

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

Vývoj jednoduché voltametrické metody pro
stanovení 17β -estradiolu v perorálních
antikoncepčních pilulkách

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Martina Chromá

Vedoucí práce: Ing. Milan Sýs, Ph.D.

2023

Univerzity of Pardubice

Faculty chemical-technology
Department of analytical chemistry

Development of a simple voltammetric method for
the determination of 17β -estradiol in oral
contraceptive pills

Thesis

Author: Bc. Martina Chromá
Supervisor: Ing. Milan Sýs, Ph.D.

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Chromá**
Osobní číslo: **C21428**
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Vývoj jednoduché voltametrické metody pro stanovení
17 β -estradiolu v perorálních antikoncepčních pilulkách**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Z odborných publikací zpracujte literární rešerši na téma voltametrického stanovení 17 β -estradiolu v hormonálních léčivech, konkrétně v perorálních antikoncepčních pilulkách. Detailněji se zaměřte na elektrochemické chování 17 β -estradiolu v nevodném prostředí na uhlíkových, popřípadě kovových elektrodoých materiálech.
2. V rámci praktické části nalezněte optimální pracovní podmínky zahrnující výběr elektrody, složení pracovního média (organické rozpouštědlo s elektrolytem) a parametry voltametrické detekční techniky.
3. Provedte elektroanalytické stanovení 17 β -estradiolu v modelovém vzorku a dále aplikujte vy – vinutou metodu pro jeho stanovení ve farmaceutických přípravcích dostupných na předpis. Na závěr zhodnoťte a porovnejte analytickou výkonnost s již dříve zveřejněnými metodami.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Dariusz Guziejewski, PhD.**
Department of Inorganic and Analytical Chemistry,
University of Lodz, Poland

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. ledna 2023

Prohlašuji:

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

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

V Pardubicích dne 02. 05. 2023

Bc. Martina Chromá

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Milanovi Sýsovi Ph.D., za možnost pracovat pod jeho dohledem, odborné vedení, cenné rady a ochotu, které mi pomohly při zpracování diplomové práce. Dále děkuji Ing. Jitce Klikarové Ph.D., za výpomoc při vypracování referenční metody.

Děkuji Vám!

NÁZEV

Vývoj jednoduché voltametrické metody pro stanovení 17β -estradiolu v perorálních antikoncepčních pilulkách.

ANOTACE

Teoretická část diplomové práce se zaměřuje na základní charakteristiku, metabolismus, výskyt a analytické stanovení 17β -estradiolu v různých matricích. V rámci experimentální části byla optimalizována square-wave voltametrie za účelem vývoje elektroanalytické metody vhodné pro stanovení 17β -estradiolu v komerčně dostupných perorálních antikoncepčních pilulkách a kapslích používaných při hormonální substituční terapii. Optimalizovaná metoda byla validována a výsledky byly porovnávány s referenční chromatografickou metodou, kterou byla vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Estradiol, cyklická a square-wave voltametrie, antikoncepční pilulky.

TITLE

Development of a simple voltammetric method for the determination of 17β -estradiol in oral contraceptive pills.

ANNOTATION

The theoretical part of the thesis is focused on the basic characteristics, metabolism, occurrence, and analytical determination of 17β -estradiol in various matrices. As part of the experimental part, square-wave voltammetry was optimized to develop an electroanalytical method suitable for the determination of 17β -estradiol in commercially available oral contraceptive pills and capsules used in hormone replacement therapy. The optimized method was validated, and the results were compared with the reference chromatographic method, representing the high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection.

KEYWORDS

Estradiol, cyclic and square-wave voltammetry, contraceptive pills.

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	13
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST	16
1 Estradiol.....	16
1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti estradiolu	16
1.2 Metabolismus estradiolu	17
1.3 Obsah estradiolu ve vybraných vzorcích	18
1.3.1 Biologické vzorky	19
1.3.2 Léčiva	19
1.3.3 Potraviny	22
1.3.4 Životní prostředí	23
2 Analytické metody pro stanovení estradiolu	26
2.1 Stávající instrumentální metody.....	26
2.1.1 Estradiol v potravinách.....	27
2.1.2 Analytické metody ve farmaceutické analýze estradiolu	30
2.1.3 Analytické metody v enviromentální analýze estradiolu	32
2.1.4 Estradiol v klinické analýze	36
2.2 Elektroanalytické metody v monitorování estradiolu	38
2.2.1 Potenciometrické snímání estrogenů.....	39
2.2.2 Voltametrické stanovení estrogenů	40
2.2.3 Amperometrie a biosenzory	43
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
3 Metodika.....	45
3.1 Chemikálie a reagencie	45
3.2 Farmaceutické vzorky	45
3.3 Přístrojové vybavení.....	47
3.4 Příprava nevodné pastové elektrody	47
3.5 Obnovování povrchu u pracovních elektrod	48

3.6	Příprava roztoků	48
3.7	Příprava vzorků k analýze	48
3.8	Pracovní podmínky	49
3.8.1	Parametry cyklické a square-wave voltametrie.....	49
3.8.2	HPLC analýza.....	49
3.9	Statistická analýza	49
4	Výsledky a diskuse	50
4.1	Elektrochemické chování 17 β -estradiolu.....	50
4.2	Elektrochemické chování dienogestu.....	52
4.3	Optimalizace elektrochemické detekce 17 β -estradiolu.....	54
4.3.1	Výběr elektrodového materiálu	54
4.3.2	Výběr vhodného organického rozpouštědla	55
4.3.3	Parametry square-wave voltametrie	55
4.4	Validace vyvinuté elektroanalytické metody	56
4.4.1	Analytická výkonost.....	57
4.5	Validace referenční chromatografické metody	61
4.6	Analýza modelových a reálných vzorků	63
5	Závěr.....	67
6	Použitá literatura.....	68

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1. Chemický vzorec E2 [3].	17
Obrázek 2. Metabolismus E2 v těle člověka [11].	18
Obrázek 3. Chemický vzorec DNG [15].	20
Obrázek 4. Chemický vzorec EE2 [14].	20
Obrázek 5. Antikoncepční formy [18].	20
Obrázek 6. Zdroje E2 v životním prostředí [18].	24
Obrázek 7. Mikroextrakce na sorbentem potaženou tyčinku [29].	33
Obrázek 8. Schematická strategie zpracování biologických vzorků [28].	37
Obrázek 9. Navrhovaný elektrochemický oxidační mechanismus E2 [21].	41
Obrázek 10. Navrhovaný elektrochemický oxidační mechanismus EE2 [36].	41
Obrázek 11. Navrhovaný elektrochemický oxidační mechanismus DGN [34].	41
Obrázek 12. Schéma biosenzoru na bázi enzymu HRP pro detekci E2 [37].	44
Obrázek 13. Vzorek č.1: Mistra (2 mg DNG a 0,03 mg EE2 na tabletu).	46
Obrázek 14. Vzorek č.2: Bonadea (2 mg DNG a 0,03 mg EE2 na tabletu).	46
Obrázek 15. Vzorek č. 3: Estrofem (2 mg E2 na tabletu).	46
Obrázek 16. CPE modifikovaná tenzidem.	48
Obrázek 17. Cyklické voltamogramy 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EE2 obdržené na GCE (černá), CPE/RWB/SDS (červená), BDDE (modrá křivka) v čistém MeCN s 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při rychlostí skenování 0,05 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$.	51
Obrázek 18. Pravděpodobný elektroodový reakční mechanismus E2 v čistém acetonitrilu.	51
Obrázek 19. Cyklické voltamogramy 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ E2 obdržené na GCE v acetonu s 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 o různé příměsi vody při rychlost skenování 0,05 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$.	52
Obrázek 20. Pravděpodobný reakční mechanismus DNG.	53
Obrázek 21. Cyklické voltamogramy 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DNG obdržené na GCE (černá), CPE/RWB/SDS (červená), BDDE (modrá křivka) v čistém MeCN s 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při rychlostí skenování 0,05 $\text{V}\cdot\text{s}^{-1}$.	54
Obrázek 22. Závislost potenciálu amplitudy na výšce anodického píku 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ E2 obdrženého na GCE v acetonu s 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při frekvenci 10 Hz a potenciálovém kroku 5 mV.	55
Obrázek 23. Vliv frekvence na výšku anodického píku pro 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ E2 obdrženého na GCE v acetonu s 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při potenciálu amplitudy 30 mV	56

Obrázek 24. Kalibrační přímka E2 obdržená na GCE v čistém acetonu obsahující 0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ při frekvenci 10 Hz, potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.	58
Obrázek 25. Kalibrační přímka EE2 obdržená na GCE v čistém MeCN obsahující 0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ při frekvenci 10 Hz, potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.	59
Obrázek 26. Kalibrační přímka DNG obdržená na GCE v čistém MeCN obsahující 0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ při frekvenci 10 Hz, potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.	59
Obrázek 27. Voltamogramy pro 10 až 100 μmol·l ⁻¹ EE2 pořízené na GCE v čistém MeCN s 0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ při frekvenci 10 Hz, amplitudě 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.	60
Obrázek 28. Voltamogramy 10 až 100 μmol·l ⁻¹ DNG pořízené na GCE v čistém MeCN s 0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ při frekvenci 10 Hz, amplitudě 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.	60
Obrázek 29. Typické RP-HPLC-DAD chromatogramy standardů o koncentraci 100 μmol·l ⁻¹ . Experimentální podmínky: Kolona Ascentis Express C18 (150 × 3 mm, 2,7 μm) temperovaná na 30 °C, izokratická eluce 50% vodného acetonitrilu (v/v) s průtokem 0,5 ml·min ⁻¹ , dávkovaný objem 2 μl, detekce při 280 nm.	62
Obrázek 30. Kalibrační křivky hormonů s odpovídajícími rovnicemi regrese a koeficienty stanovení získané pomocí referenční RP-HPLC-DAD analýzy.	63
Obrázek 31. Analýza modelového vzorku E2 metodou standardního přídatku. Hodnoty výšek píků byly obdržené na GCE v čistém acetonu obsahující 0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ při frekvenci 10 Hz, potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.	64
Obrázek 32. Záznam reálné analýzy vzorku Mistra pořízený SWV na GCE v čistém MeCN obsahující 0,1 mol·l ⁻¹ LiClO ₄ při frekvenci 10 Hz, potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.	65
Obrázek 33. Záznam reálné analýzy vzorku Mistra pořízené pomocí referenční metody RP-HPLC-DAD na koloně Ascentis Express C18 (150 × 3 mm, 2,7 μm) temperovaná na 30 °C; izokratická eluce 50% vodného acetonitrilu (v/v) s průtokem 0,5 ml·min ⁻¹ , dávkovaný objem 2 μl, detekce při 280 nm.	65
Tabulka 1. Vybrané komerční hormonální přípravky.	21
Tabulka 2. E2 v mléčných výrobcích v pg·ml ⁻¹ nebo pg·g ⁻¹ [3].	22
Tabulka 3. Typické koncentrace estradiolu produkovaných ženami močí [3].	24
Tabulka 4. Porovnání výhod a omezení různých analytických metod [24].	27
Tabulka 5. Extrakční metody pro stanovení E2 v potravinových maticích [5].	28
Tabulka 6. Aplikace různých metod analýzy E2 v potravinových maticích [24].	29

Tabulka 7. Analytické metody stanovení E2 a EE2 v tělních tekutinách [28].....	38
Tabulka 8. Srovnání voltametrických metod ve stanovení E2 a EE2 [21].....	42
Tabulka 9. Parametry validace získané pomocí vyvinuté metody SWV.	61
Tabulka 10. Analytické parametry referenční HPLC metody.	62
Tabulka 11. Porovnání SWV a referenční HPLC metody v modelové analýze.	66
Tabulka 12. Výsledky analýz reálných hormonálních léčiv.	66

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

E2 – 17 β -estradiol

EE2 – 17 α -ethinylestradiol

DNG – dienogest

ČOV – čistička odpadních vod

SHBG – globulin vázající pohlavní hormony

ECD – endokrinní disruptory

MIP – molekulárně imprintované polymery

BQEIC – benzimidazo[2,1-b]chinazolin-12(6H)-on-5-ethylimidazolester

LOD – mez detekce

LOQ – mez kvantifikace

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LC – kapalinová chromatografie

GC – plynová chromatografie

LSV – lineární voltametrie

CV – cyklická voltametrie

DPV – diferenční pulzní voltametrie

SWV – square-wave voltametrie

HMDE – visící rtuťová kapková elektroda

NPs – nanočástice

RIA – radioimunoanalýza

SPE – extrakce na pevné fázi

LLE – extrakce kapalina-kapalina

MS – hmotnostní spektrometrie

CI – chemická ionizace

ESI – elektrosprejová ionizace

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku

HRP – křenová peroxidáza

μ -SPE – extrakce mikropevnou fází

DPSE – disperzní extrakce na pevné fázi

m-SPSE – extrakce na magnetické pevné fázi

SBSE – sorpční extrakce míchací tyčinkou

SCSE – sorpční extrakce koláčem
FPSE – sorpční extrakce tkaninou
UV – ultrafialová oblast
VIS – viditelná oblast
ELISA – kvantitativní imunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent
CLETA – chemiluminescenční enzymová imunoanalýza
RAM – materiál s omezeným přístupem
FLD – fluorescenční detektor
MSPE – extrakce magnetickou pevnou fází
MCNTs – magnetické uhlíkové nanotrubičky
MWCNTs – vícestěnné uhlíkové nanotrubičky
PDA – polydopamin
BRP – Britton-Robinsonův pufr
DME – kapající rtuťová elektroda
CE – kapilární elektroforéza
ISE – iontově selektivní elektrody
H₂Q – pyrokatechol
Q – benzochinon
MeCN – acetonitril
GCE – elektroda ze skelného uhlíku
AuE – zlatá elektroda
PtE – platinová elektrody
CPE – nevodná uhlíková pastová elektroda s tenzidem
BDDE – borem dopovaná diamantová elektroda
SCE – nasycená kalomelová elektroda
MO – minerální olej
RP-HPLC-DAD – chromatografická metoda s izokratickou elucí na reverzní fázi s DAD detektorem

ÚVOD

Téma diplomové práce vychází z vlastního zájmu autorky³⁵ o problematiku užívání perorálních antikoncepčních pilulek a v nich obsažených hormonů. Hlavním předmětem této práce se proto stalo screeningové elektrochemické stanovení hormonů 17 β -estradiolu, ethinylestradiolu a dienogestu, jež jsou nejběžnějšími složkami hormonálních léčiv. Tyto léčiva spadají do skupiny endokrinních disruptorů, které následně mohou měnit reprodukční a vývojové funkce organismu. 17 β -estradiol jakožto přírodní estrogen, vykonává v lidském těle funkci steroidního hormonu, který je důležitý při pohlavním dospívání, růstu pohlavních orgánů a vývoji sekundárních pohlavních znaků. Na druhou stranu jejich vysoký příjem může způsobit zdravotní komplikace, a z tohoto důvodu se stalo stanovení těchto hormonů ústředním tématem diplomové práce.

V úvodu práce jsou popsány fyzikálně-chemické vlastnosti, metabolismus a výskyt estradiolu, jakožto nejvýznamnějšího estrogenu. Estradiol se vyskytuje v celém těle, zejména v cílových orgánech pohlavních hormonů, jako jsou prsa, vaječníky i děloha, dále v živočišných potravinách (zejména v tučných mléčných výrobcích). Syntetický ethinylestradiol a dienogest je možné nalézt v téměř všech prodávaných antikoncepčních léčiv. Práce stručně uvádí i rizika užívání hormonálních léků, včetně jejich dopadů na životní prostředí, kam se dostávají zejména nesprávnou likvidací těchto léčiv. Další část pojednává o tradičních i moderních instrumentálních analytických metodách vyvinutých pro stanovení estradiolu v biologických vzorcích, potravinách, léčivech a životním prostředí, přičemž větší prostor byl věnován metodám elektroanalytickým.

Experimentální část se zaměřuje na popis elektrochemického chování nejen estradiolu, ale také ethinylestradiolu a dienogestu, s cílem vyvinout zcela novou voltametrickou metodu pro jejich kvantifikaci ve vybraných vzorcích léčiv (Estrofem, Bonadea, Mistra). Tyto reálné vzorky se rovněž analyzovaly pomocí referenční metody kapalinové chromatografie, kdy výsledky získané oběma principiálně různými analytickými přístupy byly porovnávány.

Znalost obsahu hormonů v hormonálních přípravcích je důležitou součástí jejich vývoje, výroby, distribuce a vhodnosti použití. Tudíž je vysoká poptávka po jednoduché, rychlé a finančně nenáročné analytické metodě. Z tohoto důvodu by mohla nově vyvinutá voltametrická metoda nalézt své uplatnění ve farmaceutické analýze. Nicméně výzvou zůstává analýza potravinářských a klinických vzorků, kde se koncentrace estradiolu v tučných mléčných výrobcích pohybuje okolo 100 nmol·l⁻¹ a v séru se nachází v rozmezí 3,7×10⁻²-1,5 nmol·l⁻¹, kde i složitost matrice může významně rušit voltametrické stanovení.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Estradiol

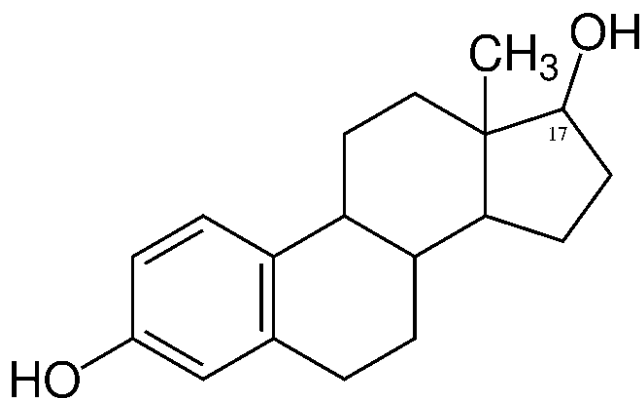
Estradiol (E2) se řadí mezi přírodní estrogény ze skupiny steroidních hormonů. Jeho syntetickou formou používanou ve farmacii je ethinylestradiol (EE2). E2 se produkuje endogenně všemi savci, a to ve vaječnících u žen a ve varlatech a nadledvinách u mužů. Jeho hladinu reguluje dostupnost androgenních prekurzorů. E2 řídí řadu fyziologických úkonů, jako je vývoj těla, ovulace, menstruační cyklus, těhotenství a početí, spermatogeneze, metabolismus minerálů, sacharidů, bílkovin a lipidů. Působí jako růstový hormon pro tkáň reprodukčních orgánů tím, že podporuje vývoj vaginální výstelky, žlázového děložního čípku, endometria, myometria a výstelky vejcovodů. Dále se podílí na vývoji mléčné žlázy, udržení zdravých kostí, kůže, jater a mozku [1].

Nejčastěji se E2 zjišťuje jako součást vyšetření hormonů folikulárního a žlutého tělíska. Nedostatkem E2 trpí ženy obvykle v období menopauzy a souvisí s vyšším rizikem srdečních chorob nebo osteoporózy. Syntetický estradiol se používá zejména při hormonální léčbě (např. v menopauze) a v léčích proti nežádoucímu otěhotnění – hormonální antikoncepci. Při hormonální léčbě hrozí nárůst rizika rakoviny vaječníků a prsu. Vyžaduje se tedy vývoj vysoce citlivých metod detekce E2, aby byla poskytována vhodná syntetická dávka během léčby. Užívání hormonální antikoncepci s obsahem E2 však rovněž nese svá rizika, jako je vyšší pravděpodobnost kardiovaskulárních onemocnění, žilní trombózy a cévní mozkové příhody. E2 také zvyšuje hladinu plazmatického reninu a angiotensinu, který způsobuje retenci sodíku a vody v těle, což má za následek hypertenzi [2].

Co se týče životního prostředí je E2 přítomen v odpadních vodách a vypouštěn do povrchových vod z čističek odpadních vod (ČOV). Nízká rozpustnost a lipofilní povaha E2 způsobuje jeho navázání na pevné substráty, a tudíž nedochází k rozpouštění E2 ve vodných roztocích [3,4,5].

1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti estradiolu

E2 je na vzduchu stabilní bílá krystalická látka bez zápachu. Při tepelném rozkladu E2 vzniká štiplavý kouř a dráždivé výpary [6]. Vyskytuje se ve dvou izomerních formách, alfa a beta. Beta-estradiol má největší fyziologickou aktivitu ze všech přirozeně se vyskytujících estrogenů. Alfa-forma je relativně neaktivní [7]. Obr. 1 zobrazuje chemický vzorec 17β -estradiolu.



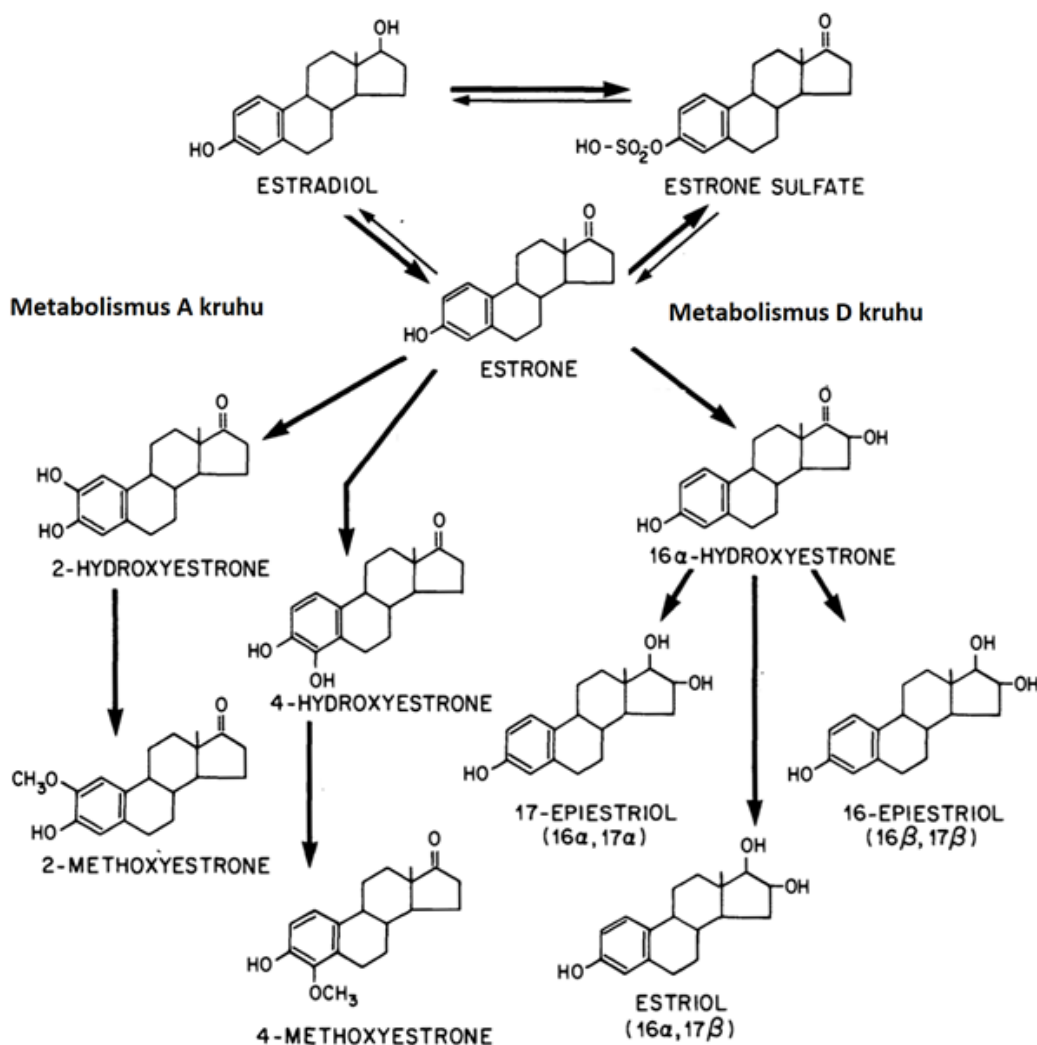
Obrázek 1. Chemický vzorec E2 [3].

Bod varu E2 je 445,9 °C, zatímco bod tání se rovná 178,5 °C (body tání derivátů E2: estradiol 17-valerát 144-145 °C, estradiol 17-heptonát 94-96 °C) [6]. E2 se dobře rozpouští v organických rozpouštědlech, jako je aceton, ethanol, dioxan, méně rozpustný je v rostlinných olejích a špatně rozpustný ve vodě (3,90 mg·l⁻¹ při 27 °C) [8].

1.2 Metabolismus estradiolu

E2 se u žen syntetizuje procesem steroidogeneze z testosteronu, a to ve žlutém tělisku vaječnicků. Dále ho v období těhotenství produkuje placenta. U mužů vzniká ve varlatech a nadledvinách stejným procesem. E2 se transportuje krví navázán na plazmové bílkoviny. Silně se váže na transportní globulin SHBG [9].

Exogenně podávané estrogény se v lidském těle metabolizují stejným způsobem jako endogenní estrogény. Metabolická přeměna probíhá především v játrech a střevech a je založena na oxidačních procesech. První fází je oxidace E2 v poloze C17 za vzniku estronu. Tento proces je sice reverzibilní, nicméně tvorba estronu je rychlejší než jeho zpětná redukce na E2. Dalším oxidačním krokem je hydroxylace estronu. Tato reakce je již ireverzibilní a probíhá buď na A-kruhu (katalyzovaná cytochromovými enzymy CYP3A4 a CYP1A2) za vzniku 2-hydroxyestronu nebo na D-kruhu za vzniku 16-hydroxyestronu. 2-hydroxyestron se nazývá jako „dobrý“ estrogen, zatímco 16-hydroxyestron je považován za „špatný“ estrogen, protože zvyšuje riziko vzniku rakoviny prsu [10]. Oba hydroxylované estrony jsou dále metabolizovány na konečné metabolity (jako např. estriol), které jsou z organismu vylučovány močí s glukuronidovými a sulfátovými konjugáty [9]. Na Obr. 2 jsou zobrazeny dvě hlavní metabolické cesty estronu: 2-hydroxylace a 16 α -hydroxylace [11].



Obrázek 2. Metabolismus E2 v těle člověka [11].

1.3 Obsah estradiolu ve vybraných vzorcích

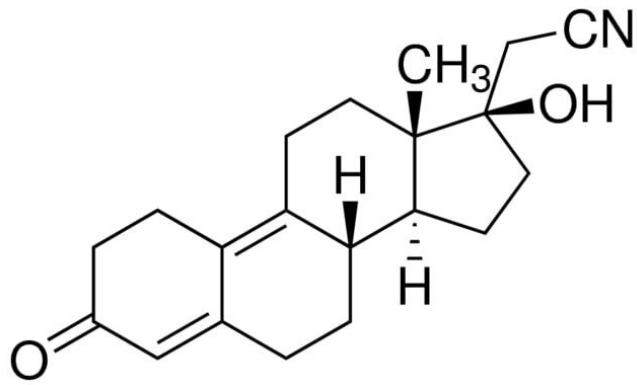
E2 vykonává v lidském těle funkci steroidního hormonu, které jsou důležité při pohlavním dospívání. Podporují růst ženských pohlavních orgánů (dělohy, pochvy) a vývoj sekundárních pohlavních znaků. U dospělých žen jejich hladina kolísá v pravidelném měsíčním rytmu (menstruační cyklus). Hladina v krvi se pohybuje v rozmezí 18–915 pmol·l⁻¹. Syntetické estrogény se pak používají ve farmacii na úpravu ovulace a menstruačního cyklu (hormonální antikoncepce), k hormonální substituční terapii u žen po menopauze, či v produktech používaných v dermatologii. Estradiol však nalezneme i v živočišných potravinách (např. ve smetaně 450 nmol·l⁻¹, podmáslí 150 nmol·l⁻¹, mléce 30 nmol·l⁻¹), kam se dostává ze zvířat, kterým jsou podávány hormony, ale i v plodinách, jež byly hnojeny hnojem. Do vodných toků se estradiol dostává z čističek odpadních vod (koncentrace E2 v odpadních vodách je okolo 0,4 ng·l⁻¹) z důvodu nesprávné likvidace léčiv [12,13].

1.3.1 Biologické vzorky

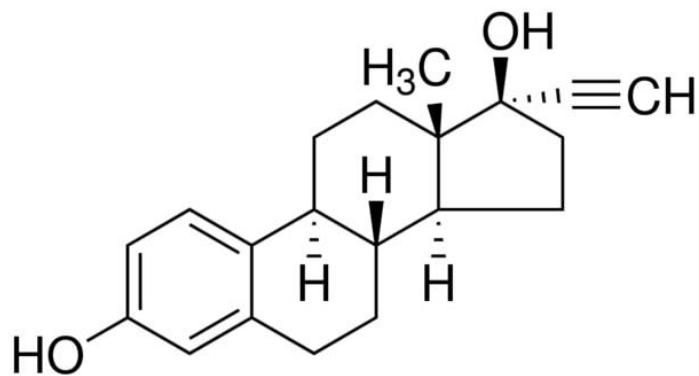
Za biologický vzorek se považuje jakýkoli správně odebraný biologický materiál, ať už se jedná o krevní sérum, moč či sliny vyšetřovaného pacienta. V biologických matricích se běžně stanovuje E2 a EE2, jehož strukturní vzorec je zobrazen na Obr. 3. Po nich následuje estron a v nejmenším množství estriol. Estrogeny se mohou nacházet v celém těle, zejména v cílových orgánech pohlavních hormonů, jako jsou prsa, vaječníky a děloha. V tělních tekutinách lze E2 stanovit v krvi, moči a slinách. U fertálních žen závisí jeho koncentrace na fázi menstruačního cyklu. Je tedy vhodné při jeho stanovení uvést den cyklu. Krevní vzorek se získává ze žíly na paži pacienta, vzorek moči je testován jako kvantitativní 24hodinový sběr moči. Vzorek slin se ke stanovení E2 používá pouze ve speciálních případech [12]. Normální hodnoty E2 v séru se nachází u mužů v rozmezí 10–50 pg·ml⁻¹, u žen před menopauzou 30–400 pg·ml⁻¹, u žen po menopauze 0–30 pg·ml⁻¹ a u dětí méně než 10 pg·ml⁻¹ [3].

1.3.2 Léčiva

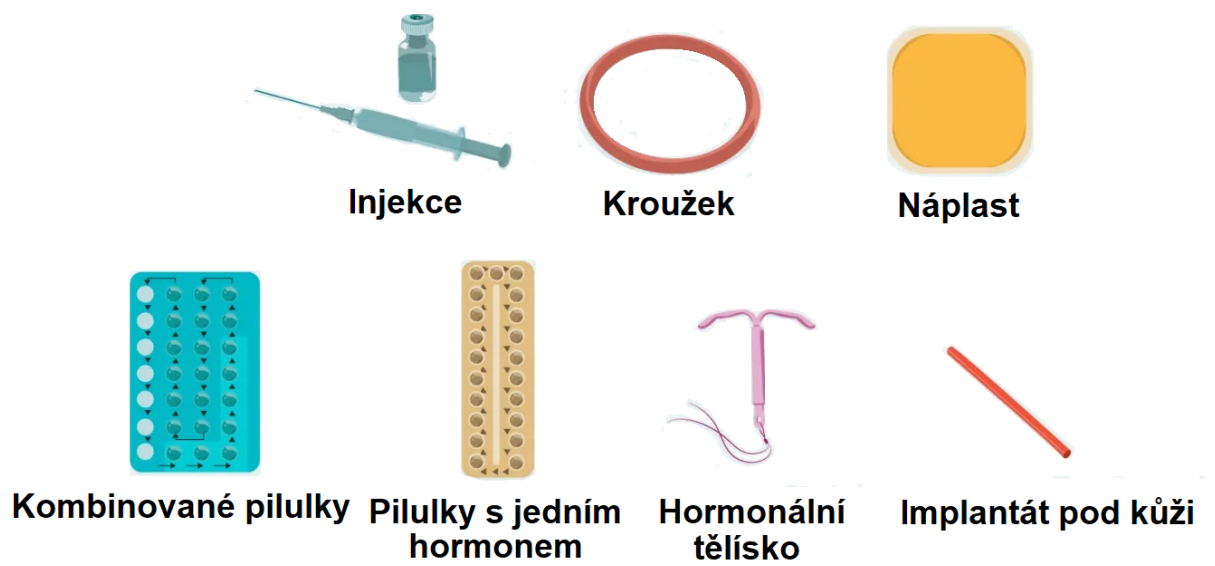
Léčivem se rozumí látka nebo kombinace látek, které prostřednictvím svého účinku obnovují, upravují nebo ovlivňují fyziologické funkce lidí či zvířat. V roce 1960 byla poprvé použita kombinovaná perorální antikoncepce. Od té doby ji užívají miliony žen, aby se vyhnuly nechtěnému těhotenství. Téměř ve všech prodávaných antikoncepčních lécích je obsažena kombinace hormonů dienogest (DNG; ze skupiny progestinů), jehož strukturní vzorec je uveden na Obr. 3 a EE2 (patřící do estrogenů) jehož strukturní vzorec je uveden na Obr. 4 [14,15,16]. E2 je pak nejvíce využíván při hormonální substituční léčbě u žen především po menopauze [17]. Kromě tabletových přípravků (perorálních, vaginálních) existují i přípravky podávané injekčně, transdermálně a implantátovou formou. Na Obr. 5 jsou uvedeny běžné formy antikoncepce [18]. Dále Tab. 1 zobrazuje obsah E2, EE2 a DNG ve vybraných komerčních hormonálních přípravcích [13].



Obrázek 3. Chemický vzorec DNG [15].



Obrázek 4. Chemický vzorec EE2 [14].



Obrázek 5. Antikoncepční formy [18].

Tabulka 1. Vybrané komerční hormonální přípravky.

Komerční název	Aktivní látka	Obsah (mg)	Forma
Linoladiol N	E2	0,1	krém
Estrace	E2	0,1	krém
Diecyclen	EE2	2/0,03	tableta
Yosefinne	drospirenon/EE2	3/0,02	tableta
Lindynette	gestoden/EE2	0,075/0,02	tableta
Sidreta	drospirenon/EE2	3/0,03	tableta
Estrofem	E2	2	tableta
Mistra	DNG/EE2	2/0,03	tableta
Bonadea	DNG/EE2	2/0,03	tableta

Poznámka: Obsah hormonů v krémech se uvádí vždy na 1 g přípravku a v tabletách na 1 tabletu.

1.3.2.1 Perorální tablety

Poločasy rozpadu různých estrogenových přípravků jsou v rozmezí 1–12 hodin, přičemž se různí dle způsobu podání [12]. Existují dva druhy perorální antikoncepce, tj. kombinovaná hormonální antikoncepce (obsahující estrogeny i gestageny) a gestagenní antikoncepce (obsahující pouze gestageny). Při průchodu gastrointestinálním traktem se tableta rychle rozkládá, uvolněné hormony se absorbují a následně jsou v játrech metabolizovány. Nicméně biologická dostupnost orálních estrogenů se pohybuje pouze mezi 2–10 %. Esterifikace E2 (např. estradiol valerát) zlepšuje jeho vstřebávání. Nejdříve tak dochází ke štěpení esterů a až poté k uvolnění endogenního estradiolu. Hlavními metabolity jsou estron, estron sulfát a estron glukuronid. Až 15 % podané dávky E2 se absorbuje jako estron, 25 % jako estron sulfát, 25 % jako estradiol glukuronid a 25 % jako estron glukuronid [13,19].

1.3.2.2 Transdermální přípravky

Za transdermální přípravky se považují krémy a náplasti, jež obsažené aktivní látky pomalu uvolňují přes kůži do krevního řečiště. Tyto přípravky udržují konstantní hladiny E2 po dobu 1 týdne. Zajímavé je, že biologická dostupnost estradiolu po transdermálním podání bývá až 20krát vyšší než po perorálním podání, a to pravděpodobně z důvodu pozměněné metabolické cesty v játrech. Transdermální způsob podávání E2 přitahuje v posledních letech stále větší pozornost, a to nejen kvůli lepší biologické dostupnosti, ale také proto, že na rozdíl od orální cesty je dosaženo přirozenějšího poměru koncentrací E2 a estronu v plazmě [17].

1.3.2.3 Tělíska zaváděné do pochvy

E2 se účinně vstřebává také přes sliznici pochvy. Nejznámějším produktem je nitroděložní hormonální tělísko, což je malý, pružný, předmět ve tvaru „T“, který se zavádí do dělohy. Obsahuje malé množství syntetického hormonu progestinu, který v těle pomáhá zabránit spermiím prostoupit přes děložní hrdlo do dělohy. Životnost se uvádí minimálně tři roky bez jakéhokoli vyjmutí. Dále stojí za zmínku tzv. kroužek, který se zavádí na 3 týdny, poté se na jeden týden vyjme a následně se zaveden kroužek nový. Jedná se o kombinovanou metodu hormonální antikoncepce [13].

1.3.3 Potraviny

Potravinou se rozumí výrobek nebo látka určená pro výživu lidí. Průměrný příjem hormonů v potravinách pro dospělého člověka činí 0,1 μg estrogenů za den, což je velmi málo ve srovnání s endogenní produkcí v lidském těle. Dva největší zdroje estrogenních sloučenin jsou maso a mléčné výrobky. Maso obsahuje estrogény v rozmezí od 3 do 5 $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$ a mléčné výrobky jich obsahují většinou ještě více. Jelikož jsou steroidní hormony lipofilní povahy, koncentrují se v mléčných výrobcích v závislosti na obsahu jejich tuku. To je důvod, proč se nacházejí nejvyšší hodnoty ve smetaně a v másle. Obsah E2 v některých mléčných výrobcích je shrnut v Tab. 2 [3].

Tabulka 2. E2 v mléčných výrobcích v $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ nebo $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ [3].

Mléčný výrobek	Obsah E2
Kravske mléko	
Říje	84 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$
Pozdní březost	49 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$
Luteální fáze	29 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$
Smetana	< 30 $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$
Sýr	10 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$
Máslo	82 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$

Takto vysoké koncentrace E2 (i ostatních estrogenních sloučenin) v mléčných výrobcích jsou zjevným problémem zejména z důvodu časté konzumace těchto výrobků celou populací. Takto velký příjem estrogenních sloučenin může především u dětí přispívat ke vzniku rakoviny v pozdějším životě. Kromě živočišných produktů mohou být významnými zdroji estrogenů i rostliny. Mezi nejrozšířenější a nejznámější druhy fytoestrogenů patří

isoflavony, které se například nachází v sójových produktech, nebo flavony, které se nacházejí v zelené listové zelenině a bylinkách.

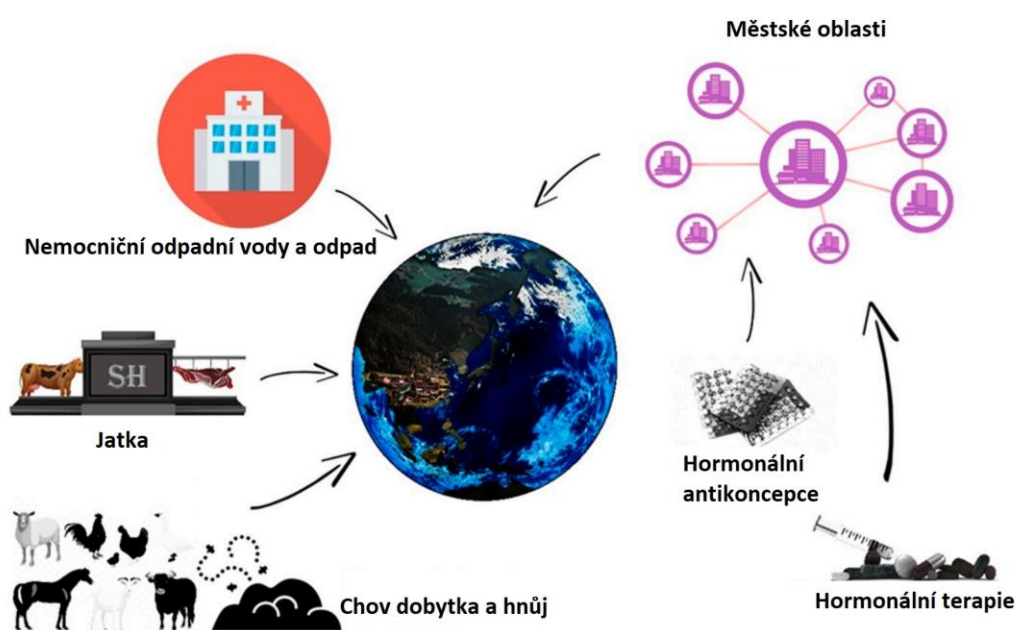
1.3.4 Životní prostředí

Kontaminanty životního prostředí, které nepříznivě působí na endokrinní systém živých organismů a narušují jejich fyziologické procesy, jsou označovány jako endokrinní disruptory (ECD). Zahrnují velkou skupinu přírodních i syntetických estrogenů. Jedním z nejvýznamnějších ECD je právě E2, proto je jeho monitorování v životním prostředí velmi důležité [4].

Endokrinní systém uvolňuje hormony, které působí jako tzv. chemičtí poslové, jelikož koordinují a regulují komunikaci mezi buňkami, interagují s receptory v buňkách, spouštějí specifické reakce a podílí se na normální biologické funkci organismu, jako je růst, embryonální vývoj a rozmnožování. ECD narušují tuto normální komunikaci mezi poslem a receptorem v buňce tak, že chemická informace není správně interpretována. ECD mohou napodobovat působení přirozeně produkovaných hormonů, což buňky vede k neopodstatněným reakcím, jako je produkce hormonů v nevhodnou dobu nebo v nadměrném množství (agonistický účinek). ECD se ale také mohou vázat na receptory, a zabránit tak navázání přirozených hormonů (antagonistický účinek) nebo se mohou vázat na transportní proteiny v krvi, a změnit tak množství přirozených hormonů přítomných v oběhu. V neposlední řadě mohou ECD zasahovat do metabolických procesů ovlivňujících syntézu a kontrolu přirozených koncentrací hormonů [3].

Hojně se ECD používají u zemědělských zvířat, protože mohou urychlit jejich růst. Výsledkem je také zvýšená produkce mléka. Nicméně estrogeny podávané zvířeti mohou skončit v jejich masě či mléce. Nadměrná konzumace potravin kontaminovaných estrogeny vede ke zdravotním problémům konzumenta [5]. Vědci zatím definovali pět hlavních kategorií nepříznivých účinků u živočichů, které mohou souviset s expozicí ECD. Patří mezi ně rakovina a poruchy kardiovaskulárního, imunitního, nervového a reprodukčního systému způsobující vývojové změny (neplodnost, předčasná puberta či endometrióza) [3,5]. Bylo prokázáno, že menší zvířata trpí po expozice ECD deformací embrya a úmrtností, zhoršenou reprodukcí, poruchami růstu, problémy se štítnou žlázou, oslabeným imunitním systémem, či feminizací. U ryb žijících v blízkosti komunálních odpadních vod bylo pozorováno tzv. intersexuální chování (samci měnící se na samice) [3].

ECD se do životního prostředí dostává ze dvou hlavních zdrojů: voda z hnojem hnojených polí a nesprávná likvidace léčiv. Prošlá nebo přebytečná estrogenní léčiva, jako je antikoncepce nebo hormonální léky, jsou častěji splachovány do kanalizace nežli zlikvidovány na skládce. Dostávají se tak do odpadních vod v jejich aktivní formě. Tyto sloučeniny se transformují a stávají se ECD. Klasické postupy čištění odpadních vod jako koagulace, usazování, prostá sedimentace a někdy i dezinfekce chlorem však léčiva, ECD nebo jejich metabolity účinně neodstraňují. Hormonální metabolity a léčiva jsou pak přímo transportovány do povrchových vod a následně způsobují expozici volně žijícím živočichům, včetně ryb a jiných savců [4]. V tuto chvíli není jasné, zda se podobné účinky vyskytují u lidské populace. Kromě toho mohou ECD ovlivnit nejen exponovaného jedince, ale i následující generace. Kontaminace podzemní vody estrogy je ale minimální, protože se svou fenolickou skupinou poměrně pevně vážou na svrchní částice půdy. Na Obr. 6 jsou ukázány zdroje estrogenů kontaminující životní prostředí. K navýšení celkové koncentrace hormonů v životním prostředí přispívá pochopitelně i jejich endogenní produkce člověkem. Tab. 3 ukazuje koncentrace E2, které vyprodukuje ženy za den [3].



Obrázek 6. Zdroje E2 v životním prostředí [18].

Tabulka 3. Typické koncentrace estradiolu produkovaných ženami močí [3].

Fáze	Produkce ($\mu\text{g}/\text{den}$)	Vylučování močí ($\mu\text{g}/\text{den}$)
předpuberta	13	0
fertilní ženy	82–695	0,3–5

1.3.4.1 Proces odstraňování estradiolu v čističkách odpadních vod

K odstranění steroidních hormonů (včetně E2) v čističkách odpadních vod (ČOV) se úspěšně používá široká škála technologií úpravy vody. Tyto pokročilé techniky čištění sice snižují vypouštění E2 do vodních toků, ale jsou finančně nákladné. Jedná se zejména o fyzikálně-chemické úpravy vod, které většinou zahrnují sorpci na pevnou fázi (SPE), filtraci přes membrány, chemickou koagulaci, oxidaci ozonem a degradaci pomocí ultrafialového (UV) záření.

Adsorpční proces na pevné částice může účinně odstraňovat ECD z vodných systémů [3]. Mezi nejpoužívanější sorbenty se řadí modifikovaný oxid křemičitý, na jehož povrchu jsou navázány zbytky alkylových řetězců, granulované aktivní uhlí a hydrofilně-lipofilní sorbenty. Běžné SPE sorbenty se vyznačují nízkou selektivitou, čímž se snižuje jejich účinnost. Lepší alternativou ke klasickým sorbentům mohou být sorbenty na bázi molekulárně imprintovaných polymerů (MIP). MIP jsou syntetické materiály získané technologií molekulového imprintování (otisku), které tak mají pro daný analyt předem stanovenou selektivitu a specifitu. Sorbenty na bázi MIP jsou snadné na přípravu, levné a vyznačující se vysokou fyzikální odolností [4].

Aktivní uhlí snadno odstraňuje estrogenové sloučeniny, nicméně jeho účinnost je ovlivněna povrchem, povrchovým pH, pórovitostí a povrchovým nábojem. Vysoká koncentrace organické složky v odpadní vodě však může ucpat póry ve struktuře sorbentu a tím snížit jeho kapacitu a účinnost. Právě nasycení a inaktivace vazebných míst jsou velkými nevýhodami, tudíž je nezbytné sorbent přidávat v nadbytku. I když je aktivní uhlí účinné při snižování koncentrací ECD v odpadních vodách, není pro mnoho zařízení ČOV ekonomicky schůdnou možností.

Účinnost membrán pro odstraňování ECD závisí na velikosti sloučenin, chemických podmínkách a materiálu membrány. Odstranění E2 je možné přes membrány s malými póry (nanofiltrace a reverzní osmóza). Lze dosáhnout až 90% účinnosti. Naproti tomu membrány s velkými póry (ultrafiltrace a mikrofiltrace) nelze na odstranění estradiolu použít vůbec. Tyto technologie jsou příliš drahé a produkují odpad, který vyžaduje další zpracování. Další nevýhodou membrán je zanášení pórů, které je nutné pravidelně čistit.

Jako chemické koagulanty se v ČOV používají zejména soli hliníku a železa. Nejvhodnějším a nejspolehlivějším koagulantem pro odstraňování přírodního i syntetického E2 je polyaluminium chlorid.

Oxidace ozonem se používá k odstranění nebo chemické přeměně estrogenních sloučenin na méně škodlivé látky, které představují menší riziko pro životní prostředí.

Účinnost oxidace E2 ozónem souvisí s pH, chemickým složením vody a teplotou. Při expozici E2 a jeho sloučenin ozonem v koncentraci $2 \cdot 10^3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ lze dosáhnout více než 95% účinnosti.

Vysokoenergetické ultrafialové světlo se široce používá pro mikrobiální dezinfekci vody. UV záření může degradovat estrogenní sloučeniny přímou fotolýzou. Aby bylo UV ošetření účinné, v sloučenině musí být přítomen chromofor (tj. látka je schopná absorbovat světelnou energii) a energie světla musí být adekvátní k rozbití chemických vazeb ve struktuře sloučeniny. UV degradace estrogenních sloučenin se většinou používá pouze při úpravě pitné vody. V ČOV se aplikuje velmi zřídka kvůli složitosti matrice [3].

2 Analytické metody pro stanovení estradiolu

Jelikož se E2 vyskytuje v potravinách a v životním prostředí většinou ve velmi nízkých až stopových koncentracích, klade se velký důraz na vývoj vysoce citlivých instrumentálních metod, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC) s hmotnostní detekcí (MS), imunotesty a elektrochemické metody. Nicméně uvedené metody jsou časově náročné na přípravu vzorku, používají drahá činidla a vyžadují dobře vyškolený personál. Některé z těchto problémů lze odstranit volbou voltametrické analýzy, která se stala předmětem i tohoto výzkumu. Z elektrochemických metod je voltametrie nejpoužívanější pro svou jednoduchost a vysokou citlivost. Nejčastěji se používají rtuťové kapkové elektrody a nejrůznější uhlíkaté materiály, jako je skelný uhlík, grafit, borem-dopovaný diamant a jejich povrchové modifikace vodivými a katalyticky účinnými nanomateriály a polymery [21].

2.1 Stávající instrumentální metody

Do dnešní doby bylo vyvinuto několik analytických metod pro stanovení E2 v mnoha matricích. Kromě výše uvedených metod lze E2 stanovit i fluorescenční spektrometrií [22] či kolorimetricky [23]. V praxi dominuje GC-MS a HPLC se spektrofotometrickou detekcí v UV a viditelné (Vis) oblasti. Nicméně kvůli polaritě a nízké těkavosti estrogenů vyžaduje GC analýza E2 derivatizaci, která je časově náročná, nešetrná k životnímu prostředí a pokud není provedena správně, může vést i k nepřesným výsledkům. Naproti tomu elektrochemie, fluorescenční spektrometrie a Ramanova spektroskopie vyžadují méně náročné kroky úpravy vzorku před analýzou. V Tab. 4 je uveden přehled výhod a omezení několika instrumentálních metod, které se běžně používají při stanovení E2 [24].

Tabulka 4. Porovnání výhod a omezení různých analytických metod [24].

Metoda	Výhody	Omezení
Chromatografie	Vysoká přesnost, automatická detekce	Manuálně i časově náročná příprava vzorků, použití organických rozpouštědel, dlouhá doba analýzy, riziko ztráty analytů, u GC-MS nutná derivatizace
Elektrochemie	Rychlá odezva, nízká cena, vysoká citlivost, snadná obsluha, rychlý screening (i v terénu)	Relativně nízká stabilita a reprodukovatelnost
Ramanova spektroskopie	Rychlá a citlivá, nedestruktivní, <i>in-situ</i> analýza	Slabý Ramanův rozptyl, relativně nízká stabilita a reprodukovatelnost pro substráty SERS
Fluorescence	Vysoká citlivost a selektivita	Fluorofory mohou ztratit svou schopnost fluorescence v procesu fotobělení
Kolorimetrie	Cenově výhodná, jednoduchá, <i>in-situ</i> analýza	Problémy s rozpoznáním barevných změn pouhým okem, poměrně nízká citlivost

Poznámka: SERS; povrchově rozšířená Ramanova spektroskopie.

2.1.1 Estradiol v potravinách

Většina vědeckých prací zaměřená na vývoj a validaci analytické metody pro analýzu potravin demonstruje svou použitelnost na vzorcích živočišného původu obsahující zvýšená množství estrogenů, jako jsou mléčné a masné výrobky. Vzhledem ke složitosti potravinových matric je důležité před samotnou detekcí E2 odstranit přirozeně se vyskytující interferenty. U živočišných potravin interferují zejména bílkoviny a tuky. K vysrážení proteinů a extrakci E2 u masa a mléčných výrobků se často používá acetonitril. Přímá detekce může být použita u tekutých mléčných výrobků (př. mléko) s použitím MIP [24].

2.1.1.1 Extrakce estradiolu z potravin

Extrakce je běžným krokem přípravy vzorku před vlastní analýzou, která slouží k zakoncentrování a purifikaci vzorku. Pro extrakci estrogenů se vedle konvenčních SPE sorbentů používají i inovativní materiály, jako je funkcionalizovaný magnetický materiál a MIP. Přehled některých extrakčních technik v konkrétních potravinových matricích je shrnut v Tab. 5 [5].

Tabulka 5. Extrakční metody pro stanovení E2 v potravinových matricích [5].

Extrakční metoda	Matrice	Analýza	LOD (pg·l ⁻¹)	Lineární rozsah (pg·l ⁻¹)	Poznámky
Extrakce magnetickými kovalentními organickými strukturami	Maso	HPLC FLD	1,4–8,7	10–1×10 ³	Zvýšená adsorpční kapacita a snadná regenerace po sorpci
Extrakce magnetickými nanočásticemi potaženými polydopaminem	Mléko	UHPLC MS/MS	0,6–11	—	Simultánní analýza až 21 sloučenin
Extrakce magnetickými uhlíkovými nanotrubicemi s SrTi adsorbentem	Mléko	HPLC UV–Vis	0,03–03	1–1×10 ³	Snadné regenerace po sorpci, vysoká schopnost vazby
Směs grafen s vícečetnými magnetickými uhlíkovými nanotrubičkami	Mléko	LC FLD	0,7	5–250	Konjugovaný systém pro synergickou adsorpci
	Mléčné výrobky	UHPLC MS/MS	—	—	Jednoduchá a rychlá metodika, současná extrakce 22 sloučenin

Poznámka: FLD; fluorescenční detektor, UHPLC; ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie.

2.1.1.2 Derivatizace estradiolů

Derivatizace je běžný postup úpravy vzorku, který se provádí nejčastěji u chromatografických technik, a to za účelem zlepšení separace či detekce analytu. K derivatizaci estrogenů se často používá dansylace nebo silylace. Méně známým derivatizačním činidlem je benzimidazo[2,1-b]chinazolin-12(6H)-on-5-ethylimidazolester (BQEIC). BQEIC se váže na fenolickou skupinu E2 (Ar-OH) za vzniku fluoreskujícího derivátu. Vede k vysokým procentům výtěžnosti (92,6–98,5 %) a nízkým detekčním limitům 10,5 ng·l⁻¹. Díky přítomnosti terciárních aminových skupin, které mají silnou ionizační schopnost, lze BQEIC použít také v hmotnostní spektrometrii [5].

2.1.1.3. Detekce estradiolu v potravinách

K analýze E2 v potravinách i farmaceutických výrobcích v praxi dominuje HPLC/UV-Vis technika [25]. Pro vzorky potravin je však nutné zařazení obohacovacích kroků za použití nejčastěji SPE kolonek. Tab. 6 zobrazuje přehled různých analytických metod vyvinutých pro stanovení E2 v potravinách [24].

Tabulka 6. Aplikace různých metod analýzy E2 v potravinových matricích [24].

Vzorek	Metoda	Lineární rozsah ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
Mléko	GC-MS	0,2–20	0,02
Mléko	HPLC	0,5–100	0,25
Mléko	Elektrochemie	1×10^{-6} – 1×10^{-1}	$1,3\times 10^{-6}$
Mléko	Elektrochemické imunotesty	0,04–7,0	0,02
Mléko	Fluorescence	$9,5\times 10^{-5}$ –0,1	0,1
Mléko	Fluorescenční imunotesty	—	$<2,7\times 10^{-3}$
Mléko	Kolorimetrie	—	0,25
Sušené mléko	HPLC-UV	—	0,8–1,2
Sušené mléko	Kolorimetrické imunotesty	0,037–1,48	$3,7\times 10^{-2}$
Máslo	GC-MS	1–300	0,3
Mléko, jogurt, hovězí, vepřové, kuřecí maso	HPLC-UV	$2,72$ – $2,7\times 10^3$	4,09
Ryby	HPLC	2 – 1×10^3	0,42
Vejce	LC-MS/MS	0,5–40	5×10^{-3}

Poznámka: LC-MS/MS; kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Elektrochemické metody, fluorescenční analýza a Ramanova spektroskopie přitahuje v poslední době stále větší pozornost. Nevyžadují totiž téměř žádnou přípravu vzorku, čímž se minimalizuje ztráta analytu a manuální a časová náročnost celé analýzy. Obecně řečeno, elektrochemické metody se vyznačují nízkou citlivostí, nenáročností instrumentace a jednoduchou obsluhou. To je také důvod, proč se využívají jako rychlé screeningové testy v monitorování v terénu [24].

Aptamerové senzory využívající krátké úseky DNA nebo RNA se používají kvůli jejich vysoké selektivitě, citlivosti a minimální přípravě vzorku. Tyto senzory jsou založeny na elektrochemických, fotochemických a optických metodách. Pro lepší specifitu a rychlou detekci se používají také imunosenzory vyrobené s použitím magnetických a povrchově modifikovaných nanočástic [4]. Pro současnou detekci více estrogenů se používá povrchem zesílená Ramanova spektroskopie [24], známá též jako SERS.

Vzhledem k bioakumulaci E2 v tucích se nové metody detekce E2 zaměřují na rychlost a citlivost ve stopových nebo dokonce až ultrastopových hladinách. Zlepšením předúpravy vzorku nebo inovace metod detekce může mnoho technik zásadně snížit své

limity detekce. Stále ale není vyvinuto dostatek účinných metod pro *in-situ* detekci E2 v reálném čase. Jejich realizace je důležitá pro zamezení vstupu E2 do potravních řetězců [4].

2.1.2 Analytické metody ve farmaceutické analýze estradiolu

Účelem analytických rozborů farmaceutických přípravků s obsahem estrogenů a progestinů je ověřit výrobcem deklarovaný obsah, aby nemohlo dojít k poškození nebo zhoršení zdravotního stavu pacienta. První orální tobolka s estrogeny uvedená na trh obsahovala 1 mg E2 a 100 mg progestinu. Nyní už jsou dávky hormonů v tabletě podstatně nižší, a to v koncentracích 15–35 µg E2 a 3 mg progestinu na tabletu. Kombinace E2 a progestinu v jedné dávce považují lékaři za ideální formu hormonální antikoncepce. Na závěr je nutné si uvědomit, že rozdíly v chemické struktuře aktivních látek (strukturní analogy) a jejich nízká rozpustnost ve vodě často způsobují problémy při výrobě farmaceutických produktů, které by měly vhodnou biologickou dostupnost [17].

2.1.2.1 Příprava vzorku ve farmaceutické analýze

Příprava vzorku k analýze u farmaceutických přípravků je podstatně jednodušší než u potravinových nebo environmentálních vzorků, jelikož se zde téměř nevyskytují rušivé prvky matrice. Příprava vzorku je tak prakticky stejná bez ohledu na metodu stanovení. Jako rozpouštědlo se používá např. methanol ethanol, aceton, acetonitril, roztok Britton-Robinsonova pufru (BRB) obsahujícího alkohol, fyziologický roztok pufrovaný fosfátem, chloroform, izopropylalkohol nebo vodné roztoky s organickými rozpouštědly. Každá tableta se vždy nejprve důkladně rozetře v třecí misce tloučkem a rozpustí v doporučeném rozpouštědle. Pro rychlejší rozpouštění je vhodné použít ultrazvukovou lázeň. Počet rozpuštěných tablet se stanoví na základě obsahu estradiolu na tabletu a požadované koncentraci vzorku. Podobně se rozpustí požadované gramy přípravků ve formě krému. Aby se zabránilo autooxidaci vzdušným kyslíkem, uchovává se takto připravený roztok estradiolu ve tmě a chladu [17].

2.1.2.2 Analytické metody ve farmaceutické analýze estradiolu

Jako metodu detekce pro stanovení E2 ve farmacii lze použít např. radioimunoanalýzu (RIA), jenž je velmi citlivou a selektivní metodou. RIA používá pro stanovení E2 specifické antisérum ve spojení s jodovaným derivátem E2. Po inkubaci přes noc (16–18 h) se protilátka E2 separuje od nenavázaného estradiolu pomocí druhé protilátky. Po odstředění se stanovuje radioaktivita vzorku. Koncentrace E2 se zpětně vypočítá pomocí počítačového programu ze standardní křivky estradiolu [17].

Metoda HPLC–UV/Vis je schopna stanovit současně všechny hormony obsažené v antikoncepčních lécích. Nejpoužívanějším typem je separace v systému s obrácenými fázemi, při níž se používají standardní C8 nebo C18 kolony a směs acetonitril/voda (1:1) jako mobilní fáze. Nastavení jediné vlnové délky pro současnou detekci estrogenů a progesteronu literatura neuvádí kvůli rozdílům v jejich UV absorpčních spektrech. Estrogeny vykazují maximální absorbanci při 205 nm, zatímco progesteron má UV maximum při 245 nm. V této diplomové práci se optimalizovala HPLC metoda s UV detekcí pro separaci E2, EE2 a DNG v izokratickém elučním režimu s 50% vodným acetonitrilem (v/v) při vlnové délce 280 nm, jež posloužila jako referenční metoda.

Další faktorem, který se musí vzít v úvahu je relativně malé množství estrogenů ve srovnání s progesteronem v těchto kombinovaných lécích. Metoda tedy musí být schopná v jediném kroku stanovit estrogeny v nízkých koncentracích a progesteron ve vyšších koncentracích. E2 existuje ve dvou izomerech α a β , který se používá v lécích. Je žádoucí, aby metoda byla schopna oddělit i tyto dva izomery, protože izomer α je v tomto případě kontaminantem [26].

Voltametrické metody bývají často vhodné pro rychlé a citlivé stanovení estradiolu ve vzorcích, kde se vyskytuje pouze jedna forma aktivní látky. Z důvodu stejného elektrochemického chování (elektrodové reakce) nelze totiž rozpoznat například E2 od EE2, a tudíž u komplexních léčiv je možné voltametricky stanovit pouze jejich sumu. Pro dosažení nízké citlivosti se preferují akumulární kroky (adsorpce na povrch nebo extrakce do vnitřku elektrodového materiálu) v rámci stripping analýzy. Pro měření v průtoku lze provést také amperometrickou detekci E2 pomocí totožných elektrod. Optimální potenciál se obvykle pohybuje kolem +0,8 V v závislosti na pH nosiče s optimálním průtokem $1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ [21].

Estrogeny nelze redukovat na kapající rtuťové elektrodě (DME), protože neobsahují α - nebo β -nenasycené karbonylové skupiny. Naštěstí některé deriváty estriolu a E2 to umožňují. V případě stripping voltametrie jsou estrogeny elektroaktivní pomocí dusitanu sodného ve formě nitroderivátů. Předběžné experimenty ukázaly, že nitroderiváty estriolu nebo E2 jsou silně adsorbovány na rtuťové elektrody, kdy je možné redukovat vzniklou nitroskupinu. Pomocí tohoto jevu je dosahováno extrémně citlivých a rychlých adsorpčních stripovacích postupů. Tento přístup je poměrně jednoduchý, protože není nutné oddělovat příbuzné sloučeniny, a nitrované estrogeny mohou být stanoveny přímo ve směsi [27].

2.1.3 Analytické metody v enviromentální analýze estradiolu

V ekoanalýze se klade velký důraz především na citlivost vyvinuté metody, poněvadž i velmi nízké koncentrace estrogenů či progesteronů (a dokonce i jejich metabolitů) mohou napáchat dalekosáhlé škody, při nichž již často nelze provést ani sanace kontaminované lokality. Obsah estrogenů ve vodách se procesem čištění odpadních vod pouze snižuje [28]. Ve vodních biotopech se estrogeny detekují na úrovni $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, a běžně používané chromatografické metody se tak neobejdou bez nutnosti zakoncentrování vzorku [4].

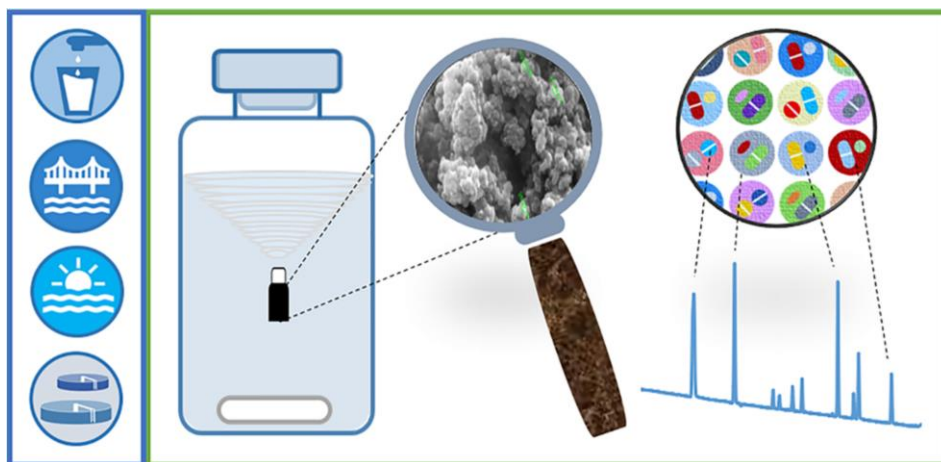
2.1.3.1 Příprava vzorků ze životního prostředí

Po odběru odpadních nebo povrchových vod se vzorky okyselí přidáním $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$ na $\text{pH} = 2-4$ a přefiltrují, aby se odstranily suspendované částice, které mohou interferovat. Vodné matrice lze filtrovat přes různé materiály jako skleněné vlákno, nylon nebo nitrát celulózy, aby se zamezilo ztrátám analytu v důsledku sorpce. Snížením pH se zabrání mikrobiální aktivitě, a umožní tak jeho uchování bez změny složení. Biodegradaci vzorku lze minimalizovat přidáním azidu sodného. Jako konzervační činidlo lze použít rovněž metanol. Po této předúpravě se do vzorků často přidávají vnitřní standardy. Kromě izotopicky značených molekul E2 se pro tyto účely používají deuterované sloučeniny, jako je ECD bisfenol [28].

SPE a extrakce kapalina-kapalina (LLE) jsou nejpoužívanější techniky pro zakoncentrování estrogenů ze vzorků vody. Tradiční (off-line) technika SPE je časově náročný proces a rizikem je ztráta analytu a kontaminace vzorku. V modernější on-line SPE se extrakční krok přímo spojí s chromatografickou technikou, což snižuje pravděpodobnost kontaminace, ztráty analytu, zkracuje dobu přípravy vzorku a zvyšuje reprodukovatelnost a opakovatelnost extrakčního procesu. Tato automatizace snižuje i potřebný objem vzorku a rozpouštědel, což výrazně snižuje náklady. Plně automatizovanou metodou on-line SPE/UHPLC-MS/MS je možné provést analýzu do 15 min s výtěžností více než 70,1 % při vyprodukování pouhých 2 ml odpadu. Nevýhodou on-line SPE je zdoluhavý proces optimalizace, který představuje pro analytiku poměrně velkou výzvu [4].

Konvenční techniky pro zakoncentrování vzorků (SPE nebo LLE) vyžadují velká množství rozpouštědel a jsou časově náročné a těžkopádné. Z tohoto důvodu je snaha vyvinout nové techniky, které budou šetrnější k životnímu prostředí a budou vyžadovat méně rozpouštědel, méně kroků a méně času. V posledních letech vedly různé úpravy k miniaturizaci a zjednodušení SPE. Byly vyvinuty nové analytické metody, včetně mikroextrakce na pevnou fázi (SPME), extrakce na disperzní pevnou fázi (DSPE), (mikro)extrakce na magnetickou pevnou fázi (MSPE), extrakce pevnou fází, která je na bázi

molekulárně imprintovaných polymerů (MISPE), sorpční extrakce na magnetickém míchadle (SBSE) a extrakce sorpční tkaninou (FPSE) [4]. Mikroextrakce na sorbentem potaženou tyčinku, která je představena na Obr. 7 se ukazuje jako velmi účinná při sledování stopových hladin hormonů ve vodních matricích, včetně povrchové vody, mořské vody, vody z vodovodu a odpadní vody [29].



Obrázek 7. Mikroextrakce na sorbentem potaženou tyčinku [29].

Tyto mikroextrakční tyčinky jsou relativně levné, snadné k přípravě a stačí velmi malé množství sorbentového nátěru. Provedení je jednoduché: do vzorku vody ve skleněné baňce se vloží tyčinka potažená sorbentem a konvenční teflonové magnetické míchadlo. Extrakce se provádí na magnetické míchací desce. Po mikroextrakci se tyčinka se sorbentem vyjme čistou pinzetou, několik sekund se suší hadříkem, který nepouští vlákna, a analyt se desorbuje pomocí směsi rozpouštědel acetonitrilu/hexanu/acetonu při pokojové teplotě 60 min. Následuje krok odpaření rozpouštědla, rozpuštění odparku v čistém acetonitrilu a analýza kapalinovou chromatografií [29].

Selektivita technik SPE může být zesílena sorbenty na bázi MIP. Používá se zde kyselina methakrylová jako funkční monomer, ethylenglykoldimethakrylát jako zesilující činidlo, ethynilestradiol jako templát a acetonitril jako rozpouštědlo. Poměrně běžná je i extrakce magnetickými částicemi. Povrch těchto částic je modifikován různými biologickými materiály, jako jsou protilátky, které díky specifčnosti vazby antigen-protilátka umožňují jejich použití jako bioseparačního nástroje.

Aktivovaný kal a sedimenty v odpadních vodách jsou komplexní pevné matrice, které představují problém při stanovení. Vzorky sedimentu a kalu se čistí pomocí SPE přes patrony silikagelu nebo florisilu s přídavkem Na_2SO_4 , který vysuší organický extrakt. Kromě toho se používá oxid křemičitý v kombinaci s aminopropylovým zbytkem, což vytvoří stacionární

fázi zásaditého charakteru. Polární oxidy křemičité s aminopropylovou vazbou, které jsou hydrofilnější než oxid křemičitý, zvyšují potenciál sorbentu adsorbovat polární interference z nepolárních extraktů, v nichž je přítomný E2 [28].

2.1.3.2 Metody detekce estradiolů ve vzorcích z životního prostředí

Detekce a kvantifikace estrogenů ve vzorcích životního prostředí se provádí instrumentálními nebo biologickými metodami. Doposud byla vyvinuta a následně optimalizována řada metod pro stanovení E2 v tomto typu matrice a většina z nich jsou metodiky založené na chromatografii. GC spojená s MS a tandemovou MS byla vyvinuta jako první a je stále široce používána. Ve většině případů byla GC–MS analýza vodných i pevných matric (kalů nebo sedimentů) provedena s elektronovou ionizací. I tak může být chemická ionizace také použita pro stanovení estrogenů v životním prostředí. Tato technika je šetrnější k životnímu prostředí než LC, protože mobilní fáze je nahrazena plynem. GC má řadu omezení. Nepodporuje přímé analýzy estrogenů, což výrazně komplikuje a prodlužuje dobu přípravy vzorku. Estrogeny jsou tepelně nestabilní, proto je nutná derivatizace a převedení na těkavější sloučeniny. Silylace je nejoblíbenější metodou derivatizace estrogenů. Výsledné deriváty (silylestery) se vyznačují vyšší těkavostí, tepelnou stabilitou a jsou vhodnější pro GC-MS. Silylace také zvyšuje citlivost detekce v hmotnostním detektoru [4].

HPLC je druhá nejpoužívanější metoda pro analytické stanovení E2 ve vzorcích vody, kalů a sedimentů. Tato technika podporuje přímé analýzy estrogenních sloučenin bez nutnosti derivatizace. Metoda také poskytuje mnohem reprodukovatelnější výsledky než kapilární elektroforéza (CE). Nejpoužívanější detektory v HPLC jsou spektrofotometrické detektory a také detektory diodového pole (DAD), které poskytují celé absorpční spektrum zkoumané sloučeniny [4]. Při LC–MS/MS analýze estrogenních chemikálií v říční vodě a odpadních vodách z ČOV může předchozí chemická derivatizace s dansylchloridem nebo pentafluorbenzylbromidem zlepšit ionizaci a zvýšit měřené signály (citlivost). Další derivatizační činidlo je *p*-nitrobenzoylchlorid, který reaguje s hydroxylovými a fenolickými skupinami E2 za vzniku fluoreskujícího derivátu. Ve srovnání s GC–MS je metoda LC-MS/MS citlivější na matricové interference, což má za následek snížení poměru signálu k šumu. Aby se minimalizovaly účinky matrice, je nutná selektivní extrakce, přečištění vzorku a účinná LC separace. Z ionizačních technik je chemická ionizace v negativním módu dominantní technikou pro stanovení estrogenů v environmentálních vodných nebo pevných extraktech. Poskytují nejintenzivnější signály a vykazují méně matricových efektů než ostatní techniky ionizace. Ačkoli GC–MS, GC–MS/MS i LC–MS/MS jsou schopny monitorovat

podobné koncentrace analytu, tandemové techniky MS, zejména GC–MS/MS, poskytují nižší limity detekce a jsou selektivnější, čímž zabraňují falešně pozitivní identifikaci. Mezilaboratorní srovnání analytických metod prokázalo, že nejlepší technika je založena na LC–MS/MS v kombinaci s kalibrační technikou izotopového zředování. Meze detekce (LOD) získané chromatografickými technikami s detekcí MS jsou obecně v jednotkách $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ pro kapalnou matrici a $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ pro pevné látky [28].

Na druhé straně metody elektrochemické detekce umožňují dosažení stejně nízkých limitů detekce, jako jsou limity uváděné pro techniky MS (tj. na hladinách $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$), a to za velmi nízkou cenu instrumentace. Přímé elektrochemické stanovení E2 ve vzorcích z životního prostředí není možné bez zakoncentrování. Elektrochemická oxidace estrogenních sloučenin na povrchu elektrody ale přitahuje zájem analytiků nejen kvůli nízkým pořizovacím nákladům, výhodou je i jednoduchá obsluha, přenosnost, vysoká citlivost a rychlá odezva. Pro dosažení vyšší citlivosti pak elektrochemická detekce obvykle probíhá pomocí pulsní techniky.

V dnešní době je popularita elektromigračních technik na vzestupu kvůli jejich výhodám, jako je malý objem vzorku, minimální spotřeba činidel, krátká doba analýzy a vysoká separační účinnost. Analýza estrogenů pomocí CE se ovšem vyznačuje méně uspokojivou opakovatelností než v případě HPLC. Pro stanovení estrogenů ve vzorcích vody lze použít micelární elektrokinetickou chromatografii spojenou s MS, jež zvládne úplnou separaci estrogenů do 11 minut a hodnoty LOD jsou v rozmezí 880–1100 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ [4].

Zatímco instrumentální analýza vzorků životního prostředí může umožnit identifikaci i kvantifikaci jednotlivých cílových sloučenin, biologické techniky lze použít ke stanovení celkové endokrinně-disruptivní aktivity. V případě estrogenních látek se tato aktivita obecně vyjadřuje jako tzv. celková estrogenita. Stanovení estrogenity nám poskytuje další důležité informace o vzorku. Klasické analytické metody totiž neberou v úvahu potenciální interakce mezi sloučeninami nebo přítomnost sloučenin, které ačkoli nejsou známy, mohou mít vliv na celkovou estrogenní aktivitu. Rozeznáváme dva druhy těchto testů: *in vivo* a *in vitro*. Běžně používané *in-vitro* biologické testy využívají speciálně geneticky modifikované kvasinky, a chemicky aktivovanou luciferázu reagující na estrogen. Testy na bázi kvasinek jsou méně citlivé na nesterilní podmínky, než testy založené na použití buněčných linií savců nebo ryb. Celková estrogenita hodnocená biologickými testy se obecně vypočítá srovnáním s aktivitou přirozeného estrogenu E2 a převede se na ekvivalent estradiolu (EEQ). LOD se pohybují od 0,02 do 0,68 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ EEQ pro kapalnou matrici a 0,04 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ EEQ pro sedimenty [28].

Imunotesty, jako je enzymová imunosorpční analýza (ELISA) a chemiluminiscenční enzymová imunoanalýza (CLEIA), lze také použít ke stanovení estrogenů ve vodách či jiných vzorcích. Imunologické testy jsou nákladné, snadno se používají a mají široké použití. Tyto techniky neumožňují současné stanovení více sloučenin a mohou být omezeny zkříženou reaktivitou. Kombinace instrumentálních a biologických nástrojů je cenná a žádoucí, protože může poskytnout komplexnější informace [28].

2.1.4 Estradiol v klinické analýze

Pokud jde o biologické matrice, E2 se stanovují hlavně v plazmě a tkáních savců (včetně lidí), ryb a bezobratlých. Analýza endogenních estrogenů je náročná kvůli jejich nízkým koncentracím. Navíc se jejich hladiny snižují s věkem a při některých onemocněních, jako jsou kardiovaskulární onemocnění a diabetes mellitus 2. typu. Rozsah koncentrací E2 cirkulující v krvi je 18–915 pmol·l⁻¹. Specifické stanovení E2 je náročné kvůli přítomnosti izomerů E2 a jiných steroidů v biologické matrici, které při stanovení interferují [30].

Nicméně kvantifikace E2 v tkáních a biologických tekutinách je nezbytná pro kontrolu správné hladiny v těle a předejití tak zdravotním problémům nebo pro odhalení možné interakce perorální antikoncepce se souběžně podávanými léky. Například přítomnost těchto látek v srsti skotu je jasným důkazem zneužívání steroidů v hospodářském průmyslu. Analyzuje se ale také i plazma či tkáň vodních živočichů, a to za účelem zjištění míry bioakumulace estrogenů. Analýzou estrogenů v tělech vzdušného hmyzu (bezobratlých) je pak možné odhalit, zda konzumací vody a vodních živočichů (s pozitivním nálezem estrogenů) probíhá přenos těchto látek do suchozemských živočichů [28].

2.1.4.1 Příprava vzorku ke klinické analýze

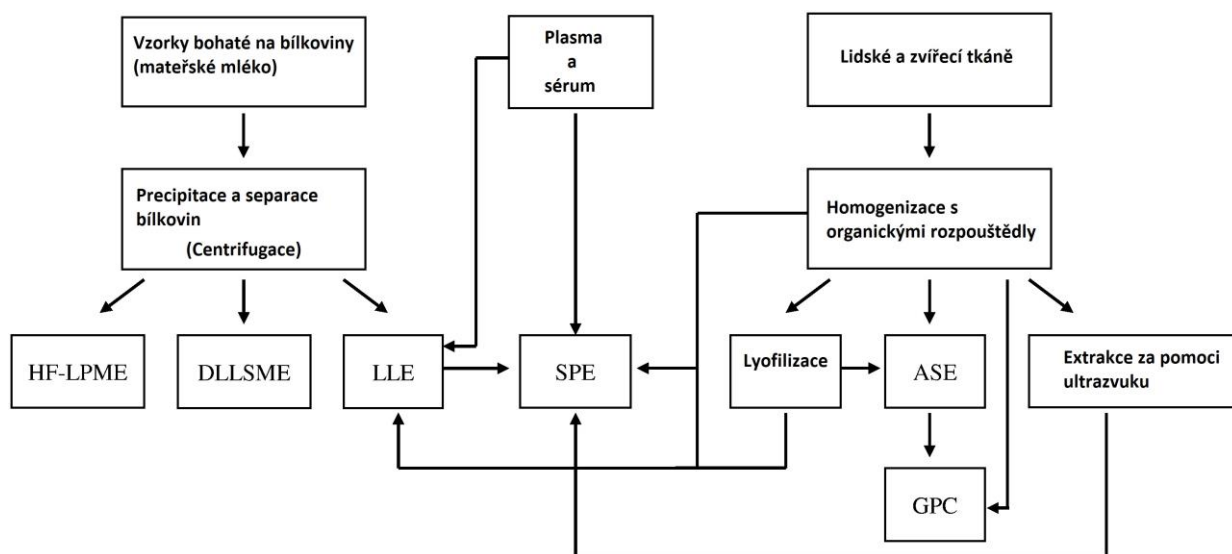
Schematické znázornění zpracování biologických vzorků ke stanovení E2 a EE2 je prezentováno na Obr 8. Vzorky plazmy a séra se obecně upravují pomocí LLE po přidání odpovídajících vnitřních standardů. Protože většina analytických technik pro stanovení estrogenů využívá detekci MS, jsou vnitřní standardy často izotopicky značené (deuteriem nebo ¹³C) cílové analyty. Pro LLE estrogenů se používá několik rozpouštědel, jako je methyl-terc-butylether nebo ethylacetát, nebo směsi rozpouštědel, jako například diethylether/hexan (70:30, v/v), dichlormethan/methanol (2:1, v/v) nebo hexan/ethylacetát (75:25, v/v). Po extrakci se organická a vodná fáze obecně oddělí odstředěním.

Klinické vzorky bohaté na bílkoviny, jako je mateřské mléko, se musí nejprve podrobit kroku precipitace a separace bílkovin. Získaný supernatant se následně extrahuje buď tradiční technikou LLE směsí rozpouštědel dichlormethan/methanol nebo

miniaturizovanými technikami, jako je mikroextrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna s použitím 1-oktanolu jako extrakčního rozpouštědla. S oblibou se využívají dutá vlákna z oxidu křemičitého potažená MIP, jež slouží k zadržení/oddělení estrogenů ze vzorku, a to i v on-line režimu. Lze také využít mikroextrakci založenou na tvorbě disperzního systému.

Pevné biologické vzorky, jako jsou lidské a zvířecí tkáně, jsou komplexní maticí vyžadující nejprve homogenizaci s organickými rozpouštědly nebo pufrovacími roztoky. Homogenát se pak může buď podrobit gelové permeační chromatografii na odstranění lipidů z tkání, nebo extrakci za použití různých technik, jako je extrakce dichlormethanem za zvýšené teploty a tlaku, či matricová disperze na pevné fázi s adsorbentem C8 a elucí směsí rozpouštědel methanol/acetone. Dále se k čištění tkáňových extraktů používá i dvourozměrná kapalinová chromatografie. Extrakty se vkládají do předkolony s náplní RAM (materiál s omezeným přístupem), která pracuje v tandemu s kolonou C18. RAM se také používá k odstranění proteinů ve vzorcích mozkomíšního moku. Pro vyšší výtěžnost však mohou být homogenáty před extrakcí navíc ještě lyofilizovány [28].

Všechny extrakty z kapalných i pevných vzorků lze dále čistit a zakoncentrovávat pomocí SPE a SPME. Tento postup lze provádět s různými sorbenty a eluenty. E2 a EE2 jsou hydrofobní sloučeniny, a proto je lze čistit pomocí nepolárních sorbentů. Používají se i inovativní pevné fáze, jako je celulózová tkanina. Možné je i postupné čištění pomocí patronek s aminopropylem vázaným na oxid křemičitý, které jsou vzhledem ke svým polárním funkčním skupinám mnohem hydrofilnější než klasické oktadecylsilikagelové fáze, a tedy účinné pro odstraňování polárních interferentů [28]. Dále se používá sorpční extrakce na míchadle Tyto techniky minimalizují objem rozpouštědel na úroveň mikrolitrů [31].



Obrázek 8. Schematická strategie zpracování biologických vzorků [28].

2.1.4.2 Metody detekce estradiolů v klinických vzorcích

Pro stanovení estrogenů v tělních tekutinách existuje několik metod, které jsou shrnuty v Tab. 7. Imunoanalýza se po mnoho let jevila zlatým standardem pro kvantifikaci estrogenů v séru nebo plazmě. Tato technika je ale časově náročná a náchylná ke kontaminaci, což může mít za následek nízkou přesnost a omezenou citlivost. Metody související s protilátkami často vyžadují samostatný test pro každý biomarker, tj. nelze stanovit více hormonů najednou. Proto se stále častěji ke stanovení estrogenů v biologických vzorcích používají chromatografické metody spojené s MS i tandemovou MS detekcí, které se vyznačují vysokou specifitou, nízkými LOD (ideálně $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ případně $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$), možností současné analýzy více sloučenin. E2 a EE2 lze přitom poměrně jednoduše ionizovat elektrosprejovou ionizací, chemickou ionizací za atmosférického tlaku i fotoionizací za atmosférického tlaku [28]. Jelikož estrogeny nejsou příliš těkavé ani dostatečně termostabilní, představuje HPLC nejpoužívanější analytickou techniku pro stanovení estrogenů v klinických matricích [30].

Mezi další často používané techniky patří CE, micelární elektrokinetická chromatografie, biosenzory, HPLC s fluorescenční detekcí, modifikované elektrochemické senzory, elektro-chemiluminiscence a chronoamperometrie.

Tabulka 7. Analytické metody stanovení E2 a EE2 v tělních tekutinách [28].

Vzorek	Příprava vzorku	Derivatizace	Analytická technika
Plazma	LLE směsí diethylether:hexan (70:30, v/v), SPE na C18 sorbent a elucí směsí methanol:voda (75:25, v/v)	—	LC-MS/MS
Sérum	LLE methyl-terc-butyleterem srážení acetonitrilem, odstředování, SPE na MIP sorbent a elucí methanolem	—	LC-MS/MS CE s UV detekcí při 210 nm
Mozkomíšní mok	Centrifugace,	dansylchlorid, 60 °C, 15 min	LC-MS/MS

2.2 Elektroanalytické metody v monitorování estradiolu

Objektem zájmu elektrochemie je studium elektrodových reakcí v roztocích a taveninách, jenž se označují jako elektrolyty. Analyty (v tomto případě estrogeny) se označují jako depolarizátory, neboť během své anodické oxidace odevzdávají elektrony z π orbitalů (konjugovaný systém dvojných vazeb) za vzniku kation radikálů, jenž podléhají dalším reakcím. Množství prošlého náboje přímo odpovídá množství přeměněného estrogenu, tedy jeho koncentraci (c) v elektrolytu. Nicméně, literatura uvádí dvě různé reakční cesty anodické oxidace E2. Tudíž bylo nutné v této diplomové práci se alespoň pokusit objasnit (detailněji

popsat) elektrodové chování E2 (potažmo EE2) a dienogestu (DNG), jenž bývá ve farmaceutických přípravcích rovněž přítomen společně s estradioly.

Většina prací týkajících se stanovení E2 v biologických vzorcích a farmaceutických přípravcích je založena na HPLC a RIA. Přestože jsou tyto metody citlivé a specifické, jsou také ekonomicky nákladné a časově náročné. Naproti tomu elektrochemické metody mohou představovat jistou alternativu, vhodnou především ve farmaceutické analýze, kde přítomná matrice (plniva, pojiva, rozvolňovadla, vlhčiva atd.) neruší samotné stanovení. Obecně platí, že elektroanalytické metody jsou rychlé a levné, a kvůli tomu se spíše uplatňují jako screeningové testy. V kritických situacích, aniž by bylo vyžadováno centralizované laboratorní testování, např. při kontrolách kvality vody a životního prostředí, je jejich význam nepopíratelný. Konkrétně při analýze E2 nebo EE2 ve vodě je nutné vzorek nejprve zakonzertovat pomocí vhodné techniky z důvodu jejich velmi nízkých koncentrací [32,33,34,35]. Konkrétní elektroanalytická metoda použita v praktické části této diplomové práce je voltametrie a jako vzorky se zkoumají různá farmaceutická léčiva s obsahem E2 nebo EE2 spolu s DNG. Z elektroanalytického hlediska převládají spíše voltametrické metody na složitě modifikovaných elektrodách ve vodných prostředích. Z důvodu nízké rozpustnosti E2 a EE2 ($3,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ při 27°C) a nerozpustnosti DNG ve vodě, byla snaha v této diplomové práci provádět měření v čistě organických rozpouštědlech na holých uhlíkových elektrodách, a to vše za účelem vyvinout jednoduchou elektroanalytickou metodu pro monitorování estrogenů a DNG (progesteronu) v antikoncepci.

2.2.1 Potenciometrické snímání estrogenů

Přestože je tato diplomová práce věnována především voltametrickému stanovení estrogenů, je nutné z metodologického (vývojového) hlediska uvést i potenciometrické indikační senzory, označované jako iontově selektivní elektrody (ISE), jenž mají vysokou afinitu k cílovému analytu. Tato vysoká afinita je způsobena přítomností předem definovaných specifických rozpoznávacích dutin přítomných ve skeletu polymerní membrány. V případě potenciometrického snímání E2 se využívá pro přípravu MIP membrán funkční monomer (methakrylová kyselina) a síťovadlo (ethylenglykoldimethakrylová kyselina).

Z praktického hlediska se sledují změny membránového potenciálu indukované disociovaným E2 v tlumivém roztok $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ uhličitanového pufru o $\text{pH} = 10,5$. Tyto ISE vykazují široký lineární rozsah stanovení, vysokou mechanickou stabilitu, selektivitu a přesnost, rychlou odezvu ($<10 \text{ s}$) a nízký limit detekce $1,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ E2. Avšak u biologických

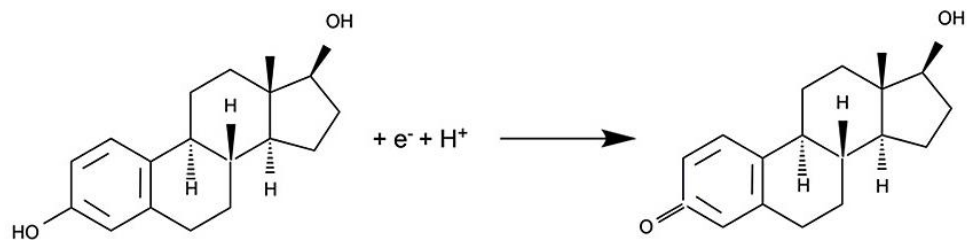
vzorků může docházet k nežádoucí adsorpci přítomných látek z matrice, což často vede ke špatné reprodukovatelnosti měřeného signálu. K zamezení účinku matrice lze použít naředění, jenž může být u klinických vzorků problematické. Tyto senzory se úspěšně používají pro stanovení E2 v některých tělních tekutinách, ale především v analýze farmaceutických přípravků, dnes již při rutinních stanoveních [33].

2.2.2 Voltametrické stanovení estrogenů

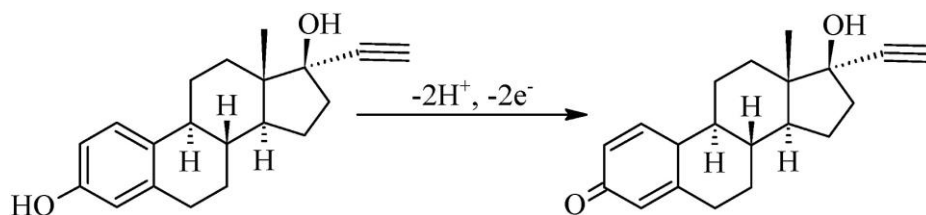
Voltametrii lze definovat jako elektrochemickou techniku založenou na měření proudu v závislosti na změně potenciálu pracovní elektrody při elektrolýze analyzovaného roztoku. Jelikož v praxi převládají elektrody s velkou pracovní plochou, používá se konvenční tříelektrodový článek se systémem, jenž se skládá z pracovní, referentní a pomocné elektrody. Jakož to referentní elektrody se osvědčily kalomelová ($\text{Hg}|\text{Hg}_2\text{Cl}_2|3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$) a chloridostříbrná ($\text{Ag}|\text{AgCl}|3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ KCl}$) elektroda. V případě pomocné elektrody bohatě postačí použít jakýkoliv inertní materiál, jmenovitě platinový drát či plíšek, grafitovou tyčku, ocelový hrot. Výběr materiálu pomocné elektrody závisí vždy jen na chemické stabilitě v daném pracovním roztoku.

EE2 je syntetická forma E2, která se vyskytuje zejména v antikoncepčních přípravcích, které jsou předmětem voltametrického měření této diplomové práce. E2 i EE2 jsou elektroaktivními sloučeninami [36], jenž se liší přítomností nitrilové skupiny, jenž nemá žádný vliv na anodické chování obou forem. Na základě tohoto faktu, lze zcela určitě předpokládat totožné elektrochemické chování. Tudíž je až překvapivé, že se literatura v tomhle ohledu různí (porovnejte reakce na Obr. 9 a 10).

Literatura uvádí, že v obou případech je oxidační proces řízen difúzí a je nevratný [36], přičemž elektrooxidace E2 se účastní stejný počet elektronů a protonů, jak je zobrazeno na Obr. 9 [21]. Odezva E2 se pozoruje při +1,1 V až +1,15 V. EE2 se také oxiduje v poměru elektronů a protonů 1:1, ale dochází zde k přenosu dvou elektronů a dvou protonů, jak je zřejmé z Obr. 10 a jeho odezva se pozoruje při +1,2 V. Pokud by tomu tak bylo, tak za stejných podmínek, by měl EE2 dvojnásobně vyšší naměřené proudy. Tento předpoklad a nesrovnalost uváděných reakcí je rovněž předmětem experimentů uvedených v praktické části.

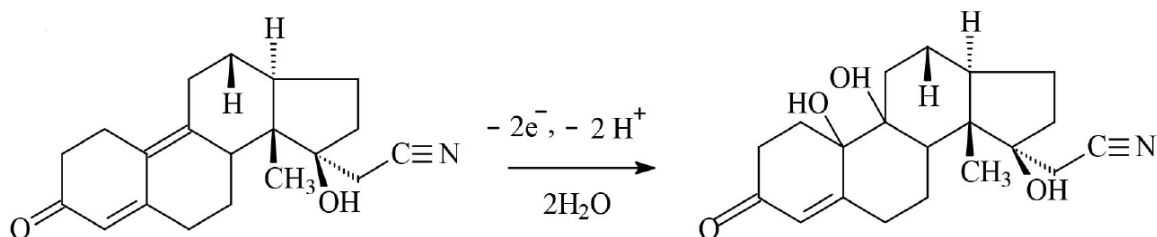


Obrázek 9. Navrhovaný elektrochemický oxidační mechanismus E2 [21].



Obrázek 10. Navrhovaný elektrochemický oxidační mechanismus EE2 [36].

Kombinované antikoncepční přípravky neobsahují pouze EE2, ale také DNG. Je tedy nutné také uvést jeho předpokládané elektrochemické chování (elektrodovou reakci). Oxidační mechanismus, který je zobrazen na Obr. 11 závisí na cyklohexanovém kruhu, který má vysokou progestogenní účinnost DNG [34]. Odezva DNG na uhlíkových elektrodách se pozoruje přibližně při +1,45 V. Na základě relativně dostatečně odlišných potenciálů anodických píků (E_p^a) by bylo možné simultánně stanovit jak estrogény (sumu E2 a EE2), tak i progesterony (DNG) v kombinovaných farmaceutických přípravcích.



Obrázek 11. Navrhovaný elektrochemický oxidační mechanismus DNG [34].

Během posledních desetiletí došlo k pokroku a vývoji voltametrických metod používaných při stanovení E2. Vhodné vlastnosti senzorů zahrnují velký povrch, vysokou rychlost přenosu náboje a specifické interakce s cílovými analyty. Elektrochemické metody vykazují analytický výkon, který je statisticky srovnatelný s chromatografickými metodami,

přičemž mají značné výhody [36]. Voltametrie se vyznačuje krátkou dobou analýzy, časově nenáročnou přípravou vzorku a nízkým detekčním limitem. Díky tomu je tato metoda vhodná pro rychlé, jednoduché a přesné stanovení E2 ve farmaceutických léčivech. Porovnání limitů detekce E2 různých voltametrických metod jsou uvedena v Tab. 8 [21]. Může být až k údivu, že pomocí málo citlivé lineární voltametrie (LSV) a z ní odvozené cyklické voltametrie (CV) bylo možné dosáhnout ultrastopových hodnot LOD, dokonce nižších než za použití citlivých pulzních technik, jmenovitě diferenčně pulzní (DPV) a square-wave voltametrie (SWV). Co se týče elektrodových materiálů, tak se osvědčili především povrchové modifikace elektrody ze skelného uhlíku (GCE). Bohužel, zřejmě kvůli nízké rozpustnosti E2 a EE2 v čistě vodných pracovních mediích, jenž může mít za příčinu pasivaci složitého elektrodového materiálu, není možné obdržet široký lineární rozsah, ve kterém by bylo možné kvantifikovat obsah estradiolů, což může činit značné obtíže při reálné analýze léčiv.

Tabulka 8. Srovnání voltametrických metod ve stanovení E2 a EE2 [21].

Senzor	Technika	Lineární rozsah (nmol·l⁻¹)	LOD (nmol·l⁻¹)
PEDOT/AuNP/GCE	SWV	0,1–100	0,02
RGO-DHP/GCE	LSV	400–2×10 ⁴	77
HMDE	DPV	50–2×10 ³	10
CNT-Ni(cyclam)/GCE	SWV	500–4×10 ⁴	60
MWNTs-Nafion/GCE	SWV	250–1×10 ⁴	10
Nafion/GCE	LSV	25–1,5×10 ³	1
GCE	DPV	4×10 ⁴ –1×10 ⁷	120
Al ₂ O ₃ NPs/GCE	LSV	400–4×10 ⁴	80
CCh/WGE	SWV	4×10 ³ –4×10 ⁴	400
MNA/PtNPs/GCE	DPV	30–5×10 ⁴	16
ErG/AuNP/ITO	CV	1×10 ⁻⁴ –1×10 ⁶	1×10 ⁻⁵
VS ₂ -Au/GCE	DPV	1×10 ⁻² –10	1×10 ⁻³

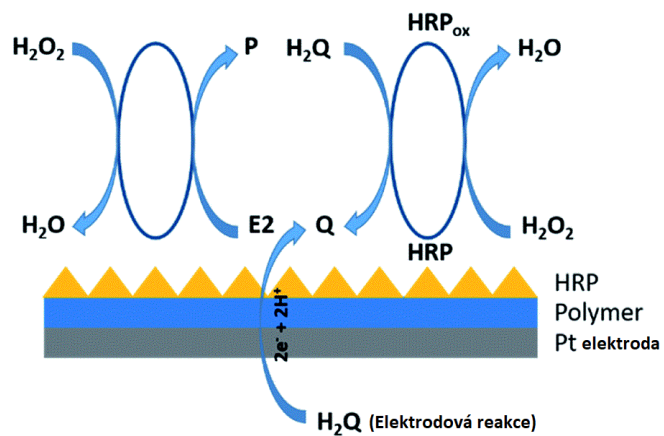
Poznámka: CV; cyklická voltametrie, DPV; diferenčně pulzní voltametrie, HMDE; visící rtuťová kapková elektroda, LSV; lineární voltametrie, NPs; nanočástice a SWV; square-wave voltametrie.

2.2.3 Amperometrie a biosenzory

Při amperometrii se na pracovní elektrodu vkládá konstantní potenciál, při kterém dochází k elektrochemické přeměně analytu (oxidaci nebo redukci). Při amperometrii se měří elektrický proud protékající článkem (i) v závislosti na čase (t). Velikost proudu je přímo úměrná koncentraci analytu. Amperometrické stanovení E2 se provádí nejčastěji na GCE a jejich modifikacích. Optimální potenciál se volí kolem +0,8 V, v závislosti na použitém pracovním médiu, konkrétně na pH, neboť se jedná z jistého úhlu pohledu o fenolickou látku (slabou organickou kyselinu). Aby byla zajištěna úplná stabilita roztoku při metodě standardního přídávku, časový interval před každým přidáním E2 trvá přibližně 25 s. [21]. Amperometrie je dynamická metoda, kde dochází k pohybu pracovního média, jenž přivádí analyt k povrchu elektrody a zas odmyvá vzniklé produkty elektrodové reakce (nedochází k difúzi jako u statické voltametrie).

Mezi výhody elektrochemických biosenzorů lze zařadit robustnost, široký lineární rozsah, nízkou cenu, jednorázové použití, snadnou obsluhu, miniaturizaci, nízkou energetickou náročnost atd. V současnosti je navrženo několik biosenzorů pro stanovení E2, které se používají zejména u biologických vzorků. Jeden z možných přístupů je založený na aptamerech E2 zakončených thiolovou skupinou s použitím komplementární DNA cílené na nenavázaný aptamer E2 – kompetitivní systém. Dalším je technika, která používá fragment rekombinantního lidského estrogenního receptoru – biosenzor založený na kompetitivním vytěšňování kumestrolu, fluorescenčního fytoestrogenu [28].

Stále se vyvíjí nové metody s co největší selektivitou a citlivostí, jako je systém založený na vodivém polymeru a platinové elektrodě modifikované křenovou peroxidázou (HRP). Miniaturní estradiolový biosenzor se konstruuje pomocí imobilizace HRP v elektroaktivním povrchu elektrody pokryté elektroaktivním polymerem: poly(4,7-bis(5-(3,4-ethylendioxythiofen) thiofen-2-yl) benzothiadiazol). Takto připravená elektroda se přenesla do elektrochemického článku obsahujícího fosfátový pufr o pH = 7, kde je přidáno dané množství HRP, pyrokatecholu (H_2Q), H_2O_2 a E2. H_2Q a E2 jsou oba kosubstráty enzymu. V přítomnosti H_2O_2 katalyzuje HRP oxidaci H_2Q na benzochinon (Q) a E2 na daný produkt. Elektrochemická odezva systému je přímo úměrná koncentraci H_2Q a nepřímo úměrné koncentraci E2 ve vzorku. Takto zkonstruovaný biosenzor, který je znázorněn na Obr. 12, prokazuje vhodnou citlivost a selektivitu v širokém lineárním rozsahu od 0,1 až do $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s detekčním limitem $105 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tato metoda je vhodná i pro detekci E2 v přítomnosti potenciálních interferujících látek (kyselina askorbová, estriol, estron, kyselina močová a cholesterol), které zde nečiní problém [37].



Obrázek 12. Schéma biosenzoru na bázi enzymu HRP pro detekci E2 [37].

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3 Metodika

Laboratorní postup je nedílnou součástí každého výzkumu tak, aby mohly být zmíněné experimenty zopakovány, popřípadě upraveny. Cílem této kapitoly je tudíž poskytnout podrobný popis jednotlivých kroků analýzy, použitých chemikálií, přehled a úprava vybraných farmaceutických vzorků, instrumentace a výčet optimálních pracovních podmínek. Kromě toho je nutností každé vědecké práce statistické hodnocení získaných experimentálních dat tak, aby se mohly výsledky analýzy správně interpretovat.

3.1 Chemikálie a reagentie

Analytické standardy 17 β -estradiolu, 17- α -ethinylestradiolu a dienogestu (všechny s čistotou ≥ 98 %) byly zakoupeny od společnosti Merck (Darmstadt, Německo). Organická rozpouštědla jako methanol, ethanol, aceton a acetonitril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), (všechny s čistotou $\geq 99,8$ %) byla testována pro voltametrickou analýzu hormonů. Elektrolyt přidávaný do těchto rozpouštědel byl bezvodý chloristan lithný s čistotou 99,99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Mobilní fáze u HPLC byla složena z acetonitrilu stejné čistoty (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a vysoce čisté vody o elektrickém odporu 18,3 M Ω cm získané z již deionizované vody přes čistící systém Milli-Q[®] od společnosti Merck Millipore (Billerica, MA, USA).

3.2 Farmaceutické vzorky

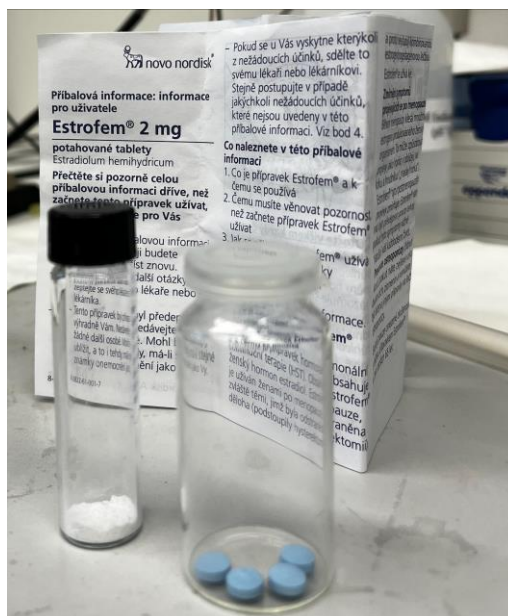
Zkoumanými vzorky byly farmaceutické výrobky komerčně dostupné na lékařský předpis v českých lékárnách. Zatímco dva vzorky představovaly kombinovanou perorální antikoncepci obsahující dva typy ženských pohlavních hormonů – ethinylestradiol (ze skupiny estrogenů) a dienogest (ze skupiny progestinů) – v koncentracích 0,03 mg a 2 mg na tabletu (vzorky Místra a Bonadea), které jsou zobrazeny na Obr. 13 a 14. Třetí vzorek byl produkt hormonální substituční terapie obsahující 2 mg estradiolu na tabletu (Estrofem), který je zobrazen na Obr. 15. Dalšími složkami těchto léků jsou monohydrát laktózy, kukuřičný škrob, povidon, hypromelosa 2910, hyprolosa, mastek, draselná sůl polakrilinu, sodná sůl karboxymethyl škrobu, stearát hořečnatý, polyvinylalkohol, oxid titaničitý, makrogol 3350 a hydrogenovaný bavlníkový olej.



Obrázek 13. Vzorek č.1: Mistra (2 mg DNG a 0,03 mg EE2 na tabletu).



Obrázek 14. Vzorek č.2: Bonadea (2 mg DNG a 0,03 mg EE2 na tabletu).



Obrázek 15. Vzorek č. 3: Estrofem (2 mg E2 na tabletu).

3.3 Přístrojové vybavení

Všechna elektrochemická měření byla provedena v konvenčním tříelektrodovém uspořádání. Ten se skládal z jedné z testovaných pracovních elektrod, jmenovitě elektroda ze skelného uhlíku (GCE), zlatá elektroda (AuE), platinová elektroda (PtE), nevodná uhlíková pastová elektroda (CPE) s obsaženým tenzidem (SDS) a borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE). Kromě planární BDDE s aktivní plochou 3 mm vyrobené Slovenskou technickou univerzitou (Bratislava, Slovensko) všechny ostatní elektrody představovaly konvenční diskovou konfiguraci o stejném průměru aktivní plochy (3 mm) od společnosti Metrohm (Praha, Česká republika), přičemž nasycená kalomelová elektroda (SCE) sloužila jako referentní a PtE jako pomocná. Tento elektrodový systém byl připojen k potenciostatu/galvanostatu Autolab PGSTAT101 ovládanému pomocí softwaru Nova verze 1.11 od společnosti Metrohm (Praha, Česká republika).

HPLC systém byl vybaven dvěma binárními gradientovými čerpadly LC-30AD, odplyňovacím zařízením DGU-20 A5, detektorem diodového pole SPD-M30A (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko), kolonovým termostatem LCO 102 (Ecom, České Meziříčí, ČR Republic), šesticestným injekčním ventilem s 2 μ l vnější smyčkou (Valco Instruments, Schenkon, Švýcarsko) a kolonou Ascentis Express C18 (150 \times 3,0 mm, částice 2,7 μ m, Supelco, Bellefonte, USA). Separace byla prováděna v izokratickém elučním režimu s 50% vodným acetonitrilem (v/v) při průtoku 0,5 ml·min⁻¹ a teplotě kolony 30°C. DAD detektor zaznamenával chromatogramy při vlnové délce 280 nm. Každé měření bylo opakováno minimálně třikrát.

3.4 Příprava nevodné pastové elektrody

Nevodná pastová elektroda byla připravována z chemicky čištěného přírodního grafitového prášku (typ RWB) s velikostí částic 10–25 μ m pořízeného od Ringsdorff-Werke (Bonn, Germany). Jako pojivo uhlíkové pasty byl použit minerální olej (MO) od Merck KGaA (Darmstadt, Německo). Modifikátorem pro tuto specifickou pastu byl zvolen dodecyl síran sodný rovněž od Merck KGaA (Darmstadt, Německo). Uhlíkový prášek, minerální olej a tenzid byly smíchány v poměru 60:20:20 (w/w/w) v porcelánové třecí misce a tloučkem homogenizovány do kompaktní hmoty. Vzniklá uhlíková pasta byla poté plněna špachtlí do teflonového elektrodového držáku opatřeného kovovým pístem, jenž sloužil k elektrickému zapojení [38]. Výsledná CPE je zobrazena na Obr. 16.



Obrázek 16. CPE modifikovaná tenzidem.

3.5 Obnovování povrchu u pracovních elektrod

Před každým experimentem byl povrch pevných elektrod (GCE, PtE a AuE) vyleštěn pomocí disperze oxidu hlinitého (s velikostí částic 1 μm) ve vodě na lešticí podložce po dobu jedné minuty, poté pečlivě omyt nejdříve proudem destilované vody, následně použitým organickým rozpouštědlem, a nakonec vysušen filtračním papírem. Povrch BDDE byl pouze vždy opláchnut proudem organického rozpouštědla (stejně jako pracovní médium), zatímco povrch nevodné CPE byl obnovován vytlačení malého množství elektrodového materiálu (pasty) a následným leštěním o suchý filtrační papír z důvodu přítomnosti tenzidu.

3.6 Příprava roztoků

Pro voltametričnou analýzu se připravily 10 ml zásobní roztoky E2 ve všech použitých organických rozpouštědlech (aceton, acetonitril, metanol, ethanol) o koncentraci 0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zásobní roztok EE2 a DNG byl připraven pouze v acetonitrilu o koncentraci 0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s totožným elektrolytem v objemu 2 ml u EE2 a 1 ml u DNG. Výše zmíněná rozpouštědla s přítomností bezvodého chloristanu lithného o koncentraci 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ se testovala během optimalizace elektrochemické detekce pomocí cyklické a square-wave voltametrie. Pro HPLC analýzu byly 10 ml zásobní roztoky E2, EE2 a DNG připraveny v čistém MeCN o koncentraci 1 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Pokud bylo nutné, jednotlivé zásobní roztoky se patřičně naředily a uchovávaly v temnu v lednici.

3.7 Příprava vzorků k analýze

Pro elektrochemickou i HPLC analýzu, bylo nejprve zváženo 5 tablet od každého léčiva a poté byly rozdrceny na prášek v keramické třecí misce. Poté se z výsledného prášku vzala navážka odpovídající hmotnosti jedné tablety, aby se alespoň částečně získal reprezentativní vzorek. Příslušný podíl práškového vzorku byl rozpuštěn v objemu 10 ml acetonu (či acetonitrilu; MeCN) s 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 (elektrolyt) pro SWV. Pro HPLC analýzu byl vzorek rozpuštěn pouze v 10 ml čistého MeCN. Samotné rozpouštění se uskutečňovalo v ultrazvukové lázni po dobu 10 min. Poté byl vzorek zfiltrován přes nylonové

injekční filtry (0,45 μm , 25 mm; Merck). Před analýzou byly vzorky v případě potřeby dále zředěny a uchovávány v temnu v lednici.

3.8 Pracovní podmínky

3.8.1 Parametry cyklické a square-wave voltametrie

Všechna měření se prováděla v 50 ml voltametrické skleněné nádobce při laboratorní teplotě 25 °C. Voltametrická měření s testovanými pracovními elektrodami se uskutečňovala v čistých organických rozpouštědlech (nebo s příměsí vody) obsahující vždy 0,1 mol·l⁻¹ LiClO₄. Podmínky CV pro tři cykly byly zvoleny následovně: potenciálový rozsah od +0,2 V do +1,8 V, skokový potenciál (E_{step}) 5 mV a rychlost skenování 0,05 V·s⁻¹. Optimální parametry SWV pro elektrochemickou detekci E2, EE2 a DNG v léčivech byly zvoleny následující: potenciálový rozsah od +0,6 V do +1,6 V, skokový potenciál (E_{step}) 5 mV, potenciál amplitudy (E_{ampl}) 30 mV·s⁻¹ a frekvence 10 Hz. Povrch GCE elektrody byl po každé analýze vzorku vyleštěn dle postupu uvedeným výše. Pro kvantifikaci sledované látky byla zvolena metoda kalibrační křivky v koncentračních rozsazích 5–200 mol·l⁻¹ E2, 10–100 mol·l⁻¹ EE2, 20–100 mol·l⁻¹ DNG.

3.8.2 HPLC analýza

Chromatografické podmínky se po optimalizaci zvolily následující: kolona C18 (150 × 3,0 mm, částice 2,7 μm), izokratický eluční režim s 50% vodným acetonitrilem (v/v) při průtoku 0,5 ml·min⁻¹ a teplotě kolony 30°C, vstřikovací objem 2 μl a spektrofotometrická detekce při vlnové délce 280 nm. Pro kvantifikaci sledované látky byla opět zvolena metoda kalibrační křivky v koncentračním rozsahu 5–200 mol·l⁻¹ pro E2, EE2 i DNG.

3.9 Statistická analýza

Analýza modelových a tří reálných farmaceutických vzorků byla provedena vždy v pěti opakováních ($n = 5$). Výsledky byly vypočteny a prezentovány jako intervaly spolehlivosti $\bar{x} \pm st_{1-\alpha}/\sqrt{n}$, kde \bar{x} je aritmetický průměr, s směrodatná odchylka a $t_{1-\alpha}$ kritická hodnota Studentova (t -rozdělení) pro 5 (4 stupně volnosti) opakování měření (2,776) na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (95% pravděpodobnost). Nakonec byla pomocí analýzy dat použitím softwaru Microsoft Excel 2016 stanovena významnost průsečíku y kalibrační křivky sestavené z průměru pěti opakováních měření na GCE [39].

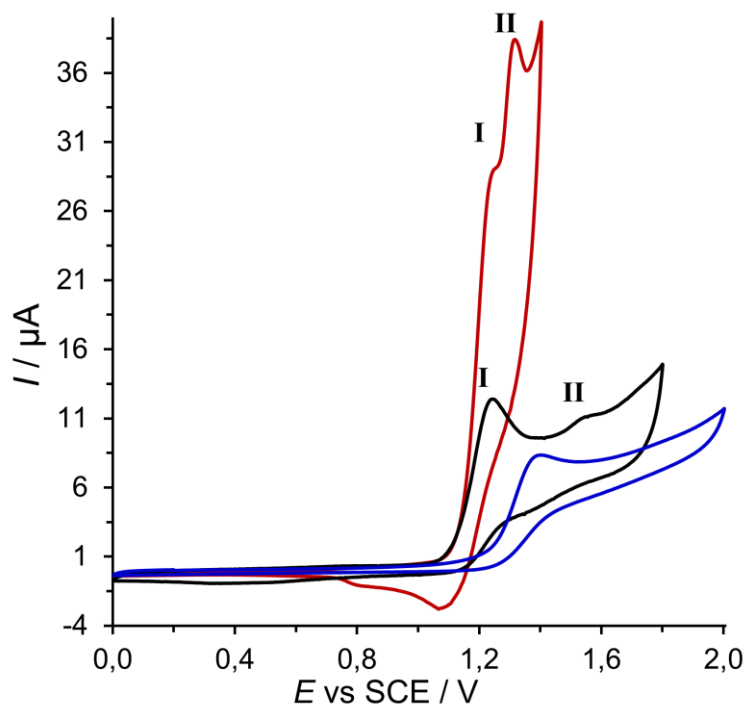
4 Výsledky a diskuse

Cílem diplomové práce bylo vyvinout jednoduchou, rychlou a spolehlivou screeningovou analytickou metodu pro stanovení E2, syntetického EE2 a DNG ve farmaceutických přípravcích, jenž by využívala jejich elektrochemických vlastností, v užším slova smyslu jejich elektrodovou oxidaci. Vývoj této elektroanalytické metody zahrnoval složitou optimalizaci pracovních podmínek a nezbytnou validaci, včetně porovnání s referenční HPLC analýzou, jenž musela být částečně upravena.

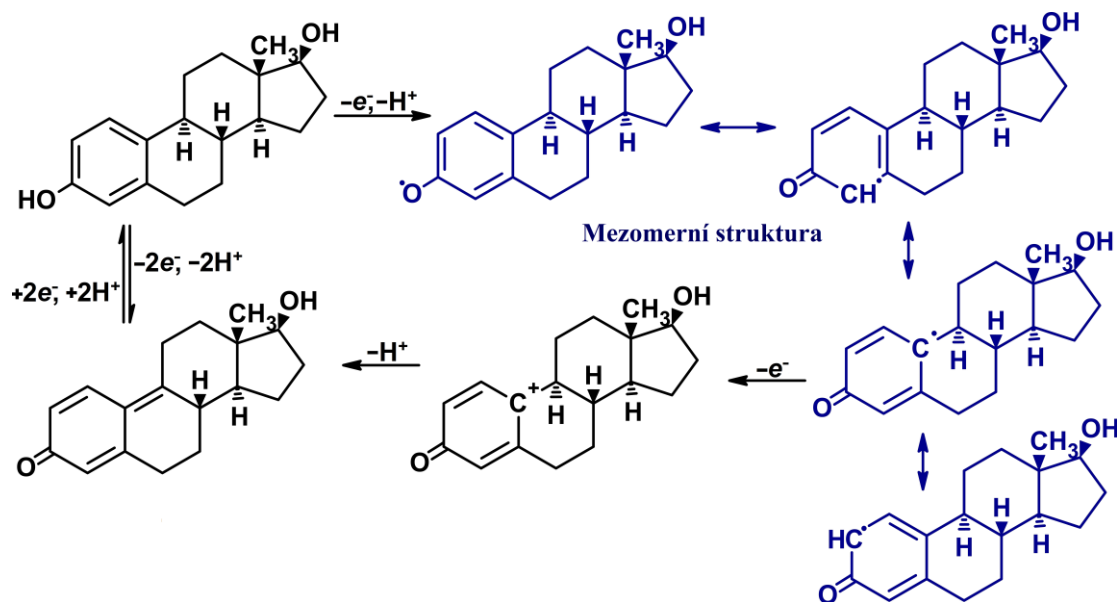
4.1 Elektrochemické chování 17 β -estradiolu

Nejdříve bylo nutné ověřit mechanismus elektrodové (anodické) oxidace E2, jelikož se literatura v mnoha případech různí [21]. Jelikož se EE2 liší od E2 pouze přítomností nitrilové skupiny na alifatické řetězci (anodicky inertní funkční skupina), lze předpokládat totožné elektrochemické chování. Tento předpoklad naštěstí nijak nekomplikuje situaci v reálné analýze, jelikož existuje celá řada léčiv, kde je použita pouze jedna z obou forem. V opačném případě, by bylo možné voltametriky stanovit pouze sumu obou forem. Jak je zřejmé z Obr. 17, EE2 poskytuje dva ireverzibilní píky na GCE (černá křivka) při potenciálech +1,2 V a +1,59 V, stejně tak poskytuje dva ireverzibilní píky na CPE/RWB/SDS (červená křivka) při potenciálech +1,2 V a +1,3 V, a pouze jeden široký ireverzibilní pík při +1,4 V byl obdržen na BDDE (modrá křivka). Tyto skutečnosti naznačují že EE2, tak i E2, se nejspíše budou elektrochemicky oxidovat ve dvou po sobě jednoelektronových krocích. Z molekulové struktury obou hormonů lze usoudit, že k elektrodové oxidaci (odevzdání elektronů s možnou dehydrogenací) dochází nejpravděpodobněji na benzenovém jádře (delokalizovaný systém π elektronů) za vzniku radikál kationtu. Po odtržení protonu, může vzniknout fenoxyl-radikál, jenž se stabilizuje mezomerními strukturami, a tudíž mohou vznikat dimery E2 a EE2 [41].

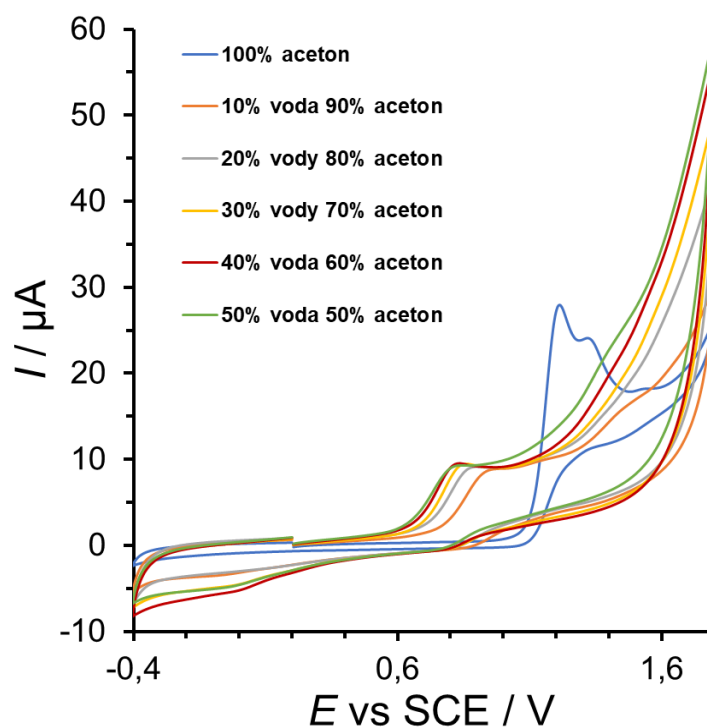
Kromě toho mohou být tyto radikály dále anodicky oxidovány (obdobně jako ostatní fenolické látky, konkrétně kresoly) [42] za vzniku kationtu, kdy po odtržení protonu může vzniknout *para*-chinonmethid [40]. Takto navržený EC-EC mechanismus (viz. Obr. 18) může platit pouze v ryze organických rozpouštědlech (zcela vysušených), jelikož nelze vyloučit nukleofilní adici vody či jiných nukleofilů za vzniku *ortho*-chinonů [43]. Tomuto tvrzení nasvědčuje i pozorování redukčního píku při $-0,0087$ V během cyklické voltametrie E2 v acetonu s různě velkými příměsi vody (viz. Obr. 19).



Obrázek 17. Cyklické voltamogramy $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EE2 obdržené na GCE (černá), CPE/RWB/SDS (červená), BDDE (modrá křivka) v čistém MeCN s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při rychlosti skenování $0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.



Obrázek 18. Pravděpodobný elektroodový reakční mechanismus E2 v čistém acetonitrilu.



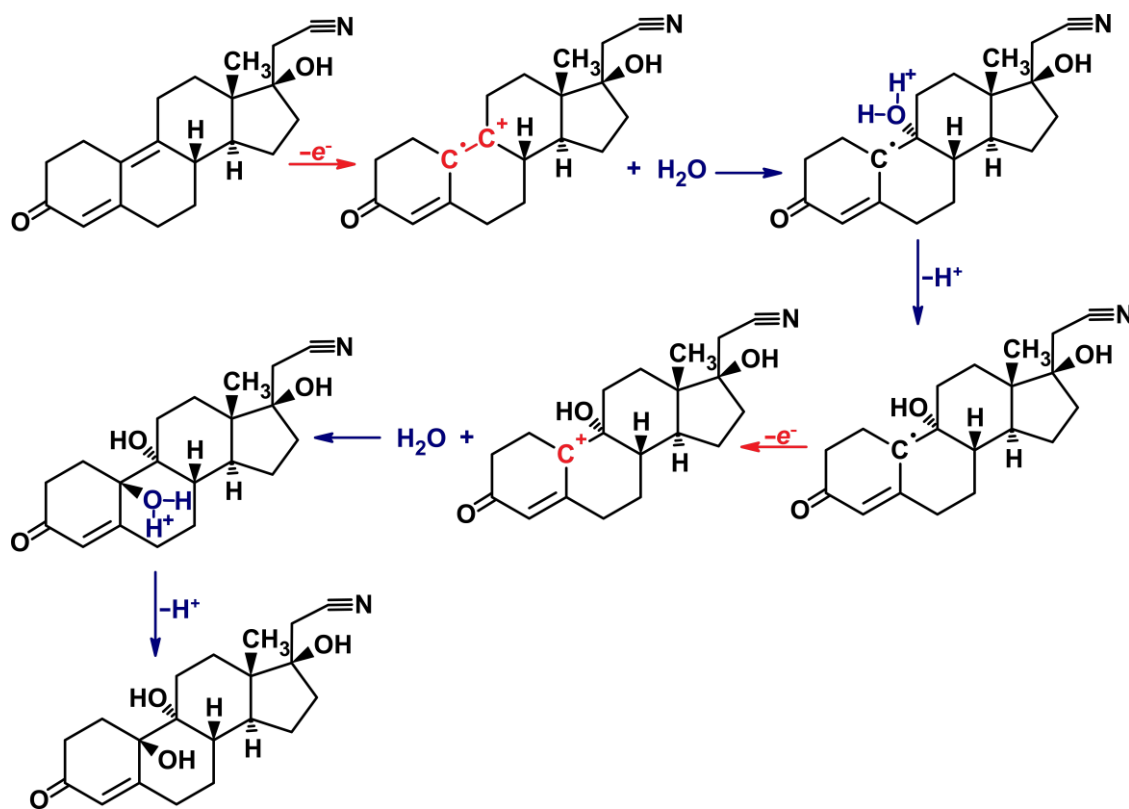
Obrázek 19. Cyklické voltamogramy $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ E2 obdržené na GCE v acetonu s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 o různé příměsi vody při rychlost skenování $0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

Co se týče kinetiky elektrodové reakce, pro tento účel se měřila závislost výšky prvního anodického píku (I_p^a) na rychlosti skenování (ν) na GCE. Získaná směrnice $0,541 \mu\text{A}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}$ z lineární závislosti $\log I_p^a$ na $\log \nu$ se blíží teoretické hodnotě 0,5 [40], jenž svědčí o difúzi řízený transport E2 k povrchu elektrody. Nicméně s ohledem k elektrochemickému chování E2 a EE2, typickému pro fenolické sloučeniny, nelze vyloučit pasivaci povrchu GCE, a tedy nutnost opakovaného mechanického obnovování povrchu po každém měření.

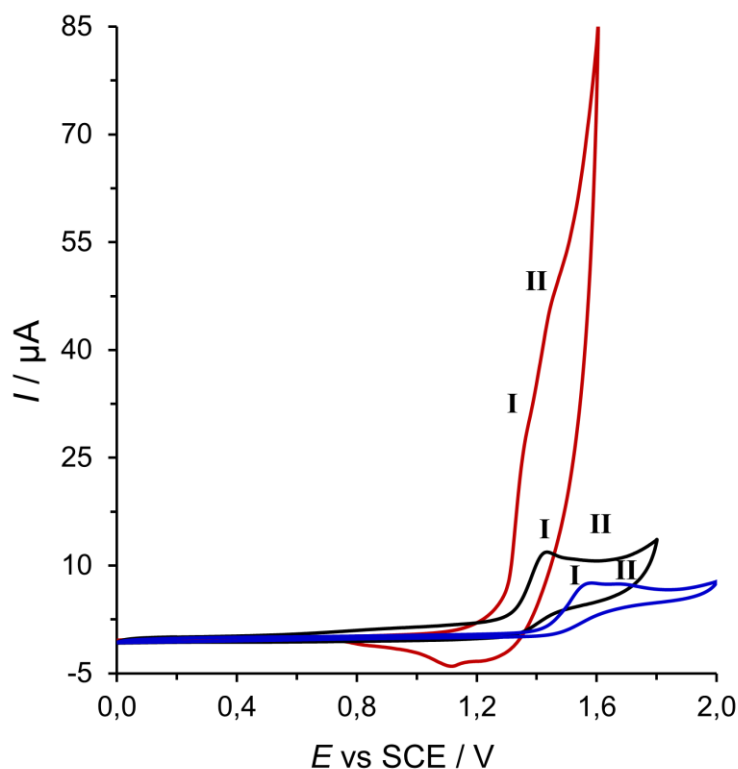
4.2 Elektrochemické chování dienogestu

Některé antikoncepční pilulky obsahují kromě E2 nebo EE2 také DNG. DNG lze tedy rovněž považovat za další významnou drogu obsaženou v antikoncepčních přípravcích. Elektrochemické chování DNG bylo již v literatuře dobře popsáno [34], i tak byl navržený mechanismus elektrodové přeměny DNG ověřen. Jde o dvoustupňovou hydroxylaci dvojně vazby v konjugovaném systému třech dvojných vazeb (π elektrony), jak je patrné z Obr. 20. Můžeme tedy předpokládat, že oxidační mechanismus závisí na cyklohexenovém kruhu, který je rovněž centrem vysoké progestogenní účinnosti DNG. Literatura uvádí, že oxidační reakce probíhá zřejmě ve třech krocích: tvorba epoxidu, otevření epoxidového kruhu a tvorba diolu [34]. Jak lze usoudit z Obr. 21, DNG poskytuje dva ireverzibilní anodické píky na GCE

(černá křivka) při potenciálech +1,4 V a +1,6 V, stejně tak poskytuje dva ireverzibilní píky na CPE/RWB/SDS (červená křivka) při potenciálech +1,38 V a +1,43 V a dva široké ireverzibilní píky při + 1,55 V a + 1,7 V byly obdrženy na BDDE (modrá křivka).



Obrázek 20. Pravděpodobný reakční mechanismus DNG.



Obrázek 21. Cyklické voltamogramy $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DNG obdržené na GCE (černá), CPE/RWB/SDS (červená), BDDE (modrá křivka) v čistém MeCN s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při rychlostí skenování $0,05 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.3 Optimalizace elektrochemické detekce 17β -estradiolu

Optimalizace elektrochemické detekce E2 spočívala v nalezení optimálního elektrodového materiálu, pracovního média (organického rozpouštědla s obsahem vody) a pracovních parametrů elektrochemické detekce pomocí SWV, kdy se musely zvolit optimální hodnoty potenciálu amplitudy a frekvence. Tato voltametrická technika byla zvolena díky výhodám jako je eliminace kapacitního (nabíjecího) proudu, a tím vyšší citlivosti. Důvodem optimalizace bylo dosáhnout co nejlepších analytických parametrů vyvinuté elektroanalytické metody.

4.3.1 Výběr elektrodového materiálu

Pro detekci E2 se testovala pětice různých pracovních elektrod (GCE, CPE/RWB/SDS, AuE, PtE, BDDE). Všechny tyto elektrody se použily při měření cyklické voltametrie $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ E2 v 10 ml acetonu s elektrolytem $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 . Jejich elektrodový povrch byl před každou analýzou obnoven. Jako optimální elektroda byla zvolena GCE, která vždy poskytla dva dobře definované oxidační píky při potenciálu $+1,2 \text{ V}$ a $+1,34 \text{ V}$ s nejvyššími proudovými výtěžky. Pokud by vzorek obsahoval pouze E2 nebo EE2 bylo eventuálně možné použít i nevodnou CPE. BDDE se rovněž ukázala jako vhodný

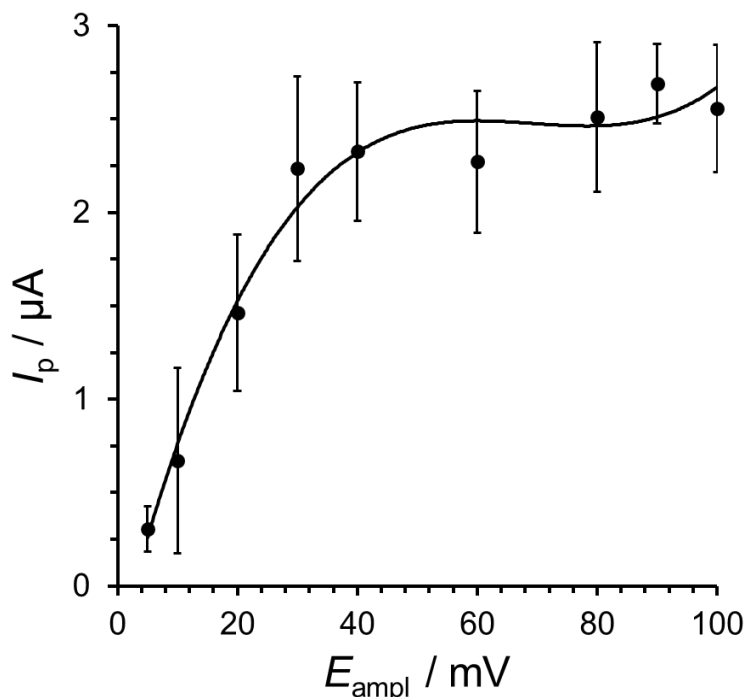
elektrodový materiál pro anodickou oxidaci E2 a EE2. Jak se dalo předpokládat, uhlíkové materiály vykazovaly lepší reaktivitu vůči těmto hormonům nežli kovové elektrody.

4.3.2 Výběr vhodného organického rozpouštědla

Pro elektrochemickou detekci E2 se testovala 4 různá polární organická rozpouštědla, jmenovitě methanol, ethanol, aceton a acetonitril. Nejvyšší naměřené proudy poskytoval E2 v acetonu, ale protože se jedná o vysoce těkavé rozpouštědlo (nestálá koncentrace E2 během manipulace a analýzy) upřednostnil se acetonitril, jenž je kompatibilní i s HPLC. Co se týče obsahu vody v rozpouštědle, nejvyšší proudy signálů poskytoval bezvodý aceton. Obsah vody v rozpouštědle nad 5 % (v/v) už způsoboval poloviční naměřené proudy.

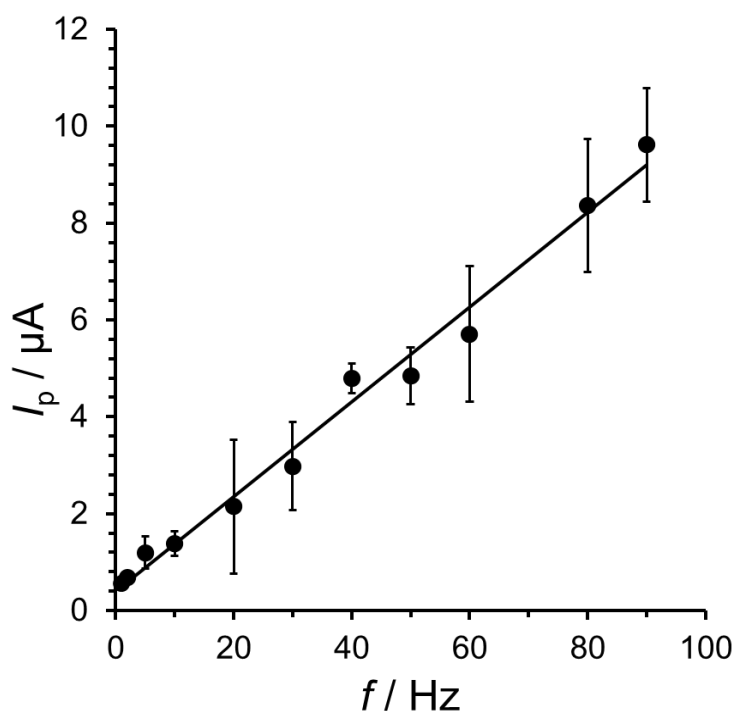
4.3.3 Parametry square-wave voltametrie

Při optimalizaci elektrochemické detekce pomocí SWV v potenciálovém rozsahu od +0,6 V do +1,4 V se použila konstantní koncentrace $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ E2 a potenciálový skok 5 mV. Nejprve se optimalizoval potenciál amplitudy (E_{ampl}) pro hodnoty od 5 do 100 mV při konstantní frekvenci 10 Hz. Výška píku (I_p) statisticky významně nerostla od hodnoty 30 mV, jak je patrné z Obr. 22. Z toho důvodu byla tato hodnota zvolena za optimální. Poté se tato hodnota potenciálu amplitudy nastavila jako konstantní a sledoval se vliv frekvence od 1 do 90 Hz na výšku anodického píku E2.



Obrázek 22. Závislost potenciálu amplitudy na výšce anodického píku $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ E2 obdrženého na GCE v acetonu s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při frekvenci 10 Hz a potenciálovém kroku 5 mV.

Volba optimální hodnoty frekvence (f) byla otázkou kompromisu mezi výškou anodického píku, opakovatelností a velikostí proudového pozadí základní linie, jelikož ta úměrně rostla s frekvencí, jenž s potenciálovým krokem určuje rychlost polarizace elektrody. Z důvodu nízké opakovatelnosti při vyšších frekvencích než 10 Hz a dostatečně nízkému pozadí základní linie ($\geq 2 \mu\text{A}$) byla tato hodnota frekvence považována za optimální pro následující validaci voltametrické metody.



Obrázek 23. Vliv frekvence na výšku anodického píku pro $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ E2 obdrženého na GCE v acetonu s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.

4.4 Validace vyvinuté elektroanalytické metody

Validace je zásadním krokem ve vývoji jakékoliv nové analytické metody, protože zajišťuje, že metoda je spolehlivá, přesná a reprodukovatelná. Jde o proces hodnocení analytické výkonnosti nové metody porovnáním jejích výsledků analýz s těmi obdrženými již zavedenými analytickými metodami nebo referenčními standardy. Vlastní validace vyvinuté elektroanalytické metody spočívala v určení lineárního rozsahu kalibrace, citlivosti (směrnice), hodnot limitu detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), opakovatelnosti (přesnosti), správnosti (návratnosti), analýzy reálných vzorků a porovnání s referenční HPLC analýzou.

4.4.1 Analytická výkonost

Požadavkem každého analytického chemika je mít co nejvíce robustní metodu, kdy bude měřený signál, v tomto případě výška anodického píku (I_p), přímo úměrný koncentraci analytu (c_a) ve vzorku podle rovnice 1, kde k představuje citlivost analytické metody a q tzv. úsek, jenž by měl být za ideálních podmínek nulový.

$$I_p = kc_a + q \quad (1)$$

Velmi důležitým parametrem je lineární rozsah, ve kterém je odezva senzoru přímo úměrná proudové odezvě elektrodové reakce, jelikož při znalosti linearit lze snáze připravit (naředit) vzorek či použít jednoduchou metodu dvoubodovou kalibraci, kdy se jen porovnává odezva analytu ve vzorku s odezvou standardu.

Z důvodu nízkého bodu varu acetonu (56 °C) a vysoké těkavosti, jež by významně ovlivňovala konstantní podmínky během analýzy, musel být aceton nahrazen mnohem stálejším acetonitrilem (MeCN). Níže jsou uvedeny kalibrační křivky, kde je možné si povšimnout vyšší citlivosti pro E2 v acetonu než EE2 v acetonitrilu. Pro stanovení lineárního rozsahu se voltametriky proměřovaly roztoky standardů jednotlivých hormonů. Tyto lineární závislosti s koeficient determinace $R^2 \geq 0,9970$ jsou popsány příslušnými rovnicemi přímek (viz. Obr. 24–26).

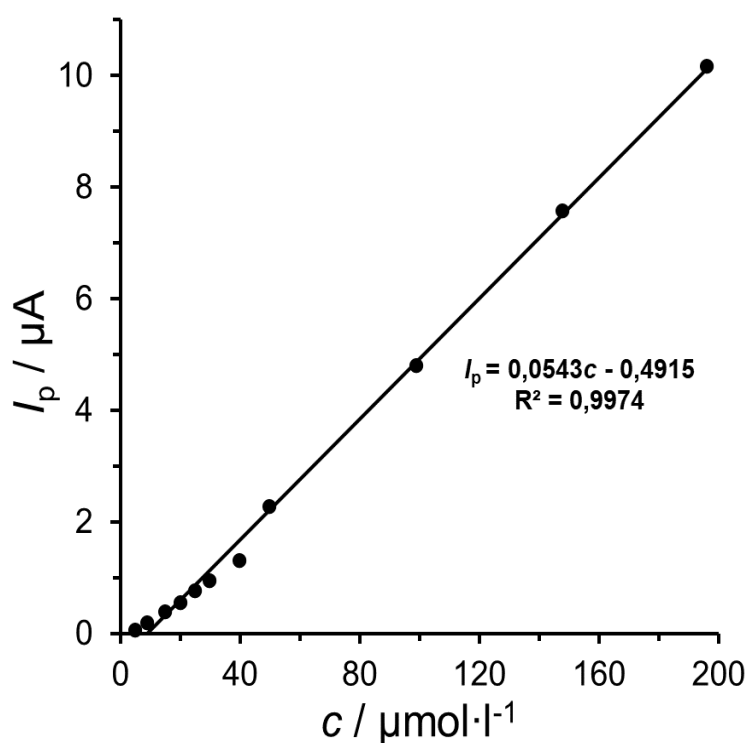
Obdržené voltamogramy pro 10 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EE2 a DNG jsou pro ukázkou zobrazeny na Obr. 28 a 29. Z důvodu téměř totožné chemické struktury E2 a EE2 je možné předpokládat jejich stejné elektrochemické chování, a tudíž je možné použít jednu kalibrační závislost pro stanovení E2, tak i EE2 ve farmaceutických přípravcích. DNG a EE2 (resp. E2) poskytují v MeCN oxidační píky při různých potenciálech (DNG při +1,4 V a +1,6 V, EE2 při +1,2 V a +1,59 V), které jsou od sebe dostatečně daleko a nejsou příliš široké na to, aby nebylo možné zkusit jejich simultánní elektrochemickou detekci, vždy dvojic E2 s DNG nebo EE2 s DNG. Tyto kombinace navíc vyhovují běžnému složení běžně používaných antikoncepcí.

Bohužel odpovídající kalibrační přímky neprocházejí počátkem, tudíž obdržené závislosti měřeného proudu na koncentraci analytu u všech hormonů nebyly přímo úměrné. Statisticky významný úsek tudíž znemožňuje použití metody standardního přídatku, jenž bylo u analýzy modelových vzorků rovněž prokázáno.

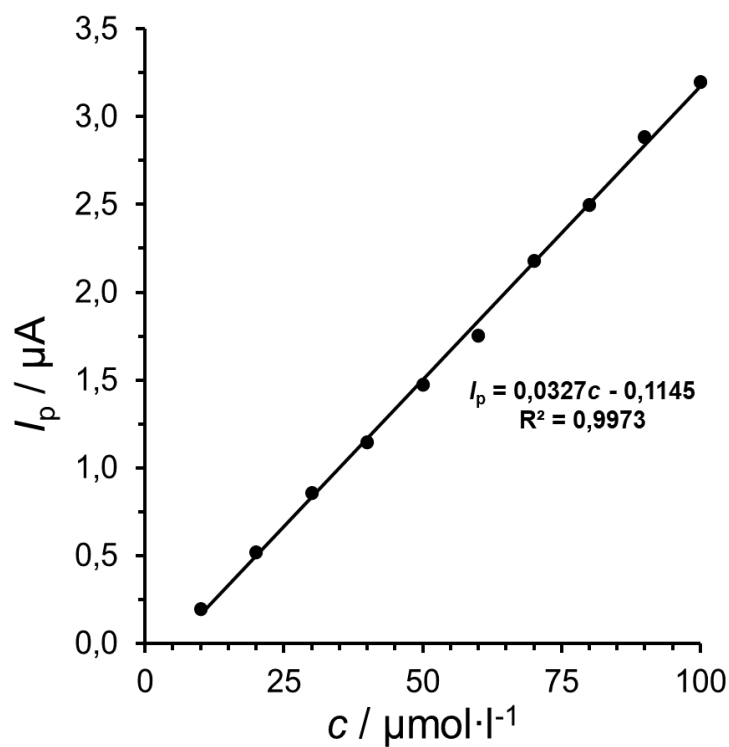
Získané parametry validace vyvinuté SWV metody jsou zobrazeny v Tab. 9, přičemž hodnoty LOD, LOQ a návratnosti pro analýzu modelového vzorku o koncentraci 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ E2 měly relativní směrodatnou odchylku (RSD) menší než 5 %.

Kalibrační křivky hormonů byly měřeny pouze do koncentrace $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (pro EE2 a DNG v acetonitrilu) a do $200 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (pro E2 v acetonu). Z důvodu známého množství hormonů v testovaných léčivech nebylo nutné měřit koncentrace vyšší a tyto hodnoty pro analytické účely postačovaly. Citlivost pro EE2 a DNG je totožná viz. obdobné směrnice (citlivosti) z rovnic regresí vyjádřených v Tab. 9, jmenovitě $0,033 \mu\text{A}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$ pro EE2 a pro $0,031 \mu\text{A}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$ DNG.

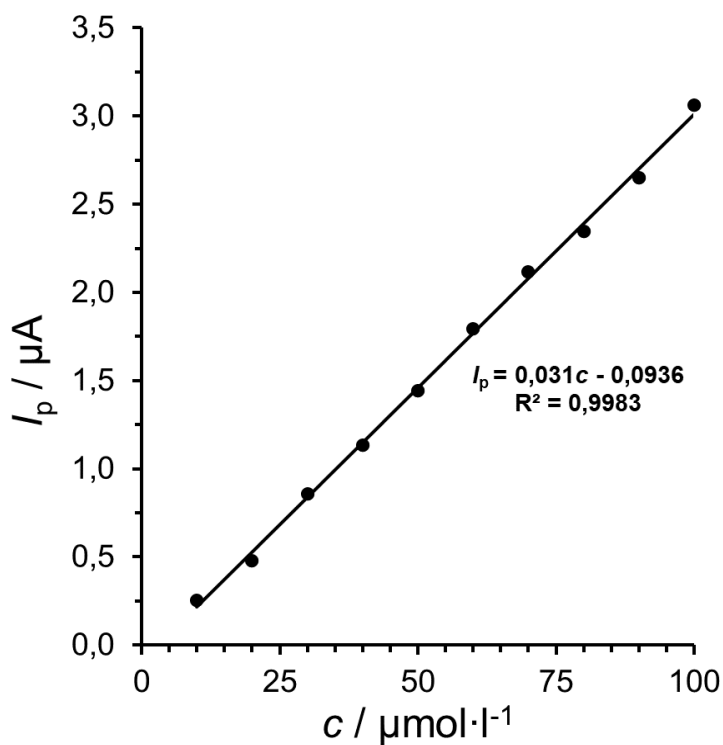
Pro určení opakovatelnosti (přesnosti) vyvinuté metody se provedla série opakovaných měření roztoku standardu E2 o koncentraci $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Bylo provedeno 5 po sobě následujících měření na stejném povrchu GCE (RSD = 2,9 %) a 5 měření na vždy leštěném povrchu GCE (RSD = 2,3 %). Hodnoty RSD jsou pod 5 %, což je pro 95% pravděpodobnost přijatelná hodnota. Z tohoto hlediska lze považovat vyvinutou metodu za velmi přesnou. Hodnota RSD je pro vždy leštěný povrch nižší než pro povrch neleštěný, tudíž pro co nejlepší výsledky byl povrch elektrody leštěn před každou analýzou.



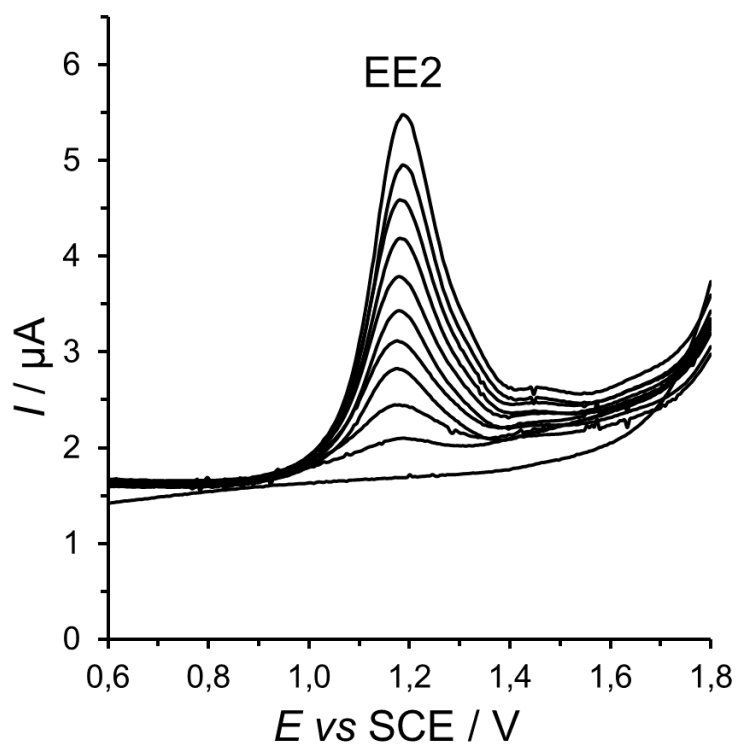
Obrázek 24. Kalibrační přímka E2 obdržená na GCE v čistém acetonu obsahující $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při frekvenci 10 Hz, potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.



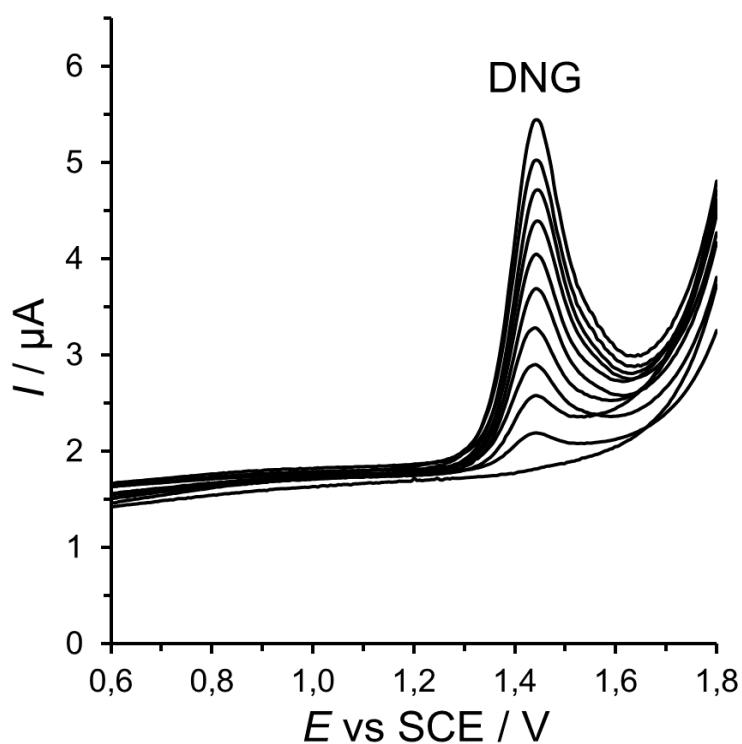
Obrázek 25. Kalibrační přímka EE2 obdržená na GCE v čistém MeCN obsahující $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při frekvenci 10 Hz, potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.



Obrázek 26. Kalibrační přímka DNG obdržená na GCE v čistém MeCN s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při frekvenci 10 Hz, potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.



Obrázek 27. Voltamogramy pro 10 až $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EE2 pořízené na GCE v čistém MeCN s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při frekvenci 10 Hz, amplitudě 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.



Obrázek 28. Voltamogramy 10 až $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DNG pořízené na GCE v čistém MeCN s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 při frekvenci 10 Hz, amplitudě 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.

Tabulka 9. Parametry validace získané pomocí vyvinuté metody SWV.

Analyt	Rovnice regrese	R ²	Lineární rozsah (μmol·l ⁻¹)	LOD (μmol·l ⁻¹)	Opakovatelnost RSD (%)
E2	$I_p = 0,054c - 0,492$	0,9974	0,42 do >196 ^a	0,13	1,20
EE2	$I_p = 0,033c - 0,115$	0,9973	0,11 do >100 ^b	0,03	4,94
DNG	$I_p = 0,031c - 0,094$	0,9983	0,65 do >100 ^b	0,20	8,09

Poznámka: a) hodnoty pro měření v acetonu a za b) v acetonitrilu. Opakovatelnost prezentována jako RSD byla vypočtena z pěti měření roztoků E2, EE2, DNG o koncentraci 25 μmol·l⁻¹.

Vyvinutá voltametrická metoda má srovnatelné analytické parametry jako již dříve vyvinuté metody, které jsou prezentovány v Tab. 8. Jelikož dříve navržené metody byly založené na katodické redukci nebo anodické oxidaci hormonů zejména ve vodných pracovních mediích (pufrech), ve kterých je jejich rozpustnost velmi nízká, byla spíše zvolena organická rozpouštědla (aceton a acetonitril), čímž se významně ulehčila (zjednodušila) příprava vzorků k analýze, a samozřejmě redukovala chybovost vlastní analýzy. Přestože se voltametrická měření prováděla především v čistém acetonitrilu, nemusela být použita žádná složitá a ekonomicky zatěžující modifikace povrchu elektrod. Hodnoty LOQ pro jednotlivé hormony (viz. Tab. 9) by měly být dostatečné pro kvantitativní analýzu léčiv, kdy není potřeba velmi vysoké citlivosti vyvinuté metody.

4.5 Validace referenční chromatografické metody

Před samotnou analýzou farmaceutických přípravků musela být i referenční chromatografická metoda s izokratickou elucí na reverzní fázi s DAD detektorem (RP-HPLC-DAD) validována z hlediska linearity, limitů detekce (LOD), limitů kvantifikace (LOQ) a přesnosti. Při zvolení optimálních parametrů HPLC analýzy se vycházelo se z publikace Wilson, P. z roku 2009 [26], která musela být částečně upravena, a to zejména v nastavení vlnové délky spektrofotometrické detekce na 280 nm. Zjistilo se totiž, že při této hodnotě vlnové délky lze uskutečnit simultánní stanovení E2, EE2 a DNG, jak je patrné ze záznamu analýzy standardů všech hormonů o koncentraci 100 μmol·l⁻¹ na Obr. 29. Získané parametry validace referenční HPLC metody jsou zobrazeny v Tab. 10.

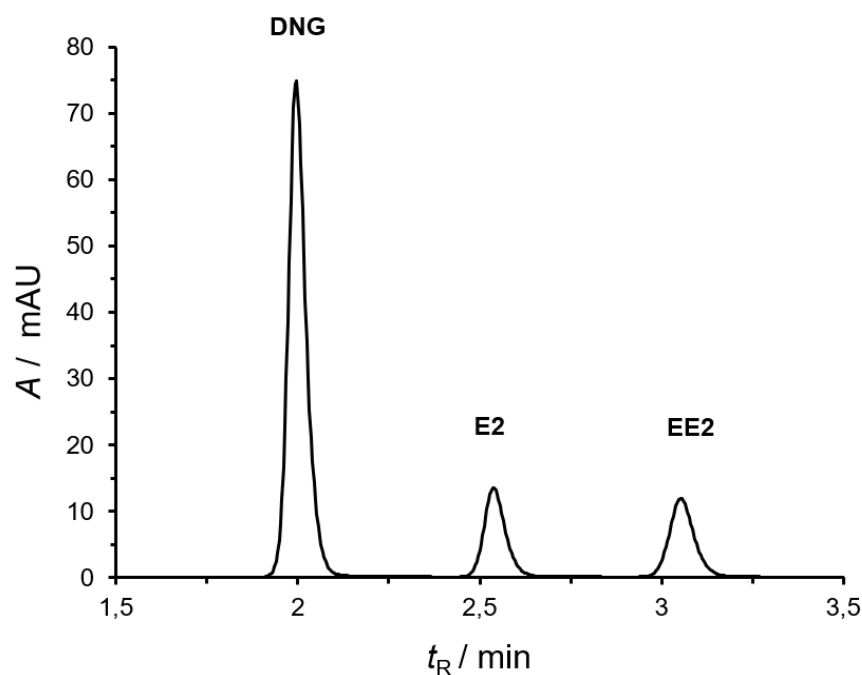
Kalibrační křivky všech standardů stanovených chromatograficky byly sestrojeny jako funkce koncentrace a plochy píku (A_p). Kalibrační rovnice E2, EE2 a DNG s odpovídajícími

koeficienty determinace jsou zobrazeny na Obr. 30. Tyto koeficienty nabývaly hodnot vyšších než 0,998 pro všechny standardy, což prokazuje vysokou linearitu. Dále LOD estradiolu, ethinylestradiolu a dienogestu dosáhly hodnot 0,10, 0,14, 0,02 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$; a LOQ byly stanoveny při koncentracích 0,32, 0,47, 0,05 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v daném pořadí.

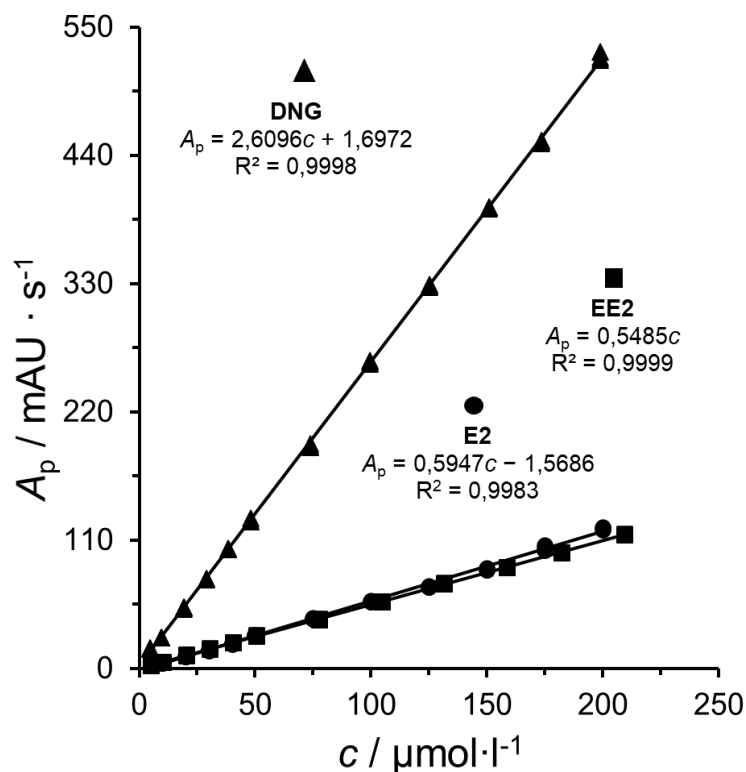
Tabulka 10. Analytické parametry referenční HPLC metody.

Analyt	Rovnice regrese	R ²	Lineární rozsah ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Opakovatelnost RSD (%)
E2	$A_p = 0,595c - 1,569$	0,9983	0,32 do >200	0,10	0,3
EE2	$A_p = 0,549c$	0,9999	0,47 do >209	0,14	0,4
DNG	$A_p = 2,610c - 1,697$	0,9998	0,05 do >199	0,02	0,1

Poznámka: opakovatelnost prezentována jako RSD byla vypočtena z pěti měření roztoků E2, EE2, DNG o koncentraci 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obrázek 29. Typické RP-HPLC-DAD chromatogramy standardů o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Experimentální podmínky: Kolona Ascentis Express C18 (150 × 3 mm, 2,7 μm) temperovaná na 30 °C; izokratická eluce 50% vodného acetonitrilu (v/v) s průtokem 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, dávkovaný objem 2 μl , detekce při 280 nm.

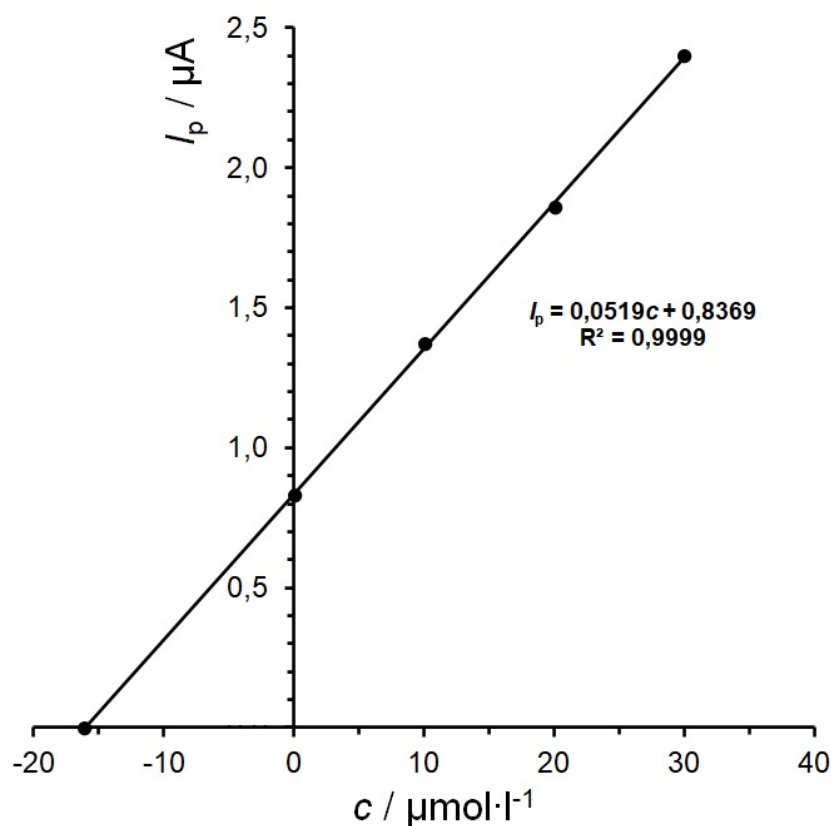


Obrázek 30. Kalibrační křivky hormonů s odpovídajícími rovnicemi regrese a koeficienty stanovení získané pomocí referenční RP-HPLC-DAD analýzy.

4.6 Analýza modelových a reálných vzorků

Před reálnou analýzou léčiv byla nejprve ověřena správnost vyvinuté SWV metody analýzou modelových vzorků, které obsahovaly pouze jeden hormon (E2, EE2 nebo DNG) o koncentraci $25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kvantifikace modelových vzorů se prováděla pomocí metody kalibrační přímky. Obdobně se postupovalo při validaci referenční HPLC metody. Porovnání naměřených hodnot s vypočtenými návratnostmi je uvedeno v Tab. 11, kde můžeme vidět, že návratnost u obou metody nebyla nižší než 96 % a tudíž lze konstatovat, že obě metody poskytují správné výsledky analýz. Přesnější výsledky však byly získány referenční metodou RP-HPLC-DAD (nižší hodnoty intervalů spolehlivosti), jak je uvedeno v Tab. 11 a 12. Nicméně nižší spotřeba organických rozpouštědel, nižší počáteční náklady na přístrojové vybavení a statisticky srovnatelné analytické parametry činí vyvinutou voltametrickou metodu atraktivní.

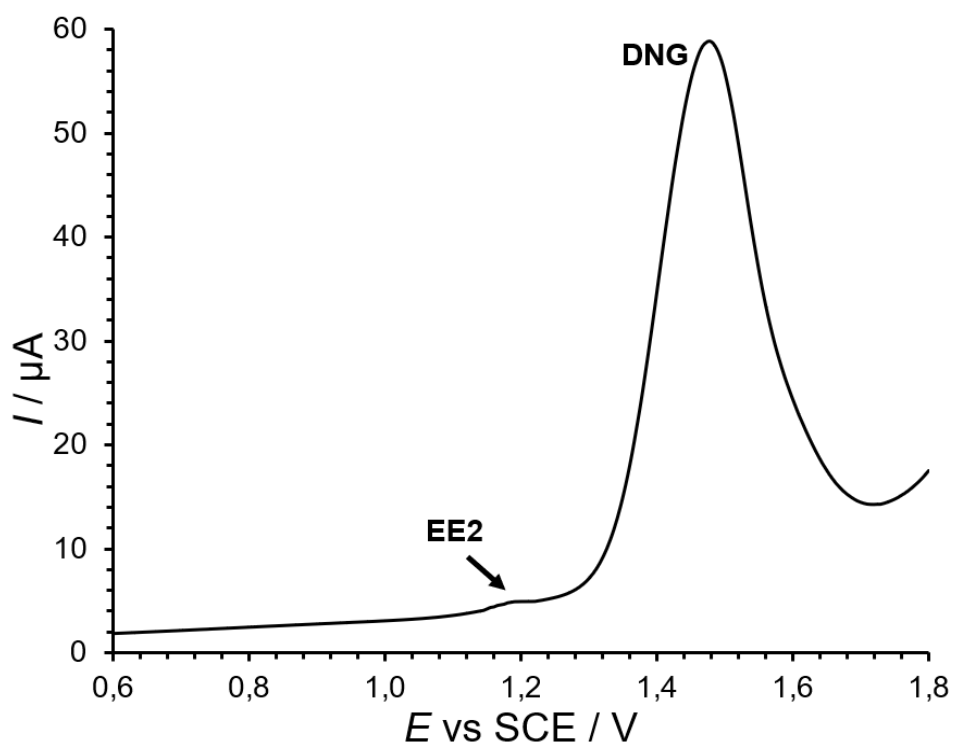
Analýza modelového vzorku E2 (Obr. 31) metodou standardního přidavku byla vyzkoušena, zda i přes statisticky významný úsek rovnice regrese bude poskytovat správné analytické údaje. I přes vysokou linearitu ($R^2 = 0,9999$), byla stanovena významně odlišná koncentrace analytu a to $16,12 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Spočtená návratnost byla pouze 64,49 %, čímž bylo ověřeno, že tento způsob kvantifikace bohužel není použitelný.



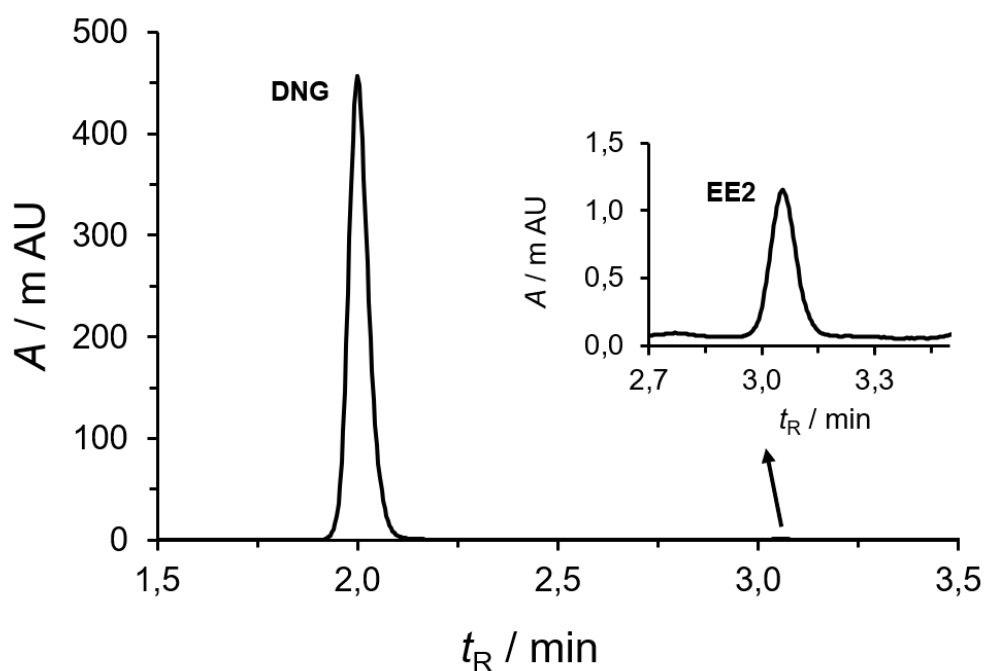
Obrázek 31. Analýza modelového vzorku E2 metodou standardního přídávku. Hodnoty výšek píků byly obdrženy na GCE v čistém acetonu obsahující $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$ při frekvenci 10 Hz, potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.

Všechny vzorky reálných léčiv (Estrofem, Mистра, Bonadea) byly připraveny dle postupu v kapitole 2.7 a analyzovány jak za optimalizovaných podmínek SWV, tak i pomocí referenční HPLC metody. Pro stanovení obsahu E2, EE2 a DNG ve výše farmaceutických léčivech byla u obou případů použita metoda kalibrační křivky.

Ukázky naměřených záznamů analýzy léčiva Mистра pomocí vyvinuté SWV a referenční HPLC metody jsou zobrazeny na Obr. 32 a 33. Oba záznamy dokazují, že i přes mnohonásobně vyšší obsah DNG, je stále možné spolehlivě kvantifikovat i minoritní EE2 v jediné analýze (simultánně). Matrice vzorku naštěstí nijak neinterferovala vlastní stanovení (bez dalších nespecifikovaných signálů) a rovněž nezvyšovala pozadí základní linie, a tím pádem mohly být bez matematických úprav spolehlivě odečteny proudové odezvy E2 či EE2 v rámci voltametrické analýzy.



Obrázek 32. Záznam reálné analýzy vzorku Mistra pořízený SWV na GCE v čistém MeCN obsahující $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ LiClO}_4$ při frekvenci 10 Hz, potenciálu amplitudy 30 mV a potenciálovém kroku 5 mV.



Obrázek 33. Záznam reálné analýzy vzorku Mistra pořízené pomocí referenční metody RP-HPLC-DAD na koloně Ascentis Express C18 ($150 \times 3 \text{ mm}$, $2,7 \mu\text{m}$) temperované na $30 \text{ }^\circ\text{C}$, izokratická eluce 50% vodného acetonitrilu (v/v) s průtokem $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, dávkovaný objem $2 \mu\text{l}$, detekce při 280 nm.

Tabulka 11. Porovnání SWV a referenční HPLC metody v modelové analýze.

Analyt	Skutečná koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Stanovená koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		Návratnost (%)	
		SWV	HPLC	SWV	HPLC
E2		24,46±0,32	24,97±0,39	97,4±0,3	99,9±0,5
EE2	25	24,89±0,04	25,48±0,21	99,6±1,1	101,9±0,4
DNG		25,51±0,07	24,08±0,07	102,0±2,0	96,3±0,1

Poznámka: hodnoty jsou uvedeny jako intervaly spolehlivosti $\bar{x} \pm st_{1-\alpha}/\sqrt{n}$, kde \bar{x} je aritmetický průměr, s standardní odchylka a $t_{1-\alpha}$ kritická hodnota (2,776) Studentova t -rozdělení pro 5 opakování (4 stupně volnosti) každé analýzy při $\alpha = 0,05$ (95% pravděpodobnost).

Tab. 12 ukazuje hodnoty, které jsou prezentovány jako intervaly spolehlivosti pro 5 opakovaných analýz reálných léčiv, které byly připraveny jako reprezentativní vzorky rozdrcením 5 tablet a rozpuštěním průměrné navážky 1 tablety v acetonu nebo acetonitrilu. Výsledky jsou vždy uvedeny jako mg příslušného hormonu na 1 tabletu. U vzorku Estrofemu byla zjištěna velmi těsná shoda s deklarovaným obsahem estradiolu. Rozdíly se vyskytly u vzorku Bonadea, a to jak při stanovení hormonu EE2, tak u DNG, kde větší správnosti dosáhla referenční HPLC metoda. U vzorku Mistra bylo dosaženo téměř srovnatelných výsledků při analýze EE2, větší rozdíl se vyskytl u stanovení DNG, kde opět větší správnost měla referenční HPLC analýza. Vzorky se připravovaly zvlášť jak pro SWV, tak i pro HPLC analýzu, což je možným důvodem, proč jsou výsledky částečně rozdílné. Odchylky analýz byly nakonec u obou metod podobné.

Tabulka 12. Výsledky analýz reálných hormonálních léčiv.

Vzorek	SWV	HPLC	Deklarováno
Estradiol (mg/tabletu)			
Estrofem	2,23±0,06	2,12±0,011	2
Ethinylestradiol (mg/tabletu)			
Mistra	0,039±0,003	0,029±0,002	0,03
Bonadea	0,053±0,002	0,024±0,001	0,03
Dienogest (mg/tabletu)			
Mistra	1,796±0,07	1,92±0,005	2
Bonadea	1,721±0,016	1,98±0,003	2

Poznámka: hodnoty jsou uvedeny jako intervaly spolehlivosti $\bar{x} \pm st_{1-\alpha}/\sqrt{n}$, kde \bar{x} je aritmetický průměr, s standardní odchylka a $t_{1-\alpha}$ kritická hodnota (2,776) Studentova t -rozdělení pro 5 opakování (4 stupně volnosti) každé analýzy při $\alpha = 0,05$ (95% pravděpodobnost.)

5 Závěr

V rámci diplomové práce se podařilo vyvinout jednoduchou a rychlou elektroanalytickou metodu pro monitorování estradiolu, ethinylestradiolu a dienogestu v antikoncepčních přípravcích, která je založena na jejich anodické oxidaci pomocí square-wave voltametrie v bezvodém acetonitrilu s $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LiClO_4 sloužící jako elektrolyt. Jelikož se E2 a EE2 vyznačují totožným elektrochemickým chováním, lze je voltametriky stanovit pouze jako sumu obou forem. Tato skutečnost naštěstí nijak nekomplikuje situaci v reálné analýze, jelikož v léčivech se vyskytuje vždy jen jedna forma spolu s DNG, který lze simultánně stanovit jak s E2, tak i s EE2. Při analýze farmaceutických léčiv není nutná ani žádná složitá předúprava vzorků, kdy postačí pouhé rozdrcení tablet na jemný prášek, jeho rozpuštění v organickém rozpouštědle pomocí ultrazvuku a zfiltrování nerozpustných balastních látek (nejčastěji plnidel).

Jako vhodný elektroodový materiál byl zvolen skelný uhlík bez jakékoliv povrchové modifikace. Kromě toho i bórem dopovaný diamant by šel použít, ale s podstatě nižšími proudovými výtěžky. V rámci optimalizace elektrochemické detekce byly určeny parametry SWV, jmenovitě frekvence 10 Hz a potenciálu amplitudy 30 mV. Pro všechny tři hormony se pohybuje LOQ kolem $0,5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a linearita je až přes dva řády (nad $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Správnost metody byla ověřena analýzou modelových vzorků, které obsahovaly pouze jeden hormon (E2, EE2 nebo DNG) o koncentraci $25 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Kvantifikace modelových vzorků se prováděla pomocí metody kalibrační přímky, přičemž návratnost SWV metody nebyla nižší než 96 %.

V rámci úpravy již navržené referenční izokratické RP-HPLC-DAD metody se podařilo spektrofotometriky detekovat všechny tři hormony (E2, EE2 a DNG) při jediné vlnové délce 280 nm, což lze považovat za jistý pokrok chromatografické analýze těchto hormonů.

Výše uvedené skutečnosti naznačují, že by vyvinutá SWV metoda mohla naleznout uplatnění ve farmaceutické analýze běžně dostupných hormonálních přípravků s obsahem E2, EE2 a DNG, neboť poskytuje spolehlivá analytická data jako referenční HPLC metoda. Jelikož tato elektroanalytická metoda využívá principiálně zcela jinou interakci analytu než již zavedené spektrofotometrické či chromatografické metody, mohla by sloužit jako jednoduchá referenční metoda během jejich validací.

6 Použitá literatura

- [1] VIJAY S.B., MICHAELIS M., SHARMA A., PLINSKI C., VIERGUTZ T., VANSELOW J. Estradiol production of granulosa cells is unaffected by the physiological mix of non-esterified fatty acids in follicular fluid. *Journal of Biological Chemistry* **298**(10), 2022, 102477.
- [2] GORRILL M.J., MARSHALL J.R. Pharmacology of estrogens and estrogen-induced effects on nonreproductive organs and systems. *Journal of Reproductive Medicine* **31**(9), 1986, 842-847.
- [3] NAZARI E., FATIHAH S. Effects of 17 β -estradiol (E2) on aqueous organisms and its treatment problem: a review. *Reviews on Environmental Health* **31**(4), 2016, 465-491.
- [4] CZARNY K.S., KRAWCZYK D., ZIELŃSKI B., MIĘKOŚ M, GADZAŁA-KOPCIUCH E. The impact of estrogens on aquatic organisms and methods for their determination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **47**(11), 2017, 909-963.
- [5] WATHUDURA P.D., THIMIRA KAVINDA K., & GUNATILAKE S.R. Determination of steroidal estrogens in food matrices: current status and future perspectives. *Current Opinion in Food Science* **28**, 2019, 104-113.
- [6] PubChem, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004 [online]; PubChem Compound Summary for CID 5757, Estradiol, Převzato a upraveno z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Estradiol>, [cit. 22-10-14].
- [7] LEWIS R.J., Hawley's Condensed Chemical Dictionary 15th Edition. *John Wiley & Sons, Inc. New York* **15**, 2007, 512.
- [8] O'NEIL M.J. (ed.). The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. *Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc.*, 2006, 635.
- [9] CHENG Z.N., SHU Y., LIU Z.Q., WANG L.S., OU-YANG D.S., ZHOU H.H. Role of cytochrome P450 in estradiol metabolism in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica* **22**(2), 2001, 148-154.
- [10] MUECK A.O., SEEGER H., WALLWIENER D. Impact of hormone replacement therapy on endogenous estradiol metabolism in postmenopausal women. *Maturitas* **43**(2), 2002, 87–93.

- [11] BUCHSBAUM H.J. The Menopause. *Springer Science & Business Media*, Inc. New York, 2012, 64.
- [12] O'CONNELL M.B. Pharmacokinetic and pharmacologic variation between different estrogen products. *The Journal of Clinical Pharmacology* **35**(9), 1995, 18-24.
- [13] KUHNZ W., BLODE H., ZIMMERMANN H. Pharmacokinetics of Exogenous Natural and Synthetic Estrogens and Antiestrogens. *Handbook of experimental pharmacology* **135**, 1993, 261–322.
- [14] Obrázek chemické struktury EE2, dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/e4876>, a upraveno [23-02-27].
- [15] Obrázek chemické struktury DNG, dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/search/dienogest?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=dienogest&type=product>, a upraveno [23-02-27].
- [16] STANCZYK F.Z., ARCHER D.F., BHAVNANI B.R. Ethinyl estradiol and 17 β -estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. *Contraception* **87**(6), 2013, 706–727.
- [17] STANCZYK F.Z., NIU C., AZEN C., MIRKIN S., AMADIO J.M. Determination of estradiol and progesterone content in capsules and creams from compounding pharmacies. *Menopause* **26**(9), 2019, 966–971.
- [18] Obrázek antikoncepčních forem, dostupné z: <https://www.healthline.com/health/healthy-sex/how-effective-is-birth-control>, a upraveno [22-11-05].
- [19] BASTIANELLI, C., FARRIS, M., ROSATO, E., BROSENS, I., BENAGIANO, G. Pharmacodynamics of combined estrogen-progestin oral contraceptives 3. Inhibition of ovulation. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **11**(11), 2018, 1085-1098.
- [20] WOJNAROWSKI K., PODOBIŃSKI P., CHOLEWIŃSKA P., SMOLIŃSKI J., DOROBISZ, K. Impact of estrogens present in environment on health and welfare of animals. *Animals* **11**(7), 2021, 2152.
- [21] SMAJDOR J., PIECH R., ŁAWRYWIANIEC M., PACZOSA-BATOR B. Glassy carbon electrode modified with carbon black for sensitive estradiol determination by means of voltammetry and flow injection analysis with amperometric detection. *Analytical Biochemistry* **544**, 2018, 7–12.
- [22] HORDGE L.N., MCDANIEL, K.L., JONES D.D., & FAKAYODE S.O. Simultaneous determination of estrogens (ethinylestradiol and norgestimate) concentrations in human

- and bovine serum albumin by use of fluorescence spectroscopy and multivariate regression analysis. *Talanta* **152**, 2016, 401–409.
- [23] LI Y., XU J., JIA M., YANG, Z., LIANG, Z., GUO J., SUN C., SHEN F., LUO Y. Colorimetric determination of 17 β -estradiol based on the specific recognition of aptamer and the salt-induced aggregation of gold nanoparticles. *Materials Letters* **159**, 2015, 221–224.
- [24] PU H., HUANG, Z., SUN, D.W., FU H. Recent advances in the detection of 17 β -estradiol in food matrices. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**(13), 2019, 1–14.
- [25] YILMAZ B., KADIOGLU Y. Determination of 17 β -estradiol in pharmaceutical preparation by UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods. *Arabian Journal of Chemistry* **10**, 2017, 428–1422.
- [26] WILSON P. Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of estradiol, estriol, estrone, and progesterone in pharmaceutical preparations. *Journal of AOAC International* **92**(3), 2009, 846–854.
- [27] HU S., HE Q., ZHAO Z. Determination of trace amounts of estriol and estradiol by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analyst* **117**(2), 1992, 181-184.
- [28] BARREIROS L., QUEIROZ J.F., MAGALHÃES L.M., SILVA A.M. T., SEGUNDO M.A. Analysis of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices. A review. *Microchemical Journal* **126**, 2016, 243–262.
- [29] AHMAD S.M., MESTRE A.S., NENG N.R., ANIA C.O., CARVALHO A.P., NOGUEIRA J.M.F. Carbon based sorbent coatings for the determination of pharmaceutical compounds by bar adsorptive microextraction. *ACS Applied Bio Materials* **3**, 2020, 2078-2091.
- [30] NAREDO G., MAK T.C.S., UPRETI R., GIBB F.W., BECKETT G.J., WALKER B.R., HOMER N.Z.M., ANDREW R. Derivatization of estrogens enhances specificity and sensitivity of analysis of human plasma and serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* **151**, 2016, 148-156.
- [31] ALMEIDA C., NOGUEIRA J.M.F. Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E). *Talanta* **136**, 2014, 145-154.
- [32] RAYMUNDO-PEREIRA P.A., GOMES N.O., MACHADO S.A.S., OLIVEIRA, O.N. Simultaneous, ultrasensitive detection of hydroquinone, paracetamol and estradiol for quality control of tap water with a simple electrochemical method. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **848**(8), 2019, 113319.

- [33] KAMEL A.H., AMR A.E.G.E.; GALAL H.R.; ELSAYED E.A.; AL-SAYADY A.I. Liquid contact-selective potentiometric sensor based on imprinted polymeric beads towards 17 β -estradiol determination. *Polymers* **12**(7), 2020, 1506.
- [34] BAKIRHAN N.K., CELIK M.S.B., CELIK H., USLU B., OZKAN S.A. Electrochemical approach on mechanism of an oral progestin in aqueous media and its fully validated detection via a carbon-metal based composite sensor. *Electroanalysis* **30**(10), 2018, 2273-2283.
- [35] SALCI, B., BIRYOL, I. Voltammetric investigation of β -estradiol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **28**(3-4), 2002, 753–759.
- [36] SANTOS A.M., WONG A., PRADO T.M., FAVA E.L., FATIBELLO-FILHO, O., SOTOMAYOR M.D.P.T., MORAES, F.C. Voltammetric determination of ethinylestradiol using screen-printed electrode modified with functionalized graphene, graphene quantum dots and magnetic nanoparticles coated with molecularly imprinted polymers. *Talanta* **224**, 2021, 121804.
- [37] SPYCHALSKA K., ZAJĄC D., CABAJ J. Electrochemical biosensor for detection of 17 β -estradiol using semi-conducting polymer and horseradish peroxidase. *RSC Advances* **10**(15), 2020, 9079–9087.
- [38] JASHARI G., ŠVANCARA I., SÝS M. Characterisation of carbon paste electrodes bulk-modified with surfactants for measurements in nonaqueous media. *Electrochimica Acta* **410**(7), 2022, 140047.
- [39] JASHARI G., FRÜHBAUEROVÁ M., MIKYSEK T., ŠVANCARA I., METELKA R., SÝS M. New electroanalytical method for the determination of *trans*-anethole in spices and sweets, *Food Chemistry* **408**, 2023, 135167.
- [40] NGUNDI M.M., SADIK A.O., YAMAGUCHI T., SUYE S., First komparative reaction mechanisms of β -estradiol and selected environmental hormones in a redox environment. *Electrochemistry Communications* **5**(1), 2003, 61-67.
- [41] SAHAY R. Synthetic applications of laccase and its catalytic potentials. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science* **8**(6), 2021, 112–120.
- [42] VOSÁHLOVÁ J., SOCHR J., BALUCHOVÁ S., ŠVORC L., TAYLOR A., SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ K. Comparison of carbon-based electrodes for detection of cresols in voltammetry and HPLC with electrochemical detection. *Electroanalysis* **32**(10), 2020, 2193-2204.
- [43] RIVERA-PORTALATIN N.M., VERA-SERRANO J.L., PROKAI-TATRAI K., PROKAI L. Comparison of estrogen-derived ortho-quinone and para-quinol concerning

induction of oxidative stress. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **105**(1-5), 2007, 71–75.