MS/MS.....	120
9.3 Validace metody.....	126
9.4 Stanovení izoprostanů v tkáních <i>Actinia equina</i>	127
9.4.1 Charakterizace stanovovaných látek	128
9.4.2 Krátkodobý experiment.....	133
9.4.3 Dlouhodobý experiment.....	140
9.4.4 Kvantifikace izoprostanů ve tkáních <i>Actinia equina</i>	142
10 Shrnutí a závěr	145
11 Seznam použité literatury	148
12 Seznam použitých zkratk	162
13 Seznam příloh.....	165
14 Přílohy.....	166

1 ÚVOD

Počátky hmotnostní spektrometrie sahají až k roku 1897, kdy J. J. Thomson objevil elektron a poprvé stanovil poměr hmotnosti ku náboji m/z . V té době pravděpodobně netušil, že položil základy jedné z nejdůležitějších analytických technik pro charakterizaci nízkomolekulárních i vysokomolekulárních organických sloučenin, jakož i látek anorganického původu a organokovů.

V průběhu let se vlivem nových vynálezů a aplikačních objevů využití hmotnostní spektrometrie značně rozrostlo. Na celém světě jsou denně rutinně používány přístroje s nízkým rozlišením (LRMS) s iontovými zdroji a analyzátory cíleně volenými pro potřeby analýz, a čím dál více i přístroje s vysokým rozlišením (HRMS) sloužící především pro stanovení přesné molekulové hmotnosti, z níž lze odvodit sumární vzorec analyzované sloučeniny. Používají se jak hmotnostní spektrometry v jednoduchém, tak i v tandemovém uspořádání pro analýzy plyných, kapalných i pevných vzorků.

Separční technika, konkrétně plynová chromatografie, byla do tandemu s hmotnostní spektrometrií spojena poprvé v roce 1956. Toto spojení umožnilo separaci a hmotnostně spektrometrickou detekci volatilních a semivolatilních látek. Kapalinová chromatografie musela na spojení s hmotnostní spektrometrií čekat až do konce 70. let 20. století.

V předkládané dizertační práci byla hmotnostní spektrometrie využita pro řešení dvou odlišných problémů.

V první části byla tato technika využita ke studiu degradačních produktů flexibilních polyurethanových pěn (PUF). Právě na ně připadá největší podíl produkce polyurethanů.

S rozvojem civilizace roste i množství využívaných polymerů. To vyvolává zvyšující se tlak na jejich likvidaci. Jednou z možností likvidace PUF je jejich skládkování. Na skládkách vlivem prostředí dochází k jejich degradaci. Degradační produkty pak mohou pronikat do okolního prostředí. Protože není jisté, jaké sloučeniny degradační vznikají a jestli nejde o závažné kontaminanty životního prostředí, byly v této dizertační práci identifikovány. Pouze znalost degradačních produktů polymerů může vést k zamezení případnému vzniku potenciálně rizikových kontaminantů životního prostředí.

Při řešení této části dizertační práce byly hmotnostně-spektrometrické techniky ve spojení s kapalinovou a plynovou chromatografií využity k identifikaci neznámých látek uvolňujících se při simulaci v přírodě běžných degradačních procesů – fotolýze a hydrolýze.

V druhé části dizertační práce byla hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií použita pro sledování relativní distribuce izoprostanů – markerů oxidativního stresu, v tkáních sasanky koňské (*Actinia equina*). Tato práce byla řešena v Environmentálním výzkumném ústavu, UHI (University of the Highlands and Islands) ve Skotsku (UK). Byla součástí projektu, v němž byl sledován vliv oxidativního stresu na blednutí korálů.

Oxidativní stres je fenomén v posledních letech dosti studovaný především u lidí. Pro jeho studium bylo navrženo několik metod. Jednou z nich, v poslední době nejpoužívanější, je monitoring tvorby izoprostanů z kyseliny arachidonové v těle studovaného organismu. Kyselina arachidonová je přítomna i ve tkáních jiných živočichů než jsou savci. Odpověď na otázku, zda jsou z této kyseliny tvořeny izoprostany také v korálnatcích, byla s použitím hmotnostní spektrometrie hledána v průběhu řešení druhé části dizertační práce.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je destruktivní analytická metoda, která určuje poměry hmotnosti ku náboji (m/z) atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty.

Slouží k určení molekulových hmotností sloučenin, podává cenné informace o struktuře analyzovaných látek. Může určit izotopový poměr prvků ve vzorcích.

Lze jí použít jako analytickou techniku samostatnou nebo v kombinaci se separačními technikami.

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí:

- Iontový zdroj – slouží k převedení molekul na ionty (tzv. ionizace)
- Hmotnostní analyzátor – dělí ionty podle poměru m/z
- Detektor – detekuje ionty po jejich separaci v analyzátoru

Kromě těchto tří částí všechny hmotnostní spektrometry mají i vakuový systém, iontovou optiku sloužící k urychlení a fokusaci iontů, zařízení pro zavádění vzorku a řídicí a vyhodnocovací systém – počítač.

Oproti ostatním analytickým technikám se hmotnostní spektrometrie vyznačuje velkou variabilitou. Rozličné iontové zdroje mohou být kombinovány s různými hmotnostními analyzátory tak, aby splnily požadavky na analýzy nejrůznějších typů vzorků.

Protože pojednání o principech všech instrumentálních technik v hmotnostní spektrometrii by bylo velmi obsáhlé, jsou níže popsány pouze ty, které byly použity při řešení cílů dizertační práce.

2.1.1 Ionizace

K ionizaci molekul dochází v iontovém zdroji. Používá se několik způsobů převedení molekul na ionty, které závisí na skupenství vzorků, fyzikálně-chemických vlastnostech analytů a případně na dalších faktorech.

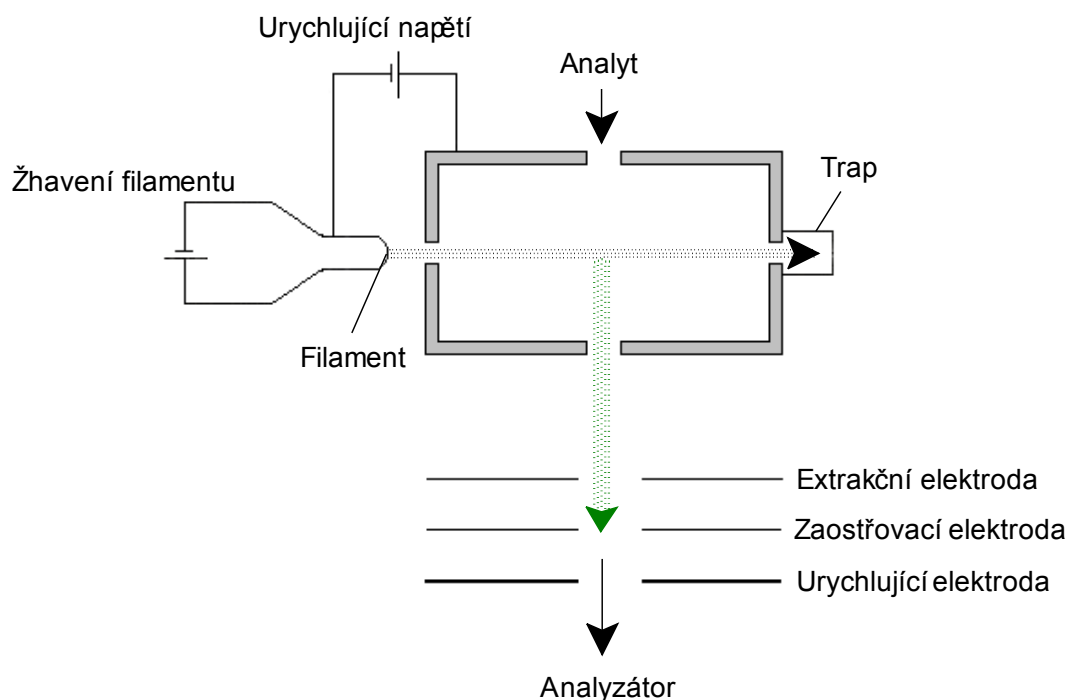
Při řešení cílů dizertační práce byly použity dvě ionizační techniky: elektronová ionizace a ionizace elektrosprejem.

2.1.1.1 Elektronová ionizace

Elektronová ionizace (EI) je jednou z nejrozšířenějších technik ionizace organických sloučenin. Používá se pro ionizaci analytů v plynném stavu. Elektronová ionizace patří mezi tzv. tvrdé ionizační techniky – získkem velkého přebytku vnitřní energie dochází k fragmentaci molekulárního iontu na velké množství fragmentů.

Principem elektronové ionizace [1-4] je interakce neutrálních molekul analytů s proudem elektronů o definované energii (obvykle 70 eV), který je emitován z wolframového (nebo rheniového) vlákna. Přiblížením emitovaného elektronu k elektronovému obalu molekuly molekuly dojde k ovlivnění jejich elektrických polí, což může vést k vyražení valenčního elektronu, a tím ke vzniku radikalkationtu $M^{\bullet+}$. Pakliže molekula získá velký přebytek energie, dojde k jejímu rozpadu na menší nabitě i nenabitě části (fragmenty). Radikalkationty a nabitě fragmenty jsou vytěšňovací elektrodou vypuzeny z iontového zdroje a fokusovány iontovou optikou do analyzátoru hmotnostního spektrometru. K ionizaci dochází za vakua ($p = 10^{-3} - 10^{-5}$ Pa).

Postupem času byly za pomoci této ionizační techniky vytvořeny databáze hmotnostních spekter. Nejznámější je databáze NIST (Wiley Registry of Mass Spectral Data) obsahující přes půl milionu hmotnostních spekter.



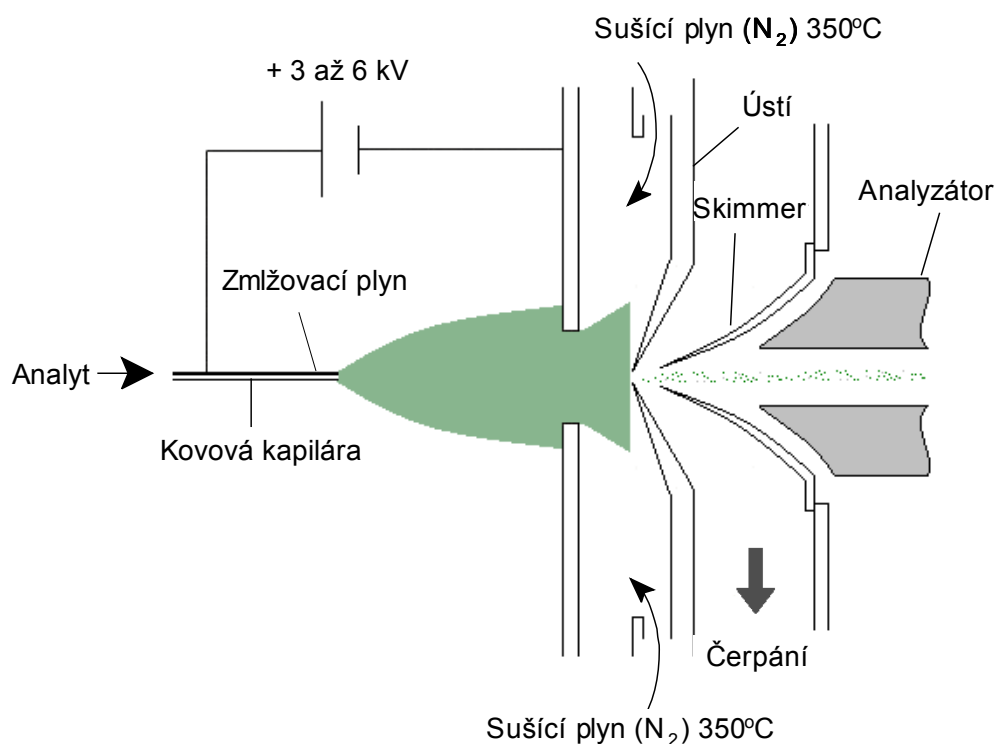
Obrázek 1: Schéma iontového zdroje pro elektronovou ionizaci [4].

2.1.1.2 Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (ESI) patří k měkkým ionizačním technikám; ionizovaná molekula získá mnohem menší množství energie než u EI, a proto dochází k fragmentaci v minimálním rozsahu. ESI byla průlomem v řešení spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Analyt, rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle, je do iontového zdroje přiveden kovovou kapilárou, přičemž mezi tuto kapiláru a protielektrodu (obvykle vstup do hmotnostního spektrometru) je vloženo vysoké napětí (3 – 6 kV) [4].

Intenzivní elektrostatické pole mezi špičkou kapiláry a vstupní elektrodou způsobuje tvorbu kapiček aerosolu, které na svém povrchu nesou velké množství nábojů. Tento proces je podporován zmlžovacím plynem (obvykle N_2). Odpařováním rozpouštědla dojde ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty dojde k tzv. Coulombické explozi – rozpadu kapiček na ještě menší kapičky, mezi něž se rozdělí původní náboje. Tento proces, Coulombických explozí a odpařování rozpouštědla z povrchu kapiček, se opakuje tak dlouho, až dojde k uvolnění kvazimolekulárních iontů [4-8]. Tyto ionty jsou vedeny přes iontovou optiku k hmotnostnímu analyzátoru.



Obrázek 2: Schéma iontového zdroje – elektrospreje [4].

Na rozdíl od elektronové ionizace dochází k ionizaci elektrosprejem za atmosférického tlaku. Ionty tedy vstupují z oblasti atmosférického tlaku do oblasti evakuované. Tento přechod je obvykle technicky řešen třístupňovým vakuovým čerpáním.

2.1.2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátory slouží k rozdělení iontů podle jejich poměru m/z . Kvalitu rozdělení iontů vyjadřuje rozlišovací schopnost hmotnostního analyzátoru. Podle ní dělíme hmotnostní analyzátory na nízko- a vysokorozlišovací.

Separace iontů podle m/z je v hmotnostních analyzátoch docílena aplikací různých fyzikálních principů; zakřivením dráhy v magnetickém nebo elektrickém poli, různou stabilitou oscilací v dvoj- nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého elektrického pole, různou dobou letu iontů urychlených na stejnou kinetickou energii nebo různou absorpcí energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném a elektrickém poli.

Při řešení cílů dizertační práce byly použity hmotnostní spektrometry využívající principu různé stability oscilace iontů v prostoru o střídavém napětí a na principu doby letu: kvadrupólový analyzátor, sférická iontová past, trojitý kvadrupól a analyzátor doby letu.

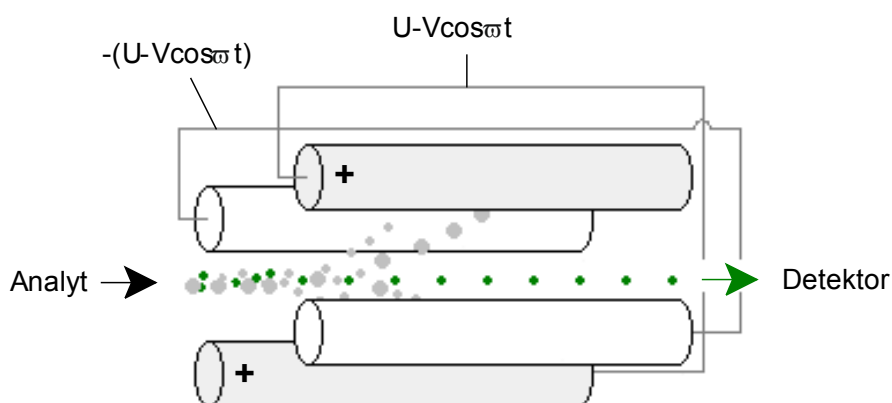
2.1.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupól (Q) je nízkorozlišovací hmotnostní analyzátor. Pro svou jednoduchou konstrukci a tím i nižší cenu v porovnání s ostatními analyzátory je velmi často používán jako analyzátor hmotnostních spektrometrů pro spojení se separačními technikami (GC/MS a HPLC/MS).

Skládá se ze čtyř stejných tyčí kruhového (nebo lépe hyperbolického) průřezu délky 20 – 30 cm. Na dvě protilehlé tyče je vloženo stejnosměrné kladné napětí, na druhé dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny tyče je superponováno vysokofrekvenční střídavé napětí.

Iont, který je přiveden do středu osy kvadrupólu, začne oscilovat. Tyto oscilace jsou v daný časový okamžik a pro určitý poměr U/V (stejnosměrné napětí/amplituda střídavého napětí) stabilní pouze pro iont s určitou hodnotou m/z . Ten projde kvadrupólem k detektoru, ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Postupnou změnou hodnot U/V jsou propouštěny na detektor všechny ionty [9]. Protože principiálně pracuje jako „hmotnostní filtr“, někdy se takto i označuje.

Hmotnostní spektrometr s kvadrupólem lze při spojení se separační technikou operovat v modu záznamu vybraného iontu (SIM – Select Ion Monitoring) nebo registrace spekter v nastaveném rozsahu m/z (SCAN). SIM mod umožňuje sledování pouze vybraného iontu nebo několika (v tomto případě se někdy používá označení MID – Multiple Ion Detection). Tato metoda se nejčastěji používá v cílené kvantitativní ultrastopové analýze. SCAN mod umožňuje proměření všech m/z v uživatelem definovaném rozsahu. Protože na proměření iontů je k dispozici menší množství času, je tento mod méně citlivý než SIM. Využívá se především pro screeningové analýzy a pro zjištění struktury neznámých látek.



Obrázek 3: Schéma kvadrupólového analyzátoru

2.1.2.2 Trojitý kvadrupól

Trojité kvadrupól (QQQ) je hmotnostní analyzátor složený ze tří kvadrupólů v tandemovém uspořádání. Dva z nich (Q_1 a Q_3) mají funkci analyzátoru, prostřední slouží jako kolizní cela. Do kolizní cely je přiváděn kolizní plyn.

Ionty vybrané v prvním kvadrupólu přichází do druhého, kde dochází k jejich kolizi s kolizním plynem – tento proces se označuje jako kolizně indukovaná disociace (CID) nebo kolizní aktivace (CA). Jestliže je tento plyn inertní, je část kinetické energie iontu transformována na vnitřní energii, která ve výsledku způsobí štěpení vazeb a fragmentaci iontů na menší ionty a neutrální ztráty.

Pakliže kolizní plyn je reaktivní, mohou být indukovány iont-molekulové reakce. Q_1 a Q_3 mohou operovat buďto jako filtry vybraných iontů nebo můžou skenovat v definovaném rozsahu.

Níže jsou uvedeny základní mody, ve kterých může trojitý kvadrupól operovat [4, 10]:

- *Skenování produktových iontů*; Q_1 je nastaven jako filtr prekurzorových iontů, které jsou fragmentovány v druhém kvadrupólu. V Q_3 dochází ke skenu fragmentových iontů
- *Skenování prekurzorových iontů*; kde Q_3 je nastaven na sledování vybraných fragmentů, zatímco Q_1 skenuje v definovaném rozsahu
- *Sken neutrálních ztrát*; kde Q_1 i Q_3 skenují s diferencí odpovídající sledované neutrální ztrátě
- *Sledování vybrané fragmentace* (SRM – Selected Reaction Monitoring), při němž Q_1 i Q_3 jsou nastavené na vybraný prekurzor a produkt a *sledování vybraných fragmentací* (MRM – Multiple Reaction Monitoring), při němž je paralelně monitorováno několik uživatelem nadefinovaných fragmentací.

Trojitý kvadrupól se nejčastěji používá při spojení hmotnostní spektrometrie se separačními technikami. Takto byl využit i při řešení cílů dizertační práce.

2.1.2.3 Iontová past

Principem iontových pastí (IT) [11] je pulzní vypuzování iontů z iontové pasti.

Odlišují se dva typy iontových pastí; sférická iontová past (3D-IT), která byla použita při řešení cílů dizertační práce a která je popsána níže, a lineární iontová past (2D iontová past). Lineární iontová past (LIT) [12] je konstrukčně kvadrupól, kterému byla přidána schopnost uchovávat ionty.

Sférická iontová past [13, 14] se skládá ze dvou koncových a jedné prstencové elektrody uzavírající objem přibližně 1 ml. Na rozdíl od kvadrupólu tento hmotnostní analyzátor pracuje v cyklech.

Do iontové pasti jsou pulzně přivedeny ionty, které jsou zde vhodným radiofrekvenčním napětím na prstencové elektrodě stabilizovány. Ionty jsou z iontové pasti vypuzovány směrem k detektoru postupným zvyšováním tohoto napětí. Tím dojde k proměření poměrů m/z ve zvoleném rozsahu.

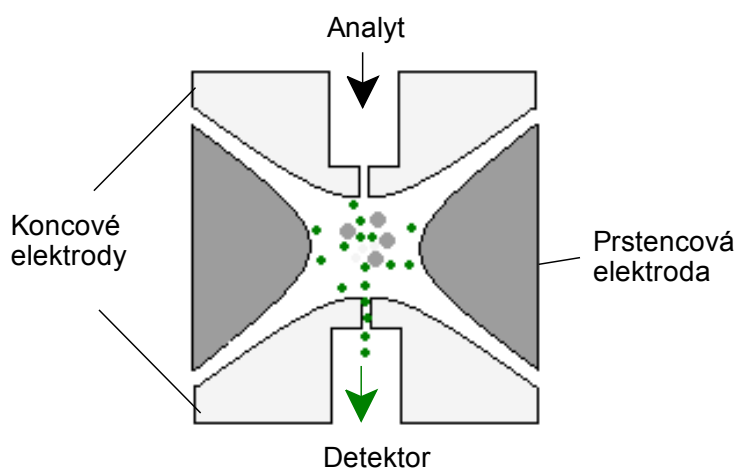
Do iontové pasti se zavádí tlumící plyn (He), který tlumí oscilace iontů v pasti. Tím se dosáhne zvýšení rozlišení iontové pasti a zlepší se i záchyt iontů. I přes použití tlumícího plynu zůstává iontová past ve skupině nízkorozlišovacích analyzátorů.

Je nutná regulace množství iontů, které vstupují do prostoru iontové pasti. Přeplnění iontové pasti může vést ke vzniku prostorového náboje, což vede ke snížení rozlišení tohoto hmotnostního analyzátoru.

Kromě skenování produktových iontů umožňuje sférická iontová past také MS^n analýzy, tedy stupňovou fragmentaci zvolených prekurzorů.

Po naplnění iontové pasti ionty dochází k izolaci vybraného prekurzoru. Opětovnou změnou napětí je tento prekurzor kolizně excitován srážkami s atomy He, což vyvolá jeho fragmentaci. V dalším kroku jsou pak buďto skenovány produktové ionty, nebo může dojít k izolaci prekurzoru další generace a jeho následné fragmentaci stejným způsobem.

Právě vícenásobné fragmentace iontů MS^n bylo využito při řešení cílů dizertační práce. Analýzami na iontové pasti byly získány velmi cenné informace o struktuře neznámých látek.



Obrázek 4: Schéma 3D iontové pasti [4]

2.1.2.4 Analyzátor doby letu

Dalším pulzním hmotnostním analyzátozem je analyzátor doby letu (TOF) [4]. Principem tohoto konstrukčně velmi jednoduchého analyzátoru, který se skládá pouze z evakuované trubice, je měření času, za který urychlené ionty „dolétnou“ k detektoru. Ionty s menším poměrem m/z o stejné kinetické energii „urazí“ stejnou vzdálenost rychleji než ionty s poměrem m/z vyšším.

Tento hmotnostní analyzátor jako jediný z popisovaných může dosahovat i vysokého rozlišení. Vysokého rozlišení je dosaženo např. použitím tzv. iontového zrcadla neboli reflektoru. To jednak odráží ionty zpět a tím prodlužuje dráhu jejich letu, jednak slouží k vyrovnávání kinetické energie u iontů se stejnou m/z . Ionty s větší dodanou kinetickou

energií proniknou hlouběji do odrazového pole reflektoru před jejich odrazem než ionty s nižší kinetickou energií. Tím se vyrovná jejich doba letu a na detektor pak tyto ionty dopadnou ve stejný čas.

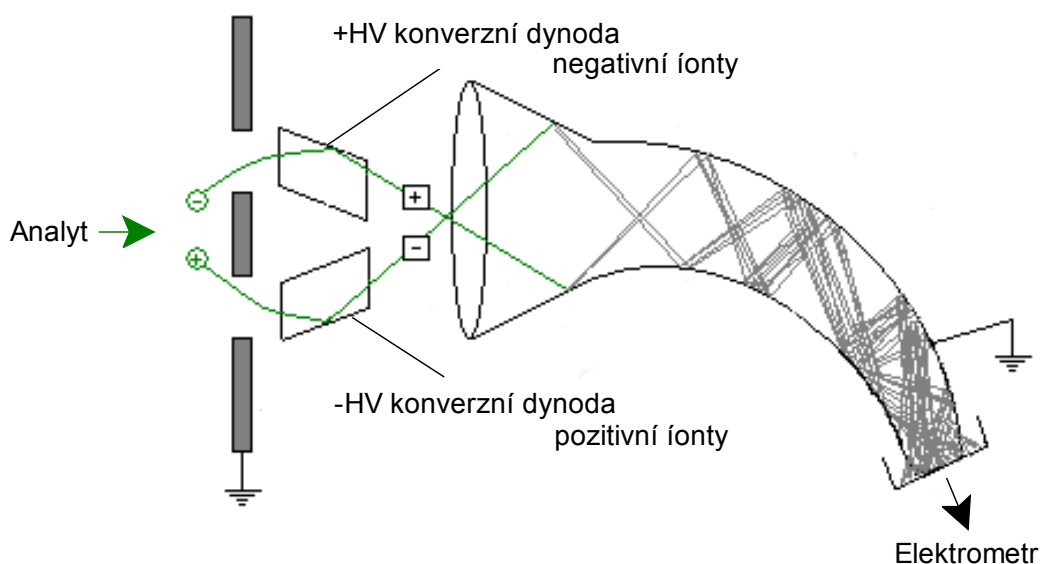
Analyzátor doby letu byl při řešení cílů dizertační práce použit jako nízko- i vysokorozlišovací.

2.1.3 Detektory v MS

Ionty separované v hmotnostním analyzátoru dopadají na detektor, který zaznamenává elektrický proud vzniklý přímým dopadem stanovovaných iontů. Nejčastěji se používají násobičové elektrody [15], které pracují na principu násobení elektronů uvolněných z první konverzní dynody po dopadu elektronů. Jiným typem detektoru je například Faradayova klec.

2.1.3.1 Elektronový násobič typu Channeltron

V elektronovém násobiči jsou ionty akcelerovány k elektrodě zvané konverzní dioda o potenciálu ± 3 až ± 30 kV a náboji daném iontovým zdrojem. Dynoda konvertuje ionty na elektrony, které jsou urychleny elektrickým polem směrem ke kontinuální dynodě. Z jejího povrchu vyrazí několik elektronů, které vyrazí elektrony z jiného místa dynody. Tímto opakovaným způsobem dojde k zesílení proudu elektronů, který je následně měřen elektrometrem.



Obrázek 5: Schéma elektronového násobiče typu Channeltron [4].

2.1.4 Vakuový systém

Vyjma některých iontových zdrojů, které pracují za atmosférického tlaku, operují všechny součásti hmotnostních spektrometru za hlubokého vakua. To zabraňuje především srážkám iontů s neutrálními molekulami a ionty mezi sebou. Rovněž je udržováno relativně inertní prostředí v hmotnostním spektrometru.

Hodnota vakua se liší podle analyzátoru a je od 10^{-3} až po 10^{-11} Pa [4]. Zajišťováno je čerpáním vysoce výkonnými vakuovými pumpami, a to ve většině případů ve dvou nebo třech stupních.

Nejčastěji se v hmotnostní spektrometrii používají rotační (obvykle první stupeň) a turbomolekulární nebo difúzní pumpy (druhý stupeň).

2.2 Separační techniky

Principem chromatografických technik je dělení směsi látek na jednotlivé složky pomocí fyzikálně-chemických mechanismů. U plynové a kapalinové chromatografie se využívá mechanismu zadržování neboli retence analytů stacionární fází [16].

Vzorek je vnesen do proudu mobilní fáze, který jej „unáší“ přes stacionární fázi, na níž dochází k separaci analytů. Ty dále putují k detektoru, který indikuje jejich přítomnost. Čas, který analyt setrvává v systému, se nazývá retenční čas (t_R) a je kvalitativní charakteristikou dané látky. Je odezva této látky na detektoru je pak přímo úměrná jejímu množství.

V plynové chromatografii (GC) se jako mobilní fáze používá plyn (He, H₂, N₂, atd.). Separace látek obvykle probíhá na křemenných kapilárních kolonách pokrytých vrstvou polyimidu, zajišťující pružnost kolon [17] o různém vnitřním průměru (nejčastěji 200 – 530 μm), délce (většinou 10 – 100 m) a tloušťce filmu stacionární fáze (zpravidla 0,1 – 5 μm). Jako stacionární fáze se často používají nepolární fáze na bázi polydimethylsiloxanů, mírně až středně polární polydifenyl-dimethylsiloxanové nebo polární polyethylenglykolové fáze (Carbowax).

Dalšími součástmi plynových chromatografů je tlaková láhev s nosným plynem, regulátor průtoku plynu, injektor, termostat, detektor, kterým byl v této dizertační práci vždy hmotnostní spektrometr a řídicí a vyhodnocovací zařízení.

Na rozdíl od kapalinové chromatografie je vzorek ihned po nástřiku odpařen. Proto je plynová chromatografie vhodná pro separaci tepelně stabilních, těkavých nebo polotěkavých nízkomolekulárních sloučenin a plynů.

V dizertační práci byla tato technika použita pro separaci volatilních a semivolatilních fotodegradčních produktů polyurethanových pěn.

Pro stanovení izoprostanů byla v této dizertační práci zvolena technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

U vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) je mobilní fází kapalina. Ta, na rozdíl od mobilní fáze v plynové chromatografii, interaguje s analyty i se stacionární fází a podílí se na chromatografickém dělení. Pro stanovení lze použít polární i nepolární rozpouštědla podle typů stanovovaných analytů i jejich směsi. K separaci analytů dochází na analytické koloně s ocelovým pláštěm o délce 5 – 25 cm, vnitřním průměru 2 – 4,6 mm s velikostí částic stacionární fáze 3 – 10 μm (v poslední době se čím dál výrazněji uplatňují náplně s velikostí částic pod 2 μm). Stacionární fáze na koloně [18] je buď kapalina zakotvená na nosiči (u rozdělovací chromatografie), nebo jí je pevná látka (adsorpční, iontoměničová, gelová a afinitní chromatografie).

U kapalinové chromatografie se rozlišuje separace na normálních fázích, kdy stacionární fáze je polárnější než mobilní, a na obrácených fázích, kdy stacionární fáze je méně polární než mobilní. Pro separaci izoprostanů se nejčastěji užívá obrácených fází [19].

Stacionární fáze v systému obrácených fází je nejčastěji silikagel povrchově modifikovaný hydrofobními alkylovými řetězci, které interagují s analytem, a tím zabezpečují jeho separaci. Obvyklé jsou délky řetězce C4, C8 a C18, přičemž C8 a C18 se používají pro separaci malých molekul, jako jsou například izoprostany, a C4 pro separaci vysokomolekulárních sloučenin – například proteinů.

Průtok mobilní fáze kolonou, v níž je stacionární fáze složená z částic o velikosti pouze několik mikrometrů, umožňuje výkonné vysokotlaké čerpadlo. Trendem v chromatografii je snižování velikosti průměru částic stacionární fáze, což umožňuje rychlejší a kvalitnější separaci. Snižování velikosti částic stacionární fáze vede ke zvyšování nároku na čerpadla mobilní fáze. Kromě vysokoúčinné (někdy též vysokotlaké) kapalinové chromatografie, která operuje s tlaky do 40 MPa, se v poslední době využívají i ultraúčinné kapalinové chromatografy (UPLC) a ultravysokoúčinné kapalinové chromatografy (UHPLC) [20], které operují při tlacích až do 120 MPa.

Dalšími součástmi kapalinových chromatografů jsou zdroj a čerpadlo mobilní fáze, dávkovací smyčka, termostat, detektor, řídicí a vyhodnocovací zařízení. Při řešení cílů dizertační práce byl jako detektor, stejně jako u plynové chromatografie, vždy použit hmotnostní spektrometr.

Množství sloučenin, které je možné na koloně rozdělit, je omezené a je dáno píkovou kapacitou kolony. Snaha o rychlé analýzy multikomponentních vzorků plynovou chromatografií vedla k zavedení ortogonální kompletní tandemové plynové chromatografie (GCxGC).

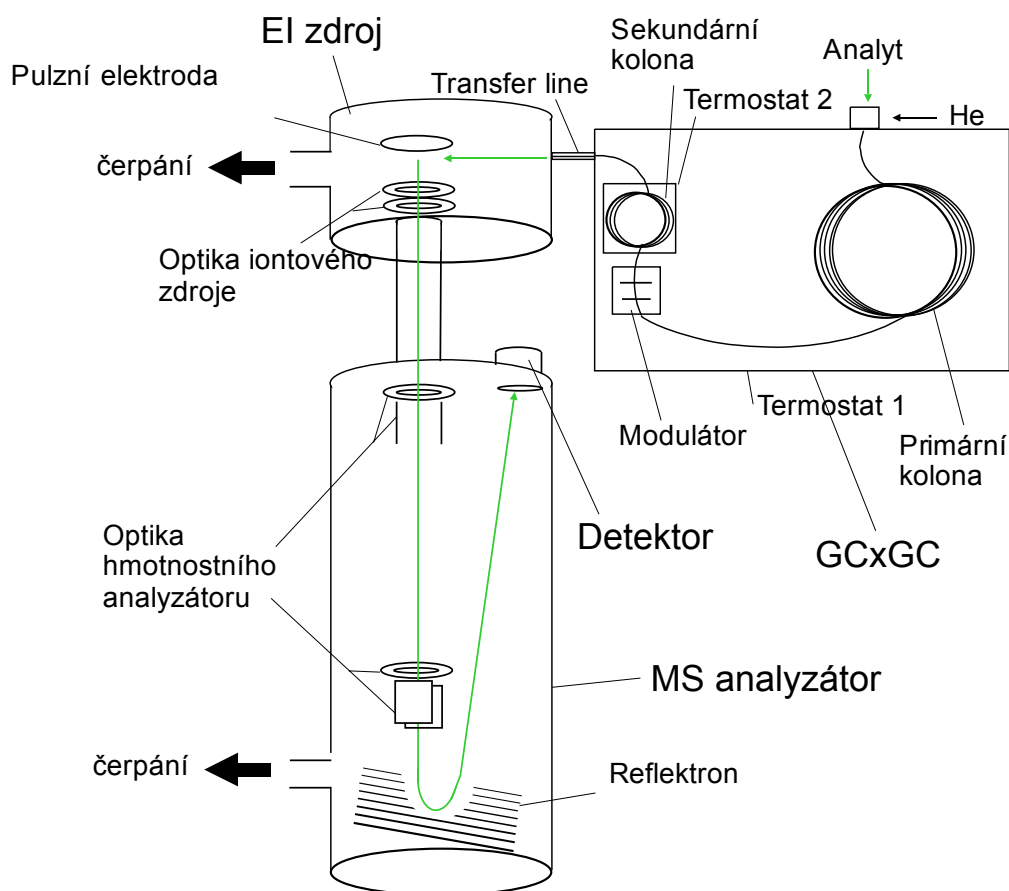
Principem této relativně nové techniky je separace analytů na dvou odlišných kolonách [21, 22]. První kolona bývá konvenční analytická kolona (například nepolární 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), druhá kolona je užší a kratší (obvykle polární 1 m x 0,1 mm x 0,1 μm) – určená pro rychlou plynovou chromatografií se stacionární fází s odlišnou selektivitu. Sloučeniny, které nebyly rozděleny na první koloně, jsou separovány na koloně druhé. Obě kolony jsou umístěny v samostatných teplotně programovatelných termostatech, přičemž teplota sekundárního termostatu je obvykle o 10 – 30 °C vyšší než primárního.

Eluent z první kolony je periodicky dávkován do druhé kolony modulátorem. Funkcí modulátoru je především zajištění zachování separace z první dimenze. Pouhé spojení dvou analytických kolon by vedlo na druhé koloně ke sloučení na první koloně separovaných analytů. Existuje několik druhů modulátorů. V experimentální části této dizertační práce byl použit ortogonální tandemový plynový chromatograf s kryogenním modulátorem.

Kryogenní systém je složen ze dvou trysek. Sloučeniny eluované z první kolony jsou zachyceny („zmrazeny“) v první fázi modulace proudem plynného dusíku (nebo CO_2), který je chlazen kapalným dusíkem (nebo kapalným CO_2). Na druhou kolonu jsou analyty přeneseny za použití pulzu horkého vzduchu [23].

Klasický interval modulace se pohybuje nejčastěji v sekundách. Za tento čas musí dojít ke kompletní separaci v druhé dimenzi. Protože píky elující ze sekundární kolony jsou velmi úzké (desetiny sekundy), lze k detekci použít pouze detektorů s rychlou odezvou. Z hmotnostně-spektrometrických analyzátorů tuto podmínku splňuje víceméně pouze analyzátor doby letu [22], který byl použit i při řešení cílů dizertační práce.

Výstupem detektoru je sekvence chromatogramů jednotlivých modulací, která je pro běžného uživatele naprosto nečitelná. Do srozumitelnější 2-D nebo 3-D formy jsou data konvertována za pomoci speciálního softwarového algoritmu.



Obrázek 6: Schéma GCxGC-EI/TOF MS v orthogonálním uspořádání [24].

2.3 Spojení MS se separačními technikami

Spojením hmotnostní spektrometrie s chromatografickými technikami byla získána kvalitní separace analytů s jejich spolehlivější detekcí, než je tomu u ostatních detektorů používaných v chromatografických technikách, a to v jednom kroku. Dnes jsou separační techniky spojené s hmotnostní spektrometrií rutinní záležitostí a nahrazují dříve standardně používané techniky.

Pro spojení plynové a kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií bylo nutné překonat dvě překážky [25]:

- Odstranění nadbytku mobilní fáze, jíž jsou analyty unášeny chromatografickým systémem
- Vyřešení záležitosti rozdílů tlaků mezi hmotnostním spektrometrem, pracujícím za hlubokého vakua, a separační technikou, která podtlak nevyžaduje.

V plynové chromatografii se dříve používaly náplňové kolony a vyšší průtoky mobilních fází než dnes. Pro odstranění nadbytku mobilní fáze se používaly separátory. Dnes se v plynové chromatografii téměř výhradně používají kapilární kolony, u nichž průtok plynu bývá přibližně $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, což umožňuje přímé zavedení konce kapilární kolony do iontového zdroje. Současné vakuové systémy bez problémů nátok nosného plynu odčerpají.

Technicky obtížnější je řešení spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, které musí řešit odstranění mobilní fáze kapalného skupenství. Průlomem v této oblasti se staly ionizační techniky za atmosférického tlaku, obzvláště elektrosprej. U nich se mobilní fáze účastní přímo ionizačního procesu. Odvod nadbytku plynné mobilní fáze pak zajišťuje konstrukce iontového zdroje.

2.4 Techniky přípravy vzorků

Při řešení cílů dizertační práce byly použity dvě techniky přípravy vzorků; extrakce tuhou fází (SPE) a mikroextrakce tuhou fází (SPME). Princip sorpce obou technik je podobný sorpci analytů na chromatografických kolonách v chromatografii.

2.4.1 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází [26] je jednou z nejčastěji používaných technik přípravy vzorků k analýzám. Pro svou jednoduchost a úsporu rozpouštědel nahradila dříve používanou techniku extrakce kapalina-kapalina.

Extrakce tuhou fází se používá při přípravě kapalných vzorků, jež obsahují středně těkavé a netěkavé sloučeniny. Je vhodná pro zakoncentrování analytů a rovněž pro odstranění interferujících sloučenin, které by rušily následující stanovení. Používá se pro extrakci analytů z různých matric, jako je voda, krev, moč, pro extrakci analytů z půdních roztoků a jiných matric nevhodných pro přímé stanovení.

Principem SPE je sorpce analytu rozpuštěného v kapalném vzorku na vhodný sorbent SPE kolonky. Eluce analytů bez interferujících látek je zabezpečena elucí interferujících látek z SPE sorbentů vhodným elučním činidlem.

Aby k extrakci došlo, musí být afinita analytu k sorbentu větší než ke kapalně fázi. Fyzikálně je extrakce založena na hydrofobních, polárních nebo iontových interakcích mezi analyty a SPE sorbentem. Sorbenty jsou převážně na bázi modifikovaného silikagelu s chemicky vázanými polárními nebo nepolárními modifikátory (v případě iontoměničů záporně či kladně nabitými funkčními skupinami) o velikosti částic $40 \mu\text{m}$, velikosti pórů 6 nm . Sorbent je

umístěn v polypropylenové nebo skleněné kolonce opatřené ve spodní části nejčastěji skleněnou nebo teflonovou fritou.

Proces extrakce se skládá z pěti základních kroků:

- Kondicionace SPE kolonek vhodným rozpouštědlem s cílem aktivace sorbentu před extrakcí
- Nanesení vzorku – analyty s některými interferujícími sloučeninami jsou zachyceny na sorbentu
- Eluce slabě vázaných interferentů vhodným rozpouštědlem
- Případné vysušení kolonek profukováním vzduchu nebo dusíku – důležité v případě, že rozpouštědlo použité k eluci analytů je nemísitelné s promývacím rozpouštědlem
- Eluce analytů rozpouštědlem

Extrakce tuhou fází je technika rychlá, spolehlivá a reprodukovatelná.

2.4.2 Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází [27, 28] je sorpčně-desorpční technika zkoncentrování analytu na vhodném vlákne. Je rychlá a jednoduchá, nevyžaduje použití jakéhokoliv rozpouštědla.

Principem extrakce je sorpce analytů na SPME vlákno. Na rozdíl od SPE, při níž je analyt extrahován z celého objemu vzorku s co největší výtěžností, jsou v SPME technice analyty sorbovány do té doby, než je dosaženo rovnováhy. Rovnovážný stav závisí na koncentraci analytu ve vzorku, tloušťce a typu sorbentu, jenž pokrývá křemenné vlákno, a na distribuční konstantě analytů.

K extrakci dochází na křemenných vláknech pokrytých sorpční vrstvou. Toto vlákno je spojeno s ocelovým pístem a umístěno v duté jehle.

Stacionárními fázemi jsou například polydimethylsiloxan, polyakrylát, divinylbenzen či směsi sorbentů o různých tloušťkách (7 – 100 μm). Nepochárné analyty je vhodnější extrahovat nepolárními sorbenty a naopak.

Mikroextrakce tuhou fází se používá při přípravě kapalných a pevných vzorků, jež obsahují těkavé a středně těkavé sloučeniny. Je rovněž využívána pro pasivní vzorkování těkavých organických látek v ovzduší.

Používají se dva typy extrakce: Vzorkování z rovnovážné plynné fáze (head-space) a a přímá sorpce. První je vhodná pro těkavé analyty a pro zpracování kontaminovaných vzorků, druhá metoda je upřednostňována pro méně těkavé nebo netěkavé látky z relativně čistých vzorků. Výběr techniky závisí na extrakční kinetice. V plynné fázi jsou těkavější analyty ve vyšších koncentracích než méně těkavé, a proto jsou extrahovány rychleji.

Proces extrakce se skládá z těchto kroků:

- Jehlou je propíchnuto septum vialky se vzorkem
- Posunutím pístu je vlákno vysunuto z duté jehly do kapalného vzorku nebo do prostoru nad hladinou vzorku
- Sorpce analytů – (obvykle 2 – 30 min)
- Zasunutí vlákna do jehly a vytažení jehly z vialky
- Desorpce analytů ze SPME vlákna – v injektoru plynového chromatografu tepelně nebo při použití SPME-HPLC adaptéru elucí mobilní fází v kapalinovém chromatografu

Technika SPME je vhodná pro screeningové analýzy, za použití interního standardu je použitelná i pro reprodukovatelné kvantitativní analýzy.

Téma A

**DEGRADAČNÍ PRODUKTY FLEXIBILNÍCH
POLYURETHANOVÝCH PĚN MODIFIKOVANÝCH
BIODEGRADABILNÍM PLNIDLEM**

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Polyurethany

Polyurethany (PU) jsou lineární nebo zesíťované polymery obsahující urethanovou skupinu ($-\text{NHCOO}$) v jejich hlavním řetězci. Syntetizovány jsou polyadiční reakcí polyfunkčních izokyanátů, tj. izokyanátů s dvěma a více funkčními skupinami s polyfunkčními alkoholy [29].

3.1.1 Historie vývoje polyurethanů

Počátek vývoje polyurethanů lze datovat koncem třicátých let dvacátého století, kdy byl objeven polymer nylonového typu. Od té doby se profesor Otto Bayer a jeho skupina v laboratořích firmy I.G. Farben v městě Leverkusen (Německo) zabývala chemickými změnami nylonového prekurzoru – hexamethylendiaminu. Objevil, že reakce tohoto aminu s fosgenem dává diizokyanát, který poté reakcí se sloučeninou s hydroxylovými skupinami reaguje za tvorby nových sloučenin, později zvaných polyurethanů [30].

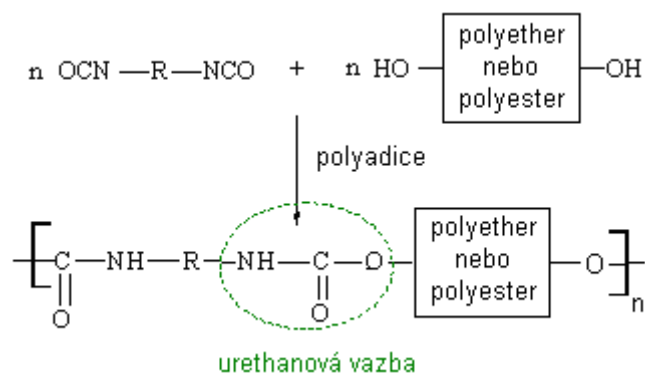
Syntézu polyurethanu si nechal patentovat v roce 1937 [31]. Během druhé světové války vyvinul Bayer elastomery syntetizované z naftalendiizokyanátu. Polyurethany vzniklé reakcí těchto izokyanátů s polyesterovými pryskyřicemi byly používány v letectví k opravám křídel bojových letadel [30, 32].

V roce 1954 začala průmyslová produkce tvarovatelných polyurethanových pěn syntetizovaných z toluendiizokyanátu a polyester-polyolů. První polyether-polyol byl komerčně dostupný během následujících dvou let [32].

Dnes jsou polyurethany šestým nejčastěji vyráběným polymerem s celkovou celosvětovou roční produkcí přesahující 10 milionů tun. Variabilita surovin využitelných pro syntézu polyurethanů otevírá široké pole tvorby produktů s různými vlastnostmi, což dále umožňuje jejich široké využití. Největší podíl z produkce polyurethanů zauímají flexibilní polyurethanové pěny (PUF) [33].

3.1.2 Syntéza polyurethanů

Polyurethany jsou syntetizovány polymerizací monomerů obsahujících alespoň dvě funkční skupiny izokyanátů s monomerem obsahující alespoň dvě hydroxylové skupiny za přítomnosti vhodného katalyzátoru a přísad (Obr. 7).



Obrázek 7: Syntéza a chemická struktura polyurethanu [33]

▪ Izokyanáty

95 % dnes vyráběných polyurethanů je syntetizováno z toluendiizokyanátu (TDI) a 4,4'-methylendifenyl-diizokyanátu (MDI) [34].

V případě toluendiizokyanátu se nejčastěji používá směs v poměru 80:20 tvořená 2,4- a 2,6-toluendiizokyanátem. TDI je obvykle syntetizován nitrací toluenu, následnou katalytickou hydrogenací vznikajícího 2,4- a 2,6-dinitrotoluenu a fosgenací vzniklého 2,4- a 2,6-diaminotoluenu. Využívá se k syntéze polyurethanových elastomerů a flexibilních polyurethanových pěn [29, 35, 36].

▪ Polyoly

Polyoly jsou reaktivní látky obsahující alespoň dvě funkční skupiny mající aktivní vodík. K syntézám polyurethanů se používají produkty s vyšší molekulovou hmotností, obvykle na bázi polyesterů nebo polyetherů [29].

Polyether-polyoly jsou produkty katalyzované polymerizační reakce jednoduchých diolů jako je např. ethandiol či propandiol s cyklickými ethery, jako je etylenoxid nebo propylenoxid.

Polyester-polyoly jsou připravovány polymerizační reakcí diolů a karboxylových kyselin (nebo jejich derivátů); například polymerizací ethandiolu s kyselinou ftalovou [29, 37].

Polyester-polyoly byly k syntéze polyurethanu používány především v minulosti, dnes z ekonomických důvodů převažuje polyether-polyurethanová výroba [35].

▪ Řetězové extendery

Extendery jsou používány k upravení konečných vlastností polyurethanů. Různé nízkomolekulární alifatické aminy a polyoly (např. pentaerythritol, sorbitol, fenylendiamin atd.) jsou používány jako prodlužovače vazeb nebo síťovače [29, 37].

▪ Katalyzátory

Katalyzátory řídí rychlost reakce, mají vliv na průběh sítění polyurethanů i na uvolňování CO₂. Většina katalyzátorů jsou organické sloučeniny cínu (např. cínoktoát, dibuthylcindilaurát) [29, 37].

▪ Pěnidla

Používají se při syntézách polyurethanových pěn. Dělí se na dvě skupiny; založené na fyzikálních nebo chemických principech. Do první skupiny patří pěnidla, která se užívala dříve, avšak byla zakázána Montrealským protokolem [32]. Jedná se o chloro- nebo fluoro-uhlovodíky. Ty byly nahrazeny nehalogenovanými sloučeninami [29].

K pěnidům fungujícím na chemickém principu patří ty, které reagují s diizokyanátem za vzniku CO₂ *in-situ*. Z nich se k syntézám nejčastěji používá voda [29].

▪ Jiné přísady

Dále se používají surfaktanty (např. sulfatovaný ricinový olej, silikonový olej atd.), které pro svou schopnost emulzifikace umožňují dobré promíchání všech složek reakce, retardéry hoření, pigmenty a jiné sloučeniny, upravující konečné vlastnosti produktu [29, 35].

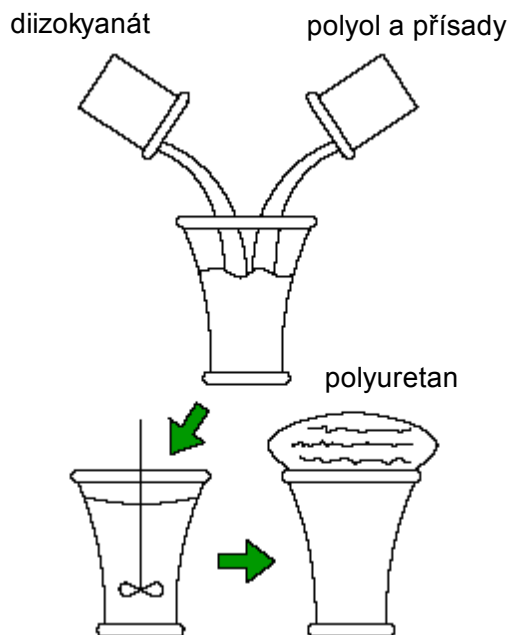
3.1.3 Flexibilní polyurethanové pěny

V současné době je z celkové produkce polyurethanu syntetizováno 50 % flexibilních a 30 % tuhých (rigidních) polyurethanových pěn.

Kromě polyizokyanátu a polyolu je základní surovinou pro přípravu flexibilní PU pěny voda. Mechanismus tvorby pěn je založen na dvou souběžně jdoucích procesech, anglicky zvaných „blowing“ a „gelation“ („vypěňování“ a „gelace“). Proces „vypěňování“ začíná vývinem nadouvacího plynu – CO₂, uvolněného chemickou reakcí diizokyanátu s vodou. K reakci diizokyanátů s polyoly dochází v procesu, v polymerní chemii nazývaném „gelace“ [29, 37].

Polyurethanové pěny se průmyslově vyrábějí plynule v pěnicích strojích. Stroj je naplněn surovým materiálem, ten je míchán a výsledná viskózní kapalina se vlévá do forem, kde pěna během několika sekund dostává svůj konečný tvar [35].

Polyurethanové pěny mají obecně hustotu od 10 – 800 kg.m⁻³ a rozdělují se na flexibilní (pružné), semirigidní (polotuhé) a rigidní (tuhé) pěny [37].



Obrázek 8: Příprava polyurethanové pěny [33]

Polyether-polyurethanové pěny jsou elastičtější než polyester-polyurethanové, vykazují dobrou odolnost proti nárazům. Svoje uplatnění našly zejména v automobilovém průmyslu (výplně sedadel, opěrky hlavy), ale také v nábytkovém, oděvním či zábavním průmyslu (výroba hraček) [35].

3.1.4 Polyurethany modifikované bio-surovinami

Od doby, kdy byla započata výroba jakéhokoliv polymeru, nevyjímaje polyurethanů, byla vždy snaha nalézt levnější a obnovitelnější zdroj surovin pro jeho syntézu. Od roku 1990 je tato snaha stále více podporována ve smyslu dosažení udržitelného rozvoje a čistější produkce s ohledem na množství produkovaných odpadů.

Většina technických aplikací polymerů vyžaduje jejich stabilitu. Na druhou stranu, z hlediska odpadového hospodářství, je žádoucí, aby plastové výrobky po splnění jejich primární funkce mohly být biologicky rozložitelné. Jednou z cest k naplnění těchto požadavků je výroba bio-modifikovaných plastů, např. smísením plastu s biologicky rozložitelným substrátem – biopolymerem [38].

Pro výrobu bio-modifikovaných polyurethanových pěn se jako bio-surovina převážně používají bio-polyoly. K syntéze polyurethanu s bio-polyoly lze použít přírodní suroviny, které mají reaktivní hydroxylové skupiny a jsou schopny reakce s dalšími surovinami

potřebnými k syntéze tohoto polymeru. Používají se buďto jako kompletní, nebo častěji jako částečné náhražky syntetických polyolů [29].

Použitelné jsou:

- rostlinné oleje [39, 40]; například ricinový olej a jeho deriváty [41], slunečnicový či palmový olej [42].
- polysacharidy [43], které jsou používány nejčastěji; celulóza a její deriváty [43, 44], použité rovněž jako výchozí suroviny k syntéze polyurethanů v této dizertační práci, škrob a jeho deriváty [45] či třísloviny [46] nebo sojová moučka [47].

3.1.5 Degradace polyurethanů

Degradaci polymerů způsobují mechanické, fyzikální, chemické i biologické vlivy, přičemž tyto vlivy mohou a také většinou bývají mezi sebou vzájemně kombinovány. K degradaci polymerů nejčastěji dochází vlivem vystavení povrchu materiálu UV záření, nízkým či vysokým teplotám, působení chemických sloučenin nebo aktivitě mikroorganismů. Může dojít nejen k narušení povrchu polymeru, ale následkem toho i k narušení vnitřního prostředí, a tím k celkové degradaci materiálu. Produkty degradace se pak mohou uvolňovat do okolního prostředí [48, 49].

Cílem dizertační práce je identifikace fotodegradačních a hydrolyzních degradačních produktů polyurethanů. Níže popsaná mikrobiální degradace souvisí s hydrolyzou degradačních produktů, s fotodegradací. Pakliže je prováděna za zvýšené teploty, uplatní se i tepelná degradace.

3.1.5.1 Mikrobiální degradace polyurethanů

O mikrobiální degradaci PU bylo sepsáno mnoho publikací [50-56]. Většina z nich byla zaměřena na prevenci mikrobiálního rozkladu polyurethanů. Analytických prací zaměřených na identifikaci degradačních produktů není mnoho.

Mechanismus mikrobiální degradace může být rozdělen do dvou skupin; degradace urethanové vazby a degradace polyolových segmentů [56].

▪ Biodegradace urethanové vazby

Urethany s nízkou molekulární hmotností lze degradovat pomocí mikroorganismů. Štěpení urethanové vazby je katalyzováno esterázami [57, 58]. Degradace urethanové vazby v polyurethanech byla taktéž několikrát popsána [54, 59].

Dodnes není ovšem známo, zdali jsou urethanové vazby štěpeny mikrobiálním atakem přímo v polymerech nebo dochází k jejich degradaci až po rozpadu polymeru na nízkomolekulární sloučeniny [60].

▪ Biodegradace polyolů

Jak již bylo uvedeno výše, polyurethany se dělí na základě výchozího polyolu na dvě skupiny: na polyether-polyurethany a polyester-polyurethany.

Polyester-polyurethany vykazují menší odolnost k mikrobiální degradaci než polyether-urethany. Je to zapříčiněno existencí mnoha esterových vazeb ve struktuře polyurethanu, které jsou mnohem méně odolné hydrolyze než vazby etherové [56].

První systematickou studii mikrobiální degradace polyurethanových pěn provedli Darby a Kaplan. Ti degradovali přibližně 100 druhů polyurethanových pěn za pomoci sedmi typů plísní (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma sp.*, a *Chaetomium globosum*). Pozorováno bylo, že polyurethany jsou odolné mikrobiální degradaci, pakliže mají v polyester-polyolové části zabudovaný postranní řetězec. Dalším výsledkem studie bylo konstatování, že degradace je ovlivněna specifickým izokyanátem používaným v syntéze polyurethanu [50].

Bakteriální degradaci polyester-polyurethanu zkoumal také Kay a kol. Ti izolovali 15 typů jak gram-positivních, tak gram-negativních bakterií, které izolovali z polyester-urethanových pěn na 28 dní uložených v půdě. Z nich vybrali ty, které vykazovaly nejvyšší polyurethanovou degradační aktivitu (*Corynebacterium sp. B6*, *B12*, a *Enterobacter agglomerans B7*) a použili je pro další experimenty. Po dvoutýdenní kultivaci těchto bakterií na polyurethanech pozorovali ztrátu na hmotnosti a na snížení pevnosti v tahu testovaných vzorků [53].

Analýzu degradačních produktů polyurethanových pěn za pomoci infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) provedli Kay a kol. Studie ukazuje, že degradace polyester-polyurethanových pěn je způsobena především hydrolyzou esterových vazeb. Výsledky uzavřeli tím, že polyester-polyurethany nebyly mikroorganismy využívány jako zdroj živin, ale jejich degradace probíhala důsledkem ko-metabolismu [52].

Jako jediný zdroj uhlíku a dusíku je schopna využít pevný polyester-polyurethan bakterie *Comamonas acidovorans TB-35*. Metabolity produkované degradací polyurethanu touto bakterií byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC/MS).

Degradačním produktem polyurethanu, vzniklým syntézou poly-(diethylenglykoladipátu) s 2,4-toluendiizokyanátem byl diethylenglykol (dihydroxydiethylether), trimethylpropan, kyselina dimethyladipová a 2,4-diaminotoluen [55].

Rovněž byla studována mikrobiální degradace polyether-polyurethanu [50, 54, 59]. Relativní odolnost polyether-urethanu k mikrobiální degradaci je vysvětlena jako následek degradačního mechanismu, který zahrnuje exo-tyt depolymerizace [56], naproti tomu polyester-urethanová degradace vyžaduje endo-tyt depolymerizace [61, 62].

3.1.5.2 Hydrolýza polyurethanů

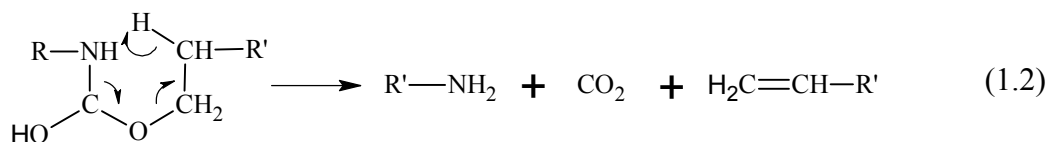
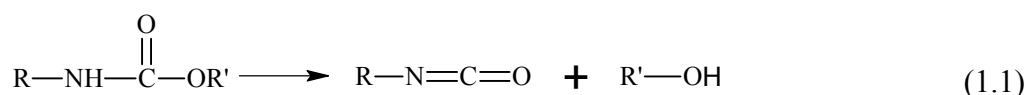
Hydrolýza polyurethanů je jedna z metod regenerace polyolů z polyurethanů. Provádí se hydrolýza za pomoci přehřáté páry na teplotu 230 – 315 °C [63, 64] po dobu 1 až 10 hodin při atmosférickém tlaku. Hydrolýze podléhají esterové, ale i urethanové vazby, přičemž esterové vazby se rozpadají nejrychleji. Produkty degradace jsou polyoly a polyamidy které mohou být kontaminovány vedlejšími produkty reakce, katalyzátory a aktivačními činidly [63, 65].

3.1.5.3 Termická degradace

Termická degradace různých typů polyurethanů byla v minulosti intenzivně zkoumána pomocí několika analytických technik [66-69].

Nejbližší tématu dizertační práce jsou experimenty, ve kterých byla zkoumána termická degradace polyurethanů syntetizovaných z izoforondiizokyanátu (IPDI) [70] a toluendiizokyanátu (TDI) [71]. Produkty degradace byly analyzovány pyrolýzní plynovou chromatografií v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (Py-GC/MS). Identifikováno bylo více než 15 volatilních degradačních produktů odpovídajících struktuře a mechanismu pyrolýzy polymerů založeného na IPDI [70] a více než 20 volatilních sloučenin uvolňujících se termickou degradací polyurethanu syntetizovaného z TDI [71].

Vznik primárních i sekundárních produktů termální degradace lze popsat rovnicemi 1.1 a 1.2. Tyto rovnice již dříve publikoval Dyer a kol. [72-74]. Třetí typ reakce (1.3) nebyl skupinou výzkumníků stanovující pyrolýzní produkty polyurethanu pozorován [70, 71].



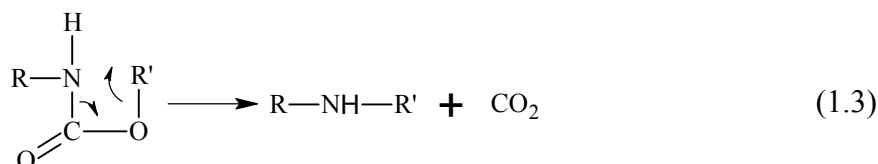


Schéma 1: Rovnice vzniku produktů termální degradace polyurethanů; (1.1) disociace na polyol a izokyanát, (1.2) tvorba primárního aminu, alkenů a oxidu uhličitého, (1.3) tvorba sekundárního aminu a oxidu uhličitého [72-74].

3.1.5.4 Fotodegradace

Fotodegradace je proces složený ze dvou dílčích procesů – fotofyzikálních a fotochemických. Po absorpci světla polyurethanovou pěnou dochází k přechodu molekul polyurethanu ze základního singletového stavu do excitovaného singletového a tripletového stavu což je proces fotofyzikální. Degradací produkty vznikají v procesu fotochemickém [75].

K fotochemickým reakcím dochází pouze tehdy, pakliže je materiálem absorbováno záření o určité vhodné vlnové délce. Ta se odvíjí od vazeb přítomných v struktuře materiálu, ve kterém chceme fotochemické procesy indukovat. Různé vazby či funkční skupiny absorbují záření o různých vlnových délkách. Rychlost degradace je závislá na struktuře polymeru, charakteru a množství přítomných promotorů degradace, teplotě okolí, intenzitě a spektrálním složení světla, které exponuje materiál [76, 77].

Níže je uveden výběr fotochemických reakcí, které by se mohly při expozici polyurethanů UV zářením podílet na tvorbě degradačních produktů. Stanovení fotodegradačních produktů polyurethanových pěn je jedním z cílů dizertační práce.

▪ Fotooxidace

Nejběžnější fotodegradační reakcí při expozici materiálu UV zářením, za přítomnosti kyslíku, je fotooxidace. Kyslík se reakcí účastní jak v singletovém, tak tripletovém stavu. Fotochemické reakce s kyslíkem v základním tripletovém stavu vyžadují vždy přítomnost fotosenzibilátoru [78].

Fotooxidačními produkty jsou peroxidy, hydroperoxidy a endoperoxidy.

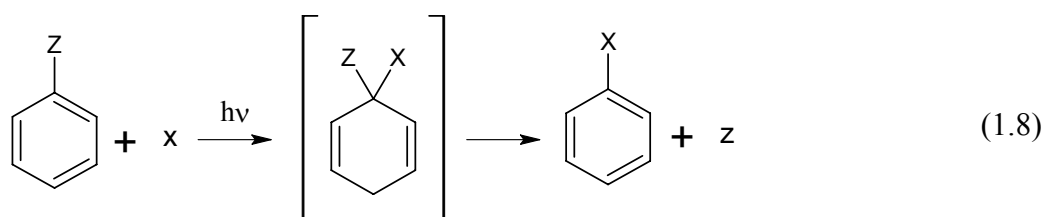
Cyklické peroxidy (endoperoxidy) vznikají reakcí dienů se singletovým kyslíkem. Například rovnice 1.4 znázorňuje oxidaci butadienu [78]:



K přechodu $n \rightarrow \pi$ v aldehydech i ketonech dochází při expozici materiálu zářením o vlnové délce 230 – 300 nm [78].

▪ Fotosubstituce

Při expozici aromatických sloučenin UV zářením dochází k výměně ligandů (1.8). Excitací aromátů vzrůstá dipólový moment molekuly a dochází ke změně elektronové hustoty. Výrazně se zvyšuje reaktivita uhlíkových atomů, které obsahují nukleofilní i elektrofilní částice [78].

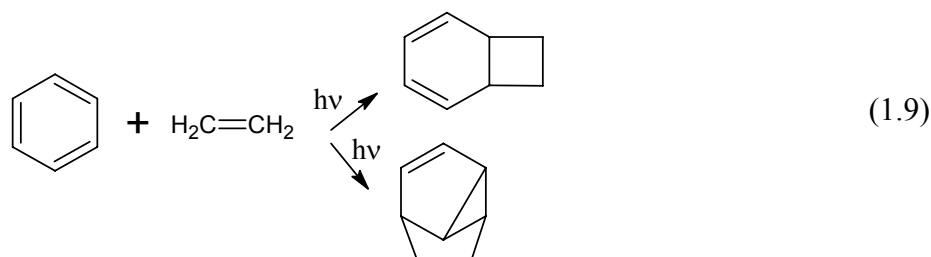


▪ Fotoadice

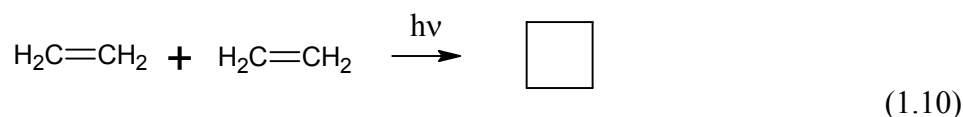
Expozicí materiálu může docházet rovněž k adičním reakcím. Při fotoadičních reakcích se uplatňuje Woodward-Hoffmannovo pravidlo zachování orbitalové symetrie [81].

Fotoadicí může vzniknout velké množství strukturně rozmanitých sloučenin. Kondenzačním mechanismem některých z nich vznikají cyklické sloučeniny, hydroperoxydy, dioxetanázy a případně aldehydy a ketony [78].

Rovnice 1.9 zobrazuje příklad fotocykloadice, která patří mezi jednokrokové pericyklické reakce [78].

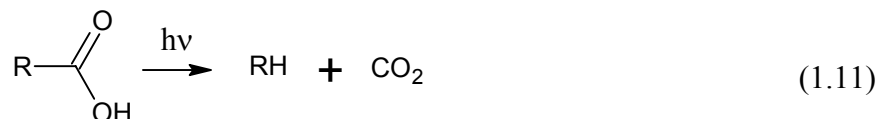


Speciálním typem fotoadice je fotodimerizace, při které reagují dvě stejné molekuly za vzniku jedné. Možná je i tvorba cyklických produktů reakcí zvanou fotocykloadimerizace (1.10) [78].



▪ Fotoeliminace

U fotoelminačních reakcí je jedním z produktů nízkomolekulární sloučenina plynného skupenství, například N_2 , CO_2 , CO nebo HX . Nejčastějším typem fotoelminační reakce je dekarboxylace (rovnice 1.11) [78].

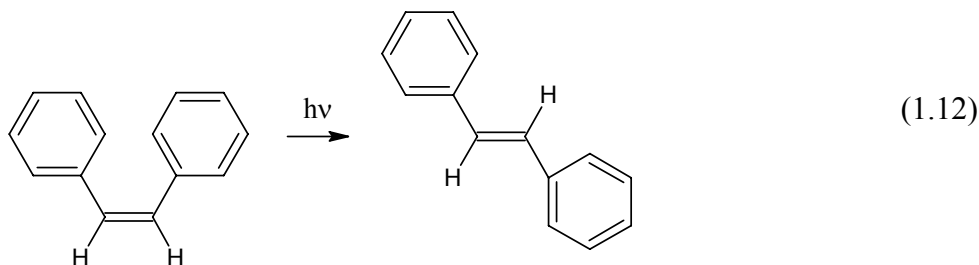


▪ Fotokondenzace

Fotokondenzace je typem fotopolymerizace, při níž ze dvou molekul vznikne sloučenina o větší molekulové hmotnosti, než byla ta původní [78].

▪ Fotoizomerizace

Expozicí zářením může dojít rovněž k vzniku nových stereoizomerů či izomerů. Nejběžnějším typem izomerizace je *cis-trans* izomerizace (rovnice 1.12), při které dojde po ozáření ke změně původní konfigurace. Možná je také změna rotace skupin kolem jednoduché vazby za vzniku konformerů a rotamerů, rotace kolem dvojně i trojně vazby a rovněž strukturální přesmyk za vzniku nových vazeb v nově vzniklém izomeru [78].

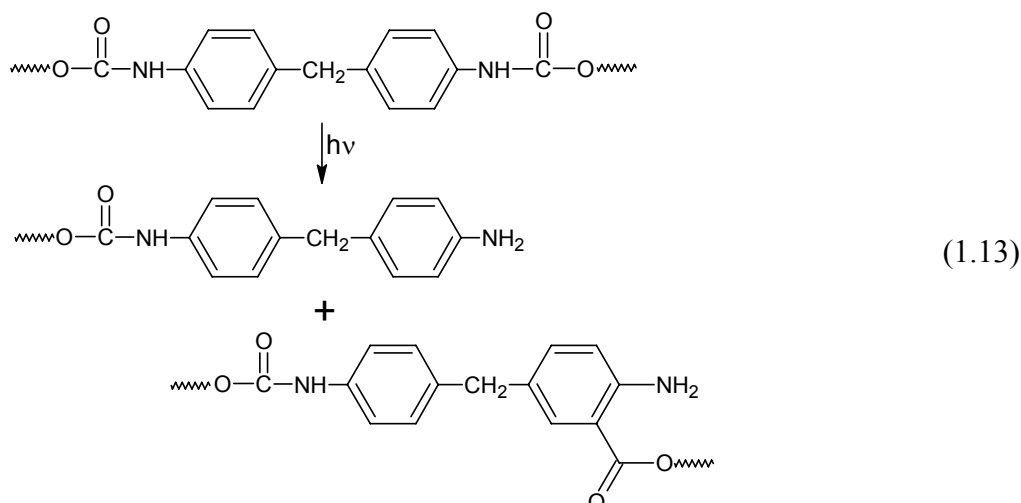


3.1.5.5 Fotodegradace polyurethanů

V minulosti nejvíce zkoumanými fotodegradačními procesy byly ty, které vedly ke změně zbarvení polyurethanů. Cílem výzkumníků bylo objasnit příčiny tohoto chování polyurethanů.

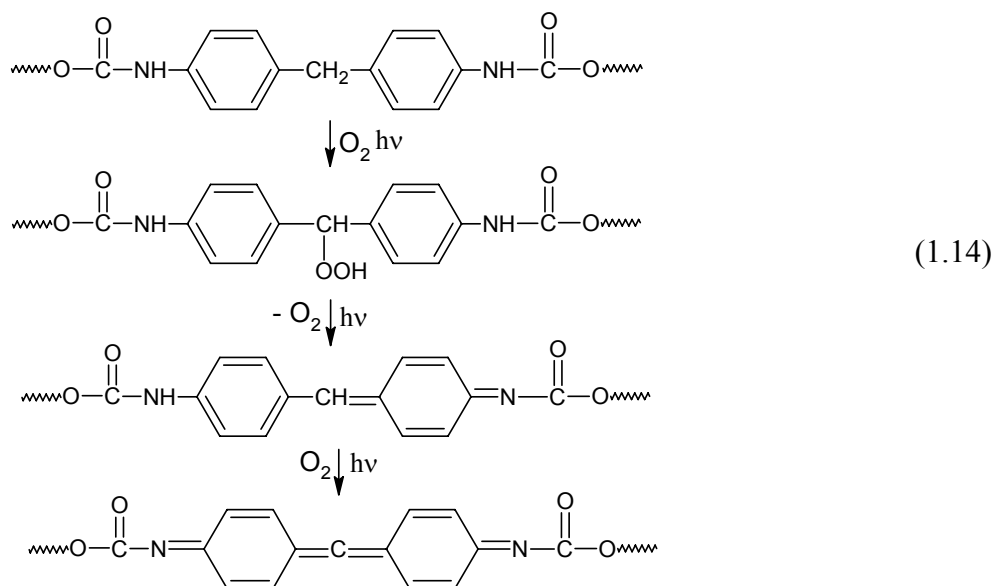
▪ Foto-Friesův přesmyk

Friesův přesmyk je přesmyk fenylesteru v kyselém prostředí. K podobné reakci může docházet i při neutrálním pH, při expozici materiálu UV záření [78, 82, 83]. Tento proces je nazýván Foto-Friesův přesmyk. Pozorován a publikován byl i u degradace polyurethanu (rovnice 1.13) [83, 84]. V přítomnosti kyslíku vlivem UV záření dochází ke vzniku sloučenin chinoidního typu, které způsobují nažloutlé zbarvení fotodegradovaných polyurethanových pěn [78]:



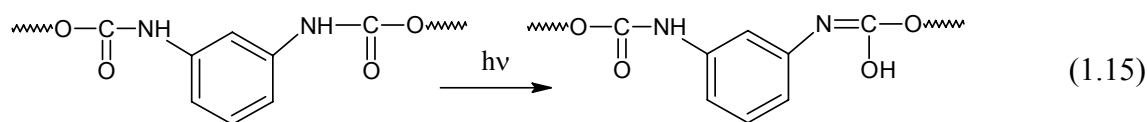
▪ Schollebergerův mechanismus

Změny zbarvení polyurethanu syntetizovaného z 4,4'-methylendifenyl-diizokyanátu vlivem UV záření zkoumali rovněž Schollenberger a Nevskii. Jimi navrhnutý mechanismus fotodegradčních změn u polyurethanu znázorňuje schéma 1.14 [83, 85]:



Tímto modelem ovšem nelze vysvětlit změnu zbarvení polyurethanů, které jsou syntetizovány z dalších aromátů, například z toluendiizokyanátu [78].

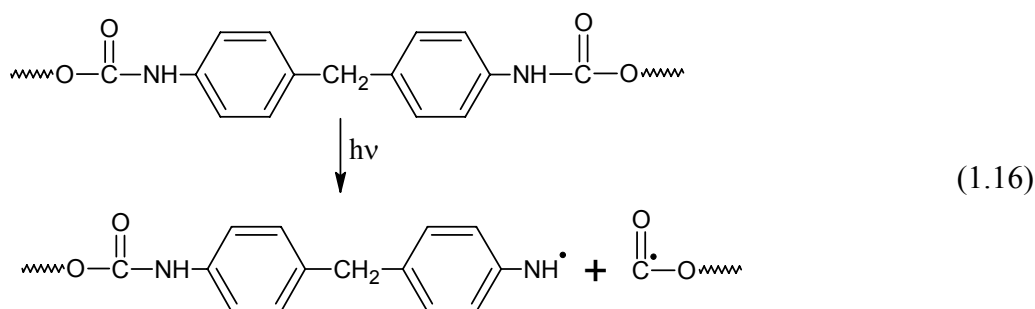
Mechanismus, který je aplikovatelný na polyurethany syntetizované ze všech aromatických izokyanátů (včetně TDI i MDI) a zároveň vysvětluje žloutnutí polyurethanů, znázorňuje schéma 1.15 [78]:



Při absorbování UV záření je polyurethan izomerizován na enol-formu, která má více než 3 konjugované dvojně vazby, jež jsou příčinou změny zbarvení exponovaného materiálu.

Systémy konjugovaných dvojných vazeb nemohou fotooxidací tvořit polyurethany syntetizované z alifatických diizokyanátů, nemohou se tedy ani chovat jako chromofory [78].

Další fotodegradační reakcí pozorovanou u polyurethanů syntetizovaných z 4,4-methylendifenyl-diizokyanátu je přímá homolýza vazby C-N, pozorovaná při expozici záření o vlnové délce nad 340 nm [78]:



Nejdůležitějším fotodegradačním mechanismem polyurethanů syntetizovaných z alifatických diizokyanátů je Norrishova reakce typu I, která je již popsána v obecném úvodu kapitoly fotodegradací (rovnice 1.6) [78].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

V této práci byla použita rozpouštědla čistoty pro GC a HPLC analýzy (Merck, Německo) a kyselina mravenčí (Sigma Aldrich, USA).

4.2 Instrumentace použitá k analýzám

Tabulka 1: Přístroje a programové vybavení použité k analýzám

Technika	Název	Specifikace MS	Výrobce	Ovládací software
GC/MS	6890N GC5973 MS	EI-Q	Agilent, USA	ChemStation verze D.03.00.611
GCxGC/MS	Pegasus® 4D	ESI-TOF	LECO instrumente, USA	CHROMATOF™ optim. pro Pegasus® 4D
MS	Esquire HCT	ESI-3D-IT	Bruker Daltonics, Německo	Bruker verze 3.4
HPLC	Ultimate 3000	-	Dionex, USA	Chromeleon® verze 6.8

4.3 Další používaná zařízení

Vysokotlaká rtuťová výbojka emitující monochromatické záření o vlnové délce 254 nm (zapůjčená Ústavem spotřební chemie VUT Brno), filtry na plastové injekční stříkačky nylonové a teflonové velikosti 13 mm x 0,45 µm (Cronus, UK), držák SPME vláken a vlákna dle tabulky 2 (Supelco, Sigma-Aldrich, USA).

Tabulka 2: SPME vlákna použitá při experimentech

Typ stacionární fáze	Označení	Tloušťka filmu (µm)
polydimethylsiloxan	PDMS	100, 30, 7
polydimethylsiloxan/divinylbenzen	PDMS/DVB	65
polyakrylát	PA	85
carboxen™/polydimethylsiloxan	CAR/PDMS	75
carbowax™/divinylbenzen	CW/DVB	65
divinylbenzen/carboxen™/polydimethylsiloxan	DVB/CAR/PDMS	50, 30

4.4 Testované vzorky

Testovaným materiálem byly flexibilní polyurethanové pěny syntetizované na Ústavu chemie materiálů Vysokého učení technického v Brně. Syntetizovány byly PUF s přidaným biodegradovatelným plnidlem (dále bio-polyol, bio-plnidlo) a pěna referenční (REF), která toto plnidlo neobsahovala.

Suroviny použité pro syntézu :

- Polyether-polyol: Slovaprop® G-48 S
- Diizokyanát: 2,4-TDI : 2,6-TDI (80:20)
- Katalyzátory: bis(dimethylaminoethyl)ether, dipropylenglykol, triethylendiamin, cín-2-ethylhexanoát
- Silikonový olej, deionizovaná voda
- Bio-plnidlo dle tabulky 3

Tabulka 3: Použité bio-polyoly v syntéze PUF

Typ	Označení	Struktura
Sodná sůl karboxymethylcelulózy	CMC	$\text{Cel-O-CH}_2\text{-COO}^- \text{Na}^+$
Acetylovaný bramborový škrob	AS	Škrob-O-CO-CH_3
Acetylcelulóza	CA	Cel-O-CO-CH_3
2-hydroxyethylcelulóza	HEC	$\text{Cel-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$
Hydratovaná pšeničná bílkovina (gluten)	WPG	-

Cel = celulóza



Obrázek 9: Testovaný vzorek PUF s bio-polyolem sodnou solí karboxymethylcelulózy

4.5 Postupy a podmínky měření

4.5.1 Příprava vzorků pro analýzy

4.5.1.1 *Hydrolyza PUF*

0,5 g ($\pm 0,05$ g) polyurethanu, nakrájeného na kousky o přibližné velikosti 1 – 2 cm³, bylo s 25 ml vodovodní vody refluxováno pod zpětným chladičem po dobu 8 hodin. Po vychladnutí byl roztok zbaven zbytků pěny filtrací přes filtrační papír. Před analýzami byl 1 ml vzorku přefiltrován přes nylonový filtr (13 mm x 0,45 μ m).

Hydrolyze byly podrobeny polyurethanové pěny s 10 % obsahem biodegradabilního plnidla a pěna referenční.

4.5.1.2 *Fotodegradace PUF pro analýzu semivolatilních produktů*

Vzorek flexibilní polyurethanové pěny o rozměru 5 x 3 x 0,8 cm byl vystaven záření o vlnové délce 254 nm po dobu 3 hodin. Fotodegradační produkty byly extrahovány manuální kompresí PU pěny v n-hexanu (200 ml) po dobu 5 min. Extrakt byl zakoncentrován na rotační vakuové odparce na 1 ml a před analýzou přefiltrován přes teflonový filtr (13 mm x 0,45 μ m). Souběžně byl stejným způsobem extrahován vzorek neozářené PU pěny.

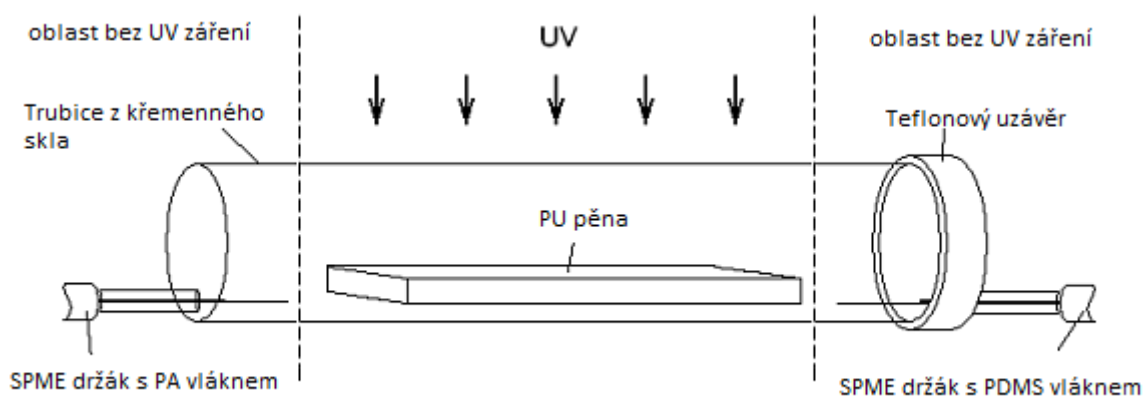
Fotodegradovány byly polyurethanové pěny s 5 % obsahem biodegradabilního plnidla a pěna referenční.

4.5.1.3 *Fotodegradace PUF pro analýzu volatilních produktů*

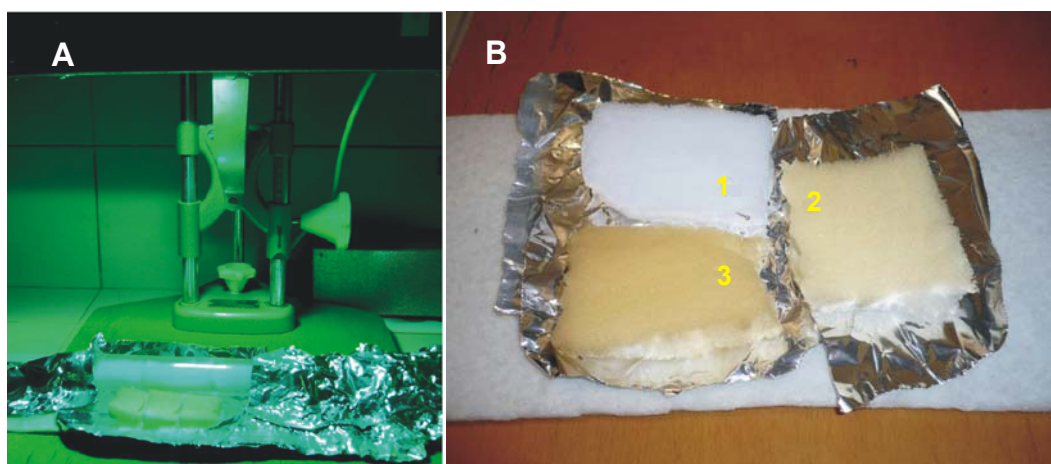
Pro vzorkování fotodegradačních produktů PUF pomocí SPME bylo v dílnách VUT Brno zkonstruováno zařízení skládající se z trubice z křemenného skla, propouštějící UV záření (délka 24,5 cm a průměr 2 cm) se dvěma vstupy a z odnímatelného teflonového uzávěru.

Vzorek polyurethanu velikosti 3,5 x 8 x 0,8 cm (šířka, délka, hloubka) byl v trubici ozařován 3 hodiny vysokotlakou rtuťovou výbojkou zářením o vlnové délce 254 nm. Fotodegradační produkty PU pěn byly sorbovány na SPME vlákna, která byla do tohoto zařízení vložena bočními vstupy. Vlákna byla po celou dobu fotodegradace chráněna před expozicí UV zářením zastíněním vstupní části trubice hliníkovou folií (obr. 10).

Fotodegradovány byly PU pěny s 1 % obsahem biodegradabilního plnidla a pěna referenční.



Obrázek 10: Schéma zařízení pro fotodegradaci



Obrázek 11: Fotodegradace PUF; Panel A: proces expozice, Panel B: 1: PUF neexponovaná; 2: PUF po expozici 3 h; 3: PUF po expozici 6 hodin (viditelné je nažloutlé až žluté zbarvení způsobené degradací PUF)

4.6 Finální podmínky stanovení hydrolyzních degradačních produktů PUF

4.6.1 Stanovení degradačních produktů pomocí HPLC/MS

Separace degradačních produktů vzniklých hydrolyzou PUF a jejich následná detekce byla provedena pomocí online HPLC/ESI-IT MS systému na přístrojích Ultimate 3000 (HPLC) Dionex, USA a Esquire HCT (ESI-IT MS) Bruker Daltonics, Německo. Data byla vyhodnocena pomocí software Bruker 3.4

Tabulka 4: Parametry stanovení HPLC/MS

Kolona	Luna 5 μm , C(18)2, 250 mm x 2 mm (Phenomenex, USA)
Průtok mobilní fáze	0,2 ml.min ⁻¹
Složení MF	Složka A – voda Složka B – ACN
Gradient MF	Počátek 30 % B, ve 30. min 100 % B (10 min), ve 42. min počáteční složení
Nástřik vzorku:	5 μl
Průtok a teplota sušícího plynu	(N ₂) 8 l.min ⁻¹ , 365 °C
Průtok zmlžovacího plynu	(N ₂) 15 l.min ⁻¹
Detekce	Negativní i pozitivní ionty
MS/MS fragmentační amplituda	0,8 V

4.6.2 Fragmentace degradačních produktů pomocí MSⁿ

Struktura neznámých látek vzniklých hydrolyzou PUF byla odvozena z dat získaných fragmentací prekurzorových píků na hmotnostním spektrometru Esquire HCT (ESI-IT MS, Bruker Daltonics, Německo). Experimentální podmínky MSⁿ (šířka izolačního okna, fragmentační amplituda) byly měněny dle odezvy detektoru. Pro jednotlivé ionty byly tyto podmínky stanovení různé. Data byla vyhodnocena pomocí software Bruker Daltonics 6.1. DataAnalysis verze 3.4.

Tabulka 5: Společné parametry stanovení ESI-IT MS

Rozsah skenu	50 – 800 m/z
Průtok a teplota sušícího plynu	N ₂ @ 10 l.min ⁻¹ , 350°C
Průtok zmlžovacího plynu	(N ₂) 5 l.min ⁻¹
Detekce	Negativní i pozitivní ionty
Dávkování vzorku	Infúze @ 3 μl .min ⁻¹
Okyselení vzorku	1 % HCOOH na pH ~ 3

4.7 Finální podmínky stanovení fotodegradačních produktů PUF

4.7.1 Stanovení degradačních produktů pomocí GC/MS

Fotodegradační produkty PU pěn extrahované z exponovaných vzorků n-hexanem byly analyzovány pomocí GC/MS na přístroji 6890N (GC) – 5973 (Q MS) (Agilent, USA). Data byla vyhodnocena pomocí software ChemStation D.03.00.611

Tabulka 6: Parametry stanovení GC/MS

Kolona	HP-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m stacionární fáze: 5 % fenyl polydimethylsiloxan (Agilent, USA)
Teplotní program kolon	50 (1 min) – 280 °C/5 °C.min ⁻¹ (1min)
Nosný plyn	He @ 1 ml.min ⁻¹ (konstantní průtok)
Nástřík vzorku	1 μ l
Technika nástříku	Bezděličová
Teplota injektoru	250°C
Teplota Transfer Line	280°C
Ionizace	Elektronová @ 70 eV
Registrace hmotnostních spekter	Rozsah 40 – 550 amu
Identifikace látek	databáze NIST05

4.7.2 Stanovení degradačních produktů pomocí GCxGC/TOF MS

Fotodegradační produkty PU pěn sorbované na SPME vlákna byly analyzovány kompletní orthogonální plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí s analyzátozem doby letu na přístroji Pegasus[®] 4D (LECO Instrumente, USA). Data byla vyhodnocena pomocí software CHROMATOF[™] optimalizovaného pro Pegasus[®] 4D

Tabulka 7: Parametry stanovení GCxGC/EI-TOF MS

Primární kolona	HT–5, 30 m x 0,25 mm x 0,10 μm , stacionární fáze: 5 % fenylpolykarboran-siloxan (SGE, Austrálie)
Sekundární kolona	BPX–50, 1,24 m x 0,10 mm x 0,10 μm , stacionární fáze: 50 % fenylpolysilfenylen-siloxan) (SGE, Austrálie)
Teplotní program kolon	Primární: 40°C (1 min) – 250 °C/10 °C.min ⁻¹ (1 min), sekundární: 20 °C nad primární kolonou
Nosný plyn	He @ 1 ml.min ⁻¹ (konstantní průtok)
Modulátor	20 °C nad primární kolonou
Nastavení modulátoru	Hot pulse 0,4 s; Cool time 1,1 s
Teplota injektoru	250 °C
Teplota transfer Line	280 °C
Doba separace v druhé dimenzi	3 s
Ionizace	Elektronová @ 70 eV
Registrace hmotnostních spekter	Rozsah 40 – 550 amu, frekvence 100 spekter/s
Identifikace látek	Databáze NIST05

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Hydrolýzní degradační produkty flexibilních PU pěn

Pro objasnění charakteru látek, uvolňujících se z flexibilních polyurethanových pěn dlouhodobým působením vody, byla provedena jejich simulovaná laboratorní hydrolýza. Paralelně bylo hydrolyzováno 5 vzorků PUF s přidaným bio-plnidlem různého charakteru a pěnou referenční, která žádné bio-plnidlo neobsahovala.

Hydrolyzáty byly analyzovány dvěma způsoby:

- Analýzou HPLC/ESI-IT MS; separace degradačních produktů PU pěn byla provedena kapalinovou chromatografií s následnou detekcí hmotnostní spektrometrií. Tyto analýzy měly dát obecný pohled na neznámé látky přítomné v hydrolyzátech.
- Analýzou pomocí víceúrovňové tandemové hmotnostní spektrometrie na sférické iontové pasti s ionizací elektroprejem (ESI/3D-IT MSⁿ), kdy byla provedena přímá infúze vzorků (upravených pro lepší ionizaci smícháním hydrolyzátu s ACN v poměru 2:1 a okyselením kyselinou mravenčí na pH ~ 3) do elektrospreje hmotnostního spektrometru s následnou MSⁿ fragmentací vybraných prekurzorů, s cílem objasnění struktury neznámých látek.

Vyhodnocení dat probíhalo souběžnou interpretací dat jak z HPLC/MS, tak z MSⁿ. Některé závěry z MSⁿ analýz byly potvrzovány daty z HPLC/MS a naopak. Rovněž byly porovnávány výsledné chromatogramy a spektra látek vzorků s rozdílnými bio-plnidly mezi sebou a s pěnou referenční.

Popis postupu hydrolýzy PUF je uveden v experimentální části v kapitole 4.5.1.1 a podmínky stanovení degradačních produktů PUF v kapitole 4.6.

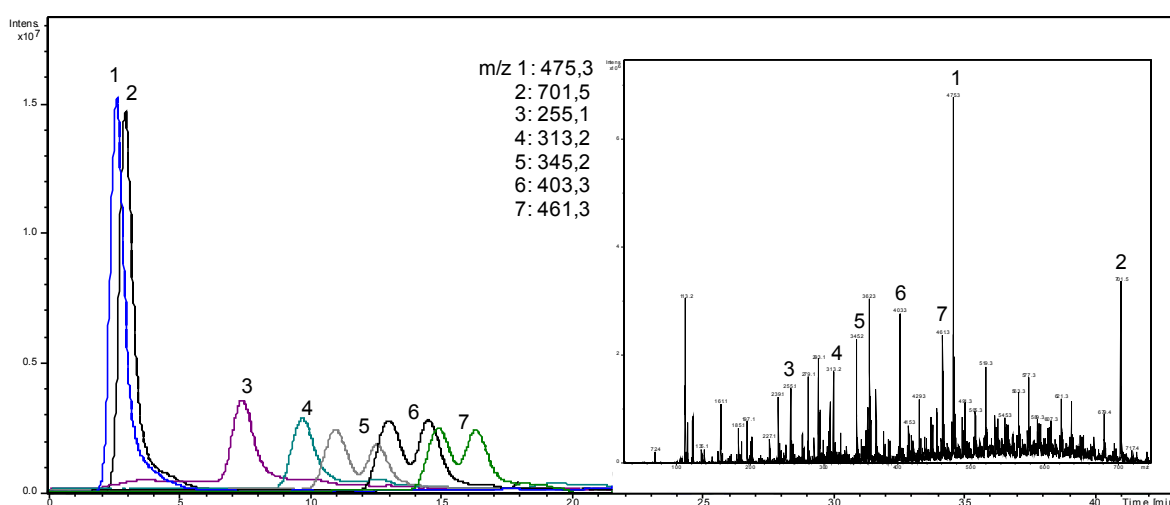
5.1.1 Interpretace dat pozitivních modů HPLC/MS a MSⁿ

První závěry bylo možné odvodit již z analýz kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií. Ty prokázaly přítomnost dvou neznámých látek obsažených ve všech hydrolyzátech bez ohledu na přítomnost nebo nepřítomnost biodegradovatelného polyolu. Tyto dvě sloučeniny měly ve všech vzorcích stejné retenční časy i shodné molekulové hmotnosti.

Protože pouhá shoda retenčních časů a molekulové hmotnosti je nedostačující k tvrzení, že se jedná o tytéž látky, byly tyto sloučeniny v každém vzorku podrobeny strukturní analýze pomocí víceúrovňové tandemové hmotnostní spektrometrie.

Selekce a fragmentace v MS^n na iontové pasti prokázala, že se jedná o tytéž látky nebo látky strukturně velmi podobné. Tyto dvě sloučeniny tvořily dominantní píky v chromatogramech celkového iontového proudu (TIC) HPLC/MS analýz a rovněž tvořily píky s největší intenzitou v MS spektrech výluhů analyzovaných přímou infúzí vzorků do iontového zdroje hmotnostního spektrometru.

Hydrolyzáty dále obsahovaly velké množství minoritních látek, které tvořily pozadí všech MS spekter, a které byly v chromatogramech nalezeny až po vyextrahování jejich m/z v extrahovaných chromatogramech (EIC). V záznamu celkového iontového proudu vidět nebyly.



Obrázek 12: Výřez EIC chromatogramu a hmotnostní spektrum hydrolyzátu polyurethanové pěny s CA plnidlem s píky neznámých látek (analýza HPLC/ESI-IT MS a ESI-IT MS)

Toto pozadí bylo tvořeno sloučeninami, které se až na výjimky vyskytovaly ve všech testovaných polyurethanových pěnách. Obdobně jako u sloučenin majoritních byly podrobeny strukturní analýze jejich fragmentací pomocí MS^n pro potvrzení, že se jedná o stejné degradační produkty přítomné v různých vzorcích.

Sloučeniny, jejichž m/z nebyly nalezeny ve všech spektrech, a které se tedy zdály být degradačními produkty specifickými pro dané PUF, byly nadále hledány v EIC HPLC/MS chromatogramech dalších vzorků. Chromatogramy ukázaly přítomnost těchto látek ve všech hydrolyzátech.

Výjimky tvořily pouze píky o m/z : 353 v AS PU pění, ve více PU pěnách sloučeniny o m/z 437, m/z 279 a m/z 415 (vše $[M+H]^+$). Tyto ovšem neměly odezvu v HPLC/MS analýzách a

rovněž je nebylo možné izolovat ani fragmentovat při MSⁿ analýzách. Tyto píky byly tedy považovány za artefakty.

Shledáno bylo, že všechny hydrolyzáty obsahují sloučeniny totožných m/z, lišící se pouze rozdílnou distribucí. Struktura a jejich strukturální totožnost byla studována tandemovou hmotnostní spektrometrií MSⁿ.

Degradační produkty vzniklé hydrolyzou PUF je možné rozdělit do tří skupin:

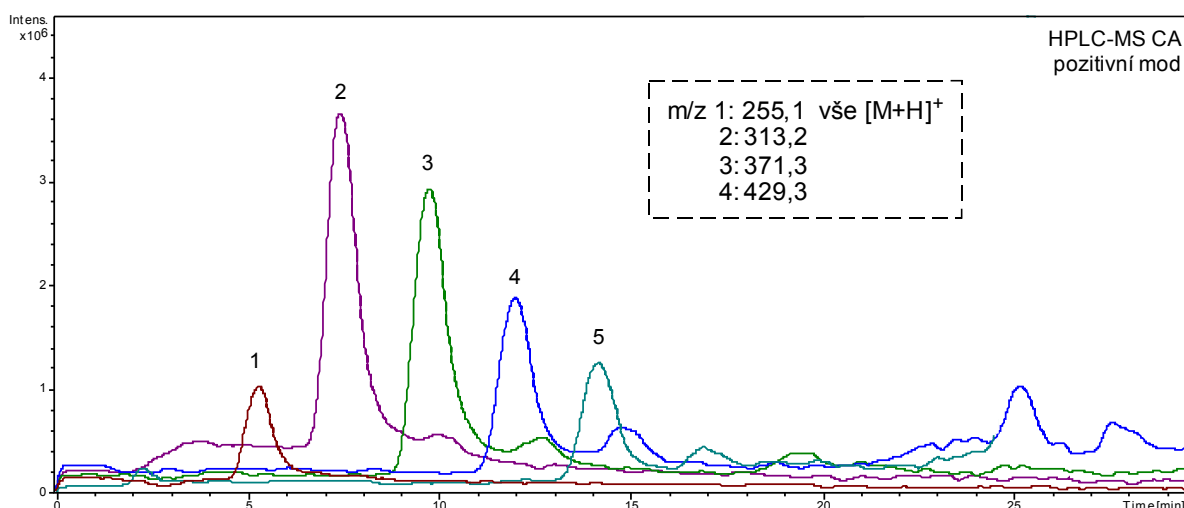
- Skupina 1 – sloučeniny, které tvoří homologickou řadu
- Skupina 2 – sloučeniny, které tvoří homologickou řadu a dva izomery
- Skupina 3 – sloučeniny samostatné

5.1.1.1 Skupina 1

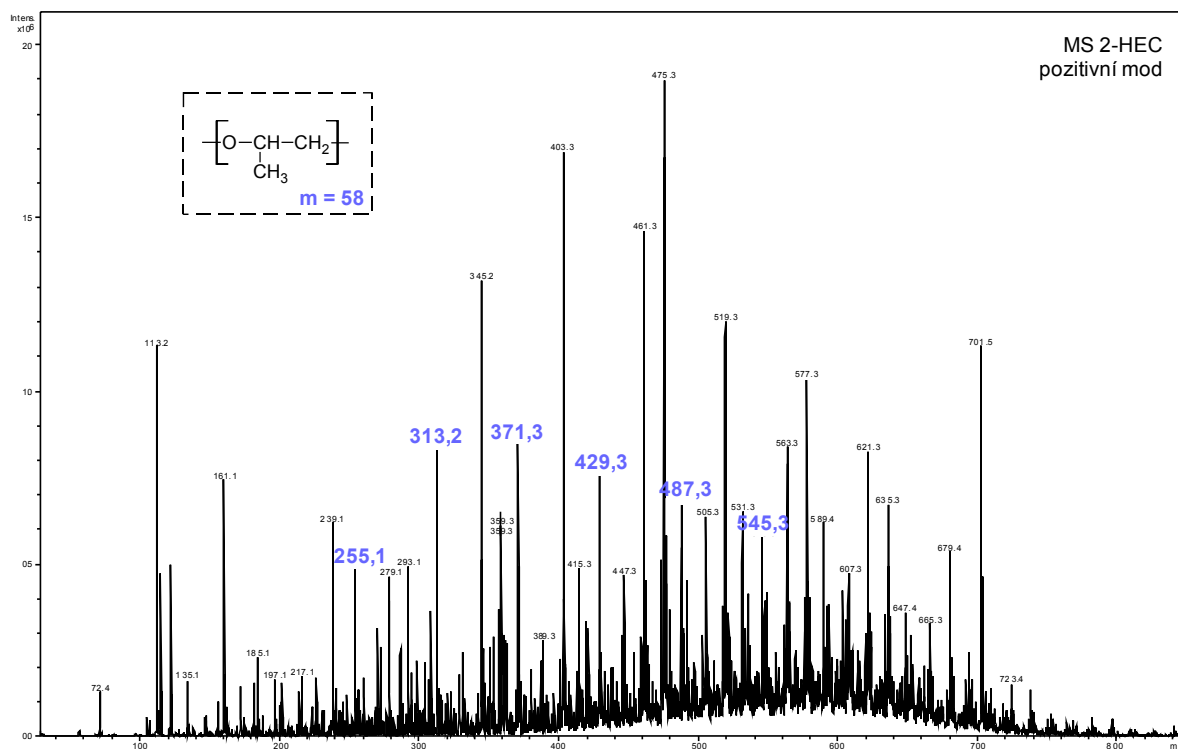
Do první skupiny byly zařazeny sloučeniny, jejichž píky v MS spektrech hydrolyzáatů tvořily homologickou řadu lišící se konstantním rozdílem m/z o $\Delta m = 58 \times n$ (viz obr. 13). Současně, po vyextrahování těchto m/z v HPLC/MS chromatogramech, tvořily tyto sloučeniny řadu chromatografických píků elujících se z kolony v pořadí od nejnižšího m/z k nejvyššímu m/z, a to v časech s konstantním přírůstkem (viz obr. 13).

Jedná se o sloučeniny s m/z 255,1; m/z 313,2; m/z 371,3; m/z 429,3; m/z 487 a m/z 545 ([M+H]⁺).

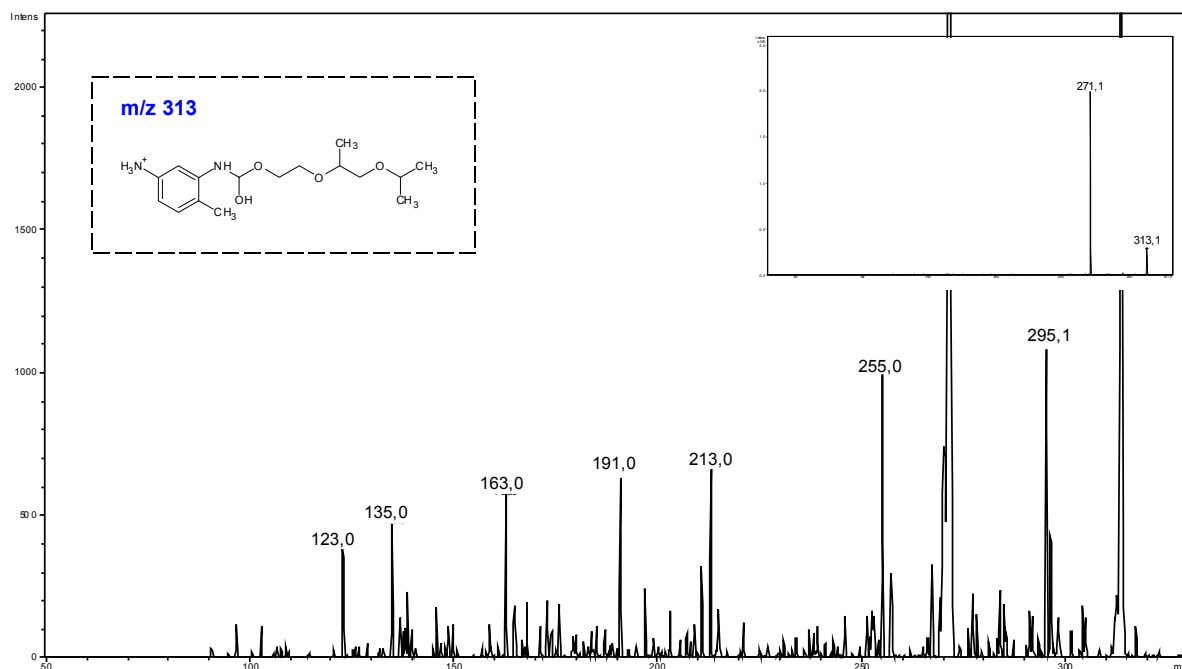
Shodný konstantní rozdíl mezi molekulovými hmotnostmi těchto sloučenin a jejich pravidelná eluce v kapalinové chromatografii naznačuje možnou strukturální příbuznost těchto látek. Ta byla ověřována selekcí a následnou fragmentací sloučenin v MSⁿ.



Obrázek 13: Výřez EIC chromatogramu hydrolyzátu PUF s vybranými píky neznámých sloučenin tvořící homologickou řadu (analýza HPLC/ESI-IT MS); m/z 487 a m/z 545 nejsou v EIC vyextrahovány z důvodu nižší intenzity píků, a tím snížení názornosti obrázku



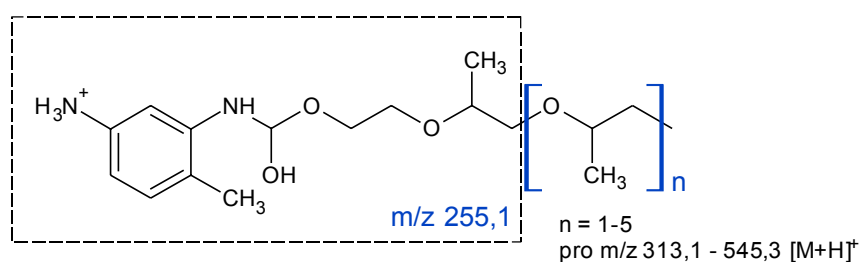
Obrázek 14: Hmotnostní spektrum hydrolyzátu PUF s plnidlem 2-HEC (analýza ESI-IT MS); modře je zvýrazněná homologická řada degračních produktů skupiny 1



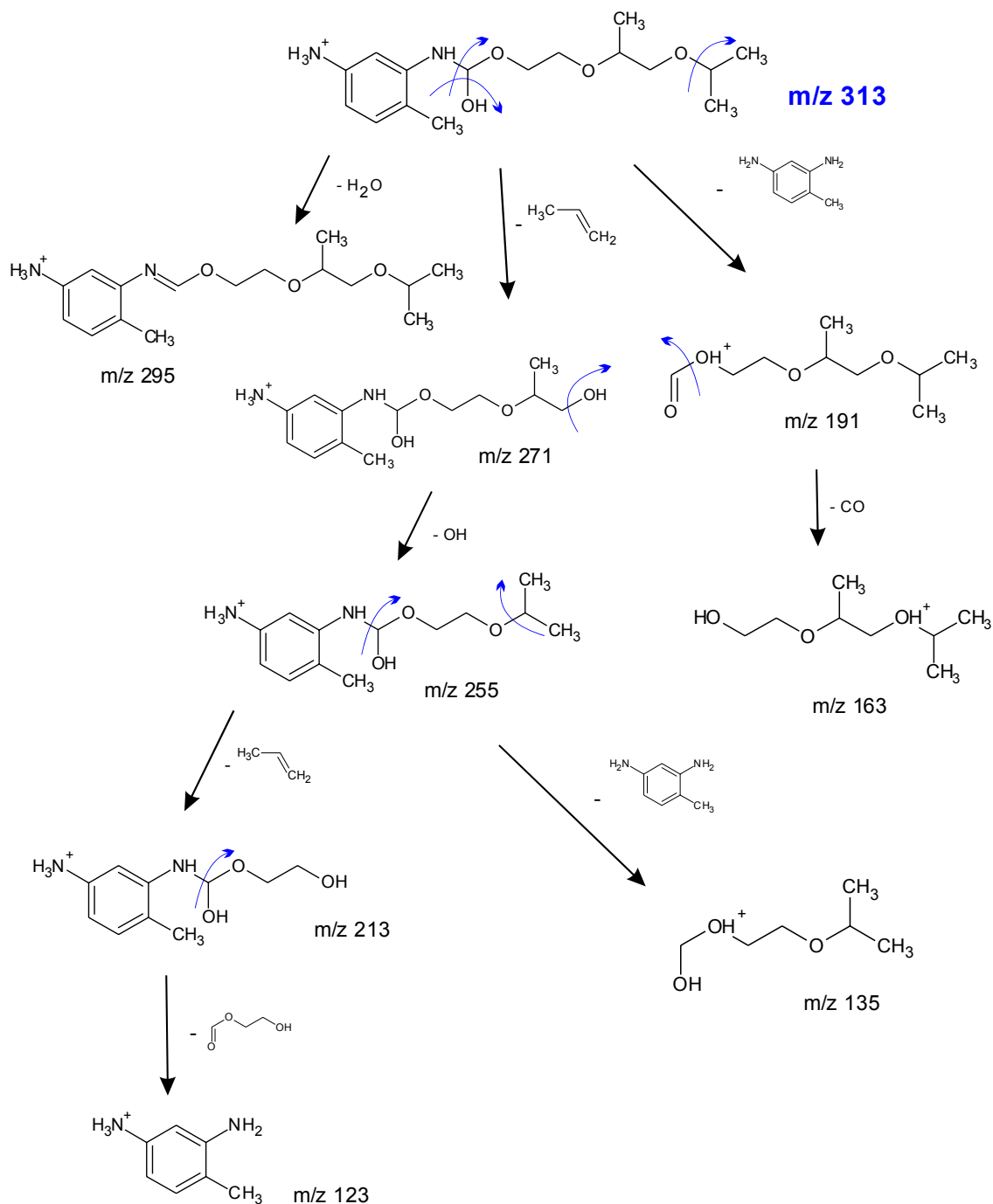
Obrázek 15: MS^2 spektrum sloučeniny o m/z 313 (analýza ESI-IT MS)

Strukturální příbuznost sloučenin skupiny 1 byla analýzami MS^n prokázána. MS^2 spektra sloučenin byla tvořena totožným základem, lišila se od sebe pouze fragmenty vzniklémi eliminací různého počtu methylethyletherů ($\Delta m = 58$). Tento methylethylether je základní stavební jednotkou polyether-polyolové části testovaných polyurethanů.

Z fragmentačních mechanismů čitelných z MS^2 a MS^3 spektrech byla navržena struktura těchto látek. Ta je souhrnně zobrazena na obrázku 16. Základ sloučenin tvoří diaminotoluen, pocházející z izokyanátu polyurethanu, který je navázán dehydrogenovanou urethanovou vazbou na polyether polyol o různém počtu merů.



Obrázek 16: Návrh struktury neznámých sloučenin skupiny 1



Obrázek 17: Návrh fragmenčního mechanismu sloučeniny m/z 313

5.1.1.2 Skupina 2

Do druhé skupiny byly zařazeny sloučeniny, jejichž m/z se lišily rovněž konstantním rozdílem $\Delta m = 58$, ale na rozdíl od první skupiny, při vyextrahování těchto m/z v HPLC/MS

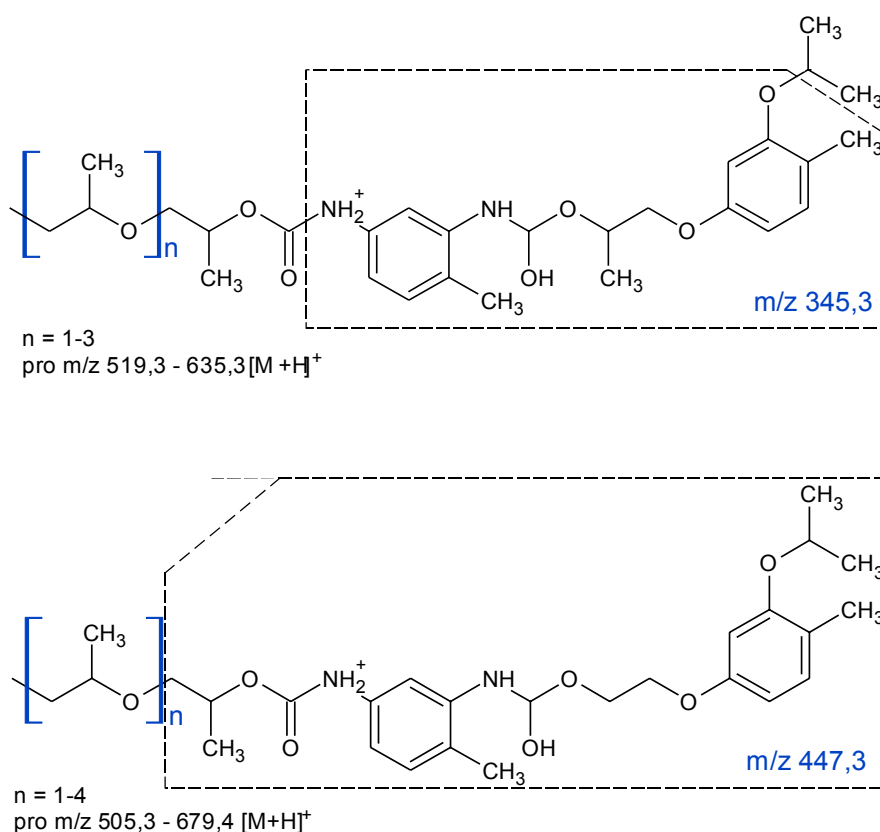
chromatogramech, netvořily tyto sloučeniny řadu jednotlivých chromatografických píků, ale pro každé m/z byly vyextrahovány dva píky – izomery (obr. 19).

Objeveny byly takto dvě homologické řady sloučenin: první s m/z 345; m/z 403; m/z 461; m/z 519; m/z 577 a m/z 635 a druhá s m/z 447; m/z 505; m/z 563; m/z 621 a m/z 679 (všechny $[M+H]^+$).

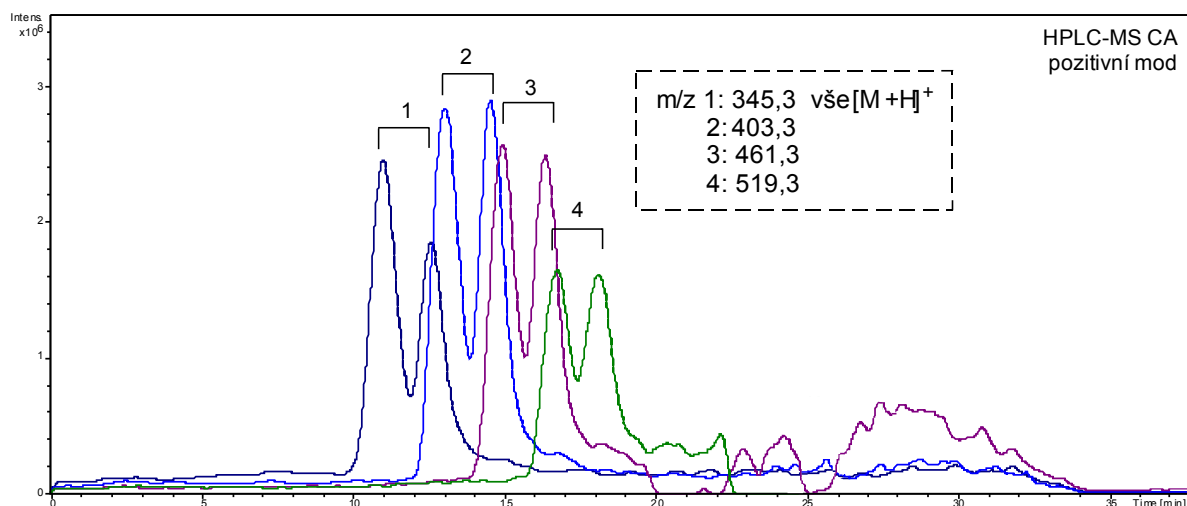
Obdobně jako v prvním případě byla ověřena a prokázána strukturní podobnost těchto sloučenin selekcí a fragmentací příslušných m/z v MS^n .

Ve spektrech je opět na první pohled viditelný obdobný fragmentační mechanismus. Neutrální ztráty ve spektrech různých sloučenin jsou vždy stejné. Liší se opět pouze m/z fragmentů o násobky $\Delta m = 58 \times n$ (methylethylether).

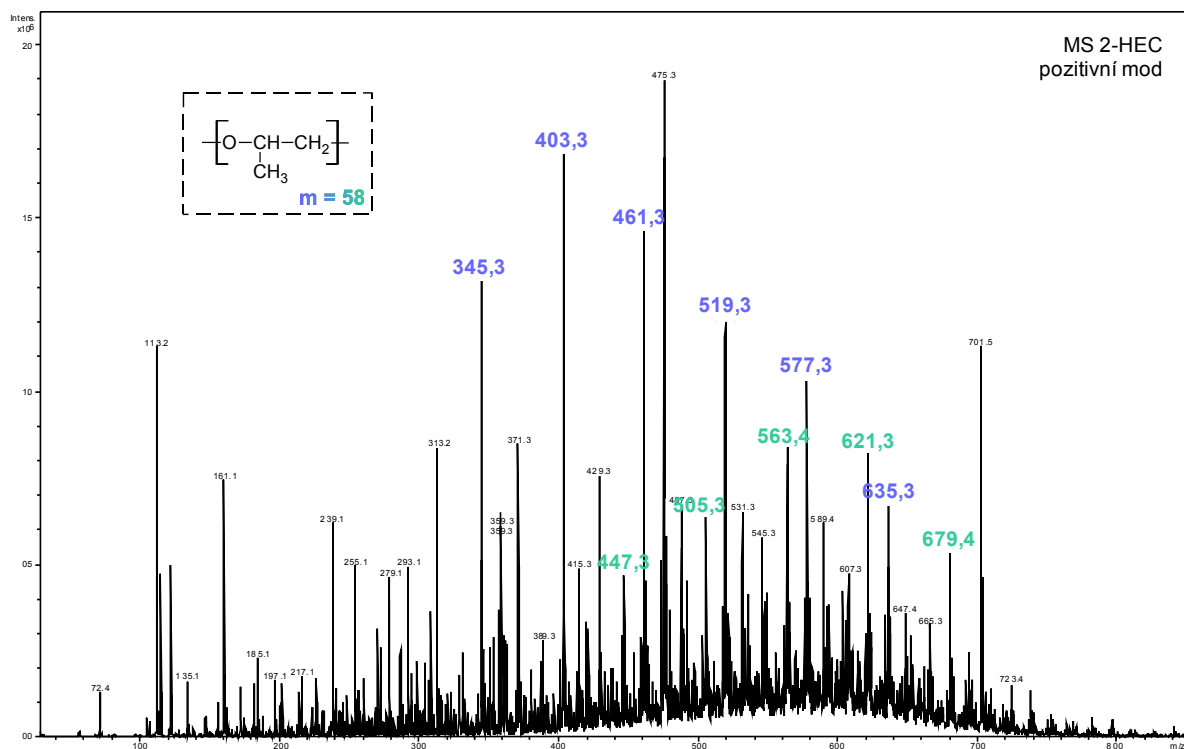
Stejně jako u první skupiny byly na základě fragmentačních mechanismů sloučenin navrženy jejich struktury (obr. 18).



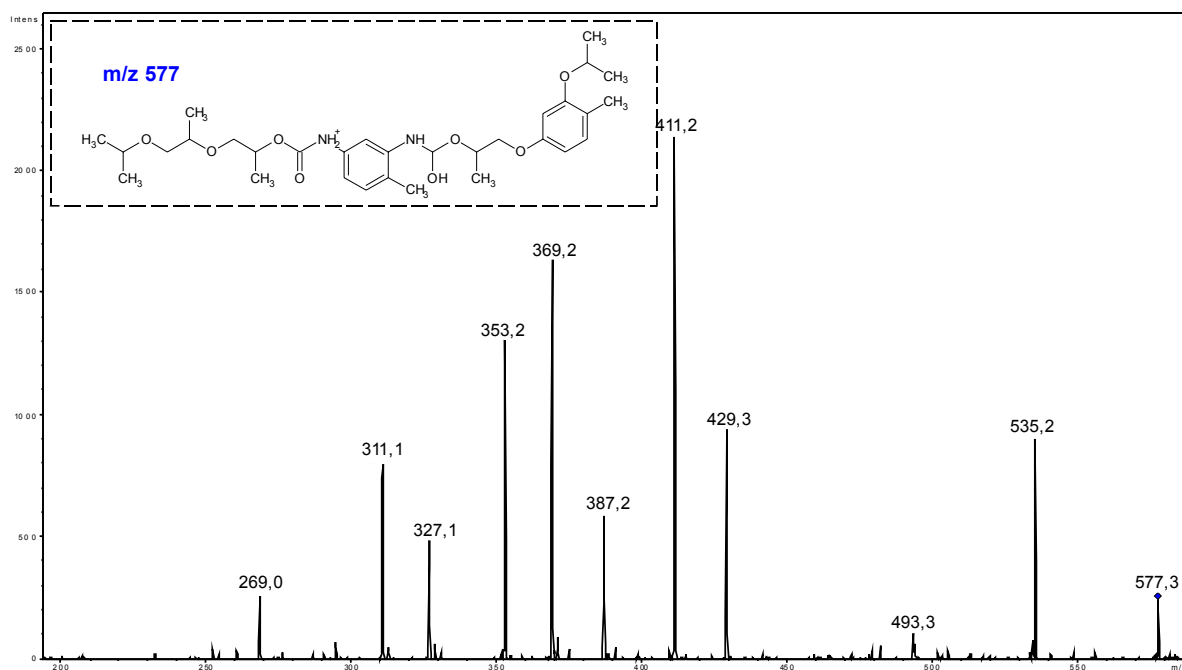
Obrázek 18: Návrhy struktur neznámých sloučenin skupiny 2



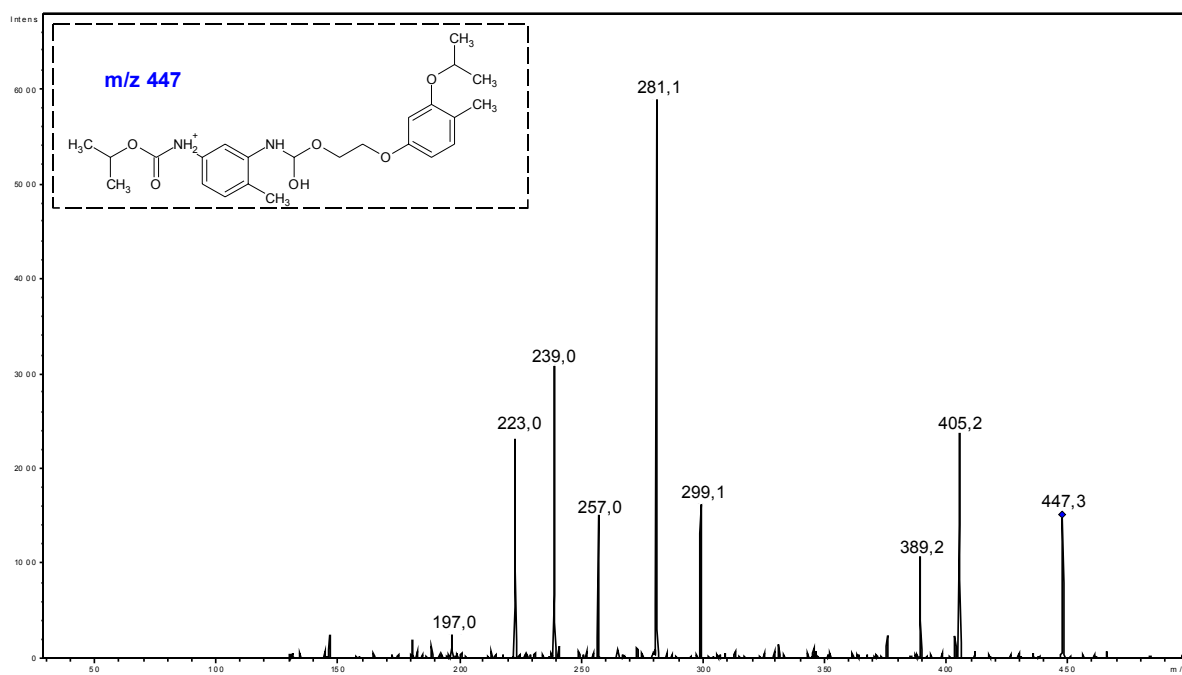
Obrázek 19: Výřez EIC chromatogramu hydrolyzátu PUF s vybranými píky neznámých látek tvořící dva izomery (analýza HPLC/ESI-IT MS); m/z 577 a m/z 635 nejsou v EIC vyextrahovány z důvodu snížení názornosti



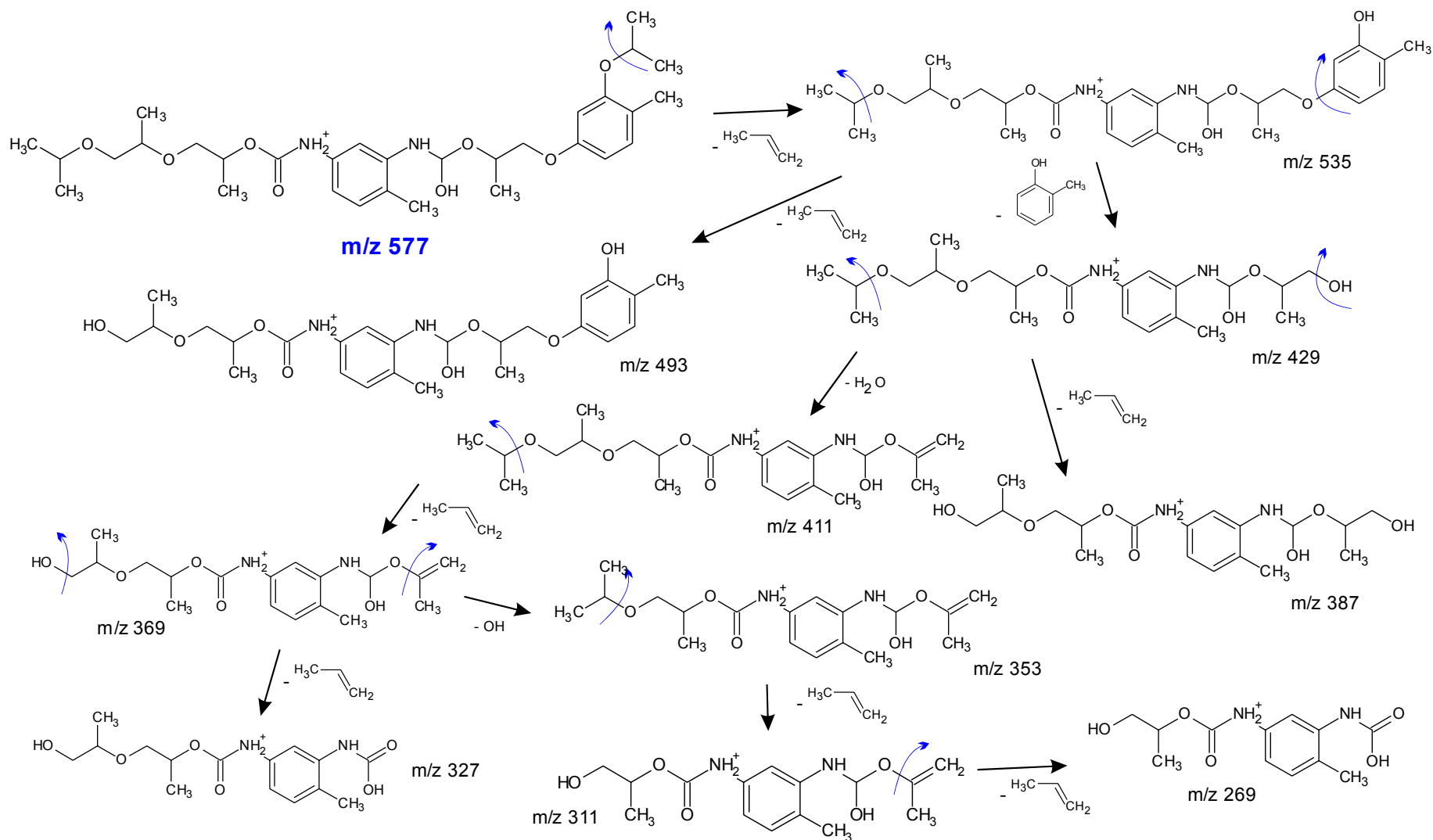
Obrázek 20: Hmotnostní spektrum hydrolyzátu PUF s plnidlem 2-HEC (analýza ESI-IT MS); modře a zeleně jsou zvýrazněné homologické řady degradačních produktů tvořící 2 izomery



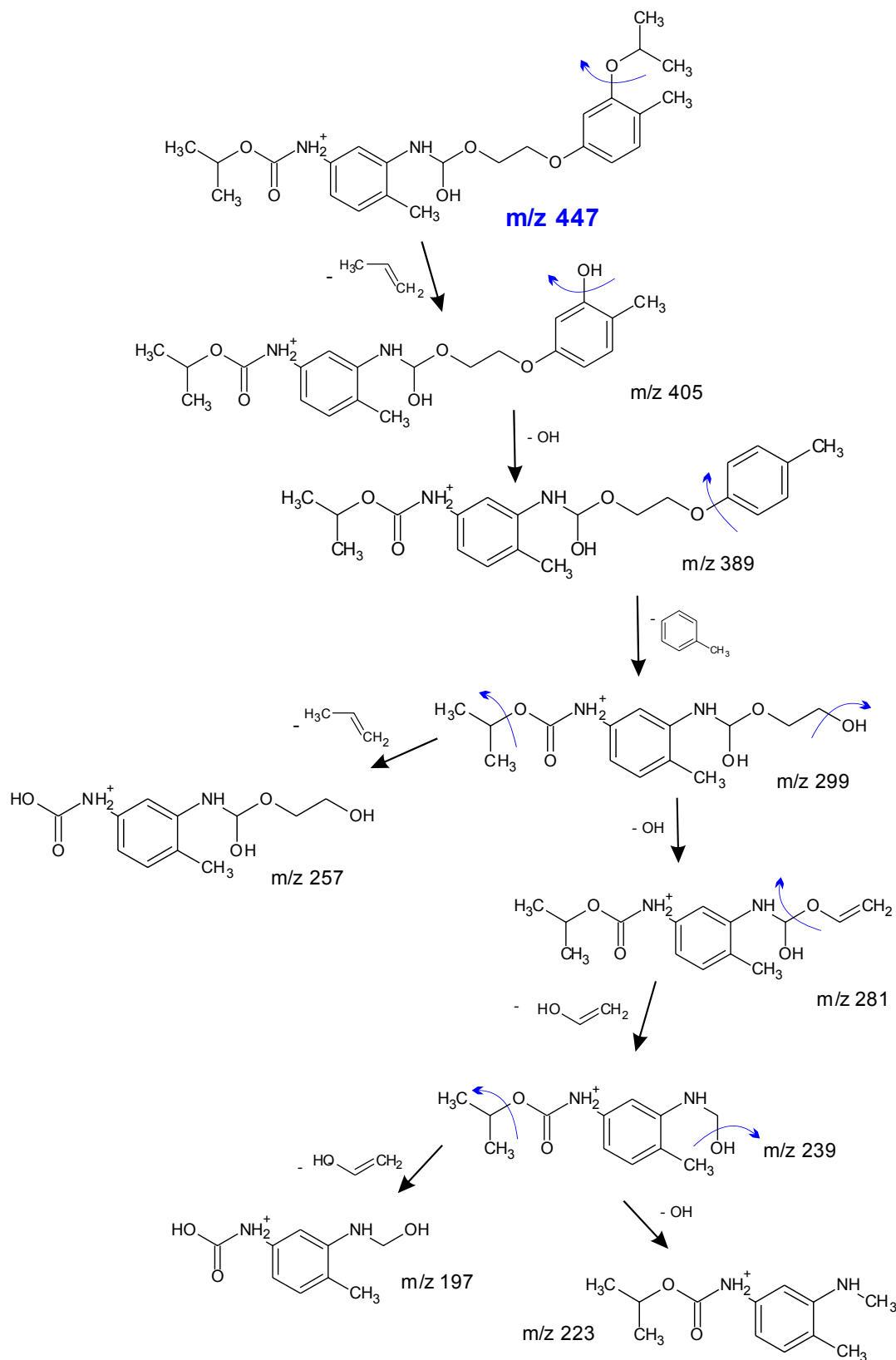
Obrázek 21: MS² spektrum sloučeniny o m/z 577 (analýza ESI-IT MS)



Obrázek 22: MS² spektrum sloučeniny o m/z 447 (analýza ESI-IT MS)



Obrázek 23: Návrh fragmentačního mechanismu sloučeniny o m/z 577 (zástupce 2. skupiny, první homologické řady)



Obrázek 24: Návrh fragmentačního mechanismu sloučeniny o m/z 447 (zástupce 2. skupiny, druhé homologické řady)

Obdobně jako u skupiny 1 jsou degradačními produkty polyurethanových pěn sloučeniny, které mají ve své struktuře úseky z toluendiizokyanátové i z polyether-polyolové části polyurethanu. Na rozdíl od první mají sloučeniny v této skupině ve své struktuře jednu nedegradovanou urethanovou vazbu.

Netypické je zakončení řetězce obou homologických řad, v němž je na etherovou vazbu řetězce navázán tolyl s jedním methylethyletherovým merem. Ovšem pouze s touto částí molekuly bylo možné navrhnout strukturu sloučeniny tak, aby bylo možné vysvětlit všechny fragmenty uvedené ve spektrech.

5.1.1.3 Skupina 3

Do třetí skupiny byly zařazeny sloučeniny, které nebyly součástí žádné homologické řady degradačních produktů polyurethanů.

Jsou to sloučeniny o m/z 113; m/z 453 a m/z 679 ($[M+H]^+$). Druhé dvě sloučeniny tvoří nejen vodíkové ($[M+H]^+$), ale jako jediné ze všech sloučenin i sodné addukty o m/z 457 a m/z 701 ($[M+Na]^+$). Tyto jsou ve spektrech mnohem intenzivnější než vodíkové.

O sloučeninách této skupiny, vyjma m/z 133, byla zmínka již v úvodu této kapitoly. Jedná se o degradační produkty, které tvořily dva nejvyšší píky jak v EIC, tak ve MS spektrech hydrolyzátů. Obdobně jako u předcházejících sloučenin byla pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie zjišťována jejich struktura. Fragmentaci byly podrobeny oba adukty obou degradačních produktů.

Identifikace těchto dvou neznámých látek byla oproti výše uvedeným mnohem komplikovanější. Jejich strukturu se nepodařilo zcela objasnit.

Na obrázku 25 a 26 jsou uvedena MS^2 spektra vodíkových aduktů obou sloučenin.

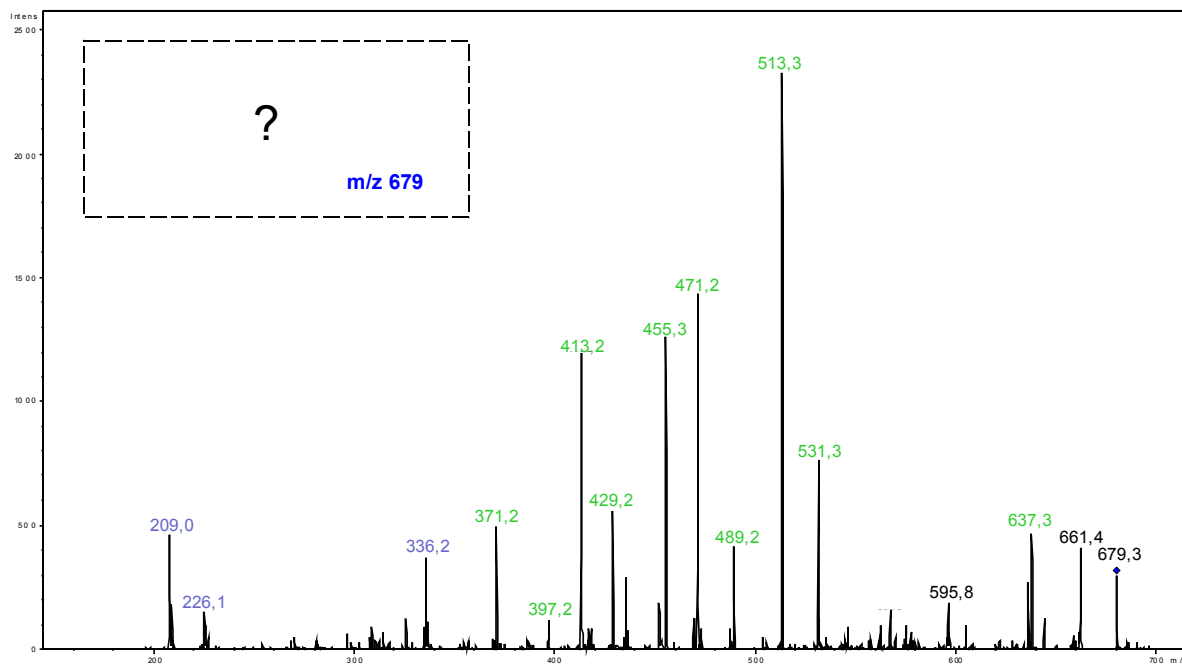
Na první pohled je vidět mezi nimi jistou podobnost. Obě sloučeniny byly štěpeny na modře zvýrazněné fragmenty m/z 336, m/z 226 a m/z 209.

Z tohoto by se dalo usuzovat, že oba neznámé degradační produkty mají shodnou část svého řetězce. Jestli tomu tak je, bylo ověřováno fragmentací společného fragmentu m/z 336.

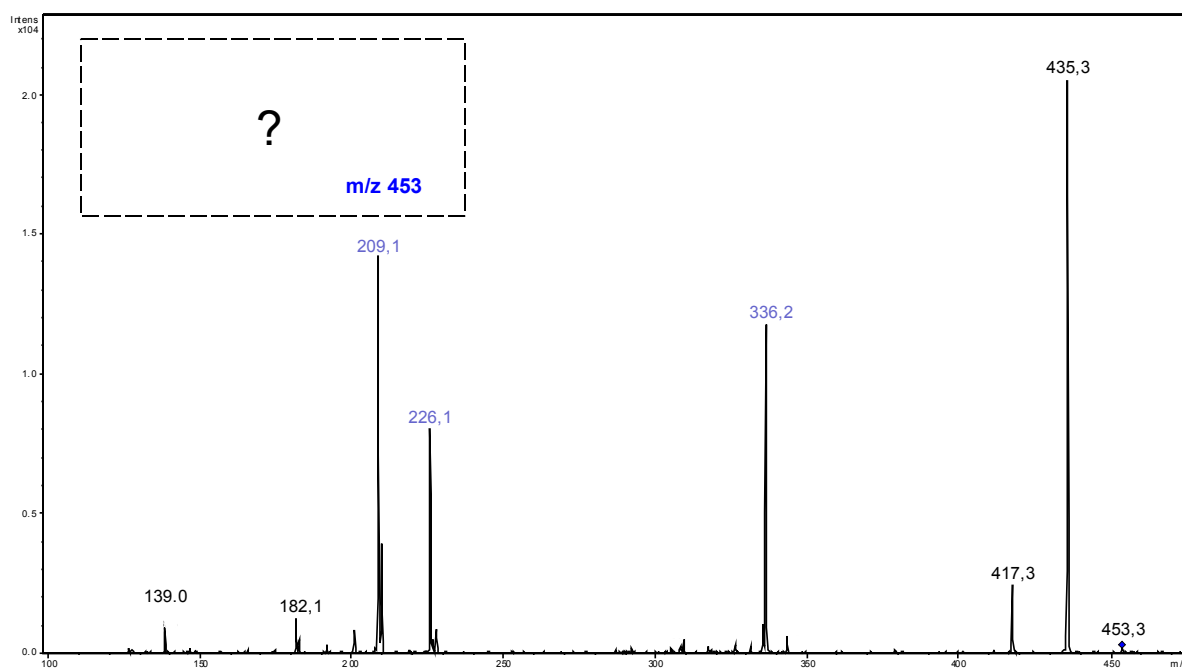
MS^3 fragmenty (m/z 679 a 453 \rightarrow m/z 336) obou sloučenin byly totožné.

V MS^2 spektru sloučeniny o m/z 679 chybí fragmenty m/z 182 a m/z 139, přítomné ve spektru sloučeniny o m/z 453.

MS^3 této sloučeniny (m/z 679 \rightarrow m/z 336) prokázala přítomnost těchto fragmentů i v tomto neznámém degradačním produktu. Důvod jejich nepřítomnosti v MS^2 spektru lze vysvětlit



Obrázek 25: MS² spektrum sloučeniny o m/z 679 (analýza ESI-IT MS)



Obrázek 26: MS² spektrum sloučeniny o m/z 453 (analýza ESI-IT MS)

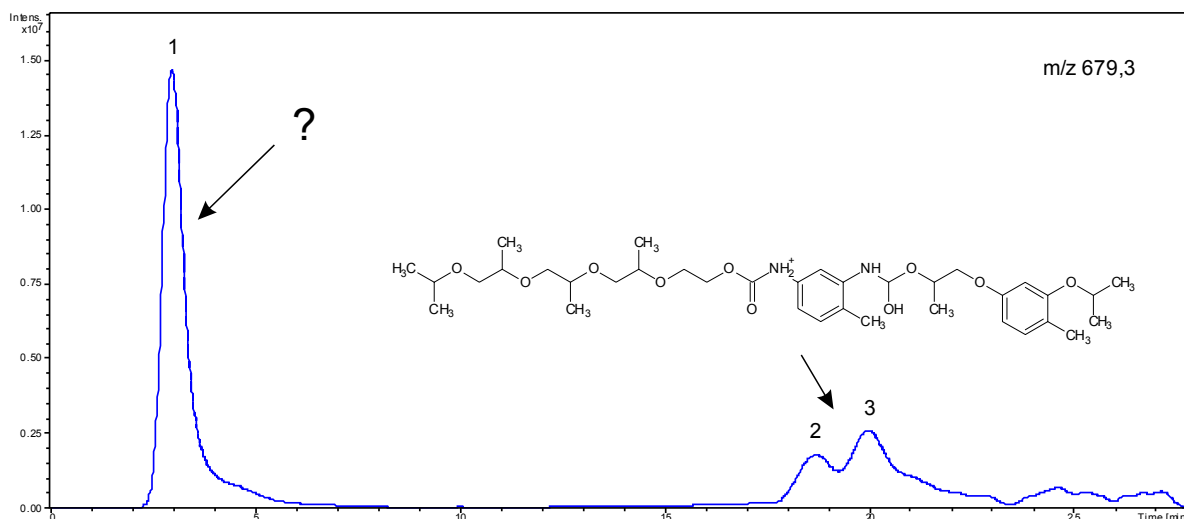
pravidlem 30:70. To říká, že hmotnostní spektrometr s analyzátozem iontovou pastí není schopen stabilizovat fragmenty s menším poměrem m/z než je 30 % štěpené molekuly. Ve spektru tedy nejsou tyto fragmenty vidět, přestože se na ně molekula štěpí.

Byla tedy prokázána shodnost fragmentů štěpících se z části řetězce sloučenin o m/z 336 v obou sloučeninách.

Strukturu fragmentu o m/z 336, kterou by bylo možné štěpit na všechny tyto fragmenty, nebylo ovšem možné navrhnout. Navržené molekuly bylo možné buďto fragmentovat na pouze některé z fragmentů uvedených ve spektrech, nebo výsledné struktury byly dosti nelogické, těžkovysvětlitelné jako degradační produkty polyurethanu.

Viditelný je rozdíl mezi počty fragmentů ve MS^2 spektrech obou sloučenin. Zatímco sloučenina o m/z 453 je na fragmenty dosti „chudá“, sloučenina o m/z 679 se štěpí na velké množství fragmentů, ve spektru zeleně označených. Tyto fragmenty jsou tvořeny štěpením řetězce složeného z několika methyletherových jednotek stejně jako u sloučenin skupiny 1 a 2.

Extrahováním m/z 679 ze záznamu z HPLC/MS analýzy získáme EIC chromatogram se třemi píky (obr. 27). Píky označené čísly 2 a 3 jsou sloučeniny popsané v rámci skupiny 2 (sloučeniny tvořící homologickou řadu a 2 izomery). Na obrázku je uveden i jejich strukturální vzorec.



Obrázek 27: EIC chromatogram hydrolyzátu polyurethanové pěny s CA biopluidem, vyextrahovaný je iont m/z 679 (analýza HPLC/ESI-IT MS)

Fragmentací prekurzoru o m/z 679 bylo tedy získáno směsné spektrum, obsahující fragmenty všech těchto min. tří sloučenin.

Ve spektru na obr. 25 zeleně označené píky, které způsobují rozdíl mezi spektry obou neznámých látek o m/z 679 a m/z 453, odpovídají fragmentům vzniklých štěpením methylethyl skupiny z řetězce sloučenin o m/z 679 ze 2. skupiny. Nelze tedy určit, které z fragmentů ve spektru jsou fragmenty neznámé sloučeniny o m/z 679 této skupiny, a proto tedy nebylo možné navrhnout strukturu bočního řetězce.

Degradační produkt o m/z 453 tvoří v HPLC/MS pouze jeden pík.

Na základě těchto skutečností lze konstatovat, že pravděpodobně sloučeniny o m/z 679 a m/z 453, obě s retenčními časy $t_R < 5$ min., mají podobnou strukturu. Protože rozdílné píky v MS^2 spektru degradačních produktů o m/z 679 mohou být fragmenty izomerů sloučenin v retenčních časech $t_R \sim 20$ min (nebo některé mohou být společné, ale není jisté, které z nich), nelze ani navrhnout strukturu této části sloučeniny, o kterou je degradační produkt o m/z 679 od 453 delší.

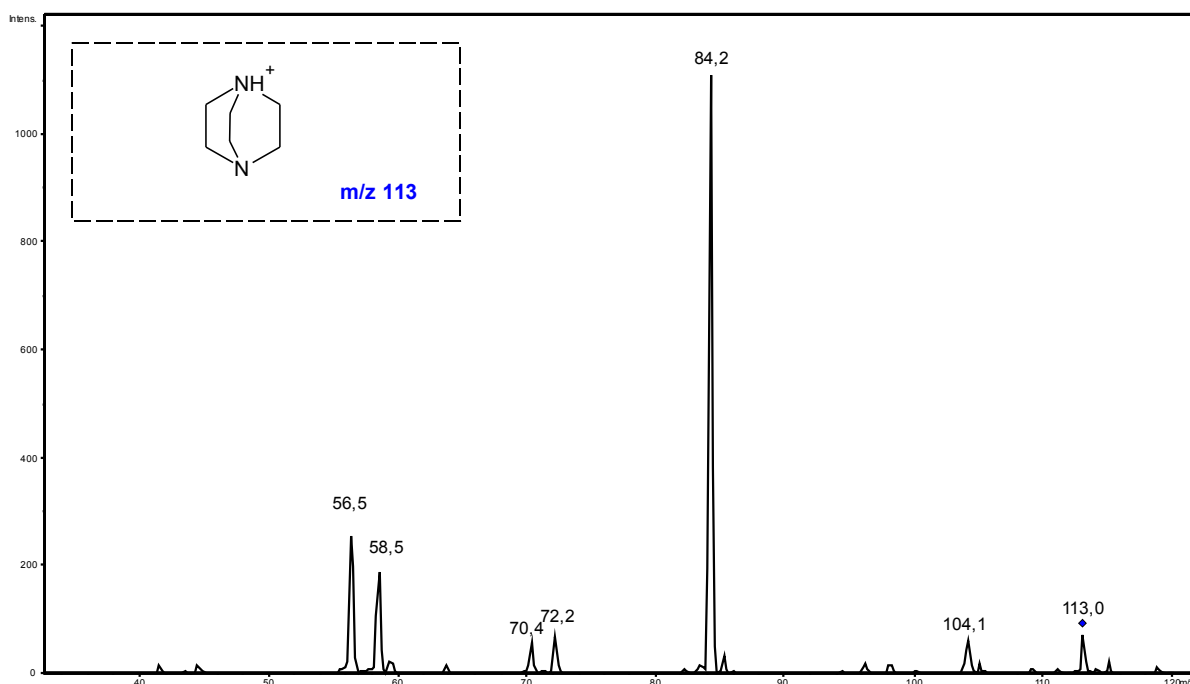
Z MS^2 spektra sloučeniny o m/z 453 lze pouze s jistotou vyčíst, že se jedná o degradační produkt s minimálně dvěma OH skupinami (2x se odštěpí voda) a dle dusíkového pravidla, že sloučeniny mají buďto žádný a nebo sudý počet dusíků zabudovaných ve své struktuře. Totéž platí i o struktuře sloučeniny o m/z 679.

Interpretace spektra takto „chudých“ na píky vedla k návržení hned několika struktur, které obsahují tyto fragmenty, přičemž jen těžko je možné říci, který je ten skutečný. Stále, jak bylo uvedeno na předcházející stránce, nebylo možné navrhnout fragment o m/z 336 tak, aby ho bylo možné štěpit na všechny ve spektru uvedené fragmenty.

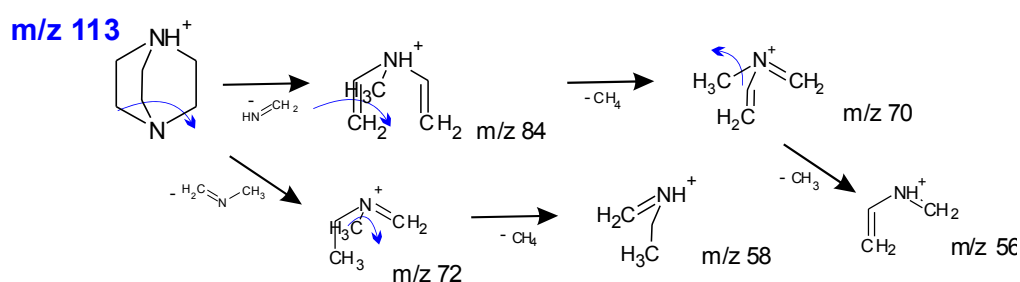
Nebylo možné navrhnout strukturní vzorec degradačního produktu tak, aby obsahoval pouze ve spektru uvedené fragmenty. Sloučeniny by pak měly velmi nepravděpodobný, malý počet atomů kyslíku a byly by pravděpodobně velmi nepolární. To odporuje retenčnímu chování těchto degradačních produktů (jejich eluce v systému obrácených fází před 5. minutou).

Jak již bylo uvedeno dříve, v této skupině, popisované dva degradační produkty tvořily jak vodíkové, doposud hodnocené, tak sodné addukty. Provedena byla i jejich MS^n fragmentace na iontové pasti. Ani fragmentace těchto prekurzorů nevedla k objasnění struktury těchto

neznámých látek. Dle vzniklých fragmentů byla pouze potvrzena přítomnost 2 OH skupin projevujících se odštěpením vody. Na rozdíl od vodíkového aduktu se z prekursoru m/z 475 i m/z 701 odštěpila COOH skupina (neutrální ztráta $m = 44$), což naznačuje přítomnost karboxylové skupiny na konci řetězce.



Obrázek 28: MS^2 spektrum sloučeniny o m/z 113 (analýza ESI-IT MS)



Obrázek 29: Návrh fragmentačního mechanismu sloučeniny o m/z 113

Poslední neznámou látkou, která byla přítomna v hydrolyzátech polyurethanových pěn, byla sloučenina o m/z 313. Její spektrum, strukturní vzorec a návrh fragmentačního mechanismu je na obrázcích 28 a 29. Detekovanou sloučeninou je ve vodě rozpustný triethylendiamin, který se při syntéze polyurethanu používá jako katalyzátor. Nejedná se tedy o degradační produkt polyurethanu, ale jeho přítomnost bude pravděpodobně způsobena kontaminací polyurethanů touto sloučeninou.

Na závěr této kapitoly je nutno uvést, že reálná struktura degradačních produktů hydrolyzy polyurethanových pěn popisovaných v této kapitole může být mírně odlišná. Například izoethyl-etherová skupina může být u sloučenin přítomna jak na pravé, tak na levé straně řetězce sloučeniny. Z hmotnostních spekter nelze polohu skupiny určit. Rovněž poloha methylu na benzenovém jádře může být odlišná. Při navrhování se vycházelo z umístění methylu na výchozím 2,4-dimethyl-toluendiizokyanátu.

5.1.2 Interpretace dat negativních modů HPLC/MS a MSⁿ

Analogicky k pozitivnímu byly prováděny analýzy i jejich interpretace v MS modu negativním. Provedeny byly HPLC/MS analýzy všech hydrolyzátů o různých biodegradovatelných plnidlech a rovněž MSⁿ analýzy sloučenin v hydrolyzátech přítomných, přímou infúzí vzorku (vzorek:ACN; 2:1; v:v, okyselený HCOOH) do elektrospreje MS s iontovou pastí.

Na rozdíl od pozitivního modu nepřinesly tyto analýzy mnoho nových informací ohledně degradačních produktů polyurethanových pěn.

Hmotnostní spektra rovněž prokázala přítomnost sloučenin o totožných m/z ve všech testovaných hydrolyzátech. Jejich následná extrakce v EIC HPLC/MS analýz prokázala, že se pravděpodobně jedná o tytéž látky. Sloučeniny o shodných m/z měly ve všech vzorcích shodné retenční časy.

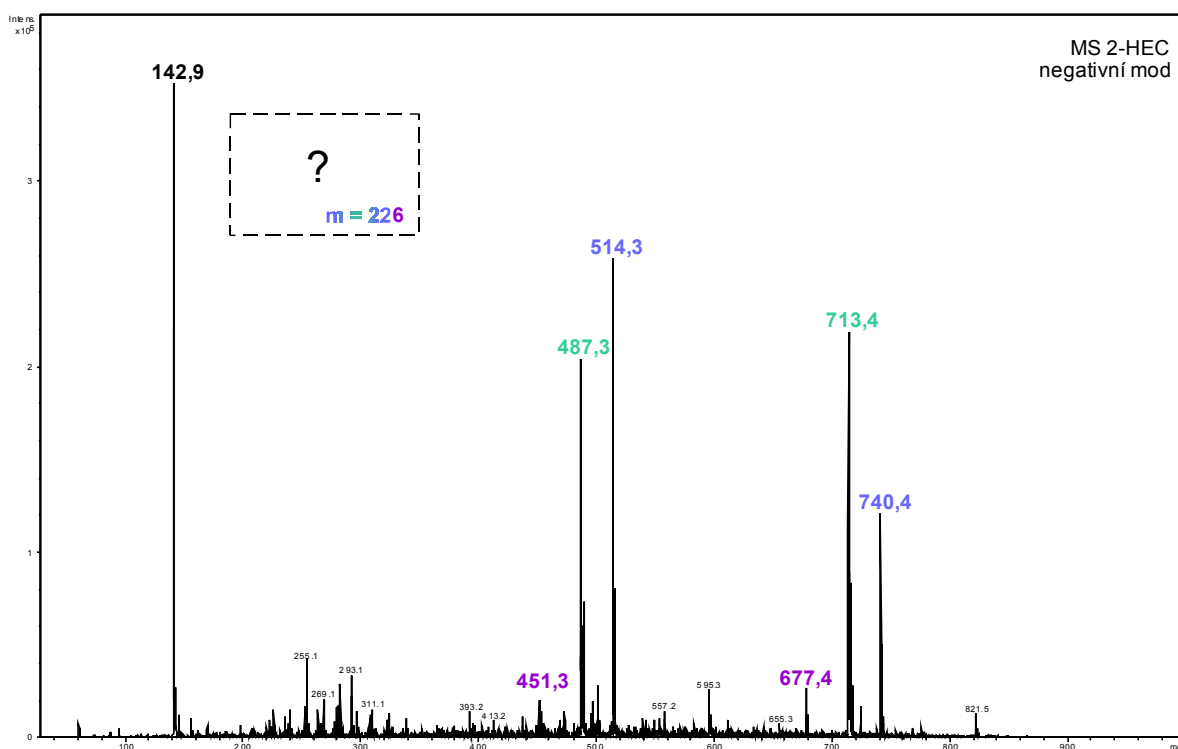
Výjimkou byl hydrolyzát z polyurethanové pěny s přidaným biopolyolem karboxymethylcelulózou. Tento hydrolyzát, i po smíchání s ACN, velmi obtížně v negativním modu ionizoval. Analýza HPLC/MS prokázala, že i hydrolyzát této polyurethanové pěny obsahuje stejné degradační produkty jako další testované vzorky.

Rozdíl mezi vzorky byl opět pouze v kvantitativním zastoupení degradačních produktů. V negativním modu bylo detekováno zřetelně menší množství sloučenin než tomu bylo v modu pozitivním. Strukturu těchto degradačních produktů polyurethanových pěn se pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie objasnit nepodařilo.

Některé sloučeniny nebylo možné v MS² fragmentovat (m/z 143 a minoritně zastoupené), byly velmi nestabilní a i při nejnižší možné dodané energii se rozpadaly. Jiné sloučeniny tvořily na píky velmi „chudá spektra“, přičemž fragmentace v MS³ byla dále, ze stejných důvodů jako je výše uvedeno, nemožná (většina s dominantními píky).

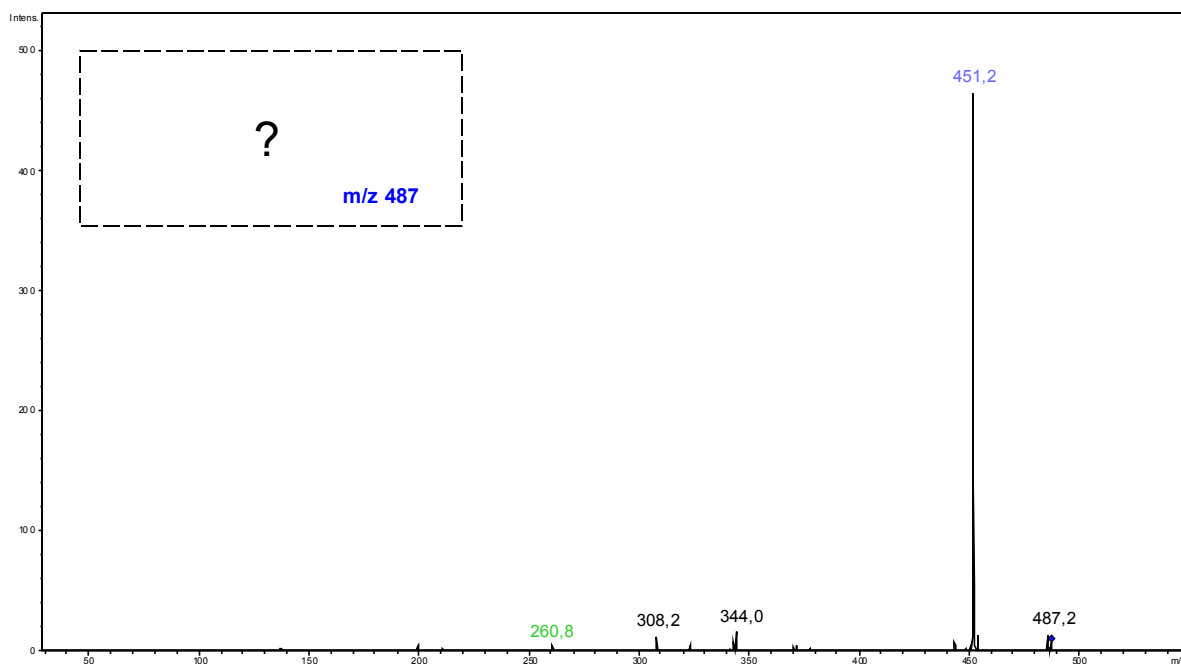
MS spektrům hydrolyzátů dominují, kromě m/z 143 ([M-H]⁻), čtyři píky, přičemž vždy dva z nich se liší rozdílem m/z o $\Delta m = 226$ (viz obr. 30). Stejný rozdíl byl nalezen i u dvou

degradačních produktů nižší intenzity píků (m/z 451 a m/z 677). Z toho může být usuzováno, že sloučeniny s m/z 677, m/z 713 a m/z 740 ($[M-H]^-$) by mohly mít strukturu stejnou jako ty s m/z 451, m/z 487 a m/z 514 ($[M-H]^-$), ale jejich část řetězce obsahuje navíc úsek o $m = 226$. Ten může být rovněž u všech třech sloučenin stejný.

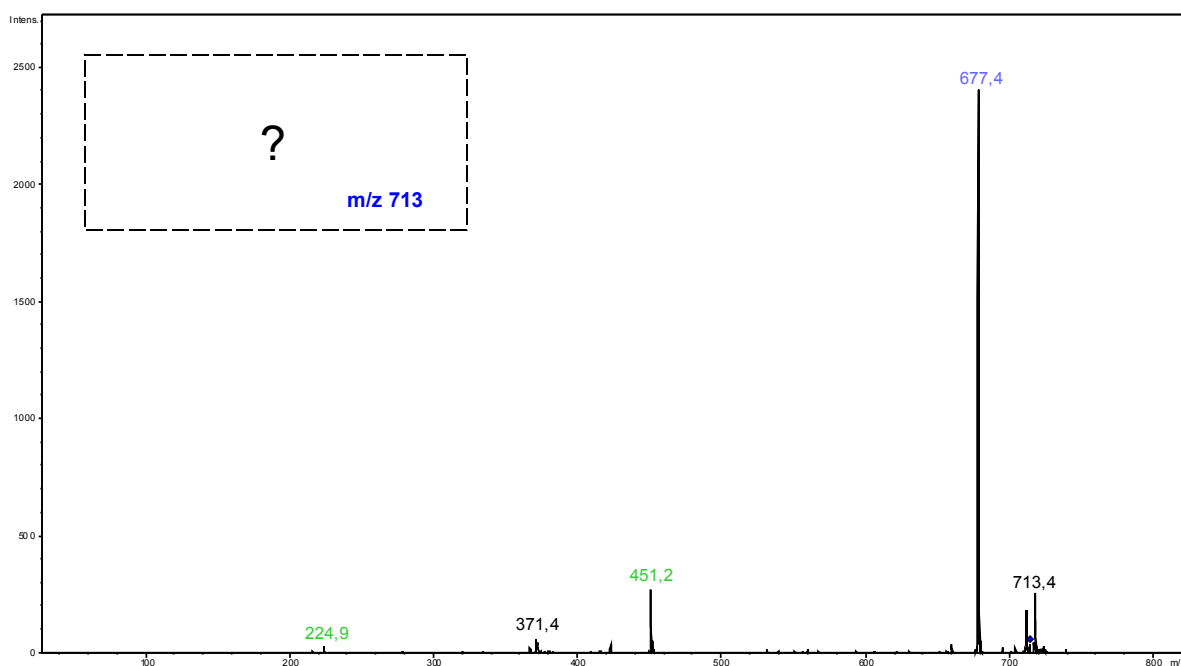


Obrázek 30: Hmotnostní spektrum hydrolyzátu PUF s plnidlem 2-HEC (analýza ESI-IT MS); barevně jsou vyznačeny degradační produkty, jejichž struktura se liší fragmentem o $m = 226$.

Tuto domněnku potvrzují pro příklad vybraná MS^2 spektra na obrázcích 31 a 32. Na horním z nich je štěpena sloučenina o m/z 487. Viditelný je slabý fragment o m/z 261, který vzniká odštěpením neutrální ztráty o $m = 226$ (m/z 487 - 226 = m/z 261) z interpretované sloučeniny. Dále je ze spektra čitelná neutrální ztráta $m = 36$ za vzniku fragmentu m/z 451. Z tohoto lze dopočítat, že poslední neutrální část molekuly má opět $m = 226$ ($488 - 226 - 36 = 226$). Sloučenina je tedy tvořena dvěma úseky o hmotnosti $m = 226$ a jedním o $m = 36$ (nejsou zahrnuty vazby na spojení těchto úseků).



Obrázek 31: MS² spektrum sloučeniny o m/z 487 (analýza ESI-IT MS), modře znázorněný je fragment vzniklý odštěpením molekuly o neutrální ztrátě $m = 36$, zeleně $m = 226$.



Obrázek 32: MS² spektrum sloučeniny o m/z 713 (analýza ESI-IT MS); modře znázorněný je fragment vzniklý odštěpením molekuly o neutrální ztrátě $m = 36$, zeleně $m = 226$.

Obdobně lze interpretovat spektrum o m/z 713. Zde je rovněž viditelná neutrální ztráta 226, a to hned dvakrát: m/z 677 \rightarrow m/z 451 a m/z 451 \rightarrow m/z 225. Fragment m/z 225 je deprotonovaný třetí úsek o $m = 226$. Stejně jako u sloučeniny o m/z 487 dochází k odštěpení neutrální ztráty $m = 36$ z interpretované sloučeniny. Molekula je tedy tvořena třemi úseky o $m = 226$ a jedním o $m = 36$ (opět nejsou zahrnuty vazby na spojení těchto úseků).

Neutrální ztráta $m = 36$ má velmi netypickou hmotnost, což je jednou z příčin, proč nebylo možné strukturní vzorce sloučenin navrhnout.

Obdobně je možné interpretovat sloučeniny o m/z 451; m/z 677; m/z 514 a m/z 740. Degradací produkty o m/z 451 a m/z 677 se liší od výše popsaných úsekem o $\Delta m = 36$, sloučeniny o m/z 514 a m/z 740 částí struktury o $\Delta m = 27$, což by mohla být například HCN skupina.

Další společnou vlastností těchto sloučenin je, že všechny měly v HPLC/MS retenční časy menší než 5 minut. To je shodné se sloučeninami o m/z 453 a m/z 679 ($[M+H]^+$) detekovanými v pozitivním modu, u nichž se rovněž strukturu nepodařilo objasnit. Je velmi pravděpodobné, že tyto degradační produkty jsou podobného charakteru.

Retenční čas degradačních produktů o m/z 451 a m/z 677 ($[M-H]^-$) se shoduje s retenčními časy sloučenin o m/z 453 a m/z 679 ($[M+H]^+$). Pravděpodobně se jedná o tytéž sloučeniny o molekulových hmotnostech $M = 452$ g/mol a 678 g/mol, které byly jako jediné ze všech stanovovaných sloučenin detekované v obou modech; jak v pozitivním, tak v negativním.

Pro úplné objasnění degradačních produktů by bylo třeba zařadit některou z dalších strukturních analýz jako například infračervenou spektroskopii, která by pomohla určit skupiny přítomné ve strukturách sloučenin, či metodu nukleové magnetické rezonance. Vhodné a přínosné by bylo rovněž zařazení vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie pro určení přesné molekulové hmotnosti degradačních produktů.

5.2 Fotodegradační produkty flexibilních PU pěn

Pro objasnění charakteru látek, uvolňujících se z flexibilních polyurethanových pěn při jejich fotodegradaci, byla provedena jejich laboratorní expozice UV zářením, výbojkou emitující monochromatické záření o vlnové délce 254 nm. Exponováno bylo 5 vzorků polyurethanových pěn s přidaným bio-plnidlem různého charakteru i PUF referenční, která žádné bio-plnidlo neobsahovala.

Izolace fotodegradačních produktů probíhala dvěma způsoby:

- extrakcí rozpouštědlem – semivolatilní sloučeniny
- mikroextrakcí tuhou fází – volatilní sloučeniny

Fotodegradační produkty byly analyzovány plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií. V případě extraktů byla využita kombinace plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem s elektronovou ionizací a analyzátozem kvadrupólem (GC/EI-Q MS).

Desorpce analytů ze SPME vláken byla provedena v injektoru ortogonálního plynového chromatografu, detekce na hmotnostním spektrometru s elektronovou ionizací a analyzátozem doby letu (GCxGC/EI-TOF MS).

K identifikaci neznámých degradačních produktů byla využita databáze NIST05.

Porovnány byly chromatogramy a spektra látek vzorků s rozdílnými bio-plnidly mezi sebou a s pěnou referenční.

5.2.1 Fotodegradační produkty flexibilních PU pěn – extrakce rozpouštědlem

5.2.1.1 *Optimalizace podmínek stanovení*

Optimalizována byla doba ozařování polyurethanové pěny a podmínky separace degradačních produktů pomocí plynové chromatografie.

Jako testovací vzorek byla použita pěna s 30 % CMC jako přidaného biodegradovatelného plnidla. U této polyurethanové pěny se z důvodu vyššího obsahu plnidla předpokládal vyšší obsah degradačních produktů oproti vzorkům s 5 % bio-polyolu.

Za účelem optimalizace separace degradačních produktů byla tato pěna exponována UV zářením po dobu 8 hodin a po extrakci n-hexanem analyzována GC/EI-Q MS. Optimalizována byl teplotní program kolony.

Pro nalezení optimální doby expozice vzorků byla PU pěna exponována UV zářením po dobu 6, 8, 18 a 32 hodin. Hexanem extrahované degradační produkty byly stanovovány GC/EI-Q MS. Hodnoceny byly především kvalitativní rozdíly mezi vzorky. Protože ty se nelišily, rozdíl mezi vzorky byl pouze v distribučním zastoupení degradačních produktů, byly nadále všechny vzorky exponovány po dobu nejkratší – 6 hodin.

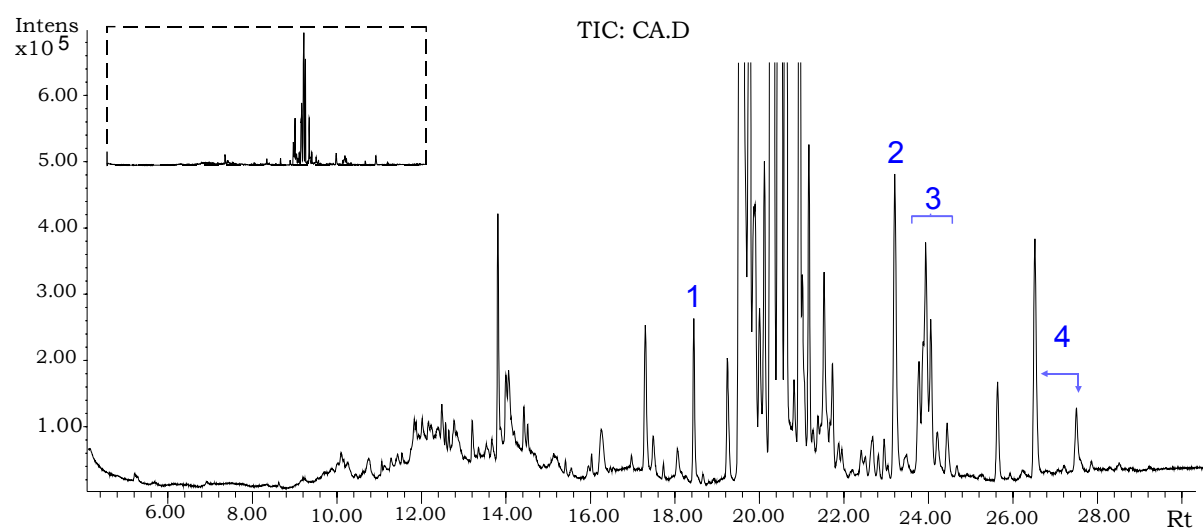
Popisy provedení fotodegradačních experimentů jsou uvedeny v experimentální části v kapitole 4.5.1.2 a podmínky stanovení v kapitole 4.7.1.

5.2.1.2 Identifikace fotodegradačních produktů

Obdobně jako tomu bylo u degradačních produktů hydrolyzy, nebyly shledány kvalitativní rozdíly mezi fotodegradačními produkty polyurethanových pěn s různými přidanými plnidly. Nalezeny byly stejné degradační produkty, obsažené všechny ve všech vzorcích, včetně polyurethanové pěny referenční (bez přidaného biodegradovatelného plnidla).

Rozdíl byl pouze v kvantitativním zastoupení těchto sloučenin. Ten oproti hydrolyzním produktům nebyl nikterak významný.

Plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií bylo detekováno velké množství sloučenin, které byly jednak fotodegradačními produkty, jednak sloučeninami, které byly vyextrahovány z polyurethanové pěny a s fotodegradací nesouvisely. Pro odlišení těchto sloučenin byla provedena i analýza neexponovaných vzorků a chromatogramy byly vzájemně porovnány.

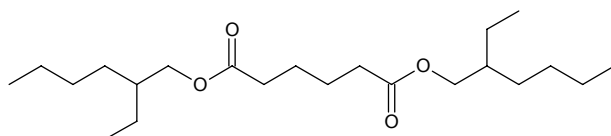


Obrázek 33: Chromatogram PUF s 5 % CA bio-plnidla, (analýza GC/EI-Q MS); modře označeny jsou fotodegradační produkty

Na obrázku 33 je příklad chromatogramu polyurethanové pěny s 5 % CA. Modře označeny jsou degradační produkty vzniklé fotodegradací této polyurethanové pěny. Ostatní sloučeniny byly vyextrahovány i z polyurethanové pěny, která expozici UV zářením nebyla vystavena.

Sloučenina č. 1

Prvním fotodegradačním produktem s $t_R = 18,3$ min je bis(2-ethylhexyl)ester kyseliny hexandiové. Faktor shody experimentálního a knihovního spektra uvedeného v databázi NIST 05 byl 94 %.



Obrázek 34: Strukturální vzorec sloučeniny č. 1; bis(2-ethylhexyl)ester kyseliny hexandiové

Sloučenina č. 2

Degradační produkt s retenčním časem $t_R = 22,9$ min nebylo možné porovnáním experimentálního spektra se spektry v databázi identifikovat. Spektrum této sloučeniny je uvedeno na obrázku 35.

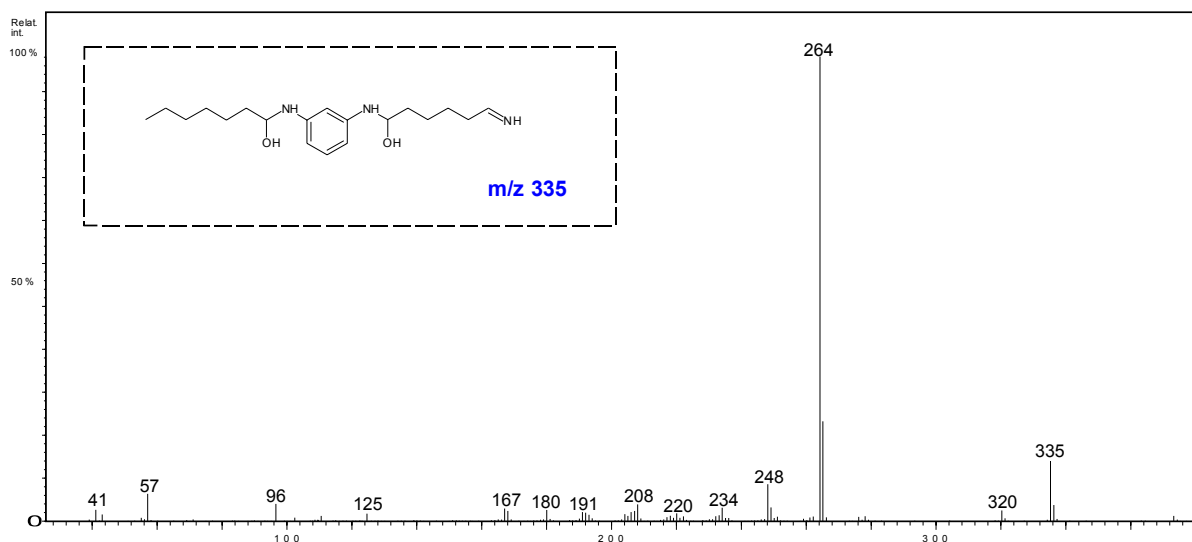
Protože z chromatogramu nebyla viditelná jakákoliv koeluze tohoto degradačního produktu s nějakou jinou sloučeninou, byla dále navrhována struktura této neznámé látky z fragmentů, na které se při elektronové ionizaci štěpila.

Nejčastěji interpretace hmotnostních spekter začíná určením molekulového iontu. Ten v MS spektrech při elektronové ionizaci není vždy vidět. U této sloučeniny tomu tak patrně není. Molekulovým radikalkationem je pravděpodobně pík m/z 335.

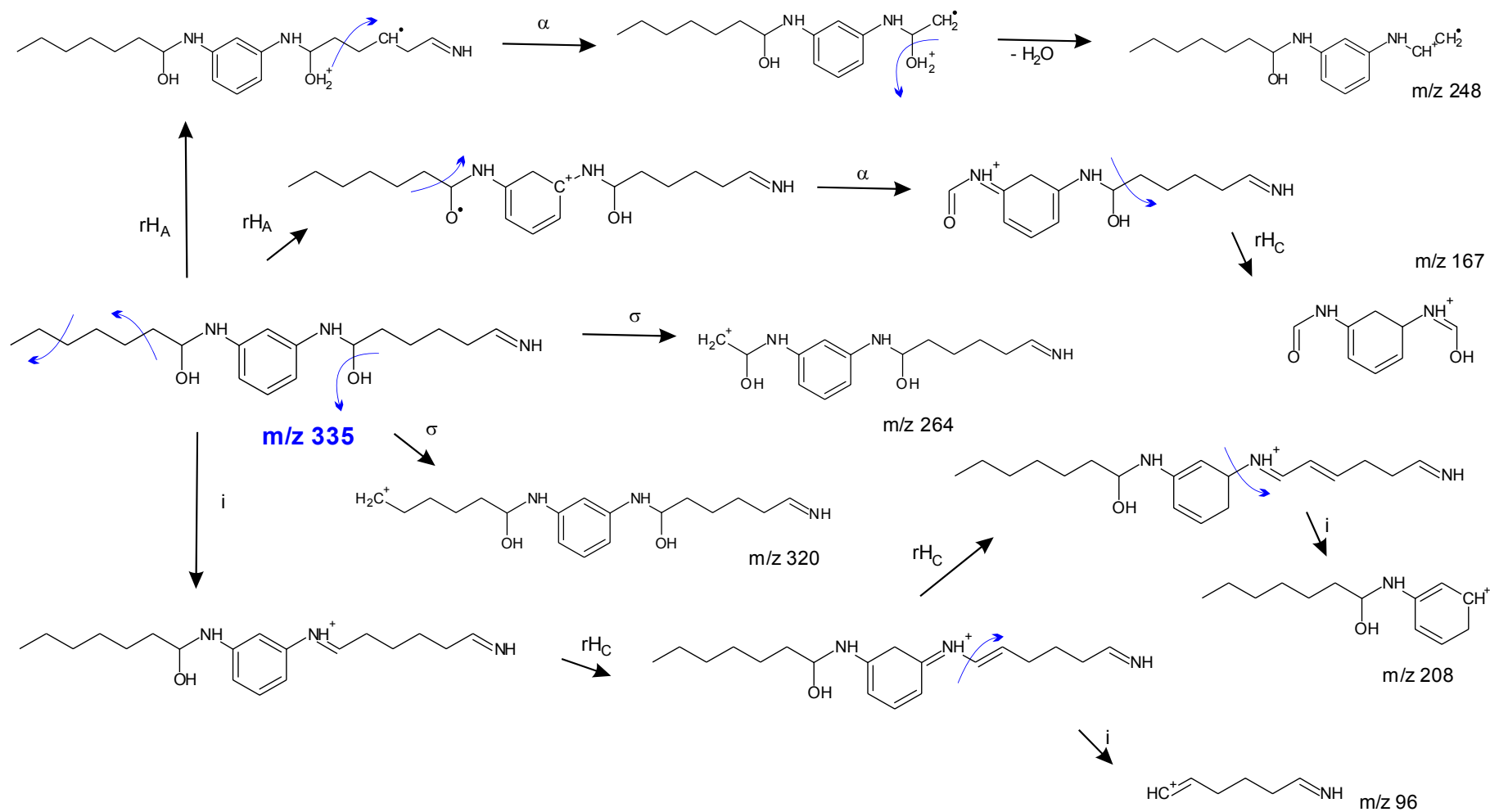
Z toho lze usoudit, že sloučenina má lichý počet dusíků. Protože čistě aromatické sloučeniny mají molekulový pík o nejvyšší intenzitě ve spektru (též základní pík) a naopak alifatické uhlovodíky s nasyceným řetězcem molekulový pík nemají, nebo jen malé intenzity, lze se domnívat, že sloučenina bude obsahovat oba zmíněné komponenty. Přítomnost alkylového řetězce indikují rovněž píky m/z 41 a m/z 57. Patrné je rovněž odštěpení methylového radikálu z molekulového píku. Ve struktuře sloučeniny bude pravděpodobně zakomponovaný i kyslík (pík o m/z 248 vzniká odštěpením OH skupiny).

Při interpretaci bylo shledáno, že je více sloučenin, které by splňovaly tyto podmínky, a které by se zároveň mohly fragmentovat na většinu ve spektru viditelných fragmentů. Při návrhu struktury byly tedy upřednostňovány fragmenty specifické, které jsou méně obvyklé a sloučeniny na ně bylo obtížnější štěpit – především m/z 96, m/z 167 a m/z 208.

Strukturní vzorec na obrázku 35 je možné fragmentovat na všechny fragmenty uvedené ve spektru. Zároveň ani spektrum této sloučeniny není obsaženo v databázi NIST 05. Nelze ale s jistotou říci, že skutečně sloučenina uvedená na obrázku je hledaným degradačním produktem. Bylo shledáno, že pouhá interpretace hmotnostního spektra je pro objasnění struktury neznámé látky nedostačující.



Obrázek 35: Hmotnostní spektrum sloučeniny č. 2 (analýza GC/EI-Q MS) a návrh struktury neznámé látky, která se štěpí na ve spektru uvedené fragmenty



Obrázek 36: Návrh fragmentačního mechanismu sloučeniny o m/z 335, znázorněny jsou pouze vybrané méně obvyklé fragmenty a fragmenty o nejvyšší intenzitě pík v hmotnostním spektru.

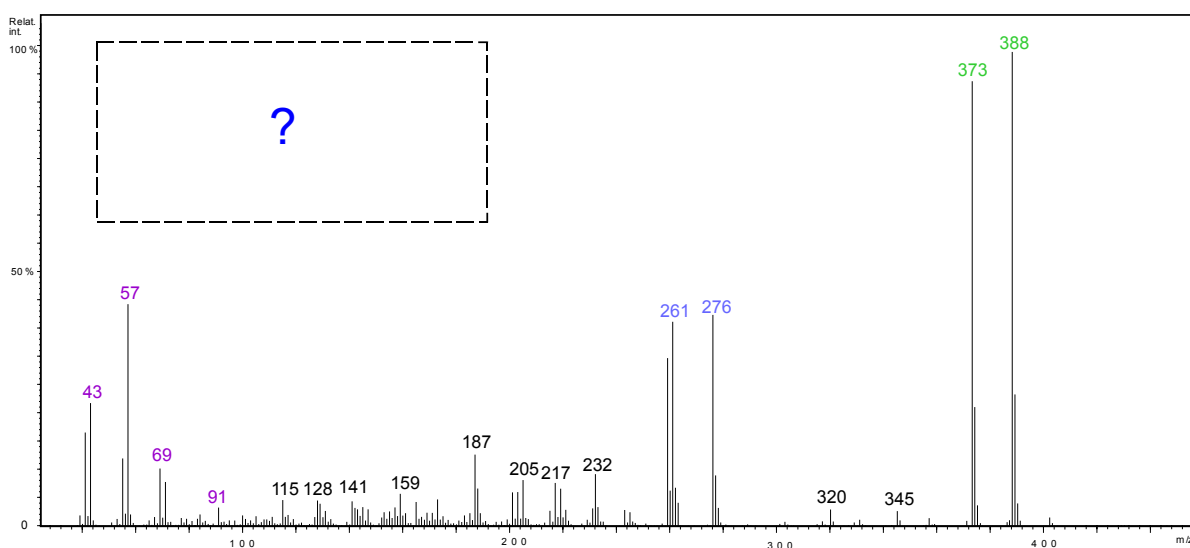
Skupina sloučenin č. 3

Porovnání spekter s databází NIST 05 bylo rovněž neúspěšné u skupiny sloučenin s t_R 23,4 – 34,3 min. Důvodem by mohla být skutečnost, že se jedná o směsná spektra v důsledku koelucí, případně nepřítomnost spektra podobné sloučeniny v databázi NIST05.

Všechny píky sloučenin této skupiny měly stejná spektra (obrázek 37). Vyextrahováním dominantních m/z v EIC chromatogramech byly nalezeny jisté nesrovnalosti. Například EIC chromatogram m/z 388 se lišil od EIC chromatogramu m/z 276. Rozdíl byl ovšem nalezen pouze v distribuci dominantních m/z (píky pod 10 % intenzity základního píku nebyly takto hodnoceny). Pozorováno bylo, že hlavní fragmenty všech píků na chromatogramech byly m/z 388 a m/z 373 o stejné intenzitě, zatímco fragmenty o m/z 276 a m/z 261 v různých chromatografických pících byly různých intenzit. V nízkých retenčních časech měly tyto odezvu vyšší, než v retenčních časech vyšších.

Vysvětlení jsou možná dvě:

- Degradančními produkty jsou izomery s molekulovým píkem m/z 388, které mají spektrum uvedené na obrázku, přičemž distribuce fragmentů o m/z 276 a m/z 261 se v těchto sloučeninách liší.
- Nebo dochází ke koeluci sloučenin dvou skupin izomerů; první, která má molekulový pík o m/z 388 a fragment 373 a druhé, v níž izomery mají molekulový pík o m/z 276 a další pík o m/z 261, přičemž je nápadná shoda retenčních časů sloučenin obou skupin izomerů.



Obrázek 37: Hmotnostní spektrum sloučenin č. 3; (analýza GC/EI-Q MS)

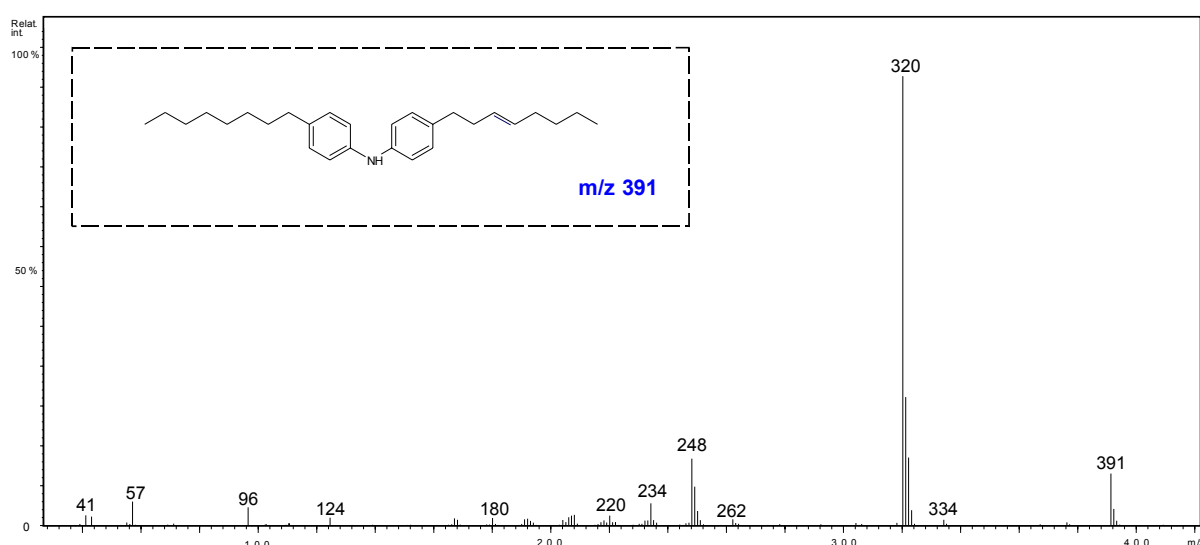
V databázi NIST05 nebyla nalezena sloučenina, která by měla spektrum alespoň z části podobné spektrům sloučenin experimentálních. Strukturu se na základě interpretace hmotnostních spekter zcela objasnit nezdařilo. Opět jako v prvním případě lze navrhnout více sloučenin, které by se mohly fragmentovat na fragmenty uvedené ve spektru.

Z naměřených spekter lze usoudit, že degradační produkty mají aromatický charakter (základní pík je pravděpodobně i molekulový pík + přítomnost m/z 91 ve spektru sloučenin) a rovněž mají minimálně alespoň jeden 5 uhlíkatý řetězec (indikace píky 43, 57, 69).

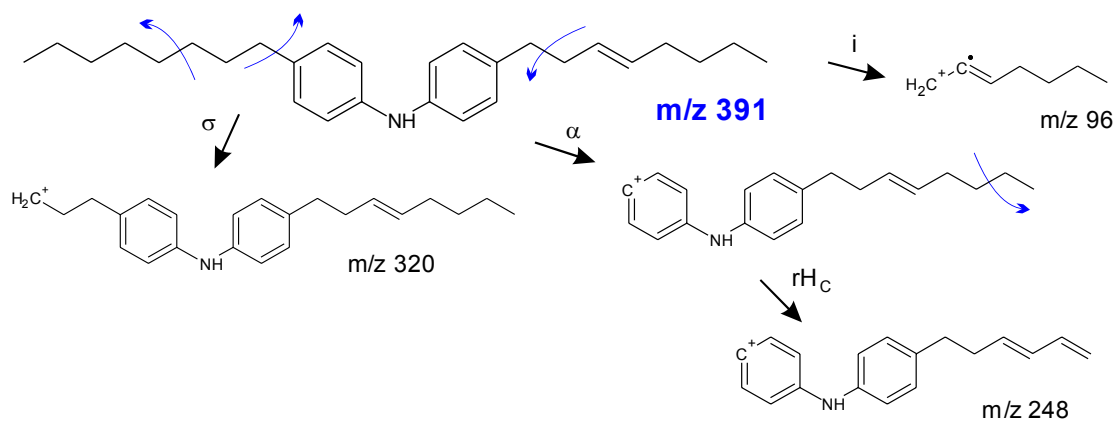
Sloučeniny č. 4

Posledními fotodegradačními produkty polyurethanových pěn, které byly vyextrahovány n-hexanem z exponovaných vzorků, jsou sloučeniny s retenčními časy $t_R = 26,2$ min a $27,2$ min. Tyto sloučeniny mají totožná spektra (obrázek 38). Ta rovněž nejsou v databázi spekter NIST 05 publikována.

Píky v retenčních časech $t_R = 26,2$ min a $27,2$ min se objevují i v chromatogramech neexponovaných polyurethanových pěn. Spektra se ovšem mírně liší. Zatímco u exponovaných PU pěn je základní pík m/z 320 a dva nejvyšší m/z 248 a m/z 391, který je pravděpodobně i molekulovým píkem, u neexponovaných PU pěn je základní pík m/z 322 a dva nejvyšší o m/z 250 a m/z 393 (molekulový pík). Spektrum sloučenin vyextrahovaných z neexponované PU pěny lze pomocí databáze NIST 05 identifikovat. Jedná se o 4-oktyl-N-(4-oktylfenyl)-benzenamin. Degradálními produkty jsou tedy pravděpodobně dva jednou dehydrogenované 4-oktyl-N-(4-oktylfenyl)-benzenaminy. Polohu dvojné vazby nelze určit.



Obrázek 38: Hmotnostní spektrum sloučenin č. 4; (analýza GC/EI-Q MS)



Obrázek 39: Návrh fragmentačního mechanismu sloučeniny o m/z 391

Chromatogramům dominuje skupina sloučenin s retenčními časy 19,2 min až 21,7 min. Jedná se o dvě skupiny izomerů, které mají podobné spektrum, lišící se pouze jednou methylovou skupinou s molekulovými píky m/z 390 a m/z 404. Tyto sloučeniny nejsou fotodegradními produkty testovaných polyurethanových pěn. Byly vyextrahovány i ze vzorků neexponovaných PU pěn. Identifikace těchto sloučenin pomocí databáze NIST 05 byla rovněž neúspěšná, a to i u sloučenin, které se vzájemně nepřekrývaly.

Základním píkem ve spektrech těchto sloučenin je molekulový pík. Druhým nejvyšším je pak pík fragmentu o methylovou skupinu menší. To se shoduje se skupinou degradačních produktů č. 3, které rovněž nebylo možné pomocí databáze spekter NIST 05 identifikovat. Shoda byla shledána i v přítomnosti alkylových řetězců, které jsou ve spektru viditelné. Stejně tak i charakter spekter byl velmi podobný. Na základě těchto skutečností lze usuzovat, že degradační produkty skupiny 3 by mohly být strukturně příbuzné izomerům, jejichž píky dominují v chromatogramech. Je i možné, že izomery skupiny 3 vznikají fotodegradací těchto izomerů. Tyto závěry jsou ovšem spekulativní a nejsou nijak vědecky podloženy.

5.2.2 Fotodegradační produkty flexibilních PU pěn – mikroextrakce tuhou fází

5.2.2.1 Optimalizace podmínek stanovení

Pro stanovení volatilních degradačních produktů byla zvolena metoda mikroextrakce tuhou fází s následnou GCxGC/EI-TOF MS analýzou.

Optimalizace postupu stanovení byla zahájena volbou vhodného SPME vlákna.

Testována byla SPME vlákna s následujícími sběrnými fázemi:

- polydimethylsiloxan (PDMS) s tloušťkou filmu 100, 30 a 7 μm ;
- polydimethylsiloxan/divinylbenzen (PDMS/DVB) s tloušťkou filmu 65 μm
- polyakrylát (PA) s tloušťkou filmu 85 μm ;
- carboxenTM/polydimethylsiloxan (CAR/PDMS) s tloušťkou filmu 75 μm
- carbowax[®]/divinylbenzen (CW/DBV) s tloušťkou filmu 65 μm
- StableFlex divinylbenzen/carboxenTM/polydimethylsiloxan (DVB/CAR/PDMS) o tloušťce filmu 50/30 μm

Jako testovací vzorek byla použita pěna s 1 % acetylovaného bramborového škrobu (AS) jako přidaným bio-plnidlem. PU pěny byly vždy po dobu 1 hodiny exponovány monochromatickým UV zářením o vlnové délce 254 nm. Fotodegradační produkty byly sorbovány na výše popsaná vlákna. Jejich desorpce a současná analýza byla provedena na GCxGC/EI-TOF MS. Obdobně jako u extrakce rozpouštědlem byly hodnoceny kvalitativní i kvantitativní rozdíly mezi fotodegradačními produkty.

Fotodegradační produkty polyurethanových pěn byly sorbovány na všechny typy PDMS vláken. Z výsledných chromatogramů bylo patrné, že typ filmu měl vliv na kvalitativní i kvantitativní zastoupení fotodegradačních produktů. Na vláknech s různými stacionárními fázemi byly sorbovány různé degradační produkty.

Nejméně vhodným k mikroextrakci degradačních produktů bylo shledáno vlákno s polydimethylsiloxanem s tloušťkou filmu 7 μm . Na vláknech byly nasorbovány viditelně stejné degradační produkty jako na PDMS filmu o tloušťce 100 μm , ovšem ne všechny a v menším kvantitativním zastoupení. Malá tloušťka filmu bude pravděpodobně důvodem, že některé degradační produkty na vláknech nebyly zachyceny v detekovatelném množství.

Polydimethylsiloxanový film o tloušťce 30 μm se již kvantitativně i kvalitativně vyrovnal filmu 100 μm .

Od ostatních se odlišoval chromatogram sloučenin sorbovaných na StableFlex divinylbenzen/carboxenTM/polydimethylsiloxanové vlákno. Na něj byly prioritně sorbovány těžavější degradační produkty. Píky těchto sloučenin značně kvantitativně převyšovaly píky sloučenin méně těžavých, které v chromatogramu téměř chyběly.

Velká podobnost jak kvalitativní, tak kvantitativní byla nalezena mezi degradačními produkty sorbovanými na vlákna s filmem carbowax[®]/divinylbenzen a polyakrylátovým.

Pro finální analýzy bylo vybráno polydimethylsiloxanové vlákno o tloušťce filmu 30 μm a polyakrylátové s tloušťkou filmu 85 μm , jejichž kombinací bylo možné stanovit největší množství fotodegradačních produktů.

Pro nalezení optimální doby expozice vzorků byla PU pěna exponována UV zářením po dobu 1 a 3 hodin. Na vlákna sorbované degradační produkty byly stanovovány GCxGC/EI-TOF MS. Opět byly hodnoceny především kvalitativní rozdíly. Protože ty se výrazně nelišily, rozdíl mezi vzorky byl především v distribučním zastoupení degradačních produktů, byly nadále všechny vzorky exponovány po dobu kratší – 1 hodiny.

Popisy provedení fotodegradačních experimentů jsou uvedeny v experimentální části v kapitole 4.5.1.3 a podmínky stanovení v kapitole 4.7.2

5.2.2.2 Identifikace fotodegradačních produktů

Z každého SPME vlákna bylo desorbováno přibližně 120 sloučenin, vzniklých při fotodegradaci kterékoliv z testovaných polyurethanových pěn. Z těchto bylo pro každý druh polyurethanové pěny a pro každé SPME vlákno vybráno 20 fotodegradačních produktů, které tvořily v chromatogramech píky s největší odezvou na detektoru, a pouze ty byly dále hodnoceny. Tímto způsobem bylo získáno 80 různých neznámých sloučenin. Sledována byla jejich přítomnost ve všech vzorcích a rovněž byly tyto sloučeniny identifikovány.

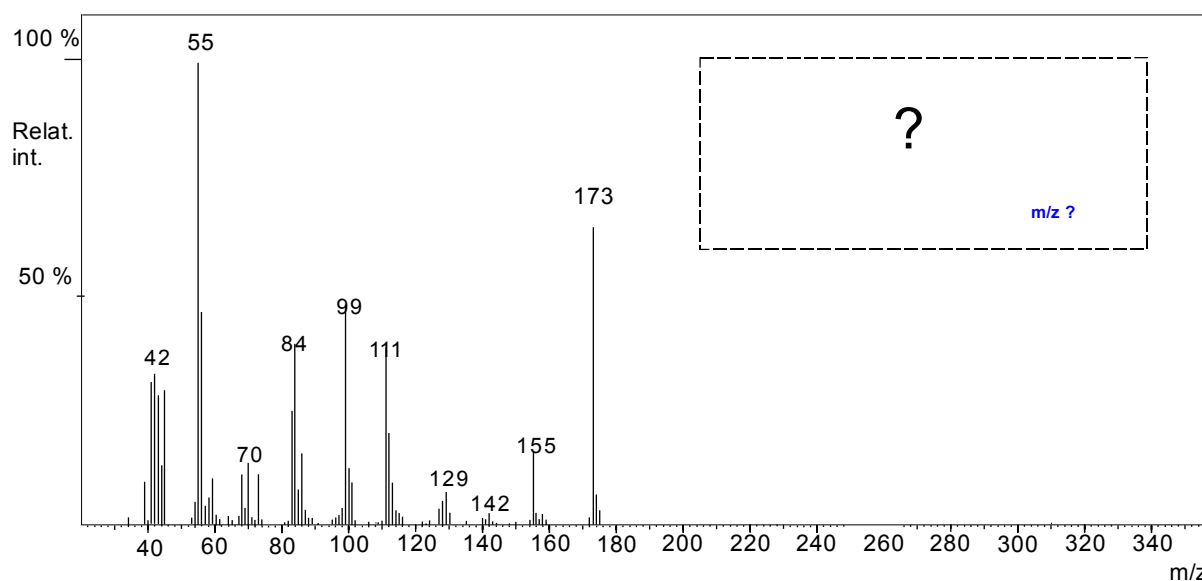
V tomto bodě je třeba zdůraznit, že i přes to, že tyto hodnocené sloučeniny měly největší odezvu na detektoru, nemusí být sloučeninami s největším množstevním zastoupením ve vzorku. Odezva detektoru pro každou látku je jiná. Proto v textu není používán termín množství, ale plocha píku.

Pro identifikaci byl použit vyhodnocovací software ChromaTOF firmy LECO Instrumente a jeho funkce automatického porovnávání experimentálních spekter po dekonvoluci se spektry v databázi NIST05. Shoda všech programem vybraných experimentálních spekter se spektry knihovními, až na jednu výjimku, byla vždy nad 80 %, což je dobrá shoda.

Funkce automatického porovnávání spekter s knihovou je pouze pomůckou nápomocnou k identifikaci látek. Proto byla provedena i vizuální kontrola shody programem vybraných experimentálních a knihovních spekter, při níž bylo zohledněno i chromatografické chování sloučenin.

Výše uvedeným způsobem nebylo možné identifikovat pouze jeden degradační produkt, jehož spektrum je uvedeno na obrázku 40. Rovněž snaha o určení alespoň přibližné struktury této sloučeniny byla neúspěšná.

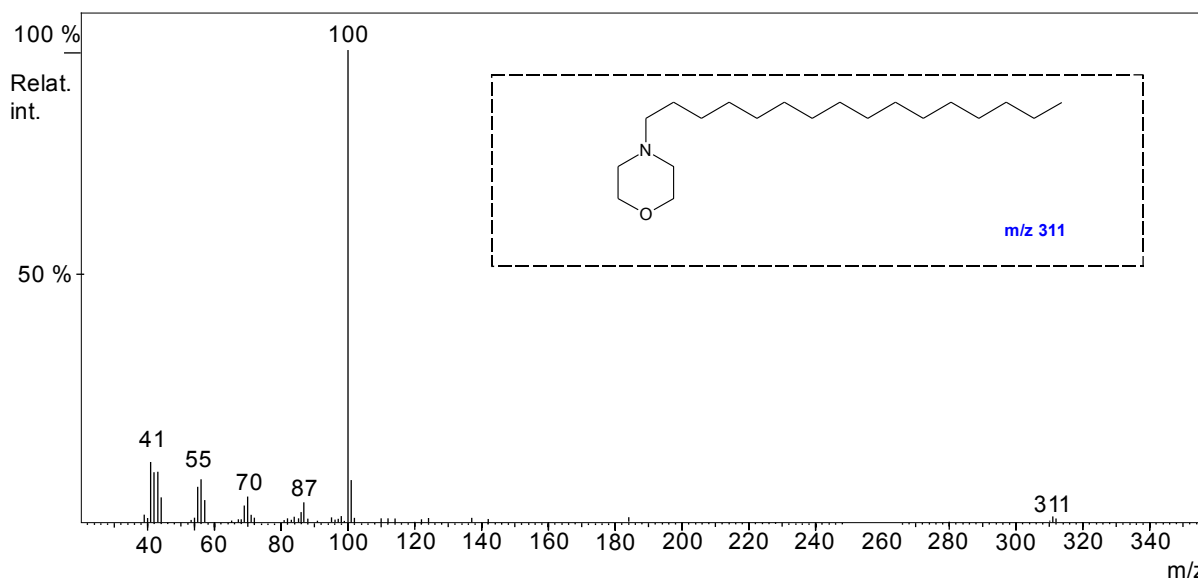
Radikálovým mechanismem, který je při expozici materiálu nejčastější, může vzniknout velké množství sloučenin strukturně velmi rozmanitých. Není rovněž vyloučen vznik unikátních, případně i neznámých látek. Jednou z nich by mohl být právě fotodegradační produkt s níže uvedeným spektrem.



Obrázek 40: Hmotnostní spektrum sloučenin s $t_R = 1198$ s, 1,440 s; (analýza GCxGC/EI-TOF MS)

O to zajímavější tato sloučenina je, že byla detekována ve všech vzorcích, zachycena na obou vláknech a patřila do skupiny 20 vybraných sloučenin s největší odezvou na detektoru u všech testovaných materiálů. Tuto podmínku splnily pouze tři ze všech 80 detekovaných sloučenin.

Nesrovnalost mezi spektry experimentálními a knihovními byla nalezena u sloučenin s t_R 1318 s; 1.120 s a 1438 s; 1.140 s. Tyto sloučeniny měly téměř totožná spektra lišící se pouze molekulovým píkem, který byl u první sloučeniny m/z 255 a u druhé m/z 311 (obr. 41). Nejvíce podobnou sloučeninou v databázi NIST05 je 4-oktadecylmorfolin (shoda nad 80 %). Na základě podobnosti experimentálních spekter z publikovaného spektra a s ohledem na molekulovou hmotnost, jež je v obou případech patrná z molekulových píků, byly tyto fotodegradační produkty identifikovány jako 4-undecylmorfolin a 4-hexadecylmorfolin.



Obrázek 41: Hmotnostní spektrum sloučenin s t_R 1438 s; 1.140 s; (analýza GCxGC-EI/TOF MS)

Další sloučeniny bylo možné pomocí databáze NIST05 identifikovat. Jejich seznam a zastoupení ve všech vzorcích PU pěn sumarizuje příloha 1 – 3.

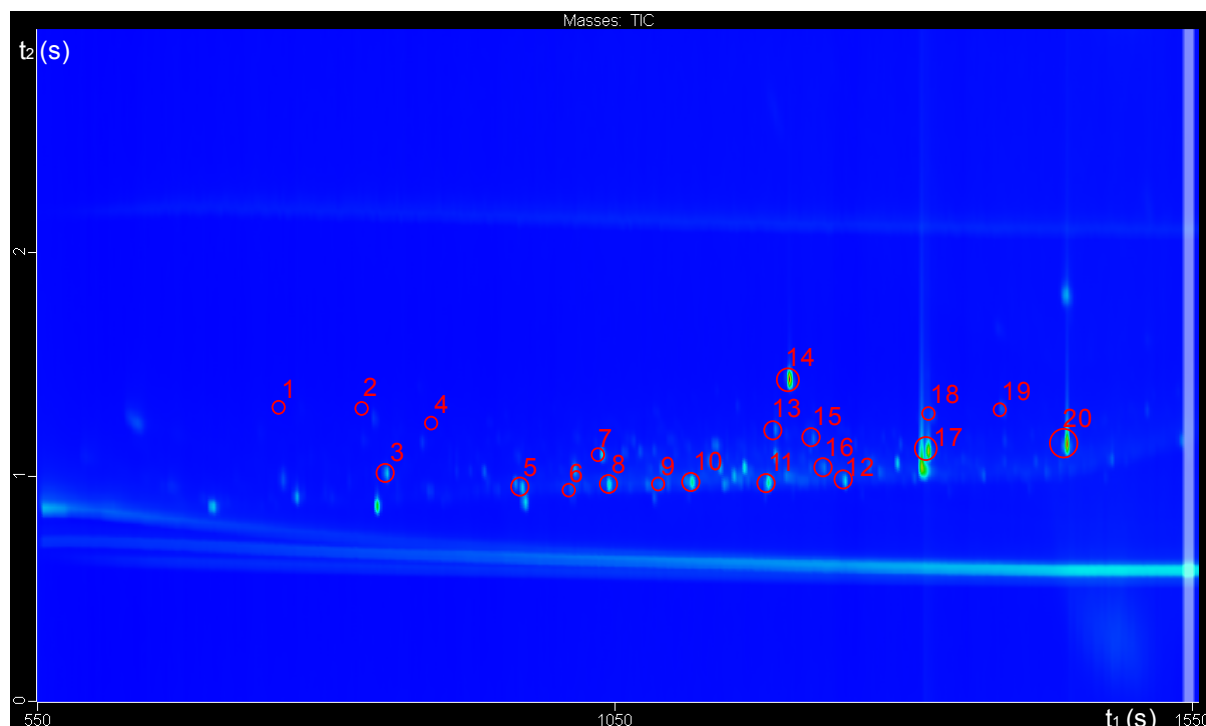
V příloze 1 jsou uvedeny fotodegradační produkty, které byly sorbovány na obě vlákna, na polyakrylátové i polydimethylsiloxanové. Příloha 2 a 3 sumarizuje sloučeniny, které byly zachyceny pouze na jedno z použitých vláken, buďto na PDMS nebo na PA vlákno.

Fotodegradační produkty jsou zde řazeny dle výskytu v testovaných vzorcích od sloučenin ve všech vzorcích přítomné po detekované pouze v jednom vzorku.

Symbol „+“ značí přítomnost sloučeniny mezi degradačními produkty ve sloupci popisované PU pěny. Rozlišováno je, zda se jedná o fotodegradační produkt, který patří mezi 20 sloučenin, které tvořily v chromatogramu píky s největší plochou (+), či tvořily píky menší plochy (+).

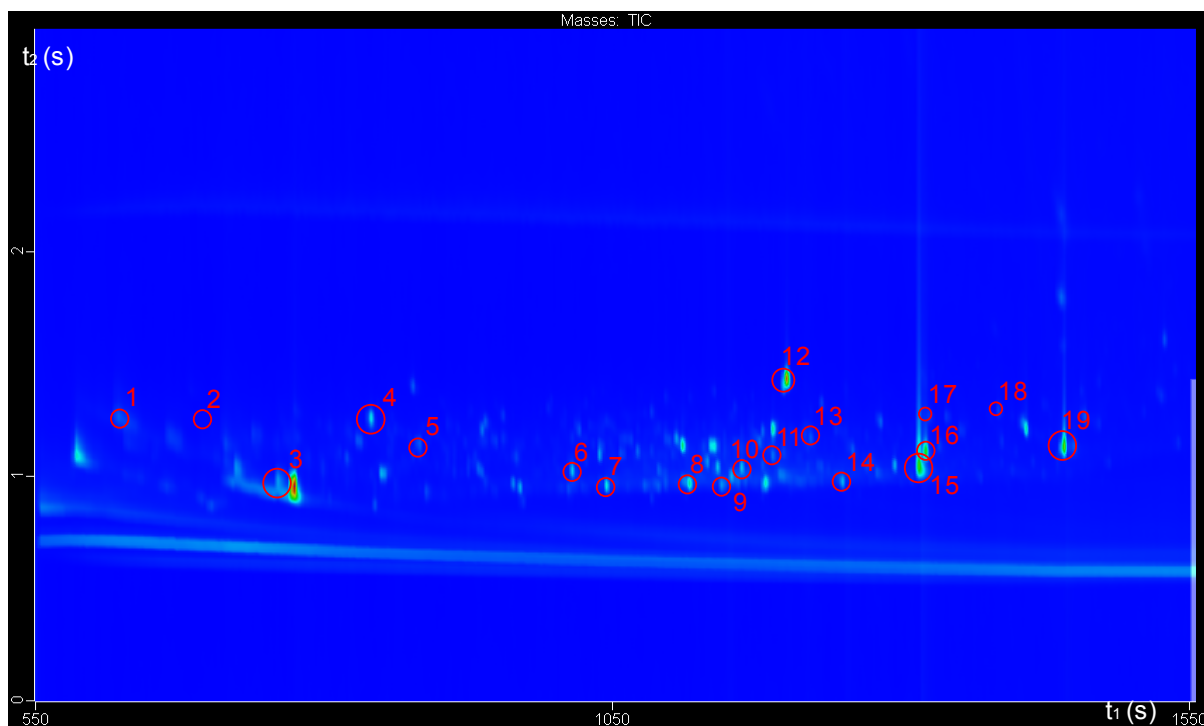
Kromě retenčních časů, ve kterých byly sloučeniny identifikovány, je v tabulkách uvedeno i CAS číslo. Toto číslo je zde dáno z důvodu konkrétní identifikace sloučenin pro nejednotnost názvosloví organických sloučenin.

Chromatogramy fotodegradačních produktů vzniklých expozicí CA PU pěny, desorbovaných z PDMS i PA vlákna, jsou znázorněny na obrázcích 42 (PDMS) a 43 (PA). Zakroužkovány jsou sloučeniny, které byly detekovány ve všech testovaných materiálech, bez ohledu na přidání bio-plnidlo i v PU pění referenční.



Obrázek 42: Chromatogram fotodegradačních produktů CA PU pěny sorbovaných na PDMS vlákno (analýza GC/EI-Q MS); označeny jsou fotodegradační produkty, které se uvolňovaly při expozici všech polyurethanových pěn bez rozdílu přidaného plnidla.

Jimi jsou: 1-methylpyrolidin-2-on, 2: naftalen, 3: dekanal, 4: 2-methyl-1,3-dioxan, 5: tetradekan, 6: 2,6,-dimethyltetradekan 7: dihydro-5-pentylfuran- 2(3H)-on, 8: hexadekan, 9: 2,6-dimethylpentadekan, 10: heptadekan, 11: 2,6,10-trimethylpentadekan, 12: 2,6,10,14-tetramethylhexadekan, 13: tricyklopentadeka-3,7-dien, 14: neznámá sloučenina, 15: 2-ethylhexylester benzoové kyseliny, 16: 2,6-diisopropylnaftalen, 17: 4-undecylmorfolin 18: diizopropylftalát, 19: dibutylftalát, 20: 4-hexadecylmorfolin



Obrázek 43: Chromatogram fotodegradačních produktů CA PU pěny sorbovaných na PA vlákno (analýza GC/EI-Q MS); označeny jsou fotodegradační produkty, které se uvolňovaly při expozici všech polyurethanových pěn bez rozdílu přidaného plnidla.

Jimi jsou: 1: butyrolakton, 2: acetofenon, 3: 1-methylpyrolidin-2-on, 4: naftalen, 5: 2-methyl-1,3-dioxan, 6: dodekanal, 7: hexadekan, 8: heptadekan, 9: 2, 6, 10-trimethylpentadekan, 10: tetradekanal, 11: 6-undecylamin, 12: neznámá sloučenina, 13: 2-ethylhexylester benzoové kyseliny, 14: 2,6,10,14-tetramethylhexadekan, 15: N,N-dimethyl-1-pentadekanamin, 16: 4-undecylmorfolin, 17: diizopropylftalát, 18: dibutylftalát, 19: 4-hexadecylmorfolin

6 SHRNU TÍ A ZÁVĚR

Cílem první části dizertační práce bylo stanovení hydrolyzních a fotodegradačních produktů polyurethanových pěn s přidaným biodegradovatelným plnidlem a posouzení vlivu tohoto přidaného bio-plnidla na degradaci vzniklé produkty.

Hydrolyzní degradační produkty byly stanovovány kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií, jejich struktura byla zkoumána tandemovou hmotnostní spektrometrií. V obou případech byl k analýzám použit hmotnostním spektrometr s ionizací elektrosprejem a analyzátozem sférickou iontovou pastí.

Detekce iontů probíhala v pozitivním i negativním modu.

Většina závěrů byla provedena z dat získaných analýzami v pozitivnímu modu. Obzvláště MS^n fragmentace v pozitivním modu byla užitečným zdrojem informací o struktuře degradačních produktů. Negativní ionizace mnoho nových poznatků nepřinesla. Důvodem je patrně struktura hydrolyzních degradačních produktů. Hydrolyzou polyurethanových pěn vznikly sloučeniny, které mají ve své struktuře místa, kde může dojít k protonizaci molekul na kationy, avšak podstatně méně kyselých funkčních skupin.

S výjimkou tří sloučenin tvoří degradační produkty polyurethanových pěn homologické řady. V rámci nich se sloučeniny liší 1-methyletyletherovým merem. Tento mer je základní stavební jednotkou polyetherové části hydrolyzovaného polyurethanu.

Nalezeny byly tři homologické řady. Ve dvou z nich tvořily degradační produkty vždy dva izomery.

První homologická řada byla tvořena sloučeninami, které vznikly štěpením urethanové a etherové vazby polyurethanu.

Homologické řady se dvěma izomery byly tvořeny sloučeninami podobné struktury, mírně odlišné od struktur sloučenin první homologické řady. V nich byla zachována struktura polyurethanu – na toulylové jádro byl přes urethanovou vazbu navázán řetězec 1-methyletyletherových merů.

Ani přibližnou strukturu se nepodařilo určit u sloučenin o m/z 679 a m/z 453 $[M+H]^+$. Tyto sloučeniny měly v hmotnostních spektrech hydrolyzátů píky nejvyšších intenzit a byly rovněž jako jediné viditelné v TIC chromatogramech. Rovněž tyto sloučeniny jako jediné tvořily jak protonované, tak sodné addukty. Strukturální příbuznost těchto dvou degradačních produktů

potvrdily MSⁿ analýzy, podobností některých fragmentů. Jedná se patrně o sloučeniny, které mají strukturně totožný základ. Liší se řetězcem o $m = 226$, o který je sloučenina o m/z 679 oproti m/z 453 delší.

Extrakcí m/z 679 v EIC chromatogramech bylo odhaleno, že hydrolyzáty obsahují tři sloučeniny tohoto m/z . Fragmentací příslušného m/z v MS² bylo tedy získáno spektrum tří izomerů. Další dva izomery patří do skupiny sloučenin, které tvoří homologickou řadu, jejichž struktura již byla objasněna a jsou tedy i známy fragmenty této sloučeniny. Protože ale tyto fragmenty jsou totožné se všemi, které jsou v MS² spektru, nelze tedy určit, které fragmenty patří sloučenině, která je třetím, strukturně neznámým izomerem.

Dvě neznámé sloučeniny o molekulových hmotnostech $678 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $452 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ byly detekovány i v negativním modu. Kromě nich obsahovala spektra všech výluhů rovněž další čtyři píky, které taktéž tvořily páry o molekulových hmotnostech s rozdílem $\Delta m = 226$. Protože MSⁿ analýzy v negativním modu neposkytly žádné informace o struktuře těchto látek, jejich identita zůstala neznámá.

Jedinou sloučeninou, která nebyla součástí žádné homologické řady a jejíž strukturu bylo možné na základě MSⁿ spekter stanovit, byl triethylendiamin. Ten pravděpodobně není degradačním produktem polyurethanové pěny. Jeho přítomnost v hydrolyzátech bude způsobena kontaminací testovaných polyurethanových pěn touto sloučeninou. Triethylendiamin byl použit při syntéze polyurethanové pěny jako katalyzátor.

Všechny degradační produkty vzniklé hydrolyzou polyurethanových pěn byly detekovány ve všech testovaných vzorcích včetně hydrolyzátu pěny referenční. Typ bioplnidla tedy neměl vliv na charakter degradačních produktů. Rozdíly byly shledány pouze v distribučním zastoupení hydrolyzních degradačních produktů.

U polyurethanových pěn může docházet k hydrolyze i vlivem přírodního prostředí. Sloučeniny podobného charakteru, jako byly identifikovány v této dizertační práci, pak mohou penetrovat do vnějšího prostředí a ovlivňovat ho.

Pro zjištění ekotoxicity sloučenin stanovených v této dizertační práci byly hydrolyzáty podrobeny ekotoxikologickým testům. Výsledky jsou uvedeny v diplomové práci Jarmily Vránové [86].

Kromě hydrolyzy může v přírodním prostředí docházet i k fotodegradačním procesům. Identifikace fotodegradačních produktů polyurethanových pěn modifikovaných bio-plnidlem byla předmětem druhé části této kapitoly této dizertační práce.

Pro stanovení fotodegradačních produktů polyurethanových pěn extrahovaných z exponovaného materiálu n-hexanem byla použita plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií s elektronovou ionizací a analyzátozem typu kvadrupól.

Fotodegradační produkty sorbované metodou mikroextrakce tuhou fází byly stanovovány kompletní orthogonální plynovou chromatografií s hmotnostně-spektrometrickou detekcí s elektronovou ionizací a analyzátozem doby letu.

Identifikace sloučenin probíhala porovnáváním spekter experimentálních s knihovnou NIST05.

Pomocí n-hexanu byly extrahovány 4 fotodegradační produkty a jedna skupina fotodegradačních produktů. Pomocí databáze NIST 05 bylo možné identifikovat pouze bis(2-ethylhexyl)ester hexandiové kyseliny. Struktura dalších fotodegradačních produktů byla navržena podle hmotnostních spekter, podle fragmentů, na které se při elektronové ionizaci štěpily.

Skupinu degradačních produktů se nepodařilo identifikovat. Příčinou byla buďto koeluce chromatografických piků a nebo nepřítomnost hmotnostního spektra v databázi NIST05, které by bylo spektrům degradačních produktů podobné. Žádné ze softwarem nabízených spekter z databáze NIST 05 nebylo spektrům experimentálním ani zčásti podobné.

Obdobně jako u hydrolyzních degradačních produktů nebyly shledány rozdíly mezi fotodegradačními produkty polyurethanových pěn s různým bio-plnidlem. Rozdíl byl opět pouze v jejich kvantitativním zastoupení, ten však, na rozdíl od hydrolyzních produktů, nebyl nikterak významný.

Úspěšnější byla identifikace fotodegradačních produktů sorbovaných na SPME vlákna. S jedinou výjimkou se podařilo identifikovat všech 80 fotodegradačních produktů.

Fotodegradací polyurethanových pěn vzniklo velké množství strukturně velmi rozmanitých sloučenin.

Detekovány byly alifatické i aromatické uhlovodíky většinou derivované, alifatické degradační produkty byly cyklické i acyklické.

Kyslíkaté sloučeniny zastupovaly všechny možné typy derivátů alifatických uhlovodíků. Detekovány byly aldehydy, hydroxyalkany, sloučeniny s etherovou vazbou i keto- skupinou, karboxylová kyselina i estery karboxylové kyseliny. Mezi degradačními produkty rovněž nechyběly anhydridy organických kyselin. Cyklické kyslíkaté deriváty uhlovodíků byly reprezentovány substituovanými oxirany, furany, dioxany a dioxolany. Detekován byl i karyofylen oxid.

Fotodegradačními produkty s kyslíkem i dusíkem v heterocyklu byly morfoliny.

Dusíkaté deriváty alifatických uhlovodíků zastupovaly všechny tři typy aminů; primární, sekundární i terciální, detekovány byly rovněž cyklické substituované pyrrolidiny a hydrazid organické kyseliny.

Detekovány byly i lineární a větvené alkany a cyklický tricyklopentadeka-3,7-dien.

Z aromatických sloučenin byly detekovány naftalen a jeho alkylsubstituované deriváty, které mají ve své struktuře zakomponovaná dvě aromatická jádra.

Ostatní aromatické sloučeniny měly pouze jeden cyklus s delokalizovaným systémem π -elektronů. Rovněž byly přítomny jak kyslíkaté, tak dusíkaté deriváty těchto fotodegradačních produktů.

Z kyslíkatých aromatických sloučenin byla přítomna benzendikarboxylová kyselina a její estery, rovněž estery benzenkarboxylové kyseliny, sloučeniny s etherovou vazbou, keto-skupinou a aldehydem na bočním uhlovodíkovém řetězci příslušného alkyl-aromátu, v případě keto-skupiny i přímo na aromatickém cyklu.

Jak kyslík, tak dusík mají ve své struktuře zakomponované fotodegradační produkty hydrazid benzoové kyseliny, dihydroaminoindol-2-on a izokyanáty.

Z bezkyslíkatých dusíkatých aromatických sloučenin byl detekován pouze benzonitril.

Hojně byly ve vzorcích zastoupeny alkylbenzeny s různě rozvětvenými substituenty.

Velká strukturní rozmanitost těchto sloučenin je patrně výsledkem mnoha reakcí, ke kterým při expozici materiálu došlo. Již z teorie vyplývá, že při expozici polymeru může dojít k velkému množství typově odlišných reakcí; jsou jimi adice, eliminace, substituce, dochází k zániku vazeb a vzniku nových a nejsou vyloučeny ani konformační změny. Strukturálně značně odlišné degradační produkty identifikované v této dizertační práci tuto teorii potvrzují.

Polyurethanová pěna je svou strukturou velmi vhodným substrátem pro tvorbu strukturně odlišných sloučenin. Je zde přítomná urethanová vazba, jejíž součástí je i vazba esterová, v polyolové části řetězce se mnohokrát opakuje etherová vazba, urethanová vazba je navázána

na aromatickém cyklu a navíc polyetherová část obsahuje dlouhý uhlovodíkový řetězec. Právě „strukturní bohatost“ testovaného materiálu dává pravděpodobně za vznik značně strukturně rozmanitým sloučeninám, což je ještě umocněno tím, že polyurethanové pěny byly exponovány za přítomnosti vzduchu a mohlo tedy docházet i k fotooxidačním reakcím.

Kromě identifikace degradačních produktů bylo cílem dizertační práce také posouzení vlivu přidaného bioplnidla na výsledné fotodegradační produkty.

Detekováno bylo 26 fotodegradačních produktů uvolněných ze všech polyurethanových pěn bez ohledu na přidané bio-plnidlo včetně pěny referenční. Ostatní fotodegradační produkty minimálně jednou mezi degradačními produkty testovaných polyurethanových pěn chyběly. 13 fotodegradačních produktů vzniklo při ozařování pouze jedné ze všech testovaných polyurethanových pěn. Tyto produkty by se daly teoreticky považovat za „markery“ pro dané polyurethanové pěny. Konfrontace struktury těchto degradačních produktů s typem plnidla v příslušné polyurethanové toto nepotvrzuje ani nevyvrací. Například 2-ethoxybutan a 3-methoxybutan jsou fotodegradačními produkty polyurethanových pěn s přidavkem 2-hydroxyethyl celulózy a hydratované pšeničné bílkoviny. Strukturně jsou si tyto sloučeniny velmi podobné, navzdory tomu vznikají z polyurethanových pěn se strukturně odlišnými bioplnidly. N-butyldeka-4,9-dien-2-amin vzniká při fotodegradaci polyurethanové pěny s CA plnidlem. I u něj je obtížné najít spojitost s plnidlem, jímž je bezdusíkatý acetát celulózy. Expozice všech polyurethanových pěn byla provedena vždy dvakrát při sorpci na dvou typech vláken. Jedině několikrát opakované měření by mohlo potvrdit, že sloučeniny, které byly detekované pouze u jedné z testovaných polyurethanových pěn, jsou skutečně fotodegradačními produkty unikátními.

Obdobně jako produkty hydrolýzy mohou do životního prostředí penetrovat i sloučeniny vzniklé fotodegradací polyurethanových pěn.

Mezi sloučeninami, které byly stanoveny v této části dizertační práce, je hned několik, jejichž přítomnost v prostředí je značně nežádoucí. Jsou jimi například izomery toluendiizokyanátu, které jsou uvedeny na seznamu IARC jako skupina 2B (možné karcinogeny pro lidský organismus, jsou škodlivé pro vodní organismy, v nichž mohou vyvolat nepříznivé účinky), dále pro vodní organismy vysoce toxický benzofenon, dibuthylftalát nebo N,N-dimethyl-1-hexadekanamin. Vysokou schopnost bioakumulace má detekovaný tetradekan, který je rovněž neprokázaným karcinogenem.

Otazníkem jsou sloučeniny, které se nepodařilo identifikovat a není tak znám jejich vliv na životní prostředí. I mezi nimi se mohou nalézt závažné kontaminanty životního prostředí.

Tato dizertační práce tedy prokazuje, že vlivem degradace polymerních materiálů může docházet ke vzniku látek nebezpečných životnímu prostředí. Pakliže po skončení životnosti těchto materiálů nebudou kontrolovaně likvidovány, mohlo by dojít ke kontaminaci životního prostředí těmito nebezpečnými látkami.

Vliv přidaného bio-plnidla na charakter degradačních produktů nebyl pozorován. Důvodem může být i skutečnost, že bio-plnidlo bylo, pro zachování vlastností polymeru, do polyurethanových pěn přidáváno jen v malém hmotnostním poměru (max. 5 hm %).

Cílem této části dizertační práce bylo stanovení degradačních produktů polyurethanů pomocí hmotnostní spektrometrie. Za pomoci této techniky bylo stanoveno velké množství degradačních produktů. U nich byla i z větší části objasněna alespoň přibližná struktura.

Pro přesnou identifikaci degradačních produktů je nutné zařadit ještě alespoň jednu další analytickou techniku vhodnou pro strukturní analýzy, která by doplnila informace získané z analýz hmotnostní spektrometrií o další, které tato strukturní technika neposkytuje.

Téma B

**IZOPROSTANY – MARKERY OXIDATIVNÍHO STRESU
V TKÁNÍCH *ACTINIA EQUINA***

7 TEORETICKÁ ČÁST

7.1 Oxidativní stres

Oxidativní stres je definován jako narušení rovnováhy systému oxidant-antioxidant ve prospěch oxidantů, který způsobuje poškození [87-89]. Za oxidanty se považují reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), zvané též pro-oxidanty. Jsou běžně tvořeny jako produkty metabolismu organismu v důležitých biochemických procesech jako např. fagocytóza, ale jejich produkce může být iniciována i zvenčí (např. radiace, účinek toxických látek nebo farmaceutik, znečištění prostředí) [90].

Nadměrné množství oxidantů v organismu pak vede k poškození biologicky důležitých molekul jejich oxidací. Tedy, kromě pozitivních účinků, mohou mít také negativní vliv [90].

7.1.1 Reaktivní formy kyslíku

K reaktivním formám kyslíku (ROS) patří volné radikály (atomy, ionty, molekuly obsahující nespárovaný valenční elektron ve vnější vrstvě jejich elektronového obalu a schopné samostatné existence) a sloučeniny kyslíku, které nemají charakter radikálů, ale mohou z nich radikály vznikat [90, 91]. Jsou to např. superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál ($\bullet OH$), singletový kyslík (1O_2), peroxy- a alkoxy- radikál ($ROO\bullet$ a $RO\bullet$) a ozón (O_3).

7.1.1.1 Superoxid ($O_2^{\bullet-}$)

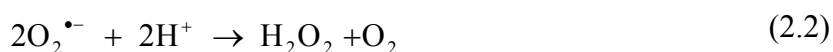
Superoxidový anionový radikál, též superoxid, vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku:



V porovnání s jinými radikály superoxydy vykazují nižší reaktivitu. Jejich toxicita se připisuje schopnosti tvorby jiných reaktivních metabolitů jako je H_2O_2 , $\bullet OH$ nebo singletový kyslík 1O_2 [90].

7.1.1.2 Peroxid vodíku (H_2O_2)

Každý přírodní systém, který produkuje superoxid, produkuje i peroxid vodíku dismutační reakcí:

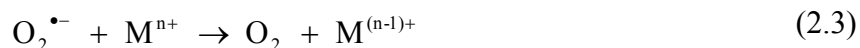


Dismutační reakci katalyzuje enzym superoxidodismutáza (SOD) nebo ionty přechodných prvků.

Produkce peroxidu, pravděpodobně ze superoxidu, je často pozorována v mitochondriích a mikrozomech *in vitro*. V buňkách se peroxid rovněž tvoří nezávisle na superoxidu některými neenzymatickými cestami. Vzniká při fyziologických procesech, jako je fotosyntéza nebo fagocytóza. Je přítomen i v mořské vodě. Může difundovat z místa vzniku na vzdálenější místo a může procházet buněčnou membránou [90]. Jeho toxicita spočívá hlavně v tvorbě vysoce reaktivních hydroxylových radikálů.

7.1.1.3 Hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$)

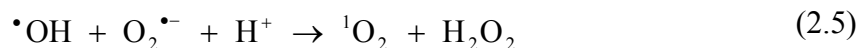
Hydroxylový radikál může vznikat homolytickým rozpadem peroxidu vodíku např. účinkem ionizujícího záření [90]. Další možností je redukce peroxidu tzv. Fentonovou reakcí (2.4) nebo reakce peroxidu se superoxidem, obě katalyzované přechodnými prvky [92, 93].



Rovnice 2.4 popisuje reakci Fentonovu; propojení reakcí 2.3 a 2.4 se nazývá Haber-Weissova reakce [92, 93].

7.1.1.4 Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$)

Singletový kyslík se může tvořit spontánní dismutací superoxidu [91] nebo pomocí modifikované Haber-Weissovy reakce [94] :



7.1.2 Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (RNS) jsou rovněž volné radikály a případně chemické entity, které volnými radikály nejsou. Patří k nim oxid dusnatý a dusičitý ($\text{NO}\bullet$ a $\text{NO}_2\bullet$), nitrosyl (NO^+), nitroxid, peroxonitrit a alkyperoxonitrit (NO , ONOO a ROONO) [90, 91].

7.1.2.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý má v molekule jeden nespárovaný elektron, což řadí tuto molekulu mezi volné radikály. Z jeho radikálové povahy vyplývá i jeho vysoká reaktivnost a krátká životnost.

Jde o hydrofobní molekulu, která překonává, stejně jako peroxid vodíku, hranice buněk bez potřeby kanálků nebo receptorů [95]. Shodně s ROS v přírodním systému se projevuje jak pozitivně – fyziologicky, tak negativně – toxicky.

V případě toxických vlivů je nejdůležitější reakcí rychlá NO^\bullet reakce s superoxidem za vzniku nitroperoxylového anionu (2.7) nebo konjugované kyseliny peroxydusité (2.8.). Oba tyto produkty jsou silné oxidanty schopné oxidačně a nitračně poškozovat biologicky důležité molekuly [90].



S kyslíkem pak NO^\bullet může reagovat za tvorby oxidu dusičitého NO_2^\bullet :



Toxické účinky ROS a RNS v organismech nelze oddělovat. Např. při reakci NO^\bullet se superoxidem se může tvořit protonovaná forma peroxyinitritového anionu, který se rychle rozkládá za tvorby vysoce toxického hydroxylového radikálu [96]:



V případě oxidativního stresu se mohou tvořit nejen radikály odvozené od kyslíku, ale i od dusíku [90]. Stejně tak antioxidanty mohou snižovat aktivitu NOS, a to nepřímo vychytáváním ROS. Např. askorbát, SOD a kataláza snižují aktivitu NOS v endotelových buňkách [97].

7.1.3 Produkce ROS v živých systémech

Účinek volných radikálů v biologických systémech, ať už pozitivní nebo negativní, závisí na přítomnosti kyslíku. Koloběh kyslíku je úzce spojen s procesem fotosyntézy, při níž dochází k uvolňování kyslíku z vody v zelených rostlinách, a s redukcí kyslíku v dýchacím řetězci v aerobních buňkách heterotrofních organismů [90, 91].

V těchto mechanismech je mnoho míst, kde kontrolované přeměny kyslíku se můžou za určitých podmínek stát nekontrolovatelnými, což může mít za následek tvorbu volných radikálů.

Pro potenciální reakci kyslíku s dalšími atomy nebo molekulami musí být O_2 aktivován. Jsou dvě možné cesty aktivace O_2 v biologických systémech: světlem nebo redukcí.

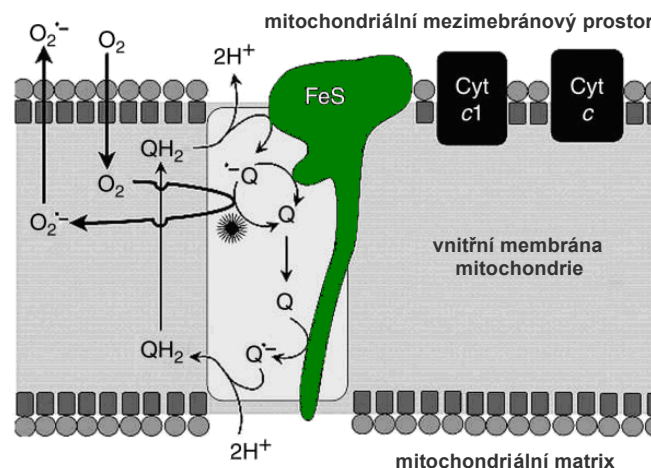
Fotodynamickou reakcí kyslíku vzniká buďto superoxid nebo singletový kyslík, které spouštějí celou řadu dalších reakcí, viz výše. U živočichů se tato iniciace uplatňuje především u buněk kůže a očí [90].

K redukci kyslíku může docházet v organismech vlivem mnoha enzymatických a neenzymatických reakcí, při nichž nejčastěji rovněž dochází primárně k tvorbě superoxidu. Některé z nich vyžadují exogenní iniciaci zvenčí; např. UV-záření, infekce, ochlazení nebo zahřívání, intoxikace [98, 99].

Ke tvorbě ROS dochází především v buněčných strukturách, a to v mitochondriích, endoplazmatickém retikulu, peroxizómech, cytoplazmatické membráně a u rostlin ve chloroplastech. Níže jsou jako příklad podrobněji popsány dvě vybrané organely.

7.1.3.1 Mitochondrie

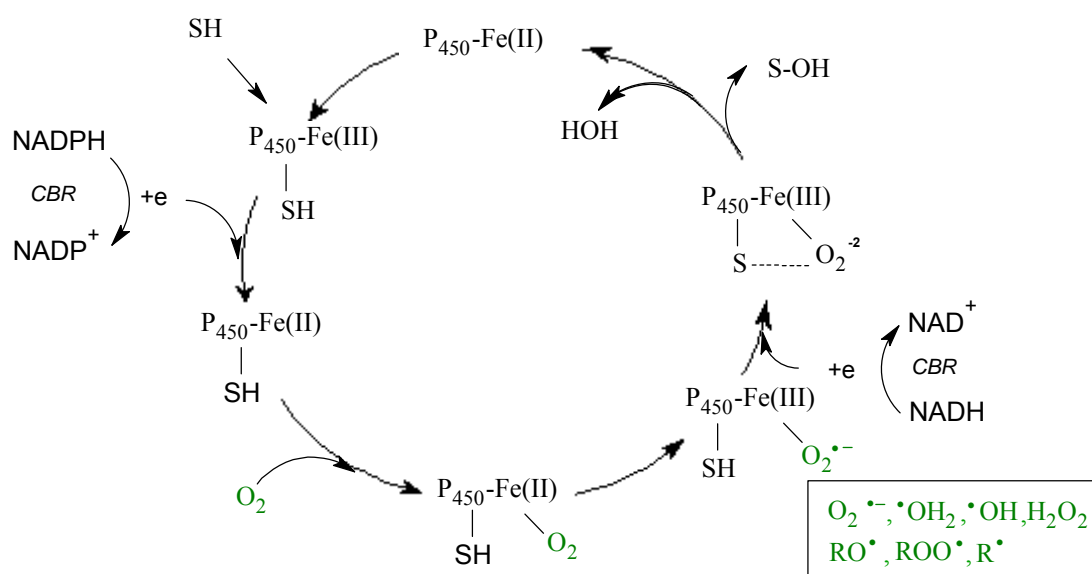
Dýchání mitochondrie bylo jako zdroj ROS poprvé popsáno Loschenem a kol. v roce 1971 [100]. Většina ROS je tvořena mitochondriálním dýcháním za normálních fyziologických podmínek u savců [101], protože 90 % jejich spotřeby kyslíku je redukováno na vodu právě v mitochondriích [102]. Jednoelektronová redukce kyslíku v mitochondriích je uskutečnitelná vlivem přítomných oxidoreduktáz [103]. Hlavními producenty superoxidu jsou komplexy I a III [104-108]. Za normálních okolností je zabezpečena funkční integrita mitochondriální membrány. Činidla, jako jsou xenobiotika, ionty kovů nebo UV záření, mohou porušit řetězec, který může vést k nárůstu koncentrace ROS v buňkách [102].



Obrázek 44: Tvorba superoxidu z kyslíku enzymatickou cestou pomocí Komplexu III [109]. Obrázek ukazuje cestu elektronu od ubichinolu (QH₂) k Rieske proteinu (zeleně) za vzniku ubisemichinonového intermediátu [110]

7.1.3.2 Endoplasmatické retikulum

V endoplasmatickém retikulu se nachází systém transportu elektronů aktivovaný hemovým proteinem P450 obsahujícím atom Fe^{3+} . Tento protein může být zvenčí indukován nějakým xenobiotikem, např. polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAH) [111]. V cyklu pak po následné redukci a oxidaci dojde k hydroxylaci tohoto xenobiotika. Zároveň dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku [112]. V průběhu hydroxylačních reakcí se může rozvinout peroxidace vlastních membránových lipidů [90].



Obrázek 45: Produkce superoxidu v endoplasmatickém retikulu [90]

7.1.4 Produkce RNS v biologických systémech

V organismu je oxid dusnatý syntetizován oxidací jednoho dusíku guanidinového zbytku aminokyseliny L-argininu působením enzymu NO syntázy (NOS).

Byly objeveny tři druhy NOS:

- neuronové NOS (nNOS) objevené v nervovém systému
- endoteliální NO syntázy (eNOS), které jsou vázané na plazmatickou membránu
- indukovatelné NOS (iNOS), které byly poprvé objeveny v makrofázích a následně v jaterních a srdečních buňkách [90, 91, 113].

7.1.5 Antioxidační obrana

K udržení integrity buněk a jejich fyziologických funkcí je potřebné udržet rovnováhu mezi oxidanty a antioxydanty. Antioxydanty jsou sloučeniny, které k rovnováze přispívají tak, že zpomalují nebo brání oxidaci substrátů. Organismy vyvinuly antioxidační obranu proti toxickým účinkům ROS, která zahrnuje [91]:

- *činitele, které katalyticky odstraňují volné radikály a jiné ROS/RNS*
např. enzymy superoxid dismutáza (SOD), kataláza, peroxidáza a molekuly obsahující thiolovou skupinu
- *proteiny, které snižují aktivitu oxidantů tím, že na sebe vážou ionty železa, mědi a hem*
např. transferin, haptoglobin, haemopexin, metalothionein
- *proteiny, které ochraňují biomolekuly proti poškození (i oxidativnímu) jinými mechanismy;*
např. proteiny teplotního šoku
- *nízkomolekulární vylučovače ROS/RNS;*
např. glutathion, α -tokoferol, askorbová kyselina, bilirubin a kyselina močová

Antioxydanty se nevyskytují v organismu „všechny a všude“. Jejich distribuce je rozdílná v intra- a extracelulárním prostředí [90].

7.1.6 Oxidativní poškození

V důsledku oxidativního stresu hodnoty ROS mohou významně narůst tak, že dojde i přes existenci antioxydativního systému k vážnému poškození buněčných struktur, a tím i ztrátě či změně jejich přirozených funkcí.

ROS mohou napadat:

- enzymy a proteiny, což může vést k přerušení normálních buněčných aktivit, jako je dýchání mitochondrií, enzymatické aktivity a buněčná komunikace [114, 115]
- lipidy, což vede ke změnám v prostupnosti buněčných membrán, změně v transportu iontů a k bránění metabolických procesů [116]
- DNA, což má za následek její dysfunkci, mutaci a může vést až k rakovinovému bujení [117, 118]

7.1.6.1 Peroxidace lipidů

Peroxidace lipidů je pravděpodobně nejvíce prozkoumaný proces poškození vlivem ROS [119]. Nejméně odolné k peroxidaci jsou membránové lipidy – fosfolipidy, protože obsahují velké množství polynenasycených mastných kyselin (PUFA). Peroxidace lipidů, mnohdy zvaná také jako autooxidace lipidů, je třífázový proces, zahrnující iniciaci, propagaci a terminaci.

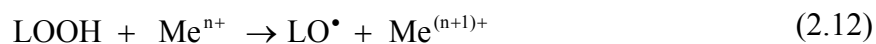
(i) Iniclace

Peroxidace začíná atakem ROS na molekuly lipidů s výsledkem odtržení atomu vodíku z methylenové skupiny ($-\text{CH}_2-$) za vzniku lipidového radikálu L^\bullet . Radikály jako $\bullet\text{OH}$, RO^\bullet , HO_2^\bullet , ROO^\bullet nebo oxo- či peroxy- komplexní sloučeniny železa [120] jsou schopny odtrhnout H z lipidů a zahájit tak proces peroxidace. Nasycené nebo nenasycené mastné kyseliny s jednou dvojnou vazbou jsou tomuto ataku mnohem odolnější než PUFA. Nejčastěji dochází k odtržení vodíku z methylenových skupin, které jsou umístěny mezi dvěma methinovými skupinami ($=\text{CH}-$) [121].

(ii) Propagace

Lipidové radikály extrémně rychle reagují v aerobním prostředí s kyslíkem za vzniku peroxyradikálů (LOO^\bullet). Ty jsou schopné dále odtrhnout atom vodíku z jiných molekul lipidů za vzniku lipidových hydroperoxidů se strukturou konjugovaných dienů. Iniclace nového řetězce oxidace se nazývá propagace. Lipidové radikály mohou opět reagovat s O_2 za tvorby jiných peroxidových radikálů, čímž se proces neustále opakuje [122].

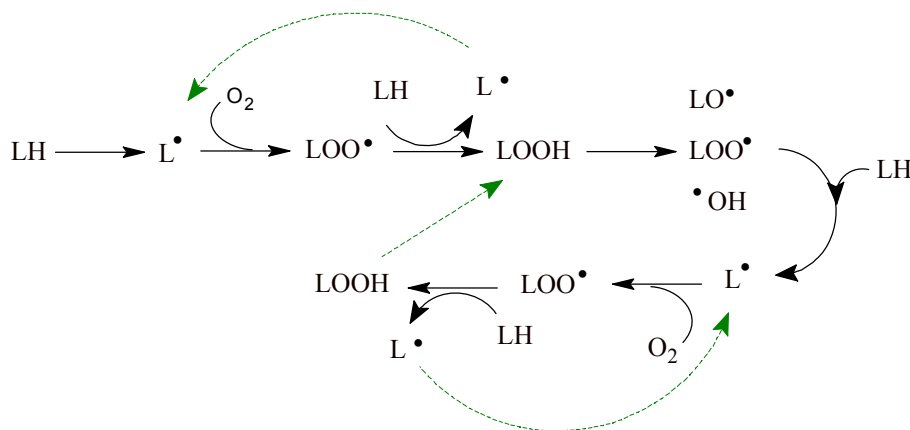
Hydroperoxidy jsou velmi nestálé a velmi rychle reagují s ionty přechodných prvků, hlavně Fe a Cu. Železnaté ionty reagují s hydroperoxidy velmi rychle za vzniku lipidových alkoxylových radikálů, železité pomaleji za vzniku lipoperoxylových radikálů [123].



(iii) Terminace

Lipidová peroxidace je ukončena reakcí mezi dvěma radikály, účinkem antioxidantů nebo vyčerpáním substrátu.

Výsledné produkty peroxidace lipidů závisí na typu oxidované mastné kyseliny, kovech a redukčních činidlech [90].



Obrázek 46: Peroxidace lipidů [90]

7.1.7 Markery oxidativního stresu

Biomarkery jsou definovány jako charakteristické sloučeniny, objektivně analyzovatelné a uznávané jako indikátory normálních biologických či patologických procesů nebo odpovědi na terapeutickou intervenci [124].

Volné radikály jsou velmi reaktivní. Nejreaktivnější radikál s nejkratším poločasem rozpadu (10^{-9} s na 1 mol.l^{-1} , $37 \text{ }^\circ\text{C}$) je hydroxylový radikál [90]. Díky krátkému poločasu rozpadu, vysoké reaktivitě a malé koncentraci v biologických systémech se volné radikály velmi těžko analyzují. Proto se pro hodnocení oxidativního stresu používají tzv. markery oxidativního stresu. Tyto indikátory jsou typické produkty vznikající při poškození biologicky důležitých molekul, např. oxidativním poškozením proteinů či DNA [125].

Nejvíce prostudované jsou biomarkery vzniklé peroxidací lipidů. Z této skupiny se pro hodnocení oxidativního stresu nejčastěji používají α,β -nenasycené reaktivní aldehydy, jako je malondialdehyd (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal, 2-propenal [126, 127] a izoprostany [128-132], o nichž bude pojednáno v samostatné kapitole.

Aldehydy jsou relativně stabilní sloučeniny, které se mohou rozptýlit uvnitř buněk nebo z nich dokonce uniknout a atakovat vzdálené cíle. Proto nejsou pouze konečnými produkty peroxidace lipidů, ale mohou také účinkovat jako „sekundární cytotoxické přenašeče“ pro primární reakce [133]. Některé z těchto aldehydů jsou schopny reagovat s množstvím dalších biomolekul, včetně proteinů, DNA a fosfolipidů za vzniku stabilních koncových produktů přispívajících k onemocněním [134].

Stanovení koncových produktů oxidativního poškození proteinů je mnohem složitější ve srovnání s identifikací produktů peroxidace, a to z důvodů jejich strukturní různorodosti.

Jako indikátory oxidativního stresu v lidském těle jsou používány redukováný glutathion (GSH) a glutathion disulfid (GSSH) [124].

Základním a zároveň i široce užívaným znakem proteinové oxidace jak *in vitro*, tak *in vivo*, je tvorba karbonylů [135]. Proteiny s karbonylovými skupinami mohou vznikat buďto přímo oxidací aminokyselin a α -amidací nebo nepřímo tvorbou aduktů s produkty lipidové peroxidace nebo glykosylací a rozvinutou glykosylací koncových produktů [136-138]. Pro svou chemickou stabilitu a stabilitu během uskladnění (10 let při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [138]) jsou velmi vhodné pro analytické stanovení.

Mimoto bylo vyvinuto několik metod pro stanovení 3-nitrothyrosinu ($\text{NO}_2\text{-Tyr}$) jako stabilního markeru pro poškození NO^{\bullet} oxidanty, a halogenovaných thyrosinů (3-chlorthyrosin a 3-bromthyrosin) pro hodnocení oxidativního stresu způsobeného halogenovanými látkami [139-141].

Jako marker oxidativního poškození DNA se velmi často sleduje 8-hydroxy-20-deoxyguanozin [142-144].

DNA by mohla být také poškozena pomocí RNS, zvláště nitrací a deaminací purinů. Rovněž pro stanovení koncových produktů těchto reakcí bylo vyvinuto několik metod, ty ovšem musí být ještě optimalizovány a ověřeny před tím, než budou moci být běžně používány [143].

7.2 Izoprostany

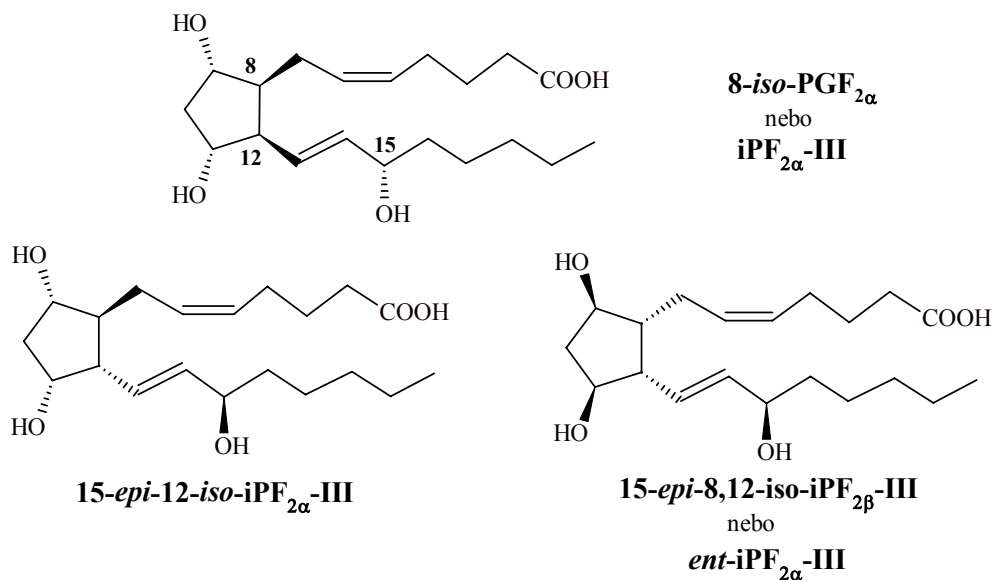
Izoprostany (IsoPs) jsou skupina prostaglandinů (PGs) podobných sloučenin, které vznikají z polynenasycených mastných kyselin (PUFAs) reakcí iniciovanou volnými radikály. Jejich vznik *in vitro* byl poprvé popsán Pryorem a Porterem v 70. letech minulého století. O dvacet let později Morrow a kol. objevili, že jsou tyto sloučeniny syntetizovány *in vivo* v lidských organismech [145, 146]. Od té doby bylo shromážděno velké množství důkazů vedoucích k závěru, že izoprostany, které lze spolehlivě monitorovat neinvazivními analytickými metodami, přinášejí informaci o peroxidaci lipidů *in vitro* a *in vivo* [130].

7.2.1 Názvosloví izoprostanů

Termín "Izoprostan" je zkracován jako "IsoP" nebo "IP". Zkratka IsoP byla poprvé navržena Robertsem a kol. s cílem vyhnout se kolizi se zkratkou "IP" pro inozitolfosfát a také s prostaglandinovým receptorem [147]. Zkratka "IsoP" je užívána ve většině odborných článků, ale obě zkratky jsou akceptovatelné.

Názvosloví izoprostanů vychází ze ω -systému dvojných vazeb PUFA a rovněž přejímá některé prvky z názvosloví prostaglandinů [130].

Název konkrétního izoprostanu obsahuje: (i) písmena D, E, F, G nebo H určující typ cyklopentanového kruhu izoprostanu; (ii) dolní index $_1, _2, _3, _4$ je počet dvojných vazeb; (iii) symboly $_{\alpha}, _{\beta}$ v dolním indexu řeší stereochemii hydroxylových skupin na cyklopentanovém kruhu (předpona $_{\alpha}$ znamená, že hydroxylové skupiny jsou orientovány pod rovinu kruhu, $_{\beta}$ nad ní); (iv) Předpona *Epi*- značí inverzi k normální chiralitě hydroxyly na postranním řetězci (S) Předpona *Iso*- chirální inverzi bočního řetězce vůči základní struktuře; (v) Předpona *Ent*- značí antipod izoprostanu; (vi) římské číslice I-VIII typ izoprostanu [147, 148] (vii) číslo 5, 8, 12, 15 polohu hydroxylové skupiny a (viii) dolní indexy $_c$ (cis) nebo $_t$ (trans) orientaci postranního řetězce [128].



Obrázek 47: Příklad názvosloví vybraných izoprostanů typu III [147].

7.2.2 Mechanismus syntézy izoprostanů

Izoprostany mohou vznikat z kyseliny arachidonové (AA), eikosapentaenové (EPA), dokosahexaenové (DHA), α či γ -linoleové (ALA, GLA) a dalších nenasycených mastných kyselin oxidací iniciovanou volnými radikály. Podmínkou pro tvorbu prostaglandinového kruhu, a tedy i izoprostanů, je přítomnost nejméně tří dvojných vazeb ve struktuře nenasycené

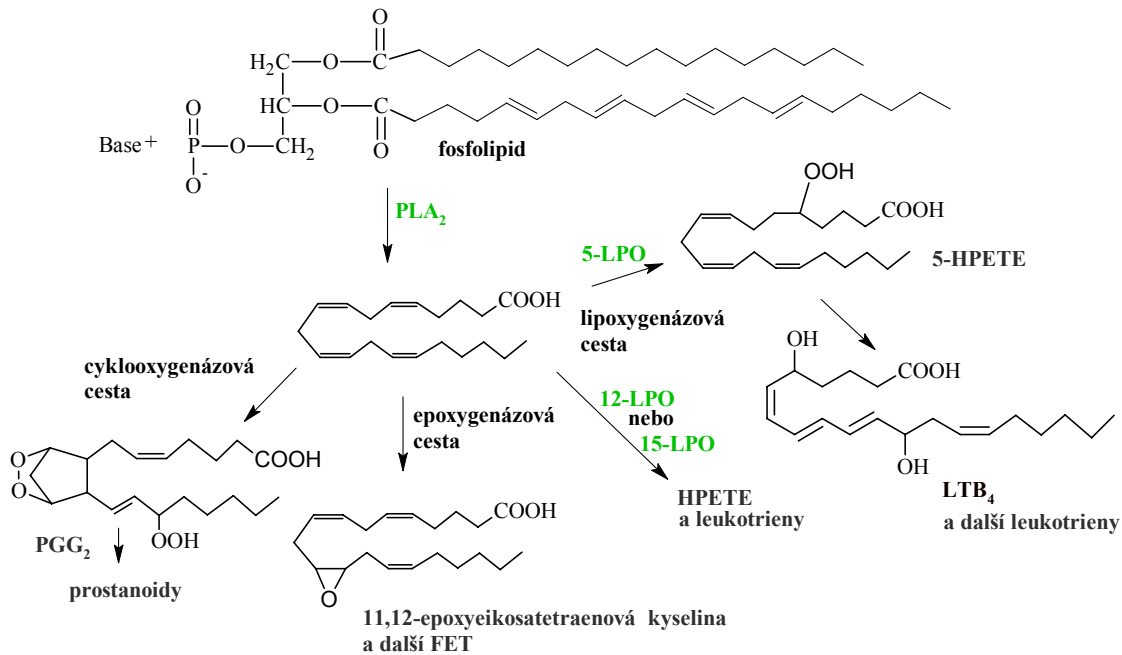
masné kyseliny. Tak například, zatímco IsoP mohou být syntetizovány z kyseliny γ -linolenové 18:3 (n-6), cyklizace kyseliny linolové 18:2 (n-6) je nemožná.

7.2.2.1 Tvorba izoprostanů odvozených od kyseliny arachidonové

Arachidonová kyselina 20:4(n-6) je „všudypřítomná“ polynenasycená ω -6 masná kyselina. Chemicky je to karboxylová kyselina s přímým dvacetihlíkatým řetězcem a čtyřmi dvojnými vazbami konfigurace *cis*. Přesné označení dle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) je kyselina (5Z,8Z,11Z,14Z)-ikosa-5,8,11,14-tetraenová.

Kyselina arachidonová je prekurzorem biologicky důležitých sloučenin – eikosanoidů, které vznikají především účinkem enzymů cyklooxygenázy (COX), cytochromu P₄₅₀ a lipooxygenázy (LOX). Výsledné bioaktivní eikosanoidy zahrnují prostaglandiny (PG), leukotrieny (LT) a lipoxiny (LX). U lidí se tyto sloučeniny účastní imunitních a zánětlivých procesů, souvisí s nádorovými onemocněními a hrají důležitou roli v imunopatologii [149, 150].

U živočichů je kyselina arachidonová součástí buněčných membrán. Zde je součástí fosfolipidů, v níž je esterovou vazbou vázaná na glycerolový zbytek. Z fosfolipidu se kyselina arachidonová může uvolnit enzymatickou deacylací působením enzymů fosfolipáz A₂ (PLA₂), C (PLC) a D (PLD). Prvním typem enzymu (PLA) se kyselina arachidonová uvolní přímo, hydrolýzou esterové vazby mastných kyselin. Působením PLC a PLD vznikají arachidonáty hydrolýzou vazby mezi fosfátem a bazí (PLD) a mezi glycerolem a fosfátem (PLC), z nichž se volná polynenasycená kyselina uvolní ve druhém kroku, působením enzymů diacylglycerol- a monoacylglycerol-lipáz [151].



Obrázek 48: Biosyntéza eikosanoidů z kyseliny arachidonové [152]

Z kyseliny arachidonové jsou působením enzymů cyklooxygenáz tvořeny endoperoxidové intermediáty PGG₂ a PGH₂, které jsou následně transformovány v biologicky aktivní molekuly zvané prostanoidy [149]. Do této strukturně různorodé skupiny rovněž patří sloučeniny zvané prostaglandiny: izoprostany D, E a F_{2α}.

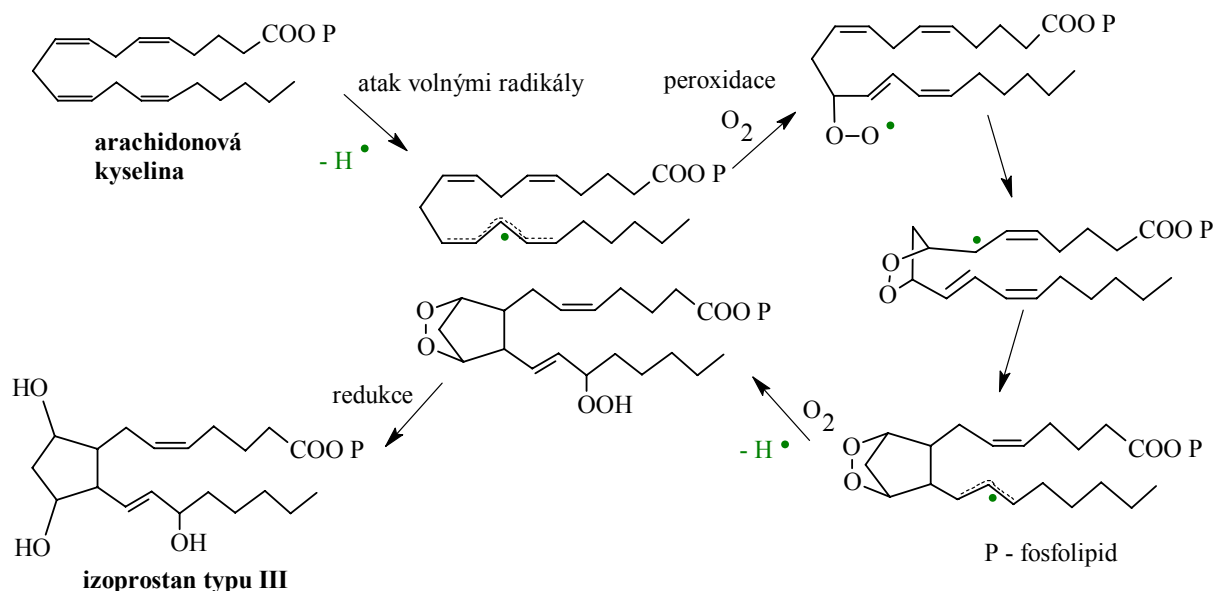
Není to dávno, co bylo objeveno, že tyto endoperoxidové intermediáty mohou být tvořeny i jinou – neenzymatickou cestou. PGG₂ a PGH₂ jsou tedy pojičkem mezi dvěma cestami produkce izoprostanů z kyseliny arachidonové – enzymatické a neenzymatické.

Vznik PGG₂ intermediátů byl popsán dvěma způsoby:

- Vznik endoperoxidovým mechanismem, kdy první molekula kyslíku je inkorporována do endoperoxidového kruhu za vzniku dvou hydroxylových skupin na 1,3-dihydroxycyklopentanovém kruhu (prostaglandinový kruh)
- dioxetan/endoperoxidový mechanismus, v němž je do prostaglandinového kruhu zakomponován až druhý molekulový kyslík [131, 153, 154].

Druhý mechanismus bývá navrhován pro tvorbu prostaglandinů biosyntézou enzymatickou cestou, endoperoxidový mechanismus se upřednostňuje pro tvorbu těchto sloučenin indukovanou volnými radikály [131].

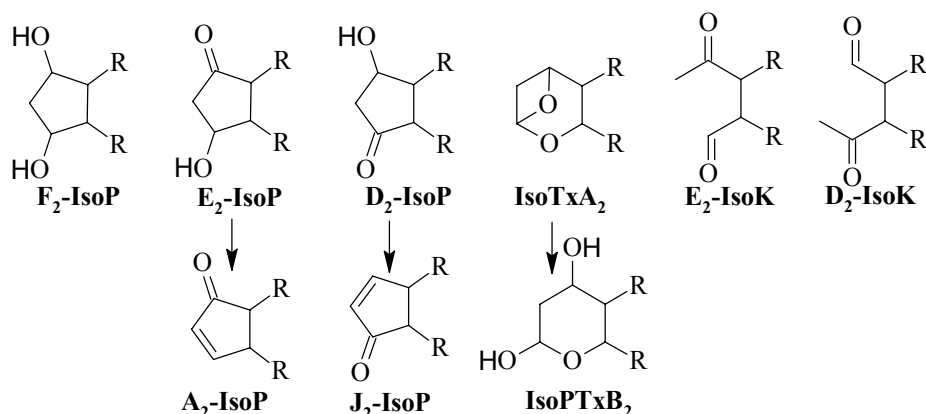
Z hlediska izoprostanů nejsou enzymatickou cestou a radikálovou tvořeny stejné produkty. Oxidací arachidonové kyseliny za pomoci enzymů jsou generovány pouze opticky čisté bicyklické endoperoxidy $\text{PGF}_{2\alpha}$, zatímco nekontrolovatelný radikálový mechanismus vede k tvorbě racemických směsí [155, 156].



Obrázek 49: Mechanismus tvorby IsoP typu III neenzymatickou cestou [128]. Stereochemie není pro jednoduchost znázorněna.

V endoperoxidovém mechanismu volné radikály zahajují peroxidaci kyseliny arachidonové odtržením vodíku z methinového uhlíku za tvorby radikálu. Na tento radikál se ihned naváže molekulový kyslík za vzniku peroxyradikálu, který následně atakuje sousední uhlík s dvojnou vazbou za vzniku endoperoxyradikálu. Z něj pak interní cyklizací vzniká bicyklický endoperoxidový radikál. K tomuto efektu dochází, pakliže je nízká tenze kyslíku a sekundární kyslík nereaguje přednostně s endoperoxidovým radikálem. Vysoká tenze kyslíku syntézu značně potlačuje. Pakliže dojde k interní cyklizaci, vzniklý cyklický endoperoxyradikál reaguje s další molekulou kyslíku za tvorby bicykloendoperoxidu PGG_2 a následně PGH_2 . Tyto nestabilní intermediáty jsou redukovány na F-typ izoprostanů PGF_2 [128, 157].

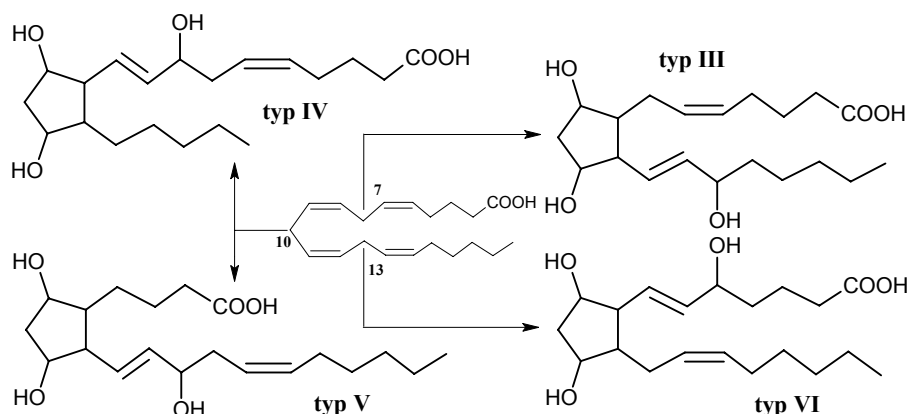
Neenzymatickým přesmykem mohou z PGH_2 intermediátů kromě F_2 -IsoP vzniknout rovněž E_2 - D_2 -IsoP, izothromboxany (IsoT) a vysoce reaktivní γ -ketoaldehydy, nazývané izoketaly (IsoK). A_2 -IsoTx dále podstupují rychlou neenzymatickou hydrolyzu za tvorby B_2 -IsoTx. Dehydratací D_2 - a E_2 -IsoP vznikají A_2 - a J_2 -IsoP [129, 157].



Obrázek 50: Prostanoidy vzniklé neenzymatickou oxidací kyseliny arachidonové; IsoP: izoprostany; IsoTx: izotromboxany; IsoK: izoketaly [129]

Kyselina arachidonová se v organismech nachází jak volná, tak vázaná ve formě fosfolipidu. K tvorbě izoprostanů dochází oxidací obou forem. Izoprostany vázané ve fosfolipidech jsou z něj uvolněny stejným mechanismem jako kyseliny arachidonové, popsaném výše, působením enzymů fosfolipáz [158].

Peroxydaci kyseliny arachidonové iniciovanou volnými radikály mohou vzniknout čtyři regioizomery izoprostanu typu F_2 v závislosti na atakovaném uhlíku. Atakem na C_7 vzniká typ II, na C_{10} typy IV a V, odštěpením H z C_{13} vznikají izoprostany typu VI. Všechny tyto regioizomery teoreticky existují v osmi racemických diastereoizomerech, což potenciálně dává 64 F_2 -izoprostanů [132].



Obrázek 51: Struktury všech čtyř forem F_2 -izoprostanů odvozených od kyseliny arachidonové. Stereochemie není pro jednoduchost znázorněna [159].

Jak lze očekávat, neenzymatickou peroxidací kyseliny arachidonové vznikne skupina izoprostanů s jednotlivými sloučeninami distribučně různě zastoupenými. Produkty s dvěma bočními řetězci v *trans* konfiguraci k endoperoxidu a *cis* vztažené k cyklopentanovému kruhu budou převládat nad izoprostany s bočním řetězcem v *trans* konfiguraci k cyklopentanovému kruhu. Těch vzniká pouhých 10 %. Konformační rozdíly mohou být použity pro separaci izoprostanů obsahujících *cis*-boční řetězec od ostatních prostaglandinů v plynové i kapalinové chromatografii [160, 161].

7.2.2.2 Tvorba izoprostanů odvozených od dalších polynenasycených kyselin

Analogicky k peroxidaci kyseliny arachidonové mohou být stejným mechanismem tvořeny další izoprostany odvozené od jiných polynenasycených mastných kyselin přítomných v organismech. Například peroxidací kyseliny dokosahexaenové, která je ve velkých množstvích obsažena v neuronech a neneuronálních tkáních v mozku savců, jsou tvořeny bicyklické endoperoxidy odvozené od DHA (H₄-neuroprostany), jež jsou redukovány na F₄-neuroprostany a dále D₄/E₄-neuroprostany [162] a neuroketaly [163]. Konkrétně analýzy F₄-neuroprostanů byly využity pro studování role oxidativního stresu v neurodegenerativních onemocněních [129].

Rovněž tvorba nových dinorů izoprostanů E₁ v rostlinách byla nedávno popsána (1998) [164]. O dva roky později bylo objeveno, že peroxidací kyseliny linolenové iniciované volnými radikály vznikají izoprostany typu F. Ty byly podle místa syntézy nazvány fytoprostany F₁ [165, 166].

7.2.3 Stanovení izoprostanů

F₂-izoprostany jsou považovány za jedny z nejlepších markerů oxidativního stresu a lipidové peroxidace *in vivo*, protože [167]:

- jsou specifickými produkty lipidové peroxidace
- jsou chemicky stabilní v porovnání s dalšími produkty ze skupiny prostanoidů
- jsou tvořeny *in vivo*
- jsou přítomny v detekovatelných množstvích ve všech tkáních a biologických tekutinách
- jejich obsah se v organismech značně zvyšuje vlivem oxidativního stresu.

Pro finální stanovení F₂-izoprostanů bylo vyvinuto mnoho metod. Ty se skládají z izolace pomocí extrakce tuhou fází (SPE) nebo afinitní chromatografie s případným využitím tenkovrstvé chromatografie (TLC) následované finální analýzou. Ta může být buďto

imunologická nebo se používá kombinace chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí [168-170].

Imunologické analýzy lze rozdělit na radioimunoanalýzní (RIA) nebo enzymové imunoanalýzní (EIA). V kombinaci s hmotnostní spektrometrií se pro separaci izoprostanů používá jak vysokoúčinná kapalinová (HPLC/MS), tak plynová chromatografie (GC/MS) [19].

Výhodou stanovení F₂-izoprostanů pomocí GC/MS je efektivní separace na křemenných kapilárních kolonách, spojená se specifickou a vysoce citlivou detekcí na hmotnostním spektrometru v případě použití negativní chemické ionizace se záchytem elektronu (GC/ECNCI-MS). Elektronová ionizace (EI) není příliš vhodná. V ní používaná energie 70 eV způsobuje vysokou fragmentaci izoprostanů dávající na fragmenty velmi bohaté spektrum, které je specifickým „fingreprintem“ stanovovaných molekul. Toto spektrum je pro všechny F₂-izoprostany totožné, je tedy nevhodné pro identifikaci jednotlivých typů stereoizomerů [19]. Navíc vysoký stupeň fragmentace snižuje citlivost stanovení.

Nevýhodou při stanovení izoprostanů pomocí plynové chromatografie je jejich malá těkavost. Proto jsou před analýzou jejich polární skupiny derivatizovány. Jako derivatizační činidla se používají například pentafluorobenzaldehyd (PFB) pro derivatizaci karboxylové skupiny a N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) k derivatizaci hydroxylů [165, 171].

Pro separaci izoprostanů kapalinovou chromatografií je možné použít jak systému normálních fází s organickými rozpouštědly, tak obrácených fází s vodně-organickou mobilní fází [19]. K separaci se nejčastěji používají standardní kolony s oktadecyl- nebo oktylsilikagelem. Nejčastěji používanou ionizační technikou pro stanovení těchto látek pomocí HPLC/MS je elektrospřej (ESI). Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) se používá výjimečně. Nedávno byla např. použita po analýzu eikosanoidů, předem derivatizovaných PFB [172].

Pro rutinní analýzy se v kombinaci s kapalinovou chromatografií nejčastěji používá tandemová hmotnostní spektrometrie s analyzátozem typu trojitého kvadrupólu (HPLC/QQQ MS). Jednoduchý kvadrupól není pro analýzy příliš vhodný z důvodu překrývání píků izomerických izoprostanů a koelujících nečistot. Sférická iontová past se používá spíše pro strukturní studie [19].

Při analýzách na hmotnostních spektrometrech s trojitým kvadrupólem jsou monitorovány většinou fragmentové ionty v MS/MS negativním modu. Prekurzory jsou m/z 353 pro izoprostany nebo m/z 357 pro jejich tetradeuterované analogy. Průkopníky MS/MS analýz eikosanoidů byla skupina Waugh a kolektiv, kteří poprvé popsali specifické fragmenty tří ze čtyř izoprostanových typů [173].

Ve tkáních a tekutinách savců jsou nejvíce obsaženy izoprostany VI. skupiny, nejčastěji se analyzují izoprostany typu III [174].

Je možná analýza jak volných nebo suma volných i vázaných izoprostanů ve fosfolipidech. Protože těch vázaných se v organismech syntetizuje více, stanovuje se obvykle suma obou. Izoprostany se z fosfolipidu uvolní alkalickou hydrolýzou v počátečním kroku přípravy vzorku [175].

7.3 Oxidativní stres a blednutí korálů

Korálové útesy tvoří jednu z největších a nejrozmanitějších ekologických společenství na zemi. Poslední tři desítky let tato společenství podléhají intenzivní celosvětové degradaci nazývané *Coral bleaching* – Blednutí korálů [176]. Jde o proces, při kterém korály ztratí jejich řasový symbiont nebo pigment těchto organismů žijících s korály v symbióze degraduje. Blednutí korálů může být indukováno různými faktory; například vysokou či nízkou teplotou, nadměrným ozářením nebo bakteriální infekcí. Tyto a další environmentální faktory pak mohou mít za následek iniciaci zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku v korálech, a tím jejich poškození [177-180].

Jak ale souvisí blednutí korálů s jejich poškozením vlivem oxidativního stresu?

K tomuto vysvětlení bylo navrženo několik modelů. Jeden z nich vysvětluje, že vlivem „stresoru“, jako je například vysoká teplota, může dojít k destabilizaci řetězce přenosu elektronů v rámci fotosyntézy, což má za následek zvýšení tvorby ROS a následnou tvorbu H₂O₂ v chloroplastech řas [180-183]. Molekuly peroxidu pak mohou difundovat z řas do cytoplazmy symbiotického korálu. Zde pak může být peroxid „neutralizován“ antioxidační obranou organismu, nebo konvertován na jinou, mnohem škodlivější reaktivní formu kyslíku mechanismy popsány v kapitole oxidativního stresu, vedoucí k oxidativnímu poškození korálu až k jeho smrti [91, 180].

Především zvýšením teploty, environmentální kontaminací a acidifikací moří způsobené zvýšením obsahu CO₂ v atmosféře, dochází k degradaci korálových útesů.

7.3.1 Sasanka koňská (*Actinia equina*) [184-186]

Protože korály jsou málo dostupné, byl hledán jiný, vhodnější organismus, který by mohl být použit pro testování možnosti využití izoprostanů pro studium oxidativního stresu korálnatců. Nejvhodnějším se ukázala být sasanka koňská – *Actinia equina*.

Klasifikace:

Říše: Animalia – živočichové

Kmen: Cnidaria – žahavci

Třída: Anthozoa – korálnatci

Řád: Actinaria – sasanky

Čeleď: Actiniidae – sasankovití

Actinia equina, anglicky zvaná Beadlet Anemone, obývá studené vody východu Atlantického oceánu, pobřeží Británie a Irska, některé druhy lze rovněž najít ve Středozemním moři. V terénních podmínkách je velmi dostupná, neboť se vyskytuje v přílivových zónách na skalnatém podkladu. Teplotní tolerance těchto organismů je 2 – 28 °C, což je pro teplotní experimenty ideální. Objeveny byly také kolonie žijící v ústí řek, z čehož lze usuzovat na určitou toleranci těchto organismů vůči kolísání salinity vody.

Barevně jsou *Actinia equina* velmi rozmanité; pokrývají barevný rozsah od červené přes oranžovou až po zelenou. Nejběžnější je červená forma. Oproti některým „obřím“ druhům mořských sasenek jsou velmi malé. Dorůstají velikosti 7 cm v průměru a 6 cm výšky maximálně. Na rozdíl od příbuzných korálů nemají ochrannou kostru, pouze zpevněné tělo. Z anatomického hlediska mají sasanky tři hlavní části: ramena, trup (gastrovaskulární dutina, hltan, pohlavní žlázy a svaly), a nožní terč (který ji pevně drží k podloží). Ramena (obvykle 192) jsou rozmístěna radiálně v šesti kruzích kolem gastrovaskulární dutiny. Pod nimi na vnějším okraji trupu mají světle modré skvrnky nazývané acrorhagi, které jsou plné žahavých buněk.

Jsou to hermafrodité; rozmnožují se pohlavním pučením a žijí velmi dlouho (až 80 let).

Sasanky jsou predátoři. Jejich trávení je extracelulární, jsou schopny pozřít téměř vše, co zachytí. Nejčastější potravou jsou škeble, měkkýši, hmyz a stejnonožci. Dokážou strávit i větší ryby, které předem omráčí knidoblasty na ramenou.



Obrázek 52: Blednutí korálů [187](vlevo) a *Actinia equina* [188](vpravo)

Actinia equina není na Červeném seznamu ohrožených druhů IUCN (IUCN Red List) vydávaném Mezinárodní unií pro ochranu přírody a přírodních zdrojů [189].

Pro laboratorní experimenty byla *Actinia equina* použita především z důvodů větší hojnosti a dostupnosti těchto organismů v terénním prostředí, než jsou korály. Pakliže by se potvrdila myšlenka, že by izoprostany mohly být využity jako markery oxidativního stresu těchto organismů, bylo by velmi pravděpodobné, že by oxidativní stres mohl být stejným způsobem studován i u dalších členů skupiny korálnatců, tedy i u samotných korálů.

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Použité chemikálie a standardy

V této práci byla použita kyselina arachidonová C20:4, $\geq 98\%$ (l) (Cayman Chemicals, USA), standardy izoprostanů: 8-izoprostan (iPF_{2 α} -III) $> 99\%$ (s); 5-iPF_{2 α} -VI, $> 95\%$, (aq v ACN); iPF_{2 α} -IV, $> 98\%$, (aq v ACN); (Cayman Chemicals, USA), O₂ (Linde Gas, N), kyselina nonadekanová C19:0, $\geq 99\%$ (l) (Sigma Aldrich, USA), rozpouštědla čistoty pro HPLC analýzy (Rathburn Chemicals Ltd., UK) a další běžně dostupné chemikálie (K₂HPO₄, KH₂PO₄, H₂O₂, NaBH₄, CuCl₂, NaOH, HCl, trifenylfosfin, butylhydroxytoluen, NaCl, Mohrova sůl: (NH₄)₂SO₄.FeSO₄.6H₂O) vše čistoty p.a.)

8.2 Instrumentace použitá k analýzám

Tabulka 8: Přehled přístrojů použitých k analýze

Technika	Název	Specifikace MS	Výrobce	Ovládací software
HPLC	Waters 2695	-	Waters, USA	MassLynx™
MS	Quatro Micro™ API	ESI-QQQ	Waters, USA	MassLynx™
HPLC	Ultimate 3000	-	Dionex, USA	Chromeleon® verze 6.8
MS	Esquire HCT	ESI-3D-IT	Bruker Daltonics, Německo	Bruker verze 3.4
MS	Micr-o-TOF	ESI-TOF	Bruker Daltonics, Německo	Bruker verze 3.4

8.3 Další používaná zařízení

V experimentech s regulovanou teplotou byl použit inkubátor pro rostliny SGC 120 (Weiss Gallenkamp, UK).

Mikroskopování tkání bylo prováděno na elektronovém mikroskopu s detektorem dispergující energii rentgenových paprsků (SEM-EDXA) Topcon SM 300 (Topcon, USA).

8.4 Postupy a podmínky měření

8.4.1 Syntéza směsi izoprostanů

8.4.1.1 Metoda I

30 μM kyseliny arachidonové bylo smícháno s 500 μl 0,01 M NaOH a ihned suspendováno ve 25 ml fosfátového pufru (13,4 ml 50 mM K_2HPO_4 s 36,6 ml 50 mM KH_2PO_4 adjustováno na pH = 7,3). Dále bylo přidáno 50 μl H_2O_2 a 500 μl 3 mM CuCl_2 a vše bylo mícháno po dobu 12 hodin při teplotě 5 °C. Po přidání malého množství (na špičku nože) NaBH_4 byla reakční směs ponechána 30 min v klidu při laboratorní teplotě a na závěr okyselena na pH 3-5 0,5 mM HCl.

8.4.1.2 Metoda II

0,5 g kyseliny arachidonové rozpuštěné ve 25 ml směsi methanol:voda (v/v 50:50) bylo probubláváno O_2 po dobu 2 minut. Ihned poté byla baňka uzavřena a směs míchána 10 dní při laboratorní teplotě. Po přidání 8,3 ml roztoku trifenyfosfinu (TPP) v CHCl_3 (3 g TPP ve 25 ml CHCl_3) byla směs ponechána 30 minut v klidu při laboratorní teplotě. Po přidání 2 ml nasyceného roztoku NaCl byla organická fáze oddělena od vodné a následně odpařena na rotační vakuové odparce do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 10 ml vody a po přidání NaBH_4 (na špičku nože) bylo upraveno pH na 3-5 okyselením 0,5 mM HCl.

8.4.2 Transport a chov sasanek *Actinia equina* pro experimenty

Pro optimalizaci podmínek stanovení bylo několik jedinců červené formy sasanek *Actinia equina* dovezeno z pláže Severního moře na okraji města Thurso do laboratoře Environmentálního výzkumného ústavu. Ze skalnatých útesů byly sasanky koňské opatrně sloupnuty v době odlivu tupým, plochým, 2 mm tenkým ocelovým plíškem tak, aby nedošlo k jejich poranění. Transport trval nanejvýše 10 minut. Sasanky byly převáženy v plastových boxech s mořskou vodou. Pro experimenty byli vybíráni vždy jedinci o přibližně stejné velikosti (v průměru 3 cm). Sasanky jsou hermafrodité, proto nebyl brán ohled na jejich pohlaví.

Takto získaní jedinci byli v laboratoři chováni ve skleněných akváriích s mořskou vodou při teplotě 15 – 17 °C. Akvária byla vybavena provzdušňovacím zařízením. Voda byla měněna každý druhý den. Protože experimenty byly založeny na principu změny teploty lázně, bylo při výměně vody vždy dbáno na to, aby čistá voda měla stejnou teplotu jako voda v akváriu

před její výměnou. Sasanky byly před experimentem třikrát týdně krmeny krmivem pro rybičky *Artemia Brine shrimp* (Nutis, UK). V průběhu provádění experimentů krmeny nebyly.



Obrázek 53: Odebrané tkáně *Actinia equina*

Pro validaci metody a finální experimenty, pracovně zvané jako krátkodobý a dlouhodobý, byli použiti jedinci nově z moře odebraní. Odběr byl proveden z téhož místa, stejným postupem jako organismy, které byly použity pro optimalizaci postupu stanovení izoprostanů. Pro stanovení reálného množství izoprostanů ve tkáních sasanek *Actinia equina* žijících volně v moři byly odebrány tkáně přímo na útesech asi z cca 50 jedinců. Hodnoty izoprostanů stanovených v těchto jedincích pak byly používány v dlouhodobém a krátkodobém experimentu jako hodnoty v čase $t = 0$ hod.

Ve všech experimentech byly z testovaných organismů odebírány tkáně – ramena *Actinia equina*, které byly získány stříháním chirurgickými ocelovými nůžkami.

8.4.3 Popis výsledných experimentů

8.4.3.1 Krátkodobý experiment

V prvním, tzv. krátkodobém, experimentu bylo 30 sasanek koňských rozděleno do šesti plastových nádrží s mořskou vodou. Umístěny byly do inkubačního zařízení SGC 120 (Weiss Gallenkamp) vytemperovaného na 15 °C (při 60 % relativní vlhkosti) a ponechány při této teplotě přes noc. Jako vedlejší činidlo iniciující oxidativní stres byla použita Mohrova sůl ve finální koncentraci 30 μ M. Ta byla přidána ráno v první den experimentu, tj. po 12 hodinách, do jednoho z 6 akvárií. V tomto okamžiku byly rovněž odebrány první vzorky – tkáně

sasank *Actinia equina* z prvních dvou nádrží, tj. z akvária s přidaným činidlem a z jednoho ze zbývajících 5 akvárií bez přidaného činidla. Obdobně byl proveden odběr tkání ze stejných organismů po 2, 6 a 24 hodinách (druhý den ráno) – Experiment A



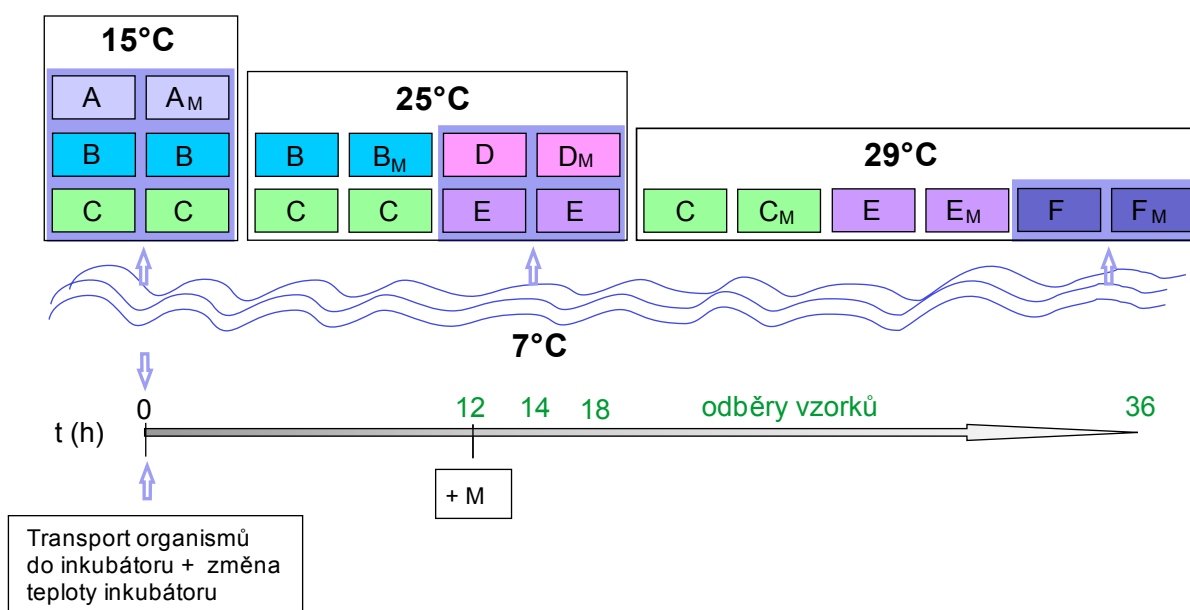
Obrázek 54: Testované organismy *Actinia equina* v krátkodobém experimentu

Večer v den posledního odběru tkání byla zvýšena teplota inkubátoru z 15 °C na 25 °C a 2 akvária s „již testovanými“ sasankami byla z inkubátoru odstraněna a nahrazena nádržemi s novými, čerstvě v moři nasbíranými organismy.

Postup experimentu se dále opakoval, oproti dřívějšímu ovšem se čtyřmi nádržemi. Po noční inkubaci bylo ráno po 12 hodinách přidáno činidlo do jedné z nádrží s organismy umístěnými den před tím do inkubátoru a do jedné z nádrží se sasankami, které byly v inkubátoru od počátku experimentu. Stejně jako u dřívější části experimentu byly další odběry provedeny po 2, 6 a 24 hodinách – Experiment B a D.

Večer v týž den byla zvýšena teplota z 25 °C na 29 °C a shodně s předcházejícím postupem byla 4 akvária s „již testovanými“ sasankami nahrazena 2 nádržemi s novými. Opět po noční inkubaci byl ráno po 12 hodinách přidán hexahydrát síranu amonno-železnatého do tentokrát třech ze šesti inkubovaných nádrží a tkáně z testovaných sasank byly odebírány v témže časovém sledu jako dříve na počátku a pak po 2, 6 a 24 hodinách – Experiment C, E a F.

Pro názornost byl experiment znázorněn graficky (obr. 55). V něm obdélníky značí lázně s organismy umístěnými do inkubátoru o různých teplotách. Písmeny A až F jsou označeny jednotlivé lázně. Např. organismy v lázni C byly vystaveny všem třem teplotám; 15 °C, 25 °C a 29 °C. Toto značení dílčích experimentů je následně dodržováno i pro identifikaci experimentů ve výsledkové části. M značí lázeň s přidaným činidlem, tmavomodré pozadí lázní zvýrazňuje organismy čerstvě přenesené z moře do inkubátoru. Níže je pak znázorněno časové rozvržení experimentů.



Obrázek 55: Schéma krátkodobého experimentu

8.4.3.2 Dlouhodobý experiment

V dlouhodobém experimentu bylo 30 testovacích organismů *Actinia equina* rozděleno do dvou akvárií s provzdušňovanou mořskou vodou. Do jednoho z nich byla přidána Mohrova sůl ve finální koncentraci 30 μM . Obě akvária byla ponechána po dobu celého experimentu v laboratoři při teplotě 19 ± 1 °C. Tkáně byly z testovaných organismů z obou lázní odebírány 2., 5., 8. a 10. den.



Obrázek 56: Testované organismy *Actinia equina* v dlouhodobém experimentu

8.4.4 Příprava vzorků pro analýzy HPLC/MS/MS

8.4.4.1 Hydrolýza izoprostanů vázaných na fosfolipidy

Tkáně sasanek *Actinia equina* ($60 \pm 0,1$ mg) byly hydrolyzovány 1 ml 1 M KOH ve 40 °C po dobu 50 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl přidán 1 ml 1 M HCl a pro úpravu pH a vysrážení proteinů 2 ml 100 mM kyseliny mravenčí. Vzorek byl následně centrifugován při 2400 g po dobu 10 min.

8.4.4.2 Extrakce tuhou fází

Ze supernatantu po centrifugaci byly izoprostany izolovány extrakcí tuhou fází. Pro tento účel byly použity kolonky Strata-X 33 μm s obrácenou fází na polymerním sorbentu (Phenomenex, USA) obsahující 200 mg sorbentu (pro 3 ml vzorku) a 30 mg sorbentu (pro 1 ml vzorku).

Kolonky Strata-X 200 mg /3 ml byly kondicionovány 2 ml ACN a následně 2 ml vody. Po kvantitativním nanesení celkového objemu vzorku po centrifugaci byly kolonky promyty 5 ml vody a 2 ml směsí ACN:voda (20:80; v/v). Izoprostany byly eluovány 4 ml směsí ACN:voda (50:50; v/v).

V dalším kroku byly použity kolonky s 30 mg sorbentu na 1 ml vzorku. Ty byly kondicionovány 1 ml ACN a 1 ml vody. Po nanesení vzorku přečištěného první extrakcí a zředěného 6 ml vody byly promyty 3 ml vody. Izoprostany byly eluovány 3 ml methanolu.

Ke vzorku bylo přidáno 30 μl 1 nM C19:0 nasycené mastné kyseliny, jako vnitřního standardu pro ESI-MS a 20 μl butylhydroxytoluenu sloužícího jako antioxidant. Před analýzou HPLC/MS byly vzorky přefiltrovány přes filtrační zařízení z buničité vaty předem vyextrahované v dichlormethanu.

8.5 Nastavení hmotnostních spektrometrů pro analýzy

Pro analýzy izoprostanů v tkáních *Actinia equina* byly používány tři hmotnostní spektrometry. Ty byly nejprve naladěny standardním způsobem pomocí ladících směsí, následně byly hledány nejvhodnější parametry pro stanovení izoprostanů.

K tomuto účelu byla použita směs izoprostanů připravená *in-vitro* z arachidonové kyseliny s methanolem (1:50 v/v) dávkovaná do elektrospreje hmotnostních spektrometrů přímou infúzí. U hmotnostního spektrometru na principu iontové pasti Esquire HCT (Bruker Daltonics, Německo) byla nastavena hodnota m/z 353,3 ($[\text{M-H}]^-$) a bylo provedeno automatické ladění přístroje na tuto hodnotu. Infúze byla prováděna rychlostí 5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Možnost automatického ladění u hmotnostního spektrometru s analyzátozem trojitým kvadrupólem Quatro MicroTM API (Waters, USA) nebyla možná. Optimalizace byla prováděna manuální změnou nastavení MS (např. změnami napětí na kapiláře, kuželu, koncových elektrodách, fragmentační amplitudě, teploty a průtoku sušícího plynu, teploty iontového zdroje aj.). Sledováním intenzity píků izoprostanů o m/z 353,3 ($[\text{M-H}]^-$) a stability elektrospreje jako odezvy na měnící se nastavení byly hledány nejvhodnější parametry pro stanovení těchto látek. Infúze byla prováděna rychlostí 5 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu Micr-o-TOF (Bruker, Německo) byl použit pouze výjimečně, a proto byl naladěn pouze standardním způsobem.

8.6 Finální podmínky stanovení izoprostanů HPLC/MS/MS

Izoprostany byly ve tkáních *Actinia equina* analyzovány pomocí HPLC-ESI/MS/MS systému na přístrojích Waters 2695 a Quatro MicroTM API za finálních, optimalizovaných podmínek uvedených v tabulce 9.

Tabulka 9: Parametry stanovení

Kolona	Luna 5 μ m, C(18)2, 250 x 2 mm (Phenomenex, USA)
Průtok mobilní fáze (MF)	0,2 ml.min ⁻¹
Složení MF	Složka A – mravenčan amonný (pH = 3) Složka B – MetOH:ACN (70:30, v/v)
Gradient MF	Počátek 55 % B, ve 12 min 100 % B (drženo 15 min), ve 30 min počáteční složení
Nástřik vzorku	10 μ l
Napětí na kapiláře	2,7 kV
Napětí na skimmeru	35 V
Napětí na extraktoru	3 V
Napětí na RF elektrodách	0,5 V
Průtok a teplota sušícího plynu	N ₂ @ 400 l.h ⁻¹ , 350 °C
Teplota iont zdroje	100°C
Průtok zmlžovacího plynu	N ₂ @ 10 l.min ⁻¹
Detekce	Negativní ionty
MS/MS kolizní energie	25 a.u.
Nastavení MRM	353 →155; 353 → 115; 353 →193; 353 →127; 351→115; 351 →155; 381 →155

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Syntéza izoprostanů *in-vitro*

Oxidací arachidonové kyseliny je teoreticky možné získat celkem 64 stereoizomerů izoprostanů. Pro optimalizaci jejich separace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a pro studium fragmentačních mechanismů hmotnostní spektrometrií byla *in-vitro* z kyseliny arachidonové syntetizována jejich směs.

Použity byly dva postupy. První z nich byl na principu modifikované Fentonovy reakce. Postup pro syntézu tímto způsobem byl popsán ve článku Waugh a kol. [173]. V něm byly hydroperoxy tvořeny z kyseliny arachidonové po její reakci s H_2O_2 za přítomnosti CuCl_2 s následnou redukcí na izoprostany přidavkem SnCl_2 .

Při použití tohoto postupu se nepodařilo izoprostany syntetizovat a kyselina arachidonová zůstala nezreagovaná. Jedinou odchylkou od postupu uvedeného v citované publikaci byla teplota reakce. V publikaci je uvedeno míchání při $5\text{ }^\circ\text{C}$, my pracovali za laboratorních podmínek ($18\text{ }^\circ\text{C}$). Tato podmínka by mohla být důvodem neúspěšnosti experimentu. Protože laboratorní podmínky ústavu, kde byla práce prováděna, neumožňovaly splnění požadavku neustálého míchání za takto nízkých teplot, byl postup nahrazen občasným, ale intenzivním mícháním reakční směsi a jejím nepřetržitým uchováváním v ledničce. Až za použití tohoto modifikovaného postupu a náhrady doporučeného redukčního činidla, jímž byl SnCl_2 , za námi použitý NaBH_4 , se podařilo touto cestou izoprostany připravit.

Pro nevelkou úspěšnost při syntéze izoprostanů prvním postupem byl vyzkoušen postup druhý, který byl časově delší, ale o to úspěšnější. V něm byly izoprostany připraveny hned napoprvé. Tento postup vycházel z publikace Parchmana a kol. [164]. V ní autoři popisují syntézu fytoprostanů z kyseliny α -linolenové autooxidační reakcí. Analogicky lze připravit i izoprostany z arachidonové kyseliny. Pro naše účely byla kyselina α -linolenová nahrazena arachidonovou a citovaný postup byl modifikován do podoby, která je uvedena v experimentální části. Především byla upravena část, kde byla reakční směs čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu. Ta byla v našem případě nahrazena extrakcí tuhou fází.

9.2 Optimalizace podmínek stanovení

9.2.1 Optimalizace přípravy vzorků

K optimalizaci postupu izolace izoprostanů z tkání bylo použito 30 mg tkáně *Actinia equina*. Tato tkáň byla pro tvorbu izoprostanů ponechána po dobu 6 hodin v 0,3 % roztoku H₂O₂. Kombinace zmíněné koncentrace a doby reakce byla zvolena jako nejvhodnější na základě předcházejících experimentů. Při vyšší koncentraci H₂O₂ už docházelo ke značnému poškození tkání. To bylo pozorováno mikroskopickou analýzou na přístroji Topcon SM 300. Kratší doba oxidace (2 hodiny) se ukázala být pro tvorbu izoprostanů nedostačující, k jejich tvorbě docházelo, ale pro optimalizaci se jeví jako vhodnější použít tkáň s větším množstvím testovaných látek. Po delší době oxidace (24 hodin) byla již tkáň opět poškozená.

9.2.1.1 Hydrolýza izoprostanů vázaných ve fosfolipidech

Izoprostany se nacházejí v organismech volné a vázané ve fosfolipidech; z nich se dají uvolnit alkalickou hydrolýzou. Protože vázaných izoprostanů je v organismech mnohem více a množství těch volných by bylo pro analýzy nedostačující, byla vždy provedena hydrolýza testované tkáně.

Postup hydrolýzy byl zvolen na základě postupů popsanych v řadě publikací, které se v této části zpracování vzorku shodovaly [190-193]. V rámci optimalizace byla pouze testována doba trvání hydrolýzy (40 – 60 min) a teplota, při které byla prováděna (40 – 80 °C); tyto údaje se v publikacích lišily. Protože vliv fyzikálních činitelů na obsah izoprostanů ve vzorcích nebyl pozorován, byla pro finální přípravy vzorků použita teplota nejnižší, ke tkáním nejšetrnější (40 °C), a doba průměrná, tedy 50 minut.

9.2.1.2 Extrakce izoprostanů tuhou fází

Pro izolaci izoprostanů byly testovány dva typy principiálně odlišných SPE kolonek; systém s obrácenými fázemi na polymerním sorbentu Strata-X 33 μm 200 mg/3 ml a slabý anex Strata-X-AW 33 μm 200 mg/6 ml (obě Phenomenex, USA). Zatímco Strata-X jsou výhradně používány pro izolaci neutrálních sloučenin, Strata-X-AW se slabým anexem na polymerním sorbentu jsou vhodné pro retenci kyselých sloučenin s pK_a menším než 5 (pK_a izoprostanů je blízké 5 [194]).

Testovací analýzy prokázaly možnost použití obou typů SPE kolonek. V obou případech byly izoprostany na kolonkách sorbovány a zvoleným rozpouštědlem kvantitativně eluovány.

K optimalizaci a výsledným analýzám byly použity kolony Strata-X pouze z důvodu snazší dostupnosti.

Optimalizace postupu izolace pomocí SPE byla zaměřena především na výběr vhodného elučního činidla. V počátku byly izoprostanu eluovány 2 ml methanolu. V průběhu experimentu bylo zjištěno, že tato volba je nevhodná jak objemem, tak selektivitou eluce. Analýzy pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií ukázaly, že čistým methanolem bylo z kolony koeluováno také velké množství mastných kyselin. Cestou ke zlepšení izolace izoprostanů bylo buďto zvolit větší množství organického rozpouštědla pro eluci jak izoprostanů tak mastných kyselin, nebo najít jiný, selektivnější způsob eluce izoprostanů. Vhodné bylo použití směsi methanolu s tuky nerozpouštějícím činidlem – vodou. Eluce izoprostanů začínala při směsi metanol : voda 50:50 (v/v). Větší eluční sílu než metanol ukázal acetonitril, který byl testován v dalších krocích optimalizace a nakonec byl zvolen pro finální extrakci. Při směsi ACN:voda byly izoprostanu eluovány už směsí 30:70 ACN:voda (v/v) a množství výše uvedených balastních látek bylo podstatně nižší. Nevýhodou tohoto jednoduchého postupu bylo složení konečného extraktu, který obsahoval velké množství vody. Proto ve druhém kroku přípravy vzorků byla použita další SPE kolonka, sloužící především k převedení izoprostanů do čistého methanolu, který bylo následně možné odpařit až na výsledný objem 100 μ l.

Protože izoprostanu byly ve vzorcích obsaženy ve stopových koncentracích, bylo v rámci optimalizace hledáno také maximální množství tkáně, které ještě bylo možné na uvedený typ kolonek aplikovat, aniž by došlo k jejich přetížení. Tímto maximem bylo 60 mg tkáně *Actinia equina*, které bylo použito pro finální experimenty.

9.2.2 Optimalizace stanovení izoprostanů pomocí HPLC/MS/MS

9.2.2.1 Výběr hmotnostního spektrometru

V Environmental Research Institute, University of the Highlands and Islands (Skotsko, UK), kde byla tato práce zpracovávána, bylo možné pro stanovení izoprostanů pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií použít tři HPLC/MS systémy. Všechny systémy měly vždy ionizaci elektrosprejem, ale byly vybaveny různými typy analyzátorů. Byl jím vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr s analyzátozem doby letu Micr-o-TOF s možností fragmentace, dále nízkorozlišovací MS s analyzátozem typu sférické iontové pasti a rovněž nízkorozlišovací MS s analyzátozem typu trojitého kvadrupólu.

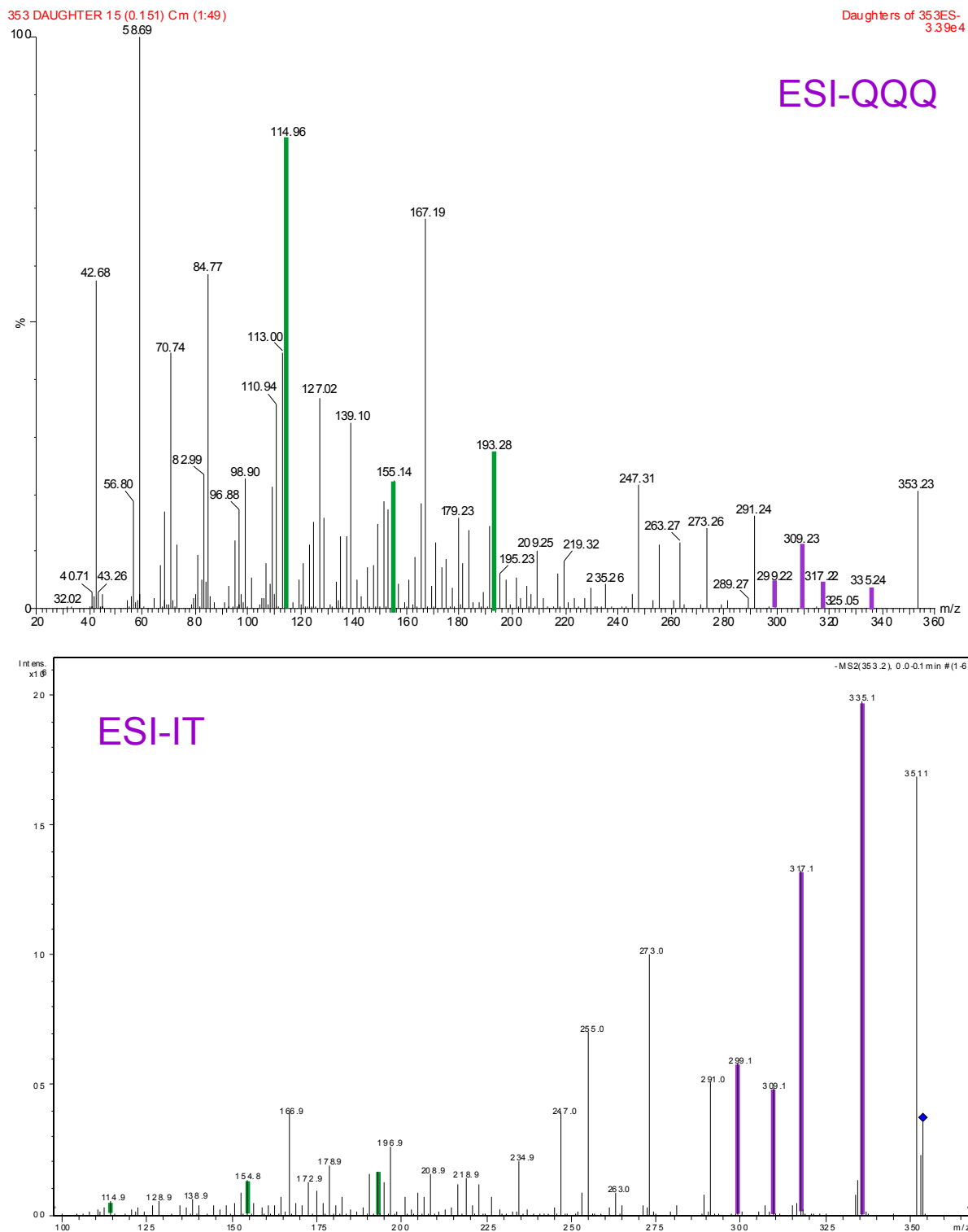
Z kyseliny arachidonové je možné připravit 4 typy izomerů izoprostanů. Tři z těchto typů jsou charakterizovány specifickým iontem produkovaným fragmentací prekurzorového iontu m/z 353 při tandemové hmotnostní spektrometrii v negativním modu. Jsou to fragmenty m/z 115 pro typ VI, m/z 127, m/z 155 pro typ IV a m/z 193 pro typ III. Tyto fragmenty byly získány fragmentací izoprostanových standardů: $iPF_{2\alpha}$ -III, 5- $iPF_{2\alpha}$ -VI a $iPF_{2\alpha}$ -IV dávkovaných do MS s iontovou pastí přímou infúzí a shodují se s údaji uvedenými v literárních zdrojích [173].

Zcela jedinečné pro příslušné typy izoprostanů uvedené fragmenty vždy nebyly, např. fragment m/z 193 byl nalezen rovněž u izoprostanu typu VI. V „nevlastních“ typech ovšem byly tyto fragmenty vždy s menší než 10 % odezvou k hlavnímu fragmentu specifickému pro danou skupinu. Předpokládalo se, že tato skutečnost nebude kvalitu stanovení nijak ovlivňovat.

Na základě studia literárních zdrojů nebylo možné určit fragment skupiny izoprostanů typu V. Rovněž MS/MS analýza přímou infúzí *in-vitro* připravené směsi izoprostanů nebyla k jeho objasnění příliš nápomocná. Protože ani standard sloučeniny této skupiny izoprostanů nebylo možné získat, ale nebylo ani potřeba tuto skupinu sledovat, byla práce směřována ke studiu pouze tří typů izoprostanů.

Ačkoliv Micr-o-ToF mohl pracovat v pseudo-MS/MS modu (kolizně indukovaná fragmentace bez možnosti selekce prekurzoru) a v průběhu zpracování práce se zkušební analýza na něm ukázala velmi užitečnou, bylo pro finální analýzy vybíráno mezi hmotnostním spektrometrem s analyzátozem typu iontové pastí a trojitým kvadrupólem.

Výběr byl prováděn na základě srovnání spekter získaných přímou infúzí směsi izoprostanů připravené *in-vitro* s methanolem 1:50 (v/v) do elektrospreje hmotnostních spektrometrů a rovněž na základě porovnání chromatogramů získaných analýzou této směsi pomocí HPLC/MS. Již z přímé infúze byly patrné rozdíly mezi testovanými přístroji. Zatímco u hmotnostního spektrometru s analyzátozem QQQ byly dominantní píky o nižších m/z , hmotnostním spektrům z iontové pastí dominovaly píky vyšších poměrů m/z vzniklé odštěpením H_2O a CO_2 (viz obr. 57).



Obrázek 57: Porovnání fragmentace směsi stereoizomerů izoprostanů; Nahoře MS spektrum z ESI-QQQ MS, dole ESI-IT MS, zeleně označené jsou specifické fragmenty charakteristické pro různé typy izoprostanů, fialově fragmenty vzniklé odštěpením H₂O a CO₂

Tato ztráta vody a oxidu uhličitého je stejná pro všechny stereoizomery izoprostanů a není tedy nijak použitelná pro rozlišení typů těchto látek. Nižší intenzita specifických fragmentových píků na MS s iontovou pastí a s ní i související nižší citlivost oproti QQQ byla patrná i z chromatogramů z HPLC/MS analýz, při nichž byly sledovány jak prekurzorový iont, tak i vzniklé fragmenty za pomoci izoprostanových standardů. Pro výsledné stanovení izoprostanů byl tedy zvolen hmotnostní spektrometr s analyzátozem trojitým kvadrupólem.

9.2.2.2 *Optimalizace separace izoprostanů*

K optimalizaci stanovení izoprostanů pomocí HPLC/MS/MS byla použita směs izoprostanů připravená *in-vitro* s methanolem 1:50 (v/v) a standardy izoprostanů iPF_{2a}-III, 5-iPF_{2α}-VI a iPF_{2α}-IV o koncentracích 0,1 μg.ml⁻¹. Směs byla použita především pro optimalizaci separace stereoizomerů izoprostanů. Standardy byly využity k určení mezí detekce metodiky.

Jako výchozí byla použita metoda separace popsaná v článku Sicilia a kol. [193]. V něm autoři pro separaci izoprostanů použili mobilní fázi složenou z 0,1 M octanu amonného (složka A) a směsi ACN:methanol (složka B). V rámci testování mobilní fáze byla vyzkoušena náhrada octanu amonného mravenčanem amonným, který se považoval za rovněž vhodný pro separaci těchto látek. Náhrada se ukázala být přínosnou. Za stejných podmínek při srovnatelné separaci se při použití mravenčanu amonného téměř o dvojnásobek zvýšila intenzita izoprostanových píků. Nevýhodou použití mravenčanu amonného byla jeho menší eluční síla. Protože ale po celou dobu optimalizace byla snaha o zlepšení mezí detekce metodiky, vycházející ze stopového množství izoprostanů obsaženého v reálných vzorcích, byl jako složka mobilní fáze mravenčan amonný upřednostněn před octanem amonným.

V dalším kroku byl testován gradient a průtok mobilní fáze. V rámci experimentů se ukázalo, že s narůstajícím procentuálním obsahem methanolu ve směsi methanol:ACN se zvyšovala intenzita stanovovaných píků. Patrně dochází k lepší ionizaci izoprostanů v metanolu než v acetonitrilu, a to díky OH skupině, přítomné ve struktuře methanolu, která interaguje s izoprostanem a podílí se na jejich lepší ionizaci. ACN zase oproti methanolu vykazoval lepší separační účinky (To mj. bylo rovněž pozorováno při optimalizaci izolace izoprostanů SPE.). Výsledné složení mobilní fáze a její průtok byl zvolen na základě kompromisu mezi nejvýhodnějším poměrem citlivosti metodiky a separací izoprostanů. Protože i přes další experimenty, uvedené níže, se prokázaly tyto podmínky stanovení jako nejvhodnější, byly použity pro finální analýzy a jsou uvedeny v experimentální části.

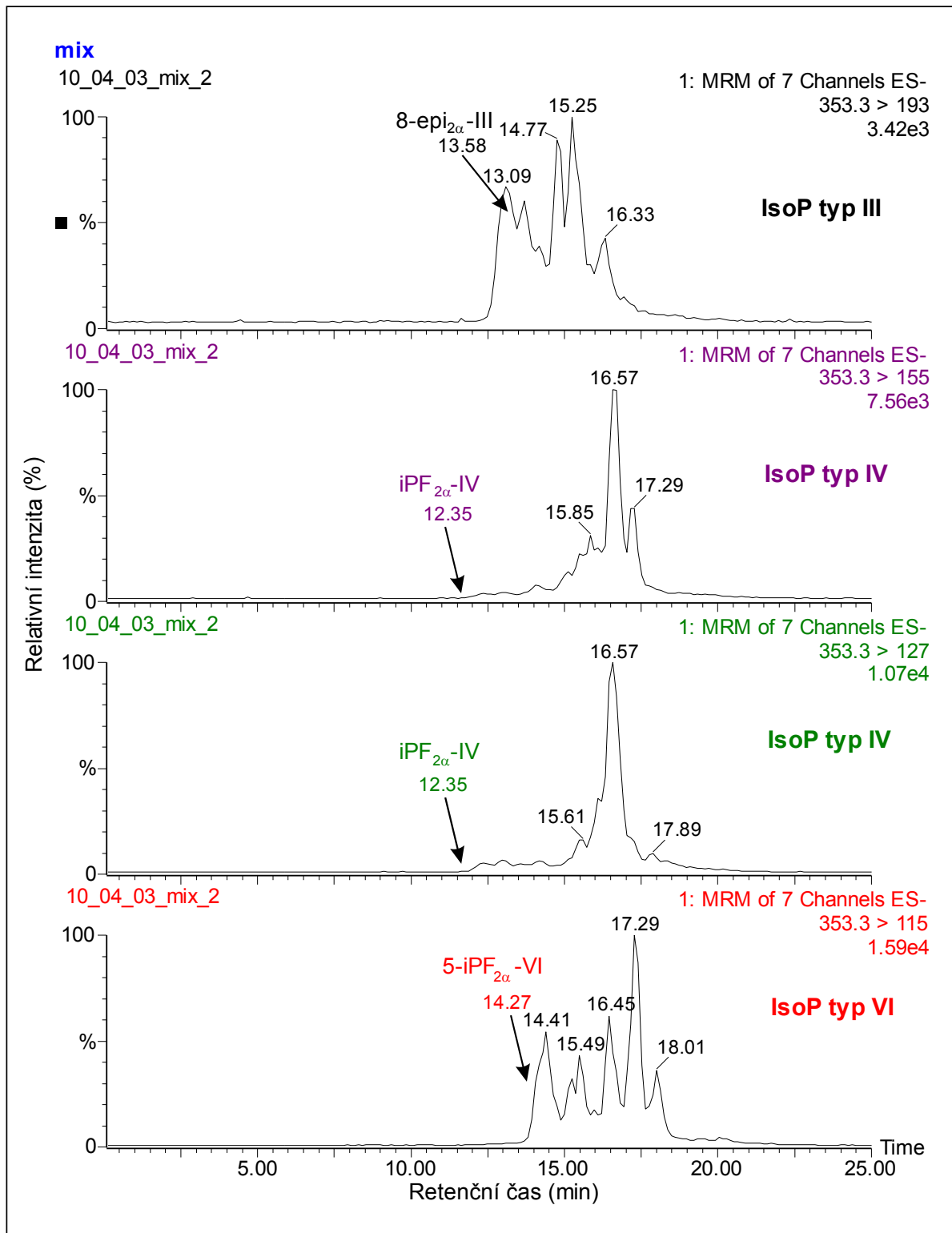
Testováno bylo rovněž pH mobilní fáze a to v pracovním rozsahu kolony, který byl 1,5 - 10. Bylo zjištěno, že pH mělo vliv pouze na intenzitu píků a separaci nijak neovlivňovalo. Optimem se ukázalo použití mobilní fáze o $\text{pH} = 3$. Při zvýšení nebo naopak snížení pH mobilní fáze docházelo k poklesu intenzity píků izoprostanů.

Protože hmotnostní spektrometr registroval spektra v negativním modu a pro ionizaci by bylo teoreticky vhodnější použít alkalickou mobilní fázi pro snížení šumu a tedy i zvýšení citlivosti metodiky, byly prováděny pokusy i v alkalické oblasti.

V rámci experimentování s mobilními fázemi byla vyzkoušena rovněž mobilní fáze s vodnou složkou 0,15 % hydroxidem amonným a organickou složkou totožnou jako v experimentu dřívějším, tedy acetonitrilem s methanolem. Za těchto podmínek nedocházelo na použité koloně k žádné separaci. Izoprostany byly eluovány v rámci jednoho píku. Izoprostany patrně v kyselém prostředí nedisociují a následně interagují se stacionární fází. V alkalickém prostředí jsou disociovány, k interakci nedochází, proto ani nedošlo k jejich separaci. V publikovaných metodikách, kde je použito alkalické mobilní fáze, obvykle má dominantní obsah její vodná složka, která pravděpodobně umožňuje separaci. Proto byly změněny počáteční podmínky ze 45 % na 94 % složky A (0,15 % hydroxid amonný) a z 55 % na 6 % složky B (ACN:methanol 1:20, v/v) s gradientem poklesu složky A na 79 %. Za těchto podmínek již k separaci izoprostanů došlo. Protože ale intenzita signálu se nevyrovnala původní metodice s mravenčanem amonným, bylo od dalšího experimentování v tomto směru upuštěno.

Poslední pokus s cílem dosáhnout co největší citlivosti metodiky byl prováděn opět s původní mobilní fází (mravenčan amonný, ACN, methanol). V něm měla být zaručena separace na koloně při kyselém pH a citlivost měla být zvýšena přidávkem amoniaku do mobilní fáze až po separaci na koloně. Amoniak (37 %, aq.) byl proto přidáván do mobilní fáze za kolonou s průtokem $5 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ těsně před vstupem do iontového zdroje. Navzdory očekávanému zvýšení ionizace došlo spíše k nepatrnému poklesu a to i při dalším zvýšení průtoku dodávaného amoniaku až k mezní hodnotě $20 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, kdy byla odezva stejná jako při použití prvního průtoku.

Praktická část tedy nepotvrdila očekávanou teorii, a proto původní metodika s mravenčanem amonným jako vodnou a methanolem s acetonitrilem jako organickou fází, uvedená v experimentální části, byla validována a následně použita pro výsledné analýzy.



Obrázek 58: Fragmentogramy směsi izoprostanů připravené *in-vitro* s vyznačenými píky v časech, kde jsou eluovány identifikované IsoP

9.3 Validace metody

Metoda byla ověřena pro kvantitativní analýzu testováním limitu detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), linearitou a testem opakovatelnosti.

LOD, LOQ a linearita byly stanoveny s použitím standardů iPF_{2α}-III o koncentraci $c = 1 \text{ mg.ml}^{-1}$; 5-iPF_{2α}-VI a iPF_{2α}-IV oba o koncentraci $c = 0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$.

Tabulka 10: Validace metody

Sloučenina	t _R (min)	LOD	LOQ	SD	Rovnice regrese	Koeficient determinace R ²
		ng.ml ⁻¹				
iPF _{2α} -III	13,58	134,9	449,7	53,8	$y = 1,197x$	0,9986
iPF _{2α} -IV (a)	12,35	154,4	514,6	124,4	$y = 2,418x + 51,638$	0,9980
iPF _{2α} -IV (b)	12,35	295,2	984,1	83,7	$y = 0,857x + 34,463$	0,9926
5-iPF _{2α} -VI	14,27	4,8	15,9	4,9	$y = 3,070x + 27,411$	0,9980

Pozn. a: m/z 353 → m/z 127, b: m/z 353 → m/z 155

Linearita byla prokázána v koncentračním rozsahu 150 – 3350 ng.ml⁻¹ pro iPF_{2α}-III, 30 – 1750 ng.ml⁻¹ pro iPF_{2α}-IV a 30 – 130 ng.ml⁻¹ pro 5-iPF_{2α}-VI (vyšší koncentrace testovány nebyly). Pro ověření linearity bylo testováno nejméně 6 koncentračních úrovní s třemi opakováními pro každou sloučeninu. Izoprostan iPF_{2α}-IV byl sledován a hodnocen pomocí fragmentací m/z 353 → m/z 155 a m/z 353 → m/z 127. Meze detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) se standardní odchylkou (SD) vypočtené z kalibrační přímky, rovnice regrese a koeficienty determinace R² jsou uvedeny v tabulce 1. Linearita byla hodnocena jako závislost plochy píku (y) na koncentraci analytu (x). Koeficient determinace R² byl shledán v rozmezí 0,9926 (iPF_{2α}-IV) po 0,9986 (iPF_{2α}-III), což prokazuje dobrou linearitu.

Protože ve finálním experimentu byly hodnoceny nejen izoprostany odvozené od kyseliny arachidonové, ale i další sloučeniny, u nichž byla pravděpodobnost, že jsou to produkty oxidace některé z dalších mastných kyselin v *Actinia equina* přítomných, byla pro test opakovatelnosti použita směs oxidačních produktů připravená oxidací 0,42 g tkání sasank *Actinia equina* (7 x 60 mg) v roztoku (NH₄)₂SO₄.FeSO₄.6H₂O o koncentraci 30 μmol.l⁻¹ po dobu 6 hodin, která byla před hydrolýzou kvantitativně rozdělena na sedm podílů. Výsledky

sumarizuje tabulka 2, v níž jsou uvedeny průměrné plochy stanovovaných píků neznámých sloučenin a izoprostanů typu III-VI se standardní relativní odchylkou uvedenou v procentech.

Tabulka 11: Opakovatelnost metody

Skupina IsoP	-	-	VI	IV	IV	III	-
m/z	351→115	351→155	353→115	353→127	353→155	353→193	353→155
t _R (min)	16,21	15,37	17,41	16,57	16,57	-	17,65
Ø plocha píku	1138,4	1213,4	263,3	460,0	341,2	ND	2927,0
RSD % (n=7)	6,0	11,4	5,3	9,4	11,5	-	7,1

Jako vnitřní standard, alespoň pro korekci nestability elektrospreje, byla použita 1 nM kyselina n-nonadekanová. Tato kyselina byla zvolena pro její absenci v testovaných organismech. Přidávána byla ke vzorkům až po extrakci tuhou fází, protože za podmínek extrakce by nebyla spolu s izoprostanem eluována (cílem SPE extrakce bylo oddělit IsoP od především mastných kyselin).

Daleko vhodnější by bylo použití deuterovaných izoprostanů, které jsou komerčně dostupné a které by mohly být kontrolou celého metodického postupu. Jejich značně vysoká cena, stejně jako vysoké ceny alternativních sloučenin jejich použití v tomto projektu znemožnily.

9.4 Stanovení izoprostanů v tkáních *Actinia equina*

Validovaná metoda byla použita pro sledování tvorby izoprostanů v tkáních *Actinia equina* v závislosti na změně teploty prostředí, ve kterém se testované organismy vyskytovaly. Pro tyto organismy mělo být zvýšení teploty iniciátorem oxidativního stresu.

Dále bylo použito doplňkové činidlo, které mělo vyvolávat oxidativní stres organismů, a tedy podpořit tvorbu izoprostanů v jejich tkání. Toto činidlo bylo přidáno pro srovnání do paralelních lázní v experimentech.

Pro iniciaci oxidativního stresu jsou nečastěji používány H₂O₂ a CCl₄ [171, 193, 195].

Peroxid vodíku se osvědčil při oxidaci tkání při optimalizaci přípravy vzorků k analýzám. Jeho nevýhodou je ale velmi rychlý rozklad na světlo. Při jeho použití by musela být neustále kontrolována koncentrace v akváriích, což bylo při 36 hodinovém a obzvláště pak několikadenním experimentu téměř nemožné. Publikováno bylo rovněž úspěšné použití *t*-butylhydroperoxidu a v dalším experimentu octanu měďného [165].

Nalezení vhodného činidla se v průběhu experimentů ukázalo být mírně problematické. Překážkou byla především mořská voda, ve které byly testované organismy chovány. Jedná se o složitý systém složený z rozpuštěných látek (především anorganické soli), se suspenzemi jak anorganickými (pevné a koloidní částice), tak biogenními (fytoplankton, zooplankton). Protože voda byla v experimentech odebírána z moře, měla pokaždé jinou distribuci těchto suspendovaných látek. Přidání jakéhokoliv činidla do tohoto systému (navíc pokaždé mírně odlišného) mohlo způsobit těžko předvídatelné reakce. Provedení experimentů s testovanými organismy v mořské vodě bylo ale nevyhnutelné. Varianta použití destilované nebo přečištěné vodovodní vody byla z důvodů osmotického tlaku vyloučena.

Teoreticky možné by byly teplotní experimenty prováděné „za sucha“. *Actinia equina* jsou schopny krátce přežít i bez vody (což je viditelné např. v době odlivu). Protože ale není jisté, jestli nepřítomnost vody nezpůsobuje rovněž oxidativní stress těchto organismů, a je otázkou, jak dlouho mohou bez vody žít, bylo od této varianty provedení experimentu upuštěno.

Jako doplňkové činidlo byla tedy pro finální experimenty zvolena Mohrova sůl. Ta byla v krátkodobém experimentu přidána vždy jen jedenkrát z počátku a v případě dlouhodobého experimentu obden při výměně mořské vody v akváriích.

9.4.1 Charakterizace stanovovaných látek

Kromě izoprostanů odvozených od kyseliny arachidonové byly sledovány další sloučeniny, které byly objeveny náhodně.

Při zkušebních analýzách předcházející finální byla provedena analýza tkání *Actinia equina* pomocí LC-MS/MS na hmotnostním spektrometru Micr-o-TOF. Tento hmotnostní spektrometr má fragmentor, v němž zvýšením napětí dochází k neřízené fragmentaci všech látek elujících se z chromatografické kolony. Překvapivým zjištěním bylo, že v některých retenčních časech, kdy byly z kolony eluovány izoprostany, byly specifické fragmenty m/z 155 a m/z 155 o vyšší intenzitě než sledovaný izoprostanový prekurzor m/z 353, což není teoreticky možné. Podrobnějším prozkoumáním chromatogramů vyšlo najevo, že tyto fragmenty, které měly shodné m/z s některými specifickými typy izoprostanů, mají stejné retenční časy jako neznámé sloučeniny s prekurzorem m/z 351 a m/z 381.

Vysvětlení bylo možných několik:

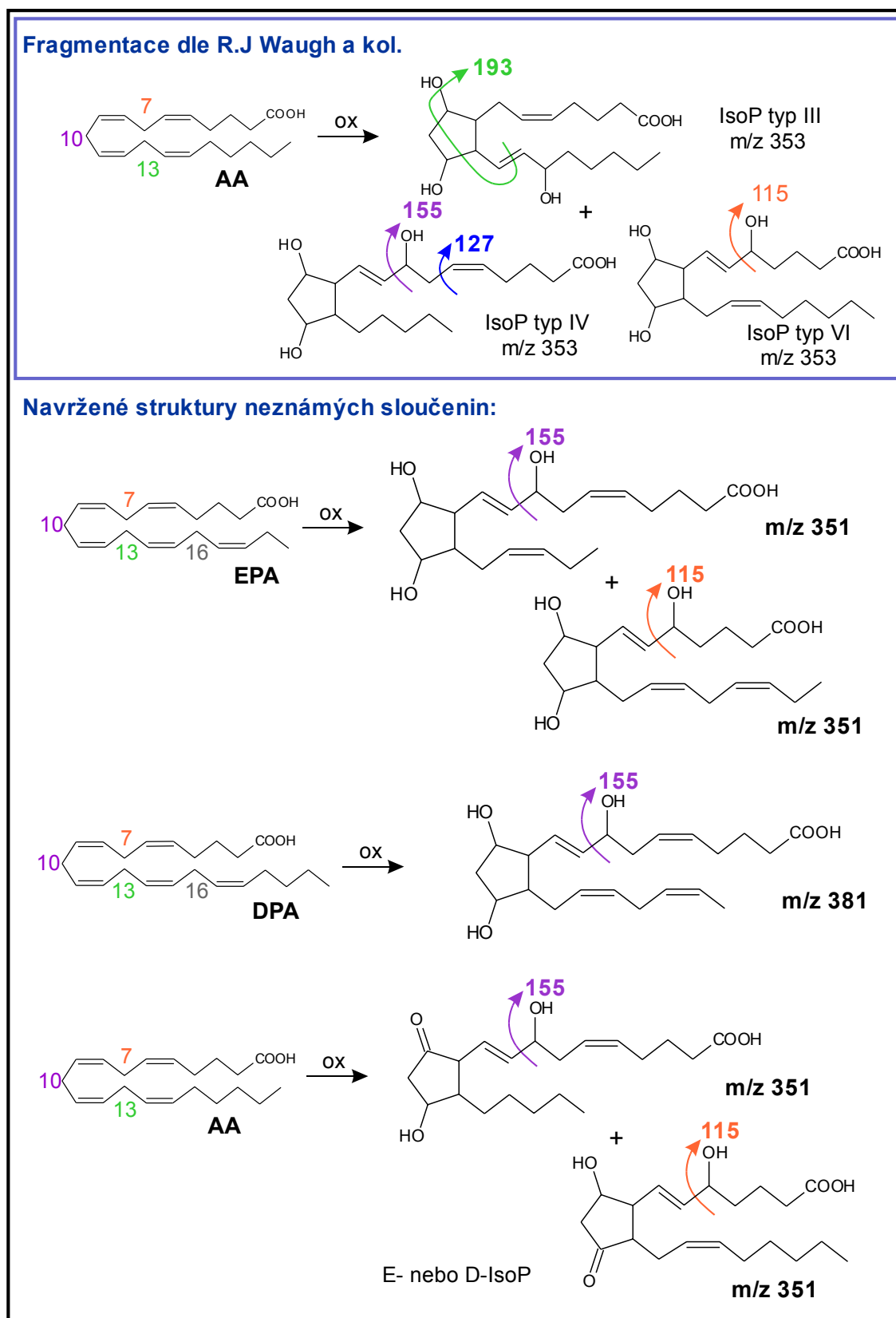
- Poměr m/z 351 přísluší keto-formě F-izoprostanů, tedy D-nebo E-izoprostanům. Protože fragment m/z 155 nepochází z části řetězce, kde je prostaglandinový kruh, a kde je tedy kyslík vázán dvojnou vazbou na uhlík, vznik tohoto fragmentu z D a E-forem izoprostanů

je možný (obr. 59). Nelze ovšem tímto způsobem objasnit vznik fragmentů s m/z 155 ze sloučenin s prekurzorem m/z 381.

- Druhým vysvětlením je, že se jedná se o izoprostany odvozené od jiných nenasycených mastných kyselin. Kyselina arachidonová není jediná nenasycená mastná kyselina obsažená ve tkáních *Actinia equina*. Z teorie je patrné, že sloučeniny s prostaglandinovým kruhem mohou být tvořeny reakcí iniciovanou volnými radikály z nenasycených mastných kyselin se třemi a více dvojnými vazbami, vhodně na řetězci umístěnými. Fragment o m/z 155 pochází z řetězce sloučeniny s karboxylovou skupinou v izoprostanech typu IV (viz obrázek 59). Tento typ izoprostanů vzniká atakem volných radikálů na uhlík C10 mezi druhou a třetí dvojnou vazbou, počítáno od COOH. Stejný fragment může mít izoprostan, který vznikl atakem na jakoukoliv nenasycenou kyselinu, která má dvojně vazby mezi uhlíky C5 a C6, C8 a C9 a C11 a C12. Tuto podmínku splňuje např. kyselina 5,8,11,14,17-eikosapentaenová C20:5 (EPA), která se od kyseliny arachidonové liší jednou dvojnou vazbou v řetězci navíc, a kyselina 5,8,11,14,17-dokosapentaenová C22:5 (DPA) lišící se navíc délkou řetězce. Z těchto nenasycených mastných kyselin tedy mohou oxidací vzniknout izoprostany, které mohou fragmentovat obdobně jako izoprostany typu IV. Z EPA může vzniknout izoprostan s počtem dvojných vazeb o jednu menším, než jsou ty odvozené od arachidonové kyseliny, tedy s m/z 351, a protože DPA je o dva uhlíky delší než AA, budou i izoprostany z ní odvozené mít C22 namísto C20, tedy m/z 381. Obdobně pak z EPA lze peroxidací připravit izoprostan, který může mít fragment totožný s IsoP typu IV, odvozeného od AA (viz obr. 59).
- Třetím zdůvodněním, nejméně pravděpodobným je, že se jedná o neznámé látky, které mají stejné prekurzory, jako by měly izoprostany odvozené od výše uvedených mastných kyselin, a stejné fragmenty a mají i podobné chromatografické vlastnosti jako námi studované látky, ale nejedná se o sloučeniny ze skupiny látek podobných prostaglandinům.

I přes nejasnost, o jaké látky se jedná, byly jejich prekurzory a fragmenty do finální metodiky přidány. V experimentech byly dále označovány zkratkou NS (neznámé sloučeniny).

Seznam hodnocených sloučenin ve finálních experimentech sumarizuje tabulka 12. Vybrán byl vždy pík s nejvyšší odezvou na detektoru pro každý typ izoprostanů. V případě m/z 351 → m/z 155 byla kromě nejvyššího píku rovněž hodnocena suma ploch píků v pevně daném rozmezí retenčních časů.



Obrázek 59: Nenasycené mastné kyseliny a jejich oxidační produkty (izoprostany), které by mohly mít prekurzory a fragmenty odpovídající náhodně objeveným, a které byly dále studovány.

Ze skupiny izoprostanů typu III, pro které je charakteristická fragmentace m/z 353 \rightarrow m/z 193, nebyl v alkalických hydrolyzátech tkání *Actinia equiena* detekován žádný stereoisomer, a to shodně ve všech experimentech. To může být dáno nižší odezvou sloučenin této skupiny na detektoru hmotnostního spektrometru, patrně z LOD zástupce $iPF_{2\alpha}$ -III .

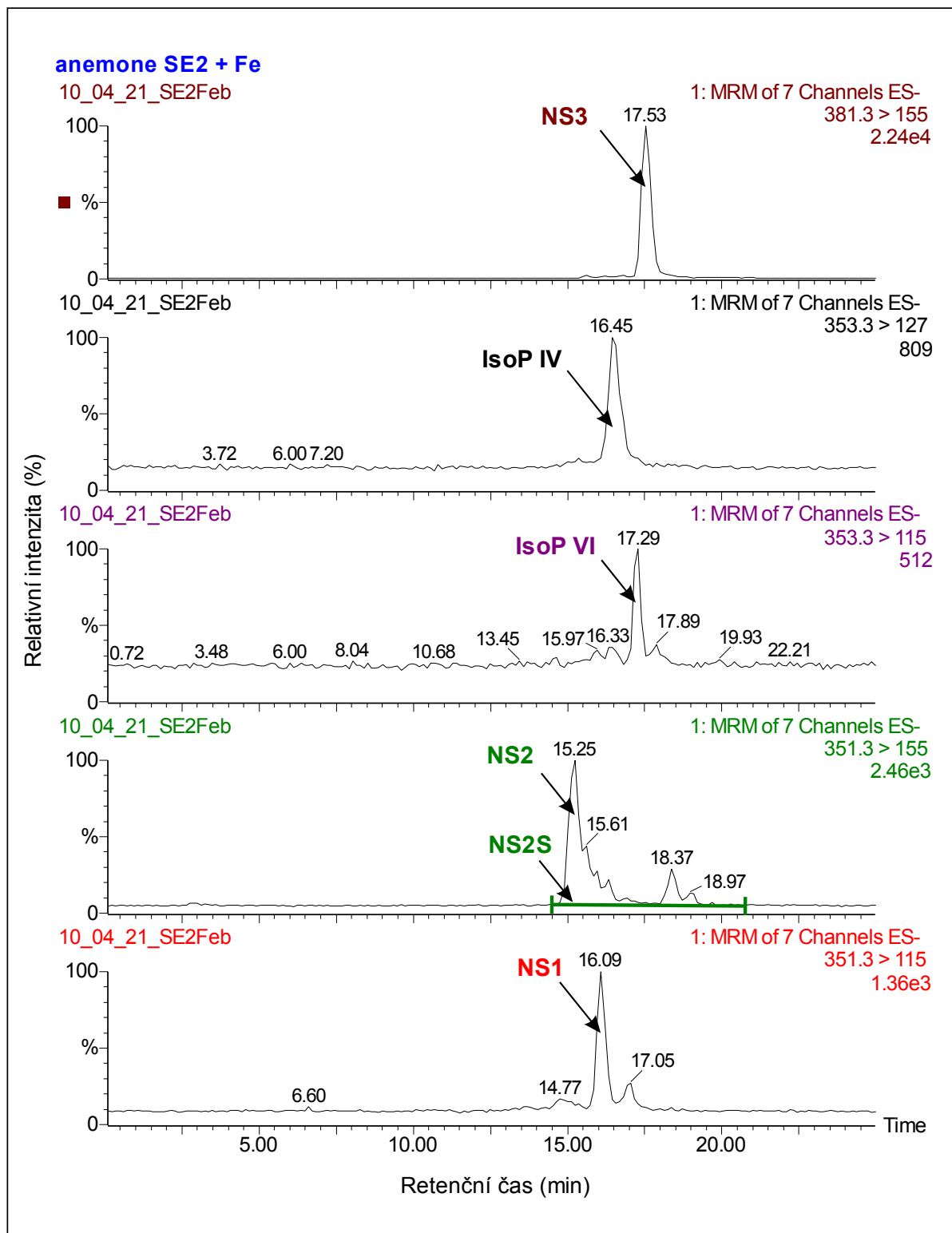
Rovněž izoprostany 5- $iPF_{2\alpha}$ -VI a $iPF_{2\alpha}$ -IV nebyly v žádném z experimentů detekovány, hodnoceny byly proto jiné sloučeniny z této skupiny.

Typ IV byl monitorován jak na fragmentu m/z 155, tak na m/z 127. Důvodem k tomuto rozhodnutí bylo zjištění, že odezva směsi izoprostanů připravených *in-vitro* z arachidonové kyseliny v počátečních pracích nebyla pro oba fragmenty totožná a bylo možné najít pozitiva pro hodnocení obou. Na fragmentu m/z 155 bylo detekováno více látek. Naproti tomu ale směrnice kalibrační křivky iPF_2 -IV je vyšší pro fragment m/z 127 než m/z 155. Rovněž publikace se ve výběru neshodují, v některých pracích je hodnocen m/z 155, jinde m/z 127. Byly proto hodnoceny oba.

V závěru této části je rovněž důležité uvést, že každý sledovaný pík nemusí být konkrétním stereoisomerem, ale může se jednat, a s velkou pravděpodobností se i jedná, o směs třeba i několika stereoisomerů jednoho typu. Na tento fakt byl brán zřetel i v průběhu vyhodnocování experimentů, kdy bylo kontrolováno, zdali se v celém průběhu analýz tvar hodnocených píků v chromatogramech nemění. Tak bylo docíleno toho, že hodnocen byl buďto konkrétní stereoizomer, nebo vždy stejná skupina více sloučenin.

Tabulka 12: Seznam sledovaných látek

Prekurzor	Fragment	t_R (min)	Identita	Označení
351	115	16,09	neznámá	NS1
351	155	15,25	neznámá	NS2
351	155	14,30 – 23,50	neznámá	NS2S
353	115	17,29	IsoP typ VI	IsoP VI
353	155	16,45	IsoP typ IV	IsoP IV
353	127	16,45	IsoP typ IV	IsoP IV
353	193	-	IsoP typ III	IsoP III
381	155	17,53	neznámá	NS3



Obrázek 60: Fragmentogram IsoP a NS; vzorek tkání *Actinie equina* z teplotního experimentu E s vyznačenými hodnocenými píky

9.4.2 Krátkodobý experiment

U krátkodobého experimentu bylo cílem zjistit, zda vlivem intenzivního zvýšení teploty dochází ke změně množství izoprostanů a NS v tkáních. Provedení experimentu bylo navrženo tak, aby některé testované organismy byly vystaveny pozvolně se zvyšující teplotě (experimenty B, C a E) a jiné organismy „teplotnímu šoku“ (experimenty A, D a obzvláště F) výrazně větší změnou teploty prostředí, ve kterém se vyskytovaly.

Sledována byla hladina izoprostanů a NS v testovaných organismech vyjádřená normalizovanou plochou píků (osy y) v závislosti na čase (osy x). V případě grafů 1 – 5 byla jako 100 % použita největší plocha píku (shodně v čase $t = 36$ h), k níž pak byly procentuálně vztahovány ostatní plochy, a to vždy pro každé m/z zvlášť. U grafů 6 a 7 byla vybrána nejvyšší plocha píku pro všechny experimenty (shodně experiment F, v čase $t = 36$ h), k níž pak byly procentuálně vztahovány všechny ostatní píky.

Tkáň byla odebírána ze stejných organismů v průběhu každého dílčího experimentu celkem 4 x ($t = 12, 14, 18$ a 36 hodin), což bylo z důvodu velikosti testovaných organismů maximum. Jako hodnota v čase $t = 0$ byla použita hladina IsoP a NS stanovená v tkáních organismů volně žijících v moři.

Z důvodu velikosti organismů, jejich počtu a časové náročnosti experimentu nebylo možné odebrat v jednom časovém bodě experimentu více vzorků pro stanovení průměrné hodnoty a relativní odchylky.

9.4.2.1 Srovnání odezvy IsoP a NS mezi sebou

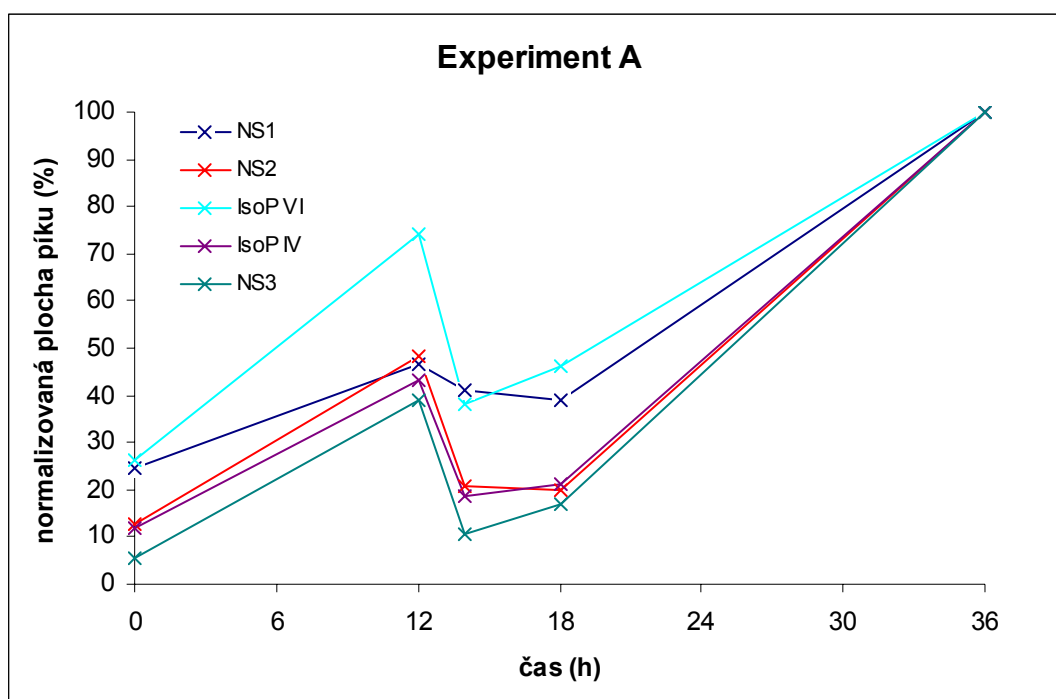
V první sérii grafů byla vynesena časová změna hladiny všech stanovovaných IsoP a NS v rámci každého dílčího experimentu (A, B, C, D, E i F). Cílem bylo objasnění, zda dojde ke změně hladin těchto stanovovaných látek vlivem vystavení organismu podmínkám způsobujícím oxidativní stres, a jestli tato změna bude pro všechny typy látek stejná. V případě rozdílu v odezvách by následně byly vybrány nejvhodnější sloučeniny k pozorování. Vybrané grafy jsou uvedeny níže (graf 1 –3).

Z grafických závislostí je patrné, že časový průběh tvorby všech stanovovaných látek, tedy i těch neznámých, je v rámci každého dílčího experimentu podobný. Rozdílnost byla sledována

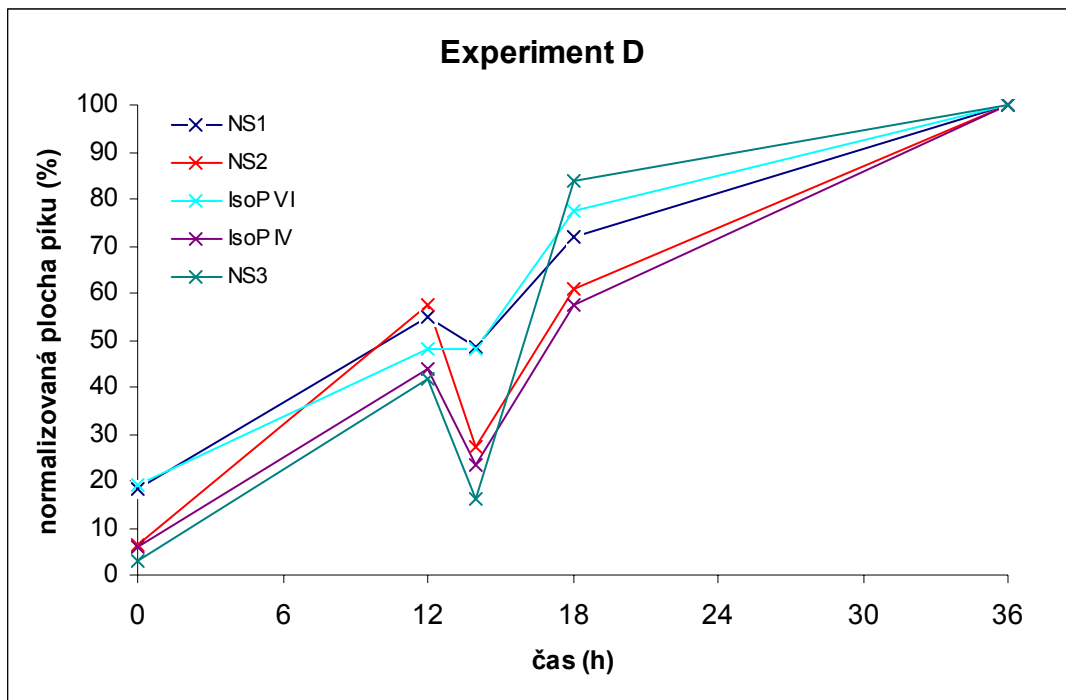
mezi samotnými experimenty. Zatímco v A, B, D a F dochází po nárůstu hladiny IsoP a NS k jejímu poklesu a pak opětovnému nárůstu, průběh C a E je pouze rostoucí.

S výjimkou B průběhy korelují s navržením experimentu, popsaného výše, kdy sasanky v A, D a F byly vystaveny „teplotnímu šoku“ přenesením ze studeného moře (7 °C) do prostředí vysoké teploty a vzorky z nich byly odebírány hned druhý den ráno. Organismy v C a E byly vystaveny více teplotám, včetně finální 29 °C, a tedy i tkáně z nich byly odebírány až v časovém odstupu.

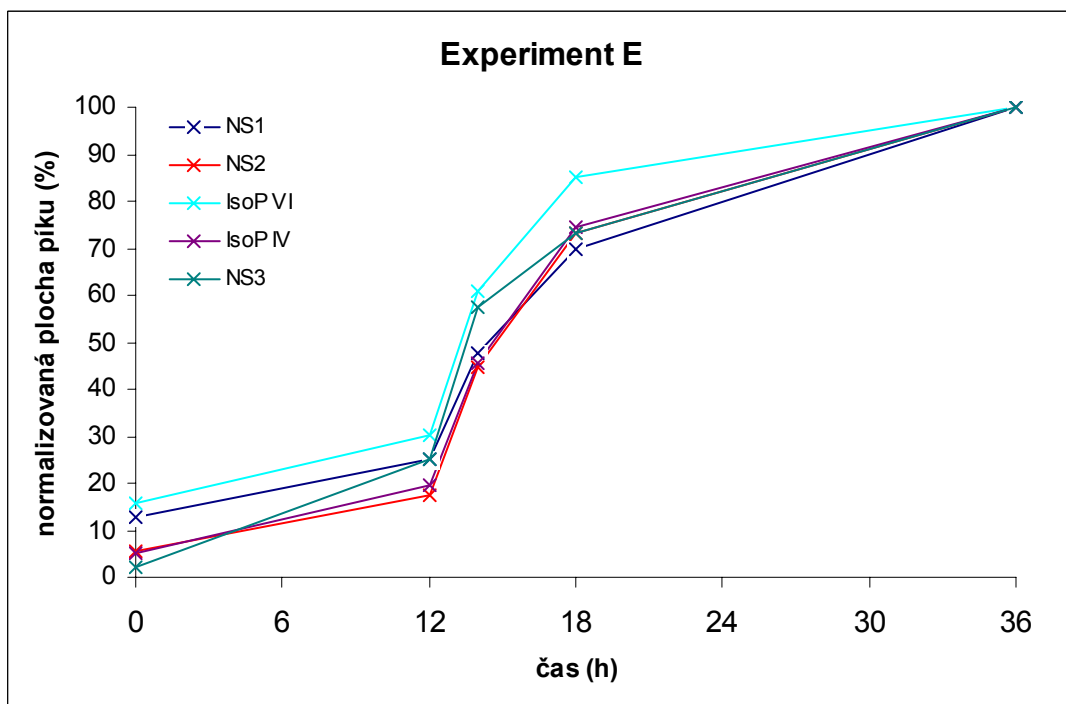
Již z těchto výsledků je patrné, že ke změně hladin izoprostanů vlivem oxidativního stresu dochází. Rovněž proto, že neznámé sloučeniny ukazují obdobnou odezvu jako izoprostanty, se lze domnívat, že se bude jednat rovněž o sloučeniny úzce související s oxidativním stresem.



Graf 1: Časový průběh tvorby IsoP a NS v experimentu A



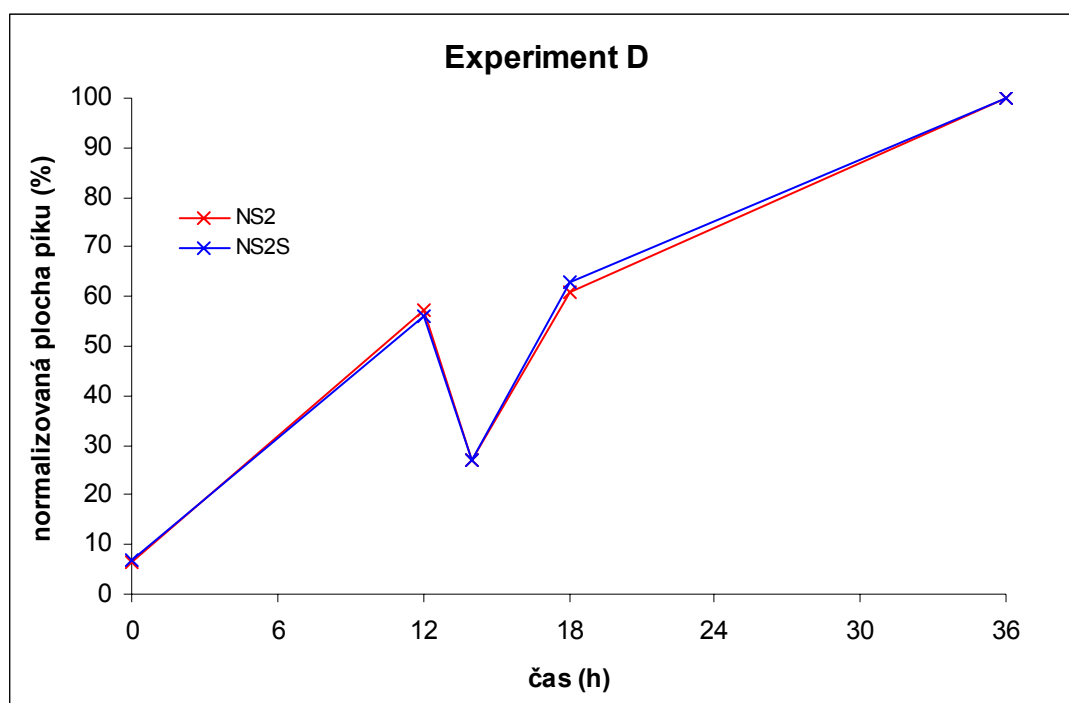
Graf 2: Časový průběh tvorby IsoP a NS v experimentu D



Graf 3: Časový průběh tvorby IsoP a NS v experimentu E

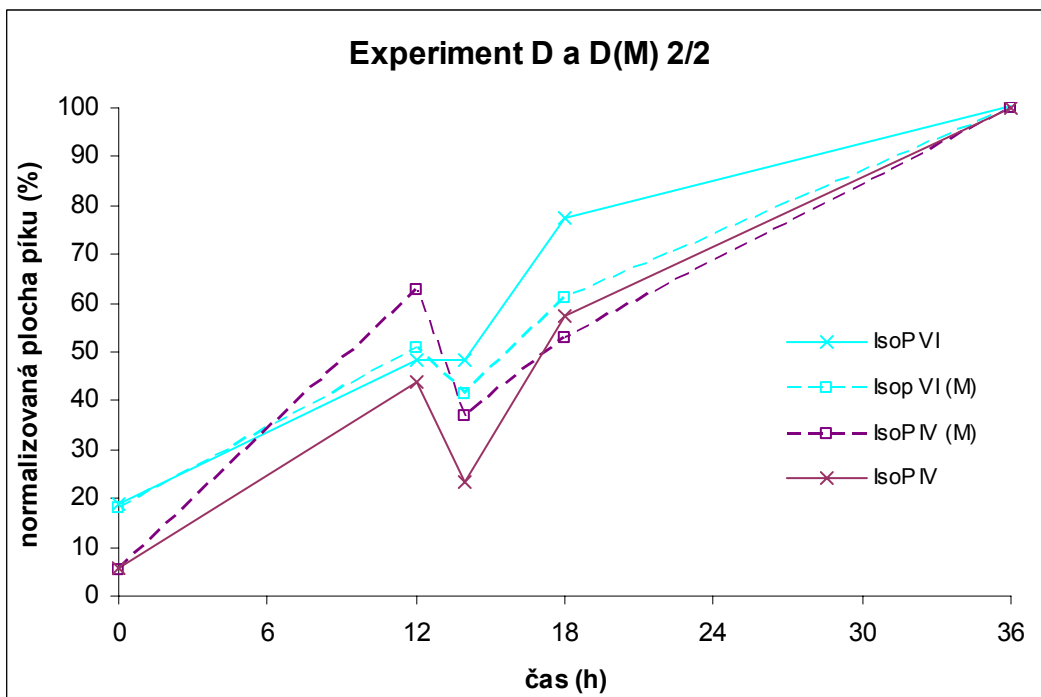
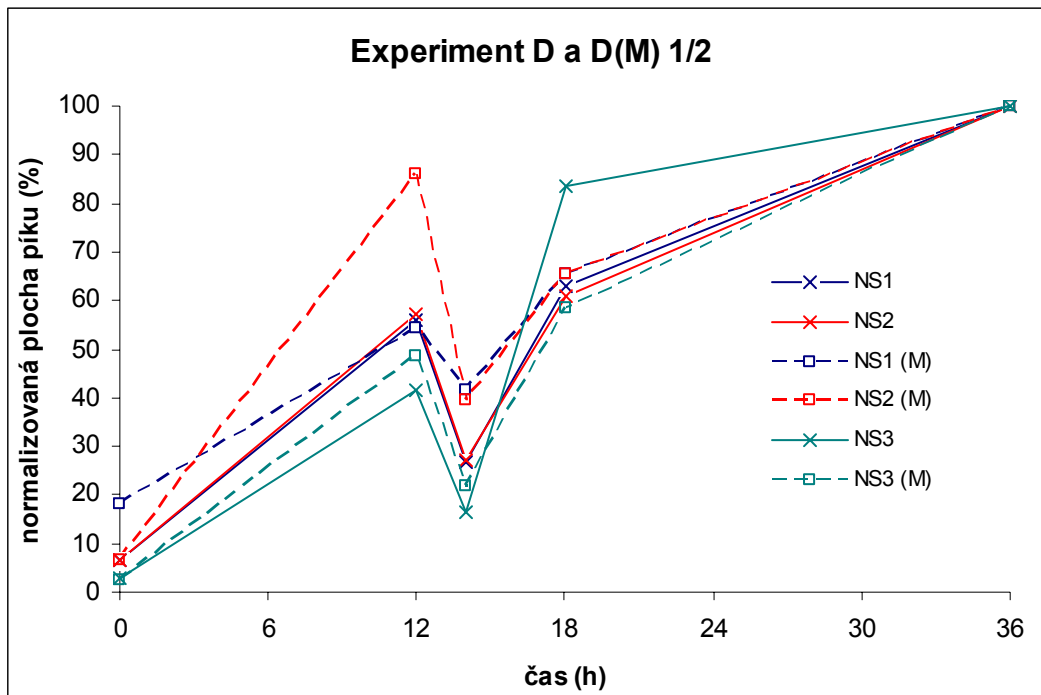
Jak ukazuje tabulka 12, bylo hodnoceno více látek, než je v grafech znázorněno. Do grafů v dizertační práci nebyly vkládány všechny stanovované sloučeniny, protože všechny měly obdobný průběh a bylo zbytečné jejich přítomností snižovat přehlednost grafu.

V Grafu 4 je vynesena téměř identická časová závislost tvorby neznámé látky NS2 monitorované na m/z 351 \rightarrow m/z 155 a suma všech detekovaných látek s tímto prekurzorem a fragmentem. Tato shoda ukazuje, že všechny detekované stereoizomery byly tvořeny vlivem oxidativního stresu přibližně se stejným příspěvkem v průběhu celého experimentu. Hlavní pík o $t_R = 15,25$ min tvořil zhruba 30 % plochy sumy všech píků. Suma ploch sloučenin NS2S2 byla spolu s plochou píku NS2 porovnávána pro všechny dílčí experimenty (A-F). U všech vyšla obdobně jako u D.



Graf 4: Srovnání průběhu tvorby NS2 a sumy sloučenin NS2S2

Rovněž nebyla v grafech znázorněna časová závislost tvorby izoprostanů o prekurzoru m/z 353 a fragmentu m/z 155. Jak je uvedeno výše, některé izoprostany typu IV je možné sledovat nejenom na fragmentu m/z 155, ale i na fragmentu m/z 127. Protože i v této práci hodnocený nejvyšší pík bylo možné sledovat na obou z nich, byl poměr m/z 127 před m/z 155 z důvodů větší intenzity píku upřednostněn a hodnocen pouze on.



Graf 5: Srovnání tvorby IsoP a NS v experimentu D s akváriem s přidaným $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (přerušované křivky s body značenými čtverci) a bez něj (plné křivky s body značenými křížky)

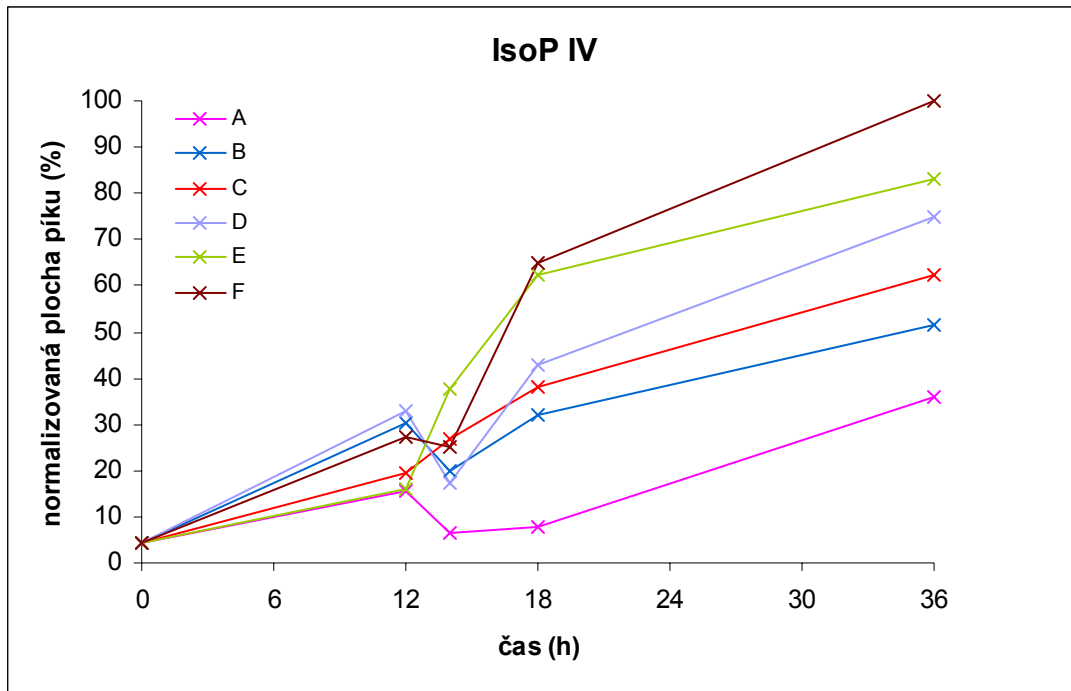
Průběhy tvorby izoprostanů a NS byly shodné jak pro organismy, které byly vystaveny pouze teplotnímu stresu, tak pro organismy, kde byla navíc přidána i Mohrova sůl. Výrazné ovlivnění tvorby stanovovaných látek tímto činidlem nebylo pozorováno, a to shodně pro všechny experimenty (A až F). Na základě naměřených dat není možno posoudit, zda přítomnost této sloučeniny v akváriu tvorbu IsoP a NS v organismech katalyzovala, zbrzdila, nebo na reakci vliv neměla, viz graf 5.

9.4.2.2 Srovnání výsledků dílčích experimentů mezi sebou

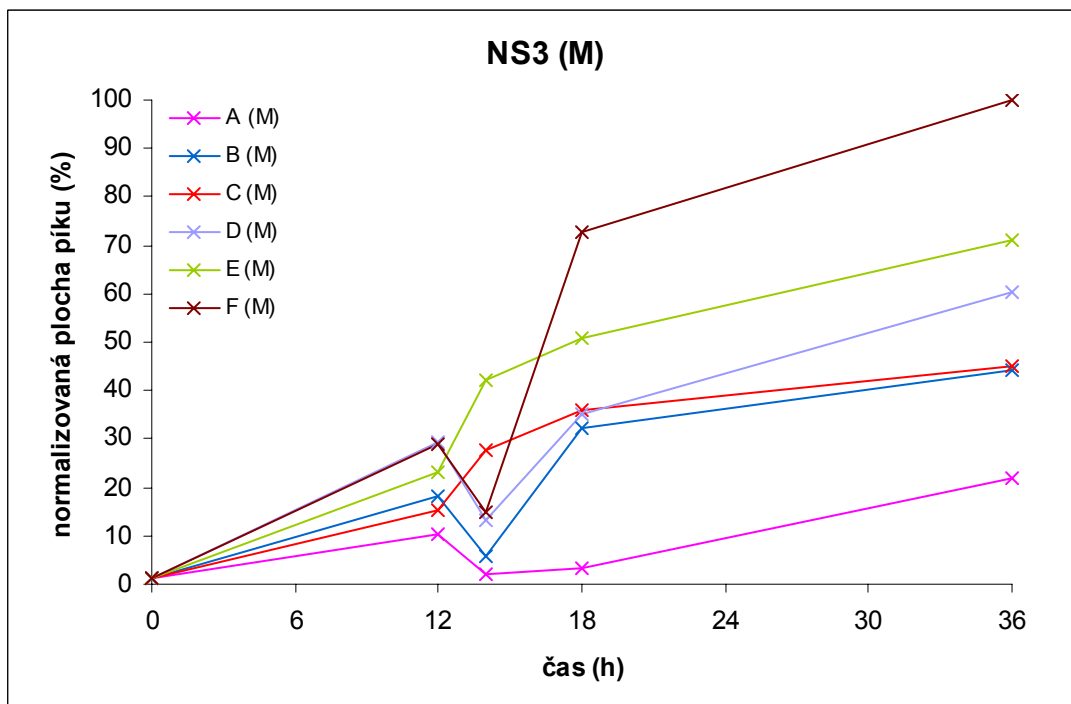
Pro zjištění, zda dochází vlivem zvýšení teploty ke zvýšení tvorby izoprostanů a NS v organismech, byly sestrojeny další grafy.

V nich byly vyneseny plochy píků vždy jediného fragmentu pro všechny dílčí experimenty v rámci jednoho grafu. Například časovou změnu hladiny IsoP typu IV a NS3 v průběhu experimentů A - F zobrazují grafy 6 a 7.

Ze závislostí je patrné, že k nejnižší produkci stanovovaných látek došlo za podmínek experimentu A, kdy byly organismy vystaveny nanejvýše 15 °C, a nejvyšší tvorba těchto látek byla nalezena při experimentu F, kdy teplota lázně, v níž byly organismy chovány, byla 29 °C. Tím byl prokázán vliv teploty na množství sloučenin, které vznikají vlivem oxidativního stresu. Se vzrůstající teplotou prostředí dochází ke vzrůstající tvorbě izoprostanů a NS.



Graf 6: Srovnání časové tvorby IsoP IV v různých experimentech o různých teplotách



Graf 7: Srovnání časové tvorby NS3 v různých experimentech s lázní s přidanou Mohrovou solí v různých experimentech o různých teplotách

9.4.3 Dlouhodobý experiment

Cílem tzv. dlouhodobého experimentu bylo ověření stability množství izoprostanů a NS v textovaných organismech *Actinia equina* v delším časovém horizontu.

Pro tento experiment byli jedinci přeneseni z moře o teplotě vody 7 °C do dvou akvárií v laboratoři o teplotě 19 ± 1 °C. Tato teplota byla udržována po celou dobu experimentu. Do jednoho z akvárií byla, obdobně jako v krátkodobém experimentu, přidána Mohrova sůl o finální koncentraci $c = 30 \mu\text{M}$.

Normalizované plochy píků izoprostanů a NS stanovené ve tkáních testovaných korálnatců byly vyneseny do grafu 8. Normalizace byla provedena na největší plochu píku sloučeniny v libovolném čase, vybrané ze všech monitorovaných látek vyjma NS3 (tedy z NS1, NS2, IsoP IV a IsoP VI) z obou experimentů, jak s přidavkem Mohrovy soli, tak bez ní. Tou byla relativní plocha píku NS2 v čase $t = 2$ h izolované z tkáně organismů chovaných v lázni bez přidavku činidla. Jí byla přidělena hodnota 100% a k ní byly následně vztahovány všechny ostatní experimentálně stanovené plochy píků všech markerů vyjma NS2.

Normalizace všech experimentálně získaných ploch píků NS3 byla provedena na největší plochu píku pouze v rámci tohoto markeru, tedy na NS3 v čase $t = 2$ hod. Důvodem byla o jeden řád větší plocha píků sloučenin této skupiny oproti dalším stanovovaným sloučeninám. Normalizací ploch píků všech ostatních sloučenin k nejvyšší ploše píku NS3 by došlo k získání všech hodnot menší než 20 %, což by značně znehodnotilo grafické znázornění.

Na základě výsledků krátkodobého experimentu byly vyneseny pouze vybrané poměry m/z . Nepřerušovaná čára v grafu znázorňuje sloučeniny izolované z tkání *Actinia equina* z akvária bez přidané Mohrovy soli, přerušovaná křivka byla získána analýzou izoprostanů a NS přítomných v tkáních organismů chovaných v akváriích s přidaným činidlem.

Protože v každém čase byly odebrány vždy tři vzorky, byla stanovena i jejich relativní směrodatná odchylka.

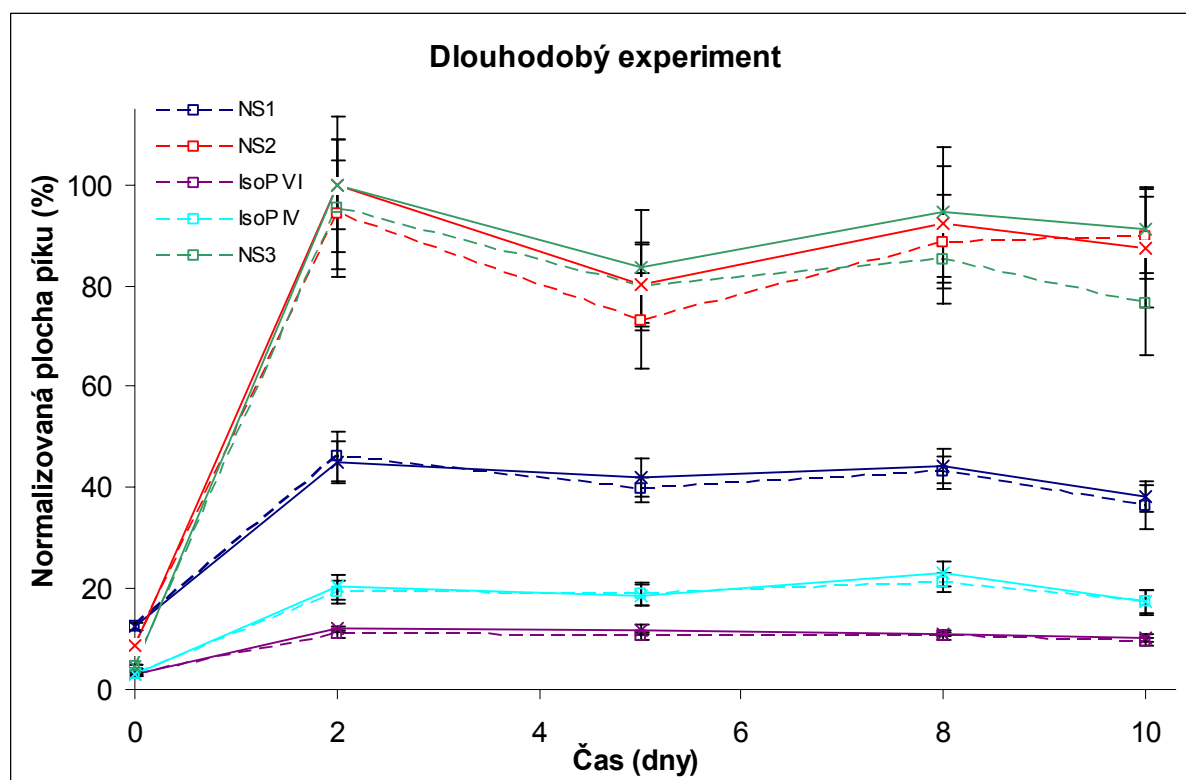
Obdobně jako v krátkodobém experimentu byla z „tkáňově úsporných důvodů“ jako hodnota v čase $t = 0$ použita hladina IsoP a NS stanovená z tkání organismů volně žijících v moři.

Pro všechny odběry vyjma času $t = 0$ byla pro každé m/z byla stanovena průměrná plocha píků a standardní relativní odchylka. Ta byla pro v rozmezí $\text{RSD} \% = 6,9$ (IsoP VI) až 14,32 (NS2). % standardní relativní odchylky stanovené v dlouhodobém experimentu jsou tedy jen

o málo vyšší než stanovené % RSD opakovatelnosti. Z toho lze usuzovat, že v rámci dlouhodobého experimentu nedocházelo k změnám hladin IsoP a NS v tkáních organismů, vyjma prvotního nárůstu při přenesení organismů z chladného moře do lázni o laboratorní teplotě.

V grafech byly rovněž zobrazeny rovnice lineární regrese ($y = ax + q$). Pro všechny m/z tyto měly zápornou hodnotu koeficientu x , a to v rozmezí od -0,13 (NS2 M) po -11,6 (NS2), což poukazuje na slabý pokles hladiny izoprostanů a NS ve tkáních testovaných organismů. To by mohlo mít dvě vysvětlení:

- První, že po prvotním „teplotním šoku“, změnou prostředí ze 7 °C na více než dvojnásobnou teplotu, dochází k adaptaci organismů na vyšší teplotu a tím k menší produkci markerů oxidativního stresu
- Druhé, že pouze 10 denní měření je nedostatečné a až při delším sledování by se projevila stabilita hladiny stanovovaných látek ve tkáních testovaných organismů.



Graf 8: Srovnání časové tvorby IsoP a NS ve dlouhodobém experimentu; plné čáry znázorňují hladiny IsoP a NS v organismech chovaných v nádržích bez přidaného činidla, přerušované čáry hladiny těchto látek v akváriu s přidanou Mohrovou solí

Normalizací ploch píků na jedinou hodnotu získáme graf, ze kterého je patrná nejen časová nestabilita hladiny monitorovaných látek, ale je zachován i poměr hladin jednotlivých sloučenin. Z grafu 8 je tedy mj. patrné, že nejmenší plochy píků měla sloučenina IsoP VI, a nejvyšší NS3 a NS2.

Rovněž je vhodné normalizovat na jednu společnou hodnotu jak experiment s přidaným činidlem – Mohrovou solí, tak i bez něj. Získá se tím tak možnost porovnání vlivu přídavku činidla na hladinu IsoP a NS. Z Grafu 8 je patrné, že obecně menší množství IsoP a NS bylo izolováno ze tkání *Actinia equina*, které byly chovány v nádržích s přidanou Mohrovou solí (přerušovaná čára).

9.4.4 Kvantifikace izoprostanů ve tkáních *Actinia equina*

Kvantifikace izoprostanů IsoP IV a IsoP VI ve tkáních studovaných organismů byla provedena metodou externí kalibrace za použití standardů iPF_{2α}-IV a 5-iPF_{2α}-VI. Volba vycházela z pravděpodobnosti shodné odezvy detektoru v případě stereoizomerů v rámci skupiny jednoho typu izoprostanu a z komerční nedostupnosti jiných sloučenin.

Kvantifikovány byly izoprostany typu IV a VI v krátkodobém (tabulky 13 – 16) a dlouhodobém experimentu (tabulky 17 a 18), izolované z organismů chovaných v akváriích bez přidaného činidla a s přidaným činidlem (značené X(M)). Rovněž byla provedena kvantifikace IsoP IV a IsoP VI ve tkáních, které byly odebrány z organismů *Actinia equina* volně žijících v moři (tabulka 19).

Index n značí počet odebraných vzorků. V případě většího počtu odebraných vzorků je v tabulkách uvedena průměrná výsledná hodnota stanovení, včetně směrodatné odchylky (SD).

Tabulka 13: Množství IsoP IV ve tkáních *Actinia equina* v krátkodobém experimentu

Čas (h)	Experiment / Koncentrace IsoP IV (ng.g ⁻¹ tkáně), n = 1					
	A	B	C	D	E	F
12	17,6	44,5	24,5	48,8	18,7	38,8
14	1,4	25,3	38,1	20,7	57,7	34,4
18	3,0	47,2	58,6	67,2	102,0	106,6
36	54,5	83,0	102,4	124,8	140,3	170,5

Tabulka 14: Množství IsoP IV ve tkáních *Actinia equina* v krátkodobém experimentu chovaných v akváriu s přidáním Mohrovou soli

Čas (h)	Experiment / Koncentrace IsoP IV (ng.g ⁻¹ tkáně), n = 1					
	A(M)	B(M)	C(M)	D(M)	E(M)	F(M)
12	18,9	30,2	18,5	81,6	36,5	56,7
14	1,7	15,4	48,7	43,1	85,3	30,4
18	2,5	45,4	74,5	67,1	122,7	145,2
36	28,2	93,6	100,0	135,9	151,9	193,4

Tabulka 15: Množství IsoP VI ve tkáních *Actinia equina* v krátkodobém experimentu

Čas (h)	Experiment / Koncentrace IsoP VI (ng.g ⁻¹ tkáně), n = 1					
	A	B	C	D	E	F
12	11,7	15,5	9,2	10,0	6,4	4,0
14	4,0	7,5	9,9	10,0	17,4	7,6
18	5,6	14,4	13,5	18,7	26,0	27,8
36	17,3	20,5	22,4	25,6	31,4	33,8

Tabulka 16: Množství IsoP VI ve tkáních *Actinia equina* v krátkodobém experimentu chovaných v akváriu s přidáním Mohrovou soli

Čas (h)	Experiment / Koncentrace IsoP VI (ng.g ⁻¹ tkáně), n = 1					
	A(M)	B(M)	C(M)	D(M)	E(M)	F(M)
12	7,1	8,6	8,7	11,4	10,7	23,5
14	5,3	9,7	15,3	8,6	20,3	9,1
18	8,1	18,0	19,2	14,7	26,3	45,2
36	12,6	23,1	24,0	26,9	33,3	58,9

Tabulka 17: Množství IsoP IV ve tkáních *Actinia equina* v dlouhodobém experimentu chovaných v akváriu bez a s přidáním Mohrovou soli

Čas (dny)	Experiment / Koncentrace IsoP IV (ng.g ⁻¹ tkáně), n = 3			
	L	SD L (±)	L(M)	SD L(M) (±)
2	18,9	2,0	18,1	1,9
5	17,8	1,9	17,9	1,9
8	19,3	2,1	18,7	2,0
10	15,7	1,7	15,7	1,8

Tabulka 18: Množství IsoP VI ve tkáních *Actinia equina* v dlouhodobém experimentu chovaných v akváriu bez a s přidáním Mohrovou soli

Čas (dny)	Experiment / Koncentrace IsoP VI (ng.g ⁻¹ tkáně), n = 3			
	L	SD L (±)	L(M)	SD L(M) (±)
2	11,7	1,5	10,4	1,4
5	10,5	1,4	9,8	1,3
8	9,9	1,3	10,6	1,4
10	8,1	1,0	8,2	1,1

Tabulka 19: Množství IsoP IV a IsoP VI ve tkáních *Actinia equina* volně žijících v moři

Koncentrace IsoP (ng.g ⁻¹ tkáně), n = 6		
Izoprostan	Konc.	SD (±)
IsoP IV	2,5	0,3
IsoP VI	2,1	0,2

10 SHRNU TÍ A ZÁVĚR

Cílem druhé části dizertační práce bylo ověření možnosti využití izoprostanů, markerů oxidativního stresu, rutinně stanovovaných u savců, ke sledování oxidativního – environmentálního stresu korálnatců, konkrétně sasanek *Actinia equina*.

Prvním krokem k dosažení cíle bylo vytvoření analytické metody pro stanovení izoprostanů ve studovaných organismech. Pro tyto účely byla nejprve připravena *in-vitro* směs izoprostanů z kyseliny arachidonové. Použity byly dva principiálně odlišné postupy; první – modifikovaná Fentonova reakce, druhý – autooxidace nenasycené mastné kyseliny. Oběma způsoby se směs izoprostanů podařilo připravit.

Optimalizace postupu stanovení pomocí HPLC/MS/MS byla zahájena výběrem hmotnostního spektrometru. K dispozici byly tři hmotnostní spektrometry, lišící se typem analyzátoru, které bylo možné spojit s kapalinovým chromatografem. Jimi byla sférická iontová past, trojitý kvadrupól a analyzátor doby letu. Pro finální stanovení izoprostanů v tkáních *Actinia equina* byl nakonec vybrán hmotnostní spektrometr s analyzátozem typu trojitého kvadrupólu, který byl vybrán z důvodu vyšší odezvy na detektoru fragmentů s nižšími poměry m/z (mezi než patřily i specifické fragmenty IsoP), než tomu bylo u iontové pasti.

Vývoj metodiky stanovení izoprostanů následně pokračoval optimalizací separace stereoizomerů pomocí HPLC/MS/MS. Výchozí byly publikované postupy, které byly modifikovány pro stanovení pomocí vybraného přístroje a na koloně Luna C18(2). V průběhu optimalizace bylo shledáno, že methanol jako mobilní fáze vykazoval horší separaci než acetonitril, ale izoprostany se v něm lépe ionizovaly, což zlepšovalo meze detekce metody. Nejlépe byly izoprostany separovány v mobilní fázi s velkým množstvím vody. K separaci v ní docházelo, ale na úkor mezí detekce stanovení. Optimální pH pro separaci i detekci bylo při hodnotě 3. Překvapivě, v rozporu s teorií, post-kolonový přídavek amoniaku do mobilní fáze nezpůsobil očekávané zvýšení účinnosti ionizace.

Rovněž bylo nutné navrhnout a optimalizovat postup izolace izoprostanů z tkání *Actinia equina*. Protože množství izoprostanů vázaných na fosfolipidovou dvojvrstvu je větší než množství volných, bylo vždy provedeno hydrolytické štěpení.

Z hydrolyzátu byly uvolněné izoprostany izolovány extrakcí tuhými fázemi. Testovány byly dva principiálně rozdílné typy SPE kolon; Strata-X, které jsou výhradně používány pro izolaci neutrálních sloučenin, a Strata-X-AW vhodné pro retenci kyselých sloučenin s pK_a menším než 5. Oba typy kolon se ukázaly být vhodné pro izolaci izoprostanů z tkání *Actinia equina*.

Optimalizace a finální stanovení bylo prováděno s SPE kolonami Strata-X. Chromatografické vlastnosti izoprostanů pozorované při jejich separaci pomocí HPLC na koloně Luna C18(2) byly rovněž pozorovány i u extrakce tuhou fází a byly využity při optimalizaci extrakce.

Experimentálně bylo stanoveno maximální množství tkáně sasanek *Actinia equina*, které je možné použít pro kvantitativní SPE na kolonách typu Strata-X (200 mg sorbentu /3 ml vzorku), a to na 60 mg.

Celý postup stanovení izoprostanů v tkáních sasanek *Actinia equina* byl validován. Za použití standardů izoprostanů byly stanoveny limity detekce a kvantifikace včetně standardní relativní odchylky, testována byla linearita pro tři stereoizomery izoprostanů různých typů. S tkáněmi sasanek byl proveden test opakovatelnosti metody. Ten byl proveden i pro sloučeniny, které byly náhodně při tvorbě metodiky objeveny (značené NS) a které byly spolu s izoprostany odvozenými od kyseliny arachidonové stanovovány.

Optimalizovaná metoda byla použita pro stanovení obsahu izoprostanů a NS v tkáních *Actinia equina*, které byly vystaveny simulovanému environmentálnímu stresu zvýšením teploty lázně, ve které se organismy vyskytovaly. Zvýšení teploty mělo v systému iniciovat oxidativní stres.

Bylo prokázáno, že i tkáň *Actinia equina* obsahují izoprostany odvozené z kyseliny arachidonové.

Výsledky rovněž ukazují, že vlivem změny teploty dochází ke změně množství izoprostanů v těchto organismech. Se vzrůstající teplotou došlo obecně ke zvýšení jejich zastoupení, přičemž vlivem různě vysokých testovaných teplot a odlišných teplotních skoků byl tento nárůst rozdílný. Na základě těchto dílčích závěrů lze konstatovat, že využití izoprostanů pro monitoring oxidativního stresu korálnatců by mohlo být reálné.

Protože průběhy tvorby izoprostanů a NS byly podobné, lze konstatovat, že pro studium oxidativního stresu *Actinia equina* je možné využít všech, v této práci stanovovaných, sloučenin. Z hlediska citlivosti se pak jeví jako lepší stanovování neznámých sloučenin než F₂-izoprostanů z důvodů jejich větší odezvy na detektoru.

Na základě chromatografických a fragmentačních vlastností, při zapojení teoretických poznatků, byly neznámé sloučeniny identifikovány jako možné další typy izoprostanů. S velkou pravděpodobností se jedná o izoprostany odvozené od kyseliny 5,8,11,14,17-eikosapentaenové (EPA) a 5,8,11,14,17-dokosapentaenové (DPA). Tento předpoklad podporuje i skutečnost, že kyseliny EPA i DPA se v tkáních *Actinia equina* vyskytují ve

větším množstvím než kyselina arachidonová. Rovněž tak i plochy píků těchto neznámých látek byly vyšší než u izoprostanů odvozených od AA.

Přítomnost EPA i DPA v tkáních sasanek byla již publikována [196] a v tkáních *Actinia equina* v rámci doprovodných prací, které nejsou uvedeny v této dizertaci, byla pomocí GC/MS analýzy potvrzena. Neznámé látky mohou být rovněž E- či D-izoprostany odvozené od arachidonové kyseliny.

Vliv přítomnosti Mohrovy soli v lázních s testovanými organismy na tvorbu izoprostanů nebyl pozorován jak v krátkodobém, tak v dlouhodobém experimentu. Důvod je obtížně identifikovatelný. Vodítkem by mohlo být vizuální pozorování při provádění experimentu. Po okamžitém přidání Mohrovy soli do lázni s mořskou vodou došlo k zhnědnutí, což bylo pravděpodobně způsobeno oxidací dvojmocného Fe(II) na trojmocné Fe(III). Protože se jednalo o mořskou vodu, která byla odebírána přímo ze Severního moře, jakékoliv úvahy o osudu tohoto činidla v tomto složitém přírodním systému, a tedy i jeho vliv na testované organismy, jsou obtížné.

11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BLEAKNEY, W.: A new method of positive ray analysis and its application to measurement of ionization potentials in mercury vapor. *Physical Reviews*, 1929, vol. 34, no. 1, pp. 157-160.
2. NIER, A. O.: A mass spectrometer for isotope and gas analysis. *Review of Scientific Instruments*, 1947. vol. 18, pp. 398-412.
3. PETERKOPS, R.: *Theory of ionization of atoms by electron impact*. 1. vyd. Boulder: Colorado Associated University Press, 1977. ISBN 0-87081-105-3.
4. DE HOFFMANN, E.; V. STROOBANT: *Mass spectrometry: Principles and Applications*. 3. vyd. Chichester - England: John Wiley & Sons Ltd. 2007. ISBN 978-0-470-03310-4.
5. FENN, J. B.; MANN, M.; MENG CH. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M.: Electrospray ionization - principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*, 1990, vol. 9, no. 1, pp. 37-70.
6. DE LA MORA, J. F.; VAN BERKEL, G. J.; ENKE, C. G.; COLE, R. B.; MARTINEZ-SANCHEZ, M., FENN, J. B.: Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2000, vol. 35, no. 8, pp. 939-952.
7. YAMASHITA, M.; FENN, J. B.: Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *Journal Physical Chemistry*, 1984, vol. 88, no. 20, pp. 4451-4459.
8. YAMASHITA, M.; FENN, J. B.: Negative ion production with the electrospray ion source. *Journal Physical Chemistry*, 1984. 88: p. 4671-4675.
9. MARCH, R. E.; HUGHES, R. J.; TODD, J. F. J.: Quadrupole storage mass spectrometry. 1. vyd. Hoboken: John Wiley & Sons, 1989, ISBN 0-471-85794-7.
10. HOPFGARTNER, G.; VARESI, E., TSCHÄPPÄT, V., GRIVET, C., BOURGOGNE, E., LEUTHOLD, L. A.: Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *Journal of Mass Spectrometry*, 2004, vol. 39, no. 8. pp. 845-855.
11. MARCH, R. E.: Quadrupole ion trap mass spectrometry: theory, simulation, recent developments and applications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1998, vol. 12, no. 20, pp. 1543-1554.
12. HAGER, J. V.: A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2002, vol. 16, no. 6, pp. 512-526.
13. PAUL, W.; STEINWEDEL, H. S.: Apparatus for separating charged particles of different specific charges. USA. Patent USA 2939952 7.6.1960.
14. TODD, J. F. J.: The ion trap mass spectrometer - past, present and future. *Mass Spectrometry Reviews*, 1991, vol. 10, no. 1, pp. 3-52.

15. DUBOIS, F.; KNOCHENMUSS, R.; ZENOBI, R.; BRUNELLE, A.; DEPRUN, C.; LE BEYEC, Y.: A comparison between ion-to-photon and microchannel plate detectors. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999, vol. 13, no. 9, pp. 786-791.
16. TAYLOR, L.; PAPP, R. B.; POLLARD, B. D.: *Instrumental methods for determining elements*. 1994: New York: Wiley-VCH. ISBN 0-471-18555-8.
17. DANDENEAU, R.; BENTE, P.; ROONEY, T.; HISKES, R.: Flexible Fused Silica Columns: An Advance in High Resolution Gas Chromatography. *American Laboratory*, 1979, vol. 11, no. 9, pp. 61-62.
18. NEUE, U. D.: *HPLC Columns: Theory, Technology, and Practice*. 1st. ed. New York: Wiley-VCH, 1997. ISBN 978-0-471-19037-0
19. LAWSON, J. A.; FITZGERALD, G. A.: Analysis of isoprostanes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2002, vol. 104, no. 7, pp. 429-435.
20. SWARTZ, M. E.: *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An introduction*. In Chromatographyonline.com [online]. ©2012 [cited 2012 12.05.]. available from: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgc/242005/164646/article.pdf>.
21. HARYNUK, J.; GORECKI, T.; PANIC, O.: The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC). *Journal of Separation science*, 2004, vol.27, no. 5-6, pp. 431-441.
22. MARRIOTT, P.; SHELLIE, R.: Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2002, vol. 21, no. 9-10, pp. 573-583.
23. HARYNUK, J.; GORECKI, T.: New liquid nitrogen cryogenic modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 1019, no. 1-2, pp. 53-63.
24. Leco Pegasus 4D GCxGC-TOFMS [online]. ©2012. University of Wisconsin - Biotechnology center. [cited 2012 12.05.]. Available from: <http://www.biotech.wisc.edu/facilities/massspec/instrumentationoverview/GCxGC-TOFMS>
25. HOLČAPEK, M.; JANDERA, P.: Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. *Chemické listy*, 1998, vol. 92, pp. 278-286.
26. SIMPSON, N. J. K., ed.: *Solid Phase Extraction, Principles, Techniques and Applications*. 1st. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. ISBN 0-8247-0021-X
27. PROCHÁZKOVÁ, D.: Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. *Chemické listy*, 2002, vol. 96, pp. 827-852.
28. PAWLISZYN, J.; PAWLISZYN, P.; PAWLISZYN, M.: Solid Phase Microextraction (SPME). *The Chemical Educator*, 1997, vol. 2, no. 4, pp. 1-7.
29. OERTEL, G., ed.: *Polyurethane Handbook*. 2nd. ed. Munich: Carl Hanser Verlag GmbH & Co, 1994. ISBN 3-446-17198-3 .

30. GRIEVE, R. L.: *The History of the Development of Polyurethane Industry* [online]. ©2012 [cited 2012 12.05.]. Available from: <http://www.sinopu.com/lunwen/116-118.doc>.
31. BAYER, O.; RINKE, H.; SIEFKEN, W.; ORTNER, L.; SCHILD, H.: A process for the production of polyurethanes and polyureas. Germany. Patent 728981 13.11.1937
32. SEYMOUR, R. B.; KAUFFMAN, G., B.: Polyurethanes: A class of modern versatile materials. *Journal of Chemical Education*, 1992, vol. 69, no. 11, pp 909-910
33. MÁCOVÁ, D.: Sledování průniku produktů degradace polymerů do abiotických složek životního prostředí, Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 144 s. Vedoucí dizertační práce ing. Josef Čáslavský, CSc.
34. VILAR, W. D.: *Chemistry and Technology of Polyurethanes* [online]. ©2002 [cited 2010 7.6.]. Available from: <http://www.poliuretanos.com.br/>
35. MLEZIVA, J.; ŠŇUPÁREK, J.: *Polymery – výroba, struktura, vlastnosti a použití*. 2nd ed. Praha: SOBOTÁLES, 2000, p. 544. ISBN 80-85920-72-7
36. HENTSCHEL, W.: Notizen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1884, vol. 17, no. 1, pp. 1284-1289.
37. SCHYZER, M.: *Schzyzer's handbook of polyurethanes*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press LLC, 1999, ISBN 0-8493-0602-7.
38. KUPEC, J.; CHARVÁTOVÁ, K.; KŘESÁLKOVÁ, M.: Biopolymery jako plniva v plastech. *Chemické listy*, 2003, vol. 97, pp. 155-159.
39. PETROVIC, Z. S.; ZHANG, W.; JAVNI, I.: Structure and properties of polyurethanes prepared from triglyceride polyols by ozonolysis. *Biomacromolecules*, 2005, vol. 6, no. 2, pp. 713-719.
40. OKIEIMEN, F. E.; PAVITHRAN, C.; BAKARE, I. O.: Epoxidation and hydroxylation of rubber seed oil: one-pot multi-step reaction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2005, vol. 107, pp. 330-336.
41. BADER H. J.; BLUME, R.; HORN, S.; JANSEN, W.; KÖNIG, C.; LATZEL, G.; LUTZ, B.; NEU, C.; NICK, S.; PFEIFER, P.; SOMMERFELD, H.; Glöckner, W.; Jansen, W.; Bader, R. G.; Weißenhorn R. G.: *Hanbuch der experimentellen Schulchemie*, band 12 Kunststoffe, Recykling, Alltagschemie. 1st ed. Köln: Verlag Deubner & Co KG, 1997. ISBN 3-7614-1888-4
42. M. Metzeler Schaumstoffe - downloads [online]. ©2010. Metzeler Schaum GmbH. [cited 2009 13.4.]. Available from: <http://www.metzeler-schaum.de>
43. VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBUCHER, A. ed.: *Biopolymers*, Volume 6, Polysaccharides II: Polysaccharides from eukaryotes. 1st ed. New York: Wiley-VCH, 2002. p. 644. ISBN: 978-3-527-30227-7
44. RIVERA-ARMENTA, J. L.; HEINZE, T.; MENDOZA-MARTÍNEZ, A. M.: *New polyurethane foams modified with cellulose derivates*. *European Polymer Journal*. 2004, vol. 40, no. 12. pp. 2803-2812.

45. ALFANI, R.; IANNACE, S.; NICOLAIS, L.: Synthesis and characterization of strach-based polyurethane foams. *Journal of Applied Polymer Science*, 1998, vol. 68, no. 5, pp. 739-745.
46. GE, J. J.; ZHONG, W.; GUO, Z. R.; LI, W. J.; SAKAI, K.: Biodegradable Polyurethane Foams from Bark and Starch. I. Highly Resilient Foams. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000, vol. 77, no. 12, pp. 2575-2580.
47. CHANG, L.C.; XUE, Y.; HSIEH, E. F.: Comparative Study of Physical Properties of Water-Blown Rigid Polyurethane Foams Extended with Commercial Soy Flours. *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, vol. 80, no. 1, pp. 10-19.
48. HONZÍK, R.: *Plasty se zkrácenou životností a způsoby jejich degradace* In biom.cz [online]. ©2004 [cited 2010 25.3.2010]. Available from: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/plasty-se-zkracenou-zivotnosti-a-zpusoby-jejich-degradace>
49. *Degradation of Polymers* In Mechanical engineering [online]. © 2006 [cited 28.5.2010]; Available from: <http://www.me.wpi.edu>
50. DARBY, R. T.; KAPLAN, A. M.: Fungal susceptibility of polyurethanes. *Applied microbiology*, 1968, vol. 16, no. 6, pp. 900-905.
51. CRABBEA, J. R.; CAMPBELLA, J. R.; THOMPSON, L.; WALZA, S. L.; SCHULTZA, W. W.: Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1994, vol. 33, no. 2, pp. 103-113.
52. KAY, M. J.; MCCABE, R. W.; MORTON, L. H. G.: Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *International Biodeterioration*, 1993, vol. 31, no. 3, pp. 209-225.
53. KAY, M. J.; MORTON, L. H. G.; PRINCE, E. L.: Bacterial degradation of polyester polyurethane. *International biodeterioration*, 1991, vol. 27, no. 2, pp. 205-222.
54. JANSEN, B.; SCHUMACHER-PERDREAU, F.; PETERS, P. G. G.: Evidence for degradation of synthetic polyurethanes by *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralblatt für Bakteriologie: international journal of medical microbiology*, 1991, vol. 276, no. 1, pp. 36-45.
55. NAKAJIMA-KAMBE, T.; ONUMA, F.; AKUTSU, Y.; NAKAHARA, T.: Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, vol. 83, no. 5, pp. 456-460.
56. NAKAJIMA-KAMBE, T.; SHIGENO-AKUTSU, Y.; NOMURA N.; ONUMA, F.; NAKAHARA, T.: Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, vol. 51, no. 2, pp. 134-140.
57. POHLENZ, H. D.; BOIDOL, W.; SCHÜTTKE, I.; STREBER, W. R.: Purification and properties of an *Arthrobacter oxydans* P52 carbamate hydrolase specific for the herbicide phenmedipham and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal of Bacteriology*, 1992, vol. 174, no. 20, pp. 6600-6607.

58. MATSUMURA, E.; SHIN, T.; MURAO, S.; KAWANO, T.: Substrate specificity and stoichiometry of Nalpha-benzyloxycarbonyl amino acid urethane hydrolase from *Streptococcus faecalis* R ATCC 8043. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1985, vol. 49, no. 4, pp. 973-979.
59. FILIP, Z.: Decomposition of polyurethane in a garbage landfill leakage water and soil microorganisms. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 1978. vol. 5, no. 3, pp. 225-231.
60. REHMAN, I.; ANDREWS, E. H.; SMITH, R.: In vitro degradation of poly(ester-urethanes) for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1996, vol. 7, pp. 17-20.
61. KAWAI, F.; KIMURA, T.; FUKAYA, M.; TANI, Y.; OGATA, K.; UENO, T.; FUKAMI, H.: Bacterial oxidation of polyethylene glycol. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, vol. 35, no. 4, pp. 679-684.
62. KAWAI, F.; OKAMOTO, T.; SUZUKI, T.: Aerobic degradation of polypropylene glycol by *Corynebacterium* sp. *Journal of Fermentation Technology*, 1985, vol. 63, pp. 239-244.
63. CAMPBELL, G. A.; MELUCH, W. C.: Polyurethane foam recycling: Superheated steam hydrolysis. *Environmental Science a Technology*, 1976. vol. 10, pp. 182-185.
64. IONESCU, M.: *Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes*. Shrewsbury: Smithers Rapra Press, 2008. 602 p. ISBN 18-59-57501-3
65. MAHONEY, L. R.; WEINER, S. A.; FERRIS F. C.: Hydrolysis of polyurethane foam waste. *Environmental Science and Technology*, 1974, vol. 8, no. 2, pp. 135-139.
66. BOUTIN, M.; LESAGE, J.; OSTIGUY, C.; BERTRAND, M. J.: Comparison of EI and metastable atom bombardment ionization for the identification of polyurethane thermal degradation products. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2003, vol. 70, no. 2, pp. 505-517.
67. FONT, R.; FULLANA, A.; CABALLERO, J. A.; CANDELA, J., GARCÍA A.: Pyrolysis study of polyurethane. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2001, vol. 58-59, no.1, pp. 63-77.
68. OHTANI, H.; KIMURA, T.; OKAMOTO, K.; TSUGE, S.: Characterization of polyurethanes by high-resolution pyrolysis-capillary gas chromatography. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1987, vol. 12, no. 2, pp. 115-133.
69. LATTIMERA, R. P.; POLCEB, M. J.; WESDEMIOTISB, C.: MALDI-MS analysis of pyrolysis products from a segmented polyurethane. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 1998, vol. 48, no. 1, pp. 1-15.
70. ZHANG, Y.; XIA, Z.; HUANG, H.; CHEN, H.: Thermal degradation of polyurethane based on IPDI. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2009, vol. 84, no. 1, pp. 89-94
71. ZHANG, Y.; XIA, Z.; HUANG, H.; CHEN, H.: A degradation study of waterborne polyurethane based on TDI. *Polymer testing*, 2009, vol. 28, no. 3, pp. 264-269.

72. DYER, E.; NEWBORN, E.: Thermal degradation of carbamates of methylenebis (4-phenyl isocyanate). *Journal of the American Chemical Society*, 1958, vol. 80, no. 20, pp. 5495-5498.
73. DYER, E.; READ, R. E.: Thermal degradation of 1-hexadecyl-1-naphthylcarbamate and 1-hexadecyl propyl(1-naphthyl) carbamate. *The Journal of Organic Chemistry*, 1961, vol. 26, pp. 4388-4394.
74. DYER, E.; WRIGHT, G. C.: Thermal degradation of alkyl N-phenylcarbamates. *Journal of the American Chemical Society*, 1959, vol. 81, pp. 2138-2143.
75. RABEK, J. F.: *Polymer Photodegradation: Mechanisms and Experimental Methods*. 1st ed. London: Chapman & Hall, 1994. 680 p. ISBN 0-412-58480-8
76. RABEK, J. F.: *Photodegradation of polymers: Physical Characterization and Applications*. 1st ed. Berlin: Springer, 1996. 212 p. ISBN 3-540-60716-1.
77. LAPČÍK, L.; PELIKÁN, P.; ČEPAN, M.: *Fotochemické procesy*. 1st ed. Bratislava: Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1989, 424 p. ISBN 80-05-00049-9
78. WYPYCH, G.: *Handbook of Material Weathering*. 3rd ed. 2. Photochemistry [online]. © 2003 ChemTec Publishing. ISBN 978-1-895198-28-7 [cited 28.5.2010]; Available from:
http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=750
79. GILBERT, A.; HORSPOOL, W. M.; ALLEN, N. S.: *Photochemistry*. 1st ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001, 276 p. ISBN 0-85404-430-2
80. DOBASHI, Y.; OHKATSU, Y.: Dependence of ultraviolet absorbers performance on ultraviolet wavelength. *Polymer Degradation and Stability*, 2008, vol. 93, pp. 436-447.
81. TURRO, N. J.; RAMAMURTHY, V.; PAGNI, R. M.; BUTCHER, J. A.: Thermal and Photochemical Interconversion of Several 1,8-Naphtho(C₄H₄) Hydrocarbons. Test of the Woodward-Hoffmann Rules. *Journal of Organic Chemistry*, 1976, vol. 42, pp. 92-96.
82. GARDETTE, J-L.; LEMAIRE, J.: Oxydation photothermique d'élastomères de polyuréthanes thermoplastiques, 2. Influence de la longueur d'onde et des conditions d'irradiation sur le jaunissement des polyuréthanes à structure aromatique. *Die Makromolekulare Chemie*, 1982, vol. 183, no. 10, pp. 2415-2425.
83. WILHELM, C.; RIVATON, A.; GARDETTE, J-L: Infrared analysis of the photochemical behaviour of segmented polyurethanes: 3. Aromatic diisocyanate based polymers. *Polymer*, 1998, vol. 39, no. 5, pp. 1223-1232.
84. GARDETTE, J-L.; LEMAIRE, J.: Photothermal oxidation of thermoplastic polyurethane elastomers: Part 3 - Influence of the excitation wavelengths on the oxidative evolution of polyurethanes in the solid state. *Polymer Degradation and Stability*, 1984, vol. 6, pp. 135-148.
85. WILHELM, C., GARDETTE, J-L.: Infrared analysis of the photochemical behaviour of segmented polyurethanes: 1. Aliphatic poly(ester-urethane). *Polymer*, 1997, vol. 38, no. 16, pp. 4019-4031.

86. VRÁNOVÁ, J.: *Posouzení vhodnosti vybraných testů ekotoxicity pro vodní a terestrické ekosystémy při hodnocení výluhů z polymerů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007. 96 p. Vedoucí diplomové práce MVDr Zlámalová Gargošová Helena, Ph.D.
87. SIES, H.: *Oxidative stress*. London: Academic Press, 1985. 507 p. ISBN 0-12642-760-7
88. SIES, H.: Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie-International Edition*, 1986, vol. 25, no. 12, pp. 1058-1071.
89. SIES, H. ed.: Oxidative stress: introduction In *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants* London: Academic Press, 1991. pp. 15-22. ISBN 0-12642-762-3
90. ĎURAČKOVÁ, Z.: *Volné radikály a antioxidanty v medicíně*. 1st ed. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998. 285 p. ISBN 80-88908-11-6
91. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C.: *Free radical in biology and medicine*. 2 ed. 1989, Oxford: Clarendon Press. 335 p. ISBN 0-19-855294-7
92. BRAUN, K.; FRIDOVICH, I.: DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1981, vol. 206, no. 2, pp. 414-419.
93. FENTON, H. J. H.: Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society*, 1894, vol. 65, pp. 899-910.
94. FERENČÍK, M.; BERGENDI, L.: Biologický význam superoxidového aniónu a ostatných reaktívnych foriem kyslíka vznikajúcich pri metabolizme aerobných buniek. *Biologické listy*, 1984, vol. 49, no.1, pp. 1-25.
95. PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 2007, vol. 87, no. 1, pp. 315-424.
96. BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A.: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite - implications for endothelial injury from nitric-oxide and superoxide. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, vol. 87, no. 4, pp. 1620-1624.
97. GALLEY, H. F.; WALKER, B. E.; HOWDLE, P. D.; WEBSTER, N. R.: Regulation of nitric oxide synthase activity in cultured human endothelial cells: Effect of antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 1996, vol. 21, no.1, pp. 97-101.
98. ELSTNER, E. F.: Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual Review Plant Physiology*, 1982, vol. 33, p. 73-96.
99. ELSTNER, E. F.: *Der Saurestoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. Mannheim: BI-Wissenschaftsverlag, 1990. 529 p. ISBN 3-411-14001-1.
100. LOSCHEN, G.; FLOHE, L.; CHANCE, B.: *Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria* FEBS Letters, 197, vol. 8, no.2, pp. 261-264.
101. AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.: Mitochondrial decay in aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Diseases*. 1995, vol. 1271, no. 1, pp. 165-170

102. GODIN, D. V.; WOHAIEB, S. A.: Nutritional deficiency, starvation, and tissue antioxidant status. *Free Radical Biology and Medicine*, 1988, vol. 5, no. 3, pp. 165-176.
103. TURRENS, J. F.: Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 2003, vol. 552, no. 2, pp. 335-344.
104. LENAŽ, G.: The mitochondrial production of reactive oxygen species: Mechanisms and implications in human pathology. *IUJMBM Life*, 2001, vol. 52, no. 3-5, pp. 159-164.
105. KUSHNAREVA, Y.; MURPHY A. N.; ANDREYEV, A.: Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)(+) oxidation-reduction state. *Biochemical Journal*, 2002, vol. 368, pp. 545-553.
106. LIU, Y. B., FISKUM, G.; SCHUBERT, D.: Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 2002, vol. 80, no. 5, pp. 780-787.
107. TURRENS, J. F.; BOVERIS A.: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart-mitochondria. *Biochemical Journal*, 1980, vol. 191, no. 2, pp. 421-427.
108. GRIGOLAVA, I. V.; KSENZENKO, M. IU; KONSTANTINOB, A. A.; TIKHONOV, A. N.; KERIMOV T. M.: Tiron as a spin trap for superoxide radicals formed by the respiratory-chain of the sub-mitochondrial particles. *Biochemistry-Moscow*, 1980, vol. 45, no.1, pp. 57-62.
109. MICHAEL, A. C.; BORLAND, L. M., ed.: *Electrochemical Methods for Neuroscience*. Amatore, C.; Arbault, S.: Oxidative Stress at the Single Cell Level. Pittsburgh: CRC press. 2007. 512 p. ISBN 10-8493-4075-6
110. RAHA, S.; ROBINSON, B. H.: Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, vol. 25, no. 10, pp. 502-508.
111. KARUZINA, I. I.; ARCHAKOV A. I.: The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 1994, vol. 16, no. 1, pp. 73-97.
112. PARKE, D.V.: The cytochromes P450 and mechanism of chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 1994, vol. 102, no. 10, pp. 852-853.
113. SASE, K.; MICHEL, T.: Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Trends in cardiovascular medicine*, 1997, vol. 7, no.1, pp. 28-37.
114. STADTMAN, E. R.: Protein oxidation and aging. *Science*, 1992, vol. 257, no. 5074, pp. 1220-1224.
115. STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L.: Protein oxidation. *Symposium on Reactive Oxygen Species from Radiation to Molecular Biology in honor of Daniel L Gilbert*, 1998, Bethesda, Md: New York Acad Sciences, pp. 191-208
116. NIGAM, S.; SCHEWE, T.: Phospholipase A(2)S and lipid peroxidation. *Biochimica Et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2000, vol. 1488, no. 1-2, pp. 167-181.

117. LEE, H. C.; WEI, Y. H.: Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Experimental Biology and Medicine*, 2007, vol. 232, no. 5, pp. 592-606.
118. FRANCO, R.; SCHONEVELD, O.; GEORGAKILAS, A. G.; PANAYIOTIDIS, M. I.: Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters*, 2008, vol. 266, no. 1: pp. 6-11.
119. ANDREOLI, R.; MANINI, P.; CORRADI, M.; MUTTI, A.; NIESSEN W. M. A.: ANDREOLI, R.: Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003, vol. 17, no. 7, pp. 637-645.
120. SEVANIAN, A.; NORDENBRAND, K.; EUNJOO, K.; ERNSTER, L.; HOCHSTEIN, P.: Microsomal lipid-peroxidation - the role of NADPH-cytochrome-P450 reductase and cytochrome-P450. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, vol. 8, no. 2, pp. 145-152.
121. HALLIWELL, B.; ARUOMA O. I., ed.: *DNA and free radicals*. Cheeseman, K. H.: Lipid peroxidation and cancer., 1993, London: Ellis Horwood, pp.109-144. ISBN: 0-13-222035-0
122. CATALA, A.: An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, vol. 38, no. 9, pp. 1482-1495.
123. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.: Role of free-radicals and catalytic metal-ions in human-disease - an overview. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 186, pp. 1-85.
124. DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.: Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*, 2006, vol. 52, no. 4, pp. 601-623.
125. HAYASHI, O.; NIKI, E., ed.: *Medical, biochemical and chemical aspects of free radicals*, vol. 1-2. Amsterdam: Elsevier, 1989. ISBN 0-444-87482-8
126. UCHIDA, K.: 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in lipid research*, 2003, vol. 42, no. 4, pp. 318-343.
127. CARINI, M.; ALDINI, G.; FACINO, R., M.: Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. *Mass spectrometry reviews 2004*. vol. 23, no. 4, pp. 281-305.
128. MORROW, J. D.; ROBERTS, L. J.: The isoprostanes: Unique bioactive products of lipid peroxidation. *Progress in Lipid Research*, 1997, vol. 36, no. 1, pp. 1-21.
129. MONTUSCHI, P.; BARNES, P. J.; ROBERTS, L. J.: Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *Faseb Journal*, 2004, vol. 18, no. 15, pp. 1791-1800.
130. PRATICO, D.: F-2-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis*, 1999, vol. 147, no. 1, pp. 1-10.
131. LAWSON, J. A.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G. A.: Isoprostanes: Formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, vol. 274, no. 35, pp. 24441-24444.

132. MORROW, J. D.; HARRIS, T. M.; ROBERTS L. J.: Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins - analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Analytical Biochemistry*, 1990, vol. 184, no. 1, pp. 1-10.
133. UCHIDA, K.: Histidine and lysine as targets of oxidative modification. *Amino acids*, 2003, vol. 25, no. 3-4, pp. 249-257.
134. DRAPER, H. H.; CSALLANY, A. S.; HADLEY, M.: Urinary aldehydes as indicators of lipid peroxidation in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, vol. 29, no. 11, pp. 1071-1077.
135. LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R.: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 186, pp. 464-478.
136. DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J.: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 1997, vol. 324, pp. 1-18.
137. DAVIES, M. J.: The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et biophysica acta-proteins and proteomics*, 2005, vol. 1703, no 2. pp. 93-109.
138. STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L.: Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 2003, vol. 25, no. 3-4, pp. 207-218.
139. DUNCAN, M. W.: A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids*, 2003, vol. 25, no. 3-4, pp. 351-361
140. BRENNAN, M. L.; WU, W.; FU, X.; SHEN, Z.; SONG, W.; FROST, H.; VADSETH, C.; NARINE, L.; LENKIEWICZ, E.; BORCHERS, M. T.; LUSIS, A. J.; LEE, J. J.; LEE, N. A.; ABU-SOUD, H. M.; ISCHIROPOULOS, H.; HAZEN, S. L.: A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, vol. 277, no. 20, pp. 17415-17427
141. GAUT, J.P.; BYUN, J.; TRAN, H. D.; HEINECKE, J. W.: Artifact-free quantification of free 3-chlorotyrosine, 3-bromotyrosine, and 3-nitrotyrosine in human plasma by electron capture-negative chemical ionization gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 2002, vol. 300, no. 2., pp. 252-259.
142. COLLINS, A. R.; CADET, J.; MÖLLER, L.; POULSEN, H. E.; VIÑA, J.: Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, vol. 423, no. 1, pp. 57-65.
143. HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M.: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 2004, vol. 142, no. 2, pp. 231-255.
144. GRIFFITHS, H. R.; OLINSKI, R.; COOLEN, S.; COLLINS, A.; ASTLEY, S. B.: Biomarkers. *Free Radical Research*, 2002, vol. 36, no. 1, pp. 7-8.

145. PRYOR, W. A.; STANLEY, J. P.; BLAIR, E.: Autooxidation of polysaturated fatty-acids II Suggested mechanism for formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*, 1976, vol. 11, no. 5, pp. 370-379.
146. PORTER, N. A.; FUNK, M. O.: LETTER: Peroxy radical cyclization as a model for prostaglandin biosynthesis. *Journal of Organic Chemistry*, 1975, vol. 40, no. 24, pp. 3614-3615.
147. TABER, D. F.; MORROW, J. D.; ROBERTS, L. J.: A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins*, 1997, vol. 53, no. 2, pp. 63-67.
148. ROKACH, J.; KHANAPURE, S. P.; HWANG, S.-W.; ADIYAMAN, M.; LAWSON, J.; FITZGERALD, G.: Nomenclature of isoprostanes: A proposal. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 1997, vol. 54, no. 6, pp. 853-873.
149. HARIZI, H.; CORCUFF, J. B.; GUALDE, N.: Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*, 2008, vol. 14, no. 10, pp. 461-469.
150. PECCHI, E.; DALLAPORTA, M.; JEAN, A.; THIRION, S.; TROADEC, J. D.: Old story, new insights. *Physiology & Behavior*, 2009, vol. 97, no. 3-4, pp. 279-292.
151. PIOMELLI, D.: *Arachidonic Acid*. [online] © 2000 [cited 27.07.2009]; Available from: <http://www.acnp.org/g4/GN401000059/Default.html>
152. SMITH, W. L.: The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochemical Journal*, 1989, vol. 259, no. 2, pp. 315-324.
153. ROKACH, J.; KHANAPURE, S. P.; HWANG, S. W.; ADIYAMAN, M.; LAWSON, J. A.; FITZGERALD, G. A.: The isoprostanes: A perspective. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 1997, vol. 54, no. 6, pp. 823-851.
154. ROKACH, J.; KHANAPURE S. P.; HWANG, S.-W.; ADIYAMAN, M.; SCHIO, L.; FITZGERALD, G. A.: The isoprostanes, a new class of natural products: Synthesis and Biosynthesis. *ChemInform*, 1998: vol. 29, no. 30, pp. 569-580.
155. HANDELMAN, G. J.; WALTER, M. F.; ADHIKARLA, R.; GROSS, J.; DALLAL, G. E.; LEVIN, N. W.; BLUMBERG, J. B.: Elevated plasma F₂-isoprostanes in patients on long-term hemodialysis. *Kidney International*, 2001, vol. 59, no. 5, pp. 1960-1966.
156. YIN, H.; HAVRILLA, C. M.; GAO, L.; MORROW, J. D.; PORTER, N. A.: Mechanisms for the formation of isoprostane endoperoxides from arachidonic acid - "Dioxetane" intermediate versus beta-fragmentation of peroxy radicals. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 19, pp. 16720-16725.
157. DAVIES, S. S.: Lipidomic approaches to measuring isoprostanes and other markers of oxidative stress. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009, vol. 111, no. 1, pp. 64-74.
158. MORROW, J. D.; AWAD, J. A.; BOSS, H. J.; BLAIR, I. A.; ROBERTS, L. J.: Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed insitu on phospholipids. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, vol. 89, no. 22, pp. 10721-10725.

159. MORROW, J. D.: Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2005, vol. 25, no. 2, pp. 279-286.
160. YIN, H.; GAO, L.; TAI, H. H.; MURPHEY, L. J.; PORTER, N. A.; MORROW, J. D.: Urinary prostaglandin F-2 alpha is generated from the isoprostane pathway and not the cyclooxygenase in humans. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, vol. 282, no. 1, pp. 329-336.
161. OCONNOR, D. E.; MIHELICH, E. D.; COLEMAN, M. C.: Isolation and characterization of bicyclo endoperoxides derived from methyl linolenate. *Journal of the American Chemical Society*, 1981, vol. 103, no. 1, pp. 223-224.
162. REICH, E. E.; ZACKERT, W. E.; BRAME, C. J.; CHEN, Y.; ROBERTS, L. J.; HACHEY, D. L.; MONTINE, T. J.; MORROW, J. D.: Formation of novel D-ring and E-ring isoprostane-like compounds (D-4/E-4-neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *Biochemistry*, 2000, vol. 39, no. 9, pp. 2376-2383.
163. BERNOUD-HUBAC, N.; DAVIES, S. S.; BOUTAUD, O.; MONTINE, T. J.; ROBERTS, L. J.: Formation of highly reactive gamma-ketoaldehydes (neuroketals) as products of the neuroprostane pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 33, pp. 30964-30970
164. PARCHMANN, S.; MUELLER, M. J.: Evidence for the formation of dinor isoprostanes E-1 from alpha-linolenic acid in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 49, pp. 32650-32655.
165. IMBUSCH, R., MUELLER M. J.: Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F-1 (phytoprostanes F-1) in plants. *Plant Physiology*, 2000, vol. 124, no. 3, pp. 1293-1303.
166. IMBUSCH, R., MUELLER M. J.: Formation of isoprostane F-2-like compounds (phytoprostanes F-1) from alpha-linolenic acid in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, vol. 28, no. 5, pp. 720-726.
167. ROBERTS, L. J.; MORROW, J. D.: Measurement of F-2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, vol. 28, no. 4, pp. 505-513.
168. MORROW, J. D.; ROBERTS, L. J.: Mass spectrometric quantification of F₂-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods in Enzymology*, 1999, vol. 300, pp. 3-12.
169. LI, H.; LAWSON, J. A.; REILLY, M.; ADIYAMAN, M.; HWANG, S-W.; ROKACH, J.; FITZGERALD, G. A.: Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F(2)-isoprostanes in human urine. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, vol. 96, no. 23, pp. 13381-13386.
170. WANG, Z.; CIABATTONI, G.; CRÉMINON, C.; LAWSON, J.; FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C.; MACLOUF, J.: Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2-alpha excretion in man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1995, vol. 275, no. 1, pp. 94-100.

171. PARKER, C. E.; GRAHAM, L. B.; NGUYEN, M. N.; GLADEN, B. C.; KADIISKA, M. B.; BARRETT, J. C.; TOMER, K. B.: An Improved GC/MS-Based Procedure for the Quantitation of the Isoprostane 15-F₂t-IsoP in Rat Plasma. *Molecular Biotechnology*, 2001, vol. 18, no. 2, pp. 105-118.
172. SINGH, G.; GUTIERREZ, K. X.; BLAIR, I. A.: Liquid chromatography/electron capture atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry: Analysis of pentafluorobenzyl derivatives of biomolecules and drugs in the attomole range. *Analytical Chemistry*, 2000, vol. 72, no. 14, pp. 3007-3013.
173. WAUGH, R. J.; MURPHY, R. C.: Mass spectrometric analysis of four regioisomers of F-2-isoprostanes formed by free radical oxidation of arachidonic acid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1996, vol. 7, no. 5, pp. 490-499.
174. NOUROOZ-ZADEH, J.: Key issues in F-2-isoprostane analysis. *Biochemical Society Transactions*. 2008, vol. 36, no. 5, pp. 1060-1065
175. NOUROOZ-ZADEH, J.; GOPAUL, N. K.; BARROW, S.; MALLET, A. I.; ANGGÅRD, E. E.: Analysis of F₂-isoprostane as indicators of non-enzymatic lipid peroxidation in vivo by gas chromatography - mass spectrometry: development of solid-phase extraction procedure. *Journal of Chromatography B*, 1995, vol. 667, no. 2, pp. 199-208.
176. STONE, L.; HUPPERT, A.; RAJAGOPALAN, B.; BHASIN, H.; LOYA, Y.: Mass coral reef bleaching: a recent outcome of increased El nino activity? *Ecology Letters*, 1999, vol. 2, pp. 325-330.
177. DOWNS, C. A.; MUELLER, E.; PHILLIPS, S.; FAUTH, J. E.; WOODLEY, C. M.: A molecular biomarker system for assessing the health of coral (*Montastrea faveolata*) during heat stress. *Marine Biotechnology*, 2000, vol. 2, no. 6, pp. 533-544.
178. BROWN, B. E.: Adaptations of reef corals to physical environmental stress. *Advances in Marine Biology*, 1997, vol. 31, pp. 222-299.
179. BROWN, B. E.: Coral bleaching: causes and consequence. *Coral Reef*, 1997, vol. 16, no. 5, pp. S129-S138.
180. DOWNS, C. A.; FAUTH, J. E.; HALAS, J. C.; DUSTAN, P.; BEMISS, J.; WOODLEY, C. M.: Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, vol. 33, no. 4, pp. 533-543.
181. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.: *Free Radical in Biology and Medicine*. 3rd ed., New York: Oxford University Press. 1999. 936 p. ISBN 0-19-850044-0
182. GIARDI, M. T.; MASOJIDEK, J.; GODDE, D.: Effects of abiotic stresses on the turnover of the D1 reaction center II protein. *Physiologia Plantarum*, 1997, vol. 101, pp. 635-642.
183. BADGER, M. R.: Photosynthetic oxygen exchange. *Annual Review of Plant Physiology*, 1985. vol. 36, pp. 27-53.
184. *Beadlet Anemone*. [online]. © 2010 World Associations of Zoos and Aquariums [cited 2010 17.05.2010]; Available from: <http://www.waza.org/en/zoo/choose-a-species/invertebrates/corals-sea-anemonas-jellyfish-and-relatives-cnidaria/actinia-equina>

185. *Beadlet Anemone*. [online]. © 2010 Animal-world [cited 2010 18.05.2010]; Available from: <http://animal-world.com/encyclo/reef/anemones/BeadletAnemone.pht>
186. TERRELL, D.: *Actinia equina*. [online]. © 2003 Animal Diversity Web [cited 2010 18.05.2010]; Available from: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Actinia_equina.html
187. *Coral Reefs v Ecological Impacts - The Southeast* [online]. © 2009 National Academy of Sciences. [cited 10.2.2012]; Available from: <http://dels-old.nas.edu/climatechange/southeast.shtml>
188. ROWE, J.: *Actinia equina - Beadlet anemone v Extended Major Project*. © 2009 [cited 10.2.2012]; Available from: <http://jemmarowe-extendedmajorproject.blogspot.com/2009/04/actinia-equina.html>.
189. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources [online]. © 2010 *The IUCN Red List of Threatened Species*. 2010 [cited 15.4. 2010]; Available from: <http://www.iucn.org/>.
190. ZHAO, Z.; HJELM, N. M.; LAM, C. W. K.; HO, C. S.: One-step solid-phase extraction procedure for F₂-isoprostanes. *Clinical Chemistry*, 2001. vol. 47, no. 7, pp. 1306-1308.
191. PARKER, C. E.; GRAHAM, L. B.; NGUYEN, M. N.; GLADEN, B. C.; KADIISKA, M. B.; BARRETT, J. C.; TOMER, K. B.: An improved GC/MS-based procedure for the quantitation of the isoprostane 15-F_{2t}-IsoP in rat plasma. *Molecular Biotechnology*, 2001. vol. 18, no. 2, pp. 105-118.
192. LEE, C.-Y., HUANG, S. H.; JENNER, A. M.; HALLIWELL, B.: Measurement of F₂-isoprostanes, hydroxyeicosatetraenoic products, and oxysterols from a single plasma sample. *Free Radical Biology & Medicine*, 2008. vol. 44, no. 7, pp. 1314–1322.
193. SICILIA, T.; MALLY, A.; SCHAUER, U.; PÄHLER, A.; VÖLKELE, W.: LC-MS/MS methods for the detection of isoprostane (iPF_{2a}-III and 8,12-iso-iPF_{2a}-VI) as biomarkers of CCl₄-induced oxidative damage to hepatic tissue. *Journal of Chromatography B*, 2008, vol. 861, no. 1, pp. 48-55.
194. YAN, W.Y.; BYRD, G. D.; OGDEN, M. W.: Quantitation of isoprostane isomers in human urine from smokers and nonsmokers by LC-MS/MS. *Journal of Lipid Research*, 2007, vol. 48, no. 7, pp. 1607-1617.
195. MORROW, J. D.; AWAD, J. A.; KATO, T.; TAKAHASHI, K.; BADR, K. F.; ROBERTS, L. J.; BURK R. F.: Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *Journal of Clinical Investigation*, 1992, vol. 90, no. 6, pp. 2502-2507.
196. STEFANOV, K. L.; CHRISTIE, W. W.; BRECHANY, E. Y.; POPOV, S. S.; ANDREEV, S. N.: Lipid Composition of the Red and Green Forms of *Actinia Equina* from Black Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1992, vol. 103, no. 3, pp. 687-690.

12 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	kyselina arachidonová
AC	acetylcelulóza
ALA	kyselina α -linoleová
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
AS	acetylovaný bramborový škrob
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
CAR	carboxen
CMC	sodná sůl karboxymethylcelulózy
COX	cyklooxygenáza
CW	carbowax
DHA	dokosahexaenová kyselina
DVB	divinylbenzen
ECNCI	negativní chemická ionizace se záchytem elektronů
EI	elektronová ionizace
EIA	enzymové imunoanalýzy
EIC	chromatogram vyextrahovaného iontu o určitém m/z (fragmentogram)
EPA	eikosapentaenová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
PUF	flexibilní polyurethanové pěny
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC	plynová chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GCxGC	orthogonální kompletní tandemová plynová chromatografie
GCxGC/MS	orthogonální kompletní tandemová plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GLA	kyselina γ -linoleová
GSH	redukovaný glutathion
GSSH	glutathion disulfid
HEC	2-hydroxyethyl celulóza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC/MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HRMS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie
IPDI	izoforondiizokyanát
IsoK	izoketaly
IsoP III	izoprostany typu III
IsoP IV	izoprostany typu VI
IsoP VI	izoprostany typu IV
IsoP, IsoPs	izoprostany
IsoT	izothromboxany
IT	iontová past

LOX	lipooxygenáza
LRMS	nízkorozlišovací hmotnostní spektrometrie
LT	leukotrieny
LX	lipoxiny
MDA	malondialdehyd
MDI	difenylmethyldiizokyanát
MRM	několikanásobný reakční monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie, hmotnostní spektrometr
MS ⁿ	tandemová hmotnostní spektrometrie
NS	neznámé sloučeniny
NS1	neznámá sloučenina 1
NS2	neznámá sloučenina 2
NS2S2	skupina neznámých sloučenin
NS3	neznámá sloučenina 3
PA	polyakrylát
PDMI	difenylmethandiizokyanát
PDMS	polydimethylsiloxan
PFB	pentafluorobenzaldehyd
PG, PGs	prostaglandiny
PGF ₂	F ₂ -izoprostany
PGG ₂ , PGH ₂	endoperoxidové intermediáty
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PLC	fosfolipáza B
PLD	fosfolipáza C
PU	polyurethan
PUF	polyurethanová pěna
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
Py-GC/MS	pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
Q	kvadrupólový analyzátor
QQQ	trojitý kvadrupól
REF	referenční pěna
RIA	radioimunoanalýza
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
SCAN	monitoring skenující v rozsahu daném uživatelem
SIM	monitoring vybraných iontů
SOD	superoxid dismutáza
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
SRM	monitorování vybrané reakce
TDI	toluendiizokyanát
TIC	chromatogram celkového iontového proudu
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOF	analyzátor doby letu

Tyr	thyrosin
UHPLC	extrémně vysokotlaká kapalinová chromatografie
UPLC	extrémně účinná kapalinová chromatografie
WPG	hydratovaná pšeničná bílkovina

13 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Fotodegradační produkty polyurethanových pěn zachycené na PDMS i PA vlákno, uvedeno je jejich semikvantitativní zastoupení

Příloha 2: Fotodegradační produkty polyurethanových pěn zachycené pouze na PA vlákno, uvedeno je jejich semikvantitativní zastoupení

Příloha 3: Fotodegradační produkty polyurethanových pěn zachycené pouze na PDMS vlákno, uvedeno je jejich semikvantitativní zastoupení

14 PŘÍLOHY

Příloha 1 Fotodegradační produkty polyurethanových pěn zachycené na PDMS i PA vlákno

R _t (x, y) (s)	CAS číslo	Fotodegradační produkt	PDMS						PA					
			CA	WPG	CMC	AS	HEX	REF	CA	WPG	CMC	AS	HEX	REF
841 ; 1,250	91-20-3	naftalen	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
883 ; 1,160	626-68-6	2-methyl-1,3-dioxan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1042 ; 0,970	544-76-3	hexadekan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1114 ; 0,980	629-78-7	heptadekan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1144 ; 0,970	3892-00-0	2,6,10,-trimethylpentadekan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1246 ; 1,050	638-36-8	2,6,10,14-tetramethylhexadekan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1198 ; 1,440	-	neznámá sloučenina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1219 ; 1,170	5444-75-7	2-ethylhexylester kyseliny benzoové	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1318 ; 1,120	46843-82-7	4-undecylmorfolin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1324 ; 1,270	605-45-8	diizopropylftalát	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1384 ; 1,300	131-16-8	dibutylftalát	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1438 ; 1,140	25727-91-7	4-hexadecylmorfolin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
751 ; 1,240	872-50-4	1-methylpyrolidin-2-on	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1186 ; 1,100	33788-00-0	6-undecylamin		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1129 ; 1,070	74381-40-1	2-methyl-1-izopropyl-2-methyl-1,3-propandiyl ester kyseliny propanové	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	
1153 ; 1,320	84-66-2	diethyl ftalát	+	+		+	+	+	+	+		+	+	+
1315 ; 1,040	49859-87-2	N,N-dimethyl-1-pentadekanamin	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+
637 ; 1,240	96-48-0	butyrolakton	+	+	+				+	+	+	+	+	+
739 ; 1,210	98-86-2	acetofenon		+				+	+	+	+	+	+	+
1198 ; 1,100	4536-88-3	1-methyldecylbenzen		+		+	+	+		+		+	+	+

R _t (x, y) (s)	CAS číslo	Fotodegradační produkt	PDMS						PA					
			CA	WPG	CMC	AS	HEX	REF	CA	WPG	CMC	AS	HEX	REF
1135 ; 1,140	14035-34-8	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-oxopropyl)fenol	+	+	+	+	+		+	+		+		
586 ; 1,150	116-09-6	1-hydroxypropan-2-on		+	+				+	+	+		+	+
760 ; 0,980	17352-32-8	nonadekanal			+	+	+		+		+	+	+	
1201 ; 1,000	55019-46-0	2-methylhexadekanal	+	+	+				+	+	+		+	
979 ; 1,140	91-08-7	1,3-diisokyanáto-2-methylbenzen	+		+			+			+	+		+
988 ; 1,110	584-84-9	2,4-diisokyanáto-1-methylbenzen	+		+			+			+	+		+
1426 ; 2,240	106-31-0	anhydrid kyseliny butanové					+		+	+	+	+	+	
1432 ; 2,150	4161-24-4	4-butoxybutanol					+		+	+	+	+	+	

+ ... degradační produkt patří mezi 20 sloučenin, které tvořily v chromatogramu píky s největší plochou

+ ... degradační produkt, přítomný, ale nepatřící mezi 20 sloučenin, které tvořily v chromatogramu píky s největší plochou

Příloha 2 Fotodegradační produkty polyurethanových pěn zachycené pouze na PA vlákno

R _t (x, y) (s)	CAS číslo	Fotodegradační produkt	PU Pěna					
			CA	WPG	CMC	AS	HEX	REF
1015 ; 1,030	112-54-9	dodekanal	+	+	+	+	+	+
1159; 1,031	124-25-4	tetradekanal	+	+	+	+	+	+
931 ; 1,100	82061-20-9	2,3,4,5-tetramethylcyklopent-2-en-1-ol	+	+	+	+		+
1021 ; 1,310	150544-04-0	2,3-dihydro-6-aminoindol-2-on		+	+	+	+	+
1195 ; 1,400	119-61-9	benzofenon	+		+	+	+	+
715 ; 1,150	149-57-5	kyselina 2-ethylhexanová	+		+		+	+
724 ; 1,050	565-59-3	2,3-dimethylpentan			+	+	+	+
1102 ; 1,180	1004-29-1	2-butyltetrahydrofuran	+		+		+	+
667 ; 1,180	100-47-0	benzoniřil	+	+	+			
862 ; 1,220	2916-31-6	2,2-dimethyl-1,3-dioxolan		+			+	+
940 ; 1,250	90-12-0	1-methylnařtalen	+	+		+		
742 ; 1,190	613-94-5	hydrazid kyseliny benzoové	+					+
937 ; 1,210	21915-56-0	3-hydroxypropyloxiran	+	+				
1105 ; 1,090	1139-30-6	karyofylen oxid		+				+
802 ; 1,220	2679-87-0	2-ethoxybutan					+	
805 ; 1,220	54658-01-4	3-methoxyhexan		+				
856 ; 1,200	822-83-3	2-izopropyldioxolan		+				
1039 ; 1,150	74793-66-1	3-(2,2-dimethylpropoxy)butan-2-ol		+				
1093 ; 1,090	26532-22-9	4-(2,4-dimethylcyklohex-3-enyl)but-3-en-2-on		+				
1279 ; 1,260	97-72-3	anhydrid kyseliny 2-methylpropanové						+
1282 ; 1,250	97-99-4	tetrahydro-2-furanmethanol	+					
1405 ; 1,220	86361-10-6	3-methylpenten-3-ol						+
1444 ; 1,790	62238-25-9	N-butyldeka-4,9-dien-2-amin	+					

Příloha 3 Fotodegradační produkty polyurethanových pěn zachycené pouze na PDMS vlákno

R _t (x, y) (s)	CAS číslo	Fotodegradační produkt	PU Pěna					
			CA	WPG	CMC	AS	HEX	REF
850 ; 1,030	112-31-2	dekanal	+	+	+	+	+	+
970 ; 0,960	629-59-4	tetradekan	+	+	+	+	+	+
1012; 0,980	61868-06-2	2,4-dimethyltetradekan	+	+	+	+	+	+
1030 ; 1,160	104-61-0	dihydro-5-pentylfuran-2(3H)-on	+	+	+	+	+	+
1087 ; 0,970	54105-65-6	2,6-dimethylptadekan	+	+	+	+	+	+
1186 ; 1,220	74708-73-9	tricyklopentadeka-3,7-dien	+	+	+	+	+	+
1243 ; 1,230	24157-81-8	2,6-diisopropylnaftalen	+	+	+	+	+	+
1387 ; 1,160	104-67-6	5-heptyldihydrofuran-2(3H)-on	+	+	+	+		+
1144 ; 1,090	4537-15-9	1-butylheptylbenzen	+	+		+	+	+
1168 ; 1,030	30689-78-2	14-methylhexadec-8-en-1-ol	+	+		+	+	+
1210 ; 1,090	2719-63-3	1-butyl-oktylbenzen	+	+		+		+
1170 ; 0,970	638-36-8	2,6,10,14-tetramethylhexadekan	+	+		+		+
1321 ; 1,280	88-99-3	kyselina ftalová		+	+		+	+
841 ; 1,330	4511-42-6	3,6-dimethyl-(3S-cis)-1,4-dioxan-2,5-dion			+	+		+
1012 ; 0,950	1921-70-6	2,6,10,14-tetramethylpentadekan		+		+	+	
1198 ; 1,190	24851-98-7	methyl dihydrojasmonát	+				+	+
1204 ; 1,000	2461-18-9	dodecyloxymethyloxiran	+	+			+	
1219 ; 1,230	487-78-3	1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)naftalen		+	+	+		
1222 ; 1,170	6938-51-8	2-oktyl benzoát	+	+			+	
1270 ; 1,100	4534-49-0	1-pentyl-oktylbenzen	+			+		+
1294 ; 1,060	629-80-1	hexadekanal	+	+		+		
1189 ; 1,300	1081-75-0	1,3-difenypropan					+	+
1201 ; 1,010	1126-18-7	3-butylcyklohexanon					+	+

R _t (x, y) (s)	CAS číslo	Fotodegradační produkt	PU Pěna					
			CA	WPG	CMC	AS	HEX	REF
1222 ; 1,090	2719-64-4	1-propylnonylbenzen	+					+
1237 ; 1,100	2400-00-2	1-ethyldecylbenzen				+		+
1351 ; 1,090	8.3.3447	2-butyl-1-methylpyrolidin	+	+				
589 ; 1,090	1068-57-1	hydrazid octové kyseliny	+					
721 ; 1,060	935-67-1	1-methoxy-1-methylethylbenzen					+	
1213 ; 1,240	53084-68-7	4-methyl-1-methylen-1,2,3,4,9,10-oktahydrofenantren			+			
1390 ; 0,010	33046-84-3	5-fenylpent-2-enal						+

+ ... degradační produkt patří mezi 20 sloučenin, které tvořily v chromatogramu píky s největší plochou

+ ... degradační produkt, přítomný, ale nepatřící mezi 20 sloučenin, které tvořily v chromatogramu píky s největší plochou

ŽIVOTOPIS

Osobní údaje	Ing. Daniela Mácová Tel: +420 721 204 404 Email: danym@email.cz Adresa: Rousínovská 26, 627 00 Brno, Česká republika Datum narození: 29.8.1983		
Pracovní zkušenosti	Česká geologická služba 2010 - dosud Pobočka Brno Obor aplikované geochemie a zkušební laboratoř Leitnerova 22, 658 69 Brno, Česká republika <i>Pracovní funkce: zástupce vedoucího laboratoře (od 1.3. 2012)</i> vývojově-výzkumný pracovník		
Absolvované pracovní stáže	Environmental Research Institute North Highland College, University of the Highhland and Islands, Castle Street, Thurso, Caithness, KW14 7JD, Scotland Doba stáže: 4 – 6/2008, 9 – 11/2008; 9/2009 – 4/2010 – pracovní-studijní stáž v rámci mobilního programu SOCRATES ERASMUS		
Vzdělání	Vysoké učení technické v Brně 2007 - dosud Fakulta chemická Purkyňova 118, 612 00 Brno, Česká republika Typ studia: <i>doktorský</i> Obor: <i>Chemie životního prostředí</i>	Vysoké učení technické v Brně 2002 - 2007 Fakulta chemická Purkyňova 118, 612 00 Brno, Česká republika Typ studia: <i>magisterský</i> Obor: <i>Chemie a technologie ochrany životního prostředí</i> Téma diplomové práce: „ <i>Sledování průniku produktů degradace polymeru do abiotických složek životního prostředí</i> “	Střední průmyslová škola chemická 1998 - 2002 Vranovská 65, 614 00 Brno, Česká republika Obor: <i>Aplikovaná chemie – Farmaceutické substance</i>

Řidičský průkaz

Skupina B

**Jazykové
znalosti****Angličtina** – pokročilý B1**Vybrané
absolvované
kurzy / školení**

2007

*8. ročník Školy hmotnostní spektrometrie (Lednice, 10-14.9.2007)**Kurz Analýza organických látek (Pohořelice, 8-11.10.2007)**Kurz celoživotního vzdělávání Aktuální evropská legislativa v potravinářství a životním prostředí (Brno, 6/3/22.12. 2007)*

2008

*Vzdělávací seminář SPME a GC (Praha, 31.1.2008)**Firemní seminář LC/MS/MS v analýze malých molekul (Brno, 12.3.2008)*

2009

*Firemní seminář Za hranice běžné LC/MS/MS (Brno, 10.3.2009)**10. ročník Školy hmotnostní spektrometrie (Seč, 14-18.9.2009)*

2010

*11. ročník Školy hmotnostní spektrometrie (Pec pod Sněžkou, 20-24.9.2010)**Analýza organických látek (Komorní Lhotka, 18-20.10.2010)*

2011

12. ročník Školy hmotnostní spektrometrie (Srní, 12-16.9.2011)

2012

Kurz základů vědecké práce (AVČR Brno, 20-24.2.2012)

VĚDECKÉ AKTIVITY

Projekty

- Interní projekt CGS/2012 No.335 – řešitel
„Monitoring POP v ovzduší na ostrově Jamese Rosse, Antarktida“
- Interní projekt CGS/2011-12 No.3339 – 2. řešitel
„Geochemické fosílie v půdách a jezerních sedimentech jako indikátory biologického původu organických látek“
- SPII 1a9/23/07 a VaV/660/1/03 – spolupráce na environmentální části projektu v letech 2010 – 2012
„Příspěvek ČR ke zajištění stavu ozónové vrstvy Země a slunečního UV záření v Antarktidě, paleoklimatická a paleogeografická rekonstrukce vybraného území Antarktidy a související geologické studium a mapování“ (nositelem Česká geologická služba)
- FRVŠ 1710/2010 – řešitel
„Stanovení reziduí pesticidů a mykotoxinů v biotických matricích pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí“
- FRVŠ 2604/2009 – 2. spoluřešitel
„Stanovení reziduí léčiv a degradačních produktů polymerů v biotických složkách životního prostředí“

Prezentace výsledků na konferencích

- Chemistry and Life (9-11.9.2008)
„Volatile degradation products of polyurethane foams“
– forma prezentace: poster
- Studentská odborná konference (Brno 4.12.2008)
„Determination of F₂-isoprostanes in vivo in biological tissues by LC/MS/MS“
– forma prezentace: přednáška (v anglickém jazyce)
- EMEC10 – 10th European Meeting on Environmental Chemistry (Limoges – FR, 2-5.12.2009)
„Environmental degradation of polyurethane foams“
– forma prezentace: poster
- MSB2010 – 25th International Symposium on Microscale Bioseparations (Praha, 21-25.3.2010)
„Determination of the oxidative stress markers isoprostanes in sea animal tissues,“
– forma prezentace: poster

- Analýza organických látek (Komorní Lhotka, 18.-20.10.2010)
„*Polycyklické aromatické uhlovodíky v okolí Valašského Meziříčí*“
– forma prezentace: přednáška (v českém jazyce)
- 5th Meeting on Chemistry and life (Brno, 14-16.9.2011)
„*Detection of polychlorinated biphenyls in air at James Ross Island, Antarctica*“
– forma prezentace: poster
- Goldschmidt 2011 (Praha, 14.-19.9.2011)
„*Molecular Fossils and Organic Proxies Evidencing the Facial Evolution of the Lower Miocene Sokolov Basin, Eger Graben*“
– forma prezentace: poster
- IMO2011 25th International Meeting on Organic Geochemistry (Interlaken – CH, 18-23.9.2011)
„*Evaluation of depositional environment and biological origin of kerogen in Lower Miocene Cyprus shale in the Eger Graben*“
– forma prezentace: poster
– prezentace návrhu pořádání konference IMO2015 v Praze

Publikační činnost

MÁCOVÁ, D.; ČÁSLAVSKÝ, J.; NÝVLT, D.: Detection of polychlorinated biphenyls in air at James Ross island, Antarctica. *Chemické listy*, 2012, roč. 106, č.1 s. 983-983. ISSN 0009-2770.

MÁCOVÁ, D.; FRANCŮ, E.; GERŠL, M.; ČÁSLAVSKÝ, J.; AULEHLOVÁ, M.: Polycyklické aromatické uhlovodíky v okolí Valašského Meziříčí. In *Analýza organických látek*. 1. vyd. Český Těšín: 2THETA, 2010. s. 157-166. ISBN 978-80-86380-54-4.

MÁCOVÁ, D.; ČÁSLAVSKÝ, J.; TOBIÁŠOVÁ, T.: Volatile degradation products of polyurethane foams. *Chemické listy*, 2008, roč. 102, č. 15, s. 351-351. ISSN 1213-7103.

ČÁSLAVSKÝ, J.; VÁVROVÁ, M.; **MÁCOVÁ, D.**; MRAVCOVÁ, L.: Degradation products of synthetic polymers as emerging environmental contaminants. *Chemické listy*, 2008, roč. 102, č. 15, s. 290-292. ISSN: 1213- 7103.

FRANCŮ, J.; **MÁCOVÁ, D.**; SÝKOROVÁ, I.; HAVELCOVÁ, M.; KŘÍBEK, B.; MARTÍNEK, K.; ROJÍK, P.: Molecular fossils and organic proxies evidencing the facial evolution of the Lower Miocene Sokolov basin, Eger Graben. *Mineralogical Magazine*, 2011(75) 3 s. 861-861

ČÁSLAVSKÝ, J.; **MÁCOVÁ, D.**; BOLECHOVÁ, M.; VÁVROVÁ, M.; VOJTOVÁ, L.; VESELÝ, M.: Produkty degradace polyurethanových pěn jako potenciální kontaminanty životního prostředí. In *XVIII. vědecké sympóziium s mezinárodní účastí "Situace v ekologicky zatížených regiónech Slovenska a střední Evropy"*. 1. vyd. Košice: Slovenská banická spoločnosť ZSVTS, 2009. s. 97-100. ISBN 978-80-970034-1- 8.

ČÁSLAVSKÝ, J.; VÁVROVÁ, M.; **MÁCOVÁ, D.**; MRAVCOVÁ, L.: Degradation Products of Synthetic Polymers: Potential Threat for the Environment. *5th Symposium Chemistry and Environmental Protection*. 1. Beograd, Serbia. Serbian Chemical Society, 2008, s. 10-11. ISBN 978-86-7132-037- 5.

VÁVROVÁ, M.; ČÁSLAVSKÝ, J.; **MÁCOVÁ, D.**; DAVID, J.: Sledování průniku produktů degradace polymerů. In *XVI. medzinárodné vedecké sympóziium o ekológii vo vybraných aglomeráciách Jelšavy – Bubenika a stredného spiša* vyd. 1. Košice. Ústav geotechniky SAV, 2007. s. 74-79. ISBN: 978-80-8077-070- 9.

MÁCOVÁ, D.; SQUIER, A., H.; ČÁSLAVSKÝ, J.; BOYD, K.; GIBB, S.: Determination of the oxidative stress markers isoprostanes in sea animal tissues. In *25th International Symposium on Microscale BioSeparations, Final program & book of abstrakt*, 2010. s. 64-65. ISBN: 978-80-254-6631- 5.

ČÁSLAVSKÝ, J.; VÁVROVÁ, M.; **MÁCOVÁ, D.**; MRAVCOVÁ, L.: Degradation Products of Synthetic Polymers: Potential Threat for the Environment. In *5th Symposium Chemistry and Environmental Protection - Book of Abstracts*. Belgrade, 1.vyd. Serbian Chemical Society, 2008. p. 10 - 11. ISBN 978-86-7132-037-5.

MÁCOVÁ, D.; ČÁSLAVSKÝ, J.; TOBIÁŠOVÁ, T.: Volatile degradation products of polyurethane foams. In *4th Meeting on Chemistry and Life: Book of Abstracts*. 1.vyd. Brno: Fakulta chemická VUT v Brně, 2008. s 28. ISBN 978-80-214-3715-9.

ČÁSLAVSKÝ, J.; **MÁCOVÁ, D.**; TOBIÁŠOVÁ, T.; ZLÁMALOVÁ GARGOŠOVÁ, H.; VÁVROVÁ, M.: Degradation products of polyurethanes with enhanced degradability. In *9th European Meeting on Environmental Chemistry: Programme and Book of Abstracts*. 1.vyd. Girona: Escola Polytechnica Superior, 2008. s. 29-29.

ČÁSLAVSKÝ, J.; VÁVROVÁ, M.; **MÁCOVÁ, D.**; MRAVCOVÁ, L.: Degradation products of synthetic polymers as emerging environmental contaminants. In *4th Meeting on Chemistry and Life: Book of Abstracts*. 1.vyd. Brno: Fakulta chemická VUT v Brně, 2008. s. 16-16. ISBN: 978-80-214-3715- 9.

ČÁSLAVSKÝ, J.; VÁVROVÁ, M.; **MÁCOVÁ, D.**; MRAVCOVÁ, L.: Degradation Products of Synthetic Polymers: Potential Threat for the Environment. In *8th European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC8): Book of abstracts*. 1.vyd. Inverness: Environmental Research Institute, 2007. s. 11-11.

FRANCŮ, J.; SÝKOROVÁ, I.; BOHDAN, K.; MARTÍNEK, K.; ROJÍK, P.; BECHTEL, A.; **MÁCOVÁ, D.**: Evolution of depositional environment and biological origin of kerogen in Lower Miocene Cyprus shale in the Eger Graben, Czech Republic. In *25th International Meeting on Organic Geochemistry – book of abstract*. 1.vyd. Hampton Hill, Middlesex: Rapiergroup, 2011. s. 184-184

Další vědecké aktivity

Spoluorganizování budoucí konference 27th International Meeting on Organic Geochemistry v roce 2015 Praze.